

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungsbericht 298 64 416
UBA-FB 000205



Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten

von

**Eric Bruns
Philipp Egeler
Thomas Moser
Jörg Römbke,
Adam Scheffczyk
Peter Spörlein**

ECT Oekotoxikologie GmbH, Flörsheim am Main

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Diese TEXTE-Veröffentlichung kann bezogen werden bei

Vorauszahlung von 10,00 €

durch Post- bzw. Banküberweisung,
Verrechnungsscheck oder Zahlkarte auf das

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

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

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

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

Redaktion: Fachgebiet IV 2.3
Dr. Gabriele Studinger

Berlin, April 2002

Berichts – Kennblatt

1. Berichtsnummer UBA 000205	2.	3.
4. Titel des Berichts Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten		
5. Autor(en) (Name, Vorname(n)) Bruns, E., Egeler, Ph., Moser, Th., Römbke, J. Scheffczyk, A., Spörlein, P.		6. Abschlußdatum des Vorhabens 31.12.2000
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) ECT Oekotoxikologie GmbH Böttgerstr. 2-14 D-65439 Flörsheim/Main		7. Veröffentlichungsdatum 9. UFOPLAN-Nr. 298 64 416 10. Seitenzahl 137 + 32 (Anhang) 11. Literaturangaben 133
12. Fördernde Institution(en) (Name, Adresse) Umweltbundesamt, Bismarckplatz 1, D-14193 Berlin 33		13. Tabellen und Diagramme 45 14. Abbildungen 44
15. Zusätzliche Angaben		
16. Kurzfassung Auf der Grundlage einer Literatursauswertung wurde ein Verfahren zur Bestimmung der Bioakkumulation im Boden entwickelt. Hierzu wurden zwei verschiedene Testsubstrate (Kunsterde nach OECD 207 und der Standardboden LUFA 2.2) verwendet. Als Testorganismen dienten zwei Enchytraeenspezies (<i>Enchytraeus luxuriosus</i> und <i>Enchytraeus albidus</i>) und zwei Vertreter der Lumbricidae: (<i>Eisenia fetida</i> und <i>Lumbricus rubellus</i>). Zwei Modellchemikalien (Lindan und Hexachlorbenzol) wurden toxikokinetisch untersucht. Für die Durchführung der Bioakkumulationsversuche wurden ausschließlich ¹⁴ C markierte Radiochemikalien eingesetzt. Vor Beginn der Untersuchungen zur Bioakkumulation wurde zunächst die akute und chronische Toxizität der beiden Modellchemikalien gegenüber den verwendeten Enchytraeenspezies bestimmt. Die Abschätzung der Toxizität gegenüber den Lumbricidae erfolgte aufgrund von Literaturdaten. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen über die Toxizität der Modellchemikalien gegenüber den vier Testspezies wurden geeignete Testsubstanzkonzentrationen festgelegt. Die Aufnahme- und Eliminationsphasen wurden über einen Zeitraum von jeweils mindestens 21 Tagen untersucht. Für die beiden Lumbricidenspezies <i>E. fetida</i> und <i>L. rubellus</i> variierten die Bioakkumulationsfaktoren zwischen 1,3 und 5,8, je nach Chemikalie und Testsubstrat. Die für die beiden Enchytraeenspezies ermittelten Bioakkumulationsfaktoren lagen zwischen 11,7 und 34,9 und waren somit deutlich höher als bei den Lumbriciden. Alle vier verwendeten Spezies und die beiden Testsubstrate erwiesen sich als geeignet zur Durchführung von Bioakkumulationsversuchen. Die Messung der Radioaktivität im Organismus war im Falle der Enchytraeen einfacher und schneller als bei den Regenwürmern, da sie mittels Gewebsauflösung und anschließender Messung im LSC bestimmt wurden. Dadurch war es möglich, die Messwerte bereits 24 h nach dem jeweiligen Messpunkt zu erhalten. Die Regenwurmproben konnten aufgrund ihrer Größe und Färbung nicht mit derselben Methode aufgearbeitet werden und wurden daher im Sample Oxidizer verbrannt. Die Vorteile der Lumbriciden lagen hauptsächlich in der wesentlich einfacheren Handhabung der Tiere. Die durchgeführten Versuche zeigten, dass das Testsystem standardisierbar ist und eine Validierung im Rahmen eines Laborvergleichsversuchs angestrebt werden sollte. Ein Richtlinienentwurf zur Durchführung von Bioakkumulationsstudien mit terrestrischen Oligochaeten ist dem Bericht als Anhang beigelegt.		
17. Schlagwörter Lindan, Hexachlorbenzol, HCB, logP _{ow} , Bioakkumulation, Oligochaeten, Enchytraeidae, Lumbricidae, <i>Enchytraeus luxuriosus</i> , <i>Enchytraeus albidus</i> , <i>Eisenia fetida</i> , <i>Lumbricus rubellus</i> , OECD Kunsterde, natürlicher Standardboden LUFA 2.2		
18. Preis	19	20.

UBA-F+E-Berichtskennblatt (6.80)

Document Control Sheet

1. Report No. UBA-F+E 000205	2.	3.	
4. Report Title Standardisation and validation of a bioaccumulation test for terrestrial oligochaetes			
5. Author(s) (Family Name(s), First Name(s)) Bruns, E., Egeler, Ph., Moser, Th., Römbke, J. Scheffczyk, A., Spörlein, P.		6. Report Date December 31, 2000	
8. Performing Organisation(s) (Name, Address) ECT Oekotoxikologie GmbH Böttgerstr. 2-14 D-65439 Flörsheim/Main		7. Publication Date	
		9. UFOPLAN-Ref. Nr. 298 64 416	
		10. No. of Pages 137 + 32 (Appendix)	
		11. No. of References 133	
12. Sponsoring Agency (Name, Address) Umweltbundesamt, Bismarckplatz 1, D-14193 Berlin 33		13. No. of Tables and Diagrams 45	
		14. No. of Figures 44	
15. Supplementary Notes			
16. Abstract Based on the results of a literature review a method for the determination of bioaccumulation in soil has been developed. Two different test substrates (artificial soil according to OECD 207 and LUFA standard soil 2.2) were used. As test organisms two enchytraeid species (<i>Enchytraeus luxuriosus</i> and <i>Enchytraeus albidus</i>) and two representatives of the Lumbricidae (<i>Eisenia fetida</i> and <i>Lumbricus rubellus</i>) were chosen. Two model chemicals (Lindane and Hexachlorobenzene) were investigated for their toxikokinetic behaviour. For the performance of the bioaccumulation tests only ¹⁴C labeled radiochemicals were used. Before undergoing the investigations on bioaccumulation the acute and chronic toxicity of both model chemicals for the two enchytraeid species was determined. The assessment of the toxicity for the Lumbricidae was performed according to literature data. Based on these data of the toxicity of the two model chemicals suitable test substance concentrations were defined. The accumulation-as well as the elimination period were investigated for time periods of at least 21 days. For the two lumbricid species <i>Eisenia fetida</i> and <i>Lumbricus rubellus</i> the bioaccumulation factors varied between 1.3 and 5.8, depending on the chemical and the test substrate. The bioaccumulation factors calculated in the case of the two enchytraeid species varied between 11.7 and 34.9 and therefore were considerably higher compared to those determined for lumbricids. All four test species and both test substrates are suitable for the performance of bioaccumulation tests. The measurement of the radioactivity was easier and less time demanding in the case of the enchytraeids since it was measured by liquid scintillation counting after solubilising of the tissues. So the results were maintained within 24 hours after the respective measurement point. The lumbricid samples could not be handled in the same way caused by the higher quantity and the colouration of the samples, therefore they had to be treated by the Sample Oxidizer. On the other hand the advantages of the lumbricids are based mostly on their larger size and, therefore, easier handling. The performed tests demonstrated that the test system is standardisable and therefore should be validated in a laboratory ring test. A draft guideline for the performance of bioaccumulation studies with terrestrial oligochaetes is attached as an Annex to this report.			
17. Keywords Lindane, Hexachlorobenzene, HCB, logP _{ow} , Bioaccumulation, Oligochaeta, Enchytraeidae, Lumbricidae, <i>Enchytraeus luxuriosus</i> , <i>Enchytraeus albidus</i> , <i>Eisenia fetida</i> , <i>Lumbricus rubellus</i> , OECD artificial soil, natural standard soil LUFA 2.2			
18. Price	19.	20.	

UBA-F+E-Berichtskennblatt (6.80)

Inhaltsverzeichnis

Seite

1	Verzeichnis der Tabellen.....	vi
2	Verzeichnis der Abbildungen	ix
3	Einleitung und Aufgabenstellung.....	1
4	Material und Methode.....	4
4.1	Testorganismen.....	4
4.1.1	Lumbricidae.....	7
4.1.1.1	<i>Eisenia fetida</i>	8
4.1.1.2	<i>Lumbricus rubellus</i>	10
4.1.2	Enchytraeidae.....	10
4.1.2.1	<i>Enchytraeus albidus</i>	13
4.1.2.2	<i>Enchytraeus luxuriosus</i>	14
4.2	Testsubstrate	15
4.2.1	Kunsterde nach OECD Guideline 207.....	16
4.2.2	Natürlicher Standardboden LUFA 2.2.....	16
4.3	Modellchemikalien	17
4.3.1	Lindan	17
4.3.2	Hexachlorbenzol.....	19
4.4	Vorversuche zur Toxizitätsbestimmung.....	20
4.5	Radioaktivitätsmessung.....	21
4.6	Exposition und Bioakkumulation	21
4.6.1	Wahl der Testsubstanzkonzentrationen	21
4.6.2	Applikation der Testsubstanzen.....	23
4.7	Versuchsaufbau.....	23
4.8	Ansatz der Testgefäße.....	24
4.9	Probennahme und Radioaktivitätsmessung.....	26
4.9.1	Testsubstrate	27
4.9.2	Enchytraeidae.....	28
4.9.3	Lumbricidae.....	29
4.10	Elimination	30
4.11	Lipidbestimmung.....	30
4.12	Auswertung.....	30
5	Ergebnisse.....	34
5.1	<i>Enchytraeus albidus</i> , OECD-Kunsterde, Lindan.....	34
5.1.1	Akkumulation	34
5.1.2	Elimination	35
5.2	<i>Enchytraeus albidus</i> , OECD-Kunsterde, HCB.....	37
5.2.1	Akkumulation	37
5.2.2	Elimination	38

5.3	<i>Enchytraeus albidus</i> , LUFA 2.2, Lindan.....	39
5.3.1	Akkumulation	40
5.3.2	Elimination	40
5.4	<i>Enchytraeus albidus</i> , LUFA 2.2, HCB.....	41
5.4.1	Akkumulation	42
5.4.2	Elimination	42
5.5	<i>Enchytraeus luxuriosus</i> , OECD-Kunsterde, Lindan.....	43
5.5.1	Akkumulation	44
5.5.2	Elimination	44
5.6	<i>Enchytraeus luxuriosus</i> , OECD-Kunsterde, HCB.....	45
5.6.1	Akkumulation	46
5.6.2	Elimination	47
5.7	<i>Enchytraeus luxuriosus</i> , LUFA 2.2, Lindan.....	48
5.7.1	Akkumulation	48
5.7.2	Elimination	49
5.8	<i>Enchytraeus luxuriosus</i> , LUFA 2.2, HCB.....	50
5.8.1	Akkumulation	50
5.8.2	Elimination	51
5.9	<i>Eisenia fetida</i> , OECD-Kunsterde, Lindan	52
5.9.1	Akkumulation	52
5.9.2	Elimination	53
5.10	<i>Eisenia fetida</i> , OECD-Kunsterde, HCB	54
5.10.1	Akkumulation	55
5.10.2	Elimination	56
5.11	<i>Eisenia fetida</i> , LUFA 2.2, Lindan.....	57
5.11.1	Akkumulation	57
5.11.2	Elimination	58
5.12	<i>Eisenia fetida</i> , LUFA 2.2, HCB.....	59
5.12.1	Akkumulation	59
5.12.2	Elimination	60
5.13	<i>Lumbricus rubellus</i> , OECD-Kunsterde, Lindan	61
5.13.1	Akkumulation	62
5.13.2	Elimination	62
5.14	<i>Lumbricus rubellus</i> , OECD-Kunsterde, HCB	63
5.14.1	Akkumulation	63
5.14.2	Elimination	64
5.15	<i>Lumbricus rubellus</i> , LUFA 2.2, Lindan	65
5.15.1	Akkumulation	66
5.15.2	Elimination	67
5.16	<i>Lumbricus rubellus</i> , LUFA 2.2, HCB	67
5.16.1	Akkumulation	68
5.16.2	Elimination	69
5.17	Versuche zum Einfluss des Darminhalts.....	70
5.18	Ergebnisse in der Übersicht.....	72
6	Diskussion.....	74
6.1	Methodik.....	74
6.1.1	Testorganismen.....	74

6.1.2	Testsubstrate	76
6.1.3	Modellchemikalien	77
6.1.4	Testdurchführung.....	78
6.2	Diskussion und Vergleich der Ergebnisse	84
6.2.1	Enchytraeidae.....	84
6.2.1.1	Aufnahmephase	84
6.2.1.2	Elimination	88
6.2.2	Lumbricidae.....	89
6.2.2.1	Aufnahmephase	89
6.2.2.2	Elimination	91
6.3	Vergleich der Ergebnisse mit Literaturdaten	94
6.3.1	Andere Enchytraeentests.....	94
6.3.2	Andere Regenwurmtests.....	95
6.4	Gesamtdarstellung	99
7	Kurzfassung	109
8	Literatur	111
9	Glossar	123
10	Anhang: Richtlinienentwurf.....	126

1 Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Eigenschaften der verwendeten Testsubstrate (WK = Wasserhaltekapazität).	16
Tab. 2: Kenndaten zur Mobilität und Persistenz sowie zur Ökotoxikologie von Lindan. Alle Daten soweit nicht anders gekennzeichnet aus RIPPEN (1999) bzw. LfU (1993); ¹ EGELER (1998); ² MELLER (1996).	18
Tab. 3: Kenndaten zur Mobilität und Persistenz sowie zur Ökotoxikologie von HCB. Alle Daten soweit nicht anders gekennzeichnet aus RIPPEN (1999); ¹ EGELER (1998); ² MELLER (1996).	19
Tab. 4: Ergebnisse der Toxizitätsstudien mit Lindan und HCB in OECD und LUFA-Boden.	20
Tab. 5: Angaben zu Herkunft, Reinheit und spezifischen Aktivität der Testsubstanzen.	21
Tab. 6: Nominale Lindan- und HCB - Konzentrationen aufgelistet nach Testsystem.	22
Tab. 7: Durchschnittliche Biomasse, Substrat- und Futtermenge pro Testgefäß.	25
Tab. 8: Fütterung der Regenwürmer in den Versuchsansätzen.	26
Tab. 9: Aufnahmeparameter von Lindan bei <i>E. albidus</i> in OECD-Kunsterde; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.	35
Tab. 10: Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von Lindan bei <i>E. albidus</i> in OECD-Kunsterde nach 28 und 60 Tagen Aufnahmephase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.	37
Tab. 11: Aufnahmeparameter von HCB bei <i>E. albidus</i> in OECD-Kunsterde; AF = Akkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.	38
Tab. 12: Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von HCB bei <i>E. albidus</i> in OECD-Kunsterde nach 21 Tagen Aufnahmephase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.	39
Tab. 13: Aufnahmeparameter von Lindan bei <i>E. albidus</i> in LUFA 2.2; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.	40
Tab. 14: Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von Lindan bei <i>E. albidus</i> in LUFA 2.2 nach 21 Tagen Aufnahmephase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.	41
Tab. 15: Aufnahmeparameter von HCB bei <i>E. albidus</i> in LUFA 2.2; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.	42
Tab. 16: Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von HCB bei <i>E. albidus</i> in LUFA 2.2 nach 21 Tagen Aufnahmephase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.	43
Tab. 17: Aufnahmeparameter von Lindan bei <i>E. luxuriosus</i> in OECD-Kunsterde; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.	44
Tab. 18: Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von Lindan bei <i>E. luxuriosus</i> in OECD-Kunsterde nach 21 Tagen Aufnahmephase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag,	

- Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung. 45
- Tab. 19:** Aufnahmeparameter von HCB bei *E. luxuriosus* in OECD-Kunsterde; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient. 46
- Tab. 20:** Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von HCB bei *E. luxuriosus* in OECD-Kunsterde nach 28 Tagen Aufnahmephase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung. 47
- Tab. 21:** Aufnahmeparameter von Lindan bei *E. luxuriosus* in LUFA 2.2; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient. 48
- Tab. 22:** Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von Lindan bei *E. luxuriosus* in LUFA 2.2 nach 21 Tagen Aufnahmephase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung. 49
- Tab. 23:** Aufnahmeparameter von HCB bei *E. luxuriosus* in LUFA 2.2; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient. 51
- Tab. 24:** Eliminationsparameter der Einkompartimentkinetik für die Ausscheidung von HCB bei *E. luxuriosus* in LUFA-Erde, Restaktivität = Radioaktivität am letzten Eliminationstag als prozentuale Angabe zur Aktivität der Würmer am letzten Aufnahmetag, k_e = Eliminationskonstante der Einkompartimentkinetik, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung. 52
- Tab. 25:** Aufnahmeparameter von Lindan bei *E. fetida* in OECD-Kunsterde; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient. 53
- Tab. 26:** Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von Lindan bei *E. fetida* in OECD-Kunsterde nach 21 Tagen Aufnahmephase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung. 54
- Tab. 27:** Aufnahmeparameter von HCB bei *E. fetida* in OECD-Kunsterde; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient. 55
- Tab. 28:** Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von HCB bei *E. fetida* in OECD-Kunsterde nach 21 Tagen Aufnahmephase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination (d 14) bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung. 56
- Tab. 29:** Aufnahmeparameter von Lindan bei *E. fetida* in LUFA 2.2; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient. 58
- Tab. 30:** Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von Lindan bei *E. fetida* in LUFA 2.2 nach 21 Tagen Aufnahmephase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung. 59
- Tab. 31:** Aufnahmeparameter von HCB bei *E. fetida* in LUFA 2.2; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient. 60

Tab. 32: Eliminationsparameter der Einkompartimentkinetik für die Ausscheidung von HCB bei <i>E. fetida</i> in LUFA 2.2, Restaktivität = Radioaktivität am letzten Eliminationstag als prozentuale Angabe zur Aktivität der Würmer am letzten Aufnahmetag, k_e = Eliminationskonstante der Einkompartimentkinetik, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.	61
Tab. 33: Aufnahmeparameter von Lindan bei <i>L. rubellus</i> in OECD-Kunsterde; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.	62
Tab. 34: Aufnahmeparameter von HCB bei <i>L. rubellus</i> in OECD-Kunsterde; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.	64
Tab. 35: Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von HCB bei <i>L. rubellus</i> in OECD-Kunsterde nach 21 Tagen Aufnahmephase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination (d 14) bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.	65
Tab. 36: Aufnahmeparameter von Lindan bei <i>L. rubellus</i> in LUFA 2.2; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.	66
Tab. 37: Aufnahmeparameter von HCB bei <i>L. rubellus</i> in LUFA 2.2; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.	68
Tab. 38: Eliminationsparameter der Einkompartimentkinetik für die Ausscheidung von HCB bei <i>L. rubellus</i> in LUFA 2.2, Restaktivität = Radioaktivität am letzten Eliminationstag als prozentuale Angabe zur Aktivität der Würmer am letzten Aufnahmetag, k_e = Eliminationskonstante der Einkompartimentkinetik, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.	69
Tab. 39: Einfluss des Darminhalts auf den Bioakkumulationsfaktor bei Regenwürmern in Abhängigkeit von Testsubstanz, Spezies und Substrat (DE = mit Darmentleerung; oDE = ohne Darmentleerung; MW = Mittelwert aller vier Replikate).	71
Tab. 40: Aufnahmeparameter von ^{14}C -Lindan und ^{14}C -HCB bei den vier Oligochaetenarten. Alle Werte beziehen sich auf den steady state. BAF_K = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme.	72
Tab. 41: Eliminationsparameter; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination (d 14) bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.	73
Tab. 42: Trockengewicht (TG), Lipidgehalt und OC (organischer Kohlenstoffgehalt) bezogen auf Frischgewicht (FG) und Trockengewicht in den Wurmarten bzw. Bodentypen.	99
Tab. 43: Vergleich der Anreicherungsfaktoren zwischen <i>E. albidus</i> und <i>E. luxuriosus</i> bzw. <i>L. rubellus</i> und <i>E. fetida</i> bezogen auf Frischgewicht (FG) und Trockengewicht in den Wurmarten bzw. Bodentypen (Daten bei <i>E. luxuriosus</i> wurden anhand des Lipidgehalts von <i>E. albidus</i> abgeschätzt).	101
Tab. 44: Bioakkumulation von Lindan in Labortests mit terrestrischen Oligochaeten.	102
Tab. 45: Bioakkumulation von HCB in Labortests mit terrestrischen Oligochaeten.	103

2 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Ventrale Ansicht von <i>Enchytraeus albidus</i> (20-fache Vergrößerung).	13
Abb. 2: <i>Enchytraeus albidus</i> in einer mit rekonstituiertem Wasser befüllten Petrischale.	14
Abb. 3: Stammkultur von <i>Enchytraeus luxuriosus</i> auf Agar, Skala in cm.	15
Abb. 4: Schematische (Bruns et al. 2000) und photographische Darstellung der Versuchsanordnung; KOH: Kalilauge (10 Gew.-%); TEG: Triethylenglykol.	24
Abb. 5: Photographische Darstellung der Testgefäße, Skala in cm.	26
Abb. 6: TriCarb 2500 TR Flüssig-Szintillationszähler (Packard)	27
Abb. 7: Photographische Darstellung der Behandlung von Enchytraeenproben. Die rechte Petrischale dient zur Reinigung der Enchytraeen von Bodenpartikeln. Daneben eine Federstahlpinzette, sowie in der linken Petrischale von anhaftenden Bodenpartikeln "gesäuberte" Enchytraeen der Art <i>E. albidus</i> (Skalierung in cm).	29
Abb. 8: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -Lindan bei <i>E. albidus</i> in OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 60, sowie die Anpassungen einer nichtlinearen Regression für die Aufnahme bis Tag 28 ($r^2 = 0.92$) und Tag 60 ($r^2 = 0,74$).	35
Abb. 9: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -Lindan bei <i>E. albidus</i> in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG nach 28 Tagen Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.88$) an ein Zweikompartimentmodell.	36
Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -Lindan bei <i>E. albidus</i> in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG nach 60 Tagen Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.95$) an ein Zweikompartimentmodell. Die rechteckig dargestellten Messwerte repräsentieren die Ergebnisse der Replikate, die am 16. Tag nochmals in undotierte Kunsterde umgesetzt wurden.	36
Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -HCB bei <i>E. albidus</i> in OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.94$).	38
Abb. 12: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -HCB bei <i>E. albidus</i> in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG am 21. Tag der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.98$) an ein Zweikompartimentmodell.	39
Abb. 13: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -Lindan bei <i>E. albidus</i> in LUFA-Boden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.99$).	40
Abb. 14: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -Lindan bei <i>E. albidus</i> in unbelasteter LUFA-Erde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.99$) an ein Zweikompartimentmodell.	41
Abb. 15: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -HCB bei <i>E. albidus</i> in LUFA-Boden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.99$).	42
Abb. 16: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -HCB bei <i>E. albidus</i> in unbelasteter LUFA-Erde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.97$) an ein Zweikompartimentmodell.	43
Abb. 17: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -Lindan bei <i>E. luxuriosus</i> in OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.8$).	44
Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -Lindan bei <i>E. luxuriosus</i> in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG am 21. Tag der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.998$) an ein Zweikompartimentmodell.	45

- Abb. 19:** Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -HCB bei *E. luxuriosus* in OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 28, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.98$). 46
- Abb. 20:** Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -HCB bei *E. luxuriosus* in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.98$) an ein Zweikompartimentmodell. 47
- Abb. 21:** Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -Lindan bei *E. luxuriosus* in LUFA-Boden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.98$) 48
- Abb. 22:** Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -Lindan bei *E. luxuriosus* in unbelasteter LUFA-Erde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.998$) an ein Zweikompartimentmodell. 49
- Abb. 23:** Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -HCB bei *E. luxuriosus* im LUFA-Boden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.99$). 50
- Abb. 24:** Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -HCB bei *E. luxuriosus* in unbelasteter LUFA-Erde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.98$) an ein Einkompartimentmodell. 51
- Abb. 25:** Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -Lindan bei *E. fetida* in OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.97$) 52
- Abb. 26:** Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -Lindan bei *E. fetida* in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.99$) an ein Zweikompartimentmodell. 53
- Abb. 27:** Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -HCB bei *E. fetida* in OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 28, sowie Anpassungen der nichtlinearen Regression für die Aufnahme bis Tag 21 und 28 (Tag 21: $r^2 = 0.98$; Tag 28: $r^2 = 0.91$). 55
- Abb. 28:** Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -HCB bei *E. fetida* in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.$) an ein Zweikompartimentmodell. 56
- Abb. 29:** Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -Lindan bei *E. fetida* in LUFA 2.2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.85$). 57
- Abb. 30:** Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -Lindan bei *E. fetida* in LUFA 2.2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.99$) an ein Zweikompartimentmodell. 58
- Abb. 31:** Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -HCB bei *E. fetida* in LUFA 2.2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.99$) 60
- Abb. 32:** Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -HCB bei *E. fetida* in unbelasteter LUFA 2.2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.97$) an ein Einkompartimentmodell. 61
- Abb. 33:** Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -Lindan bei *L. rubellus* in OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.98$). 62
- Abb. 34:** Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -Lindan bei *L. rubellus* in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase. 63
- Abb. 35:** Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -HCB bei *L. rubellus* in OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.99$). 64

- Abb. 36:** Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -HCB bei *L. rubellus* in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.$) an ein Zweikompartmentmodell. 65
- Abb. 37:** Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -Lindan bei *L. rubellus* in LUFA 2.2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.98$). 66
- Abb. 38:** Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -Lindan bei *L. rubellus* in unbelasteter LUFA 2.2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase. 67
- Abb. 39:** Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -HCB bei *L. rubellus* in LUFA 2.2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.97$). 68
- Abb. 40:** Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -HCB bei *L. rubellus* in unbelasteter LUFA 2.2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 1,0.$) an ein Zweikompartmentmodell. 69
- Abb. 41:** Anzahl der wiedergefundenen Würmer am Ende der Aufnahmephase nach mindestens 21 Tage Versuchsdauer. Die Anzahl der eingesetzten Würmer betrug 20 Exemplare. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl der Würmer aus vier Replikaten am Ende der Aufnahmephase sowie die Validitätsgrenze bezüglich Mortalität aus der ERT-Richtlinie (20% = 4 Würmer). 84
- Abb. 42:** Verlauf der ^{14}C -HCB Aufnahme von *Enchytraeus albidus* in OECD-Kunsterde (korrigiert um die Wurmbiomasse am letzten Aufnahmetag) sowie zum Vergleich die auf den Rohdaten basierende Regressionskurve (vgl. **Abb. 11**). 86
- Abb. 43:** Restaktivität (in % der Rückstände bei steady state) am Ende der Eliminationsphase (meist 21 Tage) im LUFA-Boden. 104
- Abb. 44:** Restaktivität (in % der Rückstände bei steady state) am Ende der Eliminationsphase (meist 21 Tage) in OECD-Kunsterde. 105

3 Einleitung und Aufgabenstellung

Im Zulassungsverfahren von Umweltchemikalien sowie bei der Regulierung von Pflanzenschutzmitteln wird unter bestimmten Voraussetzungen die Bestimmung der Bioakkumulation von Chemikalien verlangt. Weist beispielsweise eine Substanz einen $\log P_{OW} \geq 3$ auf, ist im Zulassungsverfahren nach diesen gesetzlichen Regelwerken ein Biokonzentrationstest mit Fischen durchzuführen. Für aquatische Systeme existiert mit der OECD-Richtlinie 305 (OECD, 1996) eine Methode zur Bestimmung der Biokonzentration wassergelöster Chemikalien. Für Untersuchungen zur Bioakkumulation sedimentbewohnender Organismen liegt bereits ein Richtlinienentwurf vor (EGELER et al., 1999b). Im Gegensatz dazu gab es bis in die jüngste Vergangenheit für terrestrische Systeme keine standardisierten Bioakkumulationstests (NAGEL & LOSKILL, 1991; PHILLIPS 1993; EU 1996; REINECKE & REINECKE 1998). Im Jahr 2000 wurde bei der Neufassung der ASTM-Richtlinie „Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* (E 1676-97)“ ein Anhang eingefügt, in dem – allerdings in sehr kurzer und allgemeiner Weise – die Durchführung von Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten beschrieben wird. Unabhängig davon hatte die OECD schon 1998 die Notwendigkeit gesehen, analog zu anderen Umweltkompartimenten einen terrestrischen Bioakkumulationstest zu standardisieren. Dieses Vorhaben wurde im Rahmen des „Test Development Programme“ als „medium priority“ klassifiziert und Deutschland als „lead country“ für dessen Umsetzung bestimmt.

Bodentiere können gegenüber wenig mobilen und persistenten Chemikalien langfristig exponiert sein. Trotz dieser Problematik werden bisher Akkumulationsstudien an Bodenorganismen im Rahmen der Zulassung oder Registrierung von Chemikalien (insbesondere Pflanzenschutzmittel) von den zuständigen Behörden selten verlangt, da keine standardisierten Prüfrichtlinien vorlagen. Statt dessen wird die Bioakkumulation entweder nach einfachen Modellen (meist auf der Grundlage des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P_{OW}$)) abgeschätzt (z.B. CONNELL & MARKWELL 1990; PFLUGMACHER 1992; SAMPLE et al. 1998), oder es wird versucht, das Bioakkumulationspotential aufgrund der Versuche im aquatischen Medium, speziell dem Fischtest nach OECD-Richtlinie 305, vorherzusagen. Die Bioakkumulation terrestrischer Organismen kann jedoch nicht ohne weiteres aus dem Akkumulationsverhalten aquatischer Systeme abgeleitet werden (HENDRIKS et al. 1995). Hierfür sprechen mehrere Gründe: Im Gegensatz zum Wasser kann z.B. der ingestive Aufnahmepfad im Boden von er-

heblicher Bedeutung sein, speziell bei Chemikalien mit einem $\log P_{OW}$ -Wert > 5 (BELFROID et al. 1995a). Umwandlungsprozesse aufgrund von Mineralisierung oder Metabolisierung laufen im Kompartiment Boden anders als im Kompartiment Wasser ab (WALKER 1990). Ferner ist fraglich, ob die Bewertung des ermittelten Biokonzentrationsfaktors (BCF), der bei einem $BCF < 30$ im aquatischen Medium als niedrig eingestuft wird, den gleichen Bewertungskriterien im terrestrischen Medium unterliegen kann (FRANKE et al. 1994).

Aufgrund der Notwendigkeit eines standardisierten terrestrischen Bioakkumulationstests wurde vom Umweltbundesamt ein F + E Vorhaben in Auftrag gegeben, in dem mittels einer Literaturstudie das vorhandene Wissen über die Methoden zur Testung der Akkumulation von Chemikalien durch terrestrische Organismen zusammengestellt wurde (RÖMBKE et al. 1998). In der genannten Arbeit wurde die Einschränkung der Testorganismen auf terrestrische Oligochaeten als Schlüsselorganismen diskutiert und zwei Vertreter der Regenwürmer (*Eisenia fetida*, *Lumbricus rubellus*) sowie zwei Enchytraeenarten (*Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus luxuriosus*) empfohlen. Darüber hinaus wurden geeignete Testsubstrate, Modellchemikalien sowie die übrigen Testbedingungen vorgeschlagen. In einer anschließenden Hauptstudie sollten die Vorschläge in einem praktischen Teil überprüft werden.

Laborstudien zur Bioakkumulation von Chemikalien durch Regenwürmer sind zahlreich (z.B. BELFROID ET AL. 1993a,b, 1995a,b; FÜLL 1996; MARINUSSEN 1997), doch sind die Ergebnisse schwer miteinander vergleichbar, denn die einzelnen Studien unterscheiden sich hinsichtlich Testspezies, Substrat, Dauer, Bezugsgrösse usw. usf. erheblich. Akkumulationsstudien mit Enchytraeen wurden hingegen, wohl vor allem aufgrund ihrer geringen Körpergröße, bisher kaum unternommen. Einige Ausnahmen stellen Labor- und Freilandversuche mit Schwermetallen (z.B. Notenboom & Posthuma 1994) oder mit organischen Chemikalien (Schön 1994; Flenner 1995) dar. Ferner wurde, weitgehend zeitlich parallel zu der vorliegenden Arbeit, die Toxikokinetik von Lindan durch *Enchytraeus albidus* untersucht (Amorim 2000). Da Enchytraeen eine wichtige ökologische Stellung innerhalb der Bodenfauna einnehmen und durch ihre Lebensweise dem Einfluß von Chemikalien über verschiedene Expositionspfade ausgesetzt sind, ist der Forschungsbedarf mit diesen Tieren als sehr hoch einzuschätzen.

Ziel des Vorhabens war demnach die Weiterentwicklung, Standardisierung und Validierung einer Testmethode zur Untersuchung der Bioakkumulation von organischen Chemikalien im

terrestrischen Medium. Als Testorganismen wurden mit *Enchytraeus luxuriosus* und *Enchytraeus albidus* zwei Vertreter der Enchytraeidae sowie mit *Eisenia fetida* und *Lumbricus rubellus* zwei Lumbricidenspezies ausgewählt. Alle vier Testorganismen sind Vertreter der Oligochaeta. Diese Tiergruppe wurde aufgrund ihrer wichtigen Rolle im Kompartiment Boden, ihrer einfachen Handhabbarkeit und wegen ihrer Nutzung in akuten und chronischen Toxizitätstests verwendet (CHRISTENSEN & MATHER 1994; RÖMBKE & MOSER 2001). *Enchytraeus albidus* und mit *Eisenia fetida* wurden aufgrund ihrer Verwendung in bereits bestehenden akuten und chronischen Prüfverfahren, *Enchytraeus luxuriosus* und *Lumbricus rubellus* aufgrund ihrer Verbreitung in zahlreichen mitteleuropäischen Böden ausgesucht. Als Testsubstrate wurden die Kunsterde nach OECD 207 (1984) und der natürliche Standardboden LUFA 2.2, der über die landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer bezogen wurde, ausgewählt. In dieser Kombination sollten Aufnahme und Elimination von Lindan und Hexachlorbenzol untersucht und verglichen werden. Beide Chemikalien unterscheiden sich in ihrem n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten, einem Maß für die Lipophilie einer Substanz und damit für ihr Bioakkumulationspotential.

Darüber hinaus wurden die folgenden Aspekte des zu standardisierenden Tests überprüft:

- pH-Wert und Feuchtegehalt des Testsubstrats
- Aufnahme- und Eliminationsdauer
- Anzahl der Würmer und davon abhängige Substratmenge
- Futtermenge während der Testdauer
- Praktikabilität und Anwendbarkeit der Testmethode
- Eignung der verschiedenen Testspezies.

Die Erfahrungen dieses Vorhabens (einschließlich der schon vorab veröffentlichten Literaturübersicht: RÖMBKE et al. 1998) sollte dann in einem Richtlinienentwurf nach OECD-Vorgaben zusammengefasst werden (siehe Anhang, Kap. 10).

4 Material und Methode

4.1 Testorganismen

Bisher wurden Bioakkumulationsuntersuchungen mit Tieren im terrestrischen Medium meist im Rahmen von Monitoringstudien vorgenommen (z.B. EBING et al. 1984). Dabei wurden aufgrund der großen analytischen Schwierigkeiten bei geringer Probenmenge, wie sie bei den meist sehr kleinen Bodenorganismen trotz Verwendung radioaktiv markierten Materials anfallen, fast ausschließlich Regenwürmer eingesetzt (z.B. HAQUE & EBING 1988). Zum Beispiel nutzt man im Rahmen des Umweltprobenbankkonzepts der Bundesregierung seit Jahren die weit verbreitete Art *Lumbricus rubellus* (LEWIS 1985). Außerdem werden verschiedene tiefgrabende Lumbricidenarten wie *Lumbricus terrestris* oder *Aporrectodea longa* als Akkumulationsindikatoren im Freiland empfohlen (KLEIN & PAULUS 1995).

Regenwürmer sind typische und wichtige Vertreter der Bodenfauna (hohe Biomasse, großer Einfluß auf Bodenfunktionen wie Streuabbau und die Bodenstruktur (EDWARDS & BOHLEN 1996)), so dass sie als Schlüsselorganismen zur Untersuchung von Chemikalien im Boden im Kompartiment Boden prädestiniert sind (GREIG-SMITH et al. 1992; EDWARDS & BOHLEN 1992). Insbesondere ist ihre zentrale Rolle im Nahrungsnetz vieler europäischer Böden herauszustellen, wodurch z.B. Vögel durch den Fraß belasteter Würmer sekundär betroffen sein können (COOKE et al. 1992; STAVOLA & CRAVEN 1992; DIETRICH et al. 1995; STEPHENSON et al. 1997). Zudem lassen sich Regenwürmer kombiniert als Wirkungs- und Akkumulationsindikatoren einsetzen (CALLAHAN et al. 1991).

Auch Laborstudien zur Akkumulation von Chemikalien wie z.B. Pflanzenschutzmitteln durch Regenwürmer sind zahlreich (z.B. CONNELL & MARKWELL 1990; BELFROID et al. 1993a,b, 1995a,b; FÜLL & NAGEL 1994; FÜLL 1996; MARINUSSEN 1997), doch gibt es bisher keine standardisierte Prüfmethode. Bei diesen Tieren kann eine Substanz wegen des Fehlens einer relativ impermeablen Cuticula über den ganzen Körper aus dem Porenwasser aufgenommen werden (VAN GESTEL & MA 1988). Darüber hinaus hat die Aufnahme über die Nahrung eine hohe Bedeutung; nicht zuletzt, weil die dabei von den Tieren aufgenommene und umgesetzte Menge an Bodensubstrat sehr groß ist (2 – 268 t/ha/ pro Jahr; Edwards & Bohlen 1996). Zudem unterscheiden sich die physiologischen Bedingungen im Oesophagus bzw. Darm dieser Würmer

deutlich von denen des Bodens (BELFROID et al. 1995) und können somit die Bioverfügbarkeit von Chemikalien beeinflussen.

Einige hundert Arten der Familie Enchytraeidae (Oligochaeta, Annelida) sind weltweit in sehr verschiedenen Ökosystemen (vom Hochgebirgsgletscher bis in die Tiefsee) verbreitet. Speziell in sauren Böden kommen sie in großer Zahl vor. Die ökologische Funktion dieser kleinen Verwandten der Regenwürmer im Kompartiment Boden ist speziell die Steuerung des komplexen Prozesses des Abbaus organischen Materials (z.B. Laubstreu). Diese Rolle ist so essentiell für das gesamte Bodenökosystem, dass man Enchytraeen als wichtigen Teil der saprophagen Mesofauna, speziell in sauren Böden mit wenig Regenwürmern, bezeichnet (DIDDEN 1993).

Enchytraeidae leben meist im Porenwasser des Bodens und sind somit direkt dem Einfluß gelöster Chemikalien ausgesetzt. Außerdem nehmen sie zusammen mit ihrer Nahrung an organischem Material adsorbierte Substanzen auf. Aus Freilandstudien ist bekannt, dass die Tiere empfindlich auf Chemikalienstreß reagieren (z.B. Schwermetalle: BENGTSSON & RUNDGREN 1982; Pflanzenschutzmittel: RÖMBKE & FEDERSCHMIDT 1995; Umweltchemikalien: HECK 1995). In Laborstudien lassen sich vor allem Arten der Gattung *Enchytraeus* gut in akuten wie chronischen Prüfungen (sowohl in Kunsterde als auch in natürlichen Substraten) testen (z.B. RÖMBKE & MOSER 2001). Akkumulationsstudien wurden mit Enchytraeen, wohl vor allem aufgrund ihrer geringen Körpergröße, bisher kaum unternommen. Eine Ausnahme stellen Labor- wie Freilandversuche mit Schwermetallen dar (NOTENBOOM & POSTHUMA 1994).

Vor- und Nachteile der beiden Gruppen als Akkumulations-Testorganismen:

Organismen, die in Bioakkumulationstests eingesetzt werden könnten, müssen vor allem die folgenden Bedingungen erfüllen:

- Haltung und Zucht im Labor sollten einfach sein;
- Lebensweise und Stoffwechsel der jeweiligen Tiere sollten eine Anreicherung der betreffenden Chemikalie ermöglichen;
- die Toleranz gegenüber akuten Wirkungen der Chemikalie sollte relativ hoch sein, damit eine von toxischen Effekten unbeeinflusste Aufnahme und Verteilung erfolgt;
- die Handhabung der Tiere im Test sollte unproblematisch sein.

Diese Bedingungen werden von verschiedenen Oligochaetenarten erfüllt, wie aus deren – teils seit ca. 20 Jahren andauernden - Verwendung in akuten wie chronischen Labortests hervorgeht (Regenwürmer, speziell *Eisenia fetida* bzw. *E. andrei*: OECD 207 (1984); OECD Draft (2001); ISO 11268-1 (1993); Enchytraeidae, speziell *Enchytraeus albidus*: OECD 220 (2000a), ISO 16387 (2001).

Beide Annelidenfamilien sind ubiquitär verbreitet und nehmen wichtige ökologische Funktionen in sehr vielen mitteleuropäischen Böden wahr. Zucht, Haltung und Testung der einzusetzenden Arten sind einfach. Damit bleiben die folgenden Unterschiede:

<i>Regenwürmer</i>	<i>Enchytraeen</i>
Individuen groß (Analytik!):	Individuen klein:
1 Ind./Probe	10 Ind./Probe
viele Monitoring-Daten	wenig Monitoring-Daten
physiol. Zustand länger konstant:	kurzer Generationszyklus:
(+) für Testdauer	(-) für Testdauer
(-) für Haltung	(+) für Haltung
große Substratmenge nötig	wenig Substrat nötig

Die Vorteile der Erfassung der Bioakkumulation von Chemikalien durch Oligochaeten lassen sich damit wie folgt zusammenfassen:

- Bessere Beurteilung des ökotoxikologischen Gefährdungspotentials von Chemikalien durch Bezugnahme auf die "interne" Konzentration (Lethal Body Burden Concept) statt auf die "externe" Substratkonzentration, deren bioverfügbarer Anteil schwer bestimmbar ist (BELFROID et al. 1993a,b).
- Gute Abschätzung des Potentials zur Biomagnifikation bzw. des "Secondary Poisoning", da Regenwürmer wie Enchytraeen aufgrund ihrer Biomasse und Lebensweise eine zentrale Stellung im terrestrischen Nahrungsnetz haben.
- Hohe Praktikabilität, da viele Erfahrungen aus anderen ökotoxikologischen Tests sowie nicht-standardisierten Akkumulationsstudien vorliegen.
- Da beide Gruppen ihren jeweiligen Verbreitungsschwerpunkt oft in unterschiedlichen Biotopen haben (Regenwürmer eher in neutralen, Enchytraeen in sauren Böden), ist mit Ausnahme trockener Standorte eine Abdeckung europäischer Böden möglich.

Für die Erarbeitung einer standardisierten Richtlinie zur Bioakkumulation mit Regenwürmern und Enchytraeen wurden die folgenden Punkte bearbeitet, wobei insbesondere auf Vorarbeiten von FÜLL (1996) zurückgegriffen werden konnte:

- Festlegung des geeigneten Substrats (OECD-Kunsterde oder LUFA-Standardboden)
- Festlegung der geeigneten Testspezies (*Eisenia fetida*, *Lumbricus rubellus* (Regenwürmer) bzw. *Enchytraeus albidus*, *E. luxuriosus* (Enchytraeen))
- Standardisierung der Test-Rahmenbedingungen
- Auswahl der Testsubstanzen und der zu verwendenden analytischen Methoden
- Standardisierung der Applikation und Expositionsdauer
- Standardisierung der Testauswertung, z.B. bezüglich des Einflusses des Darminhalts.

Im Rahmen dieses Vorhabens war es dagegen nicht möglich, eine Differenzierung der Verteilung der Testsubstanz in den verschiedenen Geweben vorzunehmen. In jedem Fall wurde aber die Aufnahme- wie auch die Eliminationsphase abgedeckt.

Bei der Formulierung einer Prüfrichtlinie für einen Akkumulationstest und deren Validierung ist zu prüfen, ob die Rahmenbedingungen an die bestehender Verfahren angeglichen werden können (z.B. Regenwurm-Reproduktionstest (ISO 1999), Modellökosystem-Tests (UBA 1994)). Der Vorschlag, die geplante Akkumulationsrichtlinie hinsichtlich der zu testenden Arten über Regenwürmer hinaus auszuweiten, steht im Einklang mit anderen ggw. diskutierten Richtlinienentwürfen der OECD, speziell der Richtlinie zur Fisch-Bioakkumulation (vgl. OECD Guideline 305), in der eine Vielzahl limnischer wie mariner Spezies alternativ zur Testung aufgeführt sind.

Alle vier Spezies, die in der vorliegenden Studie als Testorganismen eingesetzt wurden, gehören taxonomisch zu den Oligochaeta (Wenigborster), die wiederum eine Unterklasse der Clitellata (Gürtelwürmer) darstellen und damit zum Stamm der Annelida (Ringelwürmer) gehören. Es wurden je 2 Vertreter der Familien der Enchytraeidae (Topfwürmer) und der Lumbricidae (Regenwürmer) als Testorganismen ausgewählt.

4.1.1 Lumbricidae

Seit den Anfängen der Bodenbiologie sind Regenwürmer für viele Standorte Mitteleuropas als die wichtigsten Bodentiere bekannt. Diese Einschätzung beruht nicht nur auf ihrer Biomasse, sondern vor allem auf den wichtigen Funktionen, die sie im Bodenökosystem wahrnehmen: die

mechanische Durchmischung des Bodens, die Beschleunigung des Abbaus organischen Materials und die Verbesserung des Wasserhaltevermögens von Böden durch die Bildung von Ton-Humus-Komplexen seien beispielhaft genannt (ZACHARIAE 1965, SWIFT et al. 1979, PETERSEN & LUXTON 1982). Dabei ist zu beachten, dass diese im allgemeinen als positiv angesehenen Funktionen meist nur von wenigen Arten (speziell Vertikalbohrern wie *Lumbricus terrestris*) bewirkt werden.

Die Unterschiede in der Ökologie der verschiedenen Regenwurm-Arten wurden, unabhängig voneinander, von LEE (1959, zitiert in LEE 1985) und BOUCHE (1977) systematisiert. In der Literatur haben sich folgende Namen für die drei Hauptgruppen durchgesetzt (Originalbenennung von BOUCHE (1977) in Klammern):

Mineralschichtbewohner (= Endogeos):

Leben in horizontalen Gängen im Boden, fressen Erde und nutzen deren organischen Gehalt, nicht pigmentiert, schwache Grabmuskulatur.

Vertikalbohrer (= Aneciques):

Graben vertikale Gänge (bis 3 m tief) mit Öffnung zur Oberfläche, nehmen Blätter an der Oberfläche auf und fressen sie tief im Boden, zumindest dorsal meist rot pigmentiert, starke Grabmuskulatur.

Streuschichtbewohner (= Epigeos):

Keine Gänge im Boden, teilweise sogar an Bäumen lebend, fressen Streuteile und/oder die daran lebende Mikroflora, stark gefärbt, oft als Tarntracht, sehr starke Muskulatur für schnelle Bewegungen, nicht grabend.

Diese Klassifizierung ist inzwischen, hauptsächlich aufgrund der Erfahrungen mit tropischen Regenwürmern, vielfach verfeinert worden. So führte z.B. LAVELLE (1984) für diejenigen Epigeos, die an Bäumen oder Stubben leben, den Begriff Rindenbewohner (Corticole) ein. SATCHELL (1983) interpretierte aufgrund der Unterschiede in Verhalten, Morphologie und Physiologie die beiden Gruppen Streuschicht- bzw. Mineralschichtbewohner als Repräsentanten zweier Evolutionslinien: r-Selektion versus K-Selektion.

4.1.1.1 *Eisenia fetida*

Die Art *Eisenia fetida* (= Kompostwurm; nicht „foetida“ – eine erst 1900 aufgekommene falsche Schreibweise) wurde schon 1829 beschrieben, doch wird heute anerkannt, dass sich unter diesem Namen zwei nah verwandte Arten (*E. fetida* bzw. *E. andrei*) verbergen (zur

taxonomischen Situation siehe RÖMBKE (1996)). Seit AVEL (1929) war bekannt, dass sich zwei anhand ihrer Färbung (gelb-gestreift versus einheitlich dunkelrot) unterschiedliche "Formen" identifizieren lassen. Beide können im gleichen Komposthaufen vorkommen, wobei *E. andrei* durch ihre schnellere Vermehrung oft konkurrenzstärker zu sein scheint. Auf internationaler Ebene wurde das in der Taxonomie spätestens seit Anfang der Achtziger Jahre bekannte Problem (JAENIKE 1982), dass bei der Auswahl des Kompostwurms *Eisenia fetida* nicht eine, sondern zwei Testspezies festgelegt wurden, für ca. 10 Jahre in der Ökotoxikologie kaum zur Kenntnis genommen. Erst 1994 hat die Biologische Bundesanstalt (BBA) die Konsequenz gezogen und den Artrang der beiden Spezies "offiziell" bestätigt. Allerdings wurde der logisch nächstfolgende Schritt, nämlich die Entscheidung für eine der beiden Arten, bis heute nicht vollzogen.

Wie der deutsche Name aussagt, kommen beide *Eisenia*-Arten fast ausschließlich in Ansammlungen organischen Materials vor. Ihre ursprüngliche Heimat liegt wahrscheinlich in der Gegend des Schwarzen Meers. Aufgrund des hohen Temperaturoptimums (ca. 20 - 25°C) können die Tiere unter mitteleuropäischen Bedingungen in Freilandböden keine stabilen Populationen aufbauen. Nahrungsmangel oder Bodeneigenschaften (z.B. ein niedriger pH-Wert) verhindern darüber hinaus die Besiedlung natürlicher Böden. In Komposthaufen oder ähnlichen Standorten können die Würmer dagegen äußerst hohe Dichten erreichen. *Eisenia fetida* bzw. *E. andrei* sind kommerziell erhältlich, beispielsweise als Fischköder. Ihr Reproduktionszyklus ist im Vergleich mit anderen Lumbriciden relativ kurz. Bei Raumtemperatur (20 - 24°C) erreicht sie nach 2 - 3 Monaten Geschlechtsreife (VENTER & REINECKE 1988). Beide Arten bevorzugen ein relativ feuchtes Substrat mit neutralem pH und hohem organischem Kohlenstoffgehalt.

E. fetida wurde im Labor in OECD-Kunsterde gezüchtet. Die Feuchte des Substrats wurde mit deionisiertem Wasser auf ca. 50% TG und der pH-Wert durch Zugabe von Calciumcarbonat auf $\text{pH } 6 \pm 0,5$ eingestellt. Die Zucht erfolgte bei 20 - 24°C im Dauerdunkel. Um Würmer gewünschten Alters zu erhalten, wurden Zuchtansätze mit Kokons gestartet. Die aus diesen Kokons geschlüpften Würmer wurden nach mindestens zwei, höchstens nach 12 Monaten für Tests verwendet. Die Fütterung erfolgte einmal wöchentlich bzw. nach Bedarf mit Grünkorn, Haferflocken, Rinderdung oder Kaffeefiltern.

4.1.1.2 *Lumbricus rubellus*

In natürlichen Regenwurmpopulationen wird *Lumbricus rubellus* von einer Reihe von Autoren (HAIMI ET AL. 1992; STENERSEN & ØIEN 1980; SIMS & GERARD 1985; VAN BRUMMELEN et al. 1996) als dominante Art beschrieben. So ist *Lumbricus rubellus* eine der in Europa am weitesten verbreiteten Regenwürmer (BOUCHE 1972; LARSEN et al. 1992), und gehört nach ROBERTS & DOROUGH (1984) auch in Nordamerika zu den fünf häufigsten Regenwurmart. *Lumbricus rubellus* wird im Rahmen des Umweltprobenbankkonzepts seit vielen Jahren als Akkumulationsindikator verwendet (LEWIS 1985). *Lumbricus rubellus* wird entweder als rein epigäisch, also an der Bodenoberfläche, bzw. in der Streuschicht lebend (CUENDET 1983; CURRY & COTTON 1983; SATCHELL 1983) oder als epigäisch-anektisch (KÜHLE 1988) bezeichnet. Seine Fähigkeit, in tiefere Bodenschichten vorzudringen, ist jedoch begrenzt. Die Art eignet sich nicht zuletzt auf Grund seiner hohen Reproduktionsraten (EIJSAKERS 1983, SATCHELL 1983) für die Zucht und Haltung im Labor; daher sind die Tiere auch kommerziell erhältlich (speziell in den USA). Seine hohe Mobilität macht ihn zu einem Pionierorganismus bei der Besiedlung von Weiden, Müllhalden und Kohlebergwerken sowie biologisch und thermisch gereinigter Böden (EIJSAKERS 1983, TAMIS & DE HAES 1995).

Lumbricus rubellus wurde in kommerziell erhältlicher Gartenerde ohne Düngemittelzusätze gezüchtet. Vor Gebrauch wurde dieses Substrat durch mehrmaliges Tieffrieren bei -18°C defauniert. Wie für *E. fetida* fand die Zucht im Dauerdunkel bei Raumtemperatur statt. Die weiteren Haltungsbedingungen entsprachen denen für *E. fetida*.

4.1.2 Enchytraeidae

Da diese Tiergruppe deutlich weniger bekannt ist als die Regenwürmer, soll ihre Biologie im Folgenden etwas genauer beschrieben werden. Die Familie der Enchytraeen (Borstenwürmer) zählt zur Ordnung der Tubificida bzw. der Unterklasse der Wenigborster (Oligochaeta), die als Klasse der Gürtelwürmer (Clitellata) zum Stamm der Ringelwürmer (Annelida) gehören. Die meist weißlichen Enchytraeen sind durch ihre Größe von ihren Verwandten, den Regenwürmern, leicht zu unterscheiden.

In der Familie der Enchytraeen sind über 600 Arten beschrieben, wobei die Zahl ständig wächst, da noch längst nicht alle Arten klassifiziert sind (NIELSEN & CHRISTENSEN 1959). Sie zeichnen sich durch ihre breite ökologische Toleranz aus und sind weltweit in marinen, limnischen und

terrestrischen Habitaten zu finden. Wie alle Oligochaeten sind die Enchytraeen Zwitterorganismen, die sich durch sexuelle Befruchtung und anschließende Kokonablage vermehren. Einige Arten können sich auch durch unbefruchtete Keimzellen (Parthenogenese) oder asexuelle Fragmentation fortpflanzen (DIDDEN 1993). Ihr Körper besteht aus einer Vielzahl gleicher Segmente. Am Ende des vorderen Körperdrittels befindet sich das Clitellum (Gürtel). Ihre Körperoberfläche ist glatt, immer feucht und dient als Atmungsorgan. Aufgrund fehlender Schutzmechanismen gegenüber Trockenheit bevorzugen diese Organismen überwiegend feuchte Standorte wie Moore und Sümpfe, doch tolerieren viele Arten auch trockene Standorte. Sie sind relativ unempfindlich gegenüber Temperaturschwankungen; so werden optimale Reproduktionsergebnisse in einem Temperaturbereich zwischen 8° und 28° C angegeben (DIDDEN 1993). Enchytraeen kommen in fast allen Bodentypen vor, sind jedoch hauptsächlich an neutralen und leicht sauren Standorten vorzufinden.

Mit einer Länge zwischen 2 und 20 mm und einem Durchmesser von 0,05 - 1,5 mm gehören die terrestrischen Formen zur Mesofauna der Streuauflage und des Mineralbodens. Enchytraeen ernähren sich von partiell zersetztem organischem Material einschließlich der daran lebenden Bodenmikroorganismen (RÖMBKE 1995). Sie werden zu 20% als saprophag und zu 80% als mikrophytophag eingeschätzt (DIDDEN 1993). Der Abbau der Streu wird von ihnen teils direkt durch Fraß, besonders aber indirekt durch die Förderung der Mikroflora beeinflusst (BECK et al. 1988). Mittels Netzbeutelversuchen konnte STANDEN (1978) feststellen, dass die Abbaugeschwindigkeit von Heidestreu sich bei Anwesenheit von Enchytraeen der Art *Cognettia sphagnetorum* erhöhte. Diese Förderung erwies sich als stark klimaabhängig (im Winter war sie kaum nachweisbar). Eine durch diese Förderung verbesserte Nährstoffverfügbarkeit und damit verstärktes Pflanzenwachstum ist schwer quantifizierbar. Durch die Fraßtätigkeit von Enchytraeen kommt es zur Ausbildung einer sehr feinkörnigen Krümelstruktur, deren Stabilität höher ist als die von unbearbeitetem Boden, der Aufbau von Ton-Humus-Komplexen unterbleibt jedoch nach ZACHARIAE (1965). Aufgrund ihrer Steuerung des Abbaus organischen Materials sind sie als wichtiger Teil der saprophagen Mesofauna zu bezeichnen (DIDDEN 1993).

Wenn man extrem anthropogen beeinflusste Standorte wie Klärschlamm oder Äcker ausschließt, so liegt die durchschnittliche Anzahl dieser Würmer in einem Bereich zwischen 20000 und 60000 Ind/m² (RÖMBKE et al. 1997). Auffallend ist die große Schwankungsbreite aller Angaben: so kann die Abundanz unabhängig vom Biotop zwischen wenigen tausend und ca. 150000

Individuen variieren. Gewisse Tendenzen sind aber erkennbar: an sauren Standorten liegt die Zahl oft, aber nicht immer, höher als auf basischen Flächen. Die hohe Schwankungsbreite innerhalb der jeweiligen Biotope ist - ebenso wie bei den Regenwürmern - in der Regel abhängig von diversen Standortfaktoren. Auch im Jahresverlauf schwankt ihre Dichte erheblich: So sind im Sommer und Winter ein Minimum, im späten Frühling und im Herbst ein Maximum zu finden. An bestimmten Standorten (z.B. deutsche Buchenwälder) stellen die Tiere ihrer Biomasse nach den Hauptteil der Bodeninvertebraten (RÖMBKE 1995). Nicht zuletzt dienen Enchytraeen zahlreichen Bodenbewohnern als Nahrung und bilden damit ein wichtiges Glied in terrestrischen Nahrungsnetzen (LOREAU 1983).

Etwas enger liegen die bisher untersuchten Standorte bei Zugrundelegung der Biomassedaten zusammen: ungefähr 0,4 - 1,2 g TG/m² beträgt die durchschnittliche Enchytraeenbiomasse, wobei die Schwankungsbreite innerhalb jedes Biotoptyps zwar erheblich, doch geringer als bei der Abundanz ist. Im Vergleich zu anderen Gruppen der Mesofauna ist die durchschnittliche Artenzahl der Enchytraeen relativ klein: je nach Standort 1 - 30. Mit Ausnahme von basischen Laubwaldstandorten, die in ihrer Faktoren-Kombination offenbar besonders viele ökologische Nischen bereitstellen, kann die Artenzahl oft bis auf ca. 3 zurückgehen.

Anthropogene Eingriffe führen meist zu einer Änderung der Besatzdichte, z.B. bei Umwandlung naturnaher Standorte in Ackerland oder bei Düngung mit Kalk bzw. Mineralsalzen. Eine ausführliche Darstellung der Nutzung von Enchytraeen in der terrestrischen Ökotoxikologie ist RÖMBKE & MOSER (2001) zu entnehmen. Die Wirkung anthropogener Stressfaktoren auf diese Tiere, speziell von Chemikalien, wurde kürzlich von DIDDEN & RÖMBKE (2001) zusammengefasst.

Die Kultivierung von Enchytraeen im Labor ist, mit Ausnahme einiger Spezies der Gattung *Enchytraeus*, problematisch (DIDDEN 1993). Wegen dieser Möglichkeit der Haltung und Zucht im Labor, ihrer wichtigen ökologischen Rolle und ihrer weiten Verbreitung, wurden zwei Arten der Gattung *Enchytraeus*, nämlich *Enchytraeus albidus* und *Enchytraeus luxuriosus* als Standardorganismen für die Testung der Bioakkumulation im terrestrischen Medium ausgewählt.

4.1.2.1 *Enchytraeus albidus*

Enchytraeus albidus Henle 1837 (Weißer Topfwurm) ist mit einer Länge von bis zu 25 mm einer der größten Vertreter der Oligochaetenfamilie Enchytraeidae (Bell 1958; **Abb. 1**). Die Art wird oft in Ansammlungen organischen Materials (Seetang, Kompost), aber, seltener, auch in Wiesen bzw. Ackerflächen gefunden (KASPRZAK 1982). *E. albidus* ist kommerziell erhältlich, da die Tiere als Futter für Zierfische verwendet werden.

In der Ökotoxikologie wurde dieser Wurm schon in mehreren Untersuchungen eingesetzt, so etablierte sich seine Verwendung z.B. als Standardorganismus im Enchytraeen-Reproduktionstest (ERT) (ISO 2001; OECD, 2000a). Die verfügbaren Testdaten und die damit mögliche Vergleichbarkeit sprechen für diese Art als Testorganismus. In **Abb. 2** sind Exemplare dieser Art in einer mit rekonstituiertem Wasser befüllten Petrischale dargestellt.

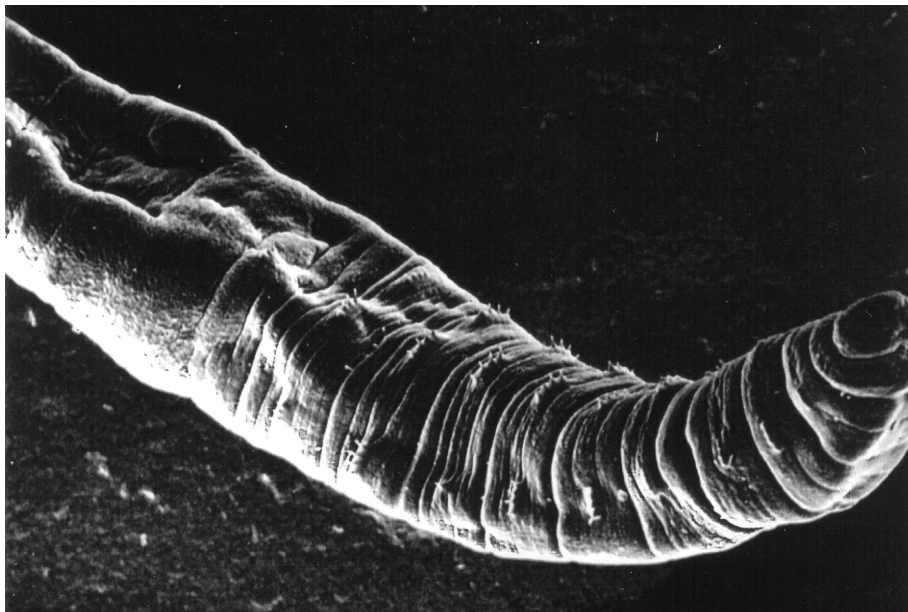


Abb. 1: Ventrale Ansicht von *Enchytraeus albidus* (20-fache Vergrößerung).

Die Topfwürmer wurden im Labor bei ca. 20° C in zusatzfreier Gartenerde kultiviert, wobei sie 1-2 mal wöchentlich mit gemahlenen Haferflocken gefüttert werden. Für die Versuche kamen ausschließlich adulte Tiere zum Einsatz (vorhandenes Clitellum). Ferner wurde darauf geachtet, dass sich die Tiere hinsichtlich ihrer Größe nicht wesentlich unterschieden. Die benötigte Anzahl an Individuen (mind. 1200) wurde vor Testbeginn in entsprechendes Testsubstrat zur Akklimatisierung umgesetzt.



Abb. 2: *Enchytraeus albidus* in einer mit rekonstituiertem Wasser befüllten Petrischale.

4.1.2.2 *Enchytraeus luxuriosus*

Mit einer Länge von ca. 8 – 13 mm ist diese Art kleiner als der vorher beschriebene *E. albidus*. Sie wurde erst vor kurzem aufgrund von Funden in Schleswig-Holstein als eigene Art identifiziert (SCHMELZ & COLLADO 1999). *E. luxuriosus* ist morphologisch nah mit den unter den Oberbegriffen *E. minutus* und *E. buchholzi* geführten Arten verwandt, weswegen sie wahrscheinlich in der Vergangenheit oft unter den Namen dieser Spezies beschrieben wurde (SCHMELZ & COLLADO 1999). Tiere dieses Artenkomplexes kommen in mitteleuropäischen Böden häufig vor. Ihre ökologische Relevanz und damit die mögliche Transformation der Testdaten auf das Freiland, sowie die schnelle Vermehrung sprechen für *E. luxuriosus* als Testorganismus. Die Auswahl der Würmer erfolgt nach identischen Kriterien wie bereits für *E. albidus* beschrieben.

E. luxuriosus wurde sowohl in zusatzfreier Gartenerde als auch zusätzlich auf Agar gezüchtet (**Abb. 3**). Die Haltung im Labor erfolgte unter konstanten Bedingungen. Der Temperaturbereich lag bei 18 ± 2 °C, der pH-Wert des Substrats bei $6 \pm 0,5$. Die Tiere wurden wöchentlich mit feingemahlenden Haferflocken gefüttert und das Zuchtsubstrat befeuchtet. Wie bei *E. albidus* wurden auch hier nur adulte, akklimatisierte Tiere für die Tests eingesetzt.

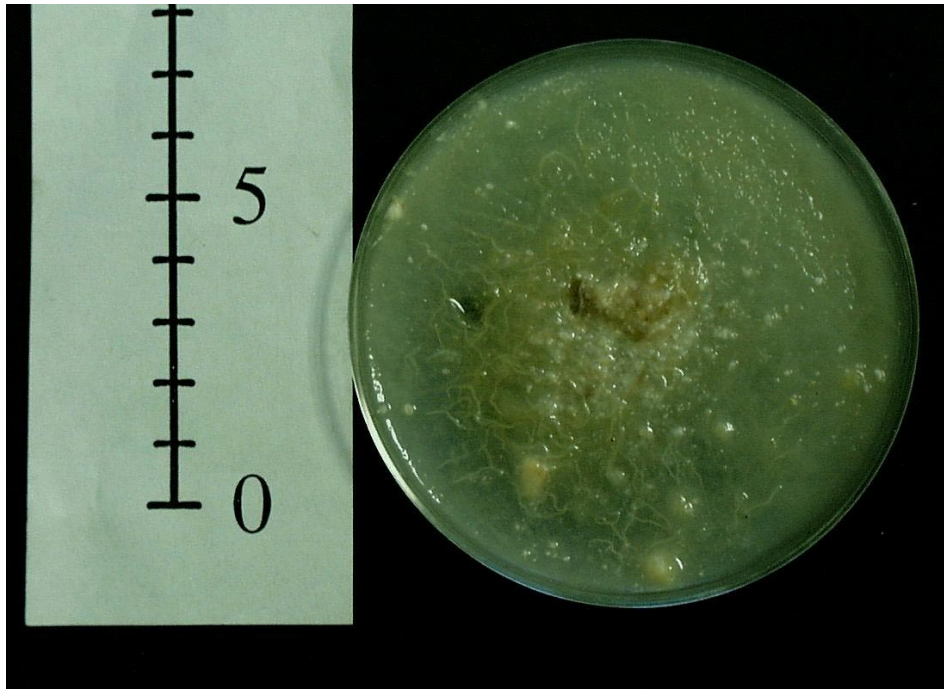


Abb. 3: Stammkultur von *Enchytraeus luxuriosus* auf Agar, Skala in cm.

4.2 Testsubstrate

Für die Bioakkumulationsversuche wurden zwei Testsubstrate ausgewählt: Kunsterde nach OECD-Guideline 207 (1984) und ein natürlicher Standardboden (St. 2.2 der LUFA Speyer). Für die OECD-Kunsterde spricht deren standardisierte Zusammensetzung. Aufgrund der weitgehend konstanten Eigenschaften wie pH-Wert und Feuchte sind Daten aus Tests mit Kunsterde untereinander sehr gut vergleichbar. Ferner ist eine Nutzung in Modellen zur Übertragbarkeit der Daten aus akuten bzw. chronischen Tests möglich. Der Einsatz des natürlichen Bodens vereinfacht den Vergleich mit der Freilandsituation. **Tab. 1** gibt eine Kurzübersicht über die wichtigsten Bodeneigenschaften beider Testsubstrate.

Bei beiden Testsubstraten wurden pH-Wert und Wassergehalt bestimmt. Die Überprüfung des pH-Werts erfolgte nach der DIN-Norm 19684, Teil 1 (1977). Dabei werden ca. 10 g luftgetrocknete Erde mit 25 ml 0,01 M CaCl_2 versetzt. Die Bodenprobe wird mit einem Magnetrührer aufgewirbelt und der pH-Wert mit einem pH-Meter (Schott CG 840) bestimmt. Die Bodenfeuchte wird durch Trocknen von ca. 10 g Erde bei 105° C ermittelt. Aus der Gewichtsdifférenz wird der Wassergehalt des Bodens als Prozentanteil des Trockengewichts errechnet (DIN 19683, Teil 4, 1973).

Tab. 1: Eigenschaften der verwendeten Testsubstrate (WK = Wasserhaltekapazität).

Substrat	pH-Wert	Org. C	Sandgehalt	Bodenart	Feuchte	Max. WK
OECD	6,0 ± 0,5	5,6%	70%	Kunsterde	50%	60 – 120%
LUFA	5,7 ± 0,2	2,2%	73%	Sandiger Lehm	39%	50%

4.2.1 Kunsterde nach OECD Guideline 207

Die nach OECD-Richtlinie Nr. 207 (OECD 1984) hergestellte Kunsterde (KE) setzt sich wie folgt zusammen (Prozentangaben bezogen auf das Trockengewicht):

10% Torf (55% C-Anteil, 95% organischer Gehalt, luftgetrocknet)

20% Kaolin (Kaolinitgehalt über 30%)

ca. 69% Quarzsand (Korngröße zwischen 0,05 und 0,2 mm > 50%)

ca 1% Calciumkarbonat (pH-Wert Einstellung auf 6,0 ± 0,5)

Die Kunsterde wurde nach der im Enchytraeen-Reproduktionstest beschriebenen Methode hergestellt (RÖMBKE & MOSER 1999). Angesetzt wurden die Bestandteile für 30 kg TG Testsubstrat. Drei Kilogramm handelsüblicher Torf wurde mit einem Häcksler zerkleinert und mit einem 5 mm Siebeinsatz gesiebt. Alle Komponenten (3 kg Torf, 12 kg Quarzsand, 6 kg Kaolin) wurden mehrere Stunden in einem Betonmischer gemischt. Nach Einstellung des pH-Werts (6,0 ± 0,5) durch Zugabe von CaCO₃ wurde der Testboden bei Raumtemperatur gelagert. Drei bis vier Tage vor Testbeginn wurde die benötigte Substratmenge mit rekonstituiertem Wasser auf 50% Feuchte, bezogen auf das Trockengewicht, eingestellt und bis Testbeginn bei Raumtemperatur gelagert. Da die Applikation der Testchemikalien ausschließlich über den Quarzsand erfolgte, wurden 30% des Quarzsandes erst nach dem Aufbringen der Testsubstanzen mit den übrigen Bestandteilen der Kunsterde vermischt.

4.2.2 Natürlicher Standardboden LUFA 2.2

Als zweites Testsubstrat wurde der natürliche Standardboden Typ Nr 2.2 mit der Chargen-Nr. Sp 2.21200 der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer (LUFA 2.2) verwendet. Der unter dokumentierten Bedingungen entnommene Boden, ein sandiger Lehm, wurde luftgetrocknet und auf 2 mm Korngröße gesiebt. Mit 2,17% Gehalt an organischem Kohlenstoff liegt dieser Wert deutlich unter dem der OECD-Kunsterde. Hinsichtlich Azidität (pH-Wert = 5,7) ähneln sich beide Testböden. Die Restfeuchte der verwendeten

Charge betrug 10% vom Trockengewicht. Nach einigen Versuchen bezüglich optimaler FeuchteEinstellung (Zusammendrücken einer kleinen Menge Bodens bis kleine Wassertropfen zwischen den Fingern auftauchen (RÖMBKE & MOSER 1999)), wurde der Wassergehalt auf 38,8% TG eingestellt.

4.3 Modellchemikalien

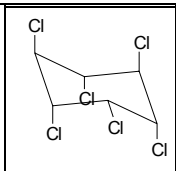
Im Rahmen des Forschungsvorhabens sollten Bioakkumulationsuntersuchungen mit zwei unterschiedlichen Modellchemikalien durchgeführt werden. Es wurden das Insektizid Lindan (γ -Hexachlorcyclohexan), ein schwach bis mäßig lipophiles Pflanzenschutzmittel ($\log P_{ow}$ 3,63; RIPPEN 1999) und die „mittel lipophile“ Umweltchemikalie Hexachlorbenzol ($\log P_{ow}$ 5,72; RIPPEN 1999) verwendet. Beide Chemikalien werden in Freilandmessungen häufig nachgewiesen. Es gibt eine Fülle von Daten zur Bioakkumulation dieser beiden Modellchemikalien im Falle von aquatischen und endobenthischen Organismen. Beide Chemikalien gelten als relativ stabil, so dass bei den geplanten Testbedingungen keine Gefahr einer photochemischen oder hydrolytischen Zersetzung bestand. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen zum Metabolismus durchgeführt wurden, sei an dieser Stelle daraufhingewiesen, dass in Bioakkumulationsstudien mit Tubificiden (EGELER et al. 1997) keinerlei Metabolismus beider Substanzen beobachtet wurde.

4.3.1 Lindan

Lindan ist das γ -Isomer von Hexachlorcyclohexan (HCH). 1983 wurden weltweit ca. 15000 t reines Lindan und dazu ca. 23000 t in technischem HCH enthaltenes Lindan produziert, wobei das technische HCH neben anderen Isomeren 10 – 17% Lindan enthält. Die Produktionsmenge in der Bundesrepublik betrug 1983 1500 t und 1985 weniger als 1000 t. Die in die Umwelt gelangende Menge wird auf weltweit 38000 t/a geschätzt, natürliche Quellen sind dabei unwahrscheinlich (RIPPEN, 1994). Verwendung fand das γ -HCH als Insektizid auf Böden (andere Isomere sind unwirksam), zur Behandlung von Saatgut, zur Parasitenbehandlung von Nutztieren sowie zur Bekämpfung von Holzschädlingen in Gebäuden und als Holzschutzmittel. Obwohl die Anwendung von technischem HCH in Deutschland seit 1988 verboten ist, für Lindan laut Pflanzenschutzverordnung bis 2000 eine Anwendungsbeschränkung galt und es in Zukunft EU-weit verboten sein wird, ist es in nahezu allen Umweltkompartimenten nachweisbar. Die Konzentrationen im Boden reichen bis zu 72 $\mu\text{g/kg}$ TG in Deutschland (Nähe Bayreuth,

1985) (DURNER et al., 1990), wobei die Schwankungen von der Bodennutzung und -behandlung abhängig sind (RIPPEN, 1999). **Tab. 2** zeigt einige wichtige Kenndaten von Lindan.

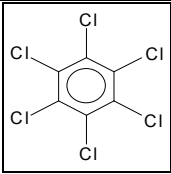
Tab. 2: Kenndaten zur Mobilität und Persistenz sowie zur Ökotoxikologie von Lindan. Alle Daten soweit nicht anders gekennzeichnet aus RIPPEN (1999) bzw. LfU (1993); ¹ EGELER (1998); ² MELLER (1996).

Chemische Bezeichnung	γ -1,2,3,4,5,6,-Hexachlorcyclohexan
CAS-Nr.	58-89-9
Synonyme	Lindan
Abkürzung	γ -HCH
Summenformel	C ₆ H ₆ Cl ₆
Strukturformel	
Molare Masse	290,83 g/mol
Aggregatzustand (25°C)	fest
Wasserlöslichkeit (20°C)	6,2 mg/L
Henry-Konstante (20°C)	56*10 ⁻⁶
Dampfdruck bei 20°C	0,0029 Pa
Adsorbierbarkeit im Boden	K _{OC} = 640-7000
Verteilungskoeffizient (n-Octanol/Wasser)	log P _{OW} = 3,66
Akkumulierbarkeit (BCF)	<i>Tubifex tubifex</i> ¹ : 4,7 Daphnie: 810 Fisch: 770 Polychaeten: 1240
Toxizität (LC ₅₀)	Regenwurm (<i>Eisenia fetida</i> 14 d): 59 mg/kg TS; (<i>Lumbricus terrestris</i> 14 d): 113 mg/kg TS Sedimentbewohner (<i>T. tubifex</i>) ² > 1000 mg/kg Fisch (Zebrabärbling 48 h): 60-90 µg/L Pflanze (Grünalge 96 h): 2,5 mg/L

4.3.2 Hexachlorbenzol

Die weltweite Produktion von Hexachlorbenzol (HCB) betrug 1993 schätzungsweise 5000 t. Die Herstellung in Deutschland belief sich 1990 auf ca. 1500 t. Dabei wurde es hauptsächlich als Ausgangsstoff für die Herstellung des Gummi-Additivstoffes Pentachlorthiophenol verwendet. Zusätzlich kann HCB als Nebenprodukt bei der Herstellung von Tetrachlorethan und chlorierten Pestiziden anfallen (BUA 1994).

Tab. 3: Kenndaten zur Mobilität und Persistenz sowie zur Ökotoxikologie von HCB. Alle Daten soweit nicht anders gekennzeichnet aus RIPPEN (1999); ¹ EGELER (1998); ² MELLER (1996).

Chemische Bezeichnung	Hexachlorbenzol
CAS-Nr.	118-74-1
Abkürzung	HCB
Summenformel	C ₆ Cl ₆
Strukturformel	
Molare Masse	284,78 g/mol
Aggregatzustand (25°C)	fest (kristallin)
Wasserlöslichkeit (15-25°C)	8*10 ⁻³ mg/L
Henry-Konstante (20°C)	0,028
Dampfdruck bei 20°C	1,1*10 ⁻³ Pa
Adsorbierbarkeit im Boden	K _{OC} = 3900-48000
Verteilungskoeffizient (n-Octanol/Wasser)	log P _{OW} = 5,7
Akkumulierbarkeit (BCF)	<i>Tubifex tubifex</i> ¹ : 6,6 Daphnie: 200-1130 Fisch (Zebraäbrbling): 20000
Toxizität (LC ₅₀)	Regenwurm (<i>Eisenia fetida</i>): > 1000 mg/kg TS Sedimentbewohner (<i>T. tubifex</i>) ² : > 1000 mg/kg Fisch (Zebraäbrbling 96h): 22 mg/L Pflanze (Grünalge 96h): > 0,01 mg/L

Das in die Umwelt gelangende HCB ist rein anthropogenen Ursprungs, die Menge wird für 1984 auf 1 – 10 t in Deutschland und auf 10 - 10000 t weltweit geschätzt (RIPPEN, 1999). Wie

das Lindan wird auch das HCB in nahezu allen Umweltkompartimenten nachgewiesen. Im Boden wurden Konzentrationen bis 340 µg/kg TG (Maulach, Deutschland, 1989) gemessen (RIPPEN, 1999). **Tab. 3** gibt eine Übersicht über die wichtigsten Kenndaten dieser Chemikalie.

4.4 Vorversuche zur Toxizitätsbestimmung

Im Vorfeld der Bioakkumulationsstudien war es notwendig, die Toxizität der beiden Modellchemikalien gegenüber den Testorganismen zu erfassen.

Für die Regenwürmer konnte diese Frage auf Basis der bestehenden Literaturdaten geklärt werden. Im Falle der Enchytraeen mussten, da in der Literatur keinerlei Daten zur Toxizität der beiden Modelchemikalien vorlagen, Tests zur akuten und chronischen Toxizität durchgeführt werden. Es wurden insgesamt acht Untersuchungen mit beiden Testorganismen und Testböden zur Bestimmung der akuten Toxizität durchgeführt (**Tab. 4**).

Tab. 4: Ergebnisse der Toxizitätsstudien mit Lindan und HCB in OECD und LUFA-Boden.

Spezies	Substrat	Endpunkt	Lindan			HCB		
Ergebnisse der Untersuchungen zur akuten Toxizität								
			NOEC	LOEC	EC50	NOEC	LOEC	EC50
<i>E. luxuriosus</i>	OECD	Mortalität	1000	>1000	n.b.	1000	>1000	n.b.
<i>E. luxuriosus</i>	LUFA	Mortalität	1000	>1000	n.b.	1000	>1000	n.b.
<i>E. albidus</i>	OECD	Mortalität	100	1000	316,2	1000	>1000	n.b.
<i>E. albidus</i>	LUFA	Mortalität	100	1000	316,2	1000	>1000	n.b.
Ergebnisse der Enchytraeen-Reproduktionstests								
			NOEC	LOEC		NOEC	LOEC	
<i>E. albidus</i>	OECD	Mortalität	62,5	125		>1000	n.b.	
	OECD	Reproduktion	31,25	62,5		>1000	n.b.	
<i>E. luxuriosus</i>	OECD	Mortalität	>1000	n.b.		>1000	n.b.	
	OECD	Reproduktion	250	500		>1000	n.b.	

n.b. = nicht bestimmt (es wurde keine Konzentration > 1000 mg/kg TG getestet)

Da keine unterschiedliche Toxizität bezüglich der beiden Testsubstrate festgestellt wurde, beschränkte sich die Ermittlung der chronischen Toxizität mittels des Enchytraeen-

Reproduktionstests (ERT) nur auf die OECD-Kunsterde. Die Ergebnisse der akuten Toxizitätstest zeigten, dass beide Enchytraeenarten bezüglich des Parameters Mortalität nicht sehr empfindlich auf die Modellchemikalien reagierten. Die Reproduktion von *E. albidus* wurde durch Lindan ab einer Konzentration von 62,5 mg/kg (TG) signifikant beeinflusst. Auch AMORIM et al. (1999) fanden bei *E. albidus* in Kunsterde keine Wirkung auf die Mortalität, aber eine Beeinträchtigung der Reproduktion ab ca. 6 mg/kg. *E. luxuriosus* reagierte deutlich unempfindlicher. Effekte waren bei dieser Spezies erst ab einer Konzentration von 500 mg/kg (TG) nachzuweisen.

4.5 Radioaktivitätsmessung

Die beiden Modellchemikalien HCB und Lindan wurden in ^{14}C -markierter Form eingesetzt. Als Lösungsmittel wurden n-Hexan im Falle von ^{14}C -Lindan sowie Cyclohexan für HCB verwendet. Die radioaktiv markierten Chemikalien wurden bei $-20^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ gelagert. **Tab. 5** informiert über Herkunft, Reinheit und spezifische Aktivität der Tracer.

Tab. 5: Angaben zu Herkunft, Reinheit und spezifischen Aktivität der Testsubstanzen.

	Hexachlorbenzol	Lindan
Tracer	U- ^{14}C -Hexachlorbenzol	U- ^{14}C -Lindan
Lieferant	Internationale Isotope, München (IIM)	Internationale Isotope, München (IIM)
Spezifische Aktivität	5mCi/mmol	30 mCi/mmol
Radiochemische Reinheit	> 98%	> 95%
Lieferzustand	Fest	in Dichlormethan gelöst
Lösungsmittel (für Bioakkumulationsversuche)	Cyclohexan	n-Hexan

4.6 Exposition und Bioakkumulation

4.6.1 Wahl der Testsubstanzkonzentrationen

Die Testsubstanzkonzentrationen richteten sich zum einen nach den ermittelten bzw. aus der Literatur bezogenen Toxizitätsdaten und zum anderen nach ebenfalls aus der Literatur bekannten Umweltkonzentrationen beider Modellchemikalien. Sie wurden so gewählt, dass eine ausreichende Messgenauigkeit auf Grund der spezifischen Aktivität der eingesetzten Tracer

und der verwendeten Methode gewährleistet war. Um auch geringe Anreicherungen schon zuverlässig messen zu können wurden die verwendeten Testsubstrate mit einer Radioaktivität von ca. 20000 dpm/g (FG) dotiert. Die entsprechenden Testsubstanzkonzentrationen lagen für Lindan zwischen 31 und 123 µg/kg TG und für HCB zwischen 643 und 1100 µg/kg TG. **Tab. 6** zeigt eine Übersicht über die jeweiligen Lindan- und HCB-Konzentrationen in den einzelnen Testsystemen.

Tab. 6: Nominale Lindan- und HCB - Konzentrationen aufgelistet nach Testsystem.

Testorganismus	Testsubstrat	Testsubstanz	Konzentration (µg/kg TG)
<i>E. luxuriosus</i>	Kunsterde	Lindan	126
<i>E. luxuriosus</i>	Kunsterde	HCB	1100
<i>E. luxuriosus</i>	LUFA 2.2	Lindan	91
<i>E. luxuriosus</i>	LUFA 2.2	HCB	643
<i>E. albidus</i>	Kunsterde	Lindan	31
<i>E. albidus</i>	Kunsterde	HCB	770
<i>E. albidus</i>	LUFA 2.2	Lindan	105
<i>E. albidus</i>	LUFA 2.2	HCB	789
<i>E. fetida</i>	Kunsterde	Lindan	124
<i>E. fetida</i>	Kunsterde	HCB	909 (819)*
<i>E. fetida</i>	LUFA 2.2	Lindan	123
<i>E. fetida</i>	LUFA 2.2	HCB	868
<i>L. rubellus</i>	Kunsterde	Lindan	190
<i>L. rubellus</i>	Kunsterde	HCB	909
<i>L. rubellus</i>	LUFA 2.2	Lindan	203
<i>L. rubellus</i>	LUFA 2.2	HCB	976

* In Klammern: Konzentration in der nachträglich angesetzten Eliminationsphase

Die große Variationsbreite für Lindan erklärt sich aus der Verwendung zweier unterschiedlicher Chargen der radioaktiv markierten Prüfsubstanz, die sich hinsichtlich der spezifischen Aktivität unterschieden. Generell ist anzumerken, dass die Herstellung exakt gleicher Konzentrationen für alle Tests nur mit einem hohen Arbeitsaufwand möglich gewesen wäre. Da

die Bioakkumulation einer Substanz in nicht toxischen Bereichen jedoch nur gering von der Testsubstanzkonzentration beeinflusst wird, war dieser Arbeitsaufwand nicht notwendig. Wie durch einen Vergleich der **Tab. 4** und **Tab. 6** deutlich wird, lagen die Testsubstanzkonzentrationen um mehrere Größenordnungen unter den ermittelten Effektkonzentrationen für die jeweilige Chemikalie, so dass eine Beeinflussung der Bioakkumulation durch toxische Effekte ausgeschlossen werden kann. Wie geplant lagen die eingesetzten Konzentrationen im Bereich von in der Umwelt gefundenen Bodenkonzentrationen (RIPPEN 1999).

4.6.2 Applikation der Testsubstanzen

Die Applikation der Testsubstanzen erfolgte nach der bei EGELER et al. (1999b) beschriebenen Methode. Dabei wurde die jeweilige Testchemikalie in geeigneten Lösungsmitteln (n-Hexan im Fall von Lindan und Cyclohexan für HCB) auf einen Teil des Testsubstrats aufgebracht. Bei der OECD-Kunsterde wurde ausschließlich über die Quarzsandfraktion appliziert. 30% (TG) Quarzsand wurden separat abgewogen und die Testchemikalie über das Lösungsmittel eingebracht. Das Volumen des Lösungsmittels wurde mit 0,25 ml/g Quarzsand so gewählt, dass eine vollständige Benetzung des Sandes gewährleistet war. Während das Lösungsmittel abdampfte, wurde der Quarzsand mehrmals mit einem Edelstahlspatel gerührt. Nach vollständigem Abdampfen wurden die restlichen Bodenkomponenten in einem großen Becherglas zusammengefügt. Mittels eines Rührwerks wurde die fertiggestellte Kunsterde intensiv gemischt, um eine homogene Verteilung der Testsubstanz zu ermöglichen. Analog dazu wurde mit dem LUFA-Boden verfahren. Ein 30%iger Gewichtsanteil der LUFA-Erde wurden abgewogen und nach erfolgter Dotierung auf die beschriebene Weise mit dem fehlenden 70%igen Gewichtsanteil vervollständigt. Zur Überprüfung der Testsubstanzkonzentration wurden jeweils Aliquots der dotierten Fraktion und des kompletten Ansatzes entnommen und deren Radioaktivität bestimmt.

4.7 Versuchsaufbau

Die Bioakkumulationsstudien fanden in einem geschlossenen System statt. Dessen Kernstück bestand aus einem belüfteten Inkubationsbehälter, der die eigentlichen Testgefäße enthielt und in einem Kühlbrutschrank untergebracht war (**Abb. 4**). Mit Hilfe einer Saugpumpe wurde Raumluft durch den Behälter und anschließend über ein System von gekühlten Waschflaschen geleitet. Diese Waschflaschen dienten zum Auffangen von in der Abluft enthaltener Radioak-

tivität. Flasche 1 war leer und sollte verdunstetes Wasser zurückhalten. Die Flaschen 2 und 3 enthielten je 250 mL Toluol, in dem flüchtige organische Verbindungen aufgefangen werden sollten. In den beiden letzten Waschflaschen befanden sich je 250 mL 10%ige Kalilauge zum Auffangen von radioaktivem CO₂, das im Zuge von Abbauvorgängen entstehen könnte. Die Versuche erfolgten bei 20 ± 2 °C im Dauerdunkel.

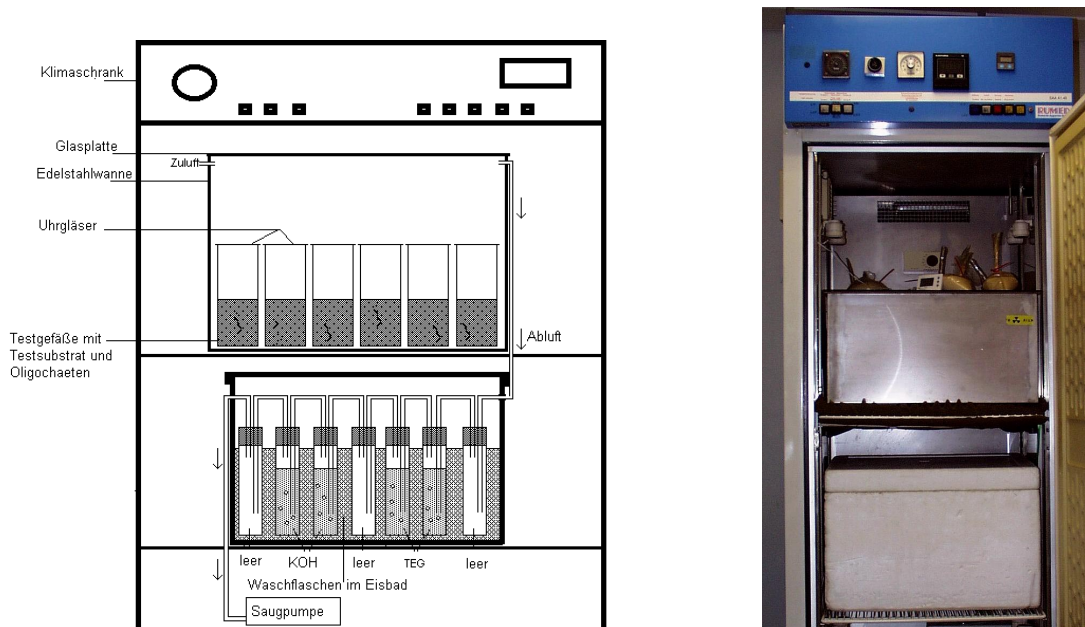


Abb. 4: Schematische (Bruns et al. 2000) und photographische Darstellung der Versuchsanordnung; KOH: Kalilauge (10 Gew.-%); TEG: Triethylenglykol.

4.8 Ansatz der Testgefäße

Als Testgefäße dienten Bechergläser ohne Ausguss (**Abb. 5**). Um die Verdunstung zu minimieren und um sicherzustellen, dass die Testorganismen die Testgefäße nicht verlassen, wurden diese mit Uhrgläsern verschlossen. Im Falle der Regenwürmer wurden die Gefäße zusätzlich noch mit luftdurchlässiger Gaze, die mit einem Gummiring an den Testgefäßen befestigt wurde, versehen. Dies war notwendig, da sich im ersten Versuch gezeigt hatte, dass die Regenwürmer ansonsten in der Lage waren die Testgefäße zu verlassen. Für die Enchytraeen wurden 50 mL Bechergläser mit einer Höhe von 70 mm und Uhrgläser mit einem Durchmesser von 40 mm verwendet. Die Regenwurmtests wurden in 250 mL Bechergläsern mit einer Höhe von 120 mm und einem Durchmesser von 60 mm durchgeführt. Die Uhrgläser hatten hier ebenfalls einen Durchmesser von 60 mm. Bei der Durchführung von Regenwurmtests wurden, unabhängig vom verwendeten Testsubstrat und der getesteten Spezies 50 g (TG) Boden je Testgefäß eingefüllt (jeweils ein Individuum pro Replikat). In Versuchen mit *E. albidus*

wurden entsprechend 20 g (TG) und im Falle von *E. luxuriosus* 10 g (TG) Boden eingesetzt. Nach 4 – 6 tägiger Akklimatisierung im entsprechenden Testsubstrat wurden 20 Enchytraeen pro Replikat aussortiert und bei gleichzeitiger Einwaage der benötigten Substratmenge im Testgefäß exponiert. Hinsichtlich der Feuchtgewichte unterschieden sich die Gewichte der Testsubstrate zwischen Tests die mit Kunsterde und dem LUFA Standardboden 2.2 durchgeführt wurden auf Grund der unterschiedlichen prozentualen Wasseranteile. Die verwendeten Testsubstrate wurden mindestens 48 h vor Testbeginn, oder dem Einsatz von Testorganismen (Akklimatisierung), befeuchtet. Zum Zeitpunkt der Feuchteeinstellung fehlten in den jeweiligen Böden die zur Dotierung benötigten Gewichtsanteile. Die zur Befeuchtung zugegebene Wassermenge entsprach jedoch immer dem Volumen für die gesamte Testsubstratmenge. Innerhalb des Zeitraums von 48 h war sichergestellt, dass der Torfanteil der Böden Wasser aufgenommen und der Quellvorgang weitgehend abgeschlossen war. Die dotierten Bodenanteile wurden mit Hilfe eines Rührwerks mit den restlichen (je 70% TG) Bodenmengen homogen vermischt. Die Homogenität der Testsubstanzverteilung wurde durch die in den einzelnen Versuchen durchgeführten Radioaktivitätsbestimmungen bestätigt. Die Befüllung der Testgefäße erfolgte ausschließlich mit derart vorbereiteten Testsubstraten. In **Tab. 7** sind die Befüllung der Testgefäße mit Testsubstrat, Wurmbiomasse und Futter, spezifiziert nach Spezies, zusammengefasst. Die aufgrund der langen Testdauer notwendige Fütterung erfolgte einmal zu Testbeginn (die in **Tab. 7** angegebene Menge wurde nach Applikation der Testsubstanz eingemischt). Danach wurde wöchentlich die jeweilige Futtermenge auf die Substratoberfläche mit der obersten Bodenschicht vermengt, um sowohl eine Störung der Tiere als auch Pilzbesatz zu verhindern. Gefüttert wurden gemahlene Haferflocken (Enchytraeen) bzw. Kaffeesatz (bei *E. fetida* allein, bei *L. rubellus* im Verhältnis 1 : 5 mit Rinderdung gemischt).

Tab. 7: Durchschnittliche Biomasse, Substrat- und Futtermenge pro Testgefäß

Testspezies	Durchschnittliche Biomasse pro Testgefäß (mg FG)	OECD-Boden (g)	LUFA 2.2 Boden (g)	Wöchentliche Futtermenge (mg)
<i>E. luxuriosus</i>	12 ± 6 (SD)	10 (TG) 15 (FG)	9 (TG) 12,5 (FG)	20
<i>E. albidus</i>	127 ± 33 (SD)	20 (TG) 30 (FG)	18 (TG) 25 (FG)	50
<i>E. fetida</i>	398 ± 132 (SD)	33 (TG) 50 (FG)	36 (TG) 50 (FG)	500
<i>L. rubellus</i>	1153 ± 453 (SD)	33 (TG) 50 (FG)	36 (TG) 50 (FG)	600

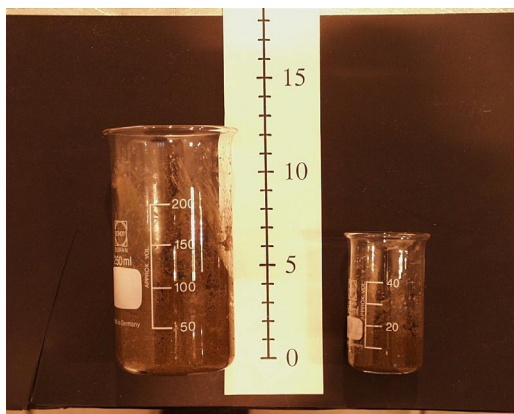


Abb. 5: Photographische Darstellung der Testgefäße, Skala in cm.

Tab. 8: Fütterung der Regenwürmer in den Versuchsansätzen.

Spezies	Substrat	Testsubstanz	Futter
<i>E. fetida</i>	Kunsterde	Lindan	500 mg Rinderdung + 100 mg Kaffeesatz
<i>E. fetida</i>	LUFA 2.2	Lindan	500 mg Rinderdung + 100 mg Kaffeesatz
<i>E. fetida</i>	Kunsterde	HCB	Brennesselpulver ¹
<i>E. fetida</i>	Kunsterde	HCB	500 mg Rinderdung + 100 mg Kaffeesatz
<i>E. fetida</i>	LUFA 2.2	HCB	600 mg Kaffeesatz
<i>L. rubellus</i>	Kunsterde	Lindan	500 mg Kaffeesatz
<i>L. rubellus</i>	LUFA 2.2	Lindan	600 mg Kaffeesatz
<i>L. rubellus</i>	Kunsterde	HCB	500 mg Rinderdung + 100 mg Kaffeesatz
<i>L. rubellus</i>	LUFA 2.2	HCB	600 mg Kaffeesatz

¹ hohe Mortalität, Versuch mit Rinderdung und Kaffeesatz wiederholt

4.9 Probennahme und Radioaktivitätsmessung

In der Regel wurden während der Aufnahmephase und der Elimination jeweils 6 Messpunkte genommen. Das Probennahmeschema sah Messpunkte nach 1, 2, 4, 7, 14 und 21 Tagen Aufnahme bzw. Eliminationsphase vor. In Abhängigkeit vom Testverlauf und bereits vorliegenden Ergebnissen konnte es hierbei zu leichten Verschiebungen kommen. Der letzte Tag der Aufnahmephase war zugleich der erste Tag der Elimination. Zu diesen Zeitpunkt wurden bei allen Versuchen Wurm- und Bodenproben genommen, die spätere Untersuchungen zum Metabolismus ermöglichen sollten. Die Radioaktivität in den Enchytraeen und den Testsubstraten

wurde nach Zugabe geeigneter Szintillationscocktails im Liquid Scintillation Counter (LSC) bestimmt. Hierzu wurde der in **Abb. 6** dargestellte TriCarb 2500 TR Flüssig-Szintillationszähler (Packard) verwendet. Als Zählcocktail diente bei den Enchytraeenproben Hionic-Fluor (Packard), die Bodenproben wurden mit Rotiszint Ecoplus (Roth) versetzt. Hionic-Fluor wurde ebenfalls zur Radioaktivitätsbestimmung der KOH-Lösung der Waschflaschen verwendet, da es für alkalische und saure Proben konzipiert ist. Die Triethylenglycol- und Kondenswasserproben wurden mit dem für hydrophile und hydrophobe Lösungen geeignetem Rotiszint Ecoplus versetzt. Gemessen wurde die Radioaktivität als dpm (disintegrations per minute) in 20 ml Polyethylenvials über einen Zeitraum von fünf Minuten. Die Radioaktivitätsbestimmung der Regenwürmer erfolgte nach Verbrennung in einem Gemisch aus Carbo-sorb E (Packard) und Permafluor (Packard), das Volumenverhältnis betrug hierbei 1:1. Die Angaben über die Radioaktivität erfolgten in dpm (disintegrations per minute). Über die spezifische Aktivität der verwendeten Tracer war eine Umrechnung in Substanzkonzentrationen im Organismus und dem jeweiligen Testsubstrat möglich.



Abb. 6: TriCarb 2500 TR Flüssig-Szintillationszähler (Packard)

4.9.1 Testsubstrate

Zu jedem Messpunkt wurde die Radioaktivität des Testsubstrats in allen aufgelösten Replikaten bestimmt. Hierfür wurden je Replikat zwei Bodenproben mit einem Frischgewicht von ca. 0,6 g entnommen. Die Probenentnahme erfolgte an zwei nicht benachbarten Stellen im Testgefäß, um Aufschluss über die homogene Verteilung der Testsubstanz zu erlangen. Die restliche Bodenmenge wurde im Falle der Versuche mit Enchytraeen komplett eingefroren. Bei den Versuchen mit Regenwürmern wurden je zwei 20 ml Polyethylenvials komplett mit Boden

befüllt und die restliche Menge entsorgt. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte in 20 mL Polyethylenvials. Abhängig von der dotierten Substanz wurden je 3 ml n-Hexan (Lindan) oder Cyclohexan (HCB) zugesetzt, und die Bodenproben für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Nach Abkühlung wurden sie mit 12 ml Cocktail versetzt. Da die gemessene Radioaktivität zunächst mit der Zeit anstieg, wurden die Proben im Abstand von mehreren Tagen bis zur Konstanz der Werte gemessen. Ebenso wurden auch undotierte Bodenproben genommen, um den Background zu bestimmen.

4.9.2 Enchytraeidae

Die Enchytraeen wurden vorsichtig mit einer Federstahlpinzette aus dem Testsubstrat ausgelesen und gezählt. Um sie von anhaftenden Bodenpartikeln zu säubern, wurden sie in rekonstituiertes Wasser (siehe **Abb. 7**) überführt und zum Abtrocknen kurz auf ein Kleenextuch gelegt. Mit der Federstahlpinzette wurden sie nun als "Wurmklumpen" in ein vorgewogenes 20 ml PE-Vial überführt und ihr Gewicht durch Rückwaage ermittelt. Anschließend folgte das Abtöten durch Einfrieren im Tiefkühler bei -20°C . Nach ca. 20 min wurden die Vials aus dem Tiefkühler entnommen und nach der von EGELER et al. (1999a,b) beschriebenen Methode zur Radioaktivitätsmessung aufgearbeitet. Nach Auftauen wurden die Wurmproben mit je 1 ml Gewebssauflöser (Soluene 350, Packard) versetzt, für ca. eine Stunde im Heizschrank (Heraeus) bei 60°C inkubiert und anschließend 10 min im Ultraschallbad behandelt. Nach vollständigem Auflösen (Sichtkontrolle) und Abkühlen der Proben wurden 100 µl rauchender Salzsäure zugesetzt. Damit wurde ein rasches Abklingen der wegen des stark basischen Gewebssauflösers auftretenden Chemolumineszenz erreicht. Nach Zugabe von 10 ml Hionic-Fluor wurden die Proben im LSC gemessen. Wurmproben aus undotiertem Substrat dienten zur Ermittlung des Leerwertes. Es wurden pro Messpunkt 4 Replikate aufgelöst. Parallel zu den Testgefäßen, die der Untersuchung der Aufnahme und Elimination dienten, wurden in allen Versuchen je 4 Kontrollgefäße mitgeführt, die fremdstofffreies Testsubstrat enthielten, sich aber ansonsten nicht von den übrigen Testgefäßen unterschieden.

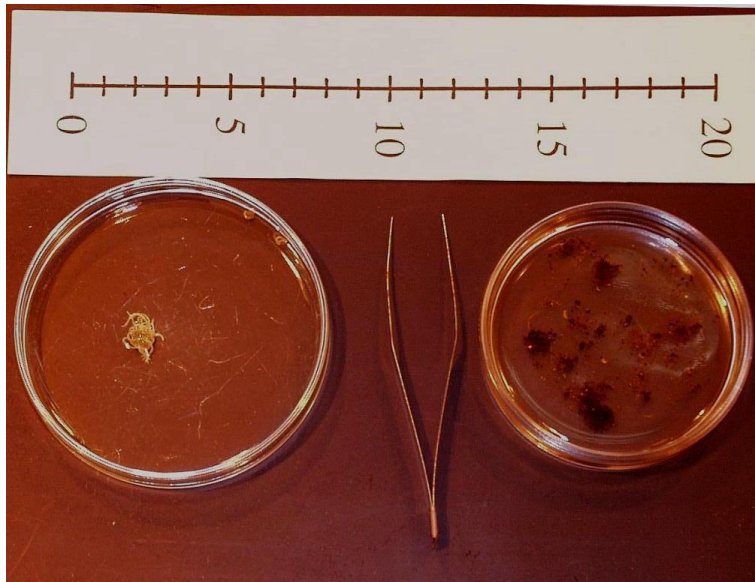


Abb. 7: Photographische Darstellung der Behandlung von Enchytraeenproben. Die rechte Petrischale dient zur Reinigung der Enchytraeen von Bodenpartikeln. Daneben eine Federstahlpinzette, sowie in der linken Petrischale von anhaftenden Bodenpartikeln "gesäuberte" Enchytraeen der Art *E. albidus* (Skalierung in cm).

4.9.3 Lumbricidae

Pro Messpunkt wurden mindestens vier Replikate aufgelöst, d.h. die Regenwürmer wurden aus den Testgefäßen aussortiert. Zwei Exemplare wurden, nach Reinigung in rekonstituiertem Wasser und Bestimmung des Gewichts, durch Einfrieren im Tiefkühler bei -20°C abgetötet. Die beiden übrigen Exemplare dienten der Untersuchung der Auswirkung einer Darmentleerung auf die Ergebnisse der Bioakkumulationsuntersuchungen. Nach Reinigung in rekonstituiertem Wasser wurde diese Würmer gewogen und in Petrischalen überführt, die mit befeuchtetem Fließpapier ausgelegt waren. Die Tiere wurden über Nacht in diesen Petrischalen gehalten und am nächsten Tag wurde die Gewichts Differenz bestimmt. Die Würmer wurden anschließend analog der oben beschriebenen Vorgehensweise behandelt. Die Kotpartikel wurden den Petrischalen entnommen und nach Gewichtsbestimmung wie die Bodenproben bearbeitet. Die Petrischalen wurden mit einem mit Aceton befeuchtetem Papiertuch ausgewischt, und die Radioaktivität dieser Wischprobe nach Zusatz von Rotiszint Ecoplus (Roth) bestimmt. Auf diese Art wurden je Messpunkt jeweils zwei Anreicherungsfaktoren mit und ohne Darmentleerung bestimmt. Parallel zu den Testgefäßen, die der Untersuchung der Aufnahme und Elimination dienten, wurden in allen Versuchen je 4 Kontrollgefäße mitgeführt, die fremdstofffreies Testsubstrat enthielten, sich aber ansonsten nicht von den übrigen Testgefäßen unterschieden.

4.10 Elimination

Neben der Anreicherung der beiden Modellsubstanzen wurde auch die Elimination untersucht. Um die Elimination der Modellsubstanzen aus den Organismen zu untersuchen, wurden die Testorganismen nach erfolgter Aufnahme in unkontaminiertes Testsubstrat umgesetzt. Zu diesem Zeitpunkt war in der Regel das Gleichgewicht zwischen Aufnahme- und Eliminationsvorgängen und somit das steady state erreicht. Die Probennahmen und die Messung während der Eliminationsphasen unterschieden sich in der praktischen Durchführung nicht von den bereits beschriebenen Arbeitsschritten, die bei der Akkumulation angewendet wurden. Es wurde lediglich auf die Erstellung von Rückstellproben des jeweiligen Testsubstrates verzichtet, da die Radioaktivität im Boden für weitere Untersuchungen (z.B. Metabolismus) zu gering war. Die während der Versuche mitgeführten Kontrollen wurden entsprechend den Replikaten, die zur Untersuchung der Elimination dienten, in frisches fremdstofffreies Testsubstrat überführt.

4.11 Lipidbestimmung

Für *E. albidus*, *E. fetida* und *L. rubellus* wurde außerdem der Lipidgehalt gemessen. Die in Kap. 6.4 angegebenen Lipidwerte beziehen sich auf das jeweilige Frischgewicht des Organismus und wurden mit einer modifizierten Methode nach Smedes (DE BOER et al. 1999) bestimmt.

4.12 Auswertung

Während der Aufnahmephase wurden Anreicherungsfaktoren für die einzelnen Replikate ermittelt. Bei den Regenwürmern wurden somit Werte für einzelne Individuen und bei den Enchytraeen für die Gesamtheit der in einem Replikat zum Messzeitpunkt befindlichen Tiere bestimmt. Die Anreicherungsfaktoren ergaben sich aus dem Quotient der Radioaktivität in dpm pro Gramm Frischgewicht im Organismus (dpm/g FG) und der Radioaktivität in dpm pro Gramm Frischgewicht im Testsubstrat (dpm/g FG). Für die Aufnahmephase wurden in den einzelnen Versuchen mindestens zu sechs Messpunkten jeweils vier Anreicherungsfaktoren ermittelt. Mit Hilfe des Computerprogramms SPSS wurden durch nichtlineare Regression Aufnahme- und Eliminationskurven an die ermittelten Daten angepasst. Die Berechnungen wurden sowohl basierend auf den Einzelwerten als auch auf Basis der Mittelwerte der vier zu einem Messpunkt ermittelten Anreicherungsfaktoren durchgeführt. Im weiteren wird aus-

schließlich auf die Berechnungen eingegangen, die auf Basis der Mittelwerte durchgeführt wurden. Die den Berechnungen zu Grunde liegenden Gleichungen sind im folgenden detailliert dargestellt. Bei konstanter Fremdstoffkonzentration im umgebenden Medium kann die Aufnahme eines Fremdstoffes mit folgender Gleichung mathematisch beschrieben werden:

$$1) \quad V_{\text{ein}} = \frac{dC_A}{dt} = k_s * C_{\text{TS}}$$

V_{ein} = Aufnahmegeschwindigkeit
 k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme
 C_{TS} = Fremdstoffkonzentration im Testsubstrat
 C_A = Fremdstoffkonzentration im Organismus

Die Elimination eines Fremdstoffes erfolgt im einfachsten Fall nach:

$$2) \quad V_{\text{aus}} = \frac{dC_A}{dt} = k_e * C_A(t)$$

V_{aus} = Eliminationsgeschwindigkeit
 k_e = Geschwindigkeitskonstante der Elimination

Da es sich bei Aufnahme und Elimination um parallel ablaufende Prozesse handelt, gilt für Aufnahme- und Eliminationsphase die nach Integrierung aus 1 und 2 entstehende Gleichung:

$$3) \quad C_A(t) = \frac{k_s}{k_e} * C_{\text{TS}} * (1 - e^{-k_e * t})$$

Wenn das Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Elimination erreicht ist, gilt

$$4) \quad V_{\text{ein}} = V_{\text{aus}}$$

Unter dieser Voraussetzung ergibt sich nach Gleichung 1 und 2

$$5) \quad C_{\text{TS}} * k_s = C_{\text{AGl}} * k_e$$

C_{AGl} = Substanzkonzentration im Organismus im Gleichgewicht

Durch Umformung von (5) ist die Berechnung der Aufnahmekonstanten k_s möglich. Die Akkumulation eines Fremdstoffes im Organismus kann aus dem Verhältnis der Aufnahme und Eliminationskonstanten beziehungsweise dem Verhältnis der Fremdstoffkonzentration im Tier und im umgebenden Medium angegeben werden. Im Gleichgewichtszustand wird dieses Verhältnis als Bioakkumulationsfaktor (BAF) bezeichnet.

$$6) \quad \text{BAF} = \frac{k_s \cdot C_{\text{Agl}}}{k_e \cdot C_{\text{TS}}} = \frac{k_s}{k_e} \cdot \frac{C_{\text{Agl}}}{C_{\text{TS}}}$$

Zur Ermittlung der Eliminationsverläufe werden die Würmer nach Erreichen des steady states in fremdstofffreies Testsubstrat ($C_{\text{TS}} = 0$) umgesetzt. Die Elimination kann im einfachsten Fall mit der folgenden Formel, die sich durch Integrierung von (2) ergibt, beschrieben werden:

$$7) \quad C_A(t) = C_{\text{Agl}} \cdot e^{-k_e \cdot t}$$

k_e = Eliminationskonstante der Elimination

Nicht alle Eliminationsverläufe lassen sich mit diesem "Ein-Kompartimentmodell" ausreichend genau beschreiben. Oft erfolgt die Elimination entsprechend der Verteilung des Fremdstoffs im Organismus, oder aufgrund von metabolischen Veränderungen, aus verschiedenen Kompartimenten mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. In solchen Fällen kann es sein, dass die mathematische Beschreibung durch Verwendung eines „Zwei-Kompartiment-Modells“ verbessert werden kann:

$$8) \quad C_A(t) = A \cdot e^{-k_a \cdot t} + B \cdot e^{-k_b \cdot t}$$

A = Kompartiment 1
 B = Kompartiment 2
 k_a = Eliminationskonstante des 1. Kompartiments
 k_b = Eliminationskonstante des 2. Kompartiments

Mathematisch handelt es sich hierbei um eine zusammengesetzte Exponentialfunktion 1. Ordnung. Die Summe der Kompartimente A und B entspricht der Konzentration des Fremdstoffs im Fisch (im Gleichgewicht). Die beiden Eliminationskonstanten k_a und k_b entsprechen den Steigungen der Eliminationsgeraden.

Ist der Verlauf der Elimination biphasisch kann nach ZOK et al. (1991) die Aufnahmekonstante nicht mit der zuvor beschriebenen Gleichung (3) berechnet werden. In einem solchen Fall ist davon auszugehen, dass auch die Aufnahme durch zwei unterschiedliche Eliminationskonstanten beeinflusst wird. Nach ZOK et al. (1991) ergibt sich für einen solchen Fall nach Differenzierung von Formel (8) und entsprechendem Einsetzen in Gleichung (6) die Aufnahmekonstante k_s für den Fall einer biphasischen Eliminationskinetik wie folgt berechnet.

$$9) \quad k_s = \frac{(A * k_a + B * k_b) * BAF}{A + B}$$

Für die Darstellung der Eliminationsverläufe, dienten die Mittelwerte des letzten Messpunktes (falls kein steady state erreicht war) oder der Mittelwert der Anreicherungs faktoren der drei letzten Messpunkte (steady state erreicht) als 100%-Wert. Nach OECD (1996) gilt das steady state als erreicht, wenn die Abweichung dreier aufeinanderfolgender Anreicherungs faktoren nicht um mehr als 20% differiert. Die denn Berechnungen zu Grunde liegenden Messwerte waren, wie bereits für die Aufnahme beschrieben, auf die ^{14}C -Aktivität in dpm pro Gramm Frischgewicht normiert. Als ein Maß für die Anpassung der Kurven an die Messpunkte wurde der Determinationskoeffizient (r^2) angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 *Enchytraeus albidus*, OECD-Kunsterde, Lindan

Der erste Bioakkumulationsversuch wurde mit *Enchytraeus albidus*, OECD-Kunsterde und Lindan durchgeführt. In diesem Versuch wurden neben der Toxikokinetik der Substanz auch weitere Versuchsbedingungen wie z.B. die Versuchsdauer, Reproduktion unter Versuchsbedingungen und Futterbedarf untersucht. So konnte nach einer Aufnahmephase von 60 Tagen, innerhalb derer zusätzlich juvenile Tiere im Testmedium heranwuchsen, eine zweite Elimination untersucht werden. Die unterschiedlichen Aufnahmephasen von 28 bzw. 60 Tagen sowie die daran anschließenden Eliminationen über jeweils 32 Tage, wurden getrennt ausgewertet. Während des zweiten Eliminationsversuchs wurden die Tiere nach 16 Tagen nochmals in undotierte Kunsterde umgesetzt, um zu überprüfen, ob bereits ausgeschiedene radioaktive Testsubstanz die weitere Ausscheidung bemerkbar beeinflusst. Es zeigte sich, dass die zusätzliche Umsetzung der Würmer während der Eliminationsphase keine unterschiedlichen Ergebnisse brachte.

90% der eingesetzten Radioaktivität wurden bei Versuchsende wiedergefunden. Die Konzentration von Lindan in der Kunsterde nahm während der Aufnahmephase von insgesamt 60 Tagen ab. So wurde am ersten Tag der Exposition ein Mittelwert von 10512 dpm/g und am 60. Tag ein Mittelwert von 9477 dpm/g gemessen (bezogen auf das Feuchtgewicht der OECD-Kunsterde). Unter der Voraussetzung, dass Lindan nicht abgebaut wurde, entspricht dies einer Konzentration von 22 µg/kg FG Kunsterde am ersten Tag und einer Konzentration von 19,7 µg/kg FG Kunsterde am 60. Aufnahmetag. Die Abnahme beträgt demnach 907 dpm/g bzw. 9%.

5.1.1 Akkumulation

Die Ergebnisse der Aufnahmekinetiken von ^{14}C -Lindan bei *E. albidus* in OECD-Kunsterde sind in **Abb. 8** dargestellt. Neben den Mittelwerten mit Standardabweichung der Anreicherungsfaktoren sind auch die nichlinearen Regressionskurven angegeben. Je Messzeitpunkt errechnet sich der Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung aus vier Replikaten. **Tab. 9** zeigt die kinetischen Aufnahmeparameter nach 28 und 60 Tagen sowie die Güte der Anpassung der Kurven an die ermittelten Daten, ausgedrückt durch die Determinationskoeffizienten r^2 .

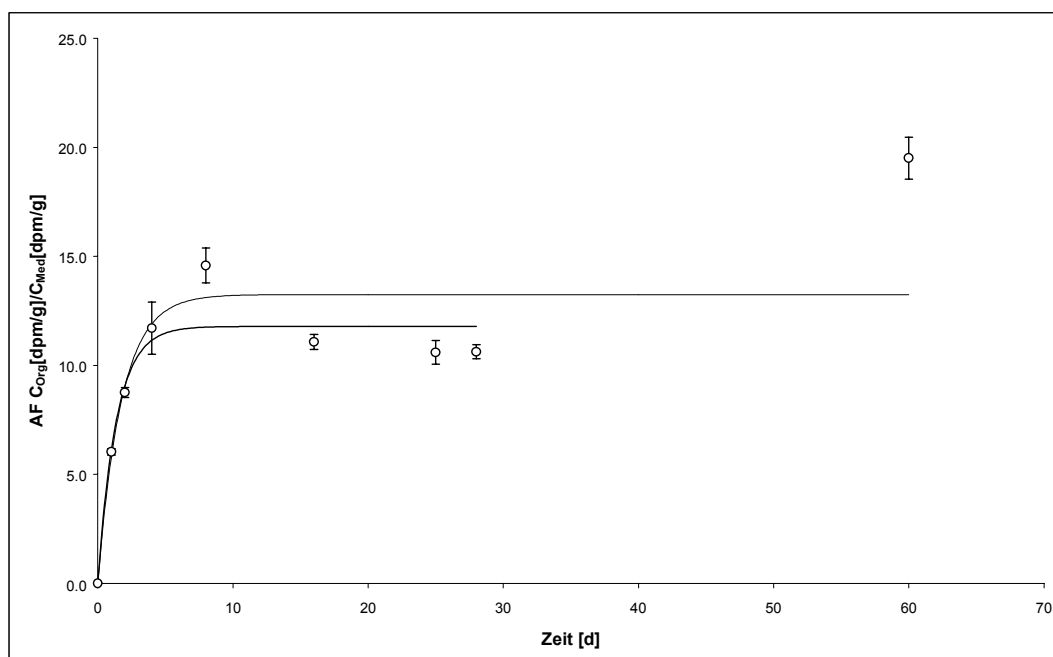


Abb. 8: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -Lindan bei *E. albidus* in OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 60, sowie die Anpassungen einer nichtlinearen Regression für die Aufnahme bis Tag 28 ($r^2 = 0,92$) und Tag 60 ($r^2 = 0,74$).

Tab. 9: Aufnahmeparameter von Lindan bei *E. albidus* in OECD-Kunsterde; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.

Exposition (d)	BAF	k_s (d^{-1})	k_e (d^{-1})	r^2
28	11,8	8,6	0,73	0,92
60	13,3	7,6	0,57	0,74

5.1.2 Elimination

In **Abb. 9** und **Abb. 10** sind die beiden Eliminationsverläufe nach 28 Tagen Aufnahme bzw. 60 Tagen Aufnahme dargestellt. Die einzelnen Daten zur Eliminationskinetik sind in **Tab. 10** aufgelistet. Der in **Abb. 9** dargestellte Kurvenverlauf spiegelt keine weitere Aufnahme wider. Die ermittelten prozentualen Werte variieren um die 50% der für den steady state ermittelten Radioaktivität im Wurm. Die für die beiden letzten Messpunkte ermittelten Werte liegen höher als die vergleichbaren Werte zu den Messpunkten Tag 4 und Tag 7 und führen so dazu, dass mittels der nichtlinearen Regression ein Modell angepasst wird, dass einen Anstieg der Radioaktivität im Wurm berechnet. Da im Testsubstrat jedoch keine weiter radioaktive Substanz zugegeben wurde, kann es zu keinem weiteren Anstieg gekommen sein. Im Versuchs-

verlauf wurden keine Auffälligkeiten beobachtet, die als Erklärung für diesen Kurvenverlauf dienen könnten.

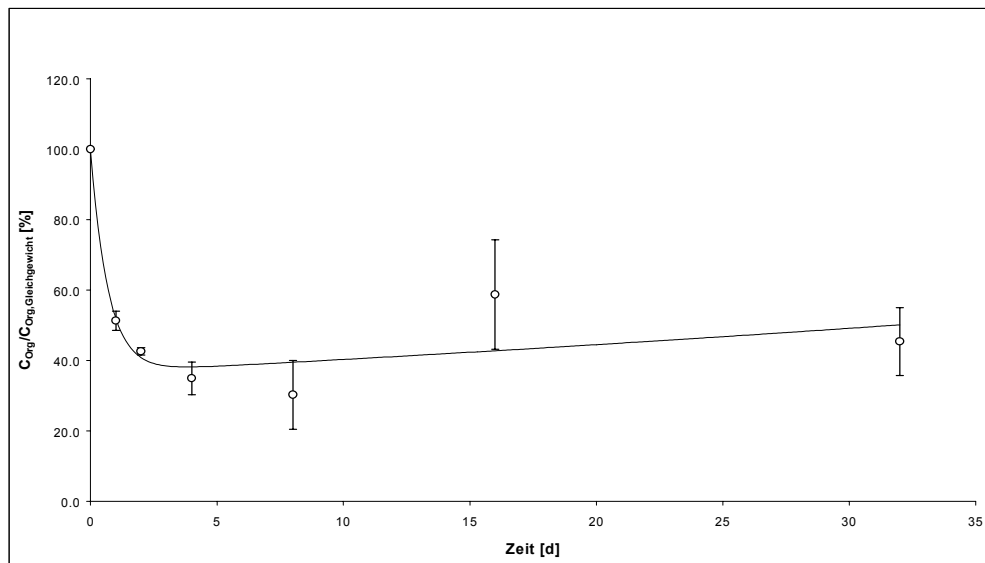


Abb. 9: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -Lindan bei *E. albidus* in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG nach 28 Tagen Aufnahme phase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,88$) an ein Zweikompartmentmodell.

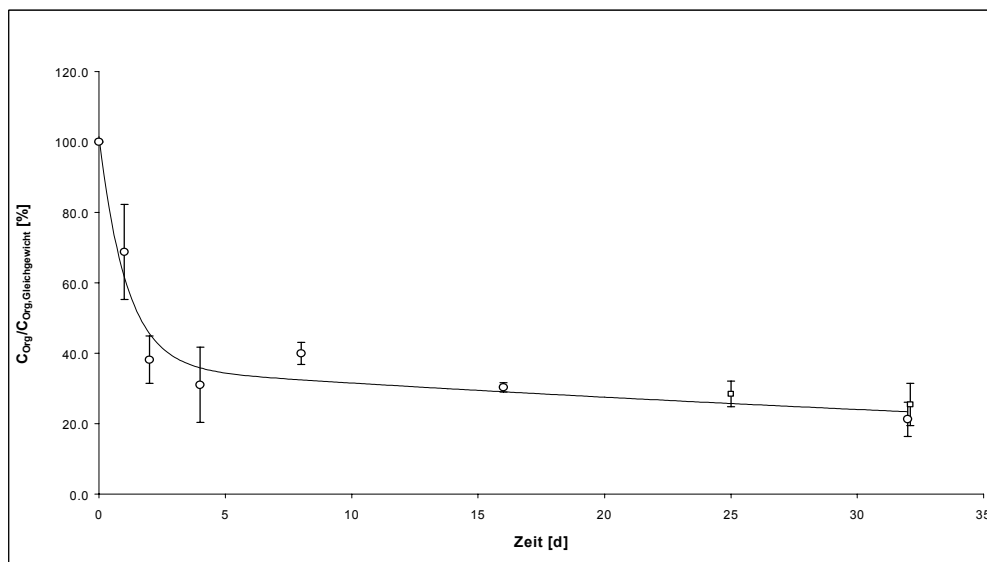


Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -Lindan bei *E. albidus* in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG nach 60 Tagen Aufnahme phase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,95$) an ein Zweikompartmentmodell. Die rechteckig dargestellten Messwerte repräsentieren die Ergebnisse der Replikate, die am 16. Tag nochmals in undotierte Kunsterde umgesetzt wurden.

Tab. 10: Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von Lindan bei *E. albidus* in OECD-Kunsterde nach 28 und 60 Tagen Aufnahme phase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.

Elimination	Restaktivität	Kompartiment A	Kompartiment	k_a (d ⁻¹)	k_b (d ⁻¹)	r^2
1	50,1%	63%	37%	1,4	-0,009	0,88
2	23,4%	65%	36%	0,9	0,013	0,96

5.2 *Enchytraeus albidus*, OECD-Kunsterde, HCB

Die Aufnahme phase wurde bei diesem Versuch über 21 Tage untersucht. Die Radioaktivität betrug am ersten Versuchstag 23524 dpm/g FG Boden, am 21. Tag lag sie bei 21476 dpm/g FG Boden. Dies entspricht einer Konzentration von 601 µg HCB/kg Kunsterde FG bzw. 550 µg HCB/kg Kunsterde FG und einer Abnahme um 9%. Am 21. Expositionstag wurden die Würmer in fremdstofffreie OECD-Kunsterde überführt und die Elimination über 21 Tage untersucht. Die Wiederfindung der Radioaktivität lag bei 96%.

5.2.1 Akkumulation

Die Aufnahmekinetik von ¹⁴C-HCB bei *E. albidus* in OECD-Kunsterde ist in **Abb. 11** dargestellt. Die kinetischen Aufnahme parameter sind in **Tab. 11** aufgelistet. Der Anreicherungs faktor ist mit einem Mittelwert von 20,7 an Tag 21 um 39% höher als am 14. Aufnahmetag (Mittelwert = 12,6). Basierend auf diesen gemessenen Werten ist ein steady state nicht erreicht, da die Schwankungen innerhalb der letzten drei Werte 20% übersteigen (OECD, 1996). Am letzten Aufnahmetag wurden in den vier Replikaten von ursprünglich 20 eingesetzten Würmern je Testgefäß durchschnittlich fünf Würmer wiedergefunden. Die Wurmbiomasse sank von 8,4 mg/Wurm FG als Mittelwert der vier Replikate am ersten Aufnahmetag auf durchschnittlich 4,9 mg/Wurm FG am letzten Expositionstag.

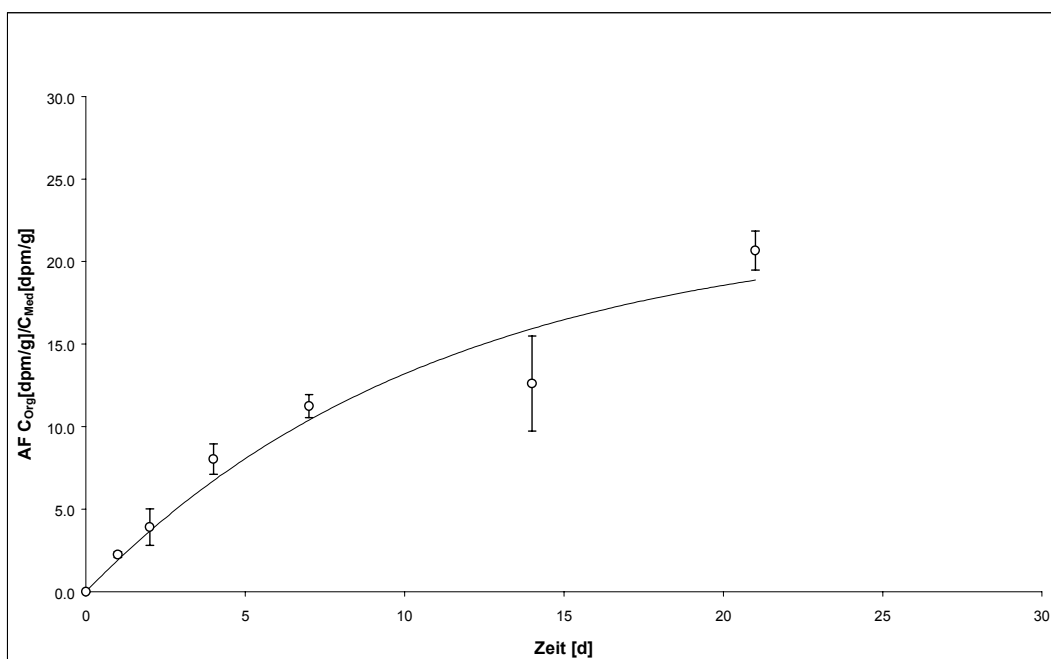


Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -HCB bei *E. albidus* in OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,94$).

In Kap. 6.2.1.1 wird im Detail beschrieben, welche Konsequenzen dieser Kurvenverlauf für die Bestimmung bzw. die Abschätzung des BAF hat.

Tab. 11: Aufnahmeparameter von HCB bei *E. albidus* in OECD-Kunsterde; AF = Akkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.

Exposition (d)	AF	k_s (d^{-1})	k_e (d^{-1})	r^2
21	20,45	1,84	0,09	0,94

5.2.2 Elimination

In **Abb. 12** ist der Verlauf der Elimination gegen die Zeit aufgetragen. Die in den Würmern gemessene Radioaktivität in dpm/g (FG) am 21. Tag der Aufnahmephase wird als 100% festgelegt und die Radioaktivität der Würmer während der Elimination dazu prozentual angegeben. **Tab. 12** zeigt die Eliminationsparameter der angewendeten Zweikompartmentkinetik.

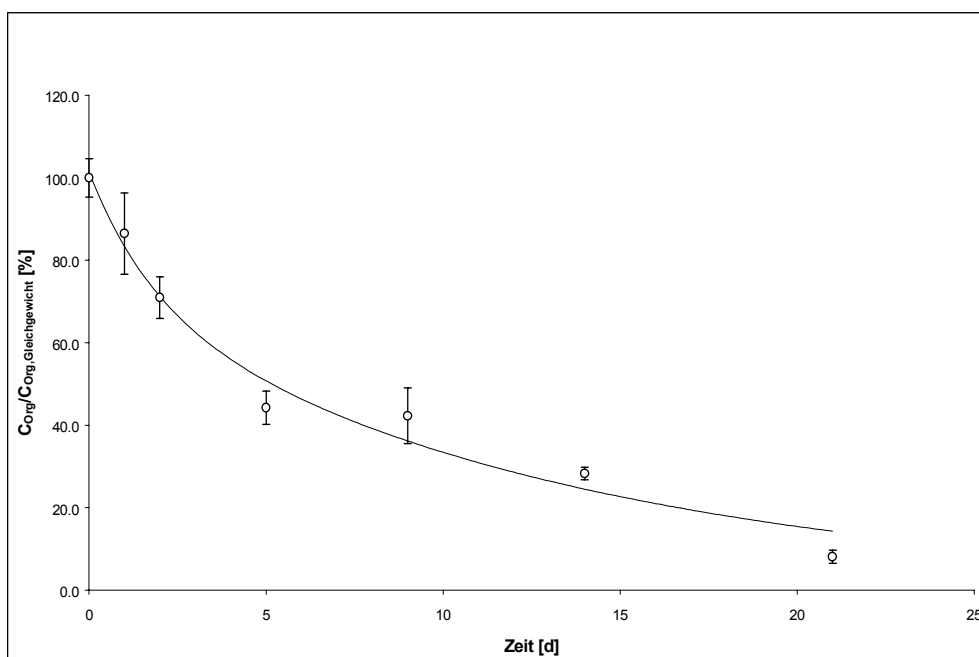


Abb. 12: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -HCB bei *E. albidus* in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG am 21. Tag der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,98$) an ein Zweikompartimentmodell.

Tab. 12: Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von HCB bei *E. albidus* in OECD-Kunsterde nach 21 Tagen Aufnahmephase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.

Restaktivität	Kompartiment A	Kompartiment B	k_a (d^{-1})	k_b (d^{-1})	r^2
14,3%	29%	71%	0,56	0,07	0,98

5.3 *Enchytraeus albidus*, LUFA 2.2, Lindan

Die Aufnahme von Lindan wurde in diesem Versuch über 21 Tage untersucht. Während der Aufnahmephase nahm die Radioaktivität im Boden ab. Am ersten Versuchstag wurde als Mittelwert der vier untersuchten Replikate 16514 dpm/g FG Boden gemessen (entsprechend 72 $\mu\text{g/kg}$ Lindan FG). Am letzten Expositionstag wurde ein Mittelwert von 14473 dpm/g FG Boden (63 $\mu\text{g/kg}$) ermittelt. Dies entspricht einer Abnahme von 13%. Die Elimination der Chemikalie wurde über 21 Tage untersucht. Die Wiederfindung der Radioaktivität betrug 95%. In den mit Triethylenglycol befüllten Waschflaschen wurde eine Radioaktivität von

17880 dpm, in der Kalilauge wurden 67252 dpm gemessen. Bezogen auf die in diesem Versuch eingesetzte Gesamtradioaktivität, wurden 0,07% in beiden “TEG-Waschflaschen“ und in den mit Kalilauge befüllten Flaschen wurden 0,26% der Gesamtradioaktivität gefunden.

5.3.1 Akkumulation

Die Aufnahmekinetik von ^{14}C -Lindan bei *E. albidus* in LUFA-Erde wird in **Abb. 13** und die dazugehörigen Parameter werden in **Tab. 13** dargestellt.

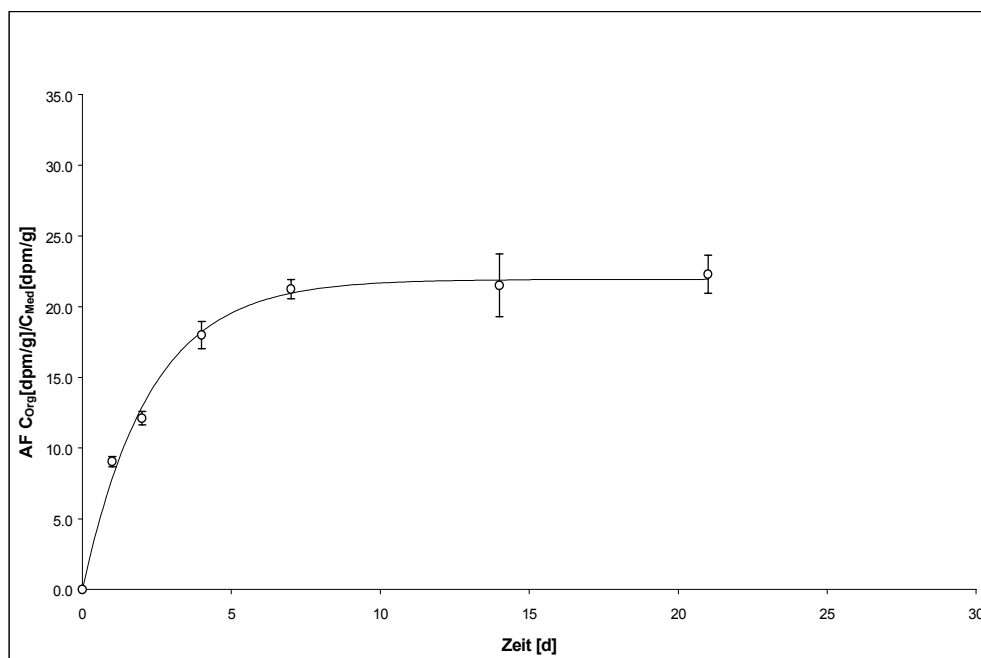


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -Lindan bei *E. albidus* in LUFA-Boden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,99$).

Tab. 13: Aufnahmeparameter von Lindan bei *E. albidus* in LUFA 2.2; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.

Exposition (d)	BAF	k_s (d ⁻¹)	k_e (d ⁻¹)	r^2
21	22	9,68	0,44	0,99

5.3.2 Elimination

In **Abb. 14** ist der Verlauf der Elimination gegen die Zeit aufgetragen. Der Mittelwert der Aktivität in den Würmern der Tage 8, 14 und 21 der Aufnahmephase wurde als 100% herangezogen (steady state) und die Aktivität der Würmer nach erfolgter Elimination ermittelt und in

Bezug zum 100% - Wert angegeben. **Tab. 14** zeigt die Eliminationsparameter der angewendeten Zweikompartmentkinetik.

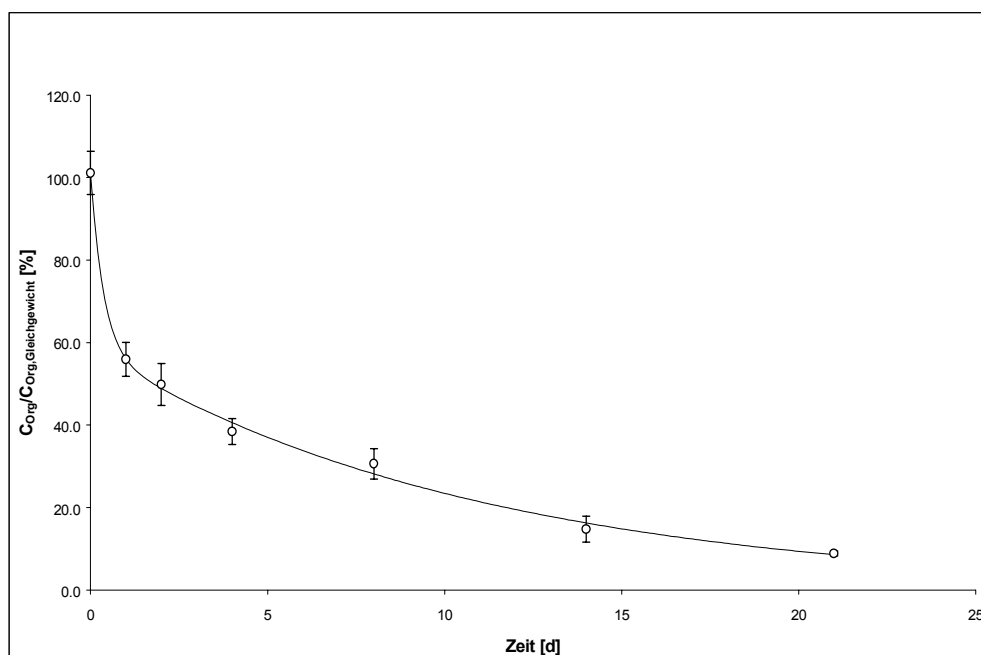


Abb. 14: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -Lindan bei *E. albidus* in unbelasteter LUFA-Erde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,99$) an ein Zweikompartmentmodell.

Tab. 14: Eliminationsparameter der Zweikompartmentkinetik für die Ausscheidung von Lindan bei *E. albidus* in LUFA 2.2 nach 21 Tagen Aufnahmephase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.

Restaktivität	Kompartiment A	Kompartiment B	k_a (d^{-1})	k_b (d^{-1})	r^2
8,6%	42%	58%	2,77	0,09	0,99

5.4 *Enchytraeus albidus*, LUFA 2.2, HCB

Während der 21 tägigen Aufnahmephase nahmen die gemessenen Werte der Radioaktivität von 22480 dpm/g (575 $\mu\text{g/kg}$) am ersten Tag auf 19518 dpm/g (499 $\mu\text{g/kg}$) am letzten Tag ab (bezogen auf das Feuchtgewicht des LUFA-Bodens). Die ermittelte Abnahme beträgt somit 13%. Am Ende der Aufnahmephase wurden die Würmer in undotierte LUFA-Erde umgesetzt

und die Ausscheidung der radioaktiv markierten Substanz über 25 Tage untersucht. Die Wiederfindung in diesem Versuch betrug 94%.

5.4.1 Akkumulation

Die Aufnahmekinetik von ^{14}C -HCB bei *E. albidus* in LUFA-Boden wird in **Abb. 15** und die dazugehörigen Parameter werden in **Tab. 15** dargestellt.

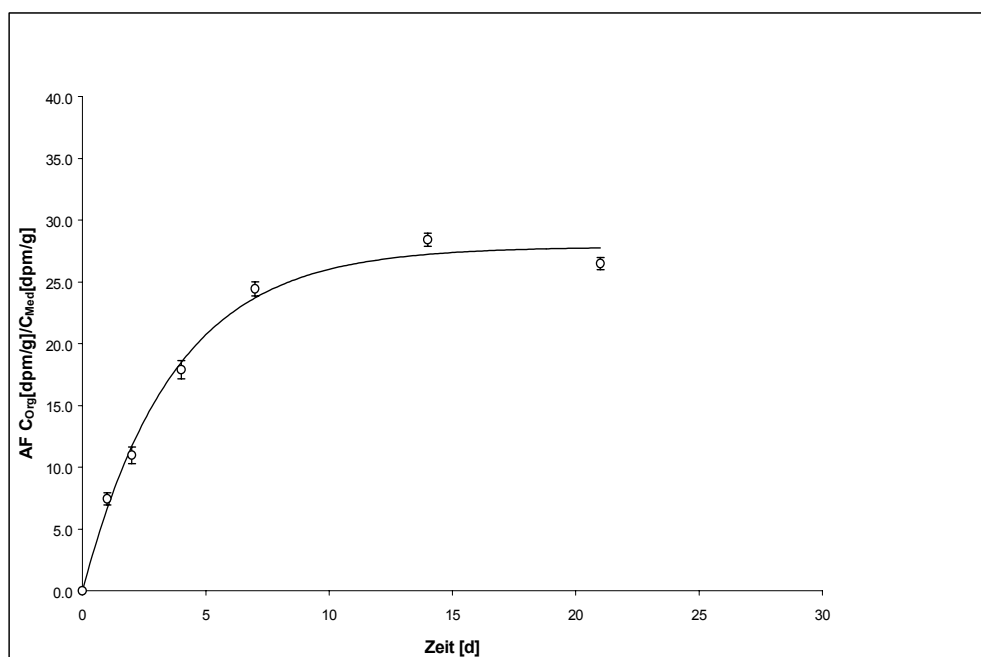


Abb. 15: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -HCB bei *E. albidus* in LUFA-Boden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,99$).

Tab. 15: Aufnahmeparameter von HCB bei *E. albidus* in LUFA 2.2; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.

Exposition (d)	BAF	k_s (d ⁻¹)	k_e (d ⁻¹)	r^2
21	28	7,56	0,27	0,99

5.4.2 Elimination

In **Abb. 16** ist der Verlauf der Elimination gegen die Zeit aufgetragen. Der Mittelwert der Aktivität in den Würmern der Tage 8, 14 und 21 der Aufnahmephase wurde als 100% festgelegt (steady state) und die Radioaktivität der Würmer nach erfolgter Elimination in Prozent dazu.

Tab. 16 zeigt die Eliminationsparameter der angewendeten Zweikompartimentkinetik.

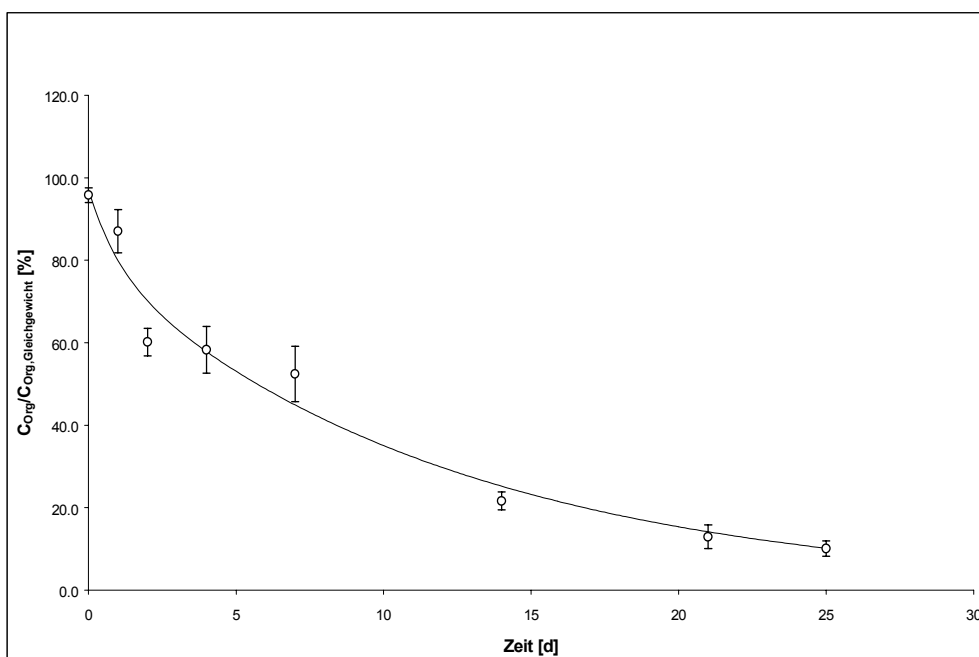


Abb. 16: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -HCB bei *E. albidus* in unbelasteter LUFA-Erde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,97$) an ein Zweikompartimentmodell.

Tab. 16: Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von HCB bei *E. albidus* in LUFA 2.2 nach 21 Tagen Aufnahmephase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsameres Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.

Restaktivität	Kompartiment A	Kompartiment B	k_a (d ⁻¹)	k_b (d ⁻¹)	r^2
10%	17%	80%	1	0,08	0,97

5.5 *Enchytraeus luxuriosus*, OECD-Kunsterde, Lindan

Die Aufnahme von Lindan wurde in dieser Kombination über 21 Tage untersucht. Während der Versuchsdauer nahm die Radioaktivität im Boden ab. Am ersten Versuchstag wurden 16585 dpm/g FG Boden (entsprechend 72 $\mu\text{g/kg}$ FG) und am letzten Expositionstag ein Wert von 15439 dpm/g FG Boden (67 $\mu\text{g/kg}$ FG) gemessen. Dies entspricht einer Abnahme von 7%. Die Elimination der Chemikalie wurde über 21 Tage untersucht. Die Wiederfindung der Radioaktivität betrug in diesem Versuch 86 Prozent.

5.5.1 Akkumulation

Die Aufnahmekinetik von ^{14}C -Lindan bei *E. luxuriosus* in OECD-Kunsterde ist in **Abb. 17** und die dazugehörigen Parameter sind in **Tab. 17** dargestellt. Die ermittelten Anreicherungsfaktoren sinken von 13,6 am 8. Versuchstag auf 9,8 am 14. Tag und 7,9 am letzten Aufnahmetag. Die Wurmbiomasse blieb während der Aufnahmephase mit ca. 0,6 mg/Wurm konstant, ebenso die Anzahl der wiedergefundenen Würmer (Mittelwert 18 Würmer pro Testgefäß über die komplette Aufnahmephase).

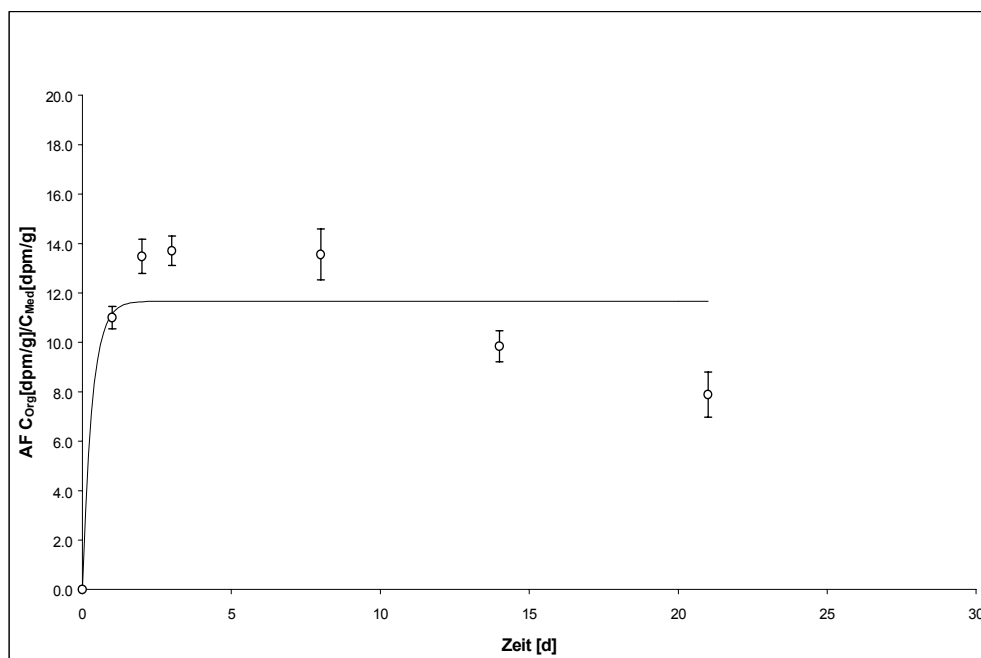


Abb. 17: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -Lindan bei *E. luxuriosus* in OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,8$).

Tab. 17: Aufnahmeparameter von Lindan bei *E. luxuriosus* in OECD-Kunsterde; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.

Exposition (d)	BAF	k_s (d^{-1})	k_e (d^{-1})	r^2
21	11,7	36,9	3,15	0,8

5.5.2 Elimination

In **Abb. 18** ist der Verlauf der Elimination gegen die Zeit aufgetragen. Der Mittelwert der Aktivität in den Würmern am 21. Tag der Aufnahmephase wird als 100% festgelegt und die Ak-

tivität der Würmer nach erfolgter Elimination ermittelt und prozentual dazu angegeben. **Tab. 18** zeigt die Eliminationsparameter der angewendeten Zweikompartimentkinetik.

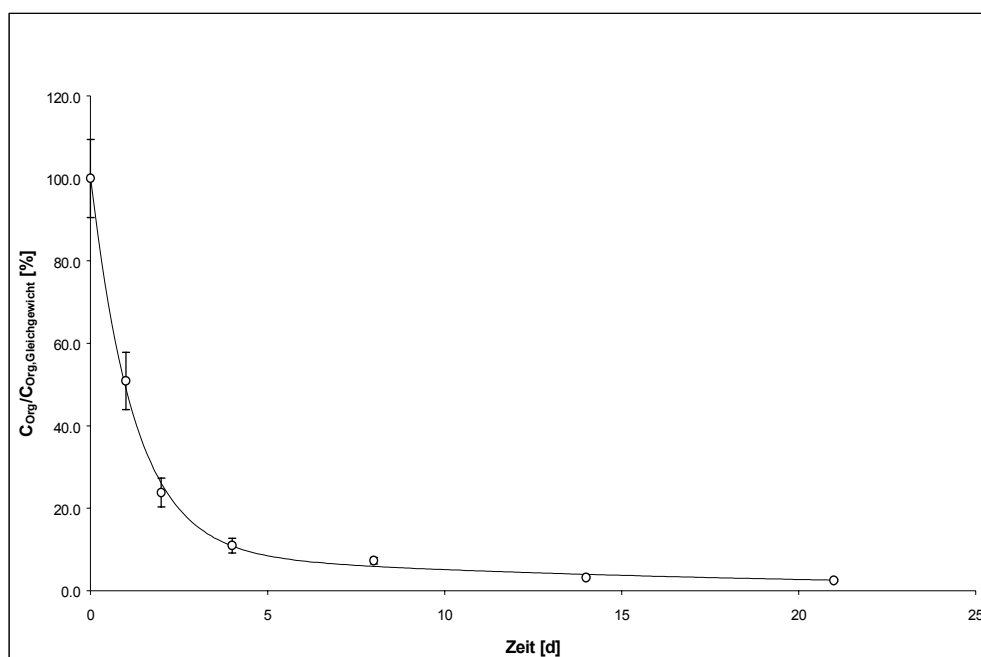


Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -Lindan bei *E. luxuriosus* in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG am 21. Tag der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,998$) an ein Zweikompartimentmodell.

Tab. 18: Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von Lindan bei *E. luxuriosus* in OECD-Kunsterde nach 21 Tagen Aufnahmephase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.

Restaktivität	Kompartiment A	Kompartiment B	k_a (d ⁻¹)	k_b (d ⁻¹)	r^2
2,6%	91%	9%	0,82	0,06	0,998

5.6 *Enchytraeus luxuriosus*, OECD-Kunsterde, HCB

E. luxuriosus wurde 28 Tage der radioaktiv markierten Chemikalie gegenüber exponiert. Die Eliminationsdauer erstreckte sich über den gleichen Zeitraum. Die Konzentration im Boden nahm während der Aufnahmephase ab. So wurde am ersten Tag ein Wert von 28371 dpm/g FG Boden (726 µg/kg) und am 28. Tag ein Wert von 24717 dpm/g FG Boden (632 µg/kg)

gemessen. Dies entspricht einer Abnahme von 13%. Die Wiederfindung der Radioaktivität betrug 93%.

5.6.1 Akkumulation

Die Aufnahmekinetik von ^{14}C -HCB bei *E. luxuriosus* in OECD-Kunsterde wird in **Abb. 19** und die dazugehörigen Parameter werden in **Tab. 19** dargestellt. Die ermittelten Anreicherungsfaktoren sind an den einzelnen Messzeitpunkten geringen Schwankungen unterworfen. Lediglich an Tag 21 der Aufnahmephase wurde in einem Replikat ein Anreicherungsfaktor von 17 ermittelt. Im Gegensatz zu den übrigen Replikaten, die im Bereich des angegebenen BAF - Wert von 25 lagen, ist dieser Wert niedriger. Aus diesem Grund ist der Fehlerbalken im Vergleich zu den anderen Messpunkten relativ hoch.

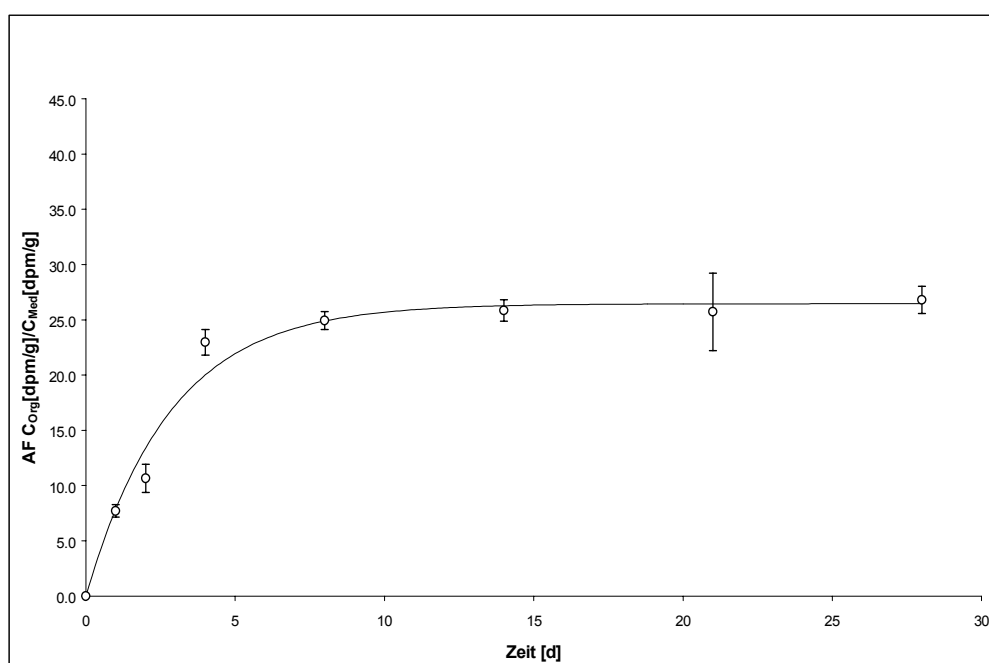


Abb. 19: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -HCB bei *E. luxuriosus* in OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 28, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,98$).

Tab. 19: Aufnahmeparameter von HCB bei *E. luxuriosus* in OECD-Kunsterde; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.

Exposition (d)	BAF	k_s (d ⁻¹)	k_e (d ⁻¹)	r^2
28	26,5	9,28	0,35	0,98

5.6.2 Elimination

In **Abb. 20** ist der zeitliche Verlauf der Elimination aufgetragen. Der Mittelwert der Aktivität in den Würmern der Tage 8, 14 und 21 der Aufnahmephase wurde als 100% festgelegt (steady state) und die Aktivität der Würmer während der Elimination ermittelt und prozentual dazu angegeben. **Tab. 20** zeigt die Eliminationsparameter der zu Grunde gelegten Zweikompartimentkinetik.

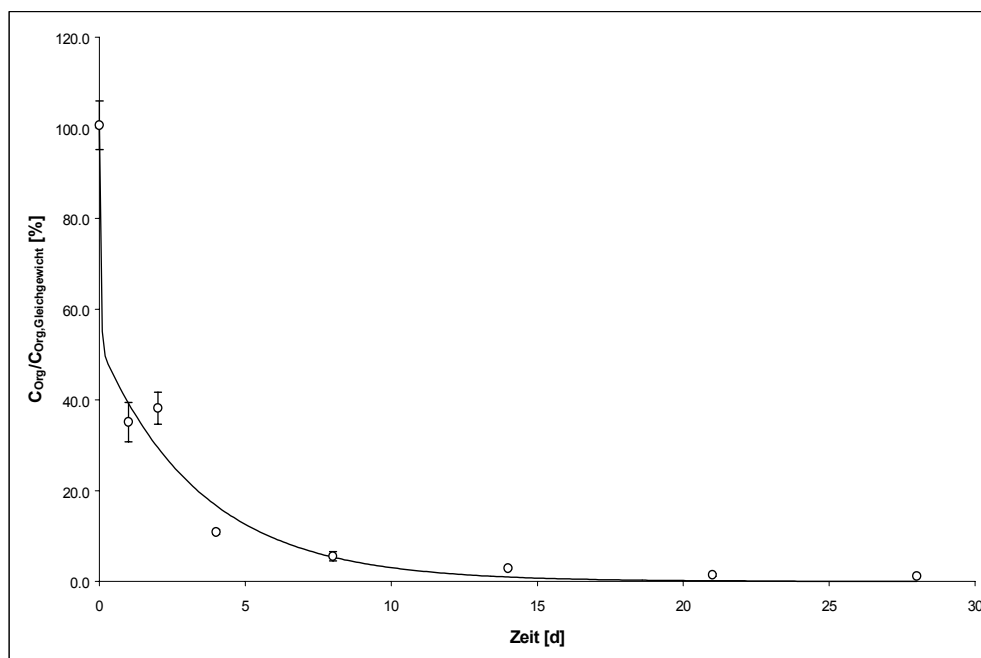


Abb. 20: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -HCB bei *E. luxuriosus* in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,98$) an ein Zweikompartimentmodell.

Tab. 20: Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von HCB bei *E. luxuriosus* in OECD-Kunsterde nach 28 Tagen Aufnahmephase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.

Restaktivität	Kompartiment A	Kompartiment B	k_a (d^{-1})	k_b (d^{-1})	r^2
0,02%	48%	52%	23,9	0,28	0,98

5.7 *Enchytraeus luxuriosus*, LUFA 2.2, Lindan

In diesem Testansatz sank die Radioaktivität im Boden um 7%. Am ersten Tag wurden 14980 dpm/g (65 µg/kg) und am 21. Aufnahmetag 13939 dpm/g (61 µg/kg) bezogen auf das Feuchtgewicht des Bodens gemessen. Die Wiederfindung der Radioaktivität betrug 90%.

5.7.1 Akkumulation

In **Abb. 21** ist der Aufnahmeverlauf von Lindan bei *E. luxuriosus* in LUFA-Erde dargestellt.

In **Tab. 21** sind die ermittelten kinetischen Parameter aufgelistet.

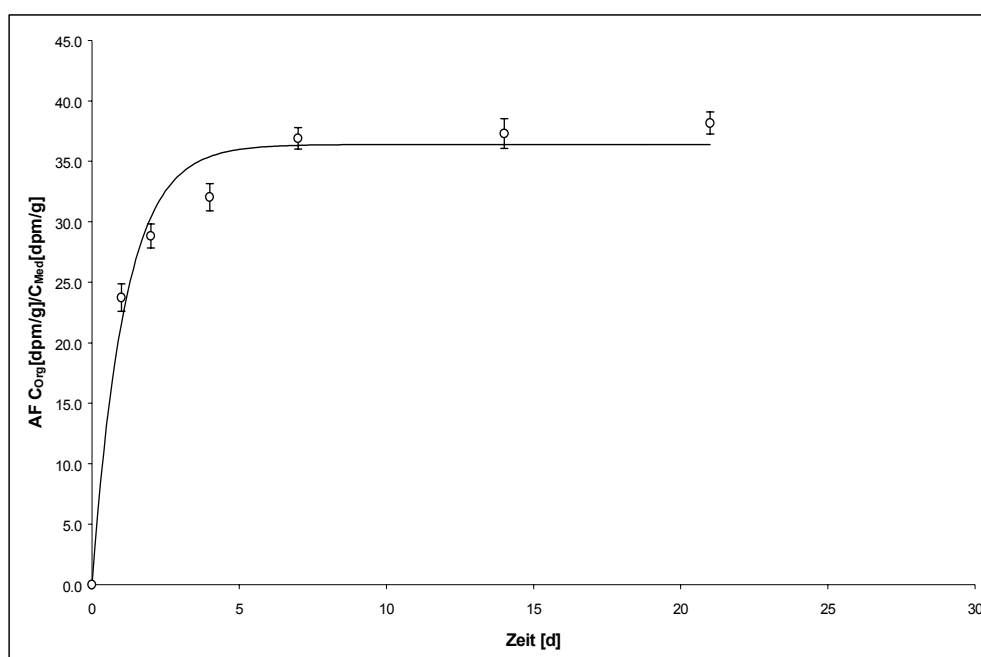


Abb. 21: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -Lindan bei *E. luxuriosus* in LUFA-Boden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,98$)

Tab. 21: Aufnahmeparameter von Lindan bei *E. luxuriosus* in LUFA 2.2; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.

Exposition (d)	BAF	k_s (d^{-1})	k_e (d^{-1})	r^2
21	36	32,4	0,9	0,98

5.7.2 Elimination

In **Abb. 22** ist der Verlauf der Elimination gegen die Zeit aufgetragen. Der Mittelwert der Radioaktivität in den Würmern der Tage 8, 14 und 21 der Aufnahme phase wurde als 100% festgelegt (steady state) und die Aktivität der Würmer nach erfolgter Elimination prozentual dazu angegeben. **Tab. 22** zeigt die Eliminationsparameter der angewendeten Zweikompartmentkinetik.

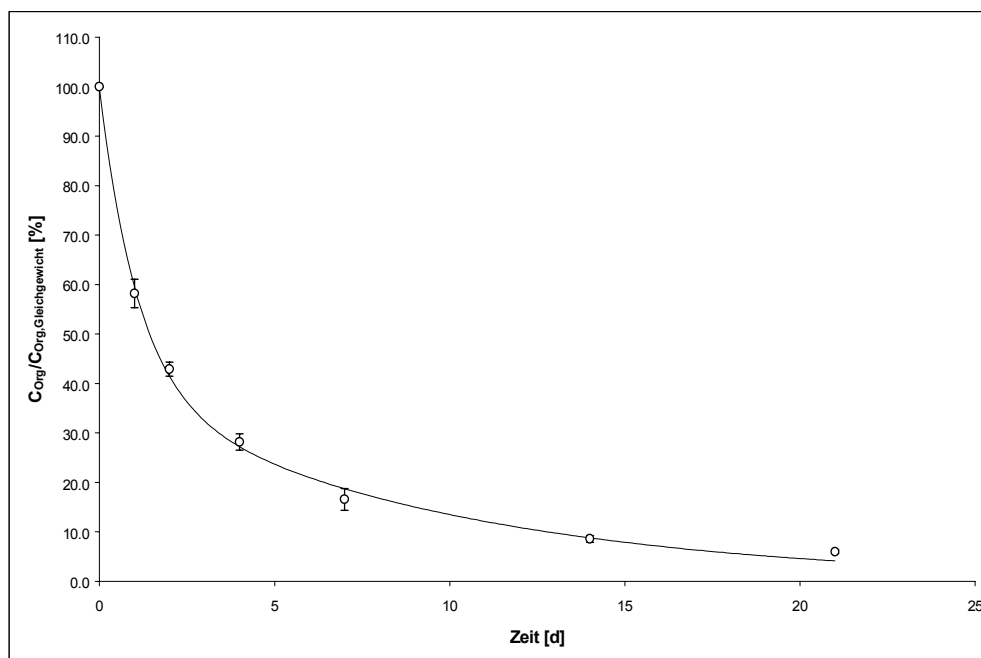


Abb. 22: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -Lindan bei *E. luxuriosus* in unbelasteter LUFA-Erde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahme phase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,998$) an ein Zweikompartmentmodell.

Tab. 22: Eliminationsparameter der Zweikompartmentkinetik für die Auscheidung von Lindan bei *E. luxuriosus* in LUFA 2.2 nach 21 Tagen Aufnahme phase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.

Restaktivität	Kompartiment A	Kompartiment B	k_a (d^{-1})	k_b (d^{-1})	r^2
4,1%	60%	40%	0,9	0,11	0,99

5.8 *Enchytraeus luxuriosus*, LUFA 2.2, HCB

Die Abnahme der Konzentration des radioaktiv markierten Hexachlorbenzols im Boden betrug während der 21-tägigen Exposition 13%. Zu Testbeginn wurden 17315 dpm/g FG Boden (443 µg/kg FG) gemessen, am Testende wurden 15124 dpm/g FG Boden (387 µg/kg FG) ermittelt. Die Wiederfindung der Radioaktivität betrug 90%.

5.8.1 Akkumulation

Der Verlauf der Aufnahme von HCB durch *E. luxuriosus* ist in **Abb. 23** dargestellt. Die dazugehörigen Kinetikparameter werden in **Tab. 23** aufgelistet. Am Tag 18 der Aufnahmephase wurde ein zusätzlicher Messpunkt genommen. Der Wert des Anreicherungsfaktors am Tag 14 war um 32% höher als der am Tag 7. Um nach nach OECD – Definition (1996) einen steady state zu erlangen und gleichzeitig die Versuchsdauer nicht zu verlängern, wurde dieser Messpunkt zusätzlich aufgenommen. Mit Hilfe der als Ersatzgefäße vorgesehenen vier Replikate konnte der Anreicherungsfaktor für diesen Zeitpunkt bestimmt werden. Das Erreichen des Gleichgewichtszustands zwischen Aufnahme- und Elimination konnte damit bestätigt werden.

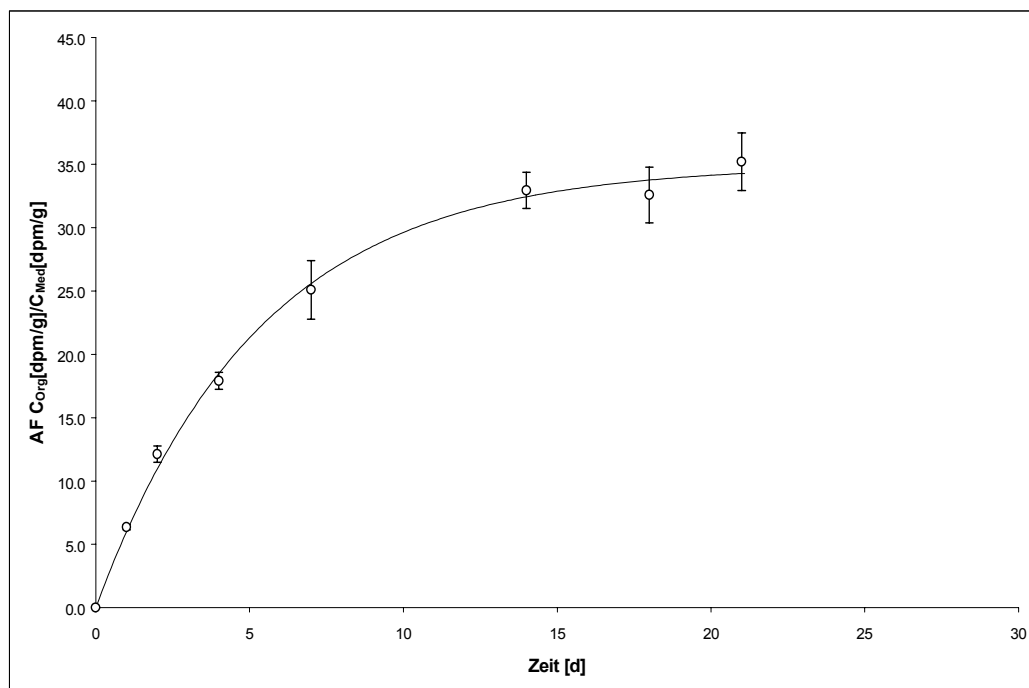


Abb. 23: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -HCB bei *E. luxuriosus* im LUFA-Boden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,99$).

Tab. 23: Aufnahmeparameter von HCB bei *E. luxuriosus* in LUFA 2.2; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.

Exposition (d)	BAF	k_s (d ⁻¹)	k_e (d ⁻¹)	r^2
21	35	6,65	0,19	0,99

5.8.2 Elimination

In **Abb. 24** ist der zeitliche Verlauf der Elimination dargestellt. Der Mittelwert der Aktivität in den Würmern der Tage 8, 14 und 21 der Aufnahmephase wird als 100% herangezogen (steady state). Die radioaktive Konzentration in den Würmern nach erfolgter Elimination wird in Prozent des Gleichgewichtszustandes angegeben. **Tab. 26** zeigt die Eliminationsparameter der angewendeten Einkompartimentkinetik. Die Anpassungsgüte sowie der Kurvenverlauf des Zweikompartimentmodells war bei diesem Versuch identisch, jedoch der Standardschätzfehler dieses Modells unverhältnismäßig groß. Aufgrund des erheblich kleineren Fehlers wurde für diesen Ausscheidungsprozeß das Einkompartimentmodell angewendet.

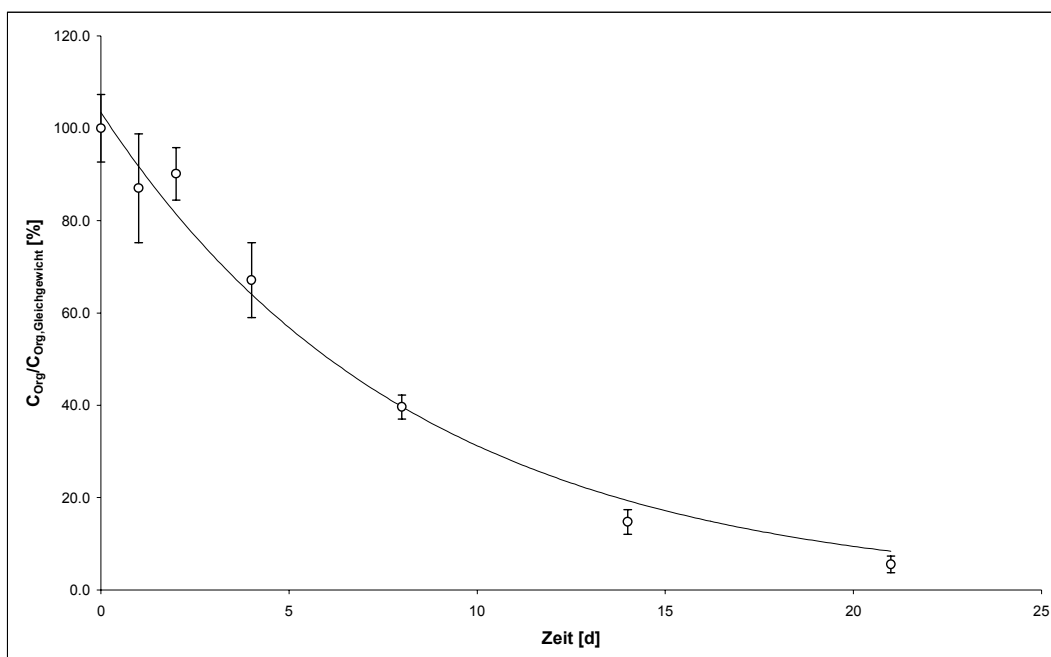


Abb. 24: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ¹⁴C-HCB bei *E. luxuriosus* in unbelasteter LUFA-Erde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,98$) an ein Einkompartimentmodell.

Tab. 24: Eliminationsparameter der Einkompartimentkinetik für die Ausscheidung von HCB bei *E. luxuriosus* in LUFA-Erde, Restaktivität = Radioaktivität am letzten Eliminationstag als prozentuale Angabe zur Aktivität der Würmer am letzten Aufnahmetag, k_e = Eliminationskonstante der Einkompartimentkinetik, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.

Restaktivität	Kompartiment	k_e (d ⁻¹)	r^2
10,2%	103,4%	0,12	0,98

5.9 *Eisenia fetida*, OECD-Kunsterde, Lindan

Die Akkumulations- und Eliminationsphase erstreckten sich jeweils über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die im Boden gemessene Konzentration zu Beginn des Versuchs lag bei 80 µg/kg und nahm ab auf 70 µg/kg am Ende des Versuchs. Die prozentuale Abnahme lag somit bei 12,5%. Die Wiederfindung betrug 83,6% der eingesetzten Radioaktivität .

5.9.1 Akkumulation

Der Verlauf der Aufnahme von Lindan durch *E. fetida* ist in **Abb. 25** und die dazugehörigen Kinetikparameter sind in **Tab. 25** aufgelistet. Der mit Hilfe der nichtlinearen Regressionsanalyse ermittelte BAF ist 1,26. Die Mittelwerte der letzten drei Messpunkte liegen innerhalb einer Schwankungsbreite von plus minus 20%, ein steady state ist somit erreicht.

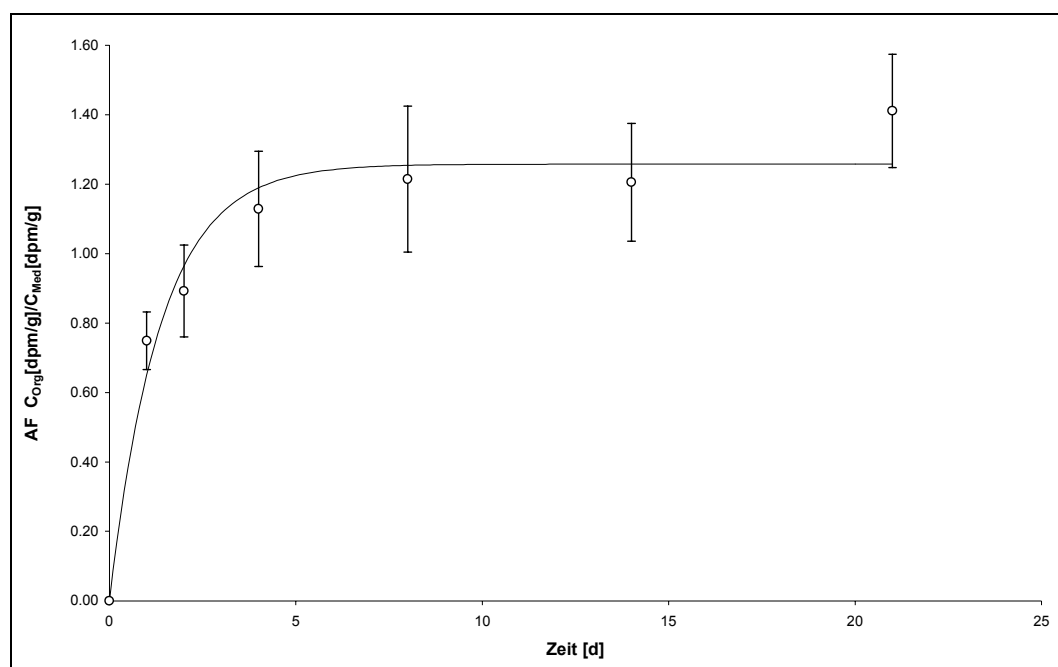


Abb. 25: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ¹⁴C-Lindan bei *E. fetida* in OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,97$)

Tab. 25: Aufnahmeparameter von Lindan bei *E. fetida* in OECD-Kunsterde; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.

Exposition (d)	BAF	k_s (d ⁻¹)	k_e (d ⁻¹)	r^2
21	1,26	0,92	0,73	0,96

5.9.2 Elimination

In **Abb. 26** ist der zeitliche Verlauf der Elimination dargestellt. Der Mittelwert der Aktivität in den Würmern der Tage 7, 14 und 21 der Aufnahmephase (steady state) dient als Ausgangswert (100%) zur Berechnung der Eliminationsdaten. Die radioaktive Konzentration in den Würmern nach erfolgter Elimination wird in Prozent des Gleichgewichtszustandes angegeben.

Tab. 26 zeigt die Eliminationsparameter der angewendeten Zweikompartimentkinetik.

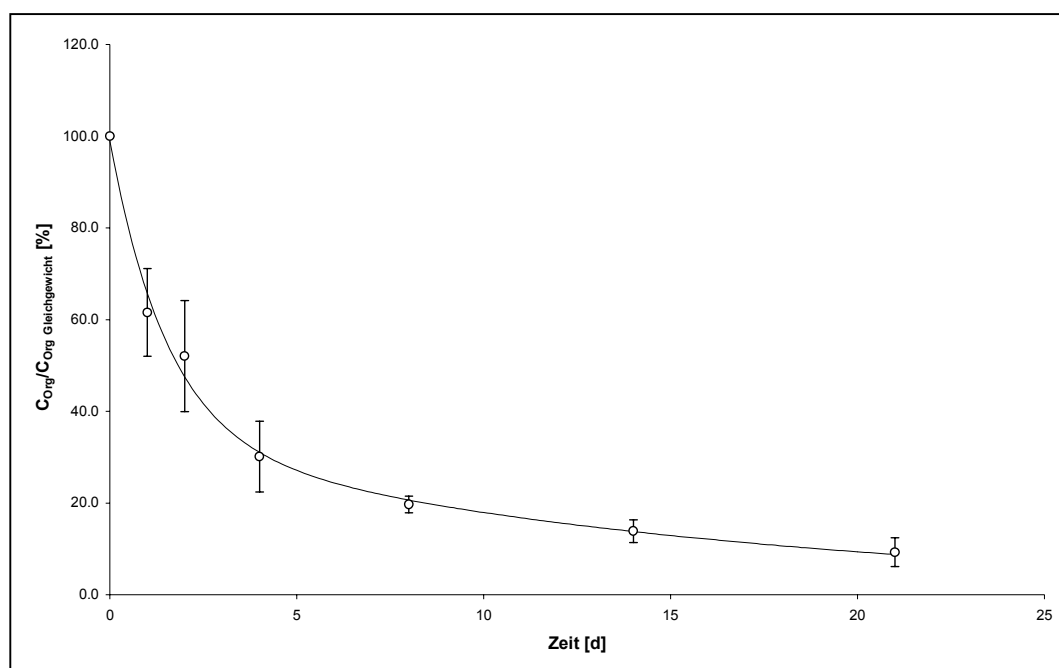


Abb. 26: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ¹⁴C-Lindan bei *E. fetida* in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,99$) an ein Zweikompartimentmodell.

Tab. 26: Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von Lindan bei *E. fetida* in OECD-Kunsterde nach 21 Tagen Aufnahmephase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.

Restaktivität	Kompartiment A	Kompartiment B	k_a (d ⁻¹)	k_b (d ⁻¹)	r^2
8,8%	65%	34%	0,65	0,064	0,99

5.10 *Eisenia fetida*, OECD-Kunsterde, HCB

Die Aufnahme von HCB durch *Eisenia fetida* wurde über einen Zeitraum von 28 Tagen untersucht. Die im Boden gemessene Konzentration zu Beginn des Versuchs lag bei 599 µg/kg und nahm ab auf 463 µg/kg am Ende des Versuchs. Die prozentuale Abnahme lag somit bei 23%. Die Wiederfindung betrug 78,3% der eingesetzten Radioaktivität.

Nach einem Zeitraum von 21 Tagen hatte sich ein steady state eingestellt. Die Mittelwerte der Anreicherungsfaktoren für die Tage 7, 14 und 21 variierten um weniger als 20% von ihrem gemeinsamen Mittelwert. Für den letzten Tag der Aufnahme (Tag 28) wurde jedoch ein erhöhter Anreicherungsfaktor ermittelt, so dass die Varianz für die Anreicherungsfaktoren der letzten drei Messpunkte ansteigt, und der Anreicherungsfaktor für den 28. Tag der Aufnahme um 23% vom gemeinsamen Mittelwert abweicht. Dementsprechend wäre der steady state nicht erreicht worden. Der Zustand der Würmer hatte sich jedoch seit dem 21. Tag der Aufnahmephase drastisch verschlechtert. Am Tag 28 war es nicht mehr möglich, einen Eliminationsansatz zu beginnen, da über 50% der Testorganismen gestorben waren. Ein Grund hierfür konnte nicht festgestellt werden. Der schlechte Gesundheitszustand der Würmer zu diesem Zeitpunkt lässt den für Tag 28 ermittelten Anreicherungsfaktor jedoch fraglich erscheinen. Daher wurde zusätzlich eine nichtlineare Regression für den Zeitraum 0-21 Tage durchgeführt. Für die Elimination wurde ein komplett neuer Versuch durchgeführt, bei dem sich die Konzentration geringfügig vom ersten Ansatz unterschied (819 statt 909 µg/kg). Hierbei wurde der Bioakkumulationsfaktor nicht erneut bestimmt. *Eisenia fetida* wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen gegenüber HCB in OECD-Kunsterde exponiert, der Anreicherungsfaktor für diesen Zeitpunkt bestimmt, und anschließend die Elimination über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht.

5.10.1 Akkumulation

Der Verlauf der Aufnahme von HCB durch *E. fetida* ist in **Abb. 27** und die dazugehörigen Kinetikparameter sind in **Tab. 27** aufgelistet. Der mit Hilfe der nichtlinearen Regressionsanalyse ermittelte BAF (28d) ist 5,85, für eine Aufnahmephase von 21 Tagen wurde ein BAF (21d) von 5,17 berechnet. Die Mittelwerte der letzten drei Messpunkte innerhalb der ersten 21 Tage liegen innerhalb einer Schwankungsbreite von plus minus 20%, ein steady state war für diesen Zeitraum somit erreicht.

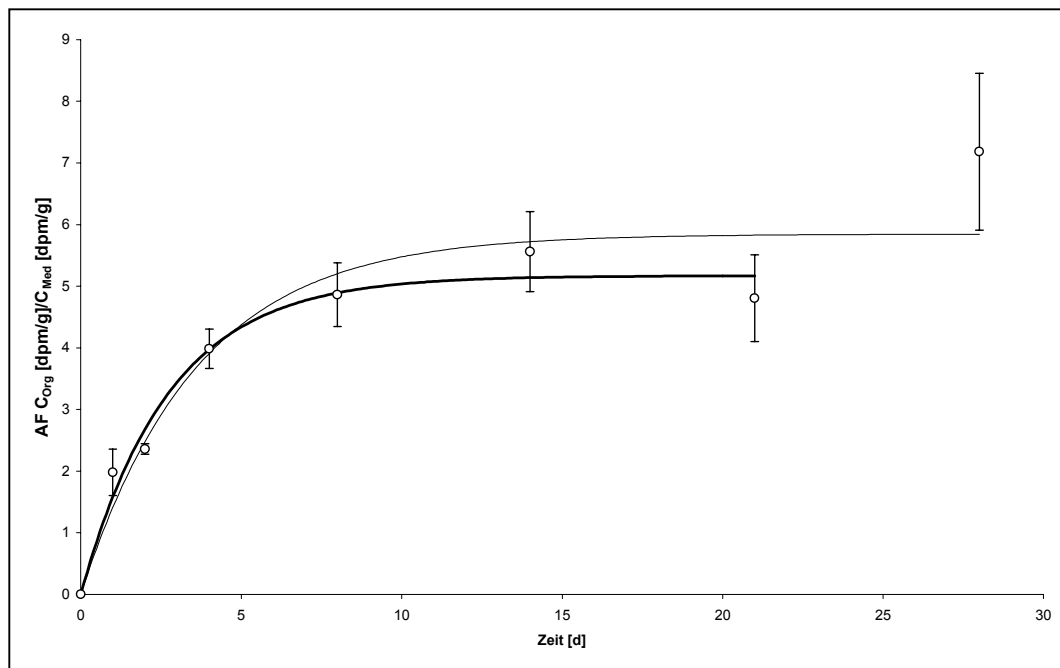


Abb. 27: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -HCB bei *E. fetida* in OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 28, sowie Anpassungen der nichtlinearen Regression für die Aufnahme bis Tag 21 und 28 (Tag 21: $r^2 = 0,98$; Tag 28: $r^2 = 0,91$).

Tab. 27: Aufnahmeparameter von HCB bei *E. fetida* in OECD-Kunsterde; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.

Exposition (d)	BAF	k_s (d^{-1})	k_e (d^{-1})	r^2
28	5,85	1,61	0,28	0,91
21	5,17	1,89	0,37	0,98

5.10.2 Elimination

In **Abb. 28** ist der zeitliche Verlauf der Elimination dargestellt. Der Mittelwert der Aktivität in den Würmern am Tag 21 einer separat durchgeführten Aufnahme- und Ausscheidungsphase dient als Ausgangswert (100%) zur Berechnung der Eliminationsdaten. Die radioaktive Konzentration in den Würmern nach erfolgter Elimination wird in Prozent des Ausgangswertes angegeben. **Tab. 28** zeigt die Eliminationsparameter der angewendeten Zweikompartimentkinetik.

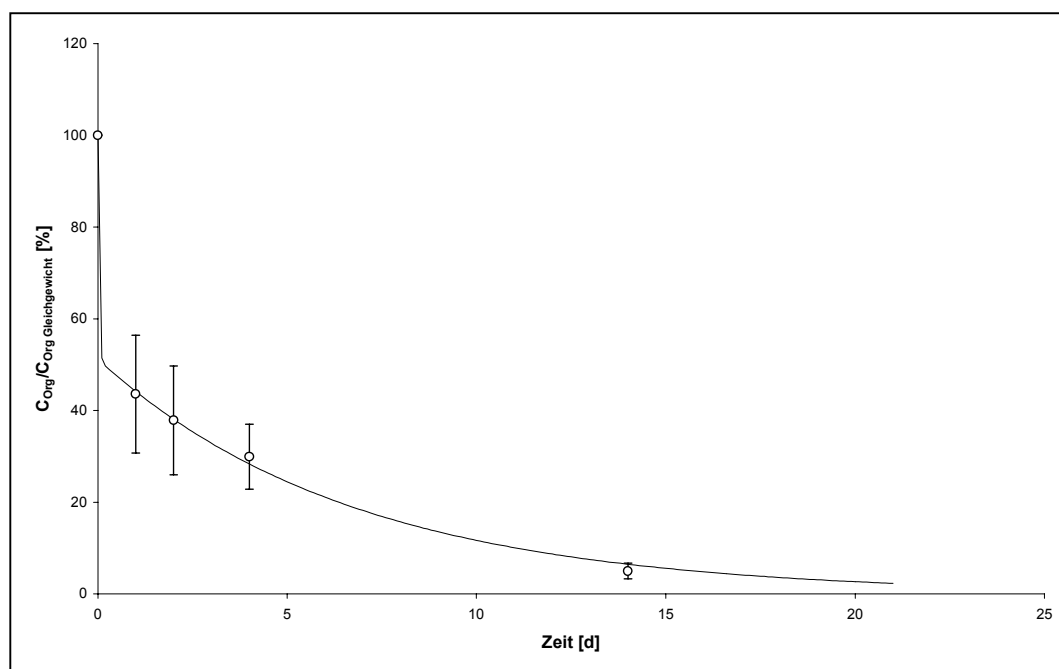


Abb. 28: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -HCB bei *E. fetida* in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahme- und Ausscheidungsphase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,9$) an ein Zweikompartimentmodell.

Tab. 28: Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von HCB bei *E. fetida* in OECD-Kunsterde nach 21 Tagen Aufnahme- und Ausscheidungsphase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination (d 14) bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.

Restaktivität	Kompartiment A	Kompartiment B	$k_a \text{ (d}^{-1}\text{)}$	$k_b \text{ (d}^{-1}\text{)}$	r^2
6,5%	49%	51%	38,30	0,15	1,00

5.11 *Eisenia fetida*, LUFA 2.2, Lindan

Die Akkumulations- und Eliminationsphase erstreckten sich jeweils über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die im Boden gemessene Konzentration zu Beginn des Versuchs lag bei 98 µg/kg und nahm ab auf 82 µg/kg am Ende des Versuchs. Die prozentuale Abnahme lag somit bei 16%. Die Wiederfindung betrug 108,5% der eingesetzten Radioaktivität .

5.11.1 Akkumulation

Der Verlauf der Aufnahme von HCB durch *E. fetida* ist in **Abb. 29** und die dazugehörigen Kinetikparameter sind in **Tab. 29** aufgelistet. Der mit Hilfe der nichtlinearen Regressionsanalyse ermittelte BAF ist 3,85. Die Mittelwerte der letzten drei Messpunkte innerhalb der ersten 21 Tage liegen nicht innerhalb einer Schwankungsbreite von plus minus 20%, ein steady state war für diesen Zeitraum somit nicht erreicht.

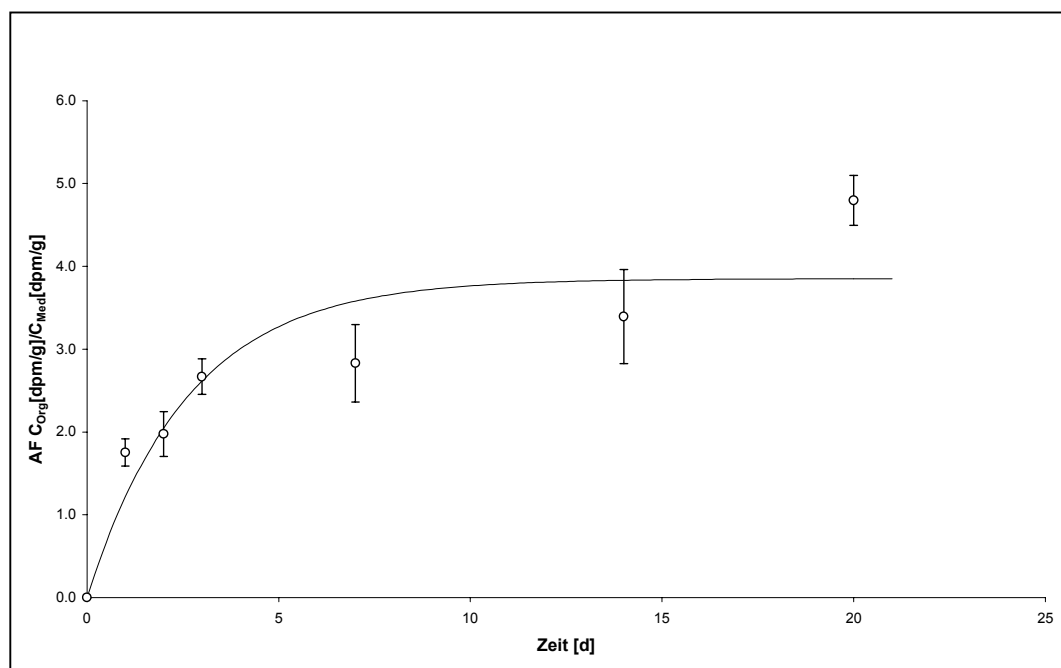


Abb. 29: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -Lindan bei *E. fetida* in LUFA 2.2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,85$).

Tab. 29: Aufnahmeparameter von Lindan bei *E. fetida* in LUFA 2.2; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.

Exposition (d)	BAF	k_s (d ⁻¹)	k_e (d ⁻¹)	r^2
21	3,85	1,46	0,38	0,85

5.11.2 Elimination

In **Abb. 30** ist der zeitliche Verlauf der Elimination dargestellt. Der Mittelwert der Aktivität in den Würmern am Tag 21 der Aufnahmephase dient als Ausgangswert (100%) zur Berechnung der Eliminationsdaten. Die radioaktive Konzentration in den Würmern nach erfolgter Elimination wird in Prozent des Ausgangswertes angegeben. **Tab. 30** zeigt die Eliminationsparameter der angewendeten Zweikompartmentkinetik.

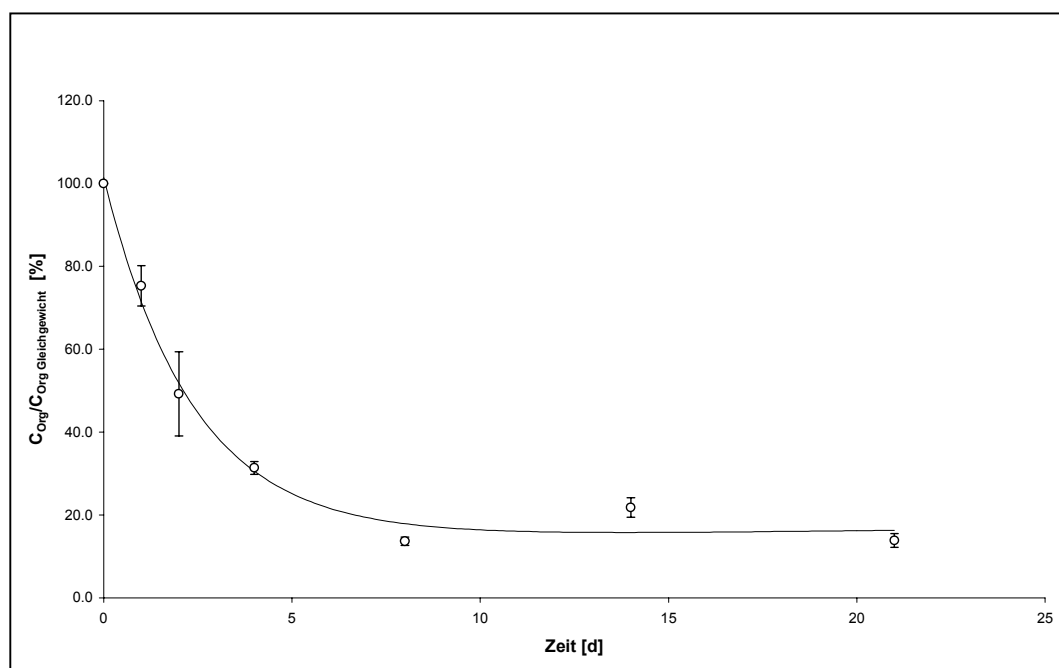


Abb. 30: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ¹⁴C-Lindan bei *E. fetida* in LUFA 2.2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,99$) an ein Zweikompartmentmodell.

Tab. 30: Eliminationsparameter der Zweikompartimentkinetik für die Ausscheidung von Lindan bei *E. fetida* in LUFA 2.2 nach 21 Tagen Aufnahme phase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.

Restaktivität	Kompartiment A	Kompartiment B	k_a (d ⁻¹)	k_b (d ⁻¹)	r^2
16,3%	87%	14%	0,42	0,007	0,99

5.12 *Eisenia fetida*, LUFA 2.2, HCB

Die Akkumulations- und Eliminationsphase erstreckten sich jeweils über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die im Boden gemessene Konzentration zu Beginn des Versuchs lag bei 623 µg/kg und nahm ab auf 564 µg/kg am Ende des Versuchs. Die prozentuale Abnahme lag somit bei 9%. Die Wiederfindung betrug 99% der eingesetzten Radioaktivität .

5.12.1 Akkumulation

Der Verlauf der Aufnahme von HCB durch *E. fetida* ist in **Abb. 31** und die dazugehörigen Kinetikparameter sind in **Tab. 31** aufgelistet. Der mit Hilfe der nichtlinearen Regressionsanalyse ermittelte BAF ist 2,33. Die Mittelwerte der letzten drei Messpunkte innerhalb der Aufnahme phase liegen innerhalb einer Schwankungsbreite von plus minus 20%, ein steady state war für diesen Zeitraum somit erreicht.

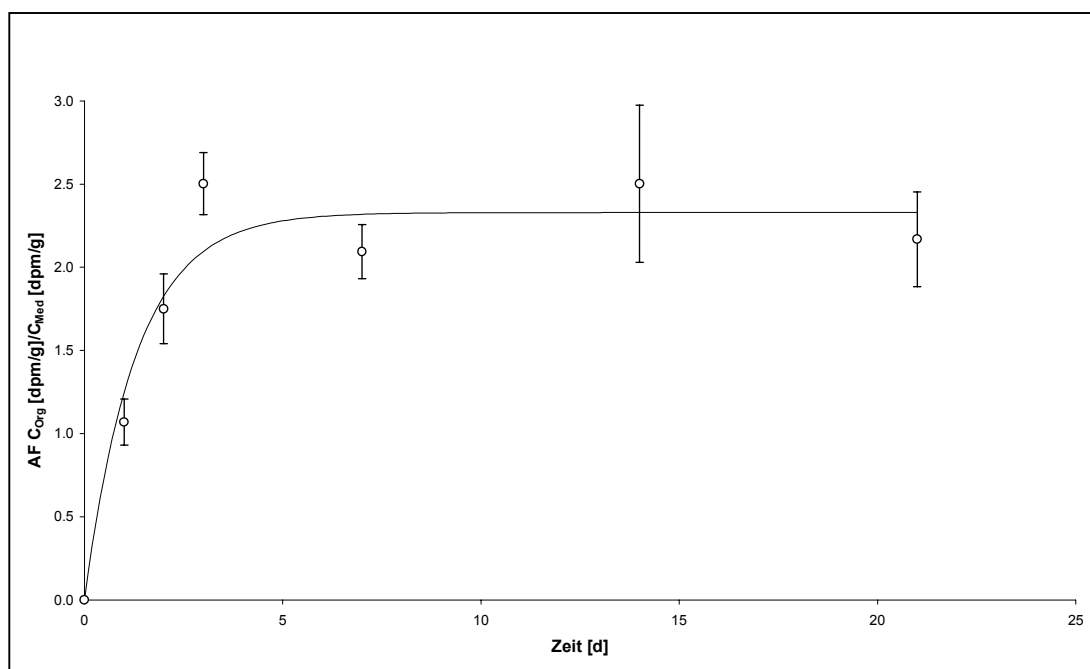


Abb. 31: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -HCB bei *E. fetida* in LUFA 2.2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,99$)

Tab. 31: Aufnahmeparameter von HCB bei *E. fetida* in LUFA 2.2; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.

Exposition (d)	BAF	k_s (d ⁻¹)	k_e (d ⁻¹)	r^2
21	2,33	1,79	0,77	0,94

5.12.2 Elimination

In **Abb. 32** ist der zeitliche Verlauf der Elimination dargestellt. Der Mittelwert der Aktivität in den Würmern der letzten drei Messpunkte der Aufnahmephase dient als Ausgangswert (100%) zur Berechnung der Eliminationsdaten. Die radioaktive Konzentration in den Würmern nach erfolgter Elimination wird in Prozent des Ausgangswertes angegeben. **Tab. 32** zeigt die Eliminationsparameter der angewendeten Einkompartimentkinetik.

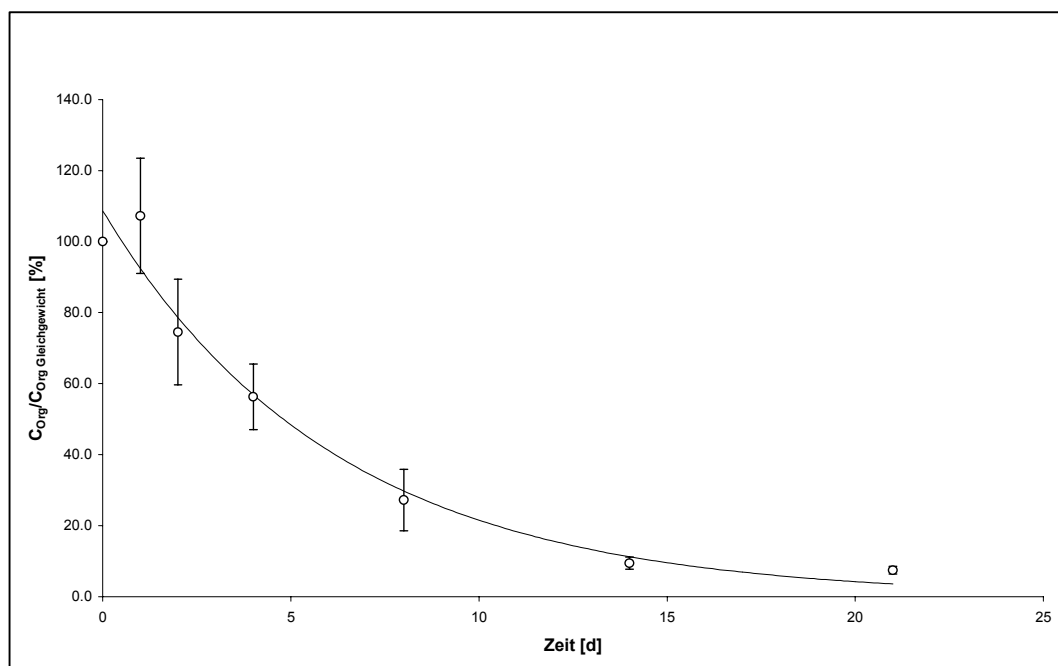


Abb. 32: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -HCB bei *E. fetida* in unbelasteter LUFA 2.2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,97$) an ein Einkompartimentmodell.

Tab. 32: Eliminationsparameter der Einkompartimentkinetik für die Ausscheidung von HCB bei *E. fetida* in LUFA 2.2, Restaktivität = Radioaktivität am letzten Eliminationstag als prozentuale Angabe zur Aktivität der Würmer am letzten Aufnahmetag, k_e = Eliminationskonstante der Einkompartimentkinetik, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.

Restaktivität in%	Kompartiment in%	k_e (d ⁻¹)	r^2
3,6	109	0,16	0,97

5.13 *Lumbricus rubellus*, OECD-Kunsterde, Lindan

Die Akkumulations- und Eliminationsphase erstreckten sich jeweils über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die im Boden gemessene Konzentration zu Beginn des Versuchs lag bei 108 $\mu\text{g/kg}$ und nahm ab auf 100 $\mu\text{g/kg}$ am Ende des Versuchs. Die prozentuale Abnahme lag somit bei 8%. Die Wiederfindung betrug 82,3% der eingesetzten Radioaktivität.

5.13.1 Akkumulation

Der Verlauf der Aufnahme von Lindan durch *L. rubellus* ist in **Abb. 33** und die dazugehörigen Kinetikparameter sind in **Tab. 33** aufgelistet. Der mit Hilfe der nichtlinearen Regressionsanalyse ermittelte BAF ist 2,64. Die Mittelwerte der letzten drei Messpunkte innerhalb der Aufnahmephase liegen nicht innerhalb einer Schwankungsbreite von plus minus 20%, ein steady state war für diesen Zeitraum somit per Definition nicht erreicht. Nach 14 Tagen scheint jedoch das steady state erreicht zu sein. Die Messwerte nach 14 und 21 Tagen unterscheiden sich nicht mehr eindeutig.

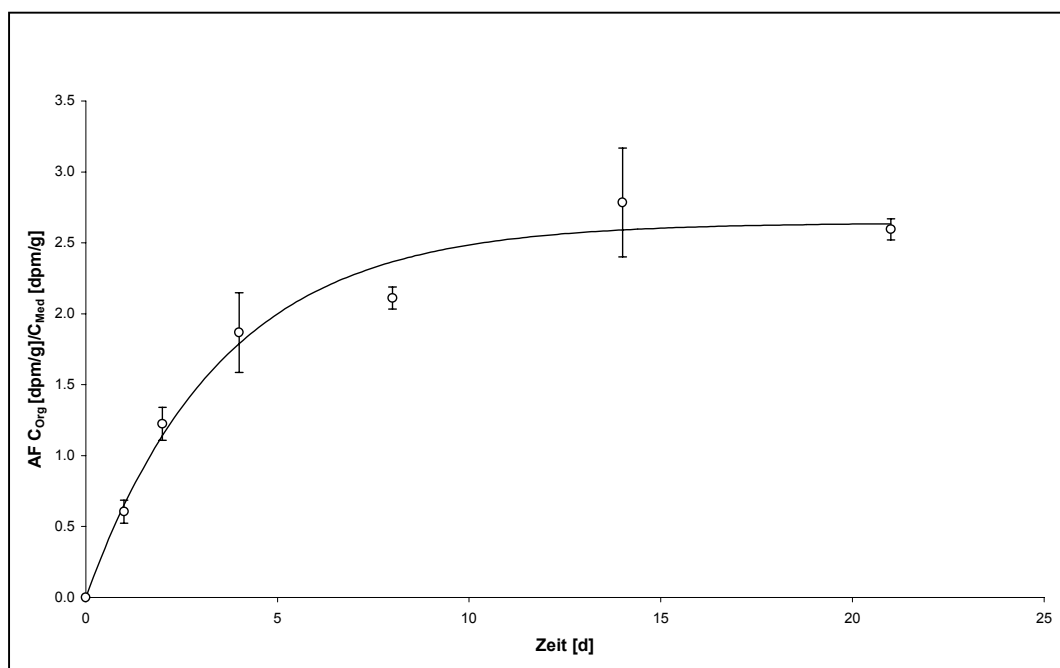


Abb. 33: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -Lindan bei *L. rubellus* in OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,98$).

Tab. 33: Aufnahmeparameter von Lindan bei *L. rubellus* in OECD-Kunsterde; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.

Exposition (d)	BAF	k_s (d^{-1})	k_e (d^{-1})	r^2
21	2,64	0,75	0,28	0,98

5.13.2 Elimination

Die Anpassung einer nichtlinearen Regression mit einem Ein- bzw. Zweikompartimentmodell ergab keine sinnvollen Ergebnisse. Keine der durchgeführten Berechnungen hatte einen De-

terminationskoeffizienten (r^2) > 0,7. Es wird daher auf die Darstellung eines berechneten Eliminationsverlaufs verzichtet. Die in der **Abb. 34** dargestellten Mittelwerte belegen, dass lediglich 30,5% der zum Ende der Aufnahme inkorporierten Radioaktivität in einem Zeitraum von 21 Tagen ausgeschieden wurden. Zwischen Tag 4 und 21 der Elimination ist keine weitere Ausscheidung des Tracers festzustellen.

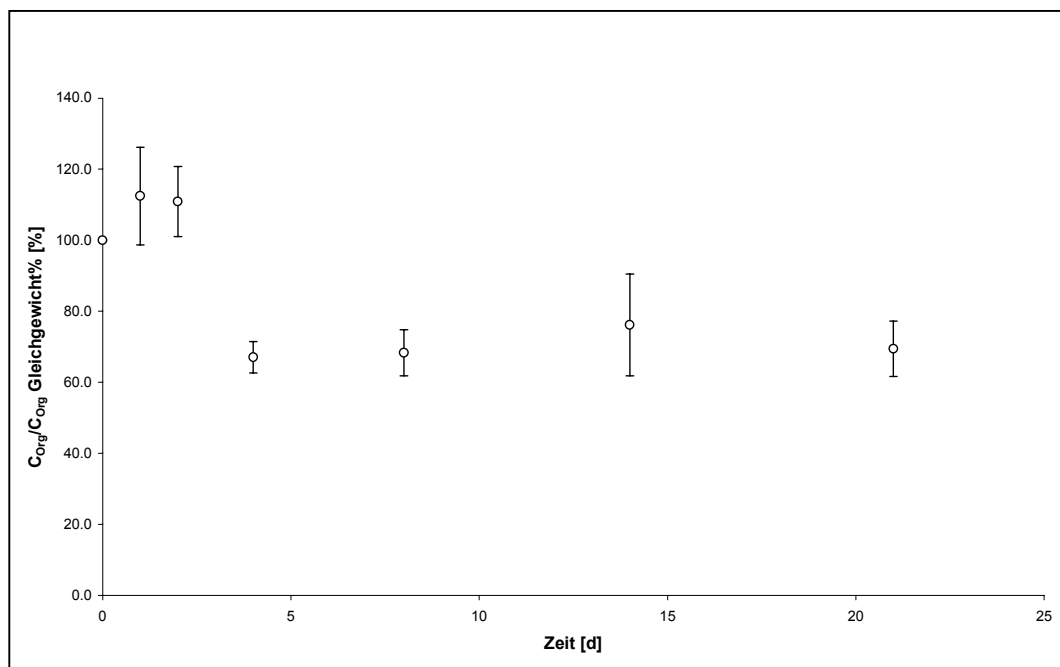


Abb. 34: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -Lindan bei *L. rubellus* in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahme phase.

5.14 *Lumbricus rubellus*, OECD-Kunsterde, HCB

Die Akkumulations- und Eliminationsphase erstreckten sich jeweils über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die im Boden gemessene Konzentration zu Beginn des Versuchs lag bei 413 $\mu\text{g/kg}$ und nahm ab auf 264 $\mu\text{g/kg}$ am Ende des Versuchs. Die prozentuale Abnahme betrug somit 36%. Die Wiederfindung lag bei 65% der eingesetzten Radioaktivität. Trotz diese relativ niedrigen Wertes - für den gegenwärtig keine Erklärung gegeben werden kann - wurde der Test aufgrund des Kurvenverlaufs und der in sich schlüssigen Ergebnisse als valide eingestuft.

5.14.1 Akkumulation

Der Verlauf der Aufnahme von HCB durch *L. rubellus* ist in **Abb. 35**, die dazugehörigen Kinetikparameter sind in **Tab. 34** aufgelistet. Der mit Hilfe der nichtlinearen Regressionsanalyse

ermittelte BAF ist 3,01. Die Mittelwerte der letzten drei Messpunkte innerhalb der Aufnahmephase liegen nicht innerhalb einer Schwankungsbreite von plus minus 20%, ein steady state war für diesen Zeitraum somit nicht erreicht. Die nach Tag 14 und 21 bestimmten Akkumulationsfaktoren unterscheiden sich jedoch fast nicht voneinander. Der Gleichgewichtszustand zwischen Aufnahme- und Eliminationsvorgängen scheint somit nach 14 Tagen erreicht worden zu sein.

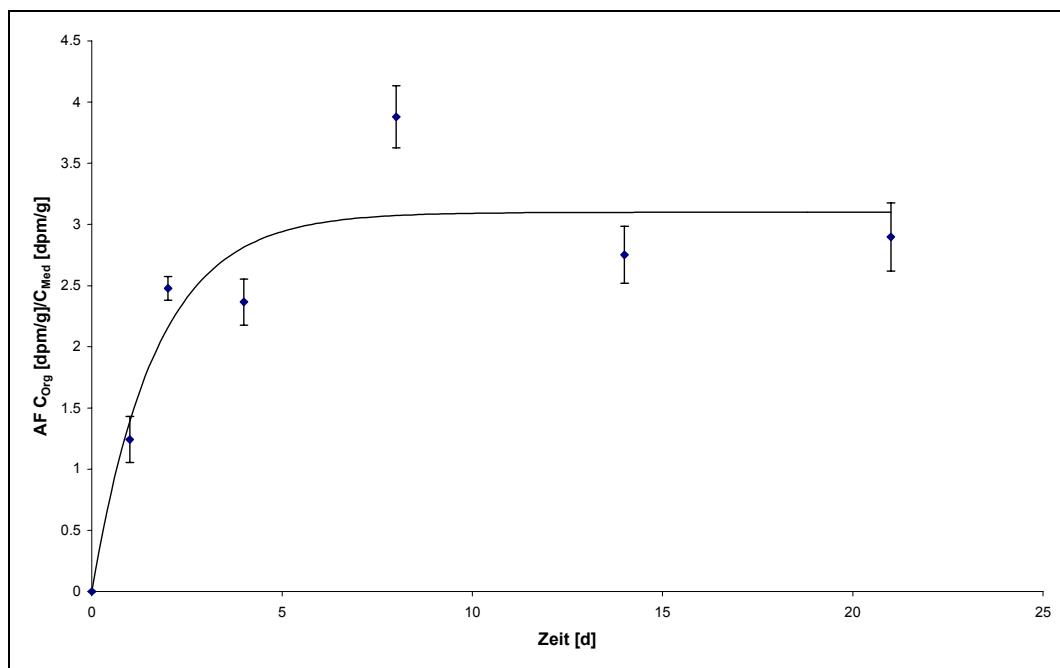


Abb. 35: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -HCB bei *L. rubellus* in OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,99$).

Tab. 34: Aufnahmeparameter von HCB bei *L. rubellus* in OECD-Kunsterde; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.

Exposition (d)	BAF	k_s (d ⁻¹)	k_e (d ⁻¹)	r^2
21	3,01	1,81	0,60	0,88

5.14.2 Elimination

In **Abb. 36** ist der zeitliche Verlauf der Elimination dargestellt. Der Mittelwert der Aktivität in den Würmern des letzten Messpunktes der Aufnahmephase dient als Ausgangswert (100%) zur Berechnung der Eliminationsdaten. Die radioaktive Konzentration in den Würmern nach

erfolgter Elimination wird in Prozent des Ausgangswertes angegeben. **Tab. 35** zeigt die Eliminationsparameter der angewendeten Zweikompartmentkinetik.

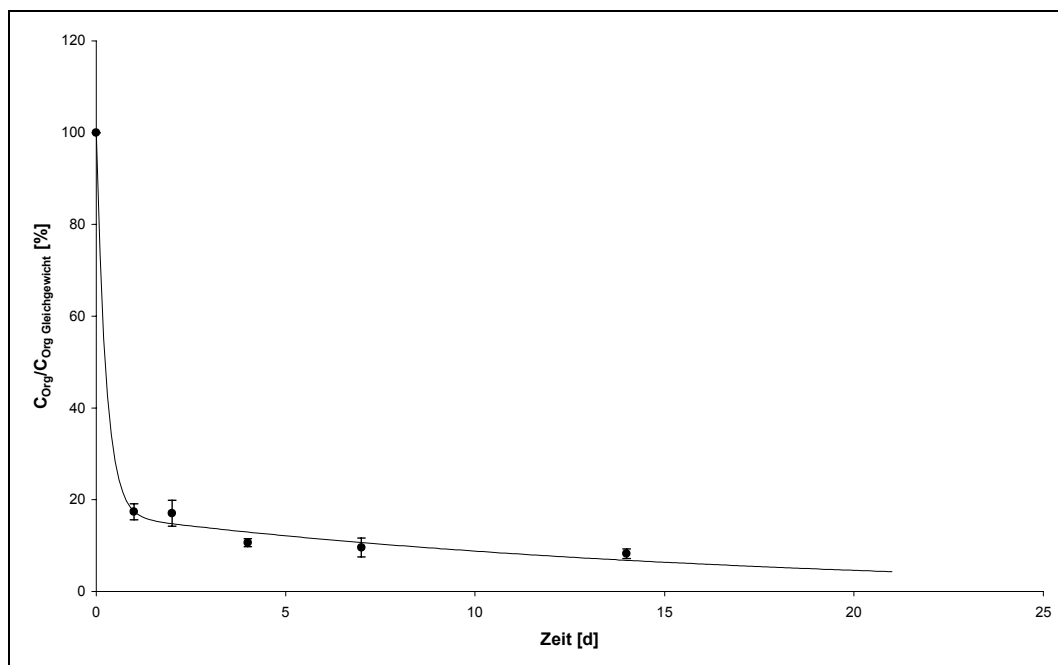


Abb. 36: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -HCB bei *L. rubellus* in unbelasteter OECD-Kunsterde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahme phase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0.$) an ein Zweikompartmentmodell.

Tab. 35: Eliminationsparameter der Zweikompartmentkinetik für die Ausscheidung von HCB bei *L. rubellus* in OECD-Kunsterde nach 21 Tagen Aufnahme phase; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination (d 14) bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.

Restaktivität	Kompartiment A	Kompartiment B	k_a (d ⁻¹)	k_b (d ⁻¹)	r^2
6,8%	83%	17	3,851	0,06	1,00

5.15 *Lumbricus rubellus*, LUFA 2.2, Lindan

Die Akkumulations- und Eliminationsphase erstreckten sich jeweils über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die im Boden gemessene Konzentration zu Beginn des Versuchs lag bei 140 µg/kg

und nahm ab auf 131 µg/kg am Ende des Versuchs. Die prozentuale Abnahme lag somit bei 6%. Die Wiederfindung betrug 94% der eingesetzten Radioaktivität .

5.15.1 Akkumulation

Der Verlauf der Aufnahme von Lindan durch *L. rubellus* ist in **Abb. 37** und die dazugehörigen Kinetikparameter sind in **Tab. 36** aufgelistet. Der mit Hilfe der nichtlinearen Regressionsanalyse ermittelte BAF ist 3,84. Die Mittelwerte der letzten drei Messpunkte innerhalb der Aufnahmephase liegen innerhalb einer Schwankungsbreite von plus minus 20%, ein steady state war für diesen Zeitraum somit erreicht.

Tab. 36: Aufnahmeparameter von Lindan bei *L. rubellus* in LUFA 2.2; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.

Exposition (d)	BAF	k_s (d ⁻¹)	k_e (d ⁻¹)	r^2
21	3,84	1,29	0,34	0,98

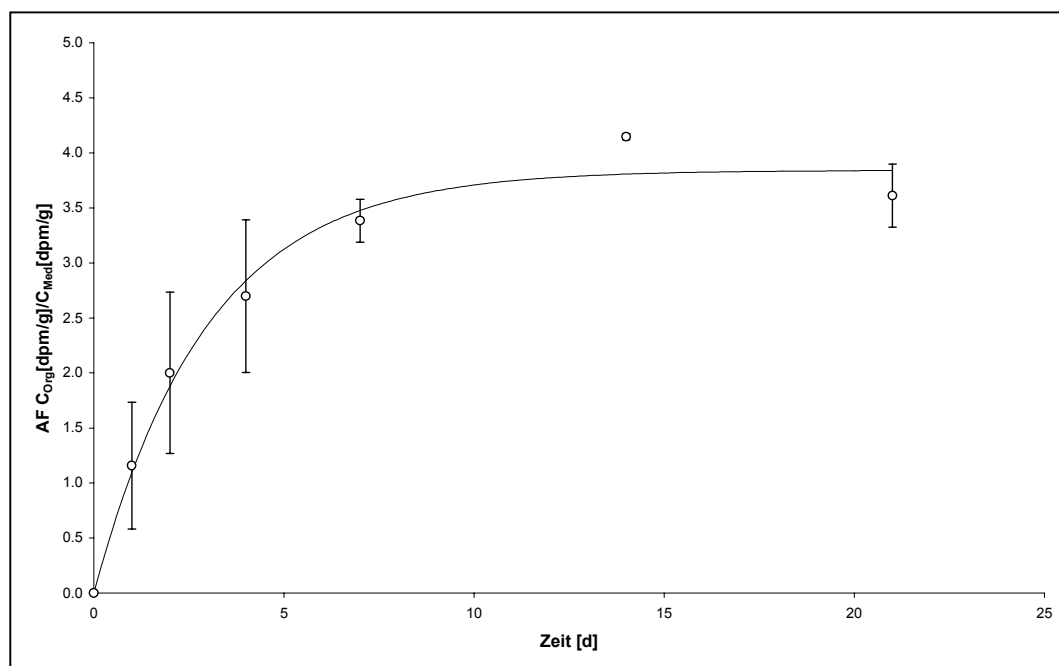


Abb. 37: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ¹⁴C-Lindan bei *L. rubellus* in LUFA 2.2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,98$).

5.15.2 Elimination

Die Anpassung einer nichtlinearen Regression mit einem Ein- bzw. Zweikompartimentmodell ergab keine sinnvollen Ergebnisse. Keine der durchgeführten Berechnungen hatte einen Determinationskoeffizienten (r^2) $> 0,7$. Es wird daher auf die Darstellung eines berechneten Eliminationsverlaufs verzichtet. Die in der **Abb. 38** dargestellten Mittelwerte belegen, dass nur 43,1% der zum Ende der Aufnahme inkorporierten Radioaktivität in einem Zeitraum von 21 Tagen ausgeschieden wurden. Zwischen Tag 4 und 21 der Elimination ist eine weitere Ausscheidung des Tracers nicht festzustellen.

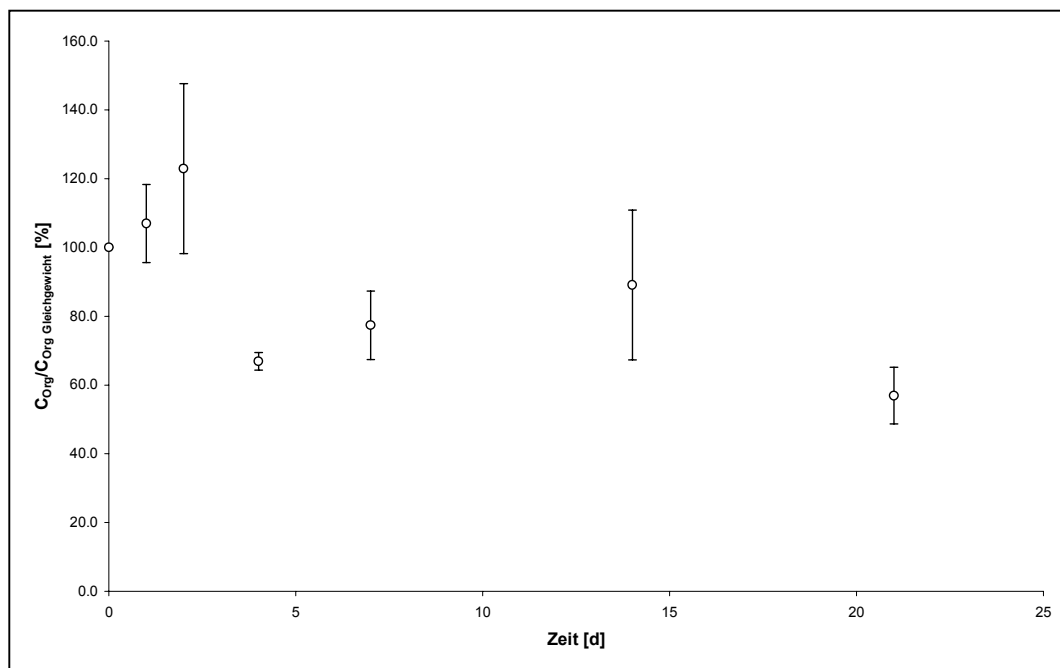


Abb. 38: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ^{14}C -Lindan bei *L. rubellus* in unbelasteter LUFA 2.2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase.

5.16 *Lumbricus rubellus*, LUFA 2.2, HCB

Die Akkumulations- und Eliminationsphase erstreckten sich jeweils über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die im Boden gemessene Konzentration zu Beginn des Versuchs lag bei 634 $\mu\text{g/kg}$ und nahm ab auf 569 $\mu\text{g/kg}$ am Ende des Versuchs. Die prozentuale Abnahme lag somit bei 10%. Die Wiederfindung betrug 83,6% der eingesetzten Radioaktivität.

5.16.1 Akkumulation

Der Verlauf der Aufnahme von HCB durch *L. rubellus* in LUFA 2.2 ist in **Abb. 39** und die dazugehörigen Kinetikparameter sind in **Tab. 37** aufgelistet. Der mit Hilfe der nichtlinearen Regressionsanalyse ermittelte BAF ist 3,99. Die Mittelwerte der letzten drei Messpunkte innerhalb der Aufnahmephase liegen nicht innerhalb einer Schwankungsbreite von $\pm 20\%$, ein definitionskonformer steady state war für diesen Zeitraum somit nicht erreicht. Die nach Tag 14 und 21 bestimmten Akkumulationsfaktoren unterscheiden sich jedoch nicht wesentlich voneinander. Der Gleichgewichtszustand zwischen Aufnahme- und Eliminationsvorgängen scheint somit nach 14 Tagen erreicht worden zu sein.

Tab. 37: Aufnahmeparameter von HCB bei *L. rubellus* in LUFA 2.2; BAF = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme, k_e = Eliminationskonstante der Aufnahme, r^2 = Determinationskoeffizient.

Exposition (d)	BAF	k_s (d ⁻¹)	k_e (d ⁻¹)	r^2
21	3,99	0,95	0,24	0,97

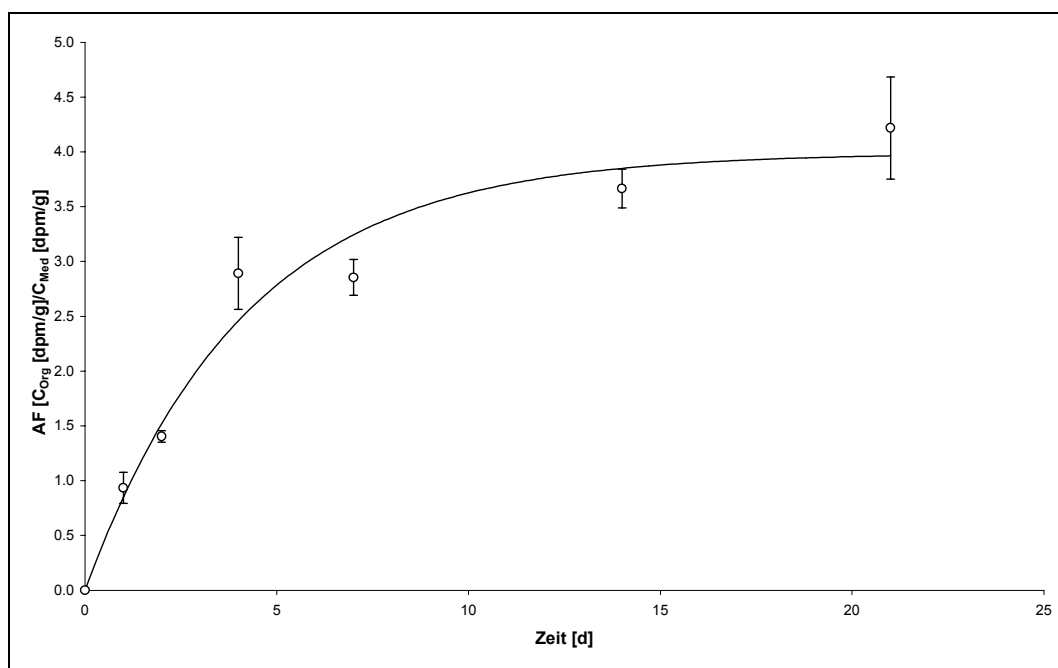


Abb. 39: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ¹⁴C-HCB bei *L. rubellus* in LUFA 2.2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung bis Tag 21, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 0,97$).

5.16.2 Elimination

In **Abb. 40** ist der zeitliche Verlauf der Elimination dargestellt. Der Mittelwert der Aktivität in den Würmern des letzten Messpunktes der Aufnahmephase dient als Ausgangswert (100%) zur Berechnung der Eliminationsdaten. Die radioaktive Konzentration in den Würmern nach erfolgter Elimination wird in Prozent des Ausgangswertes angegeben. **Tab. 38** zeigt die Eliminationsparameter der angewendeten Einkompartimentkinetik.

Tab. 38: Eliminationsparameter der Einkompartimentkinetik für die Ausscheidung von HCB bei *L. rubellus* in LUFA 2.2, Restaktivität = Radioaktivität am letzten Eliminationstag als prozentuale Angabe zur Aktivität der Würmer am letzten Aufnahmetag, k_e = Eliminationskonstante der Einkompartimentkinetik, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.

Restaktivität	Kompartiment	k_e (d ⁻¹)	r^2
7,8%	97%	0,16	1,0

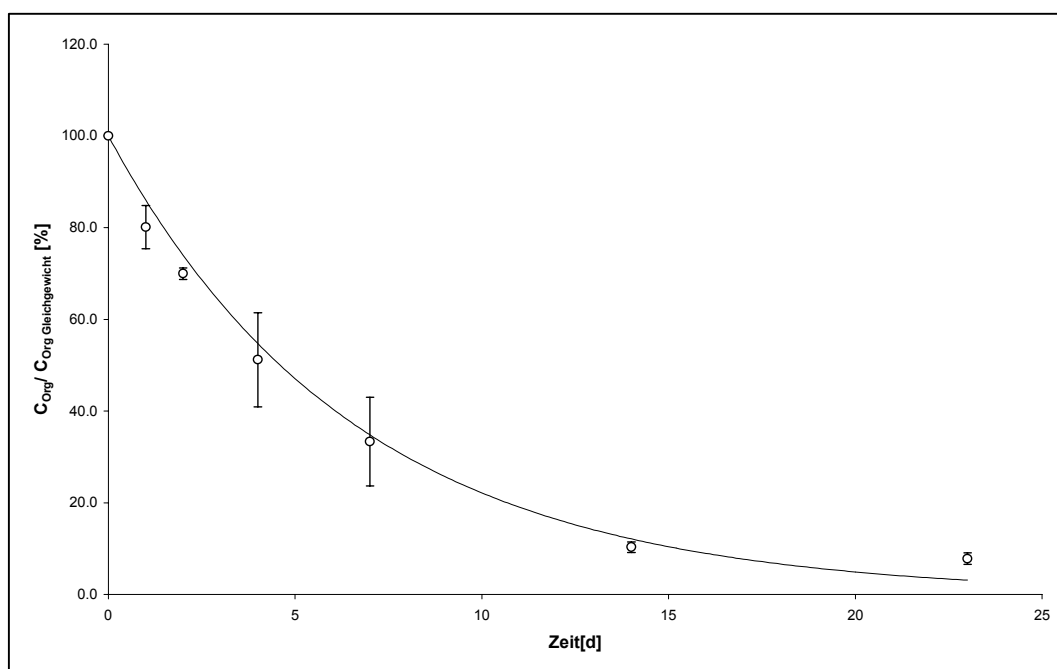


Abb. 40: Zeitlicher Verlauf der Elimination von ¹⁴C-HCB bei *L. rubellus* in unbelasteter LUFA 2.2. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG als prozentualer Anteil der Radioaktivität pro Gramm Wurm FG im steady state der Aufnahmephase, sowie die Anpassung einer nichtlinearen Regression ($r^2 = 1,0$) an ein Zweikompartimentmodell.

5.17 Versuche zum Einfluss des Darminhalts

Um den Einfluss des Darminhalts auf die Akkumulation der Chemikalien einschätzen zu können, wurden die Wurmproben nach der Probenahme geteilt: Jeweils zwei Replikate wurden direkt, die anderen beiden nach 16 – 24 Stunden aufgearbeitet. In der Zwischenzeit wurden die Tiere auf feuchtem Filterpapier gehalten und konnten dabei ihren Darminhalt abgeben. Aus Gründen der zur Verfügung stehenden Biomasse wurden diese Versuche nur mit den beiden Regenwurmspezies durchgeführt. Entscheidender Messparameter für die Beurteilung des Einflusses des Darminhalts war der BAF; d.h. es wurden die jeweiligen Akkumulationsfaktoren auf der Grundlage der Proben mit bzw. ohne Darminhalt sowie der Mittelwert aller vier Replikate miteinander verglichen. In **Tab. 39** sind die wichtigsten Ergebnisse dieser Versuche zusammengefasst, wobei zwischen Spezies, Substrat und Testsubstanz unterschieden wird (die Reihenfolge entspricht der zeitlichen Durchführung).

Generell liegen die jeweiligen BAF-Werte sehr eng beieinander. Nach den vorliegenden Ergebnissen hatte der Darminhalt keinen konsistenten Einfluss auf den BAF. Bezogen auf die Gesamtzahl von 8 durchgeführten Versuchen zeigen sich folgende Verhältnisse zwischen den drei unterschiedlich bestimmten BAF-Werten:

-	BAF (mit Darminhalt) > BAF (ohne Darminhalt):	3 Versuche
-	BAF (mit Darminhalt) < BAF (ohne Darminhalt):	4 Versuche
-	BAF (mit Darminhalt) = BAF (ohne Darminhalt):	1 Versuch
-	BAF (mit Darminhalt) > BAF (Mittelwert):	3 Versuche
-	BAF (mit Darminhalt) < BAF (Mittelwert):	4 Versuche
-	BAF (mit Darminhalt) = BAF (Mittelwert):	1 Versuche
-	BAF (ohne Darminhalt) > BAF (Mittelwert):	4 Versuche
-	BAF (ohne Darminhalt) < BAF (Mittelwert):	4 Versuche
-	BAF (ohne Darminhalt) = BAF (Mittelwert):	0 Versuche

Unter Einbeziehung der Schwankungsbreite der jeweiligen Ergebnisse (95%-Vertrauensbereich) ist damit der Einfluss des Darminhalts als vernachlässigbar anzusehen (zur Diskussion bei Sedimentoligochaeten vgl. MOUNT et al. 1999; EGELER et al. 1999a).

Tab. 39: Einfluss des Darminhalts auf den Bioakkumulationsfaktor bei Regenwürmern in Abhängigkeit von Testsubstanz, Spezies und Substrat (DE = mit Darmentleerung; oDE = ohne Darmentleerung; MW = Mittelwert aller vier Replikate).

Spezies	Darmentleerung	Substrat	Testsubstanz	BAF	95% Vertrauensbereich	
<i>E. fetida</i>	MW	OECD	Lindan	1,3	1,1	1,4
<i>E. fetida</i>	DE	OECD	Lindan	1,0	0,9	1,2
<i>E. fetida</i>	oDE	OECD	Lindan	1,5	1,3	1,7
<i>E. fetida</i>	MW	LUFA	Lindan	3,9	2,8	4,9
<i>E. fetida</i>	DE	LUFA	Lindan	4,5	3,3	5,6
<i>E. fetida</i>	oDE	LUFA	Lindan	3,4	2,3	4,5
<i>L. rubellus</i>	MW	OECD	Lindan	2,6	2,4	2,9
<i>L. rubellus</i>	DE	OECD	Lindan	2,8	2,4	3,2
<i>L. rubellus</i>	oDE	OECD	Lindan	2,5	2,2	2,8
<i>L. rubellus</i>	MW	LUFA	Lindan	3,8	3,5	4,2
<i>L. rubellus</i>	DE	LUFA	Lindan	3,9	3,3	4,6
<i>L. rubellus</i>	oDE	LUFA	Lindan	3,9	2,4	5,3
<i>E. fetida</i>	MW	OECD	HCB	5,8	4,8	6,9
<i>E. fetida</i>	DE	OECD	HCB	4,7	3,2	6,2
<i>E. fetida</i>	oDE	OECD	HCB	5,6	4,3	6,9
<i>E. fetida</i>	MW	LUFA	HCB	2,3	2,0	2,7
<i>E. fetida</i>	DE	LUFA	HCB	2,1	1,6	2,7
<i>E. fetida</i>	oDE	LUFA	HCB	2,3	1,9	2,7
<i>L. rubellus</i>	MW	OECD	HCB	3,1	2,4	3,8
<i>L. rubellus</i>	DE	OECD	HCB	3,0	2,3	3,7
<i>L. rubellus</i>	oDE	OECD	HCB	2,5	2,2	2,8
<i>L. rubellus</i>	MW	LUFA	HCB	4,0	3,4	4,6
<i>L. rubellus</i>	DE	LUFA	HCB	4,2	2,9	5,4
<i>L. rubellus</i>	oDE	LUFA	HCB	3,8	3,4	4,1

5.18 Ergebnisse in der Übersicht

Abschließend werden die wichtigsten Kenngrößen der 16 Versuche dieses Vorhabens getrennt nach Aufnahme und Elimination zusammengefasst (**Tab. 40**, **Tab. 41**).

Tab. 40: Aufnahmeparameter von ^{14}C -Lindan und ^{14}C -HCB bei den vier Oligochaetenarten. Alle Werte beziehen sich auf den steady state. BAF_k = Bioakkumulationsfaktor in dpm/g Wurm FG pro dpm/g Boden FG, k_s = Geschwindigkeitskonstante der Aufnahme.

	Substrat	Dauer (d)	C_s ($\mu\text{g kg}^{-1}$ FG)	C_s ($\mu\text{g kg}^{-1}$ TG)	C_w ($\mu\text{g g}^{-1}$ Wurm FG)	BAF_k	k_s (g Boden g^{-1} Wurm d^{-1})
Lindan							
<i>E. albidus</i>	OECD	28	21	32	0,2	11,8	8,6
<i>E. albidus</i>	LUFA 2.2	21	67	93	1,4	22,0	9,7
<i>E. luxuriosus</i>	OECD	21	73	110	0,5	11,7	36,2
<i>E. luxuriosus</i>	LUFA 2.2	21	63	87	2,3	36,4	32,4
<i>E. fetida</i>	OECD	21	80	120	0,1	1,3	0,9
<i>E. fetida</i>	LUFA 2.2	21	96	133	0,4	3,9	1,5
<i>L. rubellus</i>	OECD	21	101	152	0,3	2,6	0,8
<i>L. rubellus</i>	LUFA 2.2	21	132	183	0,4	3,8	1,3
HCB							
<i>E. albidus</i>	OECD	21	599	899	8,2	13,7*	1,8
<i>E. albidus</i>	LUFA 2.2	21	546	758	13,3	28,0	7,6
<i>E. luxuriosus</i>	OECD	28	680	1020	17,0	26,4	9,3
<i>E. luxuriosus</i>	LUFA 2.2	21	422	586	14,8	34,9	6,7
<i>E. fetida</i>	OECD	28	516	774	3,4	5,8	1,6
<i>E. fetida</i>	LUFA 2.2	21	599	831	1,3	2,3	1,8
<i>L. rubellus</i>	OECD	21	362	542	0,8	3,1	1,8
<i>L. rubellus</i>	LUFA 2.2	21	582	808	2,0	4,0	1,0

* In Kap. 5.2.1 als 20,45 angegeben; siehe Kap. 6.2.1.1 als Erklärung für die Änderung.

Tab. 41: Eliminationsparameter; Restaktivität = Radioaktivität pro Gramm Wurm am letzten Tag der Elimination (d 14) bezogen auf die Aktivität pro Gramm Wurm am letzten Aufnahmetag, Kompartiment A = "schnelles Kompartiment", Kompartiment B = "langsames Kompartiment", k_a = Eliminationskonstante aus Kompartiment A, k_b = Eliminationskonstante aus Kompartiment B, r^2 = Determinationskoeffizient der Kurvenanpassung.

	Substrat	Dauer (d)	Restaktivität (%)	A (%)	k_a (d ⁻¹)	B (%)	k_b (d ⁻¹)	r^2
Lindan								
<i>E. albidus</i>	OECD	32	50,1	63	1,4	37	-0,01	0,88*
<i>E. albidus</i>	LUFA 2.2	21	8,6	42	2,77	58	0,09	0,99
<i>E. luxuriosus</i>	OECD	21	2,6	91	0,82	9	0,06	0,99
<i>E. luxuriosus</i>	LUFA 2.2	21	4,1	60	0,9	40	0,11	0,99
<i>E. fetida</i>	OECD	21	8,8	65	0,65	34	0,064	0,99
<i>E. fetida</i>	LUFA 2.2	21	16,3	87	0,42	14	0,007	0,99
<i>L. rubellus</i>	OECD	21	69,5	--	--	--	--	--
<i>L. rubellus</i>	LUFA 2.2	21	56,9	--	--	--	--	--
HCB								
<i>E. albidus</i>	OECD	21	14,3	29	0,56	71	0,07	0,98
<i>E. albidus</i>	LUFA 2.2	25	10,0	17	1,0	80	0,08	0,97
<i>E. luxuriosus</i>	OECD	28	0,02	48	23,9	52	0,28	0,98
<i>E. luxuriosus</i>	LUFA 2.2	21	10,2	103	0,12	--	--	0,98
<i>E. fetida</i>	OECD	14	6,5	49	38,3	51	0,15	1,00
<i>E. fetida</i>	LUFA 2.2	21	3,6	109	0,16	--	--	0,97
<i>L. rubellus</i>	OECD	21	6,8	83	3,85	17	0,06	1,00
<i>L. rubellus</i>	LUFA 2.2	21	7,8	97	0,16	--	--	1,00

*Starke Streuung der Messpunkte; Versuch schwer interpretierbar

6 Diskussion

6.1 Methodik

6.1.1 Testorganismen

Wie schon in Kap. 4.1 dargelegt, sollen Organismen, die in Bioakkumulationstests eingesetzt werden, bestimmte Bedingungen erfüllen (RÖMBKE et al. 1998):

- Haltung und Zucht im Labor sollten einfach sein;
- Lebensweise und Stoffwechsel der jeweiligen Tiere sollten eine Anreicherung der betreffenden Chemikalie ermöglichen;
- die Toleranz gegenüber akuten Wirkungen der Chemikalie sollte relativ hoch sein, damit eine von toxischen Effekten unbeeinflusste Aufnahme und Verteilung erfolgt;
- die Handhabung der Tiere im Test sollte unproblematisch sein.

Dazu kommt als übergeordnetes Kriterium die ökologische Relevanz der jeweiligen Spezies. Im Folgenden wird diskutiert, inwieweit die vier getesteten Arten diese Bedingungen erfüllen.

Haltung und Zucht: Kompostwürmer sind, nicht zuletzt aufgrund ihrer langjährigen Verwendung als Testorganismen, unproblematisch zu züchten. Obwohl sich *L. rubellus* unter sehr ähnlichen Bedingungen halten lässt, muss bei der Zucht der deutlich längere Generationszyklus sowie der größere Platzbedarf bedacht werden. Damit sind einer Massenzucht organisatorische Grenzen gesetzt, die bei der Planung von Versuchen zu berücksichtigen sind. Unter den Haltungsbedingungen im Labor der ECT GmbH produzieren beide Enchytraeenarten zu jeder Jahreszeit genügend Tiere, wobei der Zeitaufwand für die Betreuung als gering einzuschätzen ist. Damit ist dieses Kriterium für alle vier Arten erfüllt.

Anreicherung: Wie die Ergebnisse zeigen, reichern alle eingesetzten Testorganismen die Modellchemikalien messbar an. Die Radioaktivität in den Enchytraeen wurde mit Darminhalt bestimmt, da die Differenz des Gewichtes vor und nach der Darmentleerung der Würmer nicht sicher messbar war. Wie in Kap. 5.17 gezeigt, hatte eine Darmentleerung bei den Regenwürmern keinen gerichteten oder erheblichen Einfluss auf den BAF, so dass die bei diesen relativ großen Tieren mögliche Differenzierung nicht empfohlen werden kann. Damit ist dieses Kriterium für alle vier Arten erfüllt.

Chemikaliertoleranz: Die im Vorfeld dieser Arbeit ermittelte Toleranz der Testorganismen gegenüber den eingesetzten Modellchemikalien erwies sich als hoch genug, um eine von toxischen Effekten unbeeinflusste Aufnahme zu ermöglichen. Zugleich waren die Testsubstanzkonzentrationen so hoch, dass eine sichere Erfassung der Chemikalien in Würmern und Boden gewährleistet war. Damit ist auch dieses Kriterium für alle vier Arten erfüllt.

Handhabbarkeit: Aufgrund ihrer Körpergröße und damit Biomasse waren beide Regenwurmarten leicht handhabbar. Allerdings neigen die Tiere bei „Einzelhaltung“ (*L. rubellus* noch mehr als *E. fetida*) dazu, das Testgefäß zu verlassen, so dass eine Abdeckung unbedingt erforderlich ist. Bei den Enchytraeen ist die Situation etwas differenzierter. Für *E. albidus* als Testorganismus sprechen Größe und Masse und damit die vereinfachte Handhabbarkeit im Labor (z.B. eine leichte und schnelle Aussortierung aus den Testsubstraten). Dieser Organismus verließ jedoch – im Gegensatz zu *E. luxuriosus* – in einigen Fällen das Testsubstrat, insbesondere die OECD-Kunsterde. Trotz Akklimatisierung wurde dieses Verhalten während der ersten Tage der Aufnahmephase beobachtet. Die an der Testgefäßwand anhaftenden Individuen wurden, soweit bemerkt, mit einer Federstahlpinzette ins Testsubstrat zurückgeführt. Es kam aber vor, dass vereinzelt vertrocknete Exemplare an der Gefäßwand gefunden wurden. Bei einer Verwendung von nur wenigen Individuen pro Testgefäß (z.B. fünf Würmer bei AMORIM (2000)) könnten daher die Anreicherungsfaktoren verfälscht werden. Bei Verwendung von 20 Individuen pro Replikat werden Beeinflussungen der Wägung wie z.B. durch anhaftende Wassertröpfchen oder durch das Auftreten von Jungtieren minimiert. Aufgrund seiner höheren Biomasse und der damit verbundenen genaueren Wägung sowie des längeren Reproduktionszyklus ist *E. albidus* als Testorganismus vorzuziehen.

Ökologische Relevanz: Hinsichtlich der ökologischen Relevanz für mitteleuropäische Böden sind die beiden Freilandarten *E. luxuriosus* und *L. rubellus* den etablierten Testspezies *E. albidus* bzw. *E. fetida* überlegen. Dies trifft insbesondere auf den Vergleich der beiden Regenwurmarten zu, wo *E. fetida* als typischer Kompostbewohner deutlich seltener in Böden vorkommt als *E. albidus*. Generell ist aber darauf hinzuweisen, dass alle getesteten Oligochaeten als endogäische, saprophage Tiere zu den für die Bodenstrukturen bzw. –funktionen wichtigsten Organismen gehören.

Zusammenfassend ist damit festzuhalten, dass sich alle Testorganismen gut als Bioakkumulationsindikator einsetzen lassen. Die ermittelten Aufnahme- und Eliminationsdaten innerhalb der beiden Artengruppen (Regenwürmer bzw. Enchytraeen) unterscheiden sich nicht wesentlich von einander. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Literaturangaben: So liegt die artspezifische Aufnahmerate oft höchstens um den Faktor 3 auseinander (z.B. HAQUE & EBING 1988). Unabhängig davon kann es, je nach Substanz, bodenartspezifische Unterschiede geben (EBERT 1992). Eine Verbreiterung des Datenmaterials vorausgesetzt könnten die mit den Standardtestorganismen erzielten Laborergebnisse auf die ökologisch relevanteren Freilandarten übertragen werden. Daher ist zum jetzigen Zeitpunkt, primär aufgrund der unterschiedlich einfachen Handhabung der Organismen, *E. albidus* für den Routineeinsatz zu empfehlen. Bei den Regenwürmern ist die Entscheidung zwischen den beiden getesteten Arten schwieriger, doch spricht das Auftreten von hohen Rückständen in den Versuchen mit Lindan (vgl. Kap. 6.2.2) eher für *L. rubellus*. Nachteilig ist bei dieser Art jedoch der hohe Zuchtaufwand sowie die Fluchttendenz einiger Individuen im Experiment, was zu einer erhöhten Variabilität der Ergebnisse führen kann.

6.1.2 Testsubstrate

Das auszuwählende Testsubstrat darf auf die eingesetzten Testorganismen keine negativen Wirkungen ausüben. Feuchtegehalt und pH-Wert des Testbodens sollten sich im Optimalbereich der Tiere befinden, um eine von diesen Parametern unbeeinflusste Akkumulation zu gewährleisten. Der pH-Wert und der eingestellte Feuchtegehalt in beiden Testsubstraten erfüllten dieses Kriterium. Dabei ist die wöchentliche Einstellung des Feuchtegehalts durch Zugabe von rekonstituiertem Wasser besonders wichtig, da Oligochaeten auf Austrocknung negativ reagieren. Für die OECD-Kunsterde sprechen deren weitgehend konstante Eigenschaften, wodurch sich Daten aus diesen Tests sehr gut vergleichen lassen. Der Einsatz des natürlichen Standardbodens vereinfacht den Vergleich mit Ergebnissen aus Freilandversuchen. Prinzipiell sind demnach beide Böden für Bioakkumulationstudien mit Oligochaeten geeignet. Zu einem ähnlichen Schluss kommt JAGER (1998) bei einem Vergleich verschiedener Modelle zur Bioakkumulation durch Oligochaeten: Signifikante Unterschiede zwischen OECD-Boden und Freilandböden wurden dabei nicht gefunden. Dabei ist allerdings daraufhin zu weisen, dass diese Versuche meist mit Böden und Spezies durchgeführt wurden, die sich hinsichtlich pH-Wert und Korngrößenverteilung nicht stark voneinander unterscheiden (wohl aber im organischen Gehalt!).

Der unterschiedliche organische Kohlenstoffgehalt beider Testsubstrate beeinflusst die Bioverfügbarkeit der Chemikalien und somit den Bioakkumulationsfaktor. So wurden in dem natürlichen Standardboden mit einer Ausnahme höhere BAF-Werte ermittelt, die mit dem geringeren organischen Kohlenstoffgehalt dieses Bodens gut korrelieren. Damit ergeben sich durch eine Normierung der Daten auf den Kohlenstoffgehalt im allgemeinen sehr ähnliche BAF-Werte. Bei Verifizierung dieser Datenlage ließen sich damit leicht Umrechnungen ausführen (vgl. VAN GESTEL & MA 1990), womit weitere Bioakkumulationsuntersuchungen sich nur auf einen dieser beiden Böden beschränken könnten. Aufgrund der weitergehenden Standardisierung wäre demnach der OECD-Boden zu präferieren.

6.1.3 Modellchemikalien

Obwohl es nicht Aufgabe dieses Vorhabens war, die Verwendung der beiden Testsubstanzen zu beurteilen, soll im Folgenden kurz auf die mit ihnen gemachten Erfahrungen eingegangen werden – nicht zuletzt, um ihre generelle Eignung als Modellchemikalien in Bioakkumulationsstudien einschätzen zu können. Mit Lindan und HCB wurden zwei Modellchemikalien ausgewählt, über die bereits zahlreiche Daten zur akuten und chronischen Toxizität vorliegen. Dies erleichtert den Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit bereits durchgeführten ökotoxikologischen Untersuchungen. Beide Substanzen haben weiterhin den Vorteil der kommerziellen Verfügbarkeit (auch in radioaktiv markierter Form) sowie der guten Handhabbarkeit im Labor. Ferner werden beide Chemikalien in nahezu allen Umweltkompartimenten nachgewiesen. Trotz der unterschiedlichen Lipophilie beider Testsubstanzen wurden sie in den hier vorgestellten Tests in ähnlicher Größenordnung durch die beiden Regenwurm- bzw. Enchytraeenarten akkumuliert.

Die Verwendung der Modellchemikalien in radioaktiv markierter Form ermöglichte es, umweltrelevante Konzentrationen in Organismen und Böden zu bestimmen. Dieses Vorgehen hat jedoch den Nachteil, dass keine Informationen über eine mögliche Metabolisierung der Testsubstanz vorliegen. EGELER et al. (1999) konnten zeigen, dass weder Lindan noch HCB durch sedimentbewohnende Oligochaeten nennenswert metabolisiert werden. Die Ergebnisse der Versuche mit *L. rubellus* von FÜLL (1996), die Daten in der vorliegenden Arbeit mit der gleichen Spezies sowie der Anreicherungsverlauf von Lindan durch *E. luxuriosus* in OECD-Kunsterde deuten auf eine mögliche Metabolisierung von Lindan hin. Um hierüber Aufschluß zu bekommen, ist die Auftrennung der Gesamtradioaktivität in den Organismen mittels geeig-

neten Methoden (z.B. HPLC) notwendig und anhand der genommenen Rückstellproben auch möglich.

6.1.4 Testdurchführung

Im Folgenden werden die Erfahrungen bei der Durchführung von 16 Versuchen anhand verschiedener Kriterien diskutiert, wobei aufgrund der geringeren Literaturangaben vor allem die Enchytraeentests eingegangen wird.

Praktikabilität

Die Testmethode ist einfach durchzuführen. Zum Beispiel ermöglicht die hohe Individuendichte in den Kulturen trotz der geringen Größe der Enchytraeen ein rasches Aussortieren geeigneter Tiere für den Testeinsatz. Allerdings war die Umsetzung der kleinen Würmer zu Beginn der Eliminationsphase aufgrund ihrer großen Anzahl pro Replikat sehr zeitintensiv. Die Testbetreuung (wöchentliche Feuchteinstellung und Fütterung) stellte nur einen geringen Arbeitsaufwand dar. Dagegen bewirkte die geringe Substratmenge in den Versuchen mit Enchytraeen ein schnelles Wiederfinden der Tiere. Nicht zuletzt sind Bioakkumulationstests mit Enchytraeen aufgrund dieser geringen Substratmenge, der niedrigen Verwendung radioaktiv markierter Testsubstanzen und den damit einhergehenden geringeren Entsorgungskosten gegenüber Experimenten mit Regenwürmern kostengünstiger. Im Vergleich mit akuten und chronischen Regenwurmtests ist die reine Durchführung eines Bioakkumulationstests mit diesen Tieren ähnlich aufwendig.

Versuchsaufbau

Die Aufbewahrung der Testgefäße in einem Klimaschrank gewährleistete eine Temperaturkonstanz über die Versuchsdauer. Damit wurde ein möglicher Einfluß der Temperatur auf die Verteilung der Testsubstanzen in den Böden wie auch auf das Verhalten der Tiere innerhalb der einzelnen Experimente ausgeschlossen.

Der Einsatz der ausgewählten Testgefäße erwies sich aus zwei Gründen als vorteilhaft. Zum einen erlaubte der Durchmesser der Glasgefäße ein ausreichendes Schüttvolumen der eingesetzten Substratmenge, und damit die Möglichkeit der vollständigen "Eingrabung" der Tiere. Zum anderen fand eine Adsorption der Testsubstanzen an die Gefäßwand so gut wie gar nicht statt, was anhand von Wischproben belegt werden konnte.

Die Wiederfindungsraten der eingesetzten Radioaktivität variierten je nach Verdunstung des Lösungsmittels zwischen 86 und 95% bei den Enchytraeen bzw. 65 und 109% bei den Regenwürmern. Damit liegen die Werte der Enchytraeentests mit einer Ausnahme (*E. luxuriosus*) in einem Bereich zwischen 90 und 110%, wie er in etablierten Testverfahren gefordert wird (z.B. OECD 2000b). Dagegen wurde in jeweils zwei Tests mit *E. fetida* und *L. rubellus* die untere Grenze um 6 - 12% verfehlt. In einem weiteren Versuch *L. rubellus* (HCB in OECD-Erde) betrug die Wiederfindungsrate nur 65%. Das Ergebnis der Enchytraeentests entspricht weitgehend den von EGELER et al. (1999a) für Sedimentversuche mit Tubificiden angegebenen Werten ($\geq 95\%$). Damit sind die in diesen Versuchen gefundenen Wiederfindungsraten als sehr gut einzuschätzen, während bei den Regenwürmern eine Optimierung nötig ist. Letzteres mag damit zusammenhängen, dass pro Replikat nur ein Individuum aufgearbeitet wurde. Zudem wurden die niedrigsten Wiederfindungsraten in den ersten beiden Versuchen mit jeder Art gefunden, wo die Erfahrung hinsichtlich der Testdurchführung noch relativ gering war (z.B. traten hier noch Verluste durch Flucht einzelner Testorganismen auf).

In allen Experimenten zur Aufnahmephase konnte eine Konzentrationsabnahme beider Testchemikalien im Testsubstrat bis zu 13% (Enchytraeen) bzw. – mit einer Ausnahme – 23% (Regenwürmer) beobachtet werden. Demgegenüber fand AMORIM (2000) nach vier Wochen eine Abnahme von ca. 50% (sowohl in OECD-Kunsterde als auch in einem Freilandboden), wobei jedoch in ihren Experimenten die Lindankonzentration im mg-Bereich und damit weit aus höher als in den hier beschriebenen Versuchen lag. Aufgrund dieser großen Konzentration könnte eine schnelle Adaption der Bodenmikroorganismen an die Substanz und damit deren Nutzung als Kohlenstoffquelle erfolgt sein, was bei den hier verwendeten, deutlich niedrigeren Konzentrationen unwahrscheinlich ist.

Die Probenaufarbeitung der Würmer erwies sich als leicht durchführbar. Sowohl die Auflösung der Enchytraeen in Soluene als auch die Verbrennung der Regenwürmer erlaubten eine schnelle Datenerfassung. Dadurch ließen sich während der Aufnahme- und Eliminationsphase die Konzentrationen im Organismus überwachen, so dass z.B. im Versuch mit *E. luxuriosus*, LUFA 2.2 und HCB ein zusätzlicher Messpunkt am Tag 18 der Aufnahmephase eingeschoben werden konnte. Zu beachten ist allerdings, dass bei einer über 42 Tage hinausgehenden Testdauer das Auftreten von Jungtieren bei den Enchytraeen das Ergebnis beeinflussen kann.

Die Radioaktivitätsbestimmungen der mit KOH bzw. TEG befüllten Waschflaschen lieferten keinen Hinweis auf einen nennenswerten Abbauvorgang der Testsubstanzen und eine damit zusammenhängende Konzentrationsabnahme. Lediglich in einem Versuch wurde in den Waschflaschen Radioaktivität gemessen (*E. albidus*, LUFA 2.2, Lindan). Bezogen auf die in diesem Versuch anfangs eingesetzte Gesamtradioaktivität wurden nur 0,07% in beiden TEG-Waschflaschen nachgewiesen. In den mit Kalilauge befüllten Flaschen wurden 0,26% der Gesamtradioaktivität gefunden. In beiden Fällen entspricht dies vernachlässigbaren Anteilen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass nicht jedes Abbauprodukt quantitativ in den dafür vorgesehenen Waschflaschen gebunden werden konnte. Flüchtige Abbauprodukte könnten auch während der Probenahme, der wöchentlichen FeuchteEinstellung und der Futtereinmischung entwichen sein, da hierfür das Edelstahlgefäß geöffnet werden musste.

Die Abnahme der Testsubstanzkonzentration in den einzelnen Versuchen könnte aber auch messtechnisch bedingt sein. Damit die radioaktive Substanz mit der LSC-Methode gemessen werden kann, muss diese in dem dafür vorgesehenen Cocktail gelöst sein. Durch die Bildung von gebundenen Rückständen der Testsubstanzen in beiden Testböden könnte das Messsystem einen Teil der Radioaktivität nicht erfassen. Die Bildung dieser sogenannten "bound-residues" ist beispielsweise für Lindan vom Bodentyp und der Zeitspanne abhängig. So konnten "bound-residues" von ^{14}C -Lindan, die bald nach der Applikation gebildet wurden, leichter freigesetzt werden als bereits "gealterte" Rückstände (DE ANDREA & WIENDL 1995). Das bedeutet, dass nach einer Zeitspanne von drei Wochen die Substanzen fester an die Bodenpartikel gebunden sind, wodurch nur ein Teil der Radioaktivität vom Messsystem erfaßt und eine Konzentrationsabnahme "vorgetäuscht" worden wäre. Dieser für die radiochemische Analytik nicht messbare Teil der Substanzen kann aber für die Bodenorganismen sehr wohl bioverfügbar sein.

Applikation

Die beschriebene Applikationsweise der Testsubstanzen in die OECD-Kunsterde und in den LUFA-Boden ermöglichte eine homogene Verteilung beider Chemikalien in den Testböden. Unter Berücksichtigung der Lipophilie der Substanzen und des organischen Anteils der Testsubstrate ist die Verteilung sehr gleichmäßig. Die Art und Weise der Chemikalieneinmischung ist stark von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der jeweiligen Substanz ab-

hängig und in vielen Fällen zu modifizieren. So besteht die Gefahr, dass leicht flüchtige Testsubstanzen in erheblichen Anteilen mit dem Lösungsmittel verdampfen könnten. Die Leitung des verdampfenden Lösungsmittels über Adsorbersubstanzen verringert dieses Risiko und ermöglicht zudem eine genauere Bilanzierung von Einsatz und Verlust der Testsubstanz (EGELER et al. 1999a).

Für die Methodenentwicklung stellt sich die Frage, ob der Beginn der Aufnahmephase unmittelbar nach Applikation oder erst nach einem "Alterungsprozess" erfolgen soll. Der sofortige Versuchsbeginn, wie in dieser Arbeit durchgeführt, simuliert eine "worst case" Situation, in der Bodenorganismen eines Habitats einem Chemikalieneintrag ohne Einstellung eines Gleichgewichts der Substanz zwischen anorganischer bzw. organischer Bodenfestphase und dem Porenwasser ausgesetzt sind. Wird das frisch kontaminierte Substrat zunächst gelagert kann sich die Anreicherung unter Umständen unterscheiden (EGELER et al. 1999a). Mit ^{14}C -Lindan kontaminierte OECD-Kunsterde bzw. ein Freilandtestboden führten nach einer Lagerung von bis zu 10 Monaten zum Konzentrationsabbau der Substanz im Substrat, aber nicht zu einem wesentlichen Unterschied der Bioakkumulationsfaktoren bei *E. albidus* (AMORIM 2000). Ausgehend von der zu untersuchenden Substanz sollten in einer zu entwickelnden Richtlinie zur Bestimmung der Bioakkumulation beide Möglichkeiten des Testbeginns, d.h. nach erfolgter Applikation oder nach zwischenzeitlicher Lagerung, möglich sein.

Dauer

Die in den ersten Testdurchgängen noch variierte Dauer von Aufnahme- bzw. Eliminationsphase wurde mit zunehmender Erfahrung auf 21 Tage pro Phase verkürzt. Dieser Zeitraum erlaubte in 15 von 16 Versuchen das Erreichen eines Steady State. In 13 von 16 Versuchen wurde zudem innerhalb von 21 Tagen fast die gesamte aufgenommene Radioaktivität ausgeschieden. Dabei hätte in den Ausnahmefällen auch eine deutlich verlängerte Eliminationsphase zu keinem anderen Ergebnis geführt, denn die Konzentration der radioaktiven Rückstände änderte sich im Zeitraum zwischen ca. 5 und 21 Tagen nach Beginn der Elimination praktisch nicht mehr.

Im Zusammenhang mit der Dauer der Tests ist kurz auf die Frage der Fütterung einzugehen. Zwar konnten MA et al. (1995) in Versuchen mit *L. rubellus* und PAHs nachweisen, dass die Tiere im Hungerzustand deutlich mehr Testsubstanz aufnahmen. Auf der anderen Seite ist

aber bei einer Testdauer von mehr als zwei Wochen eine Futterzugabe notwendig, um das Wohlergehen der Würmer sicherzustellen. Nach den Ergebnissen von BELFROID et al. (1994b, 1995a) ist dieser Aufnahmepfad nur bei Substanzen mit hohem $\log P_{ow}$ relevant, doch ist die Datenlage dazu noch sehr schmal. Zudem bedeutet der Verzicht auf die - methodisch schwierige - Kontamination des Futters nicht, dass dieser Aufnahmepfad total vernachlässigt würde, denn die Tiere fressen sich auch durch das Substrat. Zusammenfassend ist zu empfehlen, dass in Standardtests auf eine separate Kontamination des zugesetzten Futters verzichtet werden sollte, wenn während des Tests zugefüttert werden muss. Die Möglichkeit, das Futter vor der Testsubstanzapplikation schon in den Boden einzumischen, stellt allerdings eine Alternative dar, die sowohl die Nährstoffversorgung der Testorganismen als auch die höchstmögliche Exposition gewährleistet.

Validitätskriterien

Die verwendete Applikationsmethode und die damit verbundene homogene Verteilung der Testsubstanzen in beiden Substraten erlauben in Verbindung mit der Messmethode die Erfüllung eines der Validitätskriterien des Bioakkumulationstests für aquatische Systeme (OECD, 1996): Die Konzentrationen der Testsubstanzen in den Testböden schwankten während der Aufnahmephase meist um weniger als 20% des Mittelwertes der Messdaten. Damit ist auch die gemessene Konzentrationsabnahme der Substanzen in 14 von 16 Versuchen weitgehend mit dieser Richtlinie konform. Die Temperaturschwankungen während der Experimente lagen, wie bei OECD (1996) gefordert, innerhalb von $\pm 2^\circ\text{C}$.

Für Regenwürmer fordern verschiedene Akut- wie Reproduktionstests (OECD 1984; 2001) eine Mortalität von höchstens 10% nach 14 bzw. 28 Tagen. In den hier durchgeführten Versuchen lag die Mortalität über den gesamten Versuchszeitraum (Aufnahme und Elimination) mit einer Ausnahme (*E. fetida*, HCB in OECD-Kunsterde; siehe Kap. 5.10) unter 10%. Es bietet sich daher eine direkte Übernahme dieses Kriteriums an, wobei die Gesamtlänge der Versuche (42 - 56 Tage) bei der endgültigen Festlegung des Kriteriums berücksichtigt werden sollte.

Nach (OECD 1996) gilt ein Bioakkumulationstest mit Fischen als valide, wenn sowohl in den Kontroll- als auch in den Testansätzen eine Sterblichkeitsrate von 10% nicht überschritten wird. Beim Enchytraeen-Reproduktionstest sollte nach 21 Tagen eine Mortalität der Adulti von 20% nicht überschritten werden (OECD 2000a). Aufgrund der gleichen Versuchsdauer

von 21 Tagen kann dieses Kriterium direkt übernommen werden, doch sollte bis zum Ende der Eliminationsphase eine höhere Mortalität aufgrund der kompletten Versuchsdauer von insgesamt 42 Tagen erlaubt sein.

In **Abb. 41** ist die wiedergefundene Anzahl der Würmer am Ende der Aufnahmephase dargestellt. Dabei handelt es sich um die Mittelwerte aus jeweils vier Replikaten der einzelnen Versuche. Aufgetragen sind die Versuche von links nach rechts in chronologischer Reihenfolge der Testdurchführung. Hierbei wird deutlich, dass in sechs von acht Versuchen das Validitätskriterium hinsichtlich Mortalität (ERT) erfüllt wird, indem mindestens 16 Würmer wiedergefunden wurden. Der Versuch mit *E. luxuriosus*, Kunsterde und Lindan verfehlte mit 15 wiedergefundenen Würmern nur knapp diesen Wert. Es ist nicht bekannt, weshalb im Versuch mit *E. albidus*, Kunsterde und HCB nur ein Viertel der Tiere überlebten. Die hier nicht dargestellte Mortalität am Ende der Eliminationsphase stützt den Eindruck, dass mit zunehmender Erfahrung die Auswahl und Wiederfindung der Würmer aus den jeweiligen Böden und die Minimierung des Verletzungsrisikos beim Umsetzen in ein fremdstofffreies Substrat permanent optimiert wurde. Dies zeigt sich vor allem darin, dass der zuletzt durchgeführte Versuch eine sehr geringe Mortalität (< 10%) über die komplette Versuchsdauer aufweist. Aufgrund dieser Erfahrungen sind zusätzliche Hilfsmittel für das Wiederfinden der Tiere, wie z.B. die Färbung der Würmer (OECD 2000) nicht notwendig. Vielmehr ist die Testmethode auch ohne Erfahrung mit dem Umgang von Enchytraeen als leicht durchführbar zu betrachten.

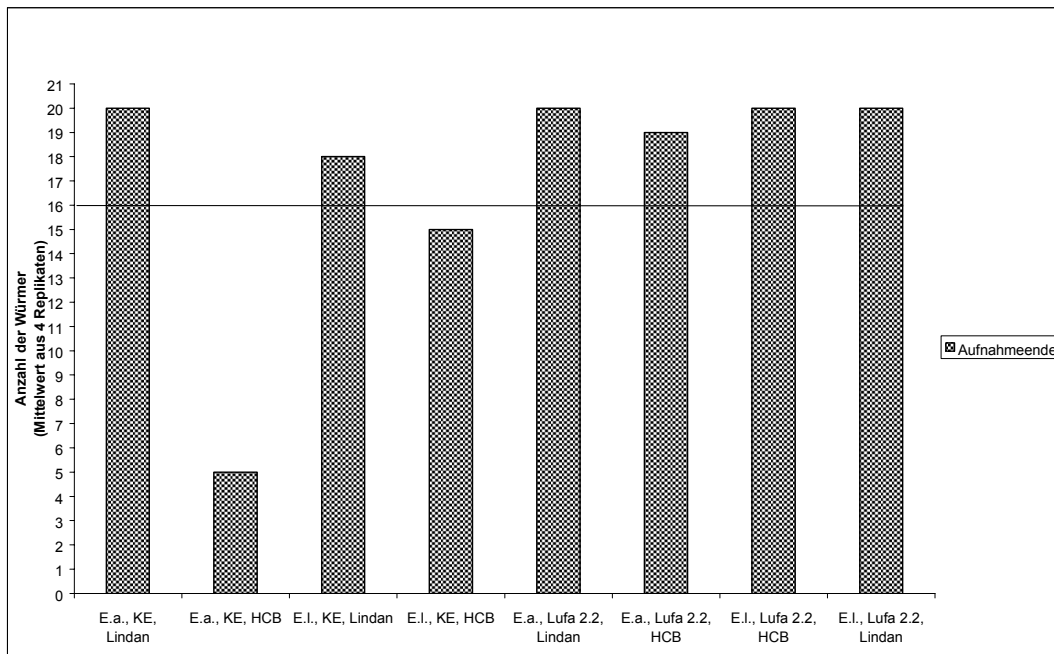


Abb. 41: Anzahl der wiedergefundenen Würmer am Ende der Aufnahmephase nach mindestens 21 Tage Versuchsdauer. Die Anzahl der eingesetzten Würmer betrug 20 Exemplare. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl der Würmer aus vier Replikaten am Ende der Aufnahmephase sowie die Validitätsgrenze bezüglich Mortalität aus der ERT-Richtlinie (20% = 4 Würmer).

6.2 Diskussion und Vergleich der Ergebnisse

Wie schon im vorhergehenden Kapitel wird aufgrund der größeren Erfahrung mit Regenwürmern bei der Durchführung von Akkumulationstests auf die Ergebnisse der Enchytraeentests genauer eingegangen.

6.2.1 Enchytraeidae

6.2.1.1 Aufnahmephase

In dem zuerst durchgeführten Versuch (*E. albidus*, OECD-Kunsterde, Lindan) zeigte sich, dass bei einer Aufnahmephase von länger als 28 Tagen mit juvenilen Würmern zu rechnen ist. Der nach 60 Tagen dieses Versuches ermittelte Anreicherungsfaktor wird nicht in den Vergleich mit den übrigen Testergebnissen einbezogen, da zu diesem Zeitpunkt die Radioaktivität hauptsächlich in juvenilen Würmern gemessen wurde. Ein Vergleich mit dieser zweiten Generation erscheint deshalb nicht sinnvoll.

Die Anpassung der nichtlinearen Regression an die experimentell gewonnenen Aufnahme­daten ist bei sieben der acht Versuche mit einem Determinationskoeffizienten von $r^2 > 0,9$ sehr gut. In dem Experiment zur Untersuchung der Aufnahme von Lindan durch *E. luxuriosus* in OECD-Kunsterde ist die Güte der Anpassung mit $r^2 = 0,8$ als akzeptabel zu betrachten (EU 2000). In diesem Versuch ist weiterhin ein überdurchschnittlich großer Standardschätzfehler der Aufnahme­parameter zu beobachten (**Tab. 17**). Das bedeutet, dass die Anpassung der nichtlinearen Regression an die experimentell ermittelten Daten mit Unsicherheiten behaftet ist. In allen anderen Anreicherungsuntersuchungen sind die mittels SPSS berechneten Fehler der Aufnahme­parameter gering. Die Messwerte der einzelnen Messzeitpunkte unterliegen innerhalb der vier Replikate geringen Schwankungen. Insbesondere die Versuchsdurchgänge mit LUFA 2.2 zeigen eine gute Replizierbarkeit, da die Varianz der einzelnen Testreplikate sehr niedrig ist.

Im Versuch mit *E. luxuriosus* und Lindan in OECD-Kunsterde nahm der BAF von 13,6 am 8. Aufnahme­tag auf 7,9 am 21. Aufnahme­tag ab. Trotz konstanter Wurmbiomasse über die komplette Aufnahme­phase sank die Radioaktivität im Organismus. So wurde am 8. Tag ein Mittelwert der vier Replikate von 237960 dpm/g FG Wurm gemessen und am 21. Aufnahme­tag ein Mittelwert von 120924 dpm/g FG Wurm. Eine mögliche Erklärung hierfür kann eine eventuelle Metabolisierung von Lindan im Organismus oder im Substrat sein. Durch diesen Umwandlungsprozeß kann es zur einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Aufnahme und Elimination im Organismus zu Gunsten der Ausscheidung des Abbauprodukts gekommen sein. Wird die Aufnahmekinetik bis zum 8. Aufnahme­tag betrachtet so ist zu erkennen, dass die Substanz sehr schnell aufgenommen wird. Nach zwei Tagen stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme- und Elimination ein. Ab diesem Zeitpunkt ist die Radioaktivität in dpm/g FG Wurm bis zum 8. Tag konstant und somit ein steady state nach OECD (1996) erreicht. Der berechnete BAF erhöht sich leicht von 12 auf 13,8, die Anpassung des Modells an die Daten wird exakter ($r^2 = 0,99$). Wie in Kap. 6.1.3 beschrieben wurden Rückstellproben für mögliche Metabolismusuntersuchungen genommen, deren Aufarbeitung über Art und Umfang der Umwandlung der Testsubstanz Aufschluß geben könnte.

Mit einer Ausnahme wurde in allen Anreicherungsversuchen während des Versuchszeitraums ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme- und Elimination (steady state) der Testsubstanzen zwischen Organismus und umgebendem Medium erreicht. Lediglich der Kurvenverlauf der

Aufnahme von HCB durch *E. albidus* in OECD-Kunsterde deutet auf eine weitere Aufnahme der Testsubstanz hin. Ausschlaggebend für diesen Kurvenverlauf ist der am 21. Aufnahmetag ermittelte, deutlich erhöhte Akkumulationsfaktor. Somit wird der in Kapitel 5.2.1 angegebene berechnete BAF von 20,45 rechnerisch erst nach 51 Tagen erreicht. In diesem Versuch wurden am letzten Tag der Aufnahmephase nur durchschnittlich fünf der anfangs 20 eingesetzten Würmer wiedergefunden. Deren Gewicht pro Individuum sank im Vergleich zum ersten Aufnahmetag von 8,4 mg/Wurm FG auf 4,9 mg/Wurm FG. Unter der Voraussetzung, dass dieser Gewichtsverlust hauptsächlich aufgrund einer Dehydrierung stattfand und das lipophile HCB im Organismus verblieb, lässt sich der auftretende Konzentrationsanstieg im Organismus und die damit zusammenhängende Erhöhung des BAF erklären. Wird der Anreicherungsfaktor für Tag 21 auf Grundlage der Wurmbiomasse zu Beginn des Experiments berechnet, so ergibt sich der in **Abb. 42** dargestellte zeitliche Verlauf. Die Unterschiede zwischen den so bestimmten Anreicherungsfaktoren am 7. Tag (AF = 11,3), am 14. Tag (AF = 12,6) und 21. Aufnahmetag (AF = 13,3) betragen nun maximal 17%. Somit kann laut OECD (1996) von einem steady state ausgegangen werden, da die Schwankungen dieser drei Messwerte 20% nicht übersteigen. Der so ermittelte Bioakkumulationsfaktor beträgt nun 13,7.

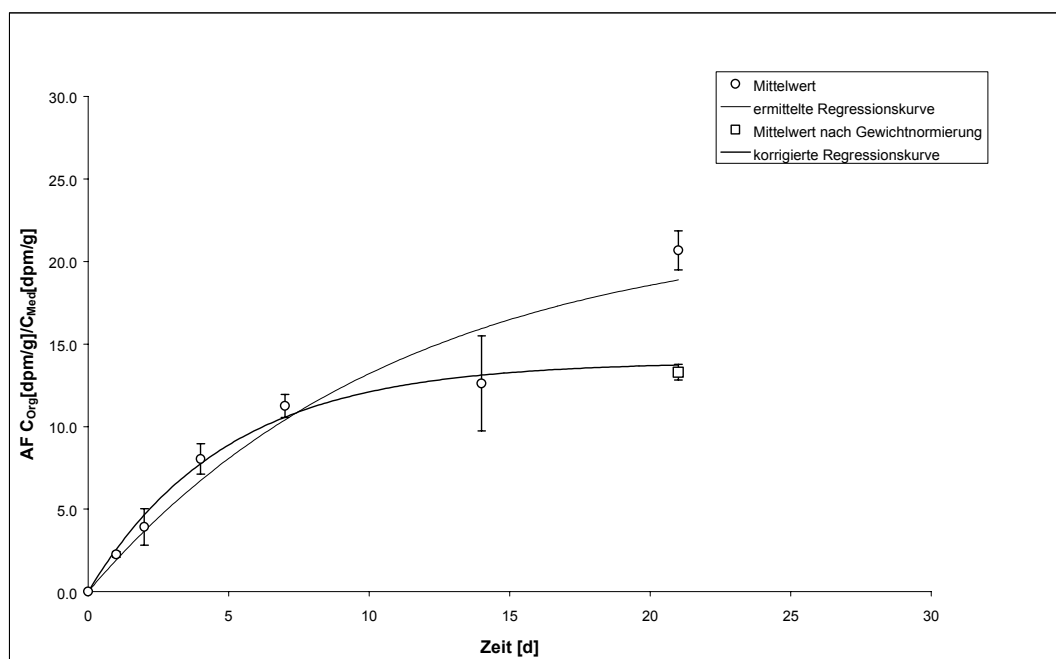


Abb. 42: Verlauf der ^{14}C -HCB Aufnahme von *Enchytraeus albidus* in OECD-Kunsterde (korrigiert um die Wurmbiomasse am letzten Aufnahmetag) sowie zum Vergleich die auf den Rohdaten basierende Regressionskurve (vgl. **Abb. 11**).

Beide Substanzen werden in Abhängigkeit von der getesteten Enchytraeenart aus dem LUFA-Boden mit unterschiedlichen Faktoren angereichert. So liegt der BAF für *E. albidus* in den

zwei Versuchen mit dem natürlichen Standardboden zwischen 22 (Lindan) und 28 (HCB). Für *E. luxuriosus* ist der BAF mit 35 (HCB) und 36 (Lindan) für beide Substanzen nahezu identisch. In den Untersuchungen mit OECD-Kunsterde ist der Sachverhalt komplexer: Bei *E. albidus* unterscheidet sich der BAF kaum (Lindan: 12; HCB: 14), während *E. luxuriosus* HCB aus diesem Medium (BAF: 26) stärker als Lindan (BAF: 12) anreichert.

Die Bioakkumulationsfaktoren sind in den Aufnahmeversuchen mit LUFA 2.2 höher als in der OECD-Kunsterde. Beide Testsubstanzen besitzen aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaft eine Affinität, sich an den organischen Gehalt des jeweiligen Testsubstrats zu binden. Der organische Kohlenstoffanteil der Kunsterde ist mit 5,5% bezogen auf das Trockengewicht um den Faktor 2,5 höher als der C-Gehalt im LUFA-Boden (2,17%). Der geringere C-Gehalt der LUFA-Erde verhält sich negativ proportional zur Aufnahme. Auch BEYER (1996) fand eine direkte negative Korrelation zwischen dem BAF von chlorierten Benzolen und dem organischen Kohlenstoffgehalt in Kunsterde: Die höchste Anreicherung erfolgte in Kunsterde ohne jeglichen Torf. Ein geringerer Kohlenstoffgehalt (wie z.B. im LUFA-Boden) erhöht folglich die Bioverfügbarkeit der Testchemikalien. Daraus läßt sich die Vermutung ableiten, dass die Aufnahme der Fremdstoffe durch beide Arten hauptsächlich über die Körperoberfläche erfolgt. Würde der ingestive Aufnahmepfad überwiegen, und würden die Substanzen über den Darmtrakt angereichert werden, dann müßte die Anreicherung über die Kunsterde höher sein. Die Testorganismen würden über die organische Fraktion der Kunsterde durch Nahrungsaufnahme mehr gebundene Substanz aufnehmen, zumal die Radioaktivität im Wurm mit Darminhalt bestimmt worden ist.

Der zeitliche Verlauf der Anreicherung eines Fremdstoffes im Organismus wurde bereits in Gleichung (6) dargestellt.

$$AF = \frac{C_{Org}(t)}{C_{Med}} = \frac{k_{ein}}{k_{aus}} \cdot (1 - e^{-k_{aus} \cdot t}) \quad (6)$$

Durch diese Beziehung ist die Sättigung der Anreicherungsfunktion neben der Zeit hauptsächlich von der Eliminationskonstanten der Aufnahme k_e abhängig. Eine hohe Geschwindigkeitskonstante führt demnach im mathematischen Modell zu einer schnellen Gleichgewichtseinstellung. Gleichzeitig beeinflusst dieser Wert im steady state ($t \rightarrow \infty$) den BAF, da dieser Ausdruck im Verhältnis der beiden Aufnahmeparameter im Nenner steht. Damit erscheint ein Vergleich der Aufnahmegeschwindigkeit über die berechneten Geschwindigkeits-

raten nur bei einem etwa gleich großen BAF sinnvoll. Demnach reichert *E. luxuriosus* Lindan aus beiden Testsubstraten schneller an als *E. albidus*. So ist beispielsweise der BAF dieser Substanz in OECD-Kunsterde bei *E. luxuriosus* von 11,7 und von *E. albidus* von 11,8 ermittelt worden. Die Geschwindigkeitsrate der Aufnahme ist jedoch bei *E. luxuriosus* mit $k_s = 36,2$ deutlich höher als bei *E. albidus* ($k_s = 8,6$). Dieser artspezifische Unterschied der Aufnahmegeschwindigkeit gilt auch für HCB. Generell sind die Aufnahmegeschwindigkeiten von Lindan art- und substratunabhängig höher, was nicht zuletzt an den anfangs steileren Kurvenverläufen der Aufnahmekinetiken deutlich wird.

6.2.1.2 Elimination

Aufgrund der Erfahrungen, die im ersten Versuch (*E. albidus*, OECD-Kunsterde, Lindan) bezüglich der zweimaligen Umsetzung der Würmer zur Elimination in undotiertes Substrat gewonnen worden waren (siehe Kapitel 6.2.1.1), wurde in den darauf folgenden Eliminationsversuchen auf diesen Schritt verzichtet. Die Anpassungsgüte des mathematischen Modells an die Eliminationsdaten ist mittels Zweikompartimentkinetik bzw. in einem Fall mit der Einkompartimentkinetik als sehr gut zu betrachten ($r^2 \geq 0,95$). Eine Ausnahme bildet die erste Untersuchung zur Elimination, die nach 28-tägiger Aufnahmephase begann (*E. albidus*, OECD-Kunsterde, Lindan). Der berechnete Determinationskoeffizient beträgt hier 0,88. Dies mag an der starken Streuung der Messwerte innerhalb der Replikate liegen, die wiederum ein Hinweis auf die zu diesem Zeitpunkt relativ geringe Erfahrung mit dem Testsystem sein könnte. Der ermittelte Kurvenverlauf deutet einen Konzentrationsanstieg ab dem vierten Eliminationstag an. Aufgrund dieser experimentell ermittelten starken Schwankungen der Messwerte und der daraus resultierend hohen Standardschätzfehler ist dieser Eliminationsverlauf mit einer großen Unsicherheit behaftet und somit kritisch zu betrachten.

Bei allen Experimenten variieren die Substanzkonzentrationen im Organismus während der ersten Tage der Elimination innerhalb der vier Replikate stark. Diese Schwankungen nehmen mit steigender Versuchsdauer ab, bis die Konzentrationen in allen vier Replikaten nahezu identisch sind. Die auf diesen teils stark variierenden Daten basierenden Eliminationsparameter der Modellkinetik sind folglich zum Teil mit beachtlichen Standardschätzfehlern behaftet. Der Startwert für die Elimination wurde anhand des mittleren Anreicherungsfaktors bei Ende der jeweiligen Aufnahmephase festgelegt (100%). Die tatsächliche Substanzkonzentration im Organismus schwankt jedoch um diese festgelegte Anfangskonzentration, womit die Varianz

der Messwerte zu Beginn der Ausscheidungsversuche und die sich daraus ergebenden Standardschätzfehler erklärt werden können.

Das Modell der Zweikompartimentkinetik erwies sich, mit einer Ausnahme, als geeigneter für die Beschreibung der Elimination gegenüber dem Einkompartimentmodell. Die Ausscheidung von HCB durch *E. luxuriosus* in LUFA 2.2 wird durch beide Modelle bezüglich nichtlinearen Regressionsverlaufs der Kurve identisch beschrieben. Die Standardschätzfehler der kinetischen Parameter sind bei Anwendung des Einkompartimentmodells jedoch erheblich geringer. Tatsächlich ist der ermittelte Eliminationsverlauf im Gegensatz zu allen übrigen Eliminationsverläufen nicht durch eine schnelle Ausscheidung zu Beginn und eine danach langsamer stattfindende Elimination, sondern vielmehr durch einen gleichmäßig abklingenden Verlauf charakterisiert.

Die zu Versuchsende gefundene Restaktivität bzw. "Restkörperbelastung" der untersuchten Enchytraeenspezies zeigt in der OECD-Kunsterde einen deutlichen Artunterschied. Die größere Art *E. albidus* ist mit 14,3% HCB und mit 50,1% bzw. 23,4% Lindan (zweite Elimination) am letzten Tag der Ausscheidung belastet, wobei der erstgenannte Wert aufgrund der hohen Variabilität der Messwerte mit Vorbehalt zu sehen ist. *E. luxuriosus* hat bis zu diesem Zeitpunkt in der Kunsterde Lindan (97,4%) bzw. HCB (99,98%) so gut wie vollständig ausgeschieden. Im LUFA-Boden unterscheidet sich die verbliebene Restkonzentration in beiden Arten kaum. Die Restaktivität betrug in diesem Medium bei *E. albidus* 10% HCB bzw. 8,6% Lindan. *E. luxuriosus* war am letzten Eliminationstag mit 10,2% HCB bzw. 4,1% Lindan belastet.

6.2.2 Lumbricidae

6.2.2.1 Aufnahmephase

Auch bei den Lumbriciden wurde der erste Versuch (*E. fetida* mit HCB und KE) mit einer 28-tägigen Aufnahmephase durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass einerseits ein steady state schon nach 21 Tagen erreicht war, andererseits aber – aus unbekannten Gründen – der Zustand der Würmer sich in der 4. Woche deutlich verschlechterte. Ausgehend von dieser Erfahrung und der zu diesem Zeitpunkt schon teilweise vorliegenden Enchytraeendaten wurde für die folgenden Versuche eine 21-tägige Aufnahmephase festgelegt. In den übrigen Versuchen war das

Kriterium für einen steady state ($\pm 20\%$ Differenz an den letzten drei Messpunkten) nicht erfüllt:

- im Versuch mit *E. fetida*, Lindan und LUFA-Boden stieg die Konzentration in den Würmern am Tag 21 deutlich an;
- im Versuch mit *L. rubellus*, HCB und LUFA-Boden nahm die Konzentration tendenziell ab Tag 7 immer weiter ab;
- im gleichen Versuch mit *L. rubellus* und HCB aber KE fiel der Messwert am Tag 7 stark aus dem Rahmen der übrigen Daten;
- im Versuch mit *L. rubellus*, Lindan und KE führte ein „Ausreißer“ am Tag 14 dazu, dass die Schwankungsbreite $> 20\%$ war.

Ein Zusammenhang zwischen einem „non-steady state“ und Faktoren wie der jeweiligen Testchemikalie oder dem Testsubstrat ist nicht erkennbar. Es deutet sich aber an, dass Probleme eher zu Projektbeginn auftraten. Dagegen scheint es mit *L. rubellus* schwieriger zu sein als mit *E. fetida*, die Variabilität der Daten in den Griff zu bekommen. Dies mag mit der in den ersten Versuchen auftretenden starken Fluchttendenz dieser Art zusammenhängen.

Trotz der Überschreitung des 20%-Kriteriums, das bei OECD (1996) für den steady state vorgeschlagen wird, wurden aufgrund des gesamten Kurvenverlaufs bzw. der Kurvenanpassung dazu ausgegangen, dass die in diesen Versuchen bestimmten Anreicherungsfaktoren valide sind. Auffallend ist dabei, dass der aufgrund der Vorarbeiten von FÜLL (1996) erwartete Anstieg des AF in den beiden Versuchen mit *L. rubellus* und Lindan nur bedingt bestätigt wurde. Einerseits wurde im Versuch mit *L. rubellus*, Lindan und OECD-Kunsterde kein steady state erreicht und die Aufnahme erfolgte relativ langsam, so dass ein weiterer Anstieg der Konzentration in den Würmern nicht ausgeschlossen ist. Andererseits fehlt im entsprechenden Versuch mit *L. rubellus*, Lindan und LUFA-Boden jeder Hinweis auf eine eventuell weiter ansteigende Aufnahme der Testsubstanz. Interessanterweise wurde ein ähnlich geringer Anstieg an den ersten Versuchstagen im Versuch mit *L. rubellus*, HCB und OECD-Kunsterde sowie, eher noch geringer, im Versuch mit *E. fetida*, Lindan und LUFA-Boden beobachtet. Dieses Ergebnis ist umso überraschender, da in beiden Lindanversuchen mit *L. rubellus* die aufgrund der Arbeiten von FÜLL (1996) ebenfalls erwartete unvollständige Elimination bestätigt wurde (vgl. Kap. 6.2.2.2). Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Aufnahmephase in den hier vorgestellten Versuchen nach 21 Tagen beendet wurden. Der bei FÜLL (1996) beobachtete Anstieg trat dagegen erst nach 22 bis 43 Tagen auf. FÜLL (1996), konnte zeigen, dass in

Lumbricus rubellus bis zu 70% des angereicherten Lindans metabolisiert wurden. Diese Metabolite verblieben auch im Körper der Würmer, nachdem die Tiere in unkontaminierte Erde umgesetzt worden waren. Im Rahmen dieses Vorhaben war es nicht möglich, die Rückstellproben aus den Experimenten bezüglich ihres Gehalts an Ursubstanz und Metaboliten zu analysieren. Zur letztendlichen Aufklärung der Ursachen für die unvollständige Elimination von Lindan bei *L. rubellus* könnte die nachträgliche Aufarbeitung der entsprechenden Proben in erheblichem Maß beitragen.

Die Anpassung der nichtlinearen Regression an die gemessenen Aufnahmedaten gelang in 6 von 8 Versuchen mit $r^2 > 0,9$ sehr gut. Auch die beiden Versuche, in denen r^2 niedriger war, "verpassten" diesen Wert mit 0,85 bzw. 0,88 nur knapp. Alle errechneten Werte waren demnach höher als der "Grenzwert" 0,8, der vielfach (z.B. EU, 2000) als Kriterium für die Akzeptanz einer Beziehung herangezogen wird.

Generell bleibt das Problem, dass in 50 % aller Tests mit Regenwürmern das OECD-Kriterium für das Erreichen des steady state nicht erreicht wurde. Zur Verbesserung dieser Situation kämen sowohl eine Verlängerung der Aufnahmephase sowie eine Erhöhung der Wurm- bzw. Replikatzahl pro Probenahmezeitpunkt in Frage.

6.2.2.2 Elimination

Alle Eliminationsversuche mit Ausnahme der nachgestellten, vierzehntägigen Eliminationsphase im Versuch mit *E. fetida* mit HCB und KE wurden mit einer Dauer von 21 Tagen durchgeführt. Wichtigster Ergebnisparameter ist die Restaktivität im Wurm am Ende der Eliminationsphase in Prozent der am Ende der Aufnahmephase gemessenen Konzentration (Nicht-eliminierte Rückstände, NER). Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede in den einzelnen Versuchen:

- Lindan wurde von *E. fetida* bis auf 8,8 % (KE) bzw. 16,3 % (LUFA-Boden) ausgeschieden. Bei *L. rubellus* blieb dagegen mehr als die Hälfte der aufgenommenen Radioaktivität in den Würmern zurück, wobei es im KE noch mehr (69,5 %) als im LUFA-Boden waren (56,9 %).
- bei HCB stellt sich das Ergebnis völlig anders dar: unabhängig von der Testspezies und dem Testsubstrat unterscheidet sich die Restaktivität kaum voneinander. Generell liegen die Werte mit 3,6 bis 7,8 % zudem in einem sehr niedrigen Bereich.

Während demnach Lindan ein erhebliches ökotoxikologisches Problem darstellen kann (vor allem in Hinsicht auf eine mögliche Anreicherung im Nahrungsnetz; d.h. nach Fraß von *L. rubellus*) wird HCB innerhalb von maximal drei Wochen so weit ausgeschieden, dass das Gefährdungspotentials via Secondary poisoning als gering einzuschätzen ist.

Bei den beiden Tests mit *L. rubellus* und Lindan erübrigte sich eine Modellierung des Kurvenverlaufs, während in den Tests mit *E. fetida* ein Zweikompartimentenmodell ($r^2 > 0,99$) gut geeignet war. In den beiden HCB-Versuchen mit OECD-Boden ließ sich der Kurvenverlauf mit einem Zweikompartimentenmodell gut anpassen, während in den Tests mit LUFA-Boden ein Einkompartimentmodell zu einem höheren Determinationskoeffizienten führte. Dieser lag in allen HCB-Versuchen bei 0,97 – 1,0. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit der Literatur: So konnten BELFROID & SIJM (1998) zeigen, dass in Versuchen mit *E. andrei* und verschiedenen Chlorbenzolen im OECD-Kunstaboden eine biphasische Elimination den Normalfall darstellt.

Auch hinsichtlich der Aufnahmegeschwindigkeit unterschieden sich die beiden Chemikalien: Während bei Lindan die Rate k_s aus LUFA-Boden etwas höher war als aus OECD-Boden, gilt diese Beziehung nicht für HCB: bei *E. fetida* unterscheiden sich beide Werte nicht (1,6 bzw. 1,8) und bei *L. rubellus* ist die Rate aus OECD-Boden sogar höher als aus LUFA-Boden (1,8 bzw. 1,0).

In den Versuchen, deren Kurvenverlauf mit einem Zweikompartimentmodell wiedergegeben werden konnte, unterschied sich die Verteilung auf das „schnelle“ bzw. „langsame“ Kompartiment (A bzw. B) erheblich: Im Versuch mit *E. fetida*, Lindan und OECD-Kunsterde war die Verteilung nur wenig unterschiedlich (65 bzw. 34%), doch im LUFA-Boden mit der gleichen Art fand sich wesentlich mehr im „schnellen“ als im „langsamen“ Kompartiment (87 bzw. 14%). Während sich hier also ein Unterschied in Abhängigkeit vom Testsubstrat andeutet, zeigt sich in den HCB-Versuchen ein Artunterschied: bei *E. fetida* wurde in beiden Kompartimenten der gleiche Anteil gefunden (49 bzw. 51%), wogegen *L. rubellus* einen weitaus größeren Anteil im „schnellen“ Kompartiment A zeigte (87%). Trotz dieser Unterschiede in der Verteilung war in beiden Versuchen mit HCB und KE unabhängig von der Spezies die Elimination

nation innerhalb der ersten 24 h mit 50 – 80% extrem schnell. Dagegen zeigte sich bei *L. rubellus*, HCB und LUFA-Boden die langsamste Abnahme.

Hinsichtlich der ermittelten BAF und unter der Voraussetzung, dass die gemessenen Werte valide sind (d.h. obwohl teilweise ein steady state nicht erreicht wurde), sind folgende Schlussfolgerungen zu ziehen:

- die BAF-Werte unterschieden sich, ungeachtet der unterschiedlichen Lipophilie der beiden Modellchemikalien, kaum voneinander (Lindan: 1,3 – 3,9; HCB: 2,3 – 5,2).
- im Einzelvergleich (d.h. bei gleicher Art und gleichem Testsubstrat) gibt es keine eindeutige Tendenz: mal ist die Anreicherung bei HCB höher (*E. fetida* in KE), mal bei Lindan (*E. fetida* in LUFA-Boden).
- in den Versuchen mit *L. rubellus* differieren die BAF-Werte, unabhängig von der Chemikalie, praktisch nicht (2,6 – 4,0), während *E. fetida* eine größere Bandbreite zeigt (1,3 – 5,2).
- die beiden Testsubstrate haben keinen deutlichen Einfluss auf die Höhe des BAF. In drei von vier Tests ist die Anreicherung aus LUFA-Boden etwas höher als aus OECD-Boden, doch gerade im Fall von *E. fetida* und HCB ist das Verhältnis eindeutig umgekehrt (5,2 in KE, aber nur 2,3 in LUFA-Boden).

Generell ist festzuhalten, dass die geringen Unterschiede in allen Versuchen mit Regenwürmern dazu führen, dass sich keine klaren Empfehlungen in die eine oder andere Richtung (z.B. in Hinsicht auf Testspezies oder Testsubstrat) ausgehend von diesen Daten ziehen lassen. Daher sind als Entscheidungskriterien eher Faktoren wie die Praktikabilität (z.B. Einfachheit der Zucht der Tiere) oder die Variabilität der Testergebnisse heranzuziehen.

6.3 Vergleich der Ergebnisse mit Literaturdaten

An dieser Stelle ist nochmals darauf hinzuweisen, dass eine Zusammenstellung der Literatur zur Bioakkumulation durch Oligochaeten schon in der Vorläuferstudie zu diesem Vorhaben erfolgte (RÖMBKE et al. 1998). Eine Aufnahme der dort erfolgten Diskussion in diesen Bericht ist sowohl aus praktischen (Wiederholung eines Textes von knapp 100 Seiten)) als auch inhaltlichen (in den vergangenen 3 Jahren sind nur wenige Arbeiten hinzugekommen) Gründen nicht sinnvoll.

6.3.1 Andere Enchytraeentests

Bioakkumulationsstudien mit Enchytraeen wurden im Labor bisher kaum unternommen. NOOTENBOOM & POSTHUMA (1994) untersuchten die Bioakkumulation von Schwermetallen (speziell Zink) in Enchytraeen. Ein Vergleich mit dieser Arbeit erscheint aufgrund der unterschiedlichen Testsubstanzen nicht sinnvoll, da sich Persistenz, Bioverfügbarkeit und "Einbau" im Organismus von anorganischen Chemikalien von organischen Verbindungen wesentlich unterscheiden. Aus dem gleichen Grund sind auch Arbeiten, in denen die Akkumulation von Schwermetallen bei Enchytraeen im Freiland untersucht wurde, mit den hier erhobenen Daten nicht direkt vergleichbar (z.B. ROTH-HOLZAPFEL 1989; WEIGMANN 1995).

In der Arbeit von FLENNER (1995) wurde die Biomagnifikation und Bioakkumulation von Benzo(a)pyren bei *Enchytraeus crypticus* untersucht. In diesem Versuch wurde lediglich nachgewiesen, dass die genannte Enchytraeenart diesen Fremdstoff über kontaminiertes Futter bzw. kontaminierten Agar aufnimmt. Die Angabe der Anreicherung erfolgte nur als aufgenommene Masse an Benzo(a)pyren pro Tier. Da die Gewichte der Tiere nicht bekannt sind und eine Anreicherung aus einem reinen "Kunstsubstrat" wie Agar mit der Anreicherung aus einem Bodensubstrat schwer vergleichbar ist, ist diese Arbeit zu Vergleichszwecken nicht geeignet.

Die einzig bekannte Akkumulationsstudie, in der die Toxikokinetik einer organischen Substanz mit Enchytraeen im terrestrischen Medium untersucht wurde, wurde von AMORIM (2000) durchgeführt. In diesem Versuch wurde die Anreicherung und Elimination von ^{14}C - Lindan durch *Enchytraeus albidus* in einem natürlichen Freilandboden bzw. in OECD-Kunsterde analysiert. Der dort ermittelte Bioakkumulationsfaktor betrug in OECD-Kunsterde 6,4 und im natürlichen Freilandboden 9,6 über einen Zeitraum von 10 Tagen. Dabei wurde der

Versuch mit OECD-Kunsterde eine Woche nach Applikation, der mit dem natürlichen Freilandboden sofort gestartet. Die diesen Bedingungen entsprechende Testkombination in der vorliegenden Arbeit ergab BAF-Werte von 11,8 für KE und 22 für LUFA 2.2. Vergleicht man die gefundenen BAF-Werte beider Arbeiten, so ist festzustellen, dass in beiden Testsubstraten die ermittelten BAF-Werte der vorliegenden Studie um etwa den Faktor zwei größer sind. Auch die Eliminationsphase unterschied sich deutlich: AMORIM fand nach 20 Tagen in beiden Medien eine Ausscheidung von über 95 %, während in den eigenen Versuchen die Restkörperbelastung von Lindan bei 23,4 % bzw. 50,1 % in KE lag. Hinsichtlich Testdesign unterscheiden sich beide Arbeiten dergestalt, dass AMORIM während der zehntägigen Aufnahme- bzw. Eliminationsphase an sieben Messzeitpunkten je sechs Replikate mit je 5 Würmern auswertete. Zusätzliche Unterschiede ergeben sich in der Substanzkonzentration von 20 mg/kg TG, die um eine Größenordnung höher war, und im pH-Wert der Testböden, der mit 4,7 die Bioverfügbarkeit der Testsubstanzen verändern kann. Trotz der Unterschiede dieser wichtigen Testbedingungen sind die ermittelten Anreicherungs- und Eliminationsverläufe für Lindan durch *E. albidus* in beiden Testsubstraten sehr gut vergleichbar. Bedenkt man ferner, dass innerhalb eines Laborvergleichsversuchs mit identischen Testrahmenbedingungen die erhobenen Ergebnisse sich durchaus mit einem Faktor von zwei unterscheiden können, so scheint die hier beschriebene Testmethode sehr gut reproduzierbar zu sein.

6.3.2 Andere Regenwurmtests

Laborstudien zur Akkumulation von Chemikalien durch Regenwürmer sind zahlreich (z. B. KHALIL 1990; BELFROID et al. 1994; FÜLL 1996). Die unterschiedlichen Intentionen der publizierten Arbeiten, die Verwendung verschiedener Testchemikalien und Substrate und die Angabe der Anreicherungsfaktoren auf Grundlage variierender Bezugsgrößen wie z. B. Lipid/Substrat FG (BELFROID et al. 1994) erschweren den Vergleich mit den hier erzielten Ergebnissen (vgl. **Tab. 44** und **Tab. 45**). Selbst nach Normierung auf den Fettgehalt der Organismen wird die Vergleichbarkeit der daraus resultierenden unterschiedlichen Ergebnisse durch die nicht standardisierte Bestimmungsmethode des Lipidgehalts erschwert.

Generell stimmen die in diesem Vorhaben gemessenen BAF-Werte mit den aus der Literatur bekannten Ergebnissen sehr gut überein. Unabhängig von Testart und -substrat liegen alle BAF-Werte aus der Literatur für Regenwürmer und Lindan in einem engen Bereich zwischen 1,3 und 3,9. Im Fall von HCB und Regenwürmern decken die Literaturangaben eine etwas

weitere Spanne als bei Lindan ab: die BAF-Werte bezogen auf FG/FG liegen zwischen 0,3 und 3,0, bzw., wenn man die Daten von BELFROID et al. (1994) einschließt, bei 0,3 – 6 (**Tab. 45**). Letzteres ist schwierig, da die in ihrer Arbeit angegebenen BSAF-Werte nur schwer auf die hier gemessenen BAF-Werte umrechnen lassen. Die eigenen Messergebnisse liegen bei beiden Substanzen innerhalb des jeweiligen Literaturbereichs. Eine Auffälligkeit im HCB-Datensatz stellen einige Versuche mit der großkörperigen Art *Lumbricus terrestris* dar, bei denen es zu keiner Anreicherung von HCB kam (HAQUE & EBING 1988; BEYER 1996). Dieser Unterschied könnte nach JAGER (1998) auf das Verhalten dieser Spezies zurückzuführen sein, die Dauerröhren anlegt. Daher könnte es – nach einer kurzen Periode intensiver Exposition nach Anlage der Röhre – zu einer langdauernden verringerten Exposition im Vergleich zu Arten kommen, die sich permanent in kontaminiertem Boden bewegen. Abschließend ist darauf hinzuweisen, dass HCB in vergleichbarer Größenordnung auch aus belasteten Komposten durch *E. fetida* angereichert werden kann (WAGMAN et al. 1999).

Dennoch ist überraschend, dass sich Unterschiede hinsichtlich Testspezies, Testsubstrat, verwendeter Konzentration etc. nur geringfügig auszuwirken scheinen (vgl. auch JAGER 1998). Ebenso wenig manifestiert sich die Differenz der Lipophilie der beiden Testsubstanzen, denn der BAF beider Chemikalien liegt jeweils in der gleichen Größenordnung. Diese Beobachtung stützt Modellberechnungen von JAGER (1998), der für eine Vielzahl von Substanzen nur eine geringe Korrelation zwischen dem P_{ow} einer Chemikalie und dem BAF bei Regenwürmern fand. Zu einem ähnlichen Schluss kommen MA et al. (1998) für die Anreicherung von PAHs durch den Regenwurm *L. rubellus* im Freiland, wobei sich allerdings die Bioakkumulation von kleineren PAH-Molekülen besser als bei Stoffen mit großem Molekulargewicht wie Benz[a]pyren vorhersagen lässt.

Da nach aktueller Gesetzeslage (z.B. EU 1996) die Akkumulation einer zu beurteilenden Substanz eher abgeschätzt als gemessen wird, sollen im Folgenden einige Beispiele für solcherart gewonnene Daten den Messwerten gegenübergestellt werden. Zum Beispiel führten Abschätzungen auf der Grundlage des - wahrscheinlich am weitesten verbreiteten - Modells von CONNELL & MARKWELL (1990) unter Verwendung von Daten von WHEATLEY & HARDMAN (1968) zu BAF-Werten zwischen 6,0 und 16,8. Wie die Autoren betonen, ist diese Modellierung mit erheblichen Unsicherheiten belastet. Zudem weist JAGER (1998) daraufhin, dass in den Berechnungen ein Lipidgehalt von 25 % des Trockengewichts verwendet wurde. JAGER

(1998) schlug daher ein verbessertes Modell vor, dessen Vorhersagen zu einer Überschätzung des BCF im Boden im Vergleich zu real gemessenen Werten führt (durchschnittlich um den Faktor 5,6). Ein Vergleich seiner Abschätzungen mit den hier gemessenen Werten ist allerdings problematisch, da Jagers Werte jeweils auf die Konzentration der Substanzen im Porenwasser bezogen sind. Einschränkend weist der Autor daraufhin, dass diese Modellierung einigen Einschränkungen unterliegt:

- für Pestizide ist sie schlechter geeignet als für Umweltchemikalien wie Chlorphenole;
- die Ökologie der jeweiligen Regenwurmart kann die Anreicherung beeinflussen und wird durch das Modell nicht wiedergegeben;
- die Ergebnisse sind kaum auf andere Bodenorganismen mit ihrer jeweils anderen Lebensweise (inkl. z.B. einem unterschiedlichen Kontakt zum Porenwasser) übertragbar.

Bezüglich der generellen Beurteilung von Bioakkumulationstests soll kurz auf einige Aspekte eingegangen werden, die in den letzten Jahren vertieft bearbeitet wurden. So konnten BELFROID & SIJM (1998) hinsichtlich der zu erwartenden Elimination organischer Chemikalien aus Böden belegen, dass die Stärke der Elimination (vor allem der ersten Phase) u.a. vom organischen Gehalt des Bodens abhängt: Je geringer dieser in ihren Versuchen mit *E. andrei*, Chlorbenzolen und OECD-Kunstaboden war, desto höher blieb die Konzentration in den Würmern über die gesamte Eliminationsphase hinweg. Diese Beobachtung konnte im vorliegenden Vorhaben nicht durchgängig bestätigt werden: Lindan wurde aus LUFA-Boden mit seinem relativ geringen organischen Gehalt stärker eliminiert als aus dem OECD-Kunstaboden.

Wie schon in der Literaturstudie dargelegt, wurden in vielen Studien bei der Akkumulation einer Substanz Artunterschiede um den Faktor 3 gefunden (z.B. nahm *L. terrestris* PCP dreimal stärker auf als *A. caliginosa* unter gleichen Bedingungen (HAQUE & EBING 1988)). Auch die Aufnahme gebundener Rückstände des Herbizids Bentazon durch die beiden Spezies *E. foetida* oder *L. rubellus* kann sich bodenartspezifisch unterscheiden (EBERT 1992). Zusätzlich ist die gerade für Schwermetalle belegte, aber auch für Organika mögliche Adaptation einzelner Populationen zu berücksichtigen, wodurch eine deutlich erhöhte Akkumulation (ohne schädliche Folgen für das Individuum) möglich wird. Bis jetzt ließ sich aber keine generelle höhere oder niedrigere Akkumulation durch eine bestimmte Regenwurmart feststellen (JAGER 1998). Der jeweilige BAF hängt dagegen von der

individuellen Kombination von Expositionsszenario, Stoffeigenschaften sowie der physiologischen Ausstattung und dem Verhalten der Tiere ab (REINECKE & REINECKE 1998).

Die Frage der Behandlung des Darminhalts (genauer der im Darm enthaltenen Menge an Testsubstanz wird kontrovers diskutiert (vgl. STAFFORD & MCGRATH 1986; HONEYCUTT et al. 1995; EGELER et al. 1999). Unter Einbeziehung der Schwankungsbreite der jeweiligen Ergebnisse (95%-Vertrauensbereich) ist damit der Einfluss des Darminhalts als vernachlässigbar anzusehen. Zudem ist eine Darmentleerung der Tiere vor der Messung dann nicht erforderlich, wenn für eine Risikoabschätzung für Organismen, die sich von Oligochaeten ernähren (üblicherweise inklusive des jeweiligen Darminhalts), diese Frage nur von sekundärem Interesse ist.

6.4 Gesamtdarstellung

Abschließend werden in diesem Kapitel die Ergebnisse aus beiden Familien sowie im Vergleich zu Literaturdaten diskutiert. Ausgehend von dieser Darstellung werden dann Empfehlungen für das weitere Vorgehen im Bereich der Entwicklung und Anwendung terrestrischer Bioakkumulationstests gegeben.

Beim Vergleich verschiedener Spezies und Bodensubstrate sollten die Anreicherungsfaktoren auf den Lipidgehalt der Tiere bzw. den organischen Gehalt des jeweiligen Testsubstrats nach der folgenden Formel von VAN BRUMMELEN et al. (1996) normiert werden:

$$BSAF_{lip} = C_A f_{OM} / Y_L C_S$$

$BSAF_{lip}$:	Biota-to Soil-Akkumulationsfaktor korrigiert um Lipidgehalt des Tieres und organischen Gehalt des Testsubstrats
C_A :	Konzentration im Wurm (C_a)
f_{OM} :	Organischer Gehalt des Testsubstrats
Y_L :	Lipidgehalt des Wurms
C_S :	Konzentration im Testsubstrat

In diesem Zusammenhang ist aber darauf hinzuweisen, dass es für die Bestimmung des Lipidgehalts von Oligochaeten keine standardisierte Methode gibt, so dass aufgrund der Verwendung verschiedener Verfahren der Normierung (noch) Grenzen gesetzt sind (FÜLL 1996).

Tab. 42: Trockengewicht (TG), Lipidgehalt und OC (organischer Kohlenstoffgehalt) bezogen auf Frischgewicht (FG) und Trockengewicht in den Wurmarten bzw. Bodentypen.

Würmer	TG [% FG]	lipid [% FG]	lipid [% TG]
<i>E. albidus</i>	20,33%	4,68%	23,03%
<i>E. luxuriosus</i>	20,33%	4,68%	23,03%
<i>E. fetida</i>	17,13%	2,22%	12,95%
<i>L. rubellus</i>	18,96%	1,98%	10,43%
Boden	TG [% FG]	OC [% FG]	OC [% TG]
OECD	66,67%	3,73%	5,60%
LUFA	72,05%	1,60%	2,20%

Um die Vergleichbarkeit der Anreicherung in den verschiedenen Testorganismen zu verbessern, können die angereicherten Testsubstanzkonzentrationen auf den Lipidgehalt der Tiere normiert werden. **Tab. 43** gibt einen Überblick über die innerhalb dieses Projektes ermittelten Ergebnisse. Es ist darauf hinzuweisen, dass der Lipidgehalt für *E. albidus* und die beiden Regenwurmarten direkt gemessen wurde. Für die Bestimmung des Lipidgehalts von *E. luxuriosus* wären aufgrund ihrer geringen Maße so viele Tiere benötigt worden, dass damit die Gefahr bestand, nicht genügend Tiere für den Testeinsatz zur Verfügung zu haben. Daher wurde statt einer Lipidbestimmung mit dieser Art eine Abschätzung auf der Grundlage der Lipiddaten von *E. albidus* vorgenommen.

Der Lipidgehalt von *E. albidus* ist mit 4,7 % etwa doppelt so hoch wie der von *L. rubellus* (1,98 %) bzw. *E. fetida* (2,22 %). Die hier angegebenen Lipidwerte beziehen sich auf das Frischgewicht des Organismus und wurden nach einer modifizierten Methode nach Smedes (DE BOER et al., 1999) bestimmt.

Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass sowohl *E. albidus* wie *E. luxuriosus* unabhängig von der Bezugsgröße Lindan und HCB in fast allen Fällen stärker anreichern als die beiden Regenwurmarten (Ausnahme: beim Bezug auf Trockengewichte). Werden die jeweiligen Frischgewichte als Bezugsgröße herangezogen, so ist die Anreicherung bei den Enchytraeen in OECD-Kunsterde um etwa den Faktor vier höher, im LUFA-Boden sogar um einen Faktor von etwa acht. Der Unterschied zwischen beiden Böden ist meist gering (ca. Faktor 2); nur bei *E. luxuriosus* und Lindan liegt die Differenz bei 3,1. In keinem Fall reichert eine Regenwurmart hierbei eine der beiden Substanzen stärker als die Enchytraeen an.

Wird die Anreicherung auf den Lipidgehalt der Tiere und den Kohlenstoffgehalt der Testböden normiert, so modifiziert sich das Bild: Generell ist die Anreicherung von der Enchytraeen etwa doppelt so hoch wie bei den Regenwürmern, doch im Einzelfall können die Unterschiede deutlich geringer sein. Zum Beispiel liegt der BSAF von *E. fetida* und HCB im OECD-Boden mit 9,8 sehr nahe an dem von *E. albidus* (10,9), nicht aber als der von *E. luxuriosus* (21,1). Mit einer Ausnahme (*E. luxuriosus*, Lindan, LUFA) reichern die Enchytraeen - normiert auf Lipid und OC - im OECD-Boden beide Substanzen um einen höheren Faktor an als aus LUFA-Boden. Mit einer Ausnahme (*E. fetida* und HCB: OECD: BSAF 9,8, LUFA: BSAF = 1,7) liegen die BSAF-Werte aus beiden Böden recht nah beieinander.

Die Reihenfolge der Höhe des BSAF innerhalb der beiden Oligochaetenfamilien ist nicht immer dieselbe, doch deutet sich meist eine Abfolge nach der individuellen Grösse an: *E. luxuriosus* > *E. albidus*, *E. fetida* > *L. rubellus*. Die Differenzen sind aber in jedem Fall recht klein (< Faktor 2), wobei die Unterschiede bei Lindan noch geringer sind als bei HCB.

Tab. 43: Vergleich der Anreicherungsfaktoren zwischen *E. albidus* und *E. luxuriosus* bzw. *L. rubellus* und *E. fetida* bezogen auf Frischgewicht (FG) und Trockengewicht in den Wurmartentypen bzw. Bodentypen (Daten bei *E. luxuriosus* wurden anhand des Lipidgehalts von *E. albidus* abgeschätzt).

Substrat		BAF (FG/FG)	BSAF (lipid/OC)
Lindan			
<i>E. albidus</i>	<i>OECD</i>	11,8	9,4
	<i>LUFA</i>	22,0	7,5
<i>E. luxuriosus</i>	<i>OECD</i>	11,7	9,3
	<i>LUFA</i>	36,4	12,4
<i>E. fetida</i>	<i>OECD</i>	1,3	2,2
	<i>LUFA</i>	3,9	2,8
<i>L. rubellus</i>	<i>OECD</i>	2,6	4,9
	<i>LUFA</i>	3,8	3,1
HCB			
<i>E. albidus</i>	<i>OECD</i>	13,7	10,9
	<i>LUFA</i>	28,0	9,6
<i>E. luxuriosus</i>	<i>OECD</i>	26,4	21,1
	<i>LUFA</i>	34,9	11,9
<i>E. fetida</i>	<i>OECD</i>	5,8	9,8
	<i>LUFA</i>	2,3	1,7
<i>L. rubellus</i>	<i>OECD</i>	3,1	5,9
	<i>LUFA</i>	4,0	3,2

Die höhere Anreicherung der beiden Fremdstoffe durch die Enchytraeen erfolgt weitgehend unabhängig von der Wahl der Bezugsgröße, so dass nicht allein der höhere Lipidgehalt der Enchytraeen für diesen Umstand in Frage kommt. Vielmehr könnten andere Faktoren wie die

größere spezifische Oberfläche der Enchytraeen oder der engere Kontakt mit dem Porenwasser für die stärkere Anreicherung verantwortlich sein.

Vergleicht man die in diesem Vorhaben ermittelten BAF-Werte (bezogen auf FG/FG) mit Literaturwerten, so zeigen sich nur relativ geringe Unterschiede (**Tab. 44**). Unabhängig von Testart und –substrat liegen alle BAF-Werte aus der Literatur für Regenwürmer und Lindan in einem engen Bereich zwischen 1,3 und 3,9. Sowohl bei AMORIM (2000) als auch in diesem Projekt sind dagegen die BAF-Werte bei Enchytraeen um den Faktor 2 – 10 höher. Selbst bei Normierung auf den Lipidgehalt der Tiere bzw. den Kohlenstoffgehalt des Bodens dürfte mindestens ein Unterschied um den Faktor 2 bleiben (eine genauere Aussage ist aufgrund der teilweise fehlenden Angaben in der Literatur nicht möglich).

Tab. 44: Bioakkumulation von Lindan in Labortests mit terrestrischen Oligochaeten.

Testspezies	Testsubstrat	BAF (FG/FG)	Zitat
<u>Lumbricidae</u>			
<i>L. terrestris</i>	LUFA, Freilandboden	1,4 – 3,0	EBING et al. 1984
<i>E. fetida</i>	Freilandboden	1,3 – 2,5	VISWANATHAN et al. 1988
<i>L. rubellus</i>	OECD	2,8 – 3,5	FÜLL 1996
<i>E. fetida</i> , <i>L. rubellus</i>	OECD, LUFA	1,3 – 3,9	Diese Arbeit
<u>Enchytraeidae</u>			
<i>E. albidus</i>	OECD, Freilandboden	6,4 – 9,6	AMORIM 2000
<i>E. albidus</i> , <i>E. luxuriosus</i>	OECD, LUFA	12 – 36	Diese Arbeit

Im Fall von HCB und Regenwürmern decken die Literaturangaben eine etwas weitere Spanne als bei Lindan ab: die BAF-Werte bezogen auf FG/FG liegen zwischen 0,3 und 3,0, bzw., wenn man die Daten von BELFROID et al. (1994) einschließt, bei 0,3 – 6 (**Tab. 45**). Letzteres ist schwierig, da ihre Werte als BSAF (g OC/g Lipid) angegeben wurden und nur mit einer gewissen Unsicherheit auf FG/FG rückgerechnet werden können. Die eigenen Werte mit Regenwürmern (2,3 – 5,8) ähneln den Literaturangaben weitestgehend. Auffallend ist dabei, dass, zumindest unter bestimmten Unterschieden, die großkörperige Art *Lumbricus terrestris* HCB gar nicht anreichert (BAF < 1; vgl. Kap. 6.3.2).

Leider gibt es in der Literatur keine anderen Bioakkumulationsversuche mit HCB und Enchytraeen, so dass keine Vergleichsangaben zur Verfügung stehen. Mit BAF-Werten von 14 – 35 sind diese um den Faktor 3 – 10 höher als bei den Regenwürmern, was auch nach Normung auf Lipid- bzw. Kohlenstoffgehalte höchstens zu einer Reduktion auf 2 – 3 führen würde.

Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass Enchytraeen beide Modellchemikalien, weitgehend unabhängig von der verwendeten Testspezies bzw. dem Testsubstrat oder der gewählten Bezugsgröße mindestens so stark anreichern wie Regenwürmer. Eine Korrelation mit dem $\log P_{ow}$ der jeweiligen Chemikalie ist dabei nicht festzustellen. Dagegen ist eine enge Korrelation zwischen diesen beiden Größen für aquatische Oligochaeten in einem Bereich von $3 < \log P_{ow} < 6$ gut belegt (z.B. GABRIC et al. 1990).

Tab. 45: Bioakkumulation von HCB in Labortests mit terrestrischen Oligochaeten.

Testspezies	Testsubstrat	BAF (FG/FG)	Zitat
<u>Lumbricidae</u>			
<i>L. terrestris</i>	LUFA, Freilandboden	0,5 – 2,0	EBING et al. 1984
<i>E. fetida</i>	Freilandboden	1,8 – 3,0	KHALIL 1990
<i>E. andrei</i>	OECD	3 – 6*	BELFROID 1994
<i>L. terrestris</i>	OECD	0,27	BEYER 1996
<i>E. fetida</i> , <i>L. rubellus</i>	OECD, LUFA	2,3 – 5,8	Diese Arbeit
<u>Enchytraeidae</u>			
<i>E. albidus</i> , <i>E. luxuriosus</i>	OECD, LUFA	14 – 35	Diese Arbeit

* Bezogen auf Frischgewichtkonzentrationen rückgerechnet von einem BSAF (g OC/ lipid)

Die Eliminationsverläufe der Testchemikalien ähneln sich bei Enchytraeen und Regenwürmern. Beide Testsubstanzen werden durch die Testorganismen größtenteils wieder ausgeschieden (**Abb. 43** und **Abb. 44**). Es gibt jedoch eine Ausnahme. Sowohl im vorliegenden Projekt als auch in der Studie von FÜLL (1996) wurden Lindan bzw. mögliche Metabolite von *L. rubellus* nur zu etwa zu 50 % ausgeschieden. Dieses Ergebnis kommt dem Eliminationsverlauf der gleichen Substanz aus *Enchytraeus albidus* in KE sehr nah. In diesem Fall schied der Testorganismus nach 28 tägiger Aufnahmephase Lindan zu 50 % und nach 60 tägiger Exposi-

tionsphase zu 23 % aus. Doch ist anzumerken, dass diese ermittelte Elimination von Lindan bei *E. albidus* in KE aufgrund der starken Schwankungen innerhalb der Einzelmesswerte mit Unsicherheiten behaftet ist, und daher, im Gegensatz zum Ergebnis bei *L. rubellus*, auf alle Fälle einer Bestätigung bedarf.

Bei der Bewertung der Elimination wird eine Restaktivität von weniger als 10 % am Ende der Eliminationsphase als unbedenklich angesehen, da dann eine Anreicherung im Nahrungsnetz unwahrscheinlich ist. Demnach wäre HCB hinsichtlich dieses Parameters als weitgehend unproblematisch anzusehen, da mit Ausnahme eines Tests mit *E. fetida* und KE dieser "Grenzwert" nicht überschritten wurde (und auch dann nur wenig). Anders sieht es bei Lindan aus, dass unzweifelhaft durch *L. rubellus* kaum ausgeschieden wurde. Auch die Ergebnisse der Versuche mit *E. fetida* und LUFA-Boden bzw. *E. albidus* in KE deuten daraufhin, dass Lindan oder seine Metabolite aufgrund ihrer Akkumulation in einem der am weitesten verbreiteten Bodenbewohner zu einem Problem werden können.

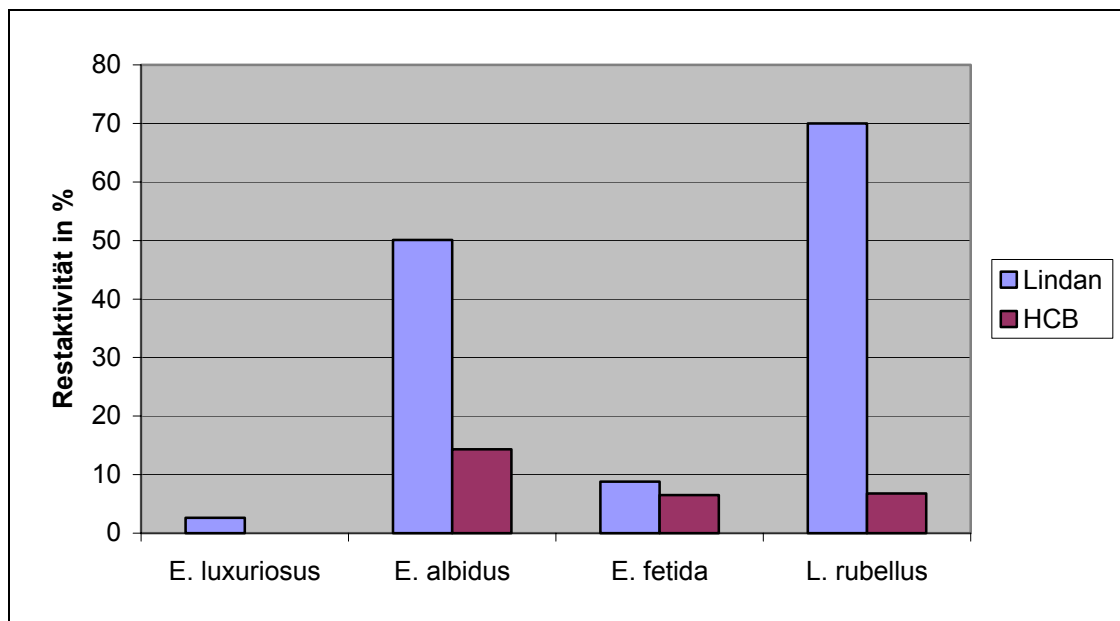


Abb. 43: Restaktivität (in % der Rückstände bei steady state) am Ende der Eliminationsphase (meist 21 Tage) im LUFA-Boden.

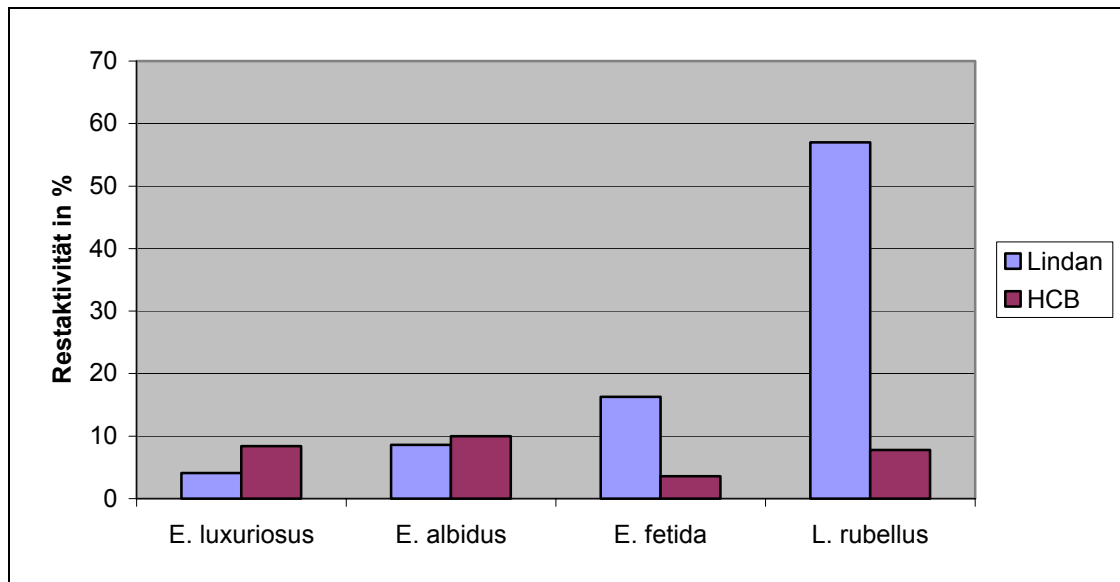


Abb. 44: Restaktivität (in % der Rückstände bei steady state) am Ende der Eliminationsphase (meist 21 Tage) in OECD-Kunsterde.

Bei der Festlegung auf nur einen Testorganismus zur Bestimmung der Bioakkumulation im terrestrischen Medium sollten verschiedene Kriterien beachtet werden. Die bisher in ökotoxikologischen Tests eingesetzten Regenwürmer als Vertreter der Bodeninvertebraten und hier insbesondere der Oligochaeten spiegeln die Anreicherung von Fremdstoffen, wie sie bei Enchytraeen stattfinden, nicht ausreichend wider. Dadurch könnte es zu einer Fehleinschätzung des Risikopotentials einer Chemikalie führen. Daneben spielt in einer Bioakkumulationsstudie die Elimination einer Substanz für deren Risikobewertung eine Rolle. Die bis auf einen Fall (*E. albidus*, KE, Lindan) annähernd vollständige Elimination beider eingesetzten Testsubstanzen im Falle der Enchytraeen entsprechen z.B. nicht den für *L. rubellus* ermittelten Daten, der Lindan nur zu ca. 50 % ausscheidet. Dadurch könnte es ebenso zu einer negativ beeinflussten Einschätzung des Gefährdungspotentials einer Substanz kommen. Des weiteren ist zu beachten, dass das Fehlen einer Korrelation mit organischem Gehalt oder Lipophilie eher für die Verwendung von Regenwürmern spricht, während wegen der höheren BAF-Werte Enchytraeen präferiert werden. Allerdings sollte die Höhe dieser Werte nicht überbewertet werden: Zieht man die Biomasse der Regenwürmer und damit die in den relativ großen Tieren akkumulierten absoluten Chemikalienmengen in Betracht, die innerhalb des Boden-Nahrungsnetzes angereichert werden können, so dürfte potentiell standort- bzw. bodenspezifisch die Bioakkumulation von Chemikalien in beiden Tiergruppen eine Gefährdung für das Bodenökosystem darstellen.

Das Aufnahme- und Eliminationsverhalten von organischen Chemikalien kann demnach sowohl zwischen Enchytraeen und Regenwürmern als auch innerhalb einer Familie variieren. Dieser Problematik könnte Rechnung getragen werden, indem verschiedene Testorganismen bei einem terrestrischen Bioakkumulationstest zum Einsatz kommen. Bei einer Beschränkung auf nur einen Testorganismus wäre die Einführung geeigneter Korrekturfaktoren notwendig, die das ermittelte unterschiedliche Aufnahme- und Eliminationsverhalten der eingesetzten Testorganismen berücksichtigen.

6.5 Schlussfolgerung und Empfehlungen

Die vier getesteten Arten aus zwei Familien terrestrischer Oligochaeten (Lumbricidae (Regenwürmer) und Enchytraeidae) reichern die beiden Modellchemikalien aus beiden Testsubstraten deutlich an, wobei die BAF-Werte weitgehend unabhängig von der verwendeten Bezugsgröße bei den Enchytraeen höher als bei den Regenwürmern waren. Unterschiede des BAFs in Abhängigkeit von Testspezies und Testsubstrat waren feststellbar, wurden aber nach Normierung auf Lipidgehalt der Tiere bzw. den Kohlenstoffgehalt des Bodens kleiner.

Die eingesetzte Methode, die sich in weiten Teilen ihrer Durchführung an vorhandene standardisierte ökotoxikologische Testmethoden (z.B. der OECD und ISO) anlehnt, ist praktikabel. Sie kann – mit leichten Modifikationen - unabhängig von Testspezies und Testsubstrat durchgeführt werden. Die Auswertung der Messergebnisse ist in Anlehnung an standardisierte Bioakkumulationstests mit Fischen (OECD 1996) bzw. Sedimentorganismen (EGELER et al. 1999) gut möglich. In jedem Fall sollte neben der Aufnahmephase auch die Elimination der jeweiligen Testsubstanz untersucht werden, da nur so eine Einschätzung des ökotoxikologischen Risikopotentials belastbar ist (siehe die überraschend aufgetretene unvollständige Elimination von Lindan durch den Regenwurm *L. rubellus*).

Die Relevanz dieser Ergebnisse wird nicht dadurch beeinträchtigt, dass die gemessenen BAF-Werte im Vergleich zu Daten aus aquatischen Versuchen niedrig erscheinen. Kleine BAF-Werte bedeuten allerdings nicht, dass von Oligochaeten lebende räuberische Organismen (einschließlich Vögel und Säugern) nicht gefährdet sind, da ein entsprechendes Risiko nicht zuletzt von den absoluten Chemikalienmengen im akkumulierenden Organismus abhängen (JAGER 1998; EGELER et al. 1999). In diesem Zusammenhang ist auf die große Biomasse von Regenwürmern und Enchytraeen in den meisten Bodenökosystemen hinzuweisen, die damit die Hauptnahrung für viele Räuber darstellen.

Aus wissenschaftlicher Sicht sind noch folgende, im Verlauf dieses Vorhabens aufgeworfenen Fragen zu bearbeiten:

- ist die Nicht-Ausscheidung von Lindan bei *L. rubellus* eine Ausnahme?
Dazu sollte zuerst überprüft werden, ob es sich bei der in den Würmern gemessenen Radioaktivität um den Wirkstoff oder Metabolite handelt.
- ist der BAF terrestrischer Oligochaeten mit der Lipophilie bzw. dem P_{ow} -Wert einer

Substanz und korreliert oder nicht?

Dazu sind weitere Chemikalien mit sehr unterschiedlichen P_{ow} -Werten zu testen.

Aufgrund der hier präsentierten Ergebnisse und unter Verweis auf den Beschluss der OECD, eine Testmethode für die Bioakkumulation in Bodenökosystemen zu entwickeln wird hiermit empfohlen, einen Bioakkumulationstest mit Regenwürmern und Enchytraeen international zu standardisieren. Eine konkrete Methodik wird im Anhang dieses Berichts vorgestellt, wobei die Anforderungen der OECD an Testmethoden soweit wie möglich berücksichtigt wurden. Um die Praktikabilität dieser Methode zu überprüfen wird zudem die baldige Durchführung eines Laborvergleichstests bzw. Ringtests empfohlen.

Wie schon in der Literaturstudie betont ist nicht absehbar, ob die Modellierung des Akkumulationsverhaltens verschiedener Chemikalienklassen in einer zu erarbeitenden Richtlinie mit abgedeckt werden sollte (vgl. z.B. GABRIC et al. 1990; BELFROID et al. 1995) oder gar die praktische Durchführung von Bioakkumulationstests ersetzen kann. Zwar liegen Ergebnisse aus Modellierungsstudien vor (z.B. JAGER 1998), nach denen mit einem gewissen Sicherheitsabstand die Anreicherung von Chemikalien in Regenwürmern abgeschätzt werden kann. Auf der anderen Seite beruhen diese Ergebnisse noch immer auf einem relativ kleinen Datensatz. Außerdem beziehen sich diese Modelle nur auf Regenwürmer; d.h. die Übertragung auf andere Bodenorganismen ist unklar.

Ebenfalls nicht abschließend beantwortet werden kann die Frage der Bewertung der Ergebnisse aus Akkumulationstests (vgl. dazu die kontrovers geführte Diskussion, z.B. DORN (1993) oder FRANKE (1996)). Daher sollten die beiden Punkte „Standardisierung einer Testrichtlinie zur Bioakkumulation von Chemikalien durch Oligochaeten im Kompartiment Boden“ und „Bewertung von Ergebnissen aus solchen Tests“ nicht miteinander vermischt werden. Unabhängig davon sollte aber der zu standardisierende Bioakkumulationstest in eine noch zu erarbeitende terrestrische Teststrategien eingebaut werden, was in den letzten Jahren mehrfach vorgeschlagen wurde (EPPO 1993; RÖMBKE et al. 1998).

7 Kurzfassung

Hauptaufgabe dieses Vorhabens war die Erarbeitung einer standardisierbaren Methodik und die Erstellung eines Richtlinienvorschlags für die Beurteilung der Bioakkumulation im terrestrischen Medium. Ziel der vorliegenden Arbeit war es auch, die Eignung von Regenwürmern (Lumbriciden) und Enchytraeen als Bioakkumulationsindikator im terrestrischen Medium zu überprüfen. Im Gegensatz zu den Regenwürmern wurden die Enchytraeen bisher nur selten im Rahmen von Bioakkumulationsstudien eingesetzt. Stellvertretend für die Familie der Enchytraeen wurden die Arten *Enchytraeus albidus* und *Enchytraeus luxuriosus* aufgrund ihrer leichten Zucht und Haltung im Labor als Testorganismus verwendet. *Eisenia fetida* und *Lumbricus rubellus* wurden als Vertreter der Lumbriciden getestet. Anhand zweier Modellchemikalien (^{14}C -Lindan und ^{14}C -Hexachlorbenzol) sollten die Aufnahme und Elimination in einer Kunsterde nach OECD-Guideline 207 und in einem natürlichen Standardboden (St. 2.2 der LUFA Speyer) bei diesen beiden Organismen untersucht werden.

Die Aufnahme- und Eliminationsphasen wurden über einen Zeitraum zwischen 21 und 28 Tagen untersucht (in einem Fall 60 Tage). Zur Bestimmung der Aufnahme- und Eliminationsverläufe wurde zu den jeweiligen Messpunkten die Radioaktivität in Würmern und Boden aus jeweils vier Replikaten bestimmt. Unter diesen standardisierten Bedingungen waren die Ergebnisse aller durchgeführten Versuche miteinander vergleichbar.

Die berechneten Aufnahmekurven beider Testchemikalien unterschieden sich für *Enchytraeus albidus* und *Enchytraeus luxuriosus* nicht wesentlich von einander. Der ermittelte Bioakkumulationsfaktor (BAF), bezogen auf Frischgewicht und Gesamtradioaktivität, ist tendenziell bei der kleineren Art *Enchytraeus luxuriosus* höher. Die mit beiden Organismen ermittelte höhere Anreicherung aus dem natürlichen Standardboden im Vergleich zur OECD-Kunsterde korreliert negativ mit dem organischen Kohlenstoffgehalt beider Testsubstrate. Damit scheint eine Beschränkung auf nur ein Testsubstrat möglich.

Die Regenwürmer *Eisenia fetida* und *Lumbricus rubellus* zeigten durchweg niedrigere BAFs als die Enchytraeen.

Beide Testsubstanzen wurden nach Umsetzen der Würmer in undotiertes Testsubstrat nahezu vollständig eliminiert, mit einer Ausnahme bei den Enchytraeen und zwei Ausnahmen bei den Regenwürmern. In diesen Fällen wurde ^{14}C -Lindan nur zu etwa 50% ausgeschieden. Eine

solche unvollständige Ausscheidung ist bei der Risikobewertung einer Substanz als bedenklich einzustufen.

Prinzipiell sind beide Organismengruppen als Bioakkumulationsindikator geeignet. Aufgrund seiner größeren Körpermasse erwiesen sich die Regenwürmer, wegen höherer Anreicherung die Enchytraeen als vorteilhaft beim Einsatz in Bioakkumulationstests.

Die vorgestellte Methode ist geeignet, die Bioakkumulation von Chemikalien in Enchytraeen und Regenwürmern (Lumbriciden) standardisiert und reproduzierbar zu messen. Der Vergleich mit Literaturangaben hinsichtlich der Bioakkumulationshöhe zeigte, dass die hier vorgestellten Ergebnisse im Bereich der bisher vorhandenen Angaben lagen. Daher dient die vorliegende Arbeit als Grundlage für einen Richtlinienentwurf zur standardisierten Messung der Bioakkumulation im terrestrischen Medium, der baldmöglichst im Rahmen eines Laborvergleichsversuchs bzw. eines Ringtests validiert werden sollte.

8 Literatur

- AMORIM, M.J., SOUSA, J.P., NOGUEIRA, A.J.A & SOARES, A.M.V.M. (1999): Comparison of chronic toxicity of Lindane (γ -HCH) to *Enchytraeus albidus* in two soil types: the influence of pH. *Pedobiologia* 43: 635-640.
- AMORIM, M.J. (2000): Chronic and Toxicokinetic behavior of Lindane (γ -HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*. For the Degree of Master of science in ecology. Universidade de Coimbra, Faculdade de Ciencias e tecnologia, departamento de zoologia. Coimbra, 2000.
- ASTM (American Society for Testing and Materials) (2000): Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid Potworm *Enchytraeus albidus* ASTM Guideline E 1676-97 (Draft).
- AVEL, M. (1929): Recherches experimentales sur les caracteres sexuels somatiques des Lombriciens. *Bull. biol. Fr. Belg.* 63: 149-318.
- BALLS, M. et al. (1995): Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. *ATLA* 23: 129-147.
- BBA (BIOLOGISCHE BUNDESANSTALT FÜR LAND- UND FORSTWIRTSCHAFT) (1994a): Richtlinien Nr. VI, 2-2: Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf die Reproduktion und das Wachstum von *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*.
- BECK, L.; DUMPERT, K.; FRANKE, U.; MITTMANN, H.; RÖMBKE, J. & SCHÖNBORN, W. (1988): Vergleichende ökologische Untersuchungen in einem Buchenwald nach Einwirkung von Umweltchemikalien. *Jül. Spez.* 439, 548–701.
- BEEK, B., S. BOEHLING, U. BRUCKMANN, C. FRANKE, U. JOEHNCKE & G. STUDINGER (2000). The assessment of bioaccumulation. In: HUTZINGER, O. (editor), *The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- BELFROID, A., VAN WEZEL A., SIKKENK M., VAN GESTEL C., SEINEN, W. & HERMENS, J. (1993a): The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. *Ecotox. Environ. Safety*, 25: 154-165.
- BELFROID, A.; SEINEN, W.; VAN GESTEL, K. & HERMENS, J. (1993b): The acute toxicity of Chlorobenzenes for earthworms (*Eisenia andrei*) in different exposure systems. *Chemosphere* 26: 2265-2277.

- BELFROID, A., MEILING, J., SIJM, D., HERMENS, J.; SEINEN, W. & VAN GESTEL, K. (1994a): Uptake of hydrophobic halogenated aromatic hydrocarbons from food by earthworms (*Eisenia andrei*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 27: 260-265.
- BELFROID A., SIKKENK, M., SEINEN, W., VAN GESTEL C. & HERMENS, J. (1994b): The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem., 13: 93-99.
- BELFROID, A., MEILING, J., DRENTH, H., HERMENS, J., SEINEN, W. & VAN GESTEL, K. (1995a): Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.
- BELFROID, A.; SEINEN, W.; VAN GESTEL, K.; HERMENS, J. & VAN LEEUWEN, K. (1995b): Modelling the accumulation of hydrophobic organic chemicals to earthworms. ESPR-Environ. Sci. Pollut. Res. 2: 5-15.
- BELFROID, A. & SIJM, D. (1998): Influence of soil organic matter content on elimination rates of hydrophobic compounds in the earthworm: possible causes and consequences. Chemosphere 37: 1221-1234.
- BELL, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.
- BENGTTSSON, G. & RUNDGREN, S. (1982): Population density and species number of enchytraeids in coniferous forest soils polluted by a brass mill. Pedobiologia 24: 211-218.
- BEYER, W.N. (1996): Accumulation in Chlorinated Benzenes in Earthworms. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 57: 729-736.
- BOUCHE, M. (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris. 671 p.
- BOUCHE, M. (1977): Strategies lombriciennes. Ecological Bulletin 25: 122-132.
- BRUNS, E., EGELER, PH., MOSER, TH., RÖMBKE, J., SCHEFFCZYK, A. & SPÖRLEIN, P. (2000): Bioaccumulation of lindane and hexachlorbenzene in different terrestrial oligochaete species. Poster, SETAC-Europe, Brighton, England.
- BRUNS, E., EGELER, PH., RÖMBKE, J., SCHEFFCZYK, A. & SPÖRLEIN, P. (2001): Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Zur Publikation akzeptiert in Hydrobiologia.

- BUA (1994): Hexachlorbenzol. BUA – Stoffbericht 119. Hrsg.: Beratergremium für umwelt-relevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker. Hirzel, Wissenschaft-liche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- CALLAHAN, C.A.; MENZIE, C.A.; BURMASTER, D.E.; WILBORN, D.C. & ERNST, T. (1991): On-site methods for assessing chemical impact on the soil environment using earthworms: A case study at the Baird and McGuire Superfund site, Holbrook, Massachusetts. Environ. Toxicol. Chem. 10: 817-826.
- CHRISTENSEN, O.M. & MATHER, J.G. (1994): Earthworms as Ecotoxicological Test-Organisms. Danish Envir. Protect. Agency, Report Nr. 5, 99 S.
- CONNELL, D.W. & MARKWELL, R.D. (1990): Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91-100.
- COOKE, A.S., GREIG-SMITH, P.W. & JONES, S.A. (1992): Consequences for Vertebrate Wildlife of Toxic Residues in Earthworm Prey. In: GREIG-SMITH, P.W.; BECKER, H.; EDWARDS, P.J. & HEIMBACH, F. (EDS.) Ecotoxicology of Earthworms. Intercept, Ltd., Andover. 139-155.
- CUENDET, G. (1983): Predation on earthworms by the black-headed gull (*Larus ridibundus*). In: SATCHELL, J.E. (Hrsg.): Earthworm Ecology: From Darwin to Vermiculture. 495 S. London: Chapman & Hall, 415-424.
- CURRY, J.P. & COTTON, D.C.F. (1983): Earthworms and land reclamation. In: SATCHELL, J.E. (Hrsg.): Earthworm Ecology: From Darwin to Vermiculture. 495 S. London: Chapman & Hall, 215-228.
- DE BOER, J.; SMEDES, F.; WELLS, D. & ALLAN, A. (1999): Report on the QUASH interlabora-tory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000 20 S.
- DE ANDREA, M.M. & WIENDL, F. M. (1995): Formation und biorelease of bound residues of pesticides in two Brazilian soils. (C-14)-lindane. Pesquisa Agr. Brasil 30(5): 687-694.
- DIDDEN, W.A.M. (1993): Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2-29.
- DIDDEN, W.A.M. & RÖMBKE, J. (2001): Enchytraeids as indicator organisms for chemical stress in terrestrial ecosystems. Ecotox. Envir. Safety (in press)
- DIETRICH, D.R., SCHMID, P., ZWEIFEL, U., SCHLATTER, C., JENNI-EIERMANN, S., BACHMANN, H., BÜHLER, U. & ZBINDEN, N. (1995): Mortality of Birds of Prey Following Field Application of Granular Carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140-145.

- DIN-Norm 19683 (1973): Bodenuntersuchungen im Landwirtschaftlichen Wasserbau. Physikalische Laboruntersuchungen. Bestimmung der maximalen Wasserkapazität des Bodens. Fachnormenausschuß Wasserwesen, Deutsches Institut für Normung e. V. Beuth, Berlin/Köln.
- DIN-Norm 19684 (1977): Bodenuntersuchungen im Landwirtschaftlichen Wasserbau. Physikalische Laboruntersuchungen. Bestimmung des pH-Wertes des Bodens und Ermittlung des Kalkbedarfs. Fachnormenausschuß Wasserwesen, Deutsches Institut für Normung e. V. Beuth, Berlin/Köln.
- DORN, E. (1993): Prüfung und Bewertung der Bioakkumulation aus Sicht eines Pflanzenschutzmittelherstellers. Mittl. BBA 290: 68-80.
- DURNER, W. & HERRMANN, R. (1990): Comparing the Transport of Some Organic Micro-Pollutants in a Soil-Groundwater System by means of a Mathematical Model. Groundwater Monitor. Manage (Proc. Dresden Symp. 3/87). IAHS Publ. No. 173 (1990): 213-231.
- EBERT, D. (1992): Differences in Uptake of Bound Residues of Bentazon, a Herbicide, by Two Different Earthworm Species, *Eisenia foetida* and *Lumbricus rubellus*. Soil Biol. Biochem., 24: 1715-1718.
- EBING, W.; PFLUGMACHER, J. & HAQUE, A. (1984): Der Regenwurm als Schlüsselorganismus zur Messung der Bodenbelastung mit organischen Fremdchemikalien. Ber. Landwirtsch. 62: 222-255.
- EDWARDS, C.A. & BOHLEN, P.J. (1992): The Effects of Toxic Chemicals on Earthworms. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 125: 23-99.
- EDWARDS, C.A., BOHLEN, P.J. (1996): Biology and Ecology of Earthworms. Third Edition. Chapman & Hall, London. 426 pp.
- EGELER, PH., RÖMBKE, J., MELLER, M., KNACKER, TH., FRANKE, C., STUDINGER, G. & NAGEL, R. (1997): Bioaccumulation of Lindane and Hexachlorobenzene by Tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35: 835-852.
- EGELER, PH., KNACKER, TH., MELLER, M., NAGEL, R., RÖMBKE, J., SCHALLNASS, H.-J. (1999a): Entwicklung und Erprobung eines Bioakkumulationstests mit endobenthischen Organismen. Research Report 206 03 106/03. UBA-FB 97-060. Umweltbundesamt, Berlin 1998.

- EGELER, PH., KNACKER, TH., RÖMBKE, J., SCHALLNASS, H.-J., MELLER, M., STUDINGER, G., FRANKE, C., NAGEL, R. (1999b): Draft Guideline according to OECD format. Bioaccumulation: Sediment Test Using Benthic Oligochaetes. ECT Oekotoxikologie GmbH, Flörsheim.
- EIJSACKERS, H. (1983): Development of earthworm populations in abandoned arable fields under grazing management. In: SATCHELL, J.E. (Hrsg.): Earthworm Ecology: From Darwin to Vermiculture. 495 S. London: Chapman & Hall, 241-246.
- EPPO (1993): Decision-making scheme for the environmental risk assessment of plant protection products. Bull. OEPP/EPPO Bull. 23: 131-149.
- EU (1996): Technical Guidance Documents in Support of The Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and the Commission Regulation (EC) 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances. EU, Brussels.
- EU (2000): Guidance Document on Persistence in Soil. Working Document 9188/VI/97 rev. 8. 12.07.2000. European Commission, Directorate General for Agriculture, VI B II.1. 17 S.
- FLENNER, C. (1995): Biomagnifikation und Bioakkumulation von Benzo(a)pyren bei *Enchytraeus crypticus* sowie der Nachweis von Enzymen des Biotransformationssystems. Diplomarb. FU Berlin.
- FRANKE, C., STUDINGER, G., BERGER, G., BÖHLING, S., BRUCKMANN, U., COHORS-FRESENBORG, D. & JÖHNKE, U. (1994): The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501-1514.
- FRANKE, C. (1996): How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897-1905.
- FÜLL, C. & NAGEL, R. (1994): Bioaccumulation of Lindane (γ -HCH) and Dichlorprop (2,4-DP) by Earthworms (*Lumbricus rubellus*); Poster, Third European Conference on Ecotoxicology, Zürich 1994 (Abstract Book, p.4.03).
- FÜLL, C. (1996): Bioakkumulation und Metabolismus von γ -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Diss. Uni. Mainz, 156 S.
- GABRIC, A.J., CONNELL, D.W. & BELL, P.R. (1990): A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Water Res. 24: 1225-1231.
- GREIG-SMITH, P.W.; BECKER, H.; EDWARDS, P.J. & HEIMBACH, F. (EDS.) (1992): Ecotoxicology of Earthworms. Intercept, Ltd., Andover.

- HAIMI, J., SALMINEN, J., HUHTA, V., KNUUTINEN, J. & PALM, H. (1992): Bioaccumulation of Organochlorine Compounds in Earthworms. *Soil Biol. Biochem.*, 24: 1699-1703.
- HAQUE, A. & EBING, W. (1988): Uptake and accumulation of Pentachlorophenol and Sodium-Pentachlorophenol by earthworms from water and soil. *The Science of the Total Environ.* 68: 113-126.
- HECK, M. (1995): Enchytraeidenzönosen als Indikatoren belasteter Flächen in der Region Berlin. *Newsletter on Enchytraeidae* 4: 69-77.
- HENDRIKS, A.J., MA, W-C., BROUNS, J.J., DE RUITER-DIJKMAN, E.M. & GAST, R. (1995): Modelling and Monitoring Organochlorine and Heavy Metal Accumulation in Soils, Earthworms, and Shrews in Rhine-Delta Floodplains. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 115-127.
- HONEYCUTT, M.E., ROBERTS, B.L. & ROANE, D.S. (1995): Cadmium disposition in the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotox. Environ. Safety* 30: 143-150.
- ISO (INTERNATIONAL ORGANISATION FOR STANDARDIZATION) (1993): Soil Quality - Effects of Pollutants on Earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Method for the determination of acute toxicity using artificial soil substrate. Draft International Standard ISO DIS 11268-1.
- ISO (INTERNATIONAL ORGANISATION FOR STANDARDIZATION) (1999): Soil Quality - Effects of Pollutants on Earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of Effects on Reproduction. Draft International Standard ISO DIS 11268-2.
- ISO (International Organisation for Standardisation) (2001): Soil Quality – Effects of Pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus sp.*). Determination of effects on reproduction. ISO CD 16387.
- JAENIKE, J. (1982). “*Eisenia foetida*” is two biological species. *Megadrilogica* 4, 6-8.
- JAGER, D.T. (1998): Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2080-2090.
- KASPRZAK, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23, 217-232.
- KHALIL, A.M. (1990): Aufnahme und Metabolismus von ¹⁴C-Hexachlorbenzol und ¹⁴C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Diss. Uni. München, 137 S.
- KLEIN, R. & PAULUS, M. (1995): Umweltproben für die Schadstoffanalytik im Biomonitoring. G. Fischer-Verlag, Jena. 365 S.
- KÜHLE, J.C. (1988): Radioecological Studies on Earthworms and Their Value for an Ecotoxicological Risk Assessment. In: EDWARDS, C. A., NEUHAUSER, E. F. (eds):

- Earthworms in Waste and Environmental Management: 377-388, Acad. Publ., The Hague.
- LARSEN, B., PELUSIO, F., SKEJO, H. & PAYA-PEREZ, A. (1992): Bioavailability of polychlorinated biphenyl congeners in the soil to earthworm (*L. rubellus*) system. Intern. J. Environ. Anal. Chem. 46: 149-162.
- LAVELLE, P. (1984): The soil system in the humid tropics. Biologie International 9: 2-17.
- LEE, K.E. (1985): Earthworms: Their ecology and relationships with soils and land use. Sydney, Australia: Academic Press. 411 S.
- LEWIS, R.A. (1985): Richtlinien für den Einsatz einer Umweltprobenbank in der Bundesrepublik Deutschland auf ökologischer Grundlage. Universität Saarbrücken.
- LFU (1993): Landesanstalt für Umweltschutz (Hrsg): Stoffbericht Hexachlorcyclohexan (HCH). Bericht Nr. 9/93.
- LOREAU, M. (1983): Trophic role of carabid beetles in a forest. IN LEBRUN, P.; ANDRE, H. M.; DE MEDTS, A.; GREGOIRE-WIBO, C.; WAUTHY, G. (Eds), New trends in soil biology. Dieu-Brichardt, Louvain-La-Neuve, pp. 281-286.
- MA, W-C., IMMERZEEL, J. & BODT, J. (1995): Earthworm and food interactions on bioaccumulation and disappearance in soil of polycyclic aromatic hydrocarbons: Studies on phenanthrene and fluoranthene. Ecotoxicol. Environ. Saf. 32: 226-232.
- MA, W-C., VAN KLEUNEN, A., IMMERZEEL, J. & DE MAAGD, P.G-J. (1998): Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by earthworms: Assessment of equilibrium partitioning theory in in situ studies and water experiments. Environ. Toxicol. Chem. 17: 1730-1737.
- MARINUSSEN, M.P.J.C., VAN DER ZEE, S.E.A.T.M. & DE HAAN, F.A. (1997). Cu Accumulation in *Lumbricus rubellus* under Laboratory Conditions Compared with Accumulation under Field Conditions. Ecotox. Environ. Safety 36, 17-26.
- MELLER, M. (1996): Entwicklung zweier Sediment – Toxizitätstests mit Tubificiden und Chironomiden. Vergleich subletaler und letaler Effekte dreier Chemikalien. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der J.W. Goethe – Universität, Frankfurt am Main.
- MORGAN, J.E., MORGAN, A.J. & COPP, N. (1992): Assessing soil metal pollution with earthworms: Indices derived from regression analyses. In: Ecotoxicology of Earthworms. GREIG-SMITH, P.W. et al. (eds) Intercept, Andover 233-237.

- MORGAN, J.E. & MORGAN, A.J. (1993): Seasonal changes in the tissue-metal (Cd, Zn and Pb) concentrations in two ecophysically dissimilar earthworm species: Pollution-monitoring implications. *Environ. Pollution* 82: 1-7.
- MOUNT, D.R., DAWSON, T.D. & BURKHARD, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1244-1249.
- NAGEL, R. & LOSKILL, R. (eds.) (1991): Bioaccumulation in Aquatic Systems. VCH Verlagsges., Weinheim. 239 S.
- NIELSEN, C.O. & CHRISTENSEN, B. (1959): The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. *Natura Jutlandica* 8-9, 1-160.
- NOTENBOOM, J. & POSTHUMA, L. (1994): Validatie Toxiciteitsgegevens en Risikogrenzen Bodem: Voortgangsrapportage 1993. RIVM-Rapportnr. 719102029, 70 S.
- OECD (Organisation for Economic Development) (1984): OECD-Guideline for Testing of Chemicals No. 207. Earthworm Acute Toxicity Test. OECD Paris.
- OECD (Organisation for Economic Development) (1996): OECD Guidelines for Testing of Chemicals No. 305. Bioconcentration: Flow-through fish test. OECD Paris.
- OECD (Organisation for Economic Development) (2000 a): OECD Guidelines for Testing of Chemicals No. 220 (Proposal for a new Guideline). Enchytraeide Reproduction Test. OECD Paris.
- OECD (Organisation for Economic Development) (2000 b): OECD Guidelines for Testing of Chemicals No. 307 (Proposal for a new Guideline). Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil. OECD Paris.
- OECD (Organisation for Economic Development) (2001). OECD-Guideline for Testing of Chemicals (Draft). Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). OECD Paris.
- PETERSEN, H. & LUXTON, M. (1982): A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388.
- PFLUGMACHER, J. (1992): Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffizienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81
- PHILLIPS, D.J.H. (1993): Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. CALOW, P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

- REINECKE, A.J. & REINECKE, S.A. (1998): The Use of Earthworms in Ecotoxicological Evaluation and Risk Assessment: New Approaches. In: Earthworm Ecology. Edwards, C.A. (ed.). CRC Press, Boca Raton. 273-293.
- RIPPEN, G. (1999): Handbuch der Umweltchemikalien: Physikalisch-chemische und ökotoxikologische Daten ausgewählter chemischer Stoffe. Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg.
- ROBERTS, B.L. & DOROUGH, H.W. (1984): Relative toxicities of chemicals to earthworm *Eisenia foetida*. Environ. Toxicol. Chem. 3: 67-78.
- RÖMBKE, J. & FEDERSCHMIDT (1994): Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests. Newsletter on Enchytraeidae 4: 79-96.
- RÖMBKE, J. (1995): Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikatoren. Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung Oktober 1995: 246 – 248.
- RÖMBKE, J. (1997): Taxonomische Probleme in der terrestrischen Ökotoxikologie (Laborebene). Abh. Ber. Naturkundemus. Görlitz 69: 33-44.
- RÖMBKE, J., BAUER, C. & MARSCHNER, A. (1996): Entwicklung einer Teststrategie zur Bewertung des Umweltgefährlichkeitspotentials von Chemikalien im Boden. UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 8: 158-166.
- RÖMBKE, J., BECK, L., FÖRSTER, B., FRÜND, C-H., HORAK, F., RUF, A., ROSCICZEWSKI, K., SCHEURIG, M. & WOAS, S. (1997): Boden als Lebensraum für Bodenorganismen und bodenbiologische Standortklassifikation - Literaturstudie. Texte + Berichte zum Bodenschutz 4/97. Landesanstalt für Umweltschutz Baden- Württemberg. 390 S. + Anhang.
- RÖMBKE, J., EGELER, P. & FÜLL, C. (1998): Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Research Report 206 03 909. UBA-FB 98-035. Umweltbundesamt, Berlin 1998.
- RÖMBKE, J. & MOSER, T. (1999): Report on an International Ringtest with the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Text 4/99.
- RÖMBKE, J. & MOSER, T. (2001): Validating the enchytraeid reproduction test: organization and results of an international ringtest. Chemosphere (in press)
- ROTH-HOLZAPFEL, M. & FUNKE, W. (1989): Elementflüsse im Ökosystem "Fichtenforst" unter besonderer Berücksichtigung wirbelloser Tiere. Kernforschungszentrum Karlsruhe-PEF 50: 93-103.

- SAMPLE, B.E., BEAUCHAMP, J.J., EFROYMSON, R.A., SUTER, G.W. & ASHWOOD, T.L. (1998): Development and validation of bioaccumulation models for earthworms. Lockheed Martin Energy Systems, Inc. Oak Ridge Natl. Lab., USA. 45 pp.
- SATCHELL, J.E. (1983): Earthworm ecology in forest soils. In: SATCHELL, J.E. (Hrsg.): Earthworm Ecology: From Darwin to Vermiculture. 495 S. London: Chapman & Hall S. 161-170.
- SCHMELZ, R. & COLLADO, R. (1999): *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). *Carolinea* 57: 93–100.
- SCHÖN, S. (1994): Kinetik und Metabolismus bei Benz(a)pyren bei *Enchytraeus crypticus*. Diplomarbeit Uni. Mainz.
- SIMS, R. W. & GERARD, B. M. (1985): Earthworms. In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.
- SPACIE, A. & HAMELINK, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- STAFFORD, E.A. & MCGRATH, S.P. (1986): The use of acid insoluble residue to correct for the presence of soil derived metals in the gut of earthworms used as bioindicator organisms. *Environ. Poll. Ecol. Biol.* 42: 233-246.
- STANDEN, V. (1978): The influence of soil fauna on decomposition by micro-organisms in blanked bog litter. *J. Anim. Ecol.*, 47: 25-38.
- STAVOLA, A.M. & CRAVEN, H. (1992): Terrestrial ecological risk assessment of pesticides in the United States. In: *Ecotoxicology of earthworms*. GREIG-SMITH, P. et al. (eds.) Intercept, Andover. 177-184
- STENERSEN, J. & ØIEN, N. (1981): Glutathione-S-transferases in earthworms (Lumbricidae). Substrate specificity, tissue and species distribution and molecular weight. *Comp. Biochem. Physiol.* 69C: 243-252.
- STEPHENSON, G.L., WREN, C.D., MIDDELRAAD, I.C.J & WARNER, J.E. (1997): Exposure of the earthworm, *Lumbricus terrestris*, to Diazinon, and the relative risk to passerine birds. *Soil. Biol. Biochem.* 29: 717-720.
- SWIFT, M.J., HEAL, O.W., & ANDERSON, J.M. (1979): Decomposition in terrestrial ecosystems. *Studies in Ecology* 5. Blackwell Publications, Oxford. 372 pp.

- TAMIS, W.L.M. & DE HAES, H.A.U. (1995): Recovery of earthworm communities (Lumbricidae) in some thermally and biologically cleaned soils. *Pedobiologia* 39: 351-369.
- UBA (UMWELTBUNDESAMT) (1991): Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.
- UBA (UMWELTBUNDESAMT) (1994): UBA-Workshop on Terrestrial Model Ecosystems. UBA-Texte 54/94. Berlin.
- VAN BRUMMELEN, T.C.; VERWEIJ, R.A.; WEDZINGA, S.A. & VAN GESTEL, C.A.M. (1996): Polycyclic aromatic hydrocarbons in earthworms and isopods from contaminated forest soils. *Chemosphere* 32: 315-341.
- VAN DE PLASSCHE, E.J. (1994): Towards integrated environmental quality objectives for several compounds with a potential for secondary poisoning. Report No. 679101 012, RIVM, Bilthoven.
- VAN GESTEL, C.A. & MA, W-C. (1988): Toxicity and bioaccumulation of chlorophenols in earthworms, in relation to bioavailability in soil. *Ecotox. Environ. Safety* 15: 289-297.
- VAN GESTEL, C.A. & MA, W-C. (1990): An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. *Chemosphere* 21: 1023-1033.
- VENTER, J.M. & REINECKE, A.J. (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *South African J. Zool.* 23, 161-165.
- VISWANATHAN, R., RAY, S., SCHEUNERT, I. & KORTE, F. (1988): Investigations on accumulation and biotransformation by earthworms of lindane occurring as soil contaminant. In: Hazardous waste: Detection, control, treatment. ABBOU, R. (ed.) Elsevier Publ., Amsterdam. 759-765.
- WAGMAN, N., STRANDBERG, B., VAN BAVEL, B., BERGQVIST, ÖBERG, L. & RAPPE, C. (1999): Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in household composts and earthworms. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1157-1163.
- WALKER, C.H. (1990): Kinetic models to predict bioaccumulation of pollutants. *Funct. Ecol.* 4: 295-301.
- WHEATLEY, G.A.; HARDMAN, J.A. (1968): Organochlorine insecticide residues in earthworms from arable soils. *J. Sci. Food agric.* 19: 219-225.
- WEIGMANN, G. (1995): Heavy metal burdens in forest soil fauna at polluted sites near Berlin. *Acta Zool. Fennica* 196: 369-370.

- ZACHARIAE, G. (1965): Spuren tierischer Tätigkeit im Boden des Buchenwalds. Forstwissenschaftliche Forschung 20: 1-68.
- ZOK, S., G. GÖRGE, W. KALSCH & R. NAGEL (1991): Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). Sci. Total. Environ. 109/110: 411-421.

9 Glossar

Bioakkumulation ist die Konzentrationszunahme (Anreicherung) der Testsubstanz in einem Organismus gegenüber der Substanzkonzentration im umgebenden Medium. Bioakkumulation setzt sich aus Biokonzentrations- und Biomagnifikationsvorgängen zusammen.

Biokonzentration ist die Konzentrationszunahme (Anreicherung) der Testsubstanz in einem Organismus gegenüber der Substanzkonzentration im umgebenden Medium, die ausschließlich aus der Aufnahme der Substanz über die Körperoberfläche resultiert.

Biomagnifikation ist die Konzentrationszunahme (Anreicherung) der Testsubstanz in einem Organismus, die ausschließlich aus der Aufnahme der Substanz über die Nahrung resultiert, gegenüber der Testkonzentration im Futter. Biomagnifikation kann zum Transfer oder zu Bioakkumulation der Testsubstanz in Nahrungsnetzen führen.

Die Elimination einer Testsubstanz ist die Ausscheidung der angereicherten Testsubstanz aus dem Testorganismus durch aktive oder passive Prozesse, die unabhängig von An- oder Abwesenheit der Testsubstanz im umgebenden Medium erfolgt.

Das steady state ist definiert als das Gleichgewicht zwischen den während der Aufnahmephase simultan auftretenden Aufnahme- und Eliminationsvorgängen.

Der Anreicherungsfaktor (AF) ist der Quotient aus der Konzentration der Testsubstanz in einem Organismus (C_a in mg/g Frischgewicht) und der Konzentration der Testsubstanz im umgebenden Medium (in diesem Fall C_s in mg/g Feuchtgewicht des Bodens) zu jedem beliebigen Zeitpunkt, solange kein steady state besteht.

Der Bioakkumulationsfaktor (BAF) ist der Quotient aus der Konzentration der Testsubstanz in einem Organismus (C_a in mg/g Frischgewicht) und der Konzentration der Testsubstanz im umgebenden Medium (in diesem Fall C_s in mg/g Feuchtgewicht des Bodens) im steady state.

Der Biokonzentrationsfaktor (BCF) ist der Quotient aus der Konzentration der Testsubstanz im Organismus (C_a in mg/g Frischgewicht) und der Konzentration der Testsubstanz im umgebenden Medium (C_s in mg/g Feuchtgewicht des Bodens bzw. C_w in mg/mL Porenwasser) im steady state, wenn die Anreicherung der Substanz ausschließlich über die Körperoberfläche erfolgt.

Der Biomagnifikationsfaktor (BMF) ist der Quotient aus der Konzentration der Testsubstanz im Organismus (C_a in mg/g Frischgewicht) und der Konzentration der Testsubstanz im Futter (C_f in mg/g Frischgewicht) im steady state, wenn die Anreicherung der Substanz ausschließlich über die Nahrung erfolgt.

Der Biota-Substrat-Akkumulationsfaktor (BSAF) ist der Quotient aus der auf den Lipidgehalt des Testorganismus normierten Testsubstanzkonzentration im Organismus (C_a in mg/g Lipidgehalt) und der auf den organischen Kohlenstoffgehalt normierten Testsubstanzkonzentration im Boden (C_s in mg/g organischen Kohlenstoff) im steady state.

Die Aufnahme- oder Expositionsphase ist der Zeitraum eines Bioakkumulationstests, in dem die Testorganismen der Testsubstanz ausgesetzt sind.

Die Substrat-Aufnahmekonstante (k_s) ist die Geschwindigkeitsrate der Zunahme der Testsubstanzkonzentration im Testorganismus bei Anreicherung der Substanz aus dem Boden und wird in h^{-1} ausgedrückt.

Die Eliminationsphase ist der Zeitraum eines Bioakkumulationstests, in dem, nachdem die Testorganismen von kontaminiertem in fremdstofffreies Medium überführt worden sind, die Ausscheidung der Testsubstanz beobachtet wird.

Die Eliminationskonstante (k_e) ist die Geschwindigkeitsrate der Ausscheidung der Testsubstanz aus dem Testorganismus. Treten während der Eliminationsphase unterschiedliche Geschwindigkeitsraten auf, so werden diese mit k_a , k_b , u.s.w. bezeichnet. Die Eliminationskonstanten werden in h^{-1} ausgedrückt.

Die EC₅₀ ist die Effektkonzentration der Testsubstanz im Medium, bei der 50% der Testorganismen nach 72-stündiger Exposition einen bestimmten Effekt (z.B. Verhaltensänderung) zeigen.

Mit K_{oc} wird der Verteilungskoeffizient einer Substanz zwischen dem organischen Kohlenstoffanteil eines Bodens und der Porenwasserphase im Gleichgewicht bezeichnet.

Die LC₅₀ ist die Konzentration der Testsubstanz im Boden, bei der 50% der Testorganismen nach 72-stündiger Exposition sterben (lethal concentration).

Unter einem LOEC (lowest observed effect concentration) versteht man die niedrigste Konzentration einer Prüfsubstanz, bei der nach Dauerexposition erkennbare Effekte am Versuchorganismus nachzuweisen sind.

Der NOEC (no observed effect concentration) ist die höchste Konzentration einer Prüfsubstanz, bei der nach Dauerexposition keine erkennbaren Effekte nachzuweisen sind.

Der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (P_{ow}) ist das Verhältnis zwischen der Konzentration einer Substanz in n-Oktanol und ihrer Konzentration in Wasser im Gleichgewicht. Der Logarithmus von P_{ow} ($\log P_{ow}$) gilt als Maß für die Lipophilie einer Substanz sowie auch für deren Potential, von Organismen angereichert zu werden.

Häufige Abkürzungen (soweit nicht bei den Definitionen erläutert)

Abb.:	Abbildung
C_a:	Konzentration der Testsubstanz im Organismus
C_s:	Konzentration der Testsubstanz im umgebenden Medium (hier: Boden)
dpm:	disintegrations per minute (radioaktive Zerfälle pro Minute)
E.a.:	<i>Enchytraeus albidus</i>
E.l.:	<i>Enchytraeus luxuriosus</i>
ERT:	Enchytraeen-Reproduktions-Test
EU	Europäische Union
FG:	Feucht- oder Frischgewicht
k_a:	Eliminationskonstante der biphasischen Ausscheidung im Kompartiment A
k_b:	Eliminationskonstante der biphasischen Ausscheidung im Kompartiment B
KE:	Kunsterde nach OECD (1984)
KOH:	Kaliumhydroxid
LSC	Liquid Scintillation Counting (Flüssig-Szintillationszählung)
LUFA 2.2:	ein in seiner Zusammensetzung bekannter natürlicher Standardboden der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer
OECD:	Organisation for Economic Cooperation and Development
r²:	Determinationskoeffizient der nichtlinearen Regressionsanalyse
Tab.:	Tabelle
TEG:	Triethylenglycol
TG:	Trockengewicht

10 Anhang: Richtlinienentwurf

BIOACCUMULATION: SOIL TEST USING TERRESTRIAL OLIGOCHAETES

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS

PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE

BIOACCUMULATION:

SOIL TEST USING TERRESTRIAL OLIGOCHAETES

First Draft

May 2001

Authors:

E. Bruns, Ph. Egeler, Th. Moser, J. Römbke, A. Scheffczyk, and G. Studinger

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	3
PREREQUISITE AND GUIDANCE INFORMATION	4
PRINCIPLE OF THE TEST	5
VALIDITY OF THE TEST	7
REFERENCE COMPOUNDS	7
DESCRIPTION OF THE METHOD	8
Test species	8
Apparatus	8
Soil	8
Application of the test item	9
Culturing of the test organisms	10
PERFORMANCE OF THE TEST	10
Preliminary test	10
Exposure conditions)	11
Test organisms	11
Light and temperature	12
Test concentrations	13
Controls	13
Frequency of soil quality measurements	13
Sampling and analysis of worms and soil	13
DATA AND REPORTING	16
Treatment of results	16
Interpretation of results	16
Test report	16
ANNEX 1 DEFINITIONS AND UNITS	19
ANNEX 2 CALCULATION OF UPTAKE AND ELIMINATION PARAMETERS	21
ANNEX 3 EXAMPLE OF A SAMPLING SCHEDULE FOR A 21-DAY SOIL BIOACCUMULATION TEST	23
ANNEX 4 ARTIFICIAL SOIL - PREPARATION AND STORAGE RECOMMENDATIONS	25
ANNEX 5 SPECIES OF TERRESTRIAL OLIGOCHAETES RECOMMENDED FOR TESTING BIOACCUMULATION FROM SOIL	26

INTRODUCTION

1. The Technical Guidance Document in support of the EU Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Substances, and the EU Commission Regulation (EC) No. 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances EC (1996) states that “no international accepted guidelines are available at the moment for deriving BCFs for earthworms”. Similarly, the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) classified the demand for a new guideline for accumulation in earthworms as of medium priority already in 1996. In general, a terrestrial bioaccumulation test is considered an improvement compared to the evaluation of the bioaccumulation of chemicals in soils which is based purely on models (e.g. Connell & Markwell 1990). In this context it has to be kept in mind that the extrapolation from test results gained in fish tests is not possible; therefore, a compartment-specific test method is required (Phillips 1993). Such a method is especially important for the evaluation of secondary poisoning in terrestrial food chains (Beek et al. 2000).

2. Soil-ingesting invertebrates are subject to high exposure to soil bound substances and should therefore be given preferential attention. Among these animals, terrestrial oligochaetes play an important role for the structure and the function of the soil ecosystem (Didden 1993; Edwards & Bohlen 1996). They live in the soil and, partly, at the soil surface (especially the litter layer) and often represent the most abundant species if considered in terms of biomass (Petersen & Luxton 1982). By bioturbation of the soil and by serving as prey these animals can have a strong influence on the bioavailability of such substances to other organisms like invertebrate (e.g. predatory mites and beetles; e.g. Schlosser & Riepert (1992)) or vertebrate (e.g. foxes and gulls) predators (Romijn et al. 1993; Dietrich et al. 1995). Some species of terrestrial oligochaetes that are currently used in ecotoxicological testing are described in Annex 5.

3. The OECD Guideline 305: Bioconcentration: Flow-through Fish Test (OECD 1996) and the OECD Draft Guideline: Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes (Egeler et al. 1999) provide many essential and useful details for the performance of the presented soil bioaccumulation method. A further document that is referred to in this draft guideline is the ASTM Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid Potworm *Enchytraeus albidus* (ASTM 2000). Practical experience with soil bioaccumulation studies and their standardisation, and details from literature (e.g., Belfroid et al. 1994; Füll 1996; Marinussen et al. 1997; Khalil 1990; Posthuma et al. 1996; Römbke et al. 1998; Amorim 2000; Bruns et al. 2001) are also major sources of information for drawing up this draft.

4. The method described is sufficiently detailed so that the test can be carried out whilst allowing for adaptations in the experimental design depending on the varied characteristics of test items and the conditions in particular laboratories. It is mostly applicable to stable, neutral organic chemicals, which tend to adsorb to soils. The testing of bioaccumulation of soil-associating, stable

metallo-organic compounds may also be possible with this method. As long as earthworms are used as test organisms, it is also applicable to metals and other trace elements.

5. There are only a few well established Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) concerning bioaccumulation processes presently available (e.g., Pflugmacher 1992). The most widely used relationship is the correlation between the lipophilicity of many stable organic substances (expressed as $\log K_{ow}$; see Annex 1 for definition) and their bioaccumulation and bioconcentration, respectively, which has been developed for the description of a substance's partitioning between water and fish (e.g., Spacie & Hamelink 1982, Hawker & Connell 1988). Correlation for the soil compartment has also been established using this relationship (e.g., Van Gestel & Ma 1990). Therefore, the $\log K_{ow}$ - $\log$ BCF correlation is utilised in the presented document as a major QSAR for a preliminary estimation of the bioaccumulation potential of soil-associated chemicals.

PREREQUISITE AND GUIDANCE INFORMATION

6. A test for bioaccumulation, the increase in concentration of a substance in an organism relative to the surrounding medium (in this case the soil), can be required for stable, organic substances having $\log K_{ow}$ values between 3.0 and 6.0 ((Franke et al. 1994; OECD 1996). It can also be applied to

- superlipophilic substances that show a $\log K_{ow}$ of more than 6.0,
- substances which belong to a class of organic substances known to have the potential to bioaccumulate in living organisms, e.g. surface active or highly adsorptive substances,
- substances that indicate the potential for bioaccumulation from structural features.

7. The application of this test method may not be required, if there are mitigating aspects, i.e. if bioaccumulation potential for a substance and its stable transformation products can definitely be excluded (e.g. demonstration of rapid mineralisation or degradation to substances known to have no or insignificant bioaccumulation potential (Franke et al. 1994).

8. Before carrying out a test for bioaccumulation with terrestrial oligochaetes, the following information about the test compound should be known as based on guidelines available via OECD:

- (a) solubility in water [Guideline 105];
- (b) octanol-water partition coefficient, K_{ow} [Guidelines 107, 117];
- (c) soil-water partition coefficient, expressed as K_{oc} [Guideline 109];
- (d) hydrolysis [Guideline 111];
- (e) vapour pressure [Guideline 104];
- (f) ready biodegradability [Guidelines 301 A to F].

Other information on the test item such as safety precautions, proper storage conditions and analytical methods should be obtained before beginning the study.

9. In order to mimic environmentally relevant exposure concentrations, to test at non-toxic concentrations, and to facilitate the analysis of the test item and its major metabolites in soil and worm specimens, it is recommended to use radiolabelled test items. The method described here may have to be modified, e.g., to provide sufficient biomass, for measuring non-radiolabelled test items. If total radioactive residues are measured (e.g. by liquid scintillation counting following extraction, combustion or tissue solubilisation), the bioaccumulation factor (BAF) is based on the parent compound including any retained metabolites. It is also possible to combine a metabolism study with a bioaccumulation study by analysis and quantification of the percentage of parent compound and its metabolites at the peak level of bioaccumulation. In any case, it is recommended that the BAF calculation be based on the concentration of the parent compound in the organisms and not upon total radioactive residues.

10. In addition to the knowledge of the properties of the test item given in paragraphs 6 - 8 other information required is the toxicity to the species that is to be used in the test, preferably an effect concentration (EC_x) or lethal concentration (LC_x) for the time required for the uptake phase (e.g. EC 1996). Preference should be given to toxicity values derived from long-term studies on sublethal endpoints (OECD 2000; OECD 2001). If such data are not available, an acute toxicity test under conditions identical with the bioaccumulation test conditions may provide useful information. An appropriate analytical method of known accuracy, precision, and sensitivity for the quantification of the substance in the test solutions, in the soil, and in the biological material must be available, together with details of specimen preparation and storage as well as material safety data sheets. Analytical detection limits of the test item in soil and worm tissue should also be known. If a ^{14}C -labelled test item is used, the specific radioactivity (i.e. e.g., $Bq\ mol^{-1}$) and the percentage of radioactivity associated with impurities must be known. The specific radioactivity of the test compound should be as high as possible in order to detect test concentrations as low as possible.

11. Information on certain characteristics of the soil to be used (e.g. origin of soil or its constituents, pH, organic carbon content, particle size distribution (percent sand, silt, and clay), and percent water content), and on micropollutants in the soil or its constituents should be acquired before the start of the test (OECD 1984; ASTM 2000).

PRINCIPLE OF THE TEST

12. The parameters which characterise the bioaccumulation of a substance include first of all the bioaccumulation factor (BAF), the soil uptake rate coefficient (k_s) and the elimination rate constant (k_e). Detailed definitions of these parameters are provided in Annex 1.

13. The test consists of two phases; the uptake (exposure) phase and the elimination (post-exposure) phase. During the uptake phase, separate groups of worms (*Eisenia fetida*, *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae), or *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae), see Annex 5) are exposed to soil which has been spiked with the test item 4 d beforehand (for preparation of a suitable artificial soil see Annex 4; guidance on application of test item is given

in paragraph 28). The soil had been moistened with deionised water at least 48 h before application of the test item. In addition to the animals exposed to the test item, a group of control worms is held under identical conditions except for the absence of the test item. Adverse effects observed in the bioaccumulation test can then be related to a matching control group. Furthermore, the lipid content of the test organisms can be measured using worms of the control group, and analytical background values (blank) can be obtained by analysing specimens of the control worms. For the elimination phase, the worms are transferred to a soil free of the test item. An elimination phase is always necessary to gain information on how fast the test item is excreted by the test organisms (Franke et al. 1994) unless uptake of the test item during the exposure phase has been insignificant (e.g. there is no statistically significant difference between the concentration of the test item in test and control worms). The change of the concentration of the test item in/on the worms is monitored throughout both phases of the test. Results of total radioactive concentration in soil and worm specimens can be obtained within 2 days after sampling.

14. During the uptake phase, measurements are taken by time-series sampling until a plateau or steady state (see Annex 1) of the concentration of the test item in the worms has been established, or until day 21. The steady state occurs when a plot of the test item concentration in the test animals (C_a ; see Annex 1) against time becomes parallel to the time axis and three successive analyses of C_a made on specimens taken at intervals of at least two days varying no more than $\pm 20\%$ of each other based on statistical comparisons (e.g., analysis of variance, regression analysis). Practical experience has shown that a 21 day uptake phase is sufficient for several stable, neutral organic substances to reach steady-state (e.g. Bruns et al. 2001).

15. However, if the steady state is not reached within 21 d, the elimination phase is started by transferring exposed oligochaetes to chambers containing the same medium without the test item. The first specimen is taken at 4 - 24 h after start of elimination phase. The elimination phase is terminated when the 10% level of steady state concentration in the worms is reached. If a steady state has not been reached, the 10% level of the concentration in the worms at the end of the uptake phase triggers the end of the elimination phase. However, the maximum duration of the elimination phase is 21 d. The residue level in the worms after 21 d is reported as endpoint. The bioaccumulation factor (BAF_{ss}) is calculated preferably both as the ratio of concentration in the worms (C_a) and in the soil (C_s) at apparent steady state, and as a kinetic bioaccumulation factor, BAF_K , as the ratio of the rate coefficient of uptake from soil (k_s) and the elimination rate constant (k_e) (see Annex 1 for definitions) assuming first-order kinetics. If first-order kinetics are obviously not obeyed, more complex models should be employed.

16. If a steady state is not achieved within less than 21 days, the uptake phase may be extended by subjecting groups of exposed worms - if available - to further measurements until steady state is reached; the elimination phase, however, should be started with the necessary number of replicates on day 21 of the uptake phase. If a steady state is not reached within 21 days, calculate BAF_K from the uptake rate coefficient and elimination rate constant(s). For calculation see Annex 2.

17. The soil uptake rate coefficient, the elimination rate constant (or constants, where more complex models are involved), the kinetic bioaccumulation factor (BAF_K), and where possible, the confidence limits of each of these parameters are calculated from the model that best describes the measured concentrations of the test item in worms and soil during uptake and elimination period. The goodness of fit of any model is determined from e.g., the correlation coefficient or the coefficient of determination.

18. To reduce variability in test results for those substances with high lipophilicity, bioaccumulation factors can be expressed additionally in relation to lipid content (gram of substance per gram of lipid). This approach is based on experiences and theoretical correlations for the soil and aquatic compartment, where - for some chemical classes - there is a clear relationship between a substance's potential for bioaccumulation and its lipophilicity, which has been well established for fish as model organisms (Nendza 1991). There is also a corresponding relationship between the lipid content of the test fish and the observed bioaccumulation of such substances. For benthic organisms, similar correlations have been found (e.g., Gabric et al. 1990, Landrum 1989). Also for terrestrial oligochaetes this correlation has been utilised (e.g., Connell & Markwell 1990, Belfroid et al. 1993, 1994, 1995). If sufficient worm tissue is available, the lipid content of the test animals should ideally be determined on the same biological material as is used to determine the concentration of the test item. Alternatively, control animals may be used to measure the lipid content, which can then be used to normalise BAF values.

VALIDITY OF THE TEST

19. For a test to be valid the following conditions apply:

- the temperature variation should be less than $\pm 2^\circ\text{C}$;
- the worms should burrow in the soil and ingest the soil (as visible by soil particles in the gut);
- the mortality or other adverse effects/diseases in both control and treated worms should be less than 10% (earthworms) or 20% (enchytraeids) at the end of the test; where the test is extended over several weeks or months, death or other adverse effects in both sets of animals should remain below additional 5% per month and not exceed 30% in all (e.g. OECD 1996). However, when using enchytraeid species, due to the short life-cycles of these species, an increase of the number of worms could occur during the test, if conditions are appropriate and if duration of the uptake phase exceeds 21 d (e.g., Bruns et al. 2001). In such cases, a lack of reproduction in a bioaccumulation test with enchytraeids should be recorded, and considered when interpreting the test results.

REFERENCE COMPOUNDS

20. The use of reference compounds of known bioaccumulation behaviour is not essential but would be useful in checking the experimental procedure, when required. However, specific reference substances cannot be recommended at present.

DESCRIPTION OF THE METHOD

Test species

21. Several species of terrestrial oligochaetes can be recommended for soil bioaccumulation testing. The most commonly used species worms (*Eisenia fetida*, *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae), or *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae), one of which should be used in the method described, are listed in Annex 5.

22. To assess health and sensitivity of the test organisms, reference toxicity tests should be conducted in regular intervals (e.g. twice per year) using a reference toxicant such as the fungicide carbendazim (earthworms: OECD (2001); enchytraeids: (OECD 2000)). If reference toxicity tests are not conducted at regular intervals, the batch of organisms to be used in a soil bioaccumulation test should be checked using a reference toxicant. Measurement of the lipid content might also provide useful information on the condition of the cultured animals.

Apparatus

23. Care should be taken to avoid the use of materials, for all parts of the equipment, that can dissolve, absorb test items or leach other substances and have an adverse effect on the test animals. Standard rectangular or cylindrical chambers, made of chemically inert material and of suitable capacity can be used in compliance with the loading rate, i.e. the number of test worms, (see also paragraph 39). Teflon[®], stainless steel and/or glass should be used for any equipment having contact with the test media. For substances with high adsorption coefficients, such as synthetic pyrethroids, silanised glass may be required. In these situations the equipment will have to be discarded after use (OECD 1996). For radiolabelled test items, and for volatile chemicals, care should be taken to avoid stripping and escaping of stripped test item. Traps (e.g. glass gas washing bottles) should be employed containing suitable absorbents to retain any residues evaporating from the test chambers.

Soil

24. The soil to be used must be of a quality that will allow the survival and preferably the reproduction of the test organisms for the duration of the acclimation and test periods without them showing any abnormal appearance or behaviour. The worms should burrow in the soil. They

should also ingest the soil. At least the occurrence of soil particles in the gut of the test organisms should be recorded and considered for the interpretation of the test results with respect to exposure pathways.

25. Natural soils from unpolluted sites may serve as test and/or culture soil (e.g. the German standard soil Lufa 2.2). Natural soils should be characterised at least by origin (collection site), pH, organic carbon content, particle size distribution (percent sand, silt, and clay), and percent water content (ASTM 2000). However, since natural soils from a particular source may not be available throughout the year, and indigenous organisms as well as the presence of micropollutants can influence the test, an artificial soil based on the artificial soil described in the OECD Guideline 207 (OECD 1984) is preferably recommended to be used as the substrate in the tests. Several test species can survive, grow, and reproduce in this soil, and maximum standardisation as well as intra- and interlaboratory comparability of test and culture conditions are provided. The artificial soil should be characterised at least by origin of the constituents, grain size distribution (percent sand, silt, and clay), organic carbon content, water content, and pH. Analysis of the artificial soil or its constituents for micropollutants prior to use might provide useful information.

Preparation

26. Manipulation procedures for natural soils prior to use in ecotoxicological tests with oligochaetes in the laboratory are described in ASTM (2000). The preparation of the recommended artificial soil to be used in the bioaccumulation tests is described in Annex 4.

Storage

27. In general, the storage time for soils in the laboratory should be kept as short as possible. ASTM (2000) in general recommends a maximum storage period of 8 weeks at $4 \pm 2^\circ\text{C}$ in the dark for natural soils. Recommendations for the storage of artificial soil are given in Annex 4.

Application of the test item

28. The selected method for applying the test item to the system should comply with the physicochemical properties of the substance. Since a soil bioaccumulation test is normally carried out for poorly water soluble substances, spiking of the soil appears to be the most appropriate way of administering the test compound to the test system. The spiking procedure recommended for the mentioned artificial soils involves coating of one or more of the soil constituents with the test item. For example, the quartz sand, or a portion thereof, can be soaked with a solution of the test item in a suitable solvent, which is then slowly evaporated. The coated fraction can then be mixed into the wet soil. The major advantage of this procedure is that no solvent is introduced to the soil. When using natural soil, the test chemical may be added by spiking a dried portion of the soil as described above for the artificial soil, or by stirring the test item into the wet soil, with subsequent evaporating of any solubilising agent used. In general, the contact of wet soil with solvents should

be minimised. According to ASTM (2000), the following considerations are necessary. If a solvent other than water is used, it should be one that is water-miscible and/or can be driven off (for example, evaporated), leaving only the test chemical on the soil. Both a solvent control and a negative control soil should be included in the test if a solvent other than water is used. The solvent control must contain the highest concentration of solvent added to the soil and must use solvent from the same batch used to make the stock solution. The same concentration of solvent should be used in all treatments (ASTM 2000). Toxicity and volatility of the solvent, and the solubility of the test item in the chosen solvent should be the main criteria for the selection of a suitable solubilising agent. The concentration of the test item in the soil must be determined after spiking. The method used for spiking, and the reasons for choosing a specific spiking procedure should be reported (Environment Canada 1995).

29. The chosen method should satisfy the following requirements:

- homogenous distribution of the test item in the soil, which should be determined after spiking by analysing subspecimens for test item concentration;
- the solvent used should not affect the test organisms (as specified by completely evaporating the solvent and/or running an additional solvent control).

30. An equilibrium between the soil and the soil pore water phase should ideally be established within a suitable period of time. For many poorly water soluble organic chemicals the time required to reach true equilibrium between adsorbed and dissolved fractions may range from days to months. Therefore, an arbitrary time period of 4 d is recommended for ageing the spiked soil. Depending on the purpose of the study, e.g., when environmental conditions are to be mimicked, the spiked soil may be aged for a longer period.

Culturing of the test organisms

31. In order to have a sufficient number of worms for conducting bioaccumulation tests the worms have to be kept in permanent laboratory culture. A system consisting of artificial soil according to OECD Guideline 207 (OECD 1984) as described in Annex 4 is recommended for *Eisenia fetida* culture. Summaries of laboratory culture methods for *Lumbricus rubellus*, *Enchytraeus albidus* and *Enchytraeus luxuriosus* are outlined in Annex 5. For details of culturing these species see e.g. OECD (1984) or OECD (2000).

32. To ensure that the tests are performed with animals of the same species, the establishment of single species cultures is strongly recommended. Ensure that the cultures and especially the worms used in the tests are free from observable diseases and abnormalities.

PERFORMANCE OF THE TEST

Preliminary test

33. It may be useful to conduct a preliminary experiment in order to optimise the test conditions of the definitive test, e.g. the selection of test item concentration, and the duration of the uptake and elimination phases. The behaviour of the worms, for example soil avoidance (Stephenson et al. 1998; Hund-Rinke & Wiechering 2000) which may be caused by the test chemical and/or by the soil, should be observed and recorded during a preliminary test. Soil avoidance may also be used as a sublethal parameter in a preliminary test for assessing the test item concentration(s) to be used in a bioaccumulation test.

Exposure conditions

Duration of the uptake phase

34. A prediction of the duration of the uptake phase can be obtained from practical experience (e.g. from an accumulation study on a structurally related substance or a preliminary study), or from certain empirical relationships utilising the knowledge of, for example, the K_{ow} and/or the K_{oc} of the test item (see Annex 2).

35. The uptake phase should be run for up to 21 days (e.g., Bruns et al. 2001) unless it can be demonstrated earlier that equilibrium has been reached (see paragraphs 14 and 15). If the steady state has not been reached by 21 days, the uptake phase may be ended by starting the elimination phase, and the BAF_K can be calculated from the uptake and elimination rate constants.

Duration of the elimination phase

36. It is recommended to terminate the elimination phase when either the 10% level of steady state concentration in the worms is reached, or after a maximum duration of 21 d. The residue level in the worms after 21 d is reported as endpoint (see Annex 2 for explanation of the estimation). The period may, however, be governed by the period over which the concentration of the test item in the worms remains above the analytical detection limit.

Test organisms

Numbers of test worms

37. The number of worms per specimen must provide a mass of worm tissue such that the mass of test item per specimen at the beginning of the uptake phase and at the end of the elimination phase, respectively, is significantly higher than the substance's analytical detection limit in biological material. This refers to the experience that in bioaccumulation tests, in the mentioned stages of uptake and elimination phase the concentration in the test animals is usually relatively low. The minimum number of replicates should be four per sampling point. Since the individual weight in many species of terrestrial enchytraeids is very low (e.g. 5 - 10 mg wet weight per

individual for *Enchytraeus albidus* or even less for *Enchytraeus luxuriosus*), the worms of each single replicate test chamber may be pooled for weighing and chemical analysis. For test species with higher individual weight (*Eisenia fetida*, *Lumbricus rubellus*), replicates containing one individual may be used.

38. In any one test, worms of similar size should be selected such that the smallest are no smaller than two-thirds of the size of the largest. They should all come from the same source, and should be adult animals of the same age class (see Annex 5). Since weight and age of an animal sometimes appears to have a significant effect on BAF-values (e.g. due to varying lipid content and/or presence of eggs), these parameters should be recorded accurately. It is required that a sub-specimen of the batch or stock of worms is weighed before the test in order to estimate the mean weight.

Loading

39. Use a high soil-to-worm ratio in order to minimise the reduction of test item concentration in the soil during the uptake phase. If possible, the chosen loading rate should also correspond to naturally occurring population densities of the chosen species. For example, for *Eisenia fetida*, a loading rate of 3 - 5 mg of worm tissue (wet weight) per gram of wet soil is recommended. This corresponds to a loading rate of 1 mg of worm tissue (dry weight) per 1.25 g of soil (dry weight) calculated for *Eisenia fetida* and artificial soil. Values for the other species should be selected accordingly. For earthworms, an amount of 50 g DW of soil per test vessel, and for enchytraeids, 10 – 20 g DW of soil per test vessel are suitable.

40. The worms to be used in a test are removed from the culture by using jeweller's tweezers. Adult animals are transferred to glass dishes (e.g. petri dishes) containing clean water. If the test conditions differ from the culture conditions, an acclimation phase of e.g. 24 h should be sufficient to adapt the worms to the test conditions. When the animals are acclimated, they are weighed before adding them to the test system. Prior to weighing, excess water should be removed from the worms by gently touching them against the edge of the dish or by blotting them cautiously dry by using a dry paper towel.

Feeding

41. Feeding should be considered when a soil with low total organic carbon is used. Food should then be added to the soil before the test is started. When artificial soil according to OECD (1984) is used, a weekly rate for earthworms of 10 mg of dried cow dung and for enchytraeids of 2 - 2.5 mg of ground oat flakes per g soil dry weight is recommended (Bruns et al. 2001).

Light and temperature

42. In order to prevent worms from escaping from the soil, the tests should be carried out under constant light conditions (preferably 400 to 800 lux in the area of the test vessels) (ASTM 2000).

The temperature should be identical with the culture temperature (see Annex 5), and variation should be kept below $\pm 2^{\circ}\text{C}$ throughout the test.

Test concentrations

43. To evaluate a possible concentration dependence of bioaccumulation (e.g., Franke 1996), two test concentration levels may be tested, although the testing of more than one concentration levels will result in excessive expenditure. Only one concentration (as low as possible) is tested for determination of the uptake kinetics, but a second concentration may be tested with specimens being taken and analysed at steady state or after 21 d to verify or confirm the BAF measured at the lower concentration. Normally, select the higher concentration so that it is approximately 1% of the lowest known effect concentration EC_x (see also paragraph 10) of the particular test item for the chosen test species. The lower test concentration should be significantly higher than the substances analytical detection limit in soil and/or biological tissue. If the effect concentration of the test item is close to the analytical detection limit, the use of radiolabelled test item with high specific radioactivity is recommended.

Controls

44. One control (4 replicates minimum) containing all constituents except for the test item is run in addition to the test series. If any solubilising agent is used for application of the test item, it should have no significant effect on survival nor produce any other adverse effects on the test organisms as revealed by an additional solvent-only control (see paragraph 28).

Frequency of soil quality measurements

45. During the test, pH and moisture in the soil and the temperature in the test chamber should be measured at the start and the end of the test, and at each sampling time.

Sampling and analysis of worms and soil

Sampling Schedule

46. An example of an acceptable sampling schedule for a 21 d uptake phase and a 21 d elimination phase is given in Annex 3.

47. Sample the soil from the test chambers for determination of test item concentration before inserting the worms, and during both uptake and elimination phases. During the test the concentrations of test item are determined in the worms, and soil in order to monitor the distribution of the test item in the compartments of the test system.

48. Sample the worms, and soil on at least six occasions during the uptake as well as the elimination phase.
49. Continue sampling until a plateau (steady state) has been established or for 21 days, whichever is shorter. If the plateau has not been reached within 21 days, begin the elimination phase. When beginning the elimination phase, transfer the remaining worms to replicate chambers containing uncontaminated soil.

Sampling and specimen preparation

50. Soil specimens should be removed carefully, causing minimal suspension and disturbance of the worms.
51. Remove an appropriate number of worms (see paragraph 39) from the soil at each sampling time (e.g., after spreading the soil on a shallow tray and picking the worms using a soft steel forceps), rinse them quickly with water in a shallow glass or steel tray. Remove the excess water as described in paragraph 40. Transfer the worms carefully to a pre-weighed vessel, weigh them instantly and kill them immediately thereafter, using the most appropriate and humane method (e.g., using liquid nitrogen, or freezing at $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$).
52. In general, the worms should not be allowed to purge their gut before being killed during the uptake phase in order to obtain a conservative BAF which includes contaminated gut content. During the elimination phase, the worms purge their gut in clean soil. This means, measurements immediately before the elimination phase include contaminated gut soil. For aquatic oligochaetes it is assumed that after the initial 4 - 24 h of the elimination phase, most of the contaminated gut content has been replaced by clean soil (e.g., Mount et al. 1999). Extrapolating this assumption to terrestrial oligochaetes, the concentration in the worms of this first specimen of the elimination phase may then be considered as the tissue concentration after gut purge. To account for dilution of the test item concentration by uncontaminated soil during the elimination phase, the weight of the gut content may be estimated from worm wet weight/worm ash weight or worm dry weight/worm ash weight ratios. If the purpose of a specific study is to measure the bioavailability and true tissue residues in the test organisms, then at least a subspecimen of test animals should be weighed, purged in clean water for a period of at least 6 h, and weighed again before analysis. Data on worm weight and body concentration of this subspecimen should be compared to values obtained from un-purged worms.
53. Preferably analyse the soil and worm specimens immediately (i.e. within 1 - 2 d) after removal in order to prevent degradation or other losses and to calculate the approximate uptake and elimination rates as the test proceeds. Immediate analysis also avoids delay in determining when a plateau has been reached.
54. Failing immediate analysis, the specimens should be stored by an appropriate method. Obtain information on the proper storage conditions for the particular test item - for example, duration and temperature of storage, extraction procedures, etc. - before beginning the study.

Quality of analytical method

55. Since the whole procedure is governed essentially by the accuracy, precision and sensitivity of the analytical method used for the test item, check experimentally that the precision and reproducibility of the chemical analysis, as well as the recovery of the test item from soil and worm specimens are satisfactory for the particular method. Also, check that the test item is not detectable in the control chambers in concentrations higher than background. If necessary, correct the values C_s and C_a for the recoveries and background values of controls. Handle all specimens throughout the test in such a manner so as to minimise contamination and loss (e.g. resulting from adsorption of the test item on the sampling device).

56. The overall recovery and the recovery of test item in worms, soil, and, if employed, in traps containing absorbents to retain evaporated test item, should be recorded and reported.

57. Since the use of radiolabelled instead of non-labelled substances is recommended for the presented test method, it is possible to analyse for total radioactivity (i.e. parent and metabolites). However, if analytically feasible, quantification of parent compound and metabolites at steady state or at the end of the uptake phase can provide important information. The specimens should then be cleaned so that the parent compound can be quantified separately. If single metabolites exceed 10% of total radioactivity in the analysed specimen(s), the identification of these metabolites is recommended.

58. Due to low individual biomass, in contrast to earthworm specimens it is not possible to determine the concentration of test item in each individual enchytraeid worm. Therefore, pooling is acceptable, but it does restrict the statistical procedures which can be applied to the data. If a specific statistical procedure and power are important considerations, then an adequate number of test animals and/or replicate test chambers to accommodate the desired pooling, procedure and power, should be included in the test.

59. It is recommended, that the BAF is expressed both as a function of total wet weight, and, when required (i.e. for highly lipophilic substances), as a function of the lipid content (see paragraph 18). Suitable methods should be used for determination of lipid content (e.g., Gardner et al. 1985, Randall et al. 1991). The chloroform/methanol extraction technique may be recommended as standard method (Randall et al. 1991). However, to avoid the use of chlorinated solvents, a modification of the Bligh & Dyer method (Bligh & Dyer 1959) as described in De Boer et al. (1999) might be used. Since the various methods may not give identical values, it is important to give details of the method used. It is because of the difficulties with the analytical methods, that the calculation of BAF based on lipid content is not mandatory. When possible, the lipid analysis should be made on the same specimen or extract as that produced for analysis for the test item, since the lipids often have to be removed from the extract before it can be analysed chromatographically (OECD 1996).

DATA AND REPORTING

Treatment of results

60. The uptake curve of the test item is obtained by plotting its concentration in/on the worms during the uptake phase against time on arithmetic scales. If the curve has reached a plateau, that is, become approximately parallel to the time axis, calculate the steady state BAF_{ss} from:

$$\frac{C_a \text{ at steady state or at day 21 (mean)}}{C_s \text{ at steady state or at day 21 (mean)}}$$

61. When no steady state is reached, it may be possible to calculate an accumulation factor of sufficient precision for hazard assessment from a "steady state" at 80% ($1.6/k_e$) or 95% ($3.0/k_e$) of equilibrium (OECD 1996).

62. Also, determine the accumulation factor (BAF_K) as the ratio k_s/k_e . The elimination constant (k_e) is usually determined from the elimination curve (i.e. a plot of the concentration of the test item in the worms during the elimination phase). The uptake rate coefficient k_s is then calculated given k_e and a value of C_a which is derived from the uptake curve. See Annex 2 for a description of these methods. The preferred method for obtaining BAF_K and the rate coefficients, k_s , and k_e , is to use non-linear parameter estimation methods on a computer (see Annex 2). Otherwise, graphical methods may be used to calculate k_s and k_e (OECD 1996). If the elimination is obviously not first-order, then more complex models should be employed.

Interpretation of results

63. The results should be interpreted with caution where measured concentrations of test item occur at levels close to the detection limit of the analytical method used.

64. Clearly defined uptake and elimination curves are an indication of good quality bioaccumulation data. Generally the confidence limits of BAF values from well-designed studies approach 20% (OECD 1996).

Test report

65. The test report must include the following information:

Test item:

- physical nature and, physicochemical properties e.g. $\log K_{ow}$, water solubility;

- substance identification data; source of the test item, identity and concentration of any solvent used;
- if radiolabelled, the precise position of the labelled atoms, the specific radioactivity, and the percentage of radioactivity associated with impurities.

Test species:

- scientific name, strain, source, any pre-treatment, acclimation, age, size-range, etc..

Test conditions:

- test procedure used;
- type and characteristics of illumination used and photoperiod(s);
- test design (e.g. number and size of test chambers, soil mass and volume, number of replicates, number of worms per replicate, number of test concentrations, length of uptake and elimination phases, sampling frequency);
- method of test item preparation and application as well as reasons for choosing a specific method;
- the nominal test concentrations, the means of the measured values and their standard deviations in the test chambers, and the method by which these values were obtained;
- source of the constituents of the artificial soil or - if natural media are used - origin of the soil, description of any pre-treatment, results of any demonstration of the ability of the test animals to live and/or reproduce in the media used, soil characteristics (pH, organic carbon content, particle size distribution (percent sand, silt, and clay), percent water content, and any other measurements made);
- detailed information on the treatment of soil and worm specimens, including details of preparation, storage, spiking procedures, extraction, and analytical procedures (and precision) for the test item and lipid content (if measured), and recoveries of the test item.

Results:

- results from any preliminary study performed;
- mortality of the control worms and the worms in each test chamber and any observed abnormal behaviour (e.g., soil avoidance, lack of reproduction in a bioaccumulation test with enchytraeids);
- the lipid content of the worms (if determined on testing occasion);

- curves, showing the uptake and elimination kinetics of the test item in the worms, and the time to steady state;
- C_a , C_s and C_w (with standard deviation and range, if appropriate) for all sampling times (C_a expressed in g kg^{-1} wet or dry weight of whole body, C_s expressed in g kg^{-1} wet or dry weight, and C_w in mg L^{-1}). If a biota soil accumulation factor (BSAF; see Annex 1 for definition) is required (e.g. for comparison of results from two or more tests performed with animals of differing lipid content), C_a may additionally be expressed as g kg^{-1} lipid content of the organism, and C_s may be expressed as g kg^{-1} organic carbon (OC) of the soil;
- BAF (expressed in kg soil kg^{-1} worm), soil uptake rate coefficient k_s (expressed in g soil g^{-1} of worm d^{-1}), and elimination rate constant k_e (expressed in d^{-1}); BSAF (expressed in $\text{kg soil OC kg}^{-1}$ worm lipid content) may be reported additionally;
- if measured: percentages of parent compound, metabolites, and bound residues (i.e. the percentage of test item that can not be extracted with common extraction methods) detected in the test animals;
- methods used for statistical analyses of the data.

Evaluation of results:

- compliance of the results with the validity criteria as listed in paragraph 19;
- unexpected or unusual results, e.g. incomplete elimination of the test item from the test animals.

ANNEX 1

DEFINITIONS AND UNITS

Bioaccumulation is the increase in concentration of the test item in or on an organism relative to the concentration of the test item in the surrounding medium. Bioaccumulation results from both bioconcentration and biomagnification processes (see below).

Bioconcentration is the increase in concentration of the test item in or on an organism, resulting exclusively from uptake via the body surface, relative to the concentration of the test item in the surrounding medium.

Biomagnification is the increase in concentration of the test item in or on an organism, resulting mainly from uptake from contaminated food or prey, relative to the concentration of the test item in the food or prey. Biomagnification can lead to a transfer or accumulation of the test item within food webs.

The elimination of a test item is the loss of this substance from the test organism tissue by active or passive processes, that occurs independently of presence or absence of the test item in the surrounding medium.

The bioaccumulation factor (BAF) at any time during the uptake phase of this bioaccumulation test is the concentration of test item in/on the test organism (C_a in g g^{-1} wet or dry weight) divided by the concentration of the substance in the surrounding medium (C_s as g kg^{-1} of wet or dry weight of soil). In order to refer to the units of C_a and C_s , the BAF has the units of kg soil kg^{-1} worm.

The steady state bioaccumulation factor (BAF_{ss}) is the BAF at steady state and does not change significantly over a prolonged period of time, the concentration of the test item in the surrounding medium (C_s as g kg^{-1} of wet or dry weight of soil) being constant during this period of time.

The biota-soil accumulation factor (BSAF) is the lipid-normalised concentration of test item in/on the test organism divided by the organic carbon-normalised concentration of the substance in the soil at steady state. C_a is then expressed as g kg^{-1} lipid content of the organism, and C_s as g kg^{-1} organic content of the soil.

A plateau or steady state is defined as the equilibrium between the uptake and elimination processes that occur simultaneously during the exposure phase. The steady state is reached in the plot of C_a against time when the curve becomes parallel to the time axis and three successive analyses of C_a made on specimens taken at intervals of at least two days are within 20% of each other, and there are no statistically significant differences among the three sampling periods. For test items which are taken up slowly, more appropriate intervals would be seven days (OECD 1996).

Bioaccumulation factors calculated directly from the ratio of the soil uptake coefficient and the elimination constant kinetic rate constants (k_s and k_e , respectively - see below) are termed kinetic bioaccumulation factor (BAF_K).

The organic carbon-water partitioning coefficient (K_{oc}) is the ratio of a substance's concentration in/on the organic carbon fraction of a soil and the substance's concentration in water at equilibrium.

The octanol-water partitioning coefficient (K_{ow}) is the ratio of a substance's solubility in n-octanol and water at equilibrium (OECD Guideline 117), also sometimes expressed as P_{ow} . The logarithm of K_{ow} ($\log K_{ow}$) is used as an indication of a substance's potential for bioaccumulation by aquatic organisms.

The uptake or exposure phase is the time during which the test organisms are exposed to the test item.

The soil uptake rate coefficient (k_s) is the numerical value defining the rate of increase in the concentration of the test item in/on the test organism resulting from uptake from the soil phase. k_s is expressed in g soil g^{-1} of worm d^{-1} .

The elimination phase is the time, following the transfer of the test organisms from a contaminated medium to a medium free of the test item, during which the elimination (or the net loss) of the substance from the test organisms is studied.

The elimination rate constant (k_e) is the numerical value defining the rate of reduction in the concentration of the test item in/on the test organism, following the transfer of the test organisms from a medium containing the test item to a substance-free medium; k_e is expressed in d^{-1} .

ANNEX 2

CALCULATION OF UPTAKE AND ELIMINATION PARAMETERS

Main endpoint of a bioaccumulation test is the bioaccumulation factor, BAF. The BAF can be calculated by dividing the concentration in the test organism, C_a , by the concentration in the soil, C_s , at steady state. If the steady state is not reached during the uptake phase, the BAF is calculated in the same manner for day 21. However, it should be noted if the BAF is based on steady state concentrations or not.

The preferred means for obtaining the bioaccumulation factor (BAF_K), the soil uptake rate coefficient (k_s) and the elimination rate constant (k_e) is to use non-linear parameter estimation methods on a computer. Given a set of sequential time concentration data and the model equations

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} * C_s(1-e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{equation 1}]$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} * C_s(e^{-k_e(t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t < t_c \quad [\text{equation 2}]$$

where C_a = concentration of substance in worms [g g^{-1} wet or dry weight]

k_s = uptake rate coefficient in tissue [g soil g^{-1} of worm d^{-1}]

C_s = concentration of substance in soil [g kg^{-1} of wet or dry weight]

k_e = elimination constant [d^{-1}]

t_c = time at the end of the uptake phase

these computer programs calculate values for BAF_K , k_s and k_e .

When steady state is reached during the uptake phase (i.e. $t = \infty$), equation 4

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} * C_s(1-e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{equation 1}]$$

may be reduced to:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} * C_s$$

or

$$C_a/C_s = k_s/k_e = \text{BAF} \quad [\text{equation 3}]$$

Then $k_s/k_e * C_s$ is an approach to the concentration of the test item in the worm tissue at steady state ($C_{a,ss}$).

Given a time series of concentration values, the elimination kinetics can be modelled using the following model equations and a computer calculation based non-linear parameter estimation method. If the data points plotted against time indicate a constant exponential decline of the test item concentration in the animals, a one-compartment model (equation 4) can be used to describe the time course of elimination.

$$C_a(t) = C_{a,ss} * e^{-k_e t} \quad [\text{equation 4}]$$

Elimination processes sometimes appear to be biphasic, showing a rapid decline of C_a during the early phases, that changes to a slower loss of test items in the later phases of the elimination (e.g., Franke et al. 1994). The two phases can be interpreted by the assumption, that there are two different compartments in the organism, from which the test item is lost with different velocities. In these cases specific literature should be studied (e.g., Van Gestel & Ma 1990).

Nevertheless, these model equations should be used with caution, especially when changes in the test chemical's bioavailability occur during the test.

ANNEX 3

**EXAMPLE OF A SAMPLING SCHEDULE FOR
A 21-DAY SOIL BIOACCUMULATION TEST**

a) Uptake phase

Day	Activities
-6	Separation of the test organisms from the culture for acclimation; preparation and moisturising of the soil constituents; conditioning of the prepared soil for 48 h;
-4	Spiking of the quartz sand fraction with the test item solution; evaporating the solvent; mixing of the soil constituents; distributing the soil to the test chambers; equilibration at test conditions for 4 days;
0	Measuring temperature and soil pH; removing specimens of soil for determination of test item concentration; weighing and randomised distribution of the worms to the test chambers; retaining of a subspecimen of worms for determination of analytical background values;
1	Controlling worm behaviour, temperature and soil pH; taking soil and worm specimens for determination of test item concentration;
2	Same as day 1;
3	Controlling air supply, worm behaviour and temperature;
4	Same as day 1;
5 – 6	Same as day 3;
7	Same as day 1;
8-13	Same as day 3;
14	Same as day 1;
15-20	Same as day 3;
21	Same as day 1; end of uptake phase; transfer worms from remaining exposed replicates to chambers containing clean soil for elimination phase.

b) Elimination phase

Day	Activities
-6	Preparation and moisturising of the soil constituents; conditioning of the prepared soil for 48 h;
-4	Distributing the soil to the test chambers; equilibration at test conditions for 4 days;
0 (day 21 of uptake phase)	Measuring temperature and soil pH; removing specimens of soil for determination of test item concentration; weighing and randomised distribution of the worms to the test chambers; transfer worms from remaining exposed replicates to chambers containing clean soil; retaining of a subspecimen of worms for determination of analytical background values;
1	Controlling worm behaviour, temperature and soil pH; taking soil and worm specimens for determination of test item concentration;
2	Same as day 1;
3	Controlling air supply, worm behaviour and temperature;
4	Same as day 1;
5 – 6	Same as day 3;
7	Same as day 1;
8-13	Same as day 3;
14	Same as day 1;
15-20	Same as day 3;
21	Same as day 1; end of elimination phase.

ANNEX 4

ARTIFICIAL SOIL - PREPARATION AND STORAGE RECOMMENDATIONS

Soil constituents

Peat:	10%	Sphagnum-peat, in accordance with the OECD Guideline 207 (OECD 1984);
Quartz sand:	70%	Industrial quartz sand (air dried); grain size: more than 50 % of the particles should be in the range of 0.05 - 0.2 mm
Kaolinite clay:	20%	Kaolinite content ≥ 30 %;
Calcium carbonate:	0.1%	CaCO ₃ , pulverised, chemically pure.

Preparation

The dry constituents of the soil are mixed thoroughly (e.g. in a large-scale laboratory mixer). This should be done about one week before starting the test. The mixed soil should be stored for at least two days in order to equilibrate/stabilise the acidity. For the determination of pH a mixture of soil and 1 M KCl solution in a 1:5 ration is used. If the pH value is not within the required range (6.0 ± 0.5), a sufficient amount of CaCO₃ is added to the soil, or a new batch of soil is prepared.

The maximum water holding capacity (WHC) of the artificial soil is determined according to ISO 11268-2 (ISO 1998). One or two days before starting the test, the dry artificial soil is moistened by adding enough deionised or reconstituted water to obtain approximately half of the final water content, i.e. 40% to 60% of the maximum WHC (corresponding to $50 \pm 10\%$ moisture dry mass). At the start of the test, the pre-moistened soil is divided into as many batches as the number of test concentrations and controls used for the test, and the moisture content is adjusted to 40 - 60 % by using the solution of the test item and/or by adding deionised or reconstituted water (see paragraphs 28 - 30). The moisture content is determined at the beginning and at the end of the test (at 105 °C). It should be optimal for the species' requirements (the moisture can also be checked as follows: when the soil is gently squeezed in the hand, small drops of water should appear between the fingers).

The artificial soil is now ready for use in the worm culture or in the bioaccumulation test.

Storage

The dry constituents of the artificial soil may be stored in a dry, cool place at room temperature. The prepared, wet soil may be stored (for further use in the culture only) at $4 \pm 2^\circ\text{C}$ in the dark for a maximum period of 8 weeks from the day of preparation (ASTM 2000).

Soil spiked with the test item should be used immediately unless there is information indicating that the particular soil can be stored without affecting the toxicity and bioavailability of the test item. Specimens of spiked soil may then be stored under the conditions recommended for the particular test item until analysis.

ANNEX 5

SPECIES OF TERRESTRIAL OLIGOCHAETES RECOMMENDED FOR TESTING BIOACCUMULATION FROM SOIL

Earthworms:

The recommended test species is *Eisenia fetida* (Savigny 1826), belonging to the family Lumbricidae. Since 1972 it is divided into two subspecies (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*; Bouche 1972). According to Jaenike (1982) they are true, separate species. *Eisenia fetida* is easily recognised by its bright intersegmental yellow stripes whereas *Eisenia andrei* has a uniform, dark red colour. Originating probably from the region of the Black Sea, they are distributed world-wide today, especially in anthropogenically modified habitats like compost heaps. Both can be used for ecotoxicological as well as bioaccumulation tests.

Eisenia fetida and *Eisenia andrei* are commercially available, e.g. as fish bait. In comparison to other lumbricid earthworms, they have a short life-cycle, reaching maturity within ca. 2 – 3 months (at room temperature). Their temperature optimum is approximately at 20 - 24°C. They prefer relatively moist substrates with a nearly neutral pH and a high content of organic material. Since these species are widely used in standardised ecotoxicological tests for about 20 years, their culturing is well established (OECD 1984; Venter & Reinecke 1988).

Both species can be bred in a wide range of animal wastes. The breeding medium recommended by ISO (1998) is a 50:50 mixture of horse or cattle manure and peat. The medium should have a pH value of about 6 to 7 (regulated with calcium carbonate), a low ionic conductivity (less than 6 mS1 or less than 0.5 % salt concentration) and should not be contaminated excessively with ammonia or animal urine. Also, a commercial gardening soil free of additives, or artificial soil according to OECD (1984), or a 50:50 mixture of both can be used. The substrate should be moist but not too wet. Breeding boxes of 10 litre to 50 litre volume are suitable.

To obtain worms of standard age and mass, it is best to start the culture with cocoons. Therefore, adult worms are added to a breeding box containing fresh substrate to produce cocoons. Practical experience has shown that a population density of approximately 100 adultworms per kg substrate (ww) leads to good reproduction rates. After 28 days, the adult worms are removed. The earthworms hatched from the cocoons are used for testing when mature after at least 2 months but less than 12 months.

Lumbricus rubellus Hoffmeister, 1843 is one of the most common lumbricid earthworms, probably originating in northern Europe/Asia (Sims & Gerard 1985). Nowadays it has been distributed anthropocentrically world-wide. The species is considered to be the most important saprophagous animal of European forest soils. Despite the fact that it is considered to be an inhabitant of the litter layer, especially older individuals can also be found in deeper soil layers (including meadows). Rarely *L. rubellus* is also invading compost heaps, but more common it is found in acid soils (acido-tolerant: 3.5 – 8.4). The species prefers moist but not wet soils. Due to its wide distribution, relatively large size and high abundance the species is often used for biomonitoring purposes.

L. rubellus can lay high numbers of cocoons (about 100 per year), but egg development (16 Weeks) and the time to reach maturity (ca. 9 months) take relatively long compared to *E. fetida*/*E. andrei*. Parthenogenesis is not known.

L. rubellus should preferably be bred in an untreated (e.g. fertilised) commercial garden soil with a circumneutral to slightly acid pH and a relatively high content of organic matter. The substrate has to be defaunated either by autoclaving or by deep freezing it three times. Due to the size of *L. rubellus* the worm density within a culture box (minimum 50 litre volume) should be appr. 20 adult worms per kg substrate (ww). The substrate should be moist to wet, and the optimum breeding temperature is 15 - 18°C. *L. rubellus* can be obtained from Advanced Bio Tech Inc., P.O. Box 1, 104 W. Market Street, Elliott, Illinois 60933 USA.

Worms of the species described above can be considered healthy if they move through the substrate, do not try to leave the substrate, and reproduce continuously. Very slow motioning or a yellow posterior end (in the case of *E. fetida*) indicate substrate exhaustion. In this case, fresh substrate and/or a lower number of animals per box is recommended.

Enchytraeids:

The recommended test species is *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (white potworm). *Enchytraeus albidus* is one of the biggest (up to 15 mm) species of the annelid oligochaete family Enchytraeidae and it is world-wide distributed (e.g. Bell 1958). *Enchytraeus albidus* is found in marine, limnic and terrestrial habitats, mainly in decaying organic matter (seaweed, compost) and rarely in meadows (Kasprzak 1982). This broad ecological tolerance and some morphological variations indicate that there might be different races for this species.

Enchytraeus albidus is commercially available, sold as food for fish. It should be checked whether the culture is contaminated by other, usually smaller species (Römbke & Moser 1999). If contamination occurs, all worms should be washed with water in a petri dish. Large adult specimens of *Enchytraeus albidus* are then selected (by using stereomicroscope) to start a new culture. All other worms are discarded. Its life cycle is short as maturity is reached between 33 days (at 18 °C) and 74 days (at 12 °C). Only cultures which have been kept in the laboratory for at least 5 weeks (one generation) without problems should be used for a test.

Other species of the *Enchytraeus* genus are also suitable, especially *E. luxuriosus*. This species is a true soil inhabitant, which has been newly described by Schmelz & Collado (1999). If other species of *Enchytraeus* are used, they must be clearly identified and the rationale for the selection of the species should be reported.

Enchytraeids of the species *Enchytraeus albidus* (as well as other *Enchytraeus* species) can be bred in large plastic boxes (e.g. 30 x 60 x 10 cm) filled with a mixture of artificial soil and commercially available, uncontaminated garden soil free of additives. Compost material must be avoided since it could contain toxic substances like heavy metals. Fauna should be removed from the breeding soil before use by 3 times deep-freezing. Pure artificial soil can also be used but the reproduction rate could be slower compared to that obtained with mixed substrates. The substrate should have a pH of 6.0 ± 0.5 . The culture is kept in an incubator at a temperature of 15 ± 2 °C without light. In any case, a temperature higher than 23 °C must be avoided. The artificial/natural soil moisture should be moist but not wet. When the soil is gently pressed by hand, only small

drops of water should appear. In any case, anoxic conditions must be avoided (e.g. if a lid is used, the number of lid holes must be high enough to provide sufficient exchange of air). The breeding soil has to be aerated by carefully mixing it once per week.

The worms should be fed approximately twice a week *ad libitum* with rolled oats which are strewn on the soil surface. At least once every two weeks, the applied amount of food should be carefully mixed into the substrate in order to loosen and aerate the substrate. If food from the last feeding date remains on the soil surface, the amount of food given must be adjusted accordingly. If fungi grow on the remaining food, it should be replaced by a new quantity of rolled oats. In order to stimulate reproduction, the rolled oats may be supplemented with commercially available, vitamin amended protein powder every two weeks. After three months, the animals are transferred to a freshly prepared culture or breeding substrate. The rolled oats, which have to be stored in sealed vessels, should be autoclaved or heated before use in order to avoid infections by flour mites (e.g. *Glyzyphagus sp.*, Astigmata, Acarina) or predacious mites (e.g. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina). After disinfecting, the food is ground up so that it can easily be strewn on the soil surface. Another possible food source is baker's yeast or the fish food TetraMin[®].

In general, the culturing conditions are sufficient if worms do not try to leave the substrate, move quickly through the soil, exhibit a shiny outer surface without soil particles clinging to it, are more or less whitish coloured, and if worms of different ages are visible. Actually, worms can be considered healthy if they reproduce continuously.

LITERATURE

- (1) Amorim, M. (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ -HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*. Master thesis, University Coimbra.
- (2) ASTM (2000). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. American Society for Testing and Materials, E 1676-97 (draft).
- (3) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (4) Belfroid, A., Sikkenk, M., Seinen, W., Van Gestel, C. & Hermens (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13, 93-99.
- (5) Belfroid, A., Van Wezel, A., Sikkenk, M., Van Gestel, C., Seinen, W. & Hermens, J. (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25, 154-165.
- (6) Belfroid, A., Meiling, J., Drenth, H., Hermens, J., Seinen, W., Van Gestel, C. (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31, 185-191.
- (7) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.
- (8) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.
- (9) Bouche, M. (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris. 671 p.
- (10) Bruns, E., Egeler, Ph., Moser, T., Römbke, J., Scheffczyk, A. & Spörlein, P. (2001). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. ECT Report for the Umweltbundesamt, Berlin.
- (11) Connell, D.W. & Markwell, R.D. (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20, 91-100.
- (12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37, 2-29.
- (13) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (14) Dietrich, D.R., Schmid, P., Zweifel, U., Schlatter, C., Jenni-Eiermann, S., Bachmann, H., Bühler, U., Zbinden, N. (1995). Mortality of Birds of Prey Following Field Application of Granular Carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29, 140-145.

- (15) EC (1996). Technical Guidance Documents in Support of The Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and The Commission Regulation (EC) No. 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances. Office for Official Publications of the EC (European Commission), Luxembourg; Part I - IV.
- (16) Edwards, C.A., Bohlen, P.J. (1996). Biology and Ecology of Earthworms. Third Edition. Chapman & Hall, London. 426 pp.
- (17) Egeler, P., Knacker, T., Römbke, J., Schallnass, H-J., Meller, M., Studinger, G., Franke, C., Nagel, R. (1999). Draft Guideline according to OECD format. Bioaccumulation: Sediment Test Using Benthic Oligochaetes. ECT Oekotoxikologie GmbH, Flörsheim.
- (18) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (19) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32, 1897-1905.
- (20) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501-1514.
- (21) Füll, C. (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von γ -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.
- (22) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24, 1225-1231.
- (23) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30, 1099-1105.
- (24) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22, 701-707.
- (25) Hund-Rinke, K., H. Wiechering (2000). Earthworm Avoidance Test for Soil Assessments: An Alternative for Acute and Reproduction Tests. Journal of Soils and Sediments 1, 15-20.
- (26) ISO (International Standard Organization) (1998). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.
- (27) Jaenike, J. (1982). “*Eisenia foetida*” is two biological species. Megadrilogica 4, 6-8.
- (28) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23, 217-232.
- (29) Khalil, A.M. (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C -Hexachlorbenzol und ^{14}C -Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

- (30) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Toxicol. 23, 588-595.
- (31) Marinussen, M.P.J.C., Van der Zee, S.E.A.T.M. & De Haan, F.A. (1997). Cu Accumulation in *Lumbricus rubellus* under Laboratory Conditions Compared with Accumulation under Field Conditions. Ecotox. Environ. Safety 36, 17-26.
- (32) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.
- (33) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow} /log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim
- (34) OECD (Organisation for Economic Development) (1984). Guidelines for Testing of Chemicals No. 207. Earthworm, Acute Toxicity Test. OECD, Paris.
- (35) OECD (Organisation for Economic Development) (1996). OECD Guidelines for testing of chemicals: bioconcentration: flow-through fish test. Guideline No. 305. OECD, Paris.
- (36) OECD (Organisation for Economic Development) (2000). OECD-Guideline for Testing of Chemicals No. 220. Enchytraeidae Reproduction Test. Paris (Draft).
- (37) OECD (Organisation for Economic Development) (2001). OECD-Guideline for Testing of Chemicals (Draft). Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). Paris.
- (38) Petersen, H., Luxton, M. (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39, 287-388.
- (39) Phillips, D.J.H. (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow, P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.
- (40) Pflugmacher, J. (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffizienten UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. 4, 77-81.
- (41) Posthuma, L., Weltje, L., Anton-sanchez, F.A. (1996): Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.
- (42) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L., Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10, 1431-1436.
- (43) Römbke, J., Egeler, P., Füll, C. (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.
- (44) Römbke, J, Moser, Th. (2000). Organisation and Performance of an International Ring-test for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 249 pp.

- (45) Romijn, C.A.F.M., Luttik, R., Van De Meent, D., Slooff, W., Canton, J.H. (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria. Part 2: Terrestrial food chains. *Ecotox. Envir. Safety* 27, 107-127.
- (46) Schlosser H-J., Riepert F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. *Zool Beitr NF* 34, 413-433.
- (47) Schmelz, R. & Collado, R. (1999) *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). *Carolinea* 57: 93–100.
- (48) Sims, R. W. & Gerard, B. M. (1985). Earthworms. In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): *Synopses of the British Fauna (New Series)* No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.
- (49) Stephenson, G.L., Kaushik, A., Kaushik, N.K., Solomon, K.R., Steele, T., Scroggins, R.P. (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: *Advances in earthworm ecotoxicology*. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.
- (50) Spacie, A., Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (51) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.
- (52) Van Gestel, C.A., Ma, W-C. (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. *Chemosphere* 21, 1023-1033.
- (53) Venter, J.M., Reinecke, A.J. (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *South African J. Zool.* 23, 161-165.