

Abschlussbericht

Verbundvorhaben

Validierung und praxisnahe Erprobung biologischer und ökotoxikologischer Tests zur Beurteilung belasteter und sanierter Böden und Substrate

AZ: 15716



**Gefördert durch die
Deutsche Bundesstiftung Umwelt**

Deutsche Bundesstiftung Umwelt
Postfach 1705
49007 Osnabrück



Gesamtkoordinator

Dr. W. Kördel
Fraunhofer-Institut für Umweltchemie
und Ökotoxikologie
Postfach 1260
57377 Schmallenberg

September 2001

Verbundpartner

Prof. Dr. R. Achazi
FU-Berlin
Ökotoxikologie und Biochemie
14195 Berlin

Dr. Altenburger
Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle
04318 Leipzig

Dipl. Chem. M. Eberius
Lemna Tec GmbH
52146 Würselen

Dr. A. Eisenträger
Institut für Hygiene und Umweltmedizin
des Universitätsklinikums Aachen
52074 Aachen

Dr. K. Hund-Rinke
Fraunhofer-Institut für Umweltchemie
und Ökotoxikologie
57392 Schmallenberg

Dr. F. Pfeifer
Deutsche Montan Technologie GmbH
Geschäftsbereich GUC
45307 Essen

Dr. F. Riepert
Biologische Bundesanstalt für Land-
und Forstwirtschaft
14195 Berlin

Dr. J. Römbke
ECT GmbH
65439 Flörsheim

Prof. I. Schuphan
RWTH Aachen
52074 Aachen

Prof. B.-M. Wilke
TU Berlin
Institut für Ökologie
14195 Berlin

Gliederung des Abschlussberichtes

Kapitel	Verantwortlich
I Zusammenfassung	Dr. W. Kördel Dr. K. Hund-Rinke
II Einleitung	Dr. W. Kördel Dr. K. Hund-Rinke
III Ziele des Gesamtvorhabens und Projektstruktur	Dr. W. Kördel Dr. K. Hund-Rinke
IV Beschreibung der Böden und Probenahmestellen	Dr. W. Kördel Dr. D. Hennecke
V Teilvorhaben 3: Bodenfauna: Regenwurm-Vermeidungstest und Nematodentest	Dr. K. Hund-Rinke
VI Teilvorhaben 4: Charakterisierung des wässrig estrahierbaren ökotoxischen und genotoxischen Potenzials von Böden mit Hilfe miniaturisierter Testverfahren mit kinetischer Datenaufnahme	Dr. A. Eisenträger
VII Teilvorhaben 5: Eignung des Lemna-Test als ein pflanzliches Testsystem in einer Testbatterie zur Ermittlung ökotoxikologischer Kenndaten kontaminierter Böden	Prof. I. Schuphan Dr. M. Eberius
VIII Teilvorhaben 6: Pflanzentest	Dr. J. Römbke
IX Vergleich der Empfindlichkeit und der Aussagekraft der Tests hinsichtlich der Schutzziele	Dr. W. Kördel Dr. K. Hund-Rinke
X Empfehlung einer Teststrategie	Dr. W. Kördel Dr. K. Hund-Rinke
XI Ausblick	Dr. W. Kördel Dr. K. Hund-Rinke

Kapitel I

Zusammenfassung

Dr. W. Kördel,
Dr. K. Hund-Rinke
Fraunhofer-Institut für Umweltchemie
und Ökotoxikologie
57392 Schmallenberg

Das Bundesbodenschutzgesetz (BBodSchG) nennt als wesentliche Schutzziele die menschliche Gesundheit, das Grundwasser und Boden als Lebensraum für Bodenorganismen und Pflanzen. Bisher wurde das Gesetz in der Bundesbodenschutzverordnung (BBodSchV) hinsichtlich eines stoffbezogenen Bodenschutzes operationalisiert, d.h. es wurden Bodenwerte für prioritäre Kontaminanten festgelegt. Bei der Beurteilung von belasteten Böden oder Bodenmaterialien, die verwertet werden sollen, reicht jedoch ein reiner Stoffbezug, ausgerichtet auf wenige Schadstoffe, nicht aus, sondern es bedarf der Einbeziehung ökotoxikologischer Tests zur Erfassung des Gesamttoxizitätspotenzials aller Schadstoffe bzw. zur Erfassung der Beeinträchtigung des Lebensraums für Bodenorganismen und Pflanzen. Hierzu lagen teilerprobte Testverfahren zu Beginn des Verbundvorhabens zwar vor, doch galt es diese in Ringtests zu validieren bzw. in Laborvergleichstests zu erproben, um die Akzeptanz der Verfahren in einer Bodenbewertung voranzutreiben. Dazu wurde mit finanzieller und fachlicher Unterstützung durch die DBU (Frau Dr. St. Heiden) ein Verbundvorhaben konzipiert. Zur Bewältigung des umfangreichen Arbeitsvolumens wurde die eine Projektuntergliederung in Teilvorhaben und Arbeitspaketen vorgenommen (Tabelle I - 1). Diese Konzeption hat sich bewährt, so dass die im Antrag festgelegten Arbeitspakete erfolgreich durchgeführt werden konnten. Wie im folgenden Abschnitt dargestellt, sind die angestrebten Ziele voll umgesetzt worden.

Im Bericht ist dargestellt, dass sich das Verbundvorhaben als wesentlicher Baustein in eine Reihe von Vorhaben zur Thematik der Beurteilung von Boden / Bodenmaterial einreicht, so dass experimentell begründet und validiert eine Teststrategie empfohlen werden kann, die nicht nur einzelne Testsysteme aufführt, sondern gleichzeitig auch die Testergebnisse angibt, bei welchen die getestete Bodenfunktion noch als "gegeben" angesehen werden kann. Dies bedeutet, dass bis zu dem gesetzten Schwellenwert davon auszugehen ist, dass für die betrachtete Funktion keine schädliche Bodenveränderung vorliegt. Die Teststrategie lässt sich wie in den Tabelle I - 2 bis I - 4 dargestellt, zusammenfassen.

In dem Ausblick wird darauf hingewiesen, dass die Aufgabe der Normung erprobter Verfahren vorangetrieben wird, dass jedoch in einer "konzentrierten Aktion" unter Beteiligung der betroffenen Seiten die Teststrategie exemplarisch in der Praxis erprobt werden sollte, um so ihre Unverzichtbarkeit in der Bewertung von Boden / Bodenmaterial zu demonstrieren und die Akzeptanz in dem Vollzug zu gewährleisten.

Die Ergebnisse des Ringtest sind in einem separaten Buch "Ökotoxikologische und genotoxikologische Beurteilung von Böden und Substraten – Ringtestergebnisse", erschienen im Erich-Schmidt-Verlag (2001), veröffentlicht.

Tabelle I - 1: Projektuntergliederung

Teilvorhaben/ Arbeitspaket	Titel	verantwortlich	Partner
TV 1	Koordination und Bereitstellung der Böden	W. Kördel, FhG	D. Hennecke, FhG
TV 2	Ringtests	K. Hund-Rinke, FhG	
AP 1	Aquatische Tests	K. Hund-Rinke, FhG	Ringtestteilnehmer
AP 2	Mutagenitätstests	A. Eisenträger, IHU	Ringtestteilnehmer
AP 3	Mikroflora	B-M. Wilke TUB	Ringtestteilnehmer
AP 4	Bodenfauna	R. Achazi, FBU	Ringtestteilnehmer
TV 3	Regenwurmfluchttest und Nematodentest	K. Hund-Rinke, FhG	J. Römbke, ECT R. Achazi, FUB
TV 4	Miniaturisierte Testverfahren	A. Eisenträger, IHU	K. Hund-Rinke, FhG F. Pfeifer, DMT
TV 5	Lemna-Test	I. Schuphan, RWTH	R. Altenburger, UFZ J. Römbke, ECT M. Eberius, Lemnatec
TV 6	Pflanzentest	J. Römbke, ECT	B.M. Wilke, TUB F. Riepert, BBA

Tabelle I - 2: Schutzziel : Grundwasser
Empfohlenes Testset zur Erfassung des Ökotoxizitätspotenzials im Eluat

Test	Toxizitätskriterium ²⁾
chemische Analyse	Eluatwerte in BBodSchV
Leuchtbakterien, Lumineszenz (DIN EN ISO 11348-2,-3)	$G_L \leq 8$ (> 8)
Alge, Vermehrung (DIN 38412, Teil 33 mit Modifikationen auf der Basis von DIN EN 28692 bzw. ISO 8692)	$G_A \leq 4$ (> 4)
alternativ: Alge Vermehrung – miniaturisiertes Verfahren Lemna, Vermehrung (ISO CD 20079) ¹⁾	$G_A \leq 4$ (> 4) $G_W \leq 2$ (> 2)

¹⁾ Berücksichtigung sobald endgültige Standardisierung vorliegt

²⁾ Boden gilt als untoxisch, wenn die genannten Kriterien erfüllt sind; Angaben in Klammern geben an, ab welcher G-Stufe der Boden als toxisch einzustufen ist; die Bewertung der Proben anhand der G-Werte ist dann zulässig, wenn bei der Verdünnungsreihe eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erhalten wird (Abnahme der Hemmung bei Verdünnung der Probe), wenn über mehrere getestete Verdünnungsstufen eine nahezu 100%ige Hemmung erhalten wird oder wenn in den Verdünnungsstufen bis zum Erreichen des Toxizitätskriteriums keine Hemmung auftritt. Nicht eindeutige Ergebnisse können durch Hemmungen der Wachstumskontrollen oder durch Wachstumsförderungen erhalten werden.

Tabelle I - 3: Schutzziel Grundwasser
Empfohlenes Testset zur Erfassung des genotoxikologischen Gefährdungspotenzials im Eluat bzw. ankonzentrierten Eluat

Test	Toxizitätskriterium ²⁾
1. Stufe: Bodeneluatuntersuchung umu-Test optional: Ames-Test ¹⁾ NM2009-Test ²⁾	G = 1,5 (≥ 3) G = 3 (≥ 6) G = 1,5 (≥ 3)
2. Stufe: falls Bodeneluat nicht genotoxisch: Bodeneluat-Extrakt-Untersuchung (15-fach ankonzentriert) umu-Test optional: Ames-Test ¹⁾ NM2009-Test ¹⁾	G = 1,5 (≥ 3) G = 3 (≥ 6) G = 1,5 (≥ 3)

¹⁾ Für den Fall, dass im umu-Test sowohl im wässrigen Eluat als auch im ankonzentrierten Eluat keine Genotoxizität nachweisbar ist und aufgrund der früheren Nutzung des Standorts oder aufgrund chemisch-analytischer Daten der begründete Verdacht besteht, dass wässrig extrahierbare mutagene Substanzen in der Bodenprobe vorhanden sind, sollten die Ergebnisse mit Hilfe des Ames-Tests überprüft werden. Dabei werden nach DIN 38415-4 die Stämme *Salmonella typhimurium* TA 98 und TA 100 mit und ohne metabolische Aktivierung getestet. Besteht der Verdacht, dass Böden oder Bodenmaterialien mit Nitroaromaten kontaminiert sind, sollte der NM 2009-Test – nach erfolgreicher Normung – anstelle des umu-Tests durchgeführt werden.

²⁾ Boden gilt als untoxisch, wenn die genannten Kriterien erfüllt sind; Angaben in Klammern geben an, ab welcher G-Stufe der Boden als toxisch einzustufen ist; die Bewertung der Proben anhand der G-Werte ist dann zulässig, wenn bei der dualen Verdünnungsreihe eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erhalten wird, (Abnahme der Induktionsrate bei Verdünnung der Probe), wenn über mehrere getestete Verdünnungsstufen eine nahezu konstante, hohe Induktionsrate erhalten wird oder wenn in den ersten beiden Verdünnungsstufen kein genotoxischer Effekt erhalten wird.

Tabelle I - 4: Schutzziel: Lebensraum
Empfohlenes Testset zur Beurteilung der Lebensraumfunktion für Bodenorganismen und Pflanzen

Test	Toxizitätskriterium ²⁾
Basale und substratinduzierte Atmung (ISO / DIS 17155)	$Q_R \leq 0,3$; Peakmaximum: ≤ 50 h
Nitrifikation (ISO 15685)	Auswertung gemäß Mischungsansatz
Regenwurm, kombinierter Akut-/Reprotest (nach ISO 11268-1, -2)	Anzahl der Nachkommen im Testansatz ≥ 50 % der Nachkommen im Kontrollansatz
Alternativ: Regenwurm-Vermeidungstest als Screeningtest ¹⁾	≤ 80 % Vermeidungsverhalten
Collembolen, Reproduktion (ISO 11267)	Anzahl der Nachkommen im Testansatz ≥ 50 % der Nachkommen im Kontrollansatz
Alternativ: Enchytraeen, Reproduktion (ISO CD 16387) ¹⁾	
Pflanzentest mit monokotyler (Hafer: <i>Avena sativa</i>) und dikotyler Art (Stoppelrübe: <i>Brassica rapa</i>) (DIN ISO 11269-2)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ < 30 % Abweichung vom Kontrollansatz ❖ Statistisch signifikante Unterschiede in den Ergebnissen von Test- und Kontrollansatz ❖ Bewertung nach Mischmethode

¹⁾ sobald der Test in genormter Form vorliegt

²⁾ Boden gilt als untoxisch, wenn die genannten Kriterien erfüllt sind.

Kapitel II

Einleitung

Dr. W. Kördel,
Dr. K. Hund-Rinke
Fraunhofer-Institut für Umweltchemie
und Ökotoxikologie
57392 Schmallenberg

Zweck des Bundesbodenschutzgesetzes (BBodSchG) ist es, nachhaltig die Funktionen des Bodens zu erhalten bzw. wieder herzustellen. Angesichts der zentralen Stellung des Bodens im Ökosystem und der an ihn gestellten Nutzungsansprüche nimmt der Boden eine Vielzahl von Funktionen ein. Hervorzuheben sind die ökologischen Funktionen: Regulations-, Lebensraum- und Produktionsfunktion. Zentraler Begriff in der Bodenschutzgesetzgebung ist die schädliche Bodenveränderung. Dieser wird wie folgt definiert: "Schädliche Bodenveränderungen sind Beeinträchtigungen der Bodenfunktionen, die geeignet sind, erhebliche Nachteile oder erhebliche Belästigungen für den einzelnen oder die Allgemeinheit herbeizuführen."

Bei der Bewertung der Bodenqualität - der Abklärung ob eine schädliche Bodenveränderung vorliegt oder zu befürchten ist – wird der belastete Boden als Emittent von Schadstoffen betrachtet (Exposition von Schutzgütern, ausgehend vom belasteten Boden). Dabei kommt es auf den Transferpfad, d.h. den Weg eines Stoffes vom Boden bis zum Ort einer möglichen Wirkung auf ein Schutzgut, an. Bisher wurden die folgenden Wirkungspfade bearbeitet:

- Boden – Mensch (Direktpfad)
- Boden – Nahrungspflanze
- Boden – Grundwasser

Für diese drei Wirkungspfade liegen fachliche Eckpunkte zur Ableitung von Prüf- und Maßnahmenwerten vor, die begründet durch die Ableitungsstrategie auf chemischer Analyse des Gesamtschadstoffgehaltes im Boden bzw. mobiler oder pflanzenverfügbarer Anteile beruhen. Die Lebensraumfunktion für Bodenorganismen sowie das Gesamtoxitätspotenzial im Porenwasser (mobiler Schadstoffanteil → Grundwassergefährdungspotenzial) sind bisher nicht in der BBodSchV verankert.

In seiner Veröffentlichung "Wege zum vorsorgenden Bodenschutz – fachliche Grundlagen und konzeptionelle Schritte für eine erweiterte Vorsorge" (WBB 2000) fordert der Wissenschaftliche Beirat Boden eine Erweiterung des Vorsorgeansatzes in der bodenrechtlichen Vorsorgekonzeption. Er führt u.a. aus: "Bodenorganismen sind wesentlich an den Abbau-, Aufbau- und Umbauvorgängen im Boden und damit an den Stoffkreisläufen, indirekt auch am Wasserkreislauf, beteiligt. Der vorsorgende Schutz der Lebensraumfunktion der Böden bzw. die Bewertung einer Beeinträchtigung dieser Funktion steht somit in engem Zusammenhang mit den gesamten natürlichen Funktionen des Bodens (sowie einem Teil der Nutzungsfunktionen), deren Beeinträchtigung soweit wie möglich vermieden werden sollte.

Aus diesem Grund hält der Beirat die Erarbeitung von Anforderungen zum vorsorgenden Schutz der Lebensraumfunktion von Böden für dringend geboten."

Grundsätzlich sollten bei der Bewertung ökotoxikologischer Wirkungsdaten folgende Punkte Berücksichtigung finden (Tertyze und Huck, 2000):

- Die ausgewählten Prüfparameter müssen in der Lage sein, die Störung zentraler ökologischer Funktionen des Bodens anzuzeigen.
- Die Prüfparameter (Wirkkriterien) sollen kurz-, mittel- und langfristige Veränderungen der Bodenqualität anzeigen können.
- Bei der Auswahl sollten sowohl strukturelle als auch funktionelle Parameter berücksichtigt werden.
- Eine umfassende Wirkungsanalyse zur Ableitung von Prüfwerten sollte möglichst Mono- und Multispezies-tests, Labor-Mikrokosmen, mathematische Modelle und Freilandexperimente miteinander kombinieren.

Zur Umsetzung der Ziele einer nachhaltigen Bodennutzung bedarf es daher weiterhin der ergebnisorientierten Forschung zur Erweiterung und Absicherung eines handlungsorientierten Wissens, gemäß den zuvor aufgezeigten Rahmenbedingungen. Für die Entwicklung von Test- und Bewertungsstrategien können wesentliche Punkte, geordnet nach den einzelnen Funktionen, wie folgt zusammengefasst werden:

- **Boden als Lebensgrundlage und Lebensraum für Menschen, Tiere und Pflanzen in der biologischen Vielfalt (Lebensraumfunktion)**
 - Ableitungsstrategien für Prüf- und Vorsorgewerte
 - geeignete Test – und Bewertungsstrategien
 - Einbeziehung von Funktion und Struktur
 - Definition von schädlichen Bodenveränderungen
 - bessere Erfassung und Einbeziehung der Bioverfügbarkeit
 - Normierung von Testergebnissen auf Standardboden bzw. Übertragbarkeit von Testergebnissen auf andere Böden

- **Boden als "Reaktor" für abiotische und biotische Stoffumwandlungen**
 - Einfluss von Bodeneigenschaften, Klima und Kultivierung auf die Aktivität und Diversität von Mikroorganismen
 - Erfassung schädlicher Bodenveränderungen im Hinblick auf die Stoffkreisläufe
 - Erfassung und Beeinflussung des Abbaus organischer Schadstoffe
 - Humusbildung und Einfluss auf Schadstofffestlegung und Verlagerung

- **Boden als Puffer und Filter**
 - Filtereigenschaften von Böden
 - Festlegung und Sorption von Schadstoffen
 - Remobilisierungsprozesse
 - Senke und Quelle für Schadstoffe (Böden als Teil des Ökosystems)

- **Boden als Standort für Nutzpflanzen einschließlich nachwachsender Rohstoffe**
 - Schadstoffaufnahme in Pflanzen
 - Ertragsminderung durch bodenphysikalische Veränderungen
 - Phytoremediation unter Nutzung nachwachsender Rohstoffe

Das Verbundvorhaben setzt in diesem Aufgabenspektrum ein, indem ökotoxikologische Tests zur Erfassung eines möglichen Schadstoffaustrags mit dem Sickerwasser zum Grundwasserleiter und zur Erfassung der Lebensraumfunktion in Ringversuchen validiert bzw. in Laborvergleichstests erprobt werden. Das Verbundvorhaben mit seinem Ringtest sowie den Laborvergleichsuntersuchungen ist dabei als ein wesentlicher Baustein innerhalb einer Reihe von Aktivitäten zu sehen:

- Im BMBF – Verbund „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“ wurde im Teilvorhaben 4 "Praxiserprobung biologischer Testverfahren" ökotoxikologische Methoden zur Erfassung der Qualität von Boden und Bodenmaterialien entwickelt bzw. erprobt. Die Ergebnisse wurden in einem Leitfaden veröffentlicht (Michels et al., 2001).

- Vom GDCh-Arbeitskreis „Bodenchemie und Bodenökologie“ wurde eine Monographie zum Thema "Anforderungen an physikalisch-chemische und biologische Testmethoden zur Einschätzung von Böden und Bodensubstraten" zusammengestellt und herausgegeben (Kördel et al., 2000), die den dringenden Bedarf an ökotoxikologischen Testverfahren zur Ergänzung der BBodSchV verdeutlicht und den derzeitigen Stand ökotoxikologischer Testsets aufzeigt.
- Von der DBU wurden Forschungsvorhaben zur Entwicklung von automatisierten Tests vergeben, im Fachgespräch diskutiert und veröffentlicht (Heiden & Dott, 1997).
- Von Frau Dr. Heiden (DBU) wurde im November 2000 eine Tagung in Osnabrück initiiert, die sich mit der Leistungsfähigkeit biologischer Testverfahren bei der Beurteilung von Böden beschäftigte. Die Beiträge wurden als Buch veröffentlicht (Heiden et al., 2000).
- Derzeit wird die DECHEMA Broschüre "Biologische Testverfahren für Boden und Bodenmaterialien" überarbeitet (Dott et al., im Druck).
Die Ergebnisse des Verbundvorhabens stellen dabei eine wesentliche Grundlage dar.

Literatur

- Dott W., Achazi R., Eisenträger A., Hund-Rinke K., Kördel W., Neumann-Hensel H., Pfeifer F., Römbke J., Wiesner J., Wilke B.-M. (in press): Biologische Testverfahren für Boden und Bodenmaterial - 7. Bericht des interdisziplinären Arbeitskreises "Umweltbiotechnologie - Boden". Schön & Wetzels GmbH, Frankfurt am Main, ISBN 3-89746-026-2.
- Heiden, St., W. Dott (Hrsg.) (1997): Miniaturisierte und automatisierte Testverfahren zur human- und ökotoxikologischen Bewertung von Schadstoffen in Umweltproben. Initiativen zur Umweltschutz 7. Zeller Verlag, Osnabrück.
- Heiden, St., R. Erb, W. Dott, A. Eisenträger (Hrsg.) (2000): Toxikologische Beurteilung von Böden. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Kördel, W., U. Müller-Wegener, J. Römbke, K.T. von der Trenck (2000): Anforderungen an physikalisch-chemische und biologische Testmethoden zur Einschätzung von Böden und Bodensubstraten. GDCh-Monographie Bd. 20.
- Michels, J., T. Track, U. Gehrke, D. Sell (Hrsg.) (2001): Biologische Verfahren zur Bodensanierung, Grün-weiße Reihe des UBA.
- Tertyze, K., S. Huck (2000): Ableitung von Schwellen- und Prüfwerten – Aktuelle Entwicklungen zur Ausarbeitung ökotoxikologischer Prüfwerte für die Beurteilung der Bodenqualität. In: St. Heiden, R. Erb, W. Dott, A. Eisenträger (Hrsg.): Toxikologische Beurteilung von Böden. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- WBB-Wissenschaftlicher Beirat Bodenschutz beim BMU (2000): Wege zum vorsorgenden Bodenschutz – Fachliche Grundlagen und konzeptionelle Schritte für eine erweiterte Boden-Vorsorge, Bodenschutz und Altlasten Bd. 8, Erich Schmidt Verlag, Berlin

Kapitel III

Ziele des Gesamtvorhabens und Projektstruktur

Dr. W. Kördel,
Dr. K. Hund-Rinke
Fraunhofer-Institut für Umweltchemie
und Ökotoxikologie
57392 Schmallenberg

Ziel des Verbundvorhabens war die Bereitstellung eines wissenschaftlich fundierten und akzeptierten Instrumentariums bestehend aus ökotoxikologischen und genotoxikologischen Methoden für die Bewertung belasteter und behandelter Böden unter Berücksichtigung spezifischer Schutzgüter. Hierfür war die Bearbeitung bzw. Berücksichtigung folgender Teilaspekte erforderlich:

- Validierung genormter oder anders harmonisierter Testsysteme, mit denen bereits umfangreiche Erfahrungen aus anderen Anwendungsbereichen vorlagen, durch Ringtests für den Anwendungsbereich der Bodenqualitätsprüfung
- Abdeckung des späteren Anwenderkreises durch Einbeziehung von Prüflaboratorien, Forschungsinstituten, staatlichen Laboratorien und Firmen in die Ringtests zur Ermittlung der zu erwartenden Ergebnisschwankungen sowie zur Akzeptanzsteigerung der entwickelten Testbatterie
- Einbeziehung von Ringtestteilnehmern aus anderen EU-Ländern zur leichteren Einführung der Testbatterie auf EU-Ebene
- Überprüfung der Eignung weiterer, vielversprechender, jedoch noch nicht so verbreiteter Verfahren durch Laborvergleichstests zur Abrundung einer Testbatterie im Hinblick auf eine Anwendbarkeit auf unterschiedlichste Böden sowie unter Berücksichtigung des Kosten- und Zeitaspekts
- Überprüfung bzw. Festlegung der Kriterien zur Bewertung der Ergebnisse im Hinblick auf das Prädikat "toxisch / untoxisch"
- Einbringung der Vorschläge zur Anpassung bereits harmonisierter Testverfahren an die Anforderungen der Bodenqualitätsprüfung und der Tests, die sich in den Ring- bzw. Laborvergleichstests als geeignet erwiesen haben, in die Normung
- Darstellung von Ergebnissen im Außenraum zur Überprüfung der Akzeptanz
- Zusammenstellung einer Testbatterie unter Berücksichtigung der verschiedenen Schutzgüter, die sich für eine breite Palette unterschiedlichster Böden geeignet ist (ggf. durch alternative Testsysteme); der Kostenaspekt sowie unterschiedlichste Laborausstattungen waren zu berücksichtigen

Zur Bewältigung des umfangreichen Arbeitsvolumens wurde die folgende Projektuntergliederung in Teilvorhaben und Arbeitspaketen vorgenommen.

Tabelle III - 1: Projektuntergliederung

Teilvorhaben/ Arbeitspaket	Titel	verantwortlich	Partner
TV 1	Koordination und Bereitstellung der Böden	W. Kördel, FhG	D. Hennecke, FhG
TV 2	Ringtests	K. Hund-Rinke, FhG	
AP 1	Aquatische Tests	K. Hund-Rinke, FhG	Ringtestteilnehmer
AP 2	Mutagenitätstests	A. Eisenträger, IHU	Ringtestteilnehmer
AP 3	Mikroflora	B-M. Wilke TUB	Ringtestteilnehmer
AP 4	Bodenfauna	R. Achazi, FBU	Ringtestteilnehmer
TV 3	Regenwurmfluchttest und Nematodentest	K. Hund-Rinke, FhG	J. Römbke, ECT R. Achazi, FUB
TV 4	Miniaturisierte Testverfahren	A. Eisenträger, IHU	K. Hund-Rinke, FhG F. Pfeifer, DMT
TV 5	Lemna-Test	I. Schuphan, RWTH	R. Altenburger, UFZ J. Römbke, ECT M. Eberius, Lemnatec
TV 6	Pflanzenzest	J. Römbke, ECT	B.M. Wilke, TUB F. Riepert, BBA

Die Ergebnisse des Ringtest sind in einem separaten Buch "Ökotoxikologische und genotoxikologische Beurteilung von Böden und Substraten – Ringtestergebnisse", erschienen im Erich-Schmidt-Verlag (2001) veröffentlicht. Der vorliegende Abschlußbericht zu den Teilvorhaben 3 bis 6, einschließlich zur zusammenfassenden Auswertung, enthält die Berichte der Teilvorhaben, die unter Verantwortung der jeweiligen Teilprojektleiter unter Vorgabe einheitlicher Rahmenbedingungen erstellt wurden (Kapitel IV – VIII). In Kapitel IX und X werden die Ergebnisse zusammenfassend bewertet und eine Teststrategie vorgestellt.

Literatur

Hund-Rinke, K., W. Kördel, R. Erb, St. Heiden (Hrsg) (2001): Ökotoxikologische und genotoxikologische Beurteilung von Böden und Substraten – Ringtestergebnisse. Erich Schmidt Verlag. Berlin.

Kapitel IV

Beschreibung der Böden und Probenahmestellen

Dr. W. Kördel,
Dr. D. Hennecke
Fraunhofer-Institut für Umweltchemie
und Ökotoxikologie
57392 Schmallenberg

Inhaltsverzeichnis

IV - 1	EINLEITUNG	5
IV - 2	BESCHREIBUNG DER BÖDEN	6
IV - 2.1	Art der Belastung	7
IV - 2.2	Probenahmestellen	8
IV - 2.3	Vorbehandlung der Böden	8
IV - 2.4	Homogenität der vorbehandelten Böden	9
IV - 3	BODENCHARAKTERISIERUNG	10
IV - 3.1	Referenzboden	10
IV - 3.2	Testböden	10
IV - 4	FESTSTOFFANALYSEN	13
IV - 4.1	Schwermetalle	13
IV - 4.2	Mineralölkohlenwasserstoffe (MKW) und Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)	13
IV - 4.3	Nitrotoluole	14
IV - 5	ELUATANALYSEN	15
IV - 5.1	Schwermetalle	15
IV - 5.2	Mineralölkohlenwasserstoffe (MKW), Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und Phenolindex	16
IV - 5.3	Nitrotoluole	17
IV - 5.4	pH, gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) und Anionen	17
IV - 6	ZUSAMMENFASSUNG	19
IV - 7	LITERATUR	20

IV - 1 Einleitung

Für die erfolgreiche Durchführung von Ring- und Laborvergleichstest ist die Auswahl von Böden, die Probenahme, Probenaufarbeitung, Homogenisierung, Charakterisierung und die Verteilung von Teilproben an die Projektpartner wesentlicher Baustein. Nur, wenn homogene Teilproben an die Projektpartner verschickt werden, sind die Teilvorhaben untereinander vergleichbar und die bei der biologischen Testung ermittelten Standardabweichungen beruhen im wesentlichen auf Variationen bei der biologischen Testdurchführung. Dies bedingt, dass Böden zentral von einem Partner bereitgestellt werden.

Für die Laborvergleichstests sollten 8 belastete und, wenn möglich, ein bis zwei unbelastete Kontrollböden zur Verfügung gestellt werden. Die Anzahl von 8 Böden stellt dabei einen Kompromiss zwischen dem im Verbundprojekt handhabbaren Untersuchungsaufwand und dem gewünschten breiten Spektrum an Bodeneigenschaften und Kontaminanten dar, da Qualität und Aussagekraft des Laborvergleichstests im wesentlichen von einer geschickten Auswahl der Testböden abhängt. Daher sollte die Bodenauswahl im Idealfall so angelegt sein, dass die folgenden Anforderungen weitestgehend erfüllt waren:

- Sie sollten die wesentlichen Schadstoffgruppen (Schwermetalle, MKW, PAK und TNT) berücksichtigen. Wenn möglich, sollte jeweils eine der Schadstoffgruppen dominieren, da diese in unterschiedlichem Maße auf verschiedene Organismengruppen wirken.
- Sie sollten einen relativ breiten pH-Bereich (4,5-8,5) abdecken ohne jedoch in Extrembereiche zu gehen, für die einige Tests nicht durchführbar sind.
- Sie sollten verschiedene Bodenarten abdecken, um die Durchführbarkeit der Tests in Abhängigkeit dieses wichtigen Parameters abzuklären.
- Sie sollten für den gesamten Satz von Tests einsetzbar sein.
- Sie sollten unterschiedliche Grade der Kontamination abdecken, um für die zu testenden Organismen ein deutliches Wirkungsspektrum, von geringer Ökotoxizität bis zu deutlicher Wirkung zu erhalten. Eine Abstufung der Empfindlichkeit der Tests war durch Vermischen der Testböden mit Kontrollböden möglich.
- Wenn möglich, sollten auch zu ein oder zwei belasteten Böden unbelastete Kontrollböden entnommen werden.

Es stellte somit eine große Herausforderung dar, acht Böden zur Verfügung zu stellen, die alle diese Voraussetzungen vereinen. Es galt, die Bodenauswahl sorgfältig zu treffen. Um

sicherzugehen, dass die ausgewählten Böden die zuvor aufgestellten Forderungen weitestgehend erfüllen, müssen mehrere geeignet erscheinende Böden nicht nur chemisch – physikalisch charakterisiert werden, sondern mit diesen Böden müssen vorab einige ausgewählte ökotoxikologische Tests durchgeführt werden, um sicherzugehen, dass sie in dem gewünschten Toxizitätsspektrum liegen.

Für die Auswahl von geeigneten belasteten Böden wurden Umweltämter von Städten und Gemeinden, Landesumweltämter, verschiedene Sanierungsunternehmen sowie Deponiebetreiber angesprochen. Es wurde dabei gezielt nach Böden mit unterschiedlichen Belastungsgraden und typischen Kontaminationen gesucht.

Wie die folgenden Abschnitte belegen, konnten die am Beginn des Verbundvorhabens aufgestellten Anforderungen weitgehend erfüllt werden.

IV - 2 Beschreibung der Böden

Es wurden nach Rücksprache mit den zuständigen Stellen an insgesamt 25 verschiedenen Standorten Vorproben entnommen. Diese wurden dann orientierenden Untersuchungen hinsichtlich Schadstoffgehalt sowie einigen biologischen Untersuchungen unterzogen. In Absprache mit den Teilprojektleitern wurden auf Grundlage der Screening-Untersuchungen schließlich 9 Testböden + 1 Standardboden (Lufa 2.2, siehe Kap. IV - 3.1) für die Durchführung des Verbundvorhabens ausgewählt. Die Böden haben die folgenden Bezeichnungen:

- Sickergraben
- Celle Hintergrund
- Neuohre
- IMA SM 66
- IMA 927 B
- PAK-Mix
- Iserlohn
- Gaswerk 1:2
- Landhausen

IV - 2.1 Art der Belastung

Bei "IMA SM 66" handelt es sich um ein Gemisch verschiedener Mineralöl – Altlasten. Das Gemisch wurde homogenisiert und gilt nach Auskunft des Sanierungsunternehmens gemäß LAGA Z 2 als saniert.

"IMA 927 B" ist Auswurfmaterial einer Bohrung, das mit verschiedenen Bohrölen verunreinigt war. Auch diese Material wurde saniert und entspricht ebenfalls den Anforderungen nach LAGA Z 2.

Bei "PAK-Mix" handelte es sich um ein Gemisch sehr stark mit PAK kontaminierter Böden. Die Böden wurden von Sanierungsunternehmen zur Verfügung gestellt, die Herkunft der einzelnen Böden kann nicht zurückverfolgt werden.

Der Boden "Sickergraben" ist eine Rüstungsaltpaste und stammt aus einem ca. 1 m tiefen Graben, in dem in früheren Jahren Abwässer aus einer TNT-Produktionsstätte versickert wurden. Der Boden ist extrem hoch mit Nitrotoluolen belastet.

Der Boden "Neuohe" ist einer Stelle entnommen, an der z. B. Nebelgranaten und andere Kampfmittel oberflächennah abgebrannt wurden. Der Boden ist oberflächlich verkohlt und enthält große Mengen Schwermetalle, insbesondere Zink.

Der Boden "Celle Hintergrund" entstammt einer als nicht belastet angesehenen Wiese in unmittelbarer Nähe zu den beiden räumlich scharf abgrenzbaren Rüstungsaltpasten.

Bei "Iserlohn" handelte es sich nach Auskunft der Sanierungsfirma um einen Ölschaden mit den Hauptkontaminanten MKW und PAK.

"Landhausen" ist Material aus einer Schlammdeponie, auf der unter anderem Waschlammdeponie deponiert wurden. Als Belastung wurden Schwermetalle, MKW und PAK angegeben.

"Gaswerk 1:2 " ist Boden aus dem Untergrund einer ehemaligen Teergrube eines Gaswerkes vermischt mit unbelastetem Sandboden. Als Hauptkontaminanten wurden PAK und MKW angegeben.

IV - 2.2 Probenahmestellen

Die Böden "IMA SM 66" und "IMA 927 B" wurden von einem Sanierungsunternehmen zur Verfügung gestellt. Die Probenentnahme in beiden Fällen von einem angeschütteten Haufen.

Die Böden für "PAK-Mix" wurden ebenfalls von Sanierungsunternehmen zur Verfügung gestellt, die Probenentnahme erfolgte jeweils durch das Unternehmen.

Bei den Böden "Sickergraben", "Neuohe" und "Celle Hintergrund" erfolgte die Probenentnahme in situ. "Sickergraben" befand sich in einem mit Kiefern bewachsenen Waldgebiet auf dem Gelände einer Rüstungsfirma, "Neuohe" und "Celle Hintergrund" am Rande eines Feldweges.

Die Böden "Iserlohn" und "Landhausen" wurden von einem Sanierungsunternehmen zur Verfügung gestellt. Die Probenentnahme erfolgte im Fall von "Landhausen" vom Rand einer Dreiecksmiete, bei "Iserlohn" von einem angeschütteten Haufen.

Der Boden "Gaswerk" wurde im Rahmen der laufenden Sanierungsmaßnahme mit einem Bagger aus der am stärksten belasteten Bodenschicht in etwa 4 m Tiefe entnommen.

IV - 2.3 Vorbehandlung der Böden

Von allen beschriebenen Böden wurden Proben von etwa 0,5 bis 1 t - je nach Bodenstruktur und -dichte - entnommen und für die weiteren Untersuchungen aufbereitet.

Alle entnommenen Bodenproben wurden in einer dünnen Schicht (ca. 10 cm) ausgebreitet und soweit getrocknet, bis eine Absiebung möglich war. Die Restwassergehalte betrugen 4 bis 10%. Die Böden wurden anschließend mit Hilfe eines 1 m² großen Siebes mit 5,5 mm Quadratlochung per Hand gesiebt. Als Siebunterlauf blieben jeweils etwa 400 bis 700 kg übrig. Die gesiebten Böden wurden zweimal mit einer Betonmischmaschine homogenisiert und bis zur Verteilung an die Verbundpartner in Bigbags bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Da der Boden "Gaswerk" nur sehr schlecht zu sieben und homogenisieren war, wurde er nach Absprache mit den Verbundpartnern nach dem Sieben mit der gleichen Menge eines unbelasteten gesiebten Sandbodens gemischt. Das erhaltene Bodengemisch war erheblich besser zu homogenisieren und wurde mit "Gaswerk 1:2" bezeichnet.

IV - 2.4 Homogenität der vorbehandelten Böden

Die Prüfung auf Homogenität erfolgte exemplarisch an zwei Böden durch mehrfache Bestimmung der Hauptkontaminanten in unabhängigen Proben. Mit dem Boden "Gaswerk" wurde dazu der am schwierigsten zu homogenisierende und daher vom optischen Eindruck her inhomogenste Boden herangezogen. Mit TNT-Mix wurde ein weiterer Boden geprüft, der ausschließlich für den Ringtest verwendet wurde. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle IV - 1:

Tabelle IV - 1: Standardabweichung und Variationskoeffizienten der Hauptkontaminanten bei ausgewählten Böden zur Prüfung der Homogenität

Boden	Parameter	n ¹⁾	Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient
Gaswerk	$\Sigma_{16}\text{PAK}$	5	6938	988	14,2%
Gaswerk 1:2	$\Sigma_{16}\text{PAK}$	3	2268	319	14,1%
TNT-Mix	TNT	4	4935,4	39,5	0,8%

¹⁾ Anzahl der unabhängigen Proben

Wie erwartet liegt die Standardabweichung bei dem Boden Gaswerk deutlich höher als bei TNT-Mix. Dies ist bedingt durch die hohe Verklumpung des Bodens und der damit einhergehenden inhomogenen Schadstoffverteilung in mehr oder weniger ausgeprägten "Schadstoffnestern". Die Standardabweichung bei TNT-Mix liegt mit einem Variationskoeffizienten von 0,8% sehr gut und ist prinzipiell auf die anderen Böden mit vergleichbarem Verhalten bei Siebung und Homogenisierung zu übertragen

IV - 3 Bodencharakterisierung

IV - 3.1 Referenzboden

Als Referenzboden für das Arbeitspaket Bodenfauna wurde gelagerter Standardboden Typ Lufa 2.2 der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt (Lufa) Speyer verwendet. Die Probennahme, –aufarbeitung und –analytik erfolgte durch die Lufa Speyer. Die folgenden Daten wurden dazu angegeben:

Tabelle IV - 2: Charakterisierung des Referenzbodens (Lufa 2.2 Charge Nr.: Sp 2.21200)

Parameter	Wert	Einheit
Bodenart	lehmiger Sand	
Siebschnitt	< 2	mm
TOC	2,17 ± 0,05	%
pH-Wert	5,7 ± 0,2	
Kationenaustauschkapazität	11 ± 2	mval/100g
WHK _{max}	50 ± 4	g/100 g TS
Schüttvolumen	1156 ± 40	g/1000 ml

IV - 3.2 Testböden

Von allen verwendeten Böden wurden Proben zur Analyse der Bodenart und des Nährstoffgehalts an die Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt (Lufa) Speyer geschickt. Das Ergebnis der Untersuchungen zeigt Tabelle IV - 3:

Tabelle IV - 3: Befund der Bodenuntersuchungen der Lufa Speyer

	IMA SM 66	IMA 927 B	Sickergraben	Neuohe	Hintergrund	PAK-Mix	Iserlohn	Landhausen	Gaswerk 1:2
Ton (< 0,002 mm)	8,2%	28,3%	6,5%	5,4%	7,6%	7,5%	6,7%	5,4%	5,4%
Schluff (0,002 – 0,063 mm)	12,8%	36,1%	0,3%	10,8%	22,0%	8,9%	10,9%	12,7%	9,8%
Sand (0,063 – 2,0 mm)	79,0%	35,6%	93,2%	83,8%	70,4%	83,6%	82,4%	81,9%	84,8%
Bodenart	lehmiger Sand	schwach toniger Lehm	schwach toniger Sand	schwach lehmiger Sand	schwach lehmiger Sand	schwach lehmiger Sand	schwach lehmiger Sand	schwach lehmiger Sand	schwach lehmiger Sand
pH (CaCl ₂)	7,7	7,8	5,0	7,2	5,3	7,5	7,5	7,3	5,6
Kalkgehalt [% CaCO ₃]	5,3	7,8	< 0,1	2,1	5,3	2,2	5,3	6,2	<0,1
Phosphat P ₂ O ₅ [mg / 100 g lufttrockener Boden]	12	58	12	6	2	15	7	16	11
Kalium K ₂ O [mg / 100 g lufttrockener Boden]	10	17	5	4	5	9	11	24	12
Magnesium Mg [mg / 100 g lufttrockener Boden]	6	23	13	35	1	12	8	29	5
Ammonium NH ₄ [mg / 100 g lufttrockener Boden]	< 0,1	0,1	0,3	<0,1	0,2	< 0,1	0,1	0,2	0,2
Nitrat NO ₃ [mg / 100 g lufttrockener Boden]	2,4	2,8	0,5	1,0	0,5	2,0	0,2	0,1	7,9
Stickstoff N [mg / 100 g lufttrockener Boden]	30	30	1460	66	70	113	200	270	160
Kohlenstoff C [mg / 100 g lufttrockener Boden]	823	1960	7323	1990	1573	4023	6360	8720	1490
C / N Verhältnis	27,4	65,3	5,0	30,2	22,5	35,6	31,8	32,3	9,3
Humus [%]	1,4	3,4	12,6	3,4	2,7	6,9	10,9	15,0	2,6

Es wurden zusätzliche Parameter zur Charakterisierung der Testböden am IUCT bestimmt:

Tabelle IV - 4: Befund der zusätzlichen Bodenuntersuchungen am IUCT

	Trockengewicht [%]	WHK _{max} [ml/kg]	TOC [%]
IMA SM 66	97,8	285,0	0,8
IMA 927 B	94,9	406,9	0,4
Sickergraben	92,0	511,3	6,2
Neuohe	94,0	421,0	2,1
Celle Hintergrund	95,3	405,5	1,7
PAK-Mix	97,1	n. B. ¹⁾	3,9
Iserlohn	98,4	241,8	5,9
Landhausen	97,4	347,7	8,5
Gaswerk 1:2	97,6	268,5	1,7

¹⁾ nicht Bestimmt

IV - 4 Feststoffanalysen

Die chemischen Analysen zur Ermittlung der Bodenbelastung wurden am IUCT durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen dargestellt:

IV - 4.1 Schwermetalle

Die Schwermetalle im Feststoff wurden gemäß DIN EN ISO 11 185 (früher DIN 38 414 Teil 7) nach Königswasseraufschluss mittels ICP-OES bestimmt.

Tabelle IV - 5: Schwermetallgehalte im Feststoff, Angaben in [mg/kg TS]

Boden	As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Hintergrund	< 15	< 13	25,3	< 34,3	< 33	<24	927,8
Sickergraben	< 15	< 13	227,1	< 34,3	< 33	38,1	312,5
IMA SM 66	< 15	< 13	61,8	< 34,3	< 33	43,0	106,5
IMA 927 B	< 15	< 13	59,3	43,8	68,7	26,1	96,8
PAK-Mix	< 15	< 13	195,9	79,1	32,8	109,9	274,9
Neuohe	< 15	< 13	304,4	83,1	50,3	1180	54980
Iserlohn	< 15	< 13	320,3	367,8	578,5	547,5	577,6
Landhausen	< 15	29,6	2005	10921	5894	1082	5065
Gaswerk 1:2	< 15	< 13	94,9	< 34,3	< 33	<24	22,3

IV - 4.2 Mineralölkohlenwasserstoffe (MKW) und Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)

Die Bestimmung der MKW erfolgte gemäß DIN 38 409 H18 mittels FT-IR.

Die PAK wurden mittels Soxhlet mit Toluol extrahiert. Die Bestimmung erfolgte mittels GC-MS. Es wurden die 16 PAK nach EPA bestimmt.

Tabelle IV - 6: PAK und MKW im Feststoff, Angaben in [mg/kg TS]

Boden	MKW	Σ_{16} PAK
Hintergrund	58,9	0,44 ²⁾
Sickergraben	105,4	2,11 ²⁾
IMA SM 66	170,5	4,32 ²⁾
IMA 927 B	66,9	0,46 ²⁾
PAK-Mix	ca. 1000 ¹⁾	2682
Neuohe	< 50	0,42
Iserlohn	8799	21
Landhausen	43660	60
Gaswerk 1:2	< 50	2268

1) Störpeak im IR-Spektrum ist nicht zu eliminieren und täuscht höheren Gehalt vor. Wert ist abgeschätzt aus Höhe des Hauptpeaks.

2) Summe der 16 EPA-PAK ohne Naphthalin, Acenaphthen und Fluoren

IV - 4.3 Nitrotoluole

Die Bestimmung der Nitrotoluole erfolgte nach Extraktion mit Methanol über Nacht im Ultraschallbad mit Hilfe der HPLC-UV. Die Böden "Iserlohn, Landhausen und Gaswerk 1:2 wurden nicht untersucht, da eine Kontamination nicht zu erwarten war.

Tabelle IV - 7: Nitrotoluole im Feststoff, Angaben in [mg/kg TS]

[mg/kg TS]	IMA SM 66	IMA 927 B	Sickergraben	Neuohe	Hintergrund	PAK-Mix
2,4,6-Trinitrotoluol	0,78	8,15	57048,2	4,05	1,36	kein TNT oder Metabolite nachweisbar
4-Amino-2,6-Dinitrotoluol	0,29	0,28	114,1	0,38	0,20	
2-Amino-4,6-Dinitrotoluol	0,39	0,23	112,0	0,20	0,03	
1,3,5-Trinitrobenzol	0,02	0,21	13,41	0,11	< Bg	
1,3-Dinitrobenzol	< Bg	< Bg	35,96	< Bg	< Bg	
2,4-Dinitrotoluol	< Bg	< Bg	85,67	< Bg	< Bg	

Bg: Bestimmungsgrenze

IV - 5 Eluatanalysen

Der Ansatz wässriger Bodeneluate erfolgte im Verhältnis 1 Teil Boden (TS) zu 2 Teilen Wasser. Hierfür wurde naturfeuchter Boden entsprechend X g Trockengewicht in Glasgefäße eingewogen und mit deionisiertem Wasser auf 3 mal X g aufgefüllt (bezogen auf das Trockengewicht des Bodens, Wassergehalt des Bodens eingerechnet). Die Gefäße wurden mit PTFE beschichteten Deckeln verschlossen und auf einem Überkopfschüttler mit 5-10 Umdrehungen/min bei Zimmertemperatur 24 Stunden geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde der Überstand in Zentrifugegefäße (Edelstahl, für Schwermetallanalyse PE) dekantiert und für eine Stunde bei 27000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend über eine Kombination aus Glasfaservorfilter und Glasfasermikrofilter (0,45 µm) filtriert (Vorfilter: Schleicher & Schuell, GF 92, Ø 50 mm; Glasfasermikrofilter: Macherey - Nagel, MN GF - 5, Ø 50 mm, 0,45 µm).

IV - 5.1 Schwermetalle

Schwermetalle im Eluat wurden mittels ICP (Induktiv gekoppeltes Hochfrequenzplasma) in Anlehnung an DIN 38 406, Teil 22 ohne vorherige Filtration bestimmt.

Tabelle IV - 8: Schwermetallkonzentration der wässrigen Bodeneluate in [mg/l]

Boden	As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Hintergrund	< 0,05	< 0,05	< 0,2	< 0,2	< 0,05	< 0,05	0,77
Sickergraben	< 0,05	< 0,05	< 0,2	7,23	< 0,05	0,21	3,95
IMA SM 66	< 0,05	< 0,05	< 0,2	< 0,2	< 0,05	< 0,05	< 0,2
IMA 927 B	< 0,05	< 0,05	< 0,2	< 0,2	< 0,05	< 0,05	< 0,2
PAK-Mix	< 0,05	< 0,05	< 0,2	1,04	< 0,05	< 0,05	0,99
Neuöhe	< 0,05	< 0,05	< 0,2	3,26	< 0,05	0,07	10,49
Iserlohn	< 0,05	< 0,05	< 0,2	< 0,2	0,15	< 0,05	< 0,2
Landhausen	< 0,05	< 0,05	< 0,2	1,71	1,57	0,06	1,59
Gaswerk 1:2	< 0,05	< 0,05	< 0,2	< 0,2	< 0,05	< 0,05	< 0,2

IV - 5.2 Mineralölkohlenwasserstoffe (MKW), Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und Phenolindex

Zur Bestimmung der MKW wurden sowohl die Eluate als auch die Glasflaschen mit Trichlortrifluorethan extrahiert, um an der Gefäßwand sorbierte Substanz zu erfassen. Die vereinigten Extrakte wurden am Rotationsverdampfer eingeeengt und in Anlehnung an DIN 38 409 H18 nach Aluminiumoxid clean-up mittels FT-IR gemessen. Um eine möglichst hohe Empfindlichkeit zu erzielen wurden Küvetten mit einer Schichtdicke von 5 cm verwendet.

Zur PAK-Bestimmung wurden die Eluate sowie die Glasflaschen mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten Extrakte am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Proben wurden anschließend mittels GC-MS bestimmt.

Die Bestimmung des Phenolindex erfolgte gemäß DIN 38 409 H16-3 nur an ausgewählten Proben, in denen aufgrund ihrer Kontamination mit Phenolen gerechnet werden musste.

Tabelle IV - 9: MKW, PAK und Phenolindex im wässrigen Bodeneluat

Boden	MKW [mg/l]	Σ_{16} PAK [$\mu\text{g/l}$]	Phenolindex [mg/l]
Hintergrund	0,3	0,5 ¹⁾	n.B.
Sickergraben	0,2	7,0 ¹⁾	n.B.
IMA SM 66	0,2	0,5 ¹⁾	n.B.
IMA 927 B	0,2	0,8 ¹⁾	n.B.
PAK-Mix	0,6	475,0 ¹⁾	0,58
Neuohe	0,6	0,9 ¹⁾	n.B.
Iserlohn	< 0,2	4,9	n.B.
Landhausen	0,5	n.B.	0,34
Gaswerk 1:2	< 0,2	1106,5	0,13

¹⁾ Summe der 16 EPA-PAK ohne Naphthalin, Acenaphthen und Fluoren

n.B. nicht Bestimmt

IV - 5.3 Nitrotoluole

Zur Bestimmung der Nitrotoluole wurde der wässrige Extrakt direkt in die HPLC eingespritzt. Die Böden "Iserlohn, Landhausen und Gaswerk 1:2 wurden nicht untersucht, da eine Kontamination nicht zu erwarten war.

Tabelle IV - 10: Nitrotoluole im wässrigen Eluat, Angaben in [mg/l]

	IMA SM 66	IMA 927 B	Sickergraben	Neuohe	Hintergrund	PAK-Mix
2,4,6-Trinitrotoluol	0,23	0,77	110,02	1,20	0,51	kein TNT oder Metabolite nachweisbar
4-Amino-2,6-Dinitrotoluol	0,06	0,03	5,22	< Bg	0,02	
2-Amino-4,6-Dinitrotoluol	0,07	0,02	5,80	< Bg	0,02	
1,3,5-Trinitrobenzol	< Bg	< Bg	0,03	< Bg	< Bg	
1,3-Dinitrobenzol	< Bg	< Bg	0,07	< Bg	< Bg	
2,4-Dinitrotoluol	< Bg	< Bg	0,12	< Bg	< Bg	

IV - 5.4 pH, gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) und Anionen

Der DOC wurde mit einem SHIMADZU TOC 5050 Analyzer bestimmt. Je Eluat wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Der pH wurde mit einer Elektrode (Mettler-Toledo, InLab 410, pH Einstabmesskette mit Flüssigelektrolyt) bestimmt.

Die Anionen wurden mittels Ionenchromatographie quantifiziert.

Tabelle IV - 11: pH, DOC und Anionen im wässrigen Eluat

Boden	DOC [mg/l]	pH	Chlorid [mg/l]	Nitrat [mg/l]	Sulfat [mg/l]
Hintergrund	32,7	6,5	1,84	38,58	3,77
Sickergraben	189,3	6,3	0,88	4,84	4,06
IMA SM 66	43,0	8,2	4,11	15,45	170
IMA 927 B	11,7	8,1	1618	871	13268
PAK-Mix	277,4	8,0	4,42	583	12872
Neuohe	11,6	8,2	1,14	8,09	nicht nachweisbar
Iserlohn	211,1	7,5	17,76	0,8	nicht nachweisbar
Landhausen	391,0	7,7	1433	0,6	17604
Gaswerk 1:2	86,0	5,6	2,04	27,48	3,91

IV - 6 Zusammenfassung

Aus einer Anzahl von 25 verschiedenen Böden wurden auf der Grundlage von Vorversuchen, chemischen Analysen und Zusatzinformationen von den Grundstückseignern/Sanierungsunternehmen in Absprache mit den Teilprojektleitern 9 Böden plus ein Standardboden für die Durchführung des Verbundvorhabens ausgewählt. Alle Böden wurden vom IUCT beprobt, aufbereitet und an die Teilprojekte verteilt. Zur bodenkundlichen Charakterisierung wurden Teilproben an die Lufa Speyer verschickt. Die chemischen Analysen hinsichtlich Schadstoffen wurden am IUCT durchgeführt. Es wurden dabei in allen Böden die Hauptkontaminanten bestimmt sowie einige weitere Parameter. Ebenso wurden von allen Böden wässrige Eluate hergestellt und auf gelöste Schadstoffe untersucht.

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt allen Sanierungsunternehmen und Behörden, die das IUCT bei der Suche nach geeigneten Testböden unterstützt haben:

Avacon AG, Nienburg

Firma Rheinmetall, Unterlüß

IMA Sanierungszentrum GmbH Zeppelinheim

Landesentwicklungsgesellschaft Dortmund

Landesumweltamt Essen

Lobbe Xenex GmbH

Stadtwerke Düsseldorf AG

Trischler & Partner GmbH, Darmstadt

Umweltamt Kreis Celle

Umweltamt Kreis Olpe

Umweltamt Kreis Siegen-Wittgenstein

Umweltamt Schwalm-Eder Kreis

Umweltschutz Nord GmbH

Umweltschutz Ruhr GmbH

IV - 7 Literatur

DIN 38 406, Teil 22: Bestimmung der 33 Elemente (...) durch Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

DIN 38 409 H16-3: Bestimmung des Phenol-Index

DIN 38 409 H18: Bestimmung von Kohlenwasserstoffen

DIN 38 414 Teil 7: Aufschluss mit Königswasser zur nachfolgenden Bestimmung des säurelöslichen Anteils von Schwermetallen

Environmental Protection Agency, Part VIII, Vol. 49, No. 209, Method 610, 1984

Kapitel V

Teilvorhaben 3: Bodenfauna: Regenwurm-Vermeidungstest und Nematodentest

Teilprojektleiter

Dr. K. Hund-Rinke
Fraunhofer-Institut für Umweltchemie
und Ökotoxikologie
57392 Schmallenberg

Partner

Dr. J. Römbke, Dr. Th. Moser
ECT Oekotoxikologie GmbH
65439 Flörsheim

Prof. Dr. R. Achazi,
Dipl-Biol. D. Warnecke
FU-Berlin; Biologie – Ökotoxikologie
und Biochemie
14195 Berlin

Technische Assistenz

Ricarda Nöker,
Theo Görtz,
Rainer Peters,
Gisela Host,
Fraunhofer-Institut für Umweltchemie
und Ökotoxikologie
Schmallenberg

Monica Armorim,
Nicole Nielow,
Patrick Sittinger,
ECT Oekotoxikologie GmbH
Flörsheim

Grazyna Chroszcz,
Rosi Auste,
Regine Schäfer,
Gabi Mascialino,
FU Berlin,
Institut für Biologie -
Ökotoxikologie und Biochemie
Berlin

Berichtserstellung

Hans-Joachim Schallnass,
ECT Oekotoxikologie GmbH
Flörsheim

Inhaltsverzeichnis

V - 1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	5
V - 2	STAND VON WISSENSCHAFT UND TECHNIK.....	6
V - 2.1	Regenwurm-Vermeidungstest	6
V - 2.2	Nematodentest mit Panagrellus redivivus	7
V - 3	MATERIAL UND METHODEN.....	9
V - 3.1	Referenzböden	9
V - 3.2	Testböden	9
V - 3.3	Vermeidungstest mit Eisenia fetida	9
V - 3.3.1	Materialien	9
V - 3.3.2	Durchführung	10
V - 3.4	Nematodentest.....	13
V - 3.4.1	Materialien	13
V - 3.4.2	Durchführung	14
V - 3.4.3	Auswertung	17
V - 4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	19
V - 4.1	Regenwurm-Vermeidungstest	19
V - 4.1.1	Streubreite der Ergebnisse	21
V - 4.1.2	Einfluss unterschiedlicher Kontrollböden auf das Verteilungsverhalten der Würmer..	21
V - 4.1.3	Beurteilung der Lebensraumfunktion.....	23
V - 4.1.4	Validitätskriterium.....	27
V - 4.2	Nematodentest.....	28
V - 4.2.1	Absolute Vermehrungsraten	31
V - 4.2.2	Prozentuale Vermehrungsraten.....	32
V - 4.2.3	Beurteilung der Lebensraumfunktion.....	32
V - 4.3	Testsysteme im Vergleich.....	34
V - 4.3.1	Sensitivität.....	38
V - 4.3.2	Variabilität zwischen den Labors	40
V - 5	BEURTEILUNG DER TESTSYSTEME "REGENWURM-VERMEIDUNGSTEST" UND "NEMATODENTEST"	41

V - 5.1	Regenwurm-Vermeidungstest	41
V - 5.2	Nematodentest.....	42
V - 6	GENERELLE SCHLUSSFOLGERUNG	44
V - 6.1	Regenwurm-Vermeidungstest	44
V - 6.2	Nematodentest.....	45
V - 7	LITERATUR	46

V - 1 Einleitung und Zielsetzung

Für die Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden für Bodenorganismen stehen eine Reihe werden derzeit primär die Akut- und Reproduktionstests mit *Eisenia fetida*, *Folsomia candida* und *Enchytraeus albidus* bzw. *crypticus* durchgeführt. Alle drei Testverfahren wurden in dem von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt finanziell unterstützen Ringtest validiert. Nicht bzw. nur ansatzweise berücksichtigt werden derzeit bei der Testung von Bodenproben Nematoden, die aufgrund ihrer verschiedenen Ernährungstypen eine zentrale Stellung im Nahrungsnetz einnehmen. Analog zu den Collembolen und Enchytraeen zählen die Nematoden zur Mesofauna. Während die Collembolen die luftgefüllten Bodenporen besiedeln, leben Enchytraeen und Nematoden im Wasserfilm.

Die Reproduktionstests mit *Folsomia candida* und *Enchytraeus albidus* bzw. *crypticus* dauern 4 – 6 Wochen. Die Testlaufzeit des Reproduktionstests mit *Eisenia fetida* beträgt sogar 8 Wochen. Soll eine Qualitätsendkontrolle eines Bodens stattfinden, kann eine Aussage somit frühestens nach acht Wochen erfolgen, was eine lange Lagerdauer des Bodens und damit einen hohen Zeitverlust bedeutet.

Ziel dieses Teilvorhabens war die Überprüfung von zwei Testsystemen mit Bodenorganismen in einem Laborvergleichstest. Gewählt wurde zum einen ein Verhaltenstest mit *Eisenia fetida* mit dem Testparameter "Vermeidungsverhalten" (Regenwurm-Vermeidungstest), der aufgrund von Voruntersuchungen durch eine hohe Sensitivität bei kurzer Testlaufzeit (48 h) charakterisiert ist. Des Weiteren wurde ein Nematodentest mit *Panagrellus redivivus* untersucht.

Beteiligte Partner waren:

Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie: im Folgenden abgekürzt als FhG bzw. Partner 1

ECT-Ökotoxikologie: im Folgenden abgekürzt als ECT bzw. Partner 2

Freie Universität Berlin, Biologie – Ökotoxikologie und Biochemie: im Folgenden abgekürzt als FU-Berlin bzw. Partner 3

V - 2 Stand von Wissenschaft und Technik

V - 2.1 Regenwurm-Vermeidungstest

Eisenia fetida wird als Testorganismus in der Bodenbeurteilung häufig eingesetzt. Dabei werden in der Regel die standardisierten Testsysteme mit dem Messparameter "Mortalität" (Akut-Test) bzw. "Reproduktion" (DIN ISO 11268-1, -2) angewendet, die ursprünglich für die Substanztestung entwickelt wurden. Im Rahmen des BMBF-Verbundvorhabens "Ökotoxikologische Testbatterien" wurden sowohl der Akuttest als auch der Reproduktionstest auf den Anwendungsbereich Bodenbeurteilung adaptiert (Michels et al., im Druck) und als kombinierter Test in einem durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt finanziell unterstützten Ringtest unter nationaler und internationaler Beteiligung validiert (DBU, 2001). Nachteile der beiden Testsysteme stellen bei dem Akut-Test die geringe Empfindlichkeit sowie bei dem Reproduktionstest die lange Testdauer (56 d) gekoppelt mit einem hohen Arbeitsaufwand bei der Ermittlung der Nachkommenanzahl dar. Wünschenswert ist es, Ergebnisse innerhalb eines kurzen Testzeitraums auf einer hohen Sensitivitätsstufe zu erhalten. So bedingen Testdauer sowie Arbeitsaufwand die Kosten eines Tests. Für eine routinemäßige Anwendung eines Tests empfiehlt sich daher die Kopplung von hoher Sensitivität und kurzer Testlaufzeit. Hierfür bietet sich ein bisher noch nicht standardisierter Verhaltenstest mit *Eisenia fetida* mit dem Testparameter "Vermeidung" an. Das Prinzip beruht darauf, dass den Würmern gleichzeitig die zu beurteilende Bodenprobe sowie ein Kontrollboden angeboten werden und nach einer Versuchszeit von wenigen Tagen der Aufenthaltsort der Tiere bestimmt wird.

Auf der Basis der Untersuchungen von Yeardley et al. (1996), Slimak (1997), Stephenson et al. (1998) sowie Hund-Rinke und Wiechering (2000) lassen sich im Hinblick auf Durchführung und Eignung eines Verhaltenstests zur Chemikalien- bzw. Bodenbeurteilung folgende Schlussfolgerungen ziehen (Hund-Rinke et al., 2000):

- Einfaches Testdesign
- Kurze Testzeit mit geringem Arbeitsaufwand im Vergleich zu den etablierten Testverfahren
- Hohe Sensitivität im Hinblick auf die Beurteilung von Chemikalien bzw. kontaminierten Böden
- Zusatzinformationen zu den etablierten Testverfahren im Hinblick auf Repellent-Wirkungen

- Einfluss von chemisch-physikalischen Bodeneigenschaften auf das Wanderungsverhalten der Regenwürmer bei der Testung von zu beurteilenden Böden gegen unbelastete Referenzböden einschätzbar
- Kriterium zur Beurteilung der Lebensraumfunktion von Testböden: bei > 80 % Vermeidung des Testbodens durch die Organismen Beurteilung als "Lebensraumfunktion eingeschränkt".

V - 2.2 Nematodentest mit *Panagrellus redivivus*

Boden-Nematoden zählen je nach ihrer Größe zu der Mikro- bzw. Mesofauna und sind mit Abundanzen bis zu 1000 Tieren pro Gramm Boden nach den Protozoen die häufigsten Bodentiere (Gisi et al., 1997). Sie sind ubiquitär verbreitet. Innerhalb der Nematoden können freilebende von parasitierenden Arten unterschieden werden, wobei die freilebenden Spezies wiederum in sieben trophische Gruppen (mycophage, bacteriophage, pantophage, phyco-phage, phytophage, Substratfresser und Predatoren) zu gliedern sind (Yeates et al. 1993). Durch diese unterschiedlichen Nahrungsgrundlagen nehmen sie eine zentrale Stellung im Nahrungsnetz des Bodens ein.

Bislang gibt es keinen standardisierten Nematodentest, doch sind in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben. Hauptunterscheidungsmerkmale stellen dabei die verwendete Nematodenart, die Anzahl der eingesetzten Tiere, die Endpunkte, Testdauer sowie das verwendete Testsubstrat dar. In Tabelle V - 1 sind exemplarisch verschiedene Tests mit Kurzcharakterisierung zur Verdeutlichung der Unterschiede aufgeführt. Nur in zwei Verfahren wird explizit natürlicher Boden verwendet. Dabei wird bei Wilms (1992) ein Boden/Sandgemisch und bei Niemann und Debus (1996) ein Boden/Agar-Gemisch eingesetzt. Für das vorliegende Projekt wurde das Verfahren von Niemann und Debus (1996) zu Grunde gelegt. Modifikationen sollten eine realistischere Abbildung der Lebensraumfunktion von Böden gewährleisten. So wurde die Anzahl der eingesetzten Nematoden reduziert und nur mit Boden an Stelle des Boden/Nährstoffgemisches gearbeitet.

Tabelle V - 1: Kurzcharakterisierung verschiedener Nematodentests

	Akut-Test		Akut-Test und Chronischer Test	Chronischer Test	Subletaler Test	
Literaturzitat	Donkin & Dusenberry (1993)	Samoiloff et al. (1980)	Wilms (1992)	Niemann & Debus (1996)	Kammenga et al. (1996)	Kammenga & Riksen (1998)
Testorganismus	<i>Caenorhabditis elegans</i> (bacteriophag)	<i>Panagrellus redivivus</i> (bacteriophag)	<i>Seinura tennicauda</i> (mycophag); <i>Monobutlerius degrissei</i> (bacteriophag); <i>Panagrellus redivivus</i> (bacteriophag)	<i>Panagrellus redivivus</i> (bacteriophag)	<i>Plectus acuminatus</i> (bacteriophag)	<i>Plectus acuminatus</i> (bacteriophag) und <i>Heterocephalobus pauciannulatus</i> (bacteriophag)
Testparameter	Mortalität	Mortalität	Mortalität; Reproduktionsrate	Reproduktionsrate	Verhältnis von Juvenilen u. Adulten	Verhältnis der beiden Arten
Anzahl von Testorganismen pro Testansatz	20	2 ml Kulturlösung (genaue Anzahl unbekannt)	Akut-Test: 1000 Chronischer Test: keine Angaben	50.000	100 Weibchen	50 <i>P. acuminatus</i> + 10 <i>H. pauciannulatus</i>
Testgefäß	Petrischale: 60 * 15 mm		Akut-Test: Petrischale: Ø 5 cm Chronischer Test: Ø 8 cm	Petrischale: Ø 5 cm	Petrischale: Ø 6 cm	Petrischale: Ø 3 cm
Testsubstrat	Bodenlösung mit Zusatz von Mineralsalzlösung	Flüssigkultur	Akut-Test: Flüssigkultur Chron. Test: Boden/Sandgemisch	Boden + Nähragar (Verhältnis 2 : 1)	Kunstaboden (ISO 11268-1, -2)	Kunstaboden (ISO 11268-1, -2)
Substratmenge pro Testansatz	7 g Sand + 3 ml Testlösung		Akut-Test: 3 ml Chron. Test: 150 g	6 – 7 ml	5 g TM	
Testdauer	24 h	4 d	Akut-Test: 24 h Chron.-Test: 28 d	7 d	21 d	14 d

V - 3 Material und Methoden

V - 3.1 Referenzböden

Für die Untersuchungen wurden drei Referenzböden (Kontrollböden) verwendet. Die physiko-chemischen Eigenschaften sind aus Tabelle V - 2 ersichtlich. Mit Ausnahme des organischen Kohlenstoffgehaltes des LUFA 2.2-Bodens entsprechen sie den Vorgaben des Bodens aus der Richtlinie ISO 11269-2. In der Richtlinie wird ein Corg-Gehalt von maximal 1,5 % festgeschrieben, wohingegen der LUFA-Boden einen Gehalt von 2,2 aufweist.

Tabelle V - 2: Physiko-chemische Eigenschaften der Kontrollböden

Parameter	LUFA 2.2	Borstel	Thyrow
Bodenart	Lehmiger Sand	Schluffiger Sand	Schluffiger Sand
Siebschnitt	≤ 2 mm	≤ 2 mm	≤ 2 mm
TOC [%]	2,19 ± 0,08	0,93	0,53
pH-Wert	5,8	5,9	7,0
WHK _{max} [g/100 g TM]	50 ± 4	27	25

V - 3.2 Testböden

Als Testböden wurden von der Koordination acht Böden zur Verfügung gestellt. Drei der acht Böden (Landhausen, Iserlohn und Gaswerk 1:2) waren bereits in dem Ringtest eingesetzt worden. Die nähere Charakterisierung der Böden ist in dem Kapitel IV zur Bodencharakterisierung aufgeführt.

V - 3.3 Vermeidungstest mit *Eisenia fetida*

V - 3.3.1 Materialien

- Gefäße: Oberfläche ca. 200 cm² (Bellaplast- bzw. Glasschale)
- Trennscheibe für die Mitte
- Luftdurchlässige Abdeckung für die Testgefäße (z. B.: Gaze)
- Ggfs. Alufolie zum Umwickeln der Testgefäße (Schutz gegen seitlichen Lichteinfall)

- Testboden
- Kontrollboden
- Adulte Tiere von *Eisenia fetida* (synchronisierte Laborzucht des jeweiligen Partners)

V - 3.3.2 Durchführung

Versuchsvorbereitung:

Pro Testboden wurde eine Verdünnungsreihe mit Kontrollboden angesetzt (Verdünnungsstufen bezogen auf Trockengewicht).

Die Böden bzw. Mischungen wurden auf 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt. Hierfür wurden die 100 %-Werte für die Testböden, die Referenzböden LUFA 2.2 und Borstel sowie die Bodenmischungen mit diesen beiden Referenzböden von Partner 1 ermittelt. Für jede Mischung wurde die maximale Wasserhaltekapazität separat bestimmt. Da der Boden Thyrow von Partner 3 besorgt und nur von ihm verwendet wurde, ermittelte er hierfür die Werte selbst. Nach der Einstellung lagerten die Böden bzw. Bodenmischungen für mindestens 24 h bei Raumtemperatur.

Testansatz:

Jedes gegen seitlichen Lichteinfall geschützte Testgefäß (z. B. durch Umwicklung mit Alufolie) wurde in der Mitte senkrecht durch eine Trennscheibe in zwei identische Hälften geteilt. In eine Gefäßhälfte wurde der Testboden, in die andere Gefäßhälfte der Kontrollboden gefüllt. Die Füllhöhe betrug ca. 5 cm, woraus sich eine Bodenmenge pro Schalenhälfte von ca. 600 g FM ergab. Unterschieden sich die Böden stark in ihrem spezifischen Gewicht, wurde der Schwerpunkt auf eine einheitliche Höhe beider Böden in dem Versuchsgefäß gelegt. Nach dem Einfüllen der Böden wurde die Trennscheibe entfernt und auf die Grenzlinie, an der die beiden Böden zusammenstießen, wurden zehn Würmer gelegt. Die Würmer hatten ein Clitellum sowie ein Gewicht zwischen 200 und 600 mg.

Abbildung V - 1 gibt exemplarisch einen Testansatz wieder. Jede Konzentration wurde in fünf Parallelen getestet. Die Gefäße wurden luftdurchlässig verschlossen, wobei jedoch ein Entweichen der Würmer zu verhindern war. Die Inkubation erfolgte bei 20 ± 2 °C für 48 h und einem Hell/Dunkel-Rhythmus (ca. 800 lux) von 16 / 8-Stunden (FhG und ECT) bzw. 12 / 12-Stunden (FU-Berlin).

Am Ende der Inkubationszeit wurde der Boden an der Grenzlinie durch die Trennscheibe getrennt und in jeder Hälfte die Anzahl an Würmern ermittelt. Tote Würmer wurden als aus dem Testboden geflüchtet gewertet.

Auswertung:

Pro Konzentrationsstufe wurden aus den Ergebnissen (Würmer im Testboden) der Mittelwert (in Prozent) und die Standardabweichung ermittelt. Validitätskriterien konnten im Vorfeld noch nicht festgelegt werden.

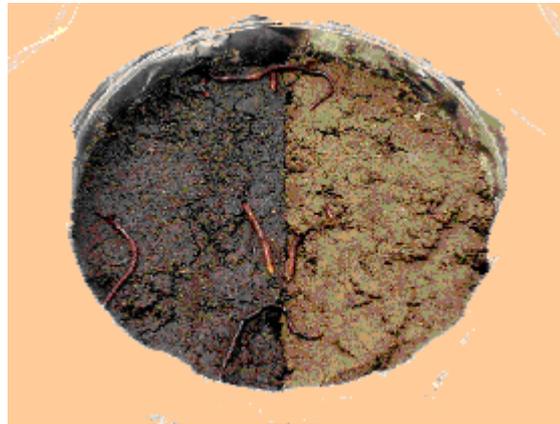


Abbildung V - 1: Testansatz im Regenwurm-Vermeidungstest unmittelbar nach Zugabe der Würmer (rechts Kontrollboden, links Testboden)

Tabelle V - 3: Durchgeführte Testansätze

Untersuchungsblock I - Aussage:				
1. Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den Labors				
2. Empfindlichkeit gegenüber den anderen terrestrischen Tests aus dem Ringtest				
3. Ermittlung / Validierung eines Effektschwellenwertes				
Boden	Ansatz [% Testboden]	Partner 1 (FhG)	Partner 2 (ECT)	Partner 3 (FU-Berlin)
Landhausen	25 / 10 / 1 %	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2
Iserlohn	25 / 10 / 1 %	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2
Gaswerk 1:2	100 / 50 / 10 %	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2

Tabelle V - 3: Durchgeführte Testansätze (Fortsetzung)

Untersuchungsblock II - Aussage:				
1. Sensitivität für sanierte Böden				
2. Ermittlung / Validierung eines Effektschwellenwertes				
3. Einfluss des Referenzbodens				
Boden	Ansatz [% Testboden]	Partner 1 (FhG)	Partner 2 (ECT)	Partner 3 (FU-Berlin)
IMA SM 66	100 / 50 / 25 %	Verdünnungs- und Referenzboden: Borstel	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2	Verdünnungs- und Referenzboden: Thyrow
IMA 927 B	100 / 50 / 25 %	Verdünnungs- und Referenzboden: Borstel	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2	Verdünnungs- und Referenzboden: Thyrow
Untersuchungsblock III – Aussage:				
1. Ermittlung / Validierung von Schwellenwert				
2. Referenzboden				
Boden	Ansatz [% Testboden]	Partner 1 (FhG)	Partner 2 (ECT)	Partner 3 (FU-Berlin)
PAK-Mix	10 / 1 %	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2
Sickergraben	10 / 1 %	Verdünnungs- und Referenzboden: Borstel	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2	Verdünnungs- und Referenzboden: Thyrow
Neuenohe	50 / 10 / 1 %	Verdünnungs- und Referenzboden: Borstel	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2	Verdünnungs- und Referenzboden: Thyrow
Untersuchungsblock IV:				
Untersuchung der Referenzsubstanz "Benomyl"				
Boden	Ansatz [% Testboden]	Partner 1 (FhG)	Partner 2 (ECT)	Partner 3 (FU-Berlin)
LUFA 2.2	100 / 10 / 1 mg/kg	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2 Zugabe von Referenzsubstanz als Reinsubstanz	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2 Zugabe von Referenzsubstanz als Formulierung (BENLATE)	Verdünnungs- und Referenzboden: LUFA 2.2 Zugabe von Referenzsubstanz als Reinsubstanz

V - 3.4 Nematodentest

V - 3.4.1 Materialien

- Nematodenkultur (*Panagrellus redivivus*)
- 150 g FG Bodenprobe
- gereinigte 250 ml PE-Flaschen (2 x mit unvergälltem Ethanol 70 % gespült)
- Petrischalen (Ø 5,5 cm)
- Parafilm
- Formalinlösung (FhG, ECT) bzw. Ethanol/Spülmittelgemisch (FU-Berlin), (jeweils 4 %)
- Milumil I (Erstlingsnahrung; nach Öffnen nur ca. 6 Wochen verwendbar)
- Brutschrank (21 ± 2°C, dunkel)
- Inversmikroskop
- Waage
- Schüttler
- Baermantrichter (je Bodenprobe sind drei Trichter erforderlich):

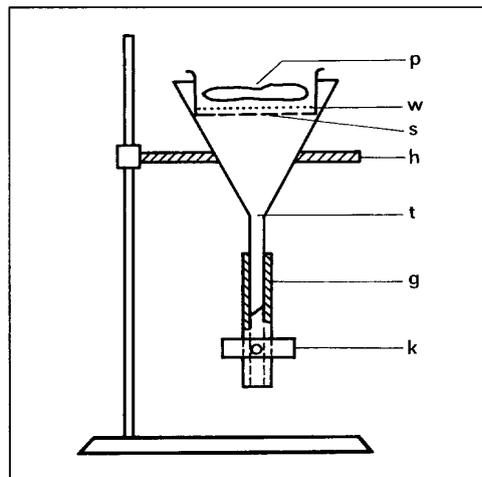


Abbildung V - 2: Modifizierter Baermann-Trichter
 t = Trichter (Ø 15 cm), s = Siebeinsatz (Ø 11 cm, Maschenweite 250 µm, Höhe ca. 4 cm), w = Milchfilterscheiben (Bezugsquelle: Paul Hartmann AG, Heidenheim / Brenz), g = Silikonschlauch, k = Schlauchklemme, p = Testsubstrat, h = Stativ für Trichter

- Extraktionslösung
 70 g NaCl
 10 g Na₂HPO₄ * 2 H₂O
 40 g KH₂PO₄
 12 g MgSO₄ * 7 H₂O

im Mörser mischen und im Exsikkator trocken lagern.

2,8 - 3,0 g dieses Salzgemisches in einem Liter deionisiertem Wasser lösen, bis die Leitfähigkeit mind. 3 mS/cm beträgt.

V - 3.4.2 Durchführung

Nematodenzucht

Herstellung von Milumilagarplatten: 24 g Milumil + 8 g Agar wurden mit 1000 ml deionisiertem Wasser aufgefüllt und kurz aufgeköcht. Anschließend wurden Petrischalen (\varnothing 12,5 mm) mit heißem Nähragar gefüllt (ca. 5 mm Schichtdicke) und die geschlossene Schale bei Raumtemperatur abgekühlt.

Milumil wurde nach Gebrauch im Gefrierschrank aufbewahrt, wobei die Packung maximal sechs Wochen nach Öffnen zur Nematoden-Anzucht geeignet ist.

Periodisch wurden die Nematoden auf neues Nährsubstrat überführt. Dazu wurde ein Viertel einer mit Nematoden besetzten Schale mit einem sterilen Spatel auf ein frisches Nährsubstrat übertragen, wobei die Oberseiten aufeinander gelegt wurden. Ein Berühren des Petrischalendeckels der neuen Schale durch das alte Substrat ist unbedingt zu vermeiden.

Die Petrischalen wurden bei 21 ± 2 °C und Dunkelheit (maximal sieben Tage, zu Testzwecken) oder bei 12 ± 2 °C (maximal vier Wochen zu Reservezwecken) gelagert.

Versuchsvorbereitung

- Abtöten der originären Nematodenfauna in den Testböden durch Behandlung mit flüssigem Stickstoff:
130 g (Frischmasse) der gesiebten Bodenprobe (≤ 2 mm) wurden in eine 250 ml PE-Flasche eingewogen und mit flüssigem Stickstoff überdeckt. Nach dem Abdampfen des N_2 wurde das Gefäß verschlossen und kräftig geschüttelt. Die Bodenprobe wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und nach ca. drei und sechs Tagen die Prozedur wiederholt. An 30 g des Substrates aus den PE Flaschen wurde der Wassergehalt bestimmt, wobei die Flaschen während der Bestimmung verschlossen im Kühlschrank gelagert wurden.
- Extraktion der Nematoden aus einer fünf – sieben Tage alten Vorkultur:
Entsprechend der obigen Abbildung V - 2 wurde ein Baermanntrichter aufgebaut. Der Trichter wurde bis zur Unterkante des Siebes mit Extraktionslösung gefüllt und der Inhalt einer Kulturschale mit der Oberseite nach unten auf den Wattefilter gelegt. Die Extraktion fand bei Raumtemperatur statt. Extraktionslösung wurde zugegeben,

bis die Milchfilterscheibe vollständig bedeckt war. Nach 3 h wurde der Überstand bis auf ca. 15 ml abgenommen und die Nematoden anschließend durch vorsichtiges Öffnen der Klemme in ein Becherglas abgelassen. Unter dem Mikroskop wurde in einem Aliquot (ca. 100 µl) die Nematodenanzahl bestimmt und die Anzahl pro ml berechnet.

- Herstellung der Milumillösung

(Vorgabe: 0,07 g Milumil pro Platte bei 9 g FM Einwaage).

Die erforderliche Milumilmenge wurde in dem Puffervolumen gelöst, das benötigt wurde, um den Boden auf 110 % von WHC_{max} einzustellen, abzüglich des Volumens, in dem sich 25.000 Nematoden pro Platte befanden (ca. 1 ml).

Testansatz

Jede Bodenprobe war in drei Parallelen zu testen. Nach der Zugabe des berechneten Volumens Milumillösung wurde die Probe für 1 h auf einem Überkopfschüttler homogenisiert, im Anschluss daran wurden jeweils 9 g der wassergesättigten Bodenprobe in drei Petrischalen ausgegossen. Die gefüllten Petrischalen wurden vorsichtig geschüttelt bis eine glatte Oberfläche entstand und pro Platte Nematodenkultur (25.000 Tiere in max. 1 ml Gesamtvolumen) zugegeben. Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur für ca. 1 h offen unter einer Sterilbank gelagert, bis kein Wasser mehr auf der Oberfläche stand. Im Anschluss daran wurden die Schalen mit Deckeln verschlossen und für sieben Tage im Brutschrank bei 21 ± 1 °C inkubiert. Bei Anzeichen von Austrocknung wurden ca. 0,5 ml Puffer zugegeben.

Testbeendigung

Nach Ablauf der Inkubationszeit (Abbildung V - 3) wurden die Nematoden aus dem Testsubstrat analog der Gewinnung aus der Vorkultur extrahiert, wobei die Extraktionszeit jedoch 16–18 h betrug. Der Boden der Parallelen wurde einzeln extrahiert. Im Anschluss daran wurde das Sieb entnommen, die Extraktionsflüssigkeit bis auf ca. 15 ml abgesaugt sowie die Nematodensuspension, die auch Bodenpartikel enthielt, abgelassen und deren Volumen bestimmt. Nach dem Resuspendieren der Nematodensuspension durch Schütteln wurde ein Aliquot (ca. 3 ml) mit Formalinlösung (4 %) im Verhältnis 1 : 2 fixiert und wiederum in einem Aliquot die Nematodenanzahl durch drei Parallelzählungen ermittelt.



Abbildung V - 3: Versuchsaufbau zur Extraktion der Nematoden aus den Bodenproben

Ablaufschema

1. Bestimmung der Wasserhaltekapazität des Substrates
2. Abtöten der originären Nematodenfauna (Ausfrieren)
3. Bestimmung des Wassergehaltes im Testsubstrat
4. Extraktion der Nematoden aus der Vorkultur, Bestimmung der extrahierten Nematodenzahl und Berechnung von W_{Diff}
5. Einstellen von 110 % WHK und Zugabe von Milumil zum Testsubstrat
6. Ausgießen des Testsubstrates in Petrischalen
7. Zufügen der definierten Nematodenzahl
8. Inkubation
9. Extraktion der Nematoden aus dem Testsubstrat
10. Auszählen der extrahierten Nematoden
11. Berechnung des Vermehrungsfaktors

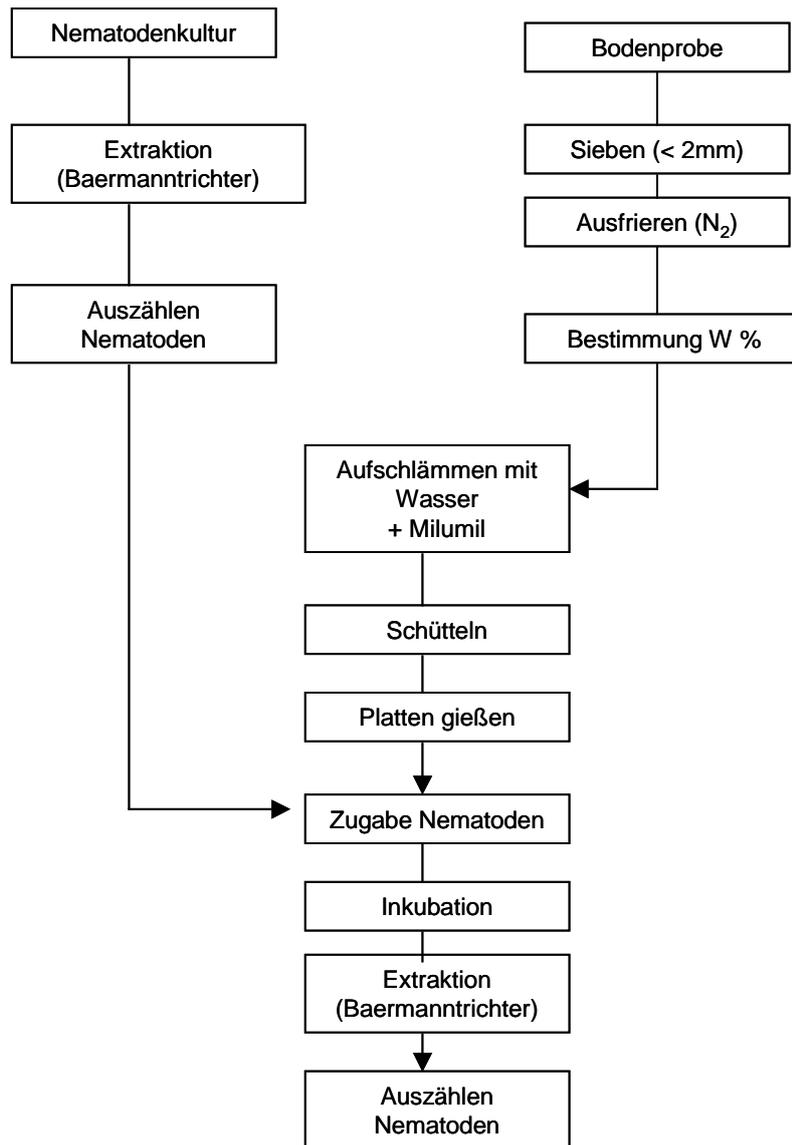


Abbildung V - 4: Ablaufschema

V - 3.4.3 Auswertung

Die berechneten Vermehrungsfaktoren der Parallelen einer Bodenprobe wurden gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

Als Validitätskriterium sollte in den Kontrollen eine Vermehrungsrate ≥ 2 erreicht werden. Es zeigte sich jedoch, dass dieses Kriterium bei einer Reihe von Versuchsansätzen nicht eingehalten werden konnte. Um nicht zu viele Daten eliminieren zu müssen, wurde dieser Parameter nicht angewandt. Validitätskriterien für den Test lagen somit nicht vor.

Testansätze

Aufgrund der Schwierigkeiten, die bei der Testdurchführung auftraten, wurde auf die geplante Variation im Hinblick auf eine C-Quelle, die einen stärkeren Bodenbezug aufweist als Milumil und den Verdünnungs- bzw. Referenzboden verzichtet. Als C-Quelle wurde immer Milumil (Erstlingsnahrung) und als Referenzboden LUFA 2.2 verwendet. Somit führten immer alle Partner identische Versuchsansätze durch.

Folgende Konzentrationen an Testboden in den Verdünnungsreihen wurden zusätzlich zu den Ansätzen mit 100 % Referenzboden gewählt:

- Landhausen: 100 %, 50 %, 10 %
- Iserlohn: 100 %, 50 %, 10 %
- Gaswerk 1:2: 100 %, 50 %, 10 %
- IMA SM 66: 100 %
- IMA 927 B: 100 %
- PAK-Mix: 50 %, 10 %
- Sickergraben: 10 %, 1 %
- Neuenohe: 50 %

V - 4 Ergebnisse und Diskussion

V - 4.1 Regenwurm-Vermeidungstest

In Abbildung V - 5 bis Abbildung V - 9 sind die Ergebnisse der Vermeidungstests mit *Eisenia fetida* dargestellt.

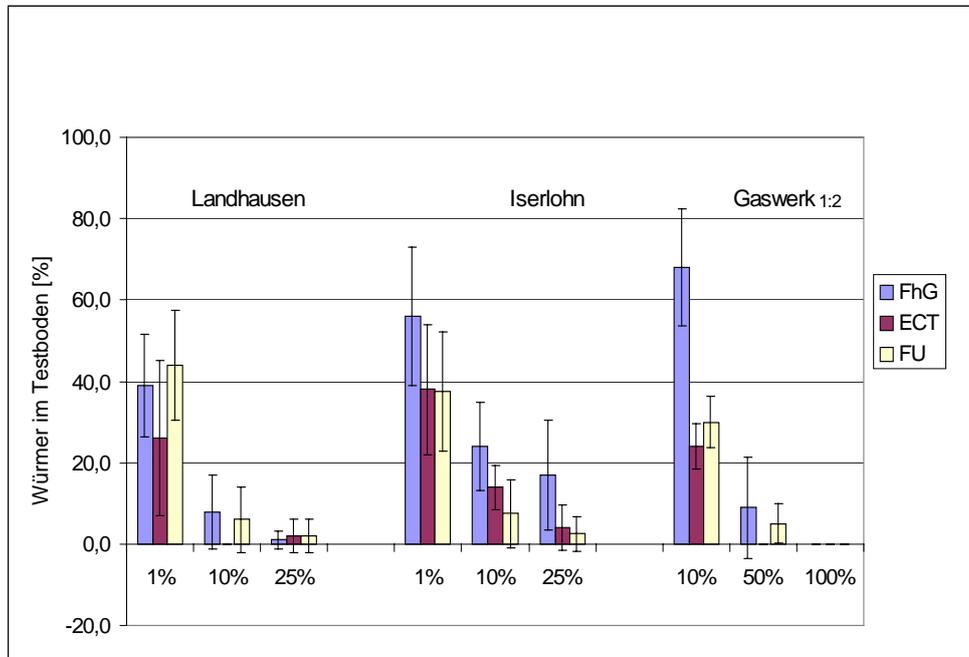


Abbildung V - 5: Prozentualer Anteil von *Eisenia fetida* im Testboden bei den Ansätzen mit den Böden Landhausen, Iserlohn und Gaswerk 1:2 (Referenzboden: LUFA 2.2)

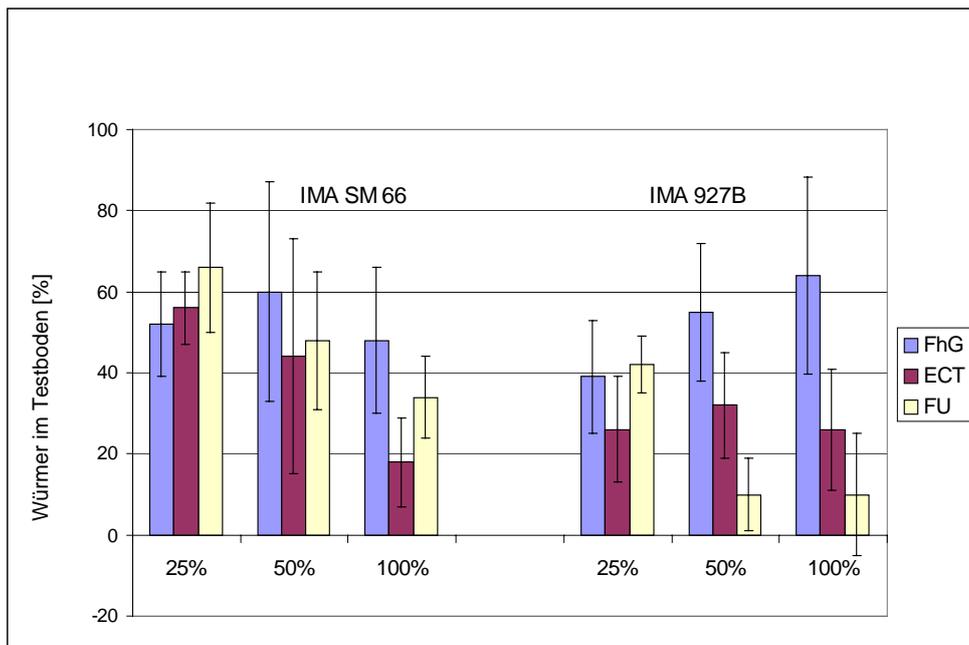


Abbildung V - 6: Prozentualer Anteil von *Eisenia fetida* im Testboden bei den Ansätzen mit den sanierten Böden IMA 66 SM und IMA 927 B (Referenzböden: FhG: Borstel; ECT: LUFA 2.2; FU Berlin: Thyrow)

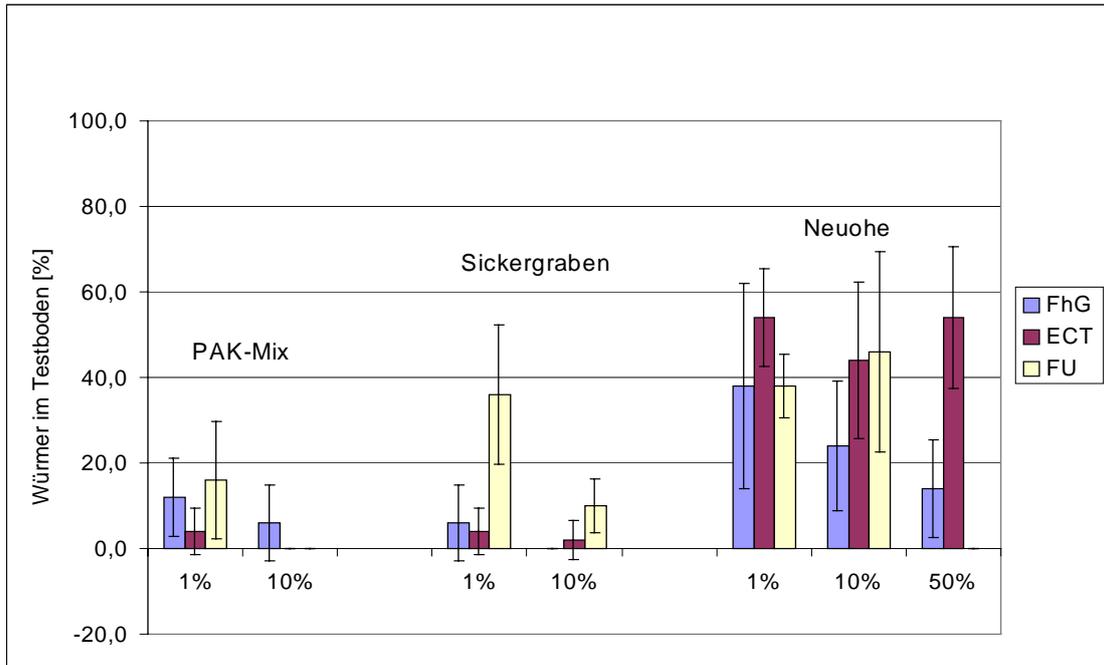


Abbildung V - 7: Prozentualer Anteil von *Eisenia fetida* im Testboden bei den Ansätzen mit den Böden PAK-Mix, Sickergraben, Neuöhe (Referenzböden: PAK-Mix: LUFA 2.2; Sickergraben, Neuöhe: FhG: Borstel; ECT: LUFA 2.2; FU Berlin: Thyrow)

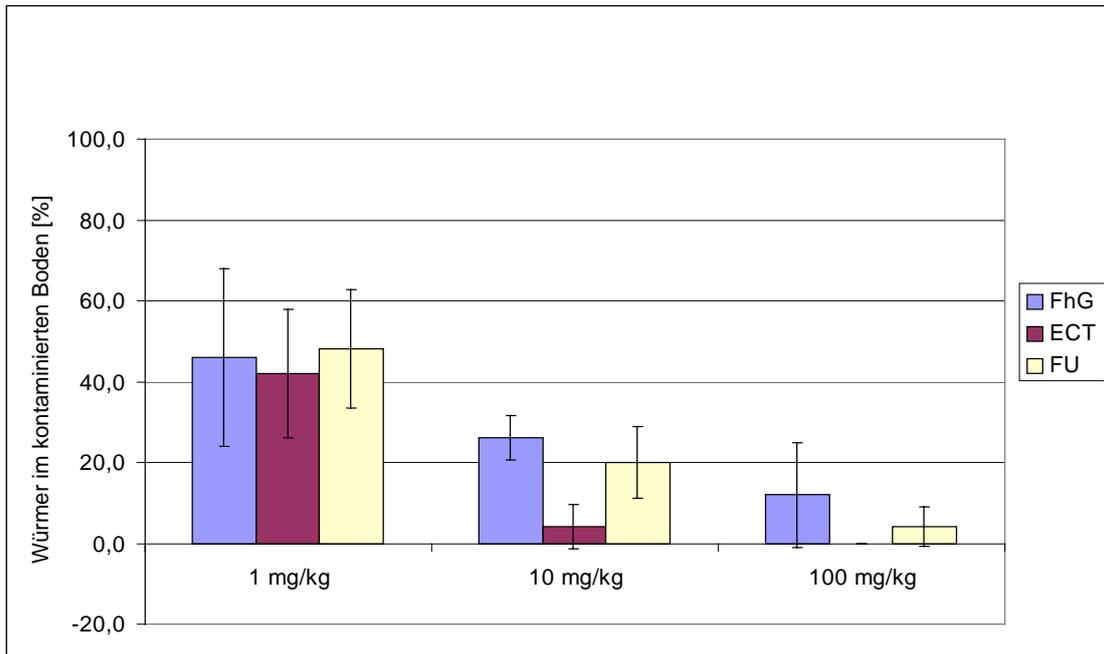


Abbildung V - 8: Prozentualer Anteil von *Eisenia fetida* im Testboden bei den Ansätzen mit der Referenzsubstanz Benomyl (Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie, FU-Berlin: Reinsubstanz; ECT: Formulierung; Referenzboden: LUFA 2.2)

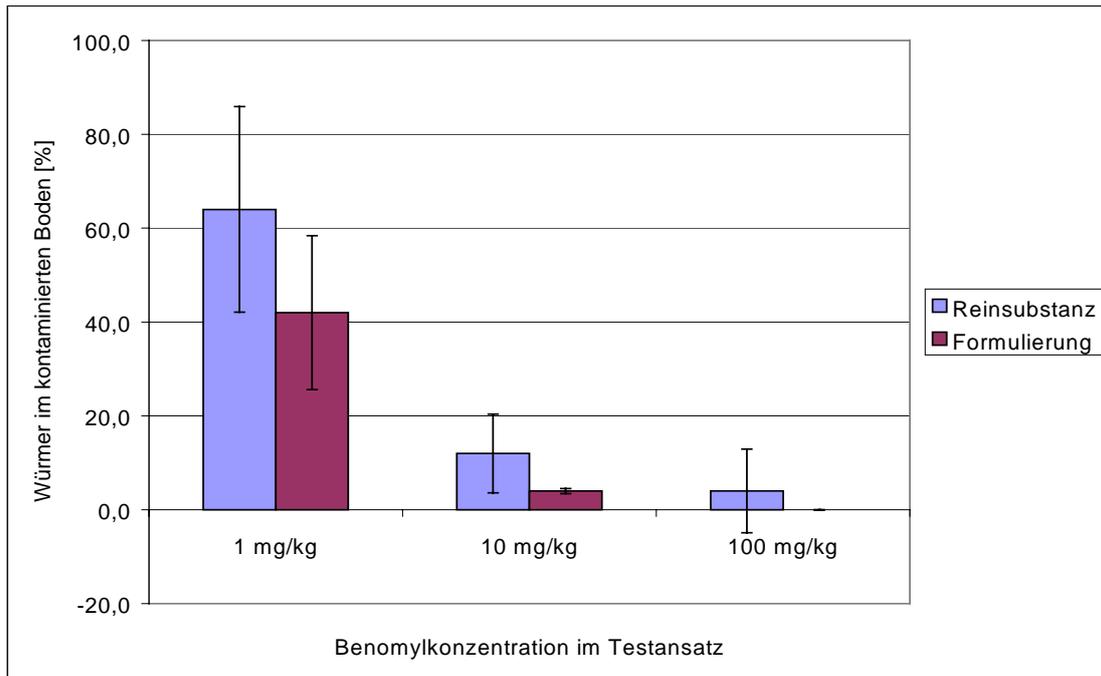


Abbildung V - 9: Prozentualer Anteil von *Eisenia fetida* im Testboden bei den Ansätzen mit der Referenzsubstanz Benomyl als Reinsubstanz bzw. Formulierung (Referenzboden: LUFA 2.2)

V - 4.1.1 Streubreite der Ergebnisse

Bei den Testansätzen ergaben sich teilweise hohe Standardabweichungen. Befanden sich 20 – 80 % der Würmer im Testboden, betragen die Variationskoeffizienten zwischen 16 und 73 %. Bei geringeren Anzahlen von Würmern im Testboden konnten noch höhere Abweichungen auftreten, da sich bei einer niedrigen Gesamtanzahl an Würmern im Testboden bereits ein Wurm mehr oder weniger prozentual stärker auswirkt.

Von der FU-Berlin wurden zusätzlich Ansätze durchgeführt, die in beiden Schalenhälften den gleichen, unkontaminierten Boden enthielten. Dabei wurden bei der Verteilung der Würmer Variationskoeffizienten von 12 – 71 % ermittelt (Tabelle V - 5).

V - 4.1.2 Einfluss unterschiedlicher Kontrollböden auf das Verteilungsverhalten der Würmer

Bei den Böden IMA SM 66, IMA 927 B, Sickergraben und Neuohe wurden von den einzelnen Partnern unterschiedliche Referenzböden eingesetzt: Partner 1 (FhG) – Borstel; Partner 2 (ECT) – LUFA 2.2 und Partner 3 (FU-Berlin) – Thyrow. Bei allen drei Böden handelte es sich um Sandböden. Diese Bodenart war gewählt worden, um bei den Verdünnungsreihen Unterschiede im Verteilungsverhalten der Organismen aufgrund einer verstärkten Sorption der Schadstoffe und damit einer geringeren Bioverfügbarkeit bei bindigeren Referenzböden auszuschließen. Eine niedrigere Vermeidungstendenz als Folge einer geringeren Bioverfügbar-

keit der Schadstoffe bei bindigeren Böden wurde in früheren Versuchen gezeigt (Hund-Rinke & Wiechering, 2000). Die drei Böden unterschieden sich im Gehalt an organischem Kohlenstoff (0,53 – 2,19 %), im pH-Wert (2,8 – 7,0) sowie in der maximalen Wasserhaltekapazität (25 – 50 g/100 g TM), wobei alle Werte in für Deutschland charakteristischen Bereichen lagen (Römbke et al., 2000). Extremwerte wie beispielsweise besonders niedriger oder hoher pH-Wert wurden nicht einbezogen, um eine hohe Relevanz für die reale Freilandsituation zu erhalten.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist in Ansätze zu differenzieren, bei denen 100 % Testboden untersucht wurde sowie in Ansätze, bei denen eine Bodenmischung vorlag. So kann ein stärkeres Vermeidungsverhalten im Fall von 100 % Testboden bei einem Partner auf eine stärkere Attraktivität des Kontrollbodens zurückgeführt werden. Ein stärkeres Vermeidungsverhalten bei Bodenmischungen hingegen deutet auf eine stärkere Bioverfügbarkeit von Schadstoffen beispielsweise aufgrund eines niedrigeren Corg-Gehaltes oder eines höheren pH-Wertes (z.B. bei Schwermetallen) hin.

Ein Einfluss der unterschiedlichen Kontrollböden auf das Verteilungsverhalten der Würmer konnte in dem vorliegenden Projekt nicht mit Sicherheit belegt bzw. widerlegt werden. So ergibt sich beispielsweise bei dem Ansatz mit IMA 927B eine deutlich Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei Partner 3. Bei den anderen beiden Institutionen konnte keinerlei Effekt detektiert werden. Bei Sickergraben (1 %) ergab sich wiederum bei Partner 3 keinerlei Vermeidungsverhalten, wohingegen bei den anderen beiden Institutionen ein eindeutiger Effekt sichtbar wurde. Bei Neuohre hingegen zeigen die Ergebnisse von Partner 1 eine deutliche Konzentrations-Wirkungsbeziehung. Bei IMA SM66 treten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen sowohl bei Partner 2 und 3 auf, wobei jedoch nur bei Partner 2 die Toxizitätsschwelle von 20 % unterschritten wird. Dies könnte theoretisch durch eine stärkere Attraktivität des Kontrollbodens von Partner 2 hervorgerufen sein. So weist dieser Boden den höchsten Corg-Gehalt auf. Dies scheint jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen von Neuohre zu stehen, bei denen unabhängig von der Konzentration nahezu eine Gleichverteilung der Würmer zu beobachten ist, wohingegen zumindest in dem 50 %-Ansatz die beiden anderen Partner einen deutlichen Effekt detektierten.

Auf der Basis dieser Resultate sowie der Ergebnisse von Hund und Wiechering (2000) scheint der Einfluss des Kontrollbodens eher gering ausgeprägt zu sein.

V - 4.1.3 Beurteilung der Lebensraumfunktion

Trotz der teilweise hohen Standardabweichungen ergab sich unter Berücksichtigung der Mittelwerte eine Übereinstimmung in der Beurteilung der Lebensraumfunktion von 72 % (Tabelle V - 4). Hierbei wurde als Kriterium > 80 % Vermeidung des Testbodens zu Grunde gelegt (Hund-Rinke und Wiechering, 2000). Bei dem Ansatz mit Benomyl ist zu berücksichtigen, dass ECT mit einer zumindest wassersuspendierbaren Formulierung, FhG und die FU-Berlin dagegen mit der äußerst gering wasserlöslichen Reinsubstanz gearbeitet haben. Die stärkere Wirkung der Formulierung bei der mittleren und höchsten Konzentration ist daher vermutlich auf die bessere Bioverfügbarkeit des Schadstoffs zurückzuführen. Hätten alle drei Labors das gleiche Ausgangsprodukt verwendet, ist es denkbar, dass sich auch bei 10 mg/kg eine völlige Übereinstimmung der Ergebnisse ergeben hätte, woraus eine Übereinstimmung der gesamten Resultate von 76 % resultiert hätte. Als Beleg, wurde von ECT der Versuch nochmals sowohl mit Reinsubstanz als auch mit Formulierung wiederholt. Die Ergebnisse sind aus Abbildung V - 9 ersichtlich. Dabei bestätigte sich die unterschiedliche Bioverfügbarkeit und damit Toxizität.

Im Rahmen des Ringtests wurde die Auswertung des Akut- und Reproduktionstests neben einem festen Beurteilungskriterium (20 % Mortalität bzw. 50 % Reproduktionsrate) zusätzlich auf der Basis der statistischen Signifikanz (DUNNET; $p = 0,05$) erprobt. Hierfür wurde die Mortalitäts- bzw. Reproduktionsrate im Test- und Referenzboden gegenübergestellt. Im Rahmen des Vermeidungstestes wurde die Anzahl der Würmer im Testboden gegenüber der Anzahl im Referenzboden statistisch (T- bzw. U-Test; $p = 0,05$) überprüft. In Tabelle V - 4 sind die Ergebnisse beider Beurteilungsweisen gegenübergestellt.

Wie bereits bei der Auswertung des Ringtests wird auf der Basis der statistischen Signifikanz weiteren Proben eine eingeschränkte Lebensraumfunktion zugeordnet. So werden beispielsweise bei der Referenzsubstanz Benomyl die Ansätze mit 10 mg/kg von FhG und der FU-Berlin als signifikant bewertet. Auch die Ansätze mit 10 % Gaswerk 1:2-Boden von ECT und FU-Berlin würden als eingeschränkte Lebensraumfunktion auf der Basis statistischer Auswertung beurteilt, was durchaus als sinnvoll betrachtet werden kann. Andererseits ergeben sich statistisch signifikante Unterschiede, die, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Konzentrationen eines Testbodens im Ansatz, nicht gerechtfertigt zu sein scheinen. So würde beispielsweise die Lebensraumfunktion als "eingeschränkt" beurteilt, obwohl keine Dosis-Wirkungsbeziehung besteht (Neuöhe / FU-Berlin). Dies legt den Schluss nahe, dass eine Ergebnisbeurteilung allein auf der Basis einer statistischen Auswertung nicht sinnvoll ist, sondern eine Kombination beider Verfahren zu erfolgen hätte. Dabei ist bei abweichenden Resultaten immer eine Begründung für die Bevorzugung einer der beiden Bewertungsmöglichkeiten zu geben. Welche Schwierigkeiten dabei auftreten können, sei am Beispiel

Landhausen / 1 % / FhG erläutert. So ergibt sich ein Mittelwert von $39 \pm 12,5$. Laut statistischer Auswertung ist das Ergebnis als "eingeschränkte Lebensraumfunktion" zu beurteilen, wohingegen auf der Basis des fixen Kriteriums "> 80 % Vermeidungsverhalten" eine intakte Lebensraumfunktion zu bescheinigen wäre. Bei derartigen Fällen ist die Gefahr einer subjektiven Ergebniswichtung zur Unterstützung spezifischer Interessen leicht gegeben.

Betrachtet man des Weiteren die Ergebnisse der FU-Berlin, die zusätzlich zu den Ansätzen mit Testboden und Referenzboden noch Ansätze, die nur aus Referenzboden bestanden, durchführte, so fällt auf, dass auch in diesen Ansätzen durchaus statistische Unterschiede auftreten können, die bei der Festlegung eines festen Prozentsatzes für das Vermeidungsverhalten nicht als auffällig gekennzeichnet worden wären (Tabelle V - 5). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass zwei der drei Versuchsansätze mit statistischer Signifikanz im ersten Untersuchungsblock liegen, was möglicherweise auf mangelnde Routine in der Versuchsdurchführung zu diesem Zeitpunkt zurückzuführen ist.

Tabelle V - 4: Beurteilung der Böden auf der Basis "> 80 % Vermeidungsverhalten" (20 % Grenzwert) bzw. "Statistische Signifikanz zur Kontrolle"(+: Lebensraumfunktion eingeschränkt, Basis < 20 % Würmer im Testboden, entsprechend > 80 % Vermeidungsverhalten, bzw. statistische Signifikanz; -: Lebensraumfunktion nicht eingeschränkt)

Boden ^{*)}	Bewertung: Grenzwert 20 %				Bewertung: Statistik		
	FhG	ECT	FU-Berlin	Übereinstimmung [%] ^{**)}	FhG	ECT	FU-Berlin
Landhausen							
1%	-	-	-	100	+	+	-
10%	+	+	+	100	+	+	+
25%	+	+	+	100	+	+	+
Iserlohn							
1%	-	-	-	100	-	+	-
10%	-	+	+	67	+	+	+
25%	+	+	+	100	+	+	+
Gaswerk 1:2							
10%	-	-	-	100	+	+	+
50%	+	+	+	100	+	+	+
100%	+	+	+	100	+	+	+
IMA SM 66							
25%	-	-	-	100	-	-	(+)
50%	-	-	-	100	-	-	-
100%	-	+	-	67	-	+	+
IMA 927 B							
25%	-	-	-	100	-	+	+
50%	-	-	+	67	-	+	+
100%	-	-	+	67	-	+	+
PAK-Mix							
1%	+	+	+	100	+	+	+
10%	+	+	+	100	+	+	+
Sickergraben							
1%	+	+	-	67	+	+	+
10%	+	+	+	100	+	+	+
Neuohe							
1%	-	-	-	100	-	-	+
10%	-	-	-	100	+	-	-
50%	+	-	+	67	+	-	+
Benomyl							
1 mg/kg	-	-	-	100	-	-	-
10 mg/kg	-	+	-	67	+	+	+
100 mg/kg	+	+	+	100	+	+	+

(+): statistisch signifikant, jedoch aufgrund einer erhöhten Anzahl an Würmern im Testboden

^{*)}: Prozentangabe: Anteil des Testbodens am Testansatz

^{**)}: maximale Übereinstimmung der drei Labors in der Aussage

Tabelle V - 5: Ansätze im Regenwurm-Vermeidungstest, die in beiden Schalenhälften den gleichen Boden und keinen Schadstoff enthalten

Ansatz	Würmer in einer Schalenhälfte [%]	Standardabweichung / Variationskoeffizient [%]	Statistische Signifikanz
Untersuchungsblock I			
LUFA 2.2 / LUFA 2.2	68	8 / 12	gegeben
LUFA 2.2 / LUFA 2.2	35	15 / 43	gegeben
LUFA 2.2 / LUFA 2.2	38	27 / 71	nicht gegeben
Untersuchungsblock II			
Thyrow / Thyrow	44	19 / 43	nicht gegeben
Thyrow / Thyrow	48	19 / 40	nicht gegeben
Untersuchungsblock III			
LUFA 2.2 / LUFA 2.2	68	23 / 34	nicht gegeben
Thyrow / Thyrow	34	8 / 24	gegeben
Untersuchungsblock IV			
LUFA 2.2 / LUFA 2.2	49	19 / 39	nicht gegeben

Im Rahmen früherer Untersuchungen wurden sechs unterschiedliche Böden, die sich nur durch ihre physiko-chemischen Eigenschaften unterschieden, kreuzweise gegeneinander getestet. Dabei ergab sich kein Hinweis auf eine Bevorzugung einzelner Böden, wenn der Grenzwert von > 80 % Vermeidungsverhalten zu Grunde gelegt wurde. Bei einer Auswertung auf statistischer Basis traten dagegen bei fünf Ansätzen signifikante Unterschiede auf (Daten zum Teil veröffentlicht: Hund-Rinke und Wichering, 2000).

Wird als Auswertekriterium nur der feste Grenzwert von > 80 % Vermeidungsverhalten im Hinblick auf den Testboden festgesetzt, bedeutet dies, dass manchen Böden im Gegensatz zur statistischen Auswertung keine eingeschränkte Lebensraumfunktion bescheinigt wird. Trotz dieser Abschwächung im Hinblick auf die Aussage "Lebensraumfunktion eingeschränkt" erweist sich der Test, trotz deutlich kürzerer Laufzeit, immer noch als mindestens ebenso sensitiv wie der Reproduktionstest (siehe V - 4.3.1)

Um dem Test eine Robustheit zu verleihen und Einflüsse durch Referenzböden, die mit den Testböden nicht identisch sind, zu minimieren, wird daher empfohlen, die Ergebnisbeurteilung nur an Hand des festen Grenzwertes "> 80 %-Vermeidungsverhalten" durchzuführen.

V - 4.1.4 Validitätskriterium

Bislang sind für diesen Test noch keine Validitätskriterien definiert. Die Sensitivität gegenüber einer Referenzsubstanz kann als Beleg für die Eignung der Testorganismen dienen. In dem vorliegenden Vorhaben war Benomyl gewählt worden. Diese Substanz war im ISO-Richtlinienentwurf von 1993 zum Reproduktionstest als Referenzsubstanz vorgeschrieben. Zwischen 1 und 20 mg/kg sollte eine Wirkung bei der Reproduktionsrate feststellbar sein. Bei dem Vermeidungstest trat im vorliegenden Vorhaben eine Wirkung bei ca. 10 mg/kg auf, die sich mit früheren Untersuchungen beim FhG decken (Ergebnisse nicht veröffentlicht). Wird Benomyl als Referenzsubstanz gewählt, könnte somit der für die Reproduktionsrate geltende Bereich auch für den Vermeidungstest gelten. Wie bereits unter V - 4.1.3 (erster Absatz) erwähnt, lassen sich die geringfügigen Unterschiede der Ergebnisse gegenüber der Referenzsubstanz durch die unterschiedlichen Applikationsformen von Benomyl erklären (ECT: Formulierung; FhG und FU-Berlin: Reinsubstanz).

In der im Jahr 2000 erschienenen Richtlinie ist Carbendazim, ein Metabolit von Benomyl, festgeschrieben, wobei in dem angegebenen Standardboden (OECD-Boden) Effekte bei 1 bis 5 mg/kg detektierbar sein sollen. Um eine Verbindung zwischen den einzelnen Richtlinien zu schaffen, wird empfohlen, diese Substanz nochmals im Vermeidungstest zu überprüfen und eine Wirkspanne festzulegen. Orientierende Untersuchungen ergaben, dass die Sensitivität des Vermeidungsverhaltens gegenüber Carbendazim sehr hoch ist. Eine Konzentration von 1 mg/kg führte in diesem Fall noch zu einem Vermeidungsverhalten von 90 %.

V - 4.2 Nematodentest

In Abbildung V - 10 bis Abbildung V - 15 sind sowohl die absoluten Vermehrungsraten als auch die auf die Kontrolle bezogenen prozentualen Vermehrungsraten aufgeführt.

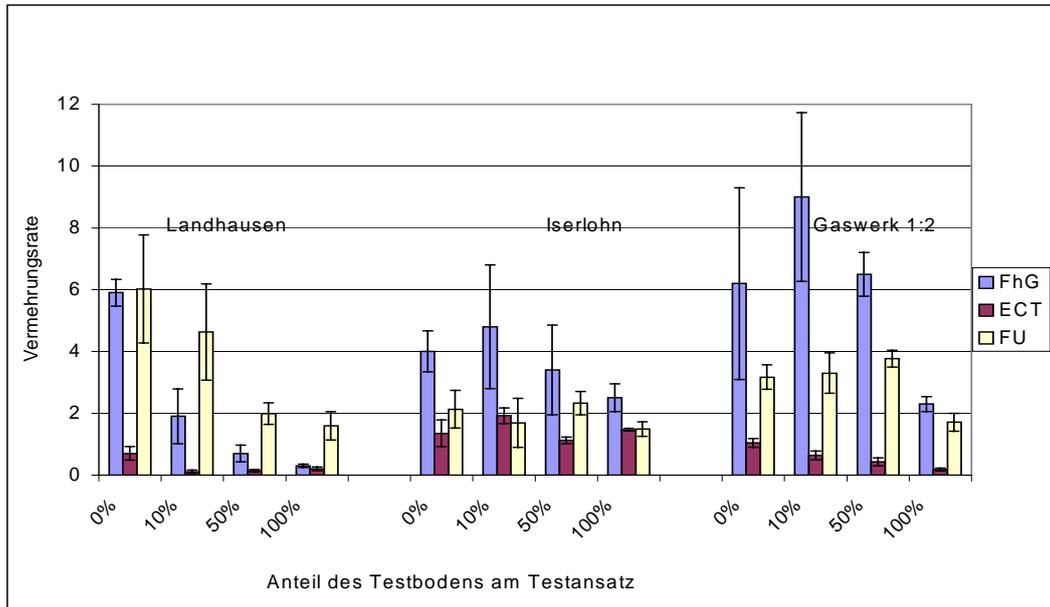


Abbildung V - 10: Absolute Vermehrungsraten der Nematoden in den Böden Landhausen, Iserlohn und Gaswerk 1:2

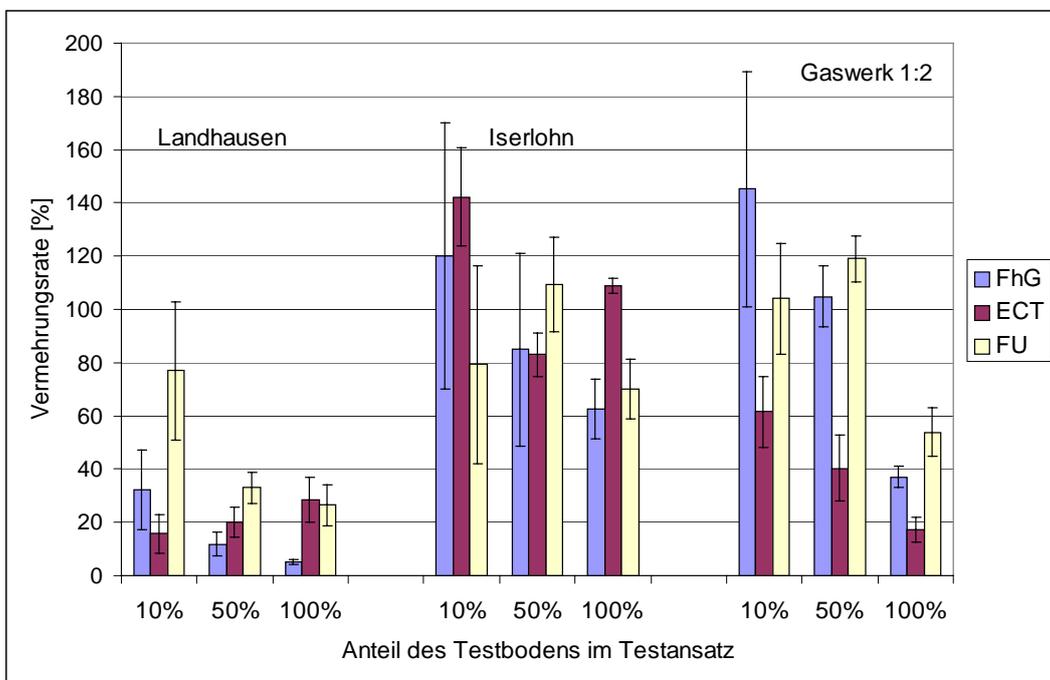


Abbildung V - 11: Prozentuale Vermehrungsraten der Nematoden in den Böden Landhausen, Iserlohn und Gaswerk 1:2

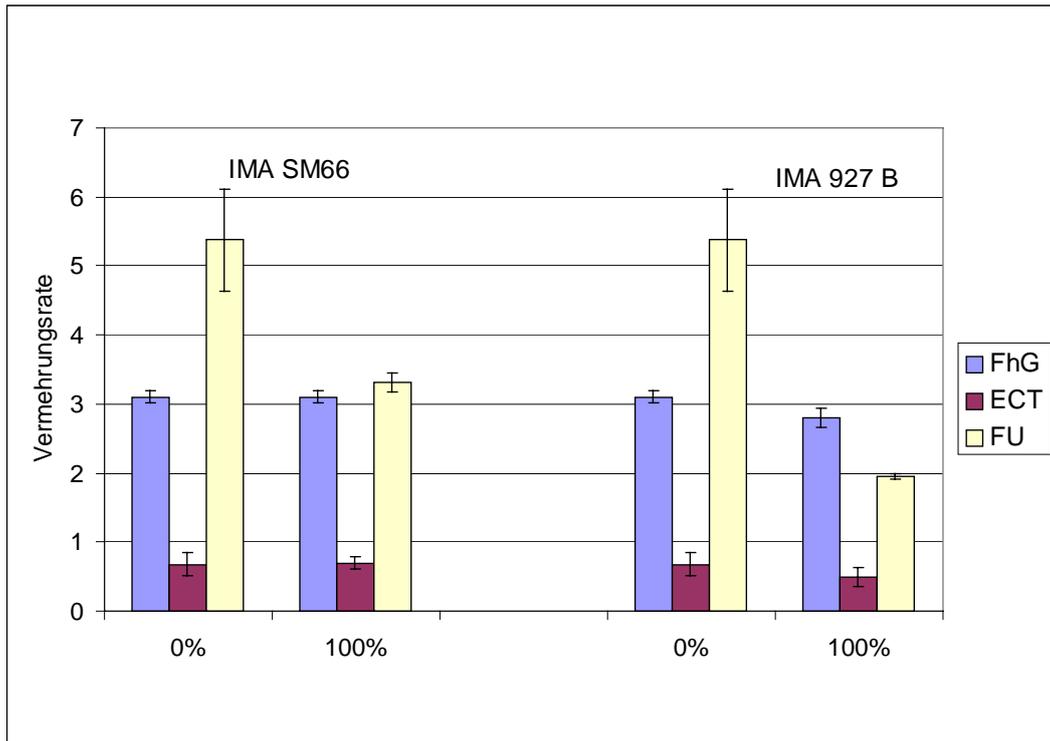


Abbildung V - 12: Absolute Vermehrungsraten der Nematoden in den Böden IMA SM 66 und IMA 927 B

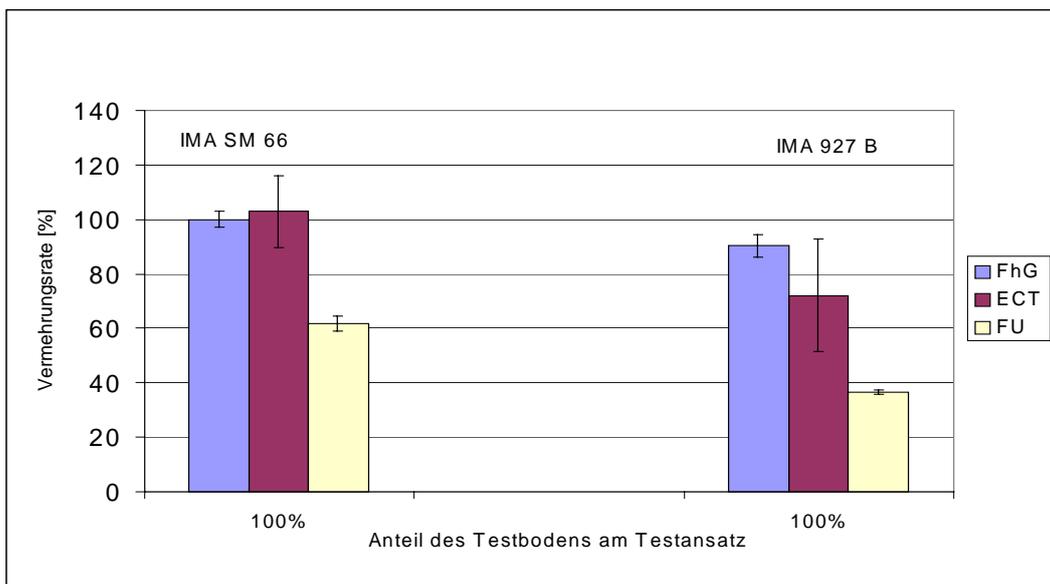


Abbildung V - 13: Prozentuale Vermehrungsraten der Nematoden in den Böden IMA SM 66 und IMA 927 B

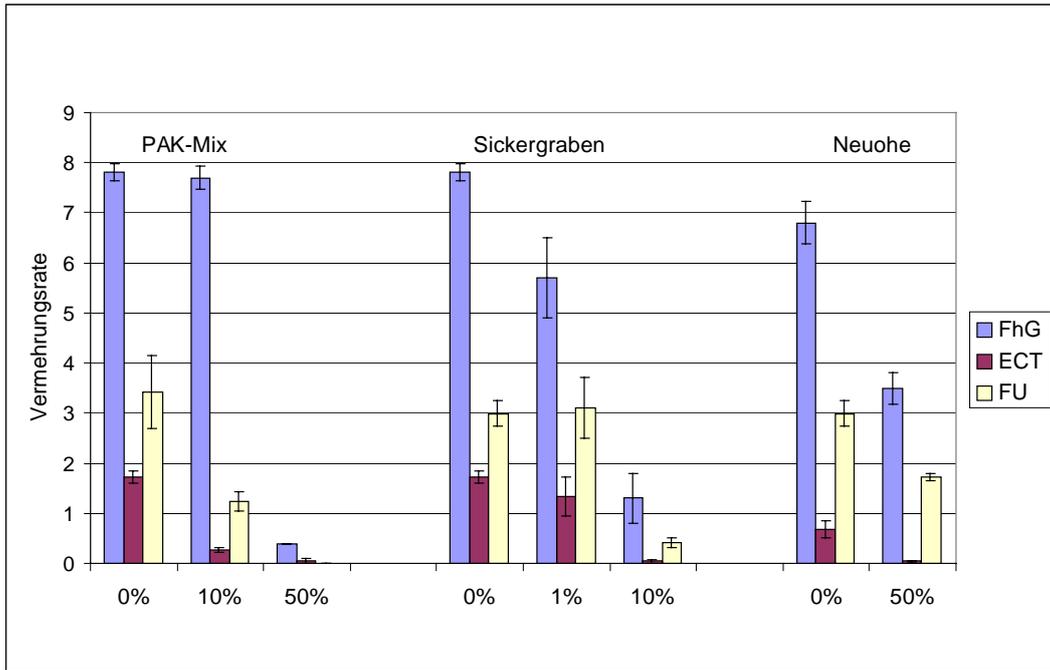


Abbildung V - 14: Absolute Vermehrungsraten der Nematoden in den Böden PAK-Mix, Sickergraben und Neuohle

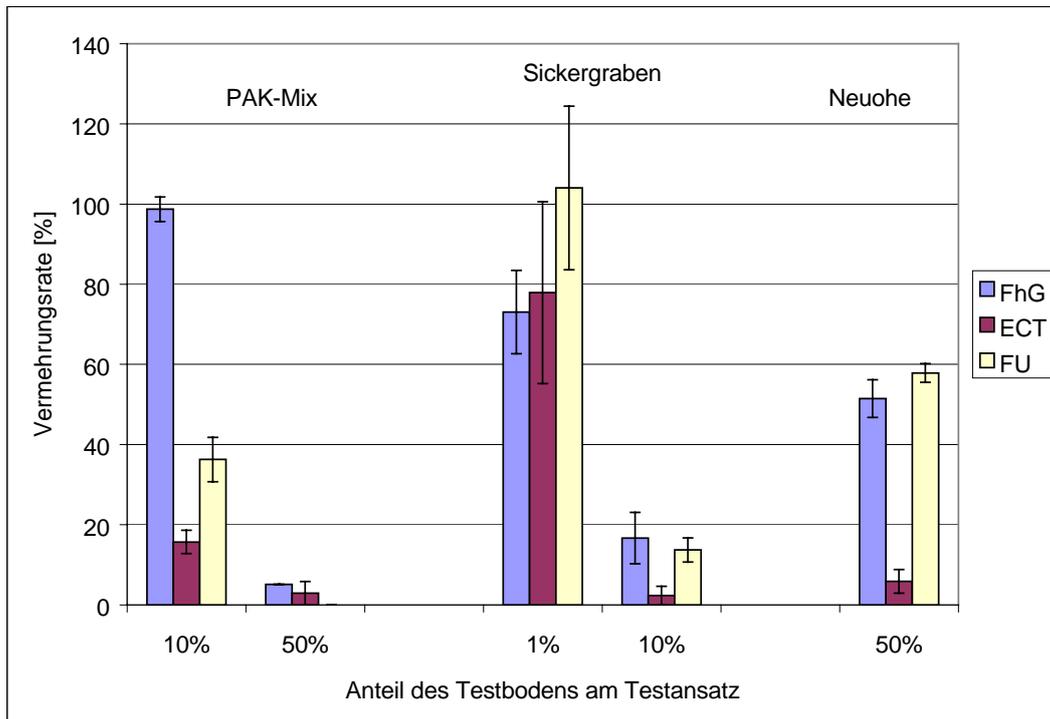


Abbildung V - 15: Prozentuale Vermehrungsraten der Nematoden in den Böden PAK-Mix, Sickergraben und Neuohle

V - 4.2.1 Absolute Vermehrungsraten

Die absoluten Vermehrungsraten in den Kontrollansätzen differierten zwischen den Partnern deutlich. Auffallend ist, dass bei ECT im Vergleich zu den anderen beiden Institutionen selbst bei den Kontrollen deutlich seltener mehr Tiere extrahiert als eingesetzt wurden. Nur in wenigen Fällen konnte von einer Vermehrungsrate gesprochen werden. Dennoch können die ermittelten Nematodenwerte eine Konzentrationsabhängigkeit zeigen (z. B. Gaswerk: Kontrolle: 1,0; 1 % Testboden: 0,6; 10 % Testboden: 0,4; 100 % Testboden: 0,2). Eine Ursache konnte nicht ermittelt werden. Rückwirkend war auch nicht mehr feststellbar, ob es sich bei den extrahierten Tiere schwerpunktmäßig um adulte oder juvenile Organismen gehandelt hat.

Aber auch bei der FU-Berlin und dem FhG, bei denen eine Reproduktion der Tiere festzustellen war, konnten sich die Reproduktionsraten um mehr als einen Faktor 2 unterscheiden. So ergaben sich beispielsweise bei dem Kontrollansatz zu dem Testboden Neuohse Vermehrungsraten von 3,0 (FU-Berlin) und 6,8 (FhG). Eine Ursache könnte in einer nicht vollständigen Extraktion der Tiere aus dem Boden zum Zeitpunkt der Testauflösung liegen. Dies war beispielsweise bei den ersten beiden Versuchsansätzen der FU-Berlin (Böden Landhausen und Gaswerk 1:2) der Fall. So wurde berichtet, dass sich, nach Abtrennung der Nematoden, noch Tiere in der Extraktionslösung nachweisen ließen, wobei eine Abschätzung im Hinblick auf die absolute Menge nachträglich nicht möglich war. Eine weitere Ursache könnte in der Zucht / Vorkultur begründet sein. So besteht der Verdacht, dass bei einem kontinuierlichen Umsetzen der Tiere alle sieben Tage und einer Inkubationstemperatur von 21 ± 2 °C höhere Vermehrungsraten im Test erzielt werden als bei Tieren, die aus einer Vorkultur stammen, die direkt von den bei 12 ± 2 °C gehaltenen Stammkulturplatten hergestellt wurde.

Die Standardabweichungen der Vermehrungsraten innerhalb der Testserie eines Partners waren, im Vergleich zu dem oben dargestellten Regenwurm-Vermeidungstest, geringer. Berücksichtigt man schwerpunktmäßig die Versuchsblöcke II und III, lagen die Streubreiten unter 30 %. Höhere Werte traten zum Teil bei ECT auf, was jedoch auf die geringen absoluten Werte der extrahierten Würmer zurückgeführt werden kann.

Um die Ergebnisse trotz der stark variierenden Absolutwerte miteinander vergleichen zu können, wird im Folgenden nur auf die prozentualen Resultate (prozentuale Vermehrungsrate im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle) eingegangen.

V - 4.2.2 Prozentuale Vermehrungsraten

Erster Untersuchungsblock: Böden Landhausen, Iserlohn und Gaswerk 1:2

Während sich bei FhG, wo der Test seit längerem durchgeführt wird, bei allen drei kontaminierten Böden eine Dosis-Wirkungsbeziehung ergab, hatte die FU-Berlin Schwierigkeiten bei den ersten beiden Testdurchführungen (Böden Iserlohn und Gaswerk 1:2). Die ermittelten Vermehrungsraten lagen sehr niedrig, eine Dosis-Wirkungs-Beziehung war nicht zu erkennen. Diese Resultate sind möglicherweise zum einen auf eine unvollständige Extraktion der Würmer zurückzuführen. So konnten bei exemplarischen Kontrollzählungen noch Tiere im wässrigen Überstand ermittelt werden. Zum anderen wurde zum Teil ungeeignetes Zählgerät verwendet. Bei der Probe Landhausen, die als dritter Boden in diesem Testblock untersucht worden war, traten diese Schwierigkeiten nicht mehr auf. In diesem Fall ist wie bei FhG eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erkennen. Bei ECT war eine Dosis-Wirkungsbeziehung nur bei dem Boden Gaswerk 1:2 zu beobachten. Doch auch hier handelte es sich um den Boden, der als drittes in diesem Testblock getestet worden war.

Zweiter Untersuchungsblock: Böden IMA SM 66, IMA 927 B

In diesem Untersuchungsblock wurden zwei Böden nach erfolgter Sanierung untersucht. Während sich bei FhG keine nennenswerten Unterschiede zwischen Kontrolle und Testböden ergaben, betrug die Vermehrungsrate bei der FU-Berlin in den Testböden ca. 40–60 % der Vermehrungsrate in den Referenzböden. Trotz der geringen Anzahl an extrahierten Würmern ergaben sich bei ECT prozentuale Werte, die im Bereich der Ergebnisse von FhG lagen.

Dritter Untersuchungsblock: Böden PAK-Mix, Sickergraben, Neuohre

Bei diesem Untersuchungsblock ergaben sich bei allen drei Partnern deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehungen, obwohl die absoluten Vermehrungsraten, die bei den einzelnen Institutionen erzielt wurden, deutlich variierten.

V - 4.2.3 Beurteilung der Lebensraumfunktion

Aufgrund der schwankenden absoluten Vermehrungsraten erscheint ein mindestens zu erreichender Vermehrungsfaktor, um die Lebensraumfunktion eines Bodens als "gegeben" einzustufen, als ungeeignetes Kriterium. Gemäß Antrag war folgende Klassifizierung vorgesehen:

- > 5,0 Lebensraumfunktion gegeben; stimuliertes Populationswachstum
- > 2,0 – 5,0 Lebensraumfunktion gegeben; normales Populationswachstum
- 1,0 – 2,0 Lebensraumfunktion eingeschränkt
- < 1,0 Lebensraumfunktion deutlichst eingeschränkt

Wird analog der Reproduktionstests mit Regenwürmern, Collembolen oder Enchytraeen eine Lebensraumfunktion bei einer Reproduktionsrate im Testboden < 50 % im Vergleich mit einer Kontrolle als "eingeschränkt" beurteilt, ergibt sich bei den drei Institutionen im Hinblick auf die Beurteilung der Böden das in Tabelle V - 6 dargestellte Bild. In den Ansätzen, in denen die einzelnen Institutionen zu einer unterschiedlichen Bewertung kamen, tendieren die Werte von ECT eher in den sensitiveren, die von der FU-Berlin in den unempfindlicheren Bereich. Die Unterschiede sind jedoch nur schwach ausgeprägt.

Tabelle V - 6: Beurteilung der Böden im Hinblick auf die Einschränkung der Lebensraumfunktion
 (+: Lebensraumfunktion eingeschränkt, Basis: < 50 % Nachkommen zur Kontrolle;
 - : Lebensraumfunktion nicht eingeschränkt)

Boden ^{*)}	FhG	ECT	FU-Berlin	Übereinstimmung [%] ^{**)}
Landhausen				
10 %	+	+	-	67
50 %	+	+	+	100
100 %	+	+	+	100
Iserlohn				
10 %	-	-	-	100
50 %	-	-	-	100
100 %	-	-	-	100
Gaswerk 1:2				
10 %	-	-	-	100
50 %	-	+	-	67
100 %	+	+	-	67
IMA SM 66				
100 %	-	-	-	100
IMA 927 B				
100 %	-	-	+	67
PAK-Mix				
10 %	-	+	+	67
50 %	+	+	+	100
Sickergraben				
1 %	-	-	-	100
10 %	+	+	+	100
Neuohe				
50 %	-	+	-	67

^{*)}: Prozentangabe: Anteil des Testbodens am Testansatz

^{**)}: maximale Übereinstimmung der drei Labors in der Aussage

Auf eine Auswertung auf der Basis einer statistischen Signifikanz zum Kontrollansatz wurde verzichtet. So ist der Einfluss der Bodenart auf die ermittelte Vermehrungsrate der Organismen nicht bekannt. Eine Bearbeitung dieser Fragestellung konnte auf Grund methodischer Schwierigkeiten der Partner 2 und 3, die den Test zum ersten Mal durchführten, nicht erfolgen. Des Weiteren wurde bereits beim Regenwurm-Vermeidungstest die Problematik dargestellt, die sich bei einer statistischen Auswertung ergeben kann.

V - 4.3 Testsysteme im Vergleich

Wie bereits dargestellt, wurden der Regenwurm-Vermeidungstest sowie der Nematodentest an drei der Böden, die Bestandteil des Ringtests gewesen waren, sowie an fünf weiteren Böden durchgeführt. Um die Sensitivität dieser beiden Tests mit den Bodenfauna-Tests, die Bestandteil des Ringtests gewesen waren, an einer breiten Palette von Schadstoffen und Böden vergleichen zu können, wurden die Verfahren mit Collembolen, Regenwürmern und Enchytraeen (Akut- und Reproduktionstest) noch mit den fünf zusätzlichen Böden von der FU-Berlin durchgeführt. Dabei wurde jeweils der unverdünnte Testboden untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte auf der Basis der im Ringtest vorgegebenen Testvorschriften sowohl als Akut- als auch als Reproduktionstest (Regenwurm: kombinierter Test). Die ausführliche Testmethodik ist in der Veröffentlichung zum Ringtest dargestellt (DBU, 2001). Tabelle V - 7 gibt die Ergebnisse im Hinblick auf die Beurteilung der Lebensraumfunktion auf der Basis der einzelnen Testsysteme und -parameter wieder. Dabei wurden folgende Kriterien zu Grunde gelegt:

"+": Lebensraumfunktion einschränkt:

- Regenwurmvermeidungstest: > 80 % Vermeidungsverhalten im Hinblick auf den Testboden
- Nematodentest: > 50 % Reduktion in der Nachkommenanzahl im Vergleich zu dem jeweiligen Kontrollboden
- Collembolen- und Enchytraeentest: > 20 % Mortalität im Akuttest, > 50 % Reduktion in der Nachkommenanzahl im Vergleich zu dem jeweiligen Kontrollboden
- Regenwurmtest: > 20 % Mortalität bzw. > 50 % Reduktion in der Nachkommenanzahl bzw. > 20 % Reduktion in der Biomassezunahme im Vergleich zu dem jeweiligen Kontrollboden im kombinierten Akut- und Reproduktionstest

"--": Lebensraumfunktion nicht eingeschränkt.

Die Bewertung ergibt sich entsprechend umgekehrt zu den Angaben bei "Lebensraumfunktion eingeschränkt".

Bei dem Regenwurm-Vermeidungstest sowie dem Nematodentest, die jeweils von mehreren Labors durchgeführt wurden, gibt die Beurteilung die Mehrheitsmeinung wieder. Gleiches gilt für die Ergebnisse mit Collembolen, Enchytraeen und Regenwürmern, die aus dem Ringtest übernommen wurden.

Tabelle V - 7: Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden auf der Basis verschiedener Bodenfaunatests (Erläuterung zu "+" und "-" siehe Text; Angaben in Klammern: bei Durchführung von mehreren Labors prozentuale Übereinstimmung in der Beurteilung)

Boden	Nematoden	Regenwürmer				Collembolen		Enchytraeen	
		Reproduktion	Vermeidung	Reproduktion	Biomasse- verlust nach 28 d	Mortalität	Reproduktion	Mortalität	Reproduktion
Landhausen									
1 %		- (100)							
10 %	+ (67)	+ (100)							
12,5 %			+ (100)	- (100)	- (100)				
25 %		+ (100)	+ (100)	+ (67)	- (56)	+/- ^{*)}	-(75)	- (100)	- (100)
50 %	+ (100)		+ (100)	+ (100)	+ (67)	+ (100)	- (63)	+/- ^{*)}	- (100)
100 %	+ (100)		+ (100)	+ (100)	+ (100)	+ (100)	+ (100)	+ (100)	+ (67)
Iserlohn									
1 %		- (100)							
10 %	- (100)	+ (67)							
12,5 %			- (67)	- (100)	- (100)				
25 %		+ (100)	+ (100)	- (78)	- (78)	+ (67)	- (100)	- (100)	- (100)
50 %	- (100)		+ (100)	+ (71)	- (71)	+/- ^{*)}	- (88)	- (75)	- (100)
100 %	- (100)		+ (100)	+ (100)	+ (100)	+ (100)	- (71)	- (100)	- (80)
Gaswerk 1:2									
10 %	- (100)	- (100)							
12,5 %			- (100)	- (100)	- (100)				
50 %	- (67)	+ (100)	- (63)	- (100)	- (100)	- (100)	- (86)	- (100)	- (100)
100 %	+ (67)	+ (100)	+ (100)	+ (67)	+ (67)	+ (100)	+ (100)	+ (100)	+/- ^{*)}
IMA SM 66									
25 %		- (100)							
50 %		- (100)							
100 %	- (100)	- (67)	-	-	-	-	-	-	-

*) jeweils 50 % Übereinstimmung

Tabelle V – 7: Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden auf der Basis verschiedener Bodenfaunatests (Erläuterung zu "+" und "-" siehe Text; Angaben in Klammern: bei Durchführung von mehreren Labors prozentuale Übereinstimmung in der Beurteilung) (Fortsetzung)

Boden	Nematoden	Regenwürmer				Collembolen		Enchytraeen	
	Reproduktion	Vermeidung	Reproduktion	Biomasseverlust nach 28 d	Mortalität	Reproduktion	Mortalität	Reproduktion	Mortalität
IMA 927 B									
25 %		- (100)							
50 %		- (67)							
100 %	- (67)	- (67)	+	-	-	-	-	+	-
PAK-Mix									
1 %		+ (100)							
10 %	+ (67)	+ (100)							
50 %	+ (100)								
100 %			+	+	+	+	+	+	+
Sickergraben									
1 %	- (100)	+ (67)							
10 %	+ (100)	+ (100)							
100 %			+	+	+	+	+	+	+
Neuohe									
1 %		- (100)							
10 %		- (100)							
50 %	- (67)	+ (67)							
100 %			+	-	-	-	-	+	-

Da die Konzentrationen des Testbodens im Testansatz der Sensitivität des jeweiligen Testparameters angepasst worden war, unterscheiden sich die Konzentrationsstufen bei den einzelnen Testsystemen. Felder ohne Kennzeichnung (ohne + oder -) zeigen an, dass die jeweilige Testkonzentration nicht überprüft wurde.

V - 4.3.1 Sensitivität

Aus der Zusammenstellung wird deutlich, dass sich die einzelnen Testorganismen bzw. -parameter deutlich in ihrer Sensitivität unterscheiden.

- Sensitivität der Testparameter "Mortalität", "Reproduktionsrate" und Biomasseverlust
Der Testparameter "Mortalität" erweist sich im Vergleich zu der "Reproduktionsrate" bei den Testorganismen schwerpunktmäßig als unempfindlich. Dies ist nicht verwunderlich, da es sich hierbei um die größtmögliche Schädigung handelt, die ein Organismus zeigen kann. Der im Rahmen des Ringtests für die Beurteilung von Böden zusätzlich angewandte Parameter "Biomasseverlust" bei *Eisenia fetida* liefert auf Basis der hier vorliegenden Ergebnisse keine zusätzlichen Informationen zu den Beurteilungskriterien "Mortalität" und "Reproduktionsrate".
- Sensitivität des Testparameters "Reproduktionsrate": unterschiedliche Testorganismen
Wird die Reproduktionsrate von Regenwürmern, Collembolen, Enchytraeen und Nematoden miteinander verglichen, weist dieser Parameter bei den Regenwürmern die höchste Sensitivität auf. Die Reproduktionsrate bei Collembolen, Enchytraeen und Nematoden zeigt in der Regel nur bei höheren Konzentrationen einen Einbruch an. Eine Reihung im Hinblick auf die Sensitivität zwischen diesen drei Organismen unter Berücksichtigung aller Testansätze ergibt folgendes Bild: Enchytraeen (viermal an erster Stelle) > Nematoden (dreimal an erster und dreimal an zweiter Stelle) > Collembolen (dreimal an erster, dreimal an zweiter und einmal an dritter Stelle). Bei dieser Auswertung konnten die Böden PAK-Mix und Sickergraben nicht berücksichtigt werden, da die Nematoden als höchste Testkonzentration im 50 %-Ansatz getestet wurden. Dabei ließen sie eine Einschränkung in der Lebensraumfunktion erkennen. Aussagen im Hinblick auf die Sensitivität im Vergleich zu den Collembolen und Enchytraeen, die nur im 100 %-Ansatz eingesetzt wurden, sind dadurch nicht möglich.
Werden nur die Testansätze mit 100 % Testboden berücksichtigt (Landhausen, Iserlohn, Gaswerk 1:2, IMA SM 66, IMA 927 B), die bei einer routinemäßigen Beurteilung von Böden im Hinblick auf die Lebensraumfunktion die essentiellen darstellen, so lässt sich im Hinblick auf die Sensitivität aller Testorganismen folgende Reihung

darstellen: Regenwürmer (4 +) > Collembolen, Enchytraeen (3 +) > Nematoden (2 +). Während Collembolen primär über die Nahrung und Enchytraeen sowie Nematoden über das Porenwasser exponiert werden, kommen bei den Regenwürmern beide Expositionspfade zum Tragen, worauf sich vermutlich die höhere Sensitivität begründet. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich bei den ersten drei Böden um hoch kontaminierte Proben handelte.

- Sensitivität der Testparameter "Vermeidungsverhalten" und "Reproduktionsrate" (*Eisenia fetida*)

Werden die Ansätze mit Verdünnungsreihen in beiden Testsystemen miteinander verglichen, erweist sich das Vermeidungsverhalten im Hinblick auf das Anzeigen einer eingeschränkten Lebensraumfunktion als mindestens so sensitiv wie die Reproduktionsrate, wobei die Versuchsdauer mit 2 d deutlich kürzer ist. Eine Ausnahme bildet der sanierte Boden IMA 927 B. Hier zeigt die Reproduktionsrate bei dem 100 % Testansatz eine deutliche Einschränkung der Lebensraumfunktion, wohingegen das Vermeidungsverhalten keinen diesbezüglichen Effekt indiziert. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass der Reproduktionstest nur bei der FU-Berlin durchgeführt wurde. Diese Institution bewertete den Boden, im Gegensatz zu den beiden anderen Partnern, auch im Vermeidungstest als toxisch, wodurch sich bei dem 100 %-Ansatz nur eine Übereinstimmung von 67 % ergab. Möglicherweise war trotz aufwendiger Homogenisierungsschritte bei der Bodenaufbereitung der FU-Berlin doch eine toxischere Bodencharge zur Verfügung gestellt worden.

Über das Vermeidungsverhalten können nur Schadstoffe detektiert werden, die *Eisenia fetida* über die Chemorezeptoren wahrnimmt. Aufgrund der in die Untersuchung einbezogenen Böden kann festgestellt werden, dass dies für MKW, PAK und TNT der Fall ist. Ob eine Reaktion auf Schwermetalle stattfindet, kann auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse nicht ausgesagt werden, da diese in höheren Konzentrationen nur bei dem Boden Landhausen vorlagen, der jedoch ebenfalls stark MKW-kontaminiert war. Aus anderen Experimenten ist bekannt, dass *E. fetida* auf KCl (5000 ppm), NH₄Cl (150 ppm) sowie auf Mangan und eine Mischkontamination aus Zink, Mangan, Eisen und Kupfer reagiert (Yearley et al., 1996). Für die Schwermetallkontaminationen werden jedoch keine Konzentrationsangaben berichtet. Untersuchungen mit *L. terrestris* zeigten, dass dieser Organismus auch auf zahlreiche Pestizide mit Vermeidungsverhalten reagiert (Slimak, 1997).

V - 4.3.2 Variabilität zwischen den Labors

Aus Tabelle V - 7 wird des Weiteren ersichtlich, dass das Ausmaß der Übereinstimmung der Ergebnisse unterschiedlicher Labors im Hinblick auf die Bodenbeurteilung vergleichbar zu sein scheint. Einschränkend ist dabei zu berücksichtigen, dass bei dem Laborvergleichstest mit drei Teilnehmern nur 100 % oder 67 % Übereinstimmung zu erzielen ist. Bei keinem Testsystem wurde nur 100 % Übereinstimmung erreicht. Bei Toxizitäten im Grenzbereich können die Ergebnisse variieren, wohingegen schwache und starke Toxizitäten erwartungsgemäß zu 100 % Übereinstimmung führen. Eine vollständige Übereinstimmung der Resultate aller Partner trat in 67 % der Fälle auf.

V - 5 Beurteilung der Testsysteme "Regenwurm-Vermeidungstest" und "Nematodentest"

V - 5.1 Regenwurm-Vermeidungstest

Aus der Durchführung des Regenwurm-Vermeidungstests im Laborvergleich lassen sich folgende Rückschlüsse ziehen:

- **Zuchtaufwand**
Der Zuchtaufwand ist mit den bereits genormten Tests mit *Eisenia fetida* vergleichbar. Der Zuchtaufwand im Vergleich zum Nematodentest liegt höher. So müssen die Tiere zum Erhalt einer synchronen Zucht monatlich umgesetzt und wöchentlich gefüttert sowie der Zuchtboden wöchentlich gewässert werden.
- **Arbeitsaufwand bei Testdurchführung**
Der Arbeitsaufwand ist sehr gering. Ebenso ist die Anzahl der zu zählenden Tiere klein. Des Weiteren sind die Tiere groß und damit leicht im Boden zu finden.
- **Standardabweichung der Parallelansätze**
Teilweise ergaben sich hohe Standardabweichungen. So lagen die Variationskoeffizienten bei den Versuchsansätzen, bei denen sich 20 – 80 % der Würmer im Testboden befanden, zwischen 16 – 73 %. Ähnliche Werte wurden bei den Kontrollansätzen, die den gleichen, unkontaminierten Boden in beiden Schalenhälften enthielten, erzielt.
- **Einfluss der Referenzböden auf das Verteilungsverhalten**
Unter der Voraussetzung, dass nur sandige Böden mit keinen extremen Kenngrößen hinsichtlich pH-Wert und C_{org} -Gehalt als Referenzböden eingesetzt werden, scheint der Einfluss von Bodeneigenschaften auf das Verteilungsverhalten eher gering zu sein. Die Anzahl der Proben war jedoch gering. Wünschenswert wäre eine nochmalige Überprüfung mit einer höheren Anzahl an Proben, die sich im Kontaminationsgrad deutlich unterscheiden. Grundsätzlich sollte immer ein Ansatz mit 100 % Testboden mit untersucht werden.
- **Kriterium zur Beurteilung der Lebensraumfunktion**
Als Beurteilungskriterium wurden sowohl ein fester Grenzwert (> 80 % Vermeidungsverhalten bei dem Testboden) als auch statistische Signifikanz in der Verteilung der Würmer überprüft. Um dem Test eine Robustheit zu verleihen und Einflüsse durch Referenzböden zu minimieren, die mit den Testböden nicht identisch sind, wird

empfohlen, die Ergebnisbeurteilung nur an Hand des festen Grenzwertes durchzuführen.

- **Vergleichbarkeit der Ergebnisse durch verschiedene Labors**
In 72 % der Testansätze entsprachen sich die Resultate aller Partner in Bezug auf die Beurteilung der Böden.
- **Sensitivität des Testparameters**
Die Sensitivität des Testparameters "Vermeidungsverhalten" entspricht unter Berücksichtigung aller Testansätze mindestens dem Testparameter "Reproduktion" bei *Eisenia fetida*. Eine Generalisierung dieses Befundes kann jedoch nicht erfolgen, da ein Vermeidungsverhalten nur für Kontaminanten möglich ist, die über Chemorezeptoren wahrgenommen werden können. Für einen Nachweis im Reproduktionstest gilt diese Einschränkung nicht.
- **Validitätskriterium**
Als Validitätskriterium im Vermeidungstest zur Beurteilung der Zucht und der Testdurchführung wird für Benomyl, der Referenzsubstanz in dem Richtlinienentwurf zum Reproduktionstest (1993), ein Wirkungsbereich von 1 bis 20 mg/kg empfohlen. Wird Carbendazim gewählt, der Referenzsubstanz in der Richtlinie zum Reproduktionstest (2000) ist der genaue Bereich noch festzulegen.
- **Methodische Schwierigkeiten**
Methodische Schwierigkeiten wurden nicht beobachtet.

V - 5.2 Nematodentest

Aus der Durchführung des Nematodentests im Laborvergleichstest lassen sich folgende Rückschlüsse ziehen:

- **Zuchtaufwand**
Der Zuchtaufwand hält sich in Grenzen. So hat ein wöchentliches Umsetzen der Tiere, jedoch ohne aufwendige Kontrolle, zu erfolgen. Soll eine synchrone Zucht erhalten werden, ist ein deutlich höherer Arbeitsaufwand erforderlich. In wie weit sich eine synchrone Zucht positiv auf die Ergebnisse auswirkt und damit den höheren Arbeitsaufwand rechtfertigt, kann nicht gesagt werden.
- **Arbeitsaufwand bei Testdurchführung**
Bei dem Testansatz und der Testauflösung ergibt sich ein hoher Arbeitsaufwand, so dass es sich bei dem Nematodentest um ein kostenintensives Verfahren handelt. So ist die Auszählung der Tiere unter dem Mikroskop recht aufwendig. Erfolgt die Entnahme

der auszählenden Aliquots nicht mit hoher Sorgfalt, besteht die Gefahr ungenauer Ergebnisse.

- **Standardabweichung der Parallelansätze**

Die Standardabweichungen der Parallelansätze liegen schwerpunktmäßig unter 30 %. Abweichungen hiervon treten bei ECT aufgrund der sehr niedrigen Werte auf und dürfen daher nicht überbewertet werden.

- **Kriterium zur Beurteilung der Lebensraumfunktion**

Aufgrund der variablen absoluten Vermehrungsraten wird eine Modifikation des Beurteilungskriteriums "Absolute Vermehrungsrate" empfohlen. Analog zu den übrigen Bodenfaunatests mit dem Testparameter "Reproduktion" wird empfohlen, die Lebensraumfunktion eines Bodens bei einer Reproduktionsrate < 50 % im Vergleich zu dem Referenzboden als eingeschränkt zu betrachten.

- **Vergleichbarkeit der Ergebnisse durch verschiedene Labors**

Es ergaben sich deutlich unterschiedliche absolute Vermehrungsraten in den Kontrollansätzen zwischen den einzelnen Labors. In 63 % der Testansätze entsprachen sich die Resultate aller Partner in Bezug auf die Beurteilung der Böden.

- **Sensitivität des Testparameters**

Die Sensitivität des Testparameters scheint unter Berücksichtigung aller Ergebnisse der Sensitivität der Reproduktionsrate von *Enchytraeus crypticus* und *Folsomia candida* zu entsprechen.

- **Methodische Schwierigkeiten**

Das Ausmaß des Austrocknens der Testansätze hängt von den zur Verfügung stehenden Inkubationsschränken ab, so dass die Häufigkeit des Befeuchtens individuell zu lösen ist. Schwierigkeiten können des Weiteren bei der Extraktion der Würmer aus dem Boden auftreten.

V - 6 Generelle Schlussfolgerung

V - 6.1 Regenwurm-Vermeidungstest

Der Regenwurm-Vermeidungstest mit dem Beurteilungskriterium "> 80 %-Vermeidungsverhalten" weist zahlreiche Vorzüge auf:

- kurze Testlaufzeit
- vergleichsweise geringer Arbeitsaufwand
- Sensitivität mindestens vergleichbar mit Reproduktionstests verschiedener Bodenorganismen (*Eisenia fetida*, *Folsomia candida*, *Enchytraeus crypticus*)
- leicht erlernbare, einfache Testdurchführung
- Referenzboden (vermutlich) durch Angabe weniger Grund-Parameter definierbar

Aufgrund der vielen Vorzüge und vielversprechenden Resultate wird der Regenwurm-Vermeidungstest daher als geeigneter Screening-Test zur Beurteilung der Lebensraumfunktion angesehen und empfohlen. Eine Normung als ISO-Richtlinie wird angestrebt.

Trotz der bereits aussagekräftigen Ergebnisse könnte die Schärfe des Tests noch gesteigert werden, wenn die Standardabweichungen innerhalb der Parallelen eines Testansatzes noch reduziert werden könnten. Ansatzpunkte hierfür stellen eine Veränderung in der Testlaufzeit (z. B. 24 h oder 72 h), eine Erhöhung der Anzahl an Parallelen, eine Variation im Wassergehalt, sowie in der Bodenmenge dar. Eine Angabe eines maximalen Variationskoeffizienten könnte dann auch als weiteres Validitätskriterium, analog zum Reproduktionstest, herangezogen werden. Zusätzlich sollte der Einfluss des Kontrollbodens nochmals überprüft werden. Dabei sollten sich die Proben im Kontaminationsgrad deutlich unterscheiden. Grundsätzlich sollte ferner immer ein Ansatz mit 100 % Testboden mit untersucht werden. Da das Vermeidungsverhalten nur einen sinnvollen Testparameter bei Schadstoffen darstellt, die über Chemorezeptoren wahrgenommen werden können, wird des weiteren empfohlen, eine systematische Untersuchung im Hinblick auf das angezeigte Schadstoffspektrum durchzuführen.

V - 6.2 Nematodentest

Wie bereits einleitend dargestellt, werden derzeit verschiedene Nematodentests erprobt. Ein Nematodentest stellt im Hinblick auf eine Testbatterie eine sinnvolle Ergänzung zu den bisher schwerpunktmäßig bearbeiteten Testsystemen mit *Eisenia fetida*, *Enchytraeus sp.* und *Folsomia candida* dar. Durch diese Organismen wird eine bisher nicht abgedeckte Kombination von besiedeltem Porenraum, Expositionsplatz und trophischer Ebene abgedeckt.

Bei dem hier vorliegenden Test zeigte es sich, dass Abstufungen in der Toxizität von Bodenproben bei allen drei Partnern erkannt wurden. Die prozentuale Übereinstimmung in der Aussage im Hinblick auf eine Beeinträchtigung der Lebensraumfunktion (Beurteilungskriterium "< 50 % Reproduktionsrate" im Vergleich zu Kontrollansätzen) entsprach der Übereinstimmung bei dem Regenwurm-Vermeidungstest. Die Sensitivität erwies sich als vergleichbar mit der von Reproduktionstests mit *Enchytraeus crypticus* und *Folsomia candida*. Somit erscheint der Nematodentest mit *Panagrellus redivivus* zur Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden als prinzipiell geeignet. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass die Ursache für die niedrige Anzahl an extrahierten Würmern bei ECT nicht geklärt werden konnte. Auch war es aufgrund methodischer Schwierigkeiten bei den Projektpartnern im Rahmen dieses Projektes nicht möglich, systematische Untersuchungen zur Beeinflussung der Vermehrungsrate durch die Bodenart durchzuführen. Derartige Untersuchungen sind jedoch Voraussetzung zur endgültigen Festlegung des Beurteilungskriteriums im Hinblick auf das Vorliegen der Lebensraumfunktion.

Es bestehen internationale Bestrebungen, einen Nematodentest zu normen. Bislang erfolgte durch Deutschland (Herr Dr. Römbke, ECT) eine Zusammenstellung existierender Methoden. Diese Zusammenstellung wurde von holländischen Experten diskutiert, ein Vorschlag zur Normung soll erarbeitet werden.

Auf der Basis der im Rahmen dieses Projektes erhaltenen Ergebnisse erscheint eine uneingeschränkte Empfehlung des in der vorliegenden Form durchgeführten Nematodentests mit *Panagrellus redivivus* als verfrüht. Die Erfahrungen sollen jedoch in die international laufenden Harmonisierungsbestrebungen aktiv eingebracht werden.

V - 7 Literatur

- DBU (2001): Ökotoxikologische und genotoxikologische Beurteilung von Böden und Substraten – Ringtestergebnisse. Geplante Veröffentlichung im Erich Schmidt Verlag – Initiativen zum Umweltschutz.
- DIN ISO 11268-1 (1997): Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer (*Eisenia fetida*) – Teil 1: Verfahren zur Bestimmung der akuten Toxizität unter Verwendung von künstlichem Bodensubstrat.
- DIN ISO 11268-2 (2000): Bodenbeschaffenheit – Wirkung von Schadstoffen auf Regenwürmer (*Eisenia Fetida*) – Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung (ISO 11268-2, 1998).
- Donkin S.G., D.B. Dusenberry (1993): A Soil Toxicity Test Using the Nematode *Caenorhabditis elegans* and an Effective Method of Recovery. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 25, 145–151.
- Gisi, U., R. Schenker, R. Schulin, F.X. Stadelmann, H. Sticher (1997): Bodenökologie. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 304 Seiten.
- Hund-Rinke, K., H. Wiechering (2000): Earthworm avoidance test for soil assessment: an alternative for acute and reproduction tests. Journal of Soils and Sediments (DOI:<http://dx.doi.org/10.1065/jss2000.11.004>).
- Hund-Rinke, K., J. Römbke, F. Riepert, R. Achazi (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Ökotoxikologie (S. Heiden, W. Dott, A. Eisenträger, Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, 59–81.
- Kammenga, J.E., P.H.G. Van Koert, J.A.G. Riksen, G.W. Korthals, J. Bakker (1996): A toxicity test in artificial soil based on the life-history strategy of the nematode *Plectus acuminatus*. Envir. Toxicol. Chem. 15, 722–727.
- Kammenga, J.E., J.A.G. Riksen (1998): Test on the competition between the Nematodes *Plectus acuminatus* and *Heterocephalobus pauciannulatus*. In: *Handbook of soil invertebrate toxicity* (H. Løkke, C.A.M. Van Gestel, eds.), John Wiley & Sons, Chichester, 227–237.
- Michels, J., T. Track, U. Gehrke, D. Sell (Hrsg.), Biologische Verfahren zur Bodensanierung. Grün-weiße Reihe des BMBF (im Druck).
- Niemann, R., R. Debus (1996): Nematodentest zur Abschätzung der chronischen Toxizität von Bodenkontaminationen. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 8, 255–260.
- Römbke, J., P. Dreher, L. Beck, W. Hammel, K. Hund, H. Knoche, W. Kördel, W. Kratz, Th. Moser, S. Pieper, A. Ruf, J. Spelda, S. Woas (2000): Bodenbiologische Bodengüte-Klassen. UBA-Texte 6/00, 276 Seiten.

- Samoiloff, M.R., S. Schulz, K. Denich, Y. Jordan, E. Arnott (1980): A rapid simple long-term toxicity assay for aquatic contaminants using the nematode *Panagrellus redivivus*. *Can. J. Fish Aquatic Sci.* 37, 1167–1174.
- Slimak, K.M. (1997): Avoidance response as a sublethal effect of pesticides on *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Soil Biol. Biochem.* 29, 719–715.
- Stephenson, G.L., A. Kaushik, N.K. Kaushik, K.R. Solomon, T. Steele, R.P. Scroggins (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.
- Stop-Bøwitz, C. (1969): A contribution to our knowledge of the systematics and zoogeography of Norwegian earthworms. *Nytt. Magazin Zoologie* 17, 169-280.
- Wilms, W. (1992): Prüfung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf räuberische Nematoden. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 44, 25–29.
- Yeardley, R.B, J.M. Lazorchak, L.C.Gast (1996): The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1532–1537.
- Yeates, G.W., T. Bongers, R.G.M. De Goede, D.W. Freckman, S.S. Georgieva (1993): Feeding habitats in soil nematode families and genera – an outline for soil ecologists. *Journal of Nematology* 25, 315–331.

Kapitel VI

Teilvorhaben 4: Charakterisierung des wässrig extrahierbaren ökotoxischen und genotoxischen Potenzials von Böden mit Hilfe miniaturisierter Testverfahren mit kinetischer Datenaufnahme

Teilprojektleiter:

Dr.-Ing. A. Eisenträger,
Prof. Dr. W. Dott
Institut für Hygiene und Umweltmedizin
des Universitätsklinikums Aachen
Pauwelsstr. 30
52074 Aachen

Partner

Dr. K. Hund-Rinke
Fraunhofer-Institut für Umweltchemie
und Ökotoxikologie
57392 Schmallenberg

Dr. F Pfeifer
Deutsche Montan Technologie GmbH
Geschäftsbereich GUC
Am Technologiepark 1
45307 Essen

Mitarbeit

Dipl.-Biol. Monika Mallau (IHU)

Drs. Jean-Paul Rila (IHU)

Technische Assistenz

Nicola Mende (IHU)

Ricarda Noeker (FhG)

Roland Otte (DMT)

Claudia Schmitz (IHU)

Inhaltsverzeichnis

VI - 1	EINLEITUNG	5
VI - 1.1	Kurzfassung des Berichts	5
VI - 1.2	Anlass und Zielsetzung des Projekts	5
VI - 1.3	Laborvergleich	6
VI - 2	METHODIK	9
VI - 2.1	Probenbeschreibung	9
VI - 2.2	Probenvorbereitung	10
VI - 2.2.1	Bodenelution	10
VI - 2.2.2	Bodeneluatextraktion	10
VI - 2.3	Ökotoxikologische Testverfahren	13
VI - 2.3.1	<i>Pseudomonas putida</i> -Zellvermehrungshemmtest	13
VI - 2.3.2	<i>Vibrio fischeri</i> -Zellvermehrungshemmtest	17
VI - 2.3.3	<i>Scenedesmus subspicatus</i> Chlorophyll-Fluoreszenztest	20
VI - 2.4	Genotoxikologische Testverfahren	29
VI - 2.4.1	umu, NM2009-Test	29
VI - 2.4.2	Salmonella-Mikrosomen-Test (Ames Test)	38
VI - 2.5	Anmerkungen zu den Laborvergleichsuntersuchungen	39
VI - 2.5.1	Eluatansätze	39
VI - 2.5.2	Referenztoxene der Testorganismen	40
VI - 3	ERGEBNISSE	41
VI - 3.1	Physikalisch-chemische Charakterisierung der Bodeneluate	41
VI - 3.2	Ökotoxikologische Charakterisierung der Bodeneluate	44
VI - 3.2.1	Zellvermehrungshemmtest mit <i>Vibrio fischeri</i>	44
VI - 3.2.2	Zellvermehrungshemmtest mit <i>Pseudomonas putida</i>	52
VI - 3.2.3	Wachstumshemmtest mit <i>Scenedesmus subspicatus</i>	59
VI - 3.2.4	Zusammenfassung der ökotoxikologischen Daten	62
VI - 3.2.5	Referenztoxene:	65
VI - 3.3	Genotoxikologische Charakterisierung der Bodeneluate	70
VI - 3.3.1	umu-Test und NM-2009-Test	70
VI - 3.3.2	Salmonella-Mikrosomen-Reversionstest (Ames-Test)	74

VI - 4	FAZIT	76
VI - 4.1	Methodische Aspekte.....	76
VI - 4.1.1	Zellvermehrungshemmtests	76
VI - 4.1.2	Chlorophyll-Fluoreszenztest	77
VI - 4.1.3	Genotoxizitätstests.....	77
VI - 4.2	Zusammenfassende Beurteilung kontaminierter/sanierter Bodenproben mit ökotoxischen und genotoxischen Testverfahren	78
VI - 4.2.1	Zellvermehrungshemmtest	78
VI - 4.2.2	Lumineszenzhemmtest mit <i>Vibrio fischeri</i>	79
VI - 4.2.3	Chlorophyll-Fluoreszenztest	79
VI - 4.2.4	Genotoxizitätstests.....	81
VI - 5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	82

VI - 1 Einleitung

VI - 1.1 Kurzfassung des Berichts

Das wässrig extrahierbare ökotoxische und genotoxische Potenzial kontaminierter Bodenproben wurde mit miniaturisierten Testverfahren mit kinetischer Datenaufnahme untersucht. Dabei wurden die miniaturisierten Testverfahren ausgewählt, die bereits soweit entwickelt sind, dass sie sich für eine routinemäßige Anwendung zur Charakterisierung des wässrig extrahierbaren öko- und genotoxischen Potenzials von Böden eignen. Zur Bestimmung des toxischen Potenzials wurden zwei prokaryontische (*V. fischeri* Zellvermehrungshemmtest, *Pseudomonas putida* Zellvermehrungshemmtest) und ein eukaryontisches Testverfahren (*Scenedesmus subspicatus* Chlorophyll-Fluoreszenztest) eingesetzt. Das erbgutverändernde Potenzial wurde mit zwei bakteriellen Kurzzeitgenotoxizitätstests (umu- sowie NM 2009-Test mit *Salmonella typhimurium*) und einem bakteriellen Mutagenitätstest (variierter Ames-Test mit *Salmonella typhimurium*) erfasst. Die öko- und genotoxischen Testverfahren wurden von drei Institutionen gleichzeitig angewandt und mit kontaminierten Bodenproben validiert. Die Auswertung und Zusammenstellung der Daten erfolgte zentral am Institut für Hygiene und Umweltmedizin Aachen.

VI - 1.2 Anlass und Zielsetzung des Projekts

In dem beantragten Projekt sollten neuartige, miniaturisierte und automatisierbare ökotoxische und genotoxische Testverfahren, die im Rahmen eines von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt finanzierten Forschungsprojekts am Institut für Hygiene und Umweltmedizin Aachen entwickelt, optimiert sowie mit Referenztoxinen und Umweltpollen validiert wurden von drei Institutionen vergleichend zur toxikologischen Bewertung kontaminierter Böden eingesetzt werden. Gleichzeitig wurden die kontaminierten Böden mit den etablierten Testverfahren in Küvetten- bzw. Erlenmeyerkolbenmaßstab getestet. Die Leistungsfähigkeit der miniaturisierten Testverfahren soll demonstriert werden, und die Abweichungen von den etablierten Testverfahren sollen aufgezeigt bzw. minimiert werden. Aus den Ergebnissen werden Empfehlungen für die Probenaufbereitung, für die Modifikation der miniaturisierten Testverfahren für die Durchführung von Ringversuchen sowie für die Einbindung dieser Testverfahren in die bestehenden Normen abgeleitet.

VI - 1.3 Laborvergleich

Teilnehmer

Nach Erarbeitung der exakten Vorgehensweise zur Charakterisierung des ökotoxischen und genotoxischen Potenzials von Bodenproben mit den miniaturisierten Testverfahren werden im Rahmen der Laborvergleichsuntersuchungen acht kontaminierte Bodenproben parallel getestet. Im folgenden sind die Teilnehmer des Laborvergleichs mit ihren entsprechenden Kürzeln aufgeführt.

- Institut für Hygiene und Umweltmedizin, Universitätsklinikum Aachen: IHU
- Fraunhofer Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie: FhG
- Deutsche Montan Technologie GmbH: DMT

Vorgehensweise

Im Gegensatz zu der Durchführung eines Ringtests, bei dem alle Teilnehmer gleiche Proben bzw. Proben mit definierten Kontaminationen erhalten, aber mit den eigenen Methoden und Messgeräten das gleiche Ergebnis erzielen sollten, wurde im Laborvergleich besonderer Wert auf die hohe Übereinstimmung der Geräteausstattung und der Testverfahren gelegt. Das bedeutete, eine Voraussetzung für den Laborvergleich war neben der Ausstattung der Institutionen mit den gleichen Messgeräten die Anwendung der gleichen Methoden. Während eines Ringtests werden keine zeitliche Absprachen bezüglich der Untersuchung der Proben vorgenommen, lediglich ein zeitlicher Rahmen, bis zu dem die Ringtest-Ergebnisse vorliegen müssen, ist abgesteckt. Bei den Laborvergleichsuntersuchungen hingegen wurde neben der schon erwähnten Übereinstimmung der Testverfahren und der Geräteausstattung auch die zeitliche Durchführung der Untersuchungen für alle Teilnehmer einheitlich festgelegt.

Zu diesem Zweck war es notwendig, etablierte Testverfahren einzusetzen. Das IHU Aachen hat im Rahmen verschiedener Projekte miniaturisierte Testsysteme etabliert. Im Rahmen dieser Laborvergleichsuntersuchungen konnten somit definierte Methoden vom IHU vorgegeben werden.

Der Erfolg der Laborvergleichsuntersuchungen war abhängig von der Einweisung der Mitarbeiter der beteiligten Partner (FhG, DMT) in die für diese Institutionen teilweise neuen Testverfahren. Die Einweisung der Mitarbeiter (FhG, DMT) erfolgte zentral durch das IHU Aachen und umfasste die Einarbeitung in die Methoden, den Umgang mit den Messgeräten und die zeitlichen Abläufe zur Durchführung der Testverfahren in der geplanten Zeitspanne von 5 bis 7 Werktagen. Für die Dauer der Einweisung vom IHU wurde eine Zeitspanne von

zwei Wochen eingeplant. Für die Durchführung der Testverfahren bei den Partnern vor Ort (FhG, DMT) war die Beschaffung der entsprechenden Messgeräte notwendig. Für die Zellvermehrungshemmtest mit *Vibrio fischeri* und *Pseudomonas putida* und die Genotoxizitätstests mit *Salmonella typhimurium* wurden Mikrotitrationsplatten-Reader der Firma Labsystems (iEMS-Reader) leihweise zur Verfügung gestellt bzw. käuflich erworben. Für den Chlorophyll-Fluoreszenztest mit *Scenedesmus subspicatus* wurde der Mikrotitrationsplatten-Reader SPECTRAfluor plus der Firma Tecan zur Verfügung gestellt. Anschließend galt es, bei den Projektpartnern (FhG, DMT) die Methoden und Messgeräte zu etablieren. Um die Übereinstimmung der Messdaten zu gewährleisten, wurden dazu von dem IHU Vorgaben zur Einstellung der Messparameter festgelegt, so dass Temperierungs- und Schütteleinrichtungen ebenso abgeglichen werden mussten wie die Softwareeinstellung.

Nach erfolgreicher Etablierung der Methoden bei FhG und DMT wurde zentral von dem Fraunhofer Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie (FhG) der Versand der Bodenproben (siehe Tabelle VI - 1) veranlasst, so dass alle Teilnehmer die Bodenproben gleichzeitig erhielten. Bis zum Beginn der Untersuchungen wurden die Bodenproben bei allen Teilnehmern bei 4°C im Dunkeln zwischengelagert. In Absprache mit DMT und FhG wurde vom IHU zentral ein Zeitplan zur Charakterisierung der Bodenproben erarbeitet. Besonderer Wert wurde darauf gelegt, dass die Bodencharakterisierung von der Eluatherstellung bis zur Testdurchführung parallel bei allen Teilnehmern stattfand.

Im ersten Untersuchungs-Zeitraum wurden die Eluate hergestellt und öko- und genotoxisch charakterisiert. Dabei wurden von je zwei Böden gleichzeitig Eluate hergestellt und innerhalb von 5 bis 10 Arbeitstagen in die biologischen Testverfahren eingesetzt. Um auch geringe Konzentrationen an erbgutverändernden Substanzen in Bodeneluat zu erfassen zu können, wurden im zweiten Untersuchungszeitraum wässrige Eluate ausgewählter Bodenproben mittels Festphasenextraktion konzentriert und als 4%ige DMSO-Lösungen genotoxisch charakterisiert. Nach Abschluss der Bodencharakterisierung wurden die Ergebnisse der Projektpartner zentral am IHU ausgewertet.

Das aufgeführte Schema veranschaulicht den Projektablauf.

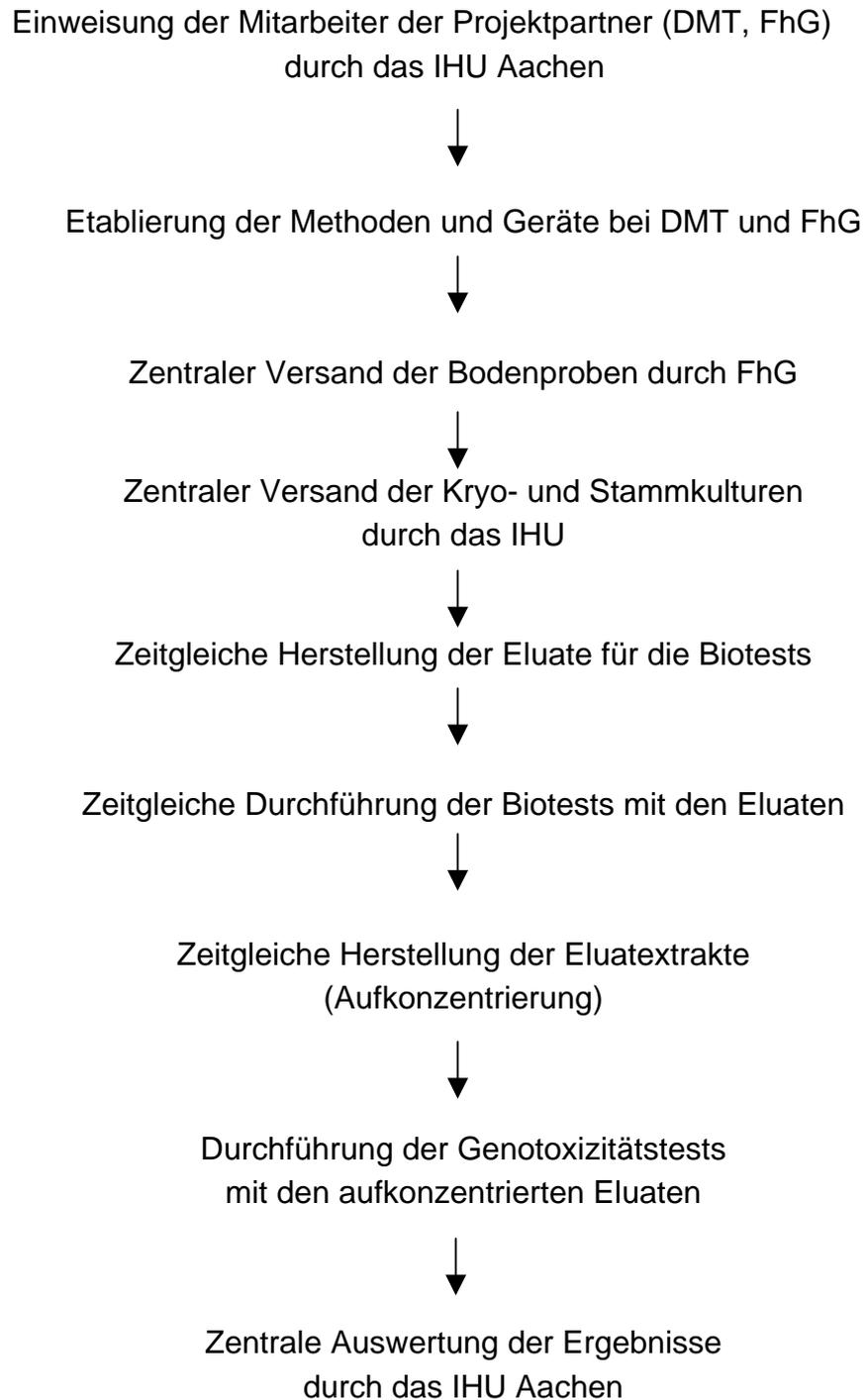


Abbildung VI - 1: Projektablauf

VI - 2 Methodik

VI - 2.1 Probenbeschreibung

Die verwendeten Bodenproben haben je nach Ursprungsort verschiedene Hintergrundbelastungen. Die charakteristischen Eigenschaften der Böden wurden vom FhG ermittelt. Die folgende Tabelle fasst die verschiedenen Merkmale der Bodenproben zusammen.

Tabelle VI - 1: Eigenschaften der untersuchten Bodenproben

Bezeichnung	Hauptkontamination	Weitere Kennzeichen	WHK _{Max} [mL/kg]	TOC [%]	pH
Iserlohn	KW, PAK	Ölschaden (angeschütteter Haufen)	242	5,9	7,5
Gaswerk 1:2	PAK, KW	Untergrund einer ehemaligen Teergrube eines Gaswerks	269	1,7	5,6
Landhausen	KW, Schwermetalle	Schlammdeponie (Dreiecksmiete)	348	8,5	7,3
PAK-Mix	PAK	k. A.	n. b.	3,9	8,1*
Sickergraben	TNT	Sandboden mit hohem Organikanteil	511	6,2	6,5*
Neuohe	Schwermetalle (Zink)	Sandboden, punktuell militärische Altlast (Munitionsabbrand)	421	2,1	8,2*
IMA SM 66	KW	Sandboden, saniert	285	0,8	n. b.
IMA 927 B	KW	Schluff-Boden, saniert	407	0,5	8,2*

* Messungen von Vorproben, die nicht mit der Hauptprobe übereinstimmen müssen, KW = Kohlenwasserstoff, PAK = Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen, TNT = 2,4,6-Trinitrotoluol; k. A. = keine Angaben, n. b. = nicht bestimmt

VI - 2.2 Probenvorbereitung

VI - 2.2.1 Bodenelution

Zur Herstellung des Bodeneluates werden 500 g Boden (TG) in zwei 1-L-Duran[®]-Glasflaschen mit teflonkaschierten Deckeln im Verhältnis 1:2 mit Aqua bidest. versetzt. Die Bodensuspension wird 24 Stunden bei ca. 10 UpM überkopf geschüttelt (GFL-Überkopfschüttler 3040). Anschließend wird das Eluat 20 min. bei 10000 UpM zentrifugiert (Heraeus Cryofuge 20-3) und über Glasfaserfilter (Macherey + Nagel, MN GF-5, Ø 5,5 cm, Cat. No. 221195) abfiltriert. Nach der Filtration wird die Trübung des Eluates nach EN 27027 gemessen. Diese Vorgehensweise zur Herstellung der Bodeneluate wurde von dem Institut für Hygiene und Umweltmedizin Aachen vorgegeben. Abweichend davon wurden bei DMT die Eluate mit ca. 25 UpM überkopf geschüttelt und das Eluat anschließend bei 25000 UpM zentrifugiert.

Da für ökotoxische Tests in der Regel die Bioverfügbarkeit der an Partikel gebundenen Schadstoffe sehr gering gegenüber dem gelösten Schadstoffanteil ist, ist das Testergebnis nicht deutlich von der Trübung abhängig. Daher können für ökotoxische Tests Eluate mit einer Trübung < 50 FNU eingesetzt werden. Dies trifft natürlich für die chemische Charakterisierung nicht zu. Daher sollte hier die Trübung 10 FNU Einheiten nicht übersteigen. Falls die gesamte Probe über 50 FNU liegt, empfiehlt sich eine zusätzliche Zentrifugation bei höherer g-Zahl (z.B. 20.000 g für eine Stunde). Ist eine solche Zentrifuge nicht vorhanden, kann auf eine Sandwichfiltration mit Glasfasermikrofilter (0.45 µm) und regenerierter Zellulose (0.45 µm) zurückgegriffen werden.

Liegt die Probe zwischen 10 und 50 FNU, so wird nur die Teilprobe für die Analytik weiter behandelt.

Der pH-Wert des Bodeneluates wird mit einer pH-Elektrode bei gleichzeitiger Temperaturmessung bestimmt. Die Leitfähigkeit wird mit einer Elektrode gemessen. Die Eluate werden maximal eine Woche bei 4° C im Kühlraum gelagert.

Zur Bestimmung des Trockengewichtes (TG) werden trockene, leere Porzellantiegel gewogen, mit 10 g gesiebttem, naturfeuchtem Boden befüllt und erneut gewogen. Die eingewogenen Bodenproben trocknen über Nacht bei 105° C im Trockenschrank. Nach dem Abkühlen werden die Tiegel erneut gewogen und auf das Gewicht vor der Trocknung der Bodenprobe bezogen. Zwei Parallelen sind für die Bestimmung des Trockengewichts ausreichend.

VI - 2.2.2 Bodeneluatextraktion

Die organischen Bestandteile der Bodeneluate werden mit Hilfe einer Festphasenextraktion konzentriert. Als Sorbens dient Serdolit[®] PAD-1 p. A. (Boehringer Ingelheim 42442). Aus

375 mL wässrigem Bodeneluat wird ein 1 mL 100 %iges DMSO-Extrakt hergestellt. Vor dem Einsatz der Konzentrate in die jeweiligen Genotoxizitätstests muss dieses reine DMSO Extrakt auf eine Endkonzentration von 4 % DMSO verdünnt werden, wodurch sich ein Konzentrationsfaktor von 15 bezogen auf das Bodeneluat ergibt.

VORBEREITUNG VON SERDOLIT® PAD-1

Bevor das Sorbens zur Konzentrierung des Bodeneluates eingesetzt werden kann, wird es über mehrere Schritte aufbereitet. Zur Entfernung von anorganischen Verunreinigungen wird das Sorbens im Verhältnis 1:5 mit 10 %iger Salzsäure gemischt und für zwei Stunden unter leichtem Erwärmen gerührt. Eine sichtbare Verunreinigung erfordert die Wiederholung des Arbeitsschrittes. Anschließend wird das Sorbens mit einem Scheidetrichter von der Flüssigkeit getrennt, im entsprechenden Verhältnis mit Millipore® Wasser gemischt und für weitere zwei Stunden unter Erwärmung gerührt. Danach wird das Millipore® Wasser abgetrennt und das gesamte Verfahren mit 10 %iger Natronlauge wiederholt. Nach dem letzten Arbeitsschritt wird das Sorbens im Trockenschrank über Nacht bei 110° C getrocknet.

Zur Entfernung von organischen Verunreinigungen wird das getrocknete Sorbens mit Pentan/Aceton im Verhältnis 2:1 für 16 Stunden an einer Soxhletapparatur gekocht und abschließend im Trockenschrank bei 110° C getrocknet.

FESTPHASENEXTRAKTION

Alle verwendeten Glasgeräte und Glasfaserfilter sind vor dem Gebrauch mit Pentan/Aceton im Verhältnis 2:1 gereinigt.

10 g des vorbehandelten PAD-1 werden über Nacht, in einem Enghals-Erlenmeyerkolben verschlossen mit einem Glasschliffstopfen, in 25 mL Methanol konditioniert.

Das konditionierte Sorbens, einschließlich der Solvatisierungsflüssigkeit, wird zusammen mit 375 mL Bodeneluat in eine 1 L-Duran® Glasflasche gegeben. Die Flasche wird mit einem teflonkaschiertem Deckel verschlossen. Dieser Ansatz muss für 2,5 Stunden auf einem GFL 3040 Überkopfschüttler bei 10 UpM (DMT: 25 UpM) gedreht werden. Anschließend lässt man das Sorbens sedimentieren und verwirft den Überstand.

Das Sorbens wird in einem Baker-spe-10-System mit 25 oder 50 mL Borosilkglasspritzen an deren Boden ein Glasfaserfilter gelegt wird, überführt und einmal mit Millipore® Wasser gespült. Das aufgefangene PAD-1 trocknet über Nacht unter Lichtausschluss und in einer Schutzgasatmosphäre unter Wasserstrahlvakuum.

Die Elution erfolgt mit einem Dichlormethan/Methanol-Gemisch im Verhältnis 10:1. Der Lösungsmittelbedarf liegt zwischen 25 mL und 40 mL. Die Tropfgeschwindigkeit sollte einen Tropfen pro Sekunde nicht überschreiten. Das so gewonnene Extrakt wird in einem 25 mL-

Schraubdeckelgefäß mit Teflonseptum (SFE-723 Vials, Dionex 214480) aufgefangen und im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.

Das gesamte Extrakt wird einen Tag vor der Genotoxizitätsprüfung mit 1 mL 100 %igem DMSO versetzt und anschließend unter Stickstoffatmosphäre auf ein Endvolumen von 1 mL eingedampft. Der DMSO-Extrakt wird im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.

Für Genotoxizitätstests wird ein Aliquot der Probe entnommen und mit Millipore® Wasser eine DMSO Konzentration von 4 % eingestellt.

Abbildung VI - 2 gibt eine Übersicht über den Ablauf der Festphasenextraktion

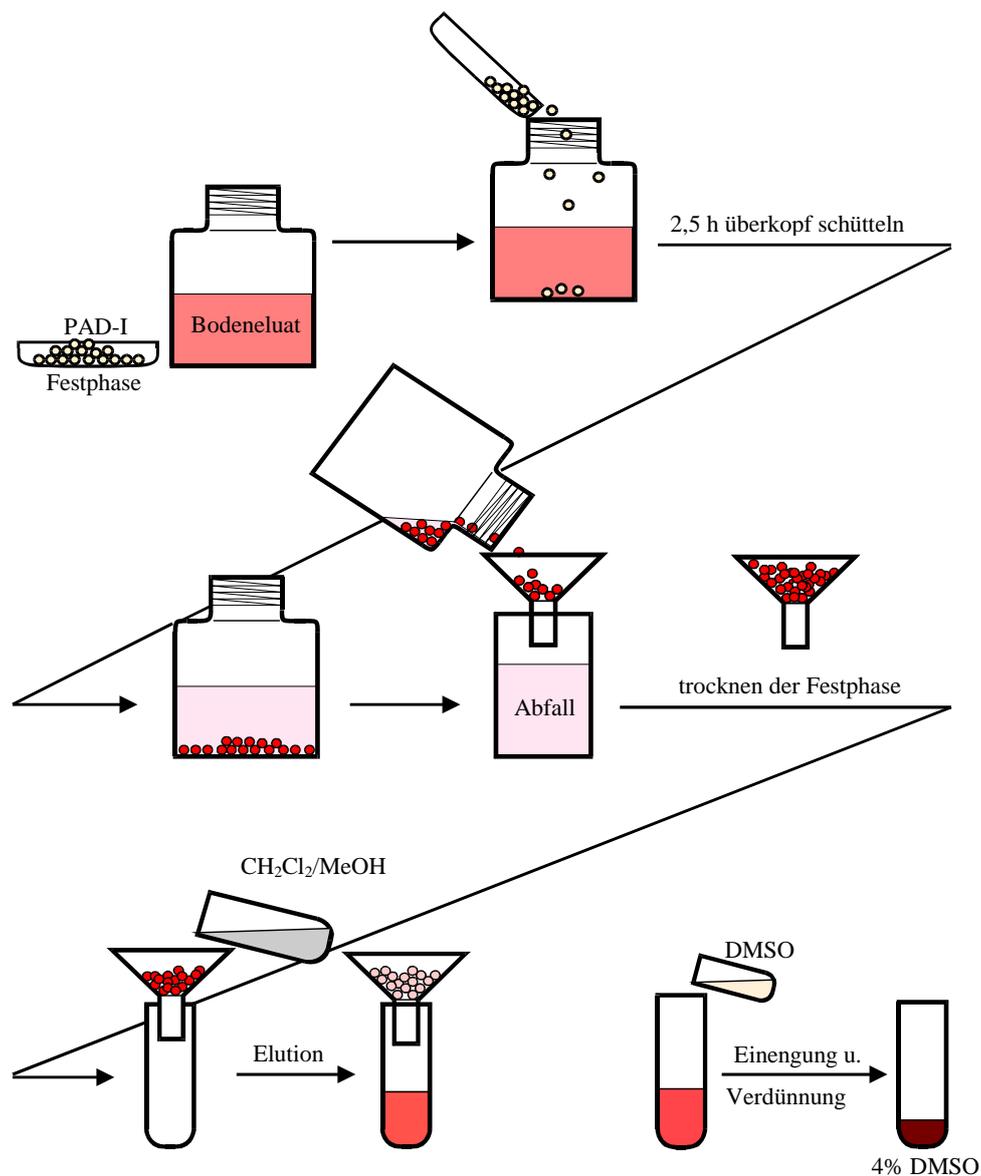


Abbildung VI - 2: Festphasenextraktion mit Serodolit PAD 1 für die Bestimmung des wässrig extrahierbaren genotoxischen Potenzials (Ablauf)

VI - 2.3 Ökotoxikologische Testverfahren

VI - 2.3.1 *Pseudomonas putida*-Zellvermehrungshemmtest

Testverfahren

PRINZIP:

Das Maß für die Toxizität eines Testgutes in diesem Testsystem ist die Hemmung der Zellvermehrung bei dem Organismus *P. putida*. Der Test wird nach DIN 38412 L 8, Erweiterung für Mikrotitrationsplatten, durchgeführt. Bis zum Erreichen des Auswerteendpunktes (gemäß DIN 38412 L 8 oder in der frühstationären Phase) wird die optische Dichte des Testansatzes in 20 Minuten-Intervallen gemessen. Da die Zunahme der Zellzahl in einem definierten Bereich mit einer Steigerung der optischen Dichte korreliert, gilt diese als Maß für die Zellvermehrung der Bakterien.

DURCHFÜHRUNG:

Die Mikroorganismen (*Pseudomonas putida* DSM 50026) werden als Glycerin-Kryokulturen von dem IHU gemäß DIN 38412 L 8 (1991) hergestellt und in Trockeneis gelagert an die Teilnehmer des Laborvergleichs versendet. Zur Rekonstituierung werden die Kryokulturen bei Raumtemperatur aufgetaut und mit Vorkulturmedium 1:10 (1 mL Kryokonserven + 9 mL Nährmedium 1x) verdünnt, um einen Wert von 50 Trübungseinheiten in den Kavitäten der Mikrotitrationsplatte zu erhalten. In dieser Verdünnung können die Bakterien in den Test eingesetzt werden.

Die Bodeneluatate werden mit A. bidest verdünnt. Ist eine duale Verdünnungsreihe gewünscht, kann diese sofort auf der Mikrotiterplatte hergestellt werden, indem in die Kavitäten der B-Reihe je 200 µl der Probe gegeben und in die Reihen C bis G pro Kavität 100 µl A. bidest vorgelegt werden. Anschließend werden aus der B-Reihe je 100 µl in die C-Reihe überpipetiert, gemischt und dieses Procedere bis zur Reihe G durchgeführt. Aus dieser letzten Probenverdünnungsreihe G müssen nach dem Mischen wieder 100 µl entnommen und verworfen werden, um das Volumen von 100 µl Probenverdünnung pro Kavität wieder herzustellen.

Die Belegung der Mikrotitrationsplatte mit den verschiedenen Ansätzen ist in Abbildung VI - 3 schematisch dargestellt.

Testansätze mit 6 Verdünnungsstufen von 4 Proben, je 3 Parallelen

- Wachstumskontrollen ohne Testgut, 12 Parallelen
- Blindwerte ohne Bakterien mit der niedrigsten Verdünnungsstufe jeder Probe, je 2 Parallelen
- Blindwerte ohne Testgut und ohne Bakterien, 4 Parallelen

Abbildung VI - 3 zeigt das Plattenlayout zur Durchführung des Tests.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Wachstums- kontrollen			Wachstums- kontrollen			Wachstums- kontrollen			Wachstums- kontrollen		
B	Probe 1 1:2			Probe 2 1:2			Probe 3 1:2			Probe 4 1:2		
C	1:4			1:4			1:4			1:4		
D	1:8			1:8			1:8			1:8		
E	1:16			1:16			1:16			1:16		
F	1:32			1:32			1:32			1:32		
G	1:64			1:64			1:64			1:64		
H	BW + TG	BW - TG		BW + TG	BW - TG		BW + TG	BW - TG		BW + TG	BW - TG	

Abbildung VI - 3: Belegung der Mikrotitrationsplatte für den *P. putida* Zellvermehrungshemmtest (Wachstumskontrollen: Nährmedium, Verdünnungswasser und Inokulum; Testansatz: Testgut, Nährmedium, Verdünnungswasser und Inokulum; BW + TG: Nährmedium, Verdünnungswasser und Testgut; BW - TG: Nährmedium und Verdünnungswasser).

Gemäß Tabelle VI - 2 werden Nährmedium (10x) und Verdünnungswasser in den entsprechenden Mengen hinzupipettiert. Das Gesamtvolumen des Testansatzes pro Well beträgt 200 µl:

Tabelle VI - 2: Zusammensetzung der Testkomponenten in dem *P. putida*-Wachstumshemmtest

	Testansatz	Wachstumskontrolle	Blindansatz mit Testgut	o. T.
Testgut	100 µl	-	100 µl	-
Nährmedium 10x	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Verdünnungswasser*	60 µl	160 µl	80 µl	180 µl
Inokulum	20 µl	20 µl	-	-

*Aqua bidest.; o. T. = ohne Testgut

Nach Zugabe des Inokulums wird der Test am iEMS-Reader gestartet. In der Regel haben die Wachstumskontrollen nach 22 bis 25 Stunden ihre stationäre Phase erreicht und der Test kann manuell beendet werden.

Messgerät und Einstellungen:

Das Bakterienwachstum wird über die optische Dichte der Zellsuspensionen verfolgt. Diese wird als Extinktion bei 450 nm (OD_{450}) mit einem rechnergesteuerten Mikrotitrationsplatten-Photometer (iEMS-Reader[®], Labsystems, Finnland) mit Inkubations- und Schüttelmöglichkeit gemessen. Mit den Geräten können sowohl Einzelmessungen als auch kinetische Datenaufnahmen durchgeführt werden. Die Geräte befinden sich unter Inkubationshauben (15 - 17°C, Multitron[®], Infors, Einsbach). Zur Gerätesteuerung und Datenaufnahme wurde ein von Reinke [1996] an der TU Berlin, Fachgebiet Hygiene, entwickeltes Programm auf einem IBM-AT-kompatiblen Rechner eingesetzt.

In Tabelle VI - 3 sind die Einstellungen zur Durchführung des *P. putida* Wachstumshemmtest aufgelistet.

Tabelle VI - 3: Einstellungen für einen *P. putida* Wachstumshemmtest mit dem iEMS-Reader

Parameter	Einstellung
Temperatur:	21 °C
Filter:	450 nm
Messintervall:	20 min
Schüttelfrequenz:	1200 U/min
Schütteldauer vor der Messung:	30 s
Schütteldauer pro Schüttelperiode:	≤ 30 s (≤ 25 % Gesamtmesszeit)
Schüttelperioden/Messintervall:	10
Messzeit:	≤ 30 h

Auswertung:

Wenn der Auswertzeitpunkt nicht anders bestimmt wurde, wird die Datenaufnahme automatisch nach 30 h abgebrochen, da im Verlauf dieses Zeitraums die stationäre Phase des Bakterienwachstums erreicht ist. Ein *Pseudomonas putida* Wachstumshemmtest ist nach DIN 38412 L 8 gültig, wenn sich die Ausgangstrübung im Kontrollansatz von 5 TE/F innerhalb der Testzeit um mindestens das 100fache erhöht hat, was sechs bis sieben Generationszyklen entspricht.

Abweichend von den Vorgaben der DIN 38412 L 8, gemäß der eine Endpunktauswertung der Messdaten stattfindet, erfolgt bei allen miniaturisierten Hemmtests eine kinetische Datenaufnahme mit Mikrotitrationsplattenreadern über den gesamten Messzeitraum. Dies ermöglicht die Beobachtung der Wachstumsverläufe der Bakterien gegenüber potentiellen Toxinen

während der verschiedenen Wachstumsphasen (lag-, log-, stationäre-Phase). So werden Effekte wie Wachstumsförderung und untypische Wachstumsverläufe der Kontrollen ermittelt und entsprechend in der Auswertung berücksichtigt. Zudem bietet die kinetische Datenaufnahme die Möglichkeit je nach eingesetzter Bakterienkultur (Kryokonserven, frisch angezüchtete Bakterien), die unterschiedlichen Lag-Phasen durch Anpassung des Auswertepunkts zu berücksichtigen. Dadurch lassen sich zusätzliche Informationen zum Hemmverlauf gewinnen, die den Informationsgehalt der Endpunktauswertung ergänzen. Neben der Endpunktauswertung kann nach kinetischer Datenaufnahme auch eine Integralauswertung erfolgen. Sie lässt eine differenzierte Kurvendiskussion und Aussagen über antagonistische und synergistische Effekte von Inhaltsstoffen komplexer Proben zu.

Material:

Die miniaturisierten bakteriellen Zellvermehrungshemmtests werden in 96-Well-Mikrotitrationsplatten aus transparentem Polystyrol (PS) angesetzt.

Kryokonserven des Bakterienstamms der Spezies *Pseudomonas putida* (Familie Pseudomonadaceae) DSM 50026

Medien:

Die in Tabelle VI - 4 aufgelisteten Medien werden für die Zellvermehrungshemmtests mit dem Teststamm *P. putida* verwendet.

Tabelle VI - 4: Medien für den Zellvermehrungshemmtest mit *P. putida* [DIN 38412 L 8, März 1991]

	Hersteller, Qualität, Bestell-Nr.	Lösung I	Lösung II	Lösung III	Lösung IV
NaNO ₃	Merck, p. a., 6537	10,0 g	10,0 g		
K ₂ HPO ₄	Merck, w. r., 5101	2,4 g	2,4 g		
KH ₂ PO ₄	Merck, p. a., 4873	1,2 g	1,2 g		
Hefeextrakt	Difco, 0127-17-9	1,0 g			
D(+)-Glukose-Monohydrat	Merck, b. Z., 4074			44,0 g	
MgSO ₄ * 7H ₂ O	Merck, p. a., 5886				4,0 g
Eisencitrat*	Serva, pure, 20195				0,01 g
Aqua bidest.		ad 500 mL	ad 500 mL	ad 500 mL	ad 1000 mL

p. a. = pro analysi, w. r. = wasserfrei reinst, b. Z. = für biochemische Zwecke, *gekörnt, ω (Fe) ≅ 19 %

Alle Lösungen werden 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert und bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Zusätzlich wird die Lösung IV zur Lösung des Eisencitrats vor dem Autoklavieren ü/N gerührt bzw. mehrere Stunden unter rühren > 50 °C erhitzt. Die Lösungen sind, bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt, mehrere Monate haltbar.

Die Ansätze für das Vorkultur- und das Testmedium werden aus den 4 Einzellösungen unter sterilen Bedingungen in folgenden Verhältnissen hergestellt:

<u>Vorkulturmedium</u>		<u>Testmedium (10x)</u>	
Aqua bidest. (steril)	900 mL	Lösung II (steril)	25 mL
Lösung I (steril)	25 mL	Lösung III (steril)	25 mL
Lösung III (steril)	25 mL	Lösung IV (steril)	50 mL
Lösung IV (steril)	50 mL		

Das Vorkultur- und das Testmedium werden bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Das Vorkulturmedium ist etwa einen Monat verwendbar, während das Testmedium wesentlich schlechter haltbar ist und es regelmäßig zu Ausfällungen kommt. Daher sollte das Testmedium wöchentlich neu aus den Einzellösungen zusammengestellt werden.

Das Nährmedium für die Stammkultur (Schrägagar) setzt sich zusammen aus:

Stammkulturmedium

Lösung I	50 mL
Lösung III	125 mL
Lösung IV	100 mL
Agar	15 - 18 g

Die Komponenten werden in Aqua bidest. unter Erhitzen gelöst und nach Lösen mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt. Anschließend werden die Lösungen 20 min. bei 121 °C autoklaviert. Die flüssige Nährlösung wird mit Hilfe des Agarmaten Tecnomat 125 (Fa. Tecnomara, Zürich, Schweiz) zu 7-8 mL in 10 mL Schrägagarröhrchen gefüllt. Die Schrägagarröhrchen werden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

VI - 2.3.2 *Vibrio fischeri*-Zellvermehrungshemmtest

Testverfahren

PRINZIP:

Das Testkriterium bei diesem Testverfahren ist die Wachstumshemmung des marinen Leuchtbakteriums *V. fischeri*. Der Test wird analog dem *P. putida*-Wachstumshemmtest im Mikrotitrationsplattenmaßstab durchgeführt. Über einen Zeitraum von maximal 30 Stunden wird die optische Dichte der Testansätze in den einzelnen Kavitäten in 20 Minuten-Abständen gemessen. Die optische Dichte ist auch in diesem Test die Grundlage für die Detektion

der Zellvermehrung des Testbakteriums. Der *V. fischeri*-Wachstumshemmtest wird gemäß DIN-Entwurf, Stand März 1995 durchgeführt.

DURCHFÜHRUNG:

Die Mikroorganismen (*Vibrio fischeri* DSM 7151 (NRRLB-11177)) werden als Frischzellen oder als Glycerin-Kryokulturen im Test eingesetzt. Im Rahmen der Laborvergleichsuntersuchungen werden die Mikroorganismen als Glycerin-Kryokulturen von dem IHU gemäß DIN 38412 L 37 (Entwurf 1995) hergestellt und in Trockeneis gelagert an die Teilnehmer des Laborvergleichs versendet. Zur Rekonstituierung werden die Kryokulturen (1 mL) bei Raumtemperatur (20 ± 2 °C) 3-5 min aufgetaut und mit Nährmedium (1x, 4mL) homogen gemischt, um einen Wert von 100 Trübungseinheiten in den Kavitäten der Mikrotitrationsplatte zu erhalten. In dieser Verdünnung können die Bakterien als Inokulum eingesetzt werden. Die Verdünnung der Eluate und die Belegung der Mikrotitrationsplatte entspricht der des Zellvermehrungshemmtest mit *P. putida* (Kapitel VI - 2.3.1).

Der Test wird wie der *P. putida*-Wachstumshemmtest in Mikrotitrationsplatten mit einem maximalen Füllvolumen von 200 µl angesetzt. Die Belegung der Mikrotitrationsplatte wird analog zu dem in Abbildung VI - 3 dargestelltem Plattenlayout ausgeführt.

Gemäß Tabelle VI - 5 werden Nährmedium (5x), Verdünnungswasser und Inokulum in den entsprechenden Mengen pipettiert. Das Gesamtvolumen des Testansatzes pro Well beträgt 200 µl.

Tabelle VI - 5: Zusammensetzung der einzelnen Testkomponenten im *V. fischeri*-Wachstumshemmtest

	Testansatz	Wachstumskontrolle	Blindansatz mit Testgut	o. T.
Testgut	100 µl	-	100 µl	-
Nährmedium 5x	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl
Verdünnungswasser*	40 µl	140 µl	60 µl	160 µl
Inokulum	20 µl	20 µl	-	-

*2 %ige NaCl-Lösung; o. T. = ohne Testgut

Nach Zugabe des Inokulums wird der Test am iEMS-Reader gestartet. In der Regel haben die Wachstumskontrollen nach 10 bis 12 Stunden ihre stationäre Phase erreicht und der Test kann manuell beendet werden.

Messgerät und Einstellungen

Einzelheiten zu dem iEMS-Reader sind dem Kapitel VI - 2.3.1 zu entnehmen.

Die Einstellungen zur Durchführung eines *V. fischeri*-Wachstumshemmtests sind in Tabelle VI - 6 aufgelistet.

Tabelle VI - 6: Einstellungen für einen *V. fischeri*-Wachstumshemmtest mit dem iEMS-Reader

Parameter	Einstellung
Temperatur:	20 °C
Filter:	450 nm
Messintervall:	20 min
Schüttelfrequenz:	1200 U/min
Schütteldauer vor der Messung:	30 s
Schütteldauer pro Schüttelperiode:	≤ 30 s (≤ 25 % Gesamtmesszeit)
Schüttelperioden/Messintervall:	10
Messzeit:	≤ 30 h

Auswertung:

Wenn der Auswertzeitpunkt nicht anders bestimmt wurde, wird die Datenaufnahme automatisch nach 30 h abgebrochen, da im Verlauf dieses Zeitraums die stationäre Phase des Bakterienwachstums erreicht ist. Ein *Vibrio fischeri*-Wachstumshemmtest ist gültig, wenn sich die Ausgangstrübung im Kontrollansatz von 10 TE/F innerhalb der Testzeit um mindestens das 10fache erhöht hat, was drei bis vier Verdopplungsschritten entspricht [DIN-Entwurf, März 1995].

Material:

Siehe Kapitel VI - 2.3.1

Medien:

Die Medien für die Zellvermehrungshemmtests mit dem Teststamm *V. fischeri* sind in Tabelle VI - 7 aufgeführt:

Tabelle VI - 7: Medien für den Zellvermehrungshemmtest mit *V. fischeri* [DIN-Entwurf, März 1995; modifiziert]

	Hersteller, Qualität, Bestell-Nr.	5 x konzentriert	1 x konzentriert	Nährboden für Stamm- Kultur
NaCl	Merck, p. a., 6404	100,0 g	20,0 g	20,0 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	Merck, p. a., 5886	1,0 g	0,2 g	2,5 g
Glycerin	Merck, w. r., 4093	15,0 mL	3,0 mL	5,0 mL
Bacto Trypton	Difco, 0123-17-3	20,0 g	4,0 g	8,0 g
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	Serva, 48600	5,0 g	1,0 g	2,0 g
Hefeextrakt	Difco, 0127-17-9	2,5 g	0,5 g	1,0 g
Bacto Agar	Difco, 0140-01			15,0 g
Aqua bidest.		ad 1000 mL	ad 1000 mL	ad 1000 mL

p. a. = pro analysi, w. r. = wasserfrei reinst

Die Reagenzien werden bei der Herstellung der jeweiligen Lösung nacheinander in 700 mL Aqua bidest. gelöst. Der pH-Wert wird mit 1 mol/L HCl bzw. 1 mol/L NaOH auf $7,2 \pm 0,2$ eingestellt. Im Anschluss wird auf 1000 mL mit Aqua bidest. aufgefüllt und die entsprechende Lösung bei 121 °C autoklaviert. Die flüssige Nährlösung für die Stammkultur wird mit einem Agarmat (Tecnomat 125) auf Petrischalen gegeben. Sowohl die Lösungen als auch der Stammkulturnährboden sind bei 4 °C im Dunkeln über mehrere Monate lagerfähig. Die Nährmedien sind etwa zwei bis drei Monate verwendbar und sollten nach Ablauf dieses Zeitraums neu hergestellt werden.

VI - 2.3.3 *Scenedesmus subspicatus* Chlorophyll-Fluoreszenztest

Testverfahren:

PRINZIP:

Als Testorganismus wird in diesem Test die zumeist einzellig vorkommende Grünalge *Scenedesmus subspicatus* CHODAT eingesetzt. Die Algen werden unter festgelegten Bedingungen in einem definierten Nährmedium in verschiedenen Verdünnungsstufen des Testgutes über mehrere Generationen kultiviert. Für den Test, der 72 Stunden dauert, werden Algen benötigt, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden.

Testkriterium ist die Hemmung der Biomasseproduktion nach Exposition gegenüber einem Testgut. Die Hemmwirkung ergibt sich aus dem Vergleich der Zellvermehrung mit und ohne Einwirkung des Testgutes. Als Maß für die Algenbiomasse gilt die Chlorophyll-Fluoreszenz. Der Test wird in Mikrotitrationsplatten in Anlehnung an DIN 38 412 Teil 33 [1991] in bzw. EN28692 L9/ISO 8692 durchgeführt.

DURCHFÜHRUNG:

Stammkultur:

Die Kultivierung der Testalge *S. subspicatus* wird gemäß der DIN-Vorschrift [DIN 38412, Teil 33, 1991] durchgeführt. Die Stammkultur wird jede Woche, spätestens jedoch alle 10 Tage, in frisches Medium überimpft. Für die Kulturhaltung werden sterile 250-mL-Enghals-Erlenmeyerkolben verwendet, die mit Wattestopfen verschlossen sind. In 100 mL des frischen Nährmediums werden 1 mL der 7 bis 10 Tage alten Stammkultur überführt.

Bei der wöchentlichen Überimpfung der Stammkultur werden die Kulturen auf eine mögliche Bakterienkontamination überprüft. Dazu werden 0,1 mL der alten Stammkultur auf R2A-Agar ausgespatelt und bei 25 °C im Brutschrank inkubiert. Ist nach ca. 5 bis 10 Tagen keine Kolonie auf den Agarplatten gewachsen, wird angenommen, dass die Algensuspension bakterienfrei ist.

Vorkultur:

Drei Tage vor Beginn eines Tests wird die Anzucht des Impfmateri als vorbereitet, damit sich die Algen beim Einsatz in den Test in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Zu diesem Zweck wird die Zellzahl der Stammkultur mit Hilfe einer NEUBAUER-Zählkammer bestimmt. Die Kammer wird mit der Algensuspension befüllt. Es werden 6 Zentralquadrate à je 16 Gruppenquadraten ausgezählt. Die Neubauer-Zählkammer ist 0,1 mm tief, und ein Gruppenquadrat hat eine Seitenlänge von 0,2 mm, d.h. eine Fläche von 0,04 mm². Das Volumen eines Gruppenquadrates beträgt also 4·10⁻⁶ mL.

Formel für die Berechnung der Algendichte:

$$\text{Zelldichte} = \frac{\sum Z_Z}{n_Z \cdot n_G \cdot V_G} \quad \text{Gleichung VI - 1}$$

- Z_Z: Zellzahl in den Zentralquadraten
- n_Z: Anzahl der Zentralquadrate
- n_G: Anzahl der Gruppenquadrate pro Zentralquadrat
- V_G: Volumen eines Gruppenquadrates

Die Stammkulturen (beim Ansetzen von Vorkulturen) bzw. Vorkulturen (zum Einsatz in den Test) werden mit Millipore®-Wasser auf eine Algendichte von 10⁵ Zellen/mL verdünnt.

Die Vorkulturen werden in sterilen 250 mL Erlenmeyer-Kolben, die mit sterilen Wattestopfen verschlossen werden wie folgt angesetzt:

- 10 mL 10-fach konzentriertes Medium
- 80 mL steriles Millipore[®]-Wasser
- 10 mL Algeninokulum aus einer Stammkultur à 10^5 Zellen/mL

Alternativ zu den 10 mL ausgezählte Algensuspension können erfahrungsgemäß 0,8 - 1,0 mL einer ca. 1 Woche alten Stammkultur zugegeben werden. Die Millipore - Menge muss dann entsprechend auf 90 mL erhöht werden, um auf ein Gesamtvolumen von 100 mL zu kommen.

Es ist empfehlenswert, 2 - 3 Kolben jeweils anzupflegen, um genügend Inokulum am Ansatztag zur Verfügung zu haben.

Die Inkubationsbedingungen der Vorkultur sollen denen der späteren Testansätze entsprechen, d.h. die Ansätze werden 3 Tage bei 23 °C, unter Dauerbeleuchtung bei einer vorgegebenen Raumbestrahlungsstärke von 60 bis 120 $\mu\text{molEm}^{-2}\text{s}^{-1}$ kultiviert. Die Schüttelfrequenz ist auf 50 min bei 100 rpm und 10 min bei 130 rpm eingestellt.

Ansatz in Mikrotitrationsplatten:

Pro 24-well-Mikrotiterplatte werden:

- 5 mL DIN-Medium (10 fach)
- 5 mL Algensuspension (10^5 Zellen/mL) benötigt.

Die Verdünnungsreihe der Proben mit Millipore[®]-Wasser wird in Reagenzröhrchen vorbereitet:

Tabelle VI - 8: Verdünnungsansätze für den Algentest mit *S. subspicatus* CHODAT im Mikrotitrationsplattenmaßstab in Anlehnung an DIN 38 412 Teil 33

Verdünnungsstufe G	Probe [µL]	Millipore®-Wasser [µL]
1	6000	0
2	5000	3000
3	3333,5	4670
4	2500	5500
6	1666,5	6333,5
8	1250	6750
12	833,5	7166,5
16	625	7350
32	312,5	7687,5
64	156,25	7843,75
128	78,13	7921,88
256	39	7961
512	19,53	7980,47

Proben müssen auf pH 7 +/- eingestellt werden!

Das Volumen von 8 mL pro Verdünnungsstufe ist ausreichend für drei parallele Bestimmungen auf der Mikrotiterplatte. Die verwendeten Mikrotitrationsplatten haben 24 Kavitäten mit einem Fassungsvermögen von jeweils 2 mL. Die Belegung der Mikrotiterplatten ist in Abbildung VI - 4 schematisch dargestellt. Je Platte wird eine Probe in 6 Verdünnungsstufen getestet.

- Testansatz mit 6 Verdünnungsstufen einer Probe, je drei Parallelen
- Wachstumskontrollen ohne Probe, 3 Parallelen
- ein Nullwert ohne Probe, ohne Inokulum
- ein Blindwert ohne Inokulum mit der niedrigsten Verdünnungsstufe der Probe
- ein Algenwert mit einer Zellzahl von $5 \cdot 10^4$ Zellen/mL

	1	2	3	4	5	6
A	Wachstumskontrollen			Nullwert	Algenwert $5 \cdot 10^4$ Zellen/mL	Blindwert Probe
B	1:2*	1:2	1:2	1:16	1:16	1:16
C	1:4	1:4	1:4	1:32	1:32	1:32
D	1:8	1:8	1:8	1:64	1:64	1:64

Abbildung VI - 4 Belegung der 24-Well-Mikrotitrationsplatte für den Wachstumshemmtest mit *Scenedesmus subspicatus* CHODAT (Testansätze (1:2 bis 1:64): Probe, Algeninokulum und Nährmedium, Wachstumskontrollen: ohne Testgut, Nullwert: ohne Testgut und Algen, Blindwert: niedrigste Verdünnungsstufe der Probe, Algenwert mit $5 \cdot 10^4$ Zellen/mL)

Die Kavitäten werden nach folgendem Schema mit Nährmedium (10x), dem Testgut und dem Algeninokulum bestückt. Jeder Testansatz hat ein Gesamtvolumen von 2000 µl.

Testansatz:	1600 µl vorverdünntes Testgut, 200 µl Nährmedium (10x), 200 µl Algensuspension (10^5 Zellen/mL)
Wachstumskontrolle:	1600 µl Millipore®-Wasser, 200 µl Nährmedium (10x), 200 µl Algensuspension (10^5 Zellen/mL)
Nullwert:	1800 µl Millipore®-Wasser, 200 µl Nährmedium (10x)
Blindwert:	2000 µl der Probe, niedrigste Verdünnungsstufe
Algensuspension:	2000 µl Algensuspension mit $5 \cdot 10^4$ Zellen/mL

Nach Zugabe des Inokulums startet der Test.

Bei der Fluoreszenzmessung wird am ersten Tag die Chlorophyll-Fluoreszenz der Kontrollansätze, die Eigenfluoreszenz der niedrigsten Verdünnungsstufen, einer Algensuspension mit $5 \cdot 10^4$ Zellen/mL und aller Testansätze gemessen. Falls die Eigenfluoreszenz der niedrigsten Verdünnungsstufe (Blindwert) ohne Algenzusatz am Ansatztag größer ist als die des Kontrollansatzes mit $5 \cdot 10^4$ Zellen/mL, werden auf einer zusätzlichen Mikrotiterplatte die Blindwerte der Verdünnungsstufen bestimmt. Bei der Auswertung wird dann der Wert der Eigenfluoreszenz von den Werten der Testansätze abgezogen.

Messgerät und Einstellungen:

Das Algenwachstum der einzelligen Alge *Scenedesmus subspicatus* CHODAT wird über die Chlorophyll-Fluoreszenz der Zellsuspensionen verfolgt. Diese wird als Extinktion bei 690 nm mit dem rechnergesteuerten Mikrotitrationsplatten-Photometer (TECAN SPECTRAFluor-Plus®, Tecan) mit Inkubations- und Schüttelmöglichkeit gemessen. Zur Gerätesteuerung und Datenaufnahme wurde das von der Tecan GmbH entwickelte Programm *XFlour* eingesetzt.

Tabelle VI - 9: Einstellungen des SPECTRAFluorPlus® zur Bestimmung der Fluoreszenzabnahme in einem Chlorophyll-Fluoreszenzhemmtest

Mess-Parameter	Einstellung
Temperatur:	RT
Excitationsfilter :	440 nm (Bandbreite 40 nm)
Emissionsfilter :	690 nm (Bandbreite 10 nm)
Messmodus (read mode)	von oben
lag-Zeit:	0 s
Integrationszeit	40 s
Gain	150 / 120* ¹
Anzahl der Blitze	50
Mikrotitrationsplatten-Parameter	Einstellung
Auswahl Plattentyp:	Greiner 24 well, steril
Messrichtung :	in Reihen
Mehrfachmessungen :	an / aus* ²
Messintervall:	20 min
Blitzanzahl:	4x4
Schüttel-Parameter	Einstellung
Schütteldauer vor der Messung:	30 s
Schüttelmodus:	orbital
Schüttelintensität:	normal

*¹ Gain-Einstellungen bei FhG und DMT auf 120, *² Bei DMT konnte aufgrund messtechnischer Schwierigkeiten die Möglichkeit der Mehrfachmessungen nicht genutzt werden.

Inkubation: Die Mikrotitrationsplatten werden in dem nachträglich mit Beleuchtung ausgestatteten Inkubationsschrank (INFORS-HT) auf einem Vibrationsschüttler (IKA® VIBRAX VXR, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen) inkubiert. Zur Optimierung der Beleuchtung wird die Oberfläche des Vibrationsschüttlers mit Spiegelfolie beklebt auf dem die Mikrotiterplatten mit Spezialhaftband befestigt werden.

Auswertung:

Die Messdaten können direkt über einen PC und Excel® (Microsoft®, InfoSoft Intern. corp, USA) weiterverarbeitet werden. In Excel® wird die Fluoreszenzsteigerung innerhalb 72 h der Kontrollen berechnet und die prozentuale Hemmung der Fluoreszenzzunahme der einzelnen Verdünnungsstufen gegenüber den Kontrollen in Bezug auf Endpunktbestimmung ermittelt.

Die Algen werden in den Testansätzen durch Fluoreszenzmessung quantifiziert und die Wachstumshemmungen über verschiedene Auswertemodi berechnet. Die Messwerte liegen 24 h auseinander. Dadurch ist es möglich, den gesamten Wachstumsverlauf in die Auswertung mit einzubeziehen, indem z. B. die Fläche unter der Wachstumskurve (Biomasseintegral) berechnet wird. Zusätzlich zur Berechnung des Biomasseintegrals werden die mitt-

lere Wachstumsrate der Testansätze und die Zellzahl in einer Endpunktbestimmung ermittelt.

Die Hemmung der Biomasseproduktion macht sich in der Verminderung der Chlorophyll-Fluoreszenz bemerkbar.

Als Ergebnis gilt der kleinste Wert von G (G_A -Wert), bei dem unter den Bedingungen dieses Verfahrens eine Hemmwirkung der Biomasseproduktion $< 20\%$ gemessen wird (G_{A20} -Wert).

Material:

Es werden 24 Well Platten mit 2mL-Wells (Multi-Well-Platten, Bestellnr. 662102, Greiner GmbH, Solingen) verwendet. Es handelt sich um einzeln steril verpackte Mikrotitrationsplatten mit Deckel. Die Deckel sind mit Kondensationsringen ausgestattet, die verhindern, dass zuviel Flüssigkeit aus dem Testansatz verdunstet.

Stamm- bzw. Vorkultur der Algenspezies *Scenedesmus subspicatus* CHODAT (Familie Chlorophyceae)

Medien:

Das Nährmedium für die Testansätze und Stammkulturhaltung setzt sich aus den Bestandteilen der Tabelle VI - 10 und Tabelle VI - 11 zusammen:

Tabelle VI - 10: Stammlösungen für den Chlorophyll-Fluoreszenztest mit *S. subspicatus* [DIN 38412 L 33, März 1991]

Chemikalie	Lösung I (Nährsalz-Lsg.) [g/L]	Lösung II (Eisen-Komplex-Lsg.) [g/L]	Lösung III (Spurenelement-Lsg.) [g/L]
NH ₄ Cl	1,5		
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5		
KH ₂ PO ₄	0,16		
FeCl ₃ ·6H ₂ O		0,08	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O		0,1	
H ₃ BO ₃			0,185
MnCl ₂ ·4H ₂ O			0,415
ZnCl ₂			0,003*)
CoCl ₂ ·6H ₂ O			0,0015*)
CuCl ₂ ·2H ₂ O			0,00001 *)
NaMoO ₄ ·2H ₂ O			0,007*)

*) Ansatz dieser Lösungen erfolgt über einen zusätzlichen Verdünnungsschritt

Alle Lösungen werden 20 Minuten bei 121°C autoklaviert und bei 4°C im Dunkeln gelagert. Das Stammkulturmedium wird mit Hilfe eines Magnetrührstabes mindestens 30 min gerührt. Dadurch stellt sich das Gleichgewicht der in der Flüssigkeit gelösten Gase und der pH-Wert ein. Dieser sollte anschließend etwa $8,2 \pm 0,2$ betragen. Bei kleineren Abweichungen wird der pH-Wert mit 1 M NaOH_{aq} oder 1 M HCl_{aq} eingestellt. Bei stärkeren Abweichungen sollte die Medienzusammensetzung überprüft werden.

Abweichend von der DIN wird für die Kultivierung der Algen in Flüssig-Medium eine 3 %ige NaHCO₃-Lösung hergestellt und steril filtriert (Minisart®-Fliter, 0,2 µm Porenweite, Sartorius). Diese Lösung muss alle drei Wochen neu angesetzt werden, da sich bei Luftkontakt ein Gleichgewicht zwischen Lösung und umgebender Luft einstellt und CO₂ aus der Lösung ausgast.

Die Ansätze für das Vorkultur- und das Testmedium werden aus den Einzellösungen unter sterilen Bedingungen in folgenden Verhältnissen hergestellt:

Tabelle VI - 11: Stammlösungen/Medien für den Chlorophyll-Fluoreszenztest mit *S. subspicatus* [DIN 38412 L 33, März 1991]

	Lösung I	Lösung II	Lösung III	NaHCO ₃ -Lsg. (3%ig)	Agar-Agar [g]
	pro L Ansatz				
Stammkultur medium (flüssig)	10 mL	1 mL	0,1 mL	1 mL	-
Stammkultur medium (fest)	100 mL	10 mL	1 mL	-	15
Vorkultur medium*	100mL	10 mL	10 mL	100 mL	-

* Die Zusammensetzung des Vorkulturmediums entspricht dem Nährmedium (10x) bzw. DIN-Medium (10x)

Die Stammkultur kann in flüssigem oder auf festem Nährmedium gehalten werden. Entsprechend der Stammhaltung in flüssigem Nährmedium kann die Stammkulturhaltung in Schrägagarröhrchen oder auf Agarplatten erfolgen. Diesem Medium wird im Gegensatz zum Flüssigansatz keine C-Quelle zugesetzt, da die Algen in diesem Fall das CO₂ ausschließlich aus der Luft entnehmen.

Quantifizierung von Mikroorganismen:

R2A-Agar: 18,2 g Agar (Difco, Art.-Nr.1826-17-1) werden in 1 Liter Aqua bidest. gelöst und 15 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert.

Gültigkeitskriterien:

Es gelten die Kriterien, die von der DIN 38412 Teil 9 und Teil 33 gefordert werden.

1. Die Chlorophyll-Fluoreszenz im Kontrollansatz muss innerhalb von 72 h mindestens um den Faktor 30 zunehmen.
2. Der pH-Wert der Kontrolle darf nicht um mehr als 1,5 Einheiten während des Tests abweichen.

VI - 2.4 Genotoxikologische Testverfahren

VI - 2.4.1 umu, NM2009-Test

Testverfahren

PRINZIP:

Es werden zwei Testsysteme, die sich in ihrer Durchführung und in ihrem Testprinzip ähneln, zum Nachweis eines genotoxischen Potenzials eingesetzt. Als Testorganismus dient im umu-Test *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK1002. Das genetisch veränderte Bakterium wird im Test gegenüber einer möglicherweise genotoxisch wirksamen Probe exponiert. Dabei kann es zur Aktivierung des bakteriellen SOS-Reparatursystems durch die partielle Zerstörung der Doppelhelix und somit dem Vorliegen einzelsträngiger DNA kommen. Das *umuC*-Gen ist eines der mindestens 12 Gene, die zum bakteriellen SOS-Reparatursystem gehören. Dieses wurde künstlich mit dem *lacZ*-Gen gekoppelt und liegt als Multi-copy-Plasmid in der Zelle vor. Die Aktivierung des SOS-Reparatursystems führt somit indirekt zur Aktivierung des *lacZ*-Gens. Das *lacZ*-Gen ist für die Bildung des Enzyms β -Galaktosidase verantwortlich. Eine Quantifizierung der β -Galaktosidasebildung ist über die Enzymaktivität möglich. Dies kann über die Spaltung von o-Nitrophenylgalactopyranosid in einen gelben Farbstoff photometrisch erfasst werden. Die Quantität der gebildeten β -Galaktosidase gilt als Testkriterium für den Nachweis einer genotoxischen Wirkung. Um die physiologischen Vorgänge in Säugetierorganismen zu simulieren, wird der Test sowohl mit als auch ohne S9-Mix durchgeführt. Der S9-Mix enthält ein mit Aroclor induziertes Rattenleberhomogenat und eine Mischung aus Enzymen und Kofaktoren, um eine säugetiertypische Metabolisierung von Substanzen hervorzurufen. Um einen möglichen toxischen Effekt bei der Auswertung berücksichtigen zu können, wird das Wachstum der Bakterien durch die Bestimmung der optischen Dichte kontrolliert.

Eine Variante des umu-Tests ist der NM2009-Test mit *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK1002/pNM12 als Testbakterium. Der Unterschied zum Teststamm im umu-Test besteht in dem Vorhandensein des Plasmids pNM12 in der Bakterienzelle. Dieses Plasmid enthält das Gen für das Enzym O-Acetyltransferase. Durch die Einführung dieses Plasmids erhöht sich die Gesamtaktivität der O-Acetyltransferase in der Zelle gegenüber der Enzymaktivität im umu-Teststamm um mehr als das 400-fache. Dies führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit des Testorganismus gegenüber Nitroaromaten.

DURCHFÜHRUNG:

Kryokonservierung der Bakterien

Anzucht auf Platte und Kryokonservierung von *Salmonella choleraesuis*/*Salmonella typhimurium* NM2009.

1. Es werden 3 verschiedene Agar - Platten hergestellt:
 - 1x TG -Medium ohne Ampicillin (+1,5% Agar-Agar)
 - 1x TG -Medium mit der 1-fachen Menge Ampicillin; 0,5 mL auf 100 mL TG -Medium
 - 1x TG -Medium mit der 3-fachen Menge Ampicillin; 1,5 mL auf 100 mL TG -MediumDie Bakterien werden dem Schrägagarröhrchen entnommen. Auf zwei der jeweils drei Platten werden sie durch einen Quadrantenausstrich verteilt. Auf der dritten Platte wird mit dem Drigalsky-Spatel ausgestrichen, anschließend gibt man ein steriles Filterpapier dazu, welches in Kristallviolettlösung getränkt wurde.
2. Selektionskriterien:
 - Ampicillinresistenz
 - Hemmung durch Kristallviolett, Hemmhof von 14mm Durchmesser um das getränkte Filterpapier herum
3. Es wird ca. 48 h bei 37 °C auf dem Kopf inkubiert. Von den Platten mit 3-fach Ampicillin werden gut gewachsene Einzelkolonien entnommen und wiederum auf Platten mit 3-fach Ampicillin Quadrantenausstriche angefertigt.
4. Hiervon werden wieder gut gewachsene Einzelkolonien entnommen, in 50 mL 1-fach TGA-Medium gegeben und bis zu einer optischen Dichte von 400 FNU inkubiert
5. 7,5 mL der Bakteriensuspension werden in sterile Röhrchen gegeben und bei 3000 Upm (2100g) 15 min zentrifugiert. Anschliessend verwirft man den Überstand. Das Pellet wird in einem Gemisch aus 0,1 mL 100%-igem DMSO und 0,9 mL TGA-Medium aufgenommen, auf dem IKA-VIBRO-FIX VF 2 (IKA-Labortechnik, Staufen) homogenisiert und in 1mL-Portionen (oder geringer) in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße gefüllt. Die Eppendorfgefäße werden bei -70°C eingefroren.

Bereitstellung der Testkulturen:

In einer 100-mL-Duranflasche wird 1 mL einer Kryokultur mit einer Dichte von $2 \cdot 10^8$ Bakterien/mL mit 29 mL TGA-Medium für ca. 2 Stunden bei 37°C unter Schütteln bei 150 UpM inkubiert. Ist nur ein Test vorgesehen (2 MTP (Mikrotitrationsplatten): ohne und mit S9) genügen auch 0,5 mL Kryokultur und 17 mL TGA-Medium. Bei der Bereitstellung der Testkultur des NM2009-Tests werden zusätzlich 10 µg/mL Chloramphenicol (Endkonzentration) zugegeben. Für die *Salmonella*-Stämme muß eine Trübung von 340 bis 350 FNU gemäß DIN 38

404 C2 (1990) der Testkultur erreicht werden. Gemessen wird die optische Dichte bei 578 nm in einer 1-cm-Küvette gegen den Reagenzienleerwert.

Ansätze in Mikrotitrationsplatten:

Im Laufe des Testes werden drei verschiedene Mikrotitrationsplatten angesetzt. In Platte A kommen die Bakterien in Kontakt mit dem Testgut. Bei der Inkubation in Platte B wird das Wachstum der Mikroorganismen gefördert und die Testsubstanz verdünnt. In Platte C wird die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Mit den folgenden Ansätzen werden die Platten nach dem Schema, das in Abbildung VI - 5 dargestellt ist, belegt.

- Testansätze in Verdünnungsstufen, 3 Parallelen
- Positivkontrollen mit Referenzsubstanzen, 3 Parallelen
- Negativkontrollen mit dem Lösungsmittel der Referenzsubstanz, 3 Parallelen
- Wachstumskontrollen ohne Testgut, 3 Parallelen
- Leerwerte ohne Bakterien, 3 Parallelen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Testansatz 1 1:1,5			Testansatz 1 1:3			Testansatz 1 1:6			Testansatz 1 1:12		
B	Testansatz 1 1:24			Testansatz 1 1:48			Testansatz 1 1:96			Testansatz 1 1:192		
C	Testansatz 2 1:1,5			Testansatz 2 1:3			Testansatz 2 1:6			Testansatz 2 1:12		
D	Testansatz 2 1:24			Testansatz 2 1:48			Testansatz 2 1:96			Testansatz 2 1:192		
E	Testansatz 3 1:1,5			Testansatz 3 1:3			Testansatz 3 1:6			Testansatz 3 1:12		
F	Testansatz 3 1:24			Testansatz 3 1:48			Testansatz 3 1:96			Testansatz 3 1:192		
G	Testansatz 4 1:1,5			Testansatz 4 1:3			Testansatz 4 1:6			Testansatz 4 1:12		
H	Positivkontrolle			Negativkontrolle			Wachstumskontrolle			Leerwert		

Abbildung VI - 5 Belegung der Mikrotitrationsplatte A für den *umu*-Test und NM2009-Test. Die Testansätze enthalten das Testgut in der angegebenen Verdünnung, die Positivkontrolle enthält die entsprechende Referenzsubstanz, die Negativkontrolle enthält das Lösungsmittel der Referenzsubstanz, die Wachstumskontrolle und der Leerwert werden mit Aqua bidest. angesetzt. Alle Ansätze enthalten die Testkulturen mit Ausnahme des Leerwertes.

Mikrotitrationsplatte A ohne Aktivierung:

Die Kavitäten der Mikrotitrationsplatte A werden im Ansatz ohne S9-Fraktion nach folgendem Schema bestückt.

Testansatz: 180 µl Testgut, 20 µl 10-fach TGA, 70 µl Testkultur

Wachstumskontrolle: 180 µl Aqua bidest., 20 µl 10-fach TGA, 70 µl Testkultur

Leerwert: 180 µl Aqua bidest., 20 µl 10-fach TGA, 70 µl TGA

Für den umu-Test:

Positivkontrolle: 27 µl 4-Nitrochinolin-N-oxid-Lösung für den umu-Test, 153 µl Aqua bidest., 20 µl 10-fach TGA, 70 µl Testkultur

Negativkontrolle: 27 µl 30% iges DMSO, 153 µl Aqua bidest., 20 µl 10-fach TGA, 70 µl Testkultur

Für den NM2009-Test:

Positivkontrolle: 180 µl der 4-Nitrochinolin-N-oxid-Lösung für den NM2009-Test, 20 µl 10-fach, 70 µl Testkultur

Negativkontrolle: 27 µL 25 %iges DMSO, 153 µl Aqua bidest., 20 µl 10-fach TGA, 70 µl Testkultur

Mit dem Zusatz der Testkultur startet der Test. Die Mikrotitrationsplatte wird mit einer nicht toxischen Folie verschlossen und für 1,5 Stunden bei 37 °C unter heftigem Schütteln auf einem Mikrotitrationsplattenschüttler inkubiert.

Mikrotitrationsplatte A mit Aktivierung:

450 µl S9-Fraktion werden mit 15 mL Testkultur gemischt. Diese Mischung wird als Testkultur in den Test eingesetzt (S9-Testkultur). Nach folgendem Schema werden die Kavitäten der Mikrotitrationsplatte gefüllt.

Testansatz: 180 µl Testgut, 20 µl Kofaktorenlösung, 70 µl S9-Testkultur

Wachstumskontrolle: 180 µl Aqua bidest., 20 µl Kofaktorenlösung, 70 µl S9-Testkultur

Leerwert: 180 µl Aqua bidest., 20 µl Kofaktorenlösung, 70 µl TGA

Für den umu-Test:

Positivkontrolle: 27 µl 2-Aminoanthracen-Lösung, 153 µl Aqua bidest., 20 µl Kofaktorenlösung, 70 µl S9-Testkultur

Negativkontrolle : 27 µl 30% iges DMSO, 153 µl Aqua bidest., 20 µl Kofaktorenlösung, 70 µl S9-Testkultur

Für den NM2009-Test:

Positivkontrolle: 180 µl der 2-Aminoanthracen-Lösung für den NM2009-Test, 20 µl Kofaktorenlösung, 70 µl S9-Testkultur

Negativkontrolle: 27 µL 10%iges DMSO, 153 µL Aqua bidest., 20 µL Kofaktorenlösung, 70 µL S9-Testkultur

Mit dem Zusatz der Testkultur startet der Test. Die Mikrotitrationsplatte wird mit einer nicht toxischen Folie verschlossen und für 1,5 Stunden bei 37 °C unter heftigem Schütteln auf einem Mikrotitrationsplattenschüttler inkubiert.

Mikrotitrationsplatte B:

Die Mikrotitrationsplatte B wird mit 270 µL TGA-Medium je Kavität vorgelegt und auf 37°C temperiert. Nach 1,5-stündiger Inkubation der Platte A werden 30 µL aus jeder Kavität in die vortemperierte Platte B überpipettiert, Platte B wird entsprechend der Platte A für 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation werden 30 µL aus jeder Kavität in Platte C überpipettiert. Anschließend wird die optische Dichte der Mikrotitrationsplatte B im iEMS-Reader bei 620 nm gemessen.

Mikrotitrationsplatte C:

120 µL B-Puffer werden vorgelegt. Nach Inkubation der Platte B werden 30 µL aus jeder Kavität in Platte C überpipettiert und 30 µL ONPG in jede Kavität zugegeben. Die Enzymkinetik wird durch die Zugabe des ONPG gestartet und kann sofort im iEMS-Reader aufgenommen werden.

In Tabelle VI - 12 sind die Änderungen des umu-Testverfahrens mit Kryokonserven gegenüber der DIN 38415 T3 zusammengefasst.

Tabelle VI - 12: Vergleich der Änderungen im optimierten umu-Test gegenüber DIN 38415 T3

	DIN 38415 T3	Optimierter umu-Test IHU
Anzucht	Übernachtskultur	Kryokonserve
Inkubationsdauer A-Platte	2 h	1,5 h
Inkubationsdauer B-Platte	2 h	2,5 h
Messung B-Platte	Endpunktmessung	Endpunktmessung
Messung C-Platte	Stoppreagenz Endpunktmessung	Enzymkinetik
Inkubationstemperatur	28°C	37°C

Auswertung:

Als Testkriterium gilt die Induktionsrate, die aus dem Anstieg der Extinktion im Laufe der Farbreaktion berechnet wird. Das Wachstum der Bakterien wird dabei in Form des Wachstumsfaktors berücksichtigt.

Bestimmung des Wachstumsfaktors W:

$$W = (E_{620}^T - E_{620}^L) / (E_{620}^W - E_{620}^L) \quad \text{Gleichung VI - 2}$$

E_{620}^T : Extinktion (Mittelwert) des Testansatzes bei 620 nm

E_{620}^W : Extinktion (Mittelwert) der Wachstumskontrolle bei 620 nm

E_{620}^L : Extinktion (Mittelwert) des Leerwertes bei 620 nm

Bestimmung der Induktionsrate I:

$$I = 1/W \cdot (E_{414}^T / E_{414}^W) \quad \text{Gleichung VI - 3}$$

E_{414}^T : Steigung des linearen Teils der Regressionsgeraden des Testansatzes bei 414 nm

E_{414}^W : Steigung des linearen Teils der Regressionsgeraden der Wachstumskontrolle bei 414 nm

Berechnung der β -Galaktosidaseaktivität in relativen Einheiten U:

$$U_T = (E_{414}^T) / (E_{620}^T - E_{620}^L) \quad \text{Gleichung VI - 4}$$

Analog dazu werden die Einheiten der Negativkontrolle U_N berechnet. Die Werte der Referenzansätze sind auf die Negativkontrollen mit DMSO zu beziehen.

Bestimmung des G_{EU} -Wertes:

Als Ergebnis gilt der kleinste Wert von G (G_{EU} -Wert), bei dem unter den Bedingungen dieses Verfahrens eine Induktionsrate $< 1,5$ gemessen wird.

Material:

Die miniaturisierten Genotoxizitätstests werden in 96-Well-Mikrotitrationsplatten aus transparentem Polystyrol (PS) angesetzt.

Kryokonserven der oben genannten Bakterienstämme

Meßgerät und Einstellungen:

Die Tests werden mit einem iEMS-Reader durchgeführt. Für eine detaillierte Beschreibung des Geräts wird verwiesen auf Kapitel VI - 2.3.1. Die Einstellungen des iEMS-Readers sind der Tabelle VI - 13 zu entnehmen.

Tabelle VI - 13: Einstellungen des iEMS-Readers für die Durchführung der Genotoxizitätstests

Parameter	Einstellung
Temperatur:	37 °C
Filter:	414 nm
Meßintervall:	60 s
Schüttelfrequenz:	1000 U/min
Schütteldauer vor der Messung:	5 s
Schütteldauer zwischen den Messungen:	5 s
Periode pro Intervall:	2 s
Meßzeit:	30 min

Lösungen und Reagenzien

- 10-fach TGA-Medium (Trypton-Glukose-Ampicillin-Medium):

Trypton	10,0 g
NaCl	5,0 g
HEPES-Puffer	11,9 g
Glukose	2,0 g

nacheinander in 100 mL Aqua bidest. lösen, pH-Wert mit HCl oder NaOH auf $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$ einstellen, sterilfiltrieren oder Glukose getrennt autoklavieren, vor dem Gebrauch 0,5 mL einer 10%-igen Ampicillinlösung zu 100 mL 10-fach-TGA-Medium zugeben (Endkonzentration: 50 mg Ampicillin in 100 mL 10-fach TGA-Medium).

- Chloramphenicollösung:

10 µg/mL Chloramphenicol werden in 100-%igem Ethanol gelöst und steril filtriert.

- Kofaktorenlösung:

Sie entspricht dem 10-fach TGA-Medium unter Zugabe von 1,23 g KCl und 0,82 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ zu 50 mL 10-fach TGA-Medium. Zusätzlich werden vor dem Gebrauch neben 50 µl einer 10%-igen Ampicillinlösung (Endkonzentration: 50 mg Ampicillin in 100 mL 10-fach TGA-Medium), 296 mg NADP (Natriumsalz) und 152 mg Glukose-6-Phosphat (Di-Natrium salt) in 10 mL 10-fach TGA-Medium gelöst.

- TGA-Medium (1-fach konzentriert):

10-fach TGA-Medium 1:10 verdünnen, autoklavieren und vor dem Gebrauch am Testtag 0,5 mL einer 10%-igen Ampicillinlösung zu 1000 mL 1-fach-konzentriertem TGA-Medium zugeben (Endkonzentration: 50 mg Ampicillin in 1000 mL 1-fach TGA-Medium).

- B-Puffer:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	20,18 g
[wird $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ verwendet:	22,45g]
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,50 g
KCl	0,75 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g

in 500 mL Aqua bidest. lösen, pH-Wert auf $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$ mit NaOH oder HCl einstellen, 1,0 g Natriumdodecylsulfat (SDS) zugeben und auf 1000 mL auffüllen und vor Gebrauch autoklavieren, 0,54 mL einer 2-Mercaptoethanol-Lösung (1 Teil Mercaptoethanol mit 3 Teilen Aqua bidest. mischen) zu 50 mL B-Puffer geben.

- ONPG-Lösung:

45 mg o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid in 10 mL Phosphatpuffer lösen. Die Lösung sollte möglichst frisch angesetzt werden. Ein Zeichen für Alterung ist eine leichte Gelbfärbung.

- Phosphatpuffer $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,086 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,538 g

in Aqua bidest. lösen und auf 100 mL auffüllen

- Referenzsubstanzen:

umu-Test ohne S9: 5 mg 4-Nitrochinolin-N-oxid (4NQO) in 5 mL reinem DMSO lösen und auf 500 $\mu\text{g/l}$ mit einem DMSO/Wasser-Gemisch (3 mL + 7 mL) verdünnen.

umu-Test mit S9: 5 mg 2-Aminoanthracen (2-AA) in 5 mL DMSO lösen und auf 2 mg/l mit einem DMSO/Wasser-Gemisch (3 mL + 7 mL) verdünnen.

NM2009-Test ohne S9: 5 mg 4-Nitrochinolin-N-oxid (4NQO) in 5 mL reinem DMSO lösen und auf 500 $\mu\text{g/l}$ mit einem DMSO/Wasser-Gemisch (3 mL + 7 mL) verdünnen. Anschließend mit Aqua bidest. 1:8 weiterverdünnen.

NM2009-Test mit S9: 5 mg 2-Aminoanthracen (2-AA) in 5 mL DMSO lösen und auf 2 mg/l mit einem DMSO/Wasser-Gemisch (3 mL + 7 mL) verdünnen. Anschließend mit aqua bidest. 1:40 weiterverdünnen.

- S9-Fraktion:

Die S9-Mikrosomen-Fraktion ist induziert mit Aroclor 1254 und wird bei der Firma Organon bezogen.

Gültigkeitskriterien:

Mindestwachstum der Kontrollen auf Platte B: 140-280 FNU

Mindestwachstumsfaktor auf der Platte B: 0,5

Mindestinduktion der Referenzansätze: 2,0

Die Abbildung VI - 6 zeigt schematisch den Ablauf der Genotoxizitätstest.

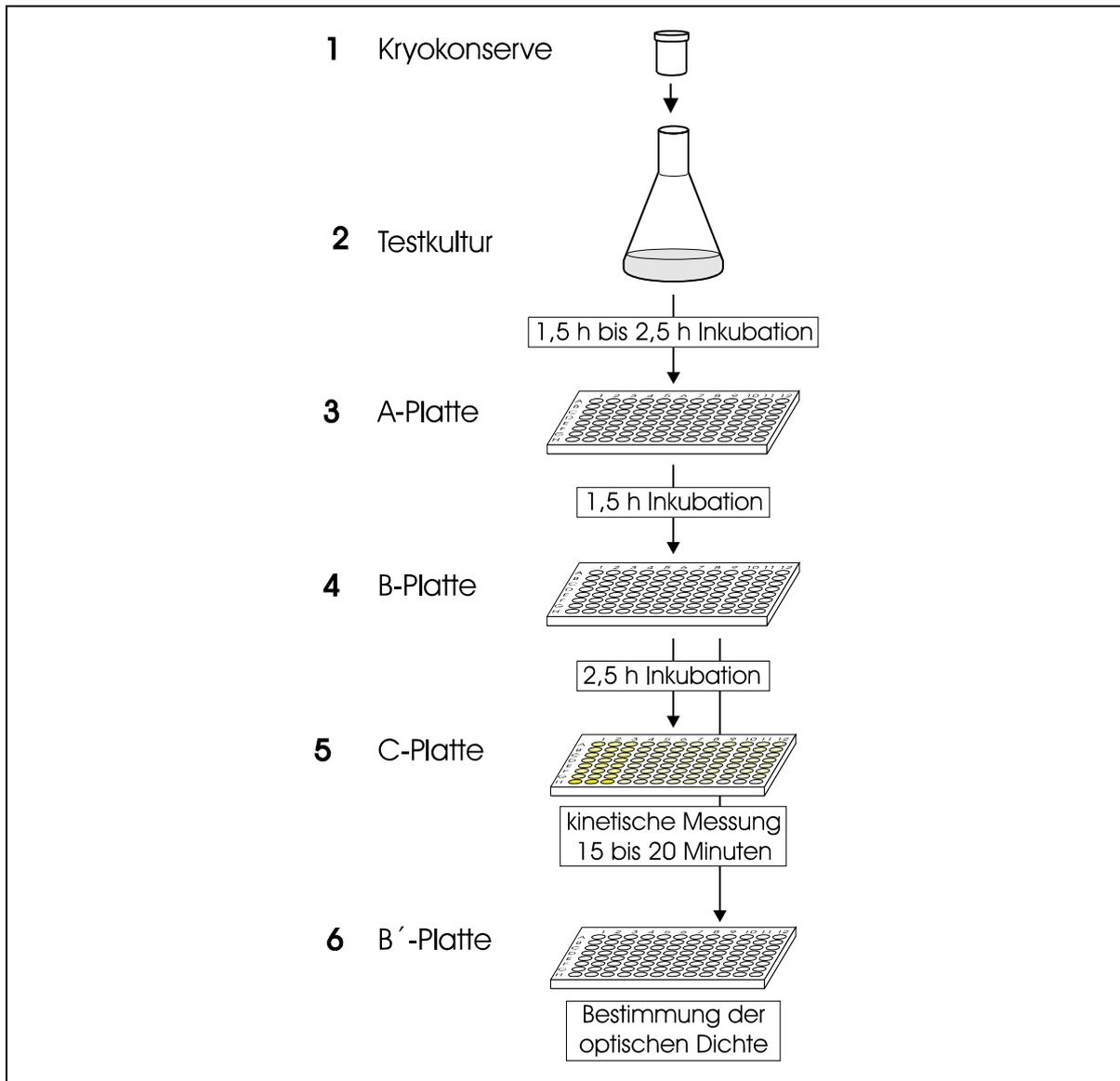


Abbildung VI - 6: Schematische Darstellung der Durchführung des umu-, und NM2009-Tests.
 1: Animpfen einer Testkultur mit einer Kryokonserve; 2: Mit der angewachsenen Testkultur wird die Platte-A beimpft. Platte A enthält die Prüfsubstanzen;
 3: Überführen eines Aliquots der Platte A in Platte B. Platte B enthält Nährmedium;
 4: Überführen eines Aliquots von B in Platte C 5: In Platte C findet der Bakterienaufschluß statt. Danach wird die Enzymaktivität der β -Galaktosidase durch Spaltung des zugegebenen farblosen Substrats ONPG nachgewiesen. Das Spaltprodukt ist gelbgefärbt. Die Zunahme der Gelbfärbung wird als Kinetik erfaßt.
 6: Die optische Dichte der Platte B wird nach Entnahme des Aliquots (B') für Platte C als Maß für das Bakterienwachstum gemessen.

VI - 2.4.2 Salmonella-Mikrosomen-Test (Ames Test)

Testverfahren

PRINZIP:

Die Histidin-auxotrophen Bakterienstämme *Salmonella typhimurium* TA100 und TA98 werden unter festgelegten Bedingungen gegenüber verschiedenen Konzentrationen des Testgutes exponiert. Dabei können Genotoxine in Abhängigkeit von ihrer Konzentration, Mutationen im hisG46-Gen (TA100) bzw. im hisD3052-Gen (TA98) induzieren. Mit diesen Markern werden Punktmutationen erfasst. Da sich Punktmutationen in zwei Klassen – Basenpaarsubstitution und Frameshiftmutation unterteilen lassen, werden zwei Stämme verwendet, die jeweils eine der beiden Klassen von Mutationen erfassen (TA 98: Basenpaarsubstitution, TA 100 Frameshiftmutation).

DURCHFÜHRUNG:

Geräte, Chemikalien und Durchführung erfolgen nach DIN 38415-4 (1999).

Auswertung:

Für jede Verdünnungsstufe einer Probe (zwei Parallelen) sowie für den Negativ-Kontrollansatz und die Positiv-Kontrollansätze, sowohl mit als auch ohne S9-Mix, werden Mittelwerte der Mutantenzahl sowie die Differenz des betroffenen Mittelwertes zum Negativ-Kontrollansatz (Induktionsdifferenz) berechnet.

Als mutagen wird eine Probe betrachtet, wenn bei mindestens einem der beiden Stämme mit oder ohne Zugabe von S9-Mix eine Erhöhung der Mutantenzahlen um mindestens die für den Stamm festgelegte Induktionsdifferenz induziert wird und eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung gegeben ist. Die Mindestanforderung für die Induktionsdifferenz für TA 100 beträgt 80 Mutanten, für TA 98 20 Mutanten.

Bestimmung des G_{EA} -Wertes:

Der G_{EA} -Wert entspricht der niedrigsten Verdünnungsstufe, mit der bei genotoxischen Proben noch keine Zunahme der Mutantenzahl größer oder gleich der für jeden Stamm festgelegten Induktionsdifferenz festgestellt wird (TA 100 $I < 80$, TA 98 $I < 20$). Werden mit den Stämmen TA 98 und TA 100 mit und ohne Zusatz von S9-Mix unterschiedliche G_{EA} -Werte bestimmt, so ist der höchste dieser G_{EA} -Werte maßgebend.

Bei nicht genotoxischen Proben bzw. wenn keine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung vorliegt, ist der dieser G_{EA} -Wert = 3.

VI - 2.5 Anmerkungen zu den Laborvergleichsuntersuchungen

VI - 2.5.1 Eluatansätze

Tabelle VI - 14: Benötigte Eluatmenge pro Boden incl. Aufkonzentrierung

Testverfahren	[mL]
Zellvermehrungshemmtests mit <i>V. fischeri</i> und <i>P. putida</i> : Verdünnungsstufen 2 bis 4096 (Dreifachparallelen)	2
Miniaturisierter Algentest: Verdünnungsstufen 2 bis 64 (Dreifachparallelen)	10
Genotoxizitätstests (umu-, SOS- und NM2009-Test): Verdünnungsstufen 1,5 bis 192 (Dreifachparallelen)	5
Aufkonzentrierung für die Genotoxizitätstests (Extrakte)	375
Trübung, pH, Lf, DOC und sonstige Analytik	50 ¹
Gesamt	817

¹Ungefähr 50 mL des Eluates werden für vergleichende Untersuchungen im Bereich der Analytik benötigt. Die Untersuchungen werden von dem IHU durchgeführt.

Um eine ausreichende Menge an Eluat zu erhalten, sollte von den Bodenproben, die auch als Extrakt getestet werden, 1 L Eluat hergestellt werden. Für die restlichen Böden ist eine Eluatmenge von 250 mL ausreichend.

VI - 2.5.2 Referenztoxene der Testorganismen

Tabelle VI - 15: Übersicht der eingesetzten Testsysteme und deren Referenztoxene

Testsystem	Referenztoxe
Zellvermehrungshemmtests mit <i>Vibrio fischeri</i> und <i>Pseudomonas putida</i>	Cr ⁶⁺ aus K ₂ Cr ₂ O ₇ (von 0,5 bis 16 mg/l, bezogen auf Cr ⁶⁺)
	3,5-DCP (von 0,75 bis 24 mg/l)
Miniaturisierter Algentest mit <i>Scenedesmus subspicatus</i> CHODAT	Cr ⁶⁺ aus K ₂ Cr ₂ O ₇ (von 0,05 bis 5 mg/l, bezogen auf Cr ⁶⁺)
	3,5-DCP (von 2,5 bis 15 mg/l)
umu-Test mit <i>Salmonella typhimurium</i>	Ohne S9: 5 mg 4NQO ¹ in 5 mL DMSO lösen und auf 500 µg/L mit einem DMSO/Wasser-Gemisch (3 mL + 7 mL) verdünnen
	Mit S9: 5 mg 2-AA ² in 5 mL DMSO lösen und auf 2 mg/L mit einem DMSO/Wasser-Gemisch (3 mL + 7 mL) verdünnen.
NM2009-Test <i>Salmonella typhimurium</i>	Ohne S9: 5 mg 4NQO ¹ in 5 mL DMSO lösen und auf 500 µg/l mit einem DMSO/Wasser-Gemisch (3 mL + 7 mL) verdünnen. Anschließend mit Aqua bidest. 1:8 verdünnen.
	Mit S9: 5 mg 2-AA ² in 5 mL DMSO lösen und auf 2 mg/l mit einem DMSO/Wasser-Gemisch (3 mL + 7 mL) verdünnen. Anschließend mit Aqua bidest. 1:40 verdünnen.

¹NQO = 4-Nitrochinolin-N-oxid, ²2-AA = 2-Aminoanthracen

VI - 3 Ergebnisse

Die Untersuchung der Böden im Laborvergleich zum Zweck der Erfassung der Übereinstimmung der Messdaten dreier Teilnehmer kann in zwei Teilabschnitte gegliedert werden.

Auf der einen Seite werden wässrige Eluate hergestellt, welche in die ökotoxischen und genotoxischen aquatischen Biotestverfahren eingesetzt werden. Die Eluate werden ebenfalls physikalisch-chemisch charakterisiert, indem pH-Wert, Leitfähigkeit, Trübung sowie der Gehalt an gelöstem organischem Kohlenstoff und die PAK' s bestimmt werden.

Auf der anderen Seite werden wässrige Eluate hergestellt, die mittels Festphasenextraktion aufkonzentriert werden und zusätzlich in die genotoxischen Testverfahren eingesetzt werden, um auch geringe Konzentrationen erbgutverändernden Materials feststellen zu können.

VI - 3.1 Physikalisch-chemische Charakterisierung der Bodeneluate

In der folgenden Tabelle sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Bodeneluate zusammengefasst.

Tabelle VI - 16: Physikalische Parameter der Bodeneluate

Boden	pH-Wert			Leitfähigkeit [mS/cm]			Trübung [TE/F]			DOC [mg/L]		
	IHU	FhG	DMT	IHU	FhG	DMT	IHU	FhG	DMT	IHU	FhG	DMT
Iserlohn	6,5	8,1	7,9	2,84	2,43	n. b.	< 1	< 50	1,3	238,2	315,5	314
Gaswerk 1:2	5,2	6,9	7,6	0,135	0,13	n. b.	29,3	< 50	0,3	56,6	91,5	122
Land- hausen	6,6	7,7	7,8	2,82	3,2	n. b.	23	< 50	46	185,9	366,3	349
PAK-Mix	6,4	8,0	7,9	1,08	1,3	n. b.	4,1	< 50	0,9	171,5	277,4	270
Sicker- graben	5,6	6,3	7,4	0,076	n. b.	n. b.	180	< 50	76	88,7	189,3	224
Neuohe	6,3	8,2	8,2	0,219	0,31	n. b.	7,5	< 50	3,4	5,1	11,6	9
IMA SM 66	6,8	8,2	8,2	0,605	0,66	n. b.	16,1	< 50	0,7	26,5	43	44
IMA 927 B	6,9	8,1	8,2	0,923	0,96	n. b.	6,2	< 50	0,2	12,1	11,7	12

DOC = dissolved organic carbon, TE/F = Trübungseinheiten Formazin, n. b. = nicht bestimmt,

Gute Übereinstimmung der Werte lässt sich bei der Bestimmung der Leitfähigkeit und des organischen Kohlenstoffgehaltes erkennen. Abweichungen der pH-Werte von denen der anderen Teilnehmer konnten beim IHU festgestellt werden. Bei FhG und DMT besitzen die Eluate der Böden in der Regel einen neutralen pH-Wert. Am IHU wurden pH-Werte gemessen, die um eine 10er-Potenz höher waren, also einem niedrigeren pH entsprachen, aber noch als neutral bezeichnet werden können. Ausnahmen davon bilden die Böden Gaswerk 1:2 und Sickergraben mit pH-Werten von 5,2 und 5,6, die damit mehr im sauren Bereich liegen.

Von dem IHU Aachen wurde ebenso der PAK-Gehalt der Bodeneluate bestimmt. Lediglich bei den Proben Gaswerk 1:2, Sickergraben und PAK-Mix wurden geringe Mengen an PAK gemessen. In der folgenden Tabelle sind die Gehalte der verschiedenen PAK in den drei Bodeneluat aufgeführt

Tabelle VI - 17: Konzentration der PAK in den Eluaten der Böden: PAK-Mix, Gaswerk 1:2, Sickergraben

PAK [$\mu\text{g/L}$]	IHU			FhG			DMT		
	PAK-Mix	Gaswerk 1:2	Sickergraben	PAK-Mix	Gaswerk 1:2	Sickergraben	PAK-Mix	Gaswerk 1:2	Sickergraben
Naphthalin	4,11	0,29	n. n.	0,37	0,36	n. n.	4,68	0,49	0,27
Acenapthen	0,28	n. n.	n. n.	0,08	0,01	n. n.	0,34	0,01	0,01
Fluoren	0,10	n. n.	n. n.	0,02	0,06	n. n.	0,10	0,10	0,05
Phenanthren	0,16	n. n.	n. n.	0,01	0,10	n. n.	0,19	0,14	0,06
Anthracen	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	0,01	n. n.	n. n.	0,01	0,01
Fluoranthen	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	0,02	n. n.	n. n.	0,04	0,02
Pyren	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	0,06	n. n.	n. n.	0,09	0,04
Benzoanthracen	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	0,01	n. n.	n. n.	0,01	0,01
Chrysen	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
Benzo (b) fluoranthen	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
Benzo (k) fluoranthen	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
Benzo (a) pyren	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
Dibenzo (a,h) anthracen	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
Benzo (g,h,i) perylen	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
Indeno (1,2,3) pyren	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
Summe PAK [$\mu\text{g/L}$]	4,65	0,29	0,00	0,48	0,62	0,00	5,31	0,91	0,47

n. n. = nicht nachweisbar, PAK = Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Die höchsten PAK-Konzentrationen werden bei dem Eluat des Bodens PAK-Mix gefunden. Dabei ist Naphthalin die einzige Verbindung, die mit Konzentration von 4,1 bis 4,7 µg/L gemessen wurde und den Hauptanteil der Summe der PAK liefert. Gute Übereinstimmung der Messergebnisse des Bodeneluates PAK-Mix können am IHU und DMT festgestellt werden, wohingegen bei FhG in bezug auf die Verbindung Naphthalin weniger als ein Zehntel gefunden wurde. Insgesamt sind die Konzentrationen der übrigen Verbindungen mit weniger als 1 µg/L sehr gering.

VI - 3.2 Ökotoxikologische Charakterisierung der Bodeneluete

Alle acht Böden wurden bei den Teilnehmern mit den Zellvermehrungshemmtests mit *Vibrio fischeri*, *Pseudomonas putida* und dem Algenwachstumshemmtest (24-Well Mikrotitrationsplatten, Volumen 2 mL) mit *Scenedesmus subspicatus* untersucht. Zusätzlich wurde an dem IHU Aachen der Algentest im 100mL-Ansatz in Erlenmeyerkolben im Vergleich zu dem 2mL-Ansatz in 24-Well-Mikrotitrationsplatten durchgeführt. Ebenso wurde an dem IHU der Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri* als Küvettentest durchgeführt.

VI - 3.2.1 Zellvermehrungshemmtest mit *Vibrio fischeri*

Zur Beurteilung der Proben wurden aus den Messergebnissen der Teilnehmer am IHU die G-Werte berechnet. Die G-Werte dienen als Maß für die Übereinstimmung der Laboruntersuchungen der drei Partner.

Zur Berechnung der G-Werte wurde die Integral- und Endpunktauswertung durchgeführt.

Zum Vergleich der Parallelität der Dreifachbestimmung einer Probe bei den jeweiligen Teilnehmern wurde die prozentuale Standardabweichung der Parallelen vom Mittelwert der optischen Dichte (prozentual) aufgeführt. In der Tabelle VI - 18 sind die Daten für den Zellvermehrungshemmtest mit *Vibrio fischeri* dargestellt.

Tabelle VI - 18: Zellvermehrungshemmtest mit *Vibrio fischeri*, G_{LW} -Werte der Integral- und Endpunktauswertung, Standardabweichung (σ) der prozentualen Hemmwerte

	G_{LW} -Werte						Standardabweichung (σ)					
	IHU		FhG		DMT		IHU		FhG		DMT	
Bodenprobe	G_{LW} (Int.)	G_{LW} (End.)	G_{LW} (Int.)	G_{LW} (End.)	G_{LW} (Int.)	G_{LW} (End.)	σ (Int.) [%]	σ (End.) [%]	σ (Int.) [%]	σ (End.) [%]	σ (Int.) [%]	σ (End.) [%]
Iserlohn	8	4	4	2	2	2	4,9	4,2	3,2	4,0	4,5	3,5
Gaswerk 1:2	4	4	4	4	2	2	1,4	2,2	1,3	0,7	1,7	1,2
Landhausen	2	2	2	2	4	2	3,0	3,3	2,9	3,4	2,2	4,8
PAK-Mix	8	8	16	8	4	4	2,8	5,0	1,1	1,1	4,6	4,7
Sickergraben	128	128	256	128	2048*	64	5,1	3,9	2,5	2,0	2,2	2,0
Neuohe	2	2	2	2	2	2	7,2	5,0	3,4	3,1	8,4	11,9
IMA SM 66	2	2	2	2	2	2	0,3	2,6	1,3	0,9	0,5	0,7
IMA 927 B	2	2	2	2	2	2	5,9	4,6	7,3	3,4	3,9	3,8

G_{LW} -Wert = Kleinster Verdünnungsfaktor, bei dem das Wachstum der Bakterien um weniger als 20% gehemmt ist. Int. = Integralauswertung, End. = Endpunktauswertung, * = Dosis-Wirkungsbeziehung der Probe Sickergraben unklar (siehe Abbildung VI - 10).

Auswertung:

Die Auswertung der von den Teilnehmern ermittelten Daten erfolgte am IHU Aachen. Allerdings konnte der Auswerteendpunkt häufig nicht eindeutig festgelegt werden, da er sich nach der Wachstumskinetik richtet. Bei *V. fischeri* liegt im Normalfall ein triaxisches Wachstum vor, d. h. nach einer kurzen lag-Phase, einer log-Phase und einer frühen, kurzen, stationären Phase, schließt sich eine zweite log-Phase, eine zweite stationäre Phase und eine dritte log-Phase und stationäre Phase an. Frische Zellen und Kryokulturen von *V. fischeri* zeigen kurze lag-Phasen von 1 - 2 h Dauer. Die erste log-Phase des triaxischen Kurvenverlaufs dauert in beiden Fällen ungefähr 8 h und erreicht spätestens mit der 12. Stunde die bei dem vorgegebenen Messintervall nur angedeutete frühe stationäre Phase des ersten Wachstumszyklus.

Der Auswerteendpunkt wird anhand der Wachstumskinetik der Kontrollen zu Beginn der frühen stationären Phase festgelegt, die normalerweise an einer leichten Schulter in der Ki-

netik optisch zu erkennen ist. Bei untypischen Wachstumskinetiken, d. h. der für ein triauxisches Wachstum typische Kurvenverlauf mit zwei Schultern wird nicht ausgebildet, kann der Übergang von der ersten log-Phase in die frühe stationäre Phase optisch nicht genau festgelegt werden.

Die folgende Abbildung zeigt den optimalen Verlauf der triauxischen Wachstumskurve für das Bakterien *V. fischeri*. Der Pfeil kennzeichnet den Auswerteendpunkt.

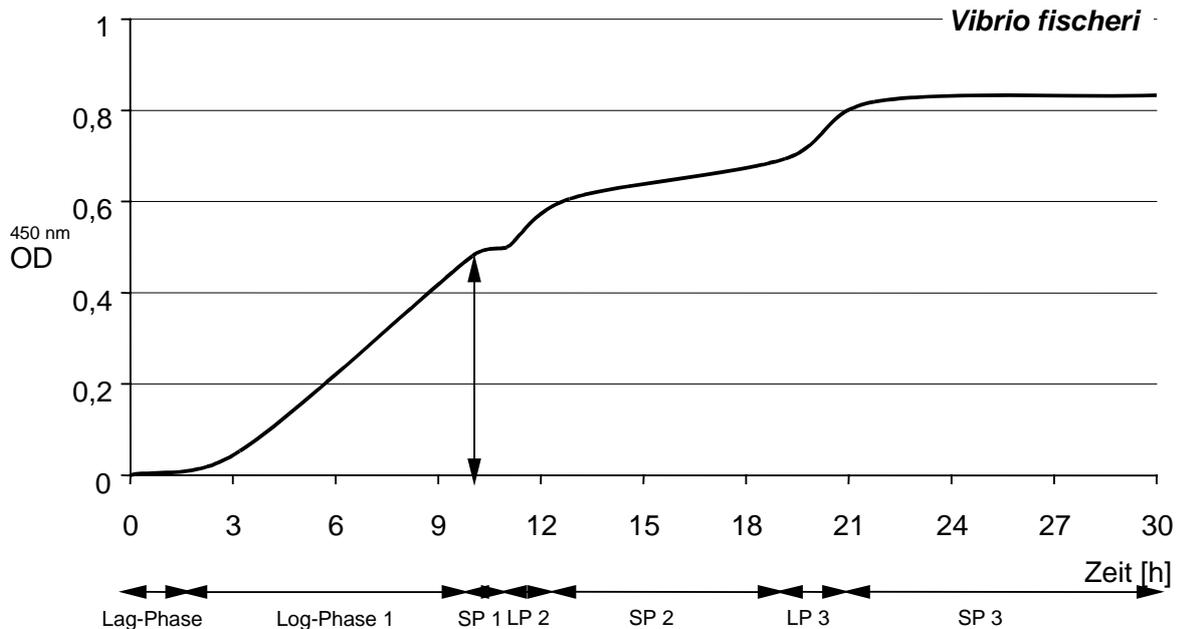


Abbildung VI - 7: Wachstumskurve von *V. fischeri* nach photometrischer Datenaufnahme mit einem Mikrotitrationsplattenphotometer (iEMS-Reader® Labsystems), LP = Log-Phase, SP = Stationäre Phase

Bei der Durchführung des Zellvermehrungshemmtests mit *Vibrio fischeri* ist in der Regel die dritte Log-Phase und die dritte stationäre Phase nicht erkennbar. Auch sind die Übergänge zwischen den einzelnen Wachstumsphasen nicht so stark ausgeprägt. Die folgende Abbildung zeigt eine typische Wachstumskurve für *Vibrio fischeri*, die im Rahmen der Laborvergleichsuntersuchungen aufgezeichnet wurde. Der Auswerteendpunkt, d. h. das Ende der Log-Phase, liegt bei 8 Stunden und ist deutlich zu erkennen.

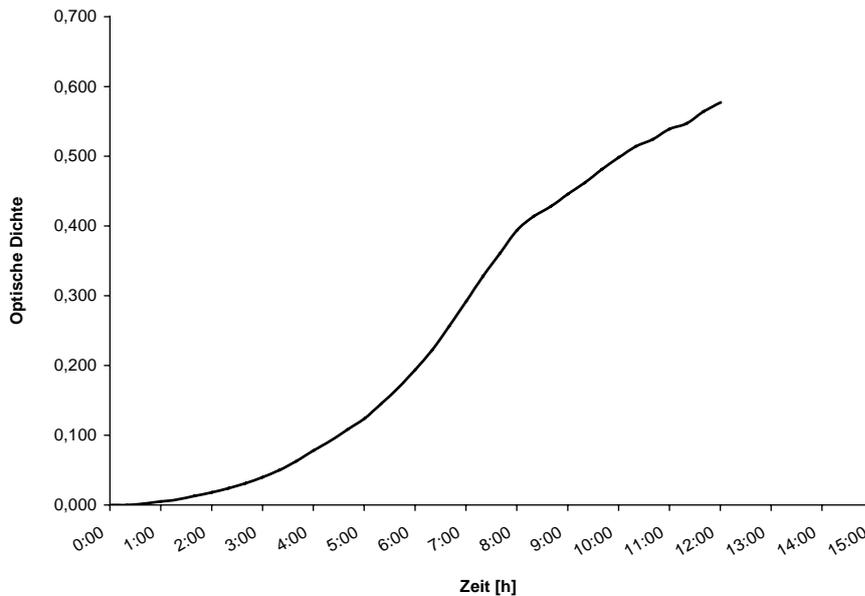


Abbildung VI - 8: Wachstum von *V. fischeri* auf der Mikrotitrationsplatte nach einem Zellvermehrungshemmtest (IHU). Dargestellt ist die Wachstumskurve einer Kontrolle.

Zum Vergleich wird die Wachstumskurve eines Zellvermehrungshemmtests mit *Vibrio fischeri* dargestellt (Abbildung VI - 9), der bei einem anderen Teilnehmer durchgeführt wurde.

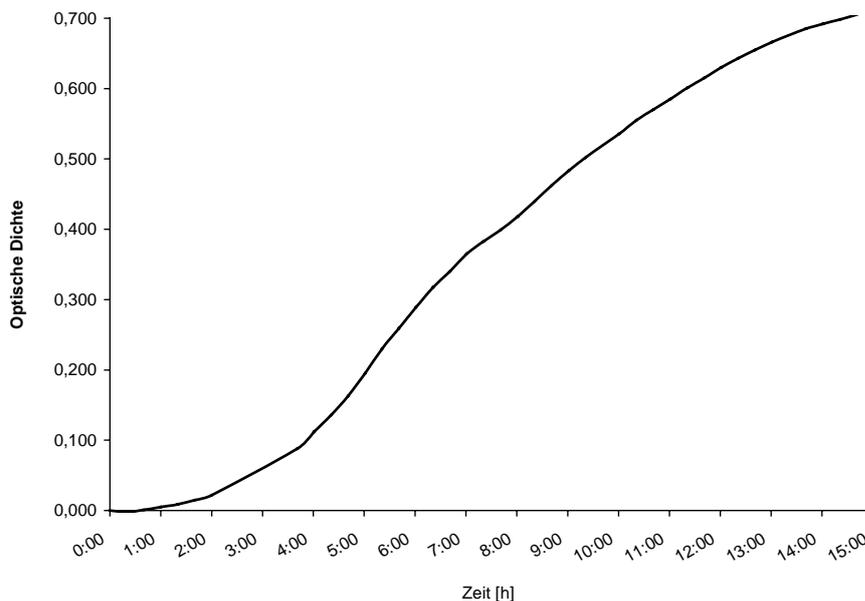


Abbildung VI - 9: Wachstum von *V. fischeri* auf der Mikrotitrationsplatte nach einem Zellvermehrungshemmtest (DMT). Dargestellt ist die Wachstumskurve einer Kontrolle.

Bei vergleichender Betrachtung der Wachstumskurven, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Skalierung der Graphen, ist der unterschiedliche Verlauf dennoch ersichtlich wie auch das Fehlen eines so deutlichen Überganges von der Log-Phase in die stationäre Phase. Bei der Auswertung dieses Tests stellt sich die Frage, wo genau der Endpunkt der Log-Phase ist. Als Bereich könnte 7 bis 9 Stunden angegeben werden, hierbei ist die Unsicherheit allerdings groß.

G_{LW}-Werte:

Es gibt eine gute Übereinstimmung der G_{LW}-Werte bei den einzelnen Teilnehmern (Tabelle VI - 18). Abweichungen von mehreren G-Stufen wurden nur bei der Probe Sickergraben beobachtet. Dabei ist allerdings anzumerken, dass die zugehörige Dosis-Wirkungsbeziehungen, die bei DMT ermittelt wurden, keinen typischen Verlauf aufweisen. So gibt es bei der Integralauswertung mehrere Verdünnungsstufen, bei denen eine Hemmung von 23 bis 29 % auftritt (Abbildung VI - 10, siehe unten). Die Dosis-Wirkungsbeziehung verläuft nicht optimal, da bei diesem Teilnehmer zwischen den Verdünnungsstufen 1:128 bis 1:1024 kaum eine Abnahme der Hemmung des Wachstums erfolgt. Die Folge ist, dass die Bewertung der Bodenprobe an hand des G_{LW}-Wertes (2048 Tabelle VI - 18) unklar ist.

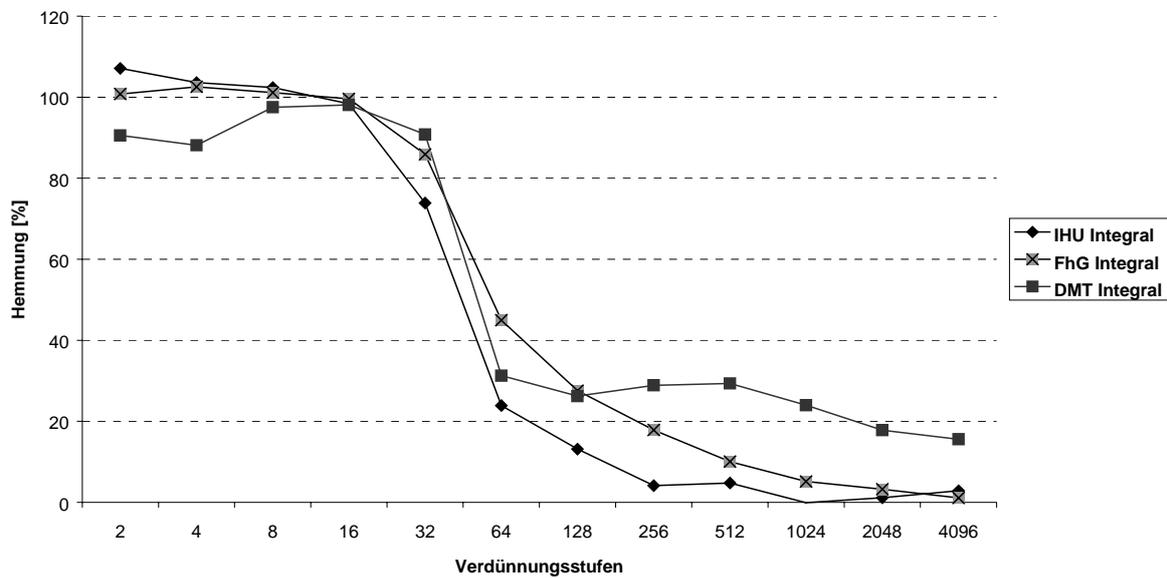


Abbildung VI - 10: Dosis-Wirkungsbeziehungen der Integralauswertung im Zellvermehrungshemmtest mit *V. fischeri*, Probe: Sickergraben

Die Abbildung VI - 11 mit den Dosis-Wirkungsbeziehungen der Endpunktauswertung der Probe Sickergraben bestätigt die Problematik bei der Beurteilung dieses Bodeneluates.

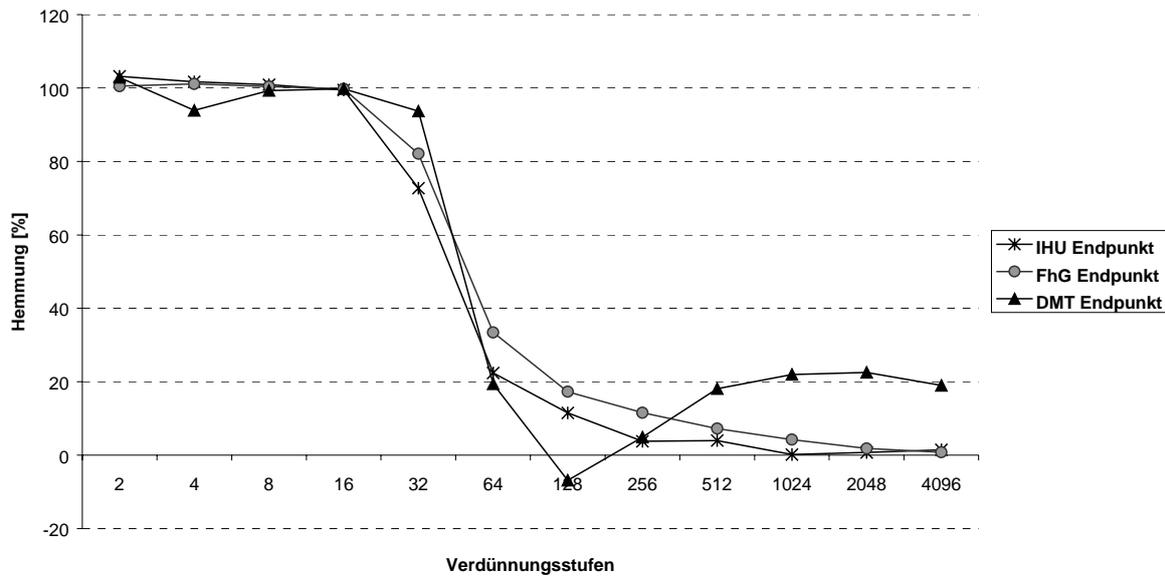


Abbildung VI - 11: Dosis-Wirkungsbeziehungen der Endpunktauswertung im Zellvermehrungshemmtest mit *V. fischeri*, Probe: Sickergraben

Bei der Endpunktauswertung (Abbildung VI - 11) wird schon bei einer Verdünnung von 1:64 eine Hemmung von weniger als 20 % ermittelt, die dann allerdings langsam wieder auf 22,5 % bei der Verdünnungsstufe 1:2048 ansteigt, um bei 1:4096 unter 20 % zu gelangen. Ob ab dieser Verdünnungsstufe eine Hemmung von weniger als 20 % tatsächlich erreicht wird oder eine erneuter Anstieg der Hemmwerte eintritt, ist unklar. In diesem Fall müsste man bei genauer Betrachtung der Hemmwerte entweder einen G_{LW} -Wert von 64 angeben (Tabelle VI - 18) bzw. eine nochmalige Überprüfung des Testergebnisses vornehmen.

Wachstumsförderung:

Häufig konnte bei der Auswertung der Daten von DMT eine hohe Wachstumsförderung festgestellt werden. Wenn auch bei den anderen Teilnehmern Wachstumsförderung beobachtet werden konnte, lag die Wachstumsförderung bei DMT in der Regel um das 10-fache höher. Oft wurde aber auch nur bei DMT eine starke Wachstumsförderung festgestellt. Als Beispiel soll der *V. fischeri* Zellvermehrungshemmtest mit der Probe Gaswerk 1:2 dienen.

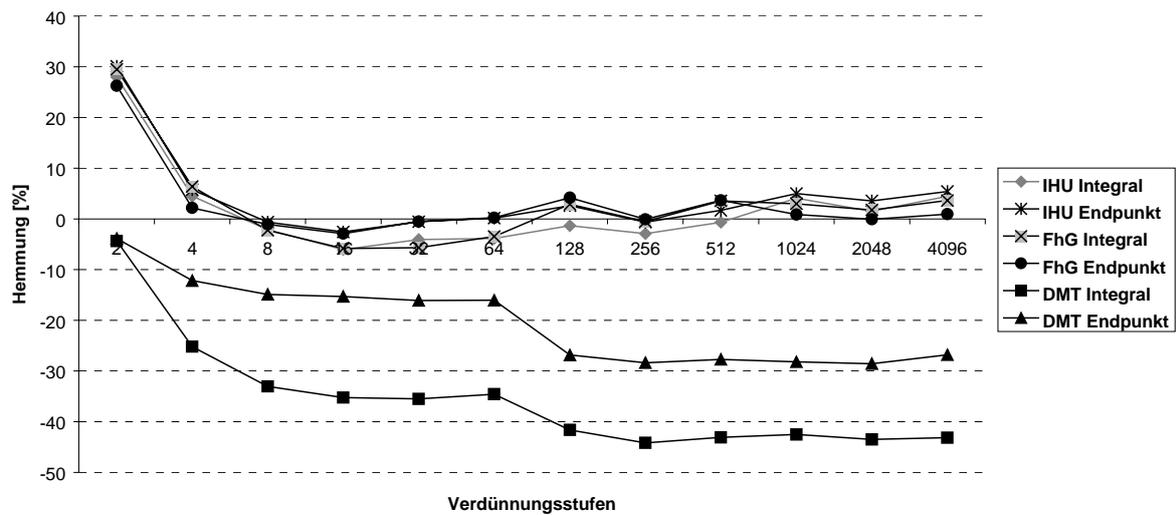


Abbildung VI - 12: Dosis-Wirkungsbeziehungen der Integral- und Endpunktauswertung im Zellvermehrungshemmtest mit *V. fischeri*, Probe: Gaswerk 1:2

Im Gegensatz zu den Dosis-Wirkungsbeziehungen von FhG und IHU, die bei der kleinsten Verdünnungsstufe von 1:2 mit einer Hemmung von 25 bis 30 % starten, kann bei DMT für die gleiche Verdünnungsstufe eine Wachstumsförderung von 5% festgestellt werden, die je nach Auswertemodus auf bis zu 45% steigt.

Standardabweichungen:

Die aufgeführten Standardabweichungen (Tabelle VI - 18) beziehen sich auf den Mittelwert der Optischen Dichten der jeweiligen Verdünnungsstufe. In der Regel liegen die Standardabweichungen der Teilnehmer unter 10 %.

Bewertung:

Zur Verdeutlichung der Übereinstimmung der Testergebnisse der Teilnehmer wird die Bewertung mit G_{LW} -Werten vereinfacht, indem eine Aussage bezüglich der Toxizität der Probe getroffen wird. Dabei wird gemäß einem Vorschlag der DECHEMA-Ad-hoc-Arbeitsgruppe "Methoden zur toxikologischen/ökotoxikologischen Bewertung von Böden" ein Grenzwert eingeführt. Für den Zellvermehrungshemmtest mit *Vibrio fischeri* gilt gemäß der DECHEMA ein Testgut dann als toxisch, wenn der G_{LW} -Wert größer 2 ist.

In der ist auf Basis dieses Grenzwertes die Bewertung der Toxizität der Bodeneluat im Zellvermehrungshemmtest mit *Vibrio fischeri* vorgenommen worden.

Tabelle VI - 19: Zellvermehrungshemmtest mit *Vibrio fischeri*, Beurteilung der Böden
 (+: Beurteilung des Eluates als toxisch auf Basis des testspezifischen G-Wertes;
 -: Beurteilung des Eluates als nicht toxisch auf Basis des testspezifischen G-Wertes)

	IHU		FhG		DMT	
	Int.	End.	Int.	End.	Int.	End.
Iserlohn	+	+	+	-	-	-
Gaswerk 1:2	+	+	+	+	-	-
Landhausen	-	-	-	-	+	-
PAK-Mix	+	+	+	+	+	+
Sickergraben	+	+	+	+	+	+
Neuohe	-	-	-	-	-	-
IMA SM 66	-	-	-	-	-	-
IMA 927 B	-	-	-	-	-	-

Int. = Integralauswertung, End. = Endpunktauswertung

Bewertung:

Die Beurteilung der Bodeneluate bezüglich ihrer Toxizität auf Basis der G-Werte ergibt ein ähnliches Bild wie die der G-Werte in der Tabelle VI - 18. Bei Betrachtung der vereinfachten Darstellung der Toxizitäten werden drei von acht Böden bei den verschiedenen Teilnehmern unterschiedlich bewertet. Da hier die G-Werte selbst nicht ersichtlich sind, kann das Ausmaß der Abweichungen nicht eingeschätzt werden. So würde die Probe Iserlohn zu 50 % als toxisch bewertet und zu 50 % als nicht toxisch, so dass eine eindeutige Bewertung nicht möglich wäre. Entsprechendes gilt für die Probe Gaswerk 1:2. Die Probe Landhausen würde nach der Endpunktauswertung, die in der Regel eingesetzt wird, als nicht toxisch klassifiziert. Einheitlich ist die Beurteilung der Toxizität bei stark belasteten Proben wie PAK-Mix und Sickergraben (PAK- bzw. TNT-Belastung) sowie bei unbelasteten Proben IMA SM 66 und IMA 927 b (sanierte Böden) (siehe auch Tabelle VI - 1). Der Schwermetallgehalt der Probe Landhausen wirkt sich in diesem Test nicht toxisch aus.

Der Informationsgewinn durch diese Art der Darstellung der Untersuchungsergebnisse ist sehr gering. Abschätzungen wie hoch das Maß der Toxizität ist und welche Abweichungen dem zugrunde liegen, entfallen gänzlich.

VI - 3.2.2 Zellvermehrungshemmtest mit *Pseudomonas putida*

Zur Beurteilung der Proben wurden aus den Messergebnissen der Teilnehmer am IHU die G-Werte ermittelt. Die G-Werte dienen als Maß für die Übereinstimmung der Laboruntersuchungen der drei Partner.

Zur Berechnung der G-Werte wurde die Integral- und Endpunktauswertung durchgeführt.

Zum Vergleich der Parallelität der Dreifachbestimmung einer Probe bei den jeweiligen Teilnehmern wurde die prozentuale Standardabweichung der Parallelen vom Mittelwert der Optischen Dichte aufgeführt. In der Tabelle VI - 20 sind die Daten für den Zellvermehrungshemmtest mit *Pseudomonas putida* dargestellt.

Tabelle VI - 20: Zellvermehrungshemmtest mit *Pseudomonas putida*, G-Werte der Integral- und Endpunktauswertung, Standardabweichung (σ) der Parallelen der prozentualen Hemmwerte

Bodenprobe	G _{PW} -Werte						Standardabweichung (σ)					
	IHU		FhG		DMT		IHU		FhG		DMT	
	G _{PW} (Int.)	G _{PW} (End.)	G _{PW} (Int.)	G _{PW} (End.)	G _{PW} (Int.)	G _{PW} (End.)	σ (Int.) [%]	σ (End.) [%]	σ (Int.) [%]	σ (End.) [%]	σ (Int.) [%]	σ (End.) [%]
Iserlohn	2	2	8	2	8	8	<1	1,2	<1	<1	1,6	2,1
Gaswerk 1:2	2	2	2	2	2	2	5,5	<1	3,0	<1	<1	<1
Landhausen	64	32	256	256	64	32	1,5	1,2	4,9	1,3	5,6	<1
PAK-Mix	2	2	16	2	2	2	4,6	<1	2,5	<1	7,8	3,3
Sickergraben	2	2	2	2	2	2	1,7	1,3	7,2	3,0	4,0	7,3
Neuohe	4	2	8	4	2	2	4,7	<1	3,1	12,0	1,8	2,7
IMA SM 66	2	2	2	2	2	2	<1	1,0	1,5	1,1	2,9	<1
IMA 927 B	2	2	2	2	2	2	<1	<1	6,6	1,4	3,8	5,1

G_{LW}-Wert = Kleinster Verdünnungsfaktor, bei dem das Wachstum der Bakterien um weniger als 20% gehemmt ist. Int. = Integraalauswertung, End. = Endpunktauswertung

Auswertung:

Die Auswertung der von den Teilnehmern ermittelten Daten erfolgte am IHU Aachen. Aufgrund ungewöhnlicher Wachstumskurven der Wachstumskontrollen war eine eindeutige Festlegung des Auswerteendpunktes, der sich nach der Wachstumskinetik richtet, häufig erschwert.

Das Wachstum der Kontrollen von *P. putida* zeigt in den Zellvermehrungshemmtests die in Abbildung VI - 13 dargestellten optimalen Verläufe.

Die Dauern der jeweiligen Phasen sind stammspezifisch und von den Kulturbedingungen (Verwendung von Frisch- oder Kryokultur, Minimal- bzw. Komplexmedium) abhängig. Bei Verwendung von ü/N-Kulturen von *P. putida* umfasst die lag-Phase einen Zeitraum von 0 bis 5 h und bei Kryokulturen 6 bis 9 h. Die exponentielle Wachstumsphase setzt demgemäß mit der 5. bzw. 9. Stunde ein und dauert bis zur 21. Stunde an. Eine Absterbphase ist während der maximal 33-stündigen Datenaufnahme (bei 20-minütigem Messintervall) nicht nachzuweisen. Der Pfeil kennzeichnet den möglichen Auswerteendpunkt.

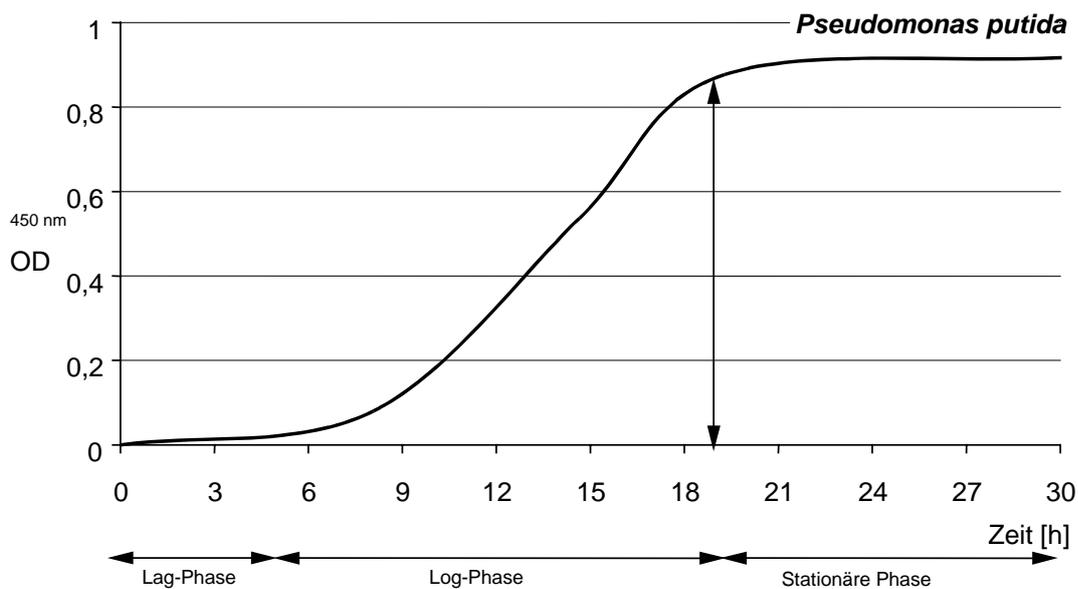


Abbildung VI - 13: Wachstumskurve von *P. putida* nach photometrischer Datenaufnahme mit einem Mikrotitrationsplattenphotometer (iEMS-Reader® Labsystems)

In der nächsten Abbildung VI - 14 ist der charakteristische Verlauf einer Wachstumskurve nach einem Zellvermehrungshemmtest mit *P. putida* gezeigt. In diesem Versuch wurden Kryokulturen als Inokulum für den Testansatz verwendet, so dass die lag-Phase etwa 11 bis 12 Stunden dauert. Dementsprechend verschiebt sich der Auswerteendpunkt nach hinten und wurde bei 21 Stunden festgelegt.

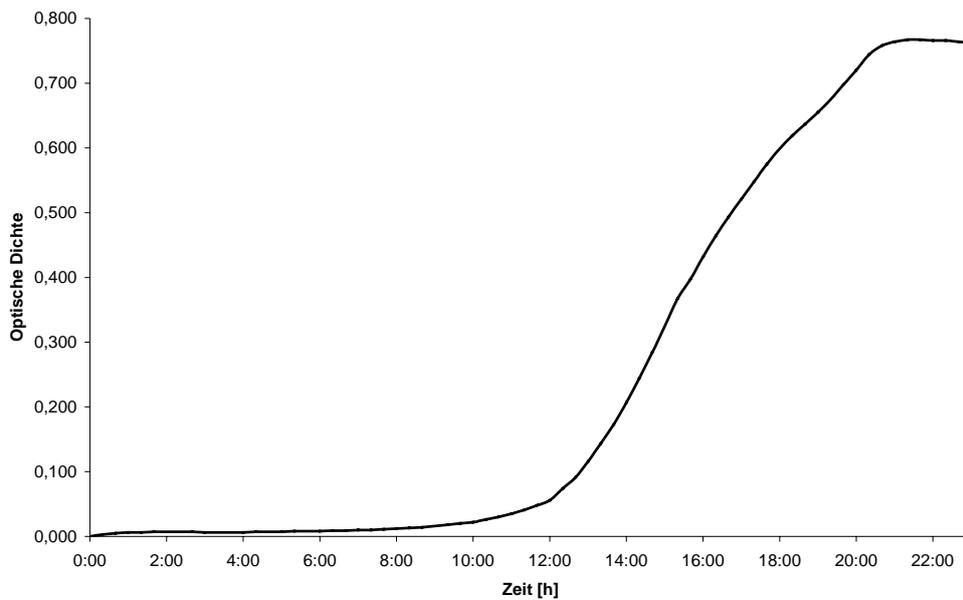


Abbildung VI - 14: Wachstum von *P. putida* auf der Mikrotitrationsplatte nach einem Zellvermehrungshemmtest eines Laborvergleichsteilnehmers. Dargestellt ist die Wachstumskurve einer Kontrolle.

Im Gegensatz zu der vorangehenden Wachstumskurve liefert die folgende Kurve ein untypisches Bild.

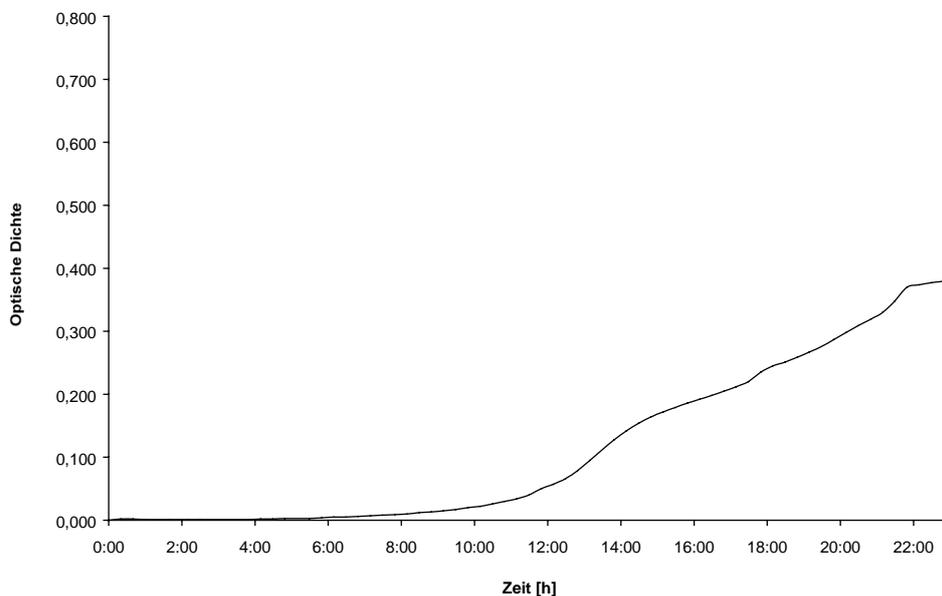


Abbildung VI - 15: Wachstum von *P. putida* auf der Mikrotitrationsplatte nach einem Zellvermehrungshemmtest eines Laborvergleichs-Teilnehmers. Dargestellt ist die Wachstumskurve einer Kontrolle.

Zwar scheint die lag-Phase ebenso nach 11 bis 12 Stunden beendet, aber die Steigung der sich anschließenden exponentiellen Wachstumsphase ist zu gering, so dass weder ein eindeutiger Auswerteendpunkt noch die übliche Optische Dichte von 0,8 erreicht wird. Obwohl

es sich hierbei um Kryokulturen der gleichen Bakteriencharge wie für den oberen Versuch handelt, muss einer der Verfahrensschritte zu diesen Abweichungen geführt haben

G_{PW}-Werte:

Es gibt eine gute Übereinstimmung der G_{PW}-Werte bei den einzelnen Teilnehmern. Abweichungen von mehreren G-Stufen wurden nur bei der Probe Landhausen (FhG) beobachtet. Dort könnte jedoch bei Prüfung von feiner abgestimmten Verdünnungsstufen ein G_{PW}-Wert bestimmt werden, der zwischen den Verdünnungsstufen 1:128 und 1:256 liegt (siehe Abbildung VI - 16).

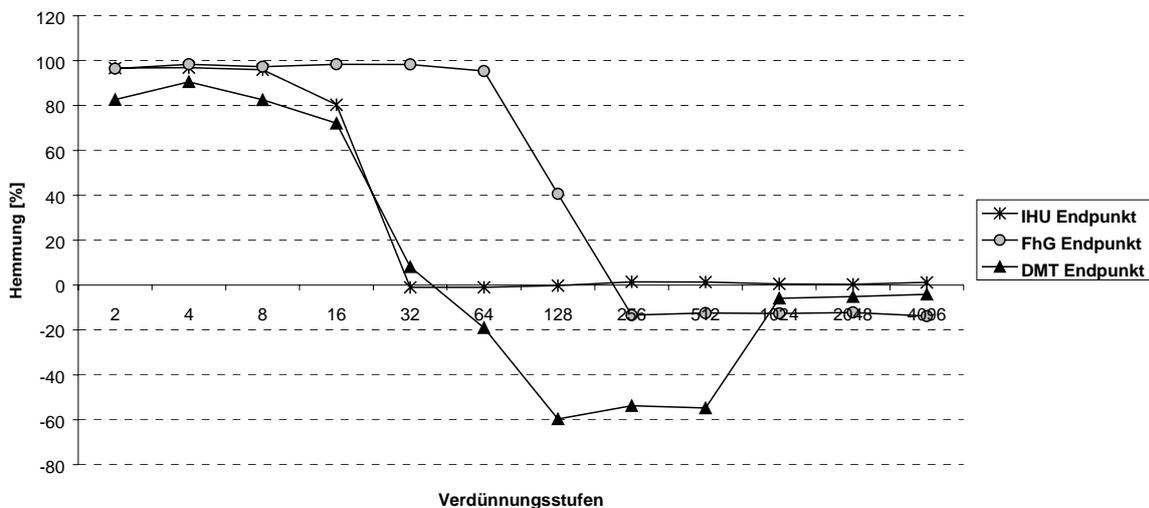


Abbildung VI - 16: Dosis-Wirkungsbeziehungen der Endpunktauswertung im Zellvermehrungshemmtest mit *P. putida* Probe: Landhausen

Generell gibt es eine gute Übereinstimmung der ermittelten G_{PW}-Werte von IHU und DMT. Häufig war wiederum bei den von DMT gemessenen Wachstumskurven der Kontrollen ein für das Bakterium untypisches Wachstumsverhalten zu beobachten, so dass die Auswertepunkte schwierig zu bestimmen waren. Die folgende Abbildung verdeutlicht die Schwierigkeiten. In der Zeile A sind die Wachstumskontrollen wiedergegeben, die wie schon in Abbildung VI - 15 gezeigt, nicht den typischen Verlauf zeigen. In diesem Zellvermehrungshemmtest ist es praktisch nicht möglich, anhand der Wachstumskontrollen den richtigen Auswertepunkt zu legen. Eine Wiederholung des Tests wäre erforderlich.

In den Zeilen B bis H befinden sich die Probenverdünnungen gemäß dem Schema in Abbildung VI - 3 (Kapitel VI - 2.3.1), wobei die Reihen 1 bis 6 mit der Probe Iserlohn, die Reihen 7 bis 12 mit der Probe Gaswerk 1:2 belegt sind.

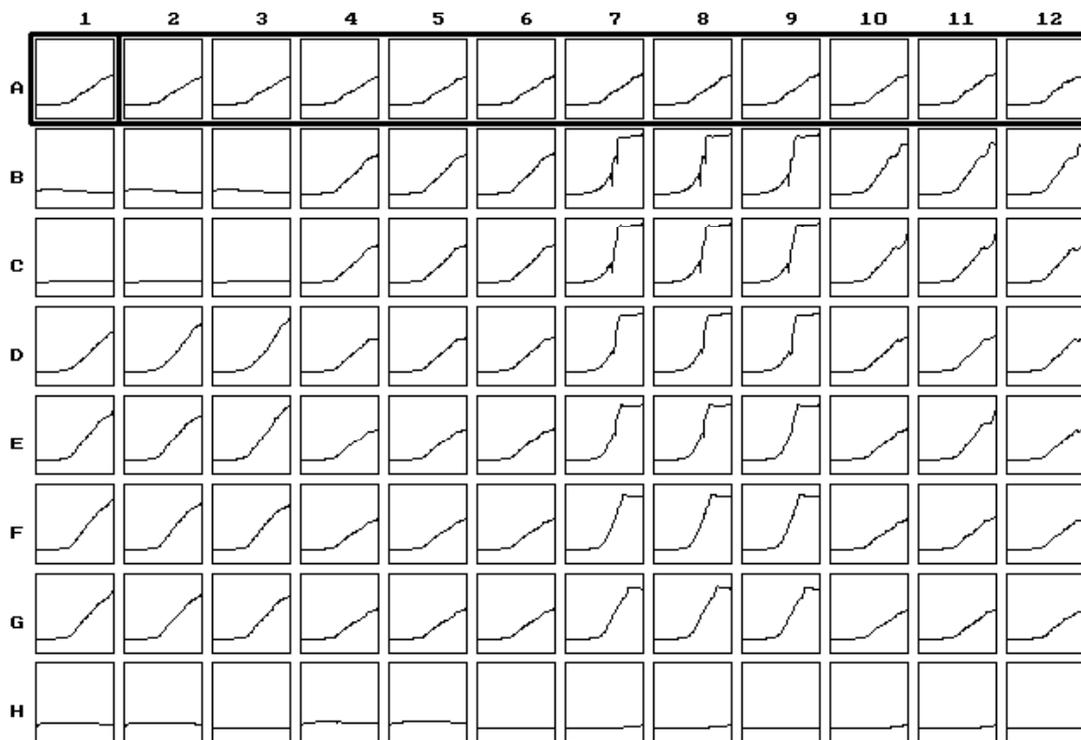


Abbildung VI - 17: Wachstumskurven von *P. putida* im Zellvermehrungshemmtest verschiedener Probenverdünnungsstufen, Proben: Iserlohn (B1-H6) und Gaswerk 1:2 (B7-H12)

Wird der Auswertendpunkt anhand dieser Wachstumskinetik auf 22 Stunden festgelegt, tritt bei der Auswertung der Probe Gaswerk 1:2 Reihe 7 bis 12, die für *P. putida* charakteristische Wachstumskurven zeigen, eine hohe Wachstumsförderung auf. Die hohe Bedeutung des Verlaufs der Wachstumskurven der Kontrollen in den Zellvermehrungshemmtests wird an diesem Beispiel offensichtlich.

Wachstumsförderung:

Wieder wurde häufig bei *Pseudomonas putida* eine extrem hohe Wachstumsförderung in den Tests festgestellt, die von DMT durchgeführt wurden. Zum Teil war die beobachtete Wachstumsförderung um das 100-fache höher als am IHU oder der FhG. Als Beispiel dient wieder die Probe Gaswerk 1:2 (Abbildung VI - 18).

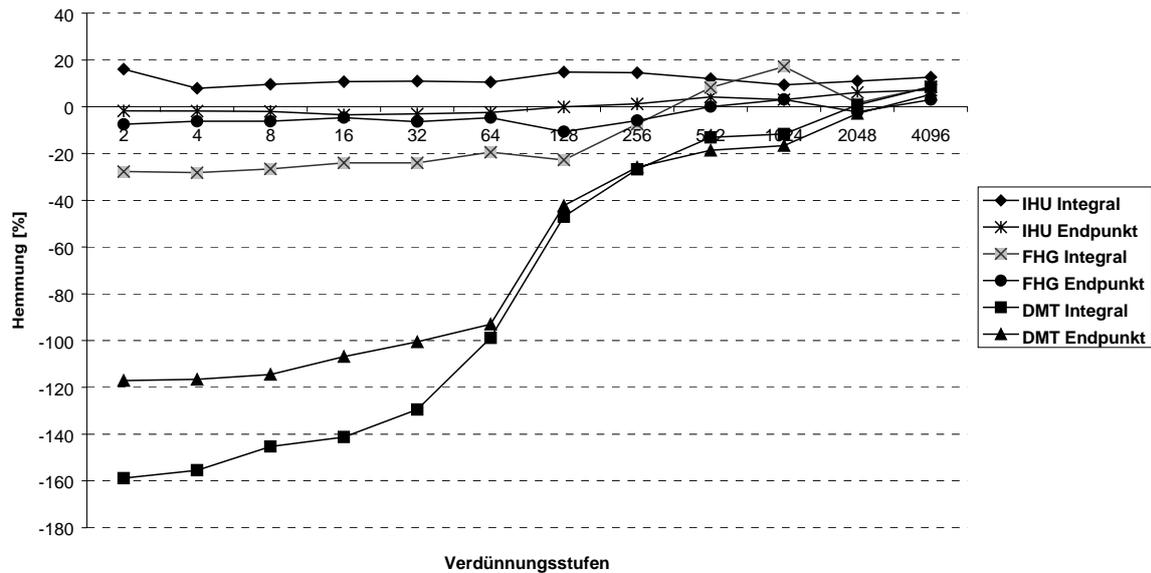


Abbildung VI - 18: Dosis-Wirkungsbeziehungen im Zellvermehrungshemmtest mit *P. putida*, Probe: Gaswerk 1:2

Standardabweichungen:

Fast alle Standardabweichungen (Tabelle VI - 20) der Teilnehmer liegen in der Regel unter 5 %. Das bedeutet, dass die Abweichungen der G-Werte der Teilnehmer nicht durch unverhältnismäßig hohe Standardabweichungen der Testverfahren begründet werden können.

Bewertung:

Zur eindeutigen Verifizierung der Testergebnisse der Teilnehmer wird die Bewertung mit G_{PW} -Werten vereinfacht, indem eine Aussage bezüglich der Toxizität der Probe getroffen wird. Dabei wird gemäß einem Vorschlag der DECHEMA-Ad-hoc-Arbeitsgruppe "Methoden zur toxikologischen/ökotoxikologischen Bewertung von Böden" ein Grenzwert eingeführt. Für den Zellvermehrungshemmtest mit *Pseudomonas putida* gilt gemäß der DECHEMA ein Testgut dann als toxisch, wenn der G_{PW} -Wert größer 2 ist.

In der Tabelle VI - 21 ist auf Basis dieses Grenzwertes die Bewertung der Toxizität der Bodeneluat im Zellvermehrungshemmtest mit *P. putida* vorgenommen worden

Tabelle VI - 21: Zellvermehrungshemmtest mit *Pseudomonas putida*, Beurteilung der Böden (+: Beurteilung des Eluates als toxisch auf Basis des testspezifischen G-Wertes; -: Beurteilung des Eluates als nicht toxisch auf Basis des testspezifischen G-Wertes)

	IHU		FhG		DMT	
	Int.	End.	Int.	End.	Int.	End.
Iserlohn	-	-	+	+	+	+
Gaswerk 1:2	-	-	-	-	-	-
Landhausen	+	+	+	+	+	+
PAK-Mix	-	-	+	-	-	-
Sickergraben	-	-	-	-	-	-
Neuohe	+	-	+	+	-	-
IMA SM 66	-	-	-	-	-	-
IMA 927 B	-	-	-	-	-	-

Int. = Integralauswertung, End. = Endpunktauswertung

Bewertung:

Die Beurteilung der Bodeneluate bezüglich ihrer Toxizität auf Basis der G-Werte ergibt ein ähnliches Bild wie die der G-Werte in der Tabelle VI - 20. Abweichungen unter den Teilnehmern treten ebenso wie bei *Vibrio fischeri* häufiger bei Proben auf, deren toxisches Potenzial nicht eindeutig festgelegt werden kann. Hingegen sind stark toxische Proben bei allen Teilnehmern positiv bewertet worden, obwohl es dort teilweise Abweichungen der G-Werte von drei Verdünnungsstufen gibt (Landhausen).

Wie schon bei *V. fischeri* gilt, dass der Informationsgewinn durch diese Art der Darstellung gering ist. Allerdings kann durch den Vergleich der beiden Tabellen aus den Zellvermehrungshemmtest die unterschiedliche toxische Wirkung der Bodeneluate auf die Bakterien erkannt werden. Deutliches Beispiel hier ist das Bodeneluat Landhausen, das im *V. fischeri* Zellvermehrungshemmtest nicht toxisch war (Tabelle VI - 20), im *P. putida* Zellvermehrungshemmtest von allen Teilnehmern als toxisch eingestuft wird (Tabelle VI - 21). Rückblickend auf die Untersuchung der Hintergrundbelastungen der Böden (Tabelle VI - 1) fällt auf, dass im Boden Landhausen sowohl Schwermetalle als auch Kohlenwasserstoffverbindungen als Belastung existieren. Ebenso kann im Boden Neohe in 50% der Fälle eine Toxizität bestimmt werden. Dieser Boden ist ebenso mit Schwermetallen, hauptsächlich Zink, belastet. Dies lässt darauf schließen, dass bestimmte

Schwermetalle oder deren Verbindungen toxisch auf das Bakterium *P. putida* wirken und nicht auf *V. fischeri*.

VI - 3.2.3 Wachstumshemmtest mit *Scenedesmus subspicatus*

Zur Beurteilung der Proben wurden aus den Messergebnissen der Teilnehmer am IHU die G-Werte ermittelt. Die G-Werte dienen als Maß für die Übereinstimmung der Laboruntersuchungen der drei Partner.

Zur Berechnung der G-Werte wurde die Integral- und Endpunktauswertung durchgeführt.

Zum Vergleich der Parallelität der Dreifachbestimmung einer Probe bei den jeweiligen Teilnehmern wurde die absolute Standardabweichung der Parallelen vom Mittelwert der Hemmung aufgeführt. In der Tabelle VI - 22 sind die Daten für den Chlorophyll-Fluoreszenztest mit *Scenedesmus subspicatus* aufgeführt.

Tabelle VI - 22: Algen-Wachstumstest mit *Scenedesmus subspicatus*, G_A -Werte, Standardabweichung (σ , absolut) der Hemmwerte

	G_A -Werte		G_A -Werte			Standardabweichung (σ) absolut		
	100 mL Ansatz im EK	STABW (σ) absolut	2 mL Ansatz in 24-Well Mikrotitrationsplatte					
Bodenprobe	IHU		IHU	FhG	DMT	IHU	FhG	DMT
Iserlohn	2	4,3	2	8*	2	7,0	12,3	1,2
Gaswerk 1:2	8	< 1	16	32	16	1,4	< 1	< 1
Landhausen	12	1,2	24	8*	4	< 1	< 1	1,3
PAK-Mix	4	1,1	3	4	2	1,9	12,9	2,5
Sickergraben	> 128	1,5	> 512	128	> 64	1,4	< 1	< 1
Neuohe	4	< 1	64	4	4	7,5	< 1	< 1
IMA SM 66	2	4,6	2	4*	2	3,9	2,3	4,0
IMA 927 B	2	< 1	6	2	4	< 1	< 1	< 1

EK = Erlenmeyerkolben, σ = Standardabweichung (STABW), * = G-Werte neu ausgewertet, nach Berücksichtigung des Einfluß der Probe auf die Wachstumskontrollen

G_A -Werte:

Die Übereinstimmung der G_A -Werte bei den einzelnen Teilnehmern variiert stärker als bei den Zellvermehrungshemmtest. Abweichungen von mehreren G-Stufen wurden bei den Proben Sickergraben, Landhausen, Neohe (IHU) beobachtet. Bei der Probe Neohe wurde am

IHU ein G_A -Wert von 64 ermittelt, hingegen bei den anderen Teilnehmern nur ein G_A -Wert von 4, entsprechend wurde die Probe Landhausen unterschiedlich bewertet. Die Überprüfung der Ergebnisse ergab, dass die absolute Standardabweichung der Hemmwerte der Probe Neuohre (IHU) in der Regel zwischen Werten von 25 und 49 (Verdünnungsstufe 1:2 bis 1:32) variierte, während die anderen Teilnehmer maximal Werte von 1,5 erreichten (Werte nicht gezeigt).

Auswertung:

Die Auswertung der von den Teilnehmern ermittelten Daten erfolgte am IHU Aachen. Den Ergebnissen liegt eine Endpunktauswertung zugrunde. Im Gegensatz zu den Zellvermehrungshemmtests, bei denen alle 20 Minuten eine Messung stattfindet, erfolgt bei dem Chlorophyll-Fluoreszenztest in Mikrotitrationsplatten alle 24 h eine Messung. Die Fluoreszenz des Algentests im 100 mL-Maßstab wird zum Zeitpunkt $t=0$ und $t=72$ h gemessen.

Standardabweichungen:

Im Gegensatz zu den Zellvermehrungshemmtests handelt es sich bei den aufgeführten Standardabweichungen um absolute Werte. In der Regel liegen die Werte für die Standardabweichungen bei der jeweiligen Verdünnungsstufe unter 1 bzw. unter 10.

Wachstumsförderung:

Extrem starke Wachstumsförderung wurde von allen Teilnehmern bei der Probe Iserlohn bestimmt. Die generelle Wachstumsförderung, die von DMT bei den Zellvermehrungshemmtests beobachtet wurde, konnte hier nicht festgestellt werden. Wachstumsförderungen treten gelegentlich auf, werden aber von unterschiedlichen Teilnehmern festgestellt. Ein Beispiel für extreme Wachstumsförderung wird in Abbildung VI - 19 gezeigt.

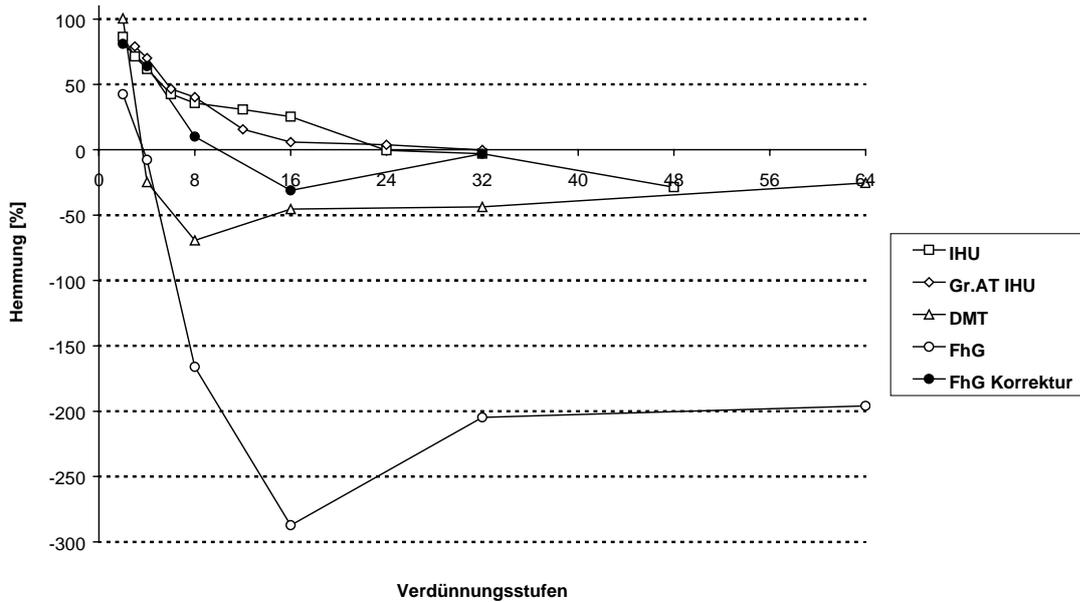


Abbildung VI - 19: Dosis-Wirkungsbeziehungen im Chlorophyll-Fluoreszenztest mit *Scenedesmus subspicatus*, Probe: Landhausen

Mit diesem Bodeneluat tritt bei FhG schon in einer Verdünnungsstufe von 1:4 eine geringe Wachstumsförderung auf, die sich rasch auf einen Wert von ca. 300 % steigert. Die scheinbare Wachstumsförderung wird durch die Beeinflussung der Wachstumskontrolle durch die Probe verursacht. Wie in Abbildung VI - 4 ersichtlich liegt die geringste Probenverdünnung neben den Wachstumskontrollen. Um diesen Effekt zu beurteilen wurde ein Teil der Daten neu ausgewertet. Dabei wurde die höchste Probenverdünnung als Wachstumskontrolle eingesetzt. Ergebnis ist die korrigierte Dosis-Wirkungsbeziehung für FhG.

Bewertung:

Gemäß einem Vorschlag der DECHEMA-Ad-hoc-Arbeitsgruppe "Methoden zur toxikologischen/ökotoxikologischen Bewertung von Böden" kann für den Chlorophyll-Fluoreszenztest ein Grenzwert eingeführt werden. Demnach gilt ein Testgut dann als toxisch, wenn der G_A -Wert größer 4 ist.

In der Tabelle VI - 23 ist auf Basis dieses Grenzwertes die Bewertung der Toxizität der Bodeneluates im Chlorophyll-Fluoreszenztest mit *S. subspicatus* vorgenommen worden.

Tabelle VI - 23: Algen-Wachstumstest *Scenedesmus subspicatus*, Beurteilung der Böden (+: Beurteilung des Eluates als toxisch auf Basis des testspezifischen G-Wertes; -: Beurteilung des Eluates als nicht toxisch auf Basis des testspezifischen G-Wertes)

	IHU	IHU	FhG	DMT
Bodenprobe	Makroansatz EK	24-Well Mikrotitrationsplatte		
Iserlohn	-	-	+	-
Gaswerk 1:2	+	+	+	+
Landhausen	+	+	+	-
PAK-Mix	-	-	-	-
Sickergraben	+	+	+	+
Neuohe	-	+	-	-
IMA SM 66	-	-	-	-
IMA 927 B	-	+	-	-

EK = Erlenmeyerkolben

Die Bewertung der Proben als toxisch bzw. nicht toxisch auf Basis der G_A -Werte (Tabelle VI - 22) liefert am IHU häufig eine Abweichung von 1 bis 4 G-Stufen zwischen dem 100 mL-Maßstab im Erlenmeyerkolben und dem 2 mL-Maßstab in der Mikrotitrationsplatte. Nur die Proben Gaswerk 1:2 und Sickergraben werden bei allen Teilnehmern als toxisch bewertet. Eine Übereinstimmung der Bewertung als nicht toxisch durch alle Teilnehmer kann für die Proben PAK-Mix und IMA SM 66 ermittelt werden. D. h. Proben mit eindeutiger Toxizität bzw. Proben, die eindeutig gering toxisch sind, wurden gleich beurteilt (siehe *Vibrio fischeri*).

VI - 3.2.4 Zusammenfassung der ökotoxikologischen Daten

In der folgenden Übersicht (Tabelle VI - 24) sind die Ergebnisse aller Laborvergleichsteilnehmer dargestellt. Zusätzlich sind die ökotoxischen Daten des Chlorophyll-Fluoreszenztests im 100 mL-Maßstab sowie die Daten des Lumineszenzhemmtests im Küvettenmaßstab aufgeführt. Beide Testverfahren wurden nur am IHU durchgeführt.

Tabelle VI - 24: Ökotoxikologische Charakterisierung der Bodeneluate im Überblick

Übersicht G-Werte																		
Ökotoxikologische Daten																		
	<i>Vibrio fischeri</i> -ZVHT						<i>Pseudomonas putida</i> -ZVHT						Algen-Wachstumstest			V. <i>fischeri</i> - LUHT		
	IHU		FHG		DMT		IHU		FHG		DMT		24-well MTP		E-K			
	Int.	End.	Int.	End.	Int.	End.	Int.	End.	Int.	End.	Int.	End.	IHU	FHG	DMT	IHU	IHU	
Iserlohn	8	4	4	2	2	2	2	2	2	8	2	8	8	2	8	2	2	32
Gaswerk	4	4	4	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	16	32	16	8	64
Landhausen	2	2	2	2	4	2	64	32	256	256	64	32	24	8	4	12	32	
PAK-Mix	8	8	16	8	4	4	2	2	16	2	2	2	3	4	2	4	256	
Sickergraben	128	128	256	128	2048	64	2	2	2	2	2	2	>512	128	>64	>128	1024	
Neuohe	2	2	2	2	2	2	4	2	8	4	2	2	64	4	4	4	8	
IMA SM 66	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	2	2	16	
IMA 927b	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	6	2	4	2	16	

EK = Erlenmeyerkolben, Int. = Integralauswertung, End. = Endpunktauswertung, ZVHT = Zellvermehrungshemmtests, LUHT = Lumineszenzhemmtest mit *V. fischeri* im Küvettenmaßstab, MTP = Mikrotitrationsplatte, G-Wert = Kleinste Verdünnungsstufe der Probe bei der eine Hemmung von weniger als 20 % auftritt

Der Vergleich der Daten im 100 mL-Maßstab des Chlorophyll-Fluoreszenztests mit dem 2 mL-Maßstab in Mikrotiterplatten, beide Testverfahren am IHU durchgeführt, zeigt für einige Proben eine gute Übereinstimmung der G_A -Werte, auf der anderen Seite werden aber auch Abweichungen von 4 G-Stufen (Probe Neuohe) beobachtet. In der Regel ist der Ansatz in Mikrotitrationsplatten etwas empfindlicher, das bedeutet, dass eine Hemmung von weniger als 20% erst in größeren Verdünnungsstufen erreicht wird.

Erstaunlicherweise ist die Übereinstimmung des 100 mL-Maßstabes mit den 24-Well-Mikrotitrationsansätzen bei FhG und DMT der Proben Sichergraben, Neuohe und IMA 927 B nahezu 100%ig. Generell werden von IHU im Mikrotitrationsplattenmaßstab höhere Hemmwerte bestimmt.

Mit dem nur am IHU für die Untersuchung der Bodeneluat eingesetzten *V. fischeri* Lumineszenzhemmtest (LUHT) im Küvettenmaßstab wurde entweder eine potentiell größere Toxizität gegenüber den Proben ermittelt oder geringere bzw. gleiche Toxizität bestimmt (Tabelle VI - 24). So wurde die Toxizität der Bodeneluat im *V. fischeri* Zellvermehrungshemmtests (Tabelle VI - 18) mit Ausnahme der Bodenprobe Sickergraben geringer eingestuft, als im *V. fischeri* LUHT. Im Lumineszenzhemmtest wurde für den Boden Sickergraben ein G_{LW} -Wert von 1024 bestimmt, der somit eine Mittelstellung zwischen den G_{LW} -Werten von IHU bzw. FhG und DMT bildet.

Im Vergleich zum *P. putida* Zellvermehrungshemmtest (Tabelle VI - 20) konnte im *V. fischeri* LUHT in der Regel eine größere Toxizität bestimmt werden. Einzige Ausnahme ist der Boden Landhausen, dessen Eluat auf *P. putida* im Zellvermehrungshemmtest deutlich toxischer wirkt.

Gegenüber dem Chlorophyll-Fluoreszenztest (Tabelle VI - 22) wurde im *V. fischeri* LUHT eine meist deutlich höhere Toxizität der Bodeneluat bestimmt.

Diese Übersicht zeigt anschaulich, dass die Testorganismen der ökotoxischen Verfahren unterschiedlich auf die Proben reagieren.

VI - 3.2.5 Referenztoxene:

Neben der Untersuchung der Bodenproben wurden von den Teilnehmern die Referenztoxene Kaliumdichromat und 3,5-Dichlorphenol in die Biotestverfahren eingesetzt. Die Testkonzentrationen wurden aus höherkonzentrierten Stammlösungen in Aqua bidest. hergestellt. Die prozentuale Hemmung der Testorganismen durch die Referenztoxene Kaliumdichromat bezieht sich auf das Kation Cr^{6+} .

V. FISCHERI ZELLVERMEHRUNGSHEMMTEST

Die folgenden Abbildungen zeigen die Hemmwerte der beiden Referenztoxene Kaliumdichromat und 3,5-Dichlorphenol gegenüber den Testorganismen *V. fischeri*, *P. putida* und *S. subspicatus*. Die Hemmwerte von Kaliumdichromat gegenüber *V. fischeri* sind in Abbildung VI - 20 zusammengefasst.

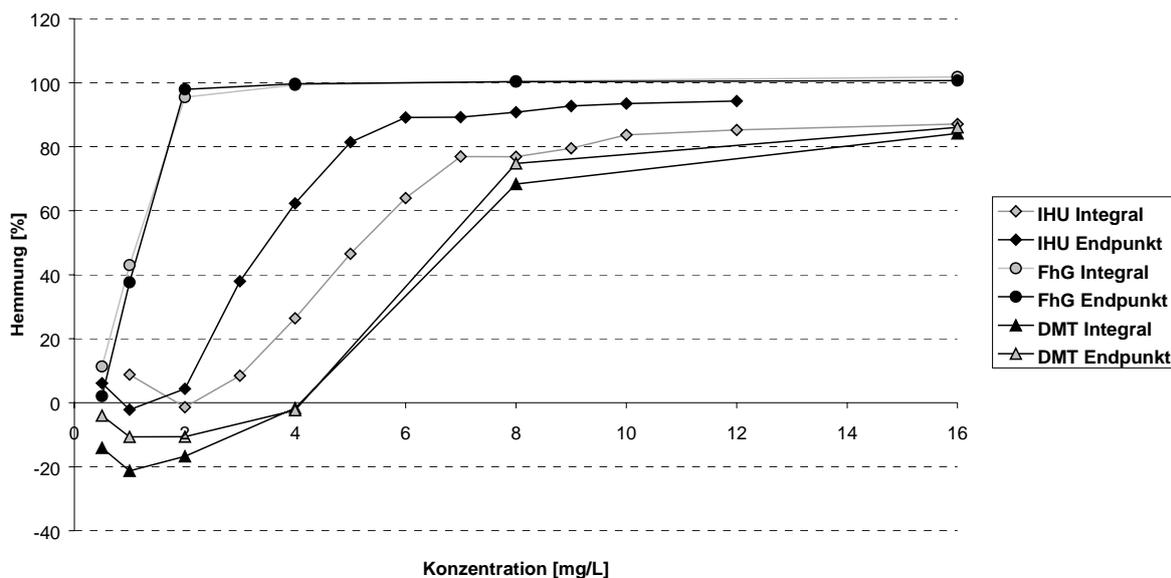


Abbildung VI - 20: Hemmung der Referenztoxene Cr^{6+} im miniaturisierten Zellvermehrungshemmtest mit *V. fischeri* nach Integral- und Endpunktauswertung.

Obwohl die eingesetzte Konzentration der Referenztoxene bei den Teilnehmern teilweise variiert, ist eine Dosis-Wirkungsbeziehung erkennbar. Geringe Konzentrationen von 1 bis 2 mg/l führen in dem von der FhG durchgeführten Test schon zu einer 100%igen Hemmung des Testorganismus. Je höher die Konzentration der eingesetzten Referenztoxene ist, um so größer ist die Übereinstimmung der Hemmwerte der Teilnehmer. Eine Bestimmung des EC_{50} für Cr^{6+} bei den Teilnehmern würde eine Konzentration von 1 bis 2 mg/L bei FhG, 5 bis 6 mg/L bei dem IHU und ca. 7mg/L bei DMT ergeben.

In der Abbildung VI - 21 sind die Hemmwerte der Referenztoxine 3,5-Dichlorphenol gegenüber *V. fischeri* aufgetragen.

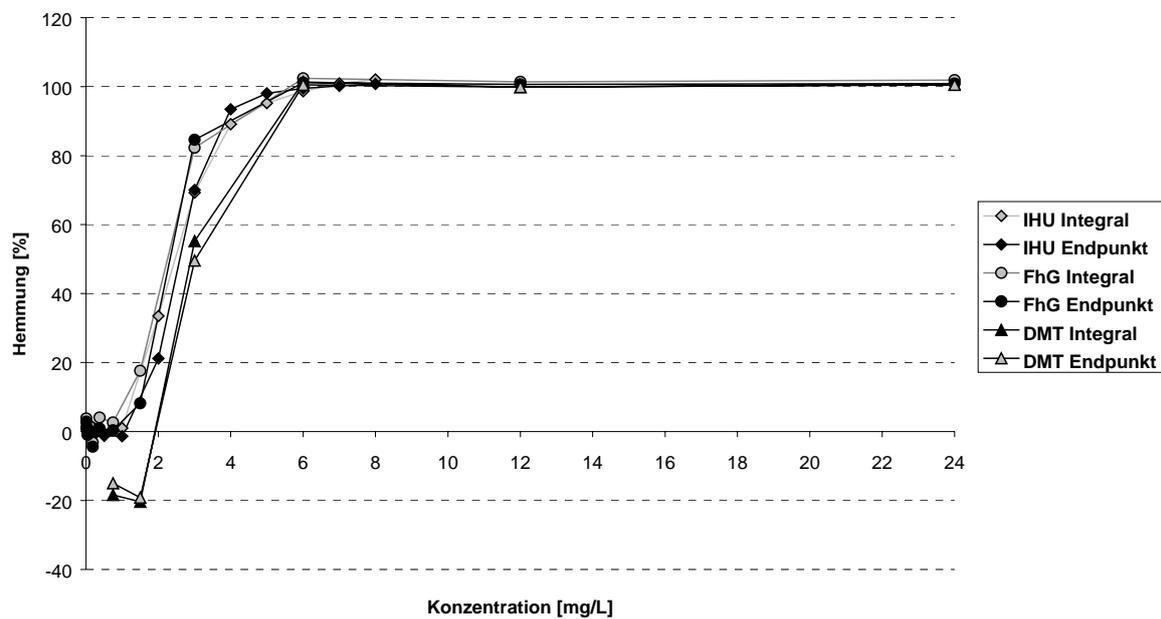


Abbildung VI - 21: Hemmung der Referenztoxine 3,5-DCP im miniaturisierten Zellvermehrungshemmtest mit *V. fischeri* nach Integral- und Endpunktauswertung.

Gegenüber dieser Referenztoxine konnte eine deutlich höhere Übereinstimmung der Testergebnisse bei allen Teilnehmern ermittelt werden. Neben der Bestimmung des EC_{50} , der für alle Teilnehmer in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 3 mg/L liegen würde, ist die Übereinstimmung der Ergebnisse der Auswertemodi (Integral oder Endpunkt) sehr hoch.

P. PUTIDA ZELLVERMEHRUNGSHEMMTEST

Entsprechend dem Zellvermehrungshemmtest mit *V. fischeri* wird die Wachstumshemmung von *P. putida* gegenüber den Referenztoxinen Kaliumdichromat und 3,5-Dichlorphenol untersucht. In Abbildung VI - 22 sind die Hemmwerte gegenüber Kaliumdichromat dargestellt.

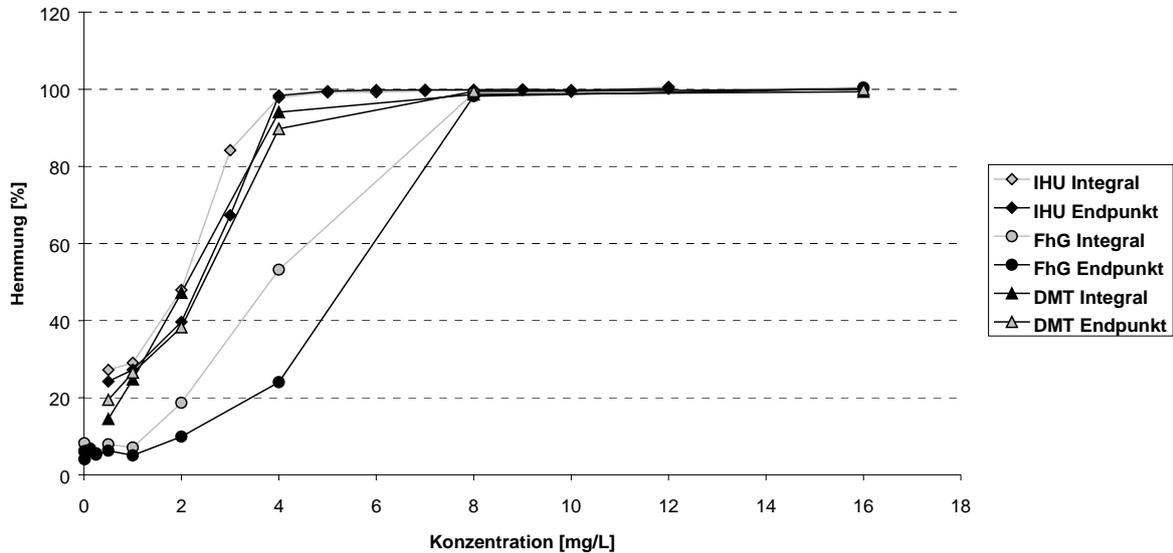


Abbildung VI - 22: Hemmung der Referenztoxine Cr^{6+} im miniaturisierten Zellvermehrungshemmtest mit *P. putida* nach Integral- und Endpunktauswertung.

Die Hemmwirkung der Referenztoxine Kaliumdichromat gegenüber *P. putida* wurde von DMT und dem IHU sehr übereinstimmend ermittelt. Die Konzentration des EC_{50} für Kaliumdichromat könnte zwischen 2 bis 3 mg/L bestimmt werden. Hingegen könnte aus den Ergebnissen der FhG ein $\text{EC}_{50} > 4$ mg/L bis ca. 5,5 mg/L ermittelt werden. Generell sind die Abweichungen jedoch geringer im Vergleich zum *V. fischeri* Zellvermehrungshemmtest mit Kaliumdichromat (Abbildung VI - 20).

Entsprechend der Hemmung von Kaliumdichromat auf *P. putida* wurde 3,5 Dichlorphenol als Referenztoxine eingesetzt. Die Dosis-Wirkungsbeziehungen sind in Abbildung VI - 23 aufgezeigt.

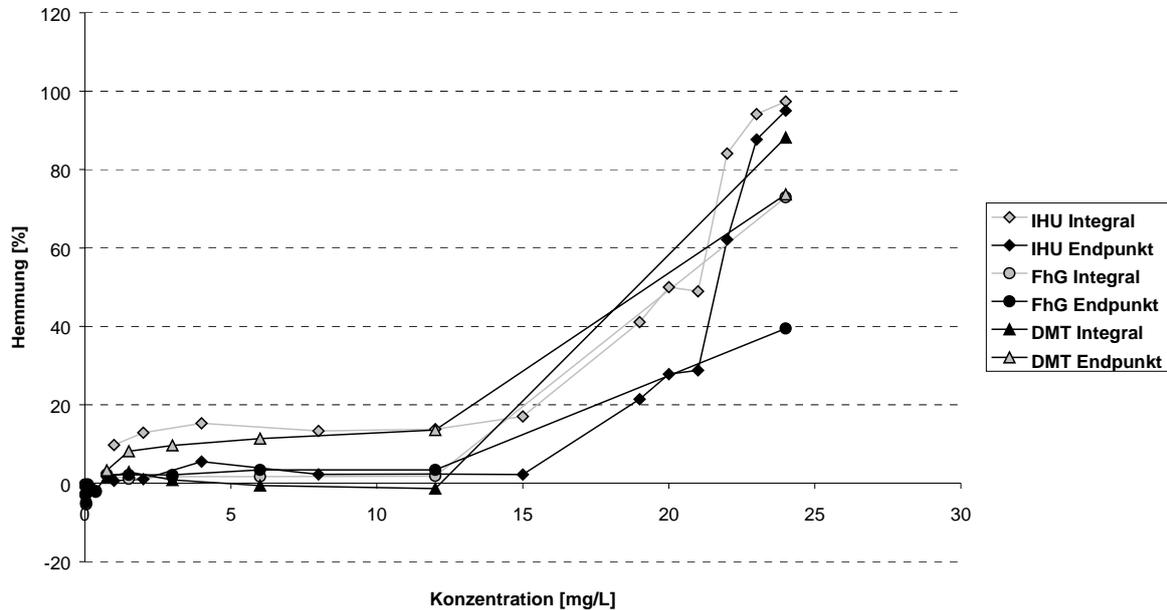


Abbildung VI - 23: Hemmung der Referenztoxine 3,5-DCP im miniaturisierten Zellvermehrungshemmtest mit *P. putida* nach Integral- und Endpunktauswertung.

Der Verlauf der Dosis-Wirkungsbeziehungen gegenüber 3,5 Dichlorphenol ist bei den Teilnehmern recht übereinstimmend. Da teilweise die Abstände zwischen den Konzentrationsstufen sehr hoch waren (z. B. 12 mg/L, 24 mg/L), kommt es zu einem "Sprung" in der Dosis-Wirkungskurve. Mit feiner abgestuften Konzentrationen könnte eine größere Parallelität der Kurven beobachtet werden. Damit würden auch die EC_{50} -Werte in einem engeren Rahmen liegen. Für die von FhG durchgeführten Untersuchungen wäre es nach der Endpunktauswertung allerdings nicht möglich einen EC_{50} zu bestimmen, da bis zu einer Konzentration von 24 mg/L die Hemmung unter 50 % bleibt.

S. SUBSPICATUS CHLOROPHYLL-FLUORESZENZTEST

Im folgenden wird die Wirkung der Referenztoxene auf die einzellige Alge *Scenedesmus subspicatus* betrachtet. Die Abbildung VI - 24 zeigt die Hemmung verschiedener Konzentrationen Kaliumdichromat auf diese Spezies.

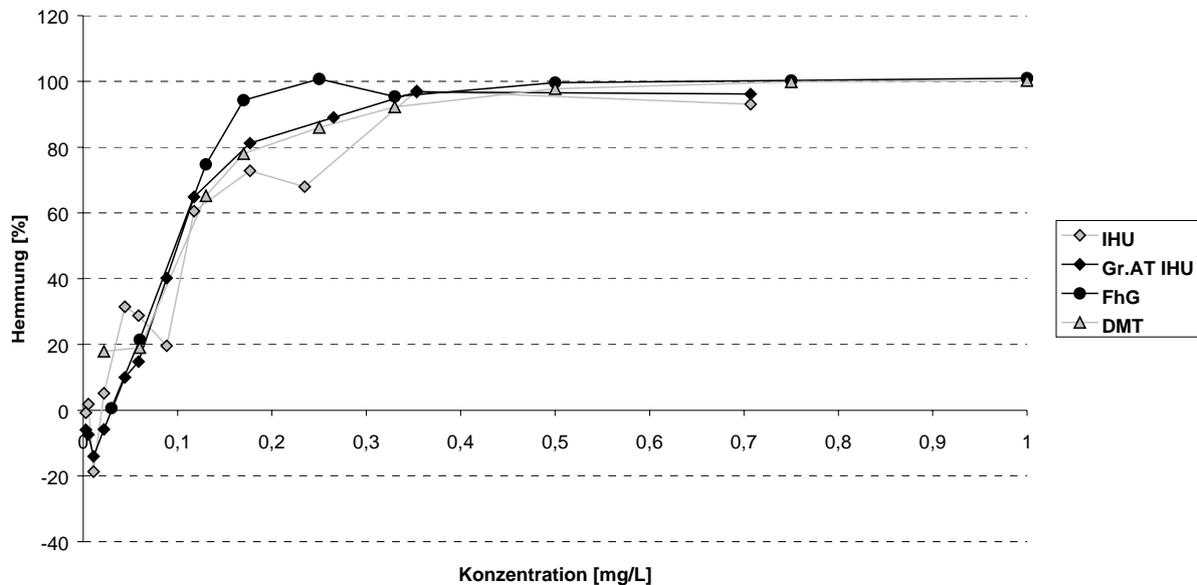


Abbildung VI - 24: Hemmung der Referenztoxene Cr^{6+} im miniaturisierten Chlorophyll-Fluoreszenztest mit *S. subspicatus* nach Endpunktauswertung.

Die Parallelität der Ergebnisse der Teilnehmer ist, abgesehen von wenigen Schwankungen sehr hoch. Im Gegensatz zu den Zellvermehrungshemmtest ist eine Konzentration von ca. 0,5 mg/L für eine nahezu 100%ige Hemmung des Wachstums von *S. subspicatus* ausreichend. Das heißt die Alge reagiert wesentlich empfindlicher auf Kaliumdichromat.

Unterschiede des Testorganismus im 2 mL-Ansatz auf Mikrotitrationsplatte und im 100 mL-Ansatz im Erlenmeyerkolben sind nicht signifikant. Als EC_{50} -Wert könnte von allen Teilnehmern eine Konzentration von <0,15 bis 0,1 mg/L bestimmt werden.

Abbildung VI - 25 zeigt die Hemmverläufe von *Scenedesmus subspicatus* gegenüber der Referenztoxine 3,5-Dichlorphenol.

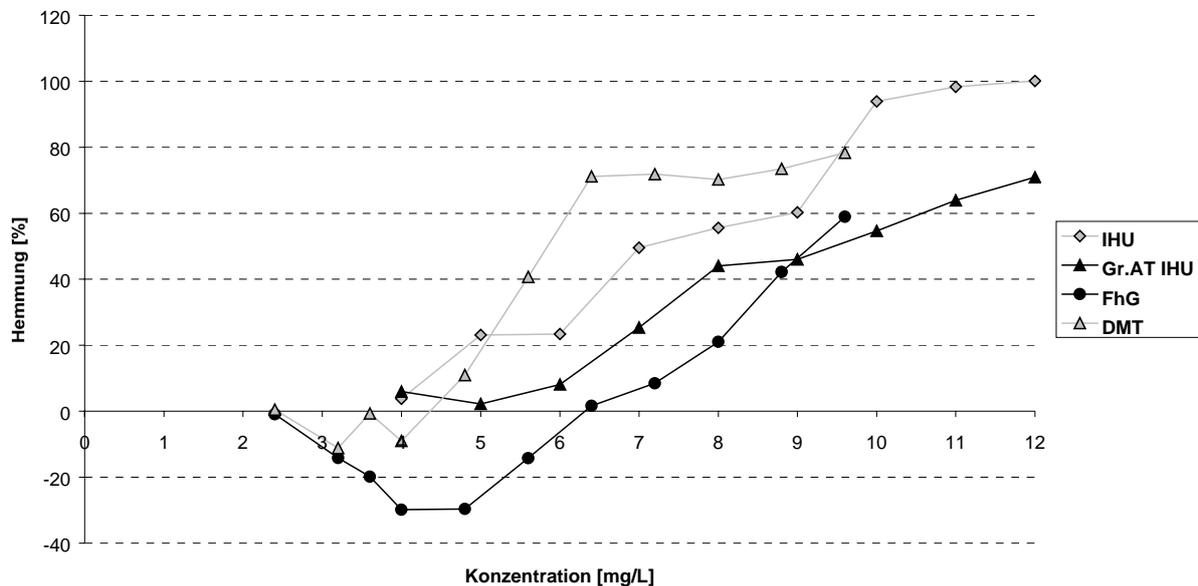


Abbildung VI - 25: Hemmung der Referenztoxine 3,5-DCP im miniaturisierten Chlorophyll-Fluoreszenztest mit *S. subspicatus* nach Endpunktauswertung.

Mit der Referenztoxine 3,5 DCP ergeben sich sehr verschiedene Hemmverläufe. Zwar sind die Tendenzen der Hemmkinetiken ähnlich, die verschiedenen Konzentrationen weisen allerdings stark voneinander abweichende Hemmwerte auf. Hinzu kommt, dass die Untersuchungen von FhG bis zu einer Konzentration von ca. 6 mg/L 3,5-Dichlorphenol Wachstumsförderungen ergeben haben.

VI - 3.3 Genotoxikologische Charakterisierung der Bodeneluate

VI - 3.3.1 umu-Test und NM-2009-Test

Alle acht Eluate der Böden wurden von den Teilnehmern mit den genotoxischen Testverfahren umu-Test und NM 2009-Test untersucht. Zusätzlich wurden vier Böden ausgewählt, von denen eine Aufkonzentrierung der Eluate erfolgte, um auch geringe Konzentrationen erbgutverändernder Substanzen zu erfassen. Dabei wurden exemplarisch Böden ausgesucht, deren Eluate sich in den meisten Testansätzen als nicht genotoxisch erwiesen hatten (Gaswerk 1:2, Landhausen, PAK-Mix, IMA SM 66).

Der für die Laborvergleichsuntersuchungen ebenso vorgesehene SOS-Test konnte nicht eingesetzt werden, da die geforderten Gültigkeitskriterien für die Positiv- und Negativ-Seite VI - 70

kontrollen nicht erreicht werden konnten. Da das Problem im Untersuchungszeitraum nicht behoben werden konnte, musste der SOS-Test aus dem Programm gestrichen werden.

Die Eluate der Böden Gaswerk 1:2, Landhausen, PAK-Mix und IMA SM 66 wurden für die Bestimmung der Genotoxizität 15-fach aufkonzentriert (siehe Kapitel VI - 2.2). Nach Aufkonzentrierung wurde die genotoxische Wirkung der Bodeneluate mit den umu- und NM-2009-Test untersucht. Die Tabelle VI - 25 gibt einen Überblick über die genotoxischen Wirkungen der Bodeneluate.

Tabelle VI - 25: Genotoxizitätstests mit *Salmonella typhimurium*, G-Werte der genotoxischen Testverfahren umu-Test und NM 2009-Test

	umu-Test						NM-2009-Test					
	IHU		FhG		DMT		IHU		FhG		DMT	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
Iserlohn	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Gaswerk 1:2	3	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	3	1,5
Gaswerk 1:2 Extrakt	48	6	12	1,5	12	6	12	6	6	3	24	12
Landhausen	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Landhausen Extrakt	6	6	6	3	6	3	6	6	6	3	6	3
PAK-Mix	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
PAK-Mix Extrakt	48	12	12	3	12	12	12	12	12	3	12	6
Sickergraben	12	24	12	6	48	6	96	48	48	48	96	24
Neuohe	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
IMA SM 66	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
IMA SM 66 Extrakt	12	6	3	1,5	3	3	12	6	12	3	12	6
IMA 927b	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

-/+ S9 = S9-Mikrosomem-Fraktion, + S9 = metabolische Aktivierung typischer Stoffwechsellleistungen des Säugetieres

G-Werte:

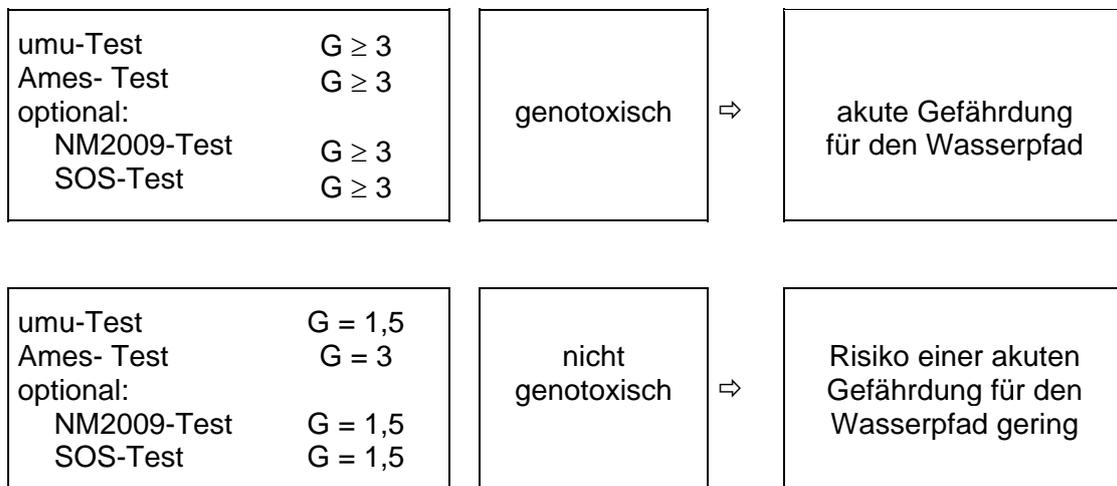
In Anlehnung an die DIN 38415 T3 wird bei der Bewertung von Umweltproben der G-Wert bestimmt. Als Ergebnis gilt der höchste Verdünnungsfaktor der Probe, bei dem unter den Bedingungen dieses Verfahrens eine Induktionsrate <1,5 vorliegt. Der NM2009-Test kann in Anlehnung an die DIN 38415 T3 ausgewertet werden.

Die Übereinstimmung der G-Werte (Tabelle VI - 25) der einzelnen Teilnehmer ist bei den genotoxischen Testverfahren von wenigen Ausnahmen abgesehen sehr hoch. Abweichungen von 2 bis 3 G-Stufen können lediglich bei den aufkonzentrierten Proben festgestellt werden

Bewertung:

Für den hier beschriebenen Ansatz zur Erfassung des wässrig extrahierbaren bzw. mobilisierbaren Anteils von Böden mit Hilfe biologischer Testverfahren nach Aufbereitung der Proben nach den oben beschriebenen Methoden wird das folgende Bewertungsschema mit den angegebenen Schwellenwerten benutzt (Abbildung VI - 26).

1. Stufe Bodeneluat-Untersuchung



2. Stufe: Bodeneluat-Extrakt-Untersuchung (15-fach aufkonzentriert)

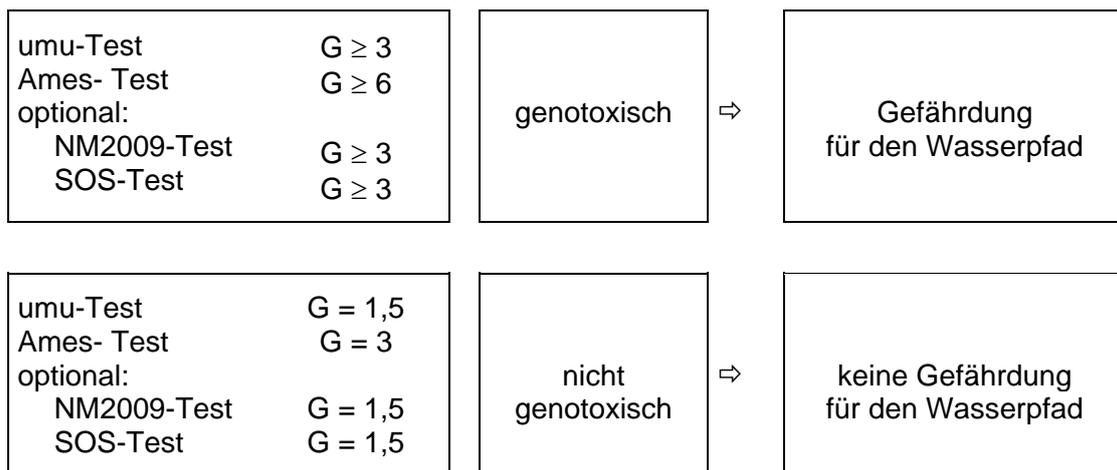


Abbildung VI - 26: Vorschlag zur Charakterisierung des wässrig extrahierbaren genotoxischen Potenzials von Böden durch Testung des wässrigen Eluats (Stufe 1) und des Eluatextrakts (Stufe 2) nach 15-facher Aufkonzentration mittels Serdolit® PAD-1. (St.Heiden, R. Erb, W. Dott, a. Eisenträger (Hrsg.): Toxikologische Beurteilung von Böden, Leistungsfähigkeit biologischer Testverfahren, Deutsche Bundesstiftung Umwelt, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin)

Für den Fall, dass im umu-Test sowohl im wässrigen Eluat als auch im aufkonzentrierten Eluat keine Genotoxizität nachweisbar ist und aufgrund der früheren Nutzung des Standorts oder aufgrund chemisch-analytischer Daten der begründete Verdacht besteht, dass wässrig extrahierbare mutagene Substanzen in der Bodenprobe vorhanden sind, sollten die Ergebnisse mit Hilfe des Ames-Tests überprüft werden. Dabei werden die Stämme TA 98 und TA 100 mit und ohne metabolische Aktivierung entsprechend DIN 38415-4 getestet.

In der Tabelle VI - 26 ist die Bewertung der Bodenproben gemäß dieses Vorschlags vorgenommen worden.

Tabelle VI - 26: Genotoxische Testverfahren, Beurteilung der Böden (+: Beurteilung des Eluates/Extraktes als genotoxisch auf Basis des testspezifischen G-Wertes; -: Beurteilung des Eluates/Extraktes als nicht genotoxisch auf Basis des testspezifischen G-Wertes)

Bodenprobe	umu						NM-2009					
	TA 1535/pSK1002						TA 1535/pSK1002/pNM12					
	IHU		FhG		DMT		IHU		FhG		DMT	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
Iserlohn Eluat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gaswerk 1:2 Eluat	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Gaswerk 1:2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Landhausen Eluat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Landhausen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PAK-Mix Eluat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAK-Mix Extrakt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sickergraben	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Neuohe Eluat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMA SM 66* Eluat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMA SM 66 Extrakt	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
IMA 927b* Eluat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-/+ S9 = S9-Mikrosomem-Fraktion, + S9 = metabolische Aktivierung typischer Stoffwechselleistungen des Säugertieres, * = sanierte Böden

Die Darstellung der genotoxischen Bewertung der Bodeneluat und -extrakte zeigt nochmals übersichtlich, dass mit den Testverfahren umu- und NM 2009 bei allen Teilnehmern gleiche Resultate erzielt wurden.

VI - 3.3.2 Salmonella-Mikrosomen-Reversionstest (Ames-Test)

Neben den Genotoxizitätstests wurden die Eluate aller acht Böden und die Extrakte der Böden Gaswerk 1:2, PAK-Mix, Landhausen und IMA SM 66 vom IHU auf mögliche mutagene Wirkungen überprüft. Ebenso wie für die Bestimmung der Genotoxizität mit dem umu-Test und dem NM 2009-Test wurden die Eluate der Böden Gaswerk 1:2, Landhausen, PAK-Mix und IMA SM 66 für den Ames-Test 15-fach aufkonzentriert (siehe Kapitel VI - 2.2).

In der Tabelle VI - 27 sind die G_{EA} -Werte der Bodeneluate und Bodenextrakte mit den Stämmen TA 98 (mit dem Frameshiftmarker hisD3052) und TA 100 (Basenpaarmarker hisG46) sowohl mit als auch ohne metabolischer Aktivierung zusammengestellt.

Tabelle VI - 27: Mutagenitätstest mit *Salmonella typhimurium*, G-Werte des Ames-Tests

Bodenprobe	TA 98				TA 100			
	G-Werte		Induktionsraten bei G = 3		G-Werte		Induktionsraten bei G = 3	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
Iserlohn	3	3	1,6	1,2	3	3	1,3	1,0
Gaswerk 1:2	3	3	1,8	1,1	3	3	1,1	0,8
Gaswerk 1:2 Extrakt	3	3	1,3	1,2	3	3	0,8	1,6
Landhausen	3	3	1,5	0,9	3	3	1,0	0,6
Landhausen Extrakt	3	3	1,2	1,0	3	3	0,9	1,1
PAK-Mix	6	6	1,4	1,2	3	3	1,1	1,5
PAK-Mix Extrakt	3	3	1,0	0,8	3	3	1,2	1,2
Sickergraben	12	3	1,4	1,6	6	3	1,1	1,3
Neuohe	3	3	0,9	1,1	3	3	1,0	0,7
IMA SM 66	6	3	1,8	1,4	3	3	1,3	1,0
IMA SM 66 Extrakt	6	3	2,1	1,6	3	3	0,8	1,0
IMA 927b	3	3	1,9	1,3	3	3	1	0,9

S9 = S9-Mikrosomen-Fraktion, + S9 = metabolische Aktivierung typischer Stoffwechsellleistungen des Säugertieres, - S9 = ohne metabolische Aktivierung

Die Beurteilung der Proben mit dem Ames-Test liefert im Gegensatz zum umu-Test und NM2009-Test (Tabelle VI - 26) hinsichtlich der genotoxischen Wirkung der Eluate und Extrakte neue Informationen für die Proben Gaswerk 1:2 Extrakt, Landhausen Extrakt, PAK-Mix Eluat und IMA SM 66 Eluat. Die Proben Gaswerk 1:2 Extrakt und Landhausen Extrakt

wurden im umu-Test und NM2009-Test von fast allen Teilnehmern als genotoxisch beurteilt. Mit dem Ames-Test, der nur von dem IHU durchgeführt wurde, konnten mutagene Wirkungen nicht gefunden werden. Dem gegenüber ist die Probe PAK-Mix Eluat nur im Ames-Test mutagen und erstaunlicher Weise das entsprechende Extrakt nicht. Die Beurteilung der Probe wäre trotzdem eindeutig, da das Eluat genotoxisch ist und eine weitere Aufkonzentrierung entfallen würde. Die Probe IMA SM 66 Eluat wurde im Ames-Test ohne S9-Mix genotoxisch beurteilt, hingegen konnte im umu-Test und NM2009-Test keine Genotoxizität ermittelt werden.

In der folgenden Tabelle ist die Beurteilung der Proben mutagen/nicht mutagen dargestellt.

Tabelle VI - 28: Salmonella-Mikrosomem Test, Beurteilung der Böden (+: Beurteilung des Eluates/Extrakts als mutagen auf Basis des testspezifischen G_{EA} -Wertes; -: Beurteilung des Eluates/Extrakts als nicht mutagen auf Basis des testspezifischen G_{EA} -Wertes)

Bodenprobe	TA 98		TA 100		Gesamtbewertung
	G-Werte		G-Werte		Mutagen
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	Ja/Nein
Iserlohn	-	-	-	-	Nein
Gaswerk 1:2	-	-	-	-	Nein
Gaswerk 1:2 Extrakt	-	-	-	-	Nein
Landhausen	-	-	-	-	Nein
Landhausen Extrakt	-	-	-	-	Nein
PAK-Mix	+	+	-	-	Ja
PAK-Mix Extrakt	-	-	-	-	Nein
Sickergraben	+	-	+	-	Ja
Neuohe	-	-	-	-	Nein
IMA SM 66	+	-	-	-	Ja
IMA SM 66 Extrakt	+	-	-	-	Ja
IMA 927b	-	-	-	-	Nein

-/+ S9 = S9-Mikrosomem-Fraktion, + S9 = metabolische Aktivierung typischer Stoffwechselleistungen des Säugertieres

Gemäß der Beurteilung der Proben anhand des Ames-Test würden die Eluate der Proben PAK-Mix, Sickergraben und IMA SM 66 als mutagen eingestuft. Ebenso ist das Extrakt der Probe IMA SM 66 mutagen.

VI - 4 **Fazit**

VI - 4.1 **Methodische Aspekte**

Das wässrig extrahierbare ökotoxische und genotoxische Potenzial kontaminierter Bodenproben wurde im Rahmen der Laborvergleichsuntersuchungen mit miniaturisierten Testverfahren untersucht, die am Institut für Hygiene und Umweltmedizin, Aachen etabliert sind. Für die Projektpartner hingegen handelte es sich zum Teil um neue Testverfahren und Messgeräte, die anfänglich zu Unsicherheiten führten. Trotz dieser Bedingungen wurden die Proben von den Laborvergleichsteilnehmern meist übereinstimmend beurteilt. (Tabelle VI - 24, und Tabelle VI - 26). Geringfügige Schwankungen der G-Werte können zum Teil auf Unterschiede in der Durchführung der Testverfahren zurückgeführt werden.

VI - 4.1.1 Zellvermehrungshemmtests

Die Kryokulturen für die Testdurchführung mit *Vibrio fischeri* und *Pseudomonas putida* wurden von dem IHU Aachen hergestellt, in Trockeneis eingelagert und am gleichen Tag den Mitarbeitern von FhG sowie DMT überreicht.

Da DMT vor Ort keine Kühltruhe (-70°C) zur Verfügung stand, wurden hier die Kryokonserven in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Bei DMT und FhG konnten aus messtechnischen Schwierigkeiten die Schüttlereinstellungen des Messgerätes (iEMS-Reader, Fa. Labsystems) nicht auf die vorgegebenen 1200 U/min eingestellt werden, sondern nur auf 1000 U/min.

Ebenso war eine Inkubation des Tests bei $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ bei DMT nicht möglich, da keine Kühlhaube vorhanden war. Demzufolge war die Temperatur während des Testablaufs in Abhängigkeit von der Wetterlage um ca. 3 - 4 $^{\circ}\text{C}$ höher.

Trotz der Abweichungen, ist die Übereinstimmung der ermittelten G-Werte erstaunlich hoch (Tabelle VI - 24). Einzig unerklärlich sind die extremen Wachstumsförderungen bei DMT in den Zellvermehrungshemmtests mit beiden Bakterienstämme (Abbildung VI - 12 bzw. Abbildung VI - 18). Dies könnte eventuell durch die um 3 bis 4 $^{\circ}\text{C}$ höhere Temperatur begründet werden, da in der DIN 38412 L8 ausdrücklich darauf hingewiesen wird, dass die Temperatur von 20 $^{\circ}\text{C}$ mit einer Spanne von $\pm 1^{\circ}\text{C}$ genau einzuhalten ist.

Ein möglicher Grund für die ungewöhnlich flachen Wachstumsverläufe der Kontrollen im Zellvermehrungshemmtest mit *P. putida* bei der Testung der Eluate der Proben Gaswerk 1:2 und Iserlohn (Abbildung VI - 17) könnte auf die Lagerung der Bakterien in flüssigem Stickstoff bei -196°C zurückgeführt werden. Die extrem niedrigen Temperaturen könnten

eine Verlängerung der Lag-Phasen der Bakterien bewirken, so dass erst zu einem späteren Zeitpunkt das exponentielle Wachstum beginnt und der eigentliche Endpunkt des Tests mit dem Ende bei 30 h (automatischer Abbruch der Messungen) nicht mehr erfasst wird. Da dies aber bei den übrigen Bodeneluaten nicht auffällig war, kann dies nicht die einzige Begründung für den untypischen Wachstumsverlauf der Kontrollen sein.

VI - 4.1.2 Chlorophyll-Fluoreszenztest

Dieser Test wurde in 24-Well Mikrotitrationsplatten am IHU Aachen entwickelt und optimiert. Die resultierenden Vorgaben des IHU für die Laborvergleichsuntersuchungen konnten bei den Partnern zum Teil nicht übernommen werden, da gerätespezifische Einstellungen variiert werden mussten. Das für den Chlorophyll-Fluoreszenztest eingesetzte Messgerät, ein Fluoreszenz-Mikrotitrationsplattenreader (SPECTRAfluor Plus® (Fa. Tecan)), musste bezüglich der Empfindlichkeitseinstellungen (GAIN) je Gerät individuell variiert werden. Obwohl am IHU mit einer GAIN-Einstellung von 150 der Messbereich nicht überschritten wurde, konnte bei den Partnern nur mit einer GAIN-Einstellung von 120 fehlerfrei gearbeitet werden. Da dieser Faktor nicht bekannt war, führte dies zunächst zu einer Reihe von Fehlmessungen.

Ein weiterer Punkt war die Zucht des Testorganismus *Scenedesmus subspicatus*. Da für die Kulturhalterung der Algen bei den Partnern vor Ort der apparative Aufwand teilweise zu groß gewesen wäre, wurden die Algen vom IHU als Stammkulturen an die Partner verschickt. Die Kultivierung der Algen für den Einsatz in Mikrotitrationsplatten erfolgte bei allen Teilnehmern in 100 mL Medium, bei 20 bis 23 °C auf Schüttelinkubatoren. Die Beleuchtungsstärke der Inkubatoren wurde mit einem Lichtmessgerät verglichen: DMT: 120 bis 123 $\mu\text{mol E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; FhG: ca. 115 $\mu\text{mol E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und IHU 115 bzw. 118 $\mu\text{mol E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

VI - 4.1.3 Genotoxizitätstests

Ebenso wie die Zellvermehrungshemmtests und der Chlorophyll-Fluoreszenztest wurden die Genotoxizitätstests auf Mikrotitrationsplatten durchgeführt. Im Folgenden werden besondere Aspekte betrachtet.

Bei der Auswertung (IHU) der Genotoxizitätstests konnten häufig große Abweichungen der Werte von Parallelansätzen in der Reihe 12 der Mikrotitrationsplatte bei den von der FhG durchgeführten Testverfahren beobachtet werden (Werte nicht gezeigt). Möglicherweise handelt es sich um einen systematischen Fehler, der auf einen Pipettierfehler oder auf einen Ansaugfehler der Pipette selbst zurückzuführen ist.

Ebenso ist die Varianz der Induktionsraten der Positivkontrollen von bedeutendem Interesse. Da in der DIN 38415 T3 nur ein Mindestwert für die Induktionsraten der Positivkontrollen von 2,0 angegeben wird und kein Maximum, ist völlig unklar, inwieweit eine Induktionsrate der

Positivkontrolle größer 5 bzw. größer 10 nachteilig sein kann für die eingesetzten Probenverdünnungen.

Nach Auswertung der Testergebnisse hätte von einigen Proben eine Wiederholung des Tests erfolgen müssen. Da aber die Auswertung aller Daten, nach Abschluss der Untersuchungen, zentral am IHU erfolgte, musste eine mögliche Wiederholung ausgeschlossen werden.

VI - 4.2 Zusammenfassende Beurteilung kontaminierter/sanierter Bodenproben mit ökotoxischen und genotoxischen Testverfahren

VI - 4.2.1 Zellvermehrungshemmtest

Die meist hohe Übereinstimmung der Testergebnisse in den Zellvermehrungshemmtests (ZVHT) mit *Vibrio fischeri* und *Pseudomonas putida* bei den Laborvergleichsteilnehmern spricht für den praktikablen Einsatz dieser miniaturisierten Testverfahren und die Unabhängigkeit von einem bestimmten Labor.

Die Untersuchung der Bodeneluat mit den Zellvermehrungshemmtests zeigte folgende Aspekte:

- zwischen Integral- und Endpunktauswertung gibt es keine Unterschiede
- gute Übereinstimmung der Testergebnisse
- gute Übereinstimmung der Ergebnisse der Referenztoxinen
- das Mikrotitrationsplattenverfahren ermöglicht feiner abgestufte Verdünnungsreihen
- hohe Sensitivität der Testverfahren

Durch den Einsatz der bakteriellen Testverfahren konnten von den Laborvergleichsteilnehmern im Wesentlichen zwei Besonderheiten aufgezeigt werden.

Die Beurteilung der Bodeneluat anhand der G-Werte zeigt bei den Proben Landhausen und Sickergraben deutliche Unterschiede zwischen den Testorganismen *Vibrio fischeri* und *Pseudomonas putida* (Tabelle VI - 24). Das Eluat der Probe Landhausen wird im ZVHT mit *Pseudomonas putida* von allen Teilnehmern toxisch eingestuft. Im ZVHT mit *Vibrio fischeri* hingegen wird diese Probe mit einer Ausnahme als nicht toxisch beurteilt. Umgekehrt verhält es sich mit dem Eluat der Probe Sickergraben, das im ZVHT mit *V. fischeri* eindeutig toxisch ist, im ZVHT mit *P. putida* hingegen nicht. Die Sensitivität der Testorganismen gegenüber bestimmten Probeninhaltsstoffen ist in diesen Fällen unterschiedlich. So reagiert *Vibrio fischeri* empfindlich gegenüber der Hauptkontamination dieses Bodens 2,4,6-Trinitrotoluol

(TNT). Auf den Testorganismus *Pseudomonas putida* wirken Kohlenwasserstoffe und Schwermetalle toxisch, die Hauptkontaminationen des Bodens Landhausen.

Die unterschiedliche Beurteilung der Bodenproben anhand dieser bakteriellen Testverfahren zeigt, dass die Untersuchung von Bodeneluat mit verschiedenen Testorganismen sinnvoll ist.

Die Auswertung der Daten ergab bei einem Partner teilweise unklare Dosis-Wirkungs-Beziehungen, so dass bei alleiniger Betrachtung der G-Werte die Probe falsch beurteilt würde. Ein Grund sind die verschiedenen Wachstumskinetiken während des Versuchszeitraums, die z. T. auf die methodischen Abweichungen zurückzuführen sind (Kapitel VI - 4.1.1). Anhand der Wachstumskinetiken wird nach Versuchsende der Auswerteendpunkt festgelegt. Da das Wachstum der Bakterien in diesen Versuchen die Bestimmung des Auswerteendpunktes erschwerte (stationäre Phasen wurden nicht erreicht, Kapitel VI - 3.2.2), kommt es zu Differenzen bei der Beurteilung der Proben. Eine Wiederholung war aus dem genannten Grund nicht möglich.

Entscheidend ist in diesem Zusammenhang, dass sowohl die Dosis-Wirkungs-Beziehung eines Testverfahrens berücksichtigt werden muss, wie auch die Aufnahme einer geeigneten Wachstumskurve.

VI - 4.2.2 Lumineszenzhemmtest mit *Vibrio fischeri*

Die Untersuchung der Bodeneluate mit dem Lumineszenzhemmtest im Küvettenmaßstab erfolgte nur am IHU Aachen. Der Nachweis der akuten Toxizität der Eluate gegenüber dem Testorganismus *Vibrio fischeri* zeigt meist eine höhere Sensitivität als der ZVHT mit *Vibrio fischeri*. Sogar die sanierten Böden IMA SM 66 und IMA 927 B werden mit diesem biologischen Testverfahren deutlich toxisch eingestuft, während in allen anderen ökotoxischen Testverfahren (mit zwei Ausnahmen, siehe Tabelle VI - 24) keine toxischen Effekte dieser Böden erfasst wurden.

VI - 4.2.3 Chlorophyll-Fluoreszenztest

Der Chlorophyll-Fluoreszenztest wurde von allen Teilnehmern in 24-Well Mikrotitrationsplatten durchgeführt und zusätzlich am Institut für Hygiene und Umweltmedizin Aachen in 250-mL-Erlenmeyerkolben. Die Miniaturisierung des Algentests ermöglicht eine deutliche Reduzierung des Arbeitsaufwands und die Steigerung des Probenumfangs. Die Übereinstimmung der Testergebnisse der Laborvergleichsteilnehmer ist bis auf einige Ausnahmen deutlich.

Die Eluate der Bodenproben Gaswerk 1:2, Landhausen und Sickergraben werden von den Partnern eindeutig als toxisch eingestuft. In zwei weiteren Fällen (Neuohe, IMA 927 B) reagiert der 24-Well Mikrotitrationsplattentest am IHU besonders empfindlich, so dass von diesem Institut die Proben als toxisch eingestuft wurden.

Während der Auswertung der Daten aus dem Algentest zeigte sich, dass bei einigen Proben extrem hohe Wachstumsförderungen auftraten, die auf die jeweilige Position der Wachstumskontrollen und der höchsten Probenkonzentration zurückgeführt werden konnten.

Der Einfluss der höchsten Probenkonzentrationen auf die Wachstumskontrollen war derart, dass die Beurteilung der Toxizität der Proben z. T. nicht eindeutig war. Durch die neue Auswertung der Daten unter Einsatz der niedrigsten Verdünnungsstufe als Wachstumskontrolle wurden z. T. die Proben neu eingestuft. Als Konsequenz der Beeinflussung der Wachstumskontrollen durch die Proben ist es erforderlich zusätzliche Wachstumskontrollen neben den höchsten Verdünnungsstufen mitzuführen. Die modifizierte Belegung der Mikrotiterplatte ist in Abbildung VI - 27 dargestellt.

	1	2	3	4	5	6
A	Wachstumskontrollen			Nullwert		
B	1:2	1:2	1:2	1:16	1:16	1:16
C	1:4	1:4	1:4	1:32	1:32	1:32
D	1:8	1:8	1:8	Wachstumskontrollen NEU		

Abbildung VI - 27: Belegung der 24-Well-Mikrotitrationsplatte für den Wachstumshemmtest mit *Scenedesmus subspicatus* CHODAT (Testansätze (1:2 bis 1:32): Probe, Algeninokulum und Nährmedium, Wachstumskontrollen: ohne Testgut, Nullwert: ohne Testgut und Algen, Blindwert: niedrigste Verdünnungsstufe der Probe, Algenwert mit $5 \cdot 10^4$ Zellen/mL)

Für die Gültigkeitskriterien des Mikrotitrationsplattentests werden dementsprechend zusätzlich gefordert:

- Der Vermehrungsfaktor der Kontrollen in der Nähe der Proben mit den hohen Konzentrationen sollte vergleichbar sein mit dem Vermehrungsfaktor der Kontrollen in der Nähe der Proben mit den niedrigen Konzentrationen.

- Der Vermehrungsfaktor der Kontrollen sollte mindestens so hoch sein wie die Vermehrungsfaktoren der Proben. Wenn dieses nicht der Fall ist, also eine Wachstumsförderung durch die Proben stattfindet, dann sollte sie sich mit Verdünnung der Proben reduzieren.

Zusätzlich ergeben sich bei dem Chlorophyll-Fluoreszenztest folgende Aspekte:

- Hohe Sensitivität des Testorganismus gegenüber den Eluaten der Proben Gaswerk 1:2, Landhausen und PAK-Mix
- Gute Übereinstimmung der Ergebnisse
- Gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit den Referenztoxinen
- Beeinflussung der Wachstumskontrollen durch die Probe
- Optimierung des Plattenlayouts ist notwendig (s. o.)

VI - 4.2.4 Genotoxizitätstests

Das genotoxische Potenzial der Bodeneluate wurde mit dem umu-Test und dem NM2009-Test untersucht. Zusätzlich wurde am IHU die mutagene Wirkung der Eluate im Salmonella-Mikrosomen-Reversionstest ermittelt. Um das maximal extrahierbare genotoxische Potenzial der Proben zu prüfen, wurden von vier Böden (Kapitel VI - 3.3.1) Extrakte (Kapitel VI - 2.2) hergestellt, die in alle Genotoxizitätstest eingesetzt wurden.

Aus den Untersuchungen der Bodeneluate und - extrakte mit den Genotoxizitätstest konnten folgende Schlüsse gezogen werden:

- sehr hohe Übereinstimmung der Aussagen bezüglich der Genotoxizität der Bodeneluate und - extrakte (Tabelle VI - 25)
- Standardisierung der Aufkonzentrierung der Bodeneluate um das **15-fache**
- der umu-Test besitzt eine ausreichende Sensitivität zum Nachweis des genotoxischen Potenzials
- der NM2009-Test mit hoher Empfindlichkeit des Testorganismus (*Salmonella typhimurium*, TA 1535/pSK 1002/pNM 12) gegenüber Amininen und Nitroaromaten ermöglicht den Einsatz dieses Tests bei entsprechendem Probenprofil
- Modifikationen der Genotoxizitätstests (umu-Test, NM2009-Test) sind nicht erforderlich
- Salmonella-Mikrosomen-Reversionstest liefert in wenigen Fällen neue Daten, ist aber gemessen an den miniaturisierten Genotoxizitätstests sehr arbeits- und zeitaufwendig

VI - 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die ökotoxischen und genotoxischen Testverfahren, die im Rahmen des Teilvorhabens 4 'Charakterisierung des wässrig extrahierbaren ökotoxischen und genotoxischen Potenzials von Böden mit Hilfe miniaturisierter Testverfahren mit kinetischer Datenaufnahme' angewandt wurden, bieten eine breite Basis zur Beurteilung der Bodeneluat.

Die toxische Beurteilung der belasteten und sanierten Böden durch die drei Institutionen erfolgte auf Basis von G-Werten (Verdünnungsfaktoren), die nach Auswertung am IHU Aachen in der Regel einheitliche Ergebnisse lieferten. Abweichungen der Ergebnisse zwischen den Teilnehmern lassen sich auf methodische Aspekte (z. B. Inkubationsbedingungen, Kapitel VI - 4.1) und dadurch bedingte Veränderung der Wachstumskurven zurückführen. Die in 96-Well-Mikrotitrationsplatten miniaturisierten bakteriellen Zellvermehrungshemmtests mit *Vibrio fischeri* und *Pseudomonas putida* zeigten unterschiedliche Sensitivitäten bezüglich der Kontamination der Bodenprobe (TNT, Kohlenwasserstoffe (KW), Schwermetalle, Kapitel VI - 4.2.1).

Der Chlorophyll-Fluoreszenztest mit der einzelligen Alge *Scenedesmus subspicatus* (neu: *Desmodesmus subspicatus*) reagiert bei allen Teilnehmern besonders auf die Kontaminationen der Böden Gaswerk 1:2 (KW, PAK), Landhausen (KW, Schwermetalle) und Sickergraben (TNT). Hierbei erweist sich der 24-Well-Mikrotitrationsplatten-Ansatz häufig empfindlicher als der nur vom IHU durchgeführte 100 mL-Ansatz in Erlenmeyerkolben. Die Genotoxizitätstests umu-Test und NM2009-Test mit dem genetisch veränderten Testorganismus *Salmonella typhimurium* erfassen genotoxisches Potenzial bei allen 15-fach aufkonzentrierten Bodenextrakten und dem mit TNT belasteten Eluat des Bodens Sickergraben. Der ursprünglich zur Stoffbewertung entwickelte Salmonella-Mikrosomen-Reversionstest (Ames-Test) detektiert mutagene Effekte und wurde vom IHU Aachen durchgeführt. Entsprechend der Genotoxizitätstests wurden auch hier alle Eluate und Extrakte auf ihre mutagene Wirkung überprüft. Die Aussagen bezüglich der Genotoxizität decken sich zum Teil nicht mit denen des umu-Tests und des NM2009-Tests. Der arbeits- und zeitaufwendige Salmonella-Mikrosomen-Reversionstest ist allerdings im Rahmen einer Testbatterie für die schnelle und einfache Einschätzung des genotoxischen Potenzials eher ungeeignet.

Die Untersuchungen im Rahmen des Laborvergleichs zeigen deutlich, dass zur toxikologischen Bewertung des wässrig extrahierbaren toxischen Potenzials von Bodenproben verschiedene biologische Testverfahren unverzichtbar sind, da mit ihnen im Gegensatz zu den Methoden der chemischen Analytik wirkungspfadbezogen die integralen Wirkungen aller vorhandenen Schadstoffe in belasteten und sanierten Böden und Substraten erfasst werden können.

Kapitel VII

Teilvorhaben 5:
Eignung des Lemna-Tests als ein pflanzliches
Testsystem in einer Testbatterie zur Ermittlung
ökotoxikologischer Kenndaten kontaminierter Böden

Teilprojektleiter

Prof. I. Schuphan
RWTH Aachen
52074 Aachen

Partner

Dr. R. Altenburger
Umweltforschungszentrum
Leipzig-Halle GmbH
04318 Leipzig

Dr. J. Römbke
ECT Oekotoxikologie GmbH
65439 Flörsheim

Technische Assistenz

Dipl.-Biol. Ilka Reuter
RWTH Aachen

Svea Reiners
UFZ Leipzig-Halle GmbH

Dr. Wolfgang Kalsch
ECT Ökotoxikologie GmbH
Flörsheim

Michael Meller
ECT Ökotoxikologie GmbH
Flörsheim

Berichtserstellung

Dipl.-Biol. Ilka Reuter
RWTH Aachen

Dipl.-Chem. Matthias Eberius,
LemnaTec GmbH Würselen

Inhaltsverzeichnis

VII - 1	ZUSAMMENFASSUNG	5
VII - 2	EINLEITUNG ZUR ÖKOTOXIKOLOGISCHEN BEWERTUNG VON BODENKONTAMINATIONEN MIT DEM WASSERLINSENTTEST:	10
VII - 2.1	Allgemeine Sachlage	10
VII - 2.2	Testbatterien	10
VII - 2.3	Teilvorhaben „Wasserlinsen-Test“	11
VII - 2.3.1	Allgemeines zum Wasserlinsentest	11
VII - 2.3.2	Beobachtungsparameter	11
VII - 2.3.3	Auswertungsparameter	12
VII - 2.3.4	Stand der Normung	12
VII - 2.4	Zielsetzung des Teilvorhabens	13
VII - 3	MATERIAL UND METHODEN:	16
VII - 3.1	Versuchsbedingungen	16
VII - 3.2	Eluatherstellung	16
VII - 4	CHARAKTERISTIK DER BÖDEN:	18
VII - 4.1	Auswahlböden für den Laborvergleich	18
VII - 4.2	Auswahlböden für den Ringtest	18
VII - 4.3	Feststoffanalytik	23
VII - 4.4	Eluatanalytik	25
VII - 5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION:	28
VII - 5.1	Methoden	28
VII - 5.1.1	Elution der Bodenproben	28
VII - 5.1.2	Licht	30
VII - 5.1.3	31	
VII - 5.1.3	Stark gefärbte Lösungen	31
VII - 5.2	Untersuchungen zur Eignung verschiedener Nährmedien	32
VII - 5.2.1	Vergleich Steinberg – SIS-Medium, Hintergrundwerte	32
VII - 5.2.2	Vergleich Steinberg – SIS-Medium, belastete Bodenproben	33
VII - 5.2.3	Auswirkungen eines Medienwechsels	34

VII - 5.2.4	Optimierung des Steinberg-Mediums	35
VII - 5.2.5	pH-Wert.....	37
VII - 5.3	Untersuchungen zur Phytotoxizität ausgewählter Reinstoffe	39
VII - 5.3.1	Kaliumdichromat	39
VII - 5.3.2	3,5-Dichlorphenol.....	40
VII - 5.4	Untersuchungen zur Phytotoxizität ausgewählter Schadstoffgruppen	41
VII - 5.4.1	PAK.....	41
VII - 5.4.2	Mineralölkohlenwasserstoffe	42
VII - 5.4.2.1	Diesel	43
VII - 5.4.2.2	Normalbenzin.....	44
VII - 5.4.3	Nitroaromaten	45
VII - 5.4.3.1	2,4,6-Trinitrotoluol	46
VII - 5.5	Untersuchung von Auswahlböden für Laborvergleich und Ringtest.....	47
VII - 5.5.1	Boden „PAK-Mix“	48
VII - 5.5.2	Boden „Clausthal“	48
VII - 5.6	Laborvergleich	50
VII - 5.6.1	Boden „Gaswerk 1:2“	50
VII - 5.6.2	Boden „Iserlohn“	52
VII - 5.6.3	Boden „Landhausen“	53
VII - 5.6.4	„IMA SM 66“	54
VII - 5.6.5	Frondfächenauswertung der Laborvergleichsböden	57
VII - 5.6.6	Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol.....	59
VII - 5.7	Ergebnisüberblick	60
VII - 5.8	Bezugspunkte der Toxizitätsklassifizierung.....	64
VII - 5.8.1	Bezugspunkt Medienkontrolle.....	64
VII - 5.8.2	Wirkschwelle und Kontrollwachstum	64
VII - 5.9	Verdünnungsstufe und Empfindlichkeiten gegenüber Bodenkontaminationen.....	67
VII - 5.10	Übereinstimmung der Toxizitätsklassifizierung des Wasserlinsentests mit den Bodentests	72
VII - 6	LITERATUR	73

VII - 1 Zusammenfassung

Der Wasserlinsentest ist geeignet, die Toxizität aller belasteten Böden differenziert nachzuweisen, die vom Fraunhofer Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie repräsentativ für die häufigsten Belastungsprofile von Altlasten ausgewählt wurden. Die Hauptkontaminanten der 14 insgesamt getesteten Böden (Laborvergleich 4 Böden) gehören folgenden Stoffklassen an: Mineralölkohlenwasserstoffe, Schwermetalle, Nitrosprengstoffe und Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe.

Durchführbarkeit

Eluatherstellung

Das Weglassen der Filtration und der Einsatz eines praxisnahen Zentrifugationsverfahrens (2100 g, 30 min, ungekühlt) hat keinen relevanten Einfluss auf die im Wasserlinsentest ermittelte Toxizität. Gleichzeitig werden der Zeitaufwand und die Kosten der Probenvorbereitung drastisch reduziert und Adsorptionseffekte schlecht wasserlöslicher Schadstoffe an das Filtermaterial ausgeschlossen. Diese Modifikation der Eluatherstellung steht in voller Übereinstimmung mit der in ISO 15677-16, die als Basisnorm für Biotests eine Minimierung der Eingriffe in das Probematerial fordert.

Licht

Der in der ISO-Norm sehr breit gefasste Bereich der Lichtintensität sollte empfehlend zur Verringerung der Standardabweichung zwischen Replikaten und zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit auf eine Abweichung innerhalb des Lichtfeldes von $\pm 5\%$ eingeeengt werden. Dies gilt generell für den Wasserlinsentest und ist meist ohne relevanten Kostenaufwand möglich.

Medium

Das Steinbergmedium ist auch für den Einsatz von Bodeneluaten optimal zusammengesetzt. Es minimiert Förderungseffekte auch nährstoffreicher unbelasteter Böden und maximiert damit die Empfindlichkeit des Tests. Der Einsatz des Mediums des OECD-Wasserlinsentests führt dagegen zu massiven Förderungseffekten und einer Verringerung der Empfindlichkeit.

Normung

Die gesamte Testdurchführung des Laborvergleiches beruht ausschließlich auf den Vorgaben des ISO-Entwurfes (ISO/CD 20079), die ohne Veränderungen für den Einsatz von Bodeneluaten umfassend validiert werden konnte. Während der Projektdauer wurde aus dem anfänglichen DIN-Entwurf eine ISO-CD Version. Damit liegt nach der endgültigen

Verabschiedung der ISO-Norm in 2002 eine internationale Normung auch für den Einsatz von Bodeneluaten vor.

Aufwand

Die Basisinvestitionen für den Test sind gering, da schon mit einer einfachen umgebauten Kühltruhe bis zu drei vollständige Tests (ca. 50-60 Ansätze) parallel ohne Phytotron pro Woche durchgeführt werden können. Die benötigte Zentrifugenleistung ist laborüblich. Die Testauswertung kann bei höherer Testzahl durch den Einsatz von Bildanalysesystemen noch kostengünstiger gestaltet werden, als die Handauswertung über Zählung und Trockengewichtsbestimmung.

Aussagekraft

Medienkontrolle als Bezugspunkt

In Tests mit 3 sehr unterschiedlichen unbelasteten Böden übten diese keinen relevanten Einfluss relativ zur Medienkontrolle (Kontrollansatz mit Medium und Organismus ohne Eluat) aus. Im Normalfall kann deshalb die Medienkontrolle als Bezugsgröße für die Ermittlung der Hemmung verwendet werden. Damit werden kaum verfügbare unbelastete Referenzböden überflüssig und die Testdurchführung und Bewertung erheblich vereinfacht.

Beobachtungsparameter

Wie in der ISO-Norm vorgesehen, erwies es sich als hilfreich, neben der Frondzahl auch einen weiteren Beobachtungsparameter quantitativ auszuwerten, da Gesamtfrondfläche (bei bildanalytischer Auswertung) bzw. Trockengewicht (bei manueller Auswertung) in 60% aller Tests eine höhere G-Stufe auslösten als die Frondzahl.

Empfindlichkeit des Tests gegenüber Reinstoffen

Bei Versuchen mit ausgewählten PAK führte Anthracen bei einer Dosis von 5 mg/L (gelöst in 0,1 % DMSO) zur maximal erreichten Hemmung von 50 % der Wachstumsrate. Schon in Konzentrationen von 7,5 (Normalbenzin) bzw. 15 mg/L (Diesel) wird das Wachstum der Wasserlinsen signifikant gehemmt. Dies gilt unabhängig davon, ob die Testgefäße offen oder verschlossen eingesetzt wurden.

Nitroaromaten wie TNT und Begleitkontaminationen wie Nitrotoluole, Aminotoluole und Nitrobenzole führen zu EC10 (Wachstumsrate)-Werten im Bereich von minimal 0,1 mg/L. Damit können sprengstoffbürtige Kontaminationen empfindlich nachgewiesen werden.

Signifikanzschwelle 10 %

Die im ISO Normentwurf vorläufig festgelegte Signifikanzschwelle von 10 % Hemmung der Wachstumsrate wird durch die Variationskoeffizienten der Kontrollen fast aller

durchgeführten Tests von deutlich unter 10 % klar untermauert. Tritt eine Hemmung von mehr als 10 % auf, ist dies als Wirkung zu bezeichnen. Unberührt davon bleibt die gesetzlich zu regelnde Festlegung, in welcher Verdünnungsstufe keine Wirkung messbar sein muss, um den Einsatz des Bodens für definierte Zwecke zu ermöglichen.

Empfindlichkeit gegenüber Eluaten kontaminierter Böden

Es wurden alle Böden, die aufgrund der chemischen Analytik als kontaminiert betrachtet werden, (und 2 weitere) in abgestufter Weise als belastet erkannt oder als potentiell belastet eingestuft.

Klassifizierung der Toxizität von Böden

Das Konzept der Ermittlung der nicht-giftigen Wirkung aus dem Bereich der DIN-Normen kann ohne Abstriche übernommen werden. Der Vergleich der chemisch ermittelten Kontamination mit den Wirkdaten führt zu der Empfehlung, dass Böden, die ohne weitere Verdünnung des Bodeneluates (900 mL/L bzw. 450 g Bodenäquivalent/L) eine Hemmung von über 10 % der Wachstumsrate haben, Verdachtsfälle sind ($G_{\text{Lemna}} = 1$). Wird bei Verdünnungsstufe 2 (500 mL/L bzw. 250 g Bodenäquivalent/L) die 10 % Marke immer noch überschritten, ist der Boden eindeutig toxisch. Hochkontaminierte Böden erreichen G_{Lemna} Werte von 64 und höher. Damit ist eine weitere Differenzierung und Prioritätensetzung möglich. Unberührt von dieser ökotoxikologisch begründeten Bewertung bleibt die gesetzlich zu regelnde Festlegung, in welcher Verdünnungsstufe keine Wirkung messbar sein darf, um den Einsatz des Bodens für definierte Zwecke zu ermöglichen.

Laborvergleichstest

Im Laborvergleich zwischen 3 Laboren unter praxisnahen Versuchsbedingungen (unabhängige Elution nach einheitlicher Vorschrift, Nutzung von Wasserlinsen des gleichen Klons, Verwendung von unterschiedlichen Versuchsaufbauten, die alle konform mit dem Normentwurf sind) wurden die 4 Böden Landhausen, Iserlohn, Gaswerk und IMA SM66 getestet.

Die ermittelten ED- und G-Werte werden in der folgenden Tabelle dargestellt. Wenn es um Verdünnungen von Lösungen geht, wird im weiteren Text von ED (Effect Dilution) Werten gesprochen, um diese von EC-Werten der Reinstoffe abzugrenzen.

Die angegebenen GL Werte geben die Spannbreite der ermittelten Werte aller einzelnen Tests an. Die Werte der DIN 3er Verdünnungsreihe sind linear interpoliert, da nur die geometrische 2er Reihe getestet wurde, um den notwendigen Konzentrationsbereich abdecken zu können.

Tabelle VII - 1: Zusammenfassung der Ergebnisse des Wasserlinsentests im Laborvergleich mit Standardabweichungen (außer IMA, dort Spannweite da dort inhomogene Daten wegen sehr flacher Dosis-Wirkungs-Beziehung).

Wachstumsrate μ	Landhausen	Iserlohn	Gaswerk 1:2	IMA SM 66
Fronanzahl ED50 [%]	14,2 +/- 8,2	38,9 +/- 4,9	911,7 +/- 934,9	161,2-8044,9
Fronanzahl ED20 [%]	2,1 +/- 0,8	9,6 +/- 2,1	133,7 +/- 83,4	43,7 +/- 42,0
Fronanzahl ED10 [%]	0,9 +/- 0,4	4,8 +/- 2,6	42,1 +/- 17,2	17,4-83,5
Fronanzahl GL-Wert	64 - 256	16 - 48	1 - 8	2 - 24
GL-Wert	64 - 256	16 - >64	4 - 8	3 - 32

= Werte liegen außerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs

Die hochbelasteten Böden Landhausen und Iserlohn führten zu gut reproduzierbaren Ergebnissen aller Testteilnehmer. Bei dem mit PAK belasteten Boden Gaswerk blieben die Hemmungen auch in der höchsten Konzentrationsstufe unter 30 % der Wachstumsrate. Hier wurde nur in 2 Laboren eine Hemmung oberhalb des Schwellenwertes 10 % ermittelt. Da jedoch bei einem Limittest mit einem zentral hergestellten Eluat in Verdünnungsstufe 1 auch in diesem Labor eine Hemmung von 26 % erreicht wurde, beruht die in den Verdünnungsreihen gefundene Abweichung sicher nicht auf dem Wasserlinsentest sondern auf dem Eluat bzw. schon auf der zur Verfügung stehenden Bodenprobe. Es handelt sich hier um einen Boden mit geringer phytotoxizität und hoher Lipophilie der Kontaminaten, der trotzdem mehrheitlich als auffällig oder toxisch erkannt wurde.

Auch der nach LAGA Kriterien sanierte MKW-Boden IMA SM 66 Boden wurde von allen Testteilnehmern als Verdachtsfall eingestuft ($V = 1$ immer $> 10 \%$, $V = 2$ in 2 von 7 Tests knapp unter 10%). Die hohen Streuungen innerhalb der einzelnen Labore weisen hier auf mögliche Probeinhomogenitäten oder Elutionsunterschiede hin. Entscheidend ist bei diesem Boden, dass er als auffällig bis toxisch erkannt wurde.

Vergleich mit den aquatischen Biotests

Der Wasserlinsentest nahm im Vergleich mit den aquatischen Tests des Ringtests beim ED50 2 ml den 2. und einmal den 5. Platz ein. Der Algentest erreichte 2 Mal nur Platz 5 und einmal Platz 4 vor dem Wasserlinsentest.

Beim Vergleich mit allen aquatischen Testsystemen gehört der Wasserlinsentest zu den empfindlichsten Testsystemen. So führt er für 6 der Laborvergleichsböden zu höheren G-Werten als der Algentest und folgt im Ranking der Spitzenplätze der G-Werte direkt hinter

dem Leuchtbakterientest. Eine sauber definierte Vergleichsskala der Empfindlichkeiten steht jedoch noch generell aus.

Vergleich mit den terrestrischen Biotest

Hier liegt der Wasserlinsentest gemeinsam mit Regenwurm, Enchytraee und Pflanzenaufwuchstest in der Spitzengruppe bei der Einstufung der Böden in toxisch bzw. nicht toxisch.

Fazit

Im Zuge dieses Projektes konnte gezeigt werden, dass die Prüfung von Bodenproben mit dem ISO-Draft (ISO/WD 20079) „Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser- und Wasserinhaltsstoffen auf Wachstum und Vermehrung von Wasserlinsen (*Lemna minor*, *Lemna gibba*)“ erfolgen kann, ohne dass Modifikationen der Testvorschrift notwendig sind. Die Ergebnisse des Laborvergleichs und die Empfindlichkeit bezogen auf verschiedene Bodeneluate und andere Eluatets (Alge, Leuchtbakterie, Daphnien) zeigen, dass der Wasserlinsentest durch seine hohe, breite und scharf differenzierende Empfindlichkeit wichtige zusätzliche Informationen zur Beurteilung der Toxizität von Böden liefert und deshalb in eine Testbatterie aufgenommen werden sollte.

VII - 2 Einleitung zur ökotoxikologischen Bewertung von Bodenkontaminationen mit dem Wasserlinsentest:

VII - 2.1 Allgemeine Sachlage

In Deutschland werden großflächige Bodenkontaminationen durch industrielle oder militärische Aktivitäten immer mehr zu einem Problem. Das gesteigerte Umweltbewusstsein und die fortschreitende Flächenversiegelung führten 1998 zur Erlassung des Bodenschutzgesetzes, das eine Beurteilung kontaminierter Böden aufgrund chemischer Analysen und eine nutzungsbezogene Sanierung vorsieht. Eine Überprüfung der von Böden ausgehenden unerwünschten biologischen Fremdwirkung und damit eine direkte Beurteilung der Toxizität ist bisher nicht vorgesehen.

Ein von der Deutschen Bundesstiftung Umweltschutz gefördertes Projekt, das vom Fraunhofer Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie in Schmallenberg koordiniert wird, soll Grundlagen für eine ökotoxikologische Bewertung von Böden mit Hilfe einer biologischen Testbatterie liefern.

VII - 2.2 Testbatterien

Der Einsatz von Testbatterien hat das Ziel, möglichst alle toxischen Auswirkungen eines Stoffes oder eines unbekanntes Stoffgemisches zu erfassen. Dafür kommen Organismen aus verschiedenen trophischen Ebenen parallel zum Einsatz.

Im Rahmen eines Ringtests sollen für die Beurteilung der Bodenqualität von Bodenproben verschiedene Expositionspfade und Wirkungen von Substanzen in einer ökotoxikologischen Testbatterie berücksichtigt werden.

Die Erfassung der Stoffwirkung über den Wasserpfad wird durch aquatische Tests wie den Leuchtbakterientest (Lumineszenztest, Wachstumstest), den Algen-Wachstumshemmtest und den Daphnientest (Immobilisation) dargestellt.

Der Wasserlinsentest ist Teil eines Laborvergleichstests im Rahmen des DBU-Projektes und stellt den einzigen Kurzzeittest (7 Tage) mit höheren Pflanzen dar. Er soll im Rahmen des Projektes als eine wichtige Ergänzung der Testbatterie validiert werden.

Der insgesamt unterrepräsentierte Pflanzenbereich wird im Laborvergleich durch einen mehrwöchigen Aufwuchstest weiter ergänzt.

VII - 2.3 Teilvorhaben „Wasserlinsen-Test“

Der Einsatz des Wasserlinsentests zur Testung von Bodenproben in Form von wässrigen Eluaten (Simulation Bodenlösung) deckt in einer Testbatterie den wichtigen Bereich der höheren Pflanzen ab, da hier generell bisher nur Algentests eingesetzt wurden und Tests mit höheren Pflanzen, besonders schnelle, aussagekräftige und validierte fehlen.

VII - 2.3.1 Allgemeines zum Wasserlinsentest

Wasserlinsen sind sehr gut für die Testung von Bodenproben geeignet. Durch die Verwendung von Bodenextrakten lassen sich alle Vorteile des wässrigen Milieus, wie z. B. die unproblematische Verdünnung der Proben oder die Verwendung der Nährlösung als Nullkontrolle, nutzen. Die oftmals große Spannbreite der pH-Werte von Wasser- oder Eluatproben stellt in diesem Testsystem kein Problem dar, da Wasserlinsen in einem weiten pH-Bereich (5 - 9) optimal wachsen können. Ein weiterer Vorteil der auf der Oberfläche schwimmenden Lemnaceen-Arten ist, dass sie auch auf getrübbten oder gefärbten Lösungen ungestört von nicht toxischen Einflüssen wachsen können, was sie geeignet für die Testung von Bodeneluaten oder -suspensionen macht. Aus diesem Grunde ist der Wasserlinsentest auch für die Testung schwieriger Substanzen und Gemische (OECD 1999b) vorgesehen.

VII - 2.3.2 Beobachtungsparameter

Da Wasserlinsen höhere Pflanzen sind, können sie sehr unterschiedlich auf Schadstoffeinwirkungen reagieren. Die in Wachstumshemmtests zu bewertende toxische Wirkung kann sich auf die Population (Frondzahl), die gebildete Biomasse (Trockengewicht, Frondfläche) und das Energieumsetzungspotenzial (Blattfärbung, Chlorophyllgehalt) beziehen und über diese Biomarker empfindlich nachgewiesen werden. Die ISO-Draft (ISO/CD 20079) trägt einer möglichst empfindlichen und gut handhabbaren Messmethodik dadurch Rechnung, dass neben dem zwingend zu erfassenden Populationsparameter Frondzahl entweder die Biomasse (Trockengewicht oder Frondfläche) oder der Chlorophyllgehalt quantitativ ermittelt und der jeweils dritte Beobachtungsaspekt qualitativ dokumentiert werden muss.

Die optischen Parameter können wiederholt und ohne Zerstörung der Pflanzen während der gesamten Testdauer erfasst werden (Wang 1989). Als besonders hilfreich haben sich dabei automatische Bildauswertungssysteme erwiesen, die den Test noch ökonomischer machen (LemnaTec 2000). Und nur mit diesen Geräten können die Parameter Frondfläche und Färbung optimal gemessen werden.

VII - 2.3.3 Auswertungsparameter

Prinzipiell stehen bei Wachstumshemmtests drei Auswertungsparameter zur Verfügung:

- Biomassezuwachs (final biomass)
- Wachstumsrate (μ)
- Fläche unter der Wachstumskurve (area under the growth curve)

Dabei ist die Wachstumsrate die einzige Größe, die unabhängig von der Testdauer und der absoluten Wachstumsrate der Kontrolle ist, da sie dem annähernd exponentiellen Wachstum der Kontrolle Rechnung trägt. Will man Tests mit einer Pflanze in verschiedenen Biotests zu verschiedenen Zeitpunkten und verschiedenen Laboren miteinander vergleichen, so empfiehlt es sich, diesen Parameter als Bezugsgröße zu verwenden (LemnaTec 2000b).

Unabhängig davon hat die ISO auf ihrer Jahressitzung in Antalya 2000 beschlossen, in Zukunft in Wachstumshemmtests nur noch die Wachstumsrate für Normtests zu nutzen.

VII - 2.3.4 Stand der Normung

Für den Wasserlinsentest liegen nationale Normen in Frankreich (AFNOR 1996), Schweden (SIS 1995), USA (APHA 1992, ASTM 1991, EPA 1996) und Kanada (Environment Canada 1998) vor. Auf OECD-Ebene wurde zum Richtlinienentwurf ein internationaler Ringtest mit 37 Teilnehmern erfolgreich abgeschlossen (OECD 1998). Die Guideline liegt als „revised draft document“ vor (10/2000). Für den DIN/ISO Bereich wurde auf der Basis eines vollständig vorliegenden DIN-Normentwurfes das offizielle ISO-Normierungsverfahren im Sommer 2000 gestartet. Die Trennung von Chemikalien und Umweltproben wird zunehmend verwischt. So soll die aus der Chemikaliertestung kommende OECD-Guideline auch zur Umweltproben-testung eingesetzt werden können. Die ISO-Norm erweitert sich dagegen zunehmend auch zur Untersuchung von Bodeneluat und Wasserinhaltsstoffen, was auch Reinstoffe einschließt.

Alle Normen sind kompatibel mit bildanalytischen Auswertungsmethoden, da diese auch die Zählung der Fronds mit einschließen. OECD- und auch ISO-Norm werden darüber hinaus auch die Gesamtrondfläche als empfindlichen Parameter berücksichtigen. Spezielle Anforderungen wie die der ASTM-Norm (USA), nur Fronds mit weniger als 50 % Chlorosen zu zählen, können von der Bildanalyse erfüllt werden.

Auch in Normen zur Bewertung von Böden mit Biotestbatterien (ISO/CD 15799) und Normen für Biotests mit schwierigen Substanzen (OECD 1999) wird der Wasserlinsentest wegen seiner breiten Einsetzbarkeit auch in Suspensionen und trübem bzw. gefärbtem Testgut gesondert erwähnt.

VII - 2.4 Zielsetzung des Teilvorhabens

Da der Einsatz des Wasserlinsentests mit Boden- und Substratbestandteilen bisher noch wenig verbreitet ist, war zu Projektbeginn noch zu klären, ob der vorliegende ISO-Entwurf auch für Bodeneluat geeignet ist.

Gesamtziel dieses Teilvorhabens war die Überprüfung und Validierung der ISO-Norm zum Einsatz des Wasserlinsentests im Bereich Boden und Substrate und ggf. die Festlegung von Ergänzungen oder die Spezifizierung des Entwurfes.

Das Hauptziel dieses Teilvorhabens gliedert sich in die Überprüfung und Beantwortung folgender Fragen:

- Gibt es Wechselwirkungen zwischen den vorgegebenen Nährmedien und den einzusetzenden Bodeneluat?
- Welchen Einfluss haben Eluate von unbelasteten Bodenproben auf die verschiedenen Testendpunkte?
- Inwieweit übt die Matrix aus Bodeneluat und Nährmedium einen Einfluss auf die Schadstoffe aus? Kann es zu einer Detoxifizierung oder Erhöhung der Verfügbarkeit kommen?
- Wie empfindlich ist der Wasserlinsentest gegenüber bodentypischen Schadstoffen im Vergleich mit Bewertungen auf der Basis der chemischen Analytik oder anderer Biotests?
- Wie wirkt sich die hohe Strahlungsdichte während des Wasserlinsentests auf phototoxische Substanzen (PAK) aus? Da dieser Wirkungspfad nicht bei Pflanzen im Boden auftritt, wie lassen sich derartige Effekte erkennen und ggf. eliminieren?
- Welche Auswirkungen haben Eluate mit hohen TOC-, CSB- oder BSB-Werten auf das Testergebnis? Kann es während der relativ hohen Temperatur und der Testdauer von 7 Tage zu unerwünschten Reaktionen in den unsterilen Eluat kommen?
- Lassen sich, in Analogie zu den G-Werten der Abwasserbiotests nach DIN, analoge Werte für Bodeneluat im Wasserlinsentest ökotoxikologisch begründet aufstellen?

Diese Fragen wurden schwerpunktmäßig durch Versuche am Lehrstuhl für Biologie V beantwortet, damit der Laborvergleich unter Bedingungen stattfinden konnte, an denen keine weiteren Modifikationen mehr notwendig sind. Dies ist für den Wert und die langfristige Aussagekraft des Laborvergleichstests von entscheidender Bedeutung.

Die Durchführung von ergänzenden Versuchen zu verschiedenen Schadstoffklassen und die Einbeziehung einer sehr breiten Bodenpalette bot die Gewähr, dass bei weiteren Untersuchungen in der Zukunft eine sichere, stabile und empfindliche Methodenbasis vorliegt die alle Anforderungen der Durchführungspraxis und der Normung genügt.

Es handelt sich bei den Versuchen also keinesfalls um Methodenentwicklung, sondern um inhaltlich fundierte Methodvalidierung mit dem Fokus auf Kernfragen der Biotestdurchführung und –auswertung (z. B. Empfindlichkeit für bestimmte Schadstoffgruppen, Aussage-schärfe belastet/unbelastet). Diese Fragen stellen klare Testbewertungskriterien dar und können nur auf einer wirklich breiten Testdurchführung mit Böden und Reinstoffen ermittelt werden. Hier soll verhindert werden, dass auf der Basis weniger, gut reproduzierbarer Messreihen Vorschriften genormt werden, die im späteren Praxiseinsatz mit dem nie normierbaren Testgut dann Probleme machen, bzw. weitere Modifikationen (z. B. in der Nährstoffversorgung der Testorganismen) erfordern.

Dies ist auch der Grund, warum in diesem Teilvorhaben alle vom IUCT verfügbaren Böden, auch über den Satz der 8 Laborvergleichsböden hinaus im ersten Projektabschnitt 14 potentiell belastete und 3 gesichert unbelastete Böden untersucht wurden. Diese Ergebnisse stellen neben dem Laborvergleich auch die Basis für den Vergleich mit den anderen Biotests dar.

Es wurde deshalb ohne Qualitätsverlust in Kauf genommen, dass in der 2. Projektphase aus Zeit und Kostengründen nur noch eine geringere Anzahl an Böden untersucht werden konnte (siehe unten).

Ein weiteres Ziel war die Validierung der ISO-Testvorschrift im Hinblick auf Reproduzierbarkeit und Stabilität gegenüber äußeren Einflußfaktoren, wie sie z. B. durch den Einsatz in verschiedenen Laboren entstehen können. Diese Fragen werden durch den Laborvergleich mit vier Böden in drei Laboren beantwortet.

Hier ging es neben der Ermittlung von ED-Werten und breiten Dosis-Wirkungsreihen ganz klar auch um die entscheidende Frage, ob alle Labore zu der gleichen Bewertung der Bodenproben kommen. Es ergab sich, bedingt durch die Auswahl schwerpunktmäßig hochkontaminierter Böden und die im ersten Projektabschnitt ermittelte hohe Empfindlichkeit des Wasserlinsentests auch für niedrig kontaminierte Böden, eine von anderen Testsystemen z. T. abweichende Situation. Aus den Versuchen in Abschnitt 1 (Bio V) war klar, dass bei den hochbelasteten Böden immer 100% Übereinstimmung der Bewertung erzeugt würde, da die unbelasteten Referenzböden keine Effekte zeigten und die ermittelten Toxizitätswerte einiger Laborvergleichsböden um 10er Potenzen oberhalb der ermittelten Toxizitätsschwelle lagen. Aus diesem Grund wären weitere Tests wissenschaftlich unsinnig gewesen, da das Ergebnis

vorab bekannt war. Deshalb erfolgte eine Konzentration auf die praxisrelevanteren Böden mit niedriger, realitätsnaher Belastung für den späteren Anwendungsbereich.

VII - 3 Material und Methoden:

VII - 3.1 Versuchsbedingungen

Für den Laborvergleichstest wurde angestrebt, möglichst viele Vorschriften aus dem aktuellen DIN-Entwurf zu übernehmen. Eine Zusammenfassung der Versuchsbedingungen liefert die folgende Tabelle.

Tabelle VII - 2: Versuchsbedingungen der Teilnehmer

	RWTH Aachen	UFZ Leipzig	ECT Flörsheim
Testgefäße	400 mL Bechergläser	100 mL Bechergläser	250 mL Kristallisierschalen
Testvolumen	150 mL	80 mL	200 mL
Medium	Steinberg	Steinberg	Steinberg
Anzahl der eingesetzten Fronds	12	9	12
Lichtquelle und –intensität	Sylvania Standard F58W/125 und Philips TLD 58W/25 universalweiß, 104-115µE/m ² *s	Osram L36 W/25 universalweiß, 95-105µE/m ² *s	Osram Lumilux L58/11 Daylight, 7112 Lux
Meßmethode	Scanalyzer® LemnaTec GmbH	Manuelle Zählung, Scanalyzer® LemnaTec GmbH	visuell auf Leuchtfeld

Alle Wasserlinsen (*Lemna minor*) stammen aus der Stammkultur von Herrn Prof. Jungnickel, Jena und wurden von der RWTH Aachen an die Teilnehmer verschickt.

Die vom IUCT erhaltenen Böden wurden im Lehrstuhl der Biologie V in 4L-Glas-Einweckgläser umgefüllt und bei 4°C gelagert. Das ECT lagerte die Böden in den mitgelieferten PP-Eimern bei RT, das UFZ bei 4°C.

VII - 3.2 Eluatherstellung

Die Eluatherstellung erfolgte nach einer Vorschrift des Fraunhofer Instituts. Tabelle VII - 3 gibt eine Zusammenfassung wider.

Tabelle VII - 3: Eluatherstellung

	RWTH Aachen	UFZ Leipzig	ECT Flörsheim
Gefäße (Material, Größe):	2L-Schottflaschen	1l Glasstandkolben	2,5 L Braunglasflasche
Art des Schüttelns (Horizontal, Überkopf)	Überkopf	Überkopf	Horizontal
Schüttelfrequenz (ca.-Angabe):	8 U/min	10 U/min	120 U/min
Temperatur während der Elution	RT	RT	RT
Art der Trennung von Boden und Überstand	Zentrifugation bei ca. 2100 g, 30 min. Überstand dekantiert	1h stehenlassen, bei 2100g, 30 min zentrifugieren	Zentrifugation bei ca. 2100 g, 30 min. Überstand dekantiert
Zentrifugengefäße	Edelstahlzylinder	Schott Zentrifugengläser mit 200 ml Volumen	Nalgene Zentrifugenflaschen (PP) mit 150 mL

Um evtl. Unregelmäßigkeiten bei der Eluatherstellung feststellen zu können, wurden mehrere Eluatproben am Fraunhofer Institut in Schmallenberg chemisch analysiert. Diese Ergebnisse werden in der folgenden Tabelle den Ergebnissen aus dem Ringtest gegenübergestellt.

Tabelle VII - 4: Vergleich Ring- und Laborvergleichstest

	Laborvergleich				Ringtest			Clausthal
	IMA SM 66	Gaswerk 1:2	Iser-lohn	Land-hausen	Gaswerk 1:2	Iser-lohn	Land-hausen	
DOC [mg/L]	49	135,6	333,0	329,9	88,9	282,0	304,6	92,8
Σ_{16} PAK [μ g/L]	n. b.	1114,6	4,9	n. b.	115,4	n. b.	n. b.	n. b.
Kohlenwasserstoffe [mg/L]	n. b.	n. b.	1,0	0,9	n. b.	n. b.	0,5	n. b.
Schwermetalle [mg/L]	n. b.	n. b.	n. b.		n. b.			n. b.
Cu				3,62		0,22	2,0	
Ni				1,34		0,12	1,09	
Zn				2,62		0,21	1,22	
TNT [mg/L]	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	10,0

n. b.= nicht bestimmt

VII - 4 Charakteristik der Böden:

Unbelastete Böden

Als unbelastete Böden wurden die Standardböden LUFA 2.1, LUFA 2.2 und LUFA 2.3 der LUFA Speyer eingesetzt.

VII - 4.1 Auswahlböden für den Laborvergleich

Die Böden „IMA SM 66“ und „IMA 937 B“ stammen aus ehemaligen Mineralölkohlenwasserstoff-Altlasten und gelten nach Auskunft des Sanierungsunternehmens als saniert.

Bei „PAK-Mix“ handelte es sich um ein Gemisch sehr stark mit PAK kontaminierter Böden. Die Böden wurden von Sanierungsunternehmen zur Verfügung gestellt.

Der Boden „Sickergraben“ ist eine Rüstungsalzlast und stammt aus einem ca. 1 m tiefen Graben, in dem in der Vergangenheit Abwässer aus der TNT-Produktion versickert wurden. Der Boden ist extrem hoch mit Nitrotoluolen belastet.

Der Boden „Neuohe“ ist einer Stelle entnommen, an der z. B. Nebelgranaten und andere Kampfmittel oberflächennah abgebrannt wurden. Der Boden ist daher oberflächlich verkohlt und enthält große Mengen Schwermetalle, insbesondere Zink.

Der Boden „Celle Hintergrund“ entstammt einer als nicht belastet angesehenen Wiese in unmittelbarer Nähe zu den beiden Rüstungsalzlasten.

Von allen beschriebenen Böden wurden Proben von etwa 1 bis 1,5 t, je nach Bodenstruktur und -dichte entnommen und aufbereitet.

VII - 4.2 Auswahlböden für den Ringtest

Der Boden „Clausthal“ ist eine Rüstungsalzlast aus dem Werk „Tanne“ in Clausthal-Zellerfeld.

Bei „Landhausen“ handelt es sich um Material aus einer Schlammdeponie (z. B. Waschlamm).

„Iserlohn“ ist laut Auskunft des Sanierers durch einen Ölschaden stark mit MKW und PAK belastet.

Der Boden „Bohrloch“ stammt aus einem Bohrkern einer Sondierungsbohrung auf einem ehemaligen Zechengelände. Die Bohrungstiefe betrug 0 bis 40 m.

Der Boden „TNT-Mix“ ist ein 1:1 Gemisch der Rüstungsalzlasten „Hallschlag“ und „Stadtlendorf“.

Vorbehandlung der Böden

Alle entnommenen Bodenproben wurden in einer dünnen Schicht (ca. 10 cm) ausgebreitet und soweit getrocknet, bis eine Absiebung möglich war. Das Material wurde < 5 mm gesiebt und homogenisiert und bis zur Durchführung der Vorversuche in geschlossenen Eimern bei 4 °C aufbewahrt. Die für den Laborvergleichstest ausgewählten Böden wurden ebenfalls in einer dünnen Schicht ausgebreitet und angetrocknet. Die Restwassergehalte betragen 4 bis 10 %. Die angetrockneten Böden wurde mit Hilfe eines 1 m² großen Siebes mit 5,5 mm Quadratlochung per Hand gesiebt. Die gesiebten Böden wurden zweimal mit einer Betonmischmaschine homogenisiert und bis zur Verteilung in Bigbags bei RT aufbewahrt.

Chemisch-physikalische Bodencharakteristik

Tabelle VII - 5: Charakterisierung der Referenzbodenproben

Bodentyp	2.1	2.2	2.3
Org. C in %	0,51 ± 0,08	2,28 ± 0,16	1,32 ± 0,10
pH-Wert (CaCl ₂)	5,5 ± 0,4	5,8 ± 0,3	6,5 ± 0,1
Kationenaustauschkapazität [mval/100g]	5 ± 0	11 ± 2	10 ± 0
WHK _{max} (g/100g)	26 ± 2	51 ± 4	38 ± 1
Schüttvolumen (g/1000mL)	1523 ± 61	1132 ± 27	1260
Bodenart	Sand	lehmiger Sand	lehmiger Sand

Tabelle VII - 6: Befund der Bodenuntersuchung der Laborvergleichsauswahlböden der LUFA Speyer

	IMA SM66	IMA 927B	Sickergraben	Neuohe	Celle Hintergrund	PAK-Mix
Ton (<0,002 mm)	8,2%	28,3%	6,5%	5,4%	7,6%	7,5%
Schluff (0,002-0,063 mm)	12,8%	36,1%	0,3%	10,8%	22,0%	8,9%
Sand (0,063-2,0 mm)	79,0%	35,6%	93,2%	83,8%	70,4%	83,6%
Bodenart	lehmiger Sand	schwach toniger Lehm	schwach toniger Sand	schwach lehmiger Sand	schwach lehmiger Sand	schwach lehmiger Sand
pH (CaCl ₂)	7,7	7,8	5,0	7,2	5,3	7,5
Kalkgehalt [% CaCO ₃]	5,3	7,8	< 0,1	2,1	5,3	2,2
Phosphat [mg/100g luftgetrockneter Boden]	12	58	12	6	2	15
Kalium [mg/100g luftgetrockneter Boden]	10	17	5	4	5	9
Magnesium [mg/100g luftgetrockneter Boden]	6	23	13	35	1	12
Ammonium [mg/100g luftgetrockneter Boden]	< 0,1	0,1	0,3	< 0,1	0,2	< 0,1
Nitrat [mg/100g luftgetrockneter Boden]	2,4	2,8	0,5	1,0	0,5	2,0
Stickstoff [mg/100g luftgetrockneter Boden]	30	30	1460	66	70	113
Kohlenstoff [mg/100g luftgetrockneter Boden]	823	1960	7323	1990	1573	4023
C/N Verhältnis	27,4	65,3	5,0	30,2	22,5	35,6
Humus [%]	1,4	3,4	12,6	3,4	2,7	6,9

Zusätzlich wurden die folgenden Parameter zur Charakterisierung der Testböden ermittelt:

Tabelle VII - 7: Befund der zusätzlichen Bodenuntersuchungen am Fraunhofer Institut IUCT der Laborvergleichsauswahlböden

	IMA SM66	IMA 927B	Sickergraben	Neuohe	Celle Hintergrund	PAK-Mix
Trockengewicht [%]	97,8	94,9	92,0	94,0	95,3	97,1
WHK _{max} [mL/Kg]	285,0	406,9	511,3	421,0	405,5	n. b.
TOC [%]	0,8	0,4	6,2	2,1	1,7	3,9

n. b.: nicht bestimmt

Tabelle VII - 8: Charakterisierung der Ringtestauswahlböden

Bezeichnung	Hauptkontamination		WHK _{max} [mL/Kg]	TOC [%]	pH
	Art	Höhe			
Bohrloch	PAK	Hoch	335	4,7	7,4
Clausthal	TNT	Hoch	512	4,7	7,3
Gaswerk 1:2	PAK, KW	Sehr hoch	269	1,7	5,6
Iserlohn	KW, PAK	Sehr hoch	242	5,9	7,5
Landhausen	KW, Schwermetalle	Sehr hoch	348	8,5	7,3
Tankstelle	MKW	Mäßig	282	0,9	7,8
Tauchbecken	Chrom	Sehr hoch	393	6,1	7,4
U-Ruhr 1	MKW	Mäßig	645	4,0	7,4
Zelt	BTX, KW, sonstige	Lokal hoch	sehr 374	1,4	7,5

Tabelle VII - 9: Chemisch-physikalische Bodenparameter der Ringtestauswahlböden

	Gaswerk 1:2	Clausthal	Iserlohn	Landhausen	Bohrloch
Ton (<0,002mm) [%]	5,4	16,8	6,7	5,4	14,6
Schluff (0,002-0,063mm) [%]	9,8	37,9	10,9	12,7	13,5
Sand (0,063-2,0mm) [%]	84,8	45,3	82,4	81,9	71,9
Bodenart	schwach lehmiger Sand	sandiger Lehm	schwach lehmiger Sand	schwach lehmiger Sand	stark lehmiger Sand
Kalkgehalt [%CaCO ₃]	< 0,1	1,7	5,3	6,2	5,4
Phosphat [mg/100g luftgetrockneter Boden]	11	5	7	16	3
Magnesium [mg/100g luftgetrockneter Boden]	5	4	8	29	13
Stickstoff [%]	0,16	0,38	0,2	0,27	0,2
Nitrat [mg/100g luftgetrockneter Boden]	7,9	35,5	0,2	0,1	0,2
Ammonium [mg/100g luftgetrockneter Boden]	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1
Trockengewicht [%]	97,6	89,4	98,4	97,4	96,7
C _{org} *. [%]	1,7	4,7	5,9	8,5	4,7

* bestimmt als TOC (C aus organischen Schadstoffen miterfasst)

VII - 4.3 Feststoffanalytik

Schwermetalle

Die chemischen Analysen zur Ermittlung der Bodenbelastung wurden am Fraunhofer IUCT durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen dargestellt:

Tabelle VII - 10: Schwermetalle nach Königswasseraufschluss [mg/kg TS]

Boden	As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Celle Hintergrund	< 15	< 13	25,3	< 34,3	< 33	< 24	927,8
Sickergraben	< 15	< 13	227,1	< 34,3	< 33	38,1	312,5
IMA SM66	< 15	< 13		< 34,3	< 33	43,0	106,5
IMA 927B	< 15	< 13		43,8	68,7	26,1	96,8
PAK-Mix	< 15	< 13		79,1	32,8	109,9	274,9
Neuohe	< 15	< 13		83,1	50,3	1179,9	54980,1

Tabelle VII - 11: Chemische Analytik (Feststoffanalysen)

	As [mg/kg]	Cd [mg/kg]	Cr [mg/kg]	Cu [mg/kg]	Ni [mg/kg]	Pb [mg/kg]	Zn [mg/kg]
Clausthal	5,4	6,4	65,9	104,4	29,2	820,8	764,7
Landhausen	3,6	29,6	2005,1	10921,3	5894,2	1082,2	5065,3
Iserlohn	12,1	9,3	320,3	367,8	578,5	547,5	577,6
Gaswerk 1:2	< Bg	< Bg	94,9	10,0	6,5	10,3	26,6
Bohrloch	3,3	< Bg	47,4	32,8	20,3	26,0	56,8
Tankstelle	Keine Werte angegeben.						
Tauchbecken							
U-Ruhr 1							
Zelt							

Bg: Bestimmungsgrenze

Organische Analytik, MKW, PAK

Tabelle VII - 12: Mineralölkohlenwasserstoffe und PAK der Laborvergleichsauswahlböden [mg/kg TS]

	IMA SM66	IMA 927B	Sickergraben	Neuohe	Celle Hintergrund	PAK-Mix
MKW gemäß DIN 38409 H18 Gehalt in mg/Kg TS	170,5	66,9	105,4	3,6	58,9	ca. 1000 ¹⁾
Σ_{16} PAK [mg/kg] (GC/MS-Analyse)	4,32 ²⁾	0,46 ²⁾	2,11 ²⁾	0,42	0,44 ²⁾	2682

¹⁾ Störpeak im IR-Spektrum ist nicht zu eliminieren und täuscht höheren Gehalt vor.

Wert ist abgeschätzt aus Höhe des Hauptpeaks.

²⁾ Summe der 16 EPA-PAK ohne Naphthalin, Acenaphthen und Fluoren

Tabelle VII - 13: MKW- und PAK-Gehalte der Ringtestauswahlböden [mg/kg]

	MKW [mg/kg]	Σ_{16} PAK [mg/kg]
Clausthal	< 50	77
Landhausen	43660,1	60
Iserlohn	8798,9	21
Gaswerk 1:2	< 50	2268
Bohrloch	< 50	93,6*
Tankstelle	893	4,71
Tauchbecken	535	18,9
U-Ruhr 1	1277	12,15
Zelt	94,9	1,58

*: sehr inhomogen verteilt (36 bis 253 mg/kg)

TNT und Metabolite

Tabelle VII - 14: TNT + Metabolite mittels HPLC/UV nach Ultraschall-Extraktion mit Methanol [mg/kg TS]

	IMA SM 66	IMA 927B	Sickergraben	Neuohe	Celle Hintergrund	PAK-Mix
2,4,6-Trinitrotoluol	0,78	8,15	57048,2	4,05	1,36	keine TNT oder Metabolite nachweisbar
4-Amino-2,6-Dinitrotoluol	0,29	0,28	114,1	0,38	0,2	
4-Amino-4,6-Dinitrotoluol	0,39	0,23	112,0	0,2	0,03	
1,3,5-Trinitrobenzol	0,02	0,21	13,41	0,11	< Bg	
1,3-Dinitrobenzol	< Bg	< Bg	35,96	< Bg	< Bg	
2,4-Dinitrotoluol	< Bg	< Bg	85,67	< Bg	< Bg	

Bg: Bestimmungsgrenze

VII - 4.4 Eluatanalytik

Die Eluatherstellung erfolgte nach Vorschrift des Fraunhofer IUCT.

Schwermetalle

Tabelle VII - 15: Schwermetallgehalt der wässrigen Bodeneluete [mg/L]

Boden	Cd	Cr	Cu	Fe	Ni	Pb	Zn
Celle Hintergrund	< 0,05	< 0,05	< 0,2	< 0,2	< 0,05	< 0,05	0,77
Sickergraben	< 0,05	< 0,05	< 0,2	7,23	< 0,05	0,21	3,95
IMA SM66	< 0,05	< 0,05	< 0,2	< 0,2	< 0,05	< 0,05	< 0,2
IMA 927B	< 0,05	< 0,05	< 0,2	< 0,2	< 0,05	< 0,05	< 0,2
PAK-Mix	< 0,05	< 0,05	< 0,2	1,04	< 0,05	< 0,05	0,99
Neuohe	< 0,05	< 0,05	< 0,2	3,26	< 0,05	0,07	10,49

Organische Analytik, MKW, PAK

Tabelle VII - 16: Mineralölkohlenwasserstoffe, PAK und Phenolindex in Eluat der Laborvergleichsauswahlböden

	IMA SM66	IMA 927B	Sickergraben	Neuohe	Celle Hintergrund	PAK-Mix
MKW gemäß DIN 38409 H18 Gehalte in mg/L	0,2	0,2	0,2	0,6	0,3	0,6
Σ_{13} PAK [$\mu\text{g/L}$] ¹⁾ (GC/MS-Analyse)	0,5	0,8	7,0	0,9	0,5	475,0
Phenolindex gemäß DIN 38 409-H16-3 Gehalte in mg/L	n. b.	n. b.	n. b.	< Bg	n. b.	0,58

¹⁾ Summe der 16 EPA-PAK ohne Naphthalin, Acenaphthen und Fluoren
Bg: Bestimmungsgrenze
n. b.: nicht bestimmt

Organische Analytik, TNT

Tabelle VII - 17: TNT + Metabolite mittels HPLC/UV in Eluat [mg/L] der Laborvergleichsauswahlböden

	IMA SM66	IMA 927B	Sickergraben	Neuohe	Celle Hintergrund	PAK-Mix
2,4,6-Trinitrotoluol	0,23	0,77	110,02	1,20	0,51	keine TNT oder Metabolite nachweisbar
4-Amino-2,6-Dinitrotoluol	0,06	0,03	5,22	< Bg	0,02	
4-Amino-4,6-Dinitrotoluol	0,07	0,02	5,80	< Bg	0,02	
1,3,5-Trinitrobenzol	< Bg	< Bg	0,03	< Bg	< Bg	
1,3-Dinitrobenzol	< Bg	< Bg	0,07	< Bg	< Bg	
2,4-Dinitrotoluol	< Bg	< Bg	0,12	< Bg	< Bg	

Bg: Bestimmungsgrenze

Sonstige

Tabelle VII - 18: pH, DOC und Anionen (mittels IC) in Eluat der Laborvergleichsauswahlböden

	IMA SM66	IMA 927B	Sickergraben	Neuohe	Celle Hintergrund	PAK-Mix
DOC [mg/L]	43,0	11,7	189,3	11,6	32,7	277,4
pH	8,2	8,1	6,3	8,2	6,5	8,0
Chlorid [mg/L]	4,11	1618	0,88	1,14	1,84	4,42
Nitrat [mg/L]	15,45	871	4,84	8,09	38,58	583
Sulfat [mg/L]	170	13268	4,06	< Bg	3,77	12872

Bg: Bestimmungsgrenze

Tabelle VII - 19: Anionen im Eluat (Boden : Wasser = 1:2) der Ringtestauswahlböden

Bodenbezeichnung	Nitrat [mg/L]	Nitrit [mg/L]	Sulfat [mg/L]	Phosphat [mg/L]
Tankstelle	2,7	--	164,5	--
Landhausen	3,0 (?)	--	1064,5	0,4 (?)
Iserlohn	17,7	0,3	997,7	--
U-Ruhr 1	2,7	--	201,6	--
Tauchbecken	6,6	--	9,5	--
Bohrloch	2,8	--	216,1	--

Tabelle VII - 20: Ergebnisüberblick Eluatanalysen der Teilnehmer

	Eluat	DOC [mg/l]	Trübung [FNU]	Σ PAK [µg/l]
RWTH Aachen	Gaswerk 1:2	132,3	112,4	1057,0
ECT Flörsheim	Gaswerk 1:2	138,6	149,9	1216,5
	IMA SM 66	54,9	1,3	n. b.
UFZ Leipzig	Gaswerk 1:2	135,8	143,6	1078,2
	IMA SM 66	43,1	2,0	n. b.

n. b. = nicht bestimmt

Die Eluate des Bodens „Gaswerk 1:2“ wurden zentral von der RWTH Aachen hergestellt und an die Teilnehmer verschickt. Die Eluate des Bodens „IMA SM 66“ wurden von den Teilnehmern selber hergestellt.

VII - 5 Ergebnisse und Diskussion:

VII - 5.1 Methoden

VII - 5.1.1 Elution der Bodenproben

Die Herstellung der wässrigen Eluate erfolgte nach einer Vorschrift des Fraunhofer Instituts für Umweltchemie und Ökotoxikologie in Schmallenberg (Fraunhofer Institut 1999).

Allerdings wurden einige Änderungen vorgenommen, die wie folgt aussahen:

- Zentrifugation bei 2100 g, aber keine Verwendung einer Ultrazentrifuge
- Keine besondere Kühlung während der Zentrifugation, d. h. Raumtemperatur
- Zeit ca. 30 min.

Diese Änderungen tragen zur Praxisnähe für einen späteren Einsatz des Wasserlinsentests und zur Kostenminimierung bei, da z. B. keine teuren Ultrazentrifugen und entsprechende Gefäße eingesetzt werden.

Ein wichtiger Punkt bei der Elution war die anschließende Filtration. Entgegen der ursprünglichen Vorschrift wurde darauf verzichtet, auch wenn die zentrifugierten Eluate einen Trübungswert > 50 FNU aufwiesen. Versuche mit Bodenproben aus dem Ringtest haben gezeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen filtrierten und unfiltrierten Eluaten bzgl. der Hemmung der Wachstumsrate von Frondanzahl und -fläche gab, wie die nachfolgenden Graphiken zeigen.

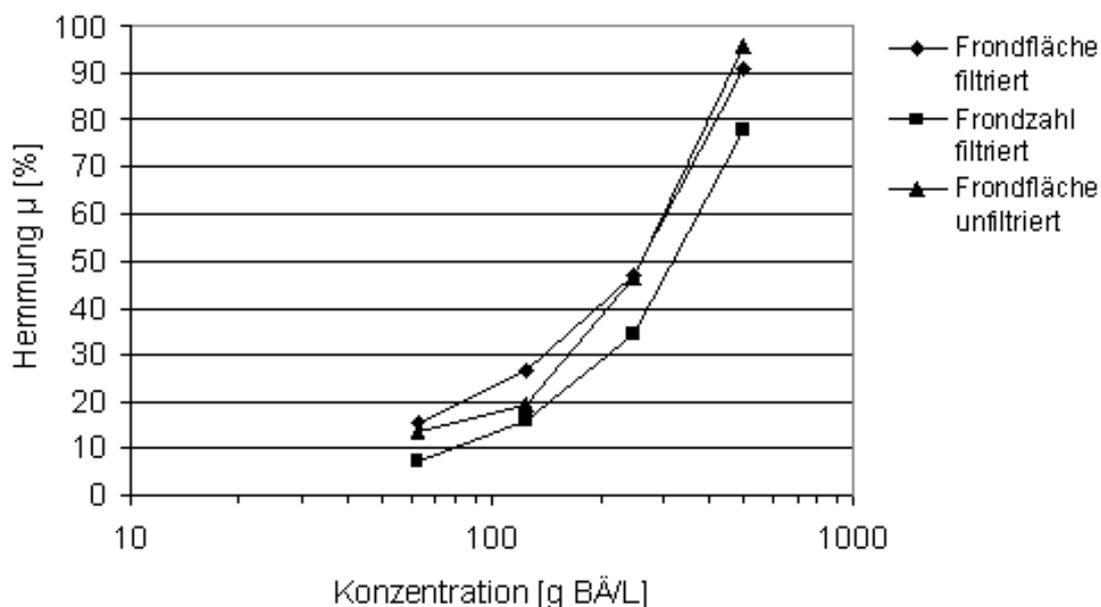


Abbildung VII - 1: Hemmung der Wachstumsrate μ der Frondfläche und der Frondanzahl gegenüber der Kontrolle in Abhängigkeit von der Konzentration des Bodens „Iserlohn“ in einer Verdünnungsreihe mit filtrierten und unfiltrierten Bodeneluates. Die Werte beruhen auf drei Parallelen in den Konzentrationsstufen und fünf Parallelen in der Medienkontrolle.

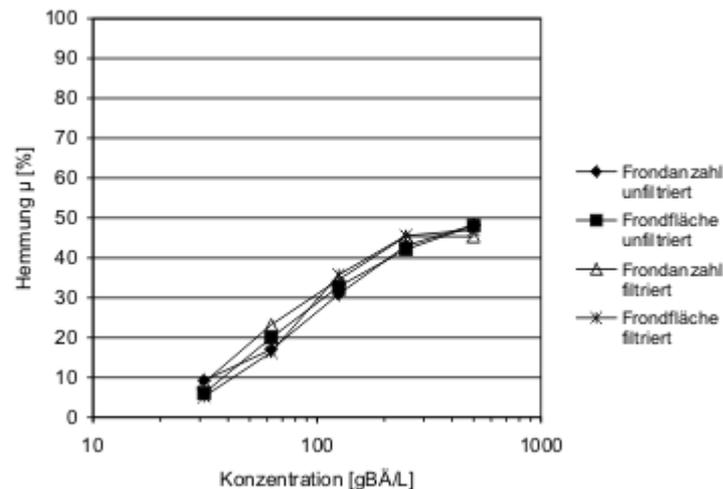


Abbildung VII - 2: Hemmung der Wachstumsrate μ der Frondfläche und der Frondanzahl gegenüber der Kontrolle in Abhängigkeit von der Konzentration des Bodens „Tauchbecken“ in einer Verdünnungsreihe mit filtrierten und unfiltrierten Bodeneluates. Die Werte beruhen auf drei Parallelen in den Konzentrationsstufen und in der Medienkontrolle.
Die Einheit g BÄ (Bodenäquivalent)/L gibt an, wie viel Boden zur Herstellung des entsprechenden Eluates unter Einhaltung der Vorschrift verwendet werden müsste.

Für das Bodeneluat Iserlohn (Abbildung VII - 1) sind die Kurven der Frondfläche der unfiltrierten Testansätze bis auf einen Punkt genau auf der Kurve der filtrierten Ansätze, was zeigt, dass die Filtration der Bodeneluate keinen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum der Wasserlinsen ausübt.

In der Abbildung VII - 2 für den Boden Tauchbecken ist dieser Effekt noch deutlicher zu sehen. Alle vier Kurven liegen dicht aufeinander, so dass kein erkennbarer Unterschied zwischen filtrierten und unfiltrierten Ansätzen zu erkennen ist. Dies ist plausibel, da Pflanzen die Schadstoffe letztendlich über die Wasserphase aufnehmen. Gleichzeitig werden Adsorptionseffekte schlecht wasserlöslicher Schadstoffe am Filter ausgeschlossen und die benötigte Probenvorbereitungszeit drastisch verringert.

Eine stärkere Trübung als die empfohlenen 50 FNU bewirkt keine Änderung des Wachstums der Wasserlinsen, da diese auf der Wasseroberfläche schwimmen und somit nicht durch Verringerung des Lichteinfalls beeinflusst werden, wie es bei dem Algentest der Fall ist. Durch die vorschriftgemäße Verwendung eines schwarzen Untergrundes in der Kulturkammer wird das Reflexionslicht vom Boden für alle Proben gleichermaßen minimiert.

VII - 5.1.2 Licht

In der ISO-Draft wird eine gleichmäßige Beleuchtung mit einer Varianz von $\pm 15\%$ empfohlen (ISO/CD 20079 2001). Versuche mit der Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol und einer $\pm 14\%$ igen Differenz bei der Lichtintensität haben allerdings gezeigt, dass dieser Wert zu hoch ist. Durch eine größere Lichtintensität kommt es zu einer Erhöhung der Hemmung bei gleicher Schadstoffkonzentration! (siehe Abbildung VII - 3).

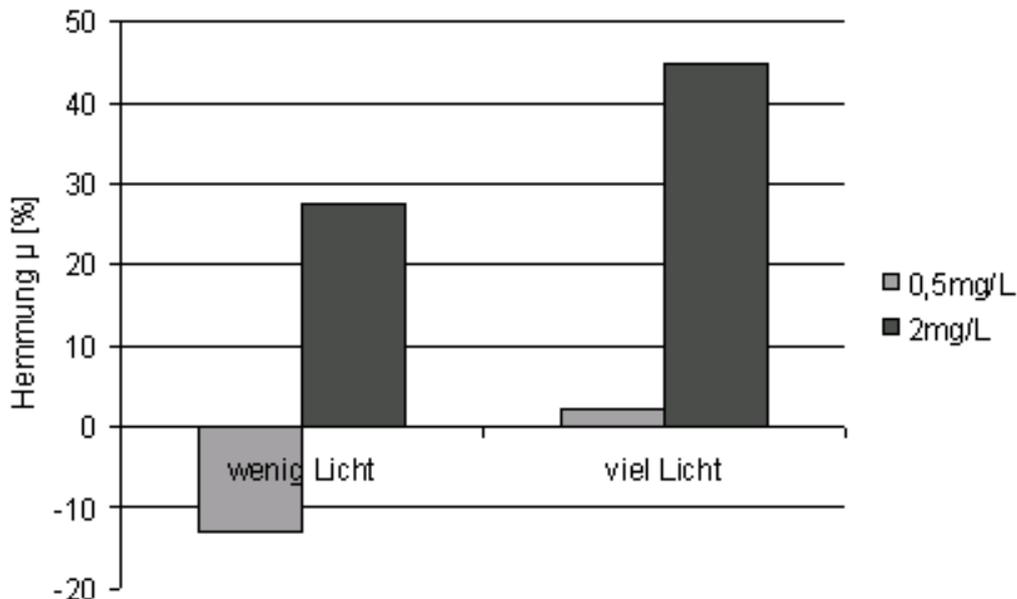


Abbildung VII - 3: Hemmung der mittleren Wachstumsrate (Frondanzahl) im Wasserlinsentest durch 3,5-Dichlorphenol in den Konzentrationen 0,5 und 2 mg/L. Der Test wurde mit viel ($120 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) und wenig Licht ($87 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) durchgeführt. Pro Ansatz gab es drei Parallelen und sechs Kontrollen pro Lichtintensität. Die absolute Wachstumsrate der Kontrollen betragen bei $120 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ $0,436 [\text{d}^{-1}]$ und $87 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ $0,247 [\text{d}^{-1}]$.

Wie man anhand der Abbildung VII - 3 sehen kann, wird die Wachstumsrate, ermittelt aus der Frondanzahl, bei einer Lichtintensität von durchschnittlich $87 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ durch das 3,5-Dichlorphenol leicht gefördert (0,5 mg/L) bzw. zu 28 % (2 mg/L) gehemmt. Dagegen kommt es bei einer Lichtintensität von durchschnittlich $120 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ zu einer weitaus größeren Hemmung, nämlich 2,3 % (0,5 mg/L) bzw. 45 % (2 mg/L). Das bedeutet eine Erhöhung um 17 %! Die Standardabweichungen betragen für die Ansätze bei geringer Lichtintensität 6,23 (0,5 mg/L) bzw. 7,74 (2 mg/L) und für die Ansätze mit mehr Licht 1,95 (0,5 mg/L) bzw. 2,25 (2 mg/L). Ein weiterer Aspekt, der für eine geringere Lichtdifferenz spricht, ist das Wachstum der Kontrollen, die bei $87 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ nicht die geforderte minimale Wachstumsrate von $0,275 [\text{d}^{-1}]$ erreichen (ISO/CD 20079 2001). Als Konsequenz aus diesem Versuch wird eine maximale Abweichung der Lichtintensitäten während eines Tests von $\pm 5\%$ und eine mittlere Lichtintensität von mindestens $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ empfohlen und im Laborvergleich eingesetzt.

VII - 5.1.3 Stark gefärbte Lösungen

Durch die besondere Fähigkeit von Wasserlinsen, auf stark gefärbten oder getrübbten Lösungen wachsen zu können, bietet sich die Testung von Farbstoffen zur Validierung extremer Umweltproben an. Deren Einsatz im Algentest ist beschränkt, da das Wachstum der Algen durch die zunehmende Verringerung der Lichtintensität gehemmt wird. Dieses Problem besteht bei dem Wasserlinsentest nicht. Aus diesem Grund können Farbstoffe in zehnfach höherer Konzentration eingesetzt werden, so dass häufig ein EC_{50} -Wert ermittelt werden kann (Cleuvers, Ratte 1999).

In der folgenden Graphik wird der Unterschied zwischen Tests mit einem blauen Farbstoff auf weißem und schwarzem Untergrund deutlich gemacht.

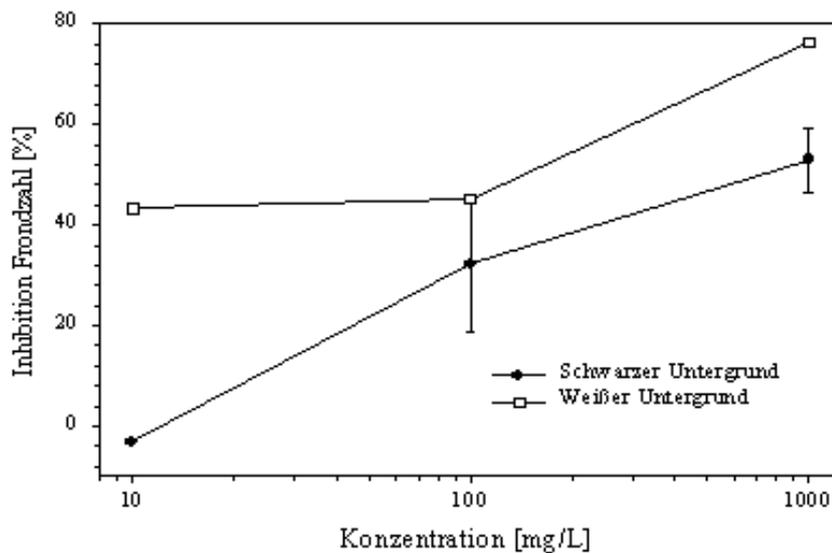


Abbildung VII - 4: Hemmung der Frondanzahl durch einen blauen Farbstoff (Brilliant Blau R Spezial“) und zwei verschiedenen Untergründen. (private Mitteilung)

Ein Wachstum der Wasserlinsen auf weißem Untergrund führt zu einer größeren Hemmung als bei einem schwarzen Untergrund. Bei der kleinsten Konzentration 10 mg/L beträgt dieser Unterschied über 40 %. Er nimmt bei der nächsten Konzentration etwas ab, beträgt aber bei 1000 mg/L immer noch ca. 25 %. Durch die Lichtstreuung erhöht sich offensichtlich die gesamte Lichtintensität pro Testansatz. Dies führt auf weißem Untergrund dazu, dass die Kontrollen besser wachsen und somit die Substanz toxischer erscheint als auf schwarzem Untergrund, weil unter letzteren Bedingungen die Kontrollen weniger gut wachsen, da die Reflektion zum größten Teil ausgeschaltet wird. Diese Ergebnisse bestätigen die sehr wichtige Empfehlung der ISO, die Testgefäße für den Wasserlinsentest bis max. zur

Wasseroberfläche von außen schwarz abzudecken, so dass das Licht nur von oben kommt und eine unkontrollierte Lichtstreuung vermieden wird.

VII - 5.2 Untersuchungen zur Eignung verschiedener Nährmedien

VII - 5.2.1 Vergleich Steinberg – SIS-Medium, Hintergrundwerte

Ziel dieses Versuchsabschnittes war zum einen die Testung des von der ISO empfohlenen Steinberg- und des von der OECD für *Lemna minor* vorgegebenen SIS-Mediums im Hinblick auf den Einsatz im Wasserlinsentest mit Umweltproben (ISO/CD 20079 2001, OECD 1999). Zu klären war, ob für eine Harmonisierung von ISO und OECD das OECD-(SIS)-Medium als Alternative zum Steinbergmedium freigegeben werden kann. Zum anderen sollte der Einfluss von Eluaten unbelasteter Böden auf die Testendpunkte (Hintergrundeffekte) untersucht werden. Als Referenzböden dienten die LUFA-Speyer-Böden 2.1, 2.2 und 2.3. Die nachfolgende Graphik verdeutlicht den Effekt der beiden Medien auf das Wachstum der Wasserlinsen.

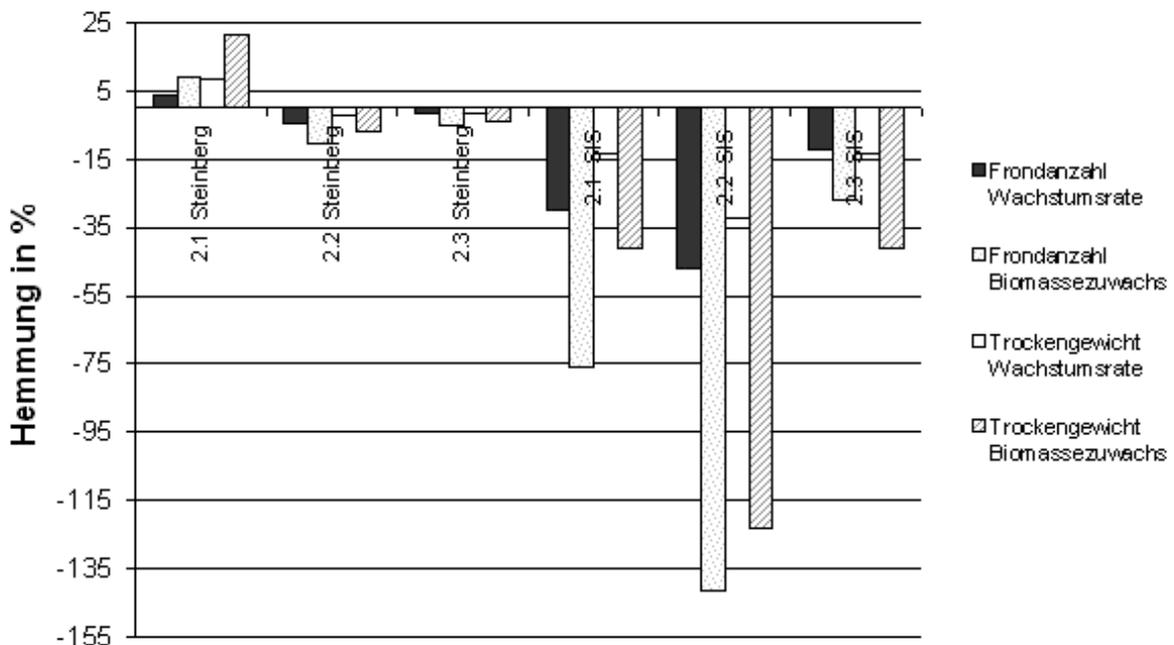


Abbildung VII - 5: Mittelwerte der Wachstumsraten- und Biomassezuwachshemmung der Frondanzahl und des Trockengewichtes der Speyer Böden 2.1, 2.2 und 2.3 im Test mit STEINBERG- und SIS-Medium. Die Werte wurden auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle bezogen.

Das SIS-Medium führt zu einer starken Förderung des Wachstums der Wasserlinsen. Die höchsten Werte weist dabei der Biomassezuwachs der Frondanzahl auf. Deren Förderung geht bis 140 %. Der Biomassezuwachs des Trockengewichtes liegt mit 123 % nur knapp dahinter. Bei den Ansätzen mit den Böden 2.1 und 2.3 erweist sich auch der Biomasse-

zuwachs als der empfindlichere Parameter. Das Steinberg-Medium führt dagegen nur bei den Böden Speyer 2.2. und 2.3. zu leichten Fördereffekten, wobei nur der Biomassezuwachs der Frondanzahl und des Trockengewichtes nennenswerte Förderungen aufweist. Der Boden Speyer 2.1. wird in allen Testendpunkten leicht gehemmt. Den höchsten Wert mit knapp 22 % erreicht der Biomassezuwachs des Trockengewichtes. Die ISO-Grenze von 10 % Hemmung der Wachstumsrate für signifikante Toxizität wurde deutlich unterschritten und die Grenze von 20 % für den Biomassezuwachs nur leicht überschritten.

Das SIS-Medium ist also nicht für die Testung von Bodenproben geeignet, da die Nährstoffe offenbar zu schwach konzentriert sind. Die in den Bodeneluat enthaltenen Nährstoffe stimulieren das Wachstum der Wasserlinsen, wodurch es zu den genannten Effekten kommt. Werden die Nährstoffe so konzentriert zugegeben, wie es beim Steinberg-Medium der Fall ist, fallen die Fördereffekte weitaus geringer aus.

Die geringen Effekte der sehr unterschiedlichen Bodeneluate im Steinbergmedium zeigen, dass im Regelfall kein Referenzboden mitgeführt werden muss. Dies vereinfacht die Testdurchführung und –bewertung stark und macht den Test wesentlich universeller und aussagekräftiger.

VII - 5.2.2 Vergleich Steinberg – SIS-Medium, belastete Bodenproben

Wie im vorigen Kapitel deutlich gemacht wurde, übt das Bodeneluat zusammen mit SIS-Medium einen Fördereffekt auf die Wasserlinsen aus, da im Medium nicht genügend Nährstoffen für ein maximales Wachstum vorhanden sind. In diesem Kapitel soll nun untersucht werden, wie sich der Wasserlinsentest hinsichtlich seiner Empfindlichkeit und Fördereffekten verhält, wenn statt dem ISO (Steinberg)- das OECD (SIS)-Medium eingesetzt wird. In der nachfolgenden Abbildungen werden die Ergebnisse mit den Böden LUFA 2.1, 2.2 und „IMA SM 66“ gezeigt.

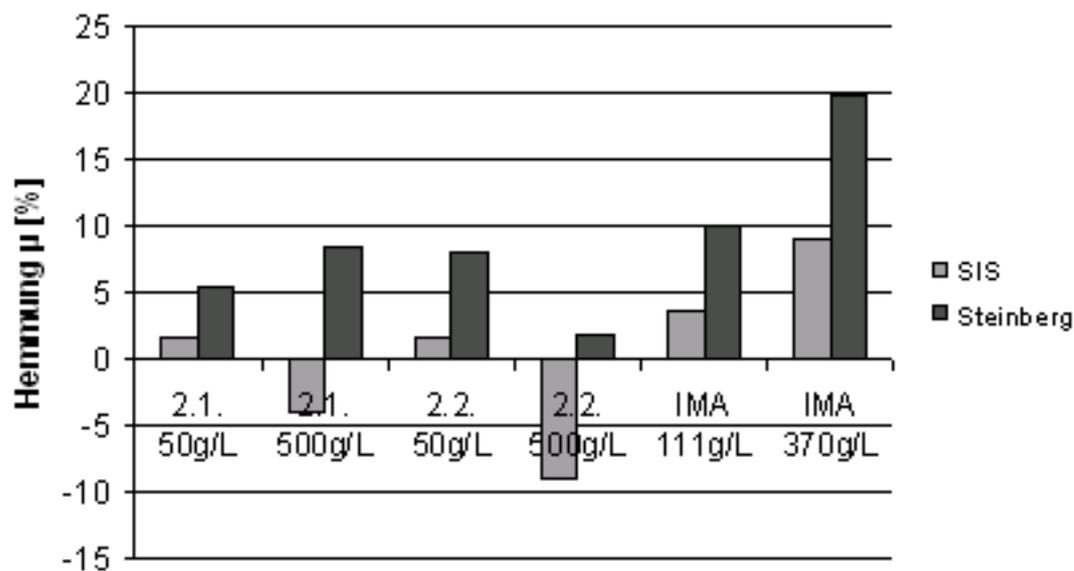


Abbildung VII - 6: Aus der Frondanzahl berechnete Hemmung der Wachstumsrate mit den Medien „SIS“ und „Steinberg“ und den Böden „LUFA 2.1“, „LUFA 2.2“ und „IMA SM 66“ in den Konzentrationen 50 und 500 gBÄ/L (2.1 und 2.2) bzw. 111 und 370 g/L („IMA SM 66“). Die Werte beruhen auf sechs Medienkontrollen und je drei Parallelen.

Einzig die Testansätze mit SIS-Medium und dem Boden „LUFA 2.2“ üben einen geringen Fördereffekt auf die Wasserlinsen aus. Alle anderen Testansätze werden mehr oder weniger stark gehemmt, wobei die Hemmungen mit SIS deutlich geringer ausfallen als mit Steinberg-Medium. Durch die Fördereffekte des von der OECD empfohlenen SIS-Mediums wird die Empfindlichkeit des Wasserlinsentests drastisch gesenkt, so dass es empfehlenswert ist, das Steinberg-Medium zu verwenden.

VII - 5.2.3 Auswirkungen eines Medienwechsels

Dieser Versuch sollte die Empfehlung der OECD, die Wasserlinsen erst 7 – 10 Tage vor Testbeginn in das jeweilige Medium zu setzen, überprüfen.

Dafür wurden die Pflanzen in Steinberg- und SIS-Medium herangezüchtet. Während der Testdauer wurde den Ansätzen dann das jeweils andere Medium zugegeben. Zum Vergleich gab es Ansätze, in denen kein Medienwechsel vorgenommen wurde. Folgende Abbildung zeigt die Hemmung der Wachstumsrate anhand der Frondanzahl, hervorgerufen durch einen Medienwechsel. Als Bezugspunkt wurde der Ansatz mit SIS-Medium gewählt, bei dem kein Wechsel vorgenommen wurde, da diese Variante die kleinste mittlere Wachstumsrate aufweist.

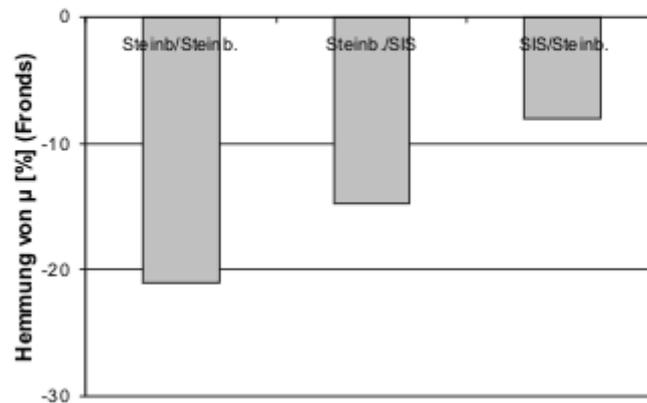


Abbildung VII - 7: Aus der Frondanzahl berechnete Hemmung der Wachstumsrate durch einen Medienwechsel der Kontrollansätze. Der Test wurde 7 Tage lang mit *L. minor* durchgeführt. Pro Ansatz gab es drei Parallelen. Steinberg=ISO-Medium, SIS=OECD-Medium

Die geringste Wachstumsförderung mit 8 % bezogen auf einen reinen SIS/SIS-Ansatz erreicht der SIS/Steinberg-Ansatz. Durch den Wechsel in Steinberg-Medium beginnt die Wachstumsgeschwindigkeit zu steigen, erreicht aber lange nicht die Steinberg-Werte. Werden die Wasserlinsen vom Steinberg- in das SIS-Medium überführt, dann wird das Pflanzenwachstum zwar auch stimuliert, aber geringer (14 %) als bei dem reinen Steinberg-Ansatz. Dies liegt daran, dass die Wasserlinsen nach der Umsetzung eine zeitlang auf ihre Nährstoffreserven zurückgreifen können, aber nicht endgültig an die dauerhaft mögliche Wachstumsrate in Steinberg-Medium heranreichen. Mit 21 % Förderung weist der Ansatz mit Steinberg-Medium die größte Förderung relativ zum SIS/SIS-Ansatz auf. Diese Effekte verdeutlichen, dass ein Mediumwechsel 7-10 Tage vor Testbeginn zu kurz ist, da in dieser Zeit noch Wachstumsverzögerungen auftreten können. Als Konsequenz schlägt die ISO nun ein Mediumwechsel 3 Wochen vor Testbeginn vor.

VII - 5.2.4 Optimierung des Steinberg-Mediums

Auch wenn das Steinberg-Medium besser für die Testung von Bodeneluaten geeignet ist als das SIS-Medium, wurden einige Parameter verändert, um evtl. eine verbesserte Nährstoffversorgung und Stabilisierung des Testsystems zu erreichen, aber v.a. sollten Förderungseffekte durch Bodeneluatete noch stärker minimiert werden.

Dafür wurden die Eisen- und EDTA-Mengen (Verbesserung der Eisenversorgung) erhöht, zusätzlich die Pufferkonzentration (geringer pH-Anstieg) und die Magnesium- und Calciumkonzentration. Mit Hilfe der nächsten Abbildung sollen die Auswirkungen der verschiedenen Medienvarianten dargestellt werden.

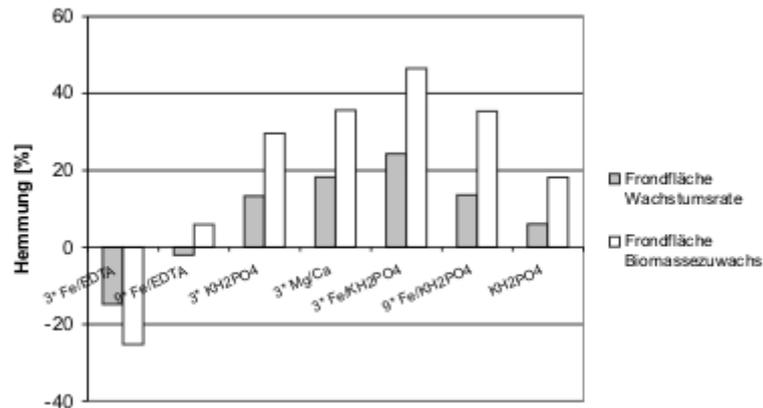


Abbildung VII - 8: Auswirkungen der verschiedenen Medienvarianten auf Kontrollansätze von *L. minor* in einem 7tägigen Wasserlinsentest. Dargestellt sind die Hemmungen des Biomassezuwachses der Fronfläche. Getestet wurden jeweils drei Parallelen.

Während fast alle Versuchsansätze eine Hemmung des Wasserlinsenwachstums hervorrufen, führt lediglich die Erhöhung des Eisen- und EDTA-Gehaltes um ein dreifaches zu einem besseren Wachstum der Wasserlinsen. Der Biomassezuwachs der Fronfläche nimmt dabei um 25 % zu, die Wachstumsrate der Fronfläche um 15 %.

Eine weitere Überlegung befasste sich mit dem Einfluss einiger Spurenelemente auf die Fördereffekte unbelasteter Böden (Taraldsen, Norberg-King 1989). Dabei sollte der Frage nachgegangen werden, ob durch die Bodeneluat zusätzlich Spurenelemente zur Verfügung gestellt werden oder ob sie eine bessere Bioverfügbarkeit der Spurenelemente im Steinberg-Medium bewirken. Aus diesem Grund wurde dem Steinberg-Medium Kupfer und Kobalt zugesetzt, da diese beiden Substanzen dem Steinberg-Medium generell fehlen, und zwar in der Konzentration, wie sie für das SIS-Medium vorgeschrieben ist. Trotz Erhöhung der Parallelansätze und einer weitestgehenden Angleichung der Lichtverhältnisse konnten keine signifikanten Verbesserung gemessen werden.

Das Steinberg-Medium ist auf der Basis der durchgeführten Versuche als optimal zu bezeichnen. Eine Erhöhung des EDTA-Gehaltes ist nicht sinnvoll, da sie zu einer Maskierung von Schwermetallen führen kann.

VII - 5.2.5 pH-Wert

Wasserlinsen können zwar in einem breiten pH-Bereich wachsen, doch ist ihre Adaptionfähigkeit nicht beliebig schnell, so dass es zu Artefakten kommen kann. Eine Überlegung des DIN/ISO-Arbeitskreises war, den pH-Wert aller Testlösungen (einschließlich Kontrolle) vor Testbeginn auf den des Eluates einzustellen, um ein zu hohes Ansteigen während des Tests zu verhindern. Im folgenden Versuch wurden daher die Kontrollen und die Testansätze auf pH 6 und 7 eingestellt. Die Vorkulturen wurden im entsprechenden Medium und pH-Wert herangezüchtet.

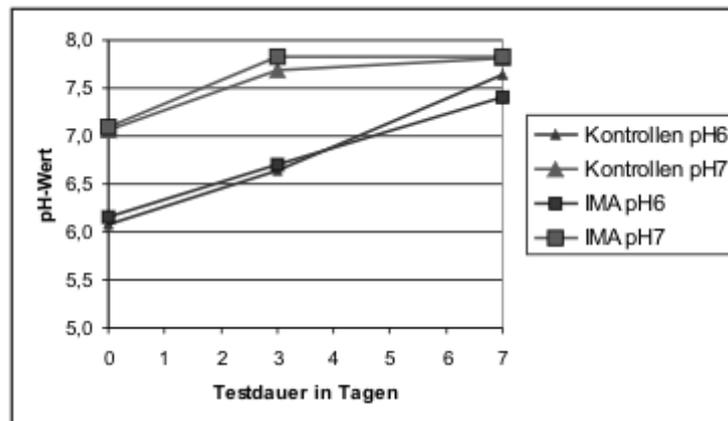


Abbildung VII - 9: Verlauf des pH-Wertes über 7 Tage in einem Wasserlinsentest mit je drei Medienkontrollen (Steinberg-Medium) und je drei Parallelen des Bodens „IMA SM 66“ in der Konzentration 370 g/L. Der pH-Wert wurde mit konz. NaOH eingestellt.

Der pH-Wert-Verlauf der Testansätze mit pH 6 verlaufen nahezu linear. Nach 7 Tagen ist der pH-Wert auf durchschnittlich 7,5 angestiegen. Die Versuchsansätze mit dem Start-pH-Wert 7 steigen bis zum 3. Tag stark an, verlaufen dann aber fast parallel zur x-Achse. Am Testende erreichen sie einen pH-Wert von 7,8, liegen also im Bereich der Testansätze mit pH 6. Wie sich nun die pH-Wert-Einstellung auf das Wachstum der Wasserlinsen auswirkt, wird in der nächsten Graphik deutlich.

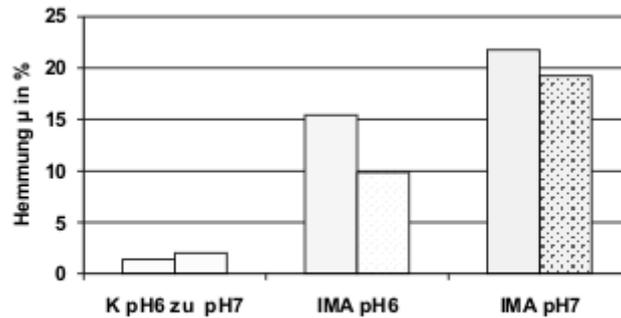


Abbildung VII - 10: Hemmung der mittleren Wachstumsrate μ der Frondanzahl und der Frondflächen. Pro Testvariante gab es drei Parallelen. Die rechten Säulen stellen jeweils die Hemmung der Frondanzahl, die linken Säulen die der Flächen dar. K bezeichnet die Kontrolle.

Die Hemmung der Ansätze mit „IMA SM 66“ wurden gegen die Kontrolle pH 7 berechnet. Während die Kontrollen kaum eine Hemmung aufwiesen, wurden die Eluatansätze max. zu 22 % gehemmt. Die Hemmungen der pH6-Ansätze liegen bei 15 % (Fläche) bzw. 10 % (Anzahl). Die Testansätze mit pH 7 weisen dagegen eine höhere Hemmung auf, obwohl gerade die pH-Voreinstellung die pH-Wert-Erhöhung vermeiden sollte. Die Hemmungen betragen 22 % für die Fläche und 19 % für die Frondanzahl. Obwohl die Wasserlinsen mit pH 7 stärker gehemmt werden als bei pH 6, erreichen sie trotzdem die gleichen Flächenwerte, wie die nächsten beiden Graphiken verdeutlichen.

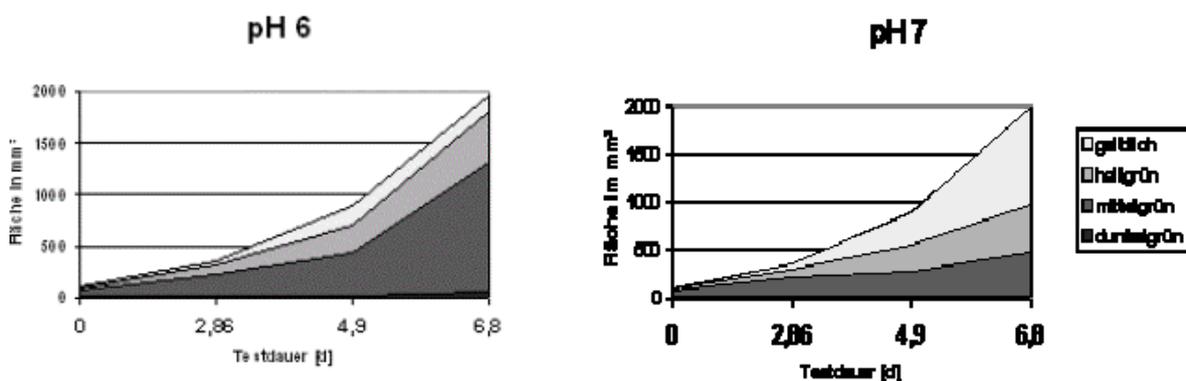


Abbildung VII - 11: Flächenzunahme und Farbklassenanteile der Kontrollen bei pH 6 und pH 7.

In der Abbildung VII - 11 wird deutlich, dass die Wasserlinsen der Kontrollen bei pH 7 zwar die gleiche endgültige Fläche erreichen wie die Kontrollen bei pH 6, trotz der in Abbildung VII - 10 gezeigten Hemmung, aber die Farbklassenverteilung macht deutlich, dass der Großteil der Fronds geschädigt ist. Der chlorotische Anteil macht fast die Hälfte der gesamten Fläche aus. Mit Hilfe dieses Versuches wird die Empfehlung, das Steinberg-Medium nicht zu

verändern und auch keine pH-Wert-Änderungen vorzunehmen, bekräftigt. Sollte es beim Einsatz von Bodeneluaten mit einem pH-Wert > 7 dennoch zu Problemen kommen, dann empfiehlt es sich, die Eluate auf einen pH-Wert zwischen 5 und 7 einzustellen. Dadurch wird auch ein Anstieg des pH-Wertes über 9 während des Testverlaufs verhindert. Der niedrigere pH-Wert minimiert auch die Gefahr eines Algenbefalls.

VII - 5.3 Untersuchungen zur Phytotoxizität ausgewählter Reinstoffe

VII - 5.3.1 Kaliumdichromat

Kaliumdichromat ist eine häufig eingesetzte Referenzchemikalie im Wasserlinsentest und von der OECD empfohlen. Die in Vorversuchen ermittelten EC-Werte (μ , Frondanzahl) liegen bei $EC_{20} = 0,5 \text{ mg/L}$, $EC_{50} = 1 \text{ mg/L}$ und $EC_{80} = 6,5 \text{ mg/L}$. Diese Werte wurden übernommen und in einem Versuch ohne Eluate eingesetzt, in dem evtl. Effekte durch die Reduzierung des Testvolumens von 200 mL auf 100 mL beobachtet werden sollten. Da es aber zu keinen signifikanten Unterschieden kam, wurde für die weiteren Versuche ein Testvolumen von 150 mL gewählt. Somit liegt man noch oberhalb des von der ISO empfohlenen Volumens von 100 mL.

Die hemmende Wirkung des Kaliumdichromats beruht höchstwahrscheinlich auf dem Chromat-Ion, welches ein starkes Oxidationsmittel ist. Allerdings ist der genaue Mechanismus bis heute unbekannt.

Im Gegensatz zu 3,5-Dichlorphenol (s. u.) weist das Kaliumdichromat eine extrem flache Konzentrations-Wirkungsbeziehung über 2 - 3 Größenordnungen auf, was typisch für unspezifisch wirkende Schadstoffe ist. Alte Fronds werden genauso geschädigt wie junge Fronds. Als Referenzchemikalie ist Kaliumdichromat deshalb nicht empfehlenswert. Eine Aufdotierung von Tests mit Bodeneluaten ist unsinnig, da das Chromat mit organischen Substanzen stark reagieren kann.

VII - 5.3.2 3,5-Dichlorphenol

Neben Kaliumdichromat ist das 3,5-Dichlorphenol die zweite Referenzchemikalie im Wasserlinsentest.

Die folgende Abbildung zeigt die Hemmung der Wachstumsrate der Frondfläche durch 3,5-DCP.

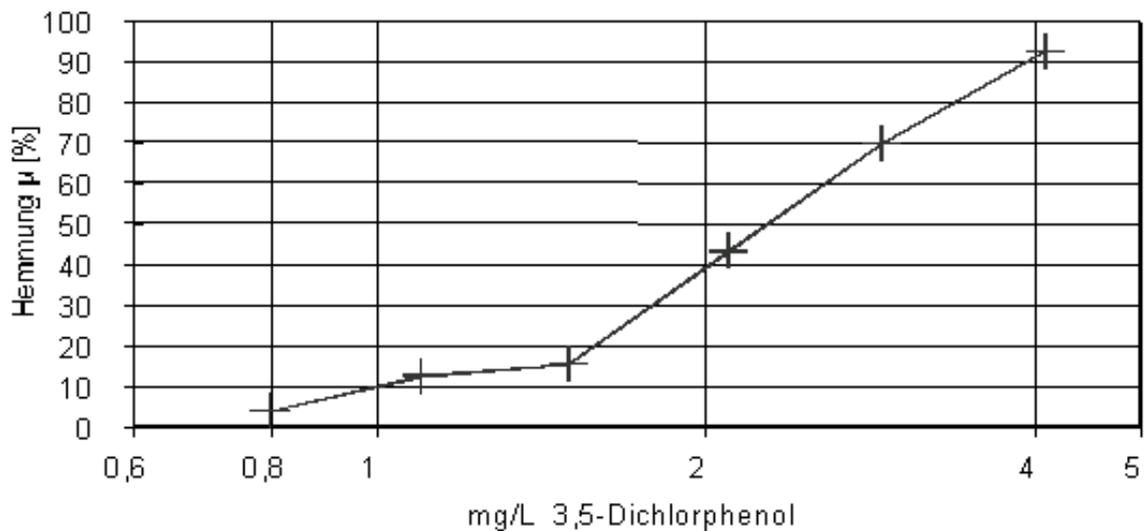


Abbildung VII - 12: Hemmung der Wachstumsrate der Frondfläche durch 3,5-Dichlorphenol in sechs Konzentrationen. Als Kontrolle dienten sechs Medienansätze und pro Konzentrationsstufe gab es drei Parallelen. Die mittlere Wachstumsrate der Kontrollen beträgt $0,382 \text{ [d}^{-1}\text{]}$.

3,5-Dichlorphenol hemmt das Wachstum der Wasserlinsen bis zu knapp 95 % in der höchsten Konzentrationsstufe (4 mg/L). Durch die steile Dosis-Wirkungs-Beziehung eignet sich das 3,5-DCP gut als Referenzsubstanz im Wasserlinsentest. Eine Aufdotierung von Eluatansätzen mit 3,5-DCP ist nicht sinnvoll, da die Hemmung geringer ausfallen kann als in Wasseransätzen (siehe nächste Abbildung).

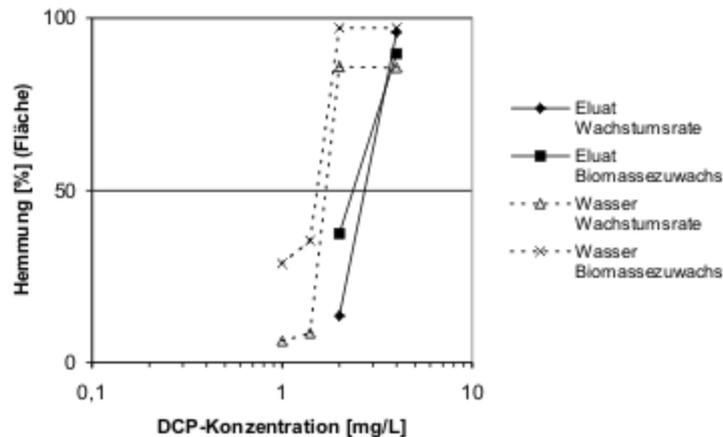


Abbildung VII - 13: Hemmung der Wachstumsrate und des Biomassezuwachses anhand der Frondfläche durch 3,5-Dichlorphenol in Eluat- und Wasseransätzen. Als Kontrollen dienten jeweils zwei Medien- und Eluatkontrollen. Pro Ansatz gab es zwei Parallelen.

Obwohl in der obigen Graphik die Konzentrationsspanne ungünstig ausgefallen ist, kann man deutlich erkennen, dass der EC_{50} -Wert in den Eluatansätzen bei höheren Konzentrationen liegt als bei den Wasseransätzen. Eine Möglichkeit für die geringere Toxizität in Testansätzen mit Bodeneluat könnte eine Detoxifizierung des 3,5-DCPs sein. Der genaue Mechanismus ist allerdings unbekannt.

VII - 5.4 Untersuchungen zur Phytotoxizität ausgewählter Schadstoffgruppen

Versuche mit repräsentativen Vertretern verschiedener Schadstoffgruppen sollen die Empfindlichkeit des Wasserlinsentests besonders gegenüber organischen Schadstoffen untersuchen, die in Altlasten relevant sind.

VII - 5.4.1 PAK

Versuche mit den PAK Phenanthren, Anthracen, Pyren und Fluoranthen sollten das Verhalten dieser wichtigen Stoffklasse im Wasserlinsentest verdeutlichen.

Aufgrund ihrer geringen Wasserlöslichkeit liegen sie im Boden adsorbiert an Partikeln vor, wodurch sie für Pflanzen nicht akut toxisch sind. Ihr Einsatz im Wasserlinsentest mit wässrigen Eluaten wird dadurch deutlich erschwert. Als Lösungsmittel hat sich DMSO bewährt, da es mit den PAK eine Suspension bildet, die eine bessere Verteilung der PAK im Testmedium bewirkt als z.B. Aceton, welches zu einer Plauebildung auf der Wasseroberfläche führt. Die folgende Abbildung zeigt die durch vier verschiedene PAK verursachte Hemmung im Wasserlinsentest.

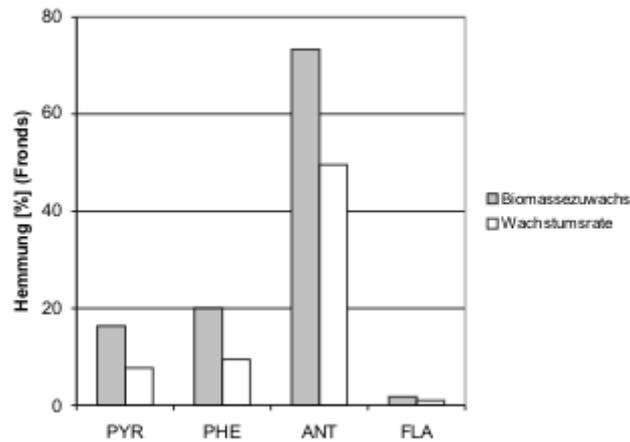


Abbildung VII - 14: Hemmung der Wachstumsrate und des Biomassezuwachses, berechnet aus der Frondanzahl, durch in DMSO (0,1 % v/v) gelöste Pyren (PYR), Phenanthren (PHE), Anthracen (ANT) und Fluoranthren (FLA) in der Konzentration 5 mg/L. Die Werte beruhen auf zwei Medienkontrollen und zwei Lösungsmittelkontrollen.

Wie man sieht, übt Anthracen trotz der geringsten Wasserlöslichkeit die stärkste Hemmung auf die Wachstumsrate (50 %) und den Biomassezuwachs (73 %), ermittelt aus der Frondanzahl, aus. Pyren und Phenanthren erzeugen in etwa die gleiche Hemmung (max. 20 %). Die geringste Toxizität übt Fluoranthren auf die Wasserlinsen aus. Es erreicht gerade mal eine Hemmung von 1 - 2 %, was aber noch im Bereich der Standardabweichung (4 % für μ , 9 % für den Biomassezuwachs) liegt, so dass nicht von einem Effekt ausgegangen werden kann.

VII - 5.4.2 Mineralölkohlenwasserstoffe

Diesel und Normalbenzin sind die am meisten verwendeten technischen Produkte aus Mineralölkohlenwasserstoffen (MKW). Sie treten deshalb häufig in Altlasten auf. In den nachfolgenden Versuchen sollte die Wirkung von Diesel-Kraftstoff und bleifreiem Normalbenzin auf das Wachstum der Wasserlinsen untersucht werden.

VII - 5.4.2.1 Diesel

In diesem Versuch sollte geklärt werden, wie sich Diesel-Kraftstoff auf das Wachstum und die Färbung von Wasserlinsen auswirkt. Die folgende Graphik zeigt die absolute Fläche und die Farbklassenanteile der Fronds nach sieben Tagen in den Konzentrationen 1,875 mg/L bis 120 mg/L.

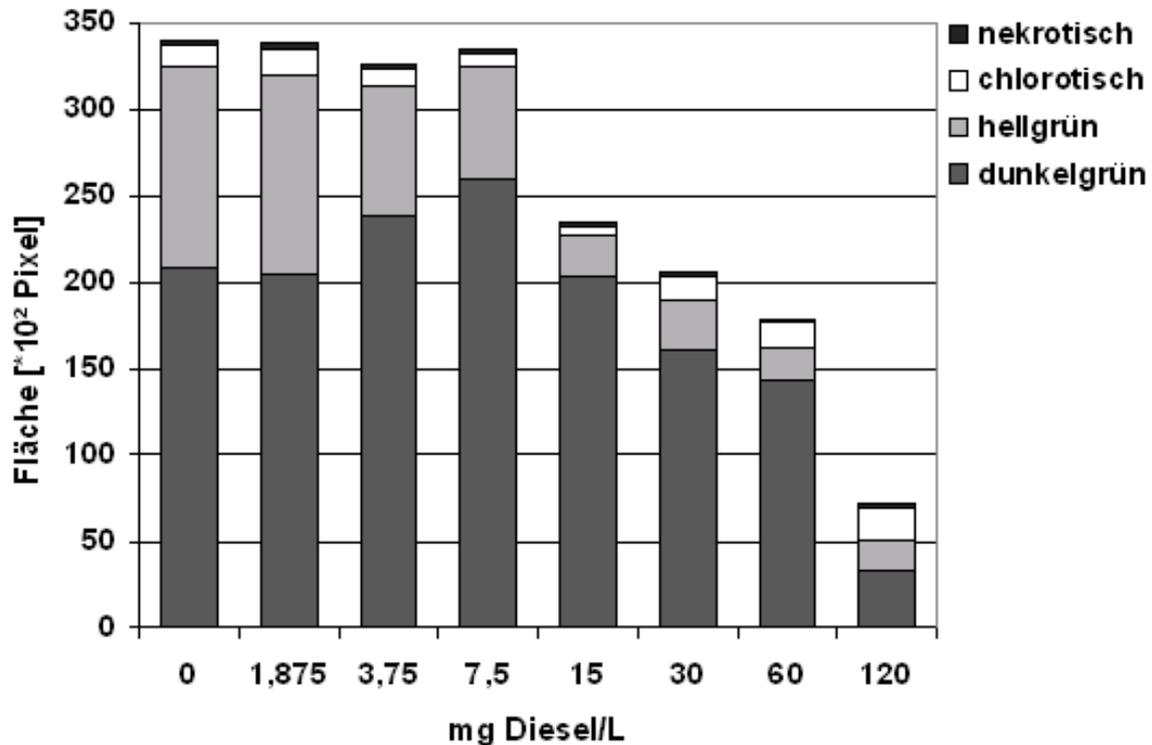


Abbildung VII - 15: Absolute Fläche und Farbklassenanteile nach sieben Testtagen Wachstum der Wasserlinsen. Die Werte beruhen auf sieben Kontrollen und drei Parallelen pro Konzentrationsstufe.

Diesel übt schon in geringen Konzentrationen eine Wirkung auf die Wasserlinsen aus. Ab 15 mg/L verursacht es eine deutliche Reduktion der Frondfläche. Des Weiteren sind Chlorosen und Nekrosen zu beobachten. Außerdem kommt es schon bei Konzentrationen von 3,75 mg/L zu einer erhöhten Chlorophyllproduktion pro Frond, was sich durch eine Vergrößerung der dunkelgrünen Frondbereiche bemerkbar macht.

Dieser Test zeigt, dass auch freie MKW-Konzentrationen, die nur einen Bruchteil der in sanierten Böden zulässigen MKW-Gesamtkonzentration (LAGA 300 mg/Kg) betragen, Wirkungen auf höhere Pflanzen zeigen und nachweisbar sind.

VII - 5.4.2.2 Normalbenzin

In diesem Versuch sollte nicht nur die Toxizität von Normalbenzin im Wasserlinsentest untersucht werden, sondern auch, ob der Einsatz einer luftdurchlässigen, klaren Spezialfolie der Firma In Vitro Systems die Verdunstung des Kraftstoffs und somit eine mögliche Toxizität verringern kann. Die folgende Abbildung zeigt den Vergleich von offenen und abgedeckten Testgefäßen.

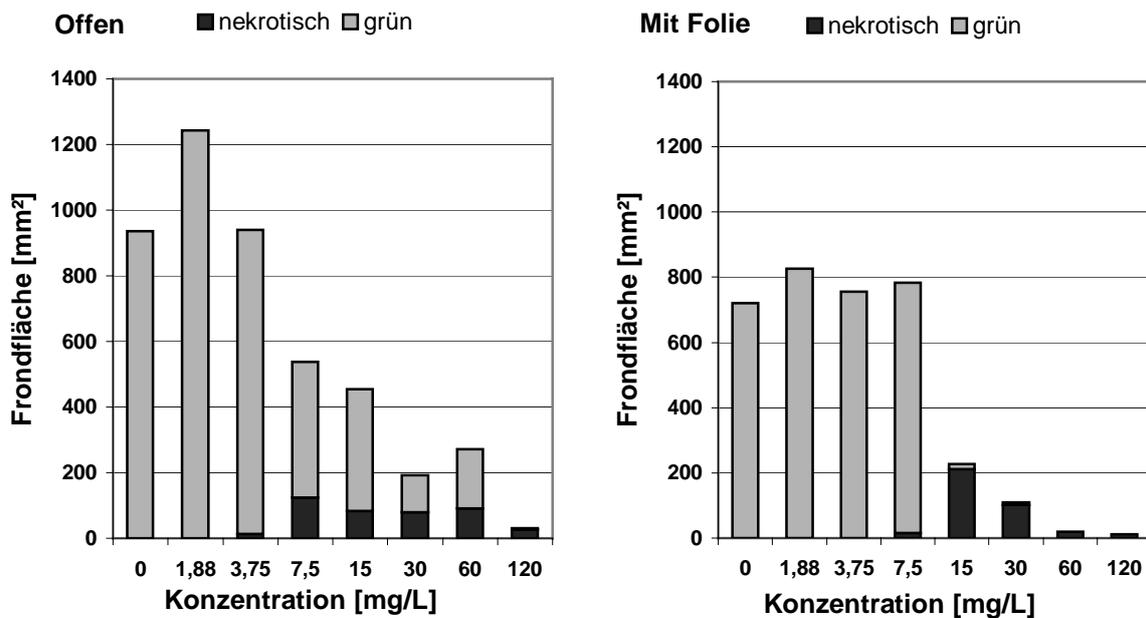


Abbildung VII - 16: Absolute Fronfläche und Farbklassenanteile nach sieben Tagen. Die rechte Graphik zeigt die offene Testreihe, die linke Graphik gibt die Fronflächen der mit Folie verschlossenen Testansätze wieder. Die Konzentrationsstufen wurden ohne Parallelen getestet, die Medienkontrollen beinhalteten zwei Parallelen.

Obwohl Benzin einen höheren Dampfdruck als Diesel besitzt, führt es schon bei geringeren Konzentrationen zu einer Reduktion der Fronfläche. Bis auf die Konzentration 7,5 mg/L weisen die Pflanzen in den offenen Kulturgefäßen stets die größere Gesamtfläche auf. Die ersten nekrotischen Flächen treten in der offenen Testserie bei einer Konzentration von 3,75 mg/L, bei der mit Folie bedeckten Testreihe bei einer Konzentration von 7,5 mg/L auf. Während in den bedeckten Testansätzen der Übergang von grünen und nekrotischen Fronds von einer Konzentration zur nächsten stattfindet, vollzieht sich dieser Prozess bei den offenen Testgefäßen über mehrere Konzentrationen. Bis 60 mg/L sind über 50 % der Fronfläche grün. In der höchsten Konzentration, 120 mg/L, sind dann alle Fronds nekrotisch. In geringen Konzentrationen führt Benzin, wie einige andere organische Substanzen auch, zu einer Wachstumsförderung.

Dieser Test zeigt, dass auch flüchtige Bestandteile wie Benzin empfindlich detektierbar sind und dass das Verschließen der Kulturgefäße zu erniedrigten CO₂-Konzentrationen führen kann, die aber keinen massiven Einfluss auf die Toxizität haben müssen.

VII - 5.4.3 Nitroaromaten

In diesem Versuch sollten Substanzen getestet werden, die als mögliche Neben- und Abbauprodukte von TNT in Böden realer Altlastenflächen nachgewiesen werden. Die Konzentrationen wurden so gewählt, wie sie auch in Bodeneluatn kontaminierter Böden vorkommen. Somit kann dieser Versuch Auskunft über die Bedeutung der getesteten Substanzen für die Phytotoxizität belasteter Böden geben.

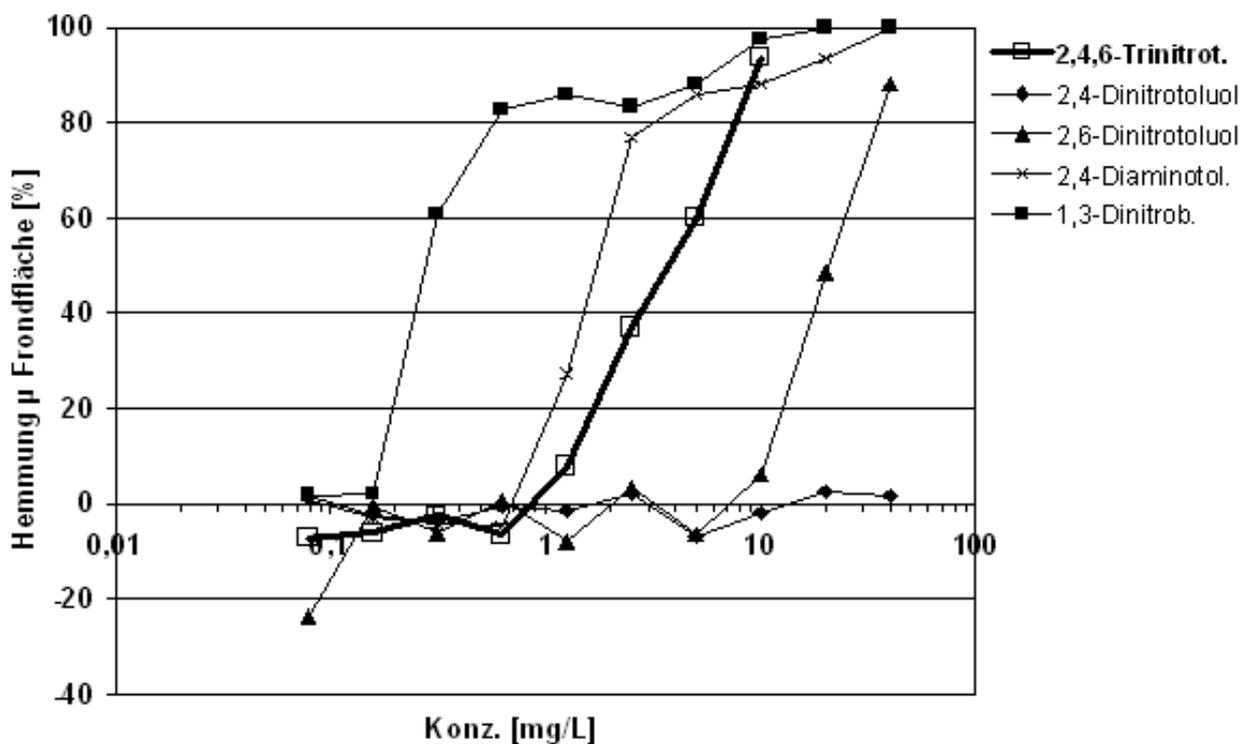


Abbildung VII - 17: Gegenüberstellung der Hemmung der Wachstumsraten der Frondfläche durch 2,4,6-Trinitrotoluol und durch die in dieser Arbeit untersuchten Neben- und Abbauprodukte 2,4-Dinitrotoluol, 2,6-Dinitrotoluol, 2,4-Diaminotoluol und 1,3-Dinitrobenzol.

Drei der getesteten Nitroaromaten können mit Hilfe des Wasserlinsentests bereits in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Am empfindlichsten reagieren Wasserlinsen auf 1,3-Dinitrobenzol. Da Eluate kontaminierter Böden bis zu 40 mg/L dieser Substanz enthalten können, ist es mit dem Wasserlinsentest möglich, auch geringe Belastungen mit Nitroaromaten in altlastenverdächtigen Böden nachzuweisen. Für die Leitsubstanz 2,4,6-Trinitrotoluol liegt der EC₂₀-Wert um den Faktor 10 höher, was ein gutes Beispiel dafür ist, dass Neben- und Abbauprodukte stärkere ökotoxikologische Effekte bewirken können, als

die eigentliche Hauptkontaminante. Somit sind Biotests unverzichtbar, wenn es darum geht, alle in einer Bodenprobe enthaltenen Substanzen zu bewerten, da es unmöglich ist, alleine mit chemischer Analytik alle Konzentrationen von Neben- und Abbauprodukten zu bestimmen.

Ein interessanter Aspekt besteht in der unterschiedlichen Wirksamkeit von Isomeren. 2,4-Dinitrotoluol verursacht bis zu einer Konzentration von 40 mg/L keinerlei Hemmung der Wachstumsrate, während die Wasserlinsen durch die entsprechende Konzentration von 2,6-Dinitrotoluol fast vollständig geschädigt werden. 2,4-Aminotoluol ist für Wasserlinsen toxischer als TNT.

Im Bereich der Sprengstoffaltlasten weisen die Versuche eine hohe Aussagekraft für den Wasserlinsentest auf, da die Gemische eine Vielzahl phytotoxischer Nitro-Verbindungen enthalten können.

VII - 5.4.3.1 2,4,6-Trinitrotoluol

In diesem Versuch sollte eine komplette Dosis-Wirkungsbeziehung des Reinstoffes 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) aufgenommen werden, um die Empfindlichkeit des Wasserlinsentests gegenüber dieser Leitsubstanz in Rüstungsaltposten zu ermitteln.

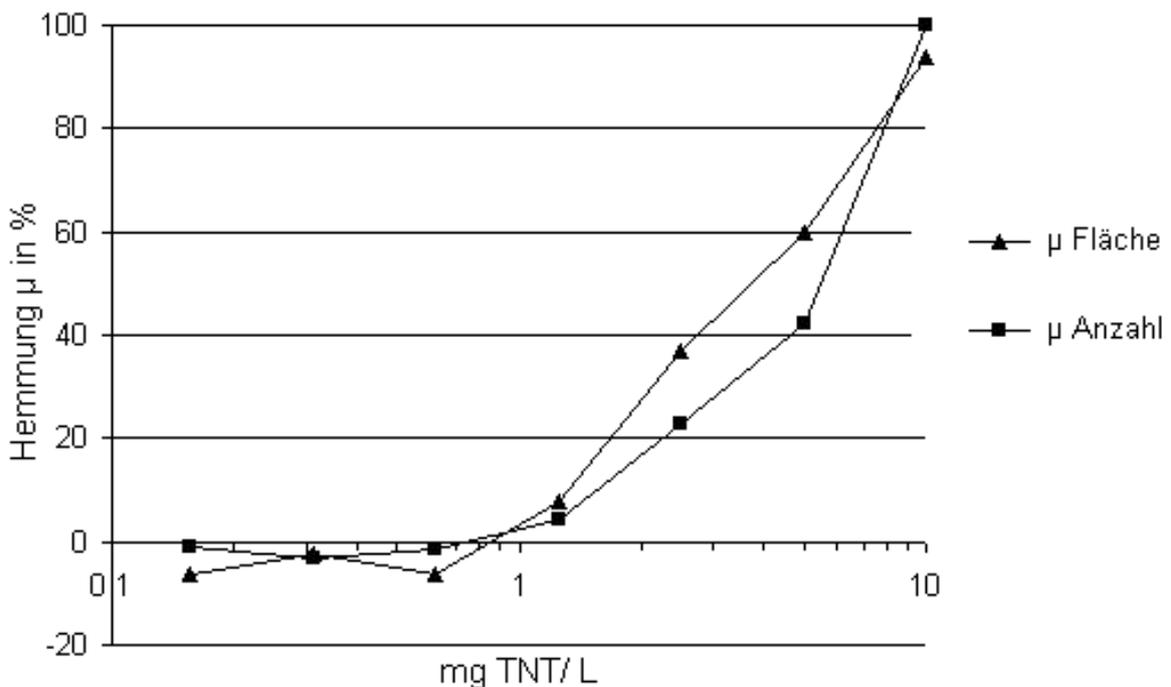


Abbildung VII - 18: Hemmung der Wachstumsrate der Frondfläche und der Frondzahl gegenüber der mittleren Wachstumsrate der DMSO-Kontrolle in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Werte beruhen auf drei Parallelen pro Konzentrationsstufe und sieben DMSO-Kontrollen. Zur Bewertung der DMSO-Kontrollen wurden zusätzlich sechs Kontrollen mit reinem Medium mitgeführt.

Die genannten Hemmwerte beziehen sich auf die DMSO-Kontrolle, weil das TNT in 150 µL DMSO gelöst vorgegeben wurde.

Der EC_{10} -Wert der Wachstumsrate für die Anzahl und Fläche der Fronds beträgt 1,5 mg/L ($EC_{50} = 3,5$ mg/L).

Bei der Testung von TNT im Wasserlinsentest trat ein besonderes Phänomen auf. Die Kolonien in den Testansätzen mit 2,5 mg/L zeigten ab dem 3. Versuchstag eine starke Aufwölbung, wobei die Mitte der Kolonie aus dem Medium herausgehoben wird, während die Ränder in das Medium eintauchen. Dieser Effekt sollte in den folgenden Versuchen mit belasteten Böden noch häufiger auftreten.

VII - 5.5 Untersuchung von Auswahlböden für Laborvergleich und Ringtest

Insgesamt wurden 14 potentiell belastete Böden und 3 sicher unbelastete Böden untersucht um einen praxisrelevanten und sicheren Überblick über die möglichen Kontaminationen und Bodenarten zu erhalten. Im Kapitel VII - 5.5 werden nur für 2 Böden die Dosis Wirkungskurven exemplarisch dargestellt. Insgesamt wurden für alle 8 Böden des Laborvergleiches in der Biologie V nach den in Abschnitt VII - 5.9 festgelegten Kriterien die Toxizität bzw. Auffälligkeit ermittelt. Da diese Böden weitaus überproportional hochbelastete Böden enthielten, die extrem toxisch auf das empfindliche Wasserlinsensystem wirkten, erschien es nicht sinnvoll und auch nicht dem Zeitrahmen entsprechend, im Laborvergleich alle 8 Böden einzusetzen. Von höchster Wichtigkeit waren die umfassenden Untersuchungen für die Differenzierung der unbelasteten und belasteten Böden und die Festlegung der Bewertungsschwelle gerade unter Berücksichtigung der niedrig belasteten Böden, die von der IUCT im ersten Projektjahr zusätzlich zur Verfügung gestellt worden waren (siehe Abschnitte VII - 5.8, VII - 5.9 und VII - 5.10).

Besonders hingewiesen sei an dieser Stelle auf den Boden „Celle“, der auch außerhalb der Ringtestböden nach chemischer Analytik als zusätzlicher Verdünnungsboden verteilt wurde. Sein Eluat stellte sich im Wasserlinsentest als stark phytotoxisch heraus, was im Pflanzenaufwuchstest bestätigt wurde.

VII - 5.5.1 Boden „PAK-Mix“

Als Beispiel für mit PAK-kontaminierten Böden soll der Versuch „PAK-Mix“ dargestellt werden.

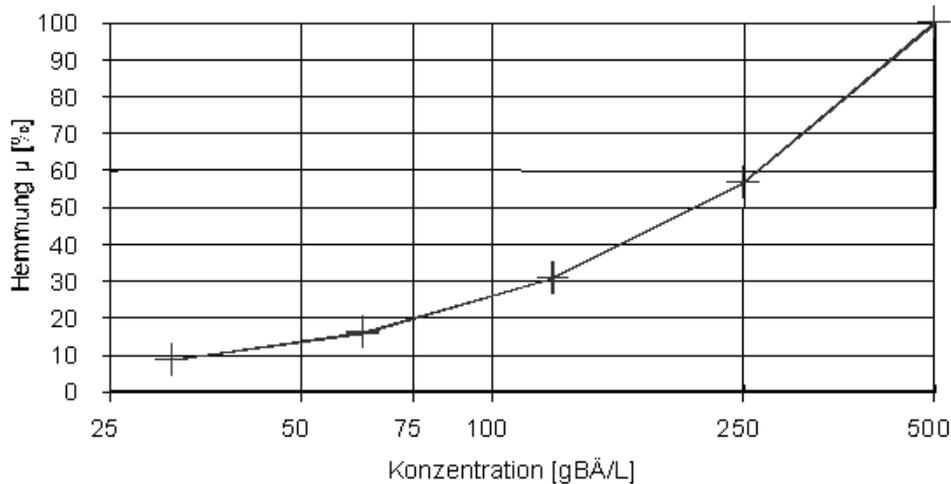


Abbildung VII - 19: Hemmung der Wachstumsrate der Frondanzahl durch den Boden „PAK-Mix“. Der Konzentrationsbereich geht von 31,25 bis 500 g Bodenäquivalent/L (entspr. 6,26 % 100 % Eluat). Die Werte beruhen auf sechs Medienkontrollen und je drei Parallelen.

Auch wenn für diesen Boden keine Analysenwerte vorliegen, so kann man aufgrund der Hemmkurve von einer hohen Schadstoff-Konzentration ausgehen, da in einem Konzentrationsbereich von 31,25 bis 500 g BÄ/L eine komplette Dosis-Wirkungsbeziehung gegeben ist. In der höchstmöglichen Konzentration (entspricht 900 mL/L) werden die Wasserlinsen zu 100 % gehemmt. Der ED₅₀-Wert liegt bei 182,9 g BÄ/L, der ED₂₀ bei 90,2 g BÄ/L und der ED₁₀ bei 62,2 g BÄ/L. Wenn es um Verdünnungen von Lösungen geht, wird im weiteren Text von ED (Effect Dilution) Werten gesprochen, um diese von EC-Werten der Reinstoffe abzugrenzen.

VII - 5.5.2 Boden „Clausthal“

Bei den mit Nitroaromaten belasteten Böden im Ringtest („Clausthal“, „TNT-Mix“) handelt es sich um Proben realer Altlastenflächen. Somit ist anzunehmen, dass noch eine Vielzahl an Substanzen in diesen Böden enthalten ist. Außer Neben- und Abbauprodukten von 2,4,6-Trinitrotoluol können Zünd-, Blend-, Brand- und Nebelmittel aus der militärischen Nutzung als Kontaminanten vorliegen. Trotzdem dürfte es sich bei der Hauptkontaminante um TNT handeln, da die eingesetzten Eluate eine charakteristische Aufwölbung der Kolonien

hervorrufen, wie es auch für die Einzelsubstanz 2,4,6-TNT nachgewiesen wurde. Als Beispiel soll der Boden „Clausthal“ gezeigt werden.

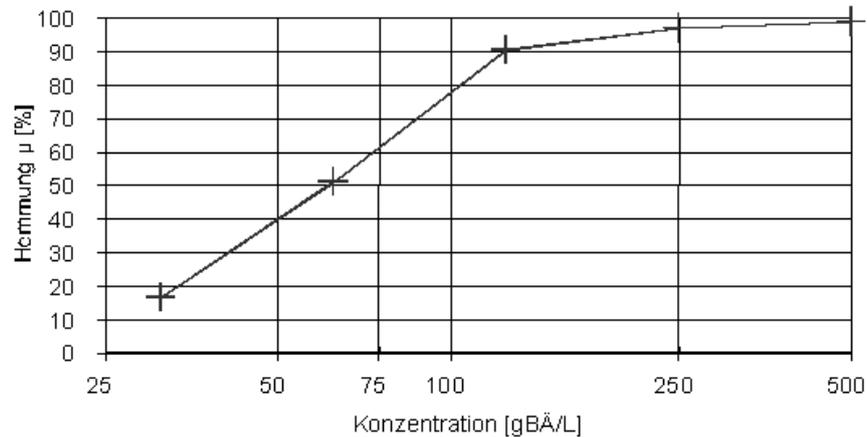


Abbildung VII - 20: Hemmung der Wachstumsrate der Frondfläche durch den Boden „Clausthal“. Die filtrierten Eluate wurden in einer Konzentration von 31,3 bis 500 g BÄ/L (entspr. 6,26 % 100 % Eluat) eingesetzt. Die Werte beruhen auf vier Medienkontrollen und je vier Parallelen.

Die filtrierten Eluate des Bodens „Clausthal“ hemmen deutlich das Wachstum der Wasserlinsen. Bis zu einer Konzentration von 125 g BÄ/L (90 % Hemmung der Wachstumsrate der Frondfläche) verläuft die Dosis-Wirkungsbeziehung linear, danach flacht sie etwas ab, erreicht aber 100 % bei 500 g BÄ/L. Der ED_{50} -Wert liegt bei 60 g BÄ/L.

Wie in Kapitel VII - 5.4.3.1 erläutert, bewirkt eine reine 2,4,6-TNT-Lösung mit der Konzentration 10 mg/L im Wasserlinsentest eine über 90 %ige Hemmung. Der Boden „Clausthal“ hat lt. einer chemischen Analytik (Feststoffanalyse) durch das IUCT einen 2,4,6-TNT-Gehalt von 259,1 mg/kg und im Eluat des Ringtests 10 mg/L. Dieses Ringtesteluat entspräche rechnerisch einer Konzentration von 500 g BÄ/L oder 1000 mL/L Eluat. Die 90 %ige Hemmung wird jedoch schon bei 125 g BÄ/L entsprechend 250 L/L erreicht, also bei einer rechnerischen Konzentration von 2,5 mg/L TNT. Dies ist ein Hinweis, dass auch die anderen Schadstoffbestandteile einen wesentlichen Beitrag zur Toxizität leisten.

VII - 5.6 Laborvergleich

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Laborvergleiches zwischen dem Lehrstuhl für Biologie V (Bio V), dem UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH (UFZ) und dem ECT Flörsheim (ECT) dargestellt. Der Vergleich erfolgt primär über die Frondzahl, da diese bei allen Projektteilnehmern ermittelt wurde.

VII - 5.6.1 Boden „Gaswerk 1:2“

Für den Laborvergleich wurde der Boden „Gaswerk 1:2“ ausgewählt, da er stark mit PAK kontaminiert ist.

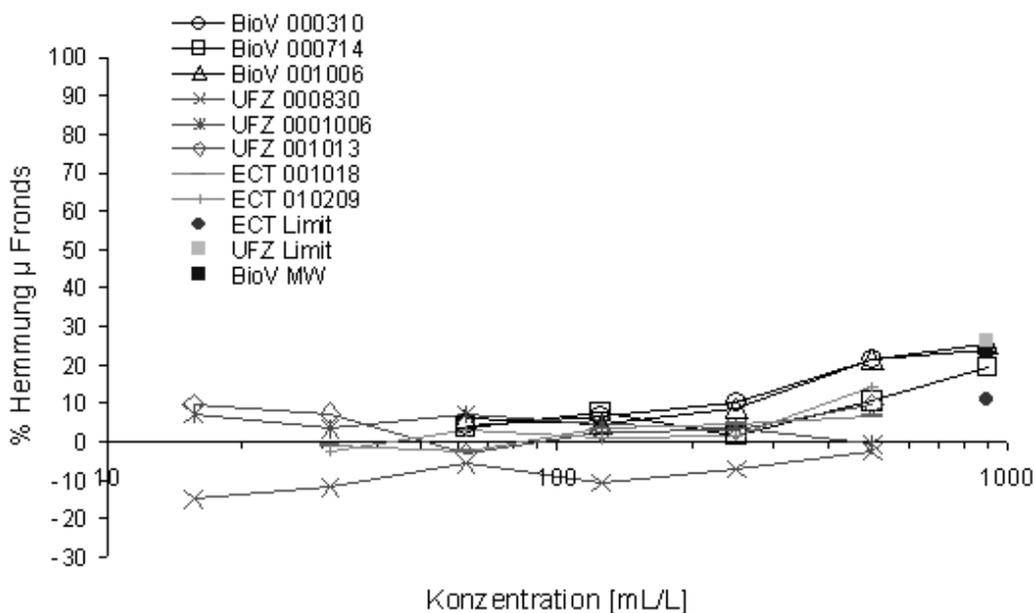


Abbildung VII - 21: Hemmung der Wachstumsrate der Frondanzahl durch Eluat des Bodens „Gaswerk 1:2“ bis zu einer Konzentration von 900 mL/L. Die Werte beruhen auf jeweils sechs Medienkontrollen und je drei Parallelen. Da der Limittest bei Bio V nicht gültig war, wurde der Mittelwert der drei Tests als Vergleichswert herangezogen. Die Eluatherstellung erfolgte zentral durch Bio V.

Der Boden „Gaswerk 1:2“ enthält laut chemischer Analyse am IUCT in Schmallenberg eine durchschnittliche PAK-Konzentration in den Eluaten von 1114,6 $\mu\text{g/L}$ und einen DOC von 135,6 mg/L. Im Vergleich dazu enthalten die Ringtesteluaten im Mittel nur 115,4 $\mu\text{g/L}$.

In der Abbildung VII - 21 sind die Mittelwerte der Hemmung (μ , Frondzahl) aller Laborvergleichstestteilnehmer gegen die Konzentration aufgetragen. Für die Auftragung der Ergebnisse vom UFZ – 000830 wurde ein Ausreißerwert (31,25 mL/L, nur zwei Parallelen gewertet) weggelassen, ansonsten sind alle Hemmwerte in die Auswertung eingegangen.

Da es bei den Versuchen mit dem Boden „Gaswerk 1:2“ zu verhältnismäßig unterschiedlichen Ergebnissen zwischen den Teilnehmern kam, was die Hemmung der Wachstumsrate betrifft, wurde ein Limittest durchgeführt, bei dem das Eluat zentral von der RWTH-Aachen hergestellt und an die Teilnehmer verschickt wurden. Jedes Labor verschickte davon eine Probe an das IUCT nach Schmallenberg, um diese chemisch analysieren zu lassen. Somit konnte einerseits herausgefunden werden, ob die unterschiedlichen Ergebnisse durch verschiedene Testbedingungen, wie z. B. die Lichtintensität, hervorgerufen wird oder ob die Eluatherstellung die Ursache für das uneinheitliche Ergebnisbild war. Da dieser Limittest bei der Biologie V nicht gültig war, wurde der Mittelwert aus den drei Versuchen als Vergleichswert herangezogen.

Die Ergebnisse des UFZ Leipzig weisen als einzige keine eindeutige Hemmung auf. Während bei der Biologie V eine Hemmung von durchschnittlich 23 % in der höchsten Konzentration und 10,4 % bei 500 mL/L bei der ECT Flörsheim erreicht wird, liegen die Werte bei dem UFZ nur bei durchschnittlich 2 %.

Sowohl Biologie V als auch UFZ konnten diese sehr unterschiedlichen Ergebnisse in 2 von 3 Testserien bei 500mL/L reproduzieren, in der jeweils 3 Serie lagen die Werte dann im mittleren Bereich zwischen den von der ECT ermittelten Werten.

Eine Mittelung der ED-Werte ergab für den ED₂₀ 134 % (1340 mL/L) und für den ED₁₀ 42 % (420 mL/L). Die Werte beruhen auf die Wachstumsrate der Frondanzahl und wurden ohne die Ergebnisse vom UFZ gemittelt, da eine ED-Wert-Berechnung aufgrund der Dosis-Wirkungsbeziehung unsinnig erschien. Für die G-Wert-Bestimmung wurden allerdings alle neun Kurven herangezogen. Dadurch erhält man einen G_{L20} von 1-3 und einen G_{L10} von 1-8.

Allerdings zeigt der Limittest, dass mit dem zentral hergestelltem Eluat im UFZ eine Hemmung der Wachstumsrate der Frondanzahl von 26 % (ECT 11 %) erreicht wird. Da der Limittest bei Bio V nicht gültig war, wurde der Mittelwert der drei Tests als Vergleichswert herangezogen (23 %).

Dies lässt vermuten, dass die geringere Hemmung des Eluats vom UFZ bzw. die hohe Hemmung von Bio V durch die Eluatherstellung verursacht wird. Gerade bei diesem Boden scheint die Eluatherstellung eine entscheidende Rolle zu spielen. Nicht nur die spätere Schadstoffkonzentration im Eluat wird dadurch erheblich beeinflusst, sondern auch die Parameter Trübung (MW im Limittest 135,5 FNU) und DOC (MW Limittest 135,6 mg/L), wobei letzterer auch das Testergebnis beeinflussen kann.

Entscheidend ist jedoch, dass die hier gefundene unterschiedliche Bewertung nur darauf beruht, dass hier im absoluten Grenzbereich der Wirkung an der Signifikanzgrenze bei minimaler Verdünnung gemessen werden musste. Es liegen daher keine widersprüchlichen

Messergebnisse vor sondern einzig die Bewertung ist mit einem Unsicherheitsfaktor behaftet, der aber nur dadurch begründet ist, dass die vorliegenden hohen Kontaminationen keine ausgeprägte Phytotoxizität aufweisen.

VII - 5.6.2 Boden „Iserlohn“

Für den Laborvergleich wurde weiterhin der Boden Iserlohn ausgewählt. Nach einer chemischen Analyse vom IUCT in Schmallenberg enthält der Boden „Iserlohn“ eine Belastung von 8798,9 mg MKW/kg und 21 mg PAK/kg. Außerdem ist dieser Boden auch noch mit Schwermetallen kontaminiert.

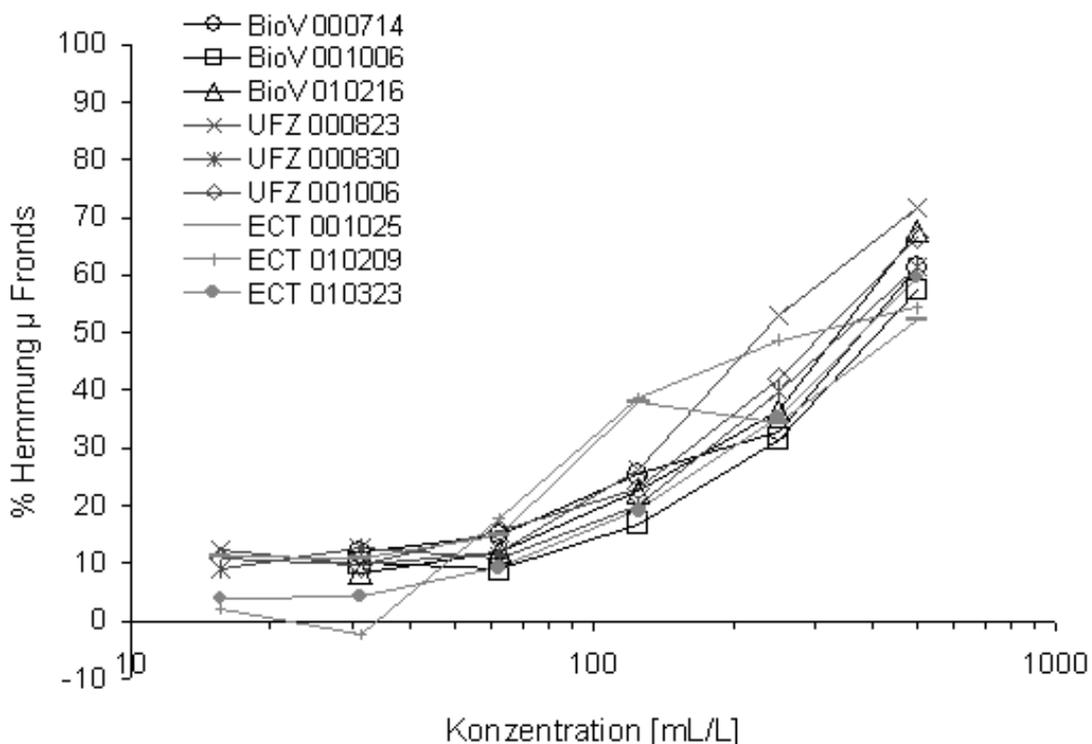


Abbildung VII - 22: Hemmung der Wachstumsrate der Frondanzahl durch den Boden „Iserlohn“ in einer Konzentration bis 500 mL/L. Die Werte beruhen auf jeweils sechs Medienkontrollen und je drei Parallelen.

Bei diesem Boden sind es nur die 125 mL Testansätze vom ECT Flörsheim, die aus der Reihe fallen. Offensichtliche Gründe für diese Ausreißer wurden nicht gefunden.

Die Mittelwerte der ED-Werte liegen bei $ED_{50} = 389$ mL/L, $ED_{20} = 96$ mL/L und $ED_{10} = 48$ mL/L. Dabei wurden alle Werte miteinbezogen. Die Bestimmung der G-Werte ergab folgendes Bild, der G_{L20} liegt bei 8 -16, der G_{L10} bei 16 - 48. Der Boden „Iserlohn“ ist somit we-

sentlich toxischer für die Wasserlinsen als der Boden „Gaswerk“ und führt zu einer gut reproduzierbaren Dosis-Wirkungsbeziehung.

VII - 5.6.3 Boden „Landhausen“

Alle schwermetallhaltigen Böden, die für den Laborvergleichstest zur Verfügung standen, weisen Mischkontaminationen auf. Die Böden „Iserlohn“ und „Landhausen“ sind sowohl mit MKW, als auch mit Schwermetallen belastet, wobei der Boden „Landhausen“ sehr hohe Gehalte beider Stoffklassen aufweist. Eine Beurteilung der Schadwirkungen, die auf die Schwermetallbelastung zurückgehen, ist aufgrund der Mischkontamination schwierig. Da „Landhausen“ auch im Laborvergleichstest verwendet wurde, sollen in folgender Graphik diese Ergebnisse dargestellt werden.

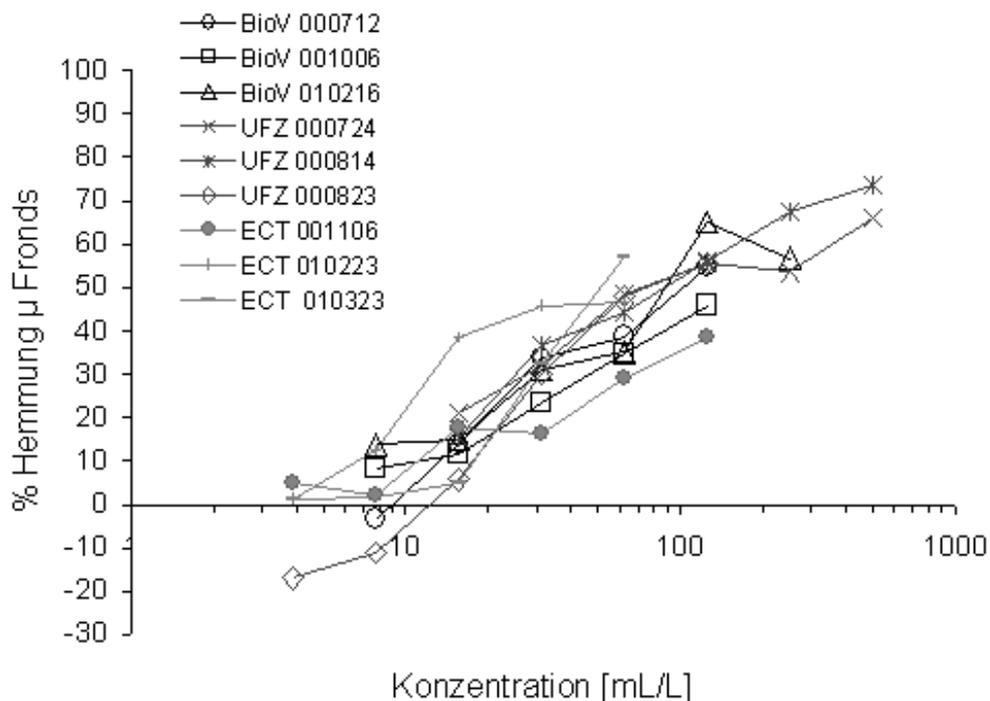


Abbildung VII - 23: Hemmung der Wachstumsrate der Frondanzahl durch den Boden „Landhausen“. Getestet wurden Konzentrationen von 3,9 bis 500 mL/L. Die Werte beruhen auf jeweils sechs Medienkontrollen und je drei Parallelen.

Im Gegensatz zu den Böden „Gaswerk 1:2“ und „Iserlohn“ bietet dieser Boden ein uneinheitliches Bild. Beim UFZ Leipzig erhielt man bei den ersten beiden Konzentrationen Förderungen, die bis zu 17 % reichen. Die Kurven des ECT weisen im mittleren Konzentrationsbereich nicht erklärbare „Ausreißer“ auf, die auch einmal bei der Biologie V vorkommen (Bio V 010216). Die ED-Werte liegen bei 142 mL/L (ED_{50}), 21 mL/L (ED_{20}) und 9 mL/L (ED_{10}). Die entsprechenden Spannbreiten liegen bei 3,7 bis 29,5 für den ED_{50} , 0,6 bis 7,8 für den ED_{20}

und 0,03 bis 2,2 für den ED₁₀. Damit ist er der toxischste Boden im Laborvergleichstest. Dies spiegeln auch die G_L-Werte wider, nämlich G_{L20} = 32 - 128 und G_{L10} = 64 - 256. Werden die stark streuenden Werte der ECT weggelassen erhält man folgende G-Werte: G_{L20} = 32 – 48 und G_{L10} = 96 – 128. Das macht noch einmal die Streuung der Hemmwerte deutlich. Da bis auf die Kurven vom ECT Flörsheim alle Werte nahe beieinander liegen, kann man vermuten, dass die jeweilige Eluatherstellung die Ursache ist, nicht jedoch die generelle Reproduzierbarkeit. Eine Eluatanalyse von der Biologie V durch das IUCT ergibt Werte, die sich gut mit denen vom Ringtest decken (s. Tabelle VII - 3).

VII - 5.6.4 „IMA SM 66“

Für den Laborvergleichstest wurden zwei KW-sanierte Böden, IMA SM 66 und IMA 927B, mit einem Restgehalt von 170,5 bzw. 66,9 mg KW/Kg zur Verfügung gestellt. Aufgrund des höheren Restgehaltes an KW und weil er auch in den Pflanzentests am ECT deutliche Effekte zeigte, wurde der IMA SM66 als vierter Laborvergleichstest-Boden ausgewählt. In der nachfolgenden Graphik werden die Ergebnisse der Teilnehmer erläutert.

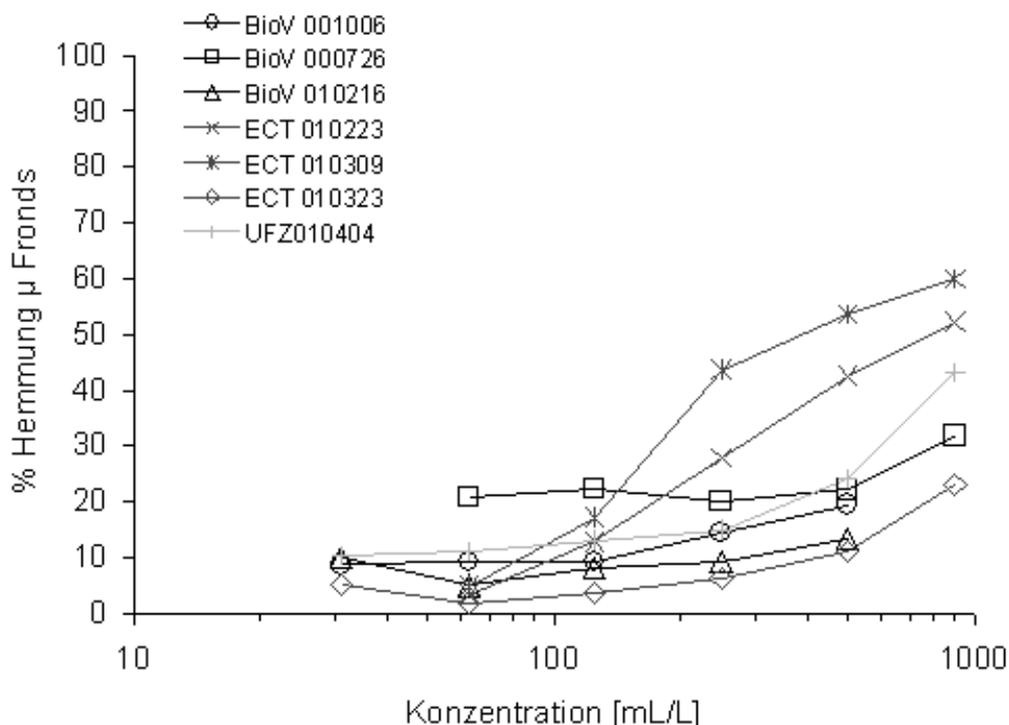


Abbildung VII - 24: Hemmung der Wachstumsrate der Frondanzahl durch den Boden „IMA SM 66“. Die Eluate wurden von 31,25 bis 900 mL/L getestet. Die Werte beruhen auf jeweils sechs Medienkontrollen und je drei Parallelen. Berücksichtigt wurden nur die letzten drei Versuchstage.

Die durch den Boden „IMA SM66“ verursachten Hemmwerte streuen von allen Laborvergleichsböden am stärksten. Der Grund dafür ist nicht bekannt. Die Suche nach der Ursache wird durch die Tatsache erschwert, dass es auch innerhalb eines Labors zu solchen Schwankungen kommt (siehe ECT). Da innerhalb der Testphasen nichts an den Bedingungen geändert wurde, kann es eigentlich nur an der Zusammensetzung der Eluate liegen. Entweder waren die Elutionen ungleichmäßig, oder der Boden wurde nicht richtig homogenisiert, so dass es zu groben Schwankungen bei der Schadstoffkonzentration kam.

Unabhängig davon ist es allerdings sehr erstaunlich, wie stark ein sanierter Boden das Wachstum der Wasserlinsen hemmen kann. Auch wenn die Werte ab einer Konzentration von 125 mL/L weit auseinanderdriften und am Ende zwischen 23 und 60 % liegen, liegen die Werte für G2 immer über 10 % und man muß davon ausgehen, dass der Boden „IMA SM66“ eindeutig phytotoxisch ist.

Da die Wachstumskurven eine deutlich verzögerte Wirkung zeigen und die langfristige Wirkung für die ökotoxikologische Bewertung entscheidender ist, wurden in Übereinstimmung mit der ISO-Draft nur die letzten 3 Tage in die Bewertung hineingenommen. Das Ergebnis ist in der nächsten Graphik dargestellt.

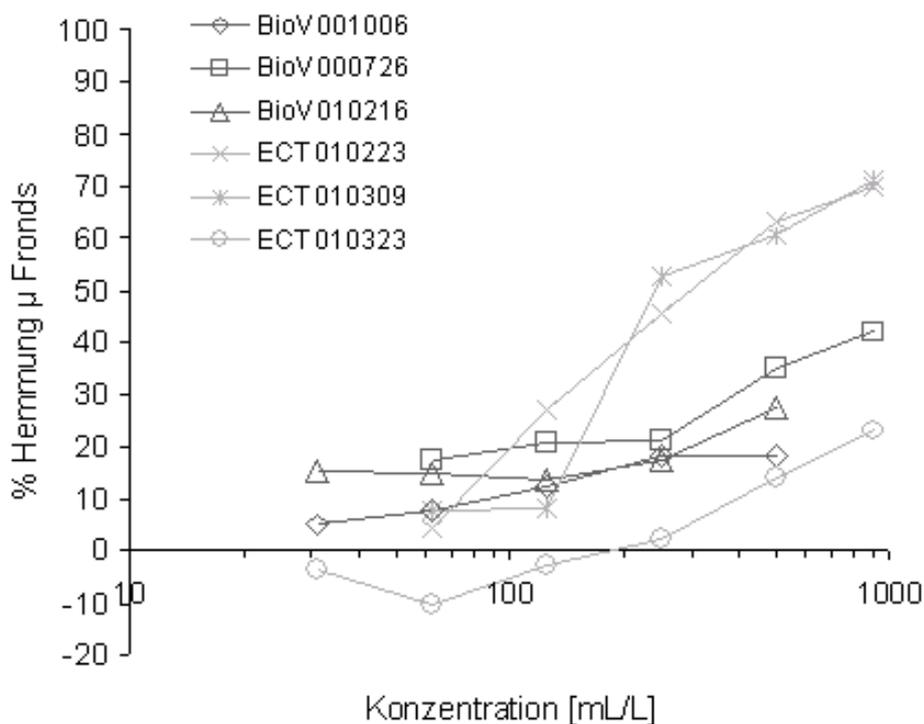


Abbildung VII - 25: Darstellung der Hemmung von „IMA SM66“ auf das Wachstum der Wasserlinsen. Die Wachstumsrate wurde aus der Frondfläche berechnet.

In dieser Graphik wurden die segmentierten Wachstumsraten aus der Abbildung VII - 24 für die Bio V und das ECT neu berechnet. Die ersten beiden Werte wurden herausgenommen

und die daraus resultierende mittlere Wachstumsrate als Basis für die neue Hemmungsberechnung herangezogen. Damit sollte der letzte Testabschnitt stärker betont werden, um feststellen zu können, ob die Schadstoffe in dem Boden „IMA SM 66“ verzögert auf die Wasserlinsen wirken. Und man kann feststellen, dass die Hemmungen durch diese Berechnung noch größer geworden sind. Die Steigung der Kurven vom ECT ist ebenfalls größer geworden. Damit scheinen die Schadstoffe im „IMA SM 66“ besonders im letzten Testabschnitt zu wirken. Durch die breite Streuung der Werte kann für den ED_{50} und ED_{10} keine Mittelung vorgenommen werden, sondern nur eine Bereichangabe, die bei 1612 – 80449 mL/L für den ED_{50} bzw. bei 174 – 835 mL/L für den ED_{10} liegt. Der ED_{20} konnte genauer bestimmt werden und liegt bei 437 mL/L. Auch die G-Wert-Bestimmung zeigt diese Streuung. Der G_{L20} liegt zwischen 1 und 12, der G_{L10} bei 2 und > 16.

Entscheidend ist, dass ein sanierter Boden, dessen Leitschadstoff deutlich unterhalb der Sanierungszielwerte liegt, im Biotest eine hohe Toxizität aufweist. Keiner der im Feststoff oder Eluat gefundenen Schadstoffe kann diese Toxizität erklären.

VII - 5.6.5 Frondflächenauswertung der Laborvergleichsböden

Die Böden „Landhausen“ und „Iserlohn“ enthielten als Hauptkontaminante MKW. Im Wasserlinsentest bewirken sie eine mehr oder weniger deutliche Reduzierung der Frondzahl und Frondfläche. Außerdem bewirken die mit MKW belasteten Böden eine Aufhellung der Fronds und Ausbildung chlorotischer Bereiche. Bei „Landhausen“ treten auch Nekrosen auf. Da schon in Kapitel VII - 5.6.2 und Kapitel VII - 5.6.3 die Hemmung von „Iserlohn“ und „Landhausen“ auf die Wachstumsrate der Frondanzahl besprochen wurde, wird hier nur kurz auf die Wirkung auf die Frondfläche eingegangen.

a) Boden „Iserlohn“

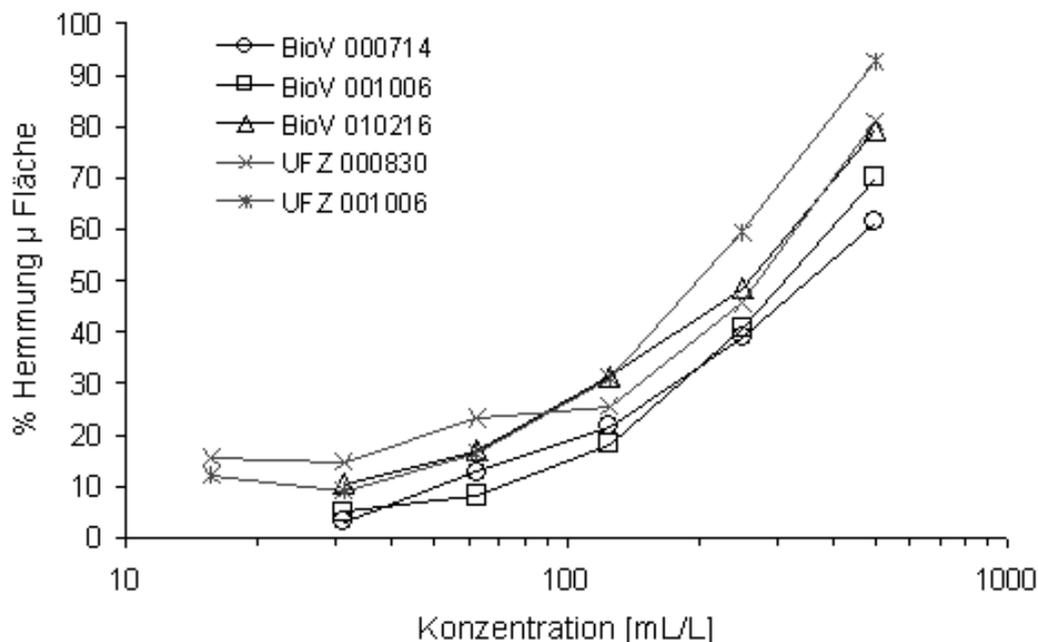


Abbildung VII - 26: Hemmung von „Iserlohn“ auf die Wachstumsrate ermittelt aus der Frondfläche. Die Werte beruhen auf jeweils sechs Medienkontrollen und je drei Parallelen. Es gehen nur zwei Labore in die Wertung ein, da nur dort eine Flächenauswertung möglich war. Getestet wurden Konzentrationen von 3,9 bis 500 mL/L. Vom UFZ waren nur zwei Versuche zur Auswertung vorhanden.

In der Abbildung VII - 26 ergibt sich dasselbe einheitliche Bild wie in der Abbildung VII - 22. Die Kurven liegen relativ dicht aufeinander, wobei die Werte vom UFZ etwas höher liegen als die von der Biologie V. Auffällig sind die Werte bei den geringen Konzentrationen. Sie sinken nicht auf den Nullpunkt ab, sondern pendeln sich bei 10 % ein und das, obwohl die Eluatmenge nur 3,9 mL/L beträgt. Die Hemmungen reichen in der höchsten Konzentration von 61 - 93 %.

Im Vergleich dazu liegen die Hemmungen bei der Auswertung der Frondanzahl bei 52 – 72 % (incl. ECT).

b) Boden „Landhausen“

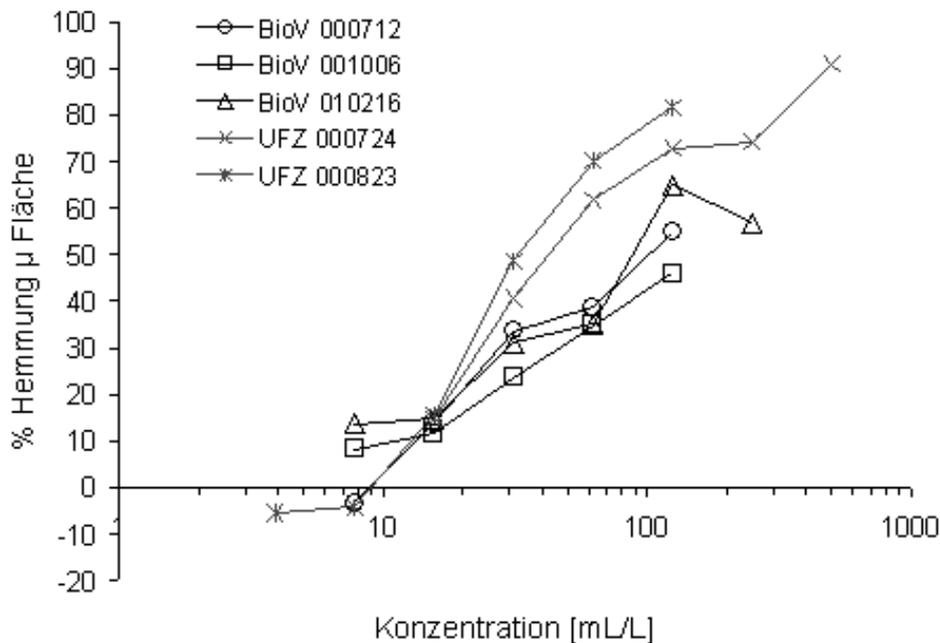


Abbildung VII - 27: Hemmung der Wachstumsrate der Frondfläche durch den Boden „Landhausen“. Der getestete Konzentrationsbereich reicht von 3,9 bis 500 mL/L. Die Werte beruhen jeweils auf sechs Medienkontrollen und je drei Parallelen.

Wie auch bei dem Boden „Iserlohn“ konnten hier nur die Versuche von zwei Laboren ausgewertet werden, da bei den anderen keine Flächenauswertung möglich war. Die Werte vom UFZ gehen anfangs gering in den Förderbereich. Das bedeutet, dass in den geringen Konzentrationen zwar viele neue Fronds gebildet wurden, diese aber sehr klein waren. Ansonsten weisen die Tests beim UFZ eine steilere Dosis-Wirkungsbeziehung auf als die gefunden in der Biologie V.

Vergleicht man die höchsten Hemmungen bei der Frondzahl und Frondfläche, ergibt sich z. B. für den Ansatz UFZ 000724 eine Hemmung von 66 % für die Anzahl und 91 % für die Fläche.

Werden die Hemmungen der Bio V und UFZ bei 125 mL/L gemittelt, so erhält man eine durchschnittliche Hemmung von 55,46 % für die Anzahl und 64,01 % für die Fläche. Das beweist, dass die Fläche auch bei diesem Versuch den empfindlicheren Parameter darstellt.

VII - 5.6.6 Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol

Nach Empfehlung der ISO wurde im Laborvergleichstest 3,5-Dichlorphenol als Referenzsubstanz genommen. Die Ergebnisse der Teilnehmer wird in der folgenden Graphik dargestellt.

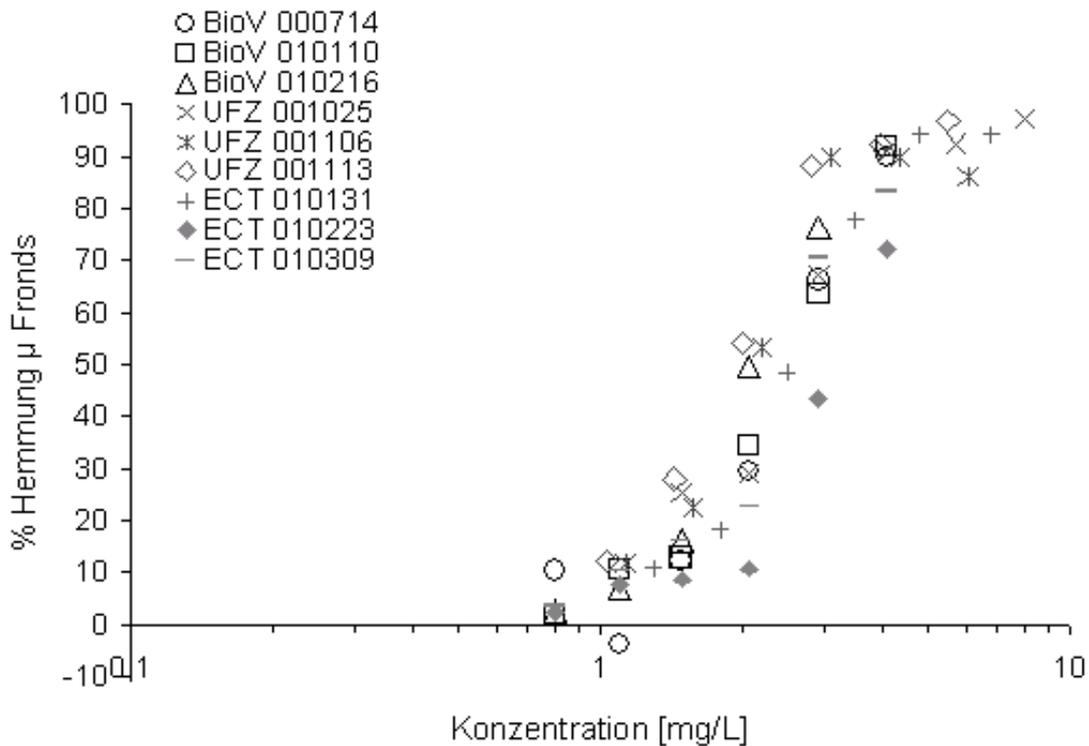


Abbildung VII - 28: Hemmung der Wachstumsrate der Frondanzahl durch 3,5-Dichlorphenol in der Konzentration 0,8-8 mg/L. Die Werte beruhen auf jeweils sechs Medienkontrollen und je drei Parallelen.

Bei den Versuchen mit 3,5-DCP verwendeten die Teilnehmer unterschiedliche Konzentrationen. Deutlich zu sehen ist aber die in Kapitel VII - 5.3.2 erläuterte steile Dosis-Wirkungsbeziehung, die 3,5-DCP im Wasserlinsentest hervorruft. Bis 2 mg/L verlaufen die Werte relativ flach, steigen dann bis 3,5 mg/L steil an und flachen zum Ende hin wieder ab. Die EC_{50} -Werte liegen zwischen 2,42 - 2,76 mg/L, 1,44 - 1,8 mg/L für den EC_{20} und der EC_{10} liegt zwischen 1,15 - 1,58 mg/L.

VII - 5.7 Ergebnisüberblick

In den folgenden Tabellen soll nun ein Überblick der Ergebnisse des Wasserlinsentests im Laborvergleichstest, aber auch aller im Ringtest durchgeführten Aquatiktests gegeben werden.

Tabelle VII - 21: Zusammenfassung der Ergebnisse des Wasserlinsentests im Laborvergleich. Die angegebenen G_L -Werte geben die Spannbreite der ermittelten Werte aller einzelnen Tests an. Die Werte der DIN 3er Verdünnungsreihe sind linear interpoliert. Der erste Wert stellt den Mittelwert dar, der zweite die Standardabweichung. Die letzte Zeile gibt an, wie häufig die verschiedenen Beobachtungsparameter (A = Anzahl, F = Fläche, TG = Trockengewicht) den höchsten G_L -Wert in den Tests darstellen (Mehrfachnennungen möglich).

Wasserlinsentest	Landhausen	Iserlohn	Gaswerk 1:2	IMA SM 66
Wachstumsrate μ				
Frondanzahl ED ₅₀ [%]	14,2 +/- 8,2	38,9 +/- 4,9	911,7 +/- 934,9	161,2-8044,9
Frondanzahl ED ₂₀ [%]	2,1 +/- 0,8	9,6 +/- 2,1	133,7 +/- 83,4	43,7 +/- 42,0
Frondanzahl ED ₁₀ [%]	0,9 +/- 0,4	4,8 +/- 2,6	42,1 +/- 17,2	17,4-83,5
Frondanzahl G_L -Wert	64 - 256	16 - 48	1 - 8	2 - 24*
G_L -Wert	64 - 256 (4*F, 1*TG, 1*A=F, 3*TG=A)	16 - >64 (3*A, 1*F=A, 4*F, 1*TG)	4 - 8 (2*TG, 3*F, 3*A=F)	3 - 32 (2*F, 3*A, 2*TG)

*= bestimmt nach der DIN-3er-Reihe

= Werte liegen außerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs

Die Tabelle VII - 21 zeigt die ermittelten ED- und G_L -Werte aller Teilnehmer für die Böden „Landhausen“, „Iserlohn“, „Gaswerk 1:2“ und „IMA SM 66“. Die erste Zeile mit den G_L -Werten bezieht sich nur auf die Frondanzahl, während die G_L -Werte in der letzten Zeile aus den empfindlichsten Parametern bestimmt wurden. In den Klammern darunter wird wieder gegeben, welcher Parameter in den jeweiligen Tests wie oft der empfindlichste war. Hier wird deutlich, dass eine Festlegung auf den einen Beobachtungsparameter Anzahl die Empfind-

lichkeit des Tests deutlich verringern würde, da die Anzahl in weniger als der Hälfte aller Tests der empfindlichste Beobachtungsparameter ist.

Bei insgesamt 35 mit Anzahl und Fläche ausgewerteten Tests verschiedener Böden führte in 17 Fällen die Frondfläche zu einer höheren G-Stufe, jedoch nur in 5 Tests die Frondanzahl. Dies ist biologisch eindeutig nachvollziehbar, da eine Wachstumshemmung sich meist nicht nur auf die Anzahl, sondern auch auf die Frondgröße auswirkt.

Für die ED-Werte wurde der Mittelwert mit der Standardabweichung und für die G_L-Werte der Bereich angegeben, in dem die G-Werte liegen.

Tabelle VII - 22: Zusammenfassung der ED₅₀ aller Aquatiktests

	Landhausen	Iserlohn	Gaswerk 1:2	IMA SM 66
Wasserlinsentest μ, Frondanzahl ED ₅₀ [%]	14,2±8,2	38,9±4,9	911,7±934,9	161,2-8044,9
Wasserlinsentest μ, Trockengewicht ED ₅₀ [%]	8,15	73,2	533,2	1660,0
Wasserlinsentest μ, Frondfläche ED ₅₀ [%]	5,9±1,0	29,4±6,5	497,9±44,4	1460±1213
Leuchtbakterien - Lumineszenzh.test ED ₅₀ -Wert [%]	19,2 ± 11,7	24,2 ± 7,8	22,2 ± 12,4	47,0
Daphnientest ED ₅₀ -Wert [%]	4,2 ± 3,9	56,5 ± 18,9	83,9 ± 7,5	--
Leuchtbakterien - Zellvermehrungsh.test (Integral) ED ₅₀ -Wert [%]	32,5 ± ? *)	48,6 ± 19,2	54,0 ± ? *)	--
Algentest Wachstumsrate ED ₅₀ -Wert [%]	71,6 ± 13,6	n. d.	72,2 ± 12,6	--

=Werte liegen außerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs

Die Standardabweichungen sind bei den Böden Landhausen und Iserlohn durch deren hohe Hemmung schon bei niedrigen Konzentrationen deutlich geringer als bei den Böden Gas

werk und IMA, die häufig nur in den 2 oder 3 höchsten Konzentrationen signifikante Hemmungen verursachten. In diese Abweichungen zwischen den Testergebnissen gehen alle Faktoren von der Eluatherstellung über die Testdurchführung bis zur Testauswertung ein.

Die hohe Reproduzierbarkeit des Wasserlinsentests wird auch an den EC-Werten mit der Referenzchemikalie 3,5-Dichlorphenol im Laborvergleich deutlich. Diese hat folgende EC-Werte (Frondanzahl): EC10 = 1,37±0,21 mg/L, EC20 = 1,67±0,24 mg/L EC50 = 2,59±0,29 mg/L.

In Tabelle VII - 22 wurden alle ED₅₀ für die vier Laborvergleichstestböden zusammengefasst, wobei auch die Ergebnisse der Aquatiktests vom Ringtest berücksichtigt wurden, da auch sie diese Böden untersucht haben. Dargestellt sind die Mittelwerte, soweit mehrere Tests durchgeführt wurden, mit den jeweiligen Standardabweichungen.

Der Wasserlinsentest liegt mit seinen Standardabweichungen im unteren bis mittleren Bereich aller Tests. Bei der Empfindlichkeit (Größe des ED₅₀) liegt der Wasserlinsentest zweimal auf Platz 2 und einmal auf Platz 5, während der Algentest unter Berücksichtigung der Vorversuche zweimal Platz 5 und einmal Platz 4 einnimmt also in diesem Vergleich deutlich unempfindlicher ist. Dies zeigt, dass beide Tests, Lemna und Alge, sich maximal ergänzen und der Wasserlinsentest eine neue Bewertungsqualität in die Biotestbatterie für den Aspekt der höheren Pflanzen und auch Grundwasserschutz einbringt.

Tabelle VII - 23: Zusammenfassung der ED₂₀ für den Wasserlinsentest

Wasserlinsentest Wachstumsrate μ	Landhausen	Iserlohn	Gaswerk 1:2	IMA SM 66
Frondanzahl ED ₂₀ [%]	2,1 +/- 0,8	9,6 +/- 2,1	133,7 +/- 83,4	43,7 +/- 42,0
Trockengewicht ED ₂₀ [%]	2,0	20,3	51,6	91,0

= Werte liegen außerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs

Diese Tabelle fasst alle ED₂₀-Werte für den Laborvergleich zusammen. Die Werte beziehen sich jeweils auf die Frondanzahl bzw. auf das Trockengewicht. Bei mehreren Test wurde der Mittelwert gebildet und die dazugehörige Standardabweichung errechnet.

Tabelle VII - 24: Zusammenfassung der ED₁₀ für den Wasserlinsentest

Wasserlinsentest Wachstumsrate μ	Landhausen	Iserlohn	Gaswerk 1:2	IMA SM 66
Fronanzahl ED ₁₀ [%]	0,9 +/- 0,4	4,8 +/- 2,6	42,1 +/- 17,2	17,4-83,5 +/- 27,1
Trockengewicht ED ₁₀ [%]	1,1	10,5	26,9	18,7

Entsprechend der Tabelle VII - 23 gibt diese Tabelle die ED₁₀ für die Fronanzahl und das Trockengewicht wieder.

Tabelle VII - 25: Zusammenfassung der G_L-Werte aus allen aquatischen Tests. Die Zusatzangaben beim Wasserlinsentest geben an, welcher der Beobachtungsparameter Fläche=F, Anzahl=A, Trockengewicht=TG wie häufig der Auslöser für den G_L-Wert war.

	Landhausen	Iserlohn	Gaswerk 1:2	IMA SM 66
Wasserlinsentest μ GL-Wert	64 - 256 (4*F, 1*TG, 1*A=F, 3*TG=A)	16 - >64 (3*A, 1*F=A, 4*F, 1*TG)	4 - 8 (2*TG, 3*F, 3*A=F)	3 - 32 (2*F, 3*A, 2*TG)
Leuchtbakterien - Lumineszenzh.test G _L -Wert	12 - 128	12 - >32	12 - >128	16
Daphnientest G _L -Wert	>4 - 320	2 - 32	1 - < 6	1
Leuchtbakterien - Zellvermehrungsh.test (Integral) G _{LW} -Wert	1 - > 10	1 - 10	1 - 8	2
Algentest Biomasseintegral G _L -Wert	1 - 8	n. d.	1 - > 35	2

Tabelle VII - 25 gibt schließlich eine Zusammenfassung aller G_L-Werte wider, die mit den vier Laborvergleichstestböden in den Aquatikttests ermittelt wurden.

Werden alle 8 im Laborvergleich eingesetzten Böden mit allen aquatischen Testsystemen auf der Basis der G-Werte verglichen, so stellen Wasserlinsen und Leuchtbakterien bis auf einen Fall immer den jeweils höchsten G-Wert. Der Vergleich hinkt jedoch, da Wasserlinsen schon ab G2 toxische Effekte darstellen, Leuchtbakterien aber erst ab G 16. Klar ist damit wiederum, dass die Wasserlinse zu den empfindlichen Testsystemen gehört. Eine genauere Detaildarstellung muss jedoch dem Testvergleich im Gesamtprojekt überlassen bleiben.

VII - 5.8 Bezugspunkte der Toxizitätsklassifizierung

Für eine abschließende Bewertung der Toxizität von Bodenproben gegenüber Wasserlinsen sind drei festzulegende Größen notwendig: Die Bezugsgröße, zu der alle Förder- und Hemmwirkungen in Relation gesetzt werden, und eine Wirkschwelle, ab der eine Hemmwirkung als Schadwirkung definiert wird und die Verdünnungsstufe, bei der diese Hemmung ggf. überschritten wird (Mennicken 2000).

VII - 5.8.1 Bezugspunkt Medienkontrolle

Als Bezugsgröße könnte ein sicher unbelasteter Boden oder eine Medienkontrolle dienen. Laut Scheffer und Schachtschabel (1998) besteht dabei das Problem, dass es eine Vielzahl an verschiedenen Bodentypen gibt, die unterschiedliche Ausprägungen zeigen. Das macht es quasi unmöglich, für einen belasteten Boden einen Kontrollboden gleicher Struktur zu finden. Auch die Auswahl eines universellen Kontrollbodens ist wenig sinnvoll, da unbelastete Böden verschiedener Bodentypen in verschiedenen Biotests z. T. sehr unterschiedliche Effekte bewirken können. Das würde dazu führen, dass Schadwirkungen toxischer Substanzen falsch beurteilt werden würden. Für den Wasserlinsentest haben alle Versuche dieses Vorhabens gezeigt, dass bei Verwendung der ISO-Norm mit dem Steinbergmedium eine Medienkontrolle ein praktikabler und zuverlässiger Bezugspunkt ist (siehe Kapitel VII - 5.2.1, VII - 5.2.2, VII - 5.9). Aus diesem Grunde wurde auch im nachfolgenden Vergleich die Medienkontrolle als Bezugspunkt gewählt.

VII - 5.8.2 Wirkschwelle und Kontrollwachstum

In der ISO-Draft wird eine mittlere Wachstumsrate von mind. $0,275 \text{ d}^{-1}$ für die Kontrollansätze vorgeschrieben. Dies ist solange kein Problem, wie die Lichtintensität in einem Bereich oberhalb $95\text{-}100 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{sec}$ liegt.

Um die z. T. geringen Hemmungen der Böden richtig beurteilen zu können, ist es wichtig, dass die Kontrollen einen Variationskoeffizienten $< 10 \%$ besitzen. In der folgenden Tabelle sind von allen Versuchen im Laborvergleichstest die wichtigsten Werte der Kontrollen zusammengefasst.

Tabelle VII - 26: Vergleich der Kontrollen von allen Laborvergleichsteilnehmern bei den Versuchen mit dem Boden „Landhausen“ (Frondanzahl)

	RWTH Aachen	UFZ Leipzig	ECT Flörsheim
Mittlere μ [d^{-1}]	0,415	0,379	0,378
Variationskoeffizient [%]	5,02	6,64	3,35
Standardabweichung	0,020	0,023	0,016

Tabelle VII - 27: Vergleich der Kontrollen von allen Laborvergleichsteilnehmern bei den Versuchen mit dem Boden „Gaswerk“ (Frondanzahl)

	RWTH Aachen	UFZ Leipzig	ECT Flörsheim
Mittlere μ [d^{-1}]	0,373	0,345	0,366
Variationskoeffizient [%]	5,08	12,47	3,73
Standardabweichung	0,02	0,04	0,013

Tabelle VII - 28: Vergleich der Kontrollen von allen Laborvergleichsteilnehmern bei den Versuchen mit dem Boden „Iserlohn“ (Frondanzahl)

	RWTH Aachen	UFZ Leipzig	ECT Flörsheim
Mittlere μ [d^{-1}]	0,39	0,342	0,373
Variationskoeffizient [%]	5,29	5,87	3,65
Standardabweichung	0,02	0,02	0,013

Tabelle VII - 29: Vergleich der Kontrollen von allen Laborvergleichsteilnehmern bei den Versuchen mit dem Boden „IMA SM 66“ (Frondanzahl)

	RWTH Aachen	UFZ Leipzig	ECT Flörsheim
Mittlere μ [d^{-1}]	0,409	0,339*)	0,354
Variationskoeffizient [%]	5,78	7,84*)	4,07
Standardabweichung	0,023	0,03*)	0,013

*) nur 1 Versuch

Die Mittelwerte der Variationskoeffizienten aller Böden wurden in einer Graphik zusammengefasst (s. Abbildung VII - 29).

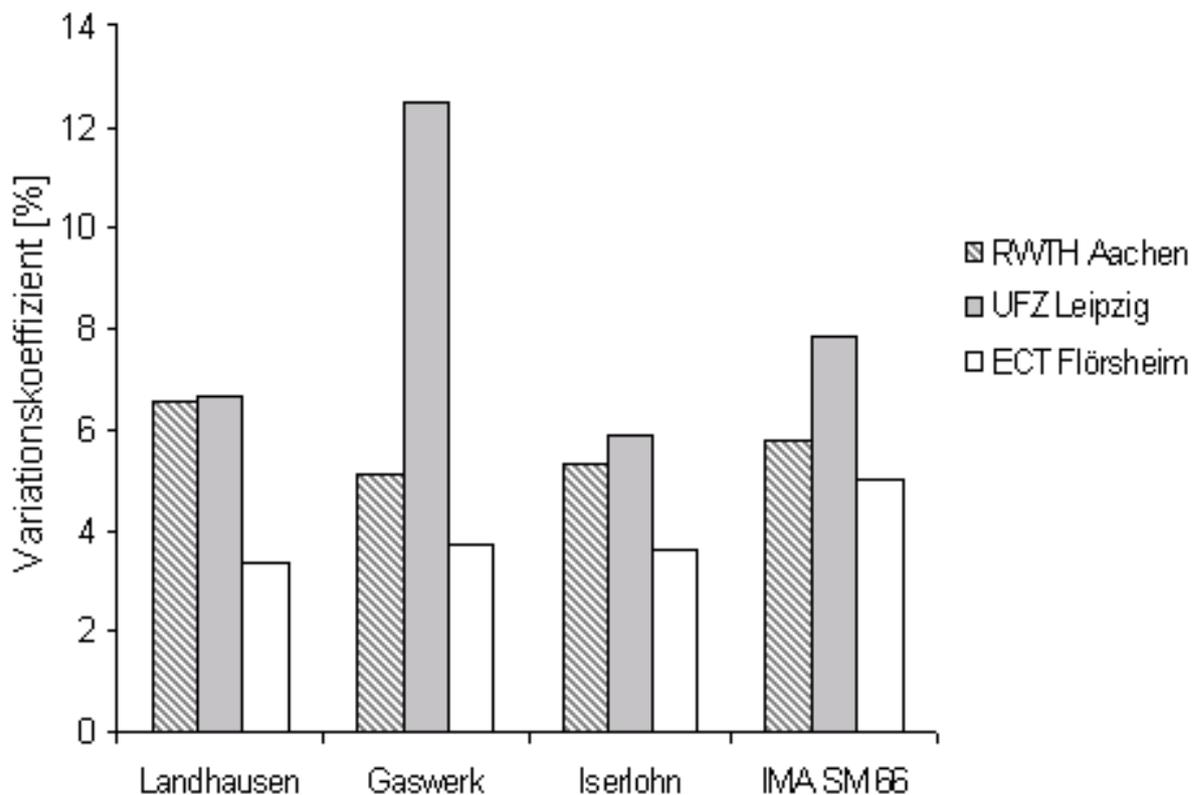


Abbildung VII - 29: Mittelwerte der Variationskoeffizienten der Kontrollen (Frondanzahl) aller Teilnehmer in den verschiedenen Bodenversuchen.

In dieser Graphik wird deutlich, dass die Variationskoeffizienten der Kontrollen in 11 von 12 Fällen deutlich unter 10 % liegen. Damit ist eine wichtige Voraussetzung erfüllt, die Toxizität der Böden richtig zu beurteilen. So können nämlich auch Hemmungen, die etwa 10 % betragen, als solche gewertet werden, ohne Gefahr zu laufen, dass es sich dabei nur um Schwankungen im biologischen Rahmen handelt. Je gleichmäßiger die Kontrollen wachsen, umso klarer werden dadurch die Ergebnisse der Testansätze. Zum Vergleich zeigt die nächste Graphik die Variationskoeffizienten der Frondflächen.

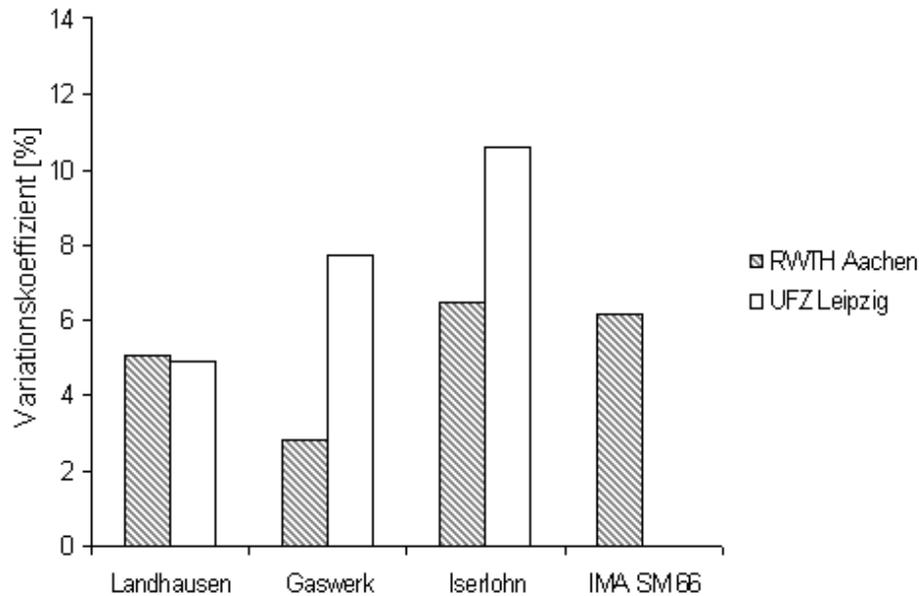


Abbildung VII - 30: Mittelwerte der Variationskoeffizienten der Kontrollen (Frondfläche) von Bio V und UFZ in den verschiedenen Bodenversuchen.

Bei dieser Auftragsung konnten nur die Variationskoeffizienten der RWTH Aachen und des UFZ Leipzig verwendet werden, da am ECT Flörsheim keine Flächenauswertung möglich ist. Die Streuung der Kontrollwerte und somit die Variationskoeffizienten sind bei der Flächenauswertung z. T. etwas größer, da die Anfangswerte der Flächen stärker schwanken als bei der Frondanzahl. Dies liegt daran, dass zu Testbeginn genau 12 (RWTH) bzw. 9 (UFZ) Fronds eingesetzt werden, aber diese sich in ihrer Größe unterscheiden. Zwar sollte darauf geachtet werden, dass die Fronds in etwa alle dieselbe Größe besitzen, aber eine gewisse Schwankung ist immer vorhanden.

VII - 5.9 Verdünnungsstufe und Empfindlichkeiten gegenüber Bodenkontaminationen

Mit Hilfe der folgenden Untersuchungen soll die Frage geklärt werden, welche Bodenbelastungen als sicher toxisch erkannt werden (Biologische Bestimmungsgrenze).

Hierbei muss berücksichtigt werden, dass das Elutionsverfahren so angelegt wurde, dass es die Verhältnisse in der Bodenlösung möglichst realistisch abbildet (IUCT 2000). Dazu wurden 14 Bodenproben, die nach der chemischen Analytik sehr unterschiedlich stark belastet sind, in der Verdünnungsstufe 1, 2 und 4 getestet und bei Verdünnungsstufe 1 noch drei unbelastete Böden mitgeführt.

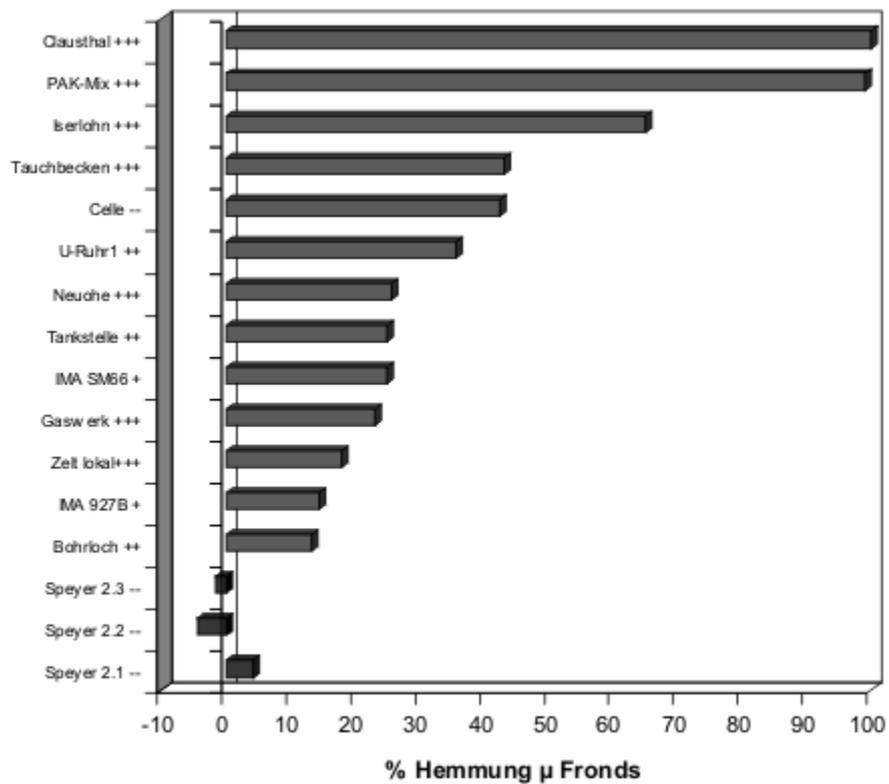


Abbildung VII - 31: Hemmung verschieden belasteter und unbelasteter Böden in einer Konzentration von 900 mL/L gegenüber der Medienkontrolle. Die Kontaminationshöhe wird gekennzeichnet durch +++: sehr hoch, ++: mäßig hoch, +: gering und --: unbelastet. Die 10%-Hemmschwelle ist durch eine Linie gekennzeichnet.

Die Abbildung VII - 31 zeigt eine Rangfolge der Böden, die mit Hilfe des Wasserlinsentests ermittelt wurde. Die sicher unbelasteten Böden Speyer 2.2 und 2.3 weisen im Eluattest eine Förderung der Wachstumsrate gegenüber der Medienkontrolle auf. Ein solcher Fördereffekt wird für keinen der belasteten Böden beobachtet. Der geringfügige Hemmung des Bodens Speyer 2.1 liegt noch im Rahmen der biologischen Streuung unterhalb der 10 % Grenze der ISO Draft. Die ermittelte Rangfolge spiegelt nicht exakt die Belastungshöhe wider, die mit Hilfe der chemischen Analytik festgestellt wurde (Einstufung durch IUCT). „Celle Hintergrund“ gilt als unbelastet, weist aber trotzdem eine Hemmung von 42,5 % auf.

Auf die mäßig belasteten Böden mit den Schadstoffklassen Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe „Bohrloch“ und Kohlenwasserstoffe (IMA 927B) folgt der Boden „Zell“, der laut IUCT lokal sehr hoch mit BTX-Aromaten belastet ist. Diese Verbindungen sind sehr flüchtig, so dass schon beim Transport in den Plastiktüten und Pappkartons zu Verlusten kommen konnte. Darüber hinaus ist es wahrscheinlich, dass bereits während der Siebung und Homogenisierung ein beachtlicher Anteil der flüchtigen Stoffe entwichen ist. Trotzdem wird der Boden bei Verdünnungsstufe 1 als toxisch eingestuft.

Durch die chemische Analytik nicht erkannt und erklärt ist die relativ hohe Hemmung von 25 % des Bodens „IMA SM66“, der laut IUCT als saniert gilt und nur noch geringe Mengen an Kohlenwasserstoffen enthalten soll (170,5 mg/kg).

Die stärkste Hemmung wird durch die Böden „Clausthal“ (TNT-Kontamination) und „PAK-Mix“ (PAK-Belastung) verursacht. Die hohe Schadwirkung des Bodens „Clausthal“ ist einerseits mit einer hohen Sensitivität der Wasserlinsen gegenüber 2,4,6-Trinitrotoluol und anderen Nitroaromaten, andererseits mit extrem hohen Konzentrationen dieser Substanzen in Altlasten zu erklären.

Für Böden, die bei G1 eine Hemmung zwischen 10 und 20 % hervorrufen sollte nach Überprüfung des Variationskoeffizienten der Kontrolle auf alle Fälle G2 getestet werden um eine Toxizität abzusichern. Tritt die Hemmung nur in G1 auf, sollte der Boden als auffällig bezeichnet werden.

Diese sehr breite Übersicht von Böden mit qualitativ und quantitativ sehr unterschiedlichen Kontaminationen vermeidet genau die methodischen Schwächen, die bei einem Validierungsversuch mit mehrheitlich hochkontaminierten Böden entstehen.

So kann für den Wasserlinsentest nicht nur klar gezeigt werden, dass die hoch kontaminierten Böden (bis auch Gaswerk 1: 2 als auffällig) immer sicher als toxisch erkannt werden. Auch schwächer kontaminierte Böden wie IMA 927b, Bohrloch und Tankstelle werden im klaren Unterschied zu den sicher unbelasteten Speyer-Böden als auffällig eingestuft. Böden wie Zelt lokal werden als eindeutig toxisch eingestuft, obwohl die chemische Analytik hier nur eine MKW Kontamination (MW 94,9 mg/kg) angibt.

Besonders ausgeprägt ist die Leistung gerade der Pflanzentests beim Boden Celle, der aufgrund seiner chemischen Analyse als Verdünnungsboden für den Boden Neuohse verteilt wurde, im Wasserlinsentest genauso wie im Aufwuchstest (TV 8) aber zu massiven Hemmungen führte. Die Ursache dafür konnte im Rahmen des Projektes chemisch nicht geklärt werden. Dies spielt aber auch keine Rolle, da sich hier auf das Beste gezeigt hat, wie eine Biotestbatterie mit höheren Pflanzen auch völlig unerwartete Resultate valide und sich gegenseitig absichernd erzeugen kann.

Damit haben die Arbeiten am Wasserlinsentest durch die Untersuchung der breiteren Bodenanzahl und den Verzicht auf die Testung höchstbelasteter Böden wie Sickergraben, Neuohse und PAK-Mix einen deutlichen zusätzlichen Erkenntnisgewinn für die Einsetzbarkeit und Validität des Testsystems Wasserlinse gebracht und stellen damit keine Einschränkung der Bewertungsgrundlage dar.

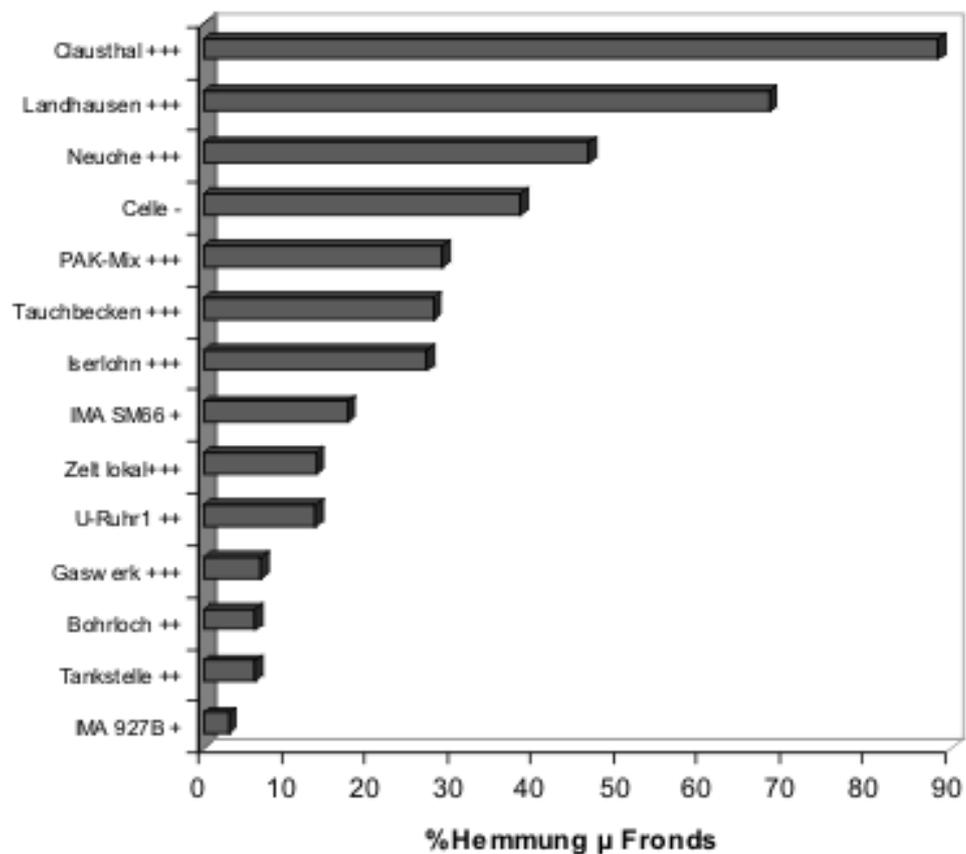


Abbildung VII - 32: Hemmung verschieden belasteter und unbelasteter Böden in einer Konzentration von 500 mL/L gegenüber der Medienkontrolle. Die Kontaminationshöhe wird gekennzeichnet durch +++: sehr hoch, ++: mäßig hoch, +: gering und --: unbelastet. Die 10 und 20 %ige-Hemmschwellen sind durch Linien gekennzeichnet.

Im Vergleich zur Abbildung VII - 31 sind in dieser Graphik die Hemmwirkungen der Bodenproben in der Verdünnungsstufe 2 aufgetragen. Eine 20 %ige Hemmung als Wirkschwelle zu nehmen, würde bei diesen kontaminierten Bodenproben bedeuten, dass einige hoch belastete Böden aus einer Risikobewertung herausfallen würden (siehe rote Linie).

Der Boden IMA 927 B hat bei G2 eine Hemmung deutlich unter 10 % muss also als auffällig, aber nicht als toxisch bezeichnet werden. Das gleiche gilt für die Böden Gaswerk, Tankstelle und Bohrloch.

Dagegen sollten alle Böden, die bei Verdünnungsstufe 2 mindestens 10 % Hemmung aufweisen, als toxisch eingestuft werden.

Dies ist auch in strikter Übereinstimmung mit den Vorgaben der Elutionsmethode, die genau das Ziel hatte, die Konzentrationen in der Bodenlösung möglichst realistisch wiederzugeben.

Wenn also Pflanzen, die mit der so simulierten Bodenlösung signifikanten Schaden erleiden muss der Boden als toxisch eingestuft werden.

Damit grenzt sich der Wasserlinsentest z. B. vom Leuchtbakterientest ab, bei dem eine Hemmung bei niedriger Verdünnung nicht als Effekt gewertet wird.

Werden die Ergebnisse der Bodenproben in einer Konzentration von 250 mL/L aufgetragen, ergibt sich folgendes Bild.

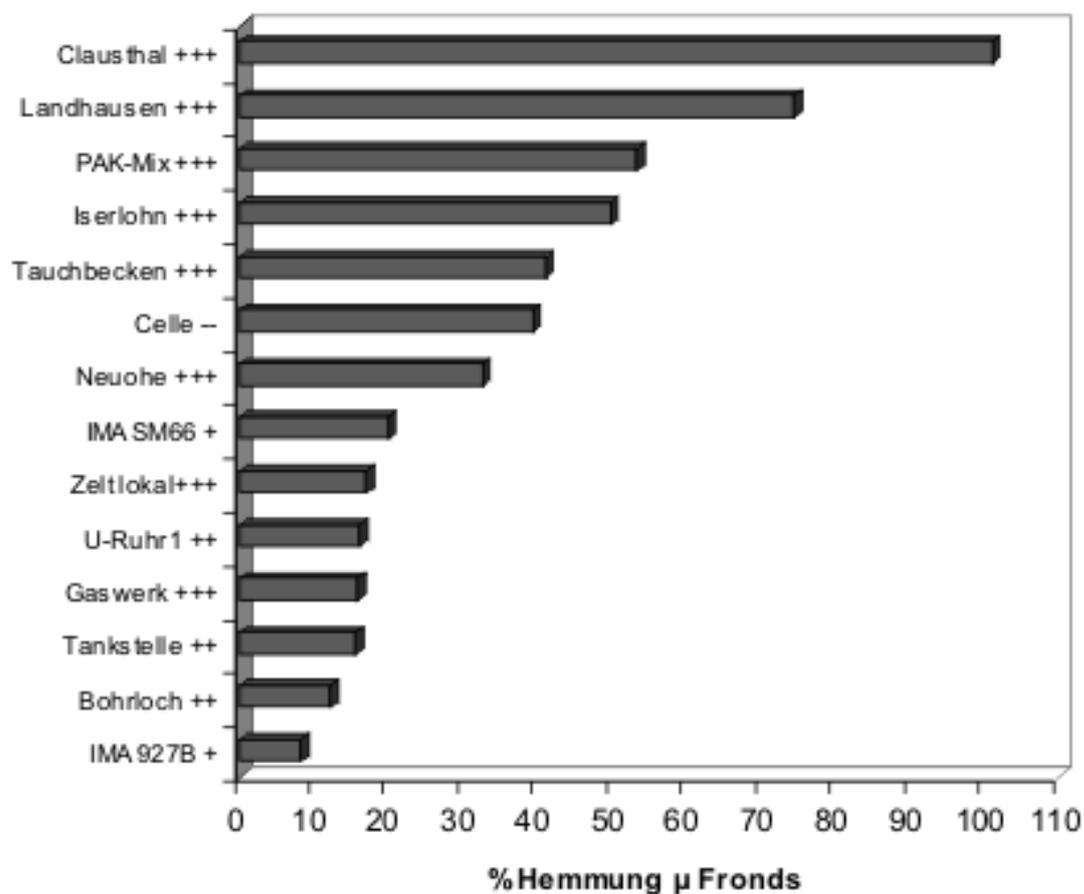


Abbildung VII - 33: Hemmung verschieden belasteter und unbelasteter Böden in einer Konzentration von 250 mL/L gegenüber der Medienkontrolle. Die Kontaminationshöhe wird gekennzeichnet durch +++: sehr hoch, ++: mäßig hoch, +: gering und --: unbelastet. Die 10 %-Hemmschwelle ist durch eine Linie gekennzeichnet.

Wie die obige Auftragung der Hemmungen zeigt, ist eine Konzentration von 250 mL/L zu schwach, um die Toxizität eines Bodens zu bewerten. Aber hier wird deutlich, dass noch drei der vier Böden aus dem Laborvergleichstest eine Hemmung der Wachstumsrate der Frondanzahl über 10 % erzeugen. Böden, die in Verdünnungsstufe 4 noch mehr als 10 % Hemmung hervorrufen, sollten als mittel bis hoch belastet eingestuft werden.

Hochbelastete Böden wie Clausthal und Landhausen überschreiten die 10 %-Schwelle schon bei Verdünnungsstufe 64.

VII - 5.10 Übereinstimmung der Toxizitätsklassifizierung des Wasserlinsentests mit den Bodentests

Um einen generellen Überblick über die Empfindlichkeit der verschiedenen Testsysteme bietet sich, bedingt durch die uneinheitliche Auswertungsmethodik nur die Toxizitätsklassifizierung (ja/ nein) an. Bei einer Gesamtschau aller Testsysteme ist es hier wichtig, den Wasserlinsentest entsprechend einzuordnen.

Tabelle VII - 30: Vergleich des Wasserlinsentest mit den terrestrischen Testsystemen (Aufstellung aus Teilvorhaben 8, Kapitel VIII – 6.2 Tabelle VIII - 17) mit den Wasserlinsentests ergänzt. + bezeichnet einen im Wasserlinsentest als auffällig klassifizierten Boden.

Testboden	Nematode	Regenwurm	Collembola	Enchytraee	Pflanze (Boden)	Wasserlinse
Landhausen	+	+	+	+	+	+
Iserlohn	-	+	+	-	+	+
Gaswerk 1:2	+	+	+	+	+	+/-
PAK-Mix	+	+	+	+	+	+
Sickergraben	+	+	+	+	+	+
Neuohe	-	+	-	+	+	+
IMA SM 66	-	-	-	-	-	+
IMA 927B	-	+	-	+	-	+/-

Gemeinsam mit Regenwurm, Enchytraee und den Pflanzenaufwuchstests gehört der Wasserlinsentest auch bei diesem Vergleich eindeutig in die Spitzengruppe der empfindlichsten Testsysteme, wie auch bei den aquatischen Systemen.

Alle 8 Böden wurden als auffällig (2) oder toxisch (6) klassifiziert. Auch hier gilt, dass eine abschließende Klassifikation nach Verwendungszweck dem Gesetzgeber vorbehalten bleibt. Die hier gezeigte Minimalklassifizierung gibt gerade bei den schwach belasteten Böden die Ergebnislage nur unzureichend wieder, da z. B. auch im Pflanzentest (Teilvorhaben 8) Auffälligkeiten bei den IMA Böden gefunden wurden. Ein Detailvergleich muss jedoch im entsprechenden Teil des Gesamtvorhabens vorgenommen werden. Dies ist besonders wichtig für die Frage, inwieweit die einzelnen Testsysteme auch schwach kontaminierte Böden erkennen.

VII - 6 Literatur

- AFNOR (1996), Determination of the inhibitory effect on the growth of *Lemna minor* XP T 90-337
- APHA (1992), Toxicity Part 8000 8-32-8-39 in: Standard methods for the examination of water and wastewater 18th ed., APHA, AWWA, WEF, Washington
- ASTM (1991), Conducting static toxicity tests with *Lemna gibba*. Guide E 1415-91. Annual book of ASTM standards. Section 11 Water and environmental technology. Vol. 11.04. ASTM, Philadelphia
- Cleuvers M., Ratte H.T. (1999), Assessment of the phytotoxicity of coloured substances with different test species. Poster zur SETAC-Tagung in Leipzig 1999
- DIN-Arbeitskreis „Bioteste“ (2000), Entwurf der DIN-Norm „Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser und Wasserinhaltsstoffen auf Wachstum und Vermehrung von Wasserlinsen (*Lemna minor*, *Lemna gibba*)“
- Environment Canada (1998), Biological test method: test for measuring the inhibition of growth using the freshwater macrophyte *lemna minor*, Report EPS 1/RM/37
- EPA (1996), Ecological effects test Guideline OPPTS 850.4400 Aquatic plant toxicity test using *lemna* ssp., Tiers I and II, EPA 712-C-96-156
- Fraunhofer Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie (1999), Mitteilung an die Teilnehmer des Ringtests "Validierung von Testsystemen für die Beurteilung der Bodenqualität"
- ISO/CD 15799 (1999), Soil quality – Guidance on the ecotoxicological characterization of soil and soil materials
- ISO/CD 20079 (2001), Water quality – Determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test ISO/CD 20079, ISO TC 147/SC 5 N
- Mennicken G. (2000), Diplomarbeit: "Untersuchung repräsentativ belasteter Böden mit Hilfe des Wasserlinsentests und nachfolgender bildanalytischer Auswertung zur Entwicklung einer ökotoxikologischen Testbatterie im Rahmen des Bodenschutzgesetzes"
- Nusch E.A. (1992), Grundsätzliche Vorbemerkungen zur Planung, Durchführung und Auswertung biologischer und ökotoxikologischer Testverfahren. Biologische Testverfahren-Beiträge zu den Biotest-Statusseminaren 1989 und 1992, herausgegeben von K.G. Steinhäuser und P.D. Hansen
- OECD test guideline (draft) (1999a), Guideline: Lemna growth inhibition test

OECD-draft guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances (1999b),
OECD Environmental Health and Safety publications

Reuter I. (1999), Diplomarbeit: !Optimierung des Wasserlinsentests zum Einsatz im Rahmen
des Bodenschutzgesetzes und bildanalytischer Auswertung der Messendpunkte“

Scheffer F., Schachtschabel P. (1970), „Lehrbuch der Bodenkunde“, 7. Auflage, Ferdinand
Enke Verlag Stuttgart

SIS 1995, Swedish Institute of Standards, Water quality – determination of growth inhibition
(7-d) Lemna minor), duckweed SS 02 82 13

Taraldsen J.E., Norberg-King T.J. (1990), New method for determining effluent toxicity using
duckweed (Lemna minor). Environmental Toxicity and Chemistry, Vol. 9, pp. 761-767

Wang W. (1990), Literature review on duckweed toxicity testing, Environmental research 52,
7-22

Kapitel VIII

Teilvorhaben 6: Pflanzentest

Teilprojektleiter

Dr. J. Römbke
Dr. W. Kalsch
ECT Oekotoxikologie GmbH
D-65439 Flörsheim

Partner

Prof. Dr. B-M. Wilke
Dipl.-Biol. B. Winkel
TU Berlin, Institut für Ökologie
D-14195 Berlin

Dr. F. Riepert
Biologische Bundesanstalt für Land- und
Forstwirtschaft
D-14195 Berlin

Technische Assistenz

Elke Kugies
Heike Steigert
Mandy Tauscher
ECT Oekotoxikologie GmbH

Silvia Baas
Biologische Bundesanstalt für Land- und
Forstwirtschaft

Ruth See
TU Berlin

Berichtserstellung

Hans-Joachim Schallnass
ECT Oekotoxikologie GmbH

Inhaltsverzeichnis:

VIII - 1	EINLEITUNG	5
VIII - 2	STAND VON WISSENSCHAFT UND TECHNIK	6
VIII - 2.1	Vorhandene Pflanzentests zur Beurteilung von Chemikalien und Böden	6
VIII - 2.2	Vorstellung der DIN ISO-Norm 11269-2	7
VIII - 2.3	Probleme und Defizite	8
VIII - 2.3.1	Auswahl der zu testenden Spezies	8
VIII - 2.3.2	Substrat	10
VIII - 2.3.3	Positivkontrolle	10
VIII - 2.3.4	Lagerung	10
VIII - 2.3.5	Messendpunkte	11
VIII - 3	MATERIAL UND METHODEN	12
VIII - 3.1	Böden	12
VIII - 3.1.1	Referenz- bzw. Kontrollböden	12
VIII - 3.1.2	Testböden	13
VIII - 3.1.3	Lagerung und Behandlung der Böden	13
VIII - 3.2	Testpflanzen	13
VIII - 3.3	Materialien	14
VIII - 3.4	Inkubationsbedingungen	14
VIII - 3.5	Testansatz	15
VIII - 3.6	Messungen während der Prüfung	16
VIII - 3.7	Auswertung	16
VIII - 3.8	Positivkontrolle	17
VIII - 3.9	Zusätzliche Tests	18
VIII - 3.10	Übersicht über die Versuchsansätze	20
VIII - 4	ERGEBNISSE	22
VIII - 4.1	Tests mit kontaminierten Böden	22
VIII - 4.1.1	Landhausen	22
VIII - 4.1.2	Iserlohn	24
VIII - 4.1.3	Gaswerk	26
VIII - 4.1.4	Sickergraben	28

VIII - 4.1.5	PAK-Mix	29
VIII - 4.1.6	Neuohe	31
VIII - 4.1.7	IMA SM 66	33
VIII - 4.1.8	IMA 927B	35
VIII - 4.2	Statistischer Vergleich von Test- und Kontrollböden.....	37
VIII - 4.3	Zusätzliche Tests.....	38
VIII - 4.3.1	Parametervergleich Auflauf / Wachstum	38
VIII - 4.3.2	Wurzellängentests mit Hafer.....	41
VIII - 4.3.3	Vergleich von Test- und Referenzböden (Celle)	44
VIII - 4.3.4	Anzahl von Wiederholungen in den Kontrollen.....	46
VIII - 4.4	Positivkontrolle.....	49
VIII - 4.4.1	Tests mit der Stoppelrübe.....	49
VIII - 4.4.2	Tests mit Hafer.....	50
VIII - 4.4.3	Statistische Auswertung der Versuche des Partners BBA	51
VIII - 5	DISKUSSION	52
VIII - 5.1	Streubreite der Ergebnisse	52
VIII - 5.2	Einfluss der Kontrollböden auf das Wachstum der Pflanzen	52
VIII - 5.3	Vergleich der Empfindlichkeit der beiden Testspezies.....	53
VIII - 5.4	Vergleich der Ergebnisse der drei Partner	54
VIII - 6	DER PFLANZENTEST VERGLICHEN MIT ANDEREN TESTSYSTEMEN.....	56
VIII - 6.1	Generelle Beurteilung	56
VIII - 6.2	Die Sensitivität des Pflanzentests.....	58
VIII - 7	KONSEQUENZEN FÜR DIE STANDARDISIERUNG	59
VIII - 7.1	Dochtbewässerung	59
VIII - 7.2	Validitätskriterien.....	60
VIII - 7.3	Bezugsgrößen.....	60
VIII - 7.4	Positivkontrolle.....	60
VIII - 8	ZUSAMMENFASSUNG	62
VIII - 8.1	Generelle Schlussfolgerung:.....	63
VIII - 9	LITERATUR	64

VIII - 1 Einleitung

Ziel des Vorhabens war es, den 1995 von der ISO verabschiedeten Pflanzen-Akutttest dahingehend zu modifizieren, dass seine Nutzung für die Beurteilung der Bodenqualität in einem (internationalen) Ringtest überprüft werden kann. Dieser Ringtest ist eine wichtige Voraussetzung für eine formale Validierung, z.B. anhand der Vorgaben der OECD. Konkret sollten dazu Proben von insgesamt 8 Standorten mit unterschiedlicher Belastung in den drei beteiligten Laboratorien getestet werden, wobei jeweils verschiedene Mischsubstrate und Kontrollböden eingesetzt wurden. Folgende Fragen standen dabei im Mittelpunkt des Interesses:

- Unterscheiden sich die Ergebnisse in Abhängigkeit vom verwendeten Misch- bzw. Kontrollsubstrat ?
- Werden kontaminierte wie unkontaminierte Proben korrekt erkannt ?
- Wie stark differieren die Ergebnisse bei den einzelnen Labors ?
- Bewähren sich die Modifizierungen der ISO-Norm (z.B. die Positivkontrolle) ?

Des Weiteren interessierten alle Erfahrungen, die für die Durchführung eines (internationalen) Ringtests wichtig sein können. Dies sind z.B. die folgenden Punkte:

- Welche Art der Auswertung (z.B. statistische Prüfung, Mischungsbeurteilung oder Grenzwertsetzung) ist zu empfehlen?
- Wie kann die Lagerung von zu beurteilenden Bodenproben optimiert werden ?
- Kann der Wurzellängentest nach ISO-Norm 11269-1 eine Alternative zum hier primär verwendeten Wachstumstest (ISO 11269-2) sein?

Die Ergebnisse der praktischen Versuche und die in den drei Laboratorien gemachten Erfahrungen sollen ihren Niederschlag in einem Vorschlag für eine überarbeitete Fassung der DIN ISO Norm 11269-2 finden. Beteiligte Partner waren:

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (Berlin)
(im Folgenden abgekürzt als BBA bzw. als Partner 1).

ECT Oekotoxikologie GmbH (Flörsheim)
(im Folgenden abgekürzt als ECT bzw. Partner 2)

Technische Universität Berlin, Institut für Ökologie (vormals Institut für Landschaftsentwicklung (Berlin)
(im Folgenden abgekürzt als TUB bzw. Partner 3)

VIII - 2 Stand von Wissenschaft und Technik

VIII - 2.1 Vorhandene Pflanzentests zur Beurteilung von Chemikalien und Böden

Im Vergleich zum aquatischen Medium gibt es bisher nur relativ wenige ökotoxikologische Testverfahren mit Produzenten für das Kompartiment Boden (BOUTIN et al. 1995). Lange Zeit war die OECD Richtlinie 208 „Terrestrial Plants, Growth Test“ (OECD 1984b) neben dem Regenwurmtest praktisch das einzige ökotoxikologische Testverfahren, mit dem das Gefährdungspotential von Chemikalien für Bodenorganismen abgeschätzt wurde. In den Achtziger Jahren wurden weitere Testsysteme mit Pflanzen entwickelt, bei denen es sich meist um Modifikationen des OECD-Tests handelte (z.B. GÜNTHER & PESTEMER 1990, MARSCHNER 1992). Die wichtigste dieser modifizierten Richtlinien ist die von der ISO 1995 verabschiedete Norm „Soil quality Determination of the effect of pollutants on soil flora – Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants“; nicht zuletzt weil sie in einem Anhang auch auf die Testung potentiell kontaminierter Böden eingeht. Außerdem liegt eine Vielzahl von Pflanzentest-Vorschlägen in wässrigen Substraten vor, in denen häufig die Biomasse bzw. die Wurzelausprägung als Testparameter verwendet werden (Übersicht in KEDDY et al. 1992, PFLEEGER et al. 1991).

Unter den Akut-Tests mit Pflanzen ist neben dem OECD-Verfahren (1984b) und seinen Modifikationen (z.B. BBA 1984, ISO 1995, DIN ISO 1997) in diesem Zusammenhang vor allem das für die Beurteilung von Altlasten entwickelte Verfahren von GREENE et al. (1989) zu erwähnen. Dabei wird die Keimung von Kopfsalatsamen (*Lactuca sativa*) in mit belastetem Boden gefüllten Blumentöpfen über einen Zeitraum von 5 Tagen untersucht, wobei Quarzsand als Verdünnungsmedium benutzt wird, um die LC₅₀ bestimmen zu können. Ebenfalls für die Evaluierung von Altlasten schlagen WOLF-SCHWENNIGER & SCHWENNIGER (1994) einen Pflanzenwuchstest auf der Grundlage des OECD-Tests vor, wobei sie allerdings neben Spinat und Rotklee Wildpflanzen wie Kamille, Kleine Brennessel und Weidelgras einsetzen.

Auch die Toxizität von Bodenproben gegenüber Pflanzen (z.B. Gurken- (*Cucumis sativus*) und Rettich-Arten (*Raphanus sativus*) sowie Bohnen (*Phaseolus vulgaris*)) wurde bisher nur in Akut-Tests evaluiert (SIMINI et al. 1995, VAN ASSCHE & CLIJSTERS 1990, ISO 1994). Allerdings nimmt die Nutzung von Pflanzen für die Beurteilung kontaminierter bzw. sanierter Böden in jüngster Zeit zu (z.B. MEIER et al. 1997). Dafür sind nicht zuletzt einige generelle Empfehlungen zur Beurteilung potentiell kontaminierter bzw. sanierter Böden verantwortlich (Deutschland: DECHEMA, 1995; Kanada: KEDDY et al., 1995). Eine von der DECHEMA durchgeführte Zusammenstellung der Testsysteme, die im Rahmen der Bodenbeurteilung neben Deutschland in Belgien, Dänemark und den Niederlanden verwendet werden, zeigte, dass auch in diesen Ländern Tests mit Pflanzen angewendet werden. Im Rahmen des

BMBF-Vorhabens „Ökotoxikologische Testbatterien – Teilvorhaben 6“ wurde analog zu den Vorgaben der ISO ein chronischer Pflanzentest entwickelt, bei dem Reproduktionsparameter als Endpunkt verwendet werden (KALSCH et al. 2000). Einen aktuellen Überblick über den Stand der Nutzung von Pflanzentests bei der Bodenbeurteilung geben RIEPERT et al. (2000).

Bisheriger Endpunkt der Nutzung von Pflanzen in standardisierten Labortests ist die Neufassung des OECD-Tests No. 208 (OECD 2000), der dabei in einen Voraufauftest (No. 208A) für Chemikalien allgemein, in dem die Pflanze über den Boden exponiert wird, und einen Nachaufauftest (No. 208B), primär für Pflanzenschutzmittel, unterteilt wurde. Wichtigste Neuerung ist die Erhöhung der Zahl der zu testenden Pflanzen in Abhängigkeit von der zu testenden Substanz: bei Pflanzenschutzmitteln sind es 6 – 10 (z.B. zwei monokotyledone und 4 – 6 dikotyledone Arten) und bei Umweltchemikalien 3 (eine monokotyledone und 2 dikotyledone Arten aus drei Familien). Für letztere können dabei neben natürlichen Böden auch künstliche Testsubstrate wie Mineralwolle oder gewaschener Quarzsand verwendet werden.

VIII - 2.2 Vorstellung der DIN ISO-Norm 11269-2

In der folgenden tabellarischen Darstellung sind die wichtigsten Details des ISO-Pflanzentests dargestellt, der in diesem Vorhaben als Grundlage benutzt wurde. Vor der Fertigstellung der Norm wurde diese in Hinsicht auf eine mögliche Nutzung zur Bodenbeurteilung nicht durch einen (internationalen) Ringtest validiert. Daher sind die für die Nutzung zur Bodenbeurteilung wesentlichen Punkte (z.B. Spezies, Substrat, Kontrolle, Lagerung) im Anschluss getrennt zu diskutieren.

Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora Teil 2: Wirkungen von Schadstoffen auf Saataufbau und Wachstum höherer Pflanzen (ISO 11269-2: 1995)

Prinzip:	Labortest zur Bestimmung der Auswirkungen von Chemikalien auf das Auflaufen und das Wachstum verschiedener höherer Pflanzen
Richtlinie/Norm:	DIN ISO 11269-2: 1997-10
Testspezies:	Eine mono- und eine dikotyledone Art, die aus einer Liste von 15 Nutzpflanzenspezies auszuwählen sind; Herkunft nicht spezifiziert
Testansatz:	Zehn Samen pro Testgefäß (Töpfe ca. mit einem internen Durchmesser von 8,5 - 9,5 cm, gefüllt mit ca. 500 g TG Boden); tägliche Kontrolle zur Aufrechterhaltung der je nach Spezies unterschiedlichen Feuchtigkeit; Ausdünnen der Keimlinge (von 10 Samen auf 5 Pflanzen)

Substrat:	Jeder Boden, der die folgenden Bedingungen erfüllt: $C_{org} < 1,5\%$ ($< 3\%$ org. Gehalt), feine Partikel $< 20\%$ TG; pH-Wert: 5 - 7,5. Natürliche Böden können dazu mit Sand gestreckt werden.
Parameter:	Auflaufen und Biomasse von Keimlingen; visuelle Beurteilung phytotoxischer Effekte (z.B. Chlorosen)
Dauer:	Versuchsende frühestens 14 Tage und spätestens 21 Tage, nachdem 50 % der Kontrollkeimlinge aufgelaufen sind
Applikation:	Variabel, je nach Expositionssituation; allerdings ohne Verwendung von oberflächenaktiven Substanzen
Konzentration:	Vortest: 0, 1, 10, 100, 1000 mg/kg TG; Haupttest: ausreichende Serie zur NOEC-Bestimmung (Abstufungsfaktor von 2 bei 4 Wiederholungen)
Durchführung:	Sicherstellung des "normalen" Wachstums durch Haltung im Phytotron o.ä.: Licht 7000 lux Minimum bei einem Zyklus von 16 : 8 h; Temperatur: variabel je nach Spezies; Bodenfeuchte: 60 – 80 % WK_{max}
Referenzsubstanz:	Natrium-Trichloracetat
Validität:	Kontrolle: Fünf gesunde Keimlinge pro Topf sollten auflaufen.
Auswertung:	Statistische Bestimmung von NOEC- und LOEC-Werten
Besonderes:	Auch für die Beurteilung der Bodenqualität einsetzbar

VIII - 2.3 Probleme und Defizite

Wie im vorigen Kapitel dargestellt, ist der ISO-Pflanzentest ein geeigneter Ausgangspunkt für die Beurteilung von potentiell kontaminierten Böden. Allerdings sind die folgenden Punkte vor der Durchführung eines Ringtests zu modifizieren bzw. zu konkretisieren: Spezies, Substrat, Positivkontrolle, Lagerung, Bewässerung.

VIII - 2.3.1 Auswahl der zu testenden Spezies

Zur Beurteilung einer möglichen Gefährdung sind aus der Vielzahl der potentiell in Frage kommenden Pflanzenarten Testspezies auszuwählen, die stellvertretend für alle übrigen Pflanzen im Labor untersucht werden können. Dabei ist zu beachten, dass Pflanzen hier als Teil der Bodenbiozönose angesehen werden; d.h. in Hinsicht auf die Beurteilung der „Funktion des Bodens als Lebensraum Bodenorganismen“ und nicht in Hinsicht auf den „Boden als Standort für Nahrungspflanzen“ (BBodSchG 1998). Neben den allgemein für die Identifikati-

on von Testorganismen gültigen Kriterien (EDWARDS 1988; RÖMBKE et al. 1995) kommen bei Pflanzen noch zwei Punkte hinzu, die auf Bodenorganismen im engeren Sinne so nicht zutreffen:

- Aufgrund der wichtigen Rolle von Pflanzen als Nahrungsmittelproduzenten für den Menschen stehen Kulturpflanzen im Mittelpunkt des Interesses. Allerdings sprechen sowohl die Vielfalt als auch die fehlenden Kenntnisse über Wildpflanzen dazu, mögliche Testspezies aus der Menge der Kulturpflanzen auszuwählen. Allerdings bemängeln LYTLE & LYTLE (2001), dass Tests mit Kulturpflanzen nicht ausreichend sind, wenn spezielle Standorte oder Lebensgemeinschaften geschützt werden sollen.
- Die eben erwähnte Vielfalt des Pflanzenreichs (z.B. Blütenpflanzen, Moose, Farne, Algen) kann durch eine oder zwei Testspezies nicht abgedeckt werden. Daher bestand seit Beginn der Nutzung von Pflanzentests in der Ökotoxikologie die Übereinkunft, jeweils eine monokotyledone und eine dikotyledone Blütenpflanzenart als Repräsentanten der Pflanzen zu fordern. Dies gilt insbesondere, wenn höhere Pflanzen im Mittelpunkt des Interesses stehen.

In der ISO-Norm werden insgesamt 6 monokotyledone und 9 dikotyledone Arten als potentiell für den Test geeignet aufgelistet (in der neuen OECD-Richtlinie 208 sind es 11 bzw. 18 Arten). Aufgrund eigener Erfahrungen sowie Literaturangaben sollen unter Verwendung der oben genannten Kriterien die folgenden Arten verwendet werden:

Monokotyledone Art:	Hafer	<i>Avena sativa</i>
Dikotyledone Art:	Stoppelrübe	<i>Brassica rapa ssp. rapa</i>

Bei beiden Arten sind Kulturpflanzensorten zu verwenden, so dass durch diese Auswahl die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit Daten aus anderen Untersuchungen sichergestellt wird. Darüber hinaus sollte wegen der in der Vergangenheit mehrfach festgestellten relativ geringen Empfindlichkeit von Hafer als monokotyledone Alternative die Hirse (*Sorghum bicolor*) vom Partner TUB überprüft werden. Vorversuche ergaben, dass Hirse empfindlicher auf Schadstoffe reagierte, andererseits wurden Nachteile deutlich, die den Einsatz der Pflanze unmöglich machen. Dazu zählen:

- geringe Keimraten (30 – 50 %);
- Unverträglichkeit gegenüber hohen Wassergehalten bei Dochtbewässerung.

VIII - 2.3.2 Substrat

Grundsätzlich kommen für die Nutzung als Kontroll- bzw. Mischsubstrat die folgenden Optionen in Frage (aufgeführt in absteigender Wertigkeit; vgl. ISO 2000):

1. Unkontaminierter Freilandboden, der in seinen pedologischen Eigenschaften dem zu testenden Boden möglichst weitgehend entspricht (entweder vom belasteten Standort selbst oder einem anderen Entnahmeort).
2. Standard-Freilandboden (z.B. der Boden der LUFA Speyer 2.2)
3. „Kunsterde,, (z.B. OECD artificial soil nach OECD 207, OECD 1984a)
4. Inertes Bodenmaterial wie z.B. Quarzsand.

Da nicht damit zu rechnen ist, dass an den jeweiligen Entnahmestandorten der kontaminierten Bodenproben unbelastetes Kontrollsubstrat zur Verfügung stehen wird, soll im vorliegenden Projekt die zweite (und partiell dritte) Option umgesetzt werden: Jeder Testboden wird mit dem LUFA Speyer Boden 2.2 gemischt werden, der damit auch als Negativkontrolle dient. Zusätzlich wird, jeweils einmal in einem der beteiligten Laboratorien, ein weiterer Misch- bzw. Kontrollboden eingesetzt werden (vgl. Kap. VIII - 3.1). Damit sollte am Projektende eine Entscheidung darüber möglich sein, welche Empfehlungen für die zukünftige Nutzung dieser Norm (konkret im geplanten Ringtest) gegeben werden können.

VIII - 2.3.3 Positivkontrolle

Die in der Chemikalienbeurteilung übliche und sinnvolle Verwendung einer Positivkontrolle (d.h. die Testung einer Referenzsubstanz) ist bei der Bodenbeurteilung bisher selten angewandt worden. Im vorliegenden Projekt wird daher eine solche Positivkontrolle zusätzlich zu den belasteten und unbelasteten Bodenproben untersucht werden. Dazu wird eine Referenzsubstanz in mehreren noch zu bestimmenden Konzentrationen den jeweiligen Kontrollböden zugemischt. In der ISO-Norm (1994) wird als Referenzsubstanz Natrium-Trichloracetat vorgeschlagen. Nach Rücksprache mit der BBA Braunschweig ist aber zu prüfen, ob das Herbizid Goltix compact (Wirkstoff Metamitron) für diesen Zweck nicht besser geeignet ist.

VIII - 2.3.4 Lagerung

Teils vorab, teils parallel zur Testung der kontaminierten Böden werden Versuche zur Optimierung der Lagerung der Bodenproben durchgeführt werden. Primär für die Kontrollböden ist zu prüfen, ob Kühlung, Trocknung oder Frischlagerung (oder eine Kombination einzelner dieser Alternativen) zu empfehlen ist. Bis zum Ende dieser Versuche werden die zur Verfü-

gung gestellten kontaminierten Bodenproben bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, sofern keine anders gearteten Hinweise (z.B. zum jeweiligen Schadstoff) vorliegen.

VIII - 2.3.5 Messendpunkte

Üblicherweise wird als Messparameter das Frischgewicht der Pflanzen herangezogen (die Verwendung des Trockengewichts ist deutlich arbeitsaufwendiger ohne zugleich neue Information zu generieren (Price 1990; Gong et al. 2001). Allerdings ist es laut ISO-Norm möglich, statt des Endpunkts Wachstum auch den Auflauf der Pflanzen zu verwenden. Die Einbeziehung dieses Endpunktes geschah durch den Partner BBA.

Eine andere Möglichkeit zur Untersuchung der Wirkung von Schadstoffen ist die Messung der Wurzellänge. Wegen der deutlichen Ausbildung einer Hauptwurzel bei den Gräsern kam der sonst im Wachstumstest als eher unempfindlich geltende Hafer hierfür in Frage. Daher sollte von allen drei Partnern beispielhaft mit einem bis zwei Testböden diese Variante durchgeführt werden. Mit den Testböden Gaswerk und Sickergraben und den Kontrollböden LUFA bzw. Institutsboden wurden Wurzellängentests mit Hafer in Anlehnung DIN ISO 11269-1 durchgeführt. Die Versuchsdauer betrug 8 Tage nachdem 50 % der Keimlinge in der Kontrolle aufgelaufen waren.

VIII - 3 Material und Methoden

Mit Ausnahme des Wurzellängentests wurden alle Versuche auf der Grundlage der DIN ISO Norm 11269-2 durchgeführt.

VIII - 3.1 Böden

VIII - 3.1.1 Referenz- bzw. Kontrollböden

Für die Untersuchungen wurden von allen drei Partnern jeweils der Standardboden der LUFA 2.2 verwendet. Darüber hinaus setzte jedes Institut einen weiteren Kontrollboden ein (im Folgenden zusammen als „Institutsböden“ bezeichnet). Die physiko-chemischen Eigenschaften aller vier Böden sind aus Tabelle VIII - 1 ersichtlich. Darüber hinaus wird in dieser Tabelle eine zusätzlich in das Vorhaben aufgenommenen Kontrolle (Celle-Boden) charakterisiert. Dieser Boden sollte in seinen Eigenschaften dem Testboden Neuohe weitgehend gleichen.

Tabelle VIII - 1: Physiko-chemische Eigenschaften der Kontrollböden

Parameter / Partnerinstitut	LUFA 2.2	OECD-Kunsterde	BBA-Boden	Inst A Boden	Celle-Boden
	BBA, ECT, TUB	ECT	BBA	TUB	BBA, ECT, TUB
Bodenart	Schwach - lehmiger Sand (SI2)	Mischung: Sand, Torf, Kaolinit	Mittel-lehmiger Sand (SI3)	Schwach schluffiger Sand (Su2)	
Sand / Schluff / Ton-Verhältnis	78 : 15 : 7 %	76 : 0 : 24 %	70 : 17 : 9 %	72 : 25 : 3	
C _{org} [%]	2,19 ± 0,08	5,88	1,59 ± 0,02	0,6	1,7
N _r -Gehalt [%]	?	?	0,125	0,04	
C/N-Verhältnis			12,7	15	
pH-Wert (CaCl ₂)	5,8	6,0	6,7	5,9	
WHK _{max} [g/100 g TM]	50 ± 4		24,1	25,4	406

Während die beiden Berliner Institutsböden jeweils vom Partner ausgewählt, gelagert und weiterbehandelt wurden, musste die OECD-Kunsterde nach OECD 207 mit folgender Zusammensetzung hergestellt werden:

Torf (luftgetrocknet, feingemahlen):	10 %
Kaolin:	20 %
Quarzsand:	70 %

Nach gründlichem Mischen dieser Komponenten wird der pH-Wert mit CaCO_3 (0,3 – 1 %) auf $6,0 \pm 0,5$ eingestellt.

Wegen des schlechten Auflaufs bei Verwendung von BBA-Boden (feldfrisch) zur Abstreckung der Testböden wurde der 1. Versuch mit gelagertem BBA-Boden wiederholt. Alle Ergebnisse der Frischgewichtsbestimmung aus Kontroll-Versuchen von Partner 1 beziehen sich damit auf langjährig gelagerten BBA-Boden.

VIII - 3.1.2 Testböden

Als Testböden wurden von der Koordination acht Böden zur Verfügung gestellt. Drei der acht Böden (Landhausen, Iserlohn und Gaswerk 1:2) waren bereits in dem Ringtest der DBU „Ökotoxikologische Testmethoden für Böden“ eingesetzt worden. Die nähere Charakterisierung der Böden ist im Kapitel zur Bodencharakterisierung aufgeführt.

VIII - 3.1.3 Lagerung und Behandlung der Böden

Die Testböden und der LUFA-Kontrollboden (direkt von der LUFA Speyer bezogen) wurden entweder in einer Kühlzelle bei 4 °C oder einem kühlen Kellerraum gelagert. 4 – 5 Tage vor Versuchsbeginn wurden die Mischungen aus Test- und Kontrollböden hergestellt und die Mischungen mit einer Feuchte von 30 – 50 % der W_{kmax} im Kühlschranks bis Versuchsbeginn gelagert. Die Testböden wurden auf 5 mm gesiebt, während der LUFA-Kontrollboden mit 2 mm gesiebt angeliefert wurde. Die gleiche Partikelgröße hatte die OECD-Kunsterde. Die Böden wurden nicht getrocknet.

VIII - 3.2 Testpflanzen

Für die Tests wurden zwei höhere Pflanzenarten verwendet, eine monokotyle, Hafer (*Avena sativa* L.) und eine dikotyle, Stoppelrübe (*Brassica rapa ssp. rapa* (DC.) var. weiße runde rotköpfige). Das Saatgut wurde im Saatguthandel beschafft. Vor ihrer Verwendung wurde das Keimpotential des Saatguts bei 20 ± 1 °C und Tageslicht geprüft. Keimraten zwischen 90 und 100 % wurden dabei bei beiden Arten erzielt.

VIII - 3.3 Materialien

- Testgefäße: Plastikgefäße der Größe 108 x 81 mm (oben), x 100 mm (Höhe), z.B. Polystyrolbecher, Bellaplast 507 (ECT), Töpfe der Größe 80 x 80 X 70 mm (BBA) bzw. Kunststofftöpfe (PP) mit einem oberen Durchmesser von 9 cm und einer Höhe von 7 cm (TUB)
- Wasserreservoir: Plastikgefäße der Größe 135 x 184 x 60 mm zur Aufnahme von jeweils zwei Pflanzgefäßen, z.B. Polystyrolschalen, Bellaplast 590 (ECT), Schalen der Größe 43 x 35 x 7 cm (Photoschalen) (BBA) oder Weckgläser (TUB).
- Glasfaserdochte, z.B. Silan 11 mm (ECT), Glasfasern \varnothing 1mm (BBA, TUB).

VIII - 3.4 Inkubationsbedingungen

Die Testgefäße wurden in bei den drei Partnern unter leicht unterschiedlichen Bedingungen während der Versuche inkubiert:

BBA: temperatur- und feuchtegeregelte Klimakammer mit einer Beleuchtungsdauer von 16 h (Osram Langfeldleuchten, Lichtfarbe 31, Lichtstärke: 11830 lx) und einer Temperatur von 20 ± 2 °C (Tag) und 15 ± 2 °C (Nacht).

ECT: temperaturgeregelter Laborraum mit einer Leuchtstärke (gemessen an der Bodenoberfläche) von ca. 12000 lx und einem 16:8 h Tag/Nachtrhythmus (Metalldampfhalogenlampen; SON-T-Agro, Philips). Die Temperatur wurde im Bereich der Pflanzgefäße bei 20 ± 2 °C gehalten.

TUB: Gewächshaus. Bedingungen: ≥ 20 °C, Beleuchtung mind. 7000 lx, sofern notwendig Zusatzbeleuchtung mit Lampen; 16:8 h Tag/Nachtrhythmus

Bei der Beleuchtung mit Leuchtstoffröhren war zu beachten, dass diese aufgrund ihrer geringeren Leuchtstärke in kleinerem Abstand zu den Pflanzgefäßen angebracht werden, was eine stärkere Erwärmung zur Folge haben kann.

Im Gewächshaus traten häufig höhere Temperaturen (bis über 35 °C) und Lichtstärken (bis 100.000 lx) auf, da viele Versuche während der Sommermonate durchgeführt wurden. Auf Grund veränderlicher Witterungsbedingungen variierten die Versuchsbedingungen stark, was z.T. zu höheren Standardabweichungen bei den Ergebnissen führte. Da die Pflanzen über den Glasfaserdocht ständig mit ausreichend Wasser versorgt waren, wirkten sich hohe Temperaturen nicht negativ auf den Pflanzenertrag aus. Hohe Lichtstärken konnten selbst mit einer Schattierung nicht vermieden werden. Als Folge davon verfärbten sich die Blattspitzen braun. Die Biomasseproduktion blieb davon unbeeinflusst.

VIII - 3.5 Testansatz

In einem Vortest beim Partner ECT wurde ermittelt, ob der Prüfboden über Dochte Wasser aufnehmen kann. Hierzu wurden zwei Gefäße mit Dochten bestückt, mit jeweils 400 g der Böden befüllt und in ein Wasserreservoir gestellt. Nach 6, 12 und 24 h wurden die Becher gewogen und die aufgenommene Wassermenge berechnet. Nach 24 h sollten die Böden mindestens einen Wassergehalt von 50 % der maximalen Wasserhaltekapazität erreicht haben. Wäre diese Bedingung nicht erfüllt worden müssten die Tests mit manueller Bewässerung durchgeführt werden (tägliches Wiegen und Einstellen auf 60 % der Wasserhaltekapazität). Dieser Fall trat bei den hier getesteten Böden nicht auf.

- Der Wassergehalt und die maximale Wasserhaltekapazität der Böden wurden kurz vor Testbeginn ermittelt.
- Die Prüfböden und die Kontrollböden wurden vermischt. Dabei wurde entweder eine Mischung von 1:1, bezogen auf die Trockensubstanz, oder 5 Mischungen in jeweils festzulegenden Verhältnissen (zuzüglich Kontrolle) hergestellt. Als Mischgefäße dienten stabile Plastikbeutel oder Eimer mit Deckel.
- Je Testgefäß wurde eine definierte Menge des feucht gelagerten Bodens eingefüllt (bei 8 x 8 x 7 cm Topfgröße z.B. 240 - 260 g; bei Verwendung von Bellaplastschalen jeweils 400 g) und anschließend 10 Samen gleichmäßig verteilt in 1,0 cm Tiefe ausgelegt. Teilweise wurde nach dem Einsetzen der Samen die Bodenoberfläche der Testgefäße mit einem Handsprünger angefeuchtet (Partner BBA).
- Bei guter Wasseraufnahme mittels Dochten wurde die Bodenfeuchte durch 1 - 2 Glasfaserdichte (\varnothing 1 mm) je Topf bei konstanter Feuchte bei 80 – 100 % der maximalen Wasserhaltekapazität gehalten. Zur Wasserversorgung wurden die Testgefäße eines Versuches so gestellt, dass die Dochte in ein darunter befindliches Wasserreservoir tauchen konnten (entweder auf eine als Gitter dienende Pikierschale (BBA), ein Gitter (TUB) oder mittels eines zweiten Plastikgefäßes (ECT)).
- In jedes Gefäß wurden 10 Samen in 10 mm Tiefe ausgelegt. Die Oberfläche wurde danach glattgestrichen, ohne den Boden stark zu verdichten.
- Anschließend wurden die Gefäße in die Wasserreservoirs gestellt. Aus technischen Gründen wurden beim Partner BBA die Töpfe einer Testbodenmischung (Hafer + Rübe) einem gemeinsamen Wasserbad zugeordnet.
- Die Gefäße wurden in zufälliger Weise (TUB, ECT) im Leuchtfeld aufgestellt. Zwei- bis dreimal wöchentlich wurde die Position der Gefäße verändert (ECT). Wegen der äußerst konstanten Licht- und Klimabedingungen in der gesamten Klimakammer der BBA konnte dort auf eine Umstellung der Testgefäße verzichtet werden.

VIII - 3.6 Messungen während der Prüfung

Nach 24 und 48 h wurden die Gefäße gewogen, um den Wassergehalt der Böden zu bestimmen. Ab dem dritten Tag wurden die aufgelaufenen Keimlinge gezählt. Nach Auflaufen von 50 % der Keimlinge in den Kontrollen begann die eigentliche Wachstumsphase, die mindestens 14 und höchstens 21 Tage dauerte. Nachdem in den Kontrolltöpfen durchschnittlich 50 % der Saat aufgelaufen war, was nach ca. 5 (Hafer) und 3 – 4 Tagen (Partner ECT) bzw. 8 Tagen (Partner BBA) für die Rübe der Fall war, wurde auf 5 repräsentative, gleichmäßig verteilte Keimlinge je Testgefäß ausgedünnt. Dazu wurden überzählige Pflanzen zufällig ausgewählt und möglichst mit Wurzel aus der Erde gezogen (Rübe) bzw. beim Hafer an der Bodenoberfläche abgeschnitten.

Bei Versuchsende (d.h. nach weiteren 14 Tagen) wurden die Sprosse der Pflanzen direkt an der Bodenoberfläche abgeschnitten und – entweder einzeln (ECT) oder alle eines Testgefäßes (BBA, TUB) – sofort gewogen. Bei *Brassica rapa* wurde bei jeder Pflanze die Länge protokolliert. Die Pflanzen je einer Bodenmischung wurden in einem Gefäß vereinigt und bei 105 °C über Nacht getrocknet, um den Wassergehalt zu bestimmen (der Wassergehalt nimmt während der Entwicklung der Pflanzen ab. Da sich erfahrungsgemäß der Wassergehalt von Pflanzen, die gleich behandelt wurden und gleich alt sind, kaum unterscheidet, genügt es, wie beschrieben, ihn nur für jede Behandlungsvariante einmal zu bestimmen.). Bei *Avena sativa* wurde das Frischgewicht, die Höhe und die Anzahl der Blätter jeder Pflanze und der Wassergehalt der vereinten Pflanzen einer Behandlungsstufe bestimmt. Neben der Betrachtung der Einzelpflanzen wurde der Biomasseertrag je Pflanzgefäß ermittelt.

VIII - 3.7 Auswertung

Die Auswertung erfolgte in tabellarischer und graphischer Form. Darüber hinaus wurde bei ausreichender Datenlage versucht, NOEC, LOEC oder EC50-Werte des Wachstums zu berechnen. Die Statistik zur Frischgewichtsbestimmung sah wie folgt aus:

- Varianzanalyse mit der General Linear Models (GLM) Prozedur von SAS®
- Mittelwertsvergleiche: Dunnett (einseitig) und Multiple Range Test nach Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (REGWQ)

Für die Tests mit der Referenzsubstanz wurden die Mittelwerte der Frischgewichte je Konzentration als prozentuale Verminderung im Vergleich zum Mittelwert der Kontrolle angegeben, so dass die logistische Sigmoidkurve über die Probitanalyse den Messwerten angepasst werden konnte.

Neben der Beurteilung der Toxizität eines Bodens über einen statistischen Vergleich zwischen Kontroll- und Testboden (Partner BBA) wurden zwei weitere Verfahren angewandt: Beim Partner ECT galt ein Unterschied von mehr als 30 % zwischen dem reinen Testboden und der Kontrolle als Auffälligkeit. Dagegen wurden die Testböden nach der am Institut für Landschaftsentwicklung durch den Partner TUB entwickelten „Mischmethode“ beurteilt. Dabei wird das jeweilige Frischgewicht der Pflanzen in der Kontrolle und der Mischungen mit 50 % LUFA 2.2 relativ zur Kontrolle (LUFA 2.2 = 1) dargestellt. Daraus ergibt sich rechnerisch ein Mittelwert (Mb) aus den Erträgen beider Böden, wobei eine Toleranz von 10 % negativer Abweichung von dem errechneten Wert zusätzlich eingerechnet wird. Die 10 % Toleranz wurden anhand von Versuchsdurchführungen mit verschiedenen belasteten und unbelasteten Bodenproben empirisch ermittelt (WINKEL & WILKE 2000).

Ausgehend von diesen Methoden wird vorgeschlagen, Effekte auf die Pflanzen in drei Gruppen zu unterteilen:

- Toxisch: Signifikante Unterschiede nach der „Mischmethode“
=> als Pflanzenstandort nicht geeignet;
- Auffällig: Signifikante Unterschiede „nur“ bei 100 % Testboden
=> Detaildiskussion der Testergebnisse (Dosis-Wirkung ?) notwendig; wenn auch in den Abstreckungen deutliche (> 30 %) bzw. signifikante Wirkungen auftreten
=> als Pflanzenstandort nicht geeignet
- Unauffällig: keine Unterschiede erkennbar
=> als Pflanzenstandort geeignet.

VIII - 3.8 Positivkontrolle

Auf Empfehlung des Partners BBA wurde das Herbizid Goltix compact (Wirkstoff Metamitron) als Referenzsubstanz eingesetzt. Die wichtigsten Substanzeigenschaften sind wie folgt (The Agrochemicals Handbook 1994):

Name:	Goltix compact (Wirkstoff Metamitron; 900 g/kg)
Formulierung:	Wasserdispergierbares Granulat
Chemische Bezeichnung:	4-Amino-4,5-dihydro-3-methyl-6-phenyl-1,2,4-triazin-5-on
Molekülformel:	$C_{10}H_{10}N_4O$
CAS-Nummer:	41394-05-2
Flüchtigkeit:	86 nPa bei 20°C
Wasserlöslichkeit:	1,82 g/L bei 20°C
Einsatz:	Kontrolle breitblättriger Kräuter sowie Gräsern

Toxizität: Nicht toxisch gegenüber Bienen, Fischen, Vögeln und Säugern
Bodenabbau: Nach 4 – 6 Wochen 20 % der applizierten Menge nachweisbar
Anwendungsempfehlung: 3,5 – 5 kg Wirkstoff/ha

Die Durchführung der Tests entsprach der ISO-Norm; nur wurden statt einem Kontroll- bzw. Mischboden analog zu den anderen Tests jeder Test mit beiden Pflanzen und beiden Mischsubstraten (LUFA bzw. Institutsboden) durchgeführt.

VIII - 3.9 Zusätzliche Tests

Hinsichtlich der Nutzung von Referenzböden (d.h. Böden mit den gleichen pedologischen Eigenschaften wie der zu beurteilende Testboden nur ohne Belastung) als Kontroll- bzw. Mischsubstrat wurde zum Vergleich mit den Testböden Neuohe und Sickergraben am Standort Celle ein Boden gefunden, der zusätzlich zu den Mischsubstraten LUFA und Institutsböden getestet werden sollte. Die Testdurchführung blieb dabei unverändert.

Beispielhaft mit einem bzw. zwei Testböden wurden Wurzellängentests mit Hafer in Anlehnung DIN ISO 11269-1 von allen drei Partnern durchgeführt. Die Versuchsdauer betrug jeweils 8 Tage nachdem 50 % der Keimlinge in der Kontrolle aufgelaufen waren. Nach Versuchsende wurde zur Längenmessung der Hauptwurzel das Testbodensubstrat vorsichtig mit Leitungswasser abgespült.



Abbildung VIII - 1: Testansatz im Pflanzentest mit *Brassica rapa*



Abbildung VIII - 2: Testgefäße mit *Brassica rapa* im Testraum



Abbildung VIII - 3: Testgefäße mit *Avena sativa* im Testraum (Foto Plants 6)

VIII - 3.10 Übersicht über die Versuchsansätze

Alle Mischungsverhältnisse der Test- und Kontrollböden wurden 4-fach (beim Partner BBA die Kontrolle 8-fach) wiederholt. Die in Tabelle VIII - 2 aufgeführten Ansätze wurden von allen drei Partnern durchgeführt (kleinere Abweichungen, z.B. bei den Mischungsverhältnissen, werden im Ergebnisteil (Kap. VIII - 4) erwähnt).

Tabelle VIII - 2: Übersicht über die durchgeführten Testansätze (Nr. = Reihenfolge im Ergebnisteil)

Nr.	Spezies	Testboden	Mischsubstrat	Mischungen
1	<i>B. rapa</i>	Landhausen	LUFA	75 %, 50 %, 25 %, 12,5 %
	<i>B. rapa</i>	Landhausen	Institut (BBA, OECD, Inst A)	50 %, 25 %, 12,5 %
	<i>A. sativa</i>	Landhausen	LUFA	100 %, 50 %
	<i>A. sativa</i>	Landhausen	Institut (BBA, OECD, Inst A)	100 %, 50 %
2	<i>B. rapa</i>	Iserlohn	LUFA	75 %, 50 %, 25 %, 12,5 %
	<i>B. rapa</i>	Iserlohn	Institut (BBA, OECD, Inst A)	50 %, 25 %, 12,5 %
	<i>A. sativa</i>	Iserlohn	LUFA	100 %, 50 %
	<i>A. sativa</i>	Iserlohn	Institut (BBA, OECD, Inst A)	100 %, 50 %
3	<i>B. rapa</i>	Gaswerk 1:2	LUFA	75 %, 50 %, 25 %, 12,5 %
	<i>B. rapa</i>	Gaswerk 1:2	Institut (BBA, OECD, Inst A)	50 %, 25 %, 12,5 %
	<i>A. sativa</i>	Gaswerk 1:2	LUFA	100 %, 50 %
	<i>A. sativa</i>	Gaswerk 1:2	Institut (BBA, OECD, Inst A)	100 %, 50 %
4	<i>B. rapa</i>	PAK-Mix	LUFA	50 %, 25 %, 12,5 %
	<i>B. rapa</i>	PAK-Mix	Institut (BBA, Inst A)	25 %, 12,5 %
	<i>A. sativa</i>	PAK-Mix	LUFA	100 %, 50 %
	<i>A. sativa</i>	PAK-Mix	Institut (BBA, OECD, Inst A)	100 %, 50 %
5	<i>B. rapa</i>	Sickergraben	LUFA	100; 50; 25; 12,5 %
	<i>B. rapa</i>	Sickergraben	Institut (BBA, OECD, Inst A)	100; 50; 25; 12,5 %
	<i>A. sativa</i>	Sickergraben	LUFA	100; 50; 25; 12,5 %
	<i>A. sativa</i>	Sickergraben	Institut (BBA, OECD, Inst A)	100; 50; 25; 12,5 %
6	<i>B. rapa</i>	Neuohe	LUFA	100; 50 %
	<i>B. rapa</i>	Neuohe	Institut (BBA, OECD, Inst A)	100; 50 %
	<i>A. sativa</i>	Neuohe	LUFA	100; 50 %
	<i>A. sativa</i>	Neuohe	Institut (BBA, OECD, Inst A)	100; 50 %

Tabelle VIII – 2: Übersicht über die durchgeführten Testansätze (Fortsetzung)

Nr.	Spezies	Testboden	Mischsubstrat	Mischungen
7	<i>B. rapa</i>	IMA SM66	LUFA	100; 50 %
	<i>B. rapa</i>	IMA SM66	Institut (BBA, OECD, Inst A)	100; 50 %
	<i>A. sativa</i>	IMA SM66	LUFA	100; 50 %
	<i>A. sativa</i>	IMA SM66	Institut (BBA, OECD, Inst A)	100; 50 %
8	<i>B. rapa</i>	IMA 927B	LUFA	100; 50 %
	<i>B. rapa</i>	IMA 927B	Institut (BBA, OECD, Inst A)	100; 50 %
	<i>A. sativa</i>	IMA 927B	LUFA	100; 50 %
	<i>A. sativa</i>	IMA 927B	Institut (BBA, OECD, Inst A)	100; 50 %

Über die in Tabelle VIII - 2 aufgeführten Testansätze wurden diverse Vorversuche zur Festlegung von Mischungsverhältnissen durchgeführt. So prüfte z.B. Partner 2 (ECT) Mischungsverhältnisse zwischen 5 und 50 %, eingemischt in LUFA-Boden, der Testböden Landhausen, Iserlohn, Gaswerk 1 : 2 und PAK-Mix. In Tabelle VIII - 3 werden darüber hinaus weitere Tests aller drei Partner aufgeführt, die nur mit wenigen Testböden primär zur Klärung methodischer Einzelheiten unternommen wurden. Neben einem unbelasteten Kontrollboden (Celle) wurde der Messendpunkt Wurzellänge (nur mit Hafer und dem Boden Gaswerk 1:2) sowie die Wirkung der Referenzsubstanz Goltix (Wirkstoff Metamitron) überprüft. Aufgrund der hohen Variabilität der Ergebnisse wurden die Goltix-Tests teilweise wiederholt.

Tabelle VIII - 3: Übersicht über zusätzlich durchgeführte Testansätze (bei den Tests mit Gaswerk 1:2 Boden wurde primär die Wurzellänge ausgewertet)

Nr.	Spezies	Testboden	Mischsubstrat	Mischungen
9	<i>B. rapa</i>	Sickergraben	Celle	100; 50; 25; 12,5 %
	<i>A. sativa</i>	Sickergraben	Celle	100; 50; 25; 12,5 %
	<i>B. rapa</i>	Neuohe	Celle	100;50 %
	<i>A. sativa</i>	Neuohe	Celle	100; 50 %
10	<i>A. sativa</i>	Gaswerk 1:2	LUFA	100; 50; 25; 12,5 %
	<i>A. sativa</i>	Gaswerk 1.2	Institut (BBA, OECD, Inst A)	100; 50; 25; 12,5 %
11	<i>B. rapa</i>	Goltix	LUFA	0,1; 0,5; 1; 5; 10 mg/kg
	<i>B. rapa</i>	Goltix	Institut (BBA, OECD, Inst A)	0,1; 0,5; 1; 5; 10 mg/kg
	<i>A. sativa</i>	Goltix	LUFA	0,1; 1; 5; 10; 50 mg/kg
	<i>A. sativa</i>	Goltix	Institut (BBA, OECD, Inst A)	0,1; 1; 5; 10; 50 mg/kg

VIII - 4 Ergebnisse

VIII - 4.1 Tests mit kontaminierten Böden

VIII - 4.1.1 Landhausen

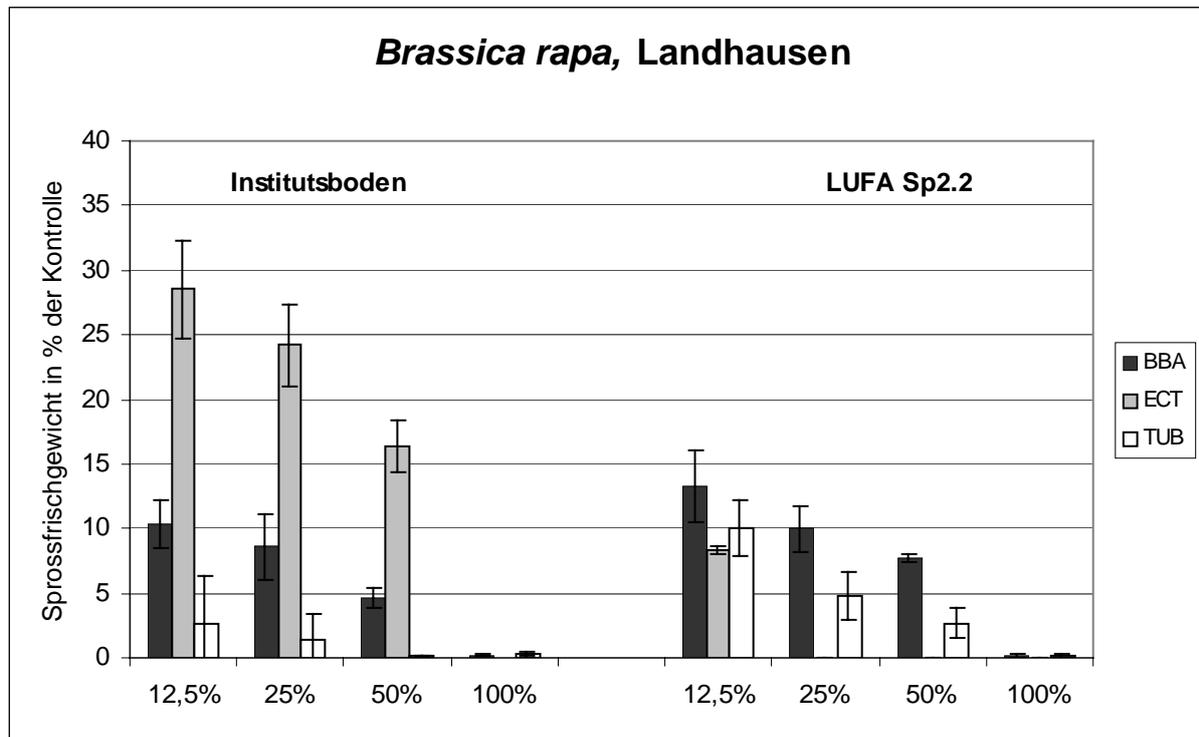


Abbildung VIII - 4: Wirkung des Testbodens Landhausen auf die Stoppelrübe

Absolutwerte der Kontrollen:

	ECT [FG je Topf (5 Pflanzen)]		BBA [FG je Topf (5 Pflanzen)]		TUB [FG je Topf (5 Pflanzen)]	
LUFA	5,085	± 0,825	2,050	± 0,160	2,316	± 0,459
Institut	0,168	± 0,012	2,535	± 0,322	2,675	± 0,376

Unabhängig vom Mischsubstrat erfolgte in reinem Testboden kein Wachstum der Stoppelrübe. Dosis-abhängig nahm die Wirkung bei allen drei Partnern ab, doch lag selbst im besten Fall (12,5 % Mischung mit OECD-Erde) die Biomasse nur bei 30 % der Kontrolle. Generell war die Wirkung des Testbodens in der OECD-Erde gegenüber den beiden Feldböden geringer. In LUFA-Erde trat die Wirkung beim Partner ECT zwei Konzentrationsstufen eher als bei den anderen Partnern auf. Auffällig ist das sehr starke Wachstum in der LUFA-Kontrolle beim Partner ECT, für das gegenwärtig keine Erklärung gegeben werden kann.

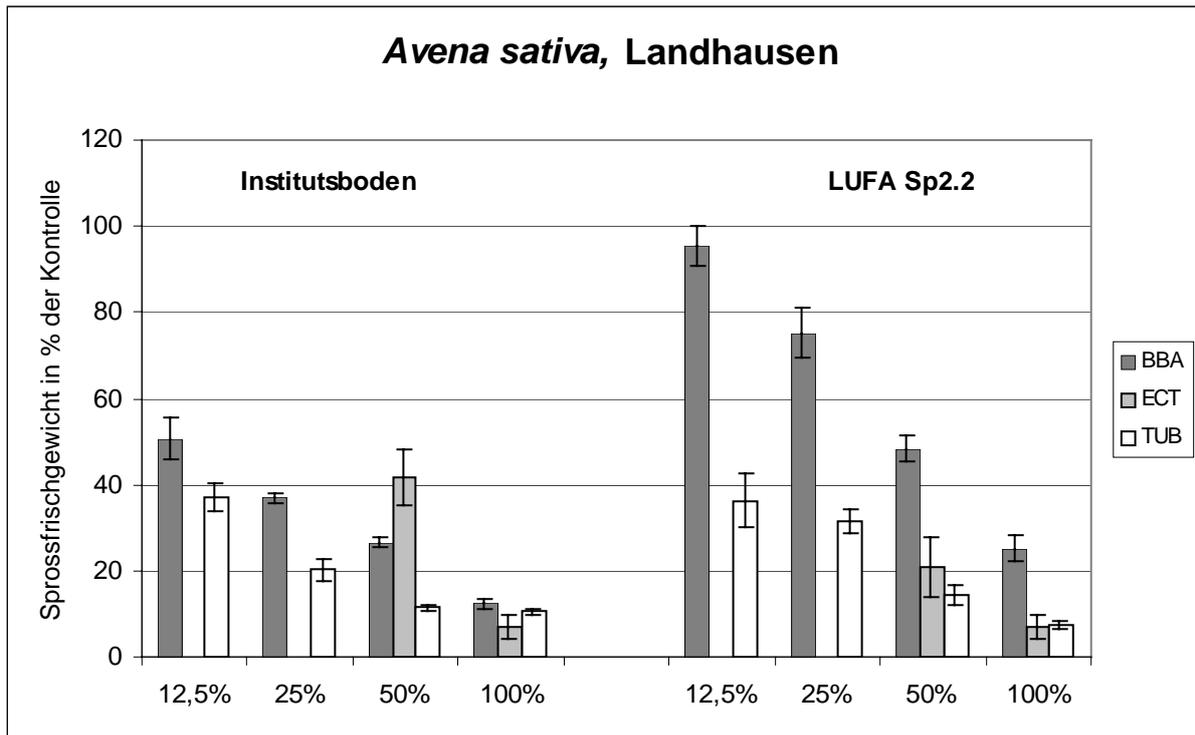


Abbildung VIII - 5: Wirkung des Testbodens Landhausen auf den Hafer

Absolutwerte der Kontrollen:

	ECT [FG je Topf (5 Pflanzen)]		BBA [FG je Topf (5 Pflanzen)]		TUB [FG je Topf (5 Pflanzen)]	
LUFA	2,300	± 0,260	1,777	± 0,281	3,073	± 0,144
Institut	0,299	± 0,024	3,646	± 0,140	2,228	± 0,301

Selbst im reinen Testboden konnte Hafer, wenn auch sehr schlecht, noch wachsen. Bei Mischung mit beiden Substraten nahm die Wirkung dosis-abhängig ab, wobei diese Abnahme am stärksten in LUFA-Boden beim Partner BBA auftrat. Da beim Partner ECT keine Konzentrationen unterhalb von 50 % getestet wurden ist nicht entscheidbar, ob diese Abnahme beim OECD-Boden noch stärker ausgefallen wäre. Mit Ausnahme der niedrigsten Konzentration in LUFA beim Partner BBA wird allerdings das Kontrollniveau bei weitem nicht erreicht.

Generell reagiert der Hafer demnach nicht nur deutlich weniger als die Stoppelrübe sondern auch qualitativ anders, zumindest in den OECD-Mischungen.

VIII - 4.1.2 Iserlohn

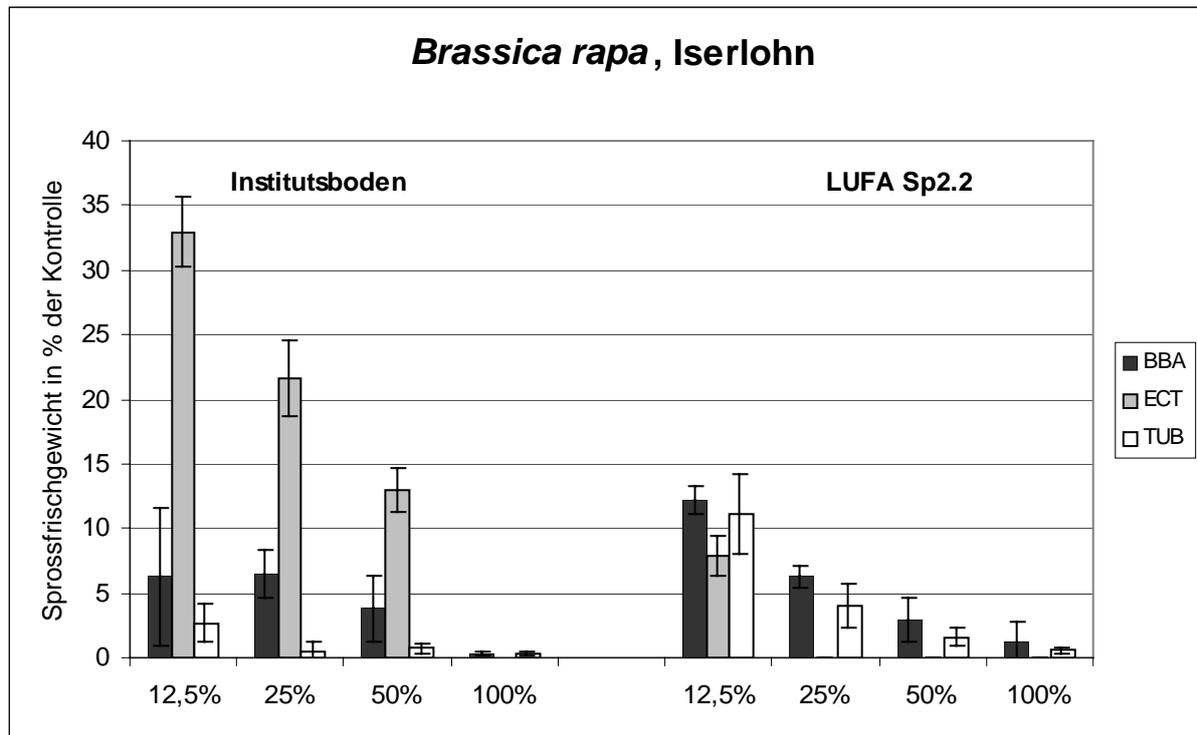


Abbildung VIII - 6: Wirkung des Testbodens Iserlohn auf die Stoppelrübe

Absolutwerte der Kontrollen:

	ECT [FG je Topf (5 Pflanzen)]		BBA [FG je Topf (5 Pflanzen)]		TUB [FG je Topf (5 Pflanzen)]	
LUFA	5,085	± 0,825	2,050	± 0,160	2,316	± 0,459
Institut	0,168	± 0,012	2,535	± 0,322	2,675	± 0,376

Im reinen Testboden trat bei allen Partnern kein bzw. nur ein sehr geringes Wachstum auf. Mit zunehmender Mischung nahm die Wirkung etwas ab, doch erreichte es nur bei Mischung mit OECD-Boden einen Anteil an der Kontrolle von mehr als 30 %. Dabei war in beiden Mischsubstraten eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zu beobachten. Wie schon mit dem Testboden Landhausen war die Wirkung in LUFA beim Partner ECT am stärksten, gefolgt vom Partner TUB und dem Partner BBA. Dabei ist zu beachten, dass beim Partner ECT die 12,5 %- Mischung getrennt von den übrigen Mischungen getestet wurde.

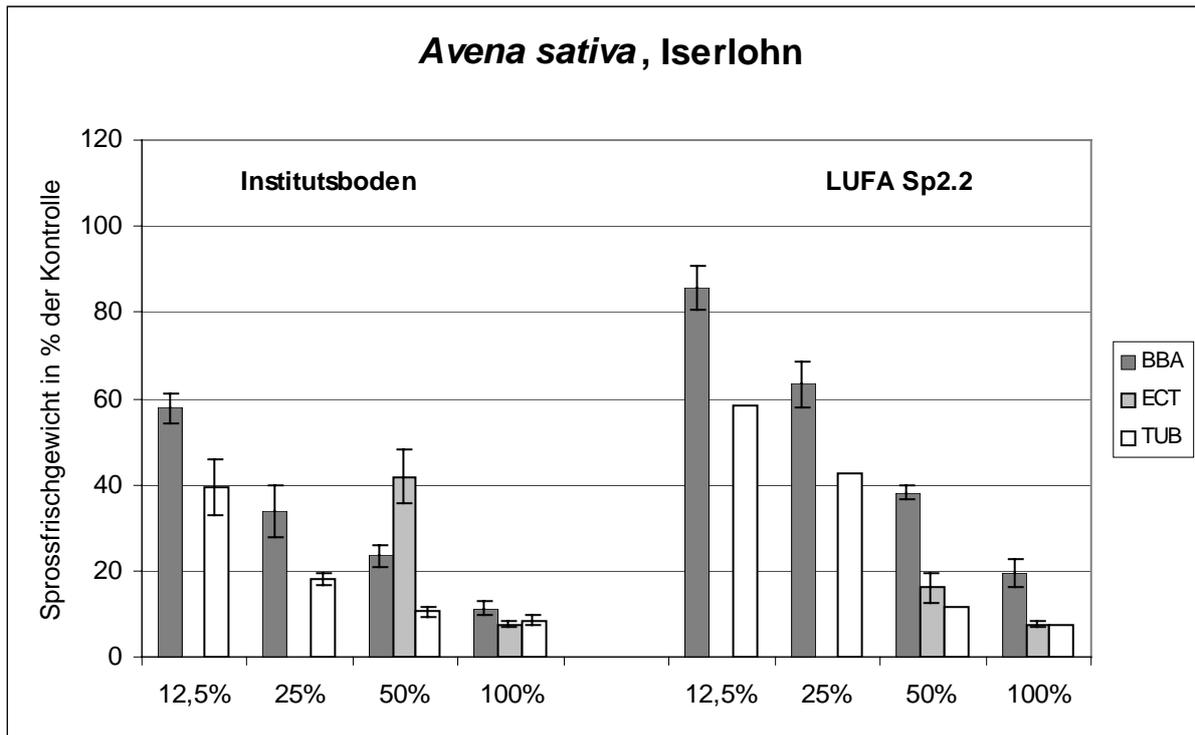


Abbildung VIII - 7: Wirkung des Testbodens Iserlohn auf den Hafer

Absolutwerte der Kontrollen:

	ECT [FG je Topf (5 Pflanzen)]		BBA [FG je Topf (5 Pflanzen)]		TUB [FG je Topf (5 Pflanzen)]	
LUFA	2,300	± 0,260	1,777	± 0,281	3,073	± 0,144
Institut	0,299	± 0,024	3,646	± 0,140	2,228	± 0,301

Mit beiden Mischsubstraten wurde eine klare Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit festgestellt, wobei selbst im reinen Testboden noch Wachstumsraten von 10 – 20 % der Kontrolle auftraten. Wie beim Testboden Landhausen wurden nur beim Partner BBA in LUFA nahezu das Kontrollniveau bei der niedrigsten Konzentration erreicht, während in fast allen anderen Ansätzen maximal die Hälfte der Kontrolle beobachtet wurde. Im Gegensatz zu Landhausen deutet sich in diesem Fall eine geringere Wirkung im OECD-Boden an.

Generell ist beim Hafer die Wirkung in LUFA schwächer als in den beiden Feld-Institutsböden, was in Übereinstimmung mit dem Reaktionsmuster der Stoppelrübe steht (Ausnahme: *Brassica rapa* im Gaswerk- bzw. BBA-Boden, Abbildung VIII - 8).

VIII - 4.1.3 Gaswerk

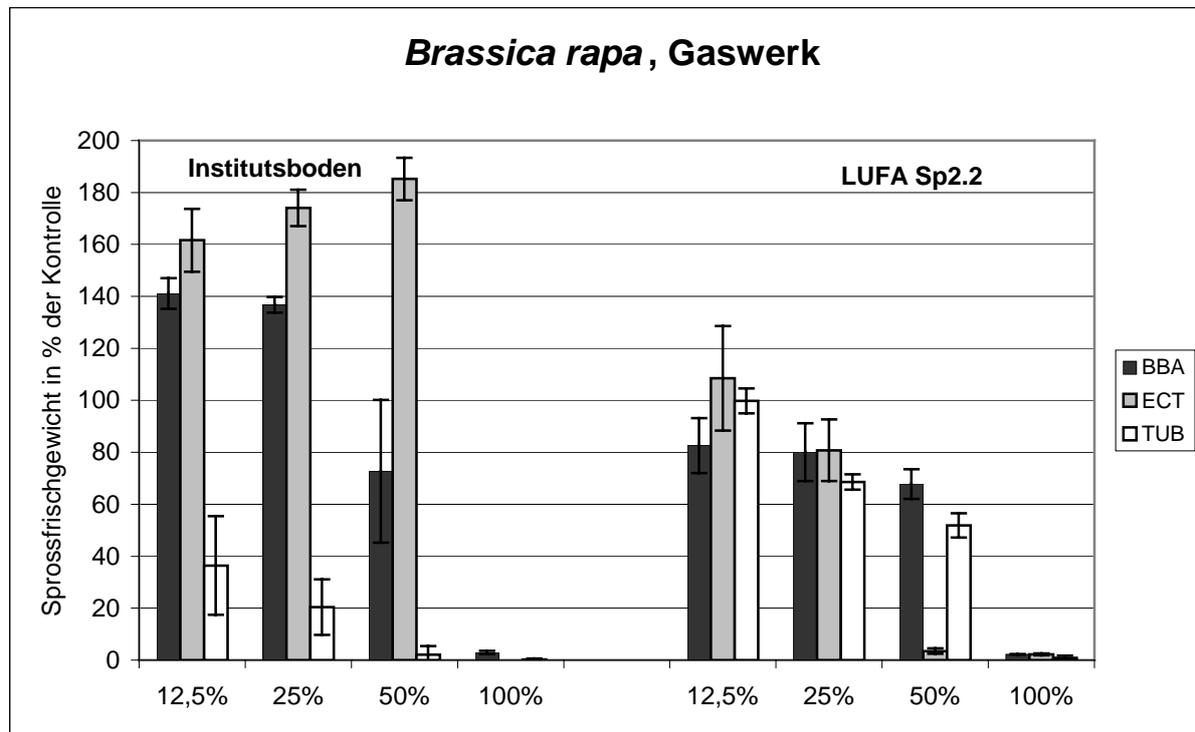


Abbildung VIII - 8: Wirkung des Testbodens Gaswerk 1:2 auf die Stoppelrübe

Absolutwerte der Kontrollen:

	ECT [FG je Topf (5 Pflanzen)]		BBA [FG je Topf (5 Pflanzen)]		TUB [FG je Topf (5 Pflanzen)]	
LUFA	5,085	± 0,825	2,050	± 0,160	2,316	± 0,459
Institut	0,168	± 0,012	2,535	± 0,322	2,675	± 0,376

Wieder führte die Verwendung reinen Testbodens zu einem fast vollständigem Ausfall der Testpflanzen. Mit LUFA als Mischboden war, nach starker Wirkungsverringerung beim Sprung von 100 % auf 50 % Testboden, eine dosis-abhängige Angleichung an das Kontrollniveau erkennbar. Dabei war praktisch kein Unterschied in allen Konzentrationsstufen bei den drei Partnern feststellbar; nur bei der 50 %-Mischung fielen beim Partner ECT nahezu alle Pflanzen aus, während bei den Partnern BBA und TUB schon rund 50 % des Kontrollniveaus erreicht wurde. Völlig anders sah das Ergebnis bei der Verwendung von Institutsböden als Mischsubstrat aus: Während in Inst A die Wirkung eher noch stärker als in LUFA war, führte die Verwendung von BBA-Böden bei der 50 %-Mischung zu einem nahezu normalen Wachstum und bei den beiden niedrigen Konzentrationen sogar zu einer Überschussreaktion (ca. 40 % über Kontrollniveau). Noch drastischer war der Unterschied bei dem OECD-Boden: ab der 50 %-Mischung wuchsen die Pflanzen dosis-unabhängig fast doppelt so gut wie in der Kontrolle.

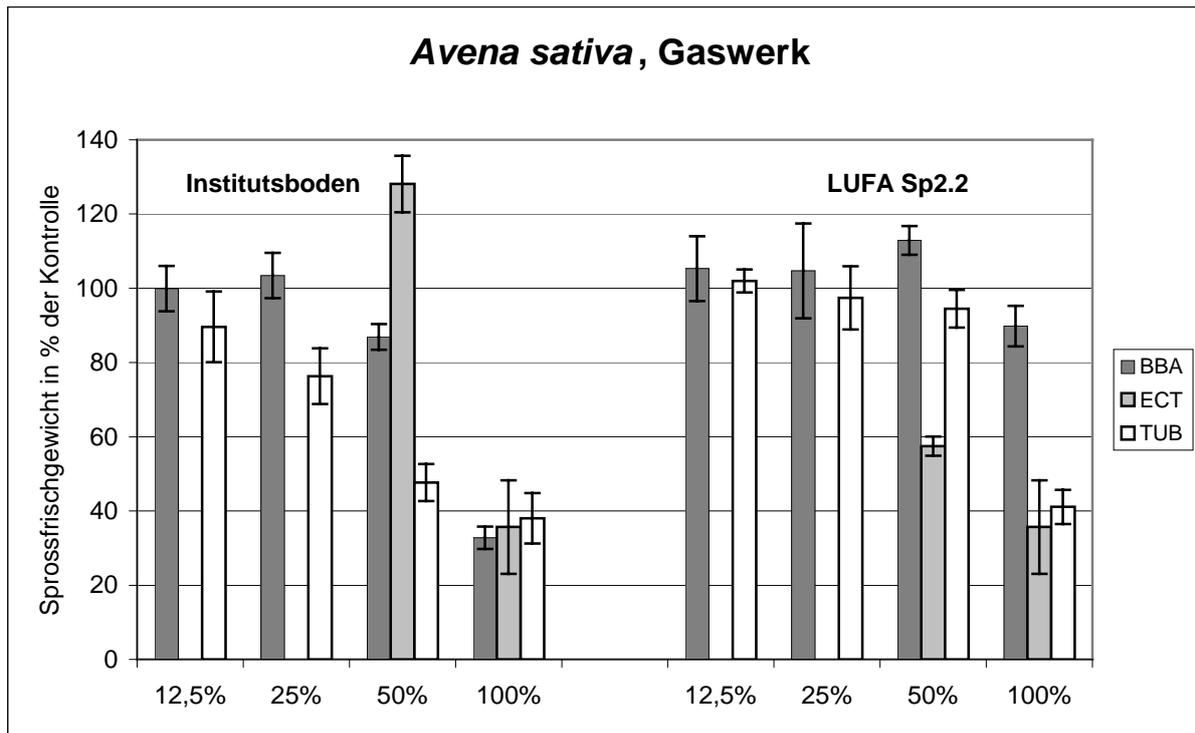


Abbildung VIII - 9: Wirkung des Testbodens Gaswerk 1:2 auf den Hafer

Absolutwerte der Kontrollen:

	ECT		BBA		TUB	
	[FG je Topf (5 Pflanzen)]		[FG je Topf (5 Pflanzen)]		[FG je Topf (5 Pflanzen)]	
LUFA	2,300	± 0,260	1,777	± 0,281	3,073	± 0,144
Institut	0,299	± 0,024	3,646	± 0,140	2,228	± 0,301

Mit wenigen Ausnahmen ähnelt sich die Wirkung des Testbodens Gaswerk 1:2 in beiden Mischsubstraten und allen Konzentrationen bei den drei Partnern stark. Während im reinen Testboden – mit Ausnahme des LUFA-Tests beim Partner BBA – knapp eine Halbierung des Wachstums zu beobachten war, wurde in allen anderen Ansätzen das Kontrollniveau erreicht, in der 50 %-OECD-Mischung sogar übertroffen. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung ist nur beim Inst A-Boden (TUB) erkennbar, kann aber bei dem OECD-Boden nicht ausgeschlossen werden.

Damit ist der Hafer deutlich weniger empfindlich als die Stoppelrübe. Auffallend ist das weitgehende Fehlen einer Überschussreaktion, die bei der Stoppelrübe in zwei Institutsböden drastisch auftrat.

VIII - 4.1.4 Sickergraben

In allen Ansätzen mit dem Testboden Sickergraben wuchs die Stoppelrübe, unabhängig vom verwendeten Mischsubstrat, nicht. Dies ist nicht verwunderlich, da die TNT-Konzentrationen in diesem Boden bei 50696 mg/kg und damit viel höher NOEC-Werte aus Labortests liegen:

- BBA-Boden: 54 mg/kg bzw. LUFA-Boden: 40 mg/kg (GONG et al. 1999)
- LUFA- bzw. OECD-Boden: 55,5 mg/kg (KALSCH et al. 2000).

Dabei ist zu bedenken, dass in den Labortests TNT zudotiert wurde; d.h. es kann im Gegensatz zum Sickergrabenboden von einer hohen Verfügbarkeit ausgegangen werden.

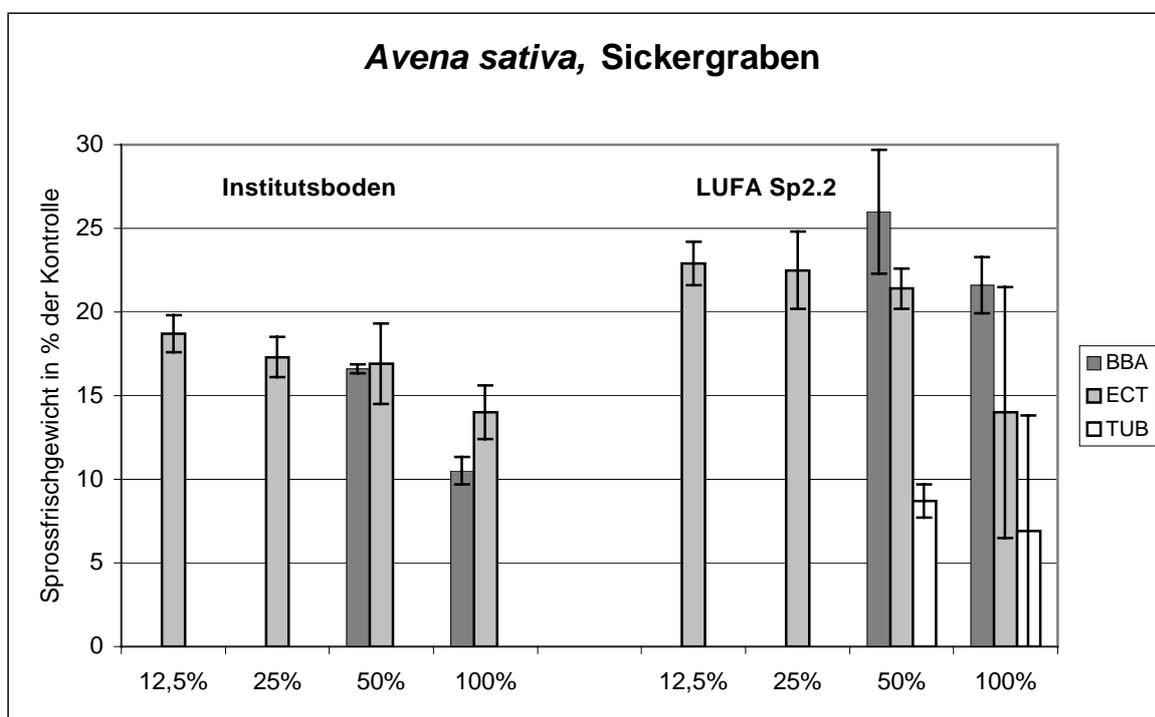


Abbildung VIII - 10: Wirkung des Testbodens Sickergraben auf den Hafer

	ECT		BBA		TUB	
Absolutwerte der Kontrollen:	[FG je Topf (5 Pflanzen)]		[FG je Topf (5 Pflanzen)]		[FG je Topf (5 Pflanzen)]	
LUFA	2,300	± 0,260	1,740	± 0,089	2,713	± 0,357
Institut	0,395	± 0,023	3,581	± 0,666	2,228	± 0,301

Weitgehend unabhängig vom jeweiligen Mischungsverhältnis erreichte Hafer in allen Tests 10 – 25 % der Kontrolle. Nur beim Partner TUB trat aus unbekanntem Gründen eine noch stärkere Hemmung im LUFA-Boden auf. In den Labortests mit frisch dotiertem TNT lagen die NOEC-Werte für Hafer im LUFA-Boden bei 37,5 mg/kg (KALSCH et al. 2000) bzw. 175 mg/kg (GONG et al. 1999). Die Differenz zwischen diesen Ergebnissen und denjenigen aus den

Tests mit Sickergrabenboden, in denen selbst bei höchster Konzentration noch Pflanzen wuchsen, spricht für eine stark herabgesetzte Verfügbarkeit des TNT.

VIII - 4.1.5 PAK-Mix

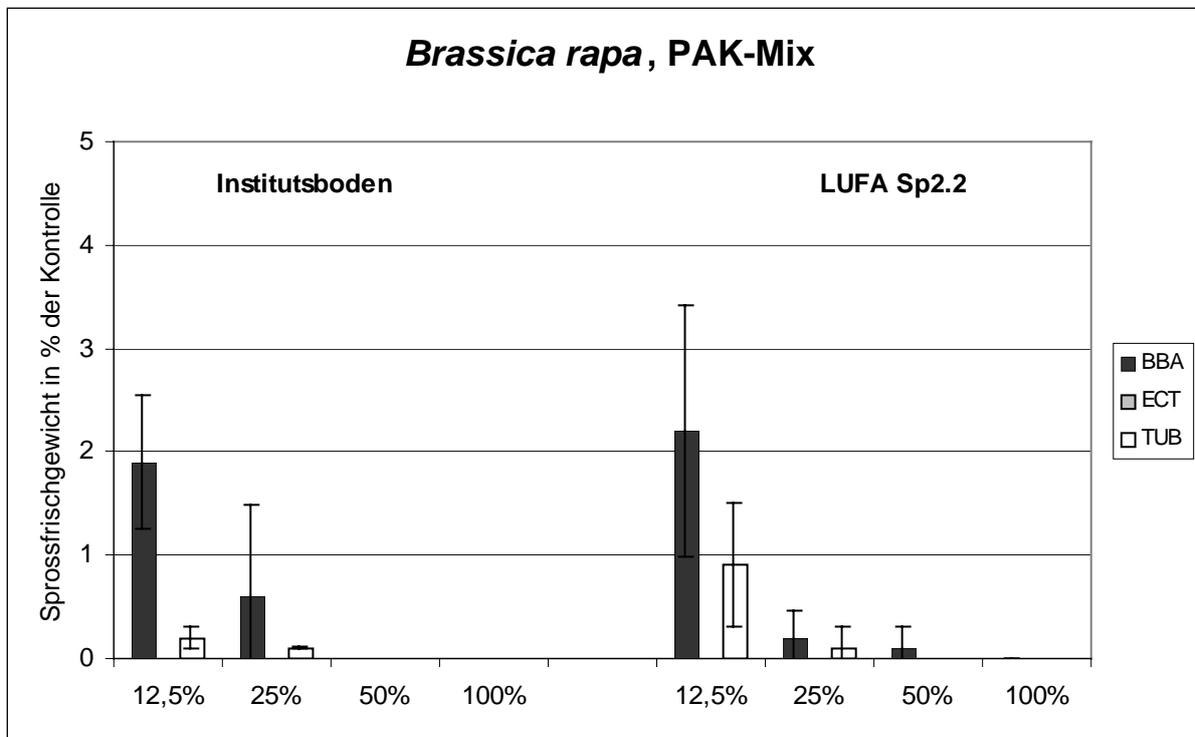


Abbildung VIII - 11: Wirkung des Testbodens PAK-Mix auf die Stoppelrübe

Absolutwerte der Kontrollen:

	ECT [FG je Topf (5 Pflanzen)]	BBA [FG je Topf (5 Pflanzen)]	TUB [FG je Topf (5 Pflanzen)]
LUFA		2,050 ± 0,160	2,316 ± 0,459
Institut		2,535 ± 0,322	2,675 ± 0,376

Der Testboden PAK-Mix führte zu einem fast vollständigen Ausfall der Stoppelrübe. Während beim Partner ECT in beiden Mischsubstraten keinerlei Wachstum auftrat, konnten bei den anderen Partnern – unter leichter Andeutung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung – noch Frischgewichte von bis zu 2 % (!) der Kontrolle gefunden werden.

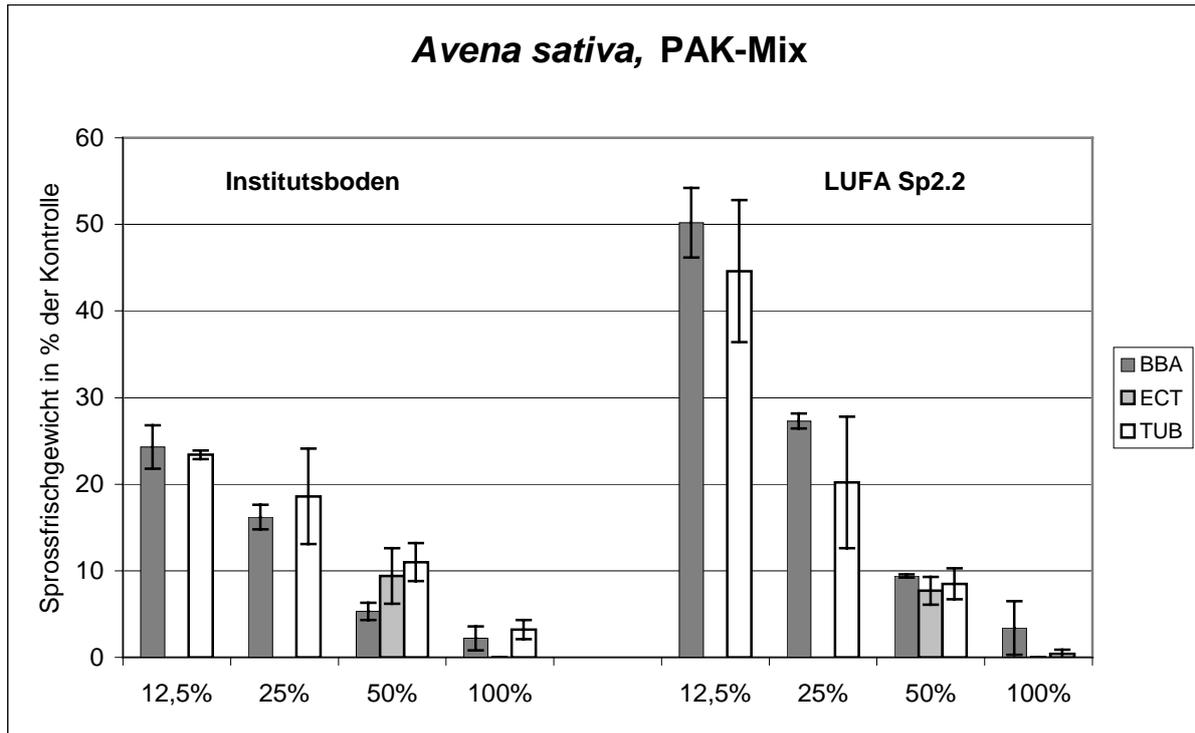


Abbildung VIII - 12: Wirkung des Testbodens PAK-Mix auf den Hafer

Absolutwerte der Kontrollen:

	ECT		BBA		TUB	
	[FG je Topf (5 Pflanzen)]		[FG je Topf (5 Pflanzen)]		[FG je Topf (5 Pflanzen)]	
LUFA	2,815	± 0,285	1,777	± 0,281	2,713	± 0,357
Institut	0,299	± 0,024	3,646	± 0,140	2,228	± 0,301

Sowohl in LUFA-Boden als auch den Institutsböden nahm das Frischgewicht mit abnehmender Konzentration deutlich zu, wobei im reinen Testboden praktisch kein Wachstum mehr stattfand. Selbst bei der niedrigsten Konzentration 12,5 % lag das Frischgewicht in den Institutsböden nur bei 25 % der Kontrolle, während es im LUFA-Boden immerhin noch 50 % erreichte.

VIII - 4.1.6 Neuohhe

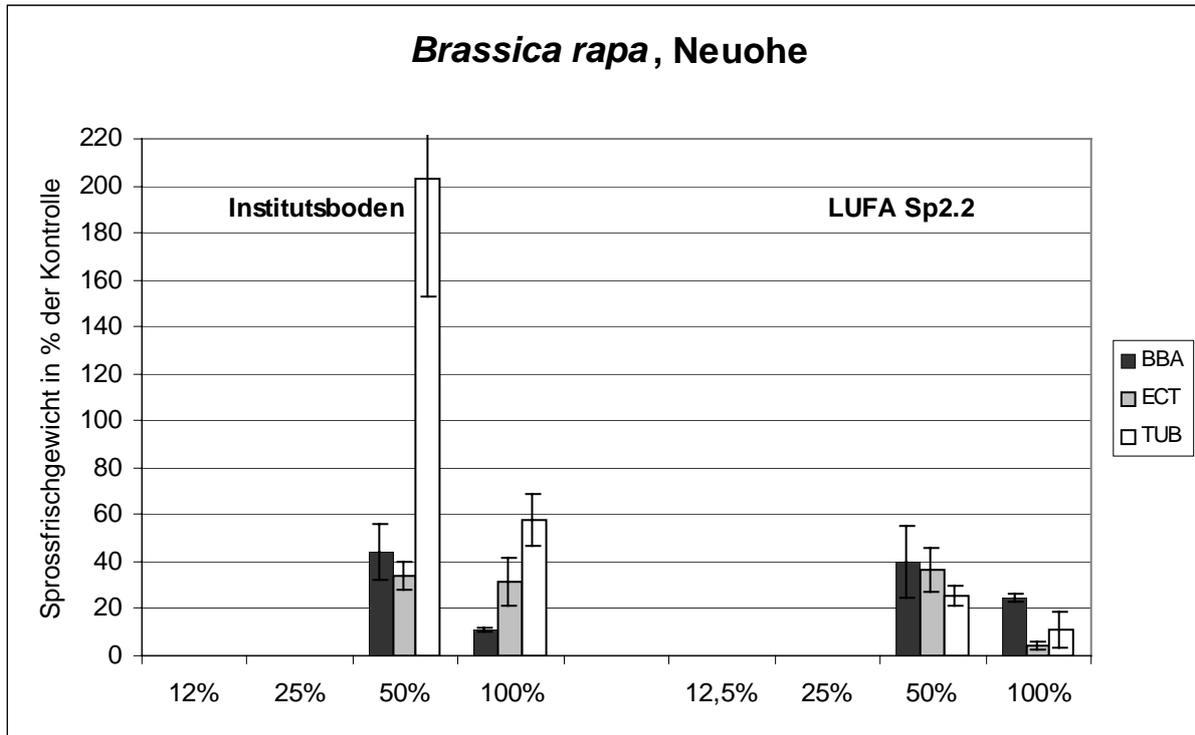


Abbildung VIII - 13: Wirkung des Testbodens Neuohhe auf die Stoppelrübe

Absolutwerte der Kontrollen:

	ECT [FG je Topf (5 Pflanzen)]		BBA [FG je Topf (5 Pflanzen)]		TUB [FG je Topf (5 Pflanzen)]	
LUFA	2,750	± 0,145	1,557	± 0,209	2,396	± 0,217
Institut	0,233	± 0,011	3,358	± 1,706	0,689	± 0,100

Die Ergebnisse der Tests mit dem Boden Neuohhe sind schwer zu interpretieren. Während bei den Ansätzen mit LUFA-Boden eine starke Hemmung im reinen Testboden auftrat und sich die Wirkung bei der 50 %-Mischung ungefähr halbierte, war das Ergebnis im Institutsboden sehr heterogen: Beim Partner ECT war das Frischgewicht bei 50 und 100 % Neuohhe praktisch gleich und beim Partner BBA glich die Hemmung weitgehend dem Ergebnis mit LUFA. Völlig anders sieht es beim Partner TUB aus: Die Pflanzen erreichten im reinen Neuohhe-Boden fast 60 % der Kontrolle und bei der 50 %-Mischung verdoppelte sich das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle. Wahrscheinlich ist dieses Ergebnis auf die ungewöhnlich geringe Größe der Pflanzen in den Inst. A-Kontrollen zurückzuführen. Ein Nährstoffmangel in diesen Kontrollen ist unwahrscheinlich, da das Frischgewicht in allen anderen Versuchen um den Faktor 3 – 4 höher lag.

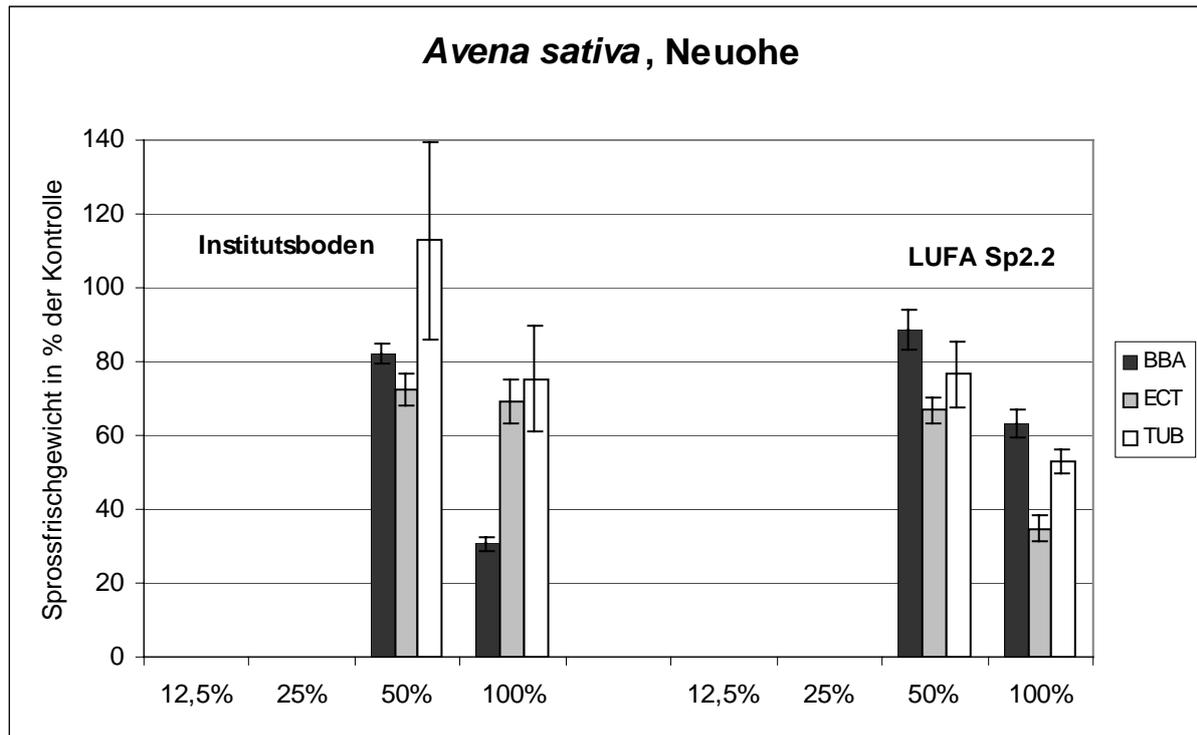


Abbildung VIII - 14: Wirkung des Testbodens Neuohe auf den Hafer

Absolutwerte der Kontrollen:

	ECT [FG je Topf (5 Pflanzen)]		BBA [FG je Topf (5 Pflanzen)]		TUB [FG je Topf (5 Pflanzen)]	
LUFA	3,125	± 0,280	1,741	± 0,089	2,935	± 0,453
Institut	0,317	± 0,002	3,582	± 0,666	1,703	± 0,323

In den Ansätzen mit LUFA-Boden war eine dosisabhängige aber relativ schwache Hemmung des Hafers bei allen drei Partnern zu beobachten. In der 50 %-Mischung wurden schon fast 80 % der Kontrollen erreicht. Dagegen zeigte sich bei den Institutsböden das schon bei der Stoppelrübe bekannte heterogene Bild: Eine bei rund 20 %, dosisunabhängige Hemmung beim Partner ECT, beim Partner BBA eine starke Hemmung im reinen Testboden bzw. eine deutlich abgeschwächte Wirkung bei der 50 % Mischung. Der Partner TUB fand dagegen kaum eine Wirkung bei 100 % Neuohe-Boden und das Fehlen jedweder Wirkung bei Verdünnung mit Inst A Boden.

Das beim Testboden Neuohe festgestellte teils heterogene Bild ist zumindest teilweise darauf zurückzuführen, dass die Wirkung dieses Bodens relativ schwach war. So können sich auch geringe Schwankungen der Größe der Kontrollpflanzen stark auswirken.

VIII - 4.1.7 IMA SM 66

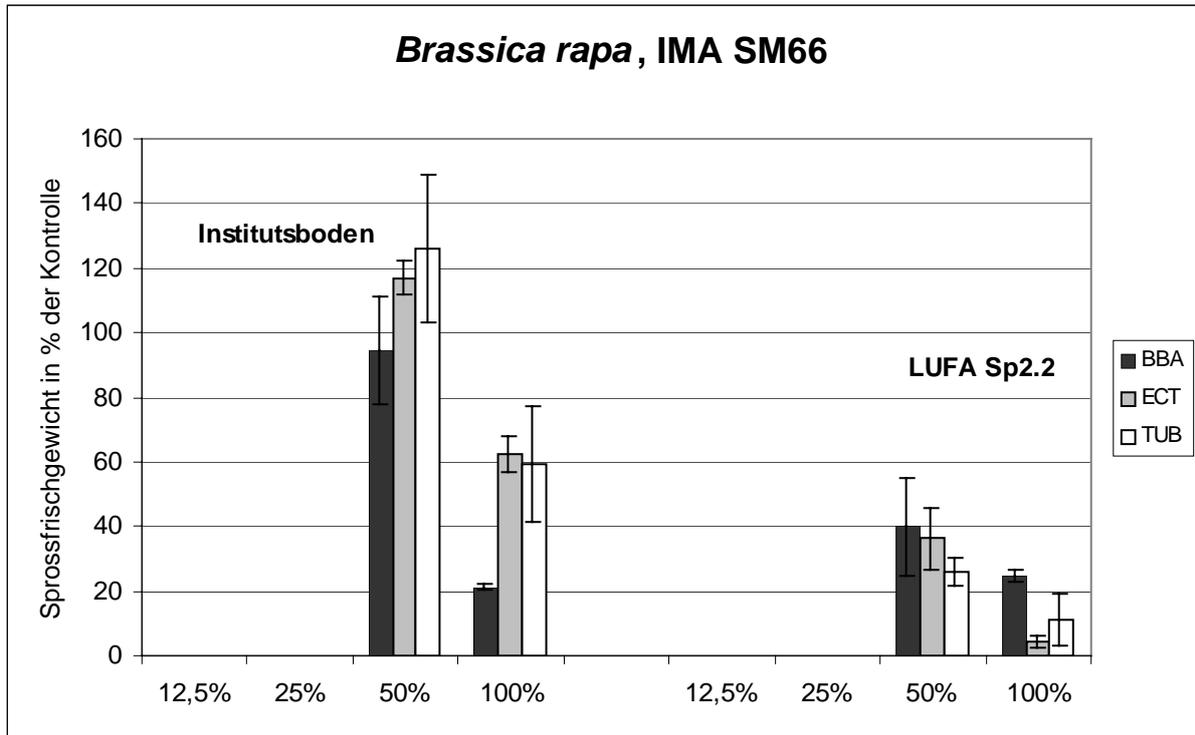


Abbildung VIII - 15: Wirkung des Testbodens IMA SM66 auf die Stoppelrübe

Absolutwerte der Kontrollen:

	ECT [FG je Topf (5 Pflanzen)]		BBA [FG je Topf (5 Pflanzen)]		TUB [FG je Topf (5 Pflanzen)]	
LUFA	2,750	± 0,145	1,557	± 0,209	2,396	± 0,217
Institut	0,233	± 0,011	3,358	± 1,706	0,689	± 0,100

Beide Konzentrationen führten im LUFA-Ansatz dosisabhängig zu einer Hemmung des Wachstums, die bei allen Partnern ähnlich ausgeprägt war (10 – 30 % der Kontrolle): Bei Verwendung von Institutsböden war die Wirkung im allgemeinen schwächer (Ausnahme: 100 %-Mischung beim Partner BBA). Allerdings wurden auch hier in der 50 %-Mischung wie bei den Partner ECT und TUB das Kontrollniveau erreicht bzw. überschritten. Eine auffällig geringere Wirkung im OECD-Boden war nicht zu beobachten.

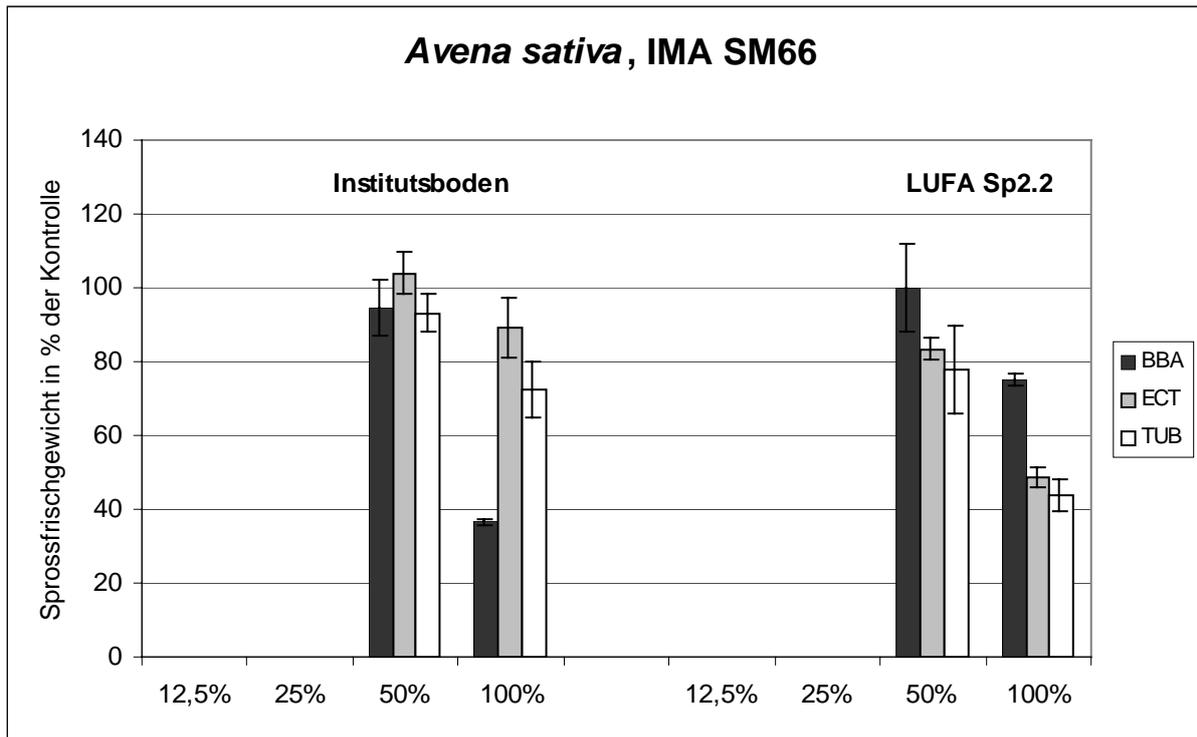


Abbildung VIII - 16: Wirkung des Testbodens IMA SM 66 auf den Hafer

Absolutwerte der Kontrollen:

	ECT		BBA		TUB	
	[FG je Topf (5 Pflanzen)]		[FG je Topf (5 Pflanzen)]		[FG je Topf (5 Pflanzen)]	
LUFA	3,125	± 0,280	1,741	± 0,089	2,935	± 0,453
Institut	0,317	± 0,002	3,582	± 0,666	1,703	± 0,323

In reinem Testboden wuchs Hafer im Vergleich zu LUFA- und dem BBA-Institutsboden schlecht, während bei den anderen Institutsböden sowie bei der 50 %-Mischung und den beiden anderen Mischsubstraten praktisch keine Wirkung auftrat. Wenn auch teilweise sehr wenig konnte in allen Fällen eine dosisabhängige Wirkung beobachtet werden.

Damit ist der Testblock mit dem Boden IMA SM 66 ein weiteres Beispiel dafür, dass sich Hafer gegenüber den hier verwendeten kontaminierten Böden weniger empfindlich erwies als die Stoppelrübe.

VIII - 4.1.8 IMA 927B

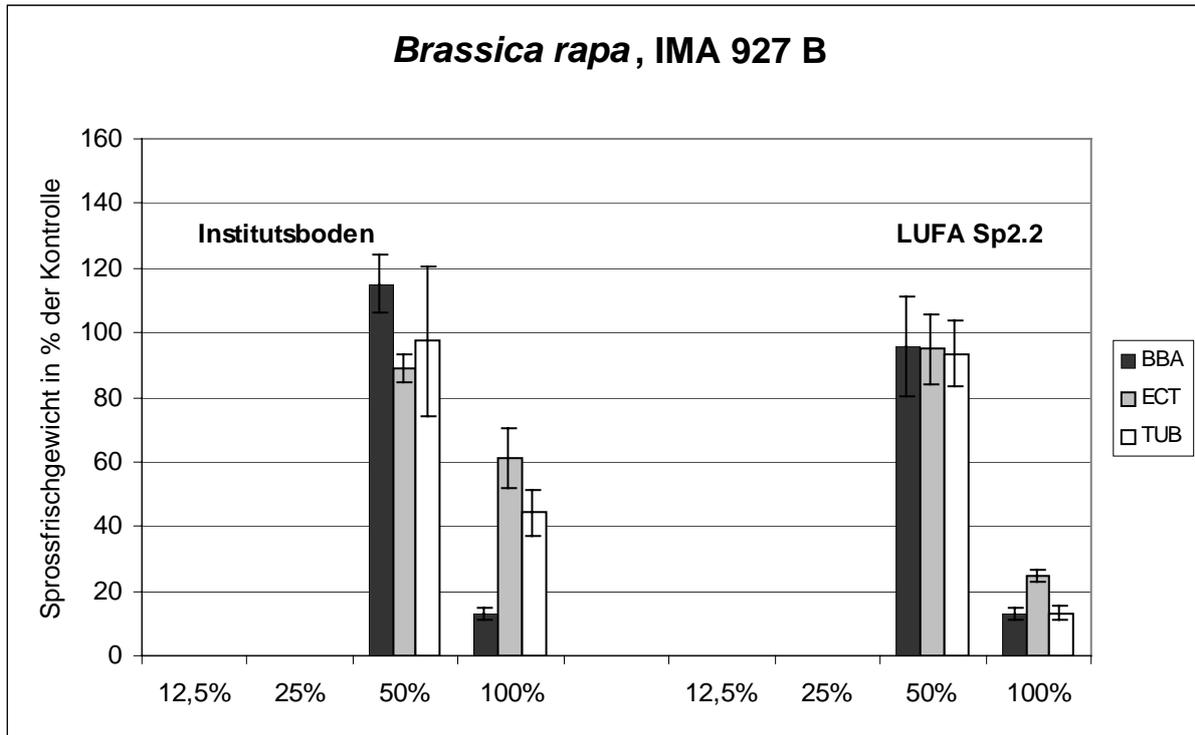


Abbildung VIII - 17: Wirkung des Testbodens IMA 927 B auf die Stoppelrübe

Absolutwerte der Kontrollen:

	ECT [FG je Topf (5 Pflanzen)]		BBA [FG je Topf (5 Pflanzen)]		TUB [FG je Topf (5 Pflanzen)]	
LUFA	2,750	± 0,145	1,557	± 0,209	2,396	± 0,217
Institut	0,233	± 0,011	3,358	± 1,706	0,689	± 0,100

Die Stoppelrübe reagierte in den LUFA-Ansätzen bei einer 50 %-Verdünnung nicht auf diesen Testboden. Die im unverdünnten Boden IMA 927 B gefundene Spanne der Frischgewichtsreduktion (80 – 90 %) war, wenn man nur den LUFA-Ansatz betrachtet, gering – bei Einbeziehung des 100 %-Testbodens in den Versuchen mit Institutsböden erhöhte sich dieser Bereich aber deutlich. Nur beim Partner BBA war die Wirkung im reinen Testboden in beiden Ansätzen gleich, während sie sich bei den Partner ECT und TUB abschwächte. In der 50 %-Mischung stellten alle drei Partner eine nahezu vollständige Angleichung fest. Eine auffällige „Abpufferung“ möglicher Effekte im OECD-Boden war nicht feststellbar.

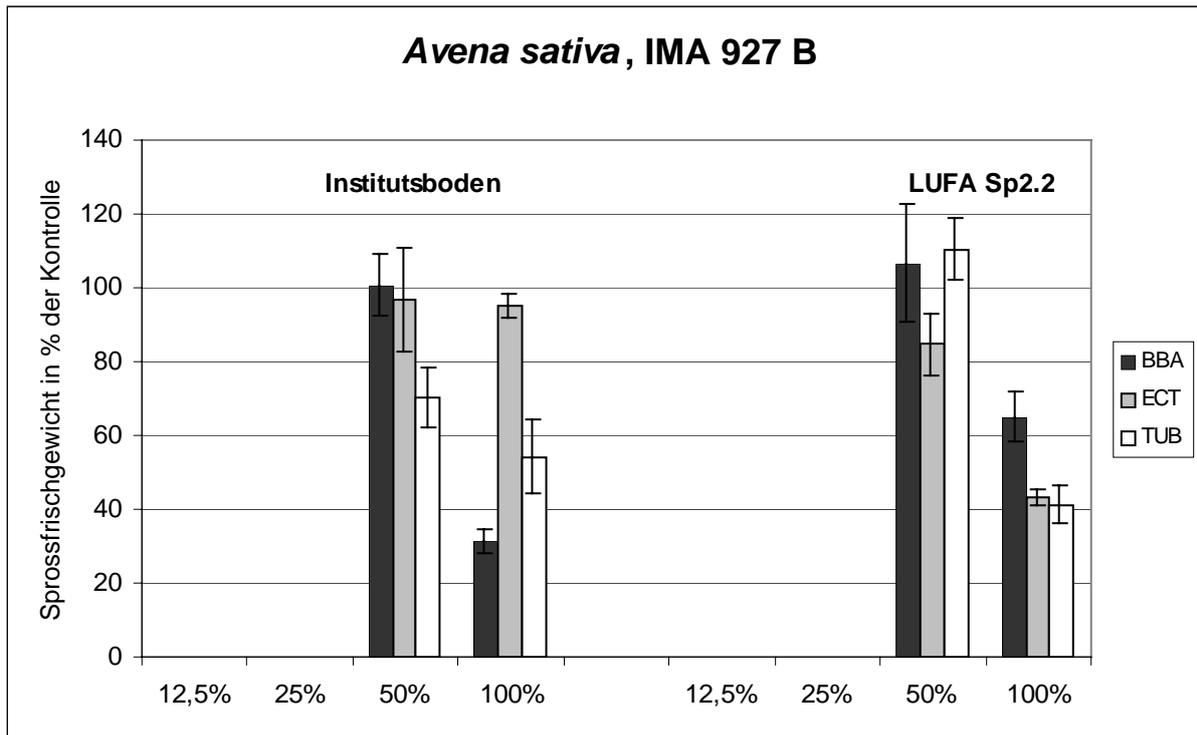


Abbildung VIII - 18: Wirkung des Testbodens IMA 927 B auf den Hafer

Absolutwerte der Kontrollen:

	ECT [FG je Topf (5 Pflanzen)]		BBA [FG je Topf (5 Pflanzen)]		TUB [FG je Topf (5 Pflanzen)]	
LUFA	3,125	± 0,280	1,741	± 0,089	2,935	± 0,453
Institut	0,317	± 0,002	3,582	± 0,666	1,703	± 0,323

Im Vergleich zu den anderen getesteten Böden zeigte IMA 927 B relativ geringe Wirkungen: Im LUFA-Ansatz wie auch bei den Institutsböden (Ausnahme: Partner ECT mit praktisch 100 % der Kontrolle) war im reinen Testansatz eine Reduktion von ca. 50 % festzustellen. Als sehr stark ist nur der Effekt des Testbodens auf den Hafer im BBA-Boden (Reduktion um ca. 2/3) zu bezeichnen. Dagegen war mit einem leichten Abfall beim Partner TUB im Institutsboden-Ansatz in beiden 50 %-Mischungen eine weitgehende Angleichung an die Kontrolle zu beobachten. Das liegt vermutlich an den „schwachen“ Kontrollen bei TUB! Sorgt man für eine bessere Nährstoffversorgung (Nitrat) fallen die Unterschiede deutlicher aus.

VIII - 4.2 Statistischer Vergleich von Test- und Kontrollböden

Vom Partner BBA wurden die Versuchsergebnisse der - eigenen - Tests mit den 8 Testböden statistisch verglichen.

Tabelle VIII - 4: Im Vergleich zur Kontrolle (LUFA oder BBA) signifikant (***)($\alpha=0,05$) geringere Sprossgewichte von Hafer bzw. Rübe in den verschiedenen Abstreckungen der Testböden

Testboden	%	Hafer		Rübe	
		LUFA	BBA	LUFA	BBA
Gaswerk	12.5			***	
	25			***	
	50		***	***	***
	100		***	***	***
Iserlohn	12.5	***	***	***	***
	25	***	***	***	***
	50	***	***	***	***
	100	***	***	***	***
Landhausen	12.5		***	***	***
	25	***	***	***	***
	50	***	***	***	***
	100	***	***	***	***
PAK-Mix	12.5	***	***	***	***
	25	***	***	***	***
	50	***	***	***	***
	100	***	***	***	***
IMA 927	50				
	100	***	***	***	***
Neuohe	50	***	***	***	***
	100	***	***	***	***
Sickergraben	50	***	***	***	***
	100	***	***	***	***
IMA SM66	50				
	100	***	***	***	***

VIII - 4.3 Zusätzliche Tests

VIII - 4.3.1 Parametervergleich Auflauf / Wachstum

Die DIN/ISO Norm 11269-2 ermöglicht im Laufe der Testdurchführung die Bonitur der aufgelaufenen Keimlinge. Eine Mindestzahl von 5 (50 %) aufgelaufenen Keimlingen in der Kontrolle markiert den Beginn der 14-tägigen Versuchsdauer des Wachstumstests. Unter den Versuchsbedingungen war dies meist nach spätestens 5 Tagen der Fall. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen beispielhaft Auflaufbonitierungen für die Testböden „Gaswerk“ (Abbildung VIII - 19) und „Iserlohn“ (Abbildung VIII - 20).

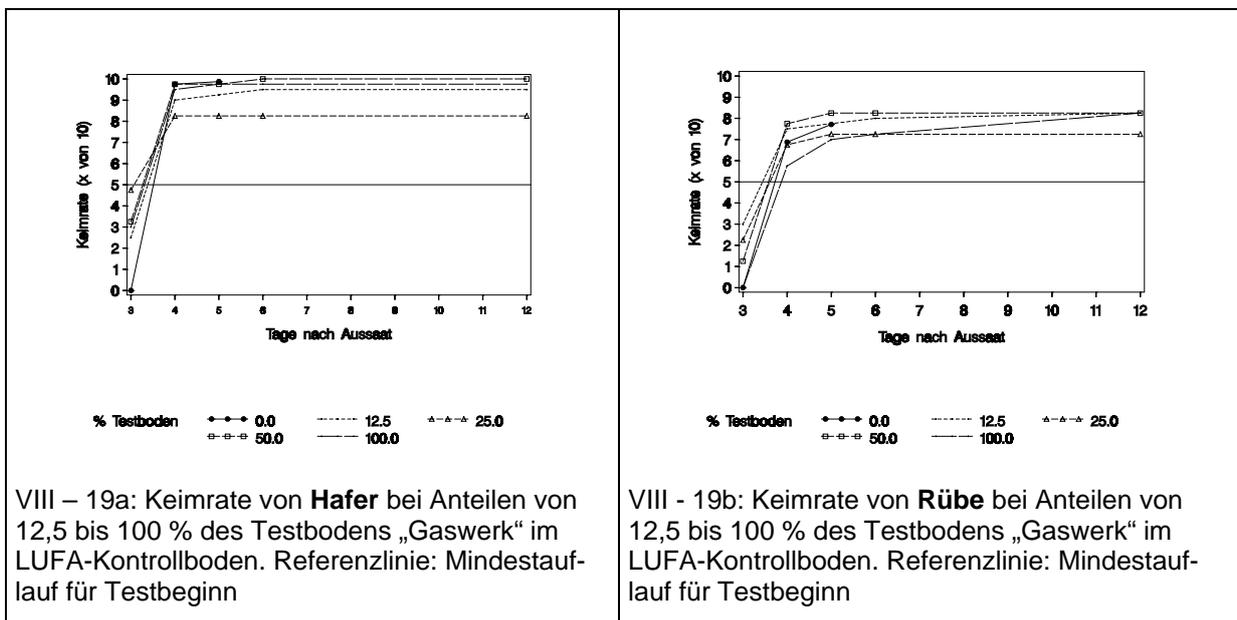


Abbildung VIII - 19: Auflaufbonitierung für den Testboden „Gaswerk“

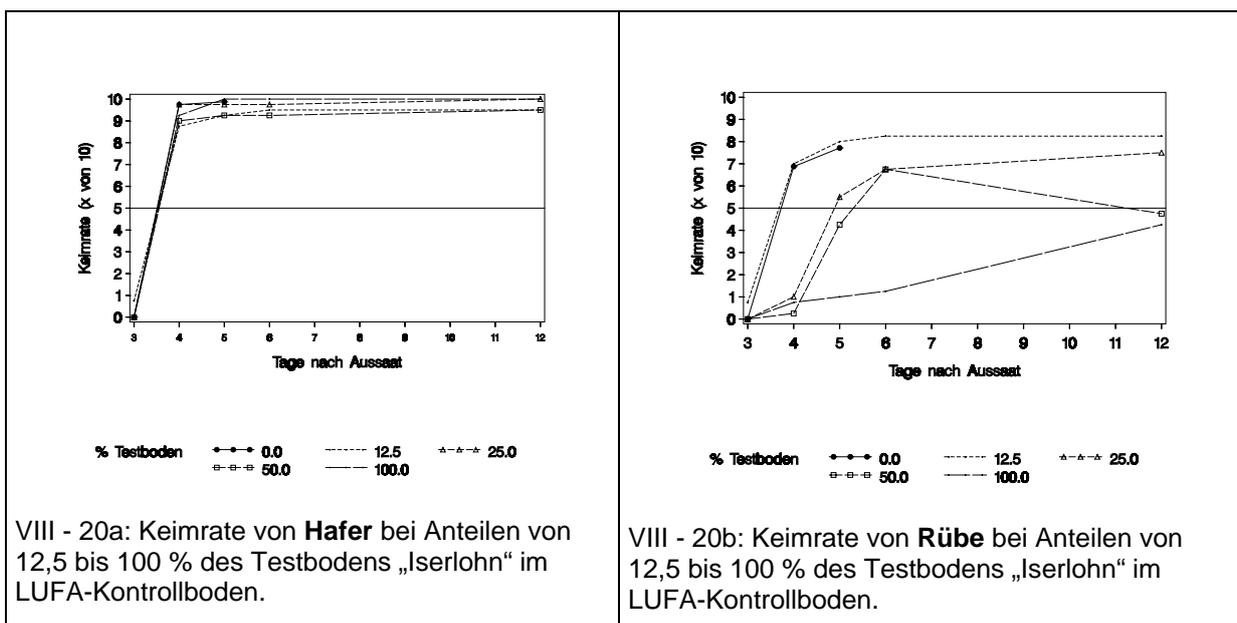


Abbildung VIII - 20: Auflaufbonitierung für den Testboden „Iserlohn“

Die Abbildungen zeigen geringe Effekte, insbesondere bei Hafer, im Fall des Testbodens „Iserlohn“ allerdings auch eine deutlichere Auflaufhemmung bei der Rübe (*Brassica rapa*) als Testpflanze.

Was der Testparameter „Auflauf“, der gerne für „Screening Tests“ vorgeschlagen wird, im Vergleich mit dem Parameter „Wachstum“ leistet, kann den folgenden Tabellen entnommen werden. Diese zeigen für die Testserien mit den Böden Gaswerk, Iserlohn, Landhausen und PAK-Mix bzw. Celle, IMA 927, Neuohe, Sickergraben und IMA SM66 diejenigen Prozentanteile der jeweiligen Testböden, bei denen eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant ($\alpha=0,05$) niedrigere Keimrate beobachtet wurde.

Tabelle VIII - 5: Im Vergleich zur Kontrolle signifikant (***) geringere Keimraten von Hafer bzw. Rübe nach 5 Tagen in abgestuften Testbodenanteilen (12,5 – 100 %) der beiden Kontrollböden LUFA oder BBA-Lager. Zum Vergleich sind die für den Parameter „Wachstum“ ermittelten Schwellenwerte grau unterlegt.

Testboden	%	Hafer		Rübe	
		LUFA	BBA-Lager	LUFA	BBA-Lager
Gaswerk	12.5				
	25	***			
	50				
	100		***		***
Iserlohn ¹	12.5				***
	25				***
	50				***
	100		***	***	***
Landhausen ¹	12.5			***	***
	25			***	***
	50			***	***
	100	***	***	***	***
PAK-Mix	12.5			***	***
	25	***	***	***	***
	50	***	***	***	***
	100	***	***	***	***

¹) nach 4 Tagen

Tabelle VIII - 5 macht deutlich, dass

- das Wachstum bei allen Testböden der empfindlichere Parameter ist,
- die Empfindlichkeit des Parameters „Keimrate“ abhängig vom verwendeten Kontrollboden ist,
- die Testpflanzen auch hinsichtlich ihrer Keimrate unterschiedlich empfindlich reagieren und
- zumindest bei der Rübe die Keimrate als Screening Testparameter geeignet erscheint.

Tabelle VIII - 6: Im Vergleich zur Kontrolle (LUFA oder BBA-Lager) signifikant (***) geringere Keimraten von Hafer bzw. Rübe nach 5 Tagen in abgestuften Testbodenanteilen (50 und 100 %) der beiden Kontrollböden LUFA oder BBA-Lager

Testboden	%	Hafer		Rübe	
		LUFA	BBA-Lager	LUFA	BBA-Lager
Celle	100			***	***
IMA 927	50				
	100				
Neuohe	50				
	100				
Sickergraben	50			***	***
	100			***	***
IMA SM66	50				
	100				

Im Falle der in Tabelle VIII - 6 verwendeten Testböden bestätigt sich die größere Empfindlichkeit der Rübe. Hafer zeigt bei keinem der Böden eine Wirkung auf den Auflauf nach 5 Tagen. Auch mit der Rübe als Testpflanze würde „Neuohe“ nicht als phytotoxisch erkannt. Insgesamt ist also eine deutlich geringere Empfindlichkeit des Parameters Auflauf festzustellen.

VIII - 4.3.2 Wurzellängentests mit Hafer

Mit dem Testböden Gaswerk 1:2 und dem Kontrollboden LUFA wurden Wurzellängentests mit Hafer in Anlehnung an DIN ISO 11269-1 von allen drei Partnern durchgeführt. Zusätzlich wurden von den Partnern ECT und TUB Mischungsansätze mit Institutsböden angesetzt, während der Partner BBA einen zusätzlichen Test mit dem Boden Sickergraben durchführte.

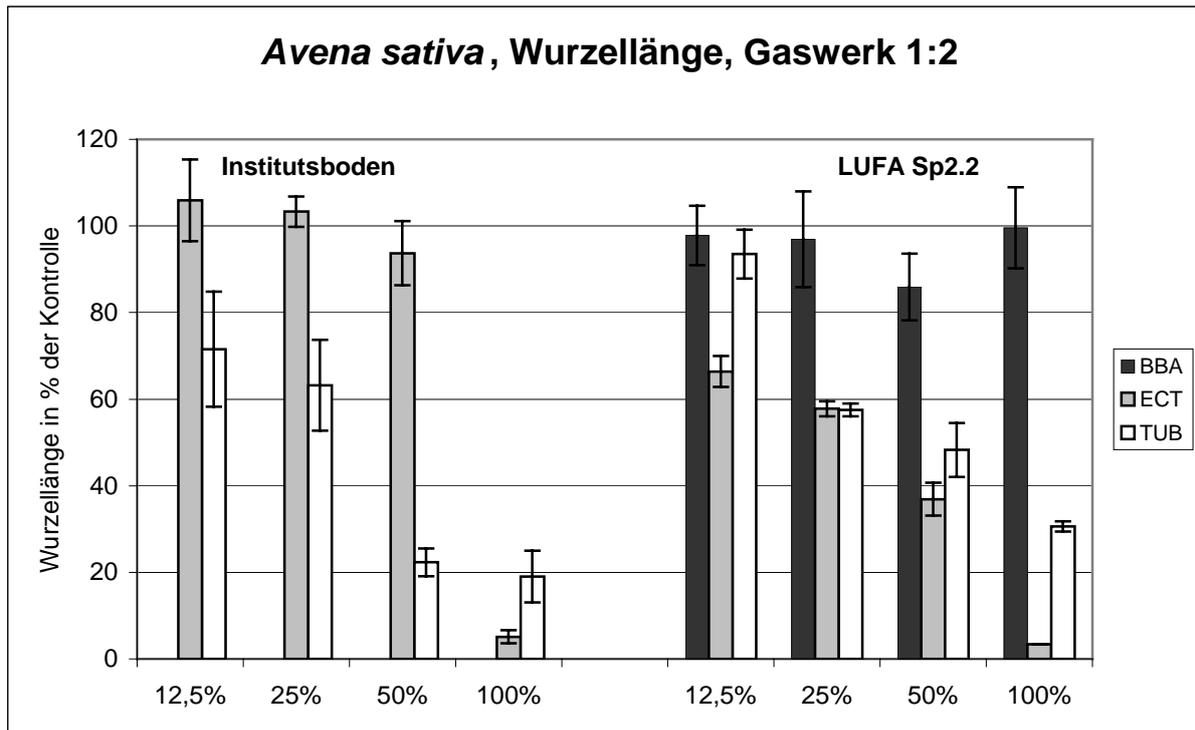


Abbildung VIII - 21: Wirkung des Testbodens Gaswerk 1:2 auf den Hafer im Wurzellängentest

In den LUFA-Ansätzen wurde bei den Partnern ECT und TUB eine dosisabhängige Wirkung festgestellt, die allerdings beim Ersten stärker (d.h. noch in der kleinsten Verdünnung bestehend) ausgeprägt war. Dagegen konnten vom Partner BBA keinerlei Wirkung in allen Konzentrationen (s. Tabelle VIII - 6) gemessen werden, so dass ein weiterer Test mit Institutsboden nicht mehr durchgeführt wurde. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zum Verhalten des Hafers im ersten Testdurchgang mit dem Endpunkt Sprossfrischgewicht, wo eine rund 60 %-Hemmung des Wachstums im reinen Testboden gefunden wurde. Bei Testung mit dem Inst A Boden fand der Partner TUB eine etwas stärkere Wirkung als bei LUFA, während die Mischung mit dem OECD-Boden beim Partner ECT zum umgekehrten Ergebnis führte.

Tabelle VIII - 7: Ergebnisse des Wurzellängentests mit Hafer für den Testboden Gaswerk 1:2 unter Verwendung des Kontrollbodens LUFA

		Wurzel		Spross		Quotient W/S
% Testbo- den	N	Mittel	VK	Mittel	VK	Mittel
0	40	164,4	12,2	130,5	5,8	1,3
12,5	20	160,8	11,3	141,0	5,0	1,1
25	20	159,3	18,2	140,1	6,9	1,1
50	20	141,2	12,7	146,0	6,6	1,0
100	20	163,8	15,4	119,6	9,9	1,4

Im nur vom Partner BBA durchgeführten Test mit dem Testboden Sickergraben wurde ein fast vollständiger Ausfall der Haferpflanzen gefunden (Abbildung VIII - 22), was die Wurzellänge im Vergleich zum Sprossfrischgewicht für diesen Boden als sensitiveren Parameter ausweist.

Für den Fall des Fehlens einer Kontrolle wird empfohlen, das Verhältnis von Wurzel- zu Sprosslänge als Messendpunkt im Wurzellängentest zu verwenden. Eine entsprechende Auswertung ist nur für die Gaswerk 1:2 -Daten der Partner TUB und BBA möglich (Abbildung VIII - 23, Tabelle VIII - 7). Dabei zeigt sich, dass der Quotient etwas weniger empfindlich ist als die Wurzellänge selber. Trotz der Notwendigkeit weiterer Überprüfung ist wegen seines hohen Aufwands der Wurzellängentest nach jetzigem Kenntnisstand keine Alternative für die Erfassung phytotoxischer Effekte von Chemikalien in Böden.

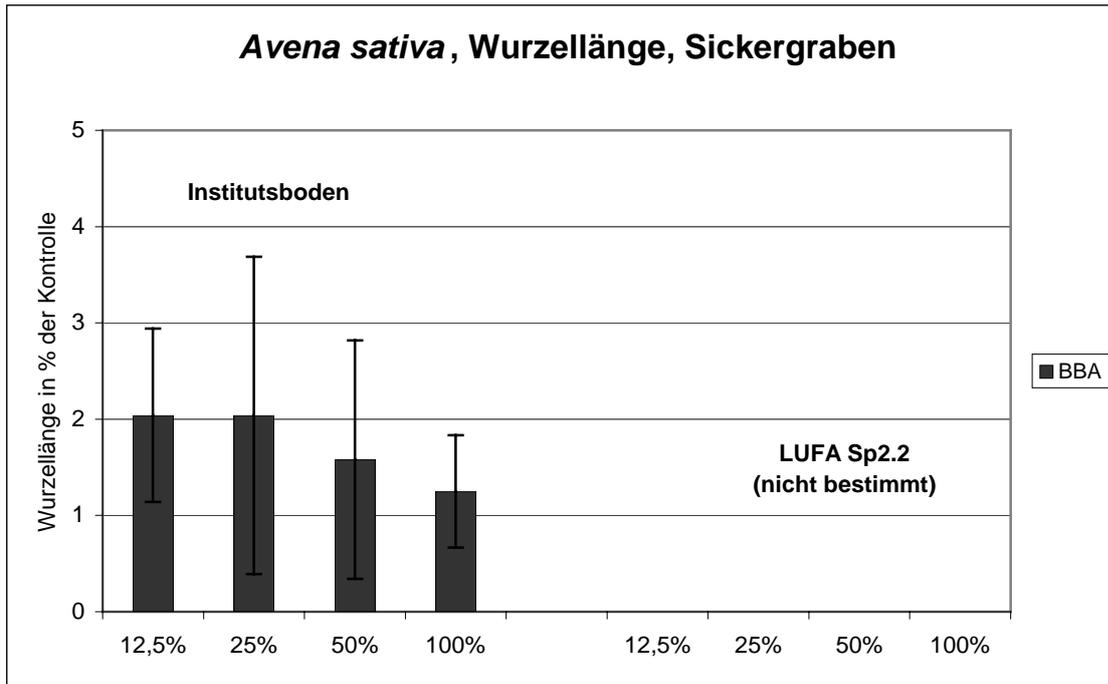


Abbildung VIII - 22: Wirkung des Testbodens Sickergraben auf den Hafer im Wurzellängentest

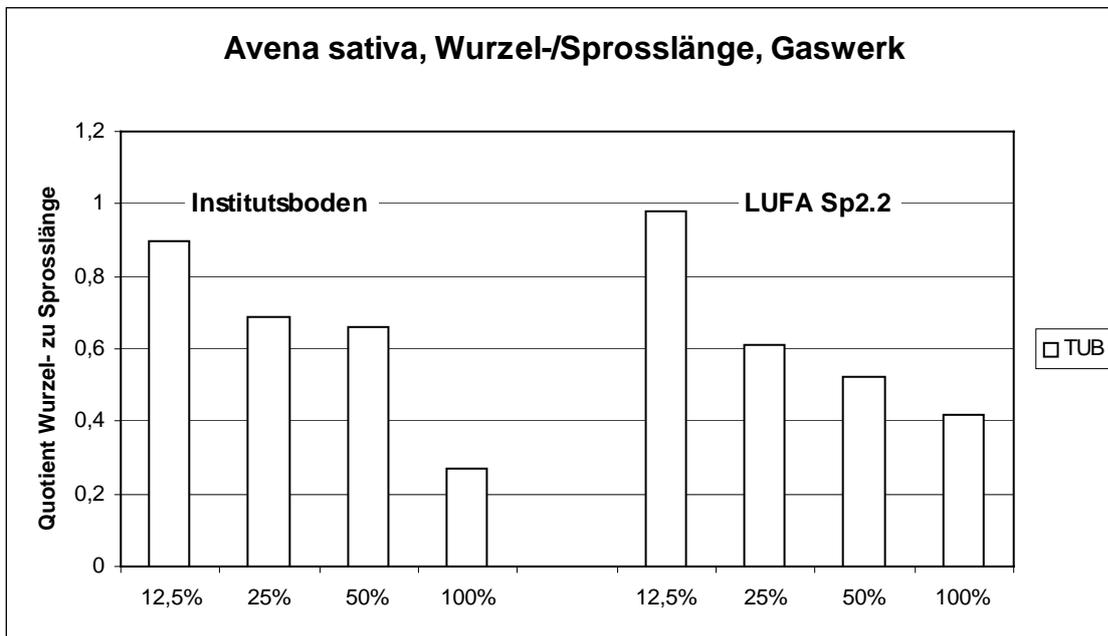


Abbildung VIII - 23: Wirkung des Testbodens Gaswerk 1:2 auf den Quotienten Wurzel/Sprosslänge beim Hafer im Wurzellängentest

VIII - 4.3.3 Vergleich von Test- und Referenzböden (Celle)

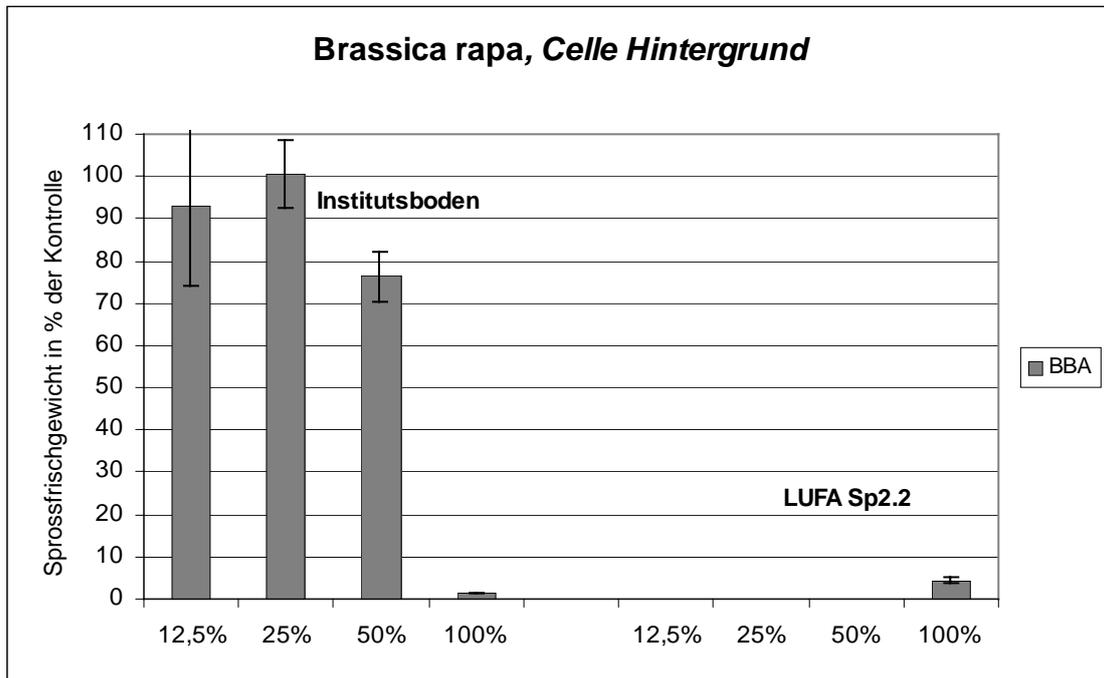


Abbildung VIII - 24: Wirkung des Referenzbodens Celle auf die Stoppelrübe

In einem ersten Ansatz wurde vom Partner BBA die Wirkung des unbelasteten Referenzbodens Celle, eingemischt in den Institutsboden BBA, auf Pflanzen überprüft. Dabei wurde klar, dass der reine Referenzboden eine sehr starke Wirkung sowohl auf die Stoppelrübe (Abbildung VIII - 24) als auch, etwas schwächer, auf den Hafer hat (Abbildung VIII - 25).

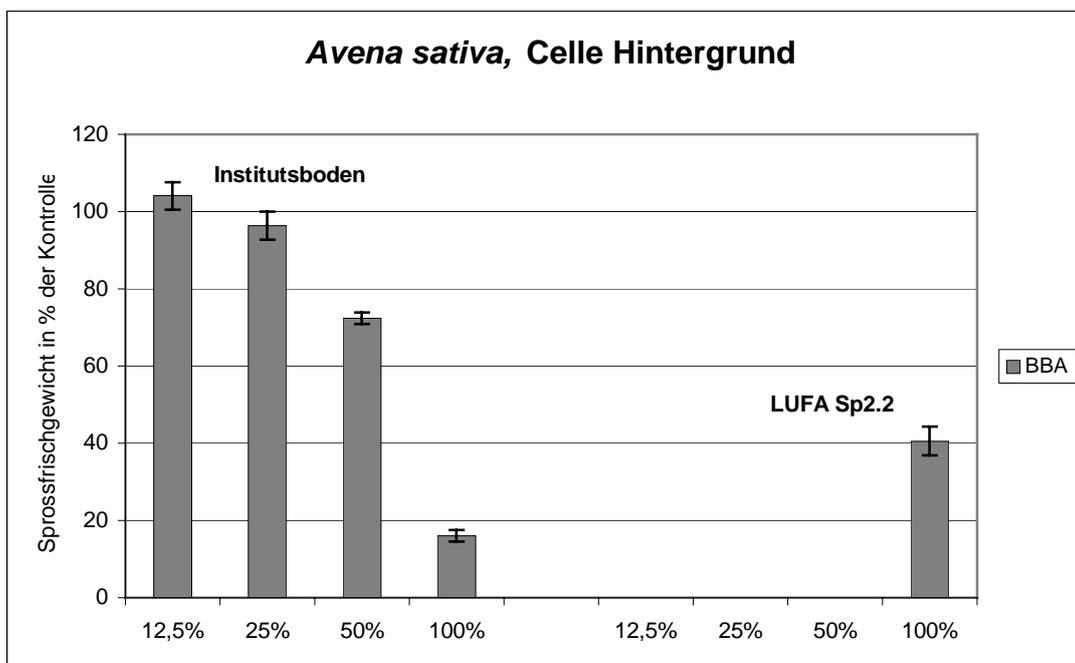


Abbildung VIII - 25: Wirkung des Referenzbodens Celle auf den Hafer

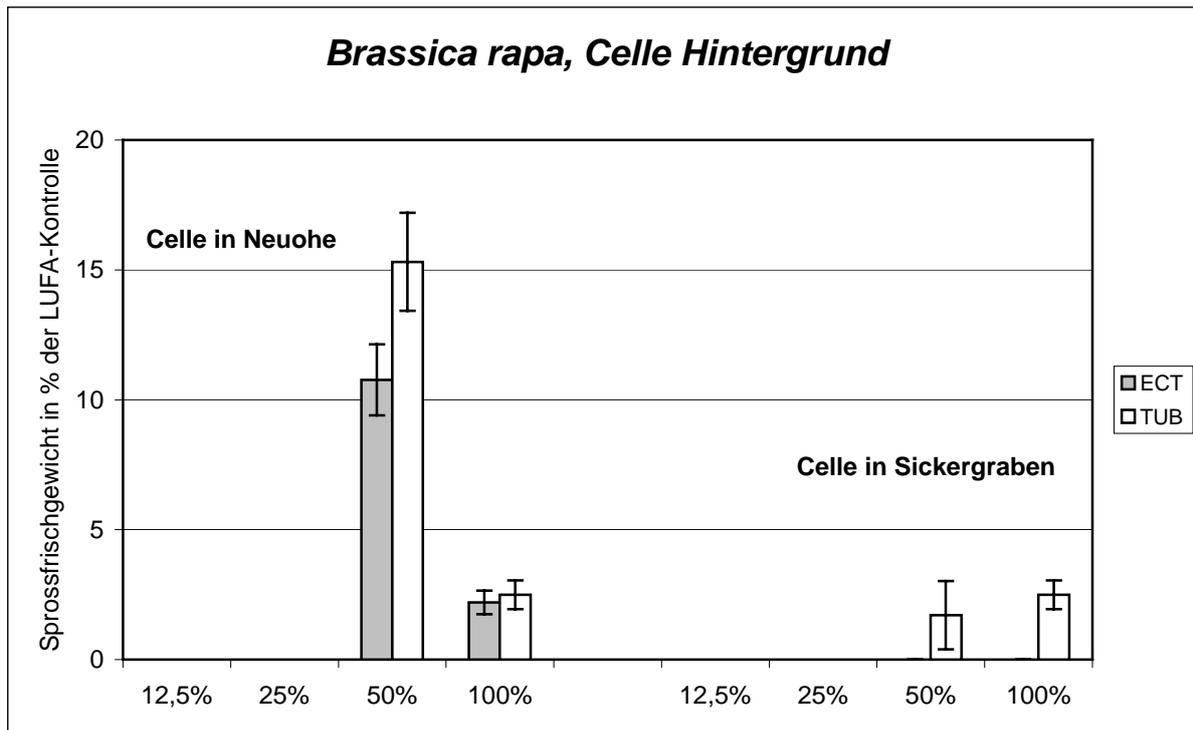


Abbildung VIII - 26: Wirkung der Testböden Neuohhe und Sickergraben auf die Stoppelrübe unter Verwendung des Referenzbodens Celle als Mischsubstrat

In Versuchen mit Testböden bestätigte sich das geringe Wachstum der Rübe in reinem Celle-Boden im Vergleich zur LUFA-Kontrolle. Während die Stoppelrübe in den LUFA- Sickergraben Mischungen wachsen konnte (vgl. Kap. VIII - 4.1.4), wurde bei Verwendung des Celle-Bodens als Mischsubstrat ein minimales Wachstum (< 5 % der LUFA-Kontrolle) beobachtet. Ein umgekehrter Fall ist beim Testboden Neuohhe zu beobachten: Sowohl im Vergleich zu den Ansätzen mit LUFA wie auch zu den Tests mit Institutsböden ist die Wirkung im Vergleich zu den hier vorgestellten Daten deutlich stärker. Bei beiden Testböden ist die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Partner ECT und TUB hoch.

Auch beim Hafer bestätigt sich das schlechte Wachstum im reinen Celle-Boden. Der Testboden Sickergraben führte bei Mischung mit dem Referenzboden Celle zu einem Rückgang des Hafer-Wachstums auf 10 bis 20 % der LUFA-Kontrolle. Auch in den Mischungen von Neuohhe mit Celle-Boden war das Wachstum des Hafers auf ca. 40 – 80 % reduziert.

Insgesamt stellt sich damit die Verwendung eines Referenzbodens als nicht unproblematisch heraus: Trotz Fehlens eines entsprechenden Hinweis wuchsen die Pflanzen im reinen Celle-Boden schlechter als in dem schon recht armen LUFA-Boden. Bevor also ein Boden wie der Celle-Boden als Referenz in Tests eingesetzt werden kann ist seine Qualität in Hinsicht auf die Eignung als Wachstumssubstrat für Pflanzen zu überprüfen.

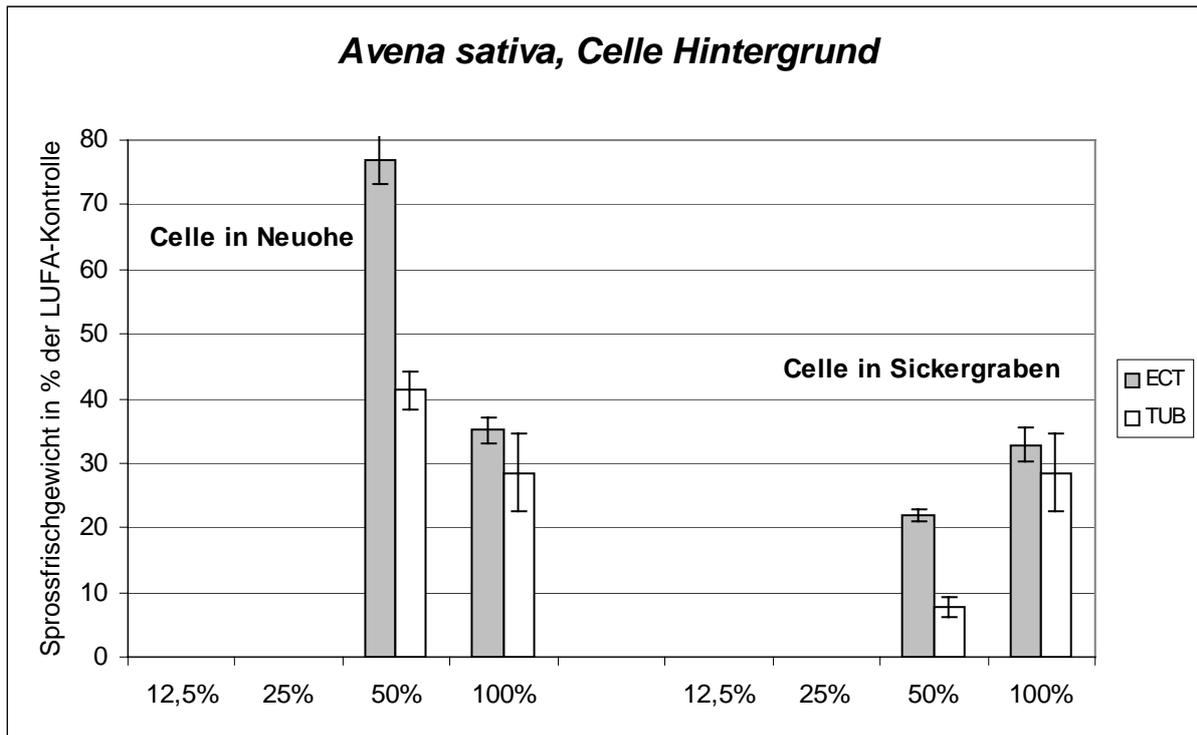


Abbildung VIII - 27: Wirkung der Testböden Neuohe und Sickergraben auf den Hafer unter Verwendung des Referenzbodens Celle als Mischsubstrat

VIII - 4.3.4 Anzahl von Wiederholungen in den Kontrollen

Die zur statistischen Bearbeitung von ökotoxikologischen Tests erforderliche Zahl von Wiederholungen je Versuchsglied wird meist aus pragmatischen, d.h. arbeitstechnischen Gründen, bei 4 angesetzt. Zur Verbesserung der Trennschärfe bei Mittelwertvergleichen werden häufig für die Kontrollgruppe 8 Wiederholungen vorgeschlagen, insbesondere dann, wenn das untersuchte Merkmal erfahrungsgemäß, auch ohne Einfluss eines Chemikalieneffektes, einer deutlichen Streuung unterliegt.

Das Testdesign der vom Partner BBA durchgeführten Wachstumstests mit Hafer und Rübensah sah für alle Kontrollgruppen jeweils 8 Wiederholungen vor. Dabei wurde für alle Testböden, die in einem Versuchsansatz unter denselben Versuchsbedingungen geprüft wurden, eine gemeinsame Kontrolle, bestehend aus LUFA- oder aus BBA-Boden, verwendet.

Auf der Basis der Daten der ersten Tests mit den Böden Gaswerk, Iserlohn, Landhausen und PAK-Mix, gemischt entweder mit LUFA- oder mit BBA-Boden, wurden neben den 8 verwendeten Kontrollen zu Simulationszwecken jeweils 4 zufällig ausgewählte Replikate der Kontrollgruppen verwendet. Damit ergeben sich die Werte der Tabelle VIII - 8.

Tabelle VIII - 8: Mittelwerte aus Kontrollen (LUFA- und BBA-Böden) auf der Basis von 8 bzw. – zufällig ausgewählten – 4 Replikaten (N = 4 grau unterlegt):

Boden	Hafer: Frischgewicht/Topf (mg)			Rübe: Frischgewicht/Topf (mg)		
	N	Mittel	VK	N	Mittel	VK
LUFA	8	1777,1	5,0	8	2050,1	7,8
	4	1727,3	5,8	4	2042,0	10,9
BBA	8	3645,8	5,1	8	2534,9	12,7
	4	3602,5	7,3	4	2604,8	17,3

Es zeigt sich, dass bei dieser willkürlichen Auswahl von 4 aus 8 Wiederholungen die Variationskoeffizienten (VK) zwar weiterhin relativ niedrig bleiben, aber in allen Fällen gegenüber N = 8 erhöht sind. Angesichts des in den Kontrollgruppen sehr homogenen Datenmaterials sollten kaum Auswirkungen auf multiple Mittelwertvergleiche zu erwarten sein. Allerdings erwiesen sich die verschiedenen Tests als unterschiedlich empfindlich, insbesondere bei schwachen Haupteffekten wie im Falle des Gaswerkbodens.

Unabhängig von der Anzahl der Wiederholungen in der Kontrolle ergaben sich keine Abweichungen von den zur Kontrolle als signifikant verschieden befundenen Abstreckungen bei Verwendung des Multiple-Range-Tests nach Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (SAS® Statistikprogramm), der für die Auswertung aller Versuche herangezogen wurde. Bei Verwendung des Bonferroni t-Tests ergaben sich allerdings für den Gaswerkboden geringfügige Unterschiede in der Identifizierung signifikanter ($\alpha = 0,05$) Unterschiede zwischen den Sprossgewichten der Behandlungen und der Kontrolle.

Die Auswirkungen der hier vorgenommenen Simulation auf den minimalen signifikanten Unterschied (Δ) bei Anwendung des „Bonferronitests“ in Abhängigkeit von Testpflanzen und Testböden zeigt die nachfolgende Tabelle VIII - 9.

Tabelle VIII - 9: Auswirkungen der Simulation von 4 Kontrollwerten im Vergleich zu 8 Kontrollen auf den minimalen signifikanten Unterschied (Δ) bei Anwendung des „Bonferroni-tests“ in Abhängigkeit von Testpflanzen und Testböden

Kontrollboden: LUFA			
Testpflanze	Testboden	min. signifikanter Unterschied (Δ)	
		N = 8	N = 4
Hafer	Gaswerk	277,73	327,81
	Iserlohn	166,06	182,05
	Landhausen	171,52	188,34
	PAK-Mix	137,89	140,46
Rübe	Gaswerk	350,44	417,46
	Iserlohn	211,34	237,44
	Landhausen	214,69	241,93
	PAK-Mix	207,44	232,19
Kontrollboden: BBA			
Hafer	Gaswerk	386,57	462,40
	Iserlohn	332,55	393,96
	Landhausen	290,45	340,05
	PAK-Mix	261,32	302,29
Rübe	Gaswerk	733,82	879,20
	Iserlohn	435,21	496,29
	Landhausen	420,25	476,45
	PAK-Mix	415,06	469,53

Hinsichtlich der Zuordnung signifikanter Unterschiede (***) bei den Mittelwertvergleichen Abstreckung – Kontrolle der Sprossfrischgewichte ergaben sich lediglich beim Gaswerk – Boden Unterschiede (Tabelle VIII - 10).

Tabelle VIII - 10: Zuordnung signifikanter Unterschiede (***) bei den Mittelwertvergleichen Abstreckung – Kontrolle der Sprossfrischgewichte. In 3 Fällen (dunkelgrau unterlegt) wäre bei einer Wiederholungszahl von 4 kein signifikanter Unterschied bei Verwendung des Bonferroni – Tests festgestellt worden.

Gasw. %	Hafer				Rübe			
	LUFA		BBA		LUFA		BBA	
	N = 8	N = 4	N = 8	N = 4	N = 8	N = 4	N = 8	N = 4
12,5					***			
25					***			
50			***		***	***		
100			***	***	***	***	***	***

VIII - 4.4 Positivkontrolle

Die Tests mit der Referenzsubstanz Goltix compact (Wirkstoffgehalt: 900 g/kg Metamitron) wurden von allen drei Partnern mit beiden Testspezies sowie beiden Mischsubstraten durchgeführt. Die Konzentrationsabstufungen von 1 – 100 mg/kg (Hafer) und 0,1 – 10 mg/kg (Rübe) wurden nach Umrechnung flächenbezogener Aufwandmengen und einem „range finding“ festgelegt. Aufgrund der teils hohen Variabilität innerhalb eines Testgefäßes bzw. zwischen den Replikaten einer Konzentration und zwischen den Partnern wurden einige der Tests wiederholt.

VIII - 4.4.1 Tests mit der Stoppelrübe

In Abbildung VIII - 28 ist die Wirkung der Referenzsubstanz Goltix in LUFA-Boden auf die Stoppelrübe relativ zur Kontrolle dargestellt. Trotz einiger Schwankungen (z.B. einmal geringe Wirkung bei 5 mg/kg) ist eine Dosis-Wirkungsbeziehung deutlich erkennbar. Auf die Darstellung von Fehlerbalken wurde wegen des teilweise Fehlens individueller Daten verzichtet. Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass die Variabilität erheblich war. Ausgehend von diesen Daten wurden die NOEC- und LOEC-Werte berechnet (Tabelle VIII - 11). Bei Ausschluss der jeweiligen Extremwerte scheint der NOEC-Wert für diese Substanz für die Stoppelrübe bei 0,1 – 1,0 mg/kg zu liegen (LOEC entsprechend 0,5 – 5,0 mg/kg).

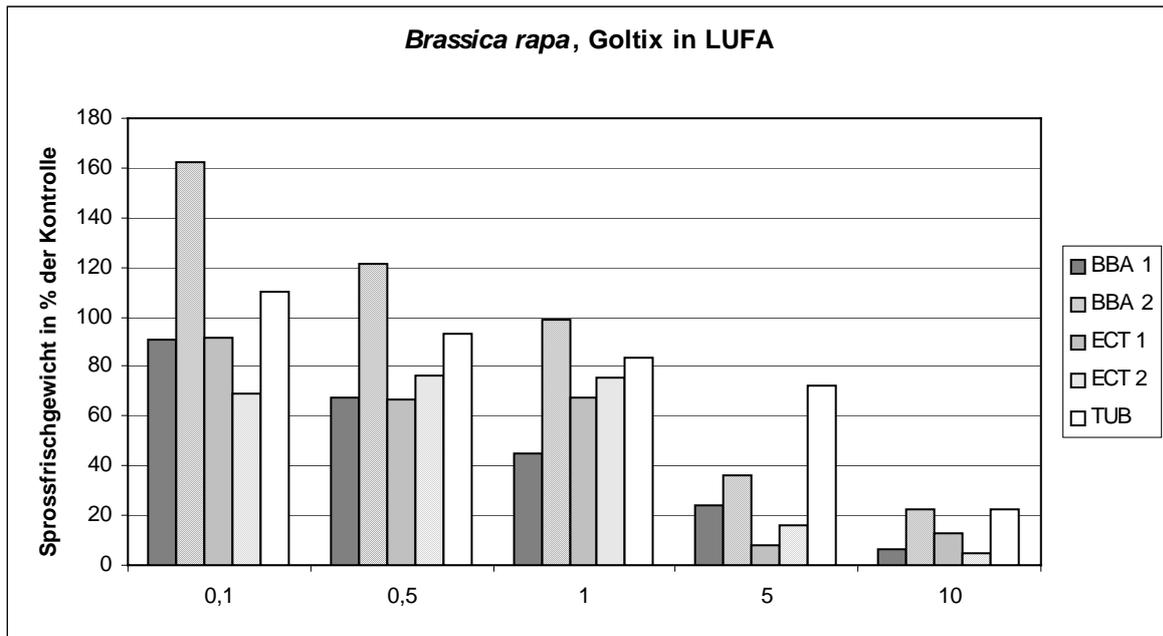


Abbildung VIII - 28: Wirkung der Referenzsubstanz Goltix compact auf die Stoppelrübe

Tabelle VIII - 11: NOEC und LOEC Konzentrationen von Goltix compact (mg/kg Boden) bei der Stoppelrübe (Je zwei Tests bei BBA und ECT, einer bei TUB).

	BBA 1	BBA 2	ECT 1	ECT 2	TUB
NOEC	0,1	1,0	0,1	< 0,1	5
LOEC	1,0	5,0	0,5	0,1	10

VIII - 4.4.2 Tests mit Hafer

Analog zum Vorgehen bei der Stoppelrübe wurden die Wirkung der Referenzsubstanz Goltix auf den Hafer sowie die zugehörigen statistischen Kennwerte dargestellt bzw. berechnet (Abbildung VIII - 29; Tabelle VIII - 12). Obwohl sich auch hier eine Dosis-Wirkung andeutet sind die Schwankungen – trotz des deutlich breiteren Bereichs der getesteten Konzentrationen – höher als bei der Stoppelrübe. Während bei den Partnern ECT und, teilweise, BBA Wirkungen in einem der Stoppelrübe vergleichbaren Bereich sichern ließen (NOEC: 0,5 – 1 bzw. LOEC: 1 mg/kg), lagen NOEC- bzw. LOEC-Wert beim Partner TUB um eine Größenordnung höher (eine Wiederholung des Versuchs ist noch in Arbeit).

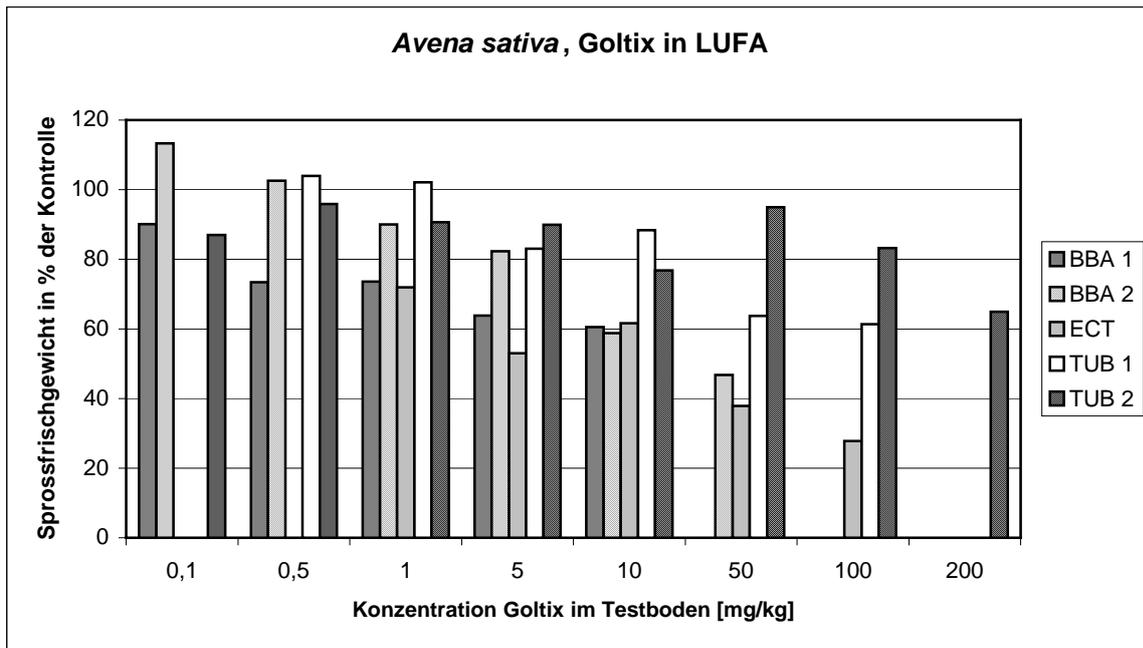


Abbildung VIII - 29: Wirkung der Referenzsubstanz Goltix compact auf den Hafer (100 mg/kg wurden nur bei ECT und TUB, 200 mg/kg nur bei TUB 2 getestet).

Tabelle VIII - 12: NOEC und LOEC Konzentrationen von Goltix compact (mg/kg Boden) bei Hafer (zwei Tests beim Projektpartner BBA, je einer bei ECT und TUB).

	BBA 1	BBA 2	ECT	TUB
NOEC	0,1	0,5	< 1,0	10
LOEC	1,0	1,0	1,0	50

VIII - 4.4.3 Statistische Auswertung der Versuche des Partners BBA

Beim Partner BBA wurden zwei Tests mit verschiedenen Konzentrationsbereichen durchgeführt, die die Berechnung von ECx-Werten erlaubten (trotz teilweise schlechter Kurvenanpassung). Der Tabelle VIII - 13 sind die berechneten Schwellenwerte für beide Testspezies zu entnehmen.

Tabelle VIII - 13: Zusammenfassung der Schwellenwerte für die Zielgröße „Frischgewicht“ des Referenztests mit Goltix compact (*95 % Vertrauensgrenzen)

Schwellenwert	Hafer (mg/kg)	Rübe (mg/kg)
EC 10	0,17 (0,02 – 0,49)*	0,10 (0,06 – 0,15)*
EC 50	2,26 (0,92 – 3,68)*	1,01 (0,80 – 1,27)*

VIII - 5 Diskussion

VIII - 5.1 Streubreite der Ergebnisse

In den meisten Tests lag die Standardabweichung sehr niedrig. Nur bei starker Beeinträchtigung des Wachstums, z.B. in den Ansätzen mit dem Boden PAK-Mix, wurden Werte von mehr als 100 % erreicht. In der folgenden Tabelle VIII - 14 wird auf der Grundlage von Kontrolltests aus den Testansätzen mit den Böden Landhausen, Iserlohn und Gaswerk 1:2 der Variationskoeffizient dargestellt (getrennt nach den vier verwendeten Mischsubstraten sowie den beiden Testspezies). Es ist davon auszugehen, dass dieser zufällige Ausschnitt aus der Gesamtheit aller Tests die Grundtendenz korrekt wiedergibt. Demnach liegen die Variationskoeffizienten, bezogen auf die jeweiligen Wiederholungen, unter 20 %, gerade beim Hafer sogar mehrfach unter 10 %. Im Durchschnitt ist die Stoppelrübe etwas variabler als der Hafer (VK im Durchschnitt 14,6 % versus 10,6 % im Mischsubstrat LUFA). In einigen wenigen Tests – hier nicht dargestellt – konnte der Variationskoeffizient in Tests mit der Stoppelrübe sogar über 30, im Maximum sogar bei 50 % liegen. Ein deutlicher Unterschied in der Variabilität der Ergebnisse in den drei Laboratorien war nicht feststellbar.

Tabelle VIII - 14: Variationskoeffizient in den Kontrollansätzen verschiedener Tests in Abhängigkeit vom Mischsubstrat und der verwendeten Testspezies sowie im Fall von LUFA der Mittelwert der drei Partnerinstitutionen

Mischsubstrat	Testspezies: Stoppelrübe [%]				Testspezies: Hafer [%]			
	BBA	ECT	TUB	Mittelwert	BBA	ECT	TUB	Mittelwert
LUFA	7,8	16,2	19,8	14,6	15,8	11,3	4,7	10,6
BBA	12,7	-	-	-	3,8	-	-	-
OECD	-	7,1	-	-	-	8,0	-	-
Inst A	-	-	14,1	-	-	-	13,5	-

VIII - 5.2 Einfluss der Kontrollböden auf das Wachstum der Pflanzen

Alle drei Institutsböden (einschließlich des OECD-Kunstabodens) wie auch der LUFA-Standardboden eigneten sich für das Wachstum der beiden Pflanzenarten. Die Schwankungen innerhalb der Kontrollansätze eines Bodens waren teils ebenso groß oder sogar noch größer als die Unterschiede zwischen den Böden. Etwas aus dem Rahmen fiel nur der OECD-Kunstaboden, in dem, wahrscheinlich wegen des gegenüber den drei anderen Böden deutlich höherem organischen Gehalt, das Wachstum der Pflanzen in den Mischungsansätzen im Vergleich zum reinen OECD-Boden prozentual häufig erhöht war. Dabei darf nicht

vergessen werden, dass das Wachstum im OECD-Kunstaboden absolut gesehen deutlich geringer war: im Durchschnitt erreichten die Pflanzen zwischen 20 und 30 % des Frischgewichts im Vergleich zum LUFA-Standardboden. Demgegenüber zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den drei anderen Böden, die sich hinsichtlich Bodenart, pH und organischem Gehalt nicht stark unterschieden.

Es fällt auf, dass in sehr vielen Mischungsansätzen die Wirkung des jeweiligen Testbodens im Inst A des Partners TUB erwartungsgemäß stärker war als in den Testansätzen des Partners BBA. Der BBA-Boden weist mit einem C_{org} -Gehalt von 2,19 % ein deutlich höheres Sorptionsvermögen insbesondere gegenüber organischen Schadstoffen auf als der Inst A Boden (C_{org} 0,6 %). Allerdings wurde eine ähnliche, wenn auch nicht ganz so durchgehende Differenz auch zwischen den Mischungsansätzen mit LUFA-Standardboden der beiden Partner gefunden. Dies spricht dafür, dass es einen weiteren, wahrscheinlich in den Testbedingungen liegenden Faktor geben muss, der diesen Unterschied bewirkte. Hervorzuheben ist aber, dass diese Differenzen nicht zu einer durchgehend anderen Beurteilung der Testböden führten.

VIII - 5.3 Vergleich der Empfindlichkeit der beiden Testspezies

Auf der Grundlage der in Kap. VIII - 5.4 vorgestellten ökotoxikologischen Beurteilung der 8 Testböden ist die Stoppelrübe empfindlicher als der Hafer einzuschätzen, da bei ersterer 73 % und bei letzterer 62 % als „nicht als Pflanzenstandort geeignet“ eingestuft wurden. Aufgrund der generell hohen Toxizität der getesteten Böden wird bei Zugrundelegung dieses Datensets der Unterschied zwischen beiden Spezies aber eher noch unterschätzt. Bei Einzelbetrachtung (siehe Kap. VIII - 4.1 – VIII - 4.1.8) wird deutlich, dass z.B. im Boden Sickergraben die Stoppelrübe bei keinem Mischungsverhältnis mehr wuchs, während der Hafer bei den niedrigen Konzentrationen, wenn auch nur mit wenigen Prozent der Kontrolle, auftrat. Ähnlich drastisch ist der Unterschied beim Boden PAK-Mix.

Hinsichtlich der Wirkung der Referenzsubstanz ist auf die beiden Pflanzenarten ist die gleiche Tendenz erkennbar: Während bei NOEC und LOEC jeweils der gleiche Wert ermittelt wurde, liegen EC10 bzw. EC50 beim Hafer jeweils ca. um den Faktor 2 oberhalb der Werte für die Stoppelrübe (Basis: Werte des Partners BBA). Diese auf den ersten Blick überraschende Differenz erklärt sich durch die im Vergleich zur Rübe geringeren Variabilität der Ergebnisse mit Hafer, wodurch bei einem NOEC-Design vorhandene Empfindlichkeitsunterschiede nicht mehr erfasst werden. In den ECx-Werten spiegelt sich dann die Sensitivitätsdifferenz beider Arten ungefiltert wieder.

Während damit – in Übereinstimmung mit Literaturergebnissen (z.B. KALSCH et al. 2000) - die Stoppelrübe in den meisten Fällen empfindlicher war als der Hafer, so ist letzterer in sei-

nem Wachstum (siehe den Vergleich des jeweiligen Variationskoeffizienten in Kap. VIII - 5.1) gleichmäßiger. Dadurch können bei einem statistischen Vergleich von Testergebnissen eventuelle Wirkungen beim Hafer eher nachgewiesen werden als bei der Stoppelrübe. Damit bestätigt sich der Ansatz der ISO-Norm, mindestens zwei Testspezies als Vertreter der beiden großen Gruppen der höheren Pflanzen sowie mit unterschiedlichen Eigenschaften für die Beurteilung der Bodenqualität in Hinsicht auf seine Phytotoxizität heranzuziehen

VIII - 5.4 Vergleich der Ergebnisse der drei Partner

In der Tabelle VIII - 15 werden die Ergebnisse der Beurteilung der drei Partner, basierend auf den in Kap. VIII - 3.7 aufgeführten Kriterien, und getrennt nach den beiden Testspezies sowie den beiden Testansätzen (LUFA- versus Institutsböden) gegenübergestellt. Die TUB wandte die „Mischmethode“ an, um den Boden entweder als „nicht als Pflanzenstandort geeignet“ (+) oder als „unauffällig“ (-) einzustufen. Die Partner BBA und ECT betrachteten zuerst den reinen Testboden und beurteilten diesen, im Falle einer statistisch signifikanten Differenz bzw. eines Unterschied von 30 %, jeweils zur Kontrolle, als „auffällig“ ((?) sonst als „unauffällig“). Im erstgenannten Fall wurden dann die weiteren Mischungen betrachtet und nach den gleichen Kriterien beurteilt. Auf der Grundlage dieser „finalen“ Beurteilung wird die Übereinstimmung zwischen den Partnern in Prozent festgehalten (100, 67 und 33 % sind möglich).

Tabelle VIII - 15: Beurteilung der Testböden durch die drei Partner sowie deren Übereinstimmung in Prozent für die Stoppelrübe (- unauffällig, ? auffällig, + nicht als Pflanzenstandort geeignet)

Testboden	LUFA				Institutsboden			
	BBA	ECT	TUB	Übereinstimmung	BBA	ECT	TUB	Übereinstimmung
Landhausen	+	+	+	100 %	+	+	+	100 %
Iserlohn	+	+	+	100 %	+	+	+	100 %
Gaswerk 1:2	+	+	+	100 %	+	?	+	66 %
PAK-Mix	+	+	+	100 %	+	+	+	100 %
Sickergraben	+	+	+	100 %	+	+	+	100 %
Neuohe	+	+	+	100 %	+	+	-	66 %
IMA SM 66	?	+	-	33 %	?	?	-	66 %
IMA 927B	?	?	-	66 %	?	?	-	66 %

Tabelle VIII - 16: Beurteilung der Testböden durch die drei Partner sowie deren Übereinstimmung in Prozent für den Hafer (- unauffällig, ? auffällig, + nicht als Pflanzenstandort geeignet)

Testboden	LUFA				Institutsboden			
	BBA	ECT	TUB	Übereinstimmung	BBA	ECT	TUB	Übereinstimmung
Landhausen	+	+	+	100 %	+	+	+	100 %
Iserlohn	+	+	+	100 %	+	+	+	100 %
Gaswerk 1:2	-	+	-	66 %	+	?	+	66 %
PAK-Mix	+	+	+	100 %	+	+	+	100 %
Sickergraben	+	+	+	100 %	+	+	+	100 %
Neuohe	+	+	-	66 %	+	?	-	33 %
IMA SM 66	?	?	-	66 %	?	-	-	66 %
IMA 927B	?	?	-	66 %	?	-	-	66 %

Die acht Testböden wurden von den drei Partnern bei Mischung mit LUFA-Böden wie folgt eingestuft (Bereiche ergeben sich durch Unterschiede bei den beiden Testspezies):

BBA: 5 – 6 als „nicht als Pflanzenstandort geeignet“, 2 als „auffällig“, 0 – 1 als unauffällig.

ECT: 6 – 7 als „nicht als Pflanzenstandort geeignet“, 1 - 2 als „auffällig“.

TUB: 4 – 6 als „nicht als Pflanzenstandort geeignet“, 2 - 4 als „unauffällig“.

Bei Verwendung von Institutsböden änderte sich die Beurteilung nur wenig:

BBA: 6 als „nicht als Pflanzenstandort geeignet“, 2 als „auffällig“.

ECT: 4 - 5 als „nicht als Pflanzenstandort geeignet“, 2 - 3 als „auffällig“, 0 – 2 als unauffällig.

TUB: 5 als „nicht als Pflanzenstandort geeignet“, 3 als „unauffällig“.

Dabei fällt auf, dass sich, wohl aufgrund des „Puffer-Effekts“ des OECD-Kunstbodens, bei dessen Verwendung die Beurteilung abschwächt; d.h. die Zahl der negativ eingestuften Böden geht klar zurück. Dieser Effekt tritt bei den beiden anderen Partnern erwartungsgemäß nicht auf. Mit 85,2 % (LUFA) bzw. 80,9 % (Institutsboden) ergeben sich sehr hohe Übereinstimmungswerte zwischen den drei Partnern. Die Sensitivität beider Testspezies war unterschiedlich: Die Stoppelrübe zeigte in 73 % aller Fälle an, dass ein Boden „als Pflanzenstandort nicht geeignet“ sei, während der entsprechende Wert beim Hafer bei 62 % lag.

VIII - 6 Der Pflanzentest verglichen mit anderen Testsystemen

VIII - 6.1 Generelle Beurteilung

Die Durchführung des akuten Pflanzentests im Laborvergleich erlaubt folgende Aussagen:

Vorbereitungsaufwand:

Hauptproblem für die Durchführung standardisierter Pflanzentest ist die Sicherstellung der entsprechenden Umweltbedingungen, vor allem in Hinsicht auf eine gleichmäßige und hohe Lichtversorgung sowie konstanter Temperatur- und Feuchtebedingungen. Die Herstellung dieser Bedingungen (Phytotron, klimatisierter Laborraum oder Gewächshaus) erfordert hohe Investitionen. Zudem ist der Platzbedarf der Pflanzen groß. Wenn eine Testumgebung zur Verfügung steht, die die Durchführung unter kontrollierten und standardisierten Bedingungen erlaubt, so sind die übrigen Vorbereitungen wie z.B. die Beschaffung von Testsubstrat (Standardböden) oder Testspezies (Samenfachhandel) als gering einzuschätzen.

Arbeitsaufwand bei Testdurchführung:

Der Arbeitsaufwand bei der Testdurchführung ist gering. Nur beim Testansatz sowie bei der Auszählung fällt erhebliche Arbeit an, während in der Zwischenzeit mit Ausnahme gelegentlicher visueller Kontrollen aufgrund der automatischen Befeuchtung fast keine Aktivitäten notwendig sind (Ausnahme: Reduktion der Pflanzen pro Testgefäß nach Auflauf). Der Verzicht auf Messendpunkte wie Auflaufkontrolle oder Wurzellänge sowie die Konzentration auf das Sprossfrischgewicht erleichtert die Durchführung nochmals erheblich.

Standardabweichung der Parallelansätze:

Die Standardabweichungen waren im Allgemeinen sehr niedrig. Nur bei starker Wirkung, wenn nur noch wenige und/oder sehr kleine Pflanzen gewachsen waren, lagen die Variationskoeffizienten deutlich im zweistelligen Bereich. In den Kontrollansätzen lagen sie bei Hafer meist deutlich unter 30 %, häufig sogar unter 20 %, während die Stoppelrübe eine höhere Variabilität zeigte, so dass der VK in einigen Fällen bis zu 50 % erreichte. Insgesamt liegt der VK damit in einer Größenordnung, wie sie von anderen terrestrischen ökotoxikologischen Tests aus der Chemikalienprüfung mit ihren wesentlich homogeneren Testsubstraten (z.B. Regenwurm-Reproduktionstest) bekannt sind.

Auswahl der Testspezies:

Die Sensitivität beider Arten ist unterschiedlich: 73 % der Böden wirkten negativ auf die Stoppelrübe im Vergleich zu 62 % beim Hafer. Dieser Unterschied ist aber im Vergleich zu anderen Kriterien nicht ausreichend, um auf eine der beiden Arten verzichten zu können.

Einfluss der Referenzböden auf das Wachstum:

Alle drei Institutsböden (einschließlich des OECD-Kunstbodens) wie auch der LUFA-Standardboden waren für das Wachstum der Pflanzen geeignet. Die Schwankungen innerhalb der Kontrollansätze eines Bodens waren teils ebenso groß oder sogar noch größer als die Unterschiede zwischen den Böden. Etwas aus dem Rahmen fiel nur der OECD-Kunstboden, in dem, wahrscheinlich wegen seines höheren organischen Gehalts, das Wachstum der Pflanzen in den Mischungsansätzen im Vergleich zum reinen OECD-Boden prozentual häufig erhöht war. Generell ist aus Sicht der Pflanzenernährung der OECD-Boden als ein Mangelsubstrat einzuschätzen. Dennoch ist er ein geeignetes Referenzsubstrat, weil er am besten standardisiert und überall herstellbar ist. Zu überprüfen ist, ob die Verwendung des OECD-Bodens durch Verbesserung der Nährstoffversorgung optimiert werden könnte. Entsprechende Versuche zur Identifizierung einer geeigneten Nährstoffmischung (sowie deren Menge bzw. Konzentration) sind dringend zu empfehlen.

Kriterien zur Beurteilung der Lebensraumfunktion:

Als Beurteilungskriterien wurden sowohl ein fester Grenzwert (> 30 % Unterschied zwischen Testboden und Kontrolle) als auch eine statistisch signifikante Differenz zwischen beiden Böden verwendet. Darüber hinaus wurde die vom Partner TUB entwickelte Mischmethode zur Beurteilung der Wirkung eingesetzt. Da jeder Partner eine andere Beurteilungsmethode verwendete und dennoch eine sehr hohe Übereinstimmung (81 – 85 %) erzielt wurde, besteht gegenwärtig keine Notwendigkeit, eins dieser Verfahren zu bevorzugen.

Vergleichbarkeit der Ergebnisse der verschiedenen Labors:

Die Übereinstimmung der Resultate in Bezug auf die Beurteilung der Böden betrug im Durchschnitt 81 - 85 % (abhängig vom Mischsubstrat: LUFA- oder Institutsboden).

Sensitivität des Testparameters:

Die Sensitivität des Testparameters "Sprossfrischgewicht" ist gleich oder höher als die des Messendpunkts Keimlingsauflauf. Auch eine Bestimmung des Trockengewichts stellt keine Verbesserung dar. Die Eignung des Parameters Wurzellänge ist noch weiter zu überprüfen, wobei allerdings der deutlich höhere Aufwand in die Bewertung einzubeziehen ist. Im Vergleich zu anderen terrestrischen ökotoxikologischen Testverfahren entspricht die Sensitivität des Pflanzentests nach den Erfahrungen dieses Vorhabens mindestens derjenigen von chronischen Tests mit Bodentieren (vgl. Kap. VIII - 6.2).

Methodische Schwierigkeiten:

Methodische Schwierigkeiten wurden nicht beobachtet.

VIII - 6.2 Die Sensitivität des Pflanzentests

Trotz aller Vorbehalte hinsichtlich der Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen eines Pflanzentests und Daten aus Tests mit Bodentieren wird im Folgenden kurz dargestellt, wie die Beurteilung der 8 Testböden (primär 100 % Mischung) in den einzelnen Testsystemen aussieht. Aus Gründen einer besseren Vergleichbarkeit wird dabei nur auf Versuche mit LUFA-Boden als Kontrollsubstrat sowie den jeweils empfindlichsten Messendpunkt (d.h. bei den Tieren die Reproduktion) eingegangen. Auch wird nicht zwischen den einzelnen Partnern (bei den Laborvergleichstests) bzw. Teilnehmern (bei den Ringtests) unterschieden, sondern jeweils die Mehrheitsmeinung präsentiert.

Tabelle VIII - 17: Beurteilung der 8 Testböden (jeweils 100 % bzw. höchste getestete Konzentration) mit dem jeweils empfindlichsten Messendpunkt in 4 Bodentierstests sowie dem Pflanzentest (+ Lebensraumfunktion eingeschränkt; - Lebensraumfunktion nicht eingeschränkt)

Testboden	Nematode	Regenwurm	Collembola	Enchytraee	Pflanze	Übereinstimmung
Landhausen	+	+	+	+	+	100 %
Iserlohn	-	+	+	-	+	60 %
Gaswerk 1:2	+	+	+	+	+	100 %
PAK-Mix	+	+	+	+	+	100 %
Sickergraben	+	+	+	+	+	100 %
Neuohe	-	+	-	+	+	60 %
IMA SM 66	-	-	-	-	-	100 %
IMA 927B	-	+	-	+	-	60 %
% Toxizität	50.0	87.5	62.5	75.0	75.0	-

Es wird klar, dass die Hälfte der Testböden so hochtoxisch sind, dass alle Testsysteme anschlagen (Landhausen, Gaswerk 1:2, PAK-Mix, Sickergraben). Zwei weitere Testböden (Iserlohn, Neohe) zeigen eine relativ hohe Toxizität, wobei die jeweils „anschlagenden“ Testsysteme unterschiedlich sind. Der Boden IMA SM 66 zeigt keine Auffälligkeit, der Boden IMA 927B wirkt nur bei den beiden Oligochaetengruppen. Hinsichtlich der Sensitivität der einzelnen Testsysteme ergibt sich folgende Abstufung: Von Regenwürmern über Pflanzen bzw. Enchytraeen und Collembolen nimmt die Sensitivität bis zu den Nematoden immer weiter ab. Ein umfassender Vergleich der verschiedenen Testsysteme würde aber die Prüfung gering bis mittel belasteter Böden erfordern, die in der hier getesteten Gruppe eindeutig unterrepräsentiert waren.

VIII - 7 Konsequenzen für die Standardisierung

VIII - 7.1 Dochtbewässerung

Diese halb-automatisierte Form der Aufrechterhaltung der Bodenfeuchte hat sich bewährt und sollte bei einer Neufassung der ISO-Norm unbedingt aufgenommen werden. Dabei sind genaue Anweisungen hinsichtlich des Verhältnisses von Dochten (inkl. des Durchmessers) und Testgefäßgröße bzw. -füllung gegeben werden (inkl. einer bildlichen Darstellung; vgl. Abbildung VIII - 30 (Herkunft: Partner TUB) bzw. Abbildung VIII - 31 (Herkunft: Partner ECT)). Auch sollte ein Vortest obligatorisch werden, um klar zu stellen, unter welchen Bedingungen eine manuelle Befuchtung vorzuziehen ist.

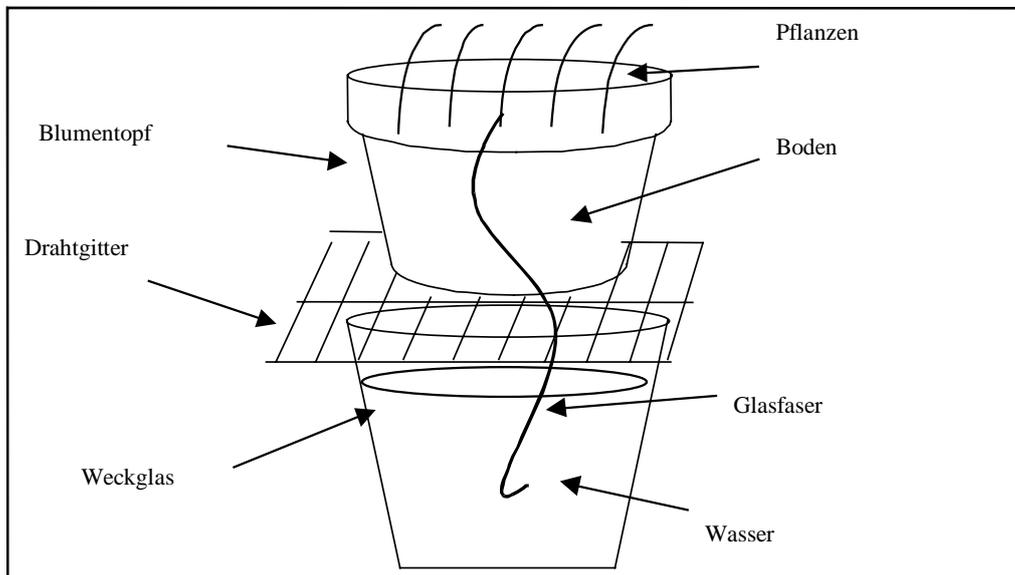


Abbildung VIII - 30: Schematische Darstellung eines halbautomatischen Bewässerungssystems

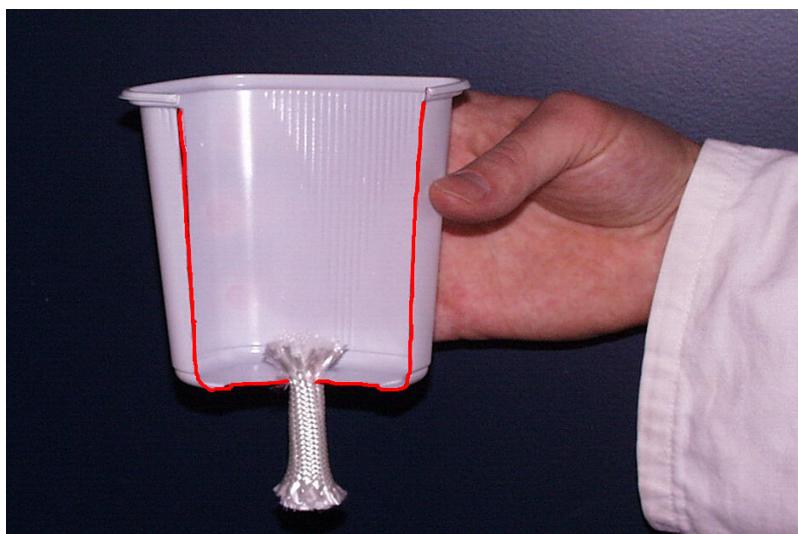


Abbildung VIII - 31: Foto der Dochtbewässerung

VIII - 7.2 Validitätskriterien

Bisher wird in der ISO-Norm 11269-2 nur ein Validitätskriterium verlangt: Mindestens 5 gesunde Keimlinge pro Testgefäße sollten auflaufen. In Analogie zur neuen OECD-Richtlinie 208 sollte zumindest das Auftreten phytotoxischer Effekte ausgeschlossen sowie eine Überlebensrate am Testende von 90 % der Kontrollen gefordert werden. Aufgrund der Erfahrungen in diesem Projekt könnten weitere Kriterien in Hinsicht auf die Verwendung von verschiedenen Kontrollböden definiert werden. So wäre ein Mindestfrischgewicht pro Pflanze im Standardboden LUFA bzw. vergleichbaren sandigen Böden zu definieren. Auch die Eingrenzung der Variabilität, z.B. durch Angabe eines maximalen VK (30 %?) ist möglich.

VIII - 7.3 Bezugsgrößen

Um die Auswertung generell sowie die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Tests im Speziellen zu erleichtern sollte eine gemeinsame Bezugsgröße für den Messparameter Sprossfrischgewicht zu empfehlen. Auf der Grundlage der hier vorgestellten Versuche sollte dies das Gewicht der Pflanzen eines Topfs (d.h. im allgemeinen 5 Individuen) sein.

VIII - 7.4 Positivkontrolle

Wie in praktisch allen neueren ökotoxikologischen Testverfahren sollte auch für den ISO-Pflanzentest die Testung einer Referenzsubstanz in regelmäßigem Abstand (ca. zweimal jährlich oder, bei geringer Zahl an Tests, parallel zum jeweiligen Einzeltest) gefordert werden. Es war zu überprüfen, ob die bisher für diesen Zweck vorgeschlagene Substanz Natrium-Trichloracetat (vgl. Kapitel VIII - 2.2) durch das Herbizid Goltix compact (Wirkstoff Metamitron) ersetzt werden kann. Eine uneingeschränkte Empfehlung von Goltix kann aber nicht gegeben werden. So treten zwar schon in sehr geringen Konzentrationen eindeutige Wirkungen bei beiden getesteten Spezies auf, die sich auch in den verschiedenen Testdurchgängen der drei Partner reproduzieren ließen. Auf der anderen Seite zeigte sich aber bei allen Partnern in den einzelnen Testgefäßen eine sehr hohe Variabilität (z.B. sterben die Hälfte der Pflanzen ab, während sich die andere Hälfte gut entwickelt), was zu entsprechend hohen Standardabweichungen führt.

Tabelle VIII - 18: Durchschnittliche Frischgewichte in Prozent der Kontrollen aus den Datensätzen von 11 Prüflabors eines internationalen EU-Ringtests (PRICE 1990)

	Testkonzentrationen (mg Na-TCA/kg Boden)					
	1		10		100	
Testpflanze	Mittel	VK	Mittel	VK	Mittel	VK
Hafer	96,4	16	43,0	53	4,9	180
Tomate	100,9	10	89,8	18	55,4	48
Rettich	95,0	17	89,9	21	52,8	51

VIII - 8 Zusammenfassung

Die wichtigsten Ergebnisse dieses Laborvergleichstests lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Qualitativ:

- Unterschiede der verschiedenen Mischsubstraten (primär organischer Gehalt) häufig verantwortlich für unterschiedliche Wirkungen (z.B. Goltix);
- OECD-Boden als Mischsubstrat einerseits wegen Verringerung der Bioverfügbarkeit weniger geeignet, andererseits aufgrund guter Standardisierbarkeit empfehlenswert
- Wurzellängentest wegen hohem Aufwand und geringer Zusatzinformation nicht sinnvoll (ähnliches gilt für den Messendpunkt „Auflaufen“;
- Empfehlung zur Nährstoffzugabe: Bei klarer Mangelsituation (z.B. im OECD-Boden) sollten Regeln für eine definierte Nährstoffzugabe erarbeitet werden;
- wenig Änderungen an der ISO-Testrichtlinie über die schon vorgeschlagenen Modifikationen hinaus (Dochtbewässerung, Referenzsubstanz) notwendig.

Quantitativ:

- Sehr hohe Übereinstimmung bei den Ergebnissen der drei Laboratorien bei mindestens 5 der 8 getesteten Böden (81 – 85 %);
- Unterteilung möglicher Effekte in drei Gruppen:
 - Toxisch: Signifikante Unterschiede nach der „Mischmethode“
=> als Pflanzenstandort nicht geeignet;
 - Auffällig: Signifikante Unterschiede „nur“ bei 100 %
=> Diskussionsbedarf der Testergebnisse (Dosis-Wirkung?) notwendig; wenn auch in den Abstreckungen deutliche (> 30 %) bzw. signifikante Wirkungen auftreten => als Pflanzenstandort nicht geeignet
 - Unauffällig: keine Unterschiede erkennbar => als Pflanzenstandort geeignet.

VIII - 8.1 Generelle Schlussfolgerung:

Die Ergebnisse dieses Labor-Vergleichstests belegen die grundsätzlich gute Eignung des akuten Pflanzentests nach ISO-Norm 11269-2 für die Beurteilung des ökotoxikologischen Gefährdungspotentials von Böden für Pflanzen. Einige Modifikationen der bestehenden Richtlinien (z.B. Empfehlung der Dochtbewässerung) sind neben einer allgemein ausführlichen Darstellung der Durchführung von Pflanzentests mit Böden im Vergleich zur Chemikalienprüfung aber notwendig. Die angewandten Beurteilungskriterien ergaben sowohl in Hinsicht auf das Spektrum der zu testenden Böden als auch im Vergleich zu anderen terrestrischen Testsystemen gute Ergebnisse. Es ist zu diskutieren, inwieweit eins oder mehrere dieser Kriterien in die Neufassung der ISO-Norm aufgenommen werden sollte.

VIII - 9 Literatur

- BBA (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft) (1984): Verfahrensvorschlag "Phytotoxizitätstest an einer monokotylen (*Avena sativa*) und einer dikotylen Pflanzenart (*Brassica rapa* (DC.) METZG.). (EC 50 14 Tage)". Berlin.
- Boutin, C., Freemark, K.E. & Keddy, C.J. (1995): Overview and rationale for developing regulatory guidelines for nontarget plant testing with chemical pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 14: 1465-1475.
- DECHEMA (1995): Bioassays for Soils. Frankfurt.
- Edwards, C.A. (1988): Impact of Herbicides of Soil Ecosystems. *Critical Rev. Plant Sci.* 8: 221-257.
- Gong, P., Wilke, B.-M. & Fleischmann, S. (1999): Soil-based phytotoxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) to terrestrial plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 152-157.
- Gong, P., Wilke, B.-M., Strozzi, E. & Fleischmann, S. (2001): Evaluation and refinement of a continuous seed germination and early seedling growth test for the use in the ecotoxicological assessment of soils. *Chemosphere* (im Druck)
- Greene, J.C., Bartels, C.L., Warren-Hicks, W.J., Parkhursts, B.R., Linder, G.L., Peterson, S.A. & Miller, W.E. (1989): Protocol for Short-term Toxicity Screening for Hazardous Waste Sites. EPA-Report No. 3-88-029. 102 pp.
- Günther, P. & Pestemer, W. (1990): Risk assessment for selected xenobiotics by bioassay methods with higher plants. *Environm. Management* 14: 381-388.
- ISO (International Organization for Standardization) (1992): Soil Quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth. ISO/DIS 11269-1, ISO/TC 190/SC 4.
- ISO (International Organization for Standardization) (1994): Soil Quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. ISO/DIS 11269-2, ISO/TC 190/SC 4.
- Kalsch, W. & Römbke, J. (1998): Zur chronischen Wirkung von TNT auf die Stoppelrübe *Brassica rapa* im Labortest. In: *Ökotoxikologie – Ökosystemare Ansätze und Methoden*. Oehlmann, J. & Markert, B. (eds.) ecomed Verlag, Landsberg. 100-105.
- Keddy, C., Greene, J.C. & Bonnell, M.A. (1992): A Review of Whole Organism Bioassays for Assessing the Quality of Soil Freshwater Sediment and Freshwater in Canada. Report for Environment Canada, Ottawa.
- Keddy, C., Greene, J., Bonnell, M. (1995): Review of whole-organism bioassays: soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. *Ecotox. Environ. Saf.* 30, 221-251.
- Lytle, J.S. & Lytle, T.F. (2001) : Use of plants for toxicity assessment of estuarine ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 68-83.
- Marschner, A. (1992): Phytotoxizitätsuntersuchungen an Wildkräutern und an einer Kulturpflanze. Schriftenreihe Ver. Wasser-, Boden- Lufthygiene 85, Berlin. 162 S.

- Meier, J., Chang, L., Jacobs, S., Torsella, J., Meckes, M. & Smith, M. (1997). Use of plant and earthworm bioassays to evaluate remediation of soil from a site contaminated with polychlorinated biphenyls. *Environ. Toxicol. Chemistry* 16: 928-938.
- Oecd (Organisation for Economic Cooperation and Development) (1984a): OECD-Guideline for the Testing of Chemicals No. 207. Earthworm, Acute Toxicity Test. Paris.
- Oecd (Organisation for Economic Cooperation and Development) (1984b): OECD-Guideline for the Testing of Chemicals No. 208. Terrestrial Plants, Growth Test. Paris.
- Oecd (Organisation for Economic Cooperation and Development) (2000): OECD-Guideline for the Testing of Chemicals No. 208. Terrestrial (Non-Target) Plant Test: 208A: Seedling Emergence and Seedling Growth Test. 208B: Vegetative Vigour Test. Paris.
- Pfleeger, T., McFarlane, C., Sherman, R. & Volk, G. (1991): A short-term bioassay for whole plant toxicity. In: Gorsuch, J.W., Lower, W.R., Wang, W. & Lewis, M.A. (eds.). *Plants for Toxicity Assessment: Second Volume*. ASTM STP 1115. ASTM, Philadelphia. 355-364.
- Price, C.E. (1990): EEC Contract to Analyse the Data from the Higher Plant Ring Test. Report XI/351/90, 252 S.
- Riepert, F. (1984): Ist Risikoabschätzung von Stoffwirkungen auf Ökosysteme mit Hilfe einfacher standardisierter Prüfungen an einzelnen Arten möglich? *Angew. Botanik* 58: 217-226.
- Riepert, F., Wilke, B-M., Kalsch, W. & Winkel, B. (2000): Höhere Pflanzen als Testorganismen zur Charakterisierung der Lebensraumfunktion des Bodens als Pflanzenstandort. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisenträger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 19-42.
- Römbke, J., Bauer, C., Brodesser, J., Brodsky, J., Danneberg, G., Heimann, D. Renner, I. & Schallnaß, H-J. (1995): Grundlagen für die Beurteilung des ökotoxikologischen Gefährdungspotentials von Altstoffen im Medium Boden. UBA-Texte 53/95.
- Simini, M., Wentsell, R.S., Checkai, R.T., Phillips, C.T., Chester, N.A., Major, M.A. & Amos, J.C. (1995): Evaluation of Soil Toxicity at Joliet Army Ammunition Plant. *Envir. Toxicol. Chem.* 14: 623-630.
- Van Assche, F. & Clijsters, H. (1990): A Biological Test System for the Evaluation of the Phytotoxicity of Metal-Contaminated Soils. *Environ. Poll.* 66: 157-172.
- Wilke, B-M., Winkel, B., Fleischmann, S. & Gong, P. (1998): Higher Plant Growth and Microbial Toxicity Tests for the Evaluation of the Ecotoxic Potential of Soils. In: Contaminated Soil '98. Conference Proceedings, Edinburgh. Telford Publ., 345-354.
- Winkel, B., Wilke B.-M. 2000. Abschlußbericht des BMBF-Verbundvorhabens: „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“, Teilverbund 4.1 „Praxiserprobung Biologischer Testverfahren.
- Wolf-Schwenniger, K. & Schwenniger, H.R. (1994): Altlastenerkundung mit biologischen Methoden. *Handbuch Altlasten und Grundwasserschadensfälle*. Materialien zur Altlastenerkundung, Bd. 13. LfU Baden-Württemberg, Karlsruhe.

Kapitel IX

Vergleich der Empfindlichkeit und der Aussagekraft der Tests

Dr. W. Kördel,
Dr. K. Hund-Rinke
Fraunhofer-Institut für Umweltchemie
und Ökotoxikologie
57392 Schmallenberg

Inhaltsverzeichnis

IX - 1	BEURTEILUNG AUF DER BASIS VON VERDÜNNUNGSREIHEN.....	5
IX - 1.1	Aquatische ökotoxikologische Testsysteme	5
IX - 1.2	Aquatische genotoxikologische Tests	6
IX - 1.3	Tests mit Bodenmikroorganismen	7
IX - 1.4	Tests mit Bodenorganismen und Pflanzen.....	8
IX - 2	BEURTEILUNG DER UNVERDÜNNTEN TESTBÖDEN	10

Ökotoxikologische Tests werden hinsichtlich einer möglichen Beeinträchtigung der folgenden Schutzziele benötigt:

- Verlagerung ökotoxischer Stoffe zum Grundwasserleiter hin
- Verlagerung genotoxischer Stoffe zum Grundwasserleiter hin
- Beeinflussung des Stoffumsetzungspotenzials von Böden
- Beeinflussung der Bodenflora und -fauna

IX - 1 Beurteilung auf der Basis von Verdünnungsreihen

IX - 1.1 Aquatische ökotoxikologische Testsysteme

Zur Erfassung eines möglichen Grundwassergefährdungspotenzials wurden eine Reihe von aquatischen Testsystemen im Verbundvorhaben in Ring- bzw. Laborvergleichstests untersucht. Die Sensitivität der Tests wurde bereits in Kapitel VI und Kapitel VII dargestellt, so dass auf eine ausführliche Diskussion hier verzichtet werden kann. Tabelle IX - 1 gibt nochmals einen Überblick über die Empfindlichkeit der verschiedenen aquatischen Tests und dient als Begründung für die Auswahl eines Testsets.

Tabelle IX - 1: Übersicht über die Ergebnisse aller aquatischen Ökotoxizitätstests

	Claus- thal	Land- hausen	Iser- lohn	Gaswerk 1:2	IMA SM 66	IMA 927 B	PAK- Mix	Sicker- graben	Neuohe
Leuchtbakterien: Lumineszenz G_L	64 ¹⁾	32 ¹⁾	24 ¹⁾	24 ¹⁾	16 ²⁾	16 ²⁾	256 ²⁾	1024 ²⁾	8 ²⁾
Daphnien G_D	2 ¹⁾	48 ¹⁾	2 ¹⁾	2 ¹⁾	1 ²⁾	1 ²⁾	4 ²⁾	32 ²⁾	4 ²⁾
Leuchtbakterien: Wachstum G_{LW}	8 ¹⁾	2 ¹⁾	2 ¹⁾	2 ¹⁾	2 ¹⁾	2 ¹⁾	8 ¹⁾	256 ¹⁾	2 ¹⁾
<i>Ps. putida</i> Wachstum G_P	--- ⁶⁾	64 ¹⁾	8 ¹⁾	2 ¹⁾	2 ¹⁾	2 ¹⁾	2 ¹⁾	2 ¹⁾	4 ¹⁾
Alge, Biomasse- integral G_{AB}	16 ¹⁾	4 ¹⁾	---	6 ¹⁾	2 ²⁾	2 ²⁾	4 ²⁾	> 128 ²⁾	4 ²⁾
Lemna: Fronanzahl G_W	32 ³⁾	128 ¹⁾	32 ¹⁾	2 ¹⁾	16 ⁴⁾	2 ²⁾	8 ³⁾	64 ²⁾	64 ³⁾

1) Median aus Ringtest bzw. Laborvergleichstest (Lagen aus beiden Vergleichstests Daten vor, wurden die Ergebnisse des Ringtests aufgrund der höheren Teilnehmeranzahl als Grundlage gewählt)

2) Einzelbestimmung

3) errechnet aus drei unabhängigen Tests eines Labors

4) aus Laborvergleichstest (hohe Streuung 4 bis > 32)

5) ---: nicht durchgeführt

Als Indikator für die Sensitivität sind die Resultate in Form der G-Werte gegenübergestellt, wobei sowohl auf die Ergebnisse des Ring- und Laborvergleichstests, als auch auf Einzeluntersuchungen zurückgegriffen wurde. Lagen Ergebnisse sowohl aus dem Ringtest als auch aus dem Laborvergleichstest vor, wurden primär die Daten aus dem Ringtest aufgrund der höheren Teilnehmeranzahl bei der Tabelle berücksichtigt. Bei Ergebnissen aus dem Ring- bzw. Laborvergleichstest wurde der Median errechnet. Bei den Untersuchungen mit *Lemna* wurde aus den im Bericht aufgeführten mittleren EC_{10} -Werten der G-Wert berechnet. Aufgrund der unterschiedlichen Datenbasis bei den einzelnen Testsystemen und Böden weist die Zusammenstellung somit primär orientierenden Charakter auf. Bei den Testsystemen mit Leuchtbakterien, Algen und *Ps. putida* sind die G-Werte als Verdünnungsstufe mit < 20 % Hemmung entsprechend der biologischen Streuung und Auswertemethode in der zugrundeliegenden Norm definiert. Die als G-Wert-Schwelle im Wasserlinsentest festgelegten 10 % Hemmung sind Teil der ISO-Norm und resultieren mathematisch aus der Berechnung über die Wachstumsrate. Bei den Daphnien ist aufgrund der minimal einzusetzenden Daphnienanzahl pro Konzentrationsstufe der G-Wert als Verdünnungsstufe mit < 10 % Hemmung festgelegt. Zur Erhöhung der Robustheit wurde bei der Festlegung, ab welcher G-Stufe ein Boden als toxisch gilt, bei den ersten fünf in der Tabelle aufgeführten Testsystemen eine mögliche Grundtoxizität unkontaminierter Böden in Betracht gezogen und als Schwellenwerte G2 (Bakterienwachstumstests), G4 (Algen- und Daphnientest) bzw. G8 (Lumineszenztest) definiert. Aus dem gleichen Grund wird für den Wasserlinsentest G2 als Schwelle vorgeschlagen, auch wenn im Projekt alle unbelasteten Böden G1 hatten und G2 nur eindeutig belastete Böden erreichten.

Es ist ersichtlich, dass kein Testsystem immer am sensitivsten reagiert, sondern die Kontaminationszusammensetzung eine Rolle spielt. Höchste Sicherheit in der Bodenbeurteilung würde bei der Einbeziehung aller Testsysteme in eine Testbatterie erreicht, was im Hinblick auf die Praxisrelevanz nicht sinnvoll erscheint. Um jedoch unterschiedliche Wirkmechanismen und/oder Expositionsmuster abzudecken, sollten darin Organismen verschiedener taxonomischer Gruppen und/oder trophischer Ebenen enthalten sein.

IX - 1.2 Aquatische genotoxikologische Tests

Tabelle IX - 2 gibt eine Übersicht der Resultate aus den genotoxikologischen Tests. Dargestellt sind die G-Stufen. Als Basis wurden die Ergebnisse des Laborvergleichstests herangezogen, so dass bei dem umu- und dem NM2009-Test jeweils der Median dargestellt ist. Der Ames-Test wurde nur in einem Labor durchgeführt. Es wurde nicht mehr zwischen Ansätzen mit und ohne S9-Extrakt differenziert, sondern der höchste Wert herangezogen, was konform zu den entsprechenden Richtlinien ist. Aus der Zusammenstellung wird nochmals deutlich,

dass sich die Ergebnisse des umu- und des NM2009-Tests weitgehend entsprechen. Ausnahmen bildet nur die Böden Sickergraben und IMA SM66. Dabei weist der Boden Sickergraben eine hohe Belastung an Nitroaromaten auf, worauf der NM 2009-Test sehr spezifisch reagiert. Eine Ursache für das deutliche Ansprechen des NM-Tests bei dem Boden IMA SM 66 kann nicht angegeben werden.

Tabelle IX - 2: Übersicht über die Ergebnisse der Genotoxizitätstests

Bodenprobe	G-Stufe			
	umu-Test	NM 2009	Ames-Test TA 98	Ames-Test TA 100
Iserlohn	1,5	1,5	3	3
Gaswerk 1:2	1,5	1,5	3	3
Gaswerk 1:2 Extrakt	12	12	3	3
Landhausen	1,5	1,5	3	3
Landhausen Extrakt	6	6	3	3
PAK-Mix	1,5	1,5	6	3
PAK-Mix Extrakt	12	12	3	3
Sickergraben	12	96	12	6
Neuohe	1,5	1,5	3	3
IMA SM 66	1,5	1,5	6	3
IMA SM 66 Extrakt	3	12	6	3
IMA 927b	1,5	1,5	3	3

IX - 1.3 Tests mit Bodenmikroorganismen

Die Bodenmikroflora wurde sowohl über die mikrobielle Atmungsleistung als auch über die potentielle Ammoniumoxidationsaktivität erfasst. Hierfür wurde nur der unverdünnte Boden sowie bei der Nitrifikationsaktivität zusätzlich eine 1 : 1-Mischung mit unkontaminiertem Boden untersucht. Da es sich hierbei um unterschiedliche Organismengruppen handelt, die erfasst werden, sowie aufgrund der fehlenden Verdünnungsreihen erscheint ein Sensitivitätsvergleich wie bei den Untersuchungen mit aquatischen Ökotox-Tests sowie den Testsystemen mit Bodenorganismen und Pflanzen nicht sinnvoll.

IX - 1.4 Tests mit Bodenorganismen und Pflanzen

Bei den Tests mit Bodenorganismen kann keine in sich homogene Tabelle erstellt werden, da mit den Testsystemen, die im Ringtest validiert wurden, aus arbeitstechnischen Gründen bei den zusätzlichen im Laborvergleichstest eingesetzten Böden, keine Konzentrationsreihen, d.h. Verdünnung des Bodens mit einem unkontaminierten Boden, getestet wurden.

In Tabelle IX - 3 ist jeweils diejenige Konzentration vermerkt, die gerade noch einen toxischen Effekt hervorrief. Trotz des eingeschränkten Prüfumfanges ist aus der Tabelle ersichtlich, dass bei den Böden eine unterschiedliche Toxizitätsausprägung vorliegt. Die aufgeführten Endpunkte erweisen sich als ausreichend empfindlich, um Böden mit Schadstoffgehalten als solche zu erkennen und in ihrer Toxizität zu differenzieren. Während hoch kontaminierte Böden selbst in hoher Verdünnung mit einem unbelasteten Boden als toxisch erkannt werden, werden schwach kontaminierte Böden (z.B. IMA SM 66 oder IMA 927 B) nicht oder nur in unverdünnter Form als toxisch erkannt.

Der Pflanzentest wurde mit zwei Arten, einer Monokotylen und einer Dikotylen, durchgeführt. Dabei erwies sich *Brassica rapa* häufig als empfindlicher als *Avena sativa*. Dennoch wurde mit beiden Arten die beiden Böden nach der Sanierung (IMA SM 66 und IMA 927 B) als auffällig erkannt.

Tabelle IX - 3: Übersicht über die Ergebnisse der Tests mit Bodenorganismen und Pflanzen (angegeben ist diejenige Konzentration, die gerade noch einen toxischen Effekt hervorgerufen hat)

Testsystem	Landhausen	Iserlohn	Gaswerk 1:2	IMA SM 66	IMA 927 B	PAK-Mix	Sickergraben	Neuohe
Regenwurm – Reproduktion ³⁾	12,5 %	25 %	100 %	- ¹⁾	100 % ²⁾	100 % ²⁾	100 % ²⁾	100 % ²⁾
Regenwurm – Vermeidung ³⁾	10 %	10 %	50 %	-	-	1 %	1 %	50 %
Collembolen – Reproduktion ³⁾	50 %	25 %	100 %	-	-	100 % ²⁾	100 % ²⁾	-
Enchytraeen - Reproduktion ³⁾	100 %	-	100 %	-	100 %	100 % ²⁾	100 % ²⁾	100 % ²⁾
Nematodentest ³⁾	10 %	-	100 %	-	-	10 %	10 %	- ⁵⁾
Stoppelrübe (<i>Brassica rapa</i>) ⁴⁾	< 12,5 %	< 12,5 %	50 %	50 %	100 %	<<12,5 %	<<12,5 %	50 %
Hafer (<i>Avena sativa</i>) ⁴⁾	50 %	25 %	100 %	100 %	100 %	<12,5 %	< 12,5 %	100 %

¹⁾ -: kein ausreichender Effekt im unverdünnten Ansatz

²⁾ nur unverdünnter Boden getestet

³⁾ Toxizitätskriterium für Bodenfauna: > 50 % Reproduktionsminderung bzw. > 80 % Vermeidungsverhalten; zur Auswertung siehe Kap. V

⁴⁾ Toxizitätskriterium für Pflanzen: > 30% Wachstumshemmung; weitere Möglichkeiten zur Auswertung des Pflanzentests siehe Kap. VIII

⁵⁾ nur 50 %-Ansatz durchgeführt, dort kein Effekt detektiert

IX - 2 Beurteilung der unverdünnten Testböden

Wird nur der unverdünnte Testboden betrachtet, ergibt sich das in Tabelle IX - 4 dargestellte Toxizitätsmuster. Wie zu erwarten, werden die meisten der Böden gemäß den angewandten Kriterien zur Bodenbeurteilung als toxisch eingestuft. Deutlich tritt dabei nochmals die unterschiedliche Sensitivität der Testsysteme zu Tage. Dabei wird deutlich, dass einige Testsysteme auf der Basis der bestehenden Beurteilungskriterien im Vergleich zu anderen Organismen generell eine Toxizität nur bei höheren Kontaminationen anzuzeigen scheinen. Dies trifft beispielsweise auf den Nematodentest zu. Jedenfalls gibt es unter den durchgeführten Bodenfauna-Tests kein Beispiel für ein ausschließlich durch diesen Test angezeigtes Toxizitätspotenzial. Andere Testsysteme reagieren wiederum auf eine Boden/Schadstoffkombination sehr sensitiv, auf eine andere hingegen nicht in erkennbarer Weise. Ein Beispiel hierfür sind die Ergebnisse der Wachstumstests mit Leuchtbakterien bzw. mit *Ps. putida*. So ergibt sich ein Toxizitätshinweis beim Boden Landhausen mit *Ps. putida*, beim Boden Gaswerk 1:2 hingegen mit den Leuchtbakterien.

Tabelle IX - 4: Übersicht über die Beurteilung der Böden mit den unterschiedlichen Testsystemen auf der Basis der Mehrheitsmeinung bei der Durchführung durch mehrere Labors ("+" toxisch gemäß testspezifischen Auswertekriterien; "-" untoxisch gemäß testspezifischen Auswertekriterien)

Testsystem	Landhausen	Iserlohn	Gaswerk 1:2	IMA SM 66	IMA 927 B	PAK-Mix	Sickergraben	Neuohe
Aquatische Testsysteme								
Leuchtbakterien – Lumineszenz	+	+	+	+	+	+	+	-
Leuchtbakterien – Zellvermehrung	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>Pseudomonas putida</i> – Zellvermehrung	+	+	-	-	-	-	-	+
Daphnientest	+	-	-	-	-	-	+	-
Algentest – Makroansatz	-	-	+	-	-	-	+	-
Algentest - Mikroansatz	+	-	+	-	-	-	+	-
Lemna-Test	+	+	+	+	-	+	+	+
Genotoxikologische Testverfahren ¹⁾								
Umu-Test	+	-	+	+	-	+	+	-
NM 2009-Test	+	-	+	+	-	+	+	-
Ames-Test	-	-	-	+	-	+	+	-
Bodenmikroflora								
Atmung – QR	+	+	+	+	-	+	+	+
Atmung – Peakmaximum	+	+	+	+	+	-	+	+
Ammoniumoxidation	+	+	+	-	-	+	+	+

Tabelle IX – 4: (Fortsetzung) Übersicht über die Beurteilung der Böden mit den unterschiedlichen Testsystemen auf der Basis der Mehrheitsmeinung bei der Durchführung durch mehrere Labors (Erläuterung zu den Markierungen s. Text)

Testsystem	Landhausen	Iserlohn	Gaswerk 1:2	IMA SM 66	IMA 927 B	PAK-Mix	Sickergraben	Neuohe
Bodenfauna								
Regenwurm – Reproduktion	+	+	+	-	+	+	+	+
Collembolen – Reproduktion	+	+	+	-	-	+	+	-
Enchytraeen – Reproduktion	+	-	+	-	+	+	+	+
Regenwurmvermeidungstest	+	+	+	-	-	+	+	+
Nematodentest	+	-	+	-	-	+	+	n.b.
Bodenflora								
Pflanzentest	+	+	+	? ²⁾	? ²⁾	+	+	+

¹⁾ ein "+" bedeutet, dass in einem der Testsysteme (Eluat, Extrakt, +/- S9) mehrheitlich der Boden als toxisch deklariert wurde

²⁾ Hemmwirkung im Pflanzentest kann sowohl durch Nährstoffmangel als auch durch Schadstoffe hervorgerufen werden; Böden, die nur im unverdünnten Testansatz deutliche Hemmwirkung zeigten, wurden daher als "auffällig" deklariert; zur detaillierten Beurteilung s. Kapitel VIII

Kapitel X

Empfehlung einer Teststrategie

Dr. W. Kördel,
Dr. K. Hund-Rinke
Fraunhofer-Institut für Umweltchemie
und Ökotoxikologie
57392 Schmallenberg

Inhaltsverzeichnis

X - 1	VORBEMERKUNGEN	5
X - 2	TESTABFOLGE	7
X - 3	TESTSTRATEGIE ZUR ERFASSUNG DES GRUNDWASSERGEFÄHRDUNGSPOTENZIALS	8
X - 3.1	Herstellung von Bodeneluaten	8
X - 3.2	Teststrategie zur Erfassung des ökotoxikologischen Gefährdungspotenzials	9
X - 3.3	Teststrategie zur Erfassung des Genotoxizitätspotenzials	10
X - 4	TESTSTRATEGIE ZUR ERFASSUNG DER LEBENSRAUMFUNKTION.....	12
X - 5	LITERATUR	14

X - 1 Vorbemerkungen

Wesentliche Schutzziele, die bei der Beurteilung belasteter Flächen, sanierter Böden / Bodenmaterialien oder von Materialien, die auf bzw. in Böden verwertet werden sollen, berücksichtigt werden müssen, sind:

- ❖ Schutz der menschlichen Gesundheit,
- ❖ Schutz der Grundwasser und
- ❖ Gewährleistung der Lebensraumfunktion für Flora und Fauna.

Hinsichtlich des Schutzzieles "menschlicher Gesundheit" liegen Ableitungsstrategien für Prüfwerte vor, die wie folgt kurz zusammengefasst werden können.

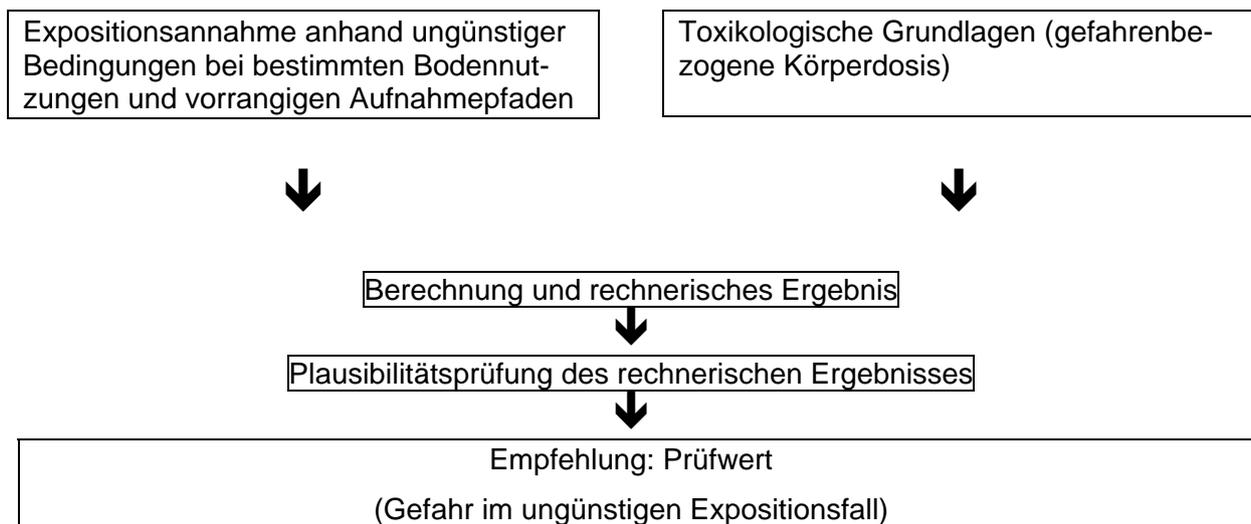


Abbildung X - 1: Vorgehensweise für die Ableitung von Prüfwerten für den Pfad Boden → Mensch (nach Bachmann et al., 1998)

Für die Vorsorgewerte wird gefordert, dass diese deutlich unterhalb der Prüfwerte liegen müssen, um den Definitionen von Prüfwert (Verdacht einer schädlichen Bodenveränderung, bzw. Verdacht einer Gesundheitsgefährdung) und von Vorsorgewert (keine Besorgnis einer schädlichen Bodenveränderung) zu genügen. Gemäß der Ableitungsstrategie werden Prüfwerte immer Einzelstoff bezogen abgeleitet und als Gesamtschadstoffkonzentration im Boden angegeben, da die Bioverfügbarkeit für den menschlichen Organismus bisher nicht mit ausreichender Sicherheit durch einfache Modellversuche bestimmt werden kann.

Die analytische Bestimmung von Schadstoffkonzentrationen in Böden / Bodenmaterialien ist somit über die durchgeführte Herleitung der Werte durch eine Expertengruppe **immer mit der möglichen Wirkung auf die menschliche Gesundheit verknüpft**. Stoffe, für die bisher keine Werte abgeleitet wurden, sind vorläufig aus der Beurteilung ausgeschlossen.

Wesentliches Kriterium für die Abschätzung eines Grundwassergefährdungspotenzials ist die Definition der Geringfügigkeitsschwelle. Demnach kann Grundwasser dann als nur geringfügig verunreinigt eingestuft werden, wenn trotz einer Erhöhung der Stoffgehalte gegenüber den geogenen Hintergrundwerten und unabhängig von der tatsächlichen Nutzungssituation

- im oder durch das Grundwasser (z.B.: bei einer angenommenen Nutzung oder beim Austritt in oberirdische Gewässer) keine relevanten ökotoxikologischen Wirkungen auftreten können

und

- im Grundwasser die Anforderungen der Trinkwasserverordnung oder entsprechend abgeleitete Werte eingehalten werden (von der Trenck & Jaroni, 1999)

Für eine Reihe von Substanzen wurden von den ad-hoc-AK "Prüfwerte" der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) Geringfügigkeitsschwellen abgeleitet. Diese Tabelle diente im Weiteren als Grundlage für die in der BBodSchV aufgeführten Prüfwerte für das Sickerwasser. Eine kritische Betrachtung hinsichtlich Vorgehensweisen und Methoden zur Bestimmung einer Grundwassergefährdung im Rahmen der BBodSchV findet sich z.B. bei Kördel et al., 2000.

Für das vorliegende Vorhaben ist es wesentlich, dass Bodeneluate für eine Beurteilung herangezogen werden und dass in der Definition der Geringfügigkeitsschwelle ökotoxikologische Wirkungen als entscheidendes Kriterium aufgeführt werden. Die vorliegenden Prüfwerte für Bodenelemente in der BBodSchV beziehen somit ökotoxikologische Wirkungen ein. Da jedoch nur für eine begrenzte Anzahl von Stoffen diese Werte vorliegen, kann eine chemische Analyse dieser Stoffe nicht ausreichen. Sie muss durch ökotoxikologische Tests mit dem Bodeneluat erweitert werden, um das gesamte Ökotoxizitätspotenzial in der Bodenlösung und somit das mobile (zum Grundwasserleiter hin verlagerbare) Toxizitätspotenzial zu erfassen. Ökotoxikologische Testsysteme sind bisher nicht in der BBodSchV aufgeführt. Einer der Gründe hierfür war die fehlende Validierung geeigneter Testsysteme für diese Fragestellung, so dass dies zu einem Schwerpunkt des Verbundvorhabens gemacht wurde.

Verfahren zur Beurteilung des Lebensraumfunktion von Böden sind bisher in der BBodSchV nicht erhalten. Da die Abschätzung der Bioverfügbarkeit von Schadstoffen in Böden von den Substanzeigenschaften, den Bodeneigenschaften, dem Lebensraum der Bodenorganismen und den spezifischen Aufnahmemechanismen abhängt, liegen bisher keine validen Korrelationen vor, so dass Prüfungen mit dem Boden bzw. Bodensubstrat empfohlen werden.

X - 2 Testabfolge

Da nach Bodenschutzgesetzgebung alle drei Schutzziele gleichberechtigt nebeneinander stehen, ist es prinzipiell gleichgültig, welches Schutzziel zuerst bearbeitet wird oder ob mit der Testung aller drei Schutzziele gleichzeitig begonnen wird.

Aus **arbeitstechnischen** Gründen (Arbeits- und Zeitaufwand für die Tests) wird sich in der Regel jedoch folgende Abfolge empfehlen:

1. Analyse des Bodens/ Bodenmaterials auf zu erwartende Schadstoffe
(Schutzziel: menschliche Gesundheit und partiell Grundwasser)
2. Analyse des Bodeneluats mittels chemischer Analyse und aquatischer Tests
(Schutzziel: Grundwasser)
3. Tests mit Bodenorganismen und Pflanzen
(Lebensraumfunktion)

Der benötigte Testumfang und die Gewichtung der einzelnen Schutzziele bei der Beurteilung eines Bodens/Bodenmaterials hängt von der beabsichtigten Nutzung der Fläche bzw. des Einsatzes des Bodens/Bodenmaterials bei Verwertung ab. Hierzu enthält die überarbeitete DECHEMA - Broschüre "Biologische Testverfahren für Boden und Bodenmaterial" (Dott et al., im Druck) exakte Angaben.

X - 3 Teststrategie zur Erfassung des Grundwassergefährdungspotenzials

Bei der Zusammenstellung einer Testbatterie sind folgende Gesichtspunkte zu berücksichtigen:

- ❖ Die Ergebnisse im Verbundvorhaben sowie die damit verbundenen Fachdiskussionen
- ❖ Wissenschaftlich ausreichend abgesicherte Aussage zum Toxizitätspotenzial des Eluats
- ❖ Wirtschaftlich vertretbarer Kosten- und Zeitbedarf

X - 3.1 Herstellung von Bodeneluaten

Für die Herstellung von Bodeneluaten, die gleichzeitig für die chemische Analyse des Eluats und für ökotoxikologische Untersuchungen eingesetzt werden sollen, eignen sich Schüttelversuche, die sich z.B. eng an DIN – EN 12457–1 anlehnen, also mit einem Feststoff/Wasser Verhältnis von 1 / 2 arbeiten. Alle clean-up-Schritte, insbesondere Filtrationsschritte, müssen auf organische Kontaminaten ausgelegt werden, um sicherzustellen, dass keine Schadstoffe durch Adsorption an Materialien dem Eluat entzogen werden (siehe auch z.B. Pfeifer et al., 2000, Kördel und Hund-Rinke, 2001).

X - 3.2 Teststrategie zur Erfassung des ökotoxikologischen Gefährdungspotenzials

Auf der Basis der oben aufgeführten Kriterien im Hinblick auf die Erfassung des ökotoxikologischen Gefährdungspotenzials wird folgende Teststrategie vorgeschlagen:

Tabelle X - 1: Schutzziel : Grundwasser

Empfohlenes Testset zur Erfassung des Ökotoxizitätspotenzials im Eluat

Test	Toxizitätskriterium ²⁾
chemische Analyse	Eluatwerte in BBodSchV
Leuchtbakterien, Lumineszenz (DIN EN ISO 11348-2,-3)	$G_L \leq 8 (> 8)$
Alge, Vermehrung (DIN 38412, Teil 33 mit Modifikationen auf der Basis von DIN EN 28692 bzw. ISO 8692)	$G_A \leq 4 (> 4)$
alternativ: Alge Vermehrung – miniaturisiertes Verfahren Lemna, Vermehrung (ISO CD 20079) ¹⁾	$G_A \leq 4 (> 4)$ $G_W \leq 2 (> 2)$

¹⁾ Berücksichtigung sobald endgültige Standardisierung vorliegt

²⁾ Boden gilt als untoxisch, wenn die genannten Kriterien erfüllt sind; Angaben in Klammern geben an, ab welcher G-Stufe der Boden als toxisch einzustufen ist; die Bewertung der Proben anhand der G-Werte ist dann zulässig, wenn bei der Verdünnungsreihe eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erhalten wird (Abnahme der Hemmung bei Verdünnung der Probe), wenn über mehrere getestete Verdünnungsstufen eine nahezu 100%ige Hemmung erhalten wird oder wenn in den Verdünnungsstufen bis zum Erreichen des Toxizitätskriteriums keine Hemmung auftritt. Nicht eindeutige Ergebnisse können durch Hemmungen der Wachstumskontrollen oder durch Wachstumsförderungen erhalten werden.

In verschiedenen Publikationen wurde bisher ein Testset bestehend aus Leuchtbakterien-, Algen- und Daphnientest als notwendig angesehen. Aufgrund der oben genannten Kriterien erscheint es jedoch vertretbar, auf den akuten Daphnientest zu verzichten und neben den chemischen Analysen die Ergebnisse des Leuchtbakterien- und des Algentests als Grundlage für eine Bewertung heranzuziehen. Dabei ist besonders auf die Miniaturisierung und Automatisierung des Algentests hinzuweisen. Diese Form des Tests kann als kostengünstige Alternative eingesetzt werden. Der Lemna-Test ist ebenfalls automatisierbar und erscheint von seiner Aussage her dem Algentest vergleichbar, so dass, nachdem dieser Test die Normungsphase erfolgreich abgeschlossen hat, er alternativ zum Algentest eingesetzt werden kann.

In fraglichen Fällen können die mikrobiellen Wachstumstests, bevorzugt der Test mit *Ps. putida*, als zusätzliche Testsysteme herangezogen werden.

X - 3.3 Teststrategie zur Erfassung des Genotoxizitätspotenzials

Neben dem Toxizitätspotenzial sollte im Bodeneluat das Genotoxizitätspotenzial erfasst werden, da genotoxische Wirkungen in Konzentrationen deutlich unterhalb der Toxizitätsschwelle auftreten können und grundsätzlich Stoffe mit einem solchen Potenzial nicht ins Grundwasser gelangen sollten. Für die Untersuchung ist eine sequenzielle Vorgehensweise vorgesehen, welche die Testung von wässrigen Bodeneluaten und Eluat-Extrakten mit dem umu-Test vorsieht. Das Eluat-Extrakt ist zu untersuchen, wenn im Bodeneluat keine genotoxischen Effekte nachweisbar sind. Als einfacher und kostengünstiger Test hat sich der umu-Test bei der Bodenbeurteilung bewährt. Aufgrund der hohen Sensitivität des NM 2009 – Tests gegenüber Nitroaromaten und einer dem umu-Test vergleichbaren Sensitivität gegenüber anderen Stoffen, sollte dieser Test – nach erfolgreicher Normung – immer dann den umu-Test ersetzen, wenn der Verdacht vorliegt, dass Böden oder Bodenmaterialien mit Nitroaromaten kontaminiert sind. Im Routinefall erscheint es ausreichend, das Genotoxizitätspotenzial mit nur einem Test zu überprüfen. Werden jedoch in der chemischen Analyse des Bodens/Bodenmaterials mutagene Stoffe nachgewiesen und spricht der umu-Test nicht an, so sollte in diesen Fällen zur Absicherung der in der Testdurchführung aufwendigere Ames-Test zusätzlich aufgrund seiner langjährigen Etablierung und breiten Akzeptanz eingesetzt werden.

Tabelle X - 2: Schutzziel Grundwasser
Empfohlenes Testset zur Erfassung des genotoxikologischen Gefährdungspotentials im Eluat bzw. ankonzentrierten Eluat

Test	Toxizitätskriterium ²⁾
1. Stufe: Bodeneluatuntersuchung umu-Test optional: Ames-Test ¹⁾ NM2009-Test ²⁾	G = 1,5 (≥ 3) G = 3 (≥ 6) G = 1,5 (≥ 3)
2. Stufe: falls Bodeneluat nicht genotoxisch: Bodeneluat-Extrakt-Untersuchung (15-fach ankonzentriert) umu-Test optional: Ames-Test ¹⁾ NM2009-Test ¹⁾	G = 1,5 (≥ 3) G = 3 (≥ 6) G = 1,5 (≥ 3)

¹⁾ Für den Fall, dass im umu-Test sowohl im wässrigen Eluat als auch im ankonzentrierten Eluat keine Genotoxizität nachweisbar ist und aufgrund der früheren Nutzung des Standorts oder aufgrund chemisch-analytischer Daten der begründete Verdacht besteht, dass wässrig extrahierbare mutagene Substanzen in der Bodenprobe vorhanden sind, sollten die Ergebnisse mit Hilfe des Ames-Tests überprüft werden. Dabei werden nach DIN 38415-4 die Stämme *Salmonella typhimurium* TA 98 und TA 100 mit und ohne metabolische Aktivierung getestet. Besteht der Verdacht, dass Böden oder Bodenmaterialien mit Nitroaromaten kontaminiert sind, sollte der NM 2009-Test – nach erfolgreicher Normung – anstelle des umu-Tests durchgeführt werden.

²⁾ Boden gilt als untoxisch, wenn die genannten Kriterien erfüllt sind; Angaben in Klammern geben an, ab welcher G-Stufe der Boden als toxisch einzustufen ist; die Bewertung der Proben anhand der G-Werte ist dann zulässig, wenn bei der dualen Verdünnungsreihe eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erhalten wird, (Abnahme der Induktionsrate bei Verdünnung der Probe), wenn über mehrere getestete Verdünnungsstufen eine nahezu konstante, hohe Induktionsrate erhalten wird oder wenn in den ersten beiden Verdünnungsstufen kein genotoxischer Effekt erhalten wird.

X - 4 Teststrategie zur Erfassung der Lebensraumfunktion

Zur Erfassung einer möglichen Beeinträchtigung der Lebensraumfunktion sind die Bereiche Bodenmikroflora, Bodenfauna und Flora abzudecken. Die empfohlenen Testsysteme sind in Tabelle X – 3 aufgeführt.

Tabelle X - 3: Schutzziel: Lebensraum
Empfohlenes Testset zur Beurteilung der Lebensraumfunktion für Bodenorganismen und Pflanzen

Test	Toxizitätskriterium ²⁾
Basale und substratinduzierte Atmung (ISO / DIS 17155)	$Q_R \leq 0,3$; Peakmaximum: ≤ 50 h
Nitrifikation (ISO 15685)	Auswertung gemäß Mischungsansatz
Regenwurm, kombinierter Akut-/Reprotest (nach ISO 11268-1, -2)	Anzahl der Nachkommen im Testansatz ≥ 50 % der Nachkommen im Kontrollansatz
Alternativ: Regenwurm-Vermeidungstest als Screeningtest **)	≤ 80 % Vermeidungsverhalten
Collembolen, Reproduktion (ISO 11267)	Anzahl der Nachkommen im Testansatz ≥ 50 % der Nachkommen im Kontrollansatz
Alternativ: Enchytraeen, Reproduktion (ISO CD 16387) ¹⁾	
Pflanzentest mit monokotyler (Hafer: <i>Avena sativa</i>) und dikotyler Art (Stoppelrübe: <i>Brassica rapa</i>) (DIN ISO 11269-2)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ < 30 % Abweichung vom Kontrollansatz ❖ Statistisch signifikante Unterschiede in den Ergebnissen von Test- und Kontrollansatz ❖ Bewertung nach Mischmethode

¹⁾ sobald der Test in genormter Form vorliegt

²⁾ Boden gilt als untoxisch, wenn die genannten Kriterien erfüllt sind.

Bodenmikroflora:

Als Parameter zur Erfassung der Bodenmikroflora sind sowohl die potentielle Ammoniumoxidation als auch die mikrobielle Atmungsleistung mit den Auswerteparametern "respiratorischer Aktivierungsquotient" und "Zeitdauer nach Glucosezugabe bis zum Erreichen der maximalen Atmungsrate" geeignet. Da mit den beiden Parametern unterschiedliche Organismengruppen erfasst werden, werden beide Methoden zur Beurteilung von Böden empfohlen.

Bodenfauna:

Bei der Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich, dass der Regenwurm- Reproduktionstest und der Regenwurm – Vermeidungstest die empfindlichsten Testsysteme zu sein scheinen. In einer Testbatterie sollte der Regenwurmtest durch einen Test mit einem zweiten Organismus ergänzt werden. Wie Kapitel V dargestellt, könnte es sich, aufgrund der vergleichbaren Sensitivität, sowohl um den Enchytraeen- als auch um den Collembolentest handeln. Aufgrund der schon weiter fortgeschrittenen Standardisierung wird zu dem jetzigen Zeitpunkt der Collembolentest empfohlen. Liegt der Test mit *Enchytraeus albidus* bzw. *Enchytraeus crypticus* ebenfalls in genormter Form vor, kann dieser aufgrund vergleichbarer Sensitivität den Test mit *F. candida* ersetzen.

Es ist jeweils ein kombinierter Akut- und Reproduktionstest durchzuführen. Übersteigt die Mortalität in den Testböden 20 %, kann der Test beendet werden, da der Boden als toxisch für Regenwürmer einzustufen ist. Ist die Mortalitätsrate geringer, ist der Reproduktionstest anzuschließen.

Flora:

Die Untersuchungen wurden sowohl mit einer Monokotyle (*Avena sativa*) als auch mit einer Dicotyle (*Brassica rapa*) Pflanzenart durchgeführt. Trotz der scheinbar höheren Sensitivität von *Brassica rapa* sollte der Prüfumfang nicht weiter reduziert werden. Derzeit befindet sich ein Reproduktionstest in der Standardisierungsphase. Zur endgültigen Beurteilung der Eignung ist noch ein entsprechender Ringtest durchzuführen. Im Zuge der derzeitigen Revision des Pflanzentests (ISO 11269-2) bestehen Überlegungen, diesen Test zu einem chronischen Test auszuweiten. In diesem Fall könnte zunächst der Keimungstest durchgeführt werden. Bei zweifelhaften Ergebnissen im Zuge des Pflanzenwachstums könnte dann anstelle des Endpunkts "Biomasse" der Test zu einem chronischen Test verlängert werden. Als Nachteil ist hierbei jedoch die lange Testdauer mit bis zu acht Wochen zu nennen.

X - 5 Literatur

- Dott W., Achazi R., Eisenträger A., Hund-Rinke K., Kördel W., Neumann-Hensel H., Pfeifer F., Römbke J., Wiesner J., Wilke B.-M. (im Druck): Biologische Testverfahren für Boden und Bodenmaterial - 7. Bericht des interdisziplinären Arbeitskreises "Umweltbiotechnologie - Boden". Schön & Wetzels GmbH, Frankfurt am Main, ISBN 3-89746-026-2.
- Kördel und Hund-Rinke (2001): Ecotoxicological Assessment of soils – bioavailability from an ecotoxicological point of view. In: R. Stegman, G. Brunner, W. Calmano, G. Matz (eds.): Treatment of contaminated soil. pp. 161 – 177. Springer Verlag, Berlin.
- Pfeifer, F., F. Haake, W. Kördel, A. Eisenträger (2000): Untersuchung der Rückhaltefunktion von Böden mit aquatischen Testsystemen. In: St. Heiden, R. Erb, W. Dott, A. Eisenträger: Toxikologische Beurteilung von Böden. Spektrum Verlag Heidelberg, Berlin. 1 – 18.
- Von der Trenck, K.T., H. Jaroni (1999): Vergleichende Bewertung von Umweltschadstoffen anhand von Risiko-Kennlinien. In: G. Rippen (Hrsg.) "Handbuch Umweltchemikalien", Band 1, II-1.2.1 S. 1 – 102 + Anhang (46. Erg.Lfg. 4/99; 47. Erg.Lfg. 7/99), ecomed-Verlag, Landsberg.
- W. Kördel, U. Müller-Wegener, M. Klein und H.-F. Gäbler (2000): Kap. 6. Schutzziele: Trink-/Grundwasser. In : Anforderungen an physikalisch – chemische und biologische Methoden zur Einschätzung von Böden und Bodensubstraten GDCh – Monographie Band 20.

Kapitel XI

Ausblick

Dr. W. Kördel,
Dr. K. Hund-Rinke
Fraunhofer-Institut für Umweltchemie
und Ökotoxikologie
57392 Schmallenberg

- ❖ Mit der Erstellung einer experimentell begründeten Teststrategie für Böden und Bodenmaterialien wurde ein entscheidender Schritt zur Etablierung ökotoxikologischer Tests in der BBodSchV getan. Diese Beurteilung wird auch insofern gestützt, dass in der Neufassung der DECHEMA-Broschüre "Biologische Testverfahren für Boden und Bodenmaterial" die hier aufgestellte Testbatterie deckungsgleich übernommen wird. Darüber hinaus differenziert die DECHEMA-Broschüre den notwendigen Umfang biologischer Tests nach dem Untersuchungsziel und der geplanten Nutzung des Bodens bzw. Bodenmaterials. Des Weiteren wird angestrebt, die DECHEMA-Broschüre als Teil des Handbuches der Bodenuntersuchung aufzunehmen.
- ❖ Testsysteme, die sich in Laborvergleichstests als empfehlenswert herausgestellt haben und als Tests in der Teststrategie aufgeführt sind, werden bzw. sind bereits mit Unterstützung der jeweils verantwortlichen Wissenschaftler in die Normung eingebracht.
- ❖ Nach der Sanierung bzw. nach der Verwertung unterliegen Böden und Bodensubstrate in der Regel einer schnellen Veränderung. Getestet wird jedoch notwendigerweise der Boden / das Bodenmaterial vor Wiederausbringung. Noch ist nichts darüber bekannt, wie sich ein Boden / Bodenmaterial im Hinblick auf die Etablierung neuer, stabiler Biozönosen verhält. Zur Absicherung der Aussagekraft von Labortests für die Qualitätsbeurteilung von Böden und Bodensubstraten sind diese langfristigen Freilandversuche (Freilandmonitoring) jedoch von großer Bedeutung und sollten als wichtiger Baustein in einem nachhaltigen Bodenmanagement exemplarisch durchgeführt werden.
- ❖ Grundsätzlich fehlt die Praxiserprobung der in diesem Bericht bzw. in der DECHEMA-Broschüre vorgeschlagenen Prüf- und Bewertungsstrategie. Hierzu bedarf es eines Verbundes unter Einbeziehung der betroffenen Industrie und der Behörden, um durch die Anwendung und Erprobung an konkreten Beispielen die Validität zu demonstrieren und somit die Akzeptanz bei Genehmigungsbehörden zu untermauern. Bei dieser Erprobung können gleichzeitig die Chancen und der Nutzen einer Kombination aus chemischer Analytik und ökotoxikologischen Tests für eine Bewertung von Böden und Bodensubstraten demonstriert und Praxisbeispiele für eine geschickte Testabfolge gegeben werden.

- ❖ In der empfohlenen Testbatterie zur Beurteilung des über den Wasserpfad austragbaren Gefährdungspotenzials wird neben dem Ökotoxizitäts- auch das Genotoxizitätspotenzial erfasst. Bei der Beurteilung der Lebensraumfunktion werden bislang nur ökotoxikologische Endpunkte betrachtet, da ausreichend erprobte Testsysteme zur Erfassung des genotoxischen Potenzials noch nicht zur Verfügung stehen. Zumindest exemplarisch sollte überprüft werden, ob die Aussagekraft der terrestrischen Testbatterie durch Einbeziehung genotoxikologischer Testverfahren noch gesteigert werden kann. Dies würde die in § 9, Abs. 2 der BBodSchV aufgeführten Vorgaben hinsichtlich der Besorgnis schädlicher Bodenveränderungen durch zusätzliche Stoffeinträge in Böden aufnehmen, in denen explizit neben toxischen Eigenschaften krebserzeugende, erbgutverändernde und fortpflanzungsgefährdende Wirkungen aufgeführt sind.