

TEXTE

60/2026

Abschlussbericht

Entwicklung eines Herangehens zur Einbeziehung der Kombinationswirkung von Schadstoffen bei der Bewertung von kontaminierten Böden

Vorschläge zur Risikobewertung

von:

Jonas Fischer, Sara Coordes, Gregor Langemeier, Carlotta Marx, Nina Nentwig, Franziska Stoll,
Juliane Filser

Zentrum für Umweltforschung und nachhaltige Technologien (UFT), Universität Bremen

Herausgeber:

Umweltbundesamt

TEXTE 60/2026

REFOPLAN des Bundesministeriums Umwelt,
Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz

Forschungskennzahl 3720 73 201 0

Abschlussbericht

Entwicklung eines Herangehens zur Einbeziehung der Kombinationswirkung von Schadstoffen bei der Bewertung von kontaminierten Böden

Vorschläge zur Risikobewertung

von

Jonas Fischer, Sara Coordes, Gregor Langemeier, Carlotta
Marx, Nina Nentwig, Franziska Stoll, Juliane Filser
Zentrum für Umweltforschung und nachhaltige
Technologien (UFT), Universität Bremen

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Impressum

Herausgeber

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

Durchführung der Studie:

Zentrum für Umweltforschung und Nachhaltige Technologien UFT
Leobener Straße 6
28359 Bremen

Abschlussdatum:

April 2025

Redaktion:

Fachgebiet II 2.6 Maßnahmen des Bodenschutzes
Urs Dippon-Deißler; Tobias Frische

DOI:

<https://doi.org/10.60810/openumwelt-7889>

ISSN 1862-4804

Dessau-Roßlau, April 2026

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen*Autoren.

Kurzbeschreibung: Entwicklung eines Herangehens zur Einbeziehung der Kombinationswirkung von Schadstoffen bei der Bewertung von kontaminierten Böden

Böden sind Senken für eine Vielzahl unterschiedlicher Schadstoffe. Diese können direkt eingetragen werden, v.a. durch landwirtschaftliche Aktivitäten, oder indirekt über diffuse Einträge, z.B. durch atmosphärische Deposition, Winddrift oder die Verlagerung von Schadstoffen bei Hochwasserereignissen. Die Risikobewertung von Schadstoffen in Böden lässt gegenwärtig mögliche Interaktionen zwischen der Vielzahl an Substanzen in einem kontaminierten Boden außen vor. In der Forschung zu Mischungstoxizität wird zwischen synergistischen, additiven und antagonistischen Interaktionen unterschieden, bei denen sich Stoffe in ihrer Wirkung entweder verstärken, neutral zueinander aufsummieren oder gegenseitig schwächen.

Diese Studie konzentriert sich auf experimentelle Untersuchungen zur Ermittlung ökotoxikologischer Effekte in einem landwirtschaftlichen Nutzungsszenario. Betrachtet werden Stoffe, welche direkt und intendiert durch die Bewirtschaftung eingebracht werden sowie nicht intendierte diffuse Einträge. In einem breiten experimentellen Ansatz wurde das Potenzial für die unterschiedlichen Ausprägungen von Mischungstoxizität in Abhängigkeit von Testboden und Testspezies erfasst. Dafür wurde eine für eine Agrarlandschaft repräsentative Substanzmischung in drei unterschiedlichen Freilandböden (sandig, sandig-organisch und lehmig) an drei verschiedenen Testorganismen (Springschwänze, Enchyträen, mikrobielle Bodengemeinschaft) auf Mischungstoxische Interaktionen untersucht. Die Substanzmischung beinhaltet als Agrochemikalien das Fungizid Fluazinam und das Netzmittel Break-Thru® S 301, als ubiquitäre Schadstoffe den polyzyklischen Aromaten Fluoranthen und den Weichmacher DEHP. Es wurden Tests sowohl in effektiven (prognostizierte Effektstärke 50% = 1 Toxic Unit) als auch in umweltrelevanten Konzentrationen durchgeführt.

In den Einzelsubstanztests zeigte sich die höchste Toxizität bei Fluazinam > Fluoranthen > Break-Thru® S 301 > DEHP. Sowohl Bodenart als auch Testspezies hatten entscheidenden Einfluss auf die Resultate. Die Toxizität aller Substanzen war im sandigen Boden am höchsten, während die niedrigste Toxizität je nach Substanz und Organismus im sandig-organischen oder im lehmigen Boden gefunden wurde. In den Reproduktionstests mit Springschwänzen mit effektiven Konzentrationen von 1 Toxic Unit (unter Annahme von Konzentrationsadditivität) addierten sich die Wirkungen der gemischten Einzelsubstanzen in den beiden sandigen Böden, während sie sich im lehmigen Boden abschwächten. In den Reproduktionstests mit Enchyträen dagegen wurden in allen Böden antagonistische Wechselwirkungen der Substanzen beobachtet, und dies am stärksten im sandigen Boden. Bei beiden Organismen wurden die Testsubstanzen unter Einfluss der Mischungen mal verstärkt, mal abgeschwächt aufgenommen, wobei dieser Effekt auf die Gewebekonzentration sich zwischen dem lehmigen Boden und den beiden sandigen Böden sehr häufig gegensätzlich verhielt. In umweltrelevanten Konzentrationen konnten keine signifikanten Effekte auf Springschwänze und Enchyträen festgestellt werden, jedoch eine häufig beobachtete Effektstärke von 10-20%, welche deutlich über den unter Annahme von Additivität erwarteten Effekten lag. Ursache dafür kann ein Synergismus der Substanzmischung, aber auch experimentell bedingt sein. Zudem wurde mit Substanzmischungen in umweltrelevanten Konzentrationen die mikrobielle Bodenatmung in den sandigen Böden deutlich reduziert, was allerdings ausschließlich auf das für Mikroorganismen hochtoxische Fungizid Fluazinam zurückgeht.

Diese Studie konnte zeigen, dass die Ausprägung Mischungstoxischer Effekte sehr stark von den jeweiligen Testorganismen und -böden abhängt. Auch wenn dabei antagonistische Interaktionen in der Mehrzahl waren, wurden in einigen Tests additive Interaktionen, also die Aufsummierung der toxischen Effekte der Einzelsubstanzen zu einem größeren Gesamteffekt, beobachtet. Daher kann die Konzentrationsadditivität für die Risikobewertung von Substanzmischungen in Böden als Ausgangsmodell empfohlen werden. Mit Hinblick auf umweltrelevante Konzentrationen gilt es, die Forschung zu intensivieren, um mögliche Synergismen von umweltrelevanten Stoffmischungen in Böden systematisch zu identifizieren und statistisch abzusichern. Dabei sollte der Einbezug verschiedener Bodentypen und ubiquitärer Hintergrundkontaminanten unbedingt beibehalten und erweitert werden. **Um dem Vorsorgeprinzip für die Ressource Boden Rechnung zu tragen, wird für eine konservative Risikoabschätzung von Einzelsubstanzen empfohlen, einen zusätzlichen Sicherheitsfaktor zur Berücksichtigung möglicher Mischungstoxischer Effekte zu implementieren.**

Abstract: Development of an approach to implement combination effects of pollutants in the assessment of contaminated soils

Soils are a sink for a variety of different pollutants. These can be introduced directly, primarily through agricultural activities, or indirectly via atmospheric deposition or flooding events. Current risk assessment of pollutants in soils ignores possible interactions between the multitude of substances in a contaminated soil. Mixture toxicity effects can be synergistic, antagonistic or additive, i.e., the single substances support or weaken each other in their toxicity or just add up neutrally.

This study focusses on ecotoxicological mixture effects in an agricultural scenario. Substances were tested that enter the soil directly and intendedly through agricultural practice, or unintendedly, e.g. by atmospheric deposition. A broad experimental approach was used to determine the manifestation of mixture toxicity depending on the test soil and species. Therefore, a mixture of substances being representative for agricultural landscapes was analysed for mixture-toxicity interactions in three different field soils (sandy, sandy-organic and loamy) using three different test organisms (springtails, enchytraeids, soil microbial community). The substance mixture contains the fungicide fluazinam and the wetting agent Break-Thru® S 301 as agrochemicals and the polycyclic aromatic compound fluoranthene and the plastic softener DEHP as ubiquitous pollutants. Tests were carried out both in effective concentrations (predicted effect level 50% = 1 Toxic Unit) and in environmentally relevant concentrations.

In the single substance tests, the highest toxicity was found for fluazinam > fluoranthene > Break-Thru® S 301 > DEHP. The toxicity of all substances was highest in the sandy soil, while the lowest toxicities were found in the sandy-organic and loamy soil, depending on the test substances and organisms. The effective substance mixtures at a toxicity of 1 Toxic Unit (under the assumption of concentration addition) revealed an additive interaction for the reproduction of springtails in the sandy soils and an antagonistic interaction in the loamy soil. In the reproduction test with enchytraeids, on the other hand, antagonistic interactions of the substances were observed in all soils, most strongly in the sandy soil. For both organisms, the uptake of test substances was either reduced or increased under the influence of the mixtures, whereby the impact of the mixture on bioaccumulation fundamentally differed between the loamy soil and the two sandy soils. In environmentally relevant concentrations, no effects on springtails and enchytraeids were observed, but an often-occurring effect size of 10-20%, which was clearly above the expected effects and the assumption of concentration addition. This can be due to synergistic effects within the substance mixture, but also due to the experimental design.

Additionally, soil microbial respiration was significantly reduced by the substance mixture at environmental concentrations in the sandy soils, although this was exclusively due to the fungicide fluazinam, which is highly toxic to microorganisms.

This study showed that the severity of toxic effects of mixtures highly depends on the respective test organisms and soils. Even if antagonistic interactions were predominant, additive interactions, i.e. the summation of the toxic effects of the individual substances to a higher total effect, were observed in some tests. Therefore, concentration addition can be recommended as a default model for the risk assessment of substance mixtures in soils. With regard to environmentally relevant concentrations, extended research is recommended to identify possible synergisms in the soil environment systematically which are statistically robust. The consequent consideration of different soil types and ubiquitous background contaminants should be continued and extended. **To account for the precautionary principle with regard to soil as a highly valuable resource, it is recommended in terms of a conservative risk assessment for single substances to implement an additional safety factor to account for potential mixture toxicity effects**

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	11
Tabellenverzeichnis.....	12
Abkürzungsverzeichnis.....	14
Zusammenfassung.....	16
Summary.....	23
1 Einleitung & Hintergrund.....	29
2 Mischungstoxische Modelle.....	31
2.1 Konzepte und Modelle der Mischungstoxizität.....	31
2.2 Parameter und Indices der Mischungstoxizität.....	32
2.3 Erweiterungen zu Concentration Addition und Independent Action.....	33
2.4 Interaktionsmodelle.....	35
2.5 Boden- und sedimentspezifische Modelle.....	37
3 Fragestellung und Studiendesign.....	40
3.1 Zielsetzung und Fragestellung der Studie.....	40
3.2 Auswahlkriterien für die einzelnen Testparameter.....	40
3.2.1 Testsubstanzen.....	40
3.2.1.1 Fluoranthen.....	41
3.2.1.2 DEHP.....	42
3.2.1.3 Fluazinam.....	43
3.2.1.4 Break-Thru® S-301.....	44
3.2.2 Testorganismen.....	44
3.2.3 Testböden.....	46
3.3 Testkonzentrationen.....	47
3.3.1 Einzelsubstanzen.....	47
3.3.2 Umweltrelevante Substanzmischungen.....	49
4 Material und Methoden/experimentelle Umsetzung.....	50
4.1 Testböden und Beaufschlagung.....	50
4.2 Testorganismen und Kulturpflege.....	51
4.3 Ökotoxikologische Tests.....	51
4.3.1 Reproduktionstests mit Bodeninvertebraten.....	51
4.3.1.1 Collembolen <i>F. candida</i>	51
4.3.1.2 Enchyträen <i>E. crypticus</i>	51
4.3.2 Mikrobielle Bodengemeinschaft.....	52

4.4	Chemische Analytik.....	53
4.5	Statistik.....	54
5	Ergebnisse	55
5.1	Einzelsubstanzen.....	55
5.1.1	Collembolen.....	55
5.1.2	Enchyträen.....	63
5.1.3	Mikrobielle Bodengemeinschaft.....	70
5.2	Effektive Substanzmischungen	74
5.2.1	Collembolen.....	74
5.2.1.1	Reproduktion.....	74
5.2.1.2	Gewebekonzentration	78
5.2.2	Enchyträen.....	80
5.2.2.1	Reproduktion, Überlebensrate und Trockengewicht.....	80
5.2.2.2	Gewebekonzentration	82
5.3	Umweltrelevante Substanzmischungen (PEC).....	88
5.3.1	Collembolen.....	88
5.3.2	Enchyträen.....	91
5.3.3	Mikrobielle Bodengemeinschaft.....	93
6	Diskussion/Synopsis	96
6.1	Einzelsubstanzen.....	96
6.2	Effektive Substanzmischungen	98
6.3	Umweltrelevante Substanzmischungen	100
6.4	Fazit.....	101
7	Quellenverzeichnis	104
B	Anhang Einzelsubstanztests	116
B.1	Collembolentests	116
B.1.1	Fluoranthen.....	116
B.1.2	DEHP	120
B.1.3	Fluazinam.....	122
B.1.4	Break-Thru	124
B.2	Enchyträen	126
B.2.1	Fluoranthen.....	126
B.2.2	DEHP	130
B.2.3	Fluazinam.....	138

B.2.4	Break-Thru	146
B.3	Mikrobielle Bodengemeinschaft.....	149
B.3.1	Fluoranthen.....	149
B.3.2	DEHP	152
B.3.3	Break-Thru	155
C	Bodenanalytik.....	158

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	EC ₅₀ -Werte verschiedener Organismengruppen.....	46
Abbildung 2	Dosis-Wirkungskurven aller möglichen Testsubstanzen für die Reproduktion von <i>F. candida</i> in allen drei Testböden	56
Abbildung 3	Toxizität von Fluoranthen ggü. <i>F. candida</i> in sandigem Boden	57
Abbildung 4	Gewebekonzentration von Fluoranthen in <i>F. candida</i> in sandigem Boden	58
Abbildung 5	Gewebekonzentration von Fluoranthen in <i>F. candida</i> in allen Böden.....	59
Abbildung 6	Biokonzentration von Fluoranthen in <i>F. candida</i> in allen Böden	60
Abbildung 7	Toxizität von DEHP ggü. <i>F. candida</i> in lehmigem Boden	61
Abbildung 8	Toxizität von Fluazinam ggü. <i>F. candida</i> in sandig-organischem Boden.....	62
Abbildung 9	Dosis-Wirkungskurven aller Testsubstanzen für die Reproduktion von <i>E. crypticus</i> in allen drei Testböden.....	64
Abbildung 10	Toxizität von Fluoranthen ggü. <i>E. crypticus</i> in lehmigem Boden	66
Abbildung 11	Gewebekonzentration von Fluoranthen in <i>E. crypticus</i> in lehmigem Boden.....	67
Abbildung 12	Gewebekonzentration von Fluoranthen in <i>E. crypticus</i> in allen Böden.....	68
Abbildung 13	Biokonzentration von Fluoranthen in <i>E. crypticus</i> in allen Böden	69
Abbildung 14	Toxizität von Fluazinam ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in sandigem Boden	70
Abbildung 15	Toxizität von Fluazinam ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in sandig-organischem Boden	71
Abbildung 16	Toxizität von Fluazinam ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in lehmigem Boden	72
Abbildung 17	Toxizität von Fluazinam auf die mikrobielle Bodenatmung in allen Böden.....	73
Abbildung 18	Toxizität von effektiven Substanzmischungen ggü. <i>F. candida</i> in sandigem Boden	74
Abbildung 19	Toxizität von Substanzmischungen ggü. <i>F. candida</i> in sandig-organischem Boden.....	75
Abbildung 20	Toxizität von Substanzmischungen ggü. <i>F. candida</i> in lehmigem Boden.....	76
Abbildung 21	Gewebekonzentration von Fluoranthen aus Substanzmischungen in <i>F. candida</i> in allen Böden.....	78
Abbildung 22	Biokonzentration von Fluoranthen aus Substanzmischungen in <i>F. candida</i> in allen Böden	79

Abbildung 23	Toxizität von quaternären Substanzmischungen ggü. <i>E. crypticus</i> in allen Böden.....	80
Abbildung 24	Gewebekonzentration aller Substanzen aus Substanzmischungstests in <i>E. crypticus</i> in allen Böden.....	82
Abbildung 25	Gewebekonzentration aller Substanzen aus Substanzmischungstests in <i>E. crypticus</i> in allen Böden.....	83
Abbildung 26	Biokonzentration von Fluoranthen aus Einzelsubstanz- und Substanzmischungstests in <i>E. crypticus</i> in allen Böden.....	84
Abbildung 27	Biokonzentration von Fluazinam aus Einzelsubstanz- und Substanzmischungstests in <i>E. crypticus</i> in allen Böden.....	85
Abbildung 28	Biokonzentration von DEHP aus Einzelsubstanz- und Substanzmischungstests in <i>E. crypticus</i> in allen Böden.....	86
Abbildung 29	Toxizität einer umweltrelevanten Substanzmischung ggü. <i>F. candida</i> in allen Böden	88
Abbildung 30	Toxizität einer umweltrelevanten Substanzmischung ggü. <i>E. crypticus</i> in allen Böden.....	91
Abbildung 31	Toxizität einer umweltrelevanten Substanzmischung ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in allen Böden.....	93
Abbildung 32	Vergleich der Toxizität einer umweltrelevanten fluazinamhaltigen Substanzmischung mit Fluazinam als Einzelsubstanz ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in allen Böden.....	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Parameter und Indices der Mischungstoxizität.....	33
Tabelle 2	Parameter und Indices der Mischungstoxizität in Abhängigkeit von Interaktionen	36
Tabelle 3	Eigenschaften der Testböden	47
Tabelle 4	Zusammensetzung der effektiven Substanzmischungen für <i>F. candida</i> -Tests.....	48
Tabelle 5	Zusammensetzung der effektiven Substanzmischungen für <i>E. crypticus</i> -Tests	49
Tabelle 6	Zusammensetzung der umweltrelevanten Substanzmischungen für alle Tests	49
Tabelle 7	EC ₅₀ -Werte für alle Testsubstanzen ggü. <i>F. candida</i> in den drei Testböden	55
Tabelle 8	EC ₅₀ -Werte für alle Testsubstanzen ggü. <i>E. crypticus</i> in den drei Testböden	63
Tabelle 9	Summen der Toxic Units (Σ TU) und Model Deviation Ratios (MDR) zu allen effektiven Substanzmischungen mit <i>F. candida</i>	77

Tabelle 10	Summen der Toxic Units (Σ TU) und Model Deviation Ratios (MDR) zu allen effektiven Substanzmischungen mit <i>E. crypticus</i>81
Tabelle 11	Summen der Toxic Units (Σ TU) und Model Deviation Ratios (MDR) zu allen umweltrelevanten Substanzmischungen mit <i>F. candida</i>89
Tabelle 12	Summen der Toxic Units (Σ TU) und Model Deviation Ratios (MDR) zu allen umweltrelevanten Substanzmischungen mit <i>E. crypticus</i>92
Tabelle 13	Summen der Toxic Units (Σ TU) und Model Deviation Ratios (MDR) zu allen umweltrelevanten Substanzmischungen mit der mikrobiellen Bodengemeinschaft.....95
Tabelle 14	Übersicht zur tendenziellen Ausprägung Mischungstoxischer Effekte in allen Böden und Testorganismen.....103

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
AI	Additive Index
BBodSchG	Gesetz zum Schutz vor schädlichen Bodenveränderungen und zur Sanierung von Altlasten
BBodSchV	Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung
BLM	Biotic Ligand Model
CA	Concentration Addition
CBA	Component Based Approaches
CI	Combination Index
CrI	Crop Interception
DBP	Dibutylphthalat
DEHP	Bis(2-ethylhexyl)phthalat
DIN	Deutsches Institut für Normung
DnBP	Di-n-Butylphthalat
DT₅₀	Abbaugeschwindigkeit Halbwertszeit
EC₅₀	Effektkonzentration mit 50% Effekt
GCA	Generalised Concentration Addition
ggü.	gegenüber
HQ/RQ	Hazard Quotient/Risk Quotient
IA	Independent Action
KAK	Kationenaustauschkapazität
Log K_{ow}	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
MAF	Mixture Allocation Factor
MDR	Model Deviation Ratio
MeoA	Mechanism of Action
mg/kg	mg Schadstoff/kg Trockenboden
MoA	Mode of Action
msPAF	Multi-substance potentially affected fraction
MTI	Mixture Toxicity Index
NOEC	No Observed Effect Concentration
PAF	Potentially affected fraction
PAH	Polyaromatic Hydrocarbon

Abkürzung	Erläuterung
PAK	Polyaromatische Kohlenwasserstoffe
PEC	Predicted Environmental Concentration
ppm	Parts per million
REACH	Verordnung (EG) Nr. 1907/2006: R egistration, E valuation, A uthorisation and R estriction of C hemicals
RPF	Relative Potency Factor
RPI	Reference Point Index
SSD	Species sensitivity distribution
TEI	Toxicity Enhancement Index
TEQ	Toxicity Equivalent Quotient
TK-TD	Toxikokinetic/Toxikodynamik
TU	Toxic Unit
US EPA	United States Environmental Protection Agency
WHAM	Windermere Humic Acid Model
WHK_{max}	Maximale Wasserhaltekapazität
WMA	Whole Mixture Approaches

Zusammenfassung

Hintergrund

Böden gelten allgemein als Schadstoffsенке, da sie zum einen in der Lage sind, diese aufgrund ihrer hohen Aufnahmekapazität in großen Mengen zu adsorbieren, und da es zum anderen vielfache Eintragswege für Schadstoffe in den Boden gibt. Große Mengen an Agrochemikalien in Form von Pestiziden, Düngemitteln und Additiven wie Netzmitteln werden im Pflanzenbau direkt auf die Felder gegeben. Weiterhin werden über die Luft zahlreiche Stoffe auf indirektem Weg in Böden eingetragen, dazu zählen neben volatilen Stoffen v.a. Stoffe aus Verbrennungsprozessen. Feinste Partikel wie Feinstaub oder Nanoplastik können über den Luftweg weite Strecken transportiert werden. Auch bei auftretenden Überschwemmungsereignissen können Schadstoffe in Böden eingetragen werden, etwa aus Fließgewässern, Haushalten oder industriellen Betrieben.

In der deutschen Bodenschutzgesetzgebung (BBodSchG, BBodSchV) werden zur Ableitung von Vorsorge-, Prüf- und Maßnahmenwerten bisher nur Einzelsubstanzen berücksichtigt. Auch bei der Bewertung der Umweltwirkung von Chemikalien nach der EU-Verordnung REACH (Verordnung (EG) Nr. 1907/2006: Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) werden Einzelsubstanzen aktuell nur isoliert untersucht, allerdings gibt es gegenwärtig Diskussionen zur Anpassung des Bewertungsprozesses, sodass der Einfluss intendierter, aber auch nicht intendierter Stoffmischungen in der Umwelt berücksichtigt wird, z.B. mithilfe eines Mixture Allocation Factors (MAF). Da in der Umwelt nahezu immer eine Vielzahl an Schadstoffen parallel vorliegt, erfordert eine freilandnahe Abschätzung der Umweltwirkung dieser Schadstoffe die Berücksichtigung potenzieller Co-Kontaminanten. In der Human- und Ökotoxikologie existieren daher eine Vielzahl an Modellen zur Abschätzung von Mischungstoxizität. Im weitverbreiteten Concentration Addition (CA-)Modell wird eine Additivität für die Toxizität der jeweiligen Einzelsubstanzen angenommen, also dass deren Wirkungen sich aufsummieren. Für den Fall, dass Effekte stärker oder schwächer ausfallen als durch angenommene Additivität prognostiziert, wird ein Synergismus bzw. Antagonismus zwischen den Einzelsubstanzen angenommen. Da Synergismen gerade bei Stoffmischungen mit vielen Substanzen eher selten sind und die Aufsummierung zu stärkeren Effekten führt als die parallele Wirkung von Stoffen wie bei der Independent Action (IA), wird die CA als eher konservatives Modell angesehen.

Studienaufbau und Methodik

In der Bodenökotoxikologie liegen bis jetzt nur relativ wenige Daten zum Mischungstoxischen Verhalten von Schadstoffen vor. Da diese jedoch große Relevanz für den Umwelt- und Bodenschutz und die dazugehörige Gesetzgebung haben, soll die vorliegende Studie einen umfassenden Eindruck über mögliche Ausprägungen von Mischungstoxizität in Böden geben. Um die biologische und chemisch-physikalische Vielfalt von Böden möglichst breit abzubilden, wurden dafür drei unterschiedliche Testböden (sandig, sandig-organisch und lehmig) sowie drei verschiedene Modellorganismen untersucht (Bodeninvertebraten: Springschwanz *Folsomia candida* und Kleinringelwurm *Enchytraeus crypticus* sowie die mikrobielle Bodengemeinschaft). Für alle Organismen wurden in allen Böden chronische Endpunkte nach 28 Tagen Exposition untersucht (Invertebraten: Reproduktion, Überlebensrate, Trockengewicht; Mikrobielle Bodengemeinschaft: substratinduzierte Bodenatmung, Nitratgehalt). Zudem wurde für die Bodeninvertebraten, wenn möglich, die Gewebekonzentration der Testsubstanzen ermittelt und auf die jeweilige Bodenkonzentration bezogen (Biokonzentrationsfaktor).

Die Testsubstanzen für die Stoffmischung wurden so ausgewählt, dass sie repräsentativ für ein landwirtschaftliches Nutzungsszenario sind. Je zwei typische ubiquitäre Schadstoffe wurden als

Repräsentanten für nicht intendierte Einträge, z.B. atmosphärische Deposition, verwendet und zwei Agrochemikalien, die direkt und intendiert durch die Bewirtschaftung eingebracht werden. Als ubiquitäre Schadstoffe wurden der polyaromatische Kohlenwasserstoff (PAK) Fluoranthen und der Weichmacher Bis(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) ausgewählt. PAK entstehen v.a. bei Verbrennungsprozessen und können über atmosphärische Deposition in den Boden eingetragen werden, was zu einer messbaren Anreicherung über die Zeit führt. Phthalate sind Plastikweichmacher, die in großen Mengen bei der Kunststoffproduktion eingesetzt werden und sich ebenfalls über die Atmosphäre ubiquitär verbreiten, teilweise auch durch partikulären Abrieb als Träger. Zudem kann das in der Landwirtschaft häufig praktizierte Plastikmulchen für einen zusätzlichen Eintrag von Phthalaten, v.a. DEHP, in den Boden sorgen, sodass dieser Stoff im Grunde sogar beide hier berücksichtigten Eintragswege abdeckt. Als Agrochemikalien wurden das Fungizid Fluazinam und das Netzmittel Break-Thru® S 301 (Break-Thru) gewählt. Fluazinam wird u.a. im Kartoffel- und Apfelanbau verwendet, während Netzmittel wie Break-Thru grundsätzlich in allen Pestizidlösungen zur Herabsetzung der Oberflächenspannung und folglich einer besseren Benetzung der Blattoberflächen verwendet werden.

Sämtliche Substanzen wurden einzeln sowie in binären, ternären und quaternären Mischungen getestet. Dabei wurden zum einen Konzentrationsbereiche in der Höhe von 1 Toxic Unit mit einer prognostizierten Effektstärke von 50% gewählt, zum anderen umweltrelevante Konzentrationen.

Ziel und Fragestellung

Der beschriebene Studienaufbau soll die folgenden Forschungsfragen hinsichtlich der Mischungstoxischen Wirkung im Boden beantworten:

1. In welchem Boden weisen die Testsubstanzen die höchste Toxizität auf, und welchen Einfluss haben die Bodeneigenschaften Ton und organischer Gehalt auf die Ausprägung der Mischungstoxizität?
2. Welche Testorganismen sind gegenüber den Testsubstanzen am sensitivsten, und wie unterscheidet sich die Ausprägung von Mischungstoxizität zwischen den Testorganismen?
3. Welche Mischungstoxische Ausprägung, also Antagonismus, Additivität oder Synergismus, ist am häufigsten zu beobachten? Lässt sich mit dem CA-Modell ein Großteil der beobachteten Ausprägungen abdecken? Lassen sich zudem Mischungstoxische Effekte über die jeweilige Gewebekonzentrationen der Schadstoffe erklären?
4. Ist die erstellte Substanzmischung in der Lage, auch in umweltrelevanten Konzentrationen signifikante toxische Effekte zu erzeugen und, wenn ja, lassen sich diese auf Mischungstoxische Interaktionen zurückführen?
5. Welche Empfehlungen lassen sich für die ökotoxikologische Risikoabschätzung von Stoffgemischen und deren Mischungstoxischen Effekten im regulatorischen Kontext aus den Ergebnissen ableiten?

Ergebnisse

In den chronischen Expositionstests ergab sich für alle Testorganismen ein eindeutig sensitivster Endpunkt, und zwar für beide Bodeninvertebraten die Reproduktion und für die mikrobielle Bodengemeinschaft die Bodenatmung oder Kohlenstofftransformation.

Die **Toxizitäten der Einzelsubstanzen** hingen stark vom Testboden ab, während die Sensitivität der Testorganismen je nach Substanz unterschiedlich war. So war der sandige Boden in den Tests mit Bodeninvertebraten durchweg derjenige, der für alle Substanz-Organismen-Kombinationen die höchste Toxizität ergab. Im Bodenatmungstest wurde für Fluazinam, die einzige toxische Substanz in diesem Testsystem, im sandig-organischen Boden

ein leicht höherer EC₅₀-Wert ermittelt als im sandigen Boden (1,4 ± 0,2 vs. 2,1 ± 0,5 mg/kg Trockenboden), wobei der Unterschied zwischen beiden nicht statistisch signifikant war. In den Reproduktionstests mit Springschwänzen war der sandig-organische Boden stets derjenige, in dem die Toxizität am niedrigsten ausfiel, während in den Reproduktionstests mit Enchyträen dies der lehmige Boden war. In letzterem war auch die toxische Wirkung auf die mikrobielle Bodenatmung deutlich geringer, sodass dort kein EC₅₀-Wert berechnet werden konnte. Somit war unter Einbezug aller Testorganismen die Toxizität der Einzelsubstanzen im sandigen Boden tendenziell am höchsten, gefolgt vom sandig-organischen und vom lehmigen Boden.

Springschwänze waren gegenüber den Substanzen Fluoranthen und Fluazinam, die für beide Bodeninvertebraten toxisch waren, in allen Böden sensitiver als Enchyträen. Zwar war die mikrobielle Bodenatmung nur gegenüber einer einzigen Substanz sensitiv, nämlich Fluazinam; diese resultierte jedoch, wie bereits erwähnt, in den insgesamt niedrigsten ermittelten EC₅₀-Werten im Bereich von 1-2 mg/kg.

Auch unter den Einzelsubstanzen zeigte sich ein klares Muster in der Toxizität. Fluazinam war als einzige Substanz gegenüber allen Organismen toxisch und dies jeweils auch am stärksten. Fluoranthen war für die Bodeninvertebraten die zweittoxischste Substanz, aber immer etwa um den Faktor 3 bis 7 weniger toxisch. Break-Thru konnte aufgrund einer starken Beeinflussung des Testsystems durch die Substanzeigenschaften nicht für Springschwänze getestet werden, für Enchyträen konnten jedoch Effekte für < 1.000 mg/kg im sandigen Boden festgestellt werden. Für DEHP dagegen wurden für keinen Testorganismus irgendwelche Effekte unterhalb dieser Testkonzentration beobachtet. Somit folgt die Toxizität der Einzelsubstanzen der Reihenfolge Fluazinam > Fluoranthen > Break-Thru > DEHP.

Die Toxizität der Substanzen und die Sensitivität der Organismen korrelierte nicht zwangsläufig mit deren Gewebe- und Biokonzentration. So war für Springschwänze die Gewebekonzentration nur für Fluoranthen nachweisbar (was allerdings auch mit deren geringen Biomasse und unterschiedlichen Nachweisgrenzen zu tun hat), während für Enchyträen die Gewebekonzentration aller Stoffe insgesamt deutlich höher war und dadurch sowohl Fluoranthen als auch DEHP und Fluazinam nachgewiesen werden konnten. Die Biokonzentration von Fluoranthen war für Enchyträen am höchsten, gefolgt von Fluazinam und DEHP, was darauf hindeutet, dass die hohe Toxizität von Fluazinam auch bei geringerer Aufnahme zu stärkeren Effekten als Fluoranthen führt. Innerhalb einer Art wiederum korrelierte die Toxizität der Substanzen relativ gut mit der Biokonzentration in den jeweiligen Böden, d.h. in Böden mit einer höheren Biokonzentration war auch die Toxizität meist höher.

In den **mischungstoxischen Versuchen mit effektiven Testkonzentrationen** wurden aufgrund der unterschiedlichen Toxizität der Stoffe bzw. Kompatibilität mit den jeweiligen Testsystemen für die jeweiligen Testorganismen verschiedene Testregime entwickelt. So konnte für die mikrobielle Bodengemeinschaft aufgrund der Tatsache, dass mit Fluazinam nur eine Substanz mit toxischer Wirkung zur Verfügung stand, keine Stoffmischung im effektiven Konzentrationsbereich erstellt werden.

Für Springschwänze wurde Break-Thru aufgrund der Inkompatibilität mit der Aufschwemmungsmethode für diesen experimentellen Teil ausgeschlossen. Mit den verbliebenen Stoffen wurden alle Kombinationen an binären und ternären Stoffmischungen untersucht sowie die toxischen Einzelsubstanzen als Referenz mitgetestet. Alle Stoffmischungen enthielten 1 Toxic Unit (TU) mit einem Zielwert von 50% Effekt, was besagt, dass unter Annahme der kompletten Additivität der Toxizitäten aller Einzelstoffe ein Effekt von 50% verursacht wird; bei gleichem Beitrag zur Gesamttoxizität würde demnach von zwei Stoffen jeweils die halbe Konzentration ihres EC₅₀-Werts appliziert. In diesem Testregime trugen nur Fluoranthen und Fluazinam zur

Toxizität bei, DEHP wiederum wurde aufgrund der fehlenden Toxizität als „passive agent“, also ohne Beitrag zur Toxizität in einer vergleichbaren Konzentration der anderen Stoffe appliziert. In den Reproduktionstests verursachten im sandigen und sandig-organischen Boden alle Behandlungen ungefähr 50% Effekt, sodass in diesen Böden Additivität der toxischen Substanzen angenommen werden kann und dass DEHP diese Additivität nicht beeinflusst. Im lehmigen Boden dagegen war in allen Stoffkombinationen der Effekt deutlich geringer als 50%. Demnach interagieren in diesem Boden zum einen die beiden toxischen Stoffe antagonistisch miteinander, während zum anderen DEHP alleine durch seine Präsenz in der Lage ist, die Toxizität der anderen Stoffe signifikant herabzusetzen. Zusammenfassend liegt somit ein deutlicher Kontrast in der Ausprägung der Mischungstoxizität zwischen den beiden sandigen und dem lehmigen Boden vor.

Die Biokonzentration von Fluoranthen in den Springschwänzen nahm im sandigen Boden vom Wert 1 in den Einzelsubstanztests auf 3 bis 10 in den Mischungen zu. Im sandig-organischen Boden dagegen blieb der Wert in allen Behandlungen konstant bei 0,1, im lehmigen Boden fiel er von ungefähr 1 in allen anderen Behandlungen auf etwa 0,2 (nur in der ternären Mischung). Demnach zeigt sich v.a. im sandigen Boden, dass Co-Kontaminanten in der Lage sind, die Biokonzentration von Fluoranthen in Springschwänzen spürbar zu beeinflussen.

In den Enchyträentests konnten alle vier Substanzen verwendet werden, sodass hier zwei quaternäre Mischungen mit der Toxizität von 1 bzw. 2 TU getestet wurden. Es konnten erst bei 2 TU signifikante Unterschiede zur Kontrolle festgestellt werden, während die Effektstärke bei 1 TU in allen Böden deutlich unter 50% lag, und das am meisten im sandigen Boden. Demnach wirkte in allen drei Böden die Substanzmischung unter Annahme von Konzentrationsadditivität antagonistisch.

Die Gewebekonzentration der Stoffe war in Enchyträen deutlich höher als in Springschwänzen, sodass alle Stoffe außer Break-Thru in der chemischen Analytik nachgewiesen werden konnten. Die absoluten Werte der Gewebekonzentration waren tendenziell in der Reihenfolge Fluoranthen > DEHP > Fluazinam am größten, aber auch in Relation zur Bodenkonzentration ließen sich Biokonzentrationswerte in der gleichen Reihenfolge anordnen. Analog zu Springschwänzen waren die Biokonzentrationsfaktoren im sandig-organischen Boden am geringsten, allerdings lagen die Werte im Bodenvergleich generell relativ nahe beieinander. Die Änderungen der Biokonzentrationsfaktoren der Testsubstanzen durch die Applikation in der Modellmischung zeigte im Vergleich zu den Einzelsubstanztests teils auffällige Veränderungen nach einem regelmäßigen Muster: so verhielten sich die Substanzen in diesem Zusammenhang im sandigen und dem sandig-organischen Boden immer relativ ähnlich, während im lehmigen Boden ein grundlegend anderes Muster zu erkennen war. So war die Biokonzentration von Fluoranthen und DEHP im sandigen und sandig-organischen Boden in den Mischungstests nicht grundsätzlich anders als in den Einzelsubstanztests, während im lehmigen Boden in Mischungstests die Biokonzentration von Fluoranthen ab- und die von DEHP zunahm. Die Biokonzentration von Fluazinam wiederum nahm in den Mischungstests in beiden sandigen Böden eher ab oder blieb gleich, während sie im lehmigen Boden zunahm.

Zusätzlich zu den effektiven Konzentrationen wurden für alle Organismen Tests mit **umweltrelevanten Konzentrationen** durchgeführt. Diese umfassten drei Mischungen: eine mit den jeweils ermittelten erwarteten Umweltkonzentrationen PEC (Predicted Environmental Concentration), welche für die ubiquitären Schadstoffe Fluoranthen und DEHP 0,1 mg/kg und für die landwirtschaftlichen Stoffe 0,4 mg/kg betragen. Zudem wurden mit PEC_{niedrig} und PEC_{hoch} zwei Mischungen mit um den Faktor 4-5 niedrigeren bzw. höheren Konzentrationen im Vergleich zu den PEC getestet, um einen weiten Konzentrationsbereich abdecken zu können.

Für Springschwänze und Enchyträen wurden in allen drei Mischungen keine Effekte > 25% gefunden und auch nie mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Allerdings war konstant in nahezu allen Testböden und Konzentrationen die Reproduktion um 10-20% reduziert. Dies ergab unter Auswertung der Toxic Units, dass die beobachteten Effekte die unter Annahme von Additivität erwarteten Effekte um ein Vielfaches überstiegen, und das in den beiden stärker adsorbierenden Böden mehr als im sandigen Boden. Aufgrund der niedrigen Konzentrationen konnte in keinem der Invertebraten eine Gewebekonzentration der Stoffe nachgewiesen werden.

Die mikrobielle Bodenatmung wurde in den Konzentrationen PEC und PEC_{hoch} in allen Böden signifikant reduziert, und zwar am stärksten im sandig-organischen Boden um bis zu 65%. Dies lässt sich auf die hohe Toxizität von Fluazinam zurückführen, da die beobachtete Effektstärke in den PEC-Konzentrationen sich mit derjenigen aus den Einzelsubstanztests mit Fluazinam deckt, welche zudem auch dort im sandig-organischen Boden am höchsten war. Vergleichstests mit einer Substanzmischung ohne Fluazinam zeigten, dass die anderen Testsubstanzen keinen Einfluss auf die mikrobielle Bodenatmung hatten.

Diskussion und Synthese

Die Ergebnisse zeigen eine Vielzahl an Mustern in Bezug auf die Auswirkung von Boden und Testorganismus auf die Toxizität sowohl von Einzelsubstanzen als auch von Mischungen auf. In den meisten Fällen sind toxische Effekte am stärksten im sandigen Boden, was sich auf seine geringe Adsorptionsfähigkeit zurückführen lässt. In den stärker adsorbierenden Böden sind die Effekte ggü. Springschwänzen im sandig-organischen Boden am schwächsten, ggü. Enchyträen im lehmigen Boden. Dies lässt sich mit dem bei Springschwänzen überwiegenden Aufnahmepfad von Schadstoffen über das Porenwasser erklären, da der größere Teil organischer Schadstoffe an die organische Fraktion im sandig-organischen Boden gebunden ist und somit eine stärkere Dissoziation ins Porenwasser unterbindet. Bei Enchyträen findet die Aufnahme überwiegend über die Haut und den im Darmtrakt verdauten Anteil der organischen Bodenfraktion statt, sodass hier Schadstoffe auf andere Art und Weise verfügbar gemacht werden. An Ton gebundene Schadstoffe sind aufgrund seiner stark vergrößerten Oberfläche schwerer verfügbar als an Organik gebundene. Für Mikroorganismen war wiederum Fluazinam im sandig-organischen Boden am toxischsten und im lehmigen Boden am wenigsten toxisch. Dies kann über die stärkere Bindung von Fluazinam an organischem Material und der dort sehr hohen Konzentration von Mikroorganismen im Vergleich zu ihrem Anteil an der Bodenmasse erklärt werden: Fluazinam wird demnach dort stark gebunden, wo ein großer Teil der mikrobiellen Biomasse sitzt und kann direkt dort wirken. Die besonders toxische Wirkung von Fluazinam auf die mikrobielle Bodengemeinschaft stellt eine Ausnahme in der Sensitivität der Testorganismen in diesem Projekt dar, ohne diese gilt generell folgende Reihenfolge in der Sensitivität: *F. candida* > *E. crypticus* > mikrobielle Bodengemeinschaft.

Testböden und Organismen haben zudem einen starken Einfluss auf die Ausprägung der Mischungstoxizität. Bei Springschwänzen wurden in sandigen und sandig-organischen Böden additive Effekte in allen Mischungskombinationen festgestellt, während diese im lehmigen Boden antagonistisch waren. Dies lässt sich u.a. durch die starke Bindung von DEHP an Tonminerale und mögliche π - π -Interaktionen zwischen den Testsubstanzen erklären, die für eine starke Retention der toxischen Substanzen Fluoranthren und Fluazinam im Boden verantwortlich sein könnten. Zudem scheinen diese Interaktionen die Aufnahme von Fluoranthren in Springschwänze zu fördern, dies wiederum jedoch nur im sandigen Boden: hier könnte die hohe Fettlöslichkeit von DEHP die Aufnahme der anderen organischen (und damit fettlöslichen) Stoffe begünstigen. Diese Beobachtung unterstreicht zudem, dass auch untoxische Stoffe wie DEHP einen nennenswerten Einfluss auf die Ausprägung von Mischungstoxizität

haben können und daher ebenfalls in Mischungstoxischen Experimenten berücksichtigt werden sollten. Bei Enchyträen zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden sandigen und dem lehmigen Boden in Bezug auf die Biokonzentration aller nachweisbaren Testsubstanzen. Allerdings lassen sich diese schwerer in Zusammenhang mit den beobachteten Mischungstoxischen Effekten bringen, da der in allen Böden beobachtete Antagonismus am stärksten im sandigen und am geringsten im sandig-organischen Boden ausgeprägt war. Die Aufnahme der Testsubstanzen durch Enchyträen spielt eine zentrale Rolle für die Ausprägung von Mischungstoxizität: sowohl die Desorption von der Bodenmatrix als auch die Metabolisierung im Verdauungstrakt sind entscheidend für die Bioverfügbarkeit, welche unter dem Einfluss der Konkurrenz der Schadstoffe um Bindungsstellen in der Bodenmatrix und im Organismengewebe steht.

Die in den umweltrelevanten Konzentrationen beobachteten Effekte auf die Reproduktion der Bodeninvertebraten waren zwar nicht signifikant, in ihrer Regelmäßigkeit und Stärke jedoch überraschend. Insbesondere in den stark adsorbierenden Böden, dem sandig-organischen und dem lehmigen, waren die Einzelsubstanzen am wenigsten toxisch und demnach deren EC_{50} -Werte um ein Vielfaches größer als die jeweiligen PEC-Konzentrationen, was sich anhand der äußerst geringen TU bzw. den hohen Modellabweichungen (Model Deviation Ratios, MDR) nachvollziehen lässt. Überraschenderweise sind ausgerechnet im sandigen Boden, wo die Substanzen am toxischsten waren, die Distanz zwischen PEC und EC_{50} also am geringsten war, häufig die beobachteten Effekte und damit auch die MDR am geringsten. Demnach würde man gerade in den stark adsorbierenden Böden keine Effekte durch das Substanzgemisch im Bereich der PEC erwarten. Daher können starke Synergismen, die für diese unerwartet hohen Effekte notwendig sind, nicht ausgeschlossen werden. Dies steht nicht im Widerspruch zu den in den effektiven Substanzmischungen beobachteten antagonistischen und additiven Effekten, da die Ausprägung von Mischungstoxizität sowohl von der Höhe als auch dem Verhältnis der Einzeldosen zueinander abhängig ist. Allerdings kann es aufgrund der geringen erwarteten Effekte schon bei kleinen beobachteten Effekten zu deutlichen Abweichungen führen, insbesondere, da die zugrunde liegenden Dosis-Wirkungskurven v.a. effektive Konzentrationsbereiche abdecken und damit in niedrigen Konzentrationsbereichen größere Unsicherheiten haben. Daher müssen zur Bestätigung möglicher synergistische Effekte in Böden Substanzmischungen in für Niedrigkonzentrationen präzisierten Experimenten vertieft untersucht werden.

Für die mikrobielle Bodenatmung wurden in allen drei Böden signifikante Effekte in den Mischungen PEC und PEC_{hoch} beobachtet, maßgeblich herbeigeführt durch die hohe Toxizität von Fluazinam: die beobachteten Effekte lagen im Bereich der Einzelsubstanztests mit Fluazinam, im Gegenzug konnte eine ternäre Mischung ohne Fluazinam keine Effekte erzielen. Dies unterstreicht, dass in einer Mischung die Gesamtoxizität einer einzelnen toxischen Substanz die der gesamten Mischung dominieren kann. Dies ist insbesondere mit Hinblick auf die hohe Toxizität von Pestiziden relevant, zumal sich über die Nahrungskette Effekte massiv verstärken können (sowohl Collembolen als auch Enchyträen fressen Pilze!). Es kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass Co-Kontaminanten in umweltrelevanten Konzentrationen die Gesamtoxizität beeinflussen, auch wenn es in diesem Testsystem nicht der Fall war.

Fazit

Die vorliegende Studie zeigt, dass die Ausprägung von Mischungstoxizität sehr stark von der Interaktion mit dem jeweiligen Testboden und -organismus abhängt. Dabei kam es in den effektiven Substanzmischungen häufig zu antagonistischen Effekten, aber auch regelmäßig zu additiven. Zudem zeigte sich, dass neben der Toxizität auch die Gewebekonzentration der

Schadstoffe stark von den bereits genannten Faktoren beeinträchtigt war. Die veränderte Aufnahme in Mischungen konnte zum Teil die beobachtete Mischungstoxizität erklären.

Die auf Basis der CA angenommene Additivität gilt in Wissenschaft und Regulatorik als konservatives oder Basismodell, v.a. aufgrund von Daten aus der aquatischen Ökotoxikologie, vergleichbare Daten aus der Bodenökotoxikologie gewinnen jedoch an Bedeutung. In der vorliegenden Studie sollte in einem umfassenden Ansatz, der mit drei Testböden und drei Testorganismen ein möglichst repräsentatives Bild vom komplexen und vielfältigen Ökosystem Boden wiedergibt, die Tendenz zur Ausprägung von Mischungstoxizität im Boden erfasst werden. Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Sinne des Vorsorgeprinzips die CA als geeignetes Modell auch in der Bodenumgebung genutzt werden sollte, da dieses Modell in der Lage ist, einen großen Teil der hier getesteten Szenarien abzudecken, insbesondere in den effektiven Substanzmischungen. Die im Vergleich zu den erwarteten Werten deutlich höheren beobachteten Effekte in den umweltrelevanten Testkonzentrationen dagegen könnten ein Hinweis für synergistische Interaktionen sein, sind in Anbetracht des experimentellen Aufbaus jedoch für eine eindeutige Aussage mit zu vielen Unsicherheiten belegt. Um die tatsächliche Ursache für die beobachteten Effekte zu ergründen und mögliche negative Umweltwirkungen niedrig konzentrierter Mischungen zu überprüfen, bedarf es eines noch spezifischer auf Umweltkonzentrationen angepassten Testaufbaus.

Die vorliegende Studie konnte einige grundlegende Mechanismen zur Entwicklung von Mischungstoxizität herausarbeiten, so etwa das grundlegend andere Verhalten von Mischungen in sandigem und lehmigem Boden. Es gilt nun, in Zukunft eine größere Zahl dieser Mechanismen aufzufindig zu machen und für eine möglichst große Bandbreite von Mischungen, insbesondere umweltrelevanten, zu verallgemeinern und gültig zu machen. Aufgrund der hohen Komplexität und Diversität von Böden ist eine prospektive Risikoabschätzung von Mischungen in Böden nur über ein grundlegendes Verständnis vom Verhalten dieser Mischungen in Böden unter dem Einfluss unterschiedlicher Bodeneigenschaften und Aufnahmemechanismen von Bodenorganismen darstellbar. Insbesondere indirekten Effekten sollte größere Aufmerksamkeit gewidmet werden. In Anbetracht des hohen experimentellen Aufwands für bodenökotoxikologische Experimente empfehlen wir für Mischungstoxische Studien die Verwendung einiger weniger Modellböden (2-5), um einerseits den Aufwand im Rahmen zu halten und andererseits eine breitere Abdeckung der Umweltbedingungen zu erzielen, unter denen Mischungstoxizität stattfinden kann. Zudem sollten gezielt und systematisch weitere umweltrealistische Stoffmischungen, die v.a. für Agrarlandschaften repräsentativ sind, in niedrigen Bodenkonzentrationen in dafür ausgelegten Testsystemen untersucht werden, um diese auf tatsächliche synergistische Aktionen hin zu überprüfen – der Miteinbezug von ubiquitären Hintergrundkontaminanten wird dabei ausdrücklich empfohlen. Die hier gezeigten Ergebnisse unterstreichen die Eignung der Konzentrationsadditivität als Ausgangsmodell auch für die Bodenökotoxikologie. **Um die bisher immer noch großen Unsicherheiten zur Mischungstoxizität in Böden zusätzlich regulatorisch abzusichern, sollte die Ermittlung und Implementierung eines geeigneten Sicherheitsfaktors für Mischungstoxizität in der Risikobewertung von Einzelstoffen angestrebt werden, bis ein umfassenderes Verständnis für deren Ausprägung in Böden gewonnen wurde.**

Summary

Background

Soils are generally seen as a sink for pollutants, as they are able to adsorb them in large quantities due to their high absorption capacity and there are also multiple pathways for pollutants to enter the soil. Firstly, large quantities of agrochemicals in the form of pesticides, fertilizers and additives such as wetting agents are applied directly to the fields during crop cultivation. Furthermore, numerous substances can also enter the soil indirectly via the air, including volatile substances and especially substances from combustion processes. Also, very small particles such as fine dust or nanoplastics can be transported long distances via the air.

In German soil protection legislation (BBodSchG, BBodSchV), only individual substances have so far been considered when deriving preventive, provision and test values. Also, in the environmental impact assessment of chemicals in framework of the EU regulation REACH (regulation (EG) Nr. 1907/2006: Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) single substances are currently tested individually, although there are ongoing discussions about adapting the assessment process so that the impact of intended, but also unintended mixtures of substances in the environment are reflected, e.g. by using a Mixture Allocation Factor (MAF). Since a large number of pollutants are nearly always present in the environment in parallel, a field-based assessment of the environmental impact of these pollutants requires the consideration of potential co-contaminants. In human and ecotoxicology, there are a large number of models for estimating mixture toxicity. In the widely used Concentration Addition (CA) model, the toxicity of the single substances is assumed to be additive, i.e. their toxic effects simply can be added up. When effects are stronger or weaker than predicted by the assumed additivity, synergism or antagonism between the individual substances are assumed. As synergisms are rather rare, especially in substance mixtures with many substances, the CA is regarded as a rather conservative default model.

Study structure and methodology

In the field of soil ecotoxicology, comparably little data are currently available on the toxic behaviour of pollutants in mixtures. However, as this is of great relevance for environmental and soil protection and the associated legislation, the present study aims to investigate the impacting factors on the manifestation of mixture toxicity in soils. In order to represent the biological and - physico-chemical diversity of soils as comprehensive as possible, three different test soils (sandy, sandy-organic and loamy) and three different model organisms (soil invertebrates: springtail *Folsomia candida* and white worm *Enchytraeus crypticus*; the soil microbial community) were investigated. Chronic endpoints were analysed for all organisms in all soils after 28 days of exposure (invertebrates: Reproduction, survival rate, dry weight; Soil microbial community: substrate-induced soil respiration, nitrate content). In addition, the tissue concentration of the test substances was determined for the soil invertebrates, where possible, and related to the respective soil concentration (bioconcentration factor).

The test substances were selected for being representative of a field-realistic chemical pollution in an agricultural landscape. Two typical ubiquitous pollutants as representatives for unintended input, e.g. by atmospheric deposition, and two agrochemicals, that are directly and intendedly applied in agriculture, were selected. The polyaromatic hydrocarbon (PAH) fluoranthene and the softener bis(2-ethylhexyl phthalate (DEHP) were selected as ubiquitous pollutants. PAHs are mainly formed during combustion processes and can be introduced into the soil via atmospheric deposition, which leads to a measurable accumulation over time. Phthalates are plastic softeners that are used in large quantities in plastic production and also spread ubiquitously via the atmosphere, partly also through abraded particles as a carrier; in addition,

the plastic mulching frequently practiced in agriculture can cause an additional input of phthalates, especially DEHP, into the soil, so that basically this substance covers even both input pathways considered here. The fungicide fluazinam and the wetting agent Break-Thru® S 301 (Break-Thru) were used as agrochemicals. Fluazinam is used in potato and apple cultivation, while wetting agents such as Break-Thru are used in pesticide solutions to reduce the surface tension and thus improve wetting of the leaf surfaces.

All substances were tested alone and in binary, ternary and quaternary mixtures. The concentrations tested in these mixtures were either effective concentrations of 1 Toxic Unit or environmentally relevant ones.

Study aim and research questions

The study design is intended to answer the following research questions on mixture toxicity effects in soils:

1. In which soil do the test substances show the highest toxicity and what influence do the soil properties clay and organic content have on the expression of mixture toxicity?
2. Which test organisms are most sensitive to the test substances and how does the expression of mixture toxicity differ between the test organisms?
3. Which manifestation of mixture toxicity, i.e. antagonism, additivity or synergism, is the most common one? Can the CA model cover the majority of the observed manifestations? Can mixture toxicity effects be explained by the respective tissue concentrations of the pollutants?
4. Is the prepared substance mixture capable of producing significant toxic effects even at environmentally relevant concentrations and, if so, can these be attributed to interactions in the mixture?
5. What recommendations can be derived for the ecotoxicological risk assessment of substance mixtures and their mixture toxicity effects in the regulatory context from the result?

Results

In the chronic exposure tests, one clearly most sensitive endpoint was found for all test organisms, namely reproduction for both soil invertebrates and soil respiration, i.e. carbon transformation, for the soil microbial community.

The individual substance tests showed a clear pattern of toxicity depending on the test soil, while there was no clear sensitivity among the test organisms. For example, in the soil invertebrate tests, the sandy soil was consistently the one that caused the highest toxicity for all substance-organism combinations. In the soil respiration test, a slightly higher EC₅₀ value was determined for fluazinam, the only toxic substance in this test system, in the sandy-organic soil than in the sandy soil (1.4 ± 0.2 vs. 2.1 ± 0.5 mg/kg dry soil), although the difference between the two was not statistically significant. In the reproduction tests with springtails, the sandy-organic soil was always the one with the lowest toxicity, while in the reproduction tests with enchytraeids it was the loamy soil. In the latter, the toxic effect on microbial soil respiration was also significantly lower, so that no EC₅₀ value could be calculated there. The toxicity of the individual substances thus tended to be highest in the sandy soil, followed by the sandy-organic soil and the loamy soil.

Springtails were more sensitive to the substances fluoranthene and fluazinam, which were toxic to both soil invertebrates, than enchytraeids in all soils. Microbial soil respiration was only sensitive to fluazinam; however, this resulted in the overall lowest EC₅₀ values determined in this study in the range of 1-2 mg/kg.

There was also a clear pattern of toxicity among the individual substances. Fluazinam was the only substance that was toxic to all organisms and was the most toxic in each case. Fluoranthene was the second most toxic substance for soil invertebrates, but was always less toxic by a factor of 3 to 7. Break-Thru could not be tested for springtails due to a strong influence of the test system by the substance properties, but in enchytraeids effects could be detected for < 1,000 mg/kg in sandy soil. For DEHP, on the other hand, no effects below this test concentration were observed for any test organism. Thus, the toxicity of the individual substances follows the order fluazinam > fluoranthene > Break-Thru > DEHP.

The toxicity of the substances and the sensitivity of the organisms did not necessarily correlate with their bioaccumulation and bioconcentration. For springtails, for example, bioaccumulation was only detectable for fluoranthene (although this is also due to their low biomass and different detection limits), while bioaccumulation overall was significantly higher for enchytraeids and, therefore, fluoranthene as well as DEHP and fluazinam could be detected in all enchytraeid assays. The bioconcentration of fluoranthene was highest for enchytraeids, followed by fluazinam and DEHP, indicating that the high toxicity of fluazinam leads to stronger effects than fluoranthene even at lower uptake levels. Within a species, the toxicity of the substances correlated relatively well with the bioconcentration in the respective soils, i.e. the toxicity was usually higher in soils with a higher bioconcentration.

In the mixture toxicity tests with effective test concentrations, different test regimes were developed for the respective test organisms due to the different toxicity of the substances and compatibility with the respective test systems. For example, due to the fact that only one substance with a toxic effect, fluazinam, was available for the microbial soil community, it was not possible to create a mixture of substances in the effective concentration range.

For springtails, Break-Thru was excluded for this experimental part due to its incompatibility with the flotation method. With the remaining substances, all combinations of binary and ternary substance mixtures were analysed and the toxic individual substances were also tested as a reference. All substance mixtures contained 1 Toxic Unit (TU), which means that, assuming complete additivity of the toxicities of all individual substances, an effect of 50% is caused; consequently, half the concentration of the EC₅₀ values of two substances would be applied, so they equally contribute to the overall toxicity. In this test regime, only fluoranthene and fluazinam contributed to toxicity, while DEHP was applied as a "passive agent" due to its lack of toxicity, i.e. without contributing to toxicity at a comparable concentration to the other substances. In the reproduction tests, all treatments in the sandy and sandy-organic soil caused about 50% effect, so that additivity of the toxic substances can be assumed in these soils, and, that DEHP does not influence this additivity. In the loamy soil, in contrast, the effect was significantly less than 50% in all substance combinations. Accordingly, on the one hand the two toxic substances interact antagonistically with each other, while on the other hand DEHP is able to significantly reduce the toxicity of the other substances by its presence alone. In summary, there is a clear contrast in the expression of mixture toxicity between the two sandy soils and the loamy soil.

The bioconcentration of fluoranthene increased in these tests in the sandy soil from 1 in the single substance tests to 3 to 10 in the mixtures. In the sandy-organic soil, however, the value remained constant at 0.1 in all treatments, while in the loamy soil it fell from around 1 in all other treatments to around 0.2 only in the ternary mixture. This shows that co-contaminants are able to noticeably influence the bioconcentration of fluoranthene in springtails, especially in the sandy soil.

All four substances could be used in the enchytraeid tests, so that two quaternary mixtures with a toxicity of 1 and 2 TU were tested. Significant differences to the control could only be determined at 2 TU, while the effect strength at 1 TU was well below 50% in all soils, and most of all in the sandy soil. Accordingly, the substance mixture had an antagonistic effect in all three soils under the assumption of concentration addition.

The tissue concentration of the substances was significantly higher in enchytraeids than in springtails, so that all substances except Break-Thru could be detected in the chemical analysis. The absolute values of the tissue concentration tended to be highest in the order fluoranthene > DEHP > fluazinam, but bioconcentration values could also be arranged in the same order in relation to the soil concentration. Analogous to springtails, the bioconcentration factors were lowest in the sandy-organic soil, although the values were generally relatively close to each other in the soil comparison. The changes in the bioconcentration factors of the test substances due to application in the model mixture showed some conspicuous changes according to a regular pattern compared to the individual substance tests: in this context, the substances always behaved quite similarly in the sandy and the sandy-organic soil, while a fundamentally different pattern was recognized in the loamy soil. Thus, the bioconcentration of fluoranthene and DEHP in the sandy and sandy-organic soil in the mixture tests was not fundamentally different from that in the single substance tests, whereas in the loamy soil in mixture tests the bioconcentration of fluoranthene decreased and that of DEHP increased. The bioconcentration of fluazinam, on the other hand, tended to decrease or remain the same in the mixture tests in both sandy soils, while it increased in the loamy soil.

In addition to the effective concentrations, tests with environmentally relevant concentrations were carried out for all organisms. These comprised three mixtures: one with the expected environmental concentrations PEC (Predicted Environmental Concentration) determined in each case, which amounted to 0.1 mg/kg for the ubiquitous pollutants fluoranthene and DEHP and 0.4 mg/kg for the agricultural substances. In addition, two mixtures, PEC_{low} and PEC_{high}, were tested with concentrations 4-5 times lower or higher than the PECs in order to cover a wide concentration range.

No effects > 25% were found for springtails and enchytraeids in all three mixtures and never with a significant difference to the control. However, reproduction was constantly reduced by 10-20% in almost all test soils and concentrations. These observed effects were much higher than the expected ones under the assumption of concentration addition, and this even more pronounced in the strongly adsorbing soils than in the sandy one. Due to the low concentrations, no bioaccumulation of the substances could be detected in any of the invertebrates.

Microbial soil respiration was significantly reduced in the PEC and PEC_{high} concentrations in all soils, and most strongly in the sandy-organic soil by up to 65%. This can be attributed to the high toxicity of fluazinam, as the observed effect strength in the PEC concentrations corresponds to that from the single substance tests with fluazinam, which was also highest in the sandy-organic soil. Comparative tests with a substance mixture without fluazinam showed that the other test substances had no effect on microbial soil respiration.

Discussion and synthesis

Overall, the results show a variety of patterns in relation to the effect of soil and test organism on the toxicity of both individual substances and mixtures. In most cases, toxic effects are strongest in sandy soil, which can be attributed to its low adsorption capacity. In the more adsorbing soils, the effects on springtails are weakest in the sandy-organic soil and on enchytraeids in the loamy soil. This can be explained by the stronger uptake of pollutants via the pore water of springtails, so that the larger organic fraction in the sandy-organic soil prevents

stronger dissociation into the pore water. In the case of enchytraeids, uptake mainly takes place via the skin and the soil digested in the intestinal tract, so that pollutants are made available in a different way here and thus those bound to clay are less readily available than those bound to organic matter. For microorganisms, fluazinam was again most toxic in sandy-organic soil and least toxic in loamy soil. This can be explained by the stronger binding of fluazinam in organic material and the relatively high proportion of microorganisms compared to the proportion of soil mass: Fluazinam is therefore strongly bound where a large proportion of the microbial biomass is located and can act directly on it. The particularly toxic effect of fluazinam on the soil microbial community represents an exception in the sensitivity of the test organisms in this project; without this, the following order of sensitivity applies: *F. candida* > *E. crypticus* > microbial soil community.

Test soils and organisms also have a strong influence on the expression of mixture toxicity. In springtails, additive effects were observed in all mixture combinations in sandy and sandy-organic soils, while these were antagonistic in loamy soils. This can be explained by the strong binding of DEHP to clay minerals and possible π - π interactions between the test substances, which could be responsible for a strong retention of the toxic substances fluoranthene and fluazinam in the soil. In addition, these interactions seem to promote the uptake of fluoranthene in springtails, but again only in sandy soil: here the high $\log K_{ow}$ of DEHP could favour the uptake of the other substances. This observation also emphasises that non-toxic substances such as DEHP can have a significant impact on the expression of mixture toxicity and should therefore also be considered in mixture toxicity experiments. For enchytraeids, there was also a clear difference between the two sandy soils and the loamy soil with regard to the bioconcentration of all detectable test substances. However, it is more difficult to relate these to the observed toxic effects of the mixture, as the antagonism observed in all soils was most pronounced in the sandy soil and least pronounced in the sandy-organic soil. The uptake by enchytraeids plays a central role in the expression of mixture toxicity: the desorption of the test substances from the soil matrix as well as the metabolization in the digestive tract are crucial for bioavailability, which is influenced by the competition of the pollutants for binding sites in the soil matrix and the organism tissue.

Although the effects on the reproduction of soil invertebrates observed in the environmentally relevant concentrations were not significant, they are surprising in their frequent occurrence and size. Particularly in the highly adsorbing soils, the sandy-organic and loamy soils, the test substances were less toxic and, therefore, the respective EC_{50} values many times higher than the respective PEC. This is reflected in the very low TU values and, consequently, the very high Model Deviation Ratios (MDR). Surprisingly, in the sandy soil substances were most toxic and, therefore, the distance between PEC and EC_{50} was the smallest. However, the observed effects and MDR were lowest there. Accordingly, one would not expect any effects from the substance mixture in the concentration range of the PEC treatments, especially in the highly adsorbing soils. Therefore, strong synergisms, which are necessary for these unexpectedly high effects, cannot be ruled out. These results are not contradictory to the observed antagonistic and additive effects caused by the effective substance mixtures, as the expression of mixture toxicity depends on both the level and the ratio of the individual doses to each other. However, due to the very low expected effects, already small observed effects can lead to remarkable deviations. This is even more relevant as the used dose-response curves mainly cover effective concentration ranges and, therefore, have rather high uncertainties in the low concentration ranges. Therefore, to state hypothetical synergistic effects in soils, substance mixtures should be tested in experimental setups specifically designed for low concentration ranges.

For microbial soil respiration, significant effects were observed in all three soils in the mixtures PEC and PEC high, mainly caused by the high toxicity of fluazinam: the observed effects were in the range of the single substance tests with fluazinam, whereas a ternary mixture without fluazinam could not achieve any effects. This emphasises that the overall toxicity of a single toxic substance in a mixture can dominate that of the entire mixture. This is particularly relevant with regard to the high toxicity of pesticides. Furthermore, it cannot be ruled out that co-contaminants in environmentally relevant concentrations influence the overall toxicity, even if this was not the case in this test system.

Conclusion

The present study shows that the expression of mixture toxicity depends very much on the interaction with the respective test soil and organism. Antagonistic effects were most abundant, but additive effects occurred frequently. It was also shown that, in addition to toxicity, the bioaccumulation of the pollutants was strongly affected by the factors already mentioned. The altered uptake in mixtures could partly explain the observed mixture toxicity.

The additivity assumed on the basis of CA is regarded in science and regulation as a conservative or default model, primarily based on data from aquatic ecotoxicology, but comparable data from soil ecotoxicology gain in importance. The aim of the present study was to use a comprehensive approach with three test soils and three test organisms to provide a picture as representative as possible of the complex and diverse soil ecosystem in order to determine the tendency towards the expression of mixture toxicity in soils. The results indicate that, in line with the precautionary principle, CA should also be used as a suitable model in the soil environment, as this model covers a large fraction of the scenarios tested here, especially in effective concentrations. However, the environmentally relevant test concentrations are rather an indicator that mixtures potentially present in the field are already capable of developing toxicity towards soil organisms through synergistic interactions between the individual substances, however, with regard to the experimental setup there exist quite some uncertainties to draw a final conclusion. To unravel the real origin of these effects, and to proof potential harm to the environment, a test design even more specified for environmental concentrations is required.

The present study was able to identify some basic mechanisms for the development of mixture toxicity, such as the fundamentally different behaviour of mixtures in different soils depending on fine soil and organic matter content. The aim now is to identify a larger number of these mechanisms in the future and to generalise and validate them for the widest possible range of mixtures, particularly those of environmental relevance. Due to the high complexity and diversity of soils, a prospective risk assessment of mixtures in soils can only be made on the basis of a fundamental understanding of the behaviour of these mixtures in soils under the influence of different soil properties and uptake mechanisms of soil organisms. In spite of the high experimental effort for soil ecotoxicological experiments, we recommend the use of few model soils (2-5) in mixture toxicity studies, to keep the effort on an acceptable level on the one side, but also to achieve a wider coverage of environmental conditions under which mixture toxicity can develop on the other side. Additionally, field-realistic substance mixtures being representative for agricultural landscapes should be tested targeted and systematically in test systems being adapted specifically to low soil concentrations to screen them for actual synergistic interactions – the consideration of ubiquitous background pollutants is explicitly recommended. The presented results underline the feasibility of CA as default model being also applicable to soil ecotoxicology. **To cover the up to now still high uncertainties on mixture toxicity in soil, the definition and implementation of a feasible safety factor for mixture toxicity in the risk assessment of single substances should be targeted, until a more comprehensive understanding for its development in soils is gained.**

1 Einleitung & Hintergrund

Bodenschutz spielt eine zentrale Rolle für die globale Biodiversität, Schadstoffretention, Klimaregulierung und Ernährungssicherheit und adressiert daher mehrere Nachhaltigkeitsziele gleichzeitig (Bach et al., 2020). Bodengesundheit wird v.a. durch den Erhalt der Bodenbiodiversität gewährleistet, welche jedoch wesentlich durch den direkten Eintrag von Pestiziden und anderen Agrochemikalien (Beaumelle et al., 2023) sowie den indirekten Eintrag von ubiquitären Schadstoffen über atmosphärische Deposition beeinträchtigt wird (Wright et al., 2018). Somit liegen durch die verschiedenen Eintragswege auch zahlreiche unterschiedliche Stoffgruppen im Boden, der allgemein als Senke für Schadstoffe gilt, vor.

In Deutschland wird der mediale Bodenschutz über das Bundesbodenschutzgesetz (BBodSchG) sowie die Bundesbodenschutzverordnung (BBodSchV) geregelt. Die BBodSchV leitet über Maßnahme-, Prüf- und Vorsorgewerte für ein Gebiet bei Überschreitung dieser Grenzwerte entsprechende Prüfungen bzw. Maßnahmen ein, dies allerdings überwiegend nur für Einzelsubstanzen. Dies lässt Interaktionen von gleichzeitig im Boden vorliegenden Substanzen und daraus resultierende ökotoxikologische Wirkungen unberücksichtigt, sodass z.B. zwei oder mehrere Stoffe bzw. Stoffgruppen zwar unterhalb der benannten Grenzwerte liegen, durch Mischungstoxizität dennoch die Bodenfunktionen nachhaltig beeinträchtigen könnten. Auch in der Europäischen Chemikalienregulierung durch die Verordnung REACH werden Substanzen bisher nur einzeln untersucht und die Existenz von Co-Kontaminanten nicht berücksichtigt (Treu et al., 2024). Es wird jedoch diskutiert, die Wirkung von intendierten (Galert and Hassold, 2021) bzw. nicht intendierten Stoffmischungen, z.B. über einen Sicherheitsfaktor MAF (Mixture Allocation Factor) abzudecken. (Treu et al., 2024)

Die Wirkung von Substanzmischungen auf Umweltorganismen ist schon lange Gegenstand der Forschung. Während die dafür grundlegenden Modelle der Humantoxikologie entstammen und bis in den Anfang des letzten Jahrhunderts zurückreichen (Bliss, 1939; Loewe and Muischnek, 1926), gewann das Thema der Mischungstoxizität im Umweltkontext Anfang des Jahrtausends zunehmend an Bedeutung (z.B. Altenburger et al., 2003; De Zwart and Posthuma, 2005). Auch bei diesem Themenkomplex ist die Forschung in der aquatischen Ökotoxikologie deutlich stärker fortgeschritten als in der terrestrischen. Dennoch gibt es in der Ökotoxikologie mehrere Ansätze zur Abschätzung der Mischungstoxizität von Substanzen, die auch deren spezielles Verhalten in Böden bzw. gegenüber Bodenorganismen berücksichtigen. Diese Konzepte behandeln überwiegend Mischungen von Schwermetallen, aber auch organische Schadstoffe (z.B. Jonker et al., 2004; Qiu et al., 2016; Shen et al., 2005; Van Gestel and Hensbergen, 1997). Dabei sind Bioverfügbarkeit, Porenwasserlöslichkeit und Bodenadsorption zentrale Faktoren zur Modellierung und Erklärung der beobachteten (Mischungs-)Effekte. Diese Faktoren wiederum hängen sehr stark von Bodeneigenschaften wie Ton- und organischem Gehalt, Kationenaustauschkapazität (KAK) und pH ab, was wiederum auch für organische Kontaminanten gilt (Brun et al., 1998; Calder et al., 2012; Criel et al., 2008; McGrath et al., 2009). So können sowohl organische Substanz (Gainer et al., 2019; Stolbova and Beregela, 2015) als auch die Tonfraktion (Amellal et al., 2001; Jia et al., 2016; Kwon et al., 2016) oder die amorphe Phase des Bodens massiven Einfluss auf die Bioverfügbarkeit, Toxizität oder Abbaubarkeit von organischen Schadstoffen haben (Irha et al., 2003). Daher sollten generalisierende Aussagen zur Mischungstoxizität anhand eines Vergleichs verschiedener Testböden mit variierenden Eigenschaften eingeschätzt werden.

Die Mischungstoxischen Prognosekonzepte, die in den letzten Jahren überwiegend zum Einsatz kamen, sind die Concentration Addition (CA) für Substanzen mit ähnlichen, sowie Independent Action (IA) für Substanzen unterschiedlicher Wirkmechanismen (Hadrup et al., 2013). Ist die

Beziehung der Wirkmechanismen unklar, werden gerne beide Modelle angewandt, um zu überprüfen, welches am ehesten den beobachteten Daten entspricht, und in welcher Weise die Substanzen ihre Toxizität gegenseitig beeinflussen (synergistisch vs. antagonistisch; Jonker et al., 2004; Qiu et al., 2016; Walter et al., 2002). Zudem gibt es erweiterte Modelle wie Regressionsanalysen (Shen et al., 2005), generalisierte CA-Modelle für Substanzen mit limitierten Maximaleffekten (Hadrup et al., 2013) und Modelle auf Basis der Bioverfügbarkeit in Böden wie das Biotic Ligand Model (BLM) oder das Windermere Humic Acid Model (WHAM, Qiu et al., 2016), die die Standardmodelle in den jeweiligen Aspekten erweitern. Eine ausführliche Darstellung zu den verschiedenen Mischungstoxischen Konzepten und Modellen findet sich in Kapitel 2 dieses Berichts.

Böden sind einer Vielzahl von Substanzen ausgesetzt, da es viele Eintragswege in diese gibt. So werden alleine über die Atmosphäre Schadstoffe aus Verbrennungs- und Industrieprozessen oder Siedlungen eingetragen, so etwa polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) (Gocht et al., 2007) oder Plastikweichmacher (Zeng et al., 2010), welche sich sogar global verbreiten können (Gao and Wen, 2016). Darüber hinaus werden in Deutschland etwa 50% der Fläche landwirtschaftlich genutzt (Umweltbundesamt, 2023), für die ein Inlandsabsatz von etwa 30.000 Tonnen an Pflanzenschutzmitteln seit etwa 30 Jahren konstant besteht, welche absehbar in Böden eingetragen werden (Umweltbundesamt, 2024). Während zwar die Einsatzmengen von Pestiziden konstant bleiben oder in manchen Regionen sogar schrumpfen und auch deren Toxizität ggü. Vertebraten abnimmt, steigt tendenziell deren Toxizität ggü. Pflanzen und Invertebraten (Schulz et al., 2021). Zudem ist der Eintrag von Pestiziden und anderen Agrochemikalien nicht alleine auf landwirtschaftliche Böden begrenzt, sondern kann über Drift auch umliegende und sogar höher gelegene Flächen erreichen (Brühl et al., 2024). Somit sind große Teile des Bodens in Deutschland einer Vielzahl von Eintragswegen ausgesetzt, die, je nach Persistenz der Stoffe, zu einer Anreicherung im Boden führen kann. Aber auch bei weniger persistenten Stoffen kommt es zu einer zeitlichen Überlappung der Präsenz einer Vielzahl von Stoffen im Boden, sodass diese dort parallel ggü. Bodenorganismen wirken können. Die gleichzeitige Präsenz von Pestiziden und anderen Agrochemikalien sowie ubiquitär verbreiteten Stoffen wie PAK oder Plastikweichmachern ist demnach auf landwirtschaftlichen Flächen und somit einem Großteil der Gesamtfläche Deutschlands sehr realistisch.

Ziel dieser Studie ist, anhand einer für landwirtschaftlichen Flächen realistischen Stoffmischung abzuschätzen, in welchem Umfang und welcher Art und Weise es dabei zur Ausprägung von Mischungstoxischen Effekten, ggü. Bodenorganismen kommen kann. Dabei sollte ein breit ausgelegtes Studiendesign mit einer Mehrzahl an Testböden und -organismen verwendet werden, um im Rahmen der experimentellen Möglichkeiten der äußerst hohen Diversität des Ökosystems Boden in Teilaspekten Rechnung zu tragen. Zudem werden in der Studie sowohl Konzentrationen im sichtbaren Effektbereich zur Offenlegung mechanistischer Stoffinteraktionen als auch umweltrelevante Konzentrationsbereiche untersucht. Das genaue Studiendesign wird in Kapitel 3 detailliert erläutert.

2 Mischungstoxische Modelle

Umweltkontaminanten kommen, abgesehen von räumlich abgegrenzten Schäden durch Unfälle, in der Regel immer in Mischung aufgrund mehrerer Eintragswege vor. Dies liegt zum einen daran, dass bei vielen Kontaminationsereignissen Stoffgemische involviert sind, z.B. Mineralöl oder Pestizidformulierungen. Zudem können auf dem gleichen Eintragsweg mehrere Stoffe eingebracht werden, z.B. durch die Ausbringung von Pestiziden in der Landwirtschaft, da innerhalb einer Saison meist mehrere Mittel nacheinander oder auch gleichzeitig ausgebracht werden. Schadstoffe können jedoch über verschiedene Quellen in ein Umweltkompartiment kommen, etwa durch atmosphärische Deposition von Stoffen aus Verbrennungsprozessen (Aichner et al., 2013; Dreij et al., 2020; Kahle, 2021), sedimentassoziierte Substanzen durch Überflutungen (Gocht et al., 2001; Pies et al., 2007) oder über Rückstände in Oberflächen- bzw. geklärtem Abwasser für die Bewässerung (Brusseau et al., 2020; Wallach et al., 2005) und Klärschlamm für Düngung (Cai et al., 2008; Cirelli et al., 2010). Deshalb muss eine umfassende Risikoabschätzung die Toxizität von Stoffgemischen stets berücksichtigen.

In der Regulatorik von Chemikalien spielt daher die Berücksichtigung von Mischungstoxischen Effekten eine zunehmend große Rolle und wird seit etwa einem Jahrzehnt gezielt von weltweit vernetzten Organisationen, u.a. OECD, WHO, IPCS bzw. auf europäischer Ebene ECHA und EFSA und in Nordamerika US EPA, FDA und HC vorangetrieben (OECD, 2018).

2.1 Konzepte und Modelle der Mischungstoxizität

Bei der Beurteilung von Mischungstoxizität im regulatorischen Bereich werden grundsätzlich zwei verschiedene Arten von Ansätzen verwendet: zum einen **Whole Mixture Approaches (WMAs)**, welche die untersuchten Substanzmischung als eine Einheit betrachten; zum anderen **Component Based Approaches (CBA)**, welche jeden einzelnen Bestandteil der Mischung als solchen berücksichtigen, und somit auch die jeweilige Konzentration und Toxizität jedes Bestandteils sowie deren Interaktionen (More et al., 2019; OECD, 2018). Im Rahmen dieses Projekts werden ausschließlich Modelle, Ansätze und Studien aus dem Bereich der CBA betrachtet, da der experimentelle Teil des Projekts selbst auf die einzelnen Beiträge sowie die Interaktionen der untersuchten Testsubstanzen abzielt.

Der Themenkomplex der Mischungstoxizität ist sowohl für die Humantoxikologie und Pharmakologie als auch die Ökotoxikologie essentiell und von seiner grundlegenden Fragestellung (wie wirkt sich die Interaktion mehrerer Substanzen in einem spezifischem Umfeld auf deren toxische Wirkung aus?) sehr ähnlich, sodass es zu einem häufigen Austausch der entwickelten Modelle kommt (z.B. Chou, 2006). Dies trifft auch auf die beiden meist verbreiteten Modelle, die **Concentration Addition (CA)** und **Independent Action (IA)** zu, welche bereits in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts entwickelt wurden und sich seitdem nicht wesentlich verändert haben (Cedergreen, 2014). Es handelt sich bei beiden Konzepten um recht simple, leicht anwendbare mathematische Modelle, welche jedoch jeweils gegensätzliche Grundannahmen zur Funktionsweise von Stoffgemischen beinhalten.

Bei der CA wird davon ausgegangen, dass alle beteiligten Substanzen auf die gleiche Art und Weise bzw. über den gleichen Mechanismus auf den Organismus wirken, also die gleiche Wirkungsweise (**Mode of Action**) bzw. den gleichen **Mechanism of Action (MoA/MeoA)** besitzen; MoA ist demnach ein Sammelbegriff für alle in diesem System wirksamen MeoA (Ogungbemi et al., 2021). Demnach sind alle beteiligten Substanzen nur Verdünnungen ihrer selbst mit jeweils unterschiedlichen Wirkstärken. Entsprechend können die nach Gewichtung von Konzentration und Wirkstärke abgeschätzten Beiträge der Einzelsubstanzen zur Toxizität einfach aufsummiert werden. Bei der IA wiederum wird davon ausgegangen, dass Substanzen

mit verschiedenen MoA vorliegen, welche unabhängig voneinander, d.h. mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit, zu einem Effekt beitragen und daher die Effekte der einzelnen Substanzen, bzw. deren Wahrscheinlichkeit, keinen Effekt auszulösen, miteinander multipliziert werden (Jonker et al., 2005). Trotz dieser recht simplen Annahmen wichen in einer Metaanalyse ökotoxikologischer Mischungsstudien die von CA und IA modellierten Effekte nur selten um einen Faktor 2 von den beobachteten Effekten ab (Belden et al., 2007), während sich in Algenstudien die Modelle untereinander selten um einen Faktor >3 unterschieden (Backhaus et al., 2004; Faust et al., 2003), bzw. in Regenwurmstudien selten um einen Faktor >2 (Knillmann et al., 2021)

In der Regel wird CA als die konservativere und damit geeignetere Methode für regulatorische, die Sicherheit priorisierende Belange angesehen, da sie die Toxizität von Stoffgemischen, in denen tendenziell immer in irgendeiner Form unterschiedliche MoA vorliegen, eher überschätzt, wenn dieser Unterschied auch meist überschaubar ausfällt (Faust et al., 2003). In einem EFSA Guidance Document zur Mischungstoxizität wird CA als „default assumption“, quasi als Ausgangsmodell bezeichnet (More et al., 2019).

2.2 Parameter und Indices der Mischungstoxizität

Eine Kernfrage bei der Ermittlung der Mischungstoxizität ist, ob Substanzen sich, in Abhängigkeit der jeweiligen Grundannahmen wie Konzentrationsaddition oder unabhängige Wirkung, in ihrer Toxizität gegenseitig abschwächen (Antagonismus), verstärken (Synergismus) oder gar nicht beeinflussen, sondern ihre Toxizitäten sich einfach aufsummieren lassen (Additivität). Mithilfe der oben beschriebenen Modelle lassen sich Indices ermitteln, die über diese Relation eine Auskunft geben können.

Der am häufigsten verwendete Modellparameter dürfte das Konzept der **Toxic Unit (TU)** sein, welcher auf dem gleichen Grundprinzip wie CA, der Aufsummierung von Toxizitäten basiert (Escher et al., 2020). Eine TU entspricht dabei der applizierten Konzentration einer Substanz geteilt durch ihre jeweilige Effektkonzentration bei dem beobachteten Effekt; ergibt die Summe der TUs aller Substanzen exakt 1, so liegt eine perfekte Additivität vor, während es sich bei Werten <1 bzw. >1 um einen Synergismus bzw. einen Antagonismus handelt, wobei oft vereinfachend Werte von <0,8 bzw. >1,2 verwendet werden, um Unsicherheiten bei der Datenerhebung zu berücksichtigen (Jonker et al., 2005). TU entspricht dem ökotoxikologischen Äquivalent zum **Reference Point Index (RPI)** in der Humantoxikologie; in der Umweltregulatorik können TU auf **Predicted Environmental Concentrations (PEC)** zur Ermittlung eines **Hazard Quotient** oder **Risk Quotient (HQ/RQ)** angewandt werden (More et al., 2019). Dies wurde sehr anschaulich von (Backhaus and Faust, 2012) mit einem **RQ_{STU} (Risk Quotient – Sum of Toxic Units)** umgesetzt.

Darüber hinaus gibt es mehrere, überwiegend in der Wissenschaft angewandte Indices. Der **Additive Index (AI)** von Marking (1977) beschreibt unter der Annahme der Konzentrationsaddition mit 0 einen additiven Effekt und mit Werten <0 bzw. >0 einen antagonistischen bzw. synergistischen Effekt, vorausgesetzt das dazugehörige Konfidenzintervall schließt 0 nicht mit ein: somit wird hier im Gegensatz zu TU ein Maß zur statistischen Unsicherheit des ermittelten AI miteinbezogen.

Der **Mixture Toxicity Index (MTI)** von Könemann (1981) besitzt gegenüber dem AI zum einen den Vorteil einer logarithmischen Form, zum anderen legt er mit 0 und 1 zwei konstante Werte für gar keine und komplette Additivität fest. Dazwischen verläuft ein Gradient für teilweise Additivität, während Werte <0 und >1 Antagonismus und Synergismus beschreiben.

Dem **Toxicity Enhancement Index (TEI)** von Warne et al. (1989) lässt sich direkt entnehmen, um welchen Faktor der beobachtete Wert vom erwarteten Wert abweicht und in welche Richtung die Abweichung verläuft, d.h. Werte >1 bzw. < -1 entsprechen einem Synergismus bzw. Antagonismus. Nach dem gleichen Prinzip, aber noch intuitiver zugänglich, funktioniert das **Model Deviation Ratio (MDR)** von Belden et al. (2007), bei dem ein Quotient aus erwartetem und beobachteter Effektkonzentration gebildet wird, sodass $MDR=1$ Additivität entspricht, sowie $MDR<1$ Antagonismus, und $MDR>1$ Synergismus, jeweils in Abhängigkeit von der entsprechenden Grundannahme.

In einem Stoffgemisch besteht darüber hinaus auch die Möglichkeit, die Toxizität aller Stoffe auf die Toxizität eines Stoffes zu normieren, z.B. in einem Schwermetallgemisch auf die Toxizität von Kupfer. Dafür kann der **Toxicity Equivalent Quotient (TEQ)** verwendet werden (Yen Le et al., 2013), der im Prinzip funktioniert wie der aus der Regulatorik besser bekannte **Relative Potency Factor (RPF)** (More et al., 2019). Der TEQ lässt sich u.a. gut in das für Schwermetallmischungen verwendete **Biotic Ligand Model (BLM)** integrieren (Liu et al., 2014; Yen Le et al., 2013).

Tabelle 1 Parameter und Indices der Mischungstoxizität

Abkürzung	Modell	Referenz
TU	Toxic Unit	z.B. Jonker et al. (2005)
AI	Additive Index	Marking (1977)
MTI	Mixture Toxicity Index	Könemann (1981)
TEI	Toxicity Enhancement Index	Warne et al. (1989)
MDR	Model Deviation Ratio	Belden et al. (2007)
TEQ	Toxicity Equivalent Ratio	z.B. Liu et al. (2014)

2.3 Erweiterungen zu Concentration Addition und Independent Action

Trotz der konservativen Ausrichtung der Standardmodelle wird auch in einigen Studien gezeigt, dass sowohl CA als auch IA die beobachtete Toxizität von Stoffgemischen systematisch unterschätzten (z.B. Matzke et al. 2008; Yang et al. 2017). Des Weiteren wurden in den letzten Jahrzehnten weitere Faktoren herausgearbeitet, welche die Toxizität von Mischungen beeinflussen. Für diese und andere Phänomene wurden Modelle entwickelt, die i.d.R. in ihrem Grundaufbau auf CA oder IA basieren, diese jedoch erweitern und damit sichtbar die Präzision dieser Basismodelle erhöhen.

Eines dieser Phänomene ist die **dose ratio bzw. dose level dependency**. Sie besagt, dass die Mischungstoxizität von Substanzen davon beeinflusst werden kann, in welchem Mischungsverhältnis diese zueinanderstehen (Jonker et al., 2005). In einer binären Mischung könnte demnach eine Veränderung des Mischungsverhältnisses der beiden Substanzen, z.B. von 1:1 hin zu 2:1 die Mischungstoxizität des Gemisches von antagonistisch zu synergistisch oder umgekehrt verschieben, oder die Ausprägung des Synergismus bzw. Antagonismus verändern. Ähnlich verhält es sich bei der Höhe der applizierten Dosis, sodass die Mischungstoxizität eines Stoffgemisches in einem niedrigen Konzentrationsbereich sich anders verhält als in einem hohen. Jonker et al. (2005) entwickelten dazu das sog. **MIXTOX Model**, welches CA und IA jeweils verallgemeinert und um Abweichungsfunktionen erweitert, um Dosisverhältnis- bzw.

Dosishöhenabhängigkeit zu erfassen. Dieses Modell wurde bereits in mehreren Studien angewandt und konnte in diesen Aussagen zur Mischungstoxizität präzisieren (Box 1).

Box 1: Beispiele zum MIXTOX Modell

Qiu et al. (2011) stellten einen generellen Antagonismus von Cadmium und Zink gegenüber Regenwürmern fest, wobei dieser sich in Abhängigkeit vom jeweiligen Verhältnis und Höhe der Dosen zwischen 1,1 und 2,7 TU bewegte. Lopes et al. (2016) beobachteten einen synergistischen Effekt zwischen Silbernanopartikeln und -ionen gegenüber Daphnien mit steigender Silberionenkonzentration; im Gegenzug führte steigende Nanopartikelkonzentration zu einer antagonistischen Beziehung. Ein ebenfalls konzentrationsabhängiger Synergismus gegenüber Daphnien wurde für niedrige Konzentrationen von Thiabendazol und Graphit-Diamant-Nanopartikel gefunden, während die verstärkte Agglomeration von Nanopartikeln in hohen Konzentrationen zu einem Antagonismus führte (Martín-de-Lucía et al., 2019).

In den Nanopartikelstudien in Box 1 lassen sich die Effekt-Isobologramme, die sich aus den binären Mischungen ergeben, gut mit dem Verhalten von Nanopartikeln in der Umwelt in Zusammenhang bringen. Dies sollte auch das Ziel bei der Anwendung der genannten Modellerweiterungen für andere Substanzgruppen sein.

Ein weiteres konzentrationsabhängiges Phänomen, das nicht von den gängigen Modellen CA und IA erfasst werden kann, sind Substanzen, die keine 100% Effektstärke im jeweiligen Testsystem erreichen, sogenannte **Partialagonisten**. Howard and Webster (2009) entwickelten dafür ein **generalisiertes CA Modell (GCA)**, welches die maximale Effektstärke aller Substanzen miteinbezieht und dadurch in der Lage ist, im verwendeten Testsystem eine Vorhersage über den kompletten Bereich der erfassten Daten zu machen. Im Gegensatz dazu können die Modelle CA und IA nicht in höheren Effektausprägungen angewandt werden, wenn Partialagonisten involviert sind (Hadrup et al., 2013). Zwar ist das GCA auch auf Agonisten und sog. kompetitive Antagonisten, also den Agonisten hemmende Stoffe anwendbar (Howard et al., 2010; Howard and Webster, 2009), nicht jedoch auf Stoffgemische, welche sowohl stimulierende als auch hemmende Substanzen enthalten (Hadrup et al., 2013). GCA entstammt der Pharmakologie, könnte aber auch für die Ökotoxikologie interessant sein. Dass für Substanzen keine 100% Effektstärke ermittelt werden kann, ist besonders im Boden aufgrund seiner hohen Absorptionskapazität für weniger toxische Substanzen nicht selten. Dies wurde u.a. für Kohlenwasserstoffverbindungen gegenüber Pflanzen (Sverdrup et al., 2003; Tang et al., 2011) oder Nanopartikeln gegenüber Mikroorganismen (Pereira et al., 2011) und Bodeninvertebraten festgestellt (Heckmann et al., 2011; Noordhoek et al., 2018).

Im Bereich der Niedrigkonzentrationen schlagen Escher et al. (2020) ein **kombiniertes CA/IA-Mischungsmodell** vor, welches v.a. Bereiche unterhalb des EC_{30} abdecken soll. Es wird dabei die Grundannahme berücksichtigt, dass unterhalb dieser Effektkonzentration Dosis-Wirkungskurven linear verlaufen (Escher et al., 2018). Die beiden erweiterten Modelle zeigten eine sehr gute Übereinstimmung in der Abschätzung niedriger Effektkonzentrationen ($<EC_{10}$) gegenüber aquatischen Organismen.

Grundlegende Neuerungen der Modelle von Jonker et al. (2005) und Escher et al. (2020) sind die Implementierung der Formeln oder einzelner Parameter, z.B. der Steigung, der Dosis-Wirkungskurven. Dadurch lässt sich der spezifische, für die jeweilige Konzentration charakteristische Beitrag einer Substanz zur Gesamttoxizität bei einer bestimmten Dosis präzisieren. Diese Modelle arbeiten demnach mit mehr Informationen als CA und IA, in denen zwar Effektkonzentrationen, aber nicht die dazugehörigen Steigungen verwendet werden.

Ebenfalls eine Methode aus der Pharmakologie stellt der von Chou (2006) entwickelte **Combination Index (CI)** dar, welcher zuerst von Rosal et al. (2010) auf die Umweltrisikobewertung angewandt wurde. Dieser erlaubt ebenfalls die Abschätzung der Interaktion zwischen mehreren Substanzen in Form von Synergismus/Antagonismus über die komplette Bandbreite der beobachteten Effektstärke, also von 0 bis 100%. Mit dieser Methode wurden starke synergistische Effekte von Pestizidmischungen gegenüber Regenwürmern sichtbar gemacht, welche von CA und IA nicht beschrieben werden konnten (Chen et al., 2015; Yang et al., 2017). In diesen Studien nahm mit der Anzahl der beteiligten Substanzen tendenziell auch die Stärke des Synergismus zu. In der weit verbreiteten **Funnel-Hypothese** von Warne und Hawker (1995) wird generell davon ausgegangen, dass mit der Zunahme der organischen Substanzen in einer Mischung die Wahrscheinlichkeit für einen additiven Effekt zunimmt. Auch für Detergenzienmischungen nahm mit der Zunahme an beteiligten Substanzen nach dem CI-Modell der Synergismus gegenüber aquatischen Mikroorganismen tendenziell zu (Rosal et al., 2010).

In einer neuen Methode von Wang et al. (2021) wurden Synergismus und Antagonismus von Antibiotika/Kupfer-Mischungen darüber definiert, wie sehr die beobachteten Werte von der CA-Modellierung abwichen: je größer die von der beobachteten Dosis-Wirkungskurve eingeschlossene Fläche über bzw. unter der modellierten Dosis-Wirkungskurve, desto größer der Synergismus bzw. Antagonismus. Hier wird der Grundannahme von CA Rechnung getragen, dass die untersuchten Substanzen nicht miteinander interagieren und eine Abweichung von CA demnach als verstärkende bzw. hemmende Interaktion interpretiert wird.

Eine mathematische Annäherung zur Darstellung von Interaktionen findet sich bei Shen et al. (2005) in Form einer multiplen linearen Regression. Diese analysiert die resultierende Toxizität aus Böden, die mehrfach mit verschiedenen Substanzen in einem gleichförmigen Design (in diesem Fall: 6 Substanzen in 10 Konzentrationsstufen über 10 Treatments verteilt, sodass jedes Treatment jede Substanz enthält) beaufschlagt wurden. Das Regressionsmodell ermittelt dabei eine Gleichung, die den toxischen Effekt in Abhängigkeit der Bodenkonzentrationen der jeweiligen Kontaminanten und deren Interaktion wiedergibt. Negative Koeffizienten zeigen hier einen negativen Effekt an, während miteinander multiplizierte Bodenkonzentrationen eine Interaktion anzeigen, sodass sich diese Zusammenhänge direkt aus der Gleichung lesen lassen. Inwieweit sich Synergismen oder Antagonismen daraus ableiten lassen, wird in dieser Studie jedoch nicht diskutiert.

2.4 Interaktionsmodelle

Bei den bisher genannten Modellen besteht zunächst die Annahme, dass die untersuchten Substanzen zwar gemeinsam wirken, jedoch nicht miteinander interagieren und ihre Toxizität beeinflussen (non-interactive joint action; Broderius et al., 1995; De Zwart and Posthuma, 2005; Vijver et al., 2010). Einige Modelle dagegen versuchen gezielt, Interaktionen zwischen toxischen Substanzen mit einzubeziehen. Es gibt mehrere Mechanismen, durch die eine Interaktion zwischen Substanzen entstehen kann. Dazu gehören etwa eine gegenseitige Beeinflussung der Bioverfügbarkeit, ein veränderter Aufnahme- und Transportprozess im Organismus, z.B. durch Erhöhung der Ventilationsrate, eine Veränderung der Metabolisierung durch Hemmung oder Förderung von Enzymen oder, im Falle von Schwermetallen, einer veränderten Spezierung mit Konsequenzen für die Toxizität (Cedergreen, 2014). Da neben der Spezierung die Konkurrenz um Bindungsstellen für Metallionen besonders prägnant ist, wurden einige dieser Modelle explizit für Mischungen von Schwermetallen entwickelt und werden auch nur dafür angewandt, was von Gong et al. (2020) zusammengefasst wurde. Inwiefern eine generelle Anwendung auf alle Substanzklassen möglich ist, sollte dringend in der Wissenschaft diskutiert werden, da viele

dieser Modelle eine deutliche Präzisierung gegenüber CA und IA darstellen und auch bei organischen Substanzen von Interaktionen und einer Konkurrenz um Bindungsstellen auszugehen ist.

Eine für alle Substanzklassen offenstehende Modellgruppe sind sogenannte **toxikokinetisch-toxikodynamische (TK/TD)** Modelle, welche die Interaktion zwischen Substanz und Organismus im zeitlichen Verlauf darstellen. Die Toxikokinetik umfasst dabei, wie Ashauer und Escher (2010) anschaulich formulieren, alle Prozesse, die beschreiben, was der Organismus mit der Substanz macht, also Aufnahme, Transport, Metabolisierung, Ausscheidung etc.; im Gegenzug beinhaltet die Toxikodynamik diejenigen Prozesse, welche beschreiben, was die Substanz mit dem Organismus macht, also die toxische Wirkung an der Zielstruktur, daraus resultierende physiologische Schädigung, Abwehrmechanismen und der sichtbare toxische Effekt auf Individuenebene. Die Modellierung der Substanz-Organismus-Interaktion im zeitlichen Verlauf erlaubt den Vergleich unterschiedlicher Expositionsszenarien, z.B. Gewässereintrag von Pestiziden über Bewässerung oder Niederschlag (Schmitt et al., 2013). Dies lässt sich auch für mehrere, unterschiedlich applizierte Substanzen mit unterschiedlichen Toxizitäten durchführen, was die Möglichkeit zur Anwendung auf Mischungstoxische Fragestellungen ermöglicht. Es wird zwar explizit darauf hingewiesen, dass für die entsprechenden Modelle spezifische Parameter zu Substanz-Organismus-Interaktionen, z.B. Aufnahme- oder Exkretionsraten, benötigt werden (Focks et al., 2014; More et al., 2019). Dennoch könnten TK/TD-Modelle eine wichtige Rolle in der Regulatorik für Mischungstoxische Effekte z.B. in Higher Tier-Studien spielen (More et al., 2019).

Im **BLM** wird davon ausgegangen, dass (Schwer-)Metallionen untereinander in Konkurrenz zu biologischen Bindungsstellen, also Liganden, stehen. Dafür werden Bindungskonstanten der i.d.R. untersuchten Schwermetallkationen sowie der ebenfalls konkurrierenden essentiellen Ionen wie Ca^{2+} oder H^+ benötigt. Das daraus resultierende Modell lässt sich für verschiedene Indices verwenden, wie z.B. **TU**, **f_{mix}** oder **TEQ** (Liu et al., 2014; Yen Le et al., 2013), wobei f_{mix} in BLM gegenüber TU den Vorteil hat, nicht nur die Konkurrenz zwischen essentiellen und Schwermetallionen, sondern auch innerhalb der Schwermetallionen zu berücksichtigen (Jho et al., 2011). In den genannten Studien wurde die Toxizität verschiedener binärer Schwermetallmischungen gegenüber Pflanzen und Algen untersucht.

Tabelle 2 Parameter und Indices der Mischungstoxizität in Abhängigkeit von Interaktionen

Abkürzung	Modell	Referenz
Non-interactive joint action		
CA	Concentration Addition	Loewe und Muischnek (1926)
IA	Independent Action	Bliss (1939)
MIXTOX	Dose ratio and dose level dependency	Jonker et al. (2005)
GCA	Generalised Concentration Addition	Howard und Webster (2009)
	Combined CA/IA for low effect mixture	Escher et al. (2020)
CI	Combination Index	Chou (2006)
Interactive joint action		
TK/TD	Toxicokinetics/Toxicodynamics	Ashauer und Escher (2010)

Abkürzung	Modell	Referenz
BLM	Biotic Ligand Model	Liu et al. (2014)
WHAM F_{tox}	Windermere Humic Acid Model Toxicity function	Stockdale et al. (2010)

Die im BLM benötigten Gleichgewichtskonstanten können im von Stockdale et al. (2010) entwickelten **WHAM F_{tox} -Modell entfallen**, da es auf einem Code zur Modellierung der Huminsäure-Speziierung basiert, (Tipping, 1998). In diesem Modell wird ebenfalls die Bindung von Schwermetallen an biologische Strukturen herangezogen, allerdings wird diese über die modellierte Bindungsaffinität der Ionen im WHAM ermittelt. Die Bindungsaffinität in WHAM wird dann indirekt als Bioverfügbarkeit interpretiert (Stockdale et al., 2010). In einem direkten Vergleich von BLM und WHAM F_{tox} erwies sich das letztere als präziser bei der Vorhersage der Pflanzentoxizität von Schwermetallmischungen in verschiedenen Böden (Qiu et al., 2016). Auch eine Anwendung für die Toxizität gegenüber Enchyträen erwies sich als praktikabel, wobei die Gewebekonzentration von Kobalt und Nickel sehr gut mit der durch WHAM modellierten Bindung an Huminsäure korrelierte (He and Van Gestel, 2015).

2.5 Boden- und sedimentspezifische Modelle

Auch wenn BLM und WHAM F_{tox} bisher nur auf Schwermetallmischungen angewandt werden, spielt das grundlegende Prinzip der Konkurrenz um biologische Bindungsstellen auch für organische Substanzen eine große Rolle. In porösen Medien wie Böden und Sedimenten kommt aufgrund ihrer großen Sorptionskapazität zusätzlich die Konkurrenz um Bindungsstellen an der Bodenmatrix ins Spiel. In folgenden boden- und sedimentspezifischen Modellen wird dieser Situation verstärkt Rechnung getragen.

Die Beschaffenheit von Matrix und Porenwasser ist essentiell für die Sorption und Desorption von Kontaminanten und somit auch deren Bioverfügbarkeit und toxische Wirkung. Um eine hochkomplexe Modellierung der Porenwasserchemie zu umgehen, entwickelten Di Toro et al. (2005) ein BLM für Sediment-Metalltoxizität, das die Partitionierung von Metallionen in die organische Substanz modelliert und eine präzise Vorhersage der Toxizität in Sedimenten ermöglicht. Darauf aufbauend wurde ein bodenspezifisches BLM entwickelt, welches in der Vorhersage von Metallmischungstoxizitäten jenen Modellen, die sich auf den Gesamtmetallgehalt oder die Ionenaktivität bezogen, deutlich überlegen war (Lin et al., 2015; Thakali et al., 2006a, 2006b). Interessanterweise wurde in allen Studien die Partitionierung Metallionen-organische Substanz mithilfe des WHAM VI-Modells (Tipping, 1998) durchgeführt, welches zentral für die Entwicklung des WHAM F_{tox} -Modells ist.

Generell sollte bei Bodenkontaminanten deren Porenwasserkonzentration als Referenz zur Gesamtbodenkonzentration ebenfalls in die Modelle eingepflegt werden. Qiu et al. (2011) untersuchten für Schwermetallmischungen die Mischungstoxizität gegenüber Regenwürmern basierend auf der Gesamt-, Porenwasser- und $CaCl_2$ -extrahierbaren Metallkonzentration. Die Autoren wiesen trotz der guten Übereinstimmung der drei Ansätze darauf hin, dass die Bioverfügbarkeit in Böden sehr stark von den Bodeneigenschaften abhängen kann und daher nicht zwangsläufig eine gute Korrelation zwischen den o.g. Konzentrationen bestünde. Für die Phytotoxizität von Mischungen von Spurenmetallen wurde in acht verschiedenen Böden die beobachtete Toxizität auf die Konzentration in unterschiedlichen Extrakten bezogen, wobei z.B. für Kupfer und Zink jeweils unterschiedliche Extraktionsmethoden die robustesten Ergebnisse lieferten (Hamels et al., 2014). Auch in mit PAK beaufschlagten Sedimenten war die Porenwasserkonzentration als Bezugsgröße zur Erklärung der Toxizität präziser (Hartzell et al., 2018).

Bei alledem darf nicht vergessen werden, dass nicht nur die abiotischen Eigenschaften, sondern auch das Bodenleben, insbesondere Mikroorganismen und grabende Tiere, ganz entscheidend für die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen und damit auch für die Vorhersage von Mischungstoxizität ist. Noch gezielter als zuvor gezeigt könnte die Gewebekonzentration von Schadstoffen in Bodenorganismen Mischungstoxische Effekte vorhersagen (Box 2).

Für die Kombination aus Multispezies-Daten und Mischungstoxizität wurden verschiedene bodenspezifische Modelle entwickelt. Die gesamte erwartete Toxizität einer Mischung in Böden kann mithilfe der „**multi-substance potentially affected fraction**“ (**msPAF**) ermittelt werden, wobei dieser Wert die „potentially affected fraction“ (PAF) aller beteiligten Substanzen kombiniert (Boivin et al., 2006; De Zwart and Posthuma, 2005). Die PAF-Werte leiten sich aus **species sensitivity distributions (SSDs)** ab und bezeichnen den Anteil an potentiell betroffenen Spezies unter der gegebenen Konzentration (Xu et al., 2016).

Box 2: Beispiele für Gewebekonzentration als Bezugsgröße

Cermak et al. (2013) konnten durch den Bezug ihrer Toxizitätswerte von Mineralölkohlenwasserstoffen gegenüber Regenwürmern den Mischungseffekt stärker in Richtung Additivität verschieben, und damit eher der Grundannahme zum toxischen Verhalten dieser Substanzen im Boden entsprechen. Hurdzan and Lanno (2011) erhielten bei der Verwendung von Gewebekonzentrationen einer Chlorbenzolmischung in Regenwürmern auch gegenüber Porenwasserextrakten die präziseren Werte. He et al. (2015) stellten fest, dass die Mischungstoxizität von Cobalt und Nickel gegenüber Enchyträen antagonistisch war, wenn sie auf die Aktivität freier Metallionen bezogen wurde, während auf die Gewebekonzentration bezogen keine Interaktion sichtbar war. Dies lässt auch Rückschlüsse auf eine Konkurrenz der Metalle in der Toxikokinetik, nicht jedoch der Toxikodynamik zu. Im Gegensatz dazu war bei van Gestel und Hensbergen (1997) die Mischungstoxizität von Cadmium und Zink gegenüber Springschwänzen bezogen auf Gesamt-, Porenwasser- und Gewebekonzentration jeweils vergleichbar. Dies unterstreicht, dass Mischungstoxische Effekte und die jeweilige Bezugsgröße substanz-, boden- und speziesabhängig sind.

Gainer et al. (2018) untersuchten die Toxizität von Mineralölkohlenwasserstoffen gegenüber sechs Standardbodenorganismen und ordneten diese nach beobachteter Effektstärke. Hier zeigte sich, dass zwar CA und IA beide die Sensitivität der Testorganismen überschätzten, also konservativ waren, jedoch die Anordnung im Sensitivitäts-Ranking sich zwischen den Modellen unterschied. Dennoch kann die Kombination aus Multispezies-Daten und Mischungstoxizität, v.a. in Verbindung mit einem konservativen CA-Modell, als sehr aussagekräftig betrachtet werden. Allerdings basieren SSD auf einer Vielzahl empirischer Daten, die nur für wenige Substanzen existieren.

Die Zusammensetzung der Testböden kann einen großen Einfluss auf die Mischungstoxizität haben. Jegede et al. (2020) konnten zeigen, dass Bodeneigenschaften wie die KAK in fünf Testböden die Toxizität von Schwermetallmischungen gegenüber Milben besser erklären konnte als gemessene Gesamtmetallgehalte. Zudem konnte, ebenfalls in Abhängigkeit vom Testboden im Bereich des EC₁₀ stärkere Synergismen festgestellt werden als beim EC₅₀. U.a. in der niederländischen (Boivin et al., 2006) sowie der deutschen Gesetzgebung zum Bodenschutz (BBodSchV; Bundesgesetzblatt, 2020) spielen Ton- und organischer Gehalt der Böden eine hervorgehobene Rolle bei der Festlegung von Richtwerten. Abseits der Mischungstoxizität konnten Römbke et al. (2021) nachweisen, dass die Normalisierung von Arsen-Toxizitätswerten von Bodenorganismen auf Basis von Endpunkt-spezifischen Korrelationen mit Bodeneigenschaften geeignet zur Ermittlung von Prüfwerten ist. Der Einfluss der

Bodenparameter Ton- und organischer Gehalt auf die Mischungstoxizität stehen daher u.a. in diesem Projekt im Fokus.

3 Fragestellung und Studiendesign

3.1 Zielsetzung und Fragestellung der Studie

In Kapitel 1 wurde die Notwendigkeit zur Beschreibung Mischungstoxischer Effekte, insbesondere in landwirtschaftlichen Böden, beschrieben. Die folgende Studie möchte zentrale Fragen zur Ausprägung von Mischungstoxizität in verschiedenen Organismen mehrerer Trophiestufen unter dem Einfluss unterschiedlicher Bodeneigenschaften untersuchen. Dafür soll eine für landwirtschaftliche Böden realistische und relevante Stoffmischung herangezogen werden, die sowohl in effektiven als auch umweltrelevanten Konzentrationen untersucht werden soll. Unter Berücksichtigung dieser verschiedenen Parameter ergeben sich folgende Forschungsfragen:

1. In welchem Boden weisen die Testsubstanzen die höchste Toxizität auf, und welchen Einfluss haben die Bodeneigenschaften Ton und organischer Gehalt auf die Ausprägung der Mischungstoxizität?
2. Welche Testorganismen sind gegenüber den Testsubstanzen am sensitivsten, und wie unterscheidet sich die Ausprägung von Mischungstoxizität zwischen den Testorganismen?
3. Welche Mischungstoxische Ausprägung, also Antagonismus, Additivität oder Synergismus, ist am häufigsten zu beobachten? Lässt sich mit dem CA-Modell ein Großteil der beobachteten Ausprägungen abdecken? Lassen sich zudem Mischungstoxische Effekte über die jeweilige Gewebekonzentrationen der Schadstoffe erklären?
4. Ist die erstellte Substanzmischung in der Lage, auch in umweltrelevanten Konzentrationen signifikante toxische Effekte zu erzeugen und, wenn ja, lassen sich diese auf Mischungstoxische Interaktionen zurückführen?
5. Welche Empfehlungen lassen sich für die ökotoxikologische Risikoabschätzung von Stoffgemischen und deren Mischungstoxischen Effekten im regulatorischen Kontext aus den Ergebnissen ableiten?

Anhand dieser Fragestellung wurde ein Studiendesign entwickelt, das all die dargestellten Parameter zu berücksichtigen und die entsprechenden Forschungsfragen so gezielt wie möglich zu beantworten versucht. Im Folgenden sollen die jeweiligen Auswahlkriterien für die verschiedenen Testparameter dargestellt werden.

3.2 Auswahlkriterien für die einzelnen Testparameter

3.2.1 Testsubstanzen

Die Auswahl der Testsubstanzen erfolgte anhand mehrerer zu erfüllender Kriterien:

- ▶ Toxizität ggü. Bodenorganismen oder erwartbarer Einfluss auf die Mischungstoxizität
- ▶ Ein sehr wahrscheinliches Vorkommen in landwirtschaftlichen Böden durch direkten oder indirekten/ubiquitären Eintrag sowie ausreichend Daten zur Berechnung des PEC
- ▶ Eine hohe Persistenz, sodass eine Akkumulation in Böden wahrscheinlich ist

Anhand dieser Kriterien wurden vier Substanzen ausgewählt, von denen zwei eher den ubiquitären Schadstoffen mit überwiegend indirektem Eintragsweg und zwei den Agrochemikalien mit direktem Eintragsweg in landwirtschaftliche Böden zugerechnet werden können. Vorkommen, Eigenschaften, Umweltverhalten sowie Toxizität dieser Stoffe sollen hier erläutert werden.

3.2.1.1 Fluoranthen

Fluoranthen ist ein Repräsentant der Stoffgruppe PAK. Diese bestehen aus mehreren kondensierten aromatischen Ringsystemen und zählen zu den wichtigsten und meist erforschten Umweltschadstoffen. Die US EPA (Environmental Protection Agency) hat aus über 100 PAK-Verbindungen 16 besonders häufige und damit repräsentative Substanzen zu prioritären Schadstoffen erklärt. Die sogenannten PAK16 umfassen aus 2-6 Ringen bestehende Moleküle. Fluoranthen besteht aus vier Ringen und bildet somit strukturell einen guten Repräsentanten für die PAK16 dar. Zudem gehört Fluoranthen häufig zur größten in Umweltproben gefundenen PAK-Fraktion mit 16- 26% (Aichner et al., 2015, 2013; Gocht et al., 2007).

Die lokal höchsten Stoffmengen an PAK in Böden werden vermutlich auf ehemaligen Industrieanlagen und bei Unfällen erreicht (Huesemann, 2004) und können Konzentrationen von bis zu 2.000 mg/kg Trockenboden (alle im Folgenden genannten Bodenkonzentrationen beziehen sich immer auf den Trockenboden) erreichen (Liste und Felgentreu, 2006). Darüber hinaus können PAK jedoch noch über andere Wege in Böden eingebracht werden, die zwar in der Höhe nicht die o.g. Konzentrationsbereiche erreichen, jedoch stärker in der Fläche stattfinden als lokale Verschmutzungsereignisse. Zu diesen gehören u.a. die atmosphärische Deposition von durch Verkehr und Verbrennungsprozesse (Dreij et al., 2020) sowie Kaminöfen aus Privathaushalten entstehende PAK (Kahle, 2021), welche u.a. mit zunehmender Nähe zu Industrieanlagen zu erhöhten Konzentrationen in Waldböden (0,1 – 4,8 mg Σ PAK/kg, Aichner et al., 2015, 2013) bzw. in deren Humusschicht führt (Riek et al., 2021). Auch in ländlichen Regionen Deutschlands konnte eine Erhöhung der Bodenkonzentration von PAK allein über atmosphärische Deposition von ca. 3 μ g/kg/Jahr gemessen werden (Gocht et al., 2007). In urbanen Böden Stockholms wiederum lagen die absoluten PAK-Werte bei einem Median von 2,8 mg/kg und einem Maximalwert von 54 mg/kg (Median Fluoranthen: 356 μ g/kg, Dreij et al., 2020). Auch in den Niederlanden wurden vergleichbare PAK-Bodenkonzentrationen mit Medianwerten von 194 (Grünland) bis 1103 μ g/kg gemessen (Urbaner Boden, Bleeker et al., 2003).

Zum anderen können während Hochwasserereignissen relevante Mengen an PAK über Flusssedimente in Überschwemmungsebenen und Flussauen eingebracht werden, mit daraus resultierenden Bodenkonzentrationen von z.B. 0.1 – 80 mg/kg an Rhein, Mosel oder Saar bzw. 0.02 – 50 mg/kg weltweit (Gocht et al., 2001; Pies et al., 2007).

PAK gelten grundsätzlich als genotoxisch (Henkler et al., 2012). Durch ihre gute Fettlöslichkeit und ihre aromatische Ringstruktur sind sie in der Lage, den Zellkern zu erreichen und sich zwischen zwei DNA-Bausteine einzufügen („intercalative binding“, Wang et al., 2009). Hier können Sie durch Elektronentransfer zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativem Stress führen, der in der Folge karzinogen im Menschen wirken kann (Jeng et al., 2021; Kovacic and Jacintho, 2005). In Pflanzen kann oxidativer Stress wiederum die Photosynthese beeinträchtigen (Kreslavski et al., 2017). Insgesamt ist die Toxizität deutlich höher als gegenüber anderen unpolaren Stoffen wie z.B. Mineralölkohlenwasserstoffen. Im Vergleich verschiedener Bodenorganismen ist die Toxizität gegenüber Bodeninvertebraten und Mikroorganismen am höchsten und deutlich reduziert gegenüber Pflanzen (**Abbildung 1** EC50-Werte verschiedener Organismengruppen).

In dieser Studie wird Fluoranthen als Stellvertreter der Stoffgruppe PAK verwendet. In Bezug auf Bodenorganismen wirkt Fluoranthen ebenfalls am toxischsten gegenüber Bodeninvertebraten und Mikroorganismen. Der EC₅₀ für die Reproduktion der Standardtestinvertebraten *Enchytraeus crypticus* und *Folsomia fimetaria* liegt bei 61 bzw. 51 mg/kg (Sverdrup et al., 2002a, 2001), während EC₅₀-Werte für die Keimungsrate von Pflanzen bei 750 mg/kg oder höher liegen

(Sverdrup et al., 2003). Diese Werte liegen demnach teilweise deutlich über den zu erwartenden Umweltbodenkonzentrationen (Deutschland: 92 µg/kg im Median, Aichner et al., 2013), sodass für Fluoranthen als Einzelsubstanz zunächst kein Umweltrisiko zu erwarten wäre.

Fluoranthen gilt als persistent bzw. schwer abbaubar, jedoch mit stark variierenden DT_{50} -Werten (Halbwertszeit) in Böden, welche zwischen 50 (Cui et al., 2016) und 300 Tagen liegen (Park et al., 1990). Neben seiner toxischen Eigenschaften gilt Fluoranthen auch als bioakkumulativ und wird daher von der ECHA als PBT-Substanz (persistent, bioaccumulative and toxic) geführt (ECHA, 2023). Somit erfüllt Fluoranthen alle drei Kriterien als geeignete Testsubstanz und ist überdies als Repräsentant der Stoffgruppe PAK, welche seit Jahrzehnten im Fokus der Umweltforschung steht und dadurch zahlreiche Toxizitäts- und Umweltdaten sowie analytische Methoden zur Verfügung stehen, eine gute projektinterne Referenz für andere, weniger gut erforschte Substanzen.

3.2.1.2 DEHP

Eine große Gruppe anthropogener Stoffe mit ubiquitärem Eintrag in nahezu alle Umweltkompartimente stellen die Phthalate dar, die als Plastikweichmacher verwendet werden und daher in sehr großen Mengen hergestellt werden (> 1 Mio. Tonnen/Jahr in Westeuropa, Anfang 2000er Jahre). Das meistproduzierte Phthalat ist Di(2-Ethylhexyl)-Phthalat (DEHP); seine ubiquitäre Verbreitung lässt sich sehr gut daran veranschaulichen, dass selbst in arktischer Luft eine Konzentration von 0,22 ng DEHP/m³ gemessen werden konnte, aber eben auch in nahezu allen untersuchten Gewässern und Böden (Review: Gao und Wen, 2016). Neben Gewässern und Sedimenten erreicht DEHP durch Klärschlammdeponierung (Tran et al., 2015) sowie die vermehrte Freisetzung aus landwirtschaftlichen Plastikfolien im Extremfall sehr hohe Bodenkonzentrationen von bis zu 63 mg/kg (Plaza-Bolaños et al., 2012), wobei die Hintergrundkontamination von DEHP in nicht intensiv genutzten Böden eher im Bereich von 30-200 µg/kg liegt (Guo et al., 2021; Hu et al., 2005; Ma et al., 2013; D. Wang et al., 2021). Unter Berücksichtigung des Eintrags über Klärschlamm wurde für DEHP ein PEC von 300 µg/kg ermittelt, während der experimentelle Wert zu diesen Berechnungen bei 160 µg/kg lag (Tran et al., 2015).

Für DEHP und Phthalate im Allgemeinen liegen deutlich weniger Toxizitätsdaten für Bodenorganismen vor als für PAK. Gleichzeitig lässt sich feststellen, dass viele der Toxizitätsstudien zu Phthalaten, im Gegensatz zu PAK, innerhalb der letzten 10 Jahre erstellt wurden und das überwiegend im asiatischen/chinesischen Raum, was zum Einen die zeitliche Aktualität als auch den geographischen Schwerpunkt dieser Art von Kontamination unterstreicht. Grundsätzlich konnten für die drei relevanten Organismengruppen Pflanzen, Mikroorganismen und Bodeninvertebraten toxische Effekte beobachtet werden, je nach Expositionsszenarien und Testspezies (Kim et al., 2019; Ma et al., 2018). Für die Reproduktion von *F. candida* konnten auf der einen Seite EC_{50} -Werte von 19 bzw. < 10 mg/kg ermittelt werden, (Kim et al., 2019; Zheng et al., 2022), auf der anderen Seite betrug der EC_{50} für DEHP gegenüber *Folsomia fimetaria* mehr als 5.000 mg/kg, DEHP war also quasi untoxisch (Jensen et al., 2001). Unter Einbezug molekularer Marker konnten toxische Effekte gegenüber *E. fetida* bereits ab 1 mg/kg für DnBP (Di-n-Butylphthalat) und DEHP festgestellt werden (Ma et al., 2017, 2016). Auch die Bodenenzymaktivität kann zumindest kurzfristig bereits ab 1 mg Phthalat/kg beeinträchtigt werden (Xie et al., 2010). Für Pflanzen wiederum wurde ein um 40% reduziertes Frischgewicht nach einer DBP-Exposition (Dibutylphthalat) von 50 mg/kg beobachtet (Kong et al., 2018).

Der DT_{50} für DEHP lag zwischen 26,3 und 30,8 Tagen in zwei chinesischen Böden (Xu et al., 2008) und 64 Tagen in französischem urbanem Boden (Tran et al., 2015). Die ECHA wiederum

benennt einen DT_{50} von 300 Tagen bei 12 °C im Boden, bezeichnet diesen Wert jedoch selbst als sehr konservativ und betont die hohe Variabilität der Abbaudaten von DEHP.

Auch wenn in den meisten Fällen die Bodenkonzentration über den erwarteten Effektkonzentrationen für Bodenorganismen liegt, so kann es dennoch zur Annäherung bzw. Überschneidung dieser Werte kommen, wenn ein sensitiver Organismus und ein hoch kontaminierter Boden zusammentreffen. Demnach erfüllt DEHP die Anforderungen weitgehend, es gibt vermehrt Evidenz in der Literatur für dessen Toxizität gegenüber *F. candida* (aber nicht für *F. fimetaria*) und Oligochaeten (zu denen auch die Enchyträen gehören) wie *E. fetida*. Zudem ist die weite Verbreitung von DEHP für konstant messbare Werte im hohen $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich gegeben, mit deutlichem Potenzial nach oben bei landwirtschaftlichen Anbauflächen. Die Halbwertszeit im Boden liegt potenziell niedriger als bei Fluoranthen, aber gilt immer noch als mäßig bis schwer abbaubar.

3.2.1.3 Fluazinam

Zu den verwendeten Agrarsubstanzen liegen die wenigsten Daten für Bodenkonzentrationen und Toxizität vor. Dies erschwert zwar die Toxizitätsabschätzung im Vorfeld, erhöht jedoch gleichzeitig die Relevanz dieser Studie.

Fluazinam wird im Obst- und Gemüseanbau als Fungizid verwendet, u.a. für Kartoffeln (EFSA, 2008) und Äpfel (Brühl et al., 2024). Es wird in Pestizidmischungen mehrmals jährlich aufs Feld gebracht bei einer gängigen Anwendungsmenge von etwa $10 \times 200 \text{ g}/\text{ha}$ im Abstand von 7 Tagen (EFSA, 2008). Fluazinam gilt als mittel bis stark persistent im Boden ($DT_{50} = 17,1 - 226$ Tage, EFSA 2008). Modellierungen aus diesen Daten ergaben bei regelmäßiger Applikation ein PEC im landwirtschaftlich genutzten Boden von max. $0,8 \text{ mg}/\text{kg}$ (EFSA, 2008), es wurden jedoch in Freilandmessungen auch Konzentrationen im Bereich von $1,15 - 2,1 \text{ mg}/\text{kg}$ in Kartoffelfeldern erfasst (Hakala et al., 2020, 2014; Niemi et al., 2009). Auch in der Vegetation und dem Boden von Gebieten, die an Apfelanbauflächen grenzen, konnte Fluazinam in Konzentrationen von durchschnittlich 44 bzw. $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ nachgewiesen werden (Brühl et al., 2024). Fluazinam war in Laborstudien auch in der niedrigsten getesteten Konzentration von $0,35 \text{ mg}/\text{kg}$ stark toxisch gegenüber Regenwürmern, was damit den PEC/5 (Sicherheitsfaktor) deutlich unterschritt. In einer Freilandstudie waren dagegen keine Effekte sichtbar. Für *F. candida* wurde ein NOEC $< 0,875 \text{ mg}/\text{kg}$ (No Observed Effect Concentration) ermittelt, was damit ebenfalls deutlich unter dem PEC/5 liegt (EFSA, 2008). Zudem wurde ein EC_{50} von $10,4 \pm 1,1 \text{ mg}/\text{kg}$ ggü. *F. candida* in sandigem Boden ermittelt (Wehrli et al., 2024).

Für die C- und N-Mineralisierung von Bodenmikroorganismen wurde bei Freilandkonzentrationen von Fluazinam kein Effekt festgestellt, ebenso für höhere Pflanzen, bei denen in Screening-Tests (u.a. Saataufbau) mit zehn Spezies nur für Gurke ein Effekt $> 25\%$ festgestellt wurde. In der Summe wurde auf Basis dieser und vieler anderer Toxizitätsdaten Fluazinam letztendlich die Zulassung zur Anwendung in der Landwirtschaft erteilt (EFSA, 2008). Außerhalb der Zulassungsstudien wurden die geringen Effekte auf Pflanzen bestätigt (Younes et al., 2020), während im Gegenzug Niemi et al. (2009) eine sehr hohe Toxizität von Fluazinam in einem Bakterien-Lumineszenztest und Mikrokosmenstudien feststellten.

Unter aeroben Laborbedingungen wurde im Boden bei 20°C, in Dunkelheit und einem pF-Wert von 2 im geometrischen Mittel ein DT_{50} von 61,5 Tagen ermittelt ($n = 10$, EFSA, 2008).

Somit erfüllt Fluazinam das Kriterium der Toxizität insbesondere gegenüber Bodeninvertebraten und Mikroorganismen, das der Persistenz im Boden und aufgrund seiner direkten Ausbringung auch das einer präzisen PEC-Berechnung.

3.2.1.4 Break-Thru® S-301

Als letzte Substanz wird ein sogenanntes Netzmittel, also eine Substanz, die die Oberflächenspannung herabsetzt und somit eine bessere Benetzbarkeit z.B. von Nutzpflanzenblättern mit einer Pestizidmischung ermöglicht, verwendet. Break-Thru® S 301 (im weiteren Verlauf als Break-Thru bezeichnet) gehört zu den Trisiloxanen bzw. den Organosiliconen, eine Stoffgruppe, die zunehmend als Netzmittel verwendet wird. Organosilicone im Allgemeinen sind in der Lage, die Wirksamkeit von Fungiziden synergistisch zu erhöhen; sie besitzen aber auch eine intrinsische, teils hohe Toxizität, werden jedoch aktuell nicht reguliert (Mullin et al., 2016).

Bisher liegen noch keine gemessenen oder modellierten Umweltkonzentrationen für Organosilicone vor. Für Organosilicone im Allgemeinen und Trisiloxane wurde eine erhöhte Persistenz im neutralen pH-Milieu von 6-8 sowie moderaten Temperaturen von 25 bzw. 12°C ermittelt (Knoche et al., 1991; Michel et al., 2014). Bei pH = 7 und T = 12°C, also bodenähnlichen Bedingungen, lag der DT₅₀ eines Polyether-Trisiloxans zwischen 151 und 289 Tagen (Michel et al., 2014). Zudem wurde für Trisiloxane nur eine geringe Mobilität im Boden beobachtet (Michel et al., 2016).

Eine grobe Abschätzung von langfristig akkumulierten Bodenkonzentrationen dieser Stoffgruppe wurde mittels eines Excel-Templates der britischen Gesundheits- und Sicherheitsbehörde vorgenommen (HSE, 2015). Die jeweils verwendeten Parameter orientierten sich an o.g. Studien sowie der Anwendung von Fluazinam und Herstellerangaben zu Break-Thru. Letztere empfehlen eine Ausbringung von 100 – 250 ml/ha, je nach Einsatzgebiet, sodass ein eher konservativer Wert von 150 ml/ha gewählt wurde. Weitere Annahmen waren, an Fluazinam orientiert, 10 Anwendungen im Abstand von 7 Tagen. Zudem wurde eine gleichmäßige Verteilung der Substanz über eine Bodentiefe von 5 cm sowie eine Bodendichte von 1,5 g/cm³ angenommen. Da die größten Unsicherheiten bei der Rückhaltung durch Pflanzen („crop interception“ CrI) und dem DT₅₀ liegen, wurden hier verschiedene Werte in einer 4x3-Matrix berechnet und zwar mit 3 CrI-Werten von 5, 20 und 50% (konstant für alle Anwendungszeitpunkte) sowie mit 4 DT₅₀-Werten von 50, 100, 200 und 300. Die hierbei ermittelten Maximalwerte liegen zwischen 0,7 und 3,0 mg/kg und sind im Detail in **Tabelle A 1** dargestellt.

Eine starke Toxizität von Trisiloxanen im ppm-Bereich wurde u.a. für Spinnmilben entdeckt (Cowles et al., 2000). Am häufigsten konnten toxische Effekte von Organosiliconen auf Bienen festgestellt werden (Fine et al., 2017; Walker et al., 2022). Zudem wurden diese Stoffe hinsichtlich ihres toxizitätsverändernden Einflusses auf Pestizide gegenüber Bienen untersucht; im Resultat erhöhte Break-Thru bei Co-Exposition die Toxizität aller getesteten Pestizide (Wernecke et al., 2022). Auch andere siloxanhaltige Netzmittel zeigten diesen synergistischen Effekt (Walker et al., 2022). Für Bodenorganismen liegen für diese Substanz noch keine Toxizitätsdaten vor.

Demnach erfüllt Break-Thru die erforderlichen Kriterien aufgrund der geringen verfügbaren Daten nur teilweise, wurde jedoch aufgrund seines Potenzials zur Beeinflussung der Mischungstoxizität dennoch in das Portfolio an Testsubstanzen mitaufgenommen. Als Agrochemikalie ist das Vorhandensein im Boden in relevanten Konzentrationen gegeben, zudem gibt es Belege für die hohe Persistenz von anderen Trisiloxanen. Toxizitätsdaten für Bodenorganismen fehlen bisher, sodass diese Studie hiermit eine bestehende Lücke füllen kann.

3.2.2 Testorganismen

Die Testorganismen wurden anhand folgender Kriterien ausgewählt:

- ▶ Toxizität ggü. PAK als weit verbreitete und untersuchte Stoffgruppe
- ▶ Repräsentation von mindestens zwei Trophiestufen
- ▶ Unterschiedliche Aufnahmewege
- ▶ Standardisierte Testguidelines, im Optimalfall relevant für Regulatorik

Zur Eingrenzung der potentiell in Fragen kommenden Taxa wurde zunächst ein Literaturscreening mit insgesamt 27 Studien durchgeführt, in dem die Toxizitätswerte, in diesem Fall der EC₅₀-Wert, für die drei PAK Fluoranthren, Phenanthren und Pyren ggü. den drei Organismengruppen Pflanzen, Mikroorganismen und Bodeninvertebraten zusammengefasst und gegenübergestellt wurden. Viele Studien enthielten eine Mehrzahl der Stoffe und/oder Organismen. Die Auswertung (**Abbildung 1** EC₅₀-Werte verschiedener Organismengruppen) zeigte, dass grundsätzlich die Bandbreite an EC₅₀-Werten sehr hoch ist, was jedoch u.a. an den unterschiedlichen Testböden, Organismen und Substanzen liegt – diese Variabilität an Testparametern wurde in Kauf genommen, um einen ausreichend hohen Datensatz generieren zu können. Insgesamt wird dennoch deutlich, dass Mikroorganismen und Invertebraten ungefähr gleich sensitiv ggü. PAK sind, während Pflanzen deutlich weniger sensitiv als die beiden anderen Gruppen sind. Dies zeigt sich u.a. auch darin, dass in den untersuchten Studien häufig gar nicht erst EC₅₀-Werte ermittelt werden konnten, da bei hohen Konzentrationen von 1,000 mg/kg oder auch noch höher keine ausreichende Toxizität festgestellt wurde.

Somit wurde die Auswahl der Testorganismen auf die beiden Organismengruppen Mikroorganismen und Bodeninvertebraten eingegrenzt. In Anbetracht der weiteren Kriterien wurden folgende Testorganismen bzw. -systeme als geeignet angesehen und für diese Studie festgelegt:

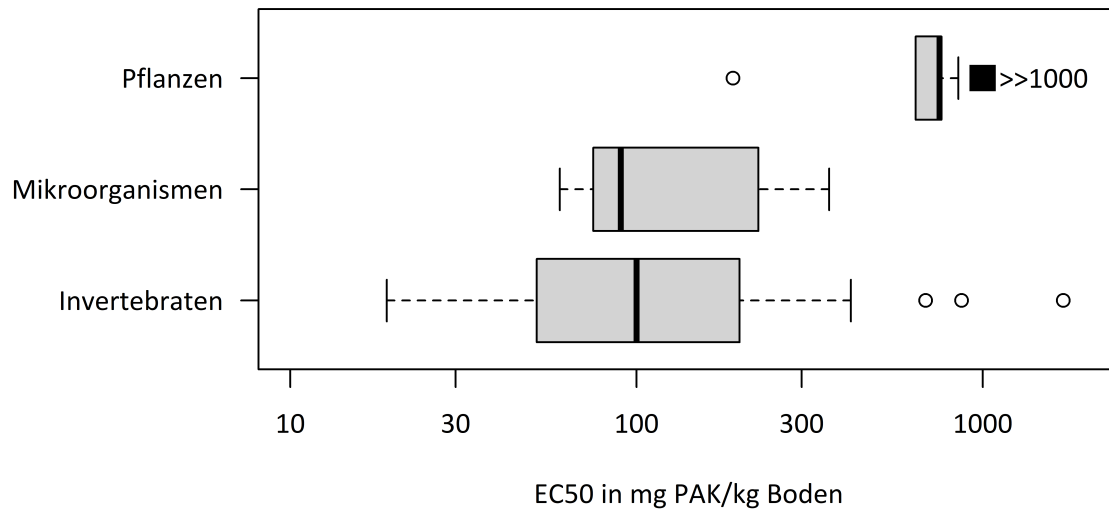
- ▶ Collembolen der Spezies *Folsomia candida* (Stamm: Arthropoda, Klasse: Collembola)
- ▶ Enchyträen der Spezies *Enchytraeus crypticus* (Stamm: Annelida, Klasse: Clitellata)
- ▶ Die mikrobielle Bodengemeinschaft

Diese Auswahl umfasst zwei Trophiestufen. So enthält die mikrobielle Bodengemeinschaft nahezu ausschließlich Primärproduzenten, -konsumenten und -destruente, während diese u.a. von Collembolen und Enchyträen konsumiert werden (Filsler, 2002). Zudem kann für jede dieser Organismen ein unterschiedlicher Aufnahmeweg von Schadstoffen angenommen werden. Während dies bei Collembolen überwiegend über das aufgenommene Porenwasser geschieht (Fountain and Hopkin, 2005), sind Enchyträen auch dazu in der Lage, Schadstoffe über die Haut aufzunehmen (Jager et al., 2003; Šmídová et al., 2021). Mikroorganismen wiederum besiedeln die Oberfläche von Bodenpartikeln und organischer Materie (Kanazawa and Filip, 1986) und sind somit in direktem Kontakt mit den dort gebundenen Schadstoffen.

Für alle ausgewählten Organismen gibt es standardisierte Testguidelines. Die in dieser Studie verwendeten sind jene der OECD, u.a. die Guidelines 232 und 220 für die Reproduktion von Collembolen (OECD, 2016a) und Enchyträen (OECD, 2016b), sowie die Guidelines 216 und 217 für die Stickstoff- (OECD, 2000a) und Kohlenstofftransformation der mikrobiellen Bodengemeinschaft (OECD, 2000b). Diese Guidelines sind für die Verwendung in Registrierung- und Zulassungsverfahren von Industriechemikalien und Pflanzenschutzmitteln geeignet und werden dort auch angewandt (BfR, 2025). Somit erfüllen die gewählten Testorganismen die hier gestellten Anforderungen.

Abbildung 1 EC₅₀-Werte verschiedener Organismengruppen

Dargestellt werden die EC₅₀-Werte für die Stoffe Fluoranthren, Phenanthren und Pyren zusammengefasst als Boxplots für die drei Organismengruppen Pflanzen, Mikroorganismen und Invertebraten in mg PAK/kg Trockenboden. Das schwarze Rechteck beim Boxplot Pflanzen symbolisiert die Werte, in denen kein EC₅₀-Wert ermittelt werden konnte und diese mind. über 1,000 mg/kg liegen müssen.



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

3.2.3 Testböden

In der Bodenökotoxikologie hat sich die standardmäßige Verwendung von sandigen Böden mit geringem organischem Gehalt, wie etwa Lufa 2.2, stark etabliert. Hintergrund ist, dass durch die geringe Absorptionsfähigkeit dieser Böden Schadstoffe tendenziell leichter bioverfügbar sind; somit bilden diese Böden in der Regel ein Worst-Case Szenario ab. Diese Annahme kann allerdings für bestimmte Substanzen abweichen (Fischer et al., 2022, 2021). Zudem stellt die alleinige Fixierung auf Standardböden eine massive Simplifizierung der in der Umwelt anzutreffenden Variabilität an Boden(-arten) dar. Auf der anderen Seite ist eine umfassende Analyse aller relevanten Bodenvarianten mit ihren vielen, wechselseitig interagierenden Bodenparametern nicht leistbar. Basierend auf (Fischer et al., 2021) wurde daher als Mittelweg ein Set von drei Böden aus der Refesol-Systematik (<https://www.refesol.de/aufbaudessystems.shtml>) zusammengestellt: einen sandigen Standardboden (Refesol 01- A), sowie einen sandigen Boden mit erhöhtem organischen Anteil (Refesol 04-A) und einem lehmigen Boden mit erhöhtem Tonanteil (Refesol 05-G;Tabelle 3). Die Böden sind so gewählt, dass sie sich bei pH, Tongehalt und organischem Gehalt in nur einem von diesen drei zentralen Bodenmerkmalen markant von dem Standardboden unterscheiden. So können Unterschiede im Toxizitätsmuster leichter dem erhöhten Ton- bzw. organischen Gehalt zugerechnet werden. Zudem können verschiedene Bodentypen jeweils andere Expositionsszenarien repräsentieren. So besteht, wie in 3.2.1.1 dargestellt, besonders für Auenböden durch fluviale Sedimentation ein erhöhtes Risiko an PAK-Einträgen. Diese Böden werden annähernd durch den lehmigen Boden, ein Fluvisol, repräsentiert.

Tabelle 3 **Eigenschaften der Testböden**

Analyse der Bodeneigenschaften wurde durchgeführt von IME Schmallenberg

Substanz	Sandiger Boden	Sandig-organischer Boden	Lehmiger Boden
Refesol-Systematik	01-A	04-A	05-G
Bodentyp	Braunerde	Gley-Podsol	Gley Marsch
Bodenart	Schwach lehmiger Sand	Schwach schluffiger Sand	Sandig lehmiger Schluff
Sandanteil in %	69,8	79,7	21,9
Schluffanteil in %	24,4	14,9	59,0
Tonanteil in %	5,9	5,4	19,1
Organischer Kohlenstoffanteil in %	0,95	2,89	2,10
Kationenaustauschkapazität (KAK) in cmol/kg	40	102	115
Maximale Wasserhaltekapazität (WHK _{max}) in g/kg	287	346	666
pH (CaCl ₂)	5,72	5,27	5,80

3.3 Testkonzentrationen

3.3.1 Einzelsubstanzen

Zu Beginn sollten für alle Testorganismen, Böden und Substanzen Dosis-Wirkungskurven und der jeweilige EC₅₀-Wert ermittelt werden. In Vortests mit sehr weitem Konzentrationsbereich und i.d.R. den Konzentrationen 0,1 – 1 – 10 – 100 – 1.000 (– 10.000) mg/kg wurde zunächst ein sinnvoller Konzentrationsbereich ermittelt, welcher im Optimalfall die zentralen Endpunkte Reproduktion bzw. Bodenatmung und Nitratgehalt von 0 bis 100% Effektstärke abdeckt. Innerhalb des ausgewählten Konzentrationsbereichs wurden dann eine geometrische Reihe aus 5 Testkonzentrationen angelegt, wobei ein Faktor von 3,2 zwischen den Konzentrationen nicht überschritten werden sollte. In Einzelfällen wurden Tests bei nicht aussagekräftigen Dosis-Wirkungstests mit speziell angepassten, ggf. nicht geometrischen Testkonzentrationen wiederholt. In gewissen Substanz-Organismus-Kombinationen konnten aufgrund zu geringer Toxizität keine geeigneten Testkonzentrationen ermittelt werden. Wenn, dann waren jedoch Effektkonzentrationen in einer Substanz-Organismus-Kombination für alle drei Böden möglich. Die höchste getestete Konzentration lag für alle Substanzen bei 1.000 mg/kg. Eine Ausnahme wurde für Break-Thru im Enchyträentest gemacht: da für den sandigen Boden ein EC₅₀-Wert < 1.000 mg/kg ermittelt werden konnte, nicht jedoch für die anderen beiden Testböden, wurden für den sandig-organischen und den lehmigen Testboden Enchyträen-Reproduktionstests mit Konzentrationen von bis zu 10.000 mg/kg angesetzt (**Abbildung 9**). Effektive Substanzmischungen

Aus den Effektkonzentrationen der Einzelsubstanzen mussten für jeden Testorganismus ein separates Design für die Zusammensetzung der Substanzmischungen im Effektbereich erstellt werden. Hintergrund ist, dass für jeden Testorganismus eine andere Auswahl an Testsubstanzen

in Frage kam, entweder aufgrund der unterschiedlichen Toxizität oder dem Einfluss auf das jeweilige Testsystem.

Beim Springschwanz *F. candida* konnten nur für die Testsubstanzen Fluoranthren und Fluazinam EC₅₀-Werte ermittelt werden, während für DEHP keine Toxizität im Konzentrationsbereich < 1.000 mg/kg gefunden wurde (s. 5.1). Da Break-Thru grundsätzlich nicht mit dem Testsystem zur Reproduktion von Springschwänzen vereinbar war (s. **Abbildung A 9**), musste diese Substanz für die effektiven Substanzmischungen komplett gestrichen werden. Somit wurden für Springschwänze alle möglichen binären und ternären Substanzmischungen aus drei Testsubstanzen (inkl. Einzelsubstanzen als Referenz) untersucht, von denen zwei als toxisch und eine als nicht toxisch eingestuft wurden. In allen Substanzmischungen sollte die Toxizität von 1 TU enthalten sein (vgl. 2.2). Dafür wurden in Mischungen mit nur einer toxischen Substanz diese 1 TU durch die Applikation der EC₅₀-Konzentration von dieser einen Substanz bereitgestellt, während in Substanzmischungen mit zwei toxischen Substanzen jede von diesen mit der Hälfte ihrer EC₅₀-Konzentration jeweils 0.5 TU zur Gesamtoxizität von 1 TU beitrugen. Das nicht toxische DEHP wurde dabei als passive Substanz behandelt, die nicht zur Toxizität der Mischung beitrug, aber die Adsorptionskinetik zwischen Boden und der Substanzmischung mit beeinflussen konnte. Da derartige kinetische Prozesse konzentrationsabhängig sind, sollte DEHP als passive Substanz immer im Konzentrationsbereich seiner Co-Kontaminanten liegen. Bei nur einer toxischen Substanz wurde DEHP daher in exakt derselben Konzentration appliziert, während bei mehreren toxischen Substanzen das geometrische Mittel aus deren applizierten Konzentrationen gewählt wurde (**Tabelle 4**).

Tabelle 4 Zusammensetzung der effektiven Substanzmischungen für *F. candida*-Tests

Die Konzentration von DEHP resultiert aus den Konzentrationen c der anderen Substanzen in der jeweiligen Behandlung. Ft = Fluoranthren, Fz = Fluazinam.

Behandlung	Fluoranthren	Fluazinam	DEHP
0 (Lösemittelkontrolle)	-	-	-
Ft	1 TU	-	-
Fz	-	1 TU	-
Ft-Fz	0.5 TU	0.5 TU	-
Ft-DEHP	1 TU	-	= c(Ft)
Fz-DEHP	-	1 TU	= c(Fz)
Ft-Fz-DEHP	0.5 TU	0.5 TU	= $\sqrt{c(Ft) \cdot c(Fz)}$

Der Weißwurm *E. crypticus* war zwar insgesamt weniger sensitiv ggü. den getesteten Einzelsubstanzen, dafür war der dazugehörige Reproduktionstest nicht durch Break-Thru beeinträchtigt. Somit konnten alle vier Testsubstanzen in die Substanzmischung eingebracht werden, wobei auch hier, analog zu den Springschwanztests, DEHP als passive Substanz aufgrund fehlender EC₅₀-Werte < 1.000 mg/kg behandelt wurde. Demnach trugen die drei toxischen Substanzen Fluoranthren, Fluazinam und Break-Thru mit jeweils 0,33 bzw. 0,67 TU zur Gesamtoxizität von 1 bzw. 2 TU bei, dies entsprach jeweils 1/3 bzw. 2/3 der jeweiligen EC₅₀-Werte. DEHP wurde auch hier, analog zu den Springschwanzversuchen, in der Höhe des geometrischen Mittels aus den anderen drei applizierten Konzentrationen eingebracht. Aufgrund der geringeren Sensitivität von *E. crypticus* wurden für die quaternäre

Substanzmischung sowohl 1 als auch 2 TU getestet, was eine Verdopplung der Testkonzentrationen von 2 TU ggü. 1 TU bedeutete.

Tabelle 5 Zusammensetzung der effektiven Substanzmischungen für *E. crypticus*-Tests

Die Konzentrationen c von DEHP beziehen sich auf die Konzentrationen der anderen Substanzen in der jeweiligen Behandlung

Behandlung	Fluoranthen	Fluazinam	Break-Thru	DEHP
0 (Lösemittelkontrolle)	-	-	-	-
1 TU	0,33 TU	0,33 TU	0,33 TU	$\sqrt[3]{c(Ft)*c(Fz)*c(BT)}$
2 TU	0,67 TU	0,67 TU	0,67 TU	$\sqrt[3]{c(Ft)*c(Fz)*c(BT)}$

Für die mikrobielle Bodengemeinschaft war nur Fluazinam ausreichend toxisch, um EC₅₀-Werte < 1.000 mg/kg für die Bodenatmung bzw. Nitratgehalt zu ermitteln. Demnach wurden für dieses Testsystem keine effektiven Substanzmischungen untersucht, sondern nur die umweltrelevanten.

3.3.2 Umweltrelevante Substanzmischungen

Die Testkonzentrationen der umweltrelevanten Substanzmischungen orientierten sich an den jeweiligen Abschätzungen der PEC-Werte. Da die tatsächlichen Umweltkonzentrationen von Schadstoffen einer breiten Streuung unterliegen, wurde versucht, einen relevanten Bereich um diese PEC-Werte herum abzubilden. Dafür wurden zusätzlich zu den PEC-Werten die Behandlungen PEC_{hoch} und PEC_{niedrig} getestet, in welchen die Konzentrationen der ubiquitären Schadstoffe um den Faktor 5 und die der Agrochemikalien um den Faktor 4 größer bzw. kleiner als die jeweiligen PEC-Konzentrationen waren (s. **Tabelle 6**).

Aufgrund der niedrigen Konzentrationen wurde für den Reproduktionstest mit *F. candida* kein Einfluss von Break-Thru auf die Testergebnisse angenommen, wenn er auch nicht endgültig ausgeschlossen werden kann. Eine nähere Erläuterung ist unter **5.1.1** zu finden.

Tabelle 6 Zusammensetzung der umweltrelevanten Substanzmischungen für alle Tests

Angegeben sind die jeweiligen Bodenkonzentrationen der Substanzen in mg/kg Trockenboden

Behandlung	Fluoranthen	DEHP	Fluazinam	Break-Thru
0 (Lösemittelkontrolle)	-	-	-	-
PEC _{niedrig}	0,02	0,02	0,1	0,1
PEC	0,1	0,1	0,4	0,4
PEC _{hoch}	0,5	0,5	1,6	1,6

4 Material und Methoden/experimentelle Umsetzung

4.1 Testböden und Beaufschlagung

In allen Tests wurden die unter 3.2.3 beschriebenen Freilandböden der Refesol-Systematik vom IME Fraunhofer in Schmallenberg, Deutschland verwendet. Die Böden wurden luftgetrocknet im Dunkeln bei 17°C gelagert. Für jeden Test wurden die Böden mit den jeweiligen Testsubstanzen mittels Aceton als Trägersubstanz in Schraubdeckelgläsern beaufschlagt. Die Substanzen wurden dafür zunächst in Aceton gelöst und diese Lösung in Anlehnung an das Protokoll von Brinch et al. (2002) nur auf einen Teil des Trockenbodens pipettiert, um negative Effekte auf die im Trockenboden befindliche mikrobielle Bodengemeinschaft durch den Kontakt mit Aceton zu minimieren. Diese Methode ist weit verbreitet und ein Verhältnis von 1 Teil beaufschlagtem zu 3 Teilen unbeaufschlagtem Boden hat sich in vielen Studien bewährt (z.B. Castro-Ferreira et al., 2012; Droge et al., 2006; Paumen et al., 2008). Dabei wurde für den beaufschlagten Boden immer das gleiche Verhältnis von 0,2 ml Aceton pro g Trockenboden gewahrt, was ebenfalls ungefähr dem Verhältnis in anderen Studien mit dieser Methodik entspricht (z.B. Kobetičová et al., 2011; Paumen et al., 2008; Smith et al., 2006; Sverdrup et al., 2002).

Für die Tests mit Bodeninvertebraten und die mikrobielle Bodengemeinschaft wurden jeweils leicht variierte Protokolle verwendet. So wurden für die Invertebratentests verschiedene Verdünnungen der Acetonlösungen auf $\frac{1}{4}$ des später verwendeten Trockenbodens pipettiert, unmittelbar danach und noch einmal 20 min. später gründlich umgerührt und das Aceton über Nacht unter einem Abzug verdampfen gelassen. Am folgenden Tag wurden die verbleibenden $\frac{3}{4}$ des Trockenbodens zugegeben und gründlich eingerührt. Anschließend wurde der Boden mit Reinstwasser (Milli-Q®, Merck, Darmstadt) auf 50% der maximalen Wasserhaltekapazität (WHK_{max}) eingestellt, noch einmal gründlich gerührt und bis zum Teststart bei fast komplett verschlossenem Deckel im Dunkeln und 17°C für 7 Tage gelagert. Zu Testbeginn wurde der jeweilige Wasserverlust ausgeglichen und alle Testböden wieder auf 50% der WHK_{max} eingestellt

Für die Tests mit der mikrobiellen Bodengemeinschaft wurden $\frac{3}{4}$ an Trockenbodenäquivalent zunächst mit Reinstwasser auf 50% der WHK_{max} eingestellt und bei 20° C im Dunkeln bei leicht verschlossenem Deckel für 7 Tage vorinkubiert. Dies diente dazu, die mikrobielle Aktivität in den Böden vor der Bodenbeaufschlagung hochzufahren, welche sich etwa 7-10 Tage nach Bodenbefeuchtung stabilisiert (Chowdhury et al., 2011). Es wurde ebenfalls $\frac{1}{4}$ des Trockenbodens mit Aceton beaufschlagt, aus logistischen Gründen allerdings nur mindestens 2 Stunden Zeit zur Evaporation gegeben. Optisch war das Aceton bereits nach ca. 30 min. komplett verdampft und eventuelle Acetonrückstände konnten in einem Vorversuch durch Abwiegen des Bodens vor und 2 Stunden nach Beaufschlagung mittels einer Feinwaage (d=0,1 mg, ENTRIS124I-1S, Sartorius, Göttingen) nicht nachgewiesen werden, daher ist nicht von einem direkten negativen Einfluss durch Acetonrückstände bei einer auf 2 Stunden verkürzten Evaporationsdauer auszugehen. Der beaufschlagte Trockenboden wurde dann mit dem vorinkubierten Boden gründlich verrührt, anschließend auf 50% der WHK_{max} eingestellt und für die weiteren Tests bei nur leicht zugeschraubtem Deckel und 20°C im Dunkeln weiter inkubiert.

In allen Tests wurden für alle Böden Lösemittelkontrollen in derselben Weise hergestellt, wie oben beschrieben, und alle Ergebnisse der mit Testsubstanzen beaufschlagten Böden in der Auswertung auf diese bezogen. Für die Invertebratentests wurden zudem Negativkontrollen als Referenz getestet, welche ohne Acetonkontakt nur mit Reinstwasser auf 50% der WHK_{max} eingestellt wurden. Weiterhin wurden für alle Tests Positivkontrollen hergestellt, wobei wässrige Kupferchloridlösungen auf den Trockenboden pipettiert, eingerührt und in der

gleichen Weise gelagert wurden wie die anderen Testböden. Für die mikrobielle Bodengemeinschaft wurde dafür ebenfalls $\frac{3}{4}$ des Bodens vorinkubiert. Die Kupferkonzentrationen entsprachen den jeweiligen in Vorversuchen ermittelten EC_{50} -Werten für die Reproduktion der Bodeninvertebraten bzw. der Bodenatmung, und zwar 400 mg Cu/kg für *F. candida*, 122 mg Cu/kg für *E. crypticus* und 900 mg/kg für die mikrobielle Bodenatmung.

4.2 Testorganismen und Kulturpflege

4.3 Ökotoxikologische Tests

4.3.1 Reproduktionstests mit Bodeninvertebraten

4.3.1.1 Collembolen *F. candida*

Der Reproduktionstest für Collembolen wurde in Anlehnung an die entsprechende OECD-Richtlinie 232 durchgeführt (OECD, 2016a). Dafür wurden jeweils $30 \pm 0,3$ g Feuchtboden in 100 ml Schnappdeckelgläser eingewogen, 10 juvenile Collembolen der Spezies *F. candida* im Alter von 10-12 Tagen eingesetzt, eine Spatelspitze Trockenhefe zugegeben und die fest verschlossenen Gefäße für 28 Tage bei 20 °C und einem 16h:8h hell:dunkel-Zyklus in einem Brutschrank inkubiert. Die Gefäße wurden 2x pro Woche für mind. 10 Minuten belüftet und Trockenhefe nachgegeben.

Bei der Aufschwemmungsmethode wurde nach 28 Tagen der Boden mit 100 ml Leitungswasser in Plastikgefäße gespült, mit einem Spritzer Tinte versetzt (Füllhaltertinte 4001, Pelikan, Hannover) und die Gefäßoberfläche fotografiert. Die Anzahl juveniler und adulter Tiere wurde später manuell mit dem Programm ImageJ ermittelt, die Probenidentität wurde dabei mittels Verblindung verschleiert. Ein Test galt gemäß der OECD-Richtlinie als valide, wenn durchschnittlich 80% der Adulten und im Durchschnitt mind. 100 Juvenile in der Lösemittel- oder Negativkontrolle wiedergefunden werden konnten. Nach dem Fotografieren wurden die adulten Tiere mit einem Metallspatel in eine Aktivkohleschale transferiert. Nach mind. 1 h (*F. candida* benötigen i.d.R. ca. 35 min. zur Defäkation, Thimm et al., 1998) wurden die Adulten in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup transferiert und bei -20 °C eingefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden die Adulten für mind. 2 h gefriergetrocknet und anschließend mit einer Ultrafeinwaage ($d=0,01$ mg, Cubis® MCA225S-2S00-I, Sartorius, Göttingen) das Trockengewicht ermittelt.

Bei der Extraktionsmethode für die Vergleichstests mit Break-Thru wurde der Boden zum Testende nach 28 Tagen in einen Metallzylinder gegeben, dieser war am Boden mit einem groben Metallsieb und Mullbindengewebe verschlossen, sodass der Boden zurückgehalten wurde, Collembolen jedoch passieren konnten. Der Metallzylinder wurde in einen MacFadyen-Extraktor (EcoTech Umwelt-Messsysteme GmbH, Bonn) in ein Trichtersystem gestellt, das in ein mit 10 ml Ethylenglykol befülltes Auffanggefäß führt. Der Extraktionsprozess startete bei 25°C, mit einer Steigerung um 5°C alle 12 h, bis zur finalen Temperatur von 40°C. Das Trichtersystem wurde dabei mit einem Deckel verschlossen, um die Bodenfeuchte während des Extraktionsprozesses bestmöglich zu erhalten. Durch den Hitzegradienten im Extraktor wurden die Collembolen über den Trichter in das Auffanggefäß getrieben und dort gesammelt und konserviert. Die Zahl der gesammelten Juvenilen und Adulten wurde unter einem Binokular per Hand ausgezählt.

4.3.1.2 Enchyträen *E. crypticus*

Der Reproduktionstest für Enchyträen wurde entsprechend der OECD-Richtlinie 220 durchgeführt (OECD, 2016b). Dabei wurden je $20 \pm 0,2$ g Feuchtboden in 50 ml

Schnappdeckelgläser eingewogen, 10 juvenile Enchyträen der Spezies *E. crypticus* im Alter von 6 Wochen eingesetzt, eine Spatelspitze getrockneter und gemahlener Haferflocken zugegeben und die fest verschlossenen Gefäße ebenfalls für 28 Tage bei 20 °C und einem 16h:8h hell:dunkel-Zyklus in einem Brutschrank inkubiert. Die Gefäße wurden 2x pro Woche für mind. 10 Minuten belüftet und Haferflocken nachgegeben. Nach 28 Tagen wurden die Testgefäße mit 20 ml Leitungswasser, 5 ml Ethanol und 0,75 ml Bengalrosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) versetzt und über Nacht verschlossen stehen gelassen. Am Folgetag wurden die eingefärbten Bodenproben in ein GazeNetz mit der Maschenweite von 150 µm gekippt, die feinen Bodenpartikel mit viel Wasser ausgespült und die verbliebenen groben Bodenpartikel und Enchyträen in eine große weiße Auszählschale gespült. Die juvenilen und adulten, durch das Bengalrosa eingefärbten Enchyträen wurden mithilfe einer Lupe (1,5-fache Vergrößerung) und einem in der Schale eingezeichneten Raster per Hand ausgezählt, die Probenidentität wurde dabei mittels Verblindung verborgen. Ein Test galt gemäß der OECD-Richtlinie als valide, wenn durchschnittlich 80% der Adulten und im Durchschnitt mind. 25 Juvenile in der Lösemittel- oder Negativkontrolle wiedergefunden werden konnten. Adulte Tiere wurden mithilfe eines Metallspatels kurz in Reinstwasser gewaschen und anschließend in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup bei -20 °C eingefroren. Später wurden die Adulten über Nacht gefriergetrocknet und anschließend mit einer Ultrafeinwaage (d=0,01 mg, Cubis® MCA225S-2S00-I, Sartorius, Göttingen) das Trockengewicht ermittelt.

4.3.2 Mikrobielle Bodengemeinschaft

Die Stickstoff- und Kohlenstofftransformation der mikrobiellen Bodengemeinschaft wurde nach Vorgabe der OECD-Richtlinien 216 und 217 ermittelt (OECD, 2000b, 2000a). Für beide Endpunkte wurden die entsprechend 4.1 aufbereiteten Böden nach Beaufschlagung für 28 Tage bei 20 °C in Dunkelheit inkubiert. Es wurde 1x pro Woche der Wassergehalt angeglichen. Nach 28 Tagen wurden für die Kohlenstofftransformation 4 mg wasserfreie Glucose pro g Feuchtboden gleichmäßig in den Boden eingerührt. Anschließend wurden von jeder Behandlung 2-3 Pseudoreplikate hergestellt, bei denen jeweils 20 g Feuchtboden in 30 ml Rollrandgläser eingewogen wurden. Die Rollrandgläser wurden mittels Draht in 0,5-L Schottflaschen gehängt, in welche zuvor 20 ml NaOH (0,1 M) gegeben wurden und mit Deckeln mit Gummidichtung verschlossen. Es wurden in jedem Test 4 Blindproben, die jeweils keinen Boden enthielten, mitgeführt. Alle Proben wurden 24 h bei 22 °C in einem Brutschrank bei Dunkelheit inkubiert. Nach 24 h Inkubation wurden die Rollrandgläser aus den Schott-Flaschen genommen, 2 ml BaCl₂ (0,5 M) in alle Proben pipettiert und 3-4 Tropfen Phenolphthalein-Lösung als Indikator unmittelbar vor der Titration in die Schottflaschen gegeben. Nun wurden mit Hilfe einer Bürette HCl (0,1 M) tröpfchenweise unter Rühren in die Lösung gegeben, bis es zu einem Farbumschlag von rosa zu weiß kam. Die benötigte Menge an HCl bis zum Farbumschlag wurde in folgender Formel zur Berechnung des produzierten CO₂ verwendet:

$$\frac{(BW-VP)*2,2*100*100}{24 h *EW*\% TS} = \text{mg CO}_2 * 100 \text{ g}^{-1} \text{ TS} * \text{h}^{-1},$$

wobei BW dem mittleren HCl-Verbrauch für die Blindwerte in ml entspricht, VP dem mittleren HCl-Verbrauch der Vollprobe in ml, 2,2 dem Umrechnungsfaktor von HCl in CO₂ (1 ml 0,1 M HCl = 2,2 mg CO₂), 100 der Umrechnung auf 100 g Trockensubstanz, 24 h der Inkubationsdauer, EW der Bodeneinwaage und 100 * %⁻¹ TS dem Trockensubstanzfaktor (Schinner et al., 1993).

Die Stickstofftransformation wurde mittels des Nitratgehalts im Boden nach 28 Tagen ermittelt. Dafür wurden 5 g Feuchtboden in 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und jeweils mit 30 ml KCl (2M) befüllt. Die Zentrifugenröhrchen wurden bei 150 rpm für 1h geschüttelt und anschließend die Lösungen über das Filterpapier in 15 ml Zentrifugenröhrchen filtriert. Von jedem Filtrat wurden jeweils 2 ml in je zwei 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und jeweils 8 ml Reinstwasser und 0,2 ml verdünnte H₂SO₄ zugegeben. Zur Erstellung der Blindprobe wurde in eines der beiden Röhrchen zusätzlich eine Zinkgranalie (Merck, Darmstadt) zur Reduktion des Nitrats zugegeben. Für die Eichkurve wurden verschiedene Verdünnungen einer KNO₃-Stammlösung (0, 0,5, 1 und 1,5 mg N/L) anstelle der Filtrate verwendet und analog zu diesen behandelt. Alle Proben wurden verschlossen und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 210 nm in einem Photospektrometer vermessen (Ultrospec® 1000, Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, Vereinigtes Königreich). Das Photometer wurde zuvor auf den Blindwert mittels einer mit Reinstwasser befüllten Küvette geeicht. Es werden nur QS-1000-Küvetten für die Messung verwendet, da nur diese ausreichend durchlässig für UV-Licht sind. Die N-Werte der Messungen mit und ohne Zinkgranalie wurden aus der Eichgeraden abgeleitet und mit folgender Formel ausgewertet:

$$\frac{(VP-LP)*V*100}{A*EW*\%TS} = \mu\text{g N}\cdot\text{g}^{-1} \text{ TS},$$

wobei VP $\mu\text{g N}$ der Vollprobe und LP $\mu\text{g N}$ der Leerprobe, V dem Gesamtvolumen des Extrakts in ml, A dem Filtrataliquot, EW der Bodeneinwaage und $100\%^{-1}$ TS dem Trockensubstanzfaktor entspricht (Schinner et al., 1993).

4.4 Chemische Analytik

Zur Analytik des Gehalts an Testsubstanzen in den Testböden wurden 2 g Trockenboden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 8 ml Methanol versetzt. Die Röhrchen wurden bei 200 rpm und Raumtemperatur über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurde der Boden bei 10.000 G für 15 min. abzentrifugiert und anschließend 1 ml des Überstands vorsichtig entnommen und in ein GC-Vial pipettiert.

Sowohl für Collembolen als auch Enchyträen wurden die gefriergetrockneten und tiefgefrorenen Gewebeproben in den Eppendorf-Cups belassen und zunächst mit 500 μl bzw. 1 ml Methanol versetzt. Die befüllten Cups wurden zunächst für 90 min bei 35 kHz ultrageschallt (Bandelin Sonorex Super RK106, Berlin) und anschließend bei 10.000 G für 10 min. zentrifugiert. Dann wurden 300 μl des Überstands vorsichtig entnommen und in ein GC-Vial pipettiert.

Alle o.g. Probenarten wurden in einem Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID; HP 6890, Palo Alto, USA) und der entsprechenden Säule (FS-Supreme- μms , CS, Langerwehe) auf ihren Gehalt an Fluoranthen, DEHP und Fluazinam vermessen. Break-Thru konnte zwar direkt in Methanol gelöst nachgewiesen werden, nicht jedoch in den oben beschriebenen Proben. Der Ofen wurde auf eine Temperatur von 310 °C erhitzt und diese für 1 Minute gehalten. Das durch den FID erzeugte Spektrum wurde mithilfe einer Software (Agilent Technologies, Inc., MSD ChemStation E.02.02.1431, Santa Clara, USA) manuell ausgewertet. Als Referenz wurden Standards von 0,1 – 10 mg/L aller drei untersuchten Substanzen an jedem Messtag dreifach mitgemessen sowie im Verlauf der Messung alle 10 Proben ein Standard und eine Blindprobe. Die Bestimmungsgrenzen der Testsubstanzen wurden in jedem Messdurchgang separat aus den jeweiligen Blindproben gemäß DIN (2008) ermittelt.

4.5 Statistik

Alle statistischen Auswertungen wurden mit der Open Source Software R (Version 4.3.3), sowie R Studio (Version 2023.12.1+402) durchgeführt (R Core Team, 2025). Unterschiede der behandelten Proben zur jeweiligen Lösemittelkontrolle wurden mit einem generalisierten linearen Modell (glm, family = gaussian) ermittelt, die Normalverteilung der Residuen wurde mit einem Shapiro-Wilk-Test ($p < 0.05$) überprüft.

Im Falle der effektiven Substanzmischungen für Collembolen wurde ein Post-hoc Tukey Test durchgeführt, um alle Behandlungen miteinander vergleichen zu können. Dafür wurde zunächst ein glm erstellt und an diesem eine ANOVA durchgeführt, damit im Anschluss der Post-hoc Test angewandt werden konnte.

Tests mit mehrfachen Wiederholungen wurden mithilfe eines linear mixed effect models (lme) ausgewertet, bei dem der jeweilige Testdurchlauf als random factor behandelt wurde. Es wurde dafür das Package lme4 verwendet (Bates et al., 2015).

Zur Berechnung von Effektkonzentrationen wurden Dosis-Wirkungsmodelle aus dem drc-Package verwendet (Ritz et al., 2015). Die Auswahl des passenden Modells für die jeweilige Dosis-Wirkungsbeziehung basierte auf dem Akaike information criterion (AIC); lag dieses für mehrere Modelle sehr nah beieinander (Abstand < 1), wurde unter diesen eines gewählt, das im Vergleich der Modelle einen mittleren EC_{50} -Wert ergab. Die jeweiligen Modelle sind in **Tabelle 7** und **Tabelle 8** aufgeführt. Die Berechnung der Summen der Toxic Units (ΣTU) erfolgte gemäß der Formel

$$\Sigma TU = \sum_{i=1}^n \left(\frac{c_i}{ECx_i} \right),$$

wobei c_i der Konzentration der Substanz i in der Mischung entspricht und ECx_i der Effektkonzentration der Substanz i , welche den gleichen Effekt verursacht wie die Substanzmischung (Jonker et al., 2005).

Die model deviation ratio MDR wurde ermittelt, indem die erwartete ΣTU , in dem Fall aufgrund der angenommenen Konzentrationsadditivität immer 1, durch die beobachtete ΣTU dividiert wurde. Eine $\Sigma TU > 1$ und dementsprechend ein $MDR < 1$ bedeuten somit Antagonismus, während $\Sigma TU < 1$ und $MDR > 1$ Synergismus darstellen. Eine MDR von 5 liest sich wie folgt: der beobachtete Effekt ist 5x größer, als man unter Annahme von Konzentrationsadditivität bei den angewendeten Testkonzentrationen erwarten würde.

5 Ergebnisse

5.1 Einzelsubstanzen

5.1.1 Collembolen

Im Reproduktionstest für Springschwänze wurden neben der Anzahl der Juvenilen als Maß für die Reproduktion auch die Überlebensrate und das Trockengewicht pro Individuum der Adulten nach 28 Tagen Exposition ermittelt. Es zeigte sich in nahezu allen Tests, dass die Reproduktion der sensitivste dieser Endpunkte war, gefolgt von der Überlebensrate und dem Trockengewicht. Während beispielhaft alle drei Endpunkte in den Graphiken dargestellt sind, wurden nur für die Reproduktion EC₅₀-Werte ermittelt und dargestellt.

Die Wirkung aller vier Testsubstanzen wurde in allen drei Testböden untersucht. Aufgrund seines massiven Einflusses auf das Testsystem konnten für Break-Thru keine für die Mischungstoxizität verwertbaren Daten generiert werden, die Problematik mit dieser Substanz für das Testsystem wird aufgrund seiner Relevanz für Wissenschaft und Regulatorik in einer separaten Publikation ausführlich diskutiert (Fischer et al., 2025, s. **Abbildung A 9**). Für alle anderen Substanzen konnten in allen drei Böden verwertbare Tests durchgeführt werden, wobei für DEHP keine Toxizität für Bodenkonzentrationen ≤ 1.000 gefunden wurde (**Tabelle 7**).

Die Adulten aus den Reproduktionstests wurden abgesammelt und chemisch auf die Gewebekonzentration der beaufschlagten Schadstoffe untersucht. Im Fall der Springschwänze, welche nur eine verhältnismäßig geringe Biomasse aufweisen, konnte von den vier Testsubstanzen nur Fluoranthen nachgewiesen werden. Aus diesen wurde neben der Gewebekonzentration auch die Biokonzentration, also der Quotient aus Gewebekonzentration und Bodenkonzentration, ermittelt.

Tabelle 7 EC₅₀-Werte für alle Testsubstanzen ggü. *F. candida* in den drei Testböden

Dargestellt wird der jeweilige EC₅₀-Wert für die Reproduktion ± Standardfehler in mg/kg Trockenboden und die jeweiligen Dosis-Wirkungsmodelle

Substanz		Sandig	Sandig-organisch	Lehmig
Fluoranthen	EC ₅₀ Reproduktion	60 ± 6	216 ± 9	86 ± 7
	Modell	LN.3	W1.3	LL.3
DEHP	EC ₅₀ Reproduktion	> 1.000	> 1.000	> 1.000
	Modell	-	-	-
Fluazinam	EC ₅₀ Reproduktion	8,8 ± 0,5	42 ± 8	25 ± 2
	Modell	L.3	W2.3	W2.3
Break-Thru	EC ₅₀ Reproduktion	NA	NA	NA
	Modell	-	-	-

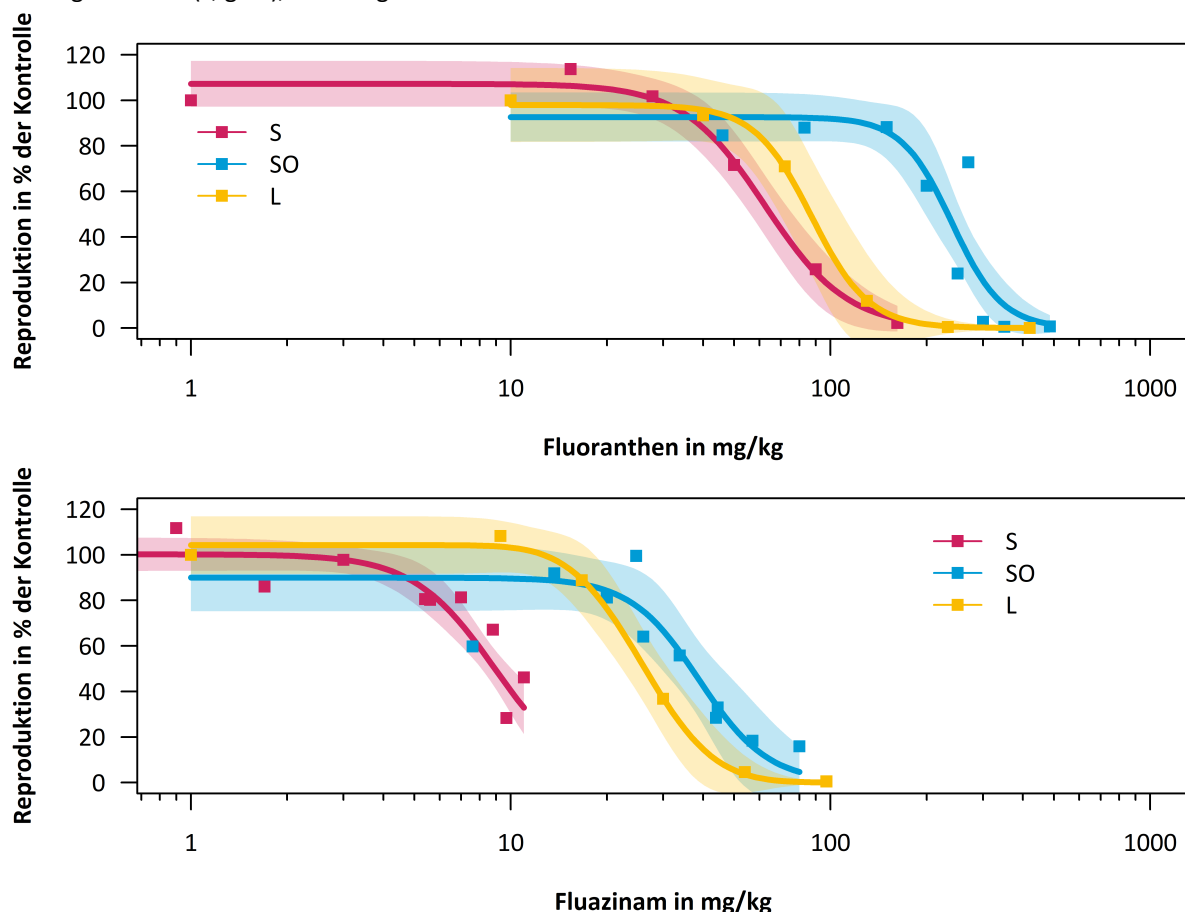
Als sensitivsten Endpunkt werden hier zu Beginn als Übersicht die Dosis-Wirkungskurven und die daraus resultierenden EC₅₀-Werte für alle Substanzen und Böden zu Effekten auf die Reproduktion dargestellt. Im direkten Vergleich dieser zeigt sich, dass *F. candida* ggü. Fluazinam am sensitivsten ist, gefolgt von Fluoranthen. Für DEHP wurden keine EC₅₀-Werte für die

Reproduktion und alle anderen Endpunkte ermittelt, da es im Bereich von bis zu 1.000 mg/kg keine signifikanten Effekte gab.

Mit Blick auf die Testböden waren für *F. candida* alle Testsubstanzen im sandigen Boden am toxischsten, was aufgrund der deutlich geringeren Adsorptionskapazität dieses Bodens zu erwarten war. Innerhalb der beiden stärker adsorbierenden Böden waren Fluoranthene und Fluazinam jeweils im lehmigen Boden toxischer als im sandig-organischen. Mögliche Ursache dafür ist, dass beide Substanzen stärker an organisches Bodensubstrat binden als an Tonminerale und dadurch schwerer aufgenommen werden können. Die Adsorption von PAK in Böden und Sedimenten ist generell stärker vom organischen als dem Tongehalt dominiert (Ahangar, 2011; Means et al., 1980; Spasojević et al., 2018). Dies zeigt sich u.a. in der Biokonzentration von Fluoranthenen in *F. candida*, welche im sandig-organischen Boden deutlich niedriger als in den anderen Böden ist (Abbildung 6).

Abbildung 2 Dosis-Wirkungskurven aller möglichen Testsubstanzen für die Reproduktion von *F. candida* in allen drei Testböden

Dargestellt werden die Mittelwerte (n=4) der Reproduktion in Relation zur Lösemittelkontrolle als Quadrate und die jeweiligen Dosis-Wirkungsmodelle als Linien für sandigen (S, rot), sandig-organischen (SO, blau) und lehmigen Boden (L, gelb), hinterlegt mit den 95%-Konfidenzintervallen als Flächen..



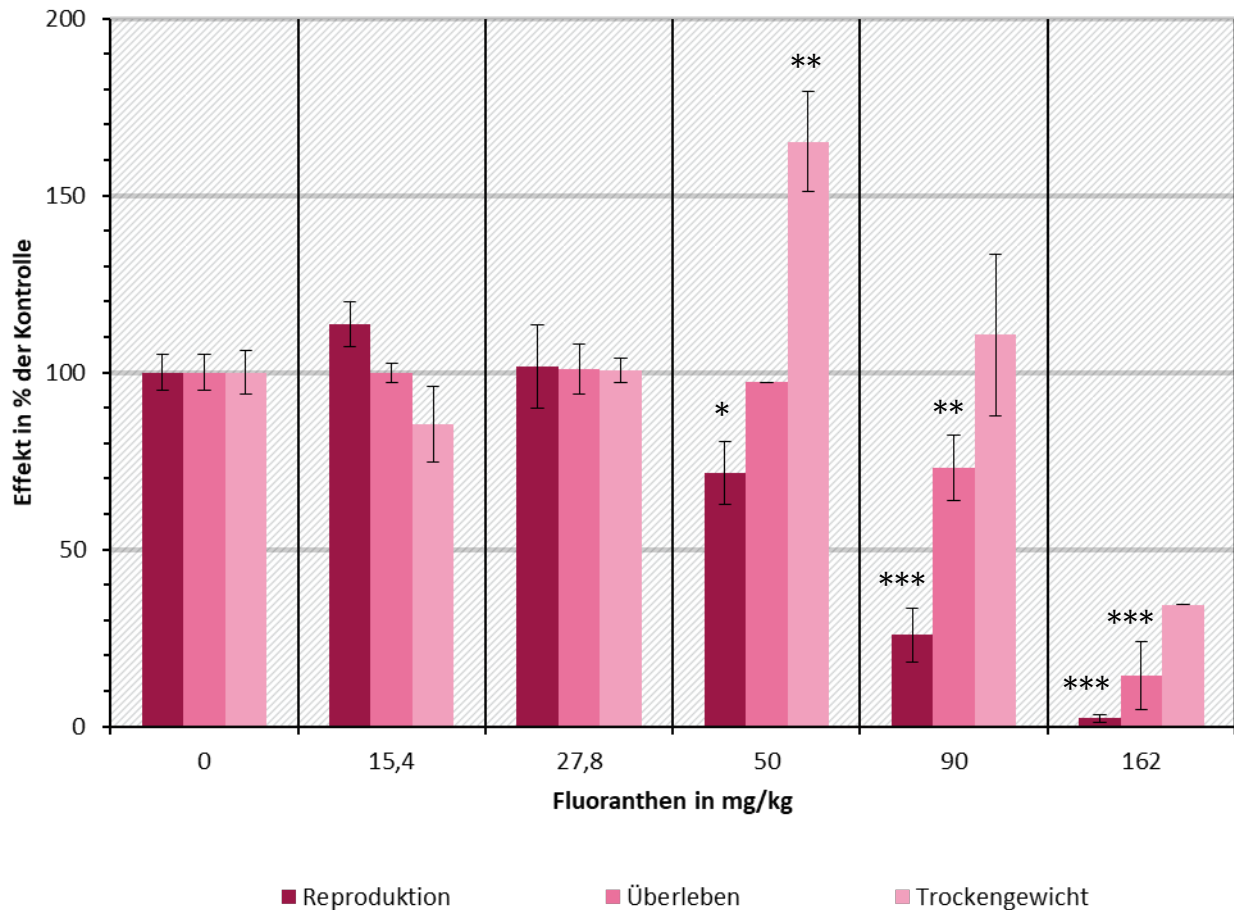
Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

In den folgenden Abschnitten werden exemplarische Ergebnisse für die drei biologischen Endpunkte Reproduktion, Überleben und individuelles Trockengewicht für die untersuchten

Substanzen dargestellt sowie die Ergebnisse aus der chemischen Analytik der Gewebeproben, Gewebekonzentration und Biokonzentration, für Fluoranthen beschrieben.

Abbildung 3 Toxizität von Fluoranthen ggü. *F. candida* in sandigem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=4$) \pm Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: $0,05 > p \geq 0,01$; **: $0,01 > p \geq 0,001$; ***: $p > 0,001$

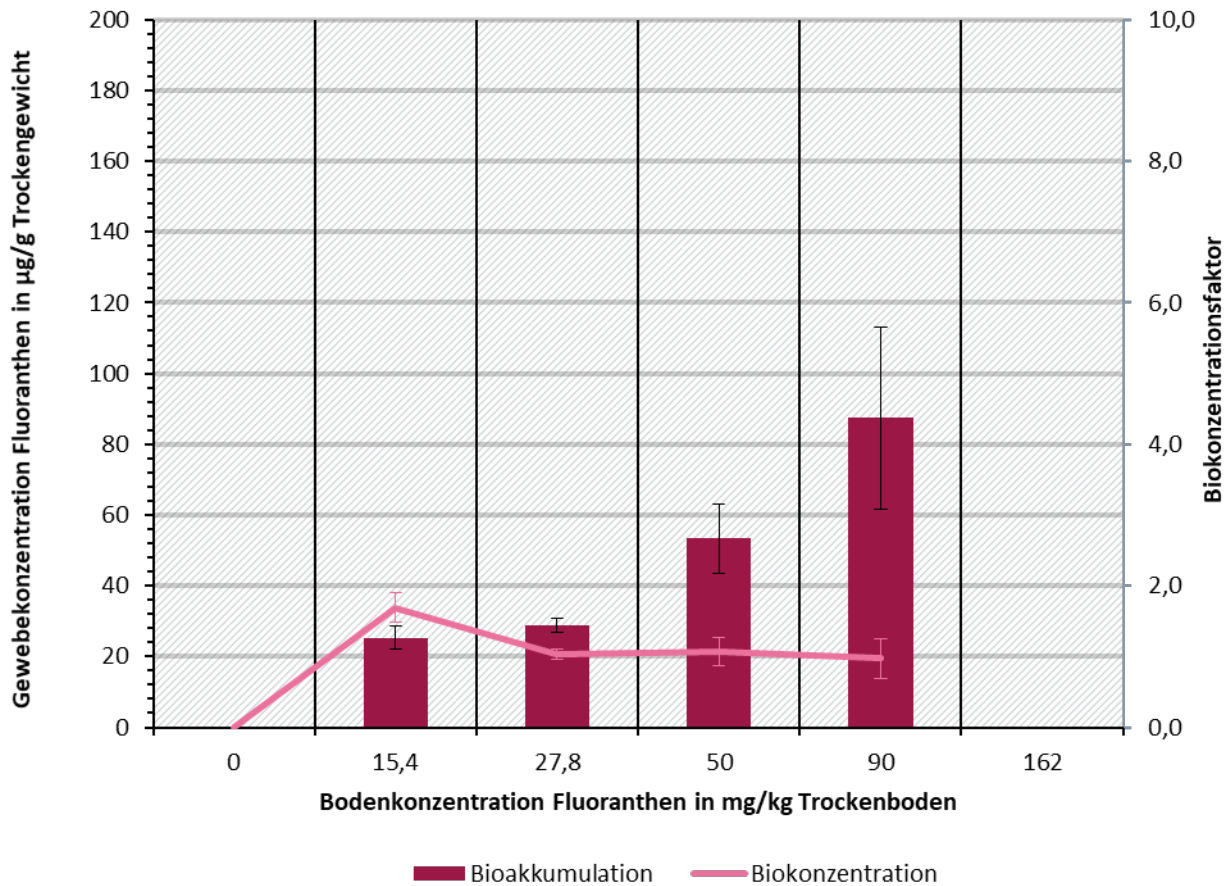


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Fluoranthen wurde im sandigen Boden im Konzentrationsbereich von 15,4 bis 162 mg/kg getestet (**Abbildung 3**). Von den untersuchten Endpunkten war die Reproduktion der sensitivste, was für alle folgenden Tests ebenfalls der Fall war. Die Reproduktion fiel bei 50 mg/kg zum ersten Mal mit $-28 \pm 9\%$ ($p = 0,013$; $t = -2,8$) signifikant ab, was sich bei 90 mg/kg ($-74 \pm 8\%$, $p < 0,001$; $t = -7,3$) und 162 mg/kg zunehmend verstärkte ($-98 \pm 1\%$, $p < 0,001$; $t = -8,9$). Die Überlebensrate war erst ab 90 mg/kg um $-86 \pm 10\%$ ($p = 0,006$; $t = -3,2$) beeinträchtigt, beim Trockengewicht war gar keine signifikante Absenkung sichtbar, nur eine Erhöhung um 65 % ($p = 0,005$; $t = 3,36$).

Abbildung 4 Gewebekonzentration von Fluoranthren in *F. candida* in sandigem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=4$) \pm Standardfehler der Endpunkte Gewebekonzentration und Biokonzentration (BCF) von Fluoranthren in adulten *F. candida* in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).

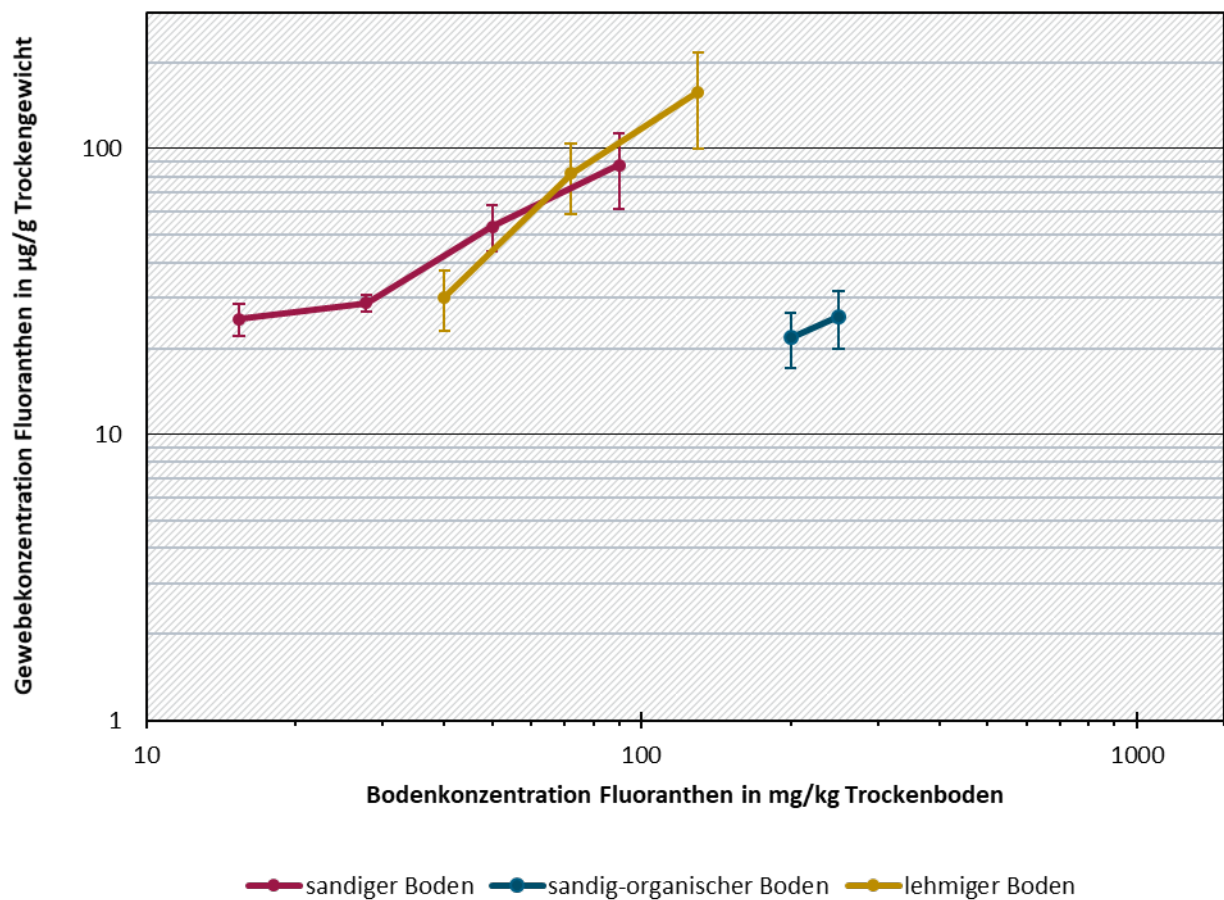


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung 4 zeigt exemplarisch die ermittelten Daten zur Gewebe- und Biokonzentration von Fluoranthren in *F. candida*. Die Gewebekonzentration stieg im sandigen Boden im Konzentrationsbereich von 15,4 mg/kg bis 90 mg/kg nahezu linear an, und zwar von 25 ± 3 µg/g auf 87 ± 26 µg/g. In der höchsten Konzentration konnte aufgrund der zu geringen Überlebensrate der Adulten und damit fehlender Biomasse kein Fluoranthren nachgewiesen werden. Der Biokonzentrationsfaktor stieg bei 15,4 mg/kg auf $1,7 \pm 0,2$ an und blieb in den folgenden Konzentrationen konstant bei etwa 1.

Abbildung 5 Gewebekonzentration von Fluoranthren in *F. candida* in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=4$) \pm Standardfehler der Gewebekonzentration von Fluoranthren in adulten *F. candida* in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).

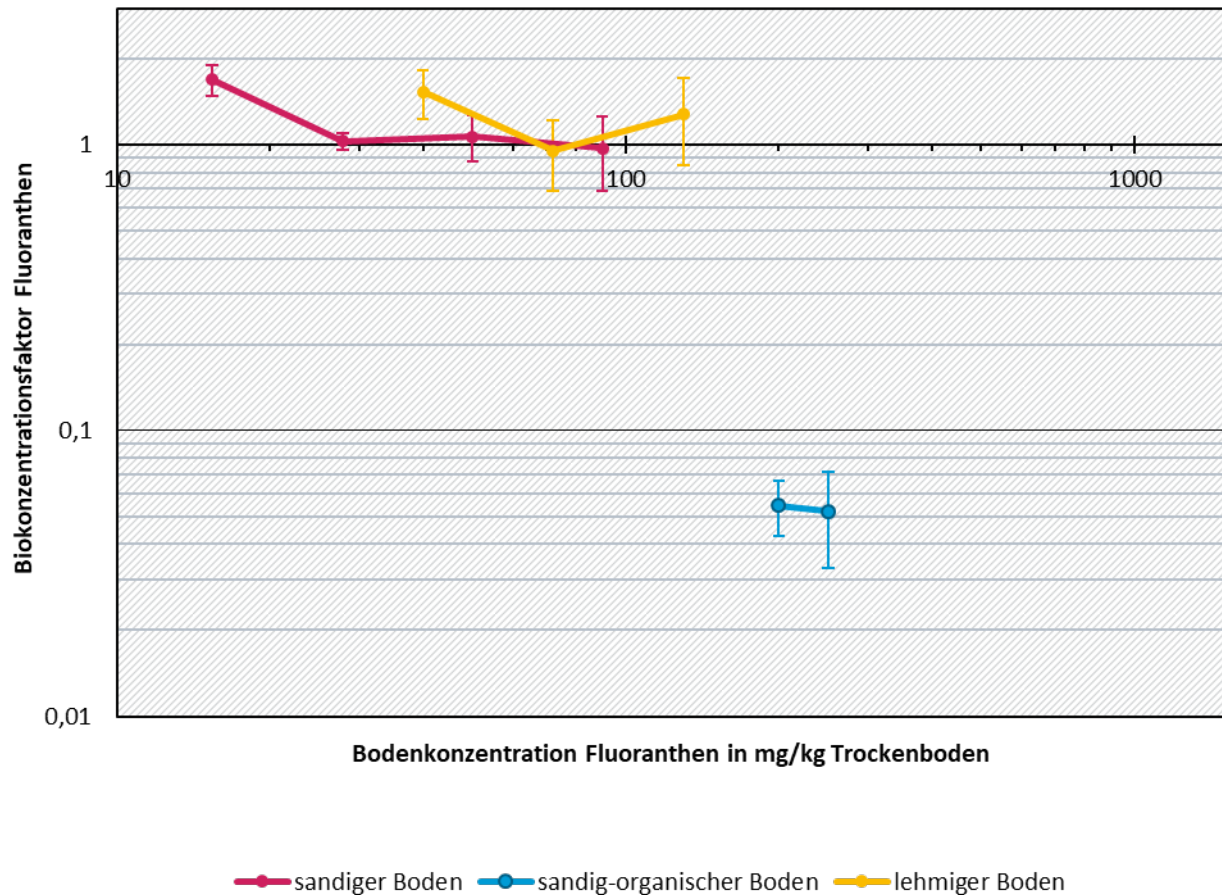


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

In **Abbildung 5** werden die Gewebekonzentrationswerte von Fluoranthren in *F. candida* in allen drei Böden in Abhängigkeit von der Bodenkonzentration vergleichend dargestellt. Während die Gewebekonzentration von Fluoranthren in Abhängigkeit von der Bodenkonzentration im sandigen und im lehmigen Boden relativ ähnlich verläuft, liegt sie im sandig-organischen Boden auch bei einer deutlich höheren Bodenkonzentration unter den Werten der anderen beiden Böden.

Abbildung 6 Biokonzentration von Fluoranthen in *F. candida* in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=4$) \pm Standardfehler der Biokonzentration von Fluoranthen in adulten *F. candida* in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).



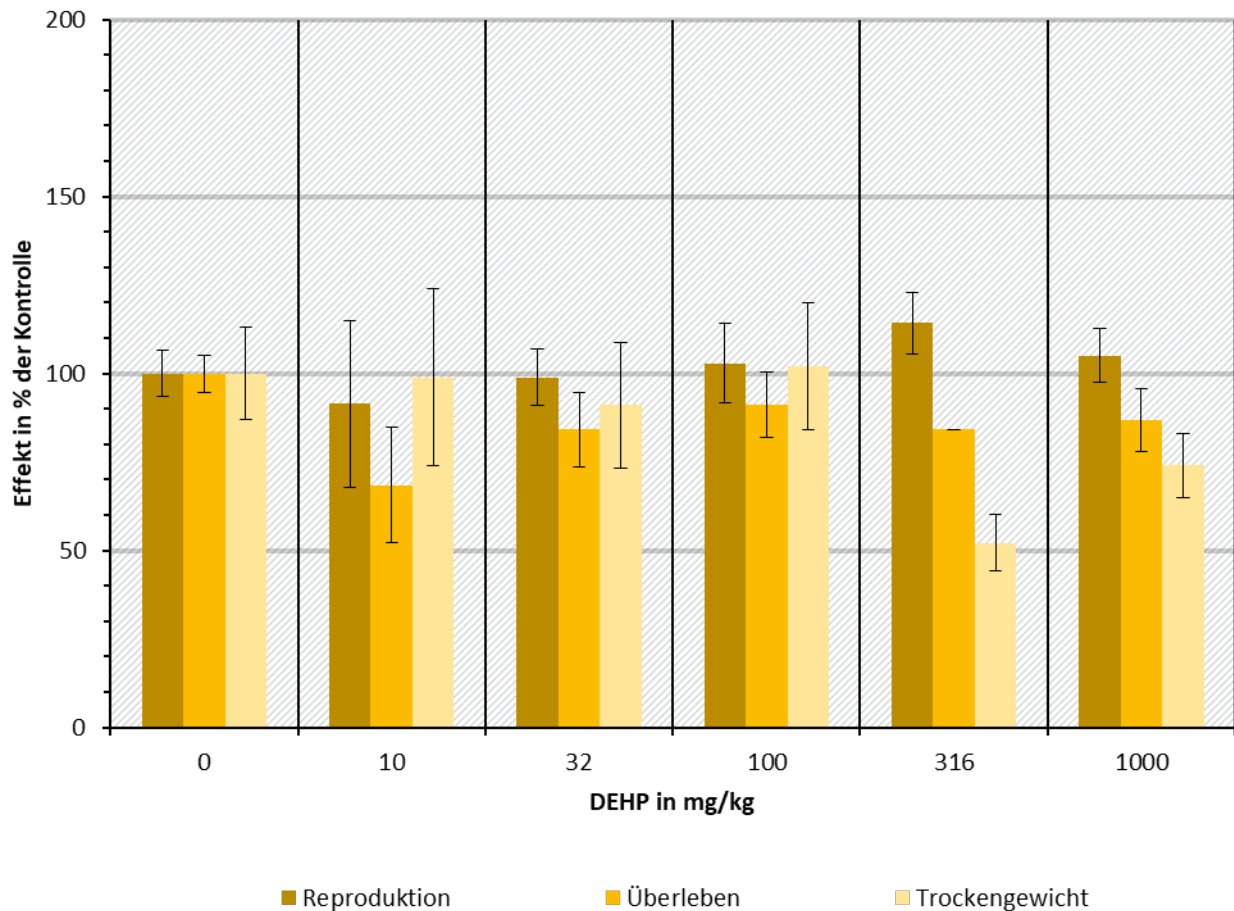
Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Dieses Muster wiederholt sich umso deutlicher mit Blick auf die Biokonzentration in Abbildung 6. Während diese im sandigen und lehmigen Boden grob zwischen 1 und 2 schwankt, die Gewebekonzentration also gleich oder maximal um den Faktor 2 höher liegt als die Bodenkonzentration, liegt sie beim sandig-organischen Boden zwischen 0,05 und 0,06, ist also um den Faktor 17 bis 20 kleiner als die Bodenkonzentration.

Die Adsorption von PAK in Böden und Sedimenten ist generell stärker vom organischen als dem Tongehalt dominiert (Ahangar, 2011; Means et al., 1980; Spasojević et al., 2018). Dies würde erklären, warum die Gewebekonzentration von Fluoranthen nur im stark adsorbierenden Boden mit dem höheren organischen Anteil von 2,89%, dem sandig-organischen Boden, stark reduziert ist. Zwar besitzt der lehmige Boden mit 2,1% zwar ebenfalls einen relativ hohen organischen Anteil, allerdings unterliegt die Adsorption von PAK im Boden auch Wechselwirkungen zwischen organischer und Tonfraktion; diese hängt wiederum von der jeweiligen Zusammensetzung dieser hochdiversen Fraktionen in den einzelnen Böden ab (Saedi et al., 2018), sodass die Größe der jeweiligen Fraktionen alleine die Adsorption nicht erklären kann.

Abbildung 7 Toxizität von DEHP ggü. *F. candida* in lehmigem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte (n=4) ± Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden nicht festgestellt.

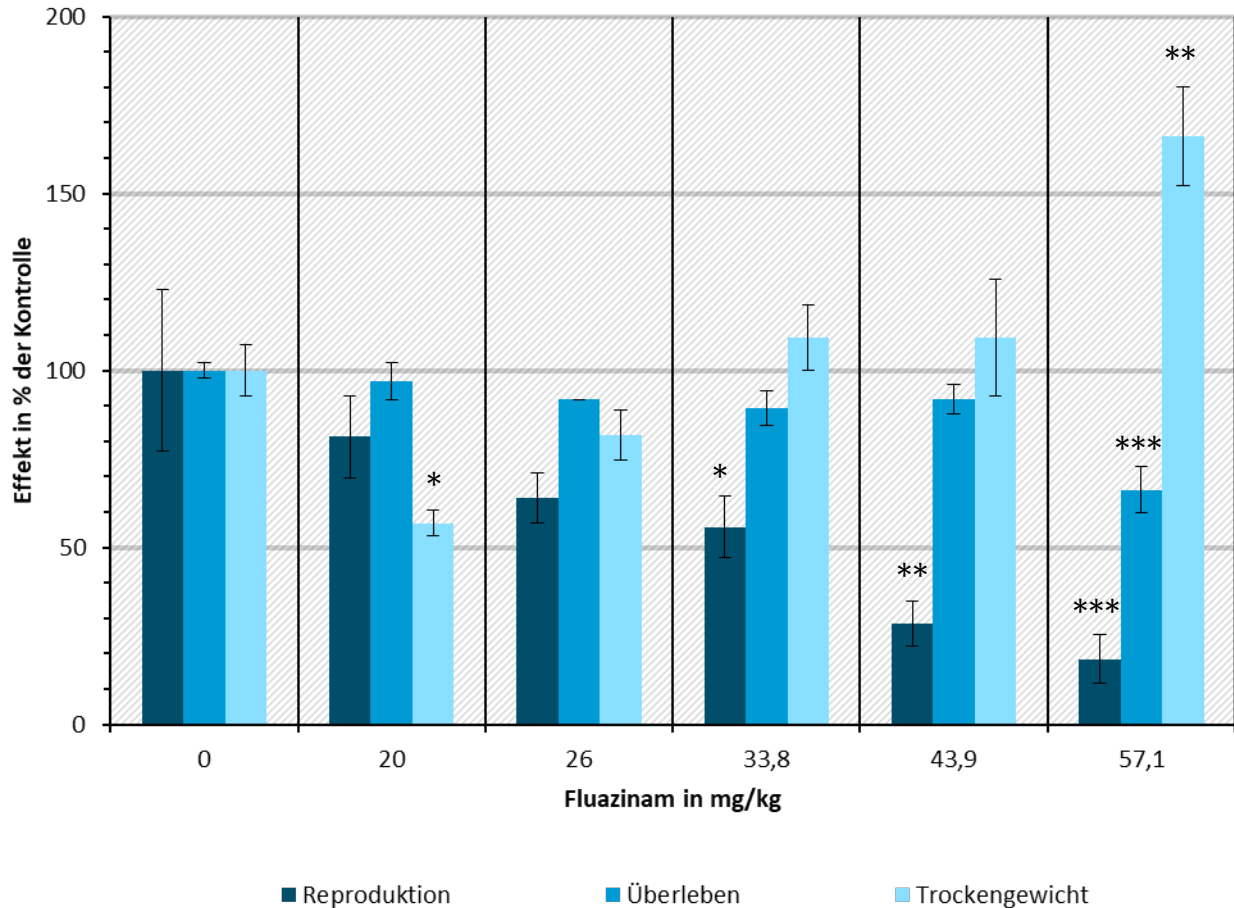


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung 7 zeigt exemplarisch den in allen Böden beobachteten Verlauf bzw. die Abwesenheit toxischer Effekte durch DEHP auf *F. candida*. Im lehmigen Boden war im Bereich von 10 bis 1.000 mg/kg der Effekt durch DEHP auf die Reproduktion nie signifikant und wich nie um mehr als 10% von der Kontrolle ab. Es wurden für DEHP in keinem der drei Testböden nennenswerte Effekte auf die Reproduktion, Überlebensrate und Trockengewicht von *F. candida* im Konzentrationsbereich von 10 bis 1.000 mg/kg festgestellt. Demnach kann DEHP in dieser Studie als nicht toxisch ggü. *F. candida* betrachtet werden. Wie in 3.2.1.2 beschrieben, variieren die Literaturangaben für die Toxizität von DEHP ggü. *Folsomia*-Spezies stark, mit EC₅₀-Werten < 10, aber auch > 5.000 mg/kg (Jensen et al., 2001; Zheng et al., 2022).

Abbildung 8 Toxizität von Fluazinam ggü. *F. candida* in sandig-organischem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte (n=4) ± Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: 0,05 > p ≥ 0,01; **: 0,01 > p ≥ 0,001; ***: p > 0,001



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung 8 zeigt exemplarisch die Toxizität für Fluazinam ggü. *F. candida*. Im sandig-organischen Boden sank die Reproduktion im Bereich von 20 bis 57,1 mg/kg kontinuierlich von $-19 \pm 12\%$ ($p = 0,32$; $t = -1,0$) auf $-82 \pm 7\%$ ($p < 0,001$; $t = -4,4$). Während die Überlebensrate kaum beeinträchtigt war, stieg in der höchsten Konzentration das individuelle Trockengewicht um $66 \pm 14\%$ ($p = 0,002$; $t = 3,9$) an.

Ähnliches wurde im sandigen Boden beobachtet. In beiden Böden besteht die Möglichkeit, dass die reduzierte Reproduktion und das erhöhte Trockengewicht eine Reaktion auf die toxische Wirkung von Fluazinam sind – während bei ersterer Energieressourcen geschont werden, erhöht letztere die Robustheit des Organismus.

Fluazinam wies allgemein eine hohe Toxizität und im Vergleich mit den anderen Testsubstanzen die höchste Toxizität auf. Dies deckt sich mit dem zuvor ermittelten EC_{50} -Wert von $10,4 \pm 1,1$ mg/kg in sandigem Boden (Wehrli et al., 2024) sowie dem NOEC $< 0,615$ mg/kg aus dem Bericht zum EU-Zulassungsverfahren (The European Commission, 2019).

5.1.2 Enchyträen

Auch für *E. crypticus* wurden in einem 28-tägigem Reproduktionstest die Auswirkungen der vier Testsubstanzen in allen drei Testböden ermittelt. Dabei wurden ebenfalls neben der Anzahl produzierter Juvenile als Maß für die Reproduktion die Überlebensrate und das Trockengewicht der Adulten aufgenommen. Analog zu den Tests mit *F. candida* war wieder die Reproduktion durchweg der sensitivste Endpunkt in allen Boden-Substanz-Kombinationen.

Ebenfalls konnte bei *E. crypticus* für DEHP keine Toxizität im untersuchten Konzentrationsbereich festgestellt und kein EC₅₀ ermittelt werden. Im Gegensatz zu *F. candida* war es jedoch möglich, aufgrund einer grundsätzlich anderen Auswertungsmethode die Auswirkungen von Break-Thru auf die Reproduktion von *E. crypticus* zu ermitteln (**Tabelle 8**).

Aufgrund der höheren Biomasse und dem höheren Fettgehalt per Trockenmasse (vgl. Amorim et al., 2012; Testerink, 1981) konnten in *E. crypticus* die drei Substanzen Fluoranthen, DEHP und Fluazinam deutlich nachgewiesen werden. Nur Break-Thru war, wie in allen anderen Kompartimenten, nicht nachweisbar. Daher wurde für diese drei Substanzen die Gewebekonzentration und der jeweilige Biokonzentrationsfaktor ermittelt.

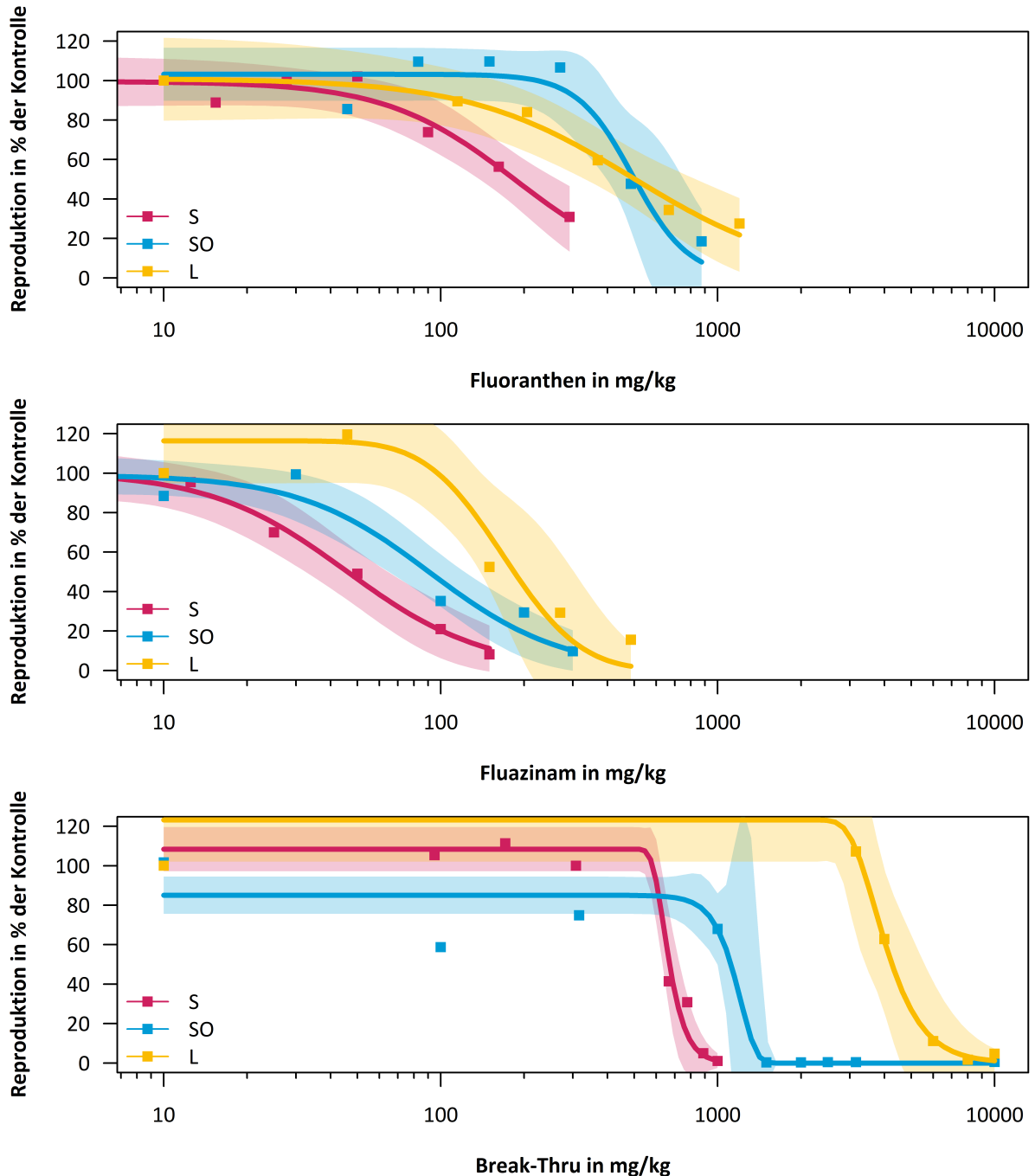
Tabelle 8 EC₅₀-Werte für alle Testsubstanzen ggü. *E. crypticus* in den drei Testböden

Dargestellt wird der jeweilige EC₅₀-Wert für die Reproduktion ± Standardfehler in mg/kg Trockenboden und die jeweiligen Dosis-Wirkungsmodelle

Substanz		Sandig	Sandig-organisch	Lehmig
Fluoranthen	EC ₅₀ Reproduktion	180 ± 34	481 ± 32	496 ± 125
	Modell	LL.3	LL.3	LL.3
DEHP	EC ₅₀ Reproduktion	> 1.000	> 1.000	> 1.000
	Modell	-	-	-
Fluazinam	EC ₅₀ Reproduktion	46 ± 8	91 ± 14	154 ± 29
	Modell	LL.3	LL.3	LN.3
Break-Thru	EC ₅₀ Reproduktion	663 ± 8	1157 ± 173	4007 ± 373
	Modell	W2.3	W1.3	W2.3

Abbildung 9 Dosis-Wirkungskurven aller Testsubstanzen für die Reproduktion von *E. crypticus* in allen drei Testböden

Dargestellt werden die Mittelwerte (n=3) der Reproduktion in Relation zur Lösemittelkontrolle als Quadrate und die jeweiligen Dosis-Wirkungsmodelle als Linien für sandigen (S, rot), sandig-organischen (SO, blau) und lehmigen Boden (L, gelb), hinterlegt mit den 95%-Konfidenzintervallen als Flächen.



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Im Vergleich der Dosis-Wirkungskurven und EC_{50} -Werte zeigt sich, dass auch *E. crypticus* ggü. Fluazepam am sensitivsten ist, gefolgt von Fluoranthen und Break-Thru. Für DEHP wurden ebenfalls keine EC_{50} -Werte ermittelt, da es im Bereich von bis zu 1.000 mg/kg keine signifikanten Effekte auf die Reproduktion gab.

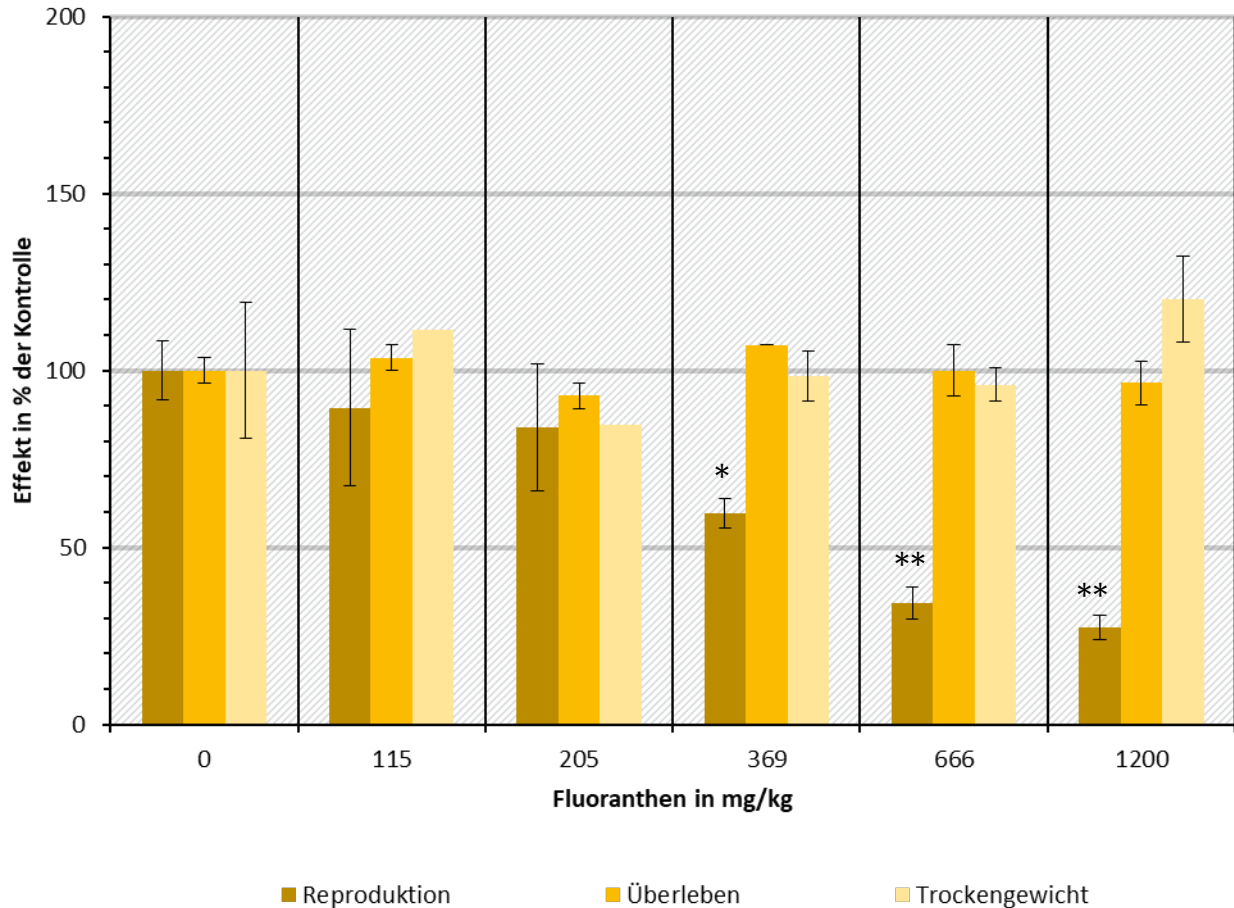
Im Vergleich zwischen den Testböden waren auch für *E. crypticus*, analog zu *F. candida*, alle Testsubstanzen im sandigen Boden erwartungsgemäß am toxischsten. Im Gegensatz zu *F. candida* waren Fluoranthen und Fluazinam, bezogen auf die EC₅₀-Werte, jedoch im sandig-organischen Boden toxischer als im lehmigen. Dies deutet darauf hin, dass beide Substanzen im sandig-organischen Boden für *E. crypticus* verhältnismäßig besser verfügbar sind als für *F. candida*. Dies ließ sich für Fluoranthen direkt nachweisen, da bei *F. candida* die Biokonzentration von Fluoranthen im sandig-organischen Boden deutlich niedriger als in den anderen Böden ist (**Abbildung 6**), während sie bei *E. crypticus* für alle Böden relativ ähnlich ist (**Abbildung 13**). Insgesamt lagen für Fluoranthen die Werte des Biokonzentrationsfaktors im Bereich von 8 bis 65 in *E. crypticus* deutlich über denen von *F. candida* mit Werten von 0,05 bis 1,7.

Die Toxizitätswerte spiegeln sich teilweise in der Gewebekonzentration der Substanzen in *E. crypticus* wieder. So ist der Biokonzentrationsfaktor von Fluazinam im lehmigen Boden deutlich geringer als im sandigen und sandig-organischen Boden (Abbildung A 30). Für Fluoranthen wiederum ist der Biokonzentrationsfaktor etwas geringer im sandig-organischen als im lehmigen Boden, allerdings noch in einer vergleichbaren Größenordnung (Abbildung 13). Während somit innerhalb einer Substanz die Biokonzentration mit dem EC₅₀-Wert in den jeweiligen Böden korreliert, gilt dies nicht für den Vergleich zwischen den Substanzen, da die Biokonzentration von Fluoranthen deutlich höher als von Fluazinam ist, die EC₅₀-Werte jedoch deutlich geringer sind. Dies hat wiederum beruht auf der spezifisch höheren Toxizität von Fluazinam.

In den folgenden Abbildungen werden anhand von Fluoranthen exemplarisch die erhobenen Daten für alle Böden und Substanzen dargestellt. Eine ausführliche Darstellung aller Gewebekonzentrationsdaten werden unter 5.2 beim Vergleich mit den effektiven Substanzmischungen vorgenommen, zudem finden sich alle hier nicht dargestellten Ergebnisse im Anhang B.2.

Abbildung 10 Toxizität von Fluoranthen ggü. *E. crypticus* in lehmigem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg) – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust $n<3$. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: $0,05 > p \geq 0,01$; **: $0,01 > p \geq 0,001$; ***: $p > 0,001$

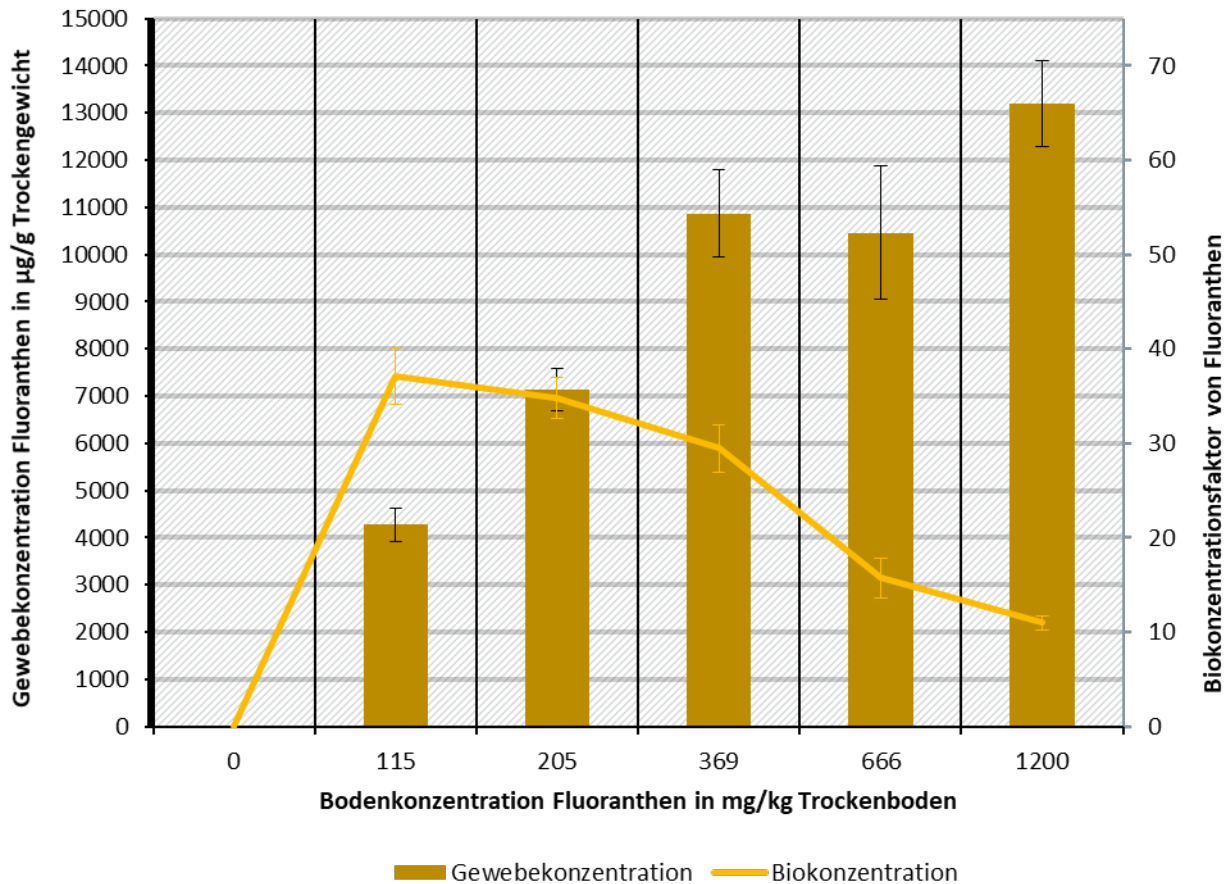


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung 10 zeigt exemplarisch die Toxizität von Fluoranthen ggü. Enchyträen. Die Reproduktion nahm im lehmigen Boden im Konzentrationsbereich von 115 bis 1200 mg/kg kontinuierlich ab, und zwar zuerst signifikant von $-40 \pm 4\%$ ($p = 0,04$; $t = -2,3$) bei 369 mg/kg bis $-73 \pm 3\%$ ($p = 0,001$; $t = -4,1$) in der höchsten Konzentration. 50% Effekt wurden zum ersten Mal bei 666 mg/kg erreicht, und zwar $-66 \pm 5\%$ ($p = 0,003$; $t = -3,7$).

Abbildung 11 Gewebekonzentration von Fluoranthen in *E. crypticus* in lehmigem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Endpunkte Gewebekonzentration und Biokonzentrationsfaktor (BCF) der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).

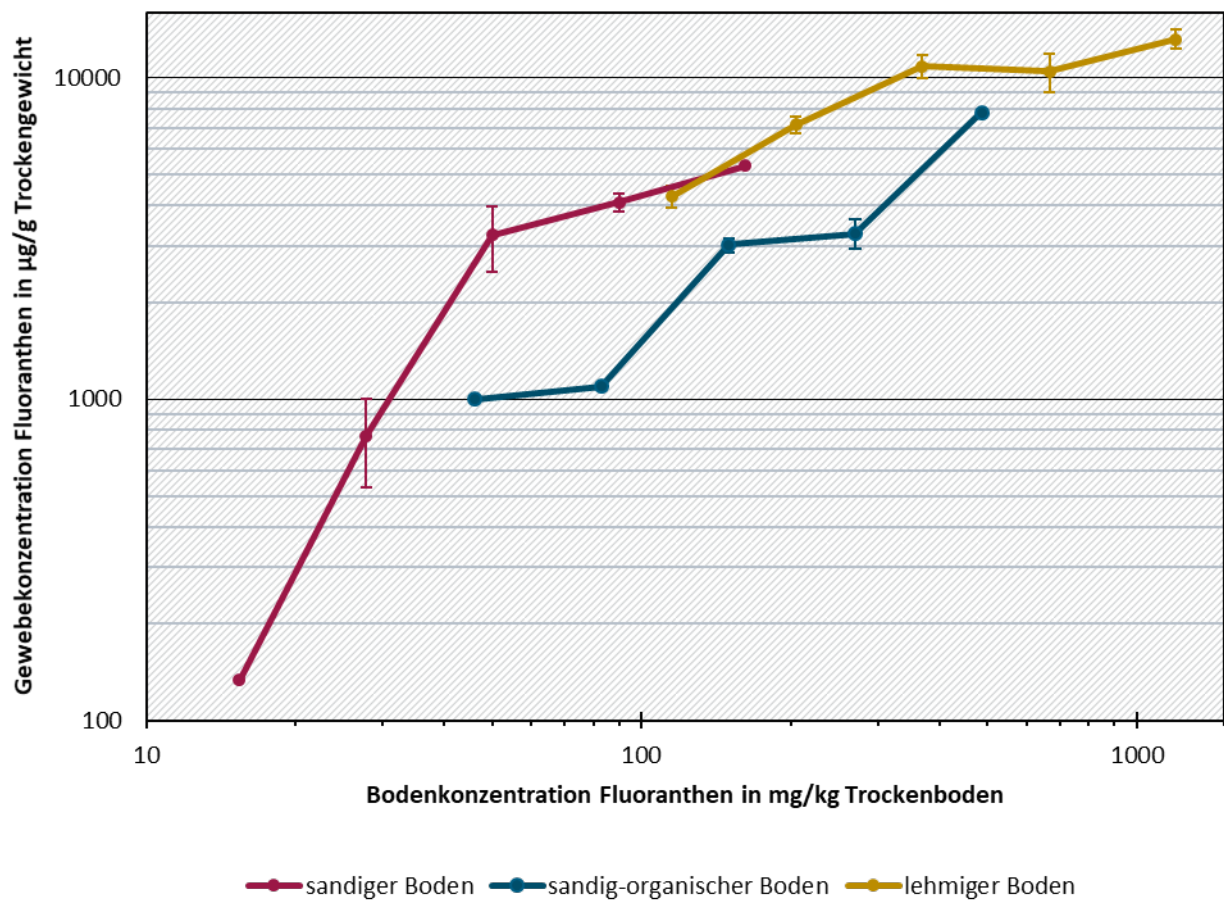


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Im lehmigen Boden stieg die Gewebekonzentration weitgehend konstant an, beginnend mit $4,272 \pm 345 \mu\text{g/g}$ bei 115 mg/kg, hin zu $13,194 \pm 902 \mu\text{g/g}$ bei 1200 mg/kg. Im gleichen Konzentrationsbereich fiel der Biokonzentrationsfaktor, der in der niedrigsten Konzentration sein Maximum hatte, konstant von 37 ± 3 auf 11 ± 1 (**Abbildung 11**).

Abbildung 12 Gewebekonzentration von Fluoranthren in *E. crypticus* in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Gewebekonzentration von Fluoranthren in adulten *E. crypticus* – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust $n < 3$.

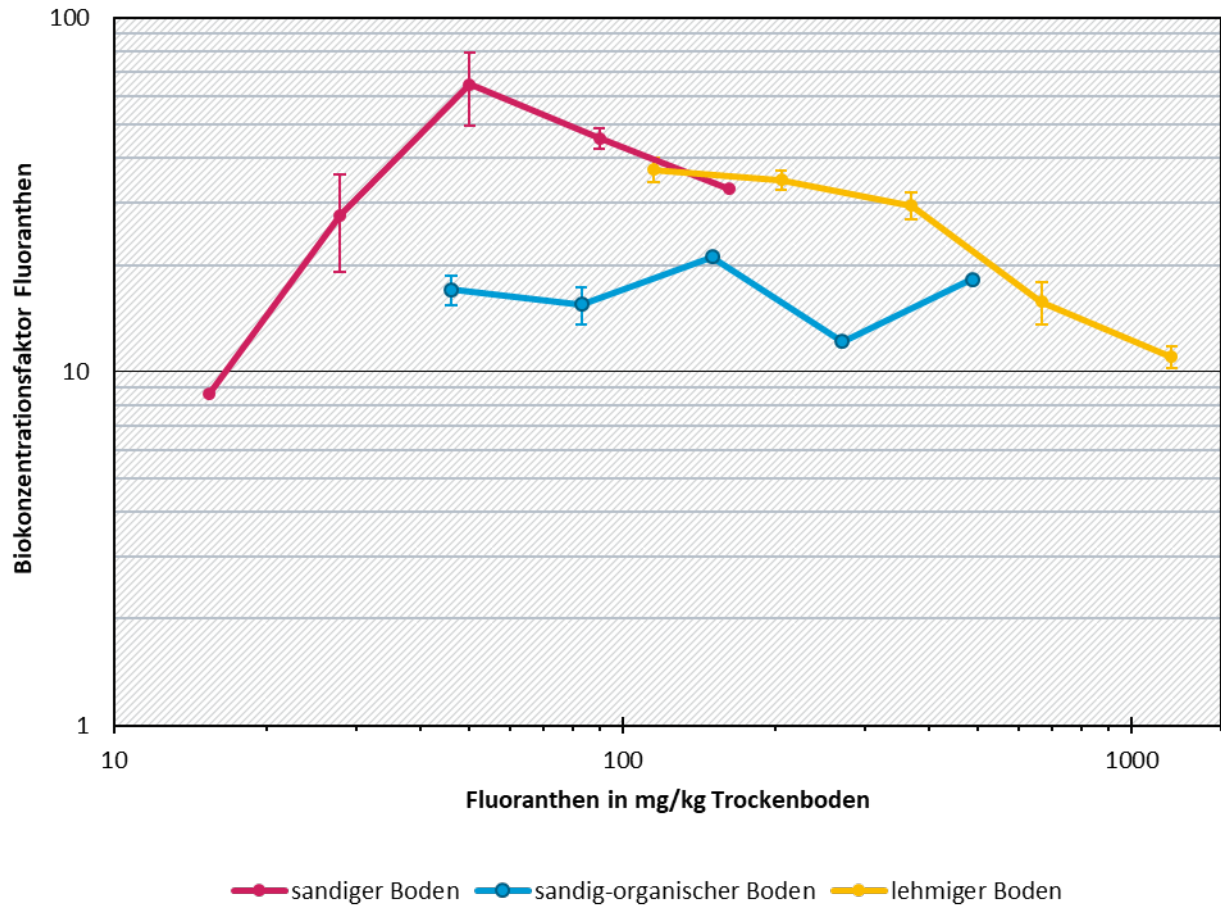


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Im Vergleich der Gewebekonzentrationen von Fluoranthren in den drei Testböden zeigt sich, dass diese sich im sandigen und im lehmigen Boden ähnlich verhalten, mit einem starken Anstieg in niedrigen Konzentrationen und einer Stagnation in höheren Konzentrationen (**Abbildung 12**). Dies kann u.a. mit Detoxifikationsmechanismen der Enchyträen zusammenhängen. Die Gewebekonzentrationen im sandig-organischen Boden lagen bei den entsprechenden Bodenkonzentrationen jeweils unter den anderen beiden Böden.

Abbildung 13 Biokonzentration von Fluoranthren in *E. crypticus* in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Biokonzentration von Fluoranthren in adulten *E. crypticus* – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust $n < 3$.



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

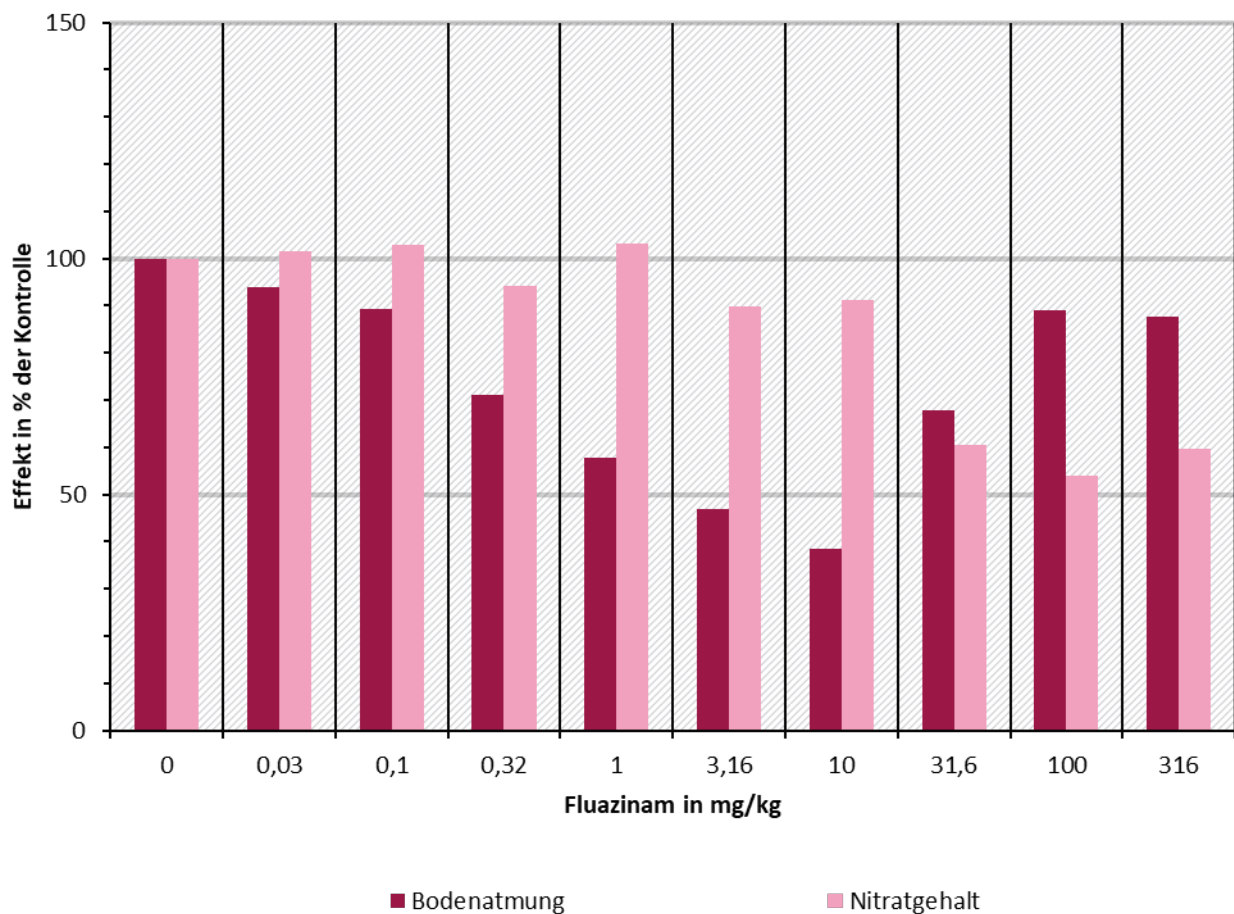
Der beschriebene abflachende Anstieg der Gewebekonzentration spiegelt sich auch im Biokonzentrationsfaktor wieder, welcher über alle Böden hinweg im sandigen Boden bei einer mittleren Konzentration von 50 mg/kg sein Maximum von 64 ± 15 erreicht (**Abbildung 13**). Möglicherweise werden erst ab einem gewissen Schwellenwert in diesem Konzentrationsbereich Detoxifikationsprozesse in Gang gesetzt, wie dies für *F. candida* und Kupfer beobachtet wurde (Pedersen et al., 2000). Auffällig bleibt auch hier, dass der Biokonzentrationsfaktor von Fluoranthren, analog zu *F. candida*, im sandig-organischen Boden deutlich niedriger ist als in den anderen beiden Böden. Dies spiegelt sich allerdings nicht in einem höheren EC_{50} -Wert im Vergleich zum lehmigen Boden wieder.

5.1.3 Mikrobielle Bodengemeinschaft

In den Tests zur mikrobiellen Bodengemeinschaft wurden nur für Fluazinam toxische Effekte beobachtet. Dort wiederum konnten nur für die Bodenatmung und im sandigen und sandig-organischen Boden EC_{50} -Werte ermittelt werden, diese waren jedoch mit $2,1 \pm 0,5$ bzw. $1,4 \pm 0,2$ mg/kg die niedrigsten in der gesamten Studie ermittelten. Im Folgenden werden daher nur die Daten für Fluazinam in allen drei Testböden dargestellt.

Abbildung 14 Toxizität von Fluazinam ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in sandigem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte (0,1 – 10 mg/kg Bodenatmung: n=2) aus 2 Pseudoreplikaten der Endpunkte Bodenatmung und Nitratgehalt in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).

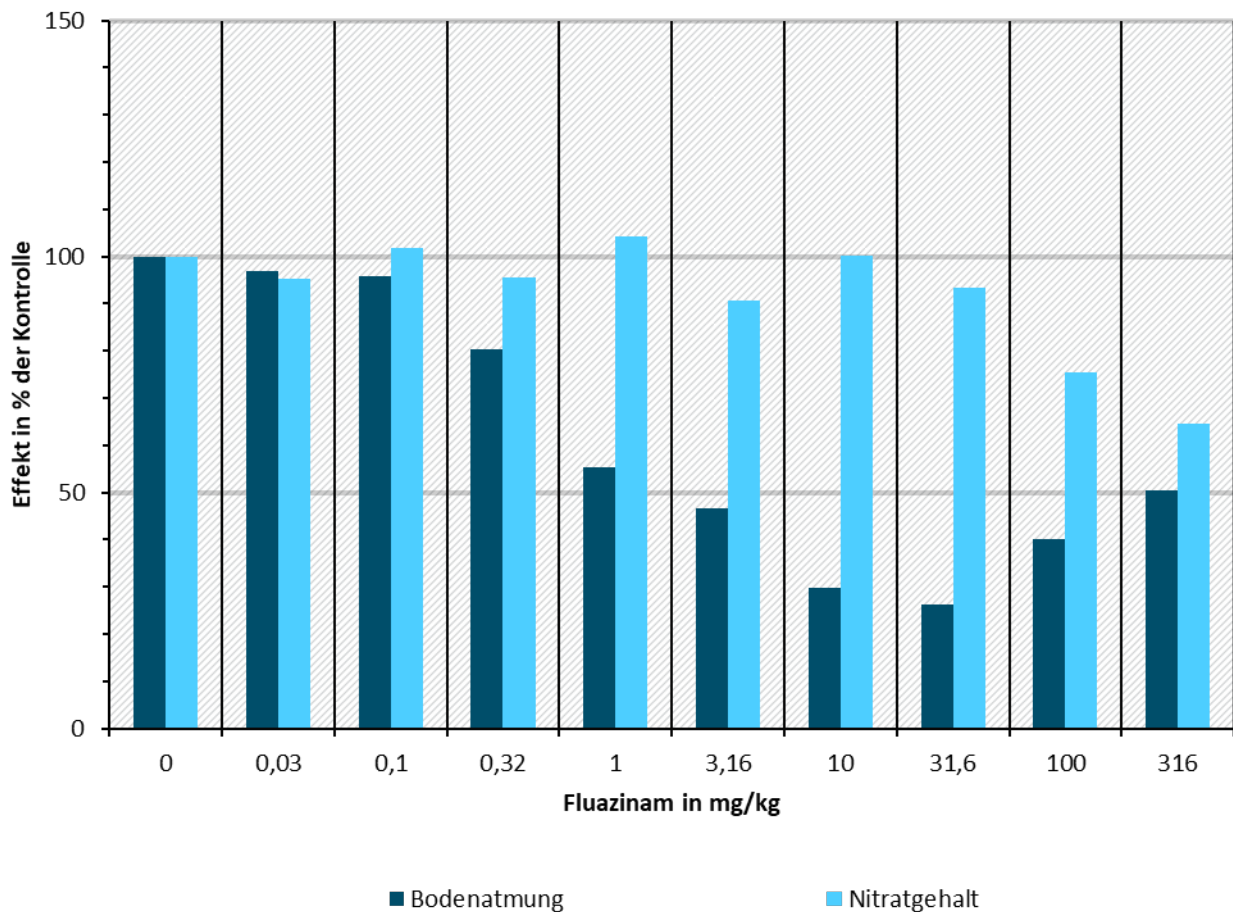


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Im sandigen Boden sinkt die Bodenatmung konstant von 0,03 bis 10 mg/kg auf den insgesamt niedrigsten Wert von 38,5% der Kontrolle. Von da an steigt die Bodenatmung wieder auf etwa 88% in den höchsten Konzentrationen von 100 und 316 mg/kg. Der Nitratgehalt wiederum, der die Stickstofftransformation repräsentiert, sinkt erst ab 31,6 mg/kg deutlich auf 60% der Kontrolle, fällt jedoch auch bis zur höchsten Konzentration nie unter 50% (**Abbildung 14**).

Abbildung 15 Toxizität von Fluazinam ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in sandig-organischem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte (0,1 – 10 mg/kg Bodenatmung: n=2 mit je 2 Pseudoreplikaten) der Endpunkte Bodenatmung und Nitratgehalt in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).

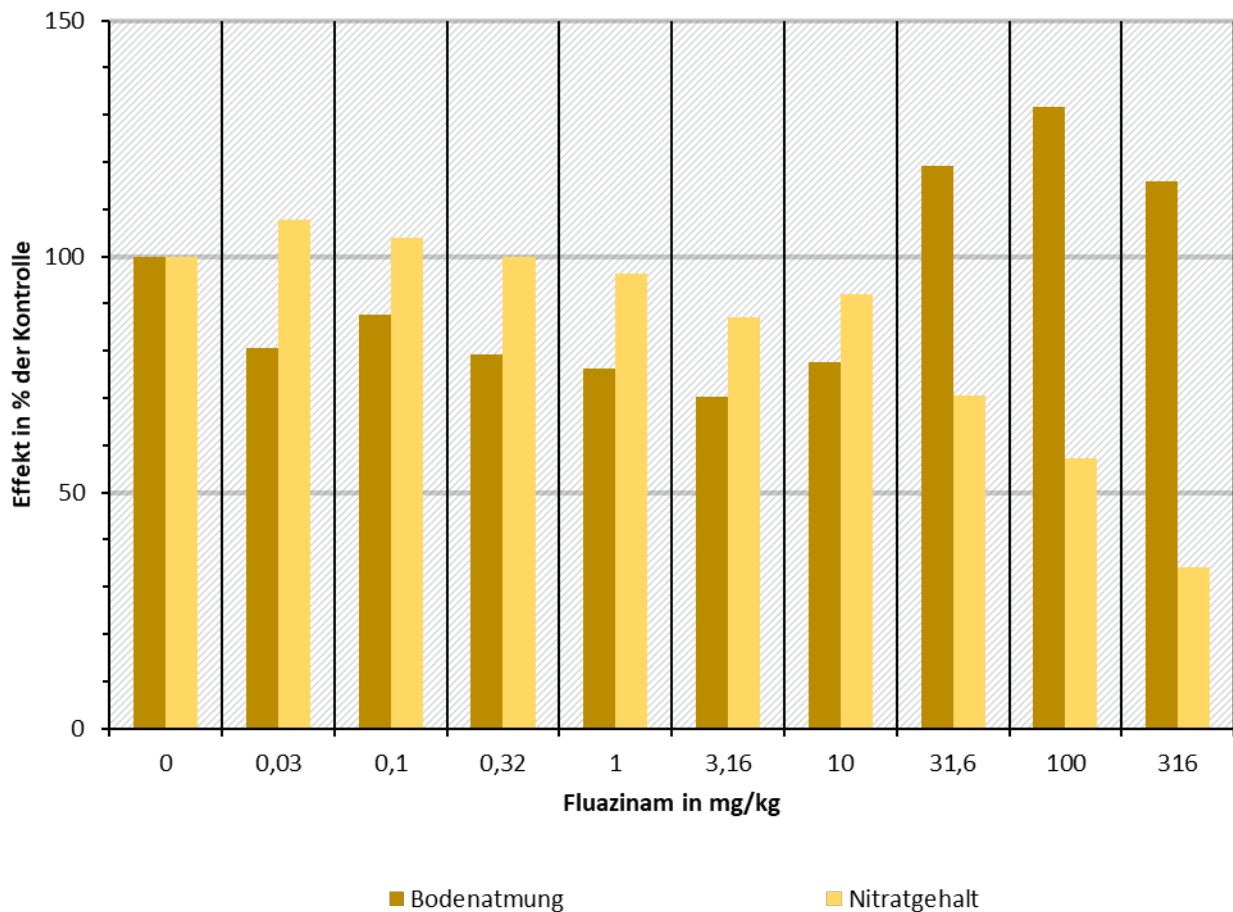


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Im sandig-organischen Boden sinkt die Bodenatmung ebenfalls zunächst konstant von 0,03 bis 31,6 mg/kg auf den insgesamt niedrigsten Wert von 26% der Kontrolle. Ab dann steigt die Bodenatmung ebenfalls wieder auf bis zu 50% der Kontrolle bei 316 mg/kg. Der Nitratgehalt fällt erst ab 100 mg/kg auf 75% der Kontrolle, jedoch ebenfalls nie unter 50% (**Abbildung 15**).

Abbildung 16 Toxizität von Fluazinam ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in lehmigem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte (0,1 – 10 mg/kg Bodenatmung: n=2 mit je 2 Pseudoreplikaten) der Endpunkte Bodenatmung und Nitratgehalt in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).

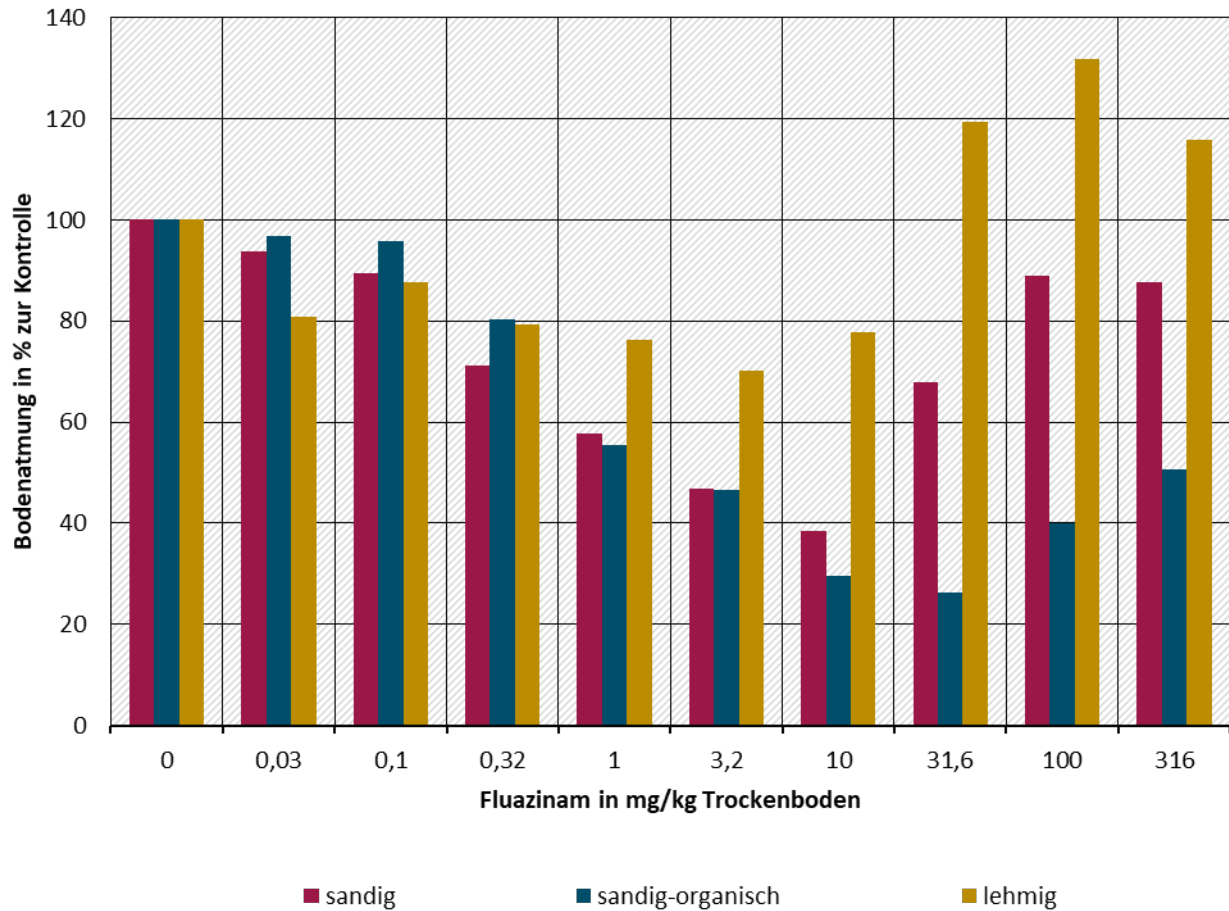


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Im lehmigen Boden stellt sich der niedrigste Wert der Bodenatmung bereits bei 3,16 mg/kg ein, erreicht dort aber immer noch 70% der Kontrolle. Daraufhin steigt die Bodenatmung bis zu einem Maximum von 132% bei 100 mg/kg. Der Nitratgehalt fällt zum ersten Mal deutlich bei 31,6 mg/kg auf 71% der Kontrolle und erreicht sein Minimum von 34% der Kontrolle bei 316 mg/kg (**Abbildung 16**).

Abbildung 17 Toxizität von Fluazinam auf die mikrobielle Bodenatmung in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte (0,1 – 10 mg/kg Bodenatmung: n=2 mit je 2 Pseudoreplikaten) des Endpunkts Bodenatmung in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Im direkten Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der Bodenatmung in allen Böden zeigt sich der nahezu identische Verlauf der sandigen Böden im Vergleich zum lehmigen. Die Zunahme in der Bodenatmung setzt zwar bei ähnlichen Konzentrationen ein, fällt jedoch auch jeweils unterschiedlich stark aus (**Abbildung 17**).

Die Erklärung für den Anstieg liegt vermutlich in der starken Toxizität von Fluazinam, die einen großen Teil der mikrobiellen Biomasse abtötet, als Fungizid in erster Linie Pilze. Dadurch wird jedoch auch organischer Kohlenstoff freigesetzt, der von den verbleibenden, weniger ggü. Fluazinam sensitiven Mikroorganismen aufgenommen und veratmet werden kann. Eine genetische Analyse der mikrobiellen Bodengemeinschaft würde womöglich eine deutlich veränderte Zusammensetzung bei höheren Konzentrationen von Fluazinam zeigen.

5.2 Effektive Substanzmischungen

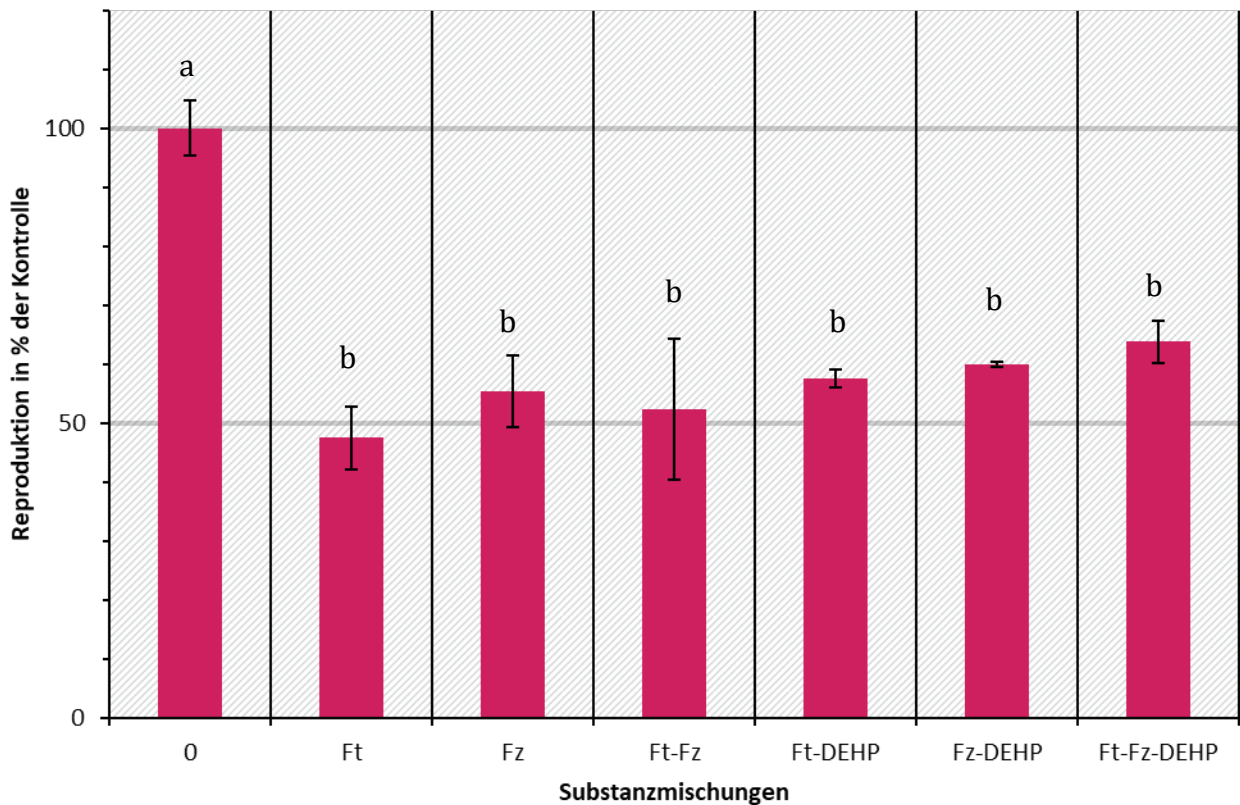
In den Tests mit effektiven Substanzmischungen wird nur die Reproduktion im Verhältnis zur Kontrolle dargestellt, da diese für beide Invertebraten der jeweils sensitivste Endpunkt war; die mikrobielle Bodengemeinschaft wird bei diesen Tests aufgrund fehlender Stoffe mit ausreichender Toxizität nicht berücksichtigt. Ebenso werden die Endpunkte der Gewebekonzentration für alle im jeweiligen Testorganismus nachweisbaren Stoffe dargestellt.

5.2.1 Collembolen

5.2.1.1 Reproduktion

Abbildung 18 Toxizität von effektiven Substanzmischungen ggü. *F. candida* in sandigem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=4$) \pm Standardfehler des Endpunktes Reproduktion in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Alle Behandlungen mit Einzelsubstanzen und Substanzmischungen aus Fluoranthen (Ft), Fluazinam (Fz) und DEHP entsprechen in ihrer Toxizität 1 Toxic Unit. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den jeweiligen Behandlungen liegen vor, wenn diese keinen gemeinsamen Buchstaben teilen (Tukey-Test).



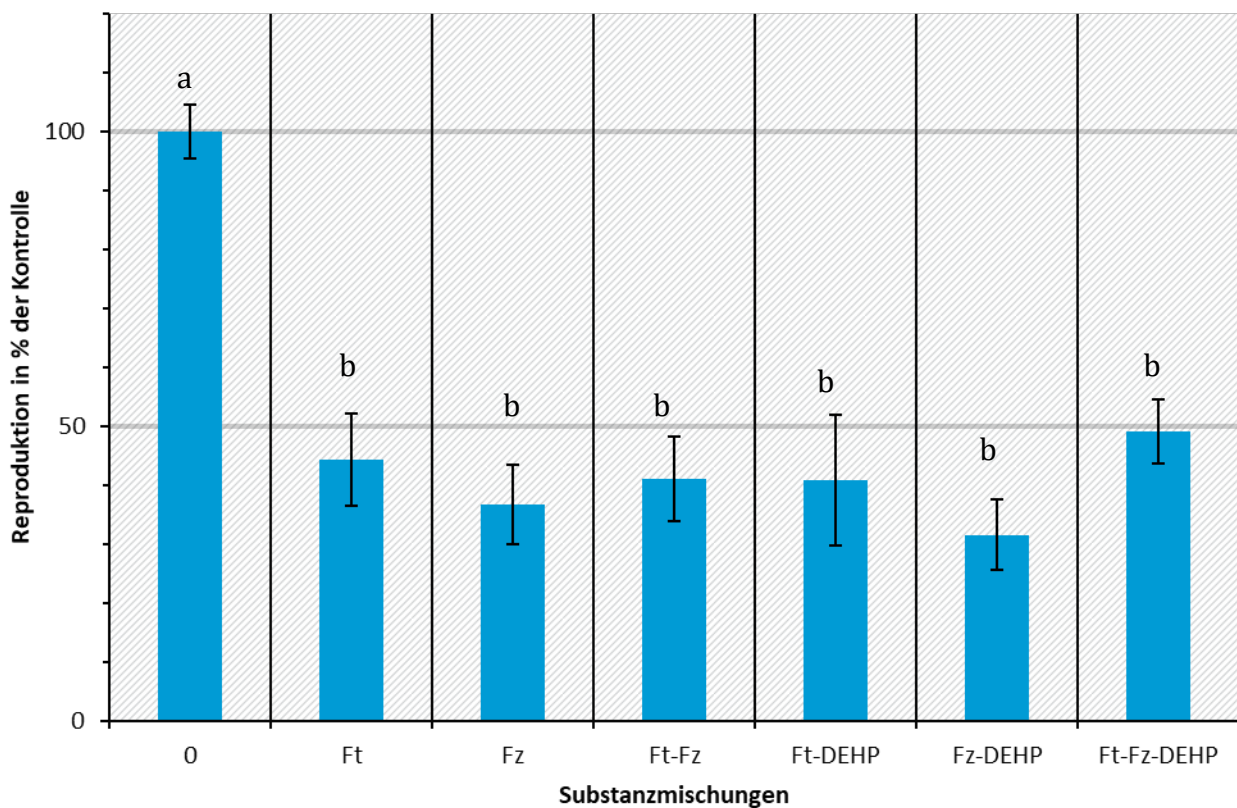
Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

In den Collembolentests wurden die Substanzen Fluoranthen, Fluazinam und DEHP sowie deren binäre und ternäre Kombinationen getestet, die alle jeweils insgesamt 1 TU an Toxizität enthielten, mit einem prognostizierten Effekt von 50%. Im Falle der toxischen Einzelsubstanzen,

welche mit Ausnahme von DEHP als Referenz dienten, wurden diese demnach in Höhe ihres EC_{50} appliziert. Im sandigen Boden konnten diese Werte für Fluoranthren mit $47 \pm 5\%$ ($p < 0,05$) und Fluazinam mit $55 \pm 6\%$ ($p < 0,05$) Reproduktion im Vergleich zur Kontrolle gut reproduziert werden. In allen Kombinationen lag die Reproduktion zwischen 52 und 64% der Kontrolle, unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander oder zu den Einzelsubstanzen (**Abbildung 18**).

Abbildung 19 Toxizität von effektiven Substanzmischungen ggü. *F. candida* in sandig-organischem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=4$) \pm Standardfehler des Endpunktes Reproduktion in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Alle Behandlungen mit Einzelsubstanzen und Substanzmischungen aus Fluoranthren (Ft), Fluazinam (Fz) und DEHP entsprechen in ihrer Toxizität 1 Toxic Unit. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den jeweiligen Behandlungen liegen vor, wenn diese keinen gemeinsamen Buchstaben teilen (Tukey-Test).

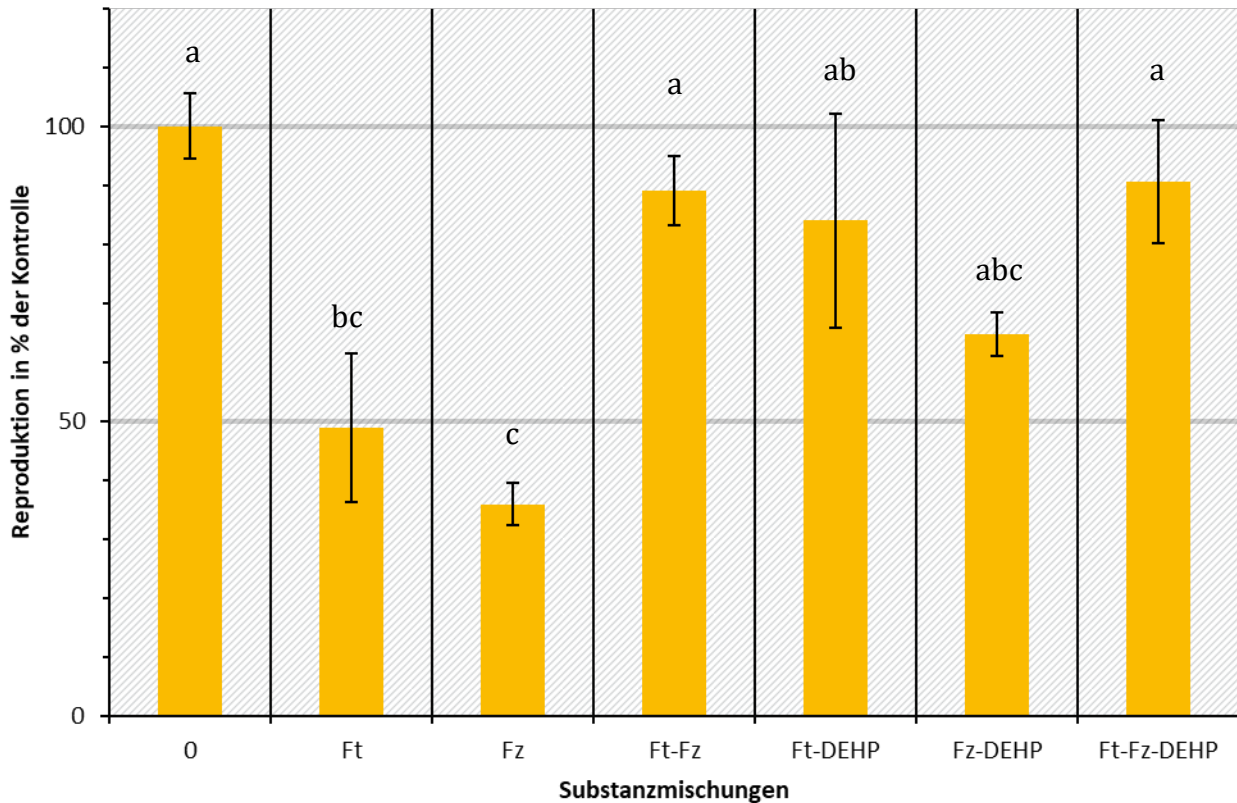


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Dasselbe Muster konnte im sandig-organischen Boden beobachtet werden. Während hier Fluoranthren und Fluazinam mit $44 \pm 8\%$ ($p < 0,05$) und $37 \pm 7\%$ zur Kontrolle ($p < 0,05$) etwas toxischer waren als erwartet, bewegten sich die binären und ternären Mischungen in einem ähnlichen Bereich, nämlich zwischen 31 und 49% der Kontrolle und waren damit weder untereinander noch im Vergleich zu den Einzelsubstanzen signifikant unterschiedlich (**Abbildung 19**).

Abbildung 20 Toxizität von effektiven Substanzmischungen ggü. *F. candida* in lehmigem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=4$) \pm Standardfehler des Endpunktes Reproduktion in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Alle Behandlungen mit Einzelsubstanzen und Substanzmischungen aus Fluoranthen (Ft), Fluazinam (Fz) und DEHP entsprechen in ihrer Toxizität 1 Toxic Unit. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den jeweiligen Behandlungen liegen vor, wenn diese keinen gemeinsamen Buchstaben teilen (Tukey-Test).



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Im lehmigen Boden konnte der EC_{50} -Wert von Fluoranthen mit $49 \pm 13\%$ der Kontrolle sehr gut reproduziert werden, während Fluazinam toxischer war als erwartet ($36 \pm 4\%$). Die binären und ternären Mischungen waren jedoch in ihrer Effektstärke deutlich geringer als die erwarteten 50%, bzw. die Reproduktion lag deutlich über 50% der Kontrolle. Dies war v.a. für die binäre Mischung aus Fluoranthen und Fluazinam sowie die ternäre Mischung der Fall, welche jeweils signifikant von den Einzelsubstanzen abwichen ($p < 0.05$), jedoch nicht von der Kontrolle. Die binären Kombinationen mit DEHP waren zwar nicht signifikant unterschiedlich zu den jeweiligen Einzelsubstanzen, allerdings waren sie dies auch nicht im Vergleich zur Kontrolle und die Reproduktion war mit $84 \pm 18\%$ (Fluoranthen-DEHP) bzw. $65 \pm 4\%$ der Kontrolle (Fluazinam-DEHP) deutlich über den Werten der toxischen Einzelsubstanzen (**Abbildung 20**).

Somit zeigt sich ein klares Muster für die Ausprägung von Mischungstoxizität ggü. *F. candida* in starker Abhängigkeit von den Testböden. In den beiden sandigen Böden wirkten alle Mischungen additiv, da sie im Bereich der 50% Effektstärke lagen und die Summen der Toxic Units (ΣTU) klar im Bereich von 0,8-1,2 liegen (**Tabelle 9**), was als angemessener Bereich zur Annahme weitgehender Additivität der Einzeltoxizitäten gesehen wird (Jonker et al., 2005).

DEHP als passive Substanz hatte demnach keinen Einfluss auf die Toxizität, da alle Mischungen mit DEHP dieselbe Effektstärke hatten wie die Mischungen ohne. Im Gegenzug war im lehmigen Boden ein klarer Unterschied in der Effektstärke sowohl zwischen den Einzelsubstanzen und den Mischungen als auch zwischen den Behandlungen mit und ohne DEHP erkennbar, wie sich auch an den Σ TU zeigt, die die in fast allen Mischungen $< 0,8$ sind (**Tabelle 9**). Somit wirken zum einen die toxischen Substanzen antagonistisch, da sie in Kombination eine deutlich geringere Effektstärke als die Einzelsubstanzen verursachen. Zum anderen zeigt sich, dass im lehmigen Boden DEHP sichtbar die Toxizität der Einzelsubstanzen reduziert, obwohl der Stoff selbst keinen Beitrag zur Gesamtoxizität leistet.

Somit zeigen diese Experimente, dass unsere Modellmischung in Böden grundsätzlich additiv wirken kann, in diesem Fall speziell in den sandigen Böden, und dass es unter veränderten Bodeneigenschaften, z.B. einem deutlich höheren Tongehalt wie in dem lehmigen Boden, es zu einem grundlegend anderen Interaktionsmuster kommen kann, in diesem Fall die Ausprägung von Antagonismus.

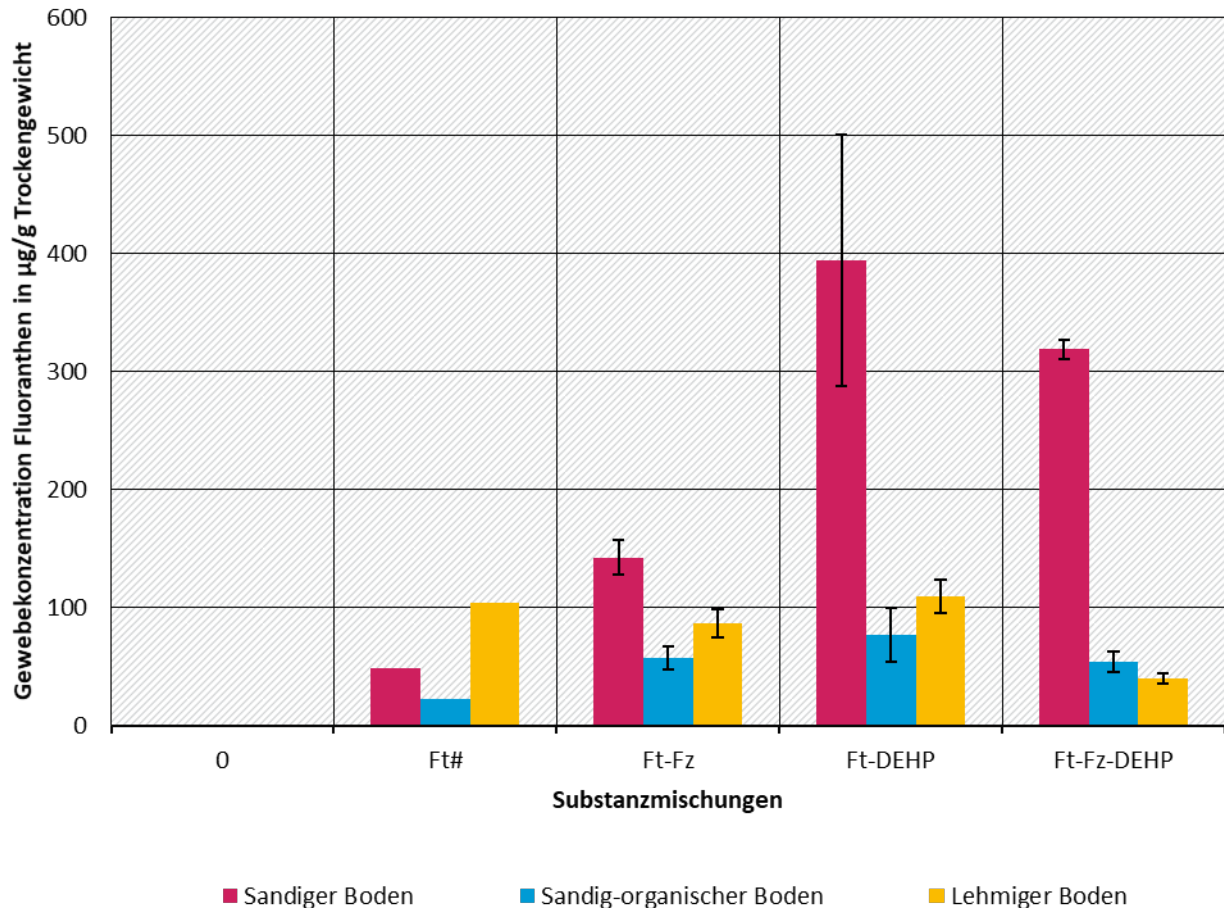
Tabelle 9 Summen der Toxic Units (Σ TU) und Model Deviation Ratios (MDR) zu allen effektiven Substanzmischungen mit *F. candida*

Mischung	Sandig		Sandig-organisch		Lehmig	
	Σ TU	MDR	Σ TU	MDR	Σ TU	MDR
Ft-Fz	0,98	1,03	0,91	1,10	1,43	0,70
Ft-DEHP	1,05	0,95	0,83	1,21	1,70	0,59
Fz-DEHP	1,13	0,89	0,88	1,14	1,17	0,86
Ft-Fz-DEHP	1,16	0,86	0,98	1,02	2,32	0,43

5.2.1.2 Gewebekonzentration

Abbildung 21 Gewebekonzentration von Fluoranthen aus Substanzmischungen in *F. candida* in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=4$) \pm Standardfehler des Endpunktes Gewebekonzentration. Die Behandlungen mit Einzelsubstanzen und Substanzmischungen aus Fluoranthen (Ft), Fluazinam (Fz) und DEHP entsprechen in ihrer Toxizität 1 Toxic Unit und enthalten jeweils 1, (Ft und Ft-DEHP) und 0.5 TU an Fluoranthen (Ft-Fz und Ft-Fz-DEHP). #: Gewebekonzentration bei Ft aus Einzelsubstanztests abgeleitet, s. **Abbildung 5**).

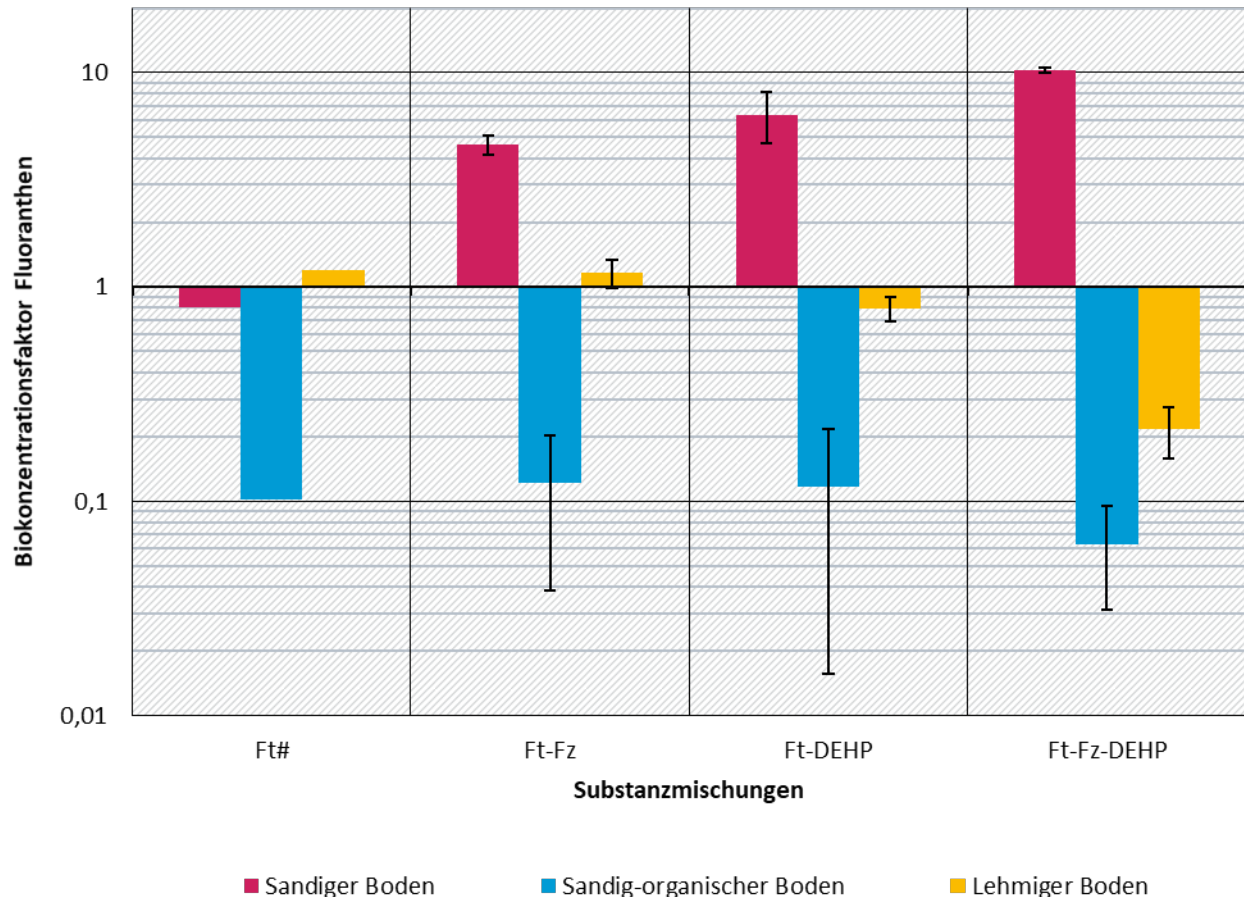


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Die Gewebekonzentration von Fluoranthen in den Collembolen unterscheidet sich deutlich zwischen den Böden und Behandlungen. So liegt in den Einzelsubstanztests der höchste Wert im lehmigen Boden mit 104 $\mu\text{g/g}$, gefolgt vom sandigen Boden mit 48 $\mu\text{g/g}$ und dem sandig-organischen Boden mit 22 $\mu\text{g/g}$. In den Mischungen bleibt die Gewebekonzentration tendenziell ähnlich, nur im sandigen Boden steigt sie deutlich an, auf bis zu 394 $\mu\text{g/g}$ in der Mischung Fluoranthen-DEHP, während sie im lehmigen Boden nur in der ternären Mischung deutlich auf 40 $\mu\text{g/g}$ abfällt (**Abbildung 21**). Da jedoch allen Behandlungen unterschiedliche Bodenkonzentrationen enthalten, sollte der Biokonzentrationsfaktor (Gewebekonzentration/Bodenkonzentration) als weitere Größe herangezogen werden, um diesen Faktor bei der weiteren Beurteilung zu berücksichtigen (**Abbildung 22**).

Abbildung 22 Biokonzentration von Fluoranthen aus Substanzmischungen in *F. candida* in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=4$) \pm Standardfehler des Endpunktes Gewebekonzentration. Die Behandlungen mit Einzelsubstanzen und Substanzmischungen aus Fluoranthen (Ft), Fluazinam (Fz) und DEHP entsprechen in ihrer Toxizität 1Toxic Unit und enthalten jeweils 1, (Ft und Ft-Ft-DEHP) und 0.5 TU an Fluoranthen (Ft-Fz und Ft-Fz-DEHP). #: Gewebekonzentration bei Ft aus Einzelsubstanztests abgeleitet, s. Abbildung 5).



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

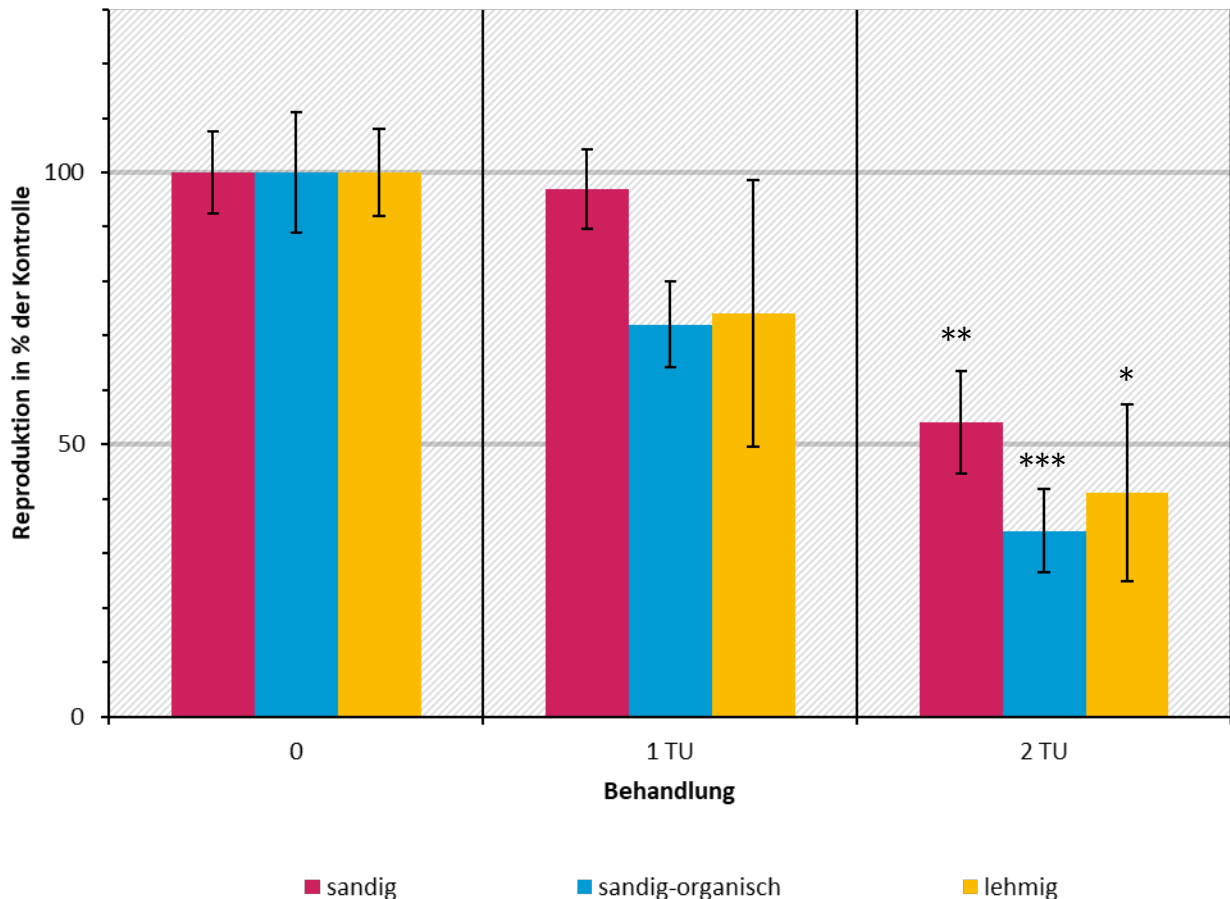
Beim Biokonzentrationsfaktor zeigt sich noch einmal verstärkt der Einfluss des Bodens und der Mischungen auf die Aufnahme von Fluoranthen. Während im sandigen und lehmigen Boden der Biokonzentrationsfaktor für die Einzelsubstanz ungefähr bei 1 liegt, Gewebekonzentration also der Bodenkonzentration entspricht, liegt dieser Wert im sandig-organischen Boden mit 0,1 deutlich niedriger. Im sandigen Boden steigt dann der Biokonzentrationsfaktor von Fluoranthen in den Mischungen auf Werte von $4,6 \pm 0,5$ bis $10,3 \pm 0,3$ sodass die Gewebekonzentration deutlich über der Bodenkonzentration liegt. Im sandig-organischen Boden bleibt der Biokonzentrationsfaktor konstant niedrig bei etwa 0,1, während er im lehmigen Boden nur in der ternären Mischung von ungefähr 1 auf $0,22 \pm 0,1$ fällt. Die Mischungen haben demnach im sandigen Boden in allen Kombinationen einen positiven Einfluss auf die Biokonzentration von Fluoranthen, im sandig-organischen Boden gar keinen und im lehmigen Boden nur in der ternären Mischung einen negativen Einfluss (**Abbildung 22**).

5.2.2 Enchyträen

5.2.2.1 Reproduktion, Überlebensrate und Trockengewicht

Abbildung 23 Toxizität von quaternären Substanzmischungen ggü. *E. crypticus* in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte (n=6, verteilt auf 2 Tests) ± Standardfehler des Endpunktes Reproduktion in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Alle Behandlungen enthalten Fluoranthen, Fluazinam, DEHP und Break-Thru und entsprechen in ihrer Toxizität 1 oder 2 Toxic Units (TU). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: 0,05 > p ≥ 0,01; **: 0,01 > p ≥ 0,001; ***: p > 0,001



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Für Enchyträen wurde eine quaternäre Mischung mit allen verfügbaren Testsubstanzen in zwei Konzentrationsstufen getestet, und zwar 1 bzw. 2 TU. Demnach sollte auch hier unter Annahme von Additivität bei 1 TU 50% Effekt erzielt werden. In **Abbildung 23** zeigt sich jedoch, dass die Reproduktion im sandigen, sandig-organischen und lehmigen Boden bei 85 ± 13%, 72 ± 8% und 74 ± 24% der Kontrolle liegt. Demnach ist hier von antagonistischen Effekten auszugehen, insbesondere im sandigen Boden. Bei 2 TU liegen alle drei Böden im Bereich der 50% zur Kontrolle bzw. darunter und unterscheiden sich jeweils signifikant von dieser, und zwar mit 54 ± 9% (p = 0,004; t = -3,5), 34 ± 8% (P < 0,001; t = -4,5) und 41 ± 16% (p = 0,04; t = -2,33) der Kontrolle. Allerdings sind die Konzentrationen in dieser Behandlung doppelt so hoch wie in 1 TU, weshalb hier nicht von Additivität gesprochen werden kann. Dies bestätigt sich auch mit Blick auf Σ TU (**Tabelle 10**), welche deutlich über 1 liegen. Lediglich im sandig-organischen Boden liegt Σ TU mit 1,35 in der Nähe des Toleranzbereichs für Additivität von 0,8 – 1,2 (Jonker

et al., 2005), gefolgt vom lehmigen Boden mit 1,66. Die Ergebnisse zeigen demnach für den sandigen Boden einen deutlichen und für den sandig-organischen und den lehmigen Boden jeweils einen leichten Antagonismus. Diese Ausprägungen bleiben jedoch über die beiden Konzentrationsstufen hinweg für alle Böden weitgehend konstant, d.h. die Ausprägung der Mischungstoxizität ist nicht abhängig von der Konzentrationshöhe (vgl. dose-level dependency, Jonker et al., 2005).

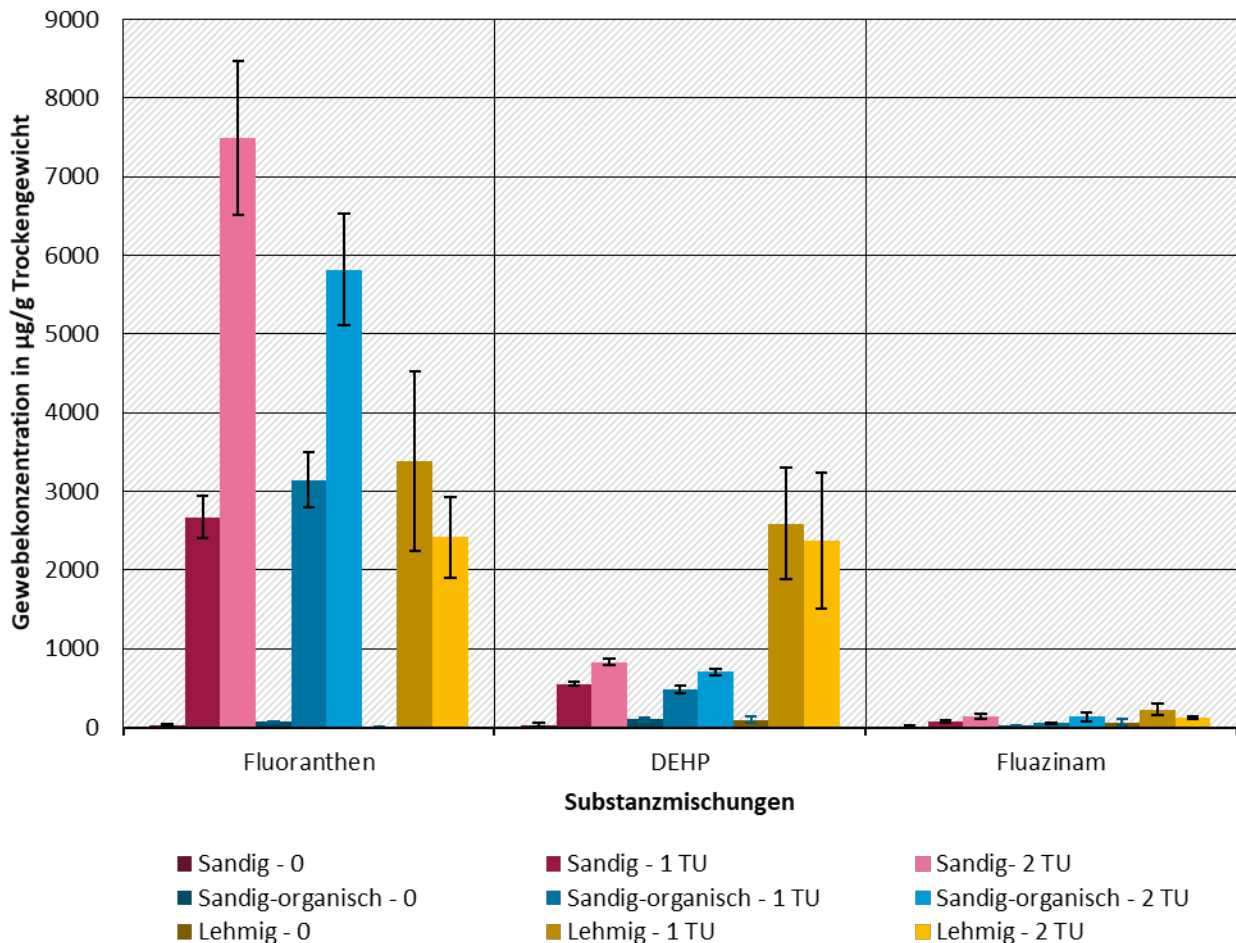
Tabelle 10 Summen der Toxic Units (Σ TU) und Model Deviation Ratios (MDR) zu allen effektiven Substanzmischungen mit *E. crypticus*

Mischung	Sandig		Sandig-organisch		Lehmig	
	Σ TU	MDR	Σ TU	MDR	Σ TU	MDR
1 TU	2,13	0,47	1,35	0,74	1,66	0,60
2 TU	2,11	0,47	1,65	0,60	1,83	0,55

5.2.2.2 Gewebekonzentration

Abbildung 24 Gewebekonzentration aller Substanzen aus Substanzmischungstests in *E. crypticus* in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte (n=3) ± Standardfehler des Endpunktes Gewebekonzentration für die Kontrollen und die quaternären Mischungen mit der Toxizität von 1 und 2 Toxic Units (TU).

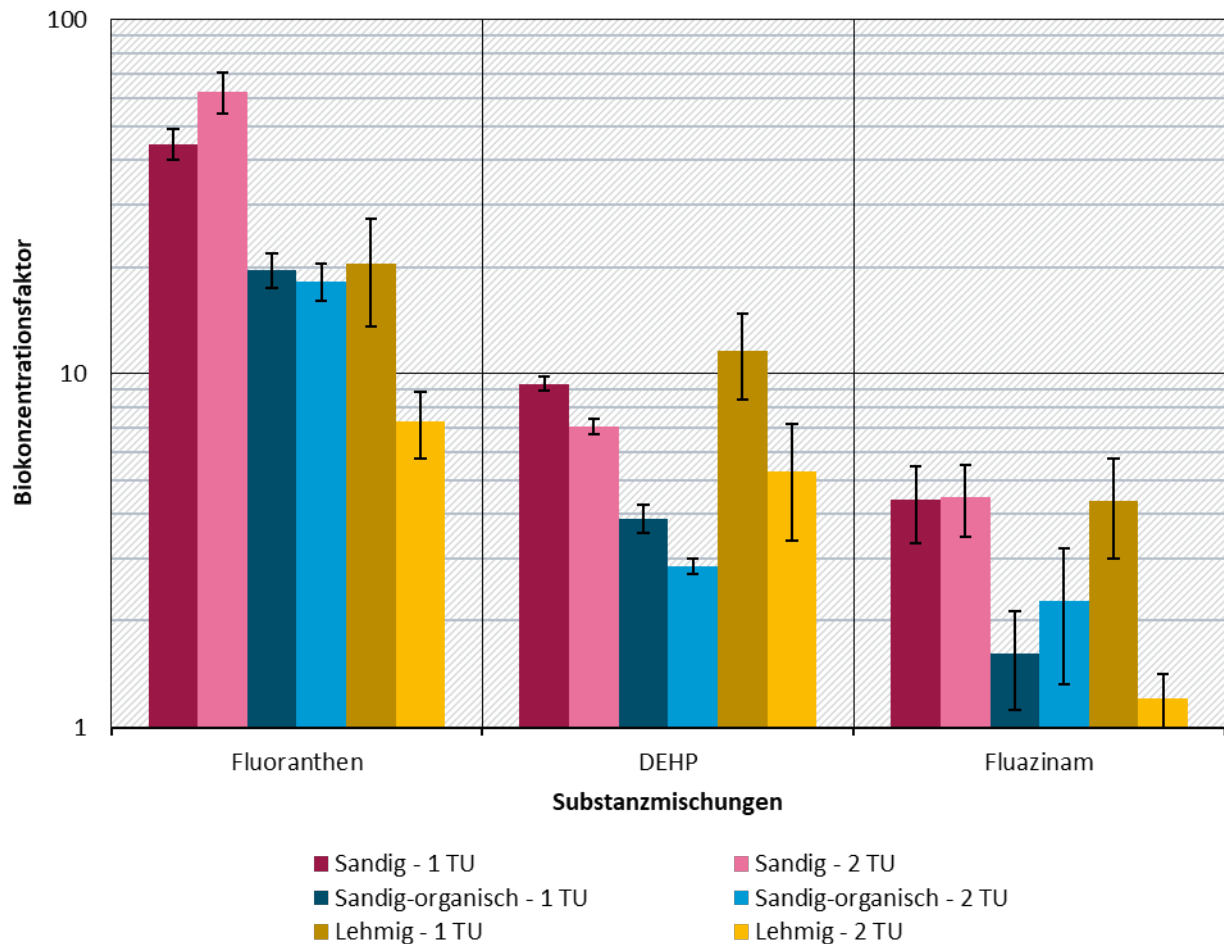


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Aufgrund der höheren individuellen Biomasse und insgesamt höherer Gewebekonzentrationen konnten für Enchyträen die drei Stoffe Fluoranthen, DEHP und Fluazinam nachgewiesen werden, und zwar mit abnehmenden Gewebekonzentrationen in dieser Reihenfolge (**Abbildung 24**). Die höchsten Werte traten je Substanz in unterschiedlichen Böden auf, da auch hier die jeweils angesetzten Bodenkonzentrationen stark variierten, weshalb sich auch hier der Biokonzentrationsfaktor besser als Bezugsgröße eignet (**Abbildung 25**).

Abbildung 25 Gewebekonzentration aller Substanzen aus Substanzmischungstests in *E. crypticus* in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler des Endpunktes Biokonzentration für die quaternären Mischungen mit der Toxizität von 1 und 2 Toxic Units (TU). Die verwendeten Gewebekonzentrationswerte zur Berechnung der Biokonzentration wurden um den Betrag der Kontrollwerte korrigiert, da diese vermutlich durch Verschleppungen während der chemischen Analyse zustande kamen.

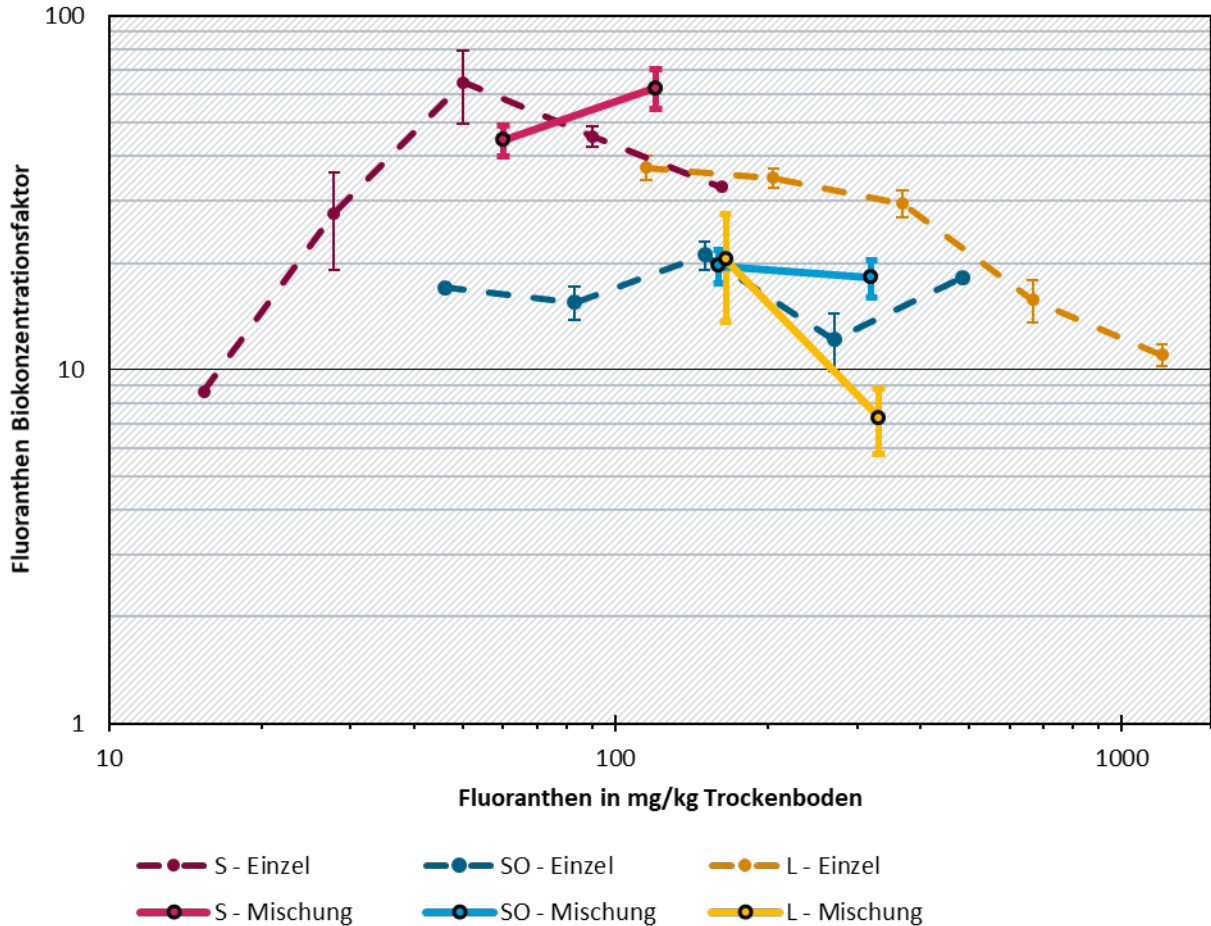


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Die Biokonzentrationsfaktoren liegen für Fluoranthen deutlich über den Werten von Collembolen in dieser Studie, und zwar um bis zu 2 Größenordnungen. Der höchste Wert wurde für 2 TU im sandigen Boden mit 62 ± 8 erzielt, generell gab es jedoch keinen eindeutigen Trend, in welchem Boden die Biokonzentration am höchsten war. Ebenfalls gab es keinen klaren Trend, in welcher Konzentrationsstufe die Biokonzentration höher war (**Abbildung 25**).

Abbildung 26 Biokonzentration von Fluoranthren aus Einzelsubstanz- und Substanzmischungstests in *E. crypticus* in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Biokonzentration von Fluoranthren in adulten *E. crypticus* – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust $n < 3$. Werte aus Substanzmischungen werden mit durchgezogenen Linien verbunden, diejenigen aus Einzelsubstanztests mit gestrichelten Linien.

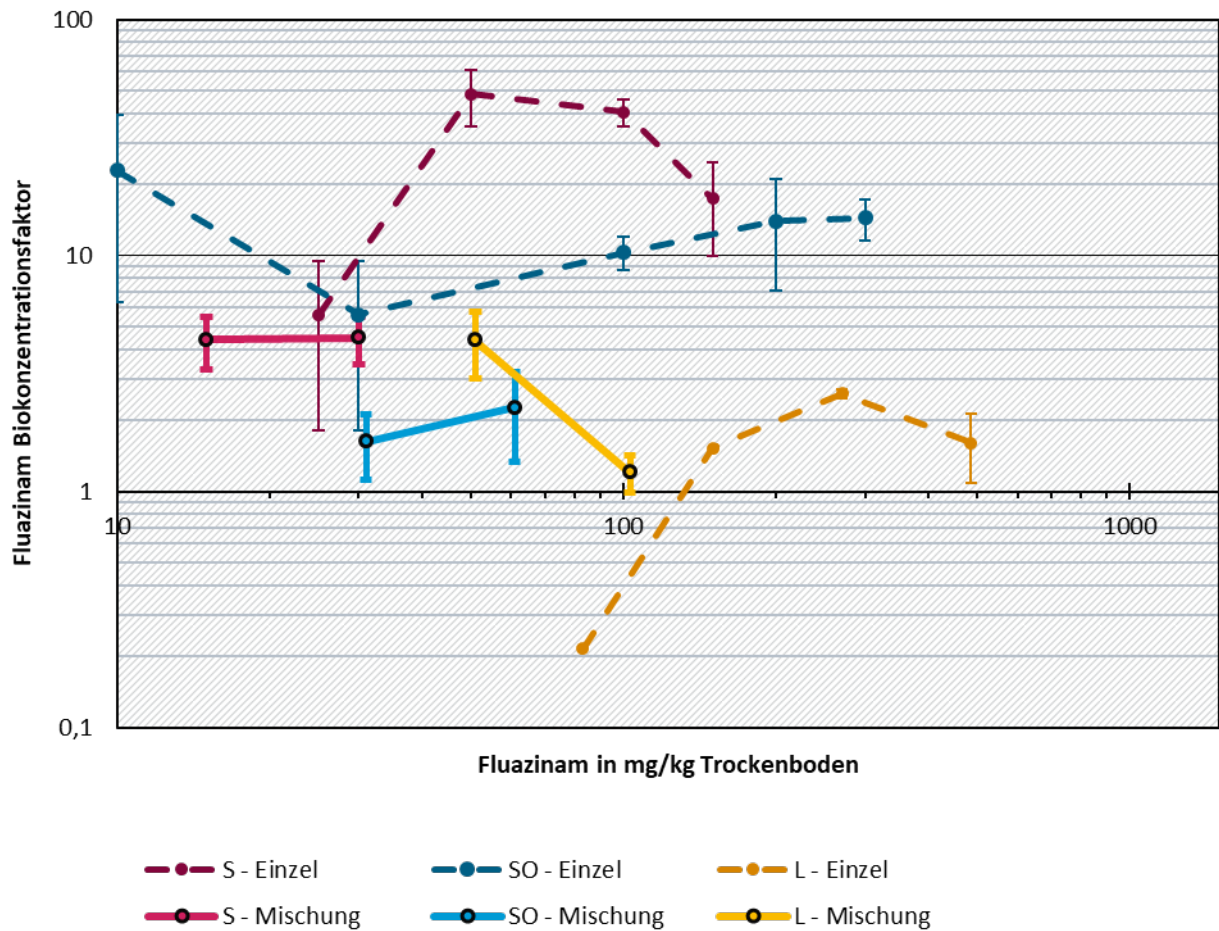


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Da in den effektiven Substanzmischungen von Enchyträen keine Einzelsubstanzen mitgetestet wurden, wird über einen Vergleich mit den Einzelsubstanztests die Auswirkungen der Substanzmischung auf die Biokonzentration untersucht. **Abbildung 26** zeigt, dass im sandigen und im sandig-organischen Boden die Biokonzentrationsfaktoren von Fluoranthren durch die Mischungen nicht verändert werden, im lehmigen Boden dagegen deutlich abnehmen.

Abbildung 27 Biokonzentration von Fluazinam aus Einzelsubstanz- und Substanzmischungstests in *E. crypticus* in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Biokonzentration von Fluazinam in adulten *E. crypticus* – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust $n < 3$. Werte aus Substanzmischungen werden mit durchgezogenen Linien verbunden, diejenigen aus Einzelsubstanztests mit gestrichelten Linien.

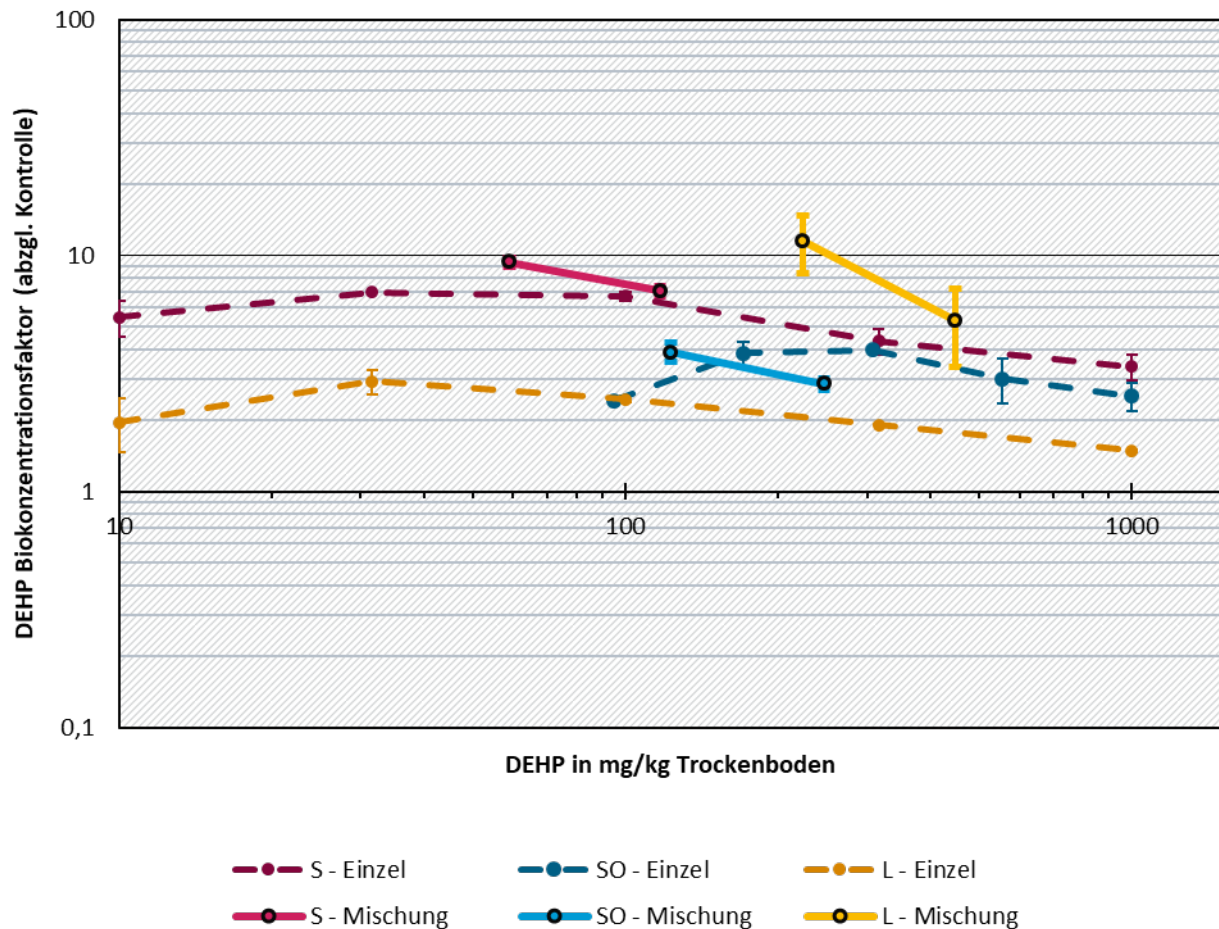


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Für Fluazinam zeigt sich in jedem Boden ein unterschiedlicher Einfluss. Im sandigen Boden beeinflusst die Mischung die Biokonzentration eher nicht (zumindest in 2 TU, 1 TU liegt außerhalb des Konzentrationsbereichs der Einzelsubstanzen). Im sandig-organischen Boden wird die Biokonzentration durch die Mischung deutlich verringert, während sie im lehmigen Boden deutlich erhöht wird (**Abbildung 27**).

Abbildung 28 Biokonzentration von DEHP aus Einzelsubstanz- und Substanzmischungstests in *E. crypticus* in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Biokonzentration von DEHP in adulten *E. crypticus* – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust $n < 3$. Werte aus Substanzmischungen werden mit durchgezogenen Linien verbunden, diejenigen aus Einzelsubstanztests mit gestrichelten Linien.



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Für DEHP zeigt sich wiederum ein klares Muster zwischen den Böden: während in den beiden sandigen Böden die Biokonzentration durch die Mischung nicht beeinflusst wird, steigt sie im lehmigen Boden durch die Mischung deutlich an (**Abbildung 28**).

Somit zeigt sich mit dem Einfluss der Mischungen auf die Biokonzentration erneut ein klares Muster in Bezug auf die jeweiligen Testböden. In den beiden sandigen Böden hat die Mischung in fast allen Fällen keinen Einfluss auf die Biokonzentration, während der lehmige Boden, je nach Substanz, diese im Vergleich zu den Einzelsubstanztests entweder deutlich hebt oder senkt.

Allerdings lässt sich die veränderte Biokonzentration nur bedingt mit der beobachteten Toxizität in Verbindung bringen. So ist der Antagonismus im sandig-organischen Boden eigentlich am schwächsten ausgeprägt, allerdings ist gerade dort nur die Aufnahme von Fluazinam stark reduziert, was eigentlich zu einem stärkeren Antagonismus führen sollte. Im sandigen Boden hat sich keine der Biokonzentrationen geändert, dennoch ist der Antagonismus hier am stärksten ausgeprägt. Im lehmigen Boden schließlich wird verstärkt Fluazinam zuungunsten von Fluoranthren aufgenommen, was eigentlich eher zu einem Synergismus führen

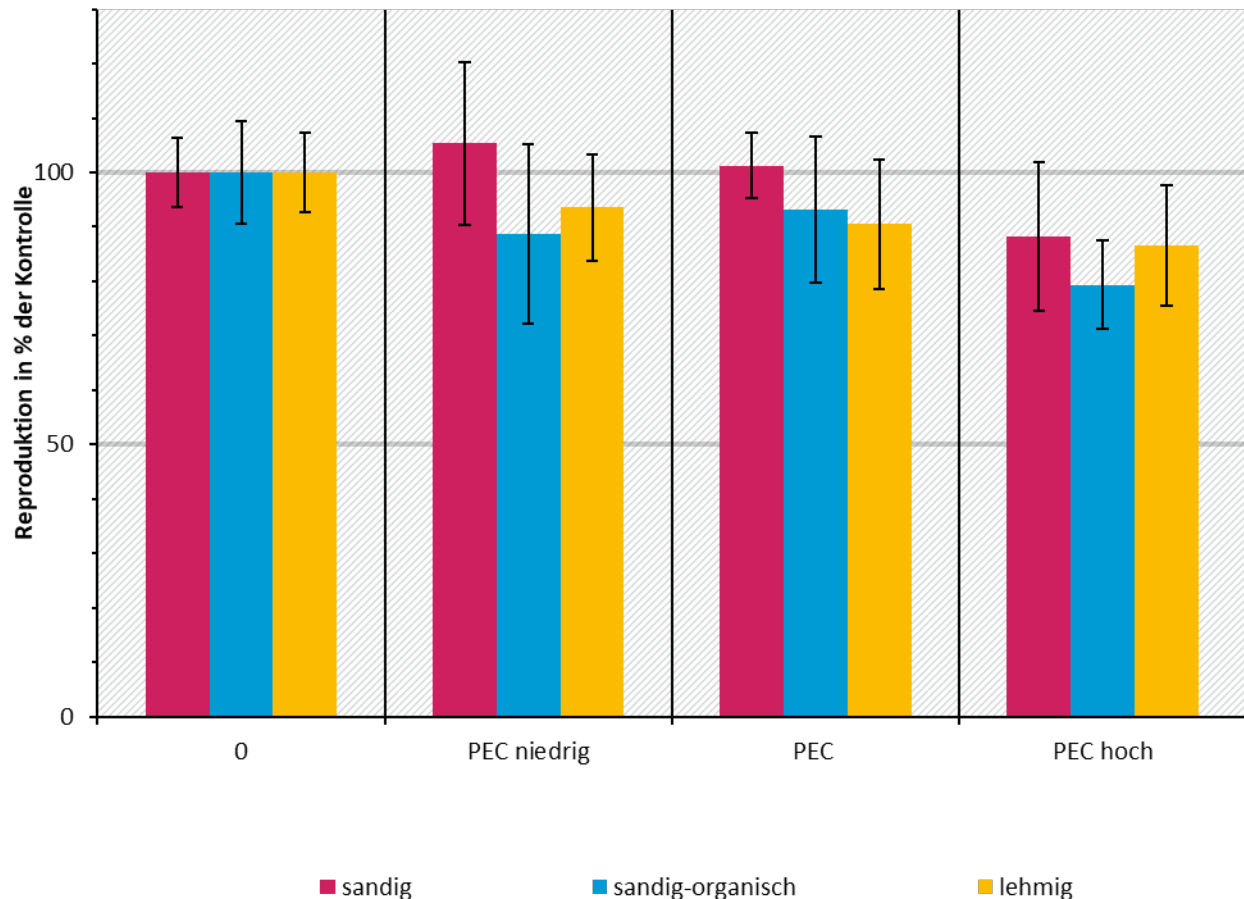
sollte. Die Lösung liegt vermutlich in der vierten, nicht chemisch analysierbaren Substanz, dem Break-Thru. Dieses weist in allen drei Böden eine sehr steile Dosis-Wirkungskurve auf (**Abbildung 9**), was dazu führen könnte, dass die in der Mischung applizierte Fraktion ($EC_{50}/3$) keinen Beitrag zur Toxizität leistet und damit insgesamt die Ausprägung der Mischungstoxizität in allen Böden Richtung Antagonismus verschoben wird. Aus diesem Grund sollen in zukünftigen Experimenten Mischungen ohne Break-Thru getestet werden, und zwar in Anlehnung an das aus binären und ternären Mischungen bestehende Testschema der Collembolen (**Tabelle 4**). Dies würde auch einen direkten Vergleich zu den in Collembolen beobachteten Effekten erlauben. Gegenwärtig lassen sich diese noch nicht miteinander in Einklang bringen, sowohl in Bezug auf die Toxizität als auch auf die Biokonzentration. Es ist jedoch unklar, ob dies speziebedingte ist oder an den unterschiedlichen Testschemata liegt.

5.3 Umweltrelevante Substanzmischungen (PEC)

5.3.1 Collembolen

Abbildung 29 Toxizität einer umweltrelevanten Substanzmischung ggü. *F. candida* in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte (n=9, verteilt auf 3 Tests) ± Standardfehler des Endpunktes Reproduktion in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Die Konzentrationen der vier Testsubstanzen in den drei Behandlungen finden sich in **Tabelle 6**. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden nicht gefunden.



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Die umweltrelevanten Substanzmischungen enthalten alle vier Testsubstanzen in Höhe ihres PECs, bzw. um den Faktor 4-5 größer oder kleiner als ihr PEC. Für Collembolen zeigte sich, dass, abgesehen von den zwei niedrigeren Konzentrationsstufen im sandigen Boden, alle Behandlungen niedriger lagen als die Kontrolle, und zwar um 7 bis 21%. Allerdings war keiner dieser Unterschiede statistisch signifikant (**Abbildung 29**).

Mit Blick auf die ΣTU zeigt sich, dass es in fast allen Behandlungen eine deutliche Abweichung von der vorhergesagten Effektstärke basierend auf der Annahme Konzentrationsadditivität und den tatsächlichen beobachteten Effekten gab. So liegen die ΣTU deutlich unter 1, in den niedrigen Konzentrationen sogar drastisch mit Werten von bis zu 0,05 bei PEC/5 im sandig-organischen Boden (**Tabelle 11**). Dies bedeutet, dass der Effekt um den Faktor 220 (s. model deviation ratio MDR in Kapitel 2) höher ausfällt, als dies das auf der theoretischen Annahme der Additivität basierende Toxic Unit-Modell nahelegen würde. Weiterhin zeigt sich, dass ausgerechnet im sandigen Boden, in dem die Toxizität der Einzelsubstanzen ggü. Collembolen

mit Abstand am höchsten war, der Synergismus am geringsten ausfällt und in zwei Konzentrationen sogar ein leicht positiver Effekt durch die Mischung zu sehen ist, für diese also am ehesten ein Antagonismus das Mischungstoxische Verhalten am besten beschreibt. Im Gegensatz dazu fallen die beobachteten Synergismen im sandig-organischen und lehmigen Boden deutlich höher aus, wie man bei PEC*5 vergleichend feststellen kann.

Tabelle 11 Summen der Toxic Units (Σ TU) und Model Deviation Ratios (MDR) zu allen umweltrelevanten Substanzmischungen mit *F. candida*

Mischung	Sandig		Sandig-organisch		Lehmig	
	Σ TU	MDR	Σ TU	MDR	Σ TU	MDR
PEC/5	-	-	0,005	220	0,007	138
PEC	-	-	0,02	49,8	0,027	36
PEC*5	0,34	2,95	0,07	14,2	0,1	9,6

Die mit Blick auf die Modellvorhersage unerwartet hohen Effekte könnten auf synergistische Interaktionen der Testsubstanzen zurückzuführen sein. Dies schließt neben direkten Interaktionen wie sich gegenseitige verstärkende Aufnahme (vgl. Abbildung 22), die in den hier getesteten Konzentrationsbereichen jedoch nicht nachgewiesen werden können, auch indirekte Effekte mit ein. So könnte Fluazinam das Nahrungsangebot für Collembolen und Enchyträen verknapen da es bereits deutlich unterhalb von Konzentrationen mit negativem Einfluss auf deren Reproduktion toxisch auf die mikrobielle Bodengemeinschaft wirkt (**Abbildung 17**

Toxizität von Fluazinam auf die mikrobielle Bodenatmung in allen Böden) und damit als Fungizid vermutlich v.a. Pilze trifft, welche als Nahrungsquelle für Collembolen und Enchyträen dienen (Filsler, 2002). Es gibt jedoch auch Erklärungsansätze, die die Höhe der beobachteten Abweichungen relativieren. So lassen sich die deutlichen Abweichungen durch einen simplen arithmetischen Effekt begründen: durch die äußerst niedrigen Testkonzentrationen bedarf es nur sehr geringer Effekte, um eine deutliche Modellabweichung zu erhalten. Zudem sind niedrige Effektkonzentrationen weniger robust und stärkeren Schwankungen unterlegen als im Bereich des EC₅₀, was die experimentelle Reproduzierbarkeit von Effekten in niedrigen Konzentrationsbereichen erschwert. Dies gilt umso mehr für diese Ergebnisse, da sie auf Dosis-Wirkungskurven zur Ermittlung des EC₅₀ für die effektiven Substanzmischungen basieren. Nichtsdestotrotz zeigen sowohl die konsistent niedrigere Reproduktion als auch die v.a. in PEC/5 dreistelligen MDRs, welche geringen Effekte unter Annahme von Additivität eigentlich zu erwarten wären und wie deutlich die hier an Bodeninvertebraten beobachteten Effekte nahezu flächendeckend darüber liegen. Da aufgrund der oben genannten Unsicherheiten ein experimentell beobachteter Effekt die reale Situation sowohl über- als auch unterschätzen kann, kann somit eine synergistische Interaktion des Stoffgemisches als Ursache nicht ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung des tatsächlichen Ursprungs der Effekte wird ein verändertes Testdesign benötigt, das die benannten Unsicherheiten deutlich reduziert, z.B. über eine erhöhte Replikatzahl und Dosis-Wirkungskurven mit detaillierten Niedrigkonzentrationsbereichen.

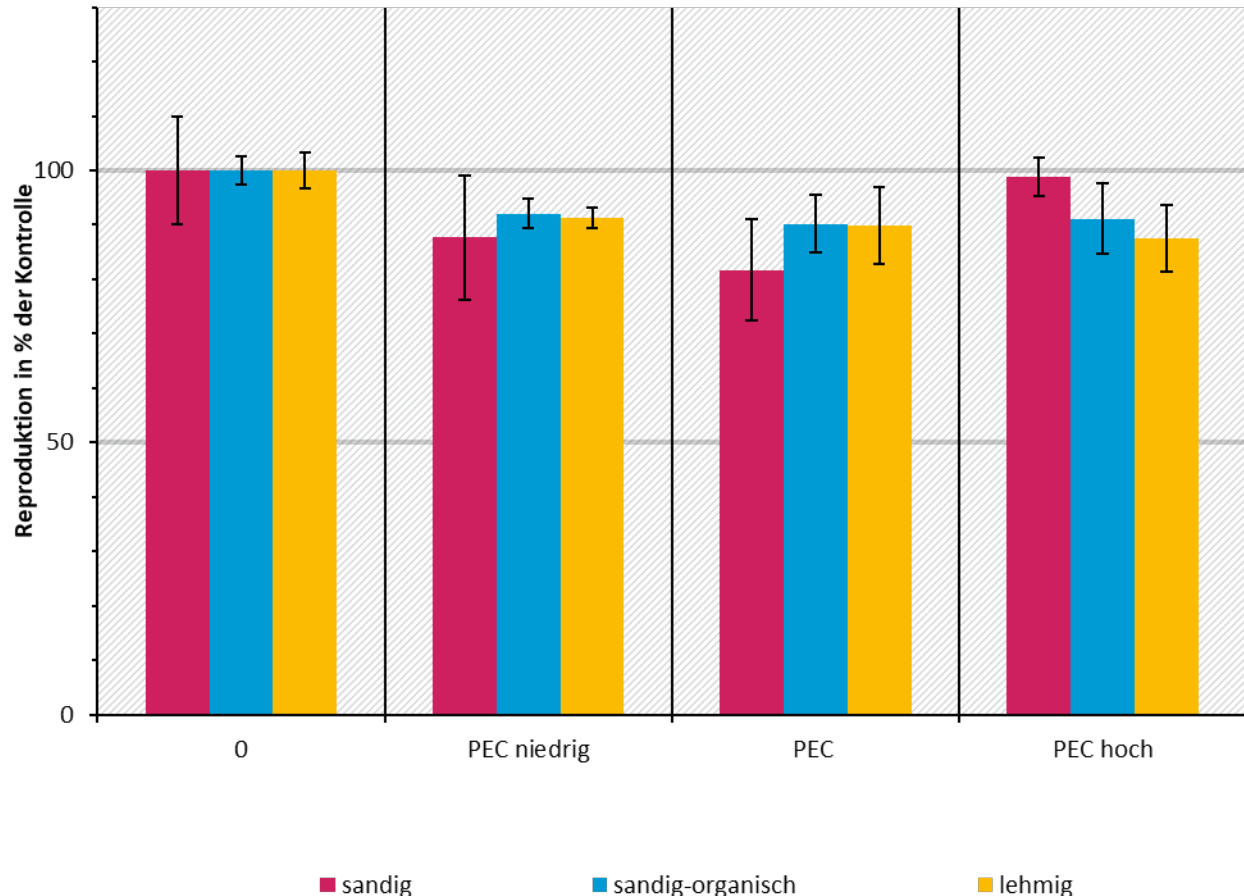
Es besteht darüber hinaus die Möglichkeit, dass v.a. im sandig-organischen Boden ein Teil des Effekts aus dem durch Break-Thru verursachten Artefakt (**Abbildung A 9**) resultiert. Ein Vergleichstest mit PEC_{hoch}, bei dem Hitzeextraktion verwendet wurde, deutet in diesem Boden jedoch einen Effekt in vergleichbarer Größenordnung an, wenn auch ebenfalls nicht statistisch signifikant (**Abbildung A 10**). Für den lehmigen Boden ist ein durch Break-Thru verursachtes

Artefakt nahezu ausgeschlossen, da der Einfluss von Break-Thru auf das Testsystem in diesem Boden erst deutlich über 100 mg/kg beginnt (**Abbildung A 9**).

5.3.2 Enchyträen

Abbildung 30 Toxizität einer umweltrelevanten Substanzmischung ggü. *E. crypticus* in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=6$, verteilt auf 2 Tests) \pm Standardfehler des Endpunktes Reproduktion in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Die Konzentrationen der vier Testsubstanzen in den drei Behandlungen finden sich in **Tabelle 6**. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden nicht gefunden.



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Im Enchyträentest war die Reproduktion in allen Konzentrationsstufen in allen Böden im Vergleich zur Kontrolle reduziert (**Abbildung 30**). Die Reduktion reichte von 1 bis 19%, wobei sie im Fall vom sandigen Boden nicht linear zum Konzentrationsanstieg verlief. Auch in diesem Test war keine der Reduktionen statistisch signifikant.

Ebenfalls wiederholen sich bei den Enchyträen grundsätzlich die bei den Collembolen beobachteten Muster: es liegen, diesmal durchweg in allen Behandlungen deutliche, teils drastische Abweichungen der beobachteten zu den modellierten Effekten vor. Diese nehmen vom sandigen Boden, in dem auch für Enchyträen alle Einzelstoffe mit Abstand am toxischsten waren, hin zu den beiden stärker adsorbierenden Böden deutlich zu. Auch nehmen diese Abweichungen von den hohen zu den niedrigen Konzentrationen massiv zu (**Tabelle 12**). Wie bereits bei den Collembolen erklärt, gibt es mehrere mögliche Ursachen für diese hohen Abweichungen abseits von einer synergistischen Interaktion. Das für Collembolen durch Break-Thru beobachtete Artefakt spielt jedoch für die Enchyträentests und somit für diese Ergebnisse keine Rolle.

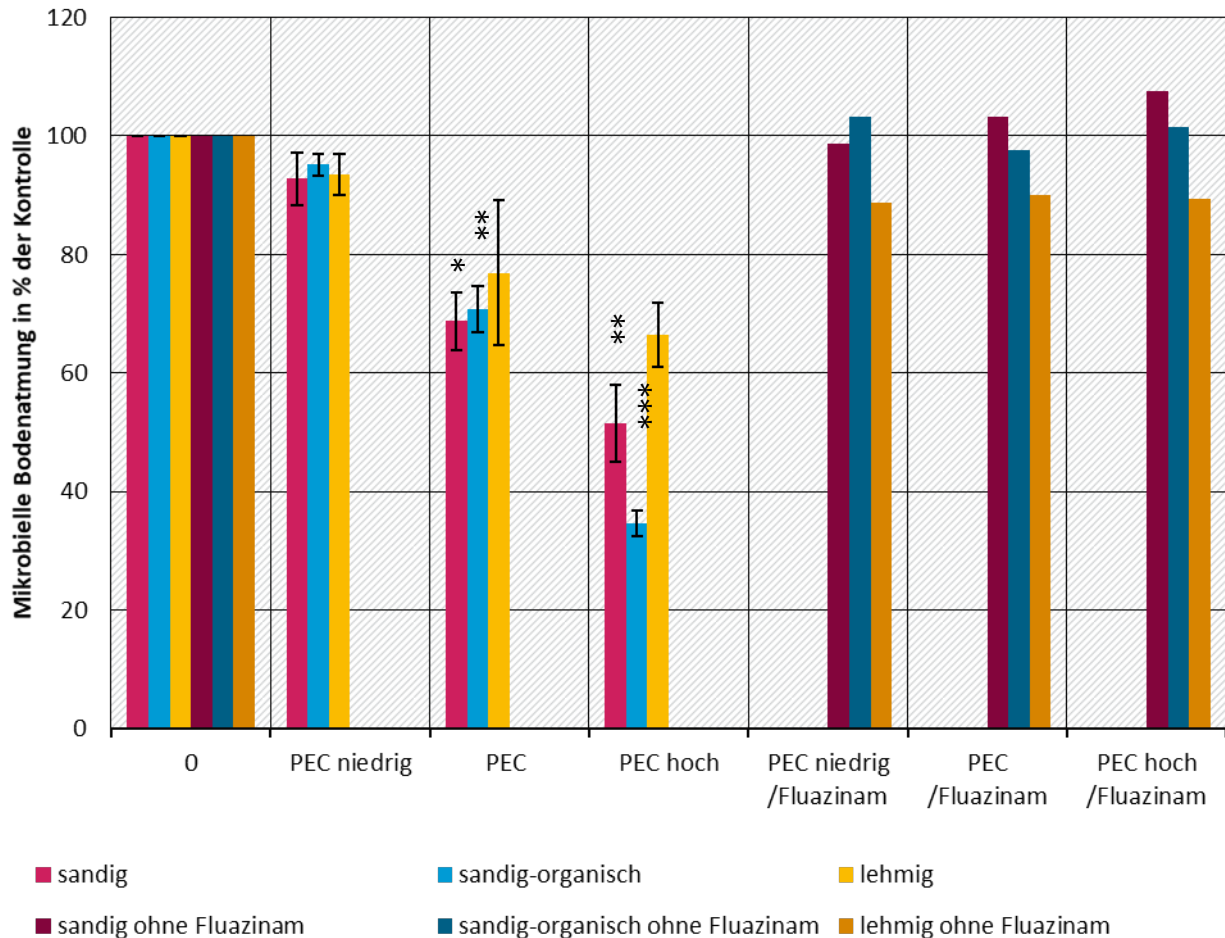
Tabelle 12 Summen der Toxic Units (Σ TU) und Model Deviation Ratios (MDR) zu allen umweltrelevanten Substanzmischungen mit *E. crypticus*

Mischung	Sandig		Sandig-organisch		Lehmig	
	Σ TU	MDR	Σ TU	MDR	Σ TU	MDR
PEC/5	0,007	142	0,004	228	0,002	666
PEC	0,022	44,8	0,016	64,3	0,006	170
PEC*5	0,46	2,16	0,067	15,0	0,022	44,2

5.3.3 Mikrobielle Bodengemeinschaft

Abbildung 31 Toxizität einer umweltrelevanten Substanzmischung ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$, verteilt auf 3 Tests mit Fluazinam, $n=2$, verteilt auf 2 Tests ohne Fluazinam) \pm Standardfehler des Endpunktes Bodenatmung in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Die Konzentrationen der vier Testsubstanzen in den Treatments finden sich in **Tabelle 6**. Eine Hälfte der Treatments enthält kein Fluazinam. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: $0,05 > p \geq 0,01$; **: $0,01 > p \geq 0,001$; ***: $p > 0,001$. Ausgewertet wurden die Daten jedoch mit absoluten, nicht mit relativen Werten, wie hier zur besseren Übersicht dargestellt.



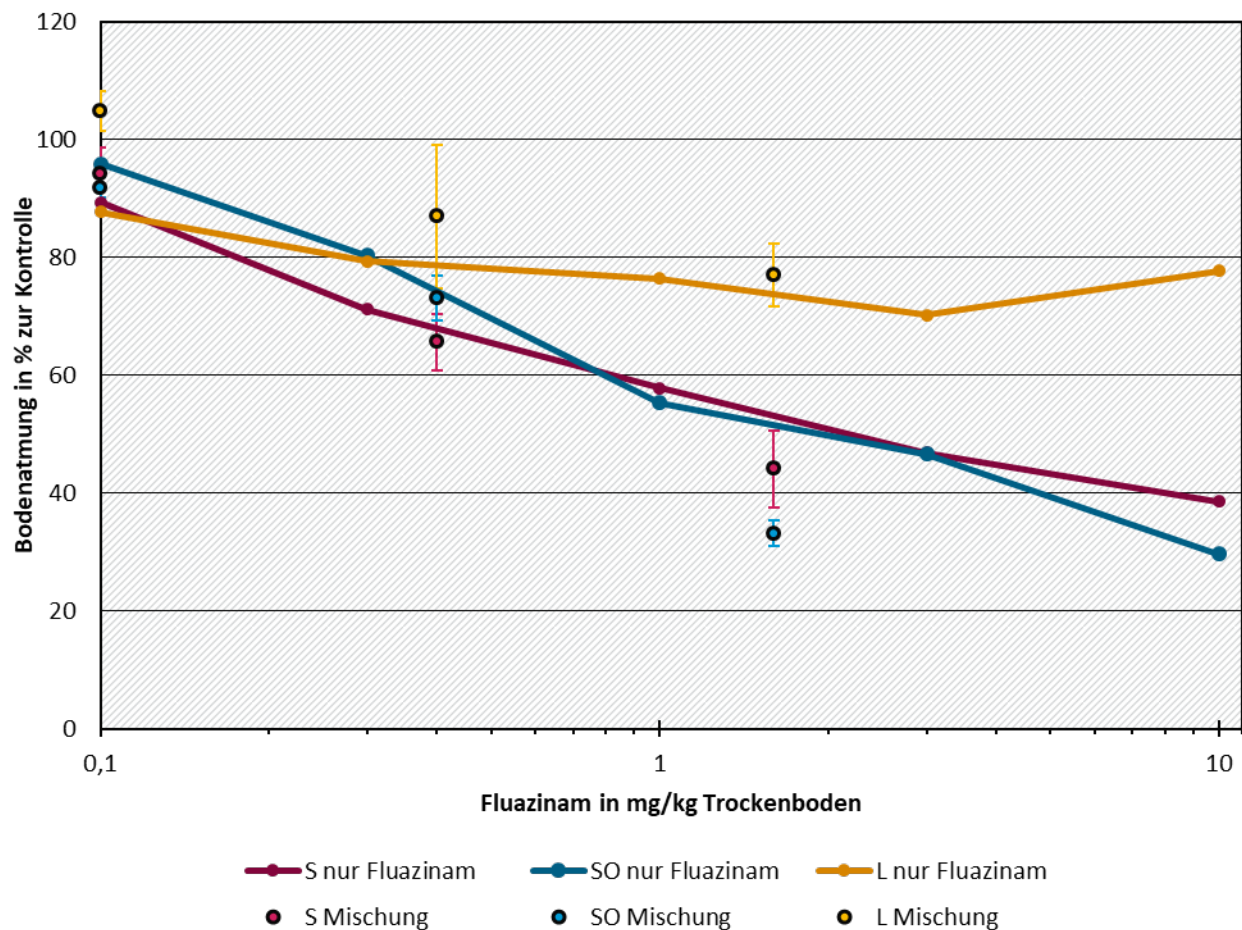
Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Aufgrund der hohen Toxizität von Fluazinam ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft verursachen die umweltrelevanten Stoffmischungen in diesem Testsystem deutlich sichtbare und signifikante Effekte auf die mikrobielle Bodenatmung. So liegt bei PEC_{niedrig} zunächst eine Reduktion von 5 bis 7% in allen Böden vor, jedoch noch nicht signifikant. Bei PEC fällt die Reduktion bereits mit 23 bis 31% deutlich stärker aus, und das für den sandigen ($p = 0,026$; $t = -2,7$) und den sandig-organischen Boden jeweils signifikant ($p = 0,002$; $t = -4,5$). In der höchsten Konzentrationsstufe zeigen sich nun auch deutliche Unterschiede in der Effektstärke zwischen den Böden. So ist der toxische Effekt mit $65 \pm 2\%$ ($p < 0,001$; $t = -10,1$) im sandig-organischen Boden am höchsten, gefolgt vom sandigen Boden mit $48 \pm 7\%$ ($p = 0,004$; $t = -4,1$) und dem lehmigen Boden mit $34 \pm 5\%$ ($p = 0,069$; $t = -2,1$), bei diesem jedoch nicht signifikant. Um den starken Einfluss von Fluazinam zu verdeutlichen, wurden parallel die gleichen Stoffmischungen

nur ohne Fluazinam getestet. Diese wiesen nur deutlich geringere und nicht signifikante Effekte auf: im sandigen Boden wurde die Bodenatmung um höchstens 1% gesenkt, im sandig-organischen um höchstens 2% und im lehmigen Boden um 10-11% (**Abbildung 31**). Dieser relativ hohe Wert deutet darauf hin, dass die anderen Substanzen neben Fluazinam doch einen gewissen Beitrag zur Gesamttoxizität leisten und könnten der Grund dafür sein, dass im lehmigen Boden die toxischen Effekte höher ausfallen, als die Werte von Fluazinam vermuten ließen.

Abbildung 32 Vergleich der Toxizität einer umweltrelevanten fluazinamhaltigen Substanzmischung mit Fluazinam als Einzelsubstanz ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte (n=3, verteilt auf 3 Tests) ± Standardfehler des Endpunktes Bodenatmung in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg) für die Substanzmischung (Punkte ohne Linie), abzüglich des Einflusses auf die Bodenatmung aller Substanzen der Substanzmischung außer Fluazinam (vgl. Abbildung 31). Zudem werden die Mittelwerte (n=2, verteilt auf 2 Tests) aus den Einzelsubstanztests mit Fluazinam dargestellt (Punkte mit Linie).



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Um die gute Übereinstimmung der beobachteten Toxizität in den umweltrelevanten Stoffmischungen mit denen von Fluazinam alleine zu verdeutlichen, wurden in **Abbildung 32**

die Effekte aus den Einzelsubstanztests mit Fluazinam mit denen der umweltrelevanten Substanzmischungen verglichen, und zwar korrigiert um den Einfluss aller anderen Substanzen ohne Fluazinam. Der Vergleich zeigt, dass die Werte nur gering und im Rahmen der Fehlerbalken voneinander abweichen. Lediglich PEC_{hoch} im sandig-organischen Boden weist mit $65 \pm 2\%$ einen deutlich höheren Effekt auf als die etwa 50% Effekt, die für Fluazinam alleine zu erwarten wären (EC_{50} : $1,4 \pm 0,2$ mg/kg).

Zusammenfassend war die durch die effektiven Substanzmischungen verursachte Toxizität ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft sehr stark von der Einzelsubstanz Fluazinam als hauptsächlicher „toxic driver“ geprägt (> 99,9% Beitrag zu ΣTU ; **Tabelle 13**). Während in den beiden sandigen Böden die verbleibenden Substanzen überhaupt keinen Effekt hatten, wurde im lehmigen Boden dennoch ein schwacher Effekt gezeigt, obwohl in den Vortests bei keiner dieser Substanzen ein Effekt bei < 1,000 mg/kg auftrat. Die starke Wirkung von Fluazinam zeigt, dass bereits Einzelsubstanzen in der Lage sind, toxische Effekte in umweltrelevanten Konzentrationen zu verursachen, diese könnten durch die Präsenz mehrerer stark toxischer Substanzen in Mischungen noch deutlich erhöht werden.

Tabelle 13 Summen der Toxic Units (ΣTU) und Model Deviation Ratios (MDR) zu allen umweltrelevanten Substanzmischungen mit der mikrobiellen Bodengemeinschaft

Mischung	Sandig		Sandig-organisch		Lehmig	
	ΣTU	MDR	ΣTU	MDR	ΣTU	MDR
PEC/5	1,67	0,60	1,25	0,80	0,03	36,8
PEC	0,74	1,35	0,85	1,17	0,11	9,20
PEC*5	0,87	1,15	0,45	2,24	0,43	2,30

6 Diskussion/Synopsis

6.1 Einzelsubstanzen

In der vorliegenden Studie wurden zahlreiche Erkenntnisse zur Toxizität und Gewebekonzentration mehrerer Schadstoffe alleine oder in Mischung unter wechselnden Bodeneigenschaften und Testorganismen gewonnen. Es zeigten sich für alle drei Parameter – Testboden, Testorganismen und Testsubstanzen – recht deutliche Muster in deren Auswirkung auf die Ausprägung toxischer Effekte. So war der sandige Boden in den meisten Fällen derjenige mit der höchsten Toxizität, gefolgt vom sandig-organischen und dem lehmigen Boden. Dies entspricht dem allgemeinen Verständnis, dass Böden mit hohem organischen (Lima et al., 2012) bzw. Tongehalt organische Schadstoffe stärker adsorbieren können (Cheng et al., 2012). Diese Adsorption wird dabei tendenziell mehr vom organischen als vom Tongehalt dominiert, was z.B. für PAK bereits nachgewiesen wurde (Means et al., 1980).

Dies zeigt sich auch für Collembolen in dieser Studie, für die Fluoranthen und Fluazinam, auf welches die Annahme höherer Adsorption in organischen Böden übertragbar sein dürfte, im sandig-organischen Boden weniger toxisch war als im lehmigen (**Abbildung 2**). Dies könnte daran liegen, dass Collembolen Schadstoffe v.a. über das Porenwasser aufnehmen (Fountain and Hopkin, 2005). Im Gegensatz dazu war bei Enchyträen im lehmigen Boden die Toxizität von Fluoranthen und Fluazinam am geringsten (**Abbildung 9**). Hierbei könnte eine Rolle spielen, dass Oligochaeten generell Schadstoffe über die Haut, aber auch über den Verdauungstrakt aufnehmen, insbesondere bei besonderen unpolaren Stoffen mit $\log K_{ow} > 5$ (Jager et al., 2003; Šmídová et al., 2021). Demnach könnten in organischer Materie gebundene Schadstoffe über den Verdauungstrakt leichter als oder ähnlich gut verfügbar gemacht werden wie in Tonmineralen gebundene. Die Ergebnisse der mikrobiellen Bodenatmung wiederum weichen am stärksten von der o.g. Annahme reduzierter Toxizität bei hoher Adsorptionsfähigkeit der Böden ab: hier war Fluazinam (als einzige Substanz mit toxischer Wirkung) am toxischsten im sandig-organischen Boden, dicht gefolgt vom sandigen Boden, während die Toxizität im lehmigen Boden deutlich geringer war (**Abbildung 17**). Der unerwartete Unterschied in den beiden stark adsorbierenden Böden lässt sich damit erklären, dass zum einen die relative Häufigkeit von Bodenmikroorganismen in der organischen Fraktion höher ist als in der Tonfraktion (Kanazawa and Filip, 1986). Zum anderen tendiert Fluazinam stärker zur Adsorption in der organischen als in der Tonfraktion (Hakala et al., 2014; Xu et al., 2013). Demnach würde im sandig-organischen Boden ein hoher Anteil der mikrobiellen Bodengemeinschaft auf einen hohen Anteil des adsorbierten Fluazinams in der organischen Fraktion, die höchste in allen Testböden, treffen und dort direkt für die mikrobielle Bodengemeinschaft verfügbar sein. Diese Ergebnisse zeigen, wie sehr die toxische Wirkung einer Einzelsubstanz von der Interaktion zwischen Boden und Organismus abhängen.

Innerhalb dieser Studie zeigte sich deutliche Muster sowohl in der Toxizität der Substanzen als auch in der Sensitivität der Organismen gegenüber diesen. So nahm die Toxizität der Substanzen in der Reihenfolge Fluazinam > Fluoranthen > Break-Thru > DEHP ab, während die Sensitivität der Organismen sich tendenziell in der Reihenfolge Collembolen > Enchyträen > mikrobielle Bodengemeinschaft reduzierte.

Die Ergebnisse für Fluazinam stimmen zum Teil sehr gut mit bisher bekannten Literaturwerten überein. So wurde in Lufa 2.2 Boden ein EC_{50} -Wert für die Reproduktion von *F. candida* von $10,4 \pm 1,1$ mg/kg ermittelt (Wehrli et al., 2024), während er in dieser Studie im sandigen Boden, der in seinen Eigenschaften Lufa 2.2 sehr ähnlich ist, $8,8 \pm 0,5$ mg/kg betrug. Zwar wurde für *F. candida* auch ein $NOEC < 0,615$ mg/kg für die Reproduktion ermittelt (EFSA, 2008), dieser Wert

lässt jedoch nicht direkt auf den EC₅₀ schließen. In einer weiteren Laborstudie ergab sich für den Regenwurm *Eisenia andrei* ein NOEC < 0.175 und damit eine höhere Toxizität ggü. diesem Organismus als ggü. *F. candida*. In unserer Studie dagegen war *E. crypticus*, der wie *E. andrei* zu den Oligochaeten gehört, deutlich weniger sensitiv ggü. Fluazinam mit einem EC₅₀ für die Reproduktion von 46 ± 8 mg/kg. Dies liegt im Bereich einer anderen unveröffentlichten Studie, in welcher der EC₅₀ von Fluazinam ggü. *E. crypticus* 59 mg/kg betrug (persönliche Kommunikation: Micha Wehrli, Mathieu Renaud; Centre Ecotox Lausanne). Des Weiteren wurde für die Stickstofftransformation durch die mikrobielle Bodengemeinschaft ein Effekt > 25% bereits bei 0,684 und 5,748 mg/kg beobachtet (EFSA, 2008), während diese Schwelle in dieser Studie im sandigen und lehmigen Boden erst ab 31,6 mg/kg überschritten wurde. Zur in dieser Studie deutlich sensitiveren Bodenatmung dagegen liegen keine anderen Daten zum Vergleich vor. Die hohe Toxizität von Fluazinam ggü. der mikrobiellen Bodenatmung liegt in seinem Wirkmechanismus begründet: als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung greift er direkt in einen zentralen Prozess der Atmungskette ein (Niemi et al., 2009).

Für Fluoranthen als zweittoxischste Substanz stimmen die Reproduktionsdaten ebenfalls teilweise mit Literaturwerten überein. Der EC₅₀ für die Reproduktion von *Folsomia fimetaria* liegt mit 51 mg/kg (Sverdrup et al., 2001) im Bereich des Wertes dieser Studie für *F. candida* mit 60 ± 6 mg/kg im sandigen Boden. Im Gegensatz dazu liegt dieser Wert im gleichen Boden für *E. crypticus* mit 180 ± 34 mg/kg deutlich über dem Literaturwert von 61 mg/kg (Sverdrup et al., 2002a).

Für Break-Thru oder andere Siloxane liegen gegenwärtig keine Toxizitätsdaten für Bodenorganismen vor. Auch in dieser Studie konnte keine hohe Toxizität ggü. Bodenorganismen festgestellt werden, allerdings wurden alle Testorganismen direkt über den Boden exponiert, was möglicherweise die Toxizität von Trisiloxanen deutlich verringert. In den Standard-Reproduktionstests mit *F. candida* konnte die übliche Aufschwemmungsmethode aufgrund der hohen Oberflächenaktivität von Break-Thru nicht verwendet werden, in einem Vergleichstest mit Hitzeextraktion zeigte sich jedoch, dass in allen drei Testböden die Toxizität eher gering ist, v.a. im lehmigen Boden (NOEC = 500 mg/kg, **Abbildung A 9**). Während für die mikrobielle Bodenatmung keine Effekte < 1.000 mg/kg durch Break-Thru beobachtet wurden, lagen die EC₅₀-Werte für die Reproduktion von Enchyträen bei 663 ± 8, 1157 ± 173 und 4007 ± 373 mg/kg im sandigen, sandig-organischen und lehmigen Boden (**Tabelle 8**). Dies unterstreicht zum einen die relativ geringe Toxizität von Break-Thru bei Exposition über den Boden, zum anderen bestätigt es die bereits bei den Collembolentests getroffene Annahme, dass die Wirksamkeit von Break-Thru im lehmigen Boden deutlich reduziert ist. Um jedoch der erhöhten Exposition von oberflächennahen Bodenorganismen bei Pestizidausbringung gerecht zu werden, kann das Besprühen der Organismen als alternative Methode in der Risikoabschätzung von Trisiloxanen bzw. Netzmitteln im Allgemeinen herangezogen werden. Nichtsdestotrotz legen diese Ergebnisse für Break-Thru und andere Siloxane eher einen Fokus auf direkt oberirdisch als indirekt über den Boden exponierte Organismengruppen nahe.

Bei DEHP divergierten die Literaturwerte sehr stark: zwar wurde für die Reproduktion von *F. candida* EC₅₀-Werte von 19 bzw. < 10 mg/kg ermittelt, (Kim et al., 2019; Zheng et al., 2022), was auf eine vergleichsweise hohe Toxizität hinweist und die von Fluoranthen oder sogar Fluazinam übertreffen würde. Allerdings zeigte sich in dieser Studie keine Toxizität von DEHP in allen drei Testorganismen bei < 1,000 mg/kg. Diese Beobachtung wird zudem gestützt von Jensen et al. (2001), wo für die Reproduktion des Springschwanz *Folsomia fimetaria* ein EC₅₀ von > 5.000 mg/kg ermittelt wurde. Zwar entspringt *F. fimetaria* der gleichen Gattung wie *F. candida*, vermehrt sich jedoch sexuell (Fountain and Hopkin, 2005) – nichtsdestotrotz kann eine vergleichbare Sensitivität ggü. chemischem Stress angenommen werden (Ferreira et al., 2022;

Martins et al., 2024). Die starke Abweichung von Studien mit hoher Toxizität von DEHP lassen sich wohl am besten mit Unterschieden in den Laborkulturen erklären, zudem kann es sich bei diesen Studien auch um Ausreißer handeln. Dennoch lohnt es sich, DEHP als Umweltschadstoff weiter im Blick zu behalten, aufgrund seiner ubiquitären Verbreitung und seines genotoxischen Potenzials sowie seiner Eigenschaften zur Bildung von oxidativem Stress in Bodenorganismen (Ma et al., 2017; Zheng et al., 2022).

Zusammenfassend bestätigten sich in den Untersuchungen der Einzelsubstanzen die erwarteten Muster größtenteils. In dem meisten Fällen liegen die ermittelten EC₅₀-Werte im Bereich der gefundenen Literaturwerte. Auch die Reihenfolge der Toxizität in den jeweiligen Böden entspricht überwiegend den Erwartungen. Dennoch gibt es einige neue Erkenntnisse: so wurde bisher noch kein so hoher Effekt auf die mikrobielle Bodengemeinschaft durch Fluazinam in natürlichen Böden ermittelt, auch ist die besonders hohe Toxizität im sandig-organischen Boden eher unerwartet. Umgekehrt gibt es bisher nach unserem Kenntnisstand in dieser Studie die ersten Daten zu über den Boden exponierten Organismen für Break-Thru, wenn auch nur für Enchyträen Effektkonzentrationen ermittelt wurden. Zudem fällt auf, dass für Collembolen auch im lehmigen Boden, im Gegensatz zum sandig-organischen Boden, relativ hohe Toxizitätswerte für Fluazinam und Fluoranthen gefunden wurden, während für Enchyträen dies eher umgekehrt war.

6.2 Effektive Substanzmischungen

Die Substanzmischungen für Collembolen zeigten am deutlichsten, welchen Einfluss Bodeneigenschaften auf die Ausprägung Mischungstoxischer Effekte haben können. Während in den beiden sandigen Böden additive Effekte auftraten (**Abbildung 18**, **Abbildung 19**), waren es im lehmigen Boden ausschließlich antagonistische Effekte, die in den Mischungen beobachtet wurden. Bemerkenswert hierbei ist, dass dies nicht nur für die Mischung aus den beiden toxischen Substanzen Fluoranthen und Fluazinam galt, sondern auch für alle Mischungen mit dem non-toxischen DEHP als „passive agent“ (**Abbildung 20**). Zudem konnte festgestellt werden, dass auch die Biokonzentration stark durch Bodeneigenschaften und Mischungen beeinflusst wurde. So wurde Fluoranthen im sandigen Boden in Mischungen bis zu 10x stärker aufgenommen als in Einzelsubstanztests, während im lehmigen Boden die ternäre Mischung für eine deutlich reduzierte Biokonzentration sorgte (**Abbildung 22**). Sowohl die antagonistischen Effekte im lehmigen Boden als auch die gestiegene Gewebe- und Biokonzentration im sandigen Boden, welche durch Substanzmischungen verursacht wurden, können sich durch Interaktion der Testsubstanzen auf molekularer Ebene erklären. So bilden Moleküle mit aromatischen Ringstrukturen, was auf die drei hier getesteten Substanzen zutrifft, über sogenannte π - π -Bindungen sehr stabile Molekülstapel aus, bei denen die Ebenen der aromatischen Moleküle parallel zueinander liegen und sehr stark aneinander gebunden sind (Cabaleiro-Lago and Rodríguez-Otero, 2018). Durch diese starke Bindung könnte DEHP die Aufnahme von Fluoranthen in das Collembolengewebe erhöht haben, da DEHP mit 7,5 einen deutlich höheren $\log K_{ow}$ besitzt als Fluoranthen mit 5,2 und damit eine höhere Fettlöslichkeit. Diese geht insbesondere von den langen, unpolaren Seitenketten aus, die nicht an der Bildung von π - π -Bindungen beteiligt sind. Weiterhin können diese starken Bindungen zwischen Fluoranthen und DEHP die antagonistischen Effekte in den Mischungen im lehmigen Boden erklären: so bilden Phthalate eine starke Bindung zu Tonmineralen über H-Brücken zwischen den Carbonylgruppen von DEHP und dem an Ton adsorbierten Wasser (Wu et al., 2015) oder über hydrophobe Interaktionen der Seitenketten aus (Wen et al., 2013). Demnach würde DEHP die Adsorption an Ton bzw. die Retention im Boden von Fluoranthen und ggf. auch Fluazinam fördern und damit deren Toxizität senken. Dass Fluoranthen in binären Mischungen dennoch ähnlich stark von

Collembolen aufgenommen wird wie als Einzelsubstanz, könnte daran liegen, dass sehr kleine, Fluoranthen- und DEHP-adsorbierende Tonkolloide über das Porenwasser zwar aufgenommen wurden, die adsorbierten Stoffe jedoch nicht mehr toxisch sind. Warum Fluoranthen in Kombination mit Fluazinam ein vergleichbares Verhalten wie mit DEHP zeigt, ist unklar. Es ist jedoch auffällig, dass sowohl die Biokonzentration von Fluoranthen im sandigen Boden als auch der im lehmigen Boden beobachtete Antagonismus, einhergehend mit der reduzierten Biokonzentration, jeweils in der ternären Mischung am ausgeprägtesten ist. Demnach muss Fluazinam die hier beschriebenen Effekte in einer gewissen Form unterstützen. Mit Hinblick auf die Risikobewertung von Gemischen in Böden bleibt jedoch der zentrale Aspekt dieser Experimente, dass in sandigen Böden additive Effekte ggü. Collembolen möglich sind. Auch wenn hier nur drei Stoffe untersucht wurden, von denen zwei toxisch sind, können diese Beobachtungen Teil einer größeren Analyse werden, wie sie z.B. von Knillmann et al. (2021) für Regenwürmer oder Cedergreen (2014) für aquatische Systeme durchgeführt wurden.

In den Reproduktionstests mit Enchyträen wurden nur quaternäre Mischungen mit allen vier Testsubstanzen untersucht und dabei ausschließlich antagonistische Effekte gefunden. Diese waren, im kompletten Gegensatz zu den Collembolen-Tests, im sandigen Boden am stärksten ausgeprägt, d.h. die Reproduktion wurde am wenigsten gehemmt (**Abbildung 23**). Neben einem grundsätzlich anderen Verhalten der Mischung ggü. Enchyträen besteht auch die Möglichkeit, dass die geringeren Effekte auf Break-Thru zurückzuführen sind: im Gegensatz zu den anderen toxischen Stoffen ist die Dosis-Wirkungskurve dieser Substanz sehr steil, was dazu führen kann, dass diese Substanz die Toxizität des Gemisches dominiert (Altenburger et al., 2003), in diesem Fall hin zu geringerer Toxizität. Auch muss für Break-Thru angenommen werden, dass dieser Stoff als Detergens vermutlich einen gänzlich anderen Wirkmechanismus besitzt als die anderen beiden Substanzen, nämlich über die Absenkung der Oberflächenspannung Toxizität entwickelt. Demnach wäre ein nicht auf Additivität basierendes Modell wie Independent Action für diese Mischung naheliegender. Binäre und ternäre Substanzmischungen ohne Break-Thru, analog zu denen der Collembolen-Tests, sollten im Anschluss an dieses Projekt unbedingt getestet werden.

Unabhängig davon konnten durch die höhere Biomasse und Gewebekonzentration im Vergleich zu Collembolen alle Substanzen außer Break-Thru in Enchyträen nachgewiesen werden. Dies ermöglichte, die Entwicklung der Gewebekonzentration aller Stoffe in Bezug zueinander zu beobachten. So blieben sowohl im sandigen als auch dem sandig-organischen Boden die Aufnahme von Fluoranthen und DEHP durch Co-Kontaminanten aus der quaternären Mischung unbeeinträchtigt (**Abbildung 26, Abbildung 28**), während die von Fluazinam mutmaßlich reduziert wurde, was jedoch nicht endgültig geklärt werden kann aufgrund sich nicht überschneidender Konzentrationsbereiche der verfügbaren Proben (**Abbildung 27**). Im Gegensatz dazu wurde die Biokonzentration von Fluoranthen im lehmigen Boden durch Co-Kontaminanten reduziert, während die von DEHP und Fluazinam erhöht wurde (**Abbildung 26, Abbildung 28**). Somit zeigt sich ein klarer Unterschied in dem Einfluss der Mischungen auf die Biokonzentration der Einzelstoffe zwischen den sandigen und dem lehmigen Boden. Die jeweiligen Beiträge der aufgenommenen Stoffmengen zur Gesamtoxizität bzw. zur Ausprägung des Antagonismus lassen sich hier nur schwer nachvollziehen, es liegt jedoch nahe, dass in den sandigen Böden die reduzierte Aufnahme von Fluazinam und im lehmigen Boden die von Fluoranthen eine Rolle für die Reduktion der Toxizität in der Mischung spielen. Die jeweiligen Interaktionen, die zu den unterschiedlichen Aufnahmeraten geführt haben, sind bisher unbekannt; nach unseren Informationen liegen Studien zur Aufnahme und Gewebekonzentration von Stoffmischungen im Boden bisher nur für Schwermetalle vor (z.B. He et al., 2015; Qiu et al., 2016). Die hier gezeigten Daten können jedoch einen ersten Ansatz zur weiteren Erforschung der durch die Gewebe- und Biokonzentration erklärbaren Mischungstoxizität von organischen Schadstoffen im Boden darstellen.

6.3 Umweltrelevante Substanzmischungen

In den umweltrelevanten Substanzmischungen konnten bei den Bodeninvertebraten häufig Effekte im Bereich von 10-20% reduzierter Reproduktion beobachtet werden, die jedoch nie statistisch signifikant waren (**Abbildung 29, Abbildung 30**). Die Erfassung der Gewebekonzentrationen war aufgrund der niedrigen Testkonzentrationen nicht möglich. Mit Hinblick auf die jeweiligen Toxizitäten der Einzelsubstanzen sind die beobachteten Effekte in ihrer Häufigkeit und Konstanz unter Annahme der Konzentrationsadditivität überraschend hoch (**Tabelle 11, Tabelle 12**). Exemplarisch soll dies am Collembolentest im lehmigen Boden in der Konzentration PEC_{hoch} veranschaulicht werden, in welcher die Reproduktion im Vergleich zur Kontrolle um 13,4% reduziert war (**Abbildung 29**): unter Annahme von perfekter Additivität (zu der zur besseren Nachvollziehbarkeit in diesem Beispiel ein gleichmäßiger Beitrag durch alle vier Substanzen angenommen wird) würde man erwarten, dass bei einer Effektstärke von 13,4% in der Mischung die Einzelsubstanzen bei etwa 4x höherer Konzentration als in den Mischungsexperimenten diese Effektstärke verursachen. Dies wären entsprechend der in PEC_{hoch} applizierten Konzentrationen von 0,5 (Fluoranthen und DEHP) bzw. 1,6 mg/kg (Fluazinam und Break-Thru) für die jeweiligen Substanzen von 2 bzw. 6,4 mg/kg. Die EC_{13} -Werte betragen jedoch für Fluazinam 16,7, für Fluoranthen 87,2, für DEHP mind. 1000 mg/kg (**Tabelle 7**) und für Break-Thru mind. 500 mg/kg (**Abbildung A 9**). Somit sind die applizierten Konzentrationen jeweils um die Faktoren 10, 174, 1000 und 625 kleiner als ihre jeweiligen Testkonzentrationen und nicht, wie man unter Additivität annehmen würde, nur um den Faktor 4. Somit überstieg umgekehrt der beobachtete Effekt deutlich den eigentlich erwarteten. Dies zeigt sich an den sehr geringen ΣTU bzw. die daraus resultierenden MDR, welche quantifizieren, dass die beobachtete Effektstärke die erwartete um teilweise mehr als drei Größenordnungen übersteigt (**Tabelle 11, Tabelle 12**). Zwar war insgesamt keiner der beobachteten Effekte signifikant, die grundsätzlich sehr hohe Variabilität in Tests mit Bodenorganismen macht es jedoch auch tendenziell schwer, Effekte im Bereich von <20% signifikant abzubilden. Generell sind geeignetere Methoden zur statistischen Beschreibung von Effekten in der Diskussion, die über die reine Festlegung von Signifikanzen durch p-Werte hinausgeht (Erickson and Rattner, 2020), diese sollen jedoch an dieser Stelle nicht weiter diskutiert werden. Es sollte jedoch festgehalten werden, dass es gerade in niedrigen Effektkonzentrationen im Vergleich zum robusten EC_{50} -Wert zu stärkeren Abweichungen kommen kann, die wiederum arithmetisch begründet schnell zu sehr hohen MDR führen. Daher bedarf es einer sehr breiten Datengrundlage (v.a. Dosis-Wirkungskurven im niedrigen Konzentrationsbereich mit hoher Replikatzahl) zur endgültigen Beurteilung, inwiefern niedrig konzentrierte Stoffgemische im Boden tatsächlich stark synergistisch wirken können. Eine Zunahme des Synergismus mit abnehmender Konzentration wurde u.a. bereits für Pestizidmischungen ggü. Regenwürmern (Chen et al., 2015; Wang et al., 2015; Yang et al., 2017) und Schwermetallmischungen ggü. Enchyträen und Milben beobachtet (Renaud et al., 2020). Auch hier stellt sich jedoch die Frage, inwieweit diese Synergismen chemisch-biologisch oder doch eher experimentell begründet sind.

Die Annahme, dass es sich bei den beobachteten Effekten tatsächlich um Synergismen handelt, würde sich auch mit den in den effektiven Substanzmischungen beobachteten Mischungstoxischen Ausprägungen, die entweder additiv oder antagonistisch waren, in Einklang bringen lassen (**Tabelle 14**). So wurde bereits durch Jonker et al. (2005) beschrieben, dass die Mischungstoxizität sowohl von der Dosishöhe als auch dem Mischungsverhältnis der Einzelsubstanzen abhängt (dose-level bzw. dose-ratio dependency, s. Kapitel 2). Da sich in unserer Studie sowohl die Dosishöhe als auch die Mischungsverhältnisse zwischen den effektiven und den umweltrelevanten Stoffmischungen deutlich unterscheiden, widersprechen

sich die unterschiedlichen Ausprägungen in effektiven und umweltrelevanten Substanzmischungen somit nicht zwangsläufig.

In der (Öko-)toxikologie existiert seit längerem die Hypothese des sog. „something from nothing“, also dass eine Stoffmischung aus Substanzen mit Konzentrationen unter ihren jeweiligen Wirkungsschwellen, z.B. NOEC oder EC₀₁, sichtbare Effekte durch Aufsummierung der Einzeleffekte hervorbringen kann (Silva et al., 2002). Dieses Prinzip wurde u.a. auch für Steroidhormone in Fischen (Thrupp et al., 2018) oder Substanzmischungen in Algen nachgewiesen (Walter et al., 2002). Mit Hinblick auf unser Testdesign sollte festgehalten werden, dass dies eine begrenzte Stoffmischung mit nur vier Substanzen enthält, diese Anzahl jedoch beliebig nach oben erweitert werden könnte, insofern die ausgewählten Stoffe umweltrelevant und gemeinsam im Boden zu finden sind. Wie groß das Potenzial dafür gerade für Pestizide ist, zeigt die Studie von Brühl et al. (2024), wo bis zu 13 Pestizide in einem mehrere Kilometer von landwirtschaftlichen Flächen entfernten Boden gefunden wurden.

In den Bodenatmungstests dagegen konnten deutliche Effekte in den Konzentrationen PEC und PEC_{hoch} festgestellt werden. Diese sind jedoch zum größten Teil auf die hohe Toxizität von Fluazinam zurückzuführen (**Abbildung 31, Abbildung 32**). Dieses Beispiel zeigt, wie sehr Einzelsubstanzen eine Stoffmischung prägen und dominieren können („toxic drivers“) und sollte bei der Testung mit Mischungen unbedingt berücksichtigt werden. Bezieht man die bereits genannte Verzerrung durch unterschiedlich steile Dosis-Wirkungskurven der Einzelsubstanzen mit ein, wird offensichtlich, dass die Beurteilung von Stoffgemischen umso komplizierter wird, je unähnlicher die Stoffe sich in ihrem toxischen Verhalten sind, was in der vorliegenden Studie definitiv der Fall war.

6.4 Fazit

Die prognostizierte Mischungstoxizität der in dieser Studie experimentell getesteten Mischungen basieren auf dem Modell der CA, welche als Grundannahme eine additive Wirkung der Einzelsubstanzen postuliert. Diese Annahme gilt in der Wissenschaft und Regulatorik eher als konservatives Modell, welches jedoch auch die meisten bisher beobachteten Effekte in Studien abdeckt (z.B. Cedergreen, 2014). Der überwiegende Teil der Studien stammt aus der aquatischen Ökotoxikologie, vergleichbare Daten aus der Bodenökotoxikologie gewinnen jedoch an Bedeutung (z.B. Knillmann et al., 2021). In der vorliegenden Studie sollten durch den umfassenden Ansatz mit drei Testböden und drei Testorganismen im Rahmen der verfügbaren Ressourcen möglichst viele Aspekte des komplexen und vielfältigen Ökosystems Boden abgebildet werden und, auf den verschiedenen Boden- und Organismeneigenschaften als Erklärungsansatz basierend, die Tendenz zur Ausprägung von Mischungstoxizität im Boden erfasst werden.

Die vorliegende Studie zeigt, dass die Ausprägung von Mischungstoxizität sehr stark von der Interaktion mit dem jeweiligen Testboden und -organismus abhängt, da die jeweiligen Stoffe unterschiedlich starke Tendenzen haben, von den unterschiedlichen Bodenkompartmenten (v.a. Ton/Organik) adsorbiert oder von den jeweiligen Testorganismen über ihre spezifischen Aufnahmepfade aufgenommen zu werden. In den Experimenten, insbesondere in den Collembolentests, kam es in regelmäßiger Häufigkeit zu additiven Effekten, wobei antagonistische Effekte insgesamt häufiger waren (**Tabelle 14**). Neben der Toxizität war auch die Gewebekonzentration der Schadstoffe stark von den bereits genannten Faktoren beeinträchtigt und variierte demnach stark zwischen Testböden und -organismen. Die veränderte Aufnahme von toxischen Substanzen aus den Mischungen konnte die beobachtete Mischungstoxizität zum Teil erklären, war jedoch nicht immer mit dieser korreliert.

Die erzielten Ergebnisse lieferten in der Mehrzahl antagonistische, aber auch additive Effekte der effektiven Substanzmischungen (**Tabelle 14**). Dies deutet darauf hin, dass CA als geeignete „realistic worst case“-Annahme auch in der ökotoxikologischen Beurteilung und Bewertung von Stoffmischungen im regulatorischen Kontext genutzt werden sollte -wie dies bereits vielfach vorgeschlagen wurde (z.B. More et al., 2019). Die untersuchten umweltrelevanten Testkonzentrationen sind zudem ein Indikator dafür, dass im Freiland potenziell vorhandene Mischungen in der Lage sein könnten, Toxizität ggü. Bodenorganismen durch Interaktionen zwischen den Einzelsubstanzen zu entwickeln. Die Ausprägung der in dieser Studie regelmäßig beobachteten Effekte liegt deutlich über den unter Annahme von Additivität erwartbaren Effekten und könnte, bei allen bereits diskutierten Unsicherheiten zu diesen Ergebnissen, auch durch Synergismen zwischen den Testsubstanzen verursacht worden sein. Vergleichbare Effekte mit zunehmenden Synergismen bei abnehmender Effektstärke wurden bereits vereinzelt in anderen bodenökotoxikologischen Studien gefunden (Chen et al., 2015; Renaud et al., 2020; Wang et al., 2015; Yang et al., 2017). Da bisher jedoch noch unklar ist, ob dieses Phänomen auch unter anderen Bodenbedingungen, für andere Bodenorganismen oder in anderen Stoffmischungen auftritt, kann die **CA als Basismodell** gesehen werden, bis weitere Informationen zur Mischungstoxizität im Boden generiert wurden oder es plausible mechanistische Hinweise auf potenzielle synergistische Interaktionen gibt.

Die vorliegende Studie konnte einige grundlegende Mechanismen und Einflussfaktoren zur Entwicklung von Mischungstoxizität herausarbeiten, die für Bodentoxizitätstests charakteristisch und somit regulatorisch relevant sind. Darunter fällt v.a.

- ▶ das grundlegend andere Verhalten von Mischungen in den sandigen Böden im Vergleich zum lehmigen Boden hinsichtlich sowohl der Ökotoxizität als auch der Biokonzentration
- ▶ Die häufiger auftretende Additivität bei Collembolen im Vergleich zu Enchyträen, was auf unterschiedliche Aufnahmepfade und Regulationsmechanismen der Tiere, aber auch der jeweils unterschiedlichen Substanzmischungen zurückzuführen sein könnte
- ▶ Der Einfluss von Einzelstoffen, unabhängig von deren eigenen Toxizität, auf die Wirkung und Aufnahme des gesamten Stoffgemisches, wie am Beispiel von DEHP deutlich wurde
- ▶ die Bedeutung von Dosis-Abhängigkeit für Mischungstoxizität mit Hinblick auf deren unterschiedliche Ausprägung in effektiven und umweltrelevanten Konzentrationen

Die hier verwendete Stoffmischung kann nur exemplarisch für unendlich große Kombinationsmöglichkeiten an Umweltschadstoffen stehen, die nicht nur in der Stoffauswahl, sondern auch in den Mischungsverhältnissen und den Konzentrationshöhen variieren können, was nachweislich Auswirkungen auf die Mischungstoxizität hat. Diese enorme Komplexität und Diversität trifft in gleicher Weise auf Bodenökosysteme zu, sowohl in deren chemisch-physikalischer Beschaffenheit als auch der ihnen innewohnenden Artengemeinschaften. In diesem Zusammenhang ist eine prospektive Risikoabschätzung von Mischungen in Böden nur über ein grundlegendes Verständnis vom Verhalten dieser Mischungen unter dem Einfluss unterschiedlicher Bodeneigenschaften und Aufnahmemechanismen von Bodenorganismen darstellbar, welches auf möglichst wenigen, einfach nachvollziehbaren Mechanismen basiert. In Zukunft gilt es daher, eine größere Zahl dieser Mechanismen ausfindig zu machen und für eine möglichst große Bandbreite von Mischungen, insbesondere umweltrelevanten, zu verallgemeinern und zu validieren. Dafür sollten systematisch besonders Mischungen für Agrarlandschaften, wie in diesem Projekt beispielhaft angewandt, mit hoher statistischer Absicherung für Effekte in niedrigen Konzentrationsbereichen untersucht werden; dabei sollten nachdrücklich neben Agrochemikalien auch ubiquitäre Schadstoffe wie Phthalate miteinbezogen

werden, da diese trotz geringer Toxizität das Potenzial zur Beeinflussung des gesamten Stoffgemisches besitzen, wie diese Studie zeigen konnte. Die Berücksichtigung der hohen Komplexität von Böden unter Beachtung des experimentellen Aufwands hat sich in diesem Projekt mit der Verwendung einiger weniger Testböden mit divergierenden Bodeneigenschaften bewährt und ist für weitere Studien zu empfehlen. Die Konzentrationsadditivität hat sich in dieser Studie als geeignetes Basismodell im Bodenkontext bestätigt, da alle in den effektiven Substanzmischungen beobachteten Interaktionen additiv oder antagonistisch waren. Es ist plausibel, dass gerade aufgrund der flächendeckenden Präsenz atmosphärisch eingetragener Stoffe im Boden, aber auch der gemeinsamen Ausbringung von Agrochemikalien in Form von Spritzmischungen Schadstoffe immer in Mischungen vorliegen. **Um die noch bestehenden Unsicherheiten bzgl. Mischungstoxischer Effekte in Böden, und seien sie auch „nur“ additiver Natur, bei der Regulierung von Einzelstoffen einzupreisen, sollte auf die Entwicklung und Implementierung eines zusätzlichen Sicherheitsfaktors hingearbeitet werden.** Die wissenschaftliche Ergründung dieser Unsicherheiten als Basis für einen umfassenden Schutz der wertvollen Ressource Boden bedarf einer breiten Datengrundlage, zu der dieser Bericht ein Auftakt und Ideengeber für weitere Studien darstellen kann.

Tabelle 14 Übersicht zur tendenziellen Ausprägung Mischungstoxischer Effekte in allen Böden und Testorganismen unter Annahme von Konzentrationsadditivität

Ausprägungen, die auf Basis von Effekten ohne statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle ermittelt wurden, sind in Klammern gesetzt

Testorganismus	sandig	Sandig-organisch	lehmig
Effektive Substanzmischungen			
<i>F. candida</i>	Additiv	Additiv	Antagonistisch
<i>E. crypticus</i>	Antagonistisch	Antagonistisch	Antagonistisch
Mikrobielle Bodengemeinschaft	-	-	-
Umweltrelevante Substanzmischungen			
<i>F. candida</i>	(Synergistisch/ Antagonistisch)	(Synergistisch)	(Synergistisch)
<i>E. crypticus</i>	(Synergistisch)	(Synergistisch)	(Synergistisch)
Mikrobielle Bodengemeinschaft	Antagonistisch	Additiv	Synergistisch

7 Quellenverzeichnis

- Ahangar, A.G., (2011). Organic Pollutant in the Soil Environment: With Emphasis on Sorption Process. A Review. In: *American Journal of Scientific Research*, 32, 32, 115–127.
- Aichner, B., Bussian, B., Lehnik-Habrink, P., Hein, S., (2013). Levels and spatial distribution of persistent organic pollutants in the environment: A case study of German forest soils. In: *Environmental Science and Technology*, 47, 22, 12703–12714. DOI: 10.1021/es4019833
- Aichner, B., Bussian, B.M., Lehnik-Habrink, P., Hein, S., (2015). Regionalized concentrations and fingerprints of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in German forest soils. In: *Environmental Pollution*, 203, Elsevier Ltd, 31–39. DOI: 10.1016/j.envpol.2015.03.026.
- Altenburger, R., Nendza, M., Schüürmann, G., (2003). Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 8, 1900–1915. DOI: 10.1897/01-386
- Amellal, N., Portal, J.M., Berthelin, J., (2001). Effect of soil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil. In: *Applied Geochemistry*, 16, 14, 1611–1619. DOI: 10.1016/S0883-2927(01)00034-8
- Amorim, M.J.B., Gomes, S.I.L., Soares, A.M.V.M., Scott-Fordsmand, J.J., (2012). Energy Basal Levels and Allocation among Lipids, Proteins, and Carbohydrates in *Enchytraeus albidus*: Changes Related to Exposure to Cu Salt and Cu Nanoparticles. In: *Water, Air, and Soil Pollution*, 223, 1, 477–482. DOI: 10.1007/s11270-011-0867-9
- Ashauer, R., Escher, B.I., (2010). Advantages of toxicokinetic and toxicodynamic modelling in aquatic ecotoxicology and risk assessment. In: *Journal of Environmental Monitoring*, 12, 11, 2056–2061. DOI: 10.1039/c0em00234h
- Bach, E.M., Ramirez, K.S., Fraser, T.D., Wall, D.H., (2020). Soil biodiversity integrates solutions for a sustainable future. In: *Sustainability (Switzerland)*. DOI: 10.3390/su12072662
- Backhaus, T., Arrhenius, Å., Blanck, H., (2004). Toxicity of a mixture of dissimilarly acting substances to natural algal communities: Predictive power and limitations of independent action and concentration addition. In: *Environmental Science and Technology*, 38, 23, 6363–6370. DOI: 10.1021/es0497678
- Backhaus, T., Faust, M., (2012). Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: A conceptual framework. In: *Environmental Science and Technology*, 46, 5, 2564–2573. DOI: 10.1021/es2034125
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. In: *J. Stat. Software*, 67, 1–48. DOI: 10.18637/jss.v067.i01
- Beaumelle, L., Tison, L., Eisenhauer, N., Hines, J., Malladi, S., Pelosi, C., Thouvenot, L., Phillips, H.R.P., (2023). Pesticide effects on soil fauna communities—A meta-analysis. In: *Journal of Applied Ecology*. DOI: 10.1111/1365-2664.14437
- Belden, J.B., Gilliom, R.J., Lydy, M.J., (2007). How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? In: *Integrated environmental assessment and management*, 3, 3, 364–372. DOI: 10.1897/2006-046.S1
- BfR, (2025). Legal foundations in the field of plant protection products [WWW Document]. https://www.bfr.bund.de/en/legal_foundations_in_the_field_of_plant_protection_products-197782.html
- Bleeker, E.A.J., Wlegman, S., Droge, S.T.J., Kraak, M.H.S., Van Gestel, C.A.M., (2003). Towards an improvement of the risk assessment of polycyclic (hetero)aromatic hydrocarbons. In: *Dierecologie*, 1, 27–32.
- Bliss, C.I., (1939). The toxicity of poisons applied jointly 1. In: *Annals of applied biology*, 26, 3, 585–615.
- Boivin, M.E.Y., Greve, G.D., Kools, S.A.E., van der Wurff, A.W.G., Leeftang, P., Smit, E., Breure, A.M., Rutgers, M., van Straalen, N.M., (2006). Discriminating between effects of metals and natural variables in terrestrial bacterial communities. In: *Applied Soil Ecology*, 34, 2–3, 103–113. DOI: 10.1016/j.apsoil.2006.03.009
- Brinch, U.C., Ekelund, F., Jacobsen, C.S., (2002). Method for spiking soil samples with organic compounds. In:

- Applied and Environmental Microbiology, 68, 4, 1808–1816. DOI: 10.1128/AEM.68.4.1808-1816.2002
- Broderius, S.J., Kahl, M.D., Hoglund, M.D., (1995). Use of joint toxic response to define the primary mode of toxic action for diverse industrial organic chemicals. In: Environmental Toxicology and Chemistry, 14, 9, 1591–1605. DOI: 10.1002/etc.5620140920
- Brühl, C.A., Engelhard, N., Bakanov, N., Wolfram, J., Hertoge, K., Zaller, J.G., (2024). Widespread contamination of soils and vegetation with current use pesticide residues along altitudinal gradients in a European Alpine valley. In: Communications Earth and Environment, 5, 1, Springer US, 1–9. DOI: 10.1038/s43247-024-01220-1
- Brun, L.A., Maillet, J., Richarte, J., Herrmann, P., Remy, J.C., (1998). Relationships Between Extractable Copper, Soil Properties and Copper Uptake By Wild Plants in Vineyard Soils. In: Environmental Pollution, 102, 151–161. DOI: 10.1016/S0269-7491(98)00120-1
- Brusseau, M.L., Anderson, R.H., Guo, B., (2020). PFAS concentrations in soils: Background levels versus contaminated sites. In: Science of the Total Environment, 740, Elsevier B.V. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140017
- Bundesgesetzblatt, (2021). Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung (BBodSchV), Bundesgesetzblatt I. https://www.gesetze-im-internet.de/bbodschv_2023/BBodSchV.pdf
- Cabaleiro-Lago, E.M., Rodríguez-Otero, J., (2018). On the Nature of σ - σ , σ - π , and π - π Stacking in Extended Systems. In: ACS Omega, 3, 8, 9348–9359. DOI: 10.1021/acsomega.8b01339
- Cai, Q.Y., Mo, C.H., Wu, Q.T., Zeng, Q.Y., (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons and phthalic acid esters in the soil-radish (*Raphanus sativus*) system with sewage sludge and compost application. In: Bioresource Technology, 99, 6, 1830–1836. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.03.035
- Calder, A.J., Dimkpa, C.O., McLean, J.E., Britt, D.W., Johnson, W., Anderson, A.J., (2012). Soil components mitigate the antimicrobial effects of silver nanoparticles towards a beneficial soil bacterium, *Pseudomonas chlororaphis* O6. In: Science of the Total Environment, 429, 215–222. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.049
- Castro-Ferreira, M.P., Roelofs, D., van Gestel, C.A.M., Verweij, R.A., Soares, A.M.V.M., Amorim, M.J.B., (2012). *Enchytraeus crypticus* as model species in soil ecotoxicology. In: Chemosphere, 87, 11, Elsevier Ltd, 1222–1227. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.01.021.
- Cedergreen, N., (2014). Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. In: PLoS ONE, 9, 5. DOI: 10.1371/journal.pone.0096580
- Cermak, J., Stephenson, G., Birkholz, D., Dixon, D.G., (2013). Toxicity and toxicokinetics of binary combinations of petroleum hydrocarbon distillates with the earthworm *eisenia andrei*. In: Environmental Toxicology and Chemistry, 32, 5, 1016–1026. DOI: 10.1002/etc.2154
- Chen, C., Wang, Y., Qian, Y., Zhao, X., Wang, Q., (2015). The synergistic toxicity of the multiple chemical mixtures: Implications for risk assessment in the terrestrial environment. In: Environment International, 77, Elsevier Ltd, 95–105. DOI: 10.1016/j.envint.2015.01.014.
- Cheng, H., Hu, E., Hu, Y., (2012). Impact of mineral micropores on transport and fate of organic contaminants: A review. In: Journal of Contaminant Hydrology, 129–130, Elsevier B.V., 80–90. DOI: 10.1016/j.jconhyd.2011.09.008.
- Chou, T.C., (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. In: Pharmacological Reviews, 58, 3, 621–681. DOI: 10.1124/pr.58.3.10
- Chowdhury, N., Burns, R.G., Marschner, P., (2011). Recovery of soil respiration after drying. In: Plant and Soil, 348, 1–2, 269–279. DOI: 10.1007/s11104-011-0871-2
- Cirelli, A.F., Ojeda, C., Castro, M.J.L., Salgot, M., (2010). Surfactants in Sludge-Amended Agricultural Soils: A Review, in: Lichtfouse, E. (Ed.), Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants: Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 227–251. DOI: 10.1007/978-1-4020-9654-9_12.

- Cowles, R.S., Cowles, E.A., McDermott, A.M., Ramoutar, D., (2000). "Inert" formulation ingredients with activity: Toxicity of trisiloxane surfactant solutions to twospotted spider mites (Acari: Tetranychidae). In: *Journal of Economic Entomology*, 93, 2, 180–188. DOI: 10.1603/0022-0493-93.2.180
- Criel, P., Lock, K., Van Eeckhout, H., Oorts, K., Smolders, E., Janssen, C.R., (2008). Influence of soil properties on copper toxicity for two soil invertebrates. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 8, 1748–1755. DOI: 10.1897/07-545.1
- Cui, S., Fu, Q., Li, T.X., Liu, D., Li, Y.F., Wang, M., (2016). Transfer and migration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil irrigated with long-term wastewater. In: *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 9, 5, 83–92. DOI: 10.3965/j.ijabe.20160905.2528
- De Zwart, D., Posthuma, L., (2005). Complex mixture toxicity for single and multiple species: Proposed methodologies. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 10, 2665–2676. DOI: 10.1897/04-639R.1
- Di Toro, D.M., McGrath, J.A., Hansen, D.J., Berry, W.J., Paquin, P.R., Mathew, R., Wu, K.B., Santore, R.C., (2005). Predicting sediment metal toxicity using a sediment biotic ligand model: Methodology and initial application. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 10, 2410–2427. DOI: 10.1897/04-413R.1
- DIN, (2008). DIN 32645:2008-11. Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung. DOI: 10.31030/1465413. <https://www.dinmedia.de/de/norm/din-32645/110729574>
- Dreij, K., Lundin, L., Bihanic, F. Le, Lundstedt, S., (2020). Polycyclic aromatic compounds in urban soils of Stockholm City: Occurrence, sources and human health risk assessment. In: *Environmental Research*, 182, 108989. DOI: 10.1016/j.envres.2019.108989
- Droge, S.T.J., Paumen, M.L., Bleeker, E.A.J., Kraak, M.H.S., Van Gestel, C.A.M., (2006). Chronic toxicity of polycyclic aromatic compounds to the springtail *Folsomia candida* and the enchytraeid *Enchytraeus crypticus*. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 9, 2423–2431. DOI: 10.1897/05-628R.1
- ECHA, (2023). Fluoranthene [WWW Document]. <https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.005.376>
- EFSA, (2008). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fluazinam. In: *EFSA Journal*, 137, 1–82. DOI: 10.2903/j.efsa.2006.55r
- Erickson, R.A., Rattner, B.A., (2020). Moving Beyond $p < 0.05$ in Ecotoxicology: A Guide for Practitioners. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39, 9, 1657–1669. DOI: 10.1002/etc.4800
- Escher, B., Braun, G., Zarfl, C., (2020). Exploring the Concepts of Concentration Addition and Independent Action Using a Linear Low-Effect Mixture Model. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39, 12, Wiley Blackwell, 2552–2559. DOI: 10.1002/ETC.4868
- Escher, B.I., Neale, P.A., Villeneuve, D.L., (2018). The advantages of linear concentration–response curves for in vitro bioassays with environmental samples. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37, 9, 2273–2280. DOI: 10.1002/etc.4178
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H., (2003). Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. In: *Aquatic Toxicology*, 63, 1, 43–63. DOI: 10.1016/S0166-445X(02)00133-9
- Ferreira, P., Gabriel, A., Sousa, J.P., Natal-da-Luz, T., (2022). Representativeness of *Folsomia candida* to assess toxicity of a new generation insecticide in different temperature scenarios. In: *Science of the Total Environment*, 837, May. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.155712
- Filser, J., (2002). The role of Collembola in carbon and nitrogen cycling in soil. In: *Pedobiologia*, 46, 3–4, 234–245. DOI: 10.1078/0031-4056-00130
- Fine, J.D., Cox-Foster, D.L., Mullin, C.A., (2017). An inert pesticide adjuvant synergizes viral pathogenicity and mortality in honey bee larvae. In: *Scientific Reports*, 7, September 2016, Nature Publishing Group, 1–9. DOI: 10.1038/srep40499.

- Fischer, J., Evlanova, A., Philippe, A., Filser, J., (2021). Soil properties can evoke toxicity of copper oxide nanoparticles towards springtails at low concentrations. In: *Environmental Pollution*, 270, Elsevier Ltd, 116084. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.116084.
- Fischer, J., Szabo, B., Manikhin, L., Filser, J., (2025). A hidden artefact : how surfactants can distort the results of springtail reproduction tests. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1–12. DOI: 10.1093/etjnl/vgaf051
- Fischer, J., Talal, G.D.A., Schnee, L.S., Otomo, P. V., Filser, J., (2022). Clay Types Modulate the Toxicity of Low Concentrated Copper Oxide Nanoparticles Toward Springtails in Artificial Test Soils. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41, 10, 2454–2465. DOI: 10.1002/etc.5440.
- Focks, A., Luttk, R., Zorn, M., Brock, T., Roex, E., Van der Linden, T., Van Den Brink, P.J., (2014). A simulation study on effects of exposure to a combination of pesticides used in an orchard and tuber crop on the recovery time of a vulnerable aquatic invertebrate. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33, 7, 1489–1498. DOI: 10.1002/etc.2502
- Fountain, M.T., Hopkin, S.P., (2005). *Folsomia candida* (Collembola): A “standard” soil arthropod. In: *Annual Review of Entomology*, 50, 201–222. DOI: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130331
- Gainer, A., Bresee, K., Hogan, N., Siciliano, S., (2019). Advancing soil ecological risk assessments for petroleum hydrocarbon contaminated soils in Canada: Persistence, organic carbon normalization and relevance of species assemblages. In: *Science of The Total Environment*, 668, 400–410. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.02.459
- Gainer, A., Cousins, M., Hogan, N., Siciliano, S.D., (2018). Petroleum hydrocarbon mixture toxicity and a trait-based approach to soil invertebrate species for site-specific risk assessments. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37, 8, 2222–2234. DOI: 10.1002/etc.4164
- Galert, W., Hassold, E., (2021). Environmental Risk Assessment of Technical Mixtures Under the European Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals—A Regulatory Perspective. In: *Integrated Environmental Assessment and Management*, 17, 3, 498–506. DOI: 10.1002/ieam.4393
- Gao, D.W., Wen, Z.D., (2016). Phthalate esters in the environment: A critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. In: *Science of the Total Environment*, 541, Elsevier B.V., 986–1001. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.09.148.
- Gocht, T., Klemm, O., Grathwohl, P., (2007). Long-term atmospheric bulk deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in rural areas of Southern Germany. In: *Atmospheric Environment*, 41, 6, 1315–1327. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2006.09.036
- Gocht, T., Moldenhauer, K.M., Püttmann, W., (2001). Historical record of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and heavy metals in floodplain sediments from the Rhine River (Hessisches Ried, Germany). In: *Applied Geochemistry*, 16, 15, 1707–1721. DOI: 10.1016/S0883-2927(01)00063-4
- Gong, B., Qiu, H., Romero-Freire, A., Van Gestel, C.A.M., He, E., (2020). Incorporation of chemical and toxicological availability into metal mixture toxicity modeling: State of the art and future perspectives. In: *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 0, 0, Taylor & Francis, 1–45. DOI: 10.1080/10643389.2020.1862560.
- Guo, W., Zhang, J., Sun, Z., Orem, W.H., Tatu, C.A., Radulović, N.S., Milovanović, D., Pavlović, N.M., Chan, W., (2021). Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Phthalate Esters in Soil and Food Grains from the Balkan Peninsula: Implication on DNA Adduct Formation by Aristolochic Acid I and Balkan Endemic Nephropathy. In: *Environmental Science and Technology*, 55, 13, 9024–9032. DOI: 10.1021/acs.est.1c00648
- Hadrup, N., Taxvig, C., Pedersen, M., Nellemann, C., Hass, U., Vinggaard, A.M., (2013). Concentration Addition, Independent Action and Generalized Concentration Addition Models for Mixture Effect Prediction of Sex Hormone Synthesis In Vitro. In: *PLoS ONE*, 8, 8. DOI: 10.1371/journal.pone.0070490
- Hakala, K.P., Tuomainen, P.M., Yli-Halla, M.J., Hartikainen, H., (2014). High-performance liquid chromatography (HPLC) as a tool for monitoring the fate of fluazinam in soil. In: *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 49, 7, 491–497. DOI: 10.1080/03601234.2014.896669

- Hakala, K.P., Yli-Halla, M.J., Tuomainen, P.M., Hartikainen, H., (2020). Persistence of fluazinam in soil under boreal conditions. In: *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 55, 6, Taylor & Francis, 539–549. DOI: 10.1080/03601234.2020.1729631.
- Hamels, F., Malevé, J., Sonnet, P., Kleja, D.B., Smolders, E., (2014). Phytotoxicity of trace metals in spiked and field-contaminated soils: Linking soil-extractable metals with toxicity. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33, 11, 2479–2487. DOI: 10.1002/etc.2693
- Hartzell, S.E., Unger, M.A., Vadas, G.G., Yonkos, L.T., (2018). Evaluating porewater polycyclic aromatic hydrocarbon-related toxicity at a contaminated sediment site using a spiked field-sediment approach. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37, 3, 893–902. DOI: 10.1002/etc.4023
- He, E., Baas, J., Van Gestel, C.A.M., (2015). Interaction between nickel and cobalt toxicity in *Enchytraeus crypticus* is due to competitive uptake. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34, 2, 328–337. DOI: 10.1002/etc.2802
- He, E., Van Gestel, C.A.M., (2015). Delineating the dynamic uptake and toxicity of Ni and Co mixtures in *Enchytraeus crypticus* using a WHAM-FTOX approach. In: *Chemosphere*, 139, Elsevier Ltd, 216–222. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.06.057.
- Heckmann, L.H., Hovgaard, M.B., Sutherland, D.S., Autrup, H., Besenbacher, F., Scott-Fordsmand, J.J., (2011). Limit-test toxicity screening of selected inorganic nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*. In: *Ecotoxicology*, 20, 1, 226–233. DOI: 10.1007/s10646-010-0574-0
- Henkler, F., Stolpmann, K., Luch, A., (2012). Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Bulky DNA Adducts and Cellular Responses, in: *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. pp. 107–131. DOI: 10.1007/978-3-7643-8340-4_5.
- Howard, G.J., Schlezinger, J.J., Hahn, M.E., Webster, T.F., (2010). Generalized concentration addition predicts joint effects of aryl hydrocarbon receptor agonists with partial agonists and competitive antagonists. In: *Environmental Health Perspectives*, 118, 5, 666–672. DOI: 10.1289/ehp.0901312
- Howard, G.J., Webster, T.F., (2009). Generalized concentration addition: A method for examining mixtures containing partial agonists. In: *Journal of Theoretical Biology*, 259, 3, 469–477. DOI: 10.1016/j.jtbi.2009.03.030
- HSE, (2015). Environmental fate models: Excel calculator tools [WWW Document]. <https://www.hse.gov.uk/pesticides/pesticides-registration/data-requirements-handbook/fate/environmental-fate-models.htm>
- Hu, X.Y., Wen, B., Zhang, S., Shan, X.Q., (2005). Bioavailability of phthalate congeners to earthworms (*Eisenia fetida*) in artificially contaminated soils. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, 1, 26–34. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2005.02.012
- Huesemann, M.H., (2004). Biodegradation and Bioremediation of Petroleum Pollutants in Soil 13–34. DOI: 10.1007/978-3-662-05794-0_2
- Hurdzan, C.M., Lanno, R.P., (2011). Predicting the acute lethality of a chlorinated benzene mixture in soils: A comparison of solid-phase microextraction, body residue, and solvent extraction techniques. In: *Toxicological and Environmental Chemistry*, 93, 4, 678–690. DOI: 10.1080/02772248.2010.544473
- Irha, N., Slet, J., Petersell, V., (2003). Effect of heavy metals and PAH on soil assessed via dehydrogenase assay. In: *Environment International*, 28, 8, 779–782. DOI: 10.1016/S0160-4120(02)00124-1
- Jager, T., Fleuren, R.H.L.J., Hogendoorn, E.A., De Korte, G., (2003). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (oligochaeta). In: *Environmental Science and Technology*, 37, 15, 3399–3404. DOI: 10.1021/es0340578
- Jegade, O.O., Awuah, K.F., Renaud, M.J., Cousins, M., Hale, B.A., Siciliano, S.D., (2020). Single metal and metal mixture toxicity of five metals to *Oppia nitens* in five different Canadian soils. In: *Journal of Hazardous Materials*, 392, September 2019, Elsevier, 122341. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122341.
- Jeng, H.A., Sikdar, S., Pan, C.-H., Chang-Chien, G.-P., (2021). Mixture Analysis of Associations between Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Sperm Oxidative DNA Damage. In:

- Annals of Work Exposures and Health, 1–13. DOI: 10.1093/annweh/wxab072
- Jensen, J., van Langevelde, J., Pritzl, G., Krogh, P.H., (2001). Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate and dibutyl phthalate on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 5, 1085–1091. DOI: 10.1002/etc.5620200520
- Jho, E.H., An, J., Nam, K., (2011). Extended biotic ligand model for prediction of mixture toxicity of Cd and Pb using single metal toxicity data. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30, 7, 1697–1703. DOI: 10.1002/etc.556
- Jia, H., Nulaji, G., Gao, H., Wang, F., Zhu, Y., Wang, C., (2016). Formation and Stabilization of Environmentally Persistent Free Radicals Induced by the Interaction of Anthracene with Fe(III)-Modified Clays. In: *Environmental Science and Technology*, 50, 12, 6310–6319. DOI: 10.1021/acs.est.6b00527
- Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E., (2005). Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 10, 2701–2713. DOI: 10.1897/04-431R.1
- Jonker, M.J., Sweijen, R.A.J.C., Kammenga, J.E., (2004). Toxicity of simple mixtures to the nematode *Caenorhabditis elegans* in relation to soil sorption. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 2, 480–488. DOI: 10.1897/03-29
- Kahle, A., (2021). PAK-Messungen an Kaminöfen. In: *Umweltbundesamt*, 57.
https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/5750/publikationen/2021-04-19_texte_57-2021_pak_messung_kaminoefen.pdf
- Kanazawa, S., Filip, Z., (1986). Distribution of microorganisms, total biomass, and enzyme activities in different particles of brown soil. In: *Microbial Ecology*, 12, 2, 205–215. DOI: 10.1007/BF02011205
- Kim, D., Cui, R., Moon, J., Kwak, J. Il, An, Y.J., (2019). Soil ecotoxicity study of DEHP with respect to multiple soil species. In: *Chemosphere*, 216, Elsevier B.V., 387–395. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.10.163
- Knillmann, S., Liess, M., Scholz-Starke, B., Daniels, B., Ottermanns, R., Schäffer, A., Sybertz, A., Roß-Nickoll, M., (2021). Environmental risks of pesticides between forecast and reality: How reliable are results of the environmental risk assessment for individual products in the light of agricultural practice (tank mixtures, spray series)?, *Umweltbundesamt*.
https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/5750/publikationen/2021-05-26_texte_82-2021_combitox_pesticides.pdf
- Knoche, M., Tamura, H., Bukovac, M.J., (1991). Performance and Stability of the Organosilicone Surfactant L-77: Effect of pH, Concentration, and Temperature. In: *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1986, 202–206. DOI: 10.1021/jf00001a041
- Kobetičová, K., Šimek, Z., Brezovský, J., Hofman, J., (2011). Toxic effects of nine polycyclic aromatic compounds on *Enchytraeus crypticus* in artificial soil in relation to their properties. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 6, 1727–1733. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2011.04.013
- Könemann, H., (1981). Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: A proposal for a quantitative approach and experimental results. In: *Toxicology*, 19, 3, 229–238. DOI: 10.1016/0300-483X(81)90132-3
- Kong, X., Jin, D., Jin, S., Wang, Z., Yin, H., Xu, M., Deng, Y., (2018). Responses of bacterial community to dibutyl phthalate pollution in a soil-vegetable ecosystem. In: *Journal of Hazardous Materials*, 353, Elsevier B.V., 142–150. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.04.015.
- Kovacic, P., Jacintho, J.D., (2005). Mechanisms of Anti-Cancer Agents Emphasis on Oxidative Stress and Electron Transfer. In: *Current Pharmaceutical Design*, 6, 3, 277–309. DOI: 10.2174/1381612003401046
- Kreslavski, V.D., Brestic, M., Zharmukhamedov, S.K., Lyubimov, V.Y., Lankin, A. V., Jajoo, A., Allakhverdiev, S.I., (2017). Mechanisms of inhibitory effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in photosynthetic primary processes in pea leaves and thylakoid preparations. In: *Plant Biology*, 19, 5, 683–688. DOI: 10.1111/plb.12598
- Kwon, M.J., Lee, G., Hwang, Y.H., Lee, M., Yang, J.S., (2016). Effects of Soil Micro-particles and Micro-pores on Petroleum Hydrocarbons Released From Contaminated Soils During Solvent Extraction with Ultrasound.

- In: Water, Air, and Soil Pollution, 227, 9, Water, Air, & Soil Pollution. DOI: 10.1007/s11270-016-3071-0
- Lima, D.L.D., Schneider, R.J., Esteves, V.I., (2012). Sorption behavior of EE2 on soils subjected to different long-term organic amendments. In: Science of the Total Environment, 423, Elsevier B.V., 120–124. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.02.014.
- Lin, Y., Di Toro, D.M., Allen, H.E., (2015). Development and validation of a terrestrial biotic ligand model for Ni toxicity to barley root elongation for non-calcareous soils. In: Environmental Pollution, 202, Elsevier Ltd, 41–49. DOI: 10.1016/j.envpol.2015.03.015.
- Liste, H.H., Felgentreu, D., (2006). Crop growth, culturable bacteria, and degradation of petrol hydrocarbons (PHCs) in a long-term contaminated field soil. In: Applied Soil Ecology, 31, 1–2, 43–52. DOI: 10.1016/j.apsoil.2005.04.006
- Liu, Y., Vijver, M.G., Peijnenburg, W.J.G.M., (2014). Comparing three approaches in extending biotic ligand models to predict the toxicity of binary metal mixtures (Cu-Ni, Cu-Zn and Cu-Ag) to lettuce (*Lactuca sativa* L.). In: Chemosphere, 112, Elsevier Ltd, 282–288. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.04.077.
- Loewe, S., Muischnek, H., (1926). Über Kombinationswirkungen Mitteilung: Hilfsmittel der Fragestellung. In: Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 114, 313–326.
- Lopes, S., Pinheiro, C., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S., (2016). Joint toxicity prediction of nanoparticles and ionic counterparts: Simulating toxicity under a fate scenario. In: Journal of Hazardous Materials, 320, Elsevier B.V., 1–9. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.07.068.
- Ma, T., Chen, L., Wu, L., Zhang, H., Luo, Y., (2016). Oxidative Stress, Cytotoxicity and Genotoxicity in Earthworm *Eisenia fetida* at Different Di-n-Butyl Phthalate Exposure Levels. In: PLoS ONE, 11, 3, 1–11. DOI: 10.1371/journal.pone.0151128
- Ma, T., Christie, P., Teng, Y., Luo, Y., (2013). Rape (*Brassica chinensis* L.) seed germination, seedling growth, and physiology in soil polluted with di-n-butyl phthalate and bis(2-ethylhexyl) phthalate. In: Environmental Science and Pollution Research, 20, 8, 5289–5298. DOI: 10.1007/s11356-013-1520-5
- Ma, T., Zhou, W., Chen, L., Wu, L., Christie, P., Liu, W., (2018). Toxicity of phthalate esters to lettuce (*Lactuca sativa*) and the soil microbial community under different soil conditions. In: PLoS ONE, 13, 12, 1–17. DOI: 10.1371/journal.pone.0208111
- Ma, T., Zhou, W., Chen, L., Wu, L., Christie, P., Zhang, H., Luo, Y., (2017). Toxicity effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate to *Eisenia fetida* at enzyme, cellular and genetic levels. In: PLoS ONE, 12, 3, 1–12. DOI: 10.1371/journal.pone.0173957
- Marking, L., (1977). Method for Assessing Additive Toxicity of Chemical Mixtures. In: Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation, 99–108. DOI: 10.1520/STP32392S
- Martín-de-Lucía, I., Gonçalves, S.F., Leganés, F., Fernández-Piñas, F., Rosal, R., Loureiro, S., (2019). Combined toxicity of graphite-diamond nanoparticles and thiabendazole to *Daphnia magna*. In: Science of the Total Environment, 688, Elsevier B.V., 1145–1154. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.06.316.
- Martins, G.C., de Ferreira Reis, F.A., Dall'Agnol, R., Ramos, S.J., Gastauer, M., Natal-da-Luz, T., Sousa, J.P., Guilherme, L.R.G., (2024). Assessment of the reproduction of six collembolan species in tropical soils naturally rich in potentially toxic elements. In: Environmental Science and Pollution Research, 31, 17, 25424–25436. DOI: 10.1007/s11356-024-32847-4
- Matzke, M., Stolte, S., Bösch, A., Filser, J., (2008). Mixture effects and predictability of combination effects of imidazolium based ionic liquids as well as imidazolium based ionic liquids and cadmium on terrestrial plants (*Triticum aestivum*) and limnic green algae (*Scenedesmus vacuolatus*). In: Green Chemistry, 10, 7, 784–79. DOI: 10.1039/b802350f
- McGrath, S.P., Schoeters, I., McLaughlin, M.J., Sprang, P. Van, Janssen, C.R., Smolders, E., Oorts, K., (2009). Toxicity of Trace Metals in Soil As Affected By Soil Type and Aging After Contamination: Using Calibrated Bioavailability Models To Set Ecological Soil Standards. In: Environmental Toxicology and Chemistry, 28, 8, 1633. DOI: 10.1897/08-592.1
- Means, J.C., Wood, S.G., Hassett, J.J., Banwart, W.L., (1980). Sorption of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by Sediments and Soils. In: Environmental Science and Technology, 14, 12, 1524–1528. DOI:

10.1021/es00096a007

- Michel, A., Brauch, H.J., Worch, E., Lange, F.T., (2014). Homologue specific analysis of a polyether trisiloxane surfactant in German surface waters and study on its hydrolysis. In: *Environmental Pollution*, 186, Elsevier Ltd, 126–135. DOI: 10.1016/j.envpol.2013.11.020.
- Michel, A., Dietschweiler, C., Böni, M., Burkhardt, M., Brauch, H.J., Worch, E., Lange, F.T., (2016). Mobility of a polyether trisiloxane surfactant in soil: Soil/water distribution coefficients and leaching in a soil column. In: *Water, Air, and Soil Pollution*, 227, 2. DOI: 10.1007/s11270-016-2755-9
- More, S.J., Hardy, A., Bampidis, V., Benford, D., Hougaard Bennekou, S., Bragard, C., Boesten, J., Halldorsson, T.I., Hernández-Jerez, A.F., Jeger, M.J., Knutsen, H.K., Koutsoumanis, K.P., Naegeli, H., Noteborn, H., Ockleford, C., Ricci, A., Rychen, G., Schlatter, J.R., Silano, V., Nielsen, S.S., Schrenk, D., Solecki, R., Turck, D., Younes, M., Benfenati, E., Castle, L., Cedergreen, N., Laskowski, R., Leblanc, J.C., Kortenkamp, A., Ragas, A., Posthuma, L., Svendsen, C., Testai, E., Dujardin, B., Kass, G.E.N., Manini, P., Zare Jeddi, M., Dorne, J.L.C., Hogstrand, C., (2019). Guidance on harmonised methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. In: *EFSA Journal*, 17, 3. DOI: 10.2903/j.efsa.2019.5634
- Mullin, C.A., Fine, J.D., Reynolds, R.D., Frazier, M.T., (2016). Toxicological Risks of Agrochemical Spray Adjuvants: Organosilicone Surfactants May Not Be Safe. In: *Frontiers in Public Health*, 4, May, 1–8. DOI: 10.3389/fpubh.2016.00092
- Niemi, R.M., Heiskanen, I., Ahtiainen, J.H., Rahkonen, A., Mäntykoski, K., Welling, L., Laitinen, P., Ruuttunen, P., (2009). Microbial toxicity and impacts on soil enzyme activities of pesticides used in potato cultivation. In: *Applied Soil Ecology*, 41, 3, 293–304. DOI: 10.1016/j.apsoil.2008.12.002
- Noordhoek, J.W., Verweij, R.A., van Gestel, C.A.M., van Straalen, N.M., Roelofs, D., (2018). No effect of selected engineered nanomaterials on reproduction and survival of the springtail *Folsomia candida*. In: *Environmental Science: Nano*, 5, 2, Royal Society of Chemistry, 564–571. DOI: 10.1039/C7EN00824D. <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7EN00824D>
- OECD, (2018). Considerations for assessment of risk from the combined exposure to multiple chemicals. In: *Testing and Assessment*, 296, 119. https://www.oecd.org/en/publications/considerations-for-assessing-the-risks-of-combined-exposure-to-multiple-chemicals_ceca15a9-en.html
- OECD, (2016a). Test No.232: Collembolan Reproduction Test in Soil. In: *OECD Guidelines for Testing of Chemicals*, September, 1–19. DOI: 10.1787/9789264264601
- OECD, (2016b). Test 220 - Enchytraeid Reproduction Test. In: *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, Section 2, OECD Publishing, July, 1–24. DOI: 10.1787/9789264264472
- OECD, (2000a). Test No. 216: Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test. In: *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, January, 1–10. DOI: 10.1787/9789264070226
- OECD, (2000b). Test No. 217: Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test. In: *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, January, 1–10. DOI: 10.1787/9789264070240.
- Ogungbemi, A.O., Massei, R., Altenburger, R., Scholz, S., Küster, E., (2021). Assessing Combined Effects for Mixtures of Similar and Dissimilar Acting Neuroactive Substances on Zebrafish Embryo Movement. In: *Toxics*, 9, 5, 104. DOI: 10.3390/toxics9050104
- Park, K.S., Sims, R.C., Dupont, R.R., Doucette, W.J., Matthews, J.E., (1990). Fate of Pah Compounds in Two Soil Types: Influence of Volatilization, Abiotic Loss and Biological Activity. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9, 2, 187. DOI: 10.1002/etc.5620090208
- Paumen, M.L., Steenbergen, E., Kraak, M.H.S., Van Straalen, N.M., Van Gestel, C.A.M., (2008). Multigeneration exposure of the springtail *Folsomia candida* to phenanthrene: From dose-response relationships to threshold concentrations. In: *Environmental Science and Technology*, 42, 18, 6985–6990. DOI: 10.1021/es8007744
- Pedersen, M.B., van Gestel, C.A.M., Elmegaard, N., (2000). Effects of copper on reproduction of two collembolan species exposed through soil, food, and water. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 10, 2579–2588. DOI: 10.1002/etc.5620191026

- Pereira, R., Rocha-Santos, T.A.P., Antunes, F.E., Rasteiro, M.G., Ribeiro, R., Gonçalves, F., Soares, A.M.V.M., Lopes, I., (2011). Screening evaluation of the ecotoxicity and genotoxicity of soils contaminated with organic and inorganic nanoparticles: The role of ageing. In: *Journal of Hazardous Materials*, 194, 345–354. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.07.112.
- Pies, C., Yang, Y., Hofmann, T., (2007). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in floodplain soils of the Mosel and Saar River. In: *Journal of Soils and Sediments*, 7, 4, 216–222. DOI: 10.1065/jss2007.06.233
- Plaza-Bolaños, P., Padilla-Sánchez, J.A., Garrido-Frenich, A., Romero-González, R., Martínez-Vidal, J.L., (2012). Evaluation of soil contamination in intensive agricultural areas by pesticides and organic pollutants: South-eastern Spain as a case study. In: *Journal of Environmental Monitoring*, 14, 4, 1182–1189. DOI: 10.1039/c2em10993j
- Qiu, H., Versieren, L., Rangel, G.G., Smolders, E., (2016). Interactions and Toxicity of Cu-Zn mixtures to *Hordeum vulgare* in Different Soils Can Be Rationalized with Bioavailability-Based Prediction Models. In: *Environmental Science and Technology*, 50, 2, 1014–1022. DOI: 10.1021/acs.est.5b05133
- Qiu, H., Vijver, M.G., Peijnenburg, W.J.G.M., (2011). Interactions of cadmium and zinc impact their toxicity to the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30, 9, 2084–2093. DOI: 10.1002/etc.595
- R Core Team, (2025). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Renaud, M., Cousins, M., Awuah, K.F., Jegede, O., Sousa, J.P., Siciliano, S.D., (2020). The effects of complex metal oxide mixtures on three soil invertebrates with contrasting biological traits, *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139921.
- Riek, W., Russ, A., Marx, M., (2021). Concentrations of inorganic and organic pollutants in forest soils as an archive of anthropogenic inputs in the state of Brandenburg, Germany. In: *Applied Sciences (Switzerland)*, 11, 3, 1–22. DOI: 10.3390/app11031189
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C., Gerhard, D., (2015). Dose-response analysis using R. In: *PLoS ONE*, 10, 12, 1–13. DOI: 10.1371/journal.pone.0146021
- Römbke, J., Jänsch, S., Minati, R., Rückamp, D., Oorts, K., (2021). Entwicklung eines ökotoxikologischen Bewertungsansatzes für Böden auf Basis der bioverfügbaren Fraktion von Schadstoffen unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Filter- und Puffereigenschaften von Böden. <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/entwicklung-eines-oekotoxikologischen>
- Rosal, R., Rodea-Palomares, I., Boltes, K., Fernández-Piñas, F., Leganés, F., Petre, A., (2010). Ecotoxicological assessment of surfactants in the aquatic environment: Combined toxicity of docusate sodium with chlorinated pollutants. In: *Chemosphere*, 81, 2, Elsevier Ltd, 288–293. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.05.050.
- Saeedi, M., Li, L.Y., Grace, J.R., (2018). Effect of organic matter and selected heavy metals on sorption of acenaphthene, fluorene and fluoranthene onto various clays and clay minerals. In: *Environmental Earth Sciences*, 77, 8, Springer Berlin Heidelberg, 1–12. DOI: 10.1007/s12665-018-7489-0.
- Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R., (1993). *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*, 2nd ed. Springer Berlin Heidelberg, Berlin. DOI: 10.1007/978-3-642-97284-3
- Schmitt, W., Bruns, E., Dollinger, M., Sowig, P., (2013). Mechanistic TK/TD-model simulating the effect of growth inhibitors on *Lemna* populations. In: *Ecological Modelling*, 255, Elsevier B.V., 1–10. DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2013.01.017.
- Schulz, R., Bub, S., Petschick, L.L., Stehle, S., Wolfram, J., (2021). Applied pesticide toxicity shifts toward plants and invertebrates, even in GM crops. In: *Science*, 372, 6537, 81–84. DOI: 10.1126/science.abe1148
- Shen, G., Lu, Y., Zhou, Q., Hong, J., (2005). Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on soil enzyme. In: *Chemosphere*, 61, 8, 1175–1182. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.02.074
- Silva, E., Rajapakse, N., Kortenkamp, A., (2002). Something from “nothing” - Eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. In: *Environmental Science*

- and Technology, 36, 8, 1751–1756. DOI: 10.1021/es0101227
- Šmídová, K., Svobodová, M., Hofman, J., (2021). Toxicokinetics of hydrophobic organic compounds in oligochaeta: A critical review. In: Environmental Pollution, 289, June. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.117743
- Smith, M.J., Flowers, T.H., Duncan, H.J., Alder, J., (2006). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. In: Environmental Pollution, 141, 3, 519–525. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.08.061
- Spasojević, J., Maletić, S., Rončević, S., Grgić, M., Krčmar, D., Varga, N., Dalmacija, B., (2018). The role of organic matter and clay content in sediments for bioavailability of pyrene. In: Water Science and Technology, 77, 2, 439–447. DOI: 10.2166/wst.2017.551
- Stockdale, A., Tipping, E., Lofts, S., Ormerod, S.J., Clements, W.H., Blust, R., (2010). Toxicity of proton-metal mixtures in the field: Linking stream macroinvertebrate species diversity to chemical speciation and bioavailability. In: Aquatic Toxicology, 100, 1, Elsevier B.V., 112–119. DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.07.018.
- Stolbova, V. V, Beregela, D. V, (2015). Correlation between phytotoxicity and properties of soils containing a group of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Moscow University Soil Science Bulletin, 70, 2, 71–77. DOI: 10.3103/s0147687415020088
- Sverdrup, L.E., Jensen, J., Kelley, A.E., Krogh, P.H., Stenersen, J., (2002a). Effects of eight polycyclic aromatic compounds on the survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Clitellata). In: Environmental Toxicology and Chemistry, 21, 1, 109–114. DOI: 10.1002/etc.5620210116
- Sverdrup, L.E., Jensen, J., Krogh, P.H., Stenersen, J., (2002b). Studies on the effect of soil aging on the toxicity of pyrene and phenanthrene to a soil-dwelling springtail. In: Environmental Toxicology and Chemistry, 21, 3, 489–492. DOI: 10.1002/etc.5620210303
- Sverdrup, L.E., Kelley, A.E., Krogh, P.H., Nielsen, T., Jensen, J., Scott-Fordsmand, J.J., Stenersen, J., (2001). Effects of eight polycyclic aromatic compounds on the survival and reproduction of the springtail *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae). In: Environmental Toxicology and Chemistry, 20, 6, 1332–1338. DOI: 10.1002/etc.5620210116
- Sverdrup, L.E., Krogh, P.H., Nielsen, T., Kjær, C., Stenersen, J., (2003). Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (*Trifolium pratense*), ryegrass (*Lolium perenne*), and mustard (*Sinapsis alba*). In: Chemosphere, 53, 8, 993–1003. DOI: 10.1016/S0045-6535(03)00584-8
- Tang, J., Wang, M., Wang, F., Sun, Q., Zhou, Q., (2011). Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil. In: Journal of Environmental Sciences, 23, 5, The Research Centre for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, 845–851. DOI: 10.1016/S1001-0742(10)60517-7.
- Testerink, G.J., (1981). Starvation in a field population of litter-inhabiting Collembola. Methods for determining food reserves in small arthropods. In: Pedobiologia, 21, 6, 427–433. DOI: 10.1016/S0031-4056(23)03603-X
- Thakali, S., Allen, H.E., Di Toro, D.M., Ponizovsky, A.A., Rooney, C.P., Zhao, F.J., McGrath, S.P., Criel, P., Eeckhout, H. Van, Janssen, C.R., Oorts, K., Smolders, E., (2006a). Terrestrial Biotic Ligand Model. 2. Application to Ni and Cu Toxicities to Plants, Invertebrates, and Microbes in Soil. In: Environmental Science and Technology, 40, 22, 7094–100. DOI: 10.1021/es061173c
- Thakali, S., Allen, H.E., Toro, D.M.D.I., Ponizovsky, A. a, Rooney, C.P., ZHAO, F.-J., McGrath, S.P., (2006b). A Terrestrial Biotic Ligand Model. 1. Development and Application to Cu and Ni Toxicities to Barley Root Elongation in Soils. In: Environmental Science & Technology, 7085–7093. DOI: 10.1021/es061171s
- The European Commission, (2019). Fluazinam - List of End Points. Combined Draft Renewal Assessment Report prepared according to Regulation (EC) N° 1107/2009 and Proposal for Harmonised Classification and Labelling (CLH Report) according to Regulation (EC) N° 1272/2008.
- Thimm, T., Hoffmann, A., Borkott, H., Munch, J.C., Tebbe, C.C., (1998). The gut of the soil microarthropod *Folsomia candida* (Collembola) is a frequently changeable but selective habitat and a vector for microorganisms. In: Applied and Environmental Microbiology, 64, 7, 2660–2669. DOI: 10.1128/aem.64.7.2660-2669.1998

- Thrupp, T.J., Runnalls, T.J., Scholze, M., Kugathas, S., Kortenkamp, A., Sumpter, J.P., (2018). The consequences of exposure to mixtures of chemicals: Something from ‘nothing’ and ‘a lot from a little’ when fish are exposed to steroid hormones. In: *Science of the Total Environment*, 619–620, The Authors, 1482–1492. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.081.
- Tipping, E., (1998). Humic ion-binding model VI: An improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances. In: *Aquatic Geochemistry*, 4, 1, 3–47. DOI: 10.1023/A:1009627214459
- Tran, B.C., Teil, M.J., Blanchard, M., Alliot, F., Chevreuil, M., (2015). Fate of phthalates and BPA in agricultural and non-agricultural soils of the Paris area (France). In: *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 14, 11118–11126. DOI: 10.1007/s11356-015-4178-3
- Treu, G., Schulze, J., Galert, W., Hassold, E., (2024). Regulatory and practical considerations on the implementation of a mixture allocation factor in REACH. In: *Environmental Sciences Europe*, 36, 1, Springer Berlin Heidelberg. DOI: 10.1186/s12302-024-00910-z
- Umweltbundesamt, (2024). Pflanzenschutzmittelverwendung in der Landwirtschaft [WWW Document]. <https://www.umweltbundesamt.de/daten/land-forstwirtschaft/pflanzenschutzmittelverwendung-in-der#funde-von-pflanzenschutzmitteln-in-gewassern>
- Umweltbundesamt, (2023). Struktur der Flächennutzung [WWW Document]. <https://www.umweltbundesamt.de/daten/flaeche-boden-land-oekosysteme/flaeche/struktur-der-flaechennutzung#die-wichtigsten-flaechennutzungen>
- Van Gestel, C.A.M., Hensbergen, P.J., (1997). Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida* willem (Collembola: Isotomidae) in relation to bioavailability in soil. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 6, 1177–1186. DOI: 10.1002/etc.5620160612
- Vijver, M.G., Peijnenburg, W.J.G.M., De Snoo, G.R., (2010). Toxicological mixture models are based on inadequate assumptions. In: *Environmental Science and Technology*,. DOI: 10.1021/es1001659.
- Walker, E.K., Brock, G.N., Arvidson, R.S., Johnson, R.M., (2022). Acute Toxicity of Fungicide–Insecticide–Adjuvant Combinations Applied to Almonds During Bloom on Adult Honey Bees. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41, 4, 1042–1053. DOI: 10.1002/etc.5297
- Wallach, R., Ben-Arie, O., Graber, E.R., (2005). Soil water repellency induced by long-term irrigation with treated sewage effluent. In: *Journal of environmental quality*, 34, 5, 1910–20. DOI: 10.2134/jeq2005.0073.
- Walter, H., Consolaro, F., Gramatica, P., Scholze, M., Altenburger, R., (2002). Mixture toxicity of priority pollutants at no observed effect concentrations (NOECs). In: *Ecotoxicology*, 11, 5, 299–310. DOI: 10.1023/A:1020592802989
- Wang, D., Xi, Y., Shi, X.Y., Zhong, Y.J., Guo, C.L., Han, Y.N., Li, F.M., (2021). Effect of plastic film mulching and film residues on phthalate esters concentrations in soil and plants, and its risk assessment. In: *Environmental Pollution*, 286, Elsevier Ltd, 117546. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.117546.
- Wang, L.R., Wang, Y., Chen, J.W., Guo, L.H., (2009). A structure-based investigation on the binding interaction of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons with DNA. In: *Toxicology*, 262, 3, 250–257. DOI: 10.1016/j.tox.2009.06.015
- Wang, T., Zhang, J., Tao, M. ting, Xu, C. ming, Chen, M., (2021). Quantitative characterization of toxicity interaction within antibiotic-heavy metal mixtures on *Chlorella pyrenoidosa* by a novel area-concentration ratio method. In: *Science of the Total Environment*, 762, Elsevier B.V., 144180. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144180.
- Wang, Y., Chen, C., Qian, Y., Zhao, X., Wang, Q., (2015). Ternary toxicological interactions of insecticides, herbicides, and a heavy metal on the earthworm *Eisenia fetida*. In: *Journal of Hazardous Materials*, 284, Elsevier B.V., 233–240. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.11.017.
- Warne, M.S.J., Connell, D.W., Hawker, D.W., Schüürmann, G., (1989). Prediction of the toxicity of mixtures of shale oil components. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 18, 2, 121–128. DOI: 10.1016/0147-6513(89)90072-9
- Warne, M.S.J., Hawker, D.W., (1995). The number of components in a mixture determines whether synergistic

- and antagonistic or additive toxicity predominate: The funnel hypothesis. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31, 1, 23–28. DOI: 10.1006/eesa.1995.1039
- Wehrli, M., Slotsbo, S., Fomsgaard, I.S., Laursen, B.B., Gröning, J., Liess, M., Holmstrup, M., (2024). A Dirt(y) World in a Changing Climate: Importance of Heat Stress in the Risk Assessment of Pesticides for Soil Arthropods. In: *Global change biology*, 30, 10, e17542. DOI: 10.1111/gcb.17542
- Wen, Z.D., Gao, D.W., Li, Z., Ren, N.Q., (2013). Effects of humic acid on phthalate adsorption to vermiculite. In: *Chemical Engineering Journal*, 223, Elsevier B.V., 298–303. DOI: 10.1016/j.cej.2013.03.012.
- Wernecke, A., Eckert, J.H., Forster, R., Kurlemann, N., Odemer, R., (2022). Inert agricultural spray adjuvants may increase the adverse effects of selected insecticides on honey bees (*Apis mellifera* L.) under laboratory conditions. In: *Journal of Plant Diseases and Protection*, 129, 1, Springer Berlin Heidelberg, 93–105. DOI: 10.1007/s41348-021-00541-z.
- Wright, L.P., Zhang, L., Cheng, I., Aherne, J., Wentworth, G.R., (2018). Impacts and effects indicators of atmospheric deposition of major pollutants to various ecosystems-A review. In: *Aerosol and Air Quality Research*, 18, 8, 1953–1992. DOI: 10.4209/aaqr.2018.03.0107
- Wu, Y., Si, Y., Zhou, D., Gao, J., (2015). Adsorption of diethyl phthalate ester to clay minerals. In: *Chemosphere*, 119, Elsevier Ltd, 690–696. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.07.063.
- Xie, H.J., Shi, Y.J., Zhang, J., Cui, Y., Teng, S.X., Wang, S.G., Zhao, R., (2010). Degradation of phthalate esters (PAEs) in soil and the effects of PAEs on soil microcosm activity. In: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 8, 1108–1116. DOI: 10.1002/jctb.2406
- Xu, G., Li, F., Wang, Q., (2008). Occurrence and degradation characteristics of dibutyl phthalate (DBP) and di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in typical agricultural soils of China. In: *Science of the Total Environment*, 393, 2–3, 333–340. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.01.001
- Xu, L., Lofts, S., Lu, Y., (2016). Terrestrial ecosystem health under long-term metal inputs: modeling and risk assessment. In: *Ecosystem Health and Sustainability*, 2, 5, 1–14. DOI: 10.1002/ehs2.1214
- Xu, X., Song, W., Wang, M., (2013). Adsorption-desorption and leaching characteristics of fluazinam in soils. In: *China Environmental Science*, 33, 4, 669–673.
<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20133171108>
- Yang, G., Chen, C., Wang, Y., Peng, Q., Zhao, H., Guo, D., Wang, Q., Qian, Y., (2017). Mixture toxicity of four commonly used pesticides at different effect levels to the epigeic earthworm, *Eisenia fetida*. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, June 2016, Elsevier Inc., 29–39. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.03.037.
- Yen Le, T.T., Vijver, M.G., Jan Hendriks, A., Peijnenburg, W.J.G.M., (2013). Modeling toxicity of binary metal mixtures (Cu²⁺-Ag⁺, Cu²⁺-Zn²⁺) to lettuce, *Lactuca sativa*, with the biotic ligand model. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32, 1, 137–143. DOI: 10.1002/etc.2039
- Younes, N.A., Dawood, M.F.A., Wardany, A.A., (2020). The phyto-impact of fluazinam fungicide on cellular structure, agro-physiological, and yield traits of pepper and eggplant crops. In: *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 15, 18064–18078. DOI: 10.1007/s11356-020-08289-z
- Zeng, F., Lin, Y., Cui, K., Wen, J., Ma, Y., Chen, H., Zhu, F., Ma, Z., Zeng, Z., (2010). Atmospheric deposition of phthalate esters in a subtropical city. In: *Atmospheric Environment*, 44, 6, Elsevier Ltd, 834–840. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2009.11.029.
- Zheng, Y., Zhou, K., Tang, J., Liu, C., Bai, J., (2022). Impacts of di-(2-ethylhexyl) phthalate on *Folsomia candida* (Collembola) assessed with a multi-biomarker approach. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 232, January, Elsevier Inc. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2022.113251

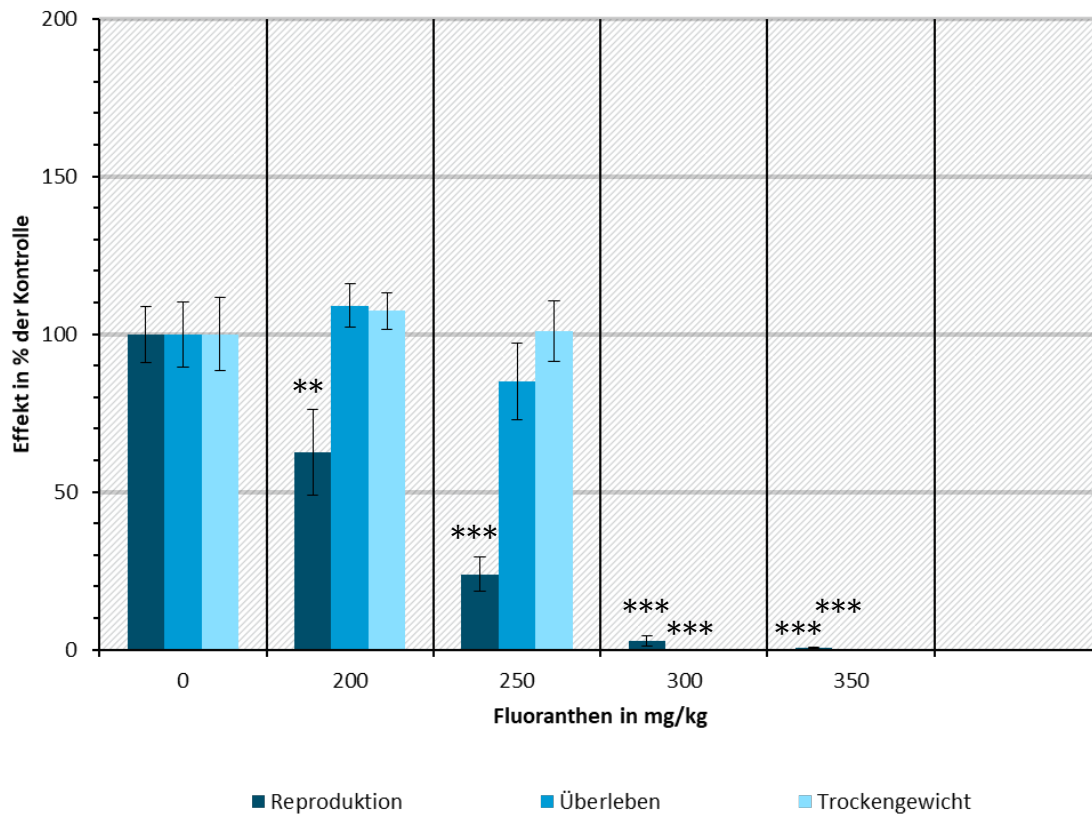
B Anhang Einzelsubstanztests

B.1 Collembolentests

B.1.1 Fluoranthen

Abbildung A 1 Toxizität von Fluoranthen ggü. *F. candida* in sandig-organischem Boden

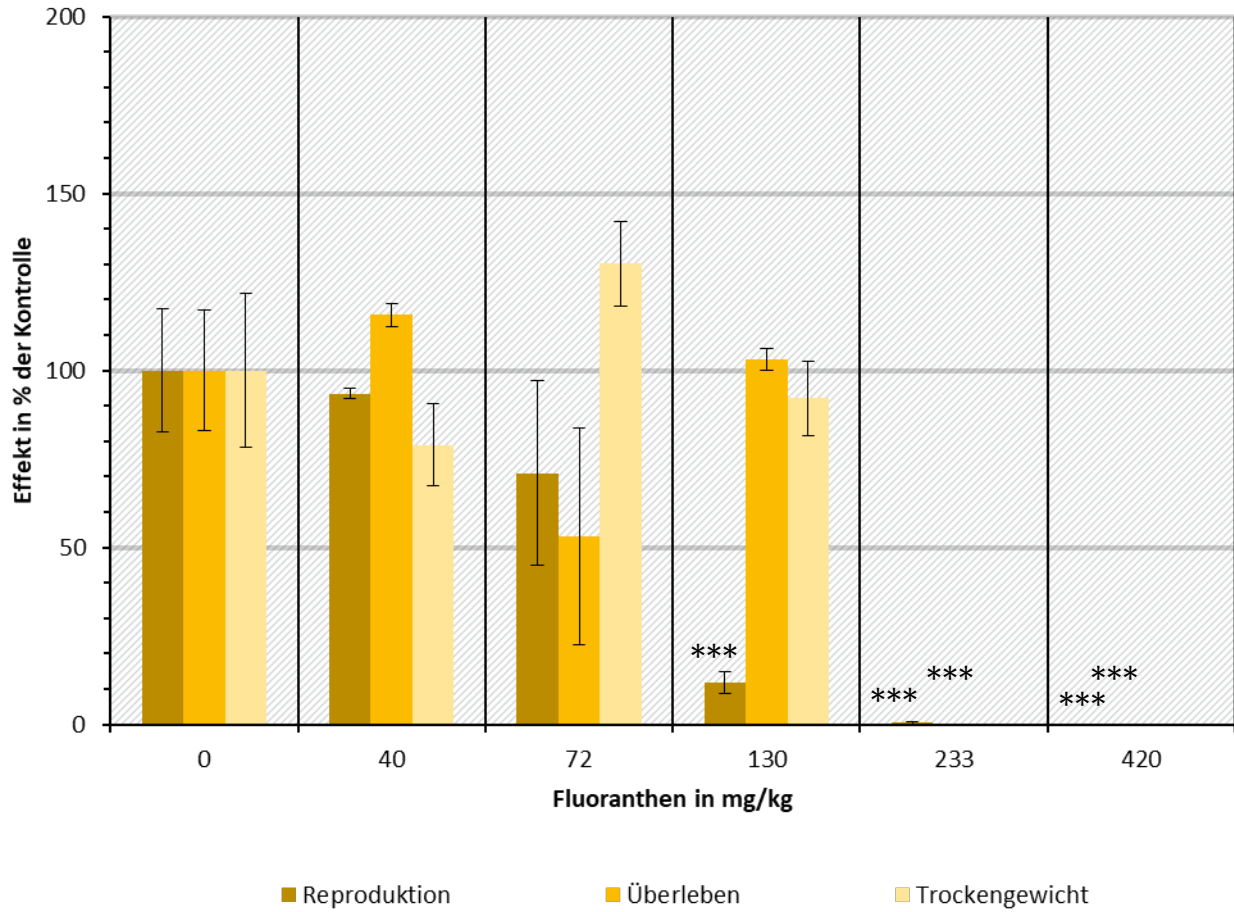
Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=4$) \pm Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: $0,05 > p \geq 0,01$; **: $0,01 > p \geq 0,001$; ***: $p > 0,001$



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 2 Toxizität von Fluoranthen ggü. *F. candida* in lehmigem Boden

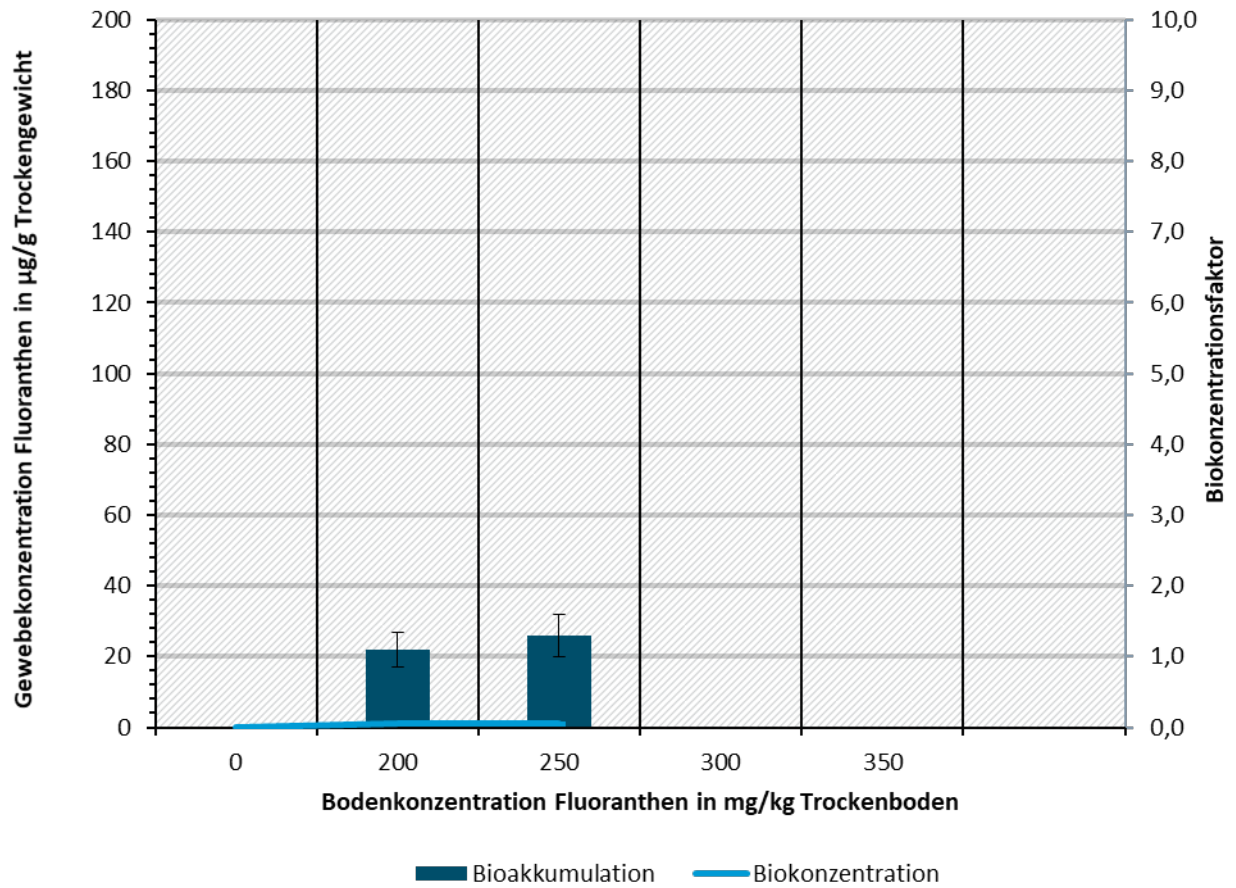
Dargestellt werden die Mittelwerte (n=4) ± Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: 0,05 > p ≥ 0,01; **: 0,01 > p ≥ 0,001; ***: p > 0,001



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 3 Gewebekonzentration von Fluoranthren in *F. candida* in sandig-organischem Boden

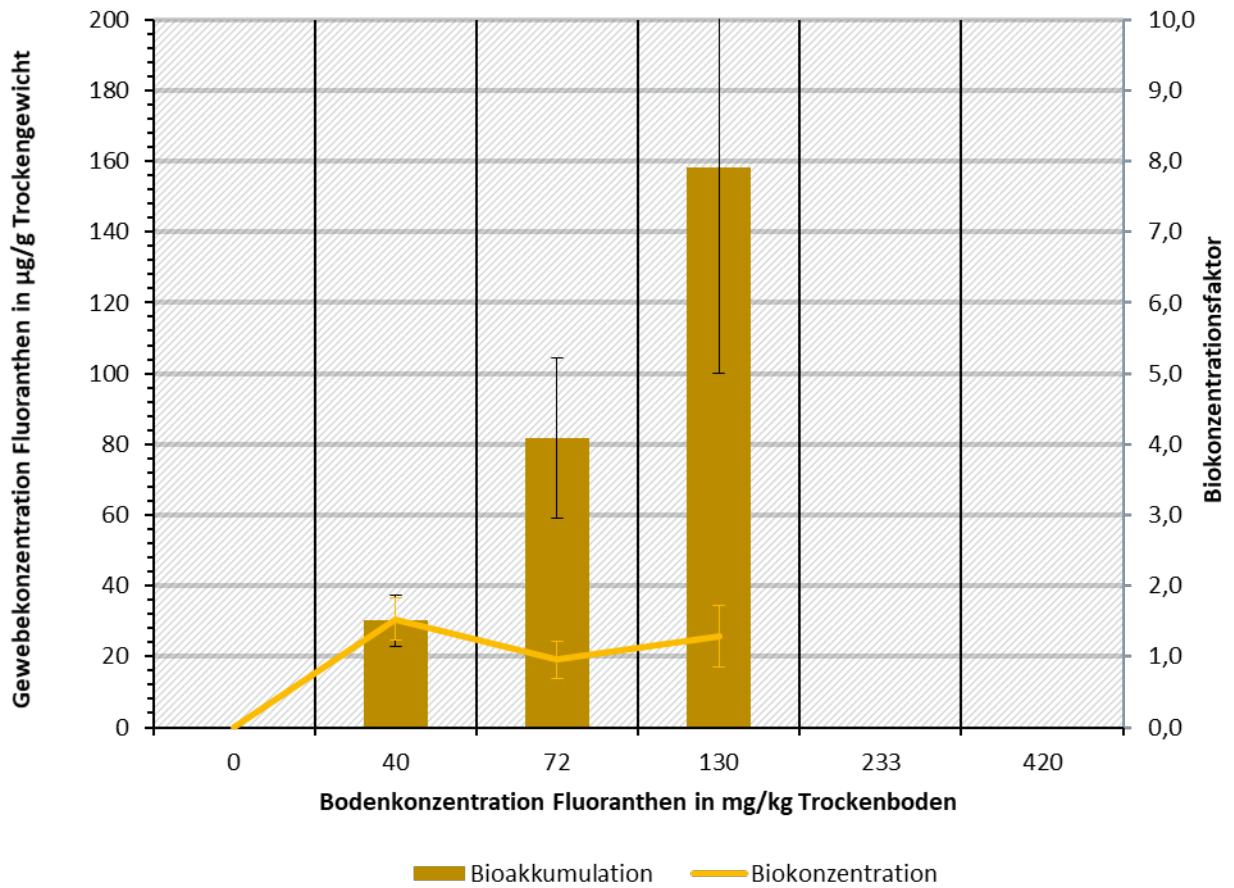
Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=4$) \pm Standardfehler der Endpunkte Gewebekonzentration und Biokonzentration (BCF) der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 4 Gewebekonzentration von Fluoranthen in *F. candida* in lehmigem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte (n=4) ± Standardfehler der Endpunkte Gewebekonzentration und Biokonzentration (BCF) der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).

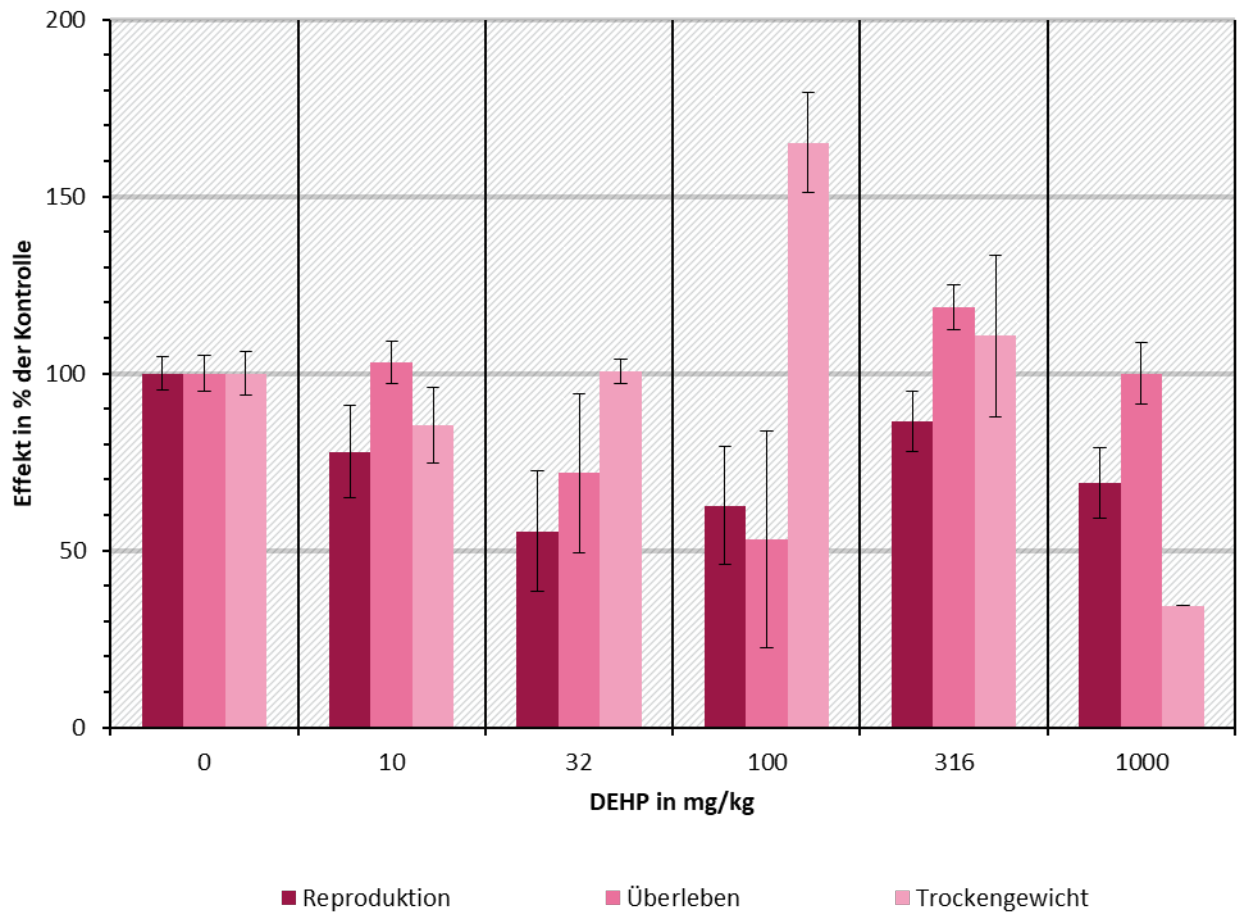


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

B.1.2 DEHP

Abbildung A 5 Toxizität von DEHP ggü. *F. candida* in sandigem Boden

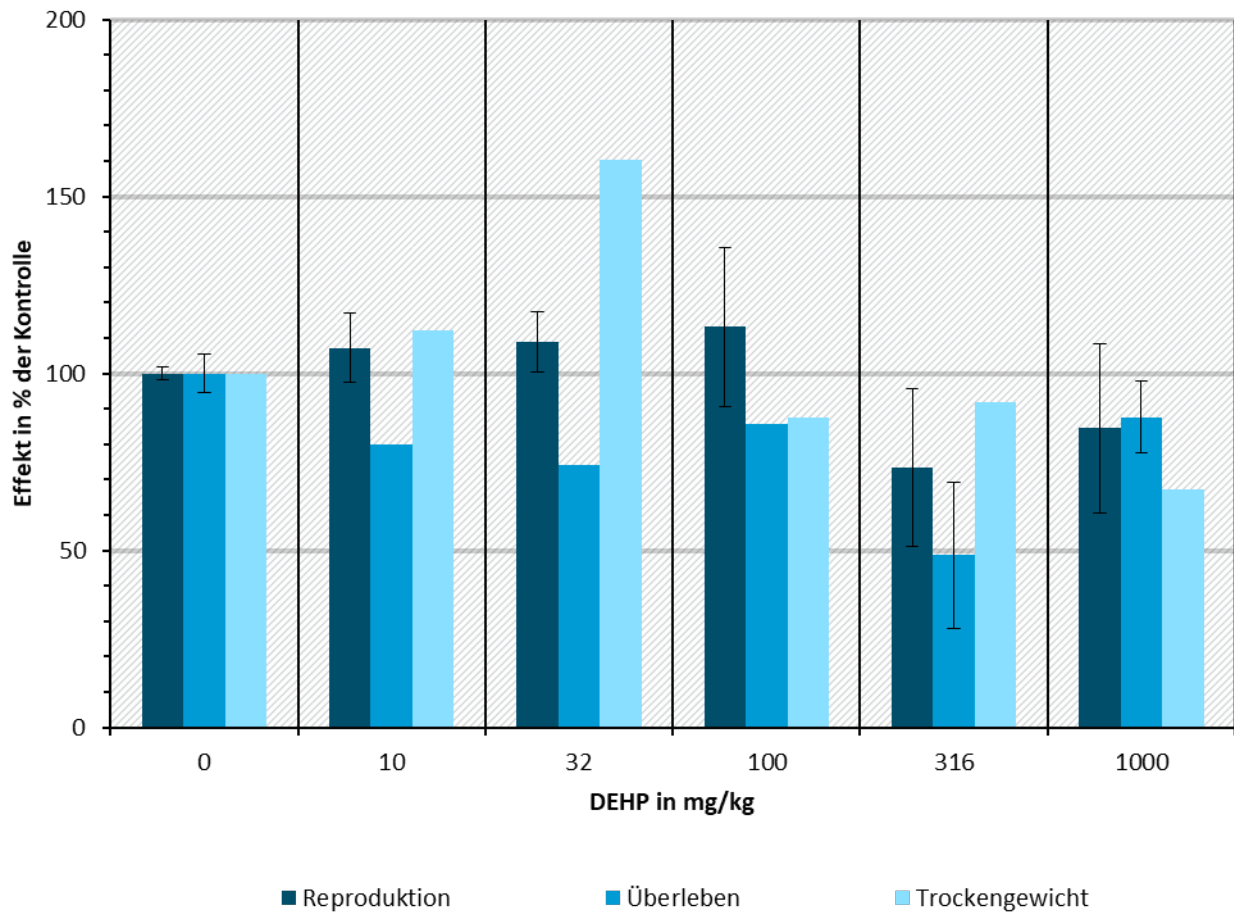
Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=4$) \pm Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden nicht festgestellt.



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 6 Toxizität von DEHP ggü. *F. candida* in sandig-organischem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=4$) \pm Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg) – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust $n<3$. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden nicht festgestellt.

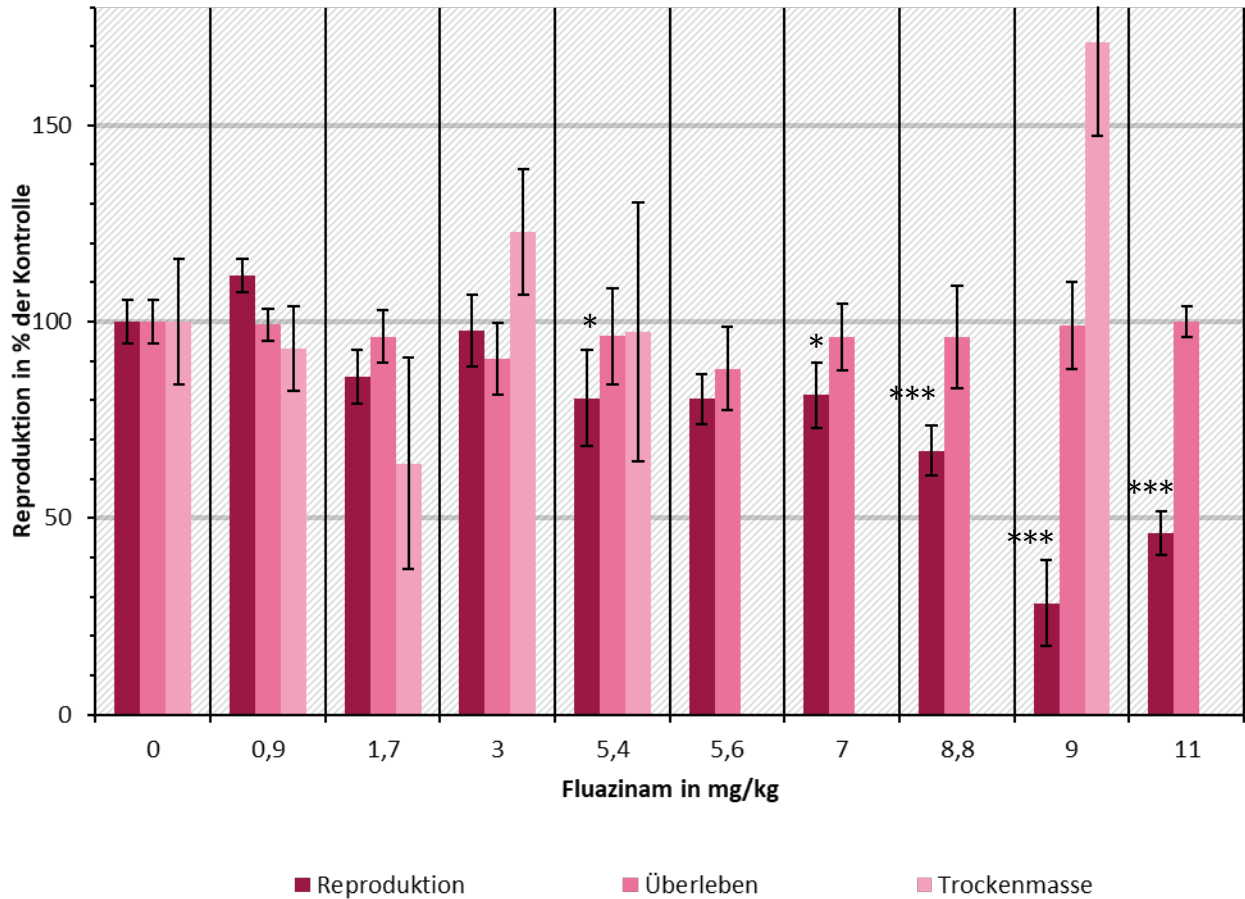


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

B.1.3 Fluazinam

Abbildung A 7 Toxizität von Fluazinam ggü. *F. candida* in sandigem Boden

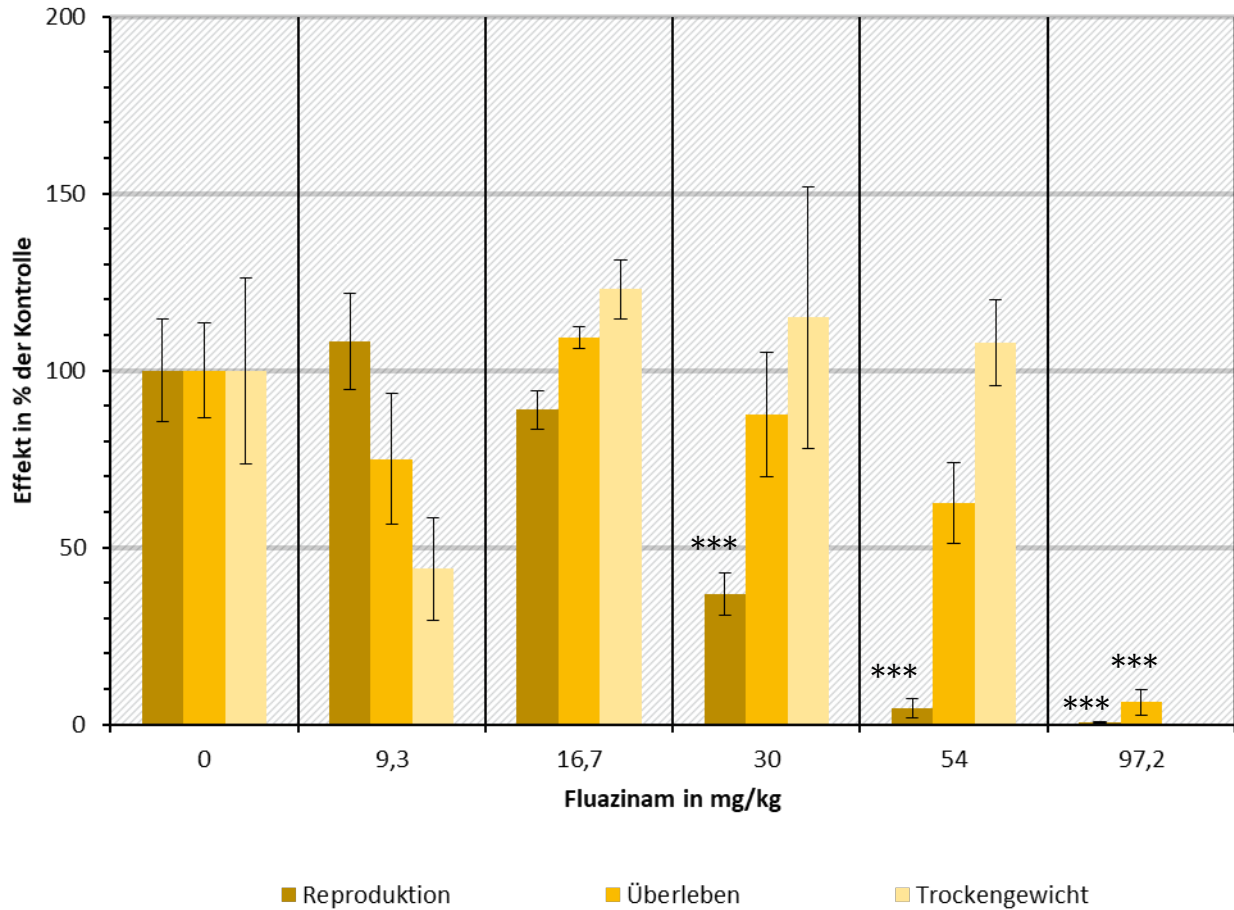
Dargestellt werden die Mittelwerte (n=4-8, verteilt auf 3 Tests) ± Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: 0,05 > p ≥ 0,01; **: 0,01 > p ≥ 0,001; ***: p > 0,001



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 8 Toxizität von Fluazinam ggü. *F. candida* in lehmigem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte (n=4) ± Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: 0,05 > p ≥ 0,01; **: 0,01 > p ≥ 0,001; ***: p > 0,001



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

B.1.4 Break-Thru

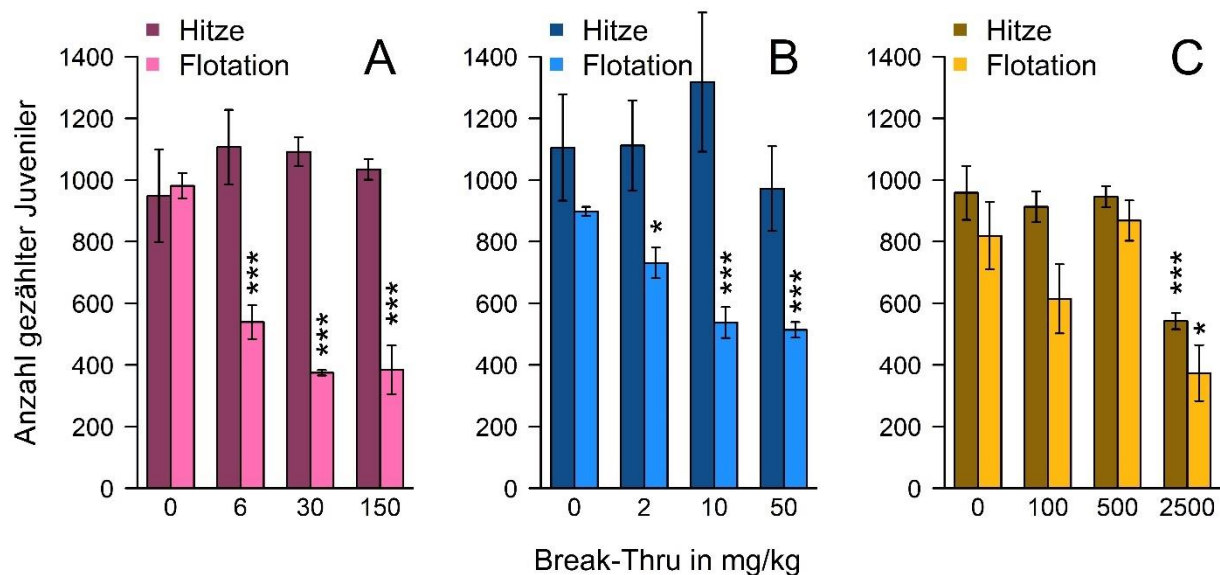
Tabelle A 1 Eigene Modellierungsergebnisse zu Minimal- und Maximalkonzentrationen von Trisiloxan in mg/kg Boden im Gleichgewichtszustand innerhalb von 20 Jahren

Annahmen: 10x150 g/ha im Abstand von 7 Tagen in Anlehnung an das Fungizid Fluazinam; Bodentiefe=5 cm, Bodendichte = 1,5 g/cm³

Abbaugeschwindigkeit (Halbwertszeit) in Tagen/Crop interception (CrI)	5% CrI	20% CrI	50% CrI
DT ₅₀ =50	0-1,3	0-1,1	0,1-0,7
DT ₅₀ =100	0,2-1,6	0,2-1,4	0,1-0,9
DT ₅₀ =200	0,8-2,4	0,6-2,0	0,4-1,2
DT ₅₀ =300	1,5-3,0	1,3-2,5	0,8-1,6

Abbildung A 9 Auswirkung der Extraktionsmethode auf die Wiederfindung juveniler *F. candida* nach Exposition ggü. Break-Thru

Mittlere Anzahl gezählter *F. candida* Juveniler (n=3, ± SE) nach Exposition ggü. Break-Thru in einem sandigen (A), einem sandig-organischen (B) und einem lehmigen Boden (C). Es wurden je Boden unterschiedliche Konzentrationsbereiche getestet, s. x-Achsen. Juvenile wurden entweder mittels Hitze oder Flotation (Aufschwemmung) extrahiert. Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle (glm) sind folgendermaßen markiert: *: 0.05 > p ≥ 0.01; **: 0.01 > p ≥ 0.001; 0.001 > p.

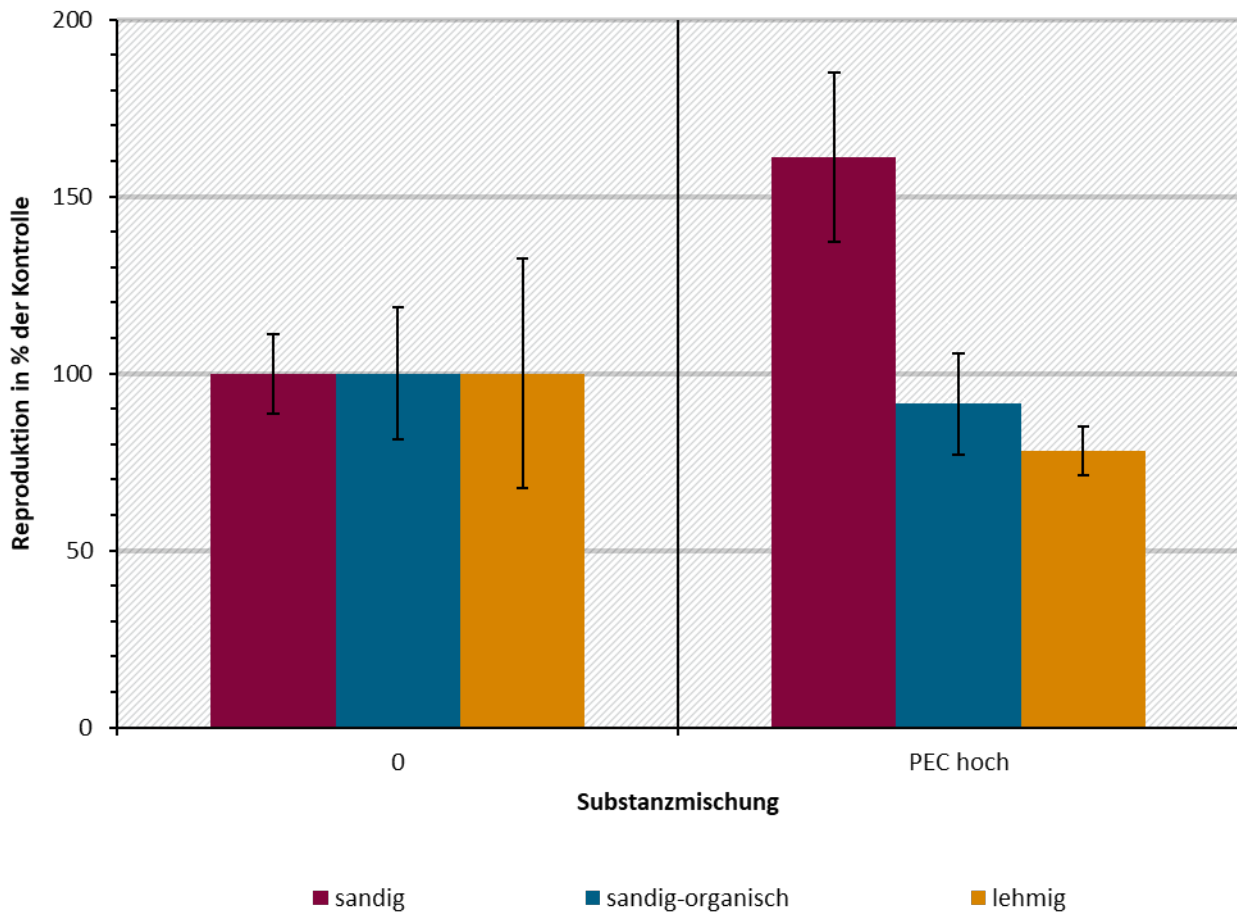


Quelle: Fischer et al. (2025)

Abbildung A 9 zeigt, wie die jeweilige Extraktionsmethode die Wiederfindungsrate von Juvenilen in mit Break-Thru versetztem Boden massiv beeinflusst. Während bei Hitzeextraktion die Anzahl juveniler Tiere im Vergleich zur Kontrolle nahezu konstant bleibt, wird bei Aufschwemmung der Böden zur Extraktion die Zahl der Juvenilen in den beiden sandigen Böden in bereits sehr niedrigen Konzentrationen von 6 bzw. 2 mg/kg signifikant gesenkt. Im lehmigen Boden dagegen tritt dieser Effekt erst viel später auf, und zwar bei über 500 mg/kg.

Abbildung A 10 Toxizität einer umweltrelevanten Substanzmischung ggü. *F. candida* in allen Böden, mittels Hitze extrahiert

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=4$) \pm Standardfehler des Endpunktes Reproduktion in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Die Konzentrationen der vier Testsubstanzen in der Behandlung PEC_{hoch} finden sich in Tabelle 6. Juvenile Tiere wurden mittels Hitze extrahiert. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden nicht gefunden.



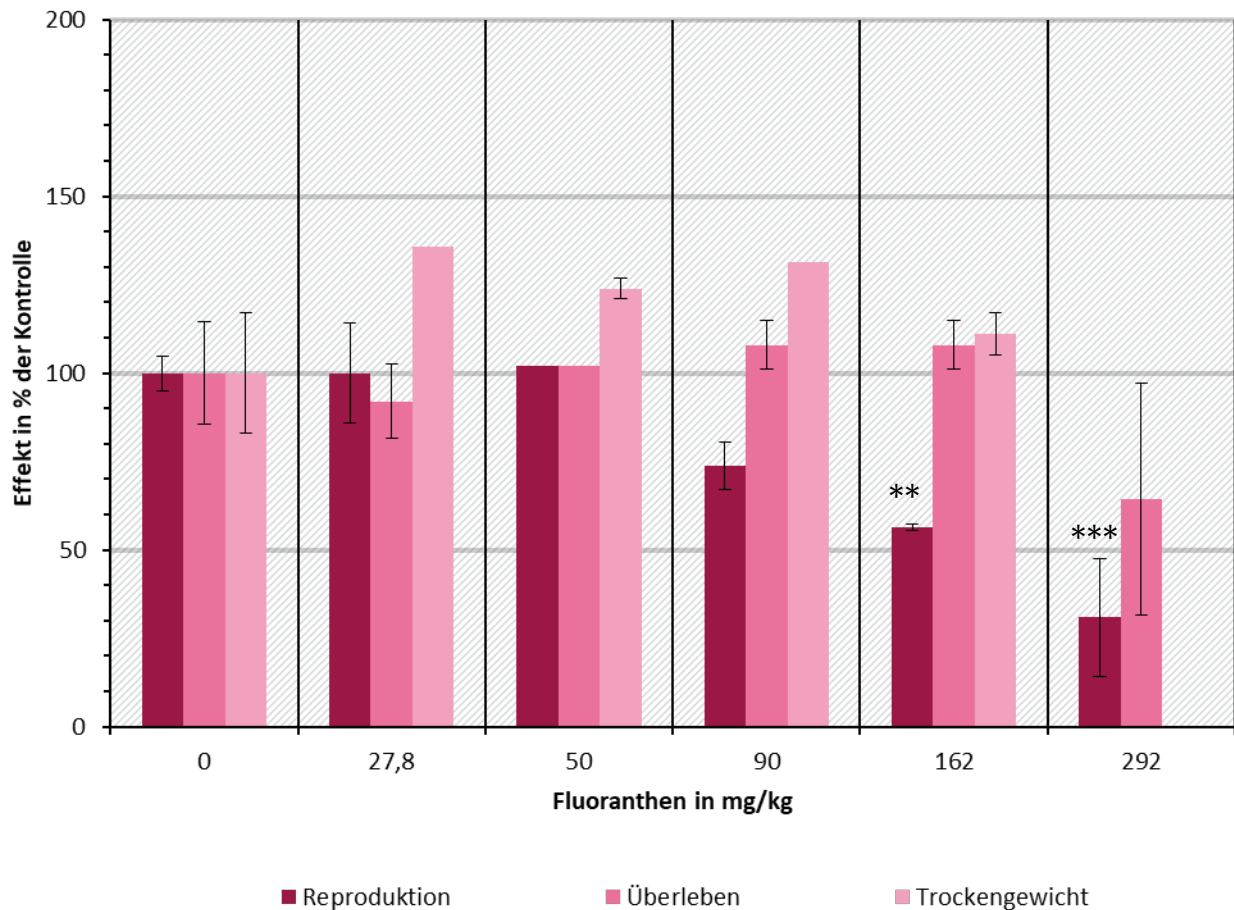
Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

B.2 Enchyträen

B.2.1 Fluoranthen

Abbildung A 11 Toxizität von Fluoranthen ggü. *E. crypticus* in sandigem Boden

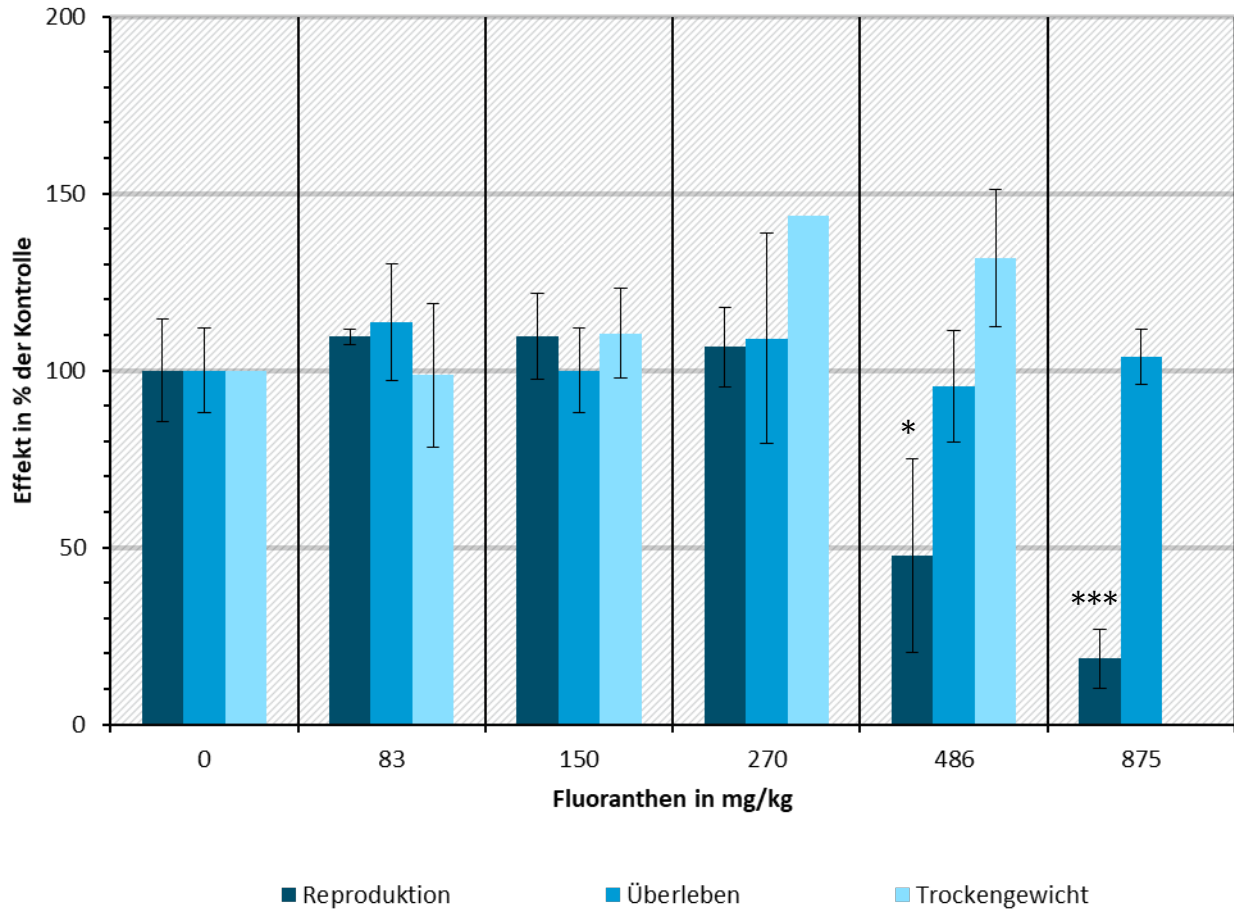
Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg) – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust $n<3$. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: $0,05 > p \geq 0,01$; **: $0,01 > p \geq 0,001$; ***: $p > 0,001$



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 12 Toxizität von Fluoranthen ggü. *E. crypticus* in sandig-organischem Boden

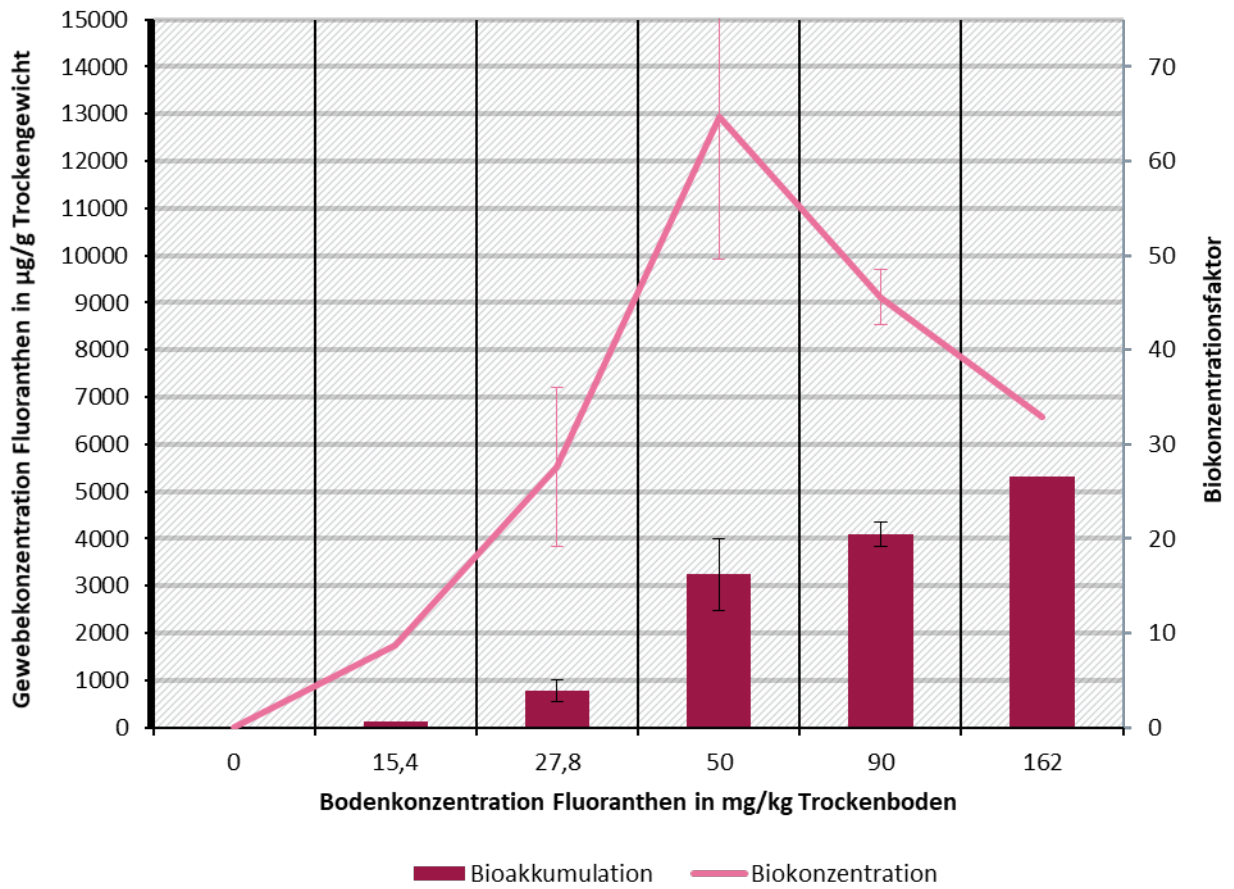
Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg) – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust $n < 3$. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: $0,05 > p \geq 0,01$; **: $0,01 > p \geq 0,001$; ***: $p > 0,001$



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 13 Gewebekonzentration von Fluoranthen in sandigem Boden

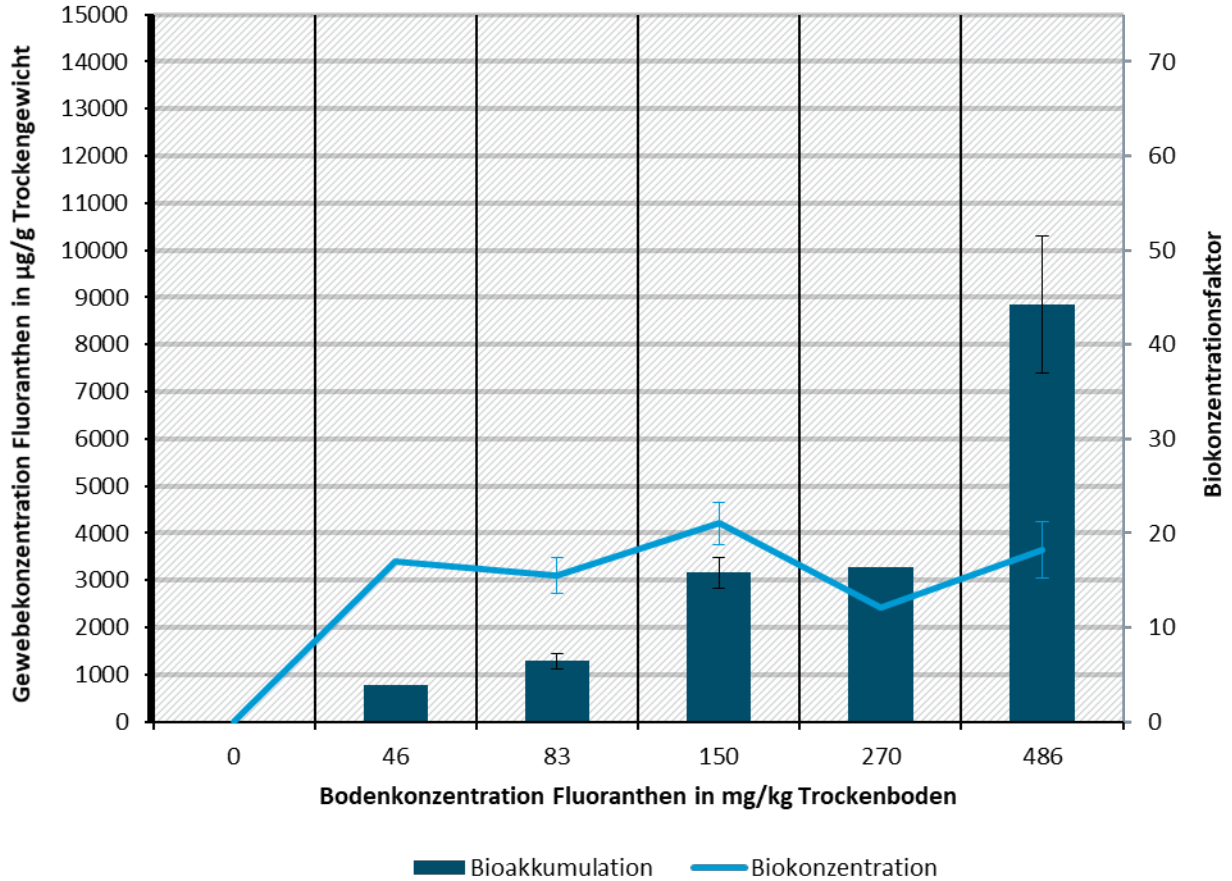
Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Endpunkte Gewebekonzentration und Biokonzentrationsfaktor (BCF) der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg) – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust $n<3$.



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 14 Gewebekonzentration von Fluoranthren in Enchyträen in sandig-organischem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte (n=3) ± Standardfehler der Endpunkte Gewebekonzentration und Biokonzentrationsfaktor (BCF) der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg) – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust n<3.

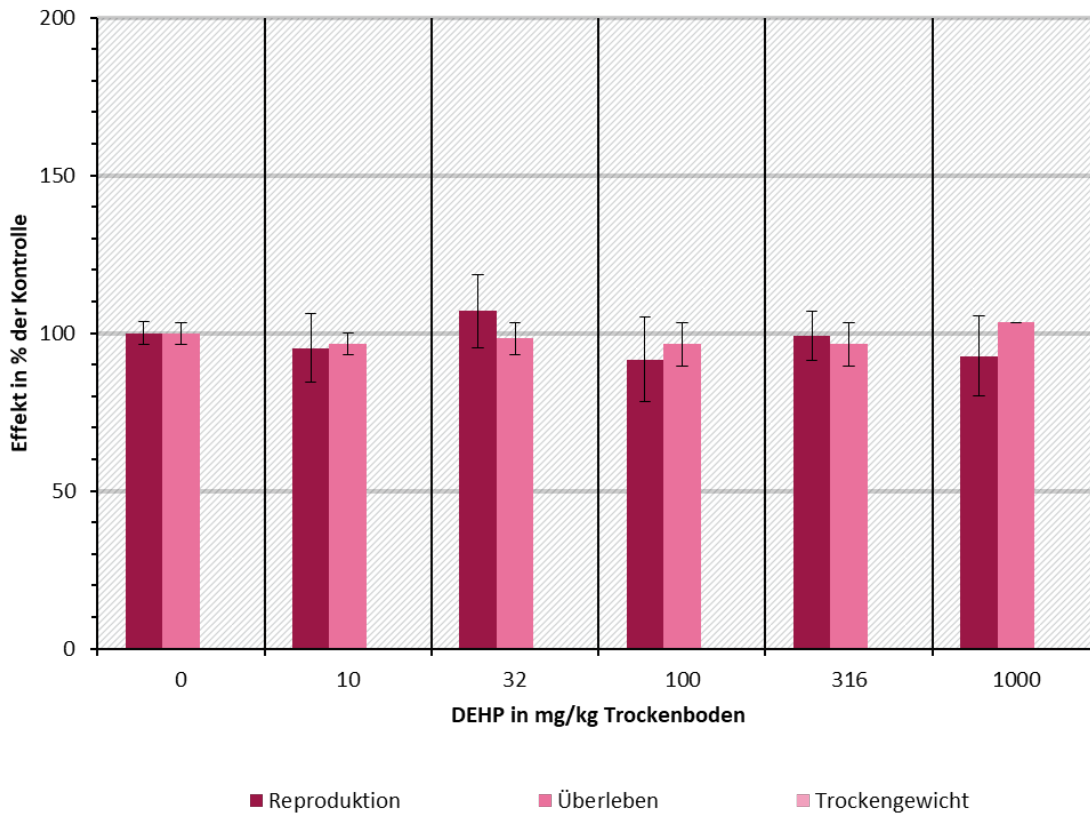


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

B.2.2 DEHP

Abbildung A 15 Toxizität von DEHP ggü. *E. crypticus* in sandigem Boden

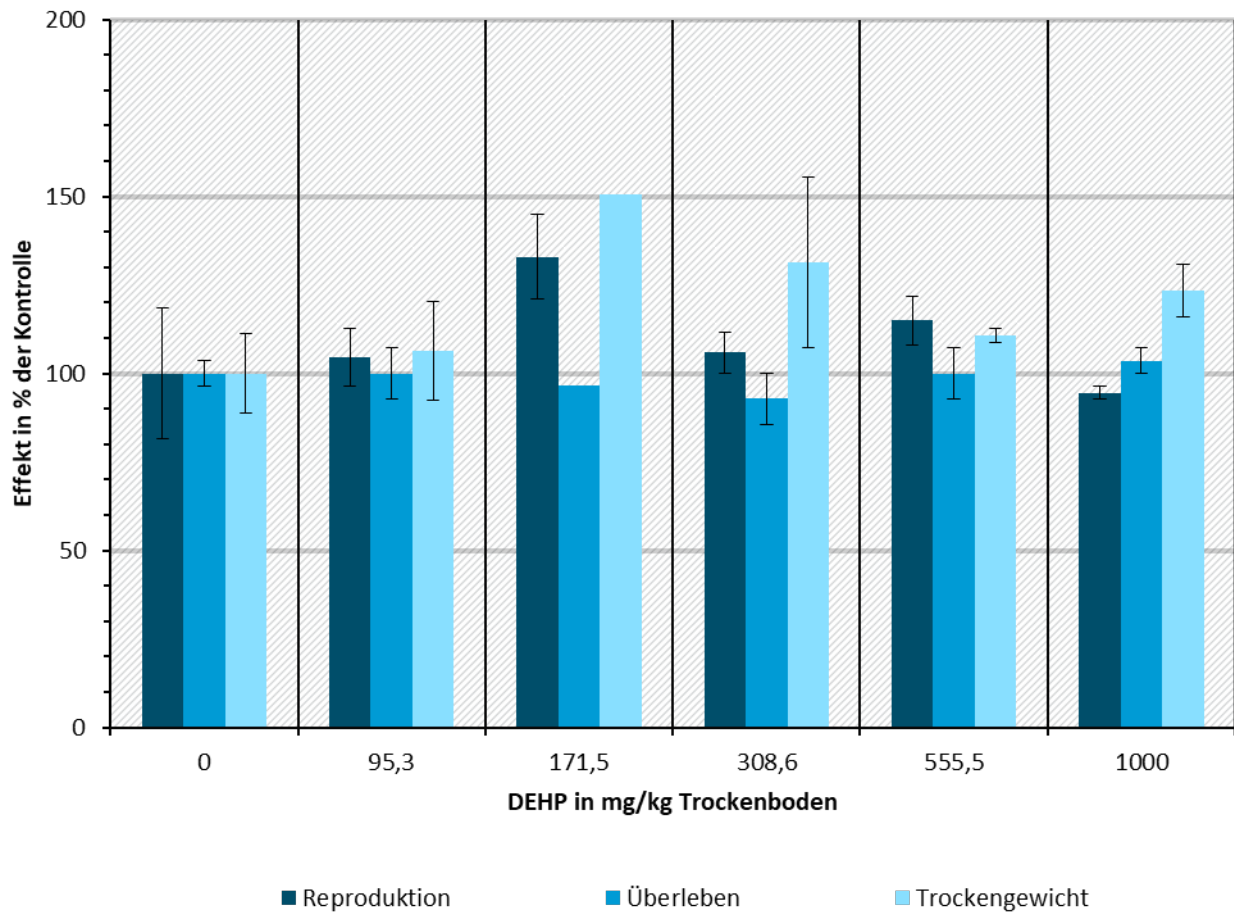
Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Endpunkte Reproduktion und Überleben der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden nicht festgestellt.



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 16 Toxizität von DEHP ggü. *E. crypticus* in sandig-organischem Boden

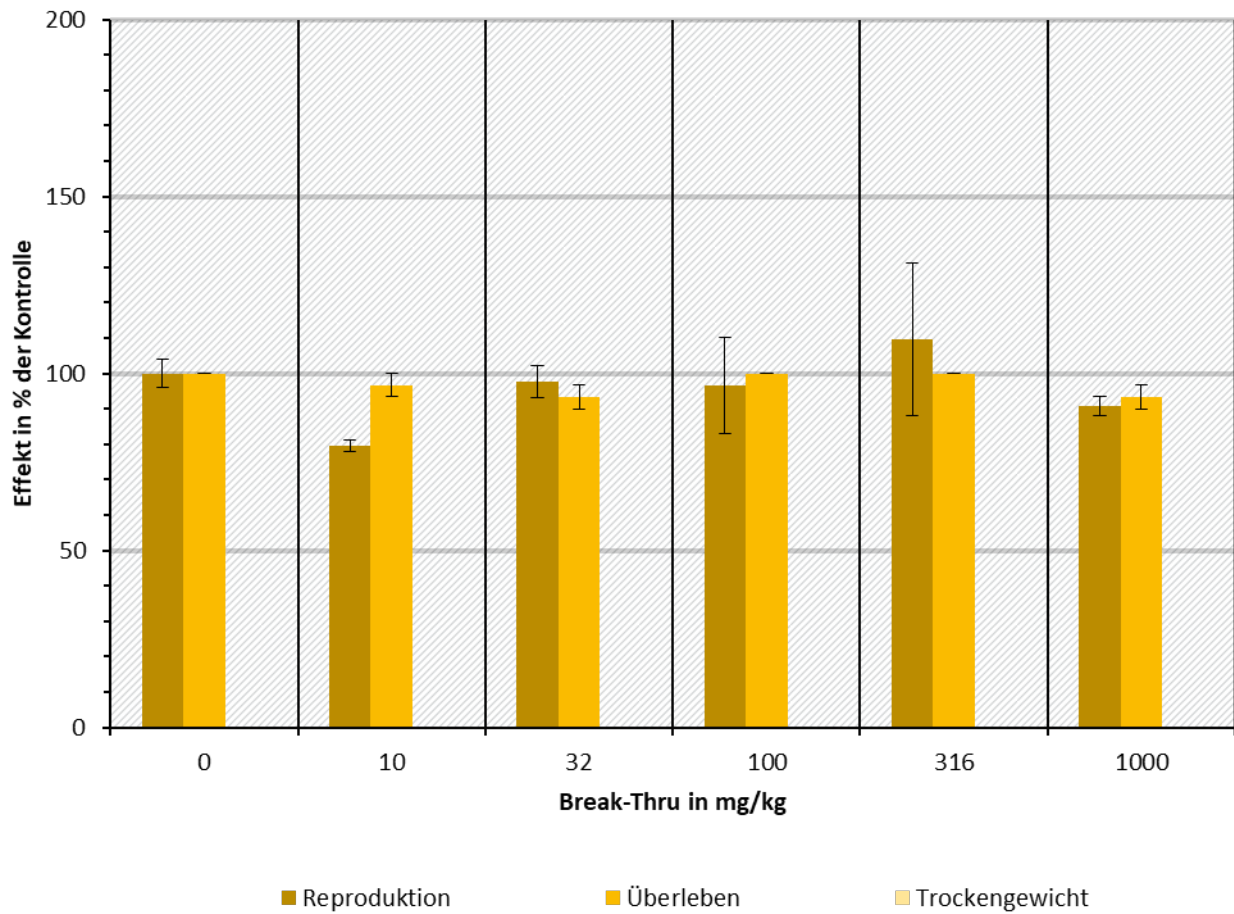
Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg) – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust $n<3$. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden nicht festgestellt.



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 17 Toxizität von DEHP ggü. *E. crypticus* in lehmigem Boden

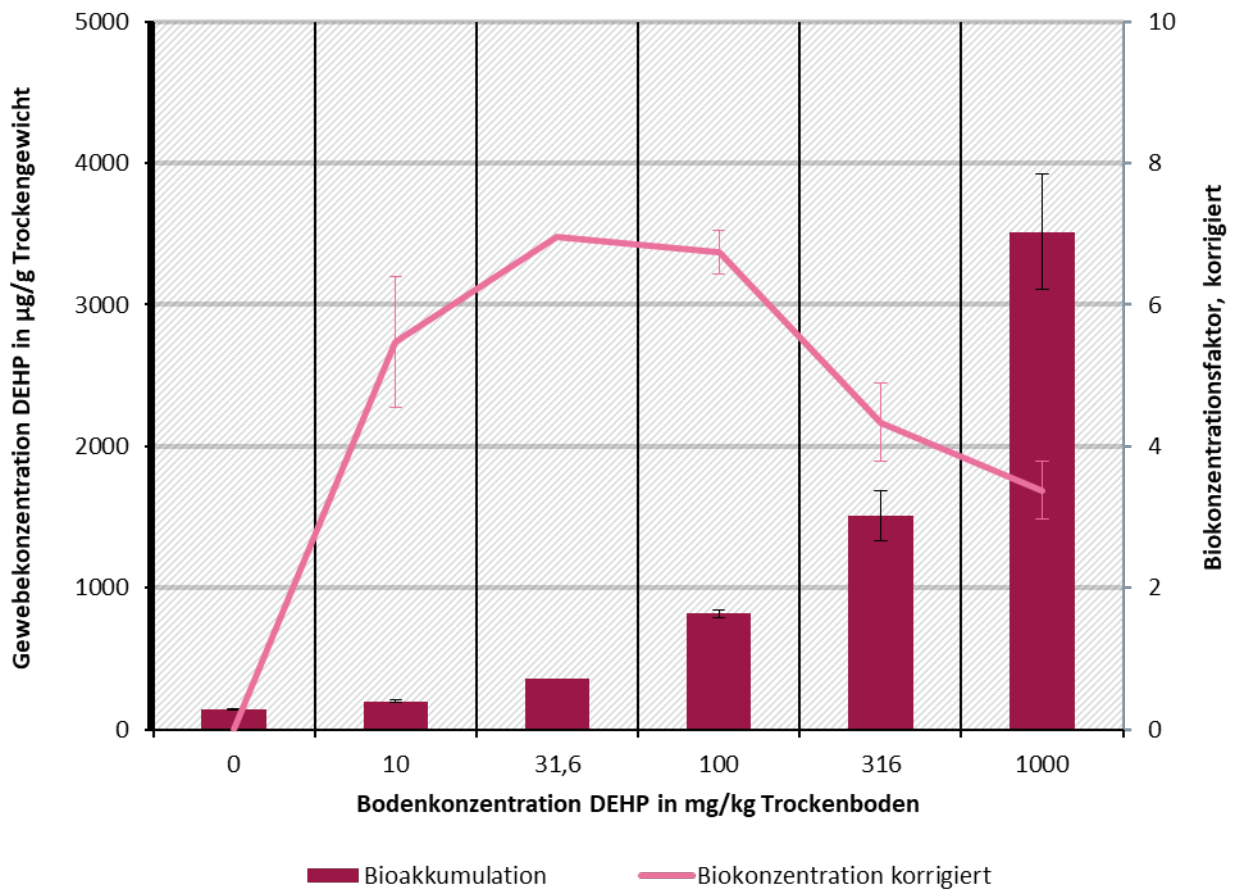
Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Endpunkte Reproduktion und Überleben der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden nicht festgestellt.



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 18 Gewebekonzentration von DEHP in *E. crypticus* in sandigem Boden

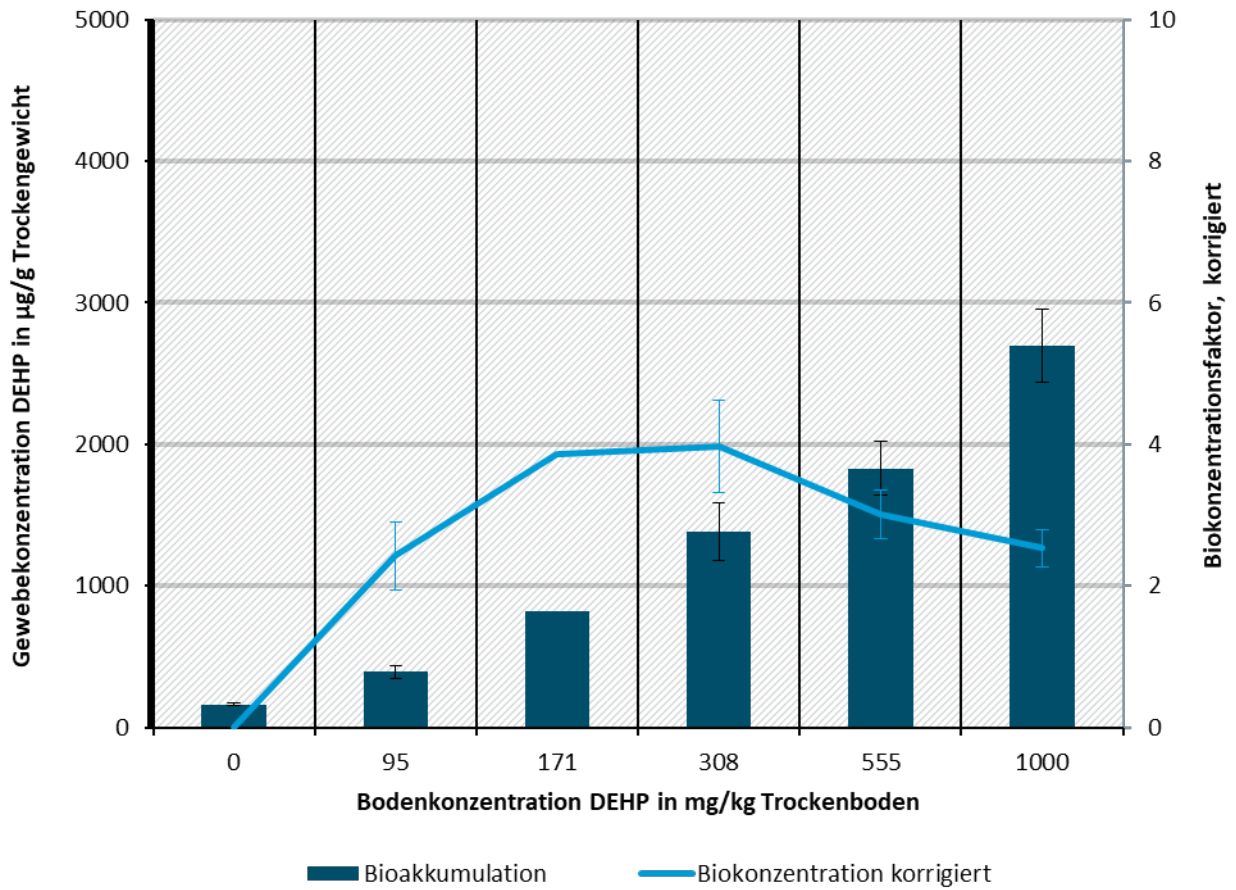
Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Endpunkte Gewebekonzentration und Biokonzentrationsfaktor (BCF) der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg) – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust $n<3$.



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 19 Gewebekonzentration von DEHP in *E. crypticus* in sandig-organischem Boden

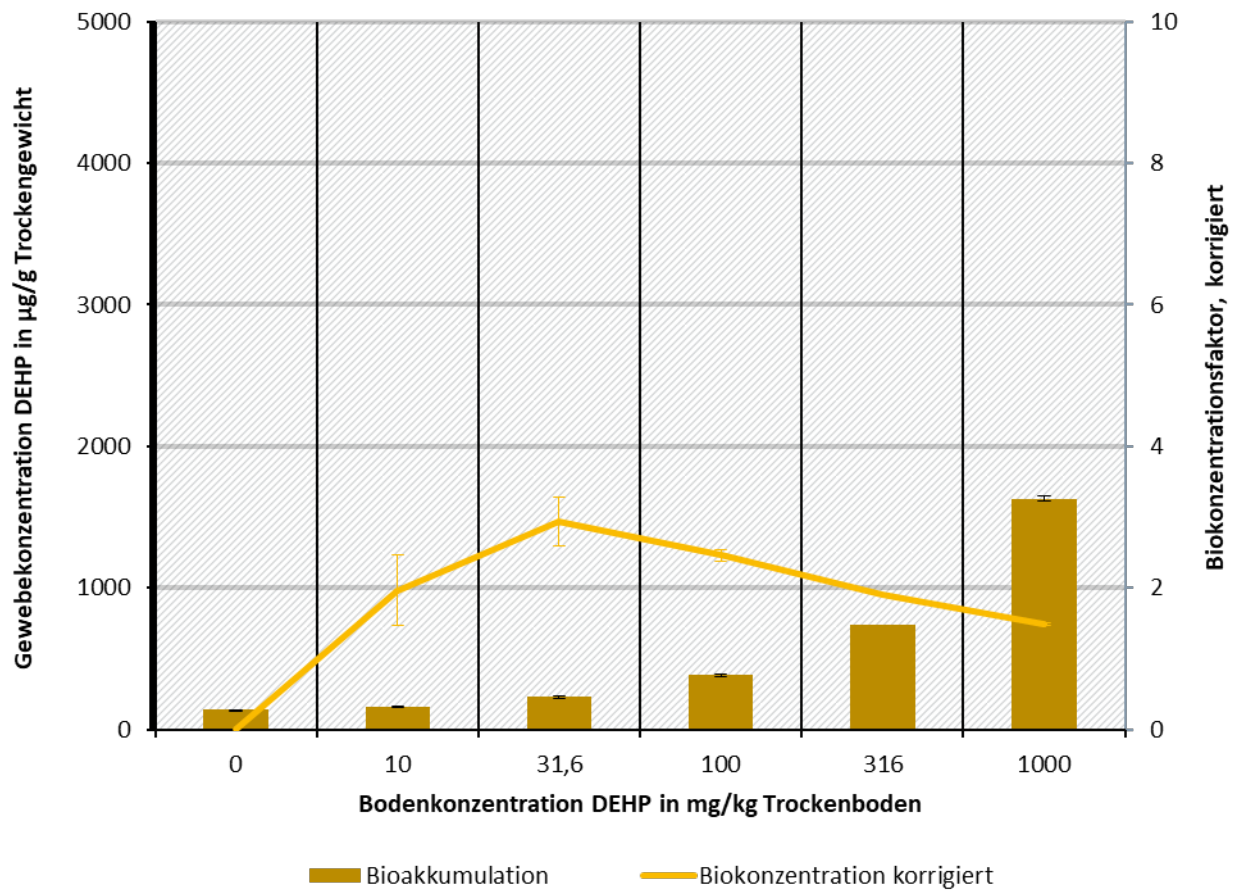
Dargestellt werden die Mittelwerte (n=3) ± Standardfehler der Endpunkte Gewebekonzentration und Biokonzentrationsfaktor (BCF) der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg) – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust n<3.



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 20 Gewebekonzentration von DEHP in *E. crypticus* in lehmigem Boden

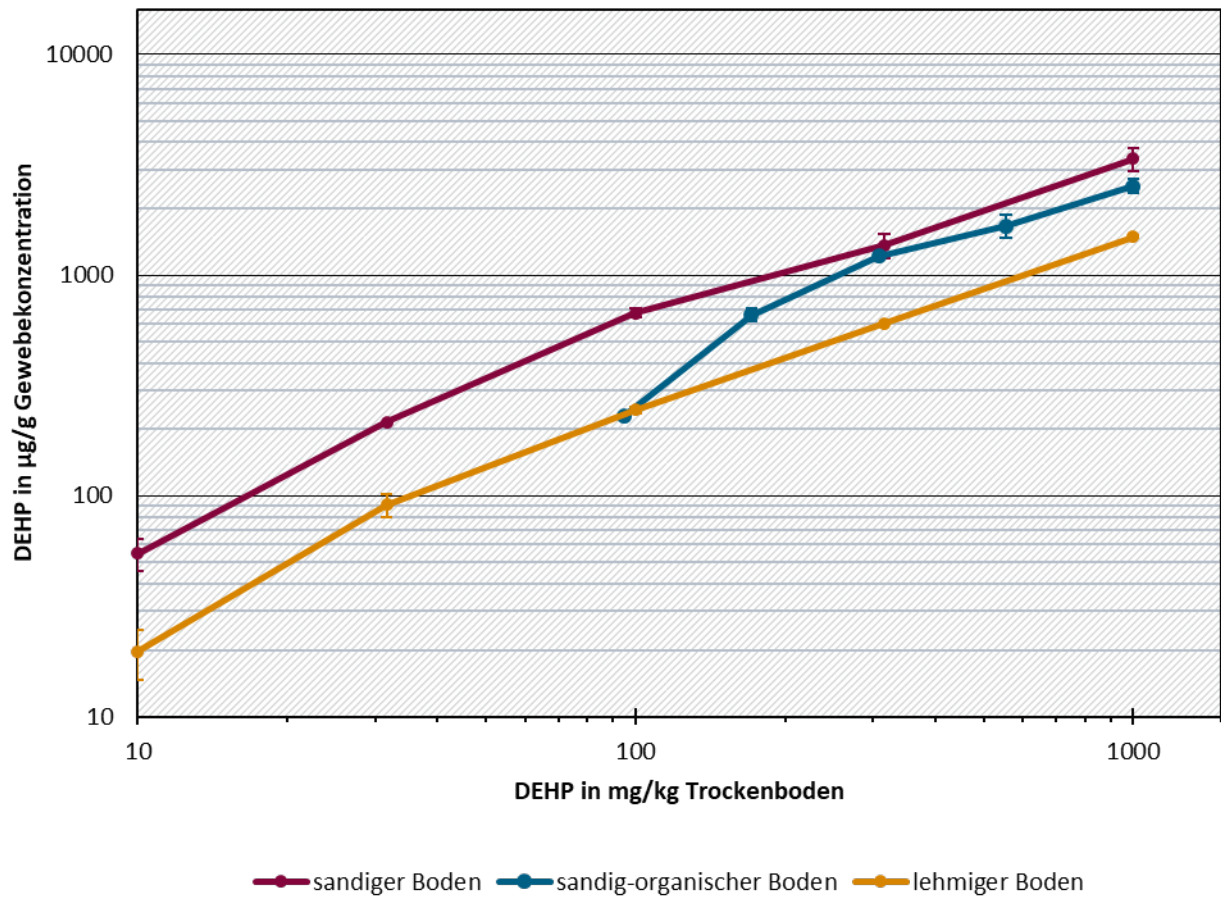
Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Endpunkte Gewebekonzentration und Biokonzentrationsfaktor (BCF) der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg) – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust $n < 3$.



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 21 Gewebekonzentration von DEHP in *E. crypticus* in allen Böden

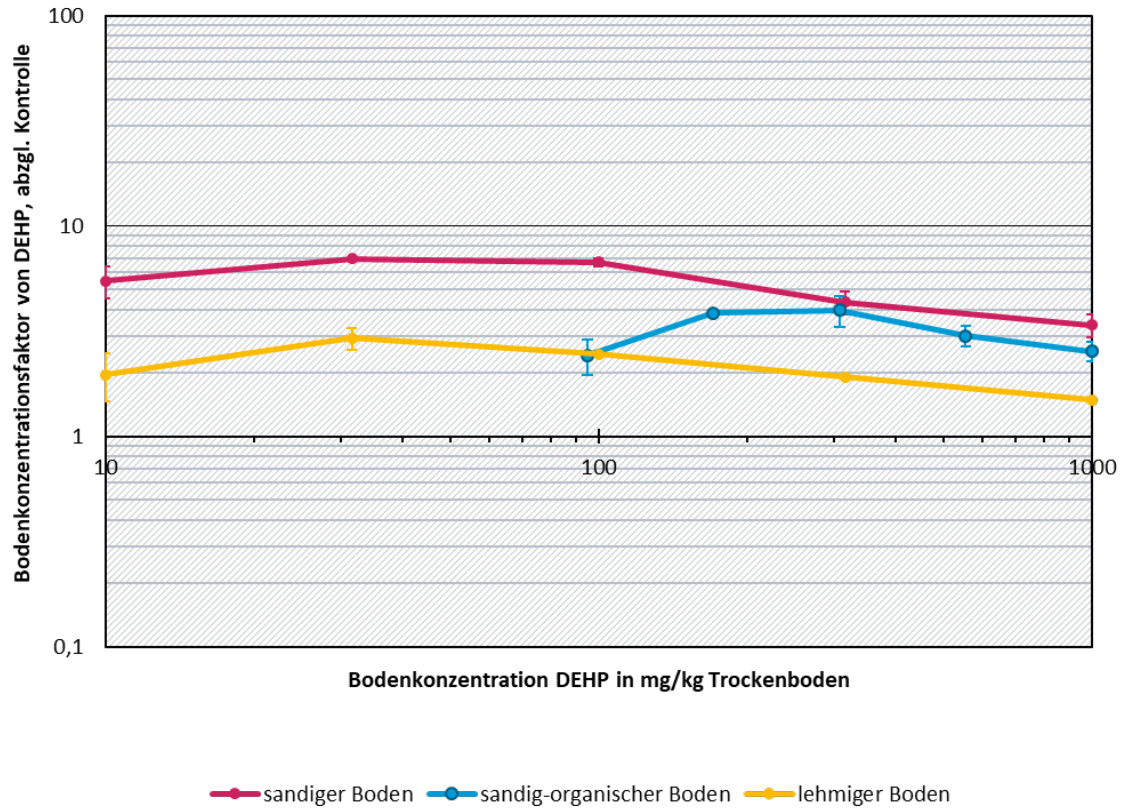
Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Gewebekonzentration von DEHP in adulten *E. crypticus* in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust $n>3$.



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 22 Biokonzentration von DEHP in *E. crypticus* in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Biokonzentration von DEHP in *adulten E. crypticus* – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust $n < 3$.

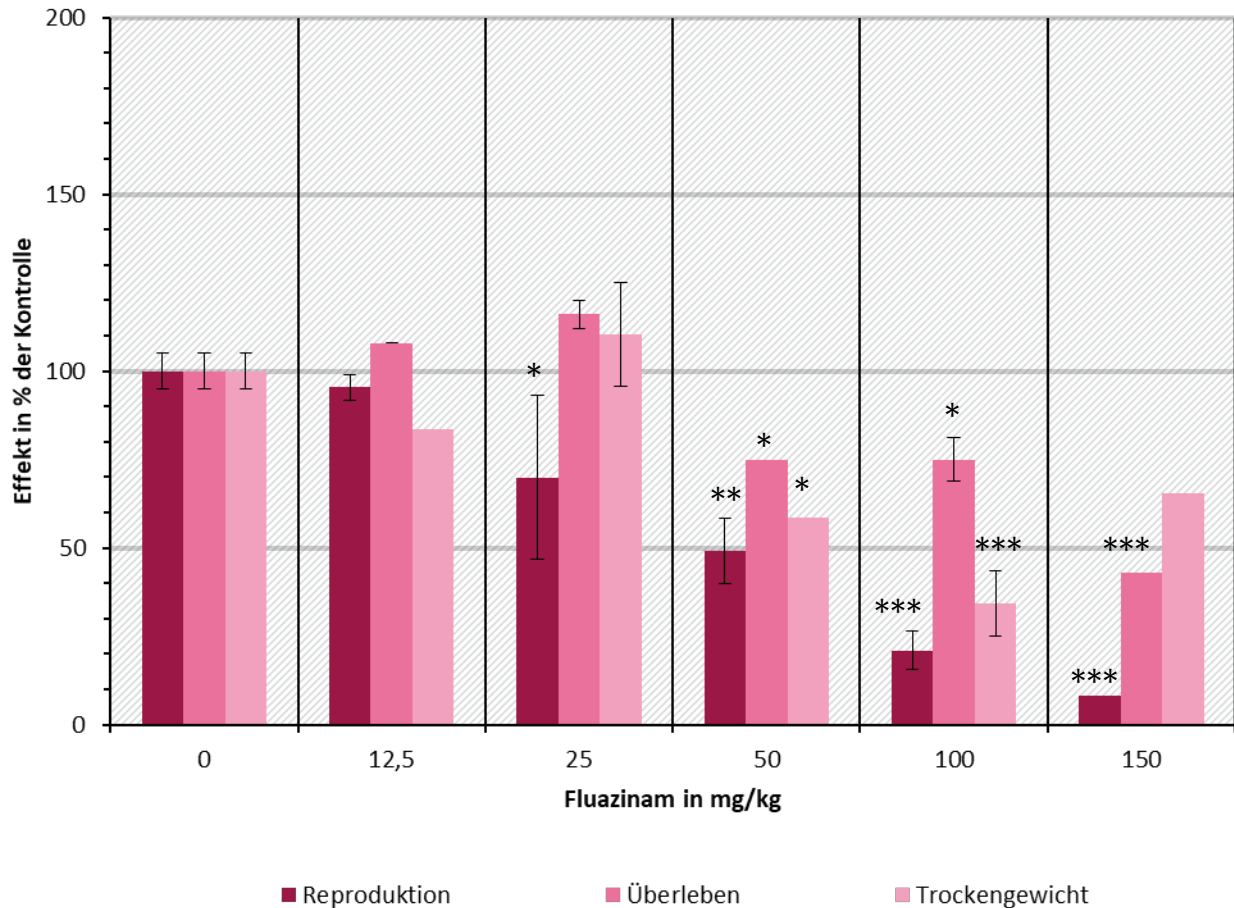


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

B.2.3 Fluazinam

Abbildung A 23 Toxizität von Fluazinam ggü. *E. crypticus* in sandigem Boden

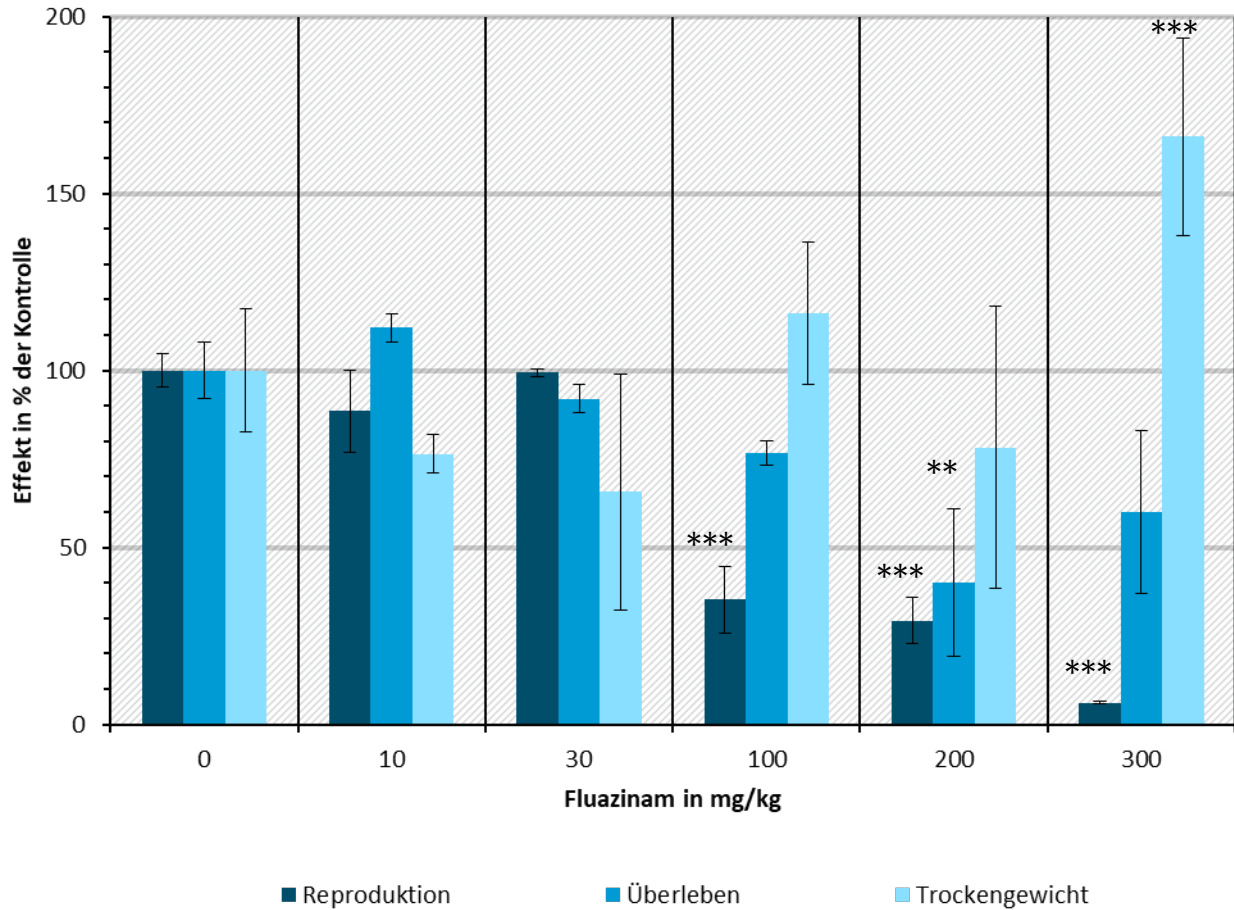
Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg) – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust $n < 3$. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: $0,05 > p \geq 0,01$; **: $0,01 > p \geq 0,001$; ***: $p > 0,001$



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 24 Toxizität von Fluazinam ggü. *E. crypticus* in sandig-organischem Boden

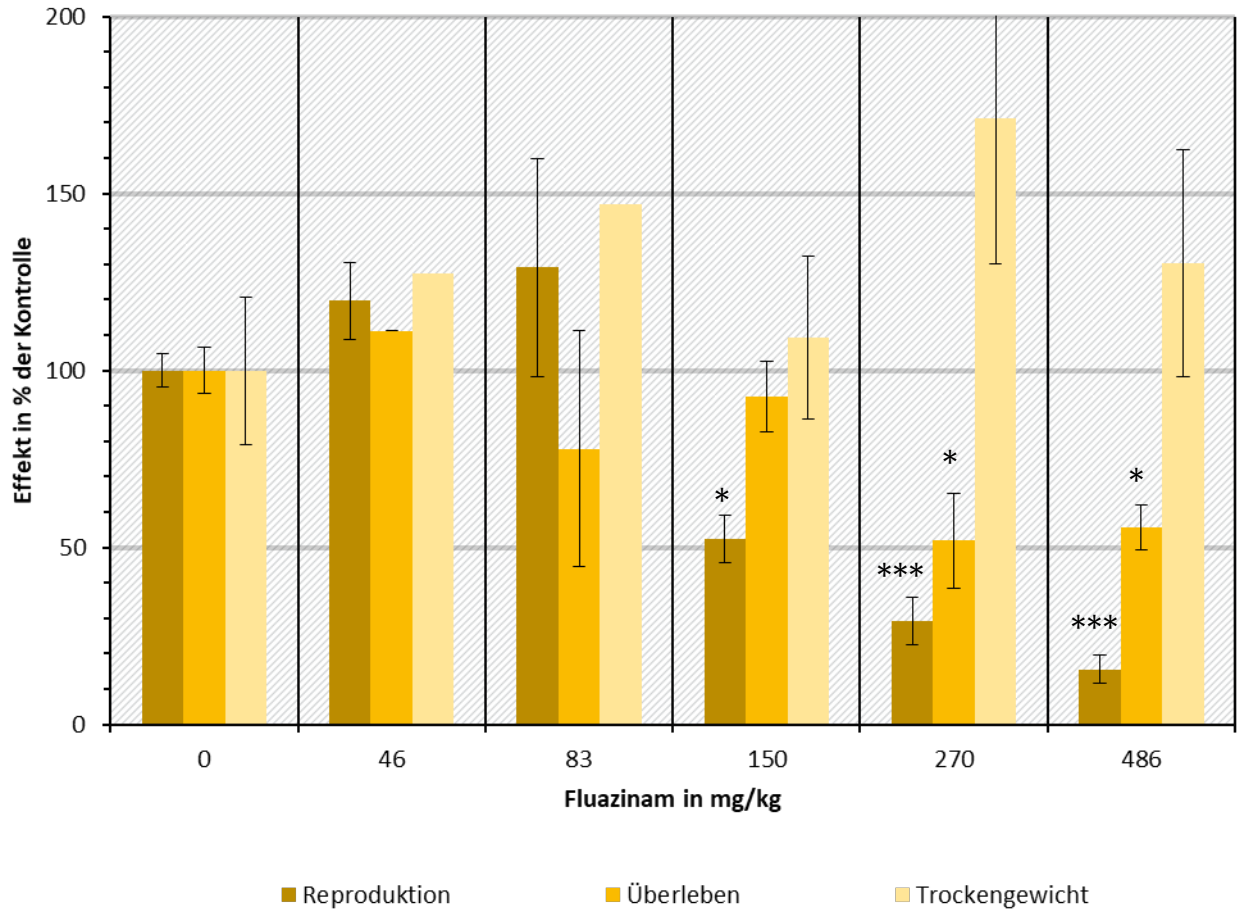
Dargestellt werden die Mittelwerte (n=3) ± Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: 0,05 > p ≥ 0,01; **: 0,01 > p ≥ 0,001; ***: p > 0,001



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 25 Toxizität von Fluazinam ggü. *E. crypticus* in lehmigem Boden

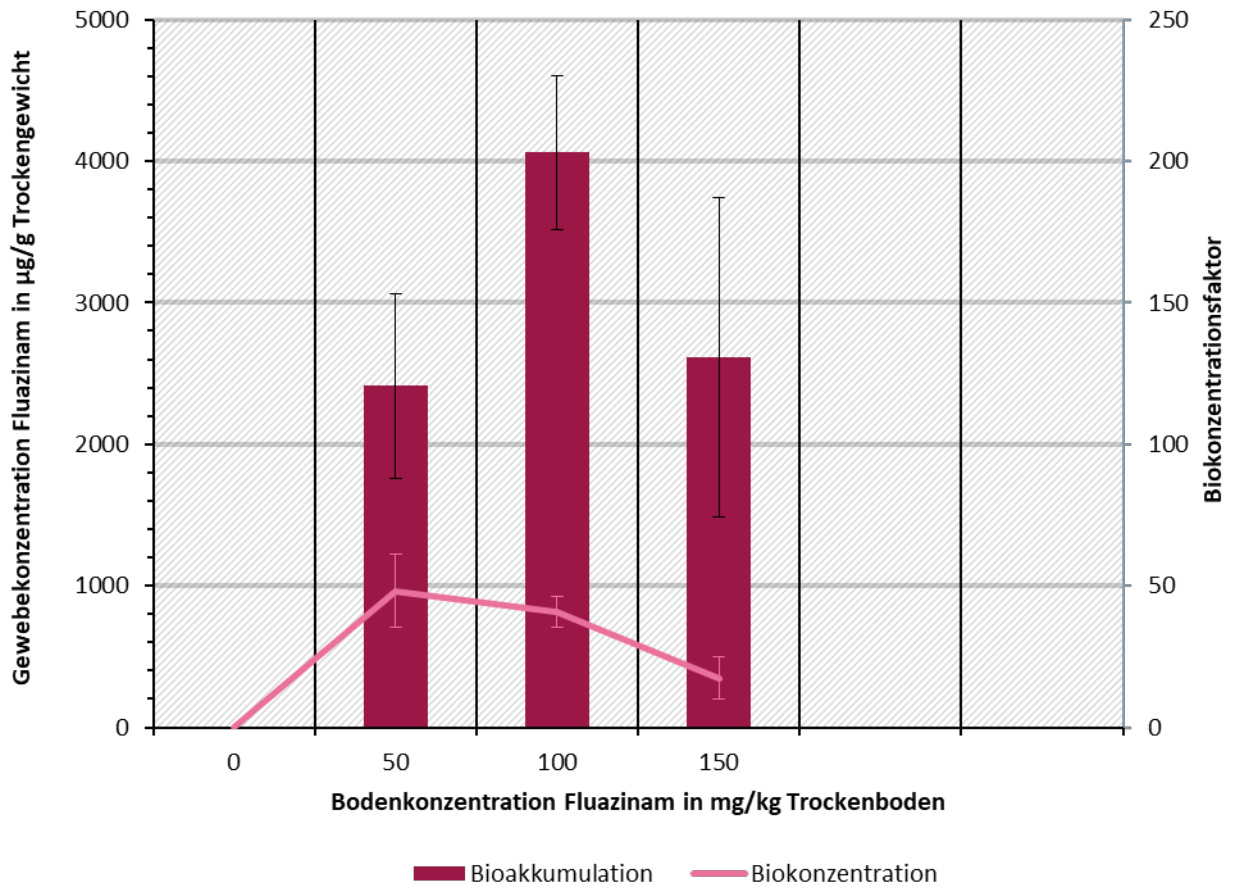
Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg) – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust $n<3$. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: $0,05 > p \geq 0,01$; **: $0,01 > p \geq 0,001$; ***: $p > 0,001$



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 26 Gewebekonzentration von Fluazinam in *E. crypticus* in sandigem Boden

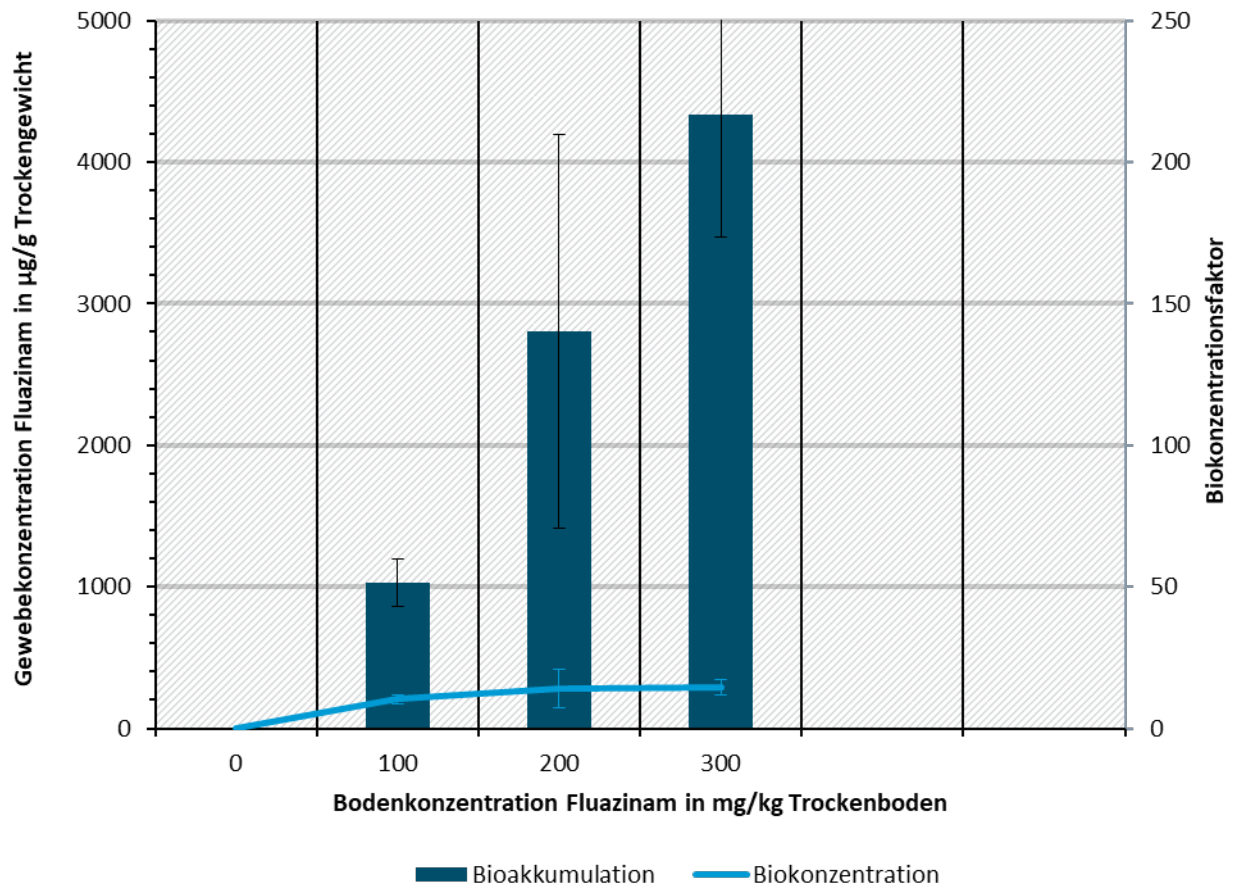
Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Endpunkte Gewebekonzentration und Biokonzentrationsfaktor (BCF) der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 27 Gewebekonzentration von Fluazinam in *E. crypticus* in sandig-organischem Boden

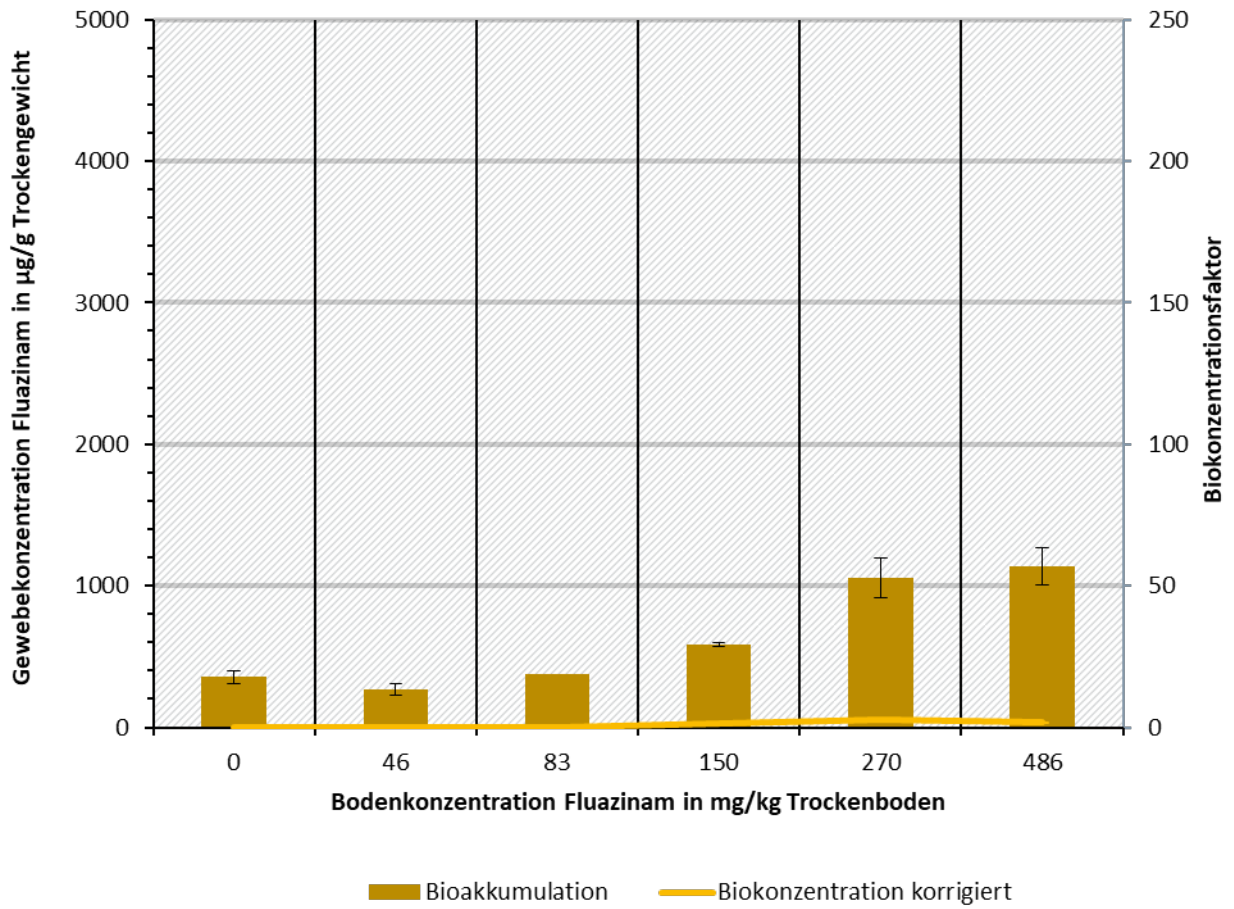
Dargestellt werden die Mittelwerte (n=3) ± Standardfehler der Endpunkte Gewebekonzentration und Biokonzentrationsfaktor (BCF) der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 28 Gewebekonzentration von Fluazinam in *E. crypticus* in lehmigem Boden

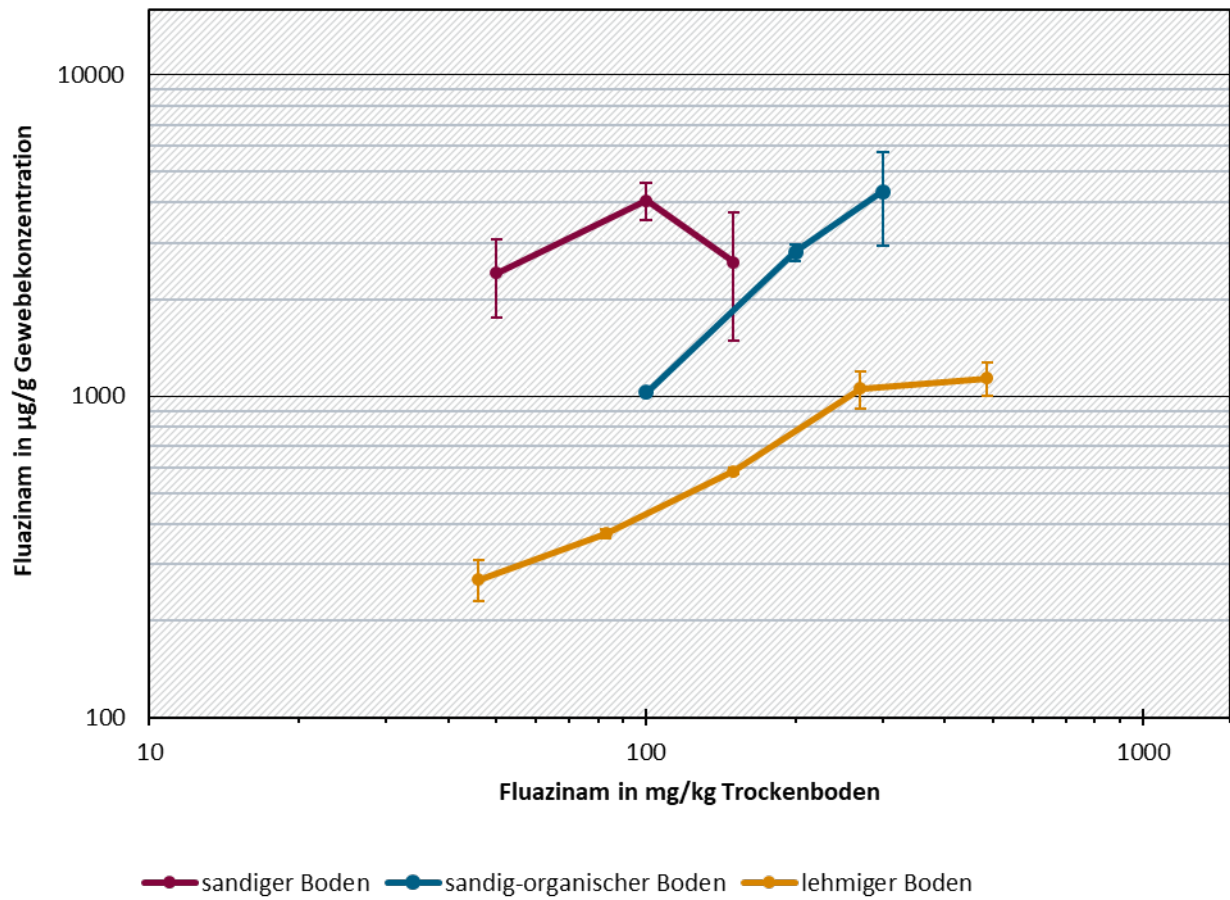
Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler der Endpunkte Gewebekonzentration und Biokonzentrationsfaktor (BCF) der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 29 Gewebekonzentration von Fluazinam in *E. crypticus* in allen Böden

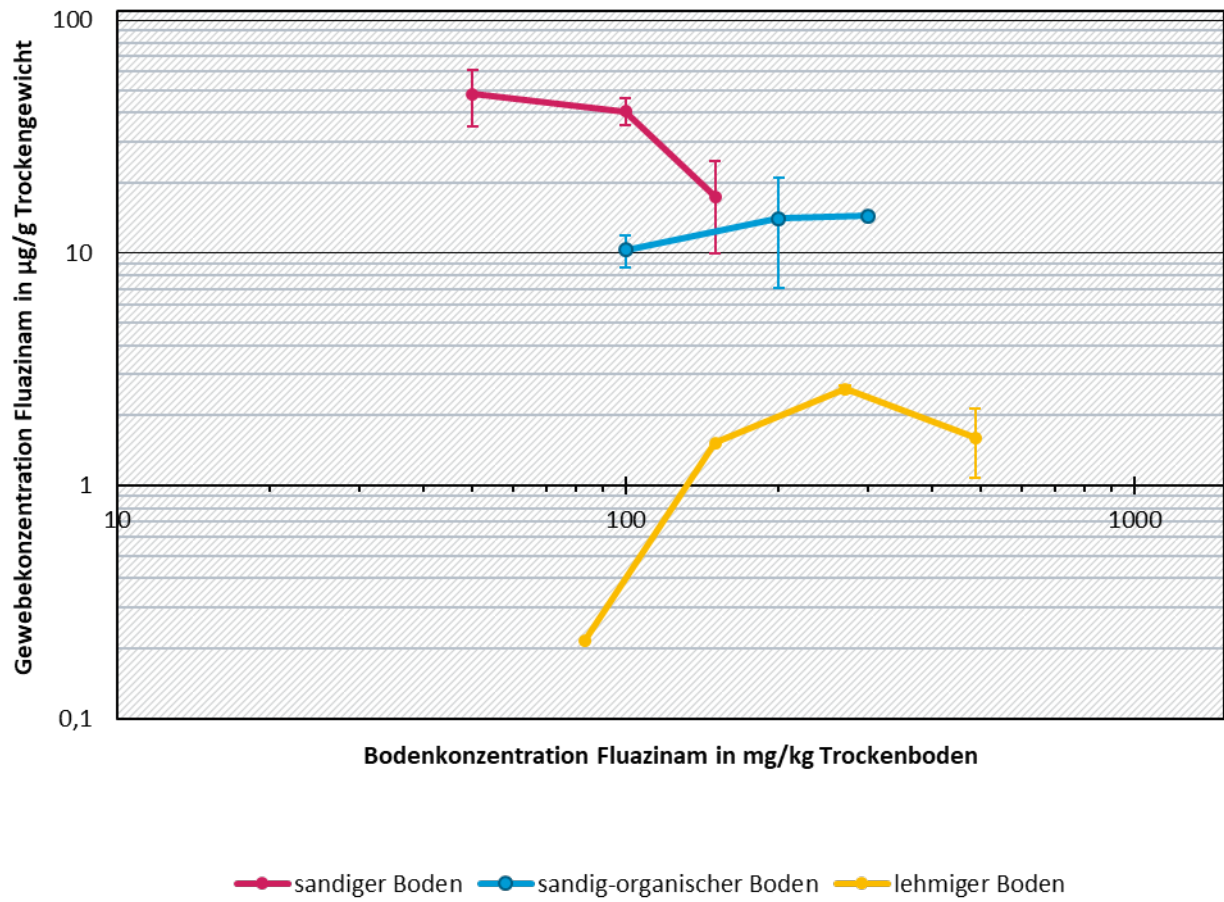
Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler des Endpunktes Gewebekonzentration in $\mu\text{g/g}$ Gewebekonzentration in Abhängigkeit von der Bodenkonzentration von Fluazinam in mg/kg Trockenboden.



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 30 Biokonzentration von Fluazinam in *E. crypticus* in allen Böden

Dargestellt werden die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler des Endpunktes Gewebekonzentration in $\mu\text{g/g}$ Gewebekonzentration in Abhängigkeit von der Bodenkonzentration von Fluazinam in mg/kg Trockenboden.



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

B.2.4 Break-Thru

Abbildung A 31 Toxizität von Break-Thru ggü. *E. crypticus* in sandigem Boden

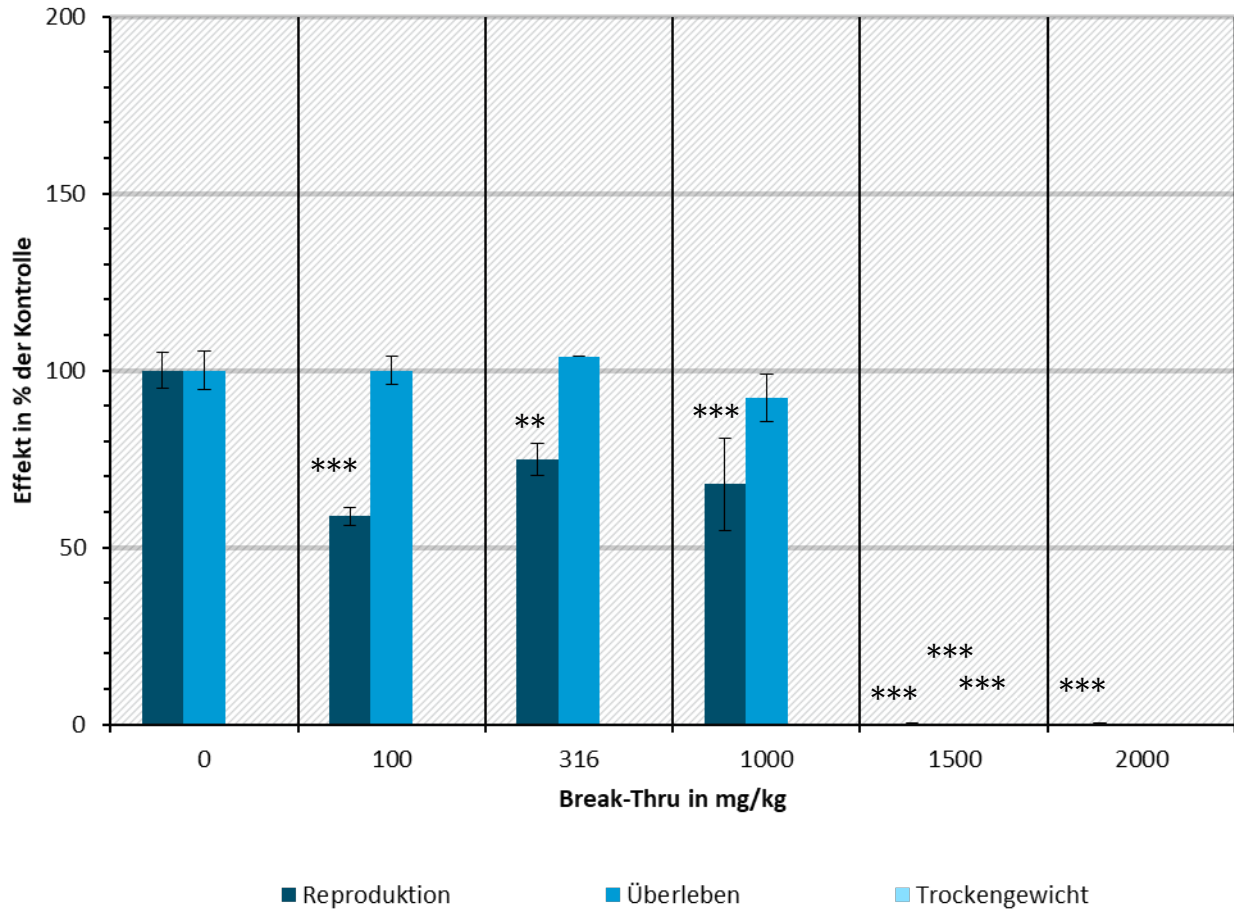
Dargestellt werden die Mittelwerte (n=3) ± Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg) – keine Fehlerindikatoren werden angezeigt, wenn durch Probenverlust n<3. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: 0,05 > p ≥ 0,01; **: 0,01 > p ≥ 0,001; ***: p > 0,001



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 32 Toxizität von Break-Thru ggü. *E. crypticus* in sandig-organischem Boden

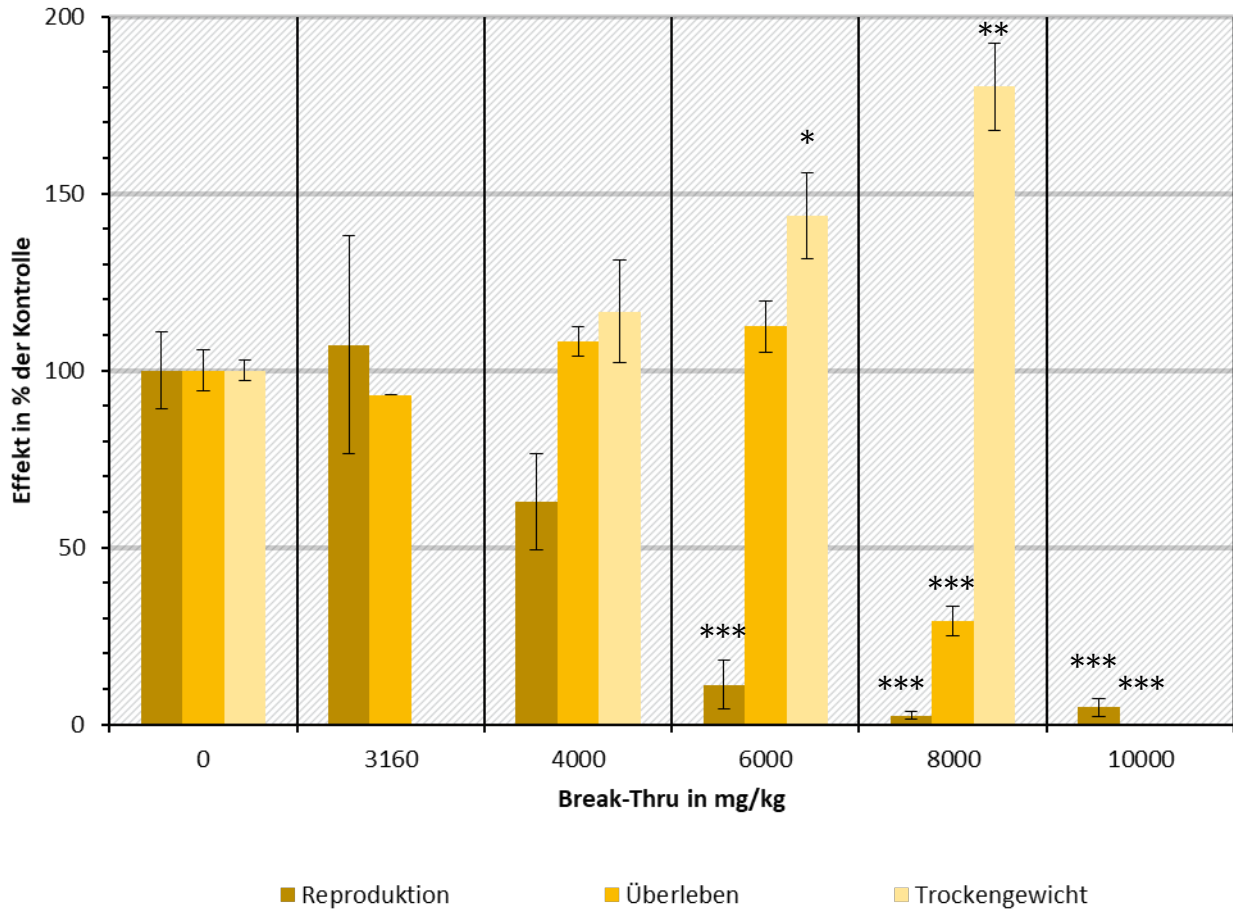
Dargestellt werden die Mittelwerte (n=3) ± Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: 0,05 > p ≥ 0,01; **: 0,01 > p ≥ 0,001; ***: p > 0,001



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 33 Toxizität von Break-Thru ggü. *E. crypticus* in lehmigem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte (n=3) ± Standardfehler der Endpunkte Reproduktion, Überleben und Trockengewicht der Adulten in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: 0,05 > p ≥ 0,01; **: 0,01 > p ≥ 0,001; ***: p > 0,001



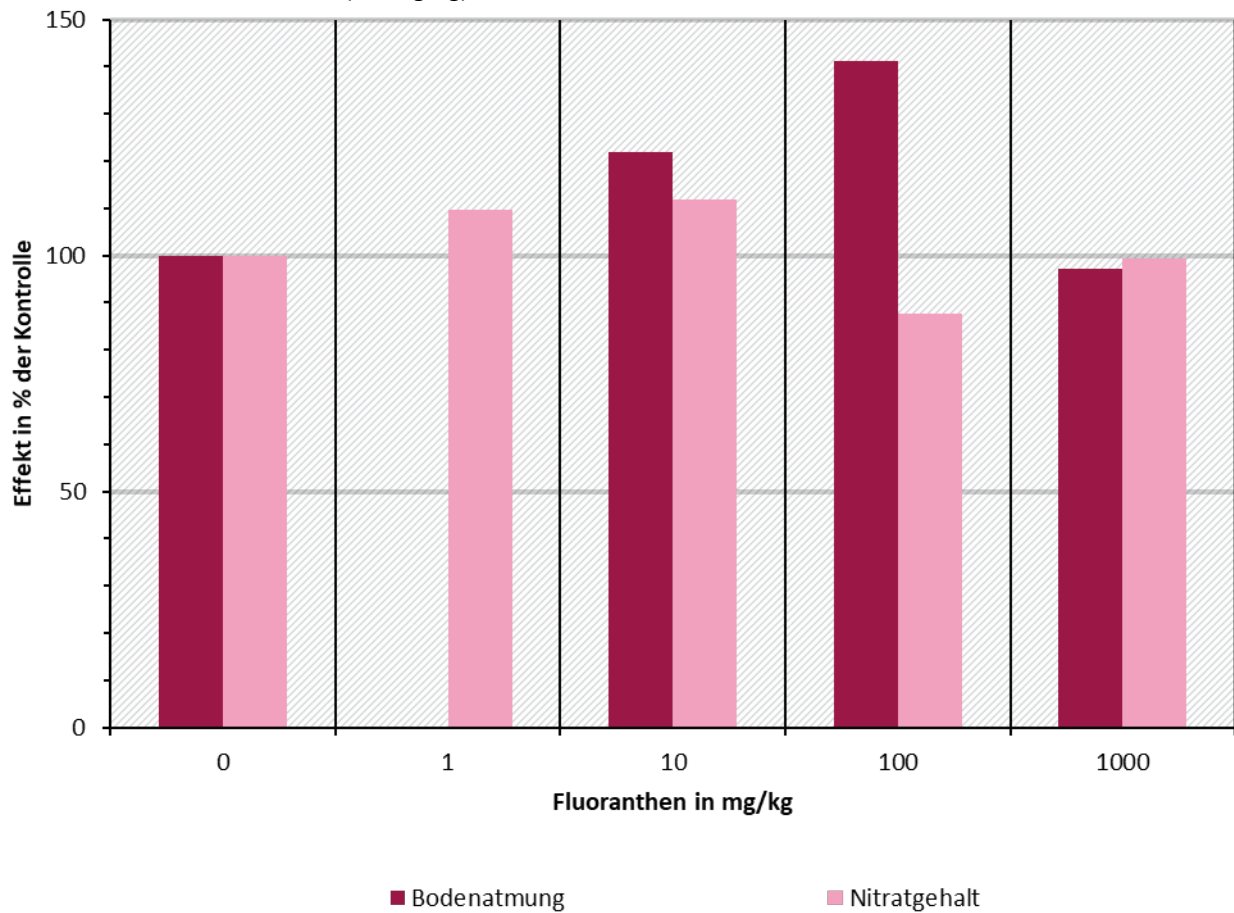
Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

B.3 Mikrobielle Bodengemeinschaft

B.3.1 Fluoranthen

Abbildung A 34 Toxizität von Fluoranthen ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in sandigem Boden

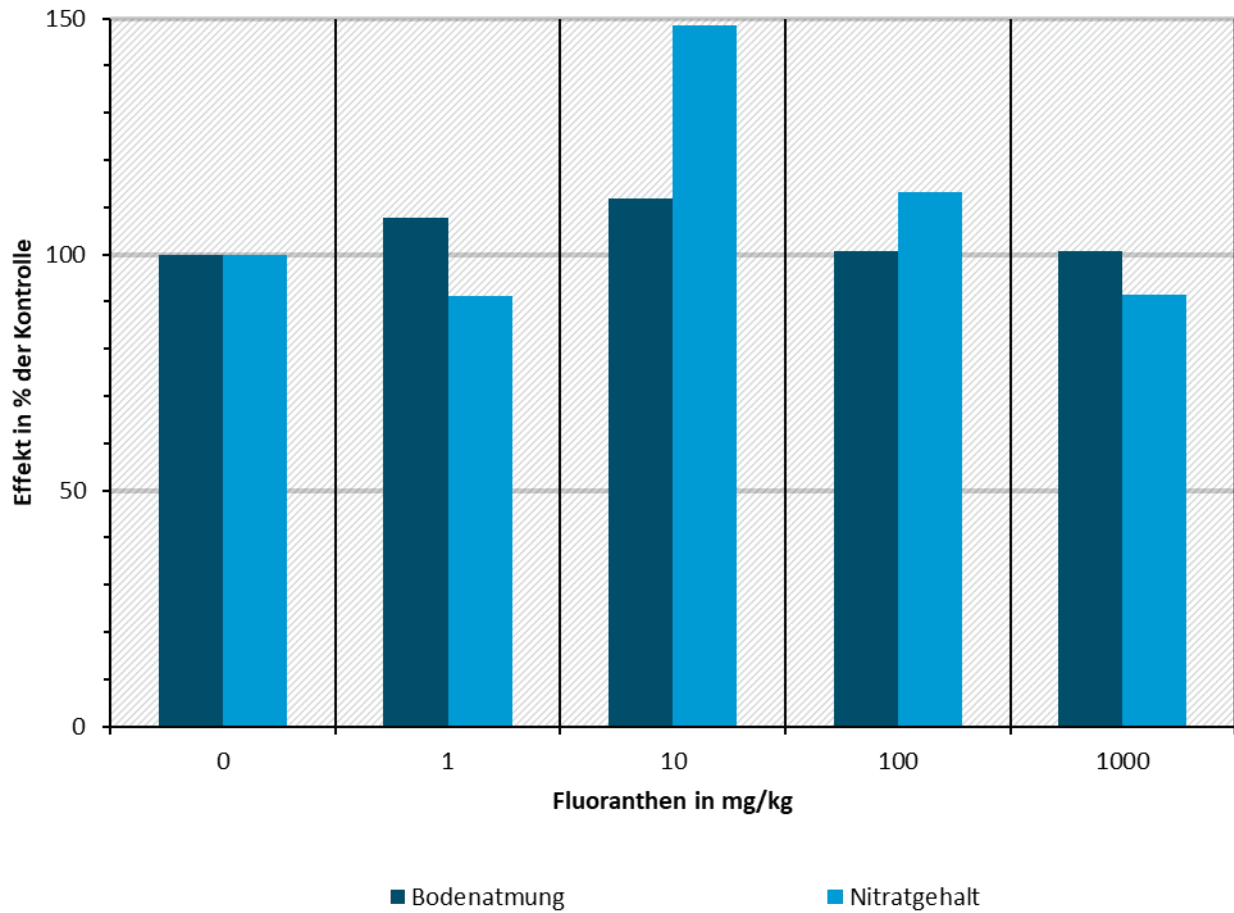
Dargestellt werden die Mittelwerte aus 2 Pseudoreplikaten der Endpunkte Bodenatmung und Nitratgehalt in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 35 Toxizität von Fluoranthen ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in sandig-organischem Boden

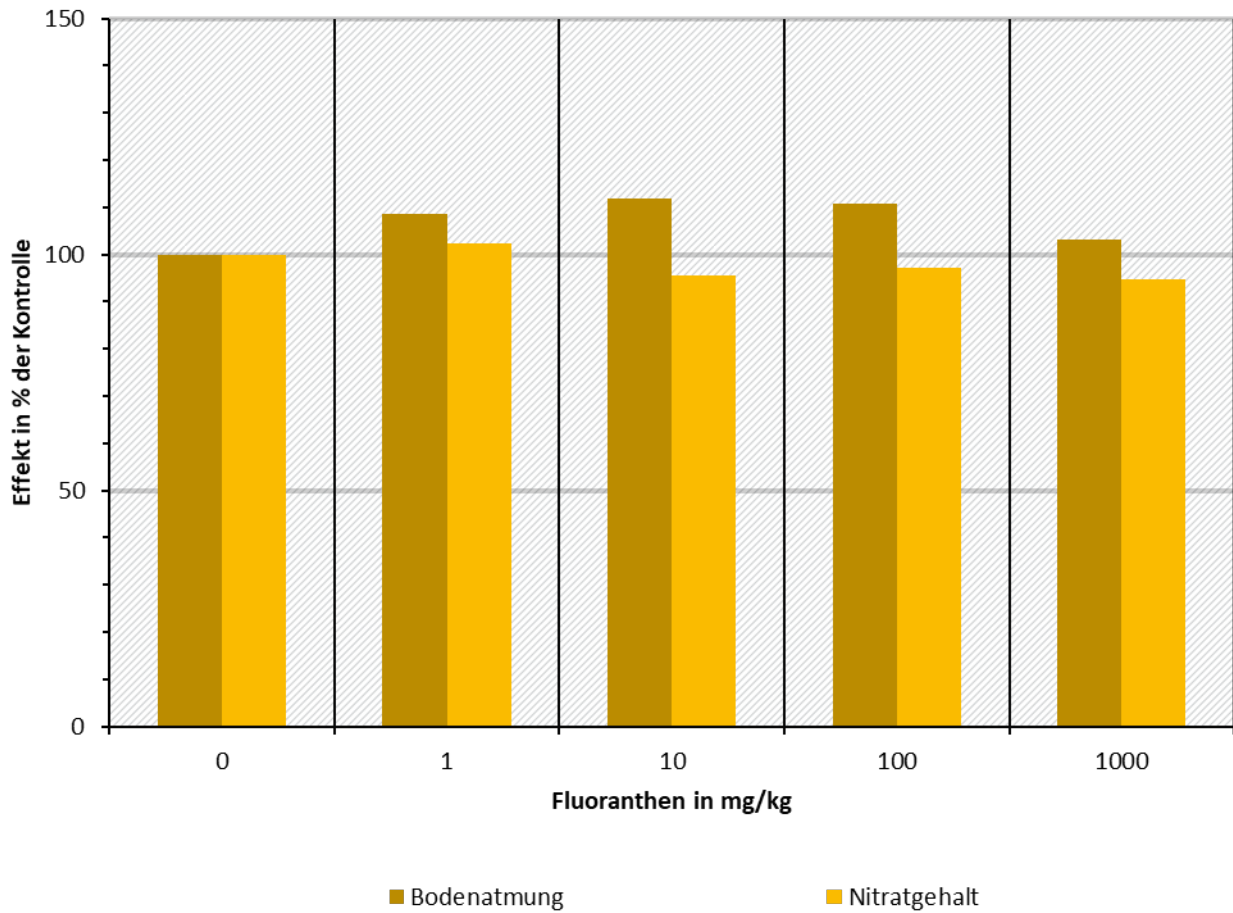
Dargestellt werden die Mittelwerte aus 2 Pseudoreplikaten der Endpunkte Bodenatmung und Nitratgehalt in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 36 Toxizität von Fluoranthen ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in lehmigem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte aus 2 Pseudoreplikaten der Endpunkte Bodenatmung und Nitratgehalt in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).

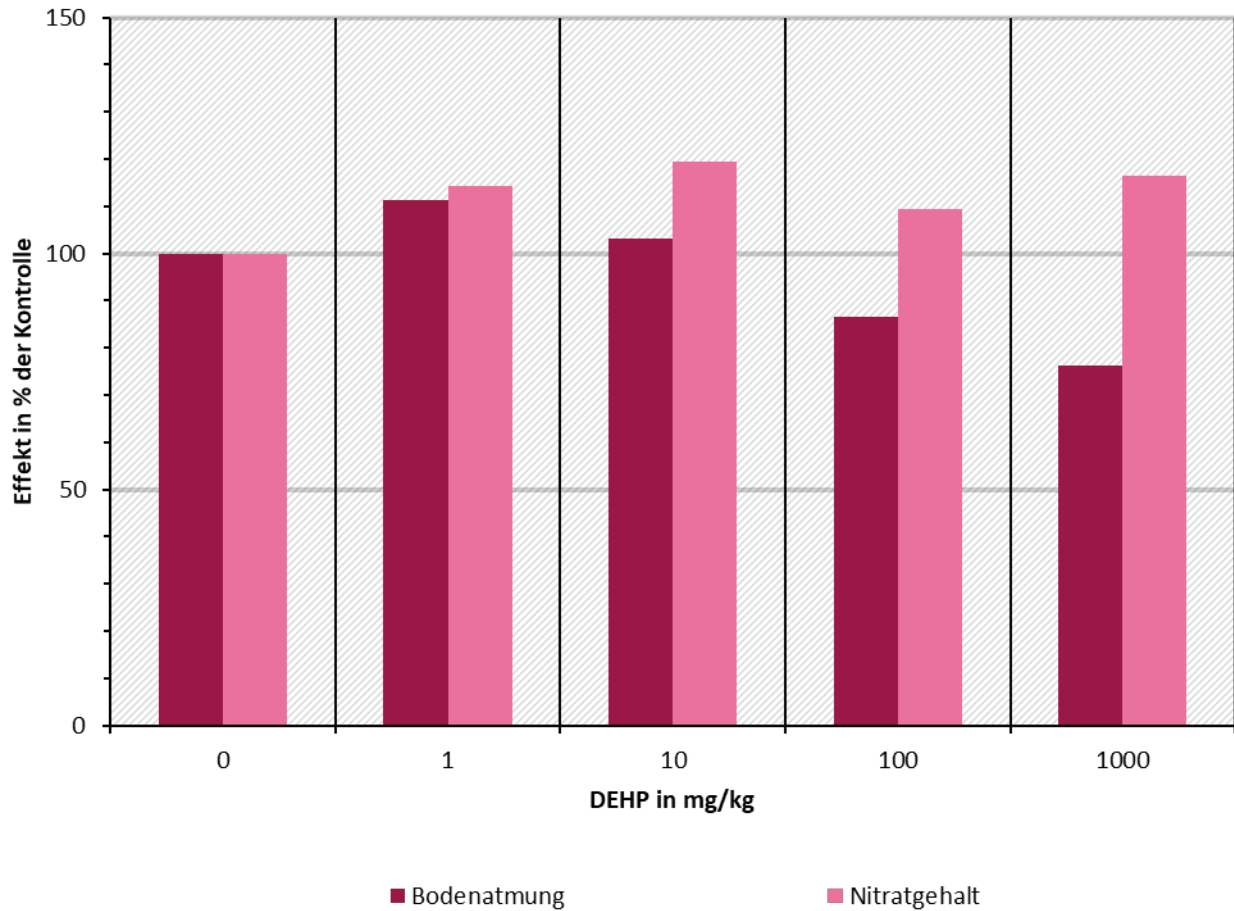


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

B.3.2 DEHP

Abbildung A 37 Toxizität von DEHP ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in sandigem Boden

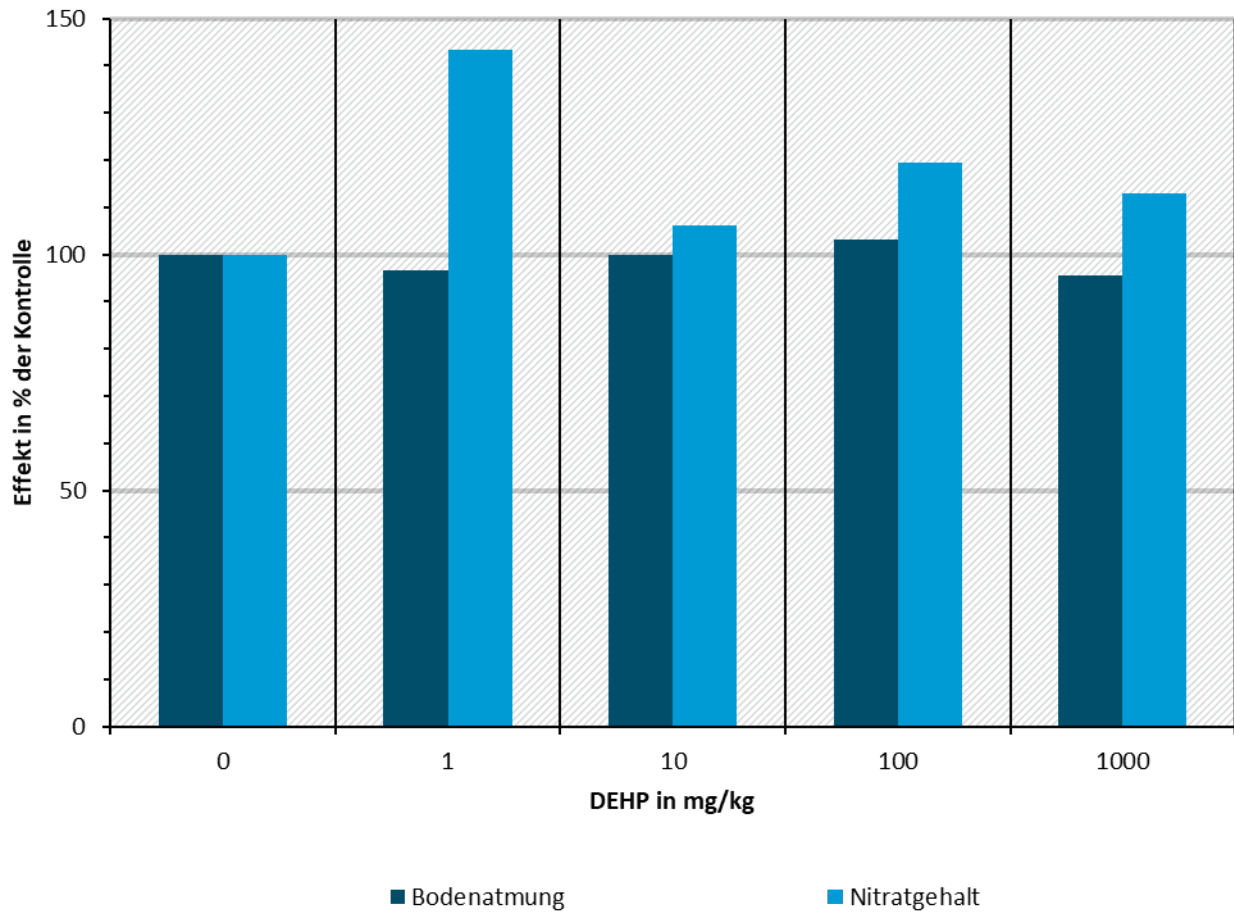
Dargestellt werden die Mittelwerte aus 2 Pseudoreplikaten der Endpunkte Bodenatmung und Nitratgehalt in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 38 Toxizität von DEHP ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in sandig-organischem Boden

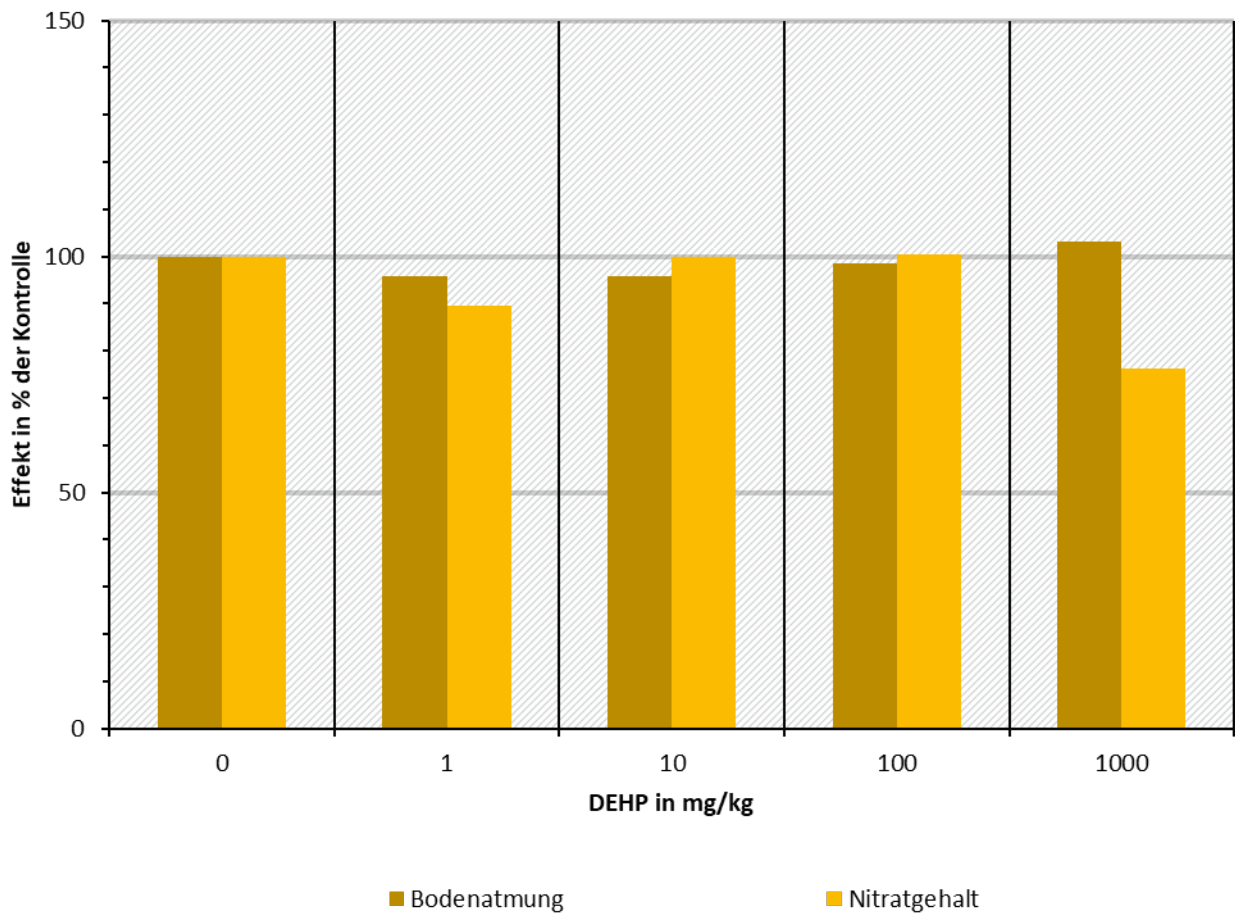
Dargestellt werden die Mittelwerte aus 2 Pseudoreplikaten der Endpunkte Bodenatmung und Nitratgehalt in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 39 Toxizität von DEHP ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in sandigem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte aus 2 Pseudoreplikaten der Endpunkte Bodenatmung und Nitratgehalt in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).

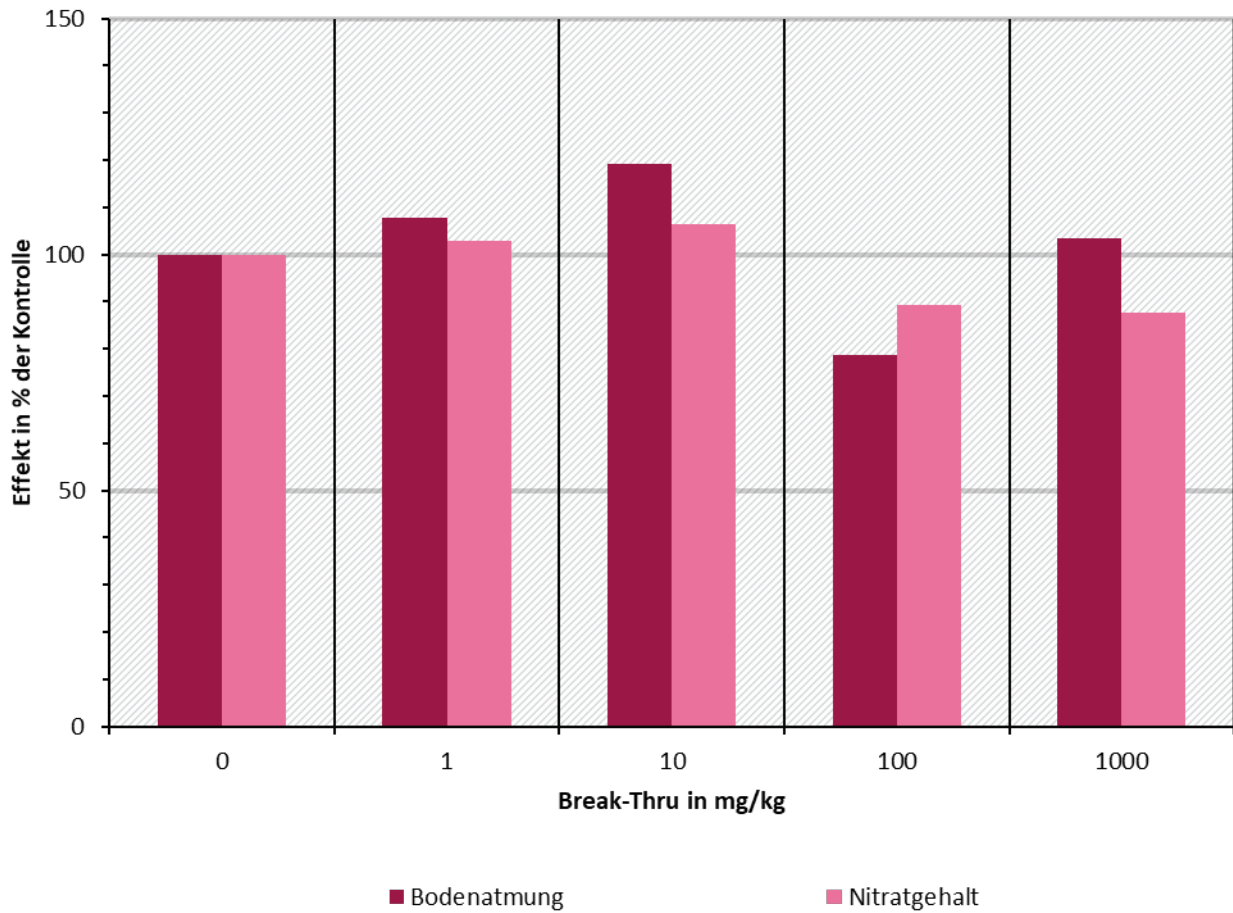


Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

B.3.3 Break-Thru

Abbildung A 40 Toxizität von Break-Thru ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in sandigem Boden

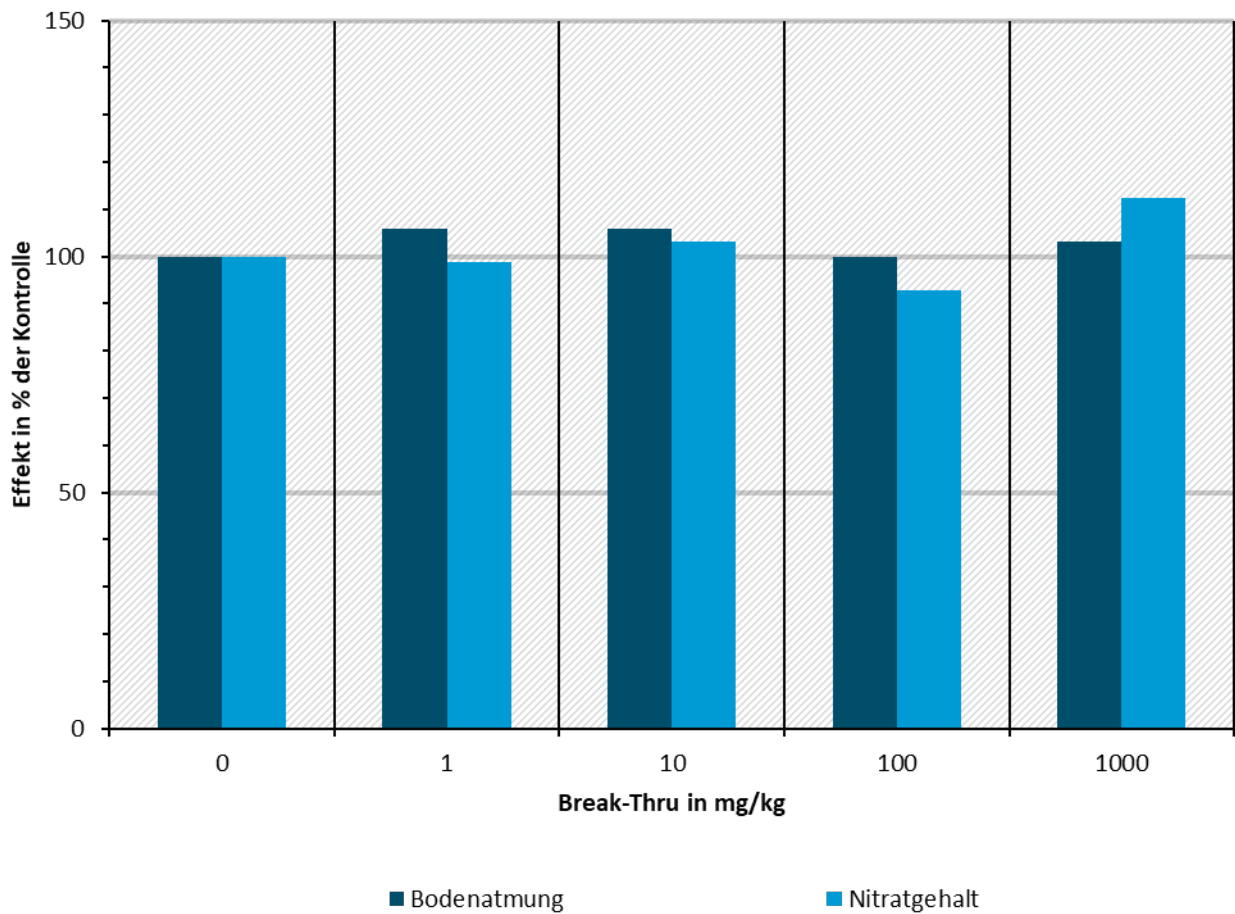
Dargestellt werden die Mittelwerte (0.1 – 10 mg/kg Bodenatmung: n=2) aus 2 Pseudoreplikaten der Endpunkte Bodenatmung und Nitratgehalt in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 41 Toxizität von Break-Thru ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in sandig-organischem Boden

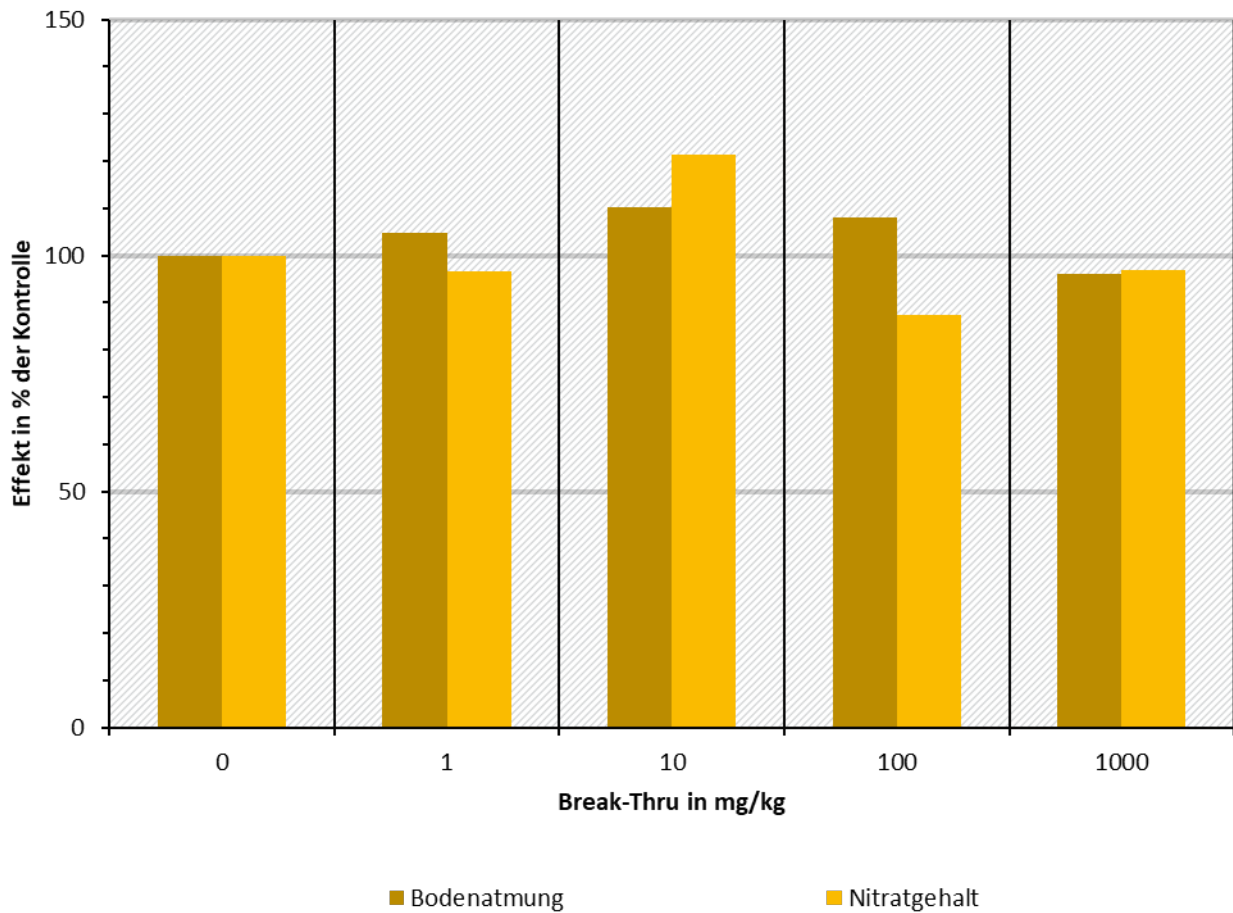
Dargestellt werden die Mittelwerte (0.1 – 10 mg/kg Bodenatmung: n=2) aus 2 Pseudoreplikaten der Endpunkte Bodenatmung und Nitratgehalt in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg).



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

Abbildung A 42 Toxizität von Break-Thru ggü. der mikrobiellen Bodengemeinschaft in lehmigem Boden

Dargestellt werden die Mittelwerte (0.1 – 10 mg/kg Bodenatmung: n=2) aus 2 Pseudoreplikaten der Endpunkte Bodenatmung und Nitratgehalt in Relation zur Lösemittelkontrolle (= 0 mg/kg). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau wie folgt dargestellt. *: 0,05 > p ≥ 0,01; **: 0,01 > p ≥ 0,001; ***: p > 0,001



Quelle: eigene Darstellung, Universität Bremen

C Bodenanalytik

Tabelle A 2 Wiederfindungsraten der Einzelsubstanztests in %

Testorganismus	Testboden	Konzentration nominell	Wiederfindungsrate in %	Tests	Replikate pro Test
Fluoranthen					
Collembolen	S	50	85,1	1	2
		162	110	1	2
	SO	270	83,7	1	2
		486	90,6	1	2
	L	72	89,1	1	2
		130	95,5	1	2
Enchyträen	S	50	85,1	1	2
		162	110	1	2
	SO	270	83,7	1	2
		486	90,6	1	2
	L	666	96,5	1	2
		1200	89,4	1	2
Fluazinam					
Collembolen	S	5,4	81,5	1	2
		9,7	68,2	1	2
	SO	44,4	85,3	1	2
		80	81,5	1	2
	L	30	61	1	2
		97,2	73,9	1	2
Enchyträen	S	25	103,5	1	2
	SO	30	71	1	2
		L	150	80,2	1
		486	80,2	1	2
DEHP					
Collembolen	S	1.000	77,5	1	2
	SO	1.000	68,1	1	2
	L	1.000	74,1	1	2
Enchyträen	S	1.000	77,5	1	2

Testorganismus	Testboden	Konzentration nominell	Wiederfindungsrate in %	Tests	Replikate pro Test
	SO	1.000	68,1	1	2
	L	1.000	74,1	1	2

Tabelle A 3 Wiederfindungsraten der Testsubstanzen in den Böden der effektiven Substanzmischungstests in %

Testorganismus	Testboden	Mischung	Wiederfindungsrate in %			Tests	Replikate pro Test	
			Ft	Fz	DEHP			
Collembolen	S	Ft	91,4	-	-	1	2	
		Fz	-	85,1	-	1	2	
		Ft-DEHP	108,9	-	119,1	1	2	
		FT-Fz	85,8	80,7	-	1	2	
		Fz-DEHP	-	89,9	125,7	1	2	
		Ft-Fz-DEHP	88,3	90,2	107,9	1	2	
	SO	Ft-DEHP	90,6	-	101,1	1	2	
		FT-Fz	125,9	117,9	-	1	2	
		Fz-DEHP	-	106,1	100,2	1	2	
		Ft-Fz-DEHP	91	111,3	101,4	1	2	
		L	Ft	108,5	-	-	1	2
			Fz	-	106,1	-	1	2
Ft-DEHP	88,8		-	115,6	1	2		
Ft-Fz	89,4		101,9	-	1	2		
Fz-DEHP	-		113,9	134,1	1	2		
Ft-Fz-DEHP	81,5		89,1	115	1	2		
Enchyträen	S	TU1	92,2	81,3	88,1	2	1	
		TU2	88,1	80,2	87,4	2	1	
	SO	TU1	92,7	102,6	99,2	2	1	
		TU2	90,4	93,6	95,6	2	1	
	L	TU1	90,2	94,4	93,4	2	1	
		TU2	90,9	100,7	94,8	2	1	

Tabelle A 4 Wiederfindungsraten der Testsubstanzen in den Böden der umweltrelevanten Substanzmischungstests in %, nur für PEC_{hoch}

Testorganismus	Testboden	Wiederfindungsrate in %			Tests	Replikate pro Test
		Ft	Fz	DEHP		
Collembolen+ Enchyträen	S	120,5	99,3	257,3	4	1
	SO	118,9	76,1	267,5	4	1
	L	127,2	97	283,7	4	1
Mikrobielle Bodengemeinschaft	S					
	SO					
	L					

Die Wiederfindungsraten für die drei Substanzen Fluoranthren, DEHP und Fluazinam in den umweltrelevanten Konzentrationen zeigen, dass in dieser Behandlung die Nominalkonzentrationen relativ gut getroffen wurden. Lediglich für DEHP liegt die Wiederfindungsrate um 257-284% deutlich über dem Nominalwert (Tabelle A 4). Die niedrigeren Mischungen PEC und PEC_{niedrig} lagen jeweils unter der in diesen Messreihen ermittelten Bestimmungsgrenze