

Schlussbericht

Ein ökologisch bedeutungsvolles und kosteneffizientes Mikrokosmen- Testsystem zur Bewertung des Risikos von umweltrelevanten Chemikalien für Bodenlebewesen

DBU 33600/01-31

Dr. Sebastian Höss¹ & Prof. Dr. Johannes Helder²

¹ Ecosa, Giselastr. 6, 82319 Starnberg, hoess@ecossa.de

² Wageningen University, Laboratory of Nematology, Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB Wageningen, Hans.Helder@wur.nl

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	6
2	EINFÜHRUNG/MOTIVATION	8
2.1	Umwelproblematik	8
2.1.1	Risikobewertung von Chemikalien	8
2.1.2	Ökotoxikologische Bewertung von Böden	8
2.1.3	Modelökosysteme (Mikro-, Mesokosmen)	8
2.1.4	Berücksichtigung von Nematoden bei der ökotoxikologischen Bewertung von Böden	9
2.1.5	Taxonomische Bestimmung von Nematoden	9
2.2	Darstellung der umweltrelevanten Projektziele	10
2.2.1	Validierung von Mini-Mikrokosmen	10
2.2.2	Evaluierung der Toxizitätspunkte	10
2.2.3	Innovation und Optimierung	11
2.2.4	Standardisierung der Mikrokosmos-Testsysteme	11
3	METHODIK / VERGEHENSWEISE	11
3.1	Standortsuche für Böden	11
3.2	Bodenoxizitätstest (ISO 10872) mit <i>Caenorhabditis elegans</i>	12
3.2.1	Boden-Spiking	12
3.2.2	Toxizitätstest	13
3.3	Analyse der Nematodenlebensgemeinschaften in Böden	14
3.3.1	Fixierung der Böden	14
3.3.2	Extraktion von Nematoden aus dem Boden	14
3.3.3	Morphologische Taxonomie	16
3.3.4	DNA-Extraktion und qPCR-basierte Taxonomie	16
3.3.5	Datenanalyse und verwendete Indices	18
3.4	Experimente in Mikrokosmen	19
3.4.1	Verwendete Böden	19
3.4.2	Dotieren (Spiken) des Bodenmaterials	20
3.4.3	Aufstellung und Beprobung der Mikrokosmen	21
3.4.4	Einfluss von Temperatur und Feuchtigkeit auf Abundanzen in Mikrokosmen	22
3.4.5	Chemische Analyse der gespikten Substanzen im Boden	22
4	PROJEKTERGEBNISSE	23
4.1	Nematodescreening und Auswahl der Standorte	23
4.2	Toxizitätsscreening	26
4.3	Methodische Aspekte	28
4.3.1	Abhängigkeit der Resultate von der Anzahl der bestimmten Nematoden	28
4.3.2	Vergleich mikroskopische und DNA-basierte Community-Analyse	29
4.3.3	Vergleich der Fixierungsmethoden	31

4.3.4	Verbesserung der Nematodenextraktion für die molekulare Taxonomie	32
4.3.5	Versuchsbedingungen (Feuchtigkeit, Temperatur)	34
4.4	Pilotstudie Mikrokosmen mit dem Fungizid Fludioxonil (FDO)	36
4.4.1	Expositionskonzentrationen von FDO	36
4.4.2	Toxizität von FDO auf <i>C. elegans</i>	36
4.4.3	Wirkung von FDO auf Nematoden-Communities in Mikrokosmen	37
4.5	Wirkung verschiedener Schadstoffe auf Nematoden-Communities in unterschiedlichen Bodentypen	38
4.5.1	Startbedingungen in den verschiedenen Böden	39
4.5.2	Toxizität von Zn, Pyren und Mancozeb auf <i>C. elegans</i> in gespikten Böden	39
4.5.3	Bodenkonzentrationen von Zn, Pyren und Mancozeb in den Mikrokosmen-Experimenten	41
4.5.4	Effekte von Zn, Pyren, Mancozeb und Carbendazim in Mikrokosmen	45
4.5.5	Vergleich der Wirkungen zwischen Schadstoffen und Böden	54
4.5.6	Sensitivität der verschiedenen Community-Parameter/Indices	57
4.5.7	Vergleich der Sensitivität von Nematoden-Communities mit anderen Organismen	58
4.6	Standardisierung der Testsysteme	58
4.7	Vergleich morphologische vs. DNA-basierte Community-Analysis	59
4.7.1	Gesamtabundanz der Nematoden	59
4.7.2	Abundanz einzelner Taxa	62
5	FAZIT	66
6	AUSBLICK	67
7	ÖFFENTLICHKEITSARBEIT/VERÖFFENTLICHUNGEN/VORTRÄGE	68
8	DANKSAGUNG	68
9	LITERATUR	69

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Standorte und Bodeneigenschaften	11
Tab. 2	Liste der mit <i>C. elegans</i> getesteten Substanzen	12
Tab. 3	Beschreibung der Probenahmestandorte	18
Tab. 4	Nominelle Konzentrationen der Testsubstanzen in den Mikrokosmen	19
Tab. 5	Vergleich der Standorte der weiteren Auswahl	24
Tab. 6	Toxizität von Pestiziden und anderen Schadstoffen auf <i>C. elegans</i>	25
Tab. 7	Nominelle und gemessene Konzentrationen von FDO in Boden von Mikrokosmen (V1)	34
Tab. 8	Nominelle und gemessene Konzentrationen aller Schadstoffe in den Mikrokosmen (V2-4)	40
Tab. 9	Indices für Versuche in Moss-Boden	47
Tab. 10	Indices für Versuche in BW-Boden	49
Tab. 11	Indices für Versuche in VP-Boden	50
Tab. 12	%MDD der Nematoden-Indices	55
Tab. 13	Vergleich NOEC-Werte	56

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Baermann-Trichter-Aufbau	15
Abb. 2	Nematodensuspension mit repräsentativen Gattungen verschiedener Ernährungstypen	15
Abb. 3	Beispiel eines einzelnen Amplifikationsplots	16
Abb. 4	Beispiel einer linearen Korrelation der Ct-Werte und der Anzahl der Nematoden	16
Abb. 5	Dotieren des Bodens und Aufbau der Mikrokosmen	20
Abb. 6	Abundanzen, Taxazahl und Maturity Index der Nematoden in Böden der weiteren Auswahl	22
Abb. 7	Ernährungstypen der Nematoden in Böden der weiteren Auswahl	23
Abb. 8	Fauna-Profil der Nematoden in Böden der weiteren Auswahl	23
Abb. 9	MDS für Gattungszusammensetzung der Nematoden in Böden der weiteren Auswahl	23
Abb. 10	Vergleich von NOEC-Bereichen für verschiedene Testorganismen	25
Abb. 11	Stabilität verschiedener Indices mit zunehmender Stichprobengröße (Beispiel KR-Boden)	26
Abb. 12	Stabilität verschiedener Indices mit zunehmender Stichprobengröße (Beispiel VP-Boden)	26
Abb. 13	Einfluss Stichprobengröße auf Gattungszusammensetzung (KR- und VP-Boden)	27
Abb. 14	Korrelation Abundanzen Mikroskop vs. qPCR	28
Abb. 15	Vergleich Indices Mikroskop vs. qPCR	29
Abb. 16	Vergleich verschiedener Fixierungsmethoden (Abundanz)	30
Abb. 17	Vergleich verschiedener Fixierungsmethoden (Foto <i>Pratylenchus</i>)	30
Abb. 18	Vergleich Extraktionsmethoden	31
Abb. 19	Vergleich Extraktionserfolg mit verschiedenen Ludox-Dichten	31
Abb. 20	Wiedergefundene Nematoden in verschiedenen Fraktionen des Überstands	32
Abb. 21	Feuchtigkeitsverlust in Mikrokosmen bei unterschiedlichen Bedingungen	33
Abb. 22	Einfluss von Temperatur und Feuchtigkeitsverlust auf Nematoden-Community	33
Abb. 23	Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für die Toxizität von FDO auf <i>C. elegans</i>	35
Abb. 24	Indices, die die Nematoden-Communities in FDO-dotierten Mikrokosmen	36
Abb. 25	Principle-Response-Kurven für Nematoden-Communities in Mikrokosmen mit FDO	36
Abb. 26	Nematoden-Communities in Moss, BW und VP am Startzeitpunkt der Mikrokosmenversuche	37
Abb. 27	Toxizität von Zn, Pyren, Mancozeb und Carbendazim auf <i>C. elegans</i> in verschiedenen Böden	38
Abb. 28	Fauna-Profile für Nematoden-Communities der Mikrokosmenversuche V2-V4	51
Abb. 29	Principle-Response-Kurven für Nematoden-Communities der Mikrokosmenversuche V2-V4	51
Abb. 30	Reaktion von Nematoden-Communities auf verschiedene Schadstoffe in Moss-Boden	52
Abb. 31	Reaktion von Nematoden-Communities auf Zn und Mancozeb in verschiedenen Böden	54
Abb. 32	Korrelation der Nematodenabundanz qPCR vs. Mikroskopie für V2-V4	58
Abb. 33	Gegenüberstellung qPCR vs. Mikroskopie: Wirkung (Zn, Pyren) in Moss auf Gesamtabundanz	59
Abb. 34	Gegenüberstellung qPCR vs. Mikroskopie: Wirkung (Zn, Manc, Ca) in VP auf Gesamtabundanz	59
Abb. 35	Gegenüberstellung qPCR vs. Mikroskopie: Wirkung (Manc) in Moss auf Gesamtabundanz	60
Abb. 36	Gegenüberstellung qPCR vs. Mikroskopie: Wirkung (Manc) in Moss auf einzelne Taxa	61
Abb. 37	Gegenüberstellung qPCR vs. Mikroskopie: Wirkung (Zn, Manc, Ca) in VP auf einzelne Taxa	62

1 Zusammenfassung

Böden strotzen vor (unauffälligem) Leben und gehören zu den dichtest besiedelten und biologisch vielfältigsten Lebensräumen auf diesem Planeten. Abgesehen vom intrinsischen Wert der Biodiversität sind die Bodenorganismen für eine Reihe von essentiellen Ökosystemdienstleistungen zuständig: Kohlenstofffixierung, Stickstoff- und Phosphorkreislauf, Wasserhaltekapazität, Entgiftung von Abfall. Aber diese Bodenlebensgemeinschaften können durch Schadstoffe gestört werden und, abhängig von Typ und Persistenz dieser Schadstoffe, können diese Schäden zu vernachlässigen oder aber irreversibel sein. Um die Auswirkungen von Schadstoffen zu bewerten, werden ökologisch relevante Methoden in der Risikoabschätzung benötigt. Allerdings ist die experimentelle Datenlage zur ökologischen Risikobewertung von Umweltchemikalien in terrestrischen Böden im Vergleich zum aquatischen Bereich relativ dünn. Dies liegt auch daran, dass zu wenige Testsysteme zur Verfügung stehen, um die Toxizität im Boden zu bewerten und um die Übertragbarkeit von Toxizitätsdaten aufs Freiland zu validieren.

In diesem Projekt wurde deshalb ein Mikrokosmen-Testsystem optimiert, validiert und standardisiert, mit dem es möglich ist, im Labormaßstab Wirkungen von umweltrelevanten Schadstoffkategorien, wie z.B. Metalle, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und Pestizide auf Nematodenlebensgemeinschaften zu untersuchen. Nematoden können als repräsentative Indikatoren für Bodenlebewesen verwendet werden, da diese abundante und artenreiche Organismengruppe in allen trophischen Ebenen des Bodennahrungsnetzes vertreten sind. Ein weiterer Vorteil ist der geringe Material- und Personalaufwand und die damit verbundenen geringen Kosten des Testsystems. Durch den Vergleich der herkömmlichen morphologischen taxonomischen mit einer DNA-basierten, quantitativen Community-Analyse, wurde eine innovative Methode erprobt, die es auch Nicht-Spezialisten (für Nematodentaxonomie) ermöglichen soll, das Testsystem anzuwenden. Um das Mikrokosmen-Testsystem zu validieren, wurde überprüft, wie die Nematoden verschiedener Bodentypen auf unterschiedliche Chemikalien reagieren. Verschiedene strukturelle und funktionelle Toxizitätspunkte wurden hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit zu verschiedenen Expositionszeitpunkten evaluiert. Dadurch wurden Kriterien festgelegt werden, um das Testsystem zu standardisieren und dadurch in seiner Aussage robust und verlässlich zu machen.

Folgende Ergebnisse konnten erzielt werden:

- (1) Die Überprüfung methodischer Details (Testgefäße, Nematodenextraktion) und bestimmter Testbedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit) stellten sicher, dass die angewandte, veröffentlichte Methode für die routinemäßige Anwendung geeignet ist. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass die relativ kleine Stichprobe von Nematoden ($n = 50$ pro Replikat), die für die taxonomische Bestimmung verwendet wird, ausreichend ist, um für die relevanten Community-Indices, die für die Bewertung von Effekten herangezogen werden, robuste und zuverlässige Ergebnisse zu erhalten.
- (2) Erste Pilotversuche zeigten, dass die Gesamtabundanzen von Nematoden im Boden, die mit DNA-basierter qPCR-Technik analysiert wurden, gut mit den Werten der klassischen mikroskopischen Auswertung übereinstimmen. Falls qPCR-Assays für die dominanten Taxa einer Nematoden-Community verfügbar sind, können auch trait-basierte Indices anhand der qPCR-Daten berechnet werden, die gut mit den Werten übereinstimmen, die auf Basis konventioneller, morphologischer taxonomischer Bestimmung ermittelt wurden.
- (3) Mit einem Toxizitätsscreening mit dem Single-Species-Test gemäß ISO 10872:2020 konnten Pestizide ermittelt werden, auf die Nematoden empfindlich reagieren. So konnte ein Vergleich mit anderen Testorganismen angestellt werden, die routinemäßig für die Risikobewertung von Pes-

tiziden verwendet werden (Regenwürmer, Collembolen, Milben). Außerdem konnten so interessante Kandidaten als Testsubstanzen für die Testung mit dem Mikrokosmensystem identifiziert werden. Die Nematoden zeigten sich relativ sensitiv gegenüber allen getesteten Fungiziden. Drei Fungizide wurden deshalb für die Verwendung in den Mikrokosmos-Experimenten ausgewählt (Fludioxonil, Mancozeb, Carbendazim).

- (4) Die kleinräumigen, kostengünstigen Mikrokosmen erwiesen sich als geeignete Testsysteme um die Toxizität verschiedener Schadstofftypen (Metalle, PAKs, Pestizide) auf die native Nematodenfauna in Böden zu untersuchen. Dabei zeigten sich die Nematoden genauso empfindlich, oder sogar empfindlicher als andere Organismengruppen (Regenwürmer, Collembolen).
- (5) Für die Quantität und die Qualität des Effekts spielt eine große Rolle, welcher Boden für die Verwendung in den Mikrokosmen herangezogen wird. Dabei sind unter anderem Bodeneigenschaften zu berücksichtigen, die die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen beeinflussen können (Textur, organischer Gehalt). Als wichtiger erwies sich allerdings die Zusammensetzung der nativen Nematoden-Community in den verschiedenen Böden; z.B. waren Communities aus Böden mit einer relativ hohen Zn-Hintergrundkonzentration als deutlich toleranter gegenüber der Behandlung mit Zn als Communities aus Böden mit niedriger Hintergrundbelastung.
- (6) Bestimmte funktionelle Gruppen der Nematoden-Community unterschiedlich auf bestimmte Schadstoffe. Während als empfindlich eingestufte K-Strategen mit zunehmender Zn-Belastung deutlich an Bedeutung verloren (Abnahmen des Maturity Index), konnten sie vom Schadstoff Pyren profitieren (Zunahme des Maturity Index). Dies legt nahe, dass in den Mikrokosmen nicht nur direkte Toxizität (Zn), sondern auch indirekte Nahrungseffekte (Pyren) detektiert werden können.
- (7) Der Maturity Index erwies sich als einer der empfindlichsten Community-Parameter (Toxizitätseindpunkte) zur Erfassung von schadstoff-induzierten Veränderungen in Nematoden-Communities.
- (8) Auch mit einer DNA-basierter Analyse der Nematoden-Community konnten Effekte der untersuchten Schadstoffe detektiert werden. Auch wenn absolute Abundanzen aller Nematoden oder bestimmter Taxa, die mit qPCR ermittelt wurden, nicht direkt mit den mikroskopisch bestimmten Daten übereinstimmen, sind die relativen Veränderungen zur Kontrolle vergleichbar. Obwohl die taxon-spezifische qPCR-Methode zu Beginn des Projekts wohl die beste Option eine DNA-basierten taxonomischen Analyse der Nematoden-Communities war, sind zukünftig neuere Methoden (z.B. NanoPore-Sequencing) vorzuziehen.

2 Einführung/Motivation

2.1 Umwelproblematik

2.1.1 Risikobewertung von Chemikalien

Chemikalien gelangen durch den Menschen (Landwirtschaft, Industrie, Privathaushalte) in die Umwelt und belasten potentiell die betroffenen Ökosysteme mit all ihren dort beheimateten Lebewesen. Toxische Umweltschadstoffe (Pflanzenschutzmittel, Industriechemikalien, Biozide, Pharmazeutika) können dort die Artenvielfalt und wichtige Funktionen von Ökosystemen beeinträchtigen und dadurch Ökosystem-Dienstleistungen schädigen, die wiederum für den Menschen essentiell sind. Deshalb müssen Ökosysteme und deren Dienstleistungen vor schädlichen Wirkungen anthropogener Schadstoffe geschützt werden. Nachhaltiger Umweltschutz erfordert allerdings eine zuverlässige Identifizierung und gleichzeitig eine ökologisch relevante Abschätzung der Risiken, die von Umweltchemikalien ausgehen. Potentielle Risiken müssen prospektiv abgeschätzt werden, indem die Wirkungen einzelner potentiell toxischer Chemikalien auf einzelne Modelorganismen (Single-Species-Toxizitätstests) oder in Modellökosystemen (Mikro-, Mesokosmen) geprüft werden. Die Risikobewertung der Chemikalien wird im Rahmen des Zulassungsverfahrens von den zuständigen Behörden auf Europäischer (EFSA, ECHA, EMEA) und nationaler Ebene (UBA, BfN) gefordert und in entsprechenden Richtlinien bzw. Gesetzen geregelt (z.B. REACH; EC Pesticide Regulation; EMEA 2006). Die EFSA (European Food Safety Authority) erarbeitet momentan eine Boden-Guideline zur Risikobewertung von Pflanzenschutzmitteln und möchte alle wichtigen Bodenorganismen („key driver“ Organismen) miteinbeziehen. Hierfür gilt es geeignete ökotoxikologische Methoden zu entwickeln, die es ermöglichen, Bodenökosysteme vor anthropogener Schädigung möglichst effizient zu schützen.

2.1.2 Ökotoxikologische Bewertung von Böden

Im Vergleich zur aquatischen Ökotoxikologie, hat die ökotoxikologische Bewertung von Böden eine kürzere Tradition. Obwohl die Bodenökotoxikologie in den letzten Jahrzehnten deutliche Fortschritte gemacht hat, sind immer noch vergleichsweise wenige Testsysteme verfügbar, um die Wirkung von Schadstoffen auf Boden-Ökosysteme zu bewerten. Zum Beispiel ist die aktuelle Batterie an verfügbaren Bodentoxizitätstests weder komplett, noch ausgewogen (Van Gestel, 2012). Außerdem gibt es deutliche Defizite beim Verständnis und der Vorhersagbarkeit von Wirkungen von Chemikalien auf Lebensgemeinschaften von Bodenorganismen und den Ökosystemleistungen, die von diesen Lebensgemeinschaften erbracht werden (Van Gestel, 2012). Dies führte unter anderem dazu, dass im Rahmen der REACH-Regulation deutlich weniger experimentelle Daten für terrestrische (ca. ein Sechstel) als für aquatische Organismen eingereicht wurden (Sobanska et al., 2014).

2.1.3 Modelökosysteme (Mikro-, Mesokosmen)

Viele Effekte von Schadstoffen auf die Struktur und Funktion von Ökosystemen können mit Single-Species-Toxizitätstests nicht abgebildet werden (Cairns et al., 1972). Modellökosysteme bieten die Möglichkeit unter kontrollierten Bedingungen Wirkungen von einzelnen Schadstoffen, Schadstoffgemischen oder Umweltproben auf komplexe Lebensgemeinschaften zu untersuchen. Dadurch können Unterschiede in der Sensitivität verschiedener Arten, aber auch indirekte Nahrungsnetzeffekte berücksichtigt werden. Außerdem können die Organismen den Schadstoffen unter mehr oder weniger realistischen Bedingungen exponiert werden (Knacker et al., 2004; Van den Brink et al., 2005). Mikro- und Mesokosmen werden daher in einer gestuften Risikobewertung (z.B. von Pflanzenschutzmitteln) in Higher-Tier Studien verwendet⁴. Die hohe ökologische Relevanz geht allerdings auf

Kosten der Interpretierbarkeit, da die Daten je nach Größe des Systems und Länge der Versuchsdauer oft eine hohe Variabilität aufweisen (Boxall et al., 2002). Ein weiterer Nachteil von groß dimensionierten Modellökosystemen ist der relativ große finanzielle und zeitliche Aufwand. Die Größe der Modellökosysteme beeinflusst aber nicht nur den apparativen Aufwand. Je kleiner das Mikrokosmosystem (per Definition $<15 \text{ m}^3$ Volumen oder 15 m Länge), desto besser lassen sich die Bedingungen kontrollieren und um so kleiner wird dadurch potentiell die Variabilität der Ergebnisse. Ein wichtiger Aspekt ist dabei auch, ob man das System im Labor aufbauen kann, oder ob man die Mikrokosmen auf Grund der Größe im Freiland installieren muss (Strauss et al., 2010).

2.1.4 Berücksichtigung von Nematoden bei der ökotoxikologischen Bewertung von Böden

Nematoden sind die individuen-reichsten und eine der artenreichsten Metazoen in Böden und tragen wesentlich zu wichtigen Ökosystem-Dienstleistungen bei (Andrassy, 1992; Ferris et al., 2001; Yeates, 1981). Durch die Evolution von vielen verschiedenen Ernährungstypen, haben Nematoden Schlüsselstellen im Bodennahrungsnetz eingenommen (Yeates et al., 1993), wodurch sie den Nährstoffkreislauf im Boden wesentlich beeinflussen (Beare, 1997; Ingham et al., 1985; Yeates and Coleman, 1982). Nematoden leben in enger Interaktion mit der mikrobiellen Gemeinschaft der Rhizosphäre (Denton et al., 1999; Turner et al., 2013) und beeinflussen dort das Wachstum der Pflanzen (Alpei et al., 1996). Pflanzenparasitische Nematoden können z.B. die C- und N-Dynamiken in Weideland verändern, indem sie die Wurzel-Ausscheidungsrate beeinflussen (Bardgett et al., 1999). Die Anwesenheit und Struktur von Nematoden-Lebensgemeinschaften sind deshalb auch für die landwirtschaftliche Produktion und Nachhaltigkeit sehr wichtig (Fiscus and Neher, 2002). Die Nematoden werden deshalb auch im Entwurf des Soil-Opinion-Papers der EFSA explizit als key-driver Organismen genannt (EFSA PPR (Panel on Plant Protection Products and their Residues), n.d.).

Index-Systeme, die auf der Struktur von Nematoden-Lebensgemeinschaften beruhen, eignen sich gut dafür die Gesundheit des Bodens und dadurch auch die Nachhaltigkeit von landwirtschaftlichen Maßnahmen zu beurteilen (Ferris et al., 2001; Neher, 2001). Außerdem sind Nematoden geeignete Indikatororganismen um schädliche Auswirkungen von Schadstoffen auf Bodenökosysteme zu erkennen (Wilson and Kakouli-Duarte, 2009). Es existieren standardisierte Verfahren mit dem Nematoden *C. elegans* zur Erfassung der Toxizität von Chemikalien in Wasser, Sediment, Boden und Abfall (ISO 10872, ASTM E2172-01), sowie Indizes zur Bewertung von schadstoff-induzierten Änderungen von *in-situ* Nematodenlebensgemeinschaften in Böden (Maturity-Index, (Bongers and Ferris, 1999)) und Sedimenten (NemaSPEAR[%]-Index; (Höss et al., 2011)). Durch ihre geringe Größe und hohen Abundanzen findet man in wenigen Gramm Boden bereits genug Individuen um eine valide statistische Auswertung vorzunehmen, was die Miniaturisierung von Modelökosystemen ermöglicht (z.B. (Höss et al., 2014)).

2.1.5 Taxonomische Bestimmung von Nematoden

Die taxonomische Bestimmung der Nematoden anhand von morphologischen Merkmalen stellt den anspruchsvollsten Teil der Auswertung der Mikrokosmen-Experimente dar, da sie die taxonomische Expertise von Spezialisten erfordert. Außerdem wird von den mehreren Tausend Nematoden in einer Probe normalerweise nur eine Stichprobe von ca. 50 – 100 Individuen taxonomisch untersucht und so die Artenzusammensetzung abgeschätzt. Deshalb ist eine Entwicklung hin zu molekularen, nicht-morphologischen Methoden zur taxonomischen Bestimmung von Nematoden anzustreben. Innerhalb der letzten zehn Jahre wurde eine große und vielfältige molekulare Datenbank aufgebaut, die im Wesentlichen alle wichtigen Taxa der Bodennematoden enthält (Quist et al., 2015). Basierend auf

dieser Datenbank, wurden über 80 verschiedene quantitative PCR-Assays entwickelt, mit welchen Nematodengemeinschaften charakterisiert werden können (Quist et al., 2016; M. T. W. Vervoort et al., 2012). Mit Hilfe der DNA-basierten Community-Analyse können, im Gegensatz zur morphologischen Bestimmung, komplette Nematodensuspensionen, die typischerweise mehrere 1000 Individuen enthalten, analysiert werden.

2.2 Darstellung der umweltrelevanten Projektziele

Kleinräumige Bodenmikrokosmos-Systeme, in welchen Effekte von Chemikalien und komplexen Umweltproben auf Nematodenlebensgemeinschaften im Labormaßstab untersucht werden können, sollen optimiert, validiert und standardisiert werden, um routinemäßig angewendet werden zu können. Die Mini-Mikrokosmen stellen ein ökologisch relevantes und gleichzeitig kostengünstiges Verbindungsglied zwischen Labor-Toxizitätstests mit Einzelarten (lower Tier-Tests) und aufwendigen Mesokosmos- (e.g. in TMEs = terrestrial model ecosystems) oder Feldstudien dar. Zur Validierung, Optimierung und Standardisierung dieser Mikrokosmensysteme sollen folgende Ziele verfolgt werden:

2.2.1 Validierung von Mini-Mikrokosmen

Die Anwendbarkeit des Testsystems muss sowohl für verschiedene Bodentypen (Acker, Grasland, Wald) als auch für verschiedene Schadstoffklassen (Schwermetalle, PAKs, Pestizide) experimentell überprüft werden.

- Nematodenlebensgemeinschaften aus verschiedenen Bodentypen zeigen unterschiedlichen Artenzusammensetzungen und man muss deshalb mit unterschiedlichen Reaktionen auf bestimmte Stressoren rechnen. Trotzdem sollten bestimmte Gesetzmäßigkeiten der Stressreaktionen für alle Typen von Lebensgemeinschaften gültig sein. Mit dem Maturity Index (MI; MI25) hat man einen Index an der Hand, der die Lebensgemeinschaften nicht anhand der taxonomischen Zusammensetzung, sondern nach der Ausprägung verschiedener Reproduktionsstrategien („traits“) beurteilt. Dies sollte eine standort-unabhängige Bewertung ermöglichen.
- Da Nematoden auf verschiedene Schadstoffklassen unterschiedlich empfindlich reagieren, sind auch hier Unterschiede in der Reaktion der Lebensgemeinschaft zu erwarten. Hier muss die Frage geklärt werden, ob in den Mikrokosmen schadstoff-spezifische oder generelle Stressantworten gezeigt werden können.

2.2.2 Evaluierung der Toxizitätsendpunkte

Effekte auf Nematodenlebensgemeinschaften können sich auf verschiedenen Ebenen manifestieren, je nachdem ob alle Arten von einem direkten toxischen Effekt betroffen sind (Abnahme der Gesamt-abundanz), ob nur bestimmte taxonomische oder trophische Gruppen geschädigt werden (Veränderung der taxonomischen Struktur), ob verschiedene organismenspezifische, autökologische Eigenschaften (Traits) eine toxische Wirkung ermöglichen (spezielle Indices) oder ob indirekte Nahrungsnetzefekte die Struktur der Lebensgemeinschaft beeinflussen (Veränderung der taxonomischen Struktur bzw. der Struktur der Ernährungstypen). Deshalb sollen verschiedene taxonomische und nicht-taxonomische Toxizitätsendpunkte unterschiedlicher Komplexität verglichen werden: z.B. Gesamt-abundanz, Struktur der Lebensgemeinschaft hinsichtlich der Zusammensetzung der Ernährungstypen, Familien und Gattungen (mittels multivariater Methoden), Indexsysteme (z.B. Maturity Index).

2.2.3 *Innovation und Optimierung: Erleichterung der Auswertung durch molekulare Methoden der Taxonomie*

Die taxonomische Bestimmung der Nematoden anhand von morphologischen Merkmalen stellt den anspruchsvollsten Teil der Auswertung der Mikrokosmen-Experimente dar, da sie die taxonomische Expertise von Spezialisten erfordert. Außerdem wird von den mehreren Tausend Nematoden in einer Probe normalerweise nur eine Stichprobe von ca. 50 – 100 Individuen taxonomisch untersucht und so die Artenzusammensetzung abgeschätzt. Durch die Verwendung molekularer Methoden (Q-PCR-basierte Analyse mit art-spezifischen Primern; z.B. (M. T. W. Vervoort et al., 2012)) könnte (1) die Artbestimmung auch für Nicht-Taxonomen ermöglicht werden, (2) alle in der Probe enthaltenen Nematoden untersucht werden und somit eine höhere statistische Belastbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden. Die direkte Extraktion von gesamt DNA aus der Bodenprobe (ohne Extraktion der Nematoden) und dadurch die Möglichkeit einer automatisierten Auswertung sollen erprobt werden. Durch die simultane Auswertung anhand klassischer morphologischer und molekularer Taxonomie kann die Machbarkeit bzw. Präzision der molekularen Methoden überprüft werden.

2.2.4 *Standardisierung der Mikrokosmos-Testsysteme*

Nur standardisierte Testsysteme können zuverlässige Ergebnisse zur Effektbewertung von Schadstoffen bzw. Umweltproben liefern und dadurch auch zur regulatorischen ökotoxikologischen Bewertung verwendet werden. Zur Standardisierung gehören neben der Validierung auch die Optimierung der Versuchsbedingungen (z.B. Testzeit, Bodentyp) zur Verringerung der Variabilität der Testparameter.

3 Methodik / Vorgehensweise

3.1 **Standortsuche für Böden**

Um geeignete Böden für die Mikrokosmen-Versuche zu finden, waren folgende Kriterien für die Vorauswahl ausschlaggebend: Die Böden sollten (1) möglichst gering kontaminiert sein, (2) sich hinsichtlich des Bodentyps unterscheiden (z.B. sandiger vs. toniger Boden), (3) aus unterschiedlicher Nutzung stammen (Acker, Grünland), und (3) hinsichtlich der vorherrschenden Bodenfauna bekannt sein (am besten auch hinsichtlich der Nematodenfauna). Damit sollte gewährleistet sein, dass die Nematodenfauna in den für die Mikrokosmenversuche verwendeten Böden nicht schon an chemischen Stress adaptiert ist und man möglichst unterschiedliche Nematoden-Lebensgemeinschaften vorfindet.

Zwei Böden wurden vom holländischen Partner der Universität Wageningen beigesteuert, welche die Kriterien erfüllten und auch schon hinsichtlich der Nematodenfauna bekannt waren (Vredepeel: ein Ackerboden aus biologischer Landwirtschaft; De Mossel: unbewirtschaftetes Grünland). Ein weiterer Standort wurde von Ibacon (Mitglied im wissenschaftlichen Beirat) vorgeschlagen (Am Kirschrain; Acker bebaut mit Winterweizen, Zuckerrübe und Kartoffel). Hierfür lagen aus einer Kooperation mit Ecosa ebenfalls Nematodendaten vor. Weitere Standorte wurden mit Hilfe der Edaphobase-Datenbank (Datenbank zu Verbreitung und Ökologie von Bodentieren; http://www.senckenberg.de/root/index.php?page_id=11082). Von diesen sechs Standorten (Tab. 1) wurden mittels Bodenstechern Bodenproben entnommen (die oberen 20 cm) und hinsichtlich der Nematodenfauna analysiert (siehe 2.3.2 und 2.3.3). Auf Basis der Qualität der Nematodenlebensge-

meinschaften sollte dann die engere Auswahl für die Verwendung in Mikrokosmos-Experimenten getroffen werden (2.4.1).

Tabelle 1: Standorte und Bodeneigenschaften

Probestelle	Abk	Nutzung	%T/S/S	Typ	%OM	Nematoden- daten	Andere Organismen
De Mossel	Moss	Wiese	2/98	sandig	3,2	x	-
Vredepeel	VP	Acker	2/5/93	sandig	3-5	x	-
Am Kirschrain	KR	Acker	17/70/13		2	x	-
Sulzthal	ST	Acker	45/50/5	Tonlehm	2,7	-	+
Büchelberger Wiese	BW	Wiese		Sandlehm	5,8	-	+
Vogelöd	VÖ	Wiese		Sandlehm	4,7	-	+

3.2 Bodenoxizitätstest (ISO 10872) mit *Caenorhabditis elegans*

Toxizitätstests mit Modelorganismen (Repräsentanten einer wichtigen Gruppe von Bodenorganismen) werden in der Risikobewertung von Chemikalien meist als erste Bewertungsstufe (Tier-1-Tests oder Lower-Tier-Tests) verwendet, um Toxizitätsschwellenwerte bzw. Effektkonzentrationen für die zu bewertenden Chemikalien zu ermitteln (EFSA, 2017). Die verwendeten Tests (z.B. mit Collembolen- oder Regenwurmartens) sind meist gut standardisiert und ermöglichen eine relativ unaufwendige und zuverlässige Einschätzung von direkter Toxizität unter Berücksichtigung einer realistischen Exposition im Boden. Die so erhaltenen Toxizitätsschwellenwerte können dann je nach Toxizitäts-Expositions-Quotienten (TER = Schwellenwert geteilt durch die erwartete Konzentration in der Umwelt) zu weiterführenden Schritten in der Risikobewertung führen (Higher-Tier Tests). Auch für Nematoden ist ein standardisierter Bodentoxizitätstest verfügbar, und zwar mit dem Modell-Nematoden *Caenorhabditis elegans* (ISO 10872; ISO, 2020). Dieser Test wurde in vorliegendem Projekt für mehrere Zwecke verwendet: (1) Toxizitätsscreening von Pestiziden: Welche Chemikalien als Modellschadstoffe für die Mikrokosmen verwendet werden, sollte in einem Toxizitätsscreening mit dem Standard-Toxizitätstest mit *Caenorhabditis elegans* (ISO 10872) ermittelt werden, da es bisher noch wenig Literaturdaten zur Toxizität von Schadstoffen, insbesondere von Pestiziden, auf Nematoden vorliegen. (2) Vergleich von Intermediate- und Lower-Tier-Toxizitätsdaten: Die für die in den Mikrokosmen (intermediate-tier) getesteten Chemikalien ermittelten Effektkonzentrationen sollten mit Toxizitätsdaten aus dem Toxizitätstest mit *C. elegans* verglichen werden. (3) Abschätzung der Bioverfügbarkeit von Chemikalien: Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von Chemikalien für Testorganismen in verschiedenen Bodentypen können besser in einfachen Testsystemen mit einzelnen Arten als Testorganismen untersucht werden. Hierfür wurden die in den Mikrokosmen verwendeten Chemikalien im Vergleich zum Standardboden Lufa 2.2 auch in allen für die Mikrokosmen verwendeten Böden mit ISO-Standardtest untersucht.

3.2.1 Boden-Spiking

Zwei Gramm trockener Boden wurden mit 1 ml Schadstofflösungen vermischt und danach unter dem Abzug bei Raumtemperatur wieder getrocknet. Für schwer wasserlösliche, hydrophobe Substanzen wurden die Substanzen in purem Aceton gelöst, das dann wieder komplett aus dem Boden verdampfen konnte. Auf diese Weise konnten für alle getesteten Substanzen Konzentrationsreihen in allen

getesteten Böden hergestellt werden. Als Kontrolle diente jeweils der Boden der mit Wasser bzw. Aceton ohne Schadstoff gespikt wurde.

Folgende Substanzen wurden getestet (Tab. 2):

Tabelle 2: Liste der mit *C. elegans* getesteten Substanzen

Chem. Substanz	CAS	M (g/mol)	getester Boden
Fungizid			
Carbendazim	10605-21-7	191	Lufa, Moss, VP
Fluazinam	79622-59-6	465	Lufa
Fludioxonil	131341-86-1	248	Lufa
Folpet	133-07-3	297	Lufa
Mancozeb	8018-01-7	541	Lufa, Moss, VP
Tebuconazole	107534-96-3	308	Lufa
Insektizid			
Acetamiprid	135410-20-7	223	Lufa
Insecticide X		408	Lufa
Cypermethrin	52315-07-8	416	Lufa
Herbizid			
			Lufa
Diflufenican	83164-33-4	394	Lufa
Ethofumesat	26225-79-6	286	Lufa
Glyphosate	1071-83-6	169	Lufa
Metsulfuron-Methyl	74223-64-6	381	Lufa
Pendimethalin	40487-42-1	281	Lufa
Nematizid			
Dazomet	533-74-4	162	Lufa
PAK			
Pyren	129-00-0	202	Lufa, Moss, VP, BW
Metall			
Zn	7446-20-0 (ZnSO ₄ 7H ₂ O)	65	Lufa, Moss, VP, BW

3.2.2 Toxizitätstest

Der Toxizitätstest mit *Caenorhabditis elegans* wurde gemäß ISO 10872:2020 (ISO, 2020) durchgeführt (Ausnahme: Fludioxonil wurde noch nach ISO 10872:2010 durchgeführt; ISO, 2010). Da sich ISO 10872 auf Grund von Änderungen in der Testung von Böden zur Zeit der Tests in Revision befand, wurde die gültige Draft-Version verwendet (ISO/DIS 10872:2019; die neue Auflage der Norm ist nun bereits veröffentlicht: ISO 10872:2020; ISO, 2020). Deshalb sollen diese Änderungen hier kurz erwähnt werden. Der Test in Böden wird in der revidierten Norm mit weniger Flüssigkeit durchgeführt, um ein bodentypisches 1-Phasensystem zu erhalten. Der Flüssiggehalt richtet sich nun nach der maximalen Wasserhaltekapazität (80% der WHC_{max}). Dies zog auch einen Wechsel der Testgefäße hin zu 24-well Platten mit. Die einzelnen Testgefäße wurden mit 0.5 (± 0.005) g trockenen, mit Schadstoff dotierten Lufa-Boden gefüllt und dann mit 0,100 ml Bakteriensuspension und der entsprechenden Menge an M9-Medium auf 80% der WHC_{max} befeuchtet (WHC_{max} von Lufa 2.2, Moss, VP und BW: 48.2%, 46,1%, 45.1% und 75,8%). Für jedes Treatment (bzw. Konzentrationsschritt) wurden 3 Replikate angesetzt. In jedes Replikat wurden 5 Testorganismen eingesetzt.

Für das Fungizid Fludioxonil wurden am Ende Tests (nach 96h) die Konzentrationen der Substanz im Boden und im Porenwasser gemessen (siehe 2.4.4). Dafür wurden Extra-Replikate für die chemische Analyse (ohne Nematoden) angesetzt, so dass 1.2 g Boden (TG) und 2 ml Porenwasser zur Analyse von Fludioxonil zur Verfügung standen. Die Proben für die chemische Analyse wurden bis zur Analyse im Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt.

3.3 Analyse der Nematodenlebensgemeinschaften in Böden

3.3.1 Fixierung der Böden

Durch die Fixierung einer Bodenprobe muss die Proben nicht sofort weiterverarbeitet werden, sondern kann länger bis zur Auswertung gelagert werden. Für die morphologische Artbestimmung wird normalerweise Formalin (4%) zur Fixierung der Proben verwendet. Da Formalin sich aber negativ auf die Qualität der DNA auswirkt, wird für die molekulare, DNA-basierte Taxonomie Ethanol als Fixierungsmittel herangezogen. Da in dieser Studie für ein und dieselbe Probe beide taxonomischen Methoden verglichen werden sollten, wurde eine Fixierungsmethode gesucht, die gleichermaßen für die taxonomische und molekulare taxonomische Bestimmung der Nematoden geeignet ist. Dafür wurden zwei alternative Fixierungsmittel überprüft, die in der Literatur als Alternativen vorgeschlagen wurden: (1) DESS (auf DMSO-Basis; Yoder et al., 2006): soll als Fixiermittel für die morphologische Taxonomie geeignet und DNA-schonend sein und (2) F-Solv: ein Formaldehydersatz, für den es noch keine Erfahrung gab. Deshalb wurde in einem Vorversuch die Qualität dieser zwei Fixierungsmittel für beide taxonomischen Methoden überprüft. Drei verschiedene Bodentypen wurden mit DESS und F-solve fixiert, oder, als Kontrolle, nicht fixiert. Die Nematoden wurden dann extrahiert und die Abundanz der Nematoden mit den beiden taxonomischen Methoden bestimmt. Für die unfixierten Proben wurden die Nematoden nach der Extraktion mit dem jeweils am besten geeigneten Fixierungsmittel (Morphologie: Formalin; DNA: Ethanol) fixiert.

3.3.2 Extraktion von Nematoden aus dem Boden

Die Extraktion der Nematoden aus dem Boden findet standardmäßig mittels einer Flotations-/Zentrifugationsmethode in einem Dichtegradienten statt. Dabei wird die Bodenprobe mit einer Silica-Suspension (Ludox TM50® verdünnt mit Wasser: 1.13 Kg/L) gründlich vermischt und danach bei ca. 800g zentrifugiert. Dadurch werden die Nematoden von den Bodenpartikeln getrennt, was das Auffinden der Nematoden erleichtert. Die Ludox-Extraktionsschritte wurden dreimal wiederholt (erfahrungsgemäß werden dadurch >90% der im Boden enthaltenen Nematoden extrahiert). Die extrahierte Nematodensuspension wurde dann in zwei Unterprobe unterteilt und je nach taxonomischer Methode fixiert: (1) für die morphologische Artbestimmung in 4% Formaldehyd (+ Bengalrosa zur Färbung); (2) für die DNA-basierte Artbestimmung entweder in Wasser bei -20°C (erster Mikrokosmenversuch 2018) oder mit 98% Ethanol (alle anderen Mikrokosmenversuche).

Die Anwesenheit von organischem Material, das nicht von Nematoden stammt, erschwerte die Extraktion der DNA aus den Boden-Extrakten. Es wurde daher überprüft, ob Modifikationen bei der Methodik der Nematoden-Extraktion vorgenommen werden können, die zu einer Reduzierung von ungewünschtem organischem Material führen. Folgende Methoden bzw. Modifikationen wurden überprüft:

- a. **Baermann-Trichter-Filtration** zur Reinigung von verunreinigten Ludox-Boden-Extrakten: Nematodensuspensionen, die durch Ludoxextraktion aus Bodenproben (De Mossel) isoliert wurden und deshalb mit organischem Material verunreinigt waren, sollten mit Hilfe der Baermann-Trichter-Filtration gereinigt werden. Das Prinzip der Methode sieht vor, dass sich lebende Nematoden durch ihre Bewegung durch ein Filterpapier bohren und in der Wassersäule unter dem Filter nach unten sinken, während totes organisches Material auf dem Filterpapier liegen bleibt. Die Effektivität der Baermann-Trichter-Filtration sollte sowohl für tote (Negativkontrolle) als auch lebende Nematoden durchgeführt werden. Dafür wurde DeMossel-Boden einmal mit Formalin fixiert, um die Nematoden abzutöten. Für beide Böden (lebend; fixiert) wurden die Nematoden mit Ludox aus dem Boden extrahiert, die Gesamtabundanz bestimmt und dann mittels der Baermann-Trichter-Filtration gereinigt.

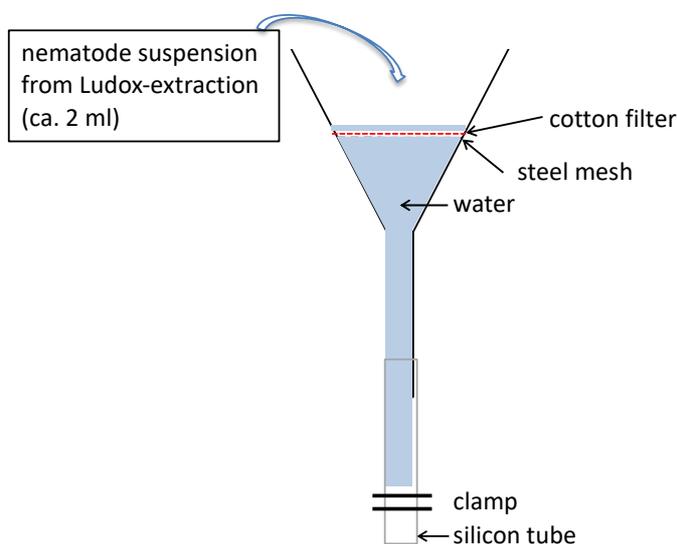


Abbildung 1: Baermann-Trichter-Aufbau zur Extraktion von lebenden Nematoden aus verunreinigtem Boden-Extrakten.

- b. **Variation der Ludox-Dichte** zur Reduzierung von feinem organischem Material: Durch Variation der Dichte der Ludoxsuspension, die zur Extraktion der Nematoden verwendet wird, kann die Menge des extrahierten organischen Materials beeinflussen. Deshalb wurden Nematoden aus Boden vom Standort De Mossel, der sehr reich an organischem Material ist, mit Ludoxsuspensionen verschiedener Dichten extrahiert: 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 g/ml.
- c. **Entfernung von auftreibendem organischem Material und organischem Material >1mm:** Ein Teil des organischen Materials, das mit dem Ludox aus dem Boden extrahiert wird und zur Verunreinigung der Probe beiträgt, ist so leicht, dass es auf der Wasseroberfläche bleibt, während die Nematoden absinken. Es sollte überprüft werden, ob durch Entfernung des auftreibenden Materials, Nematoden verloren gehen. Außerdem wurde die Probe durch einen 1-mm Sieb filtriert um grobes organisches Material zu entfernen. Auch hier sollte überprüft werden, ob sich noch größere Nematoden auf dem Sieb befinden.

3.3.3 Morphologische Taxonomie

Für die morphologische Bestimmung der Nematoden wurden die formaldehyd-fixierten Extrakte (Suspensionen) verwendet. Für jede Probe wurden alle Nematoden quantitativ erfasst, um die Abundanz (Individuen/30g Boden) zu bestimmen. Die ersten 50-150 Nematoden wurden aussortiert und in eine spezielle Fixierlösung überführt (Fix-Lösung 1: 20% Ethanol, 1% Glycerin, 79% Wasser). Nach ca. 2-3 Tagen war die Fixierlösung verdampft und mit einer anderen Fixierlösung (Fix-Lösung 2: 95% Ethanol, 5% Glycerin) ersetzt. Frühestens nach ca. 3 Tagen wurden die Nematoden dann auf Objektträgern in purem Glycerin präpariert (jeweils 10 Individuen auf einem Objektträger). Danach konnten die Nematoden unter dem Mikroskop nach morphologischen Merkmalen möglichst auf Gattungsniveau bestimmt (Bestimmung nach: Andrassy, 2007, 2005, 1984; Bongers, 1988; Goodey, 1963).

Für die morphologische Artbestimmung können nicht alle Nematoden bestimmt werden, sondern nur ein Aliquot. Oft werden 50-100 Nematoden stellvertretend für alle Nematoden im Boden bestimmt. Um die Mindestanzahl an Nematoden festzulegen, die für eine robuste Bewertung einer Nematodenlebensgemeinschaft notwendig ist, wurden von ausgewählten Proben, 150 Nematoden bestimmt. Die Analyse der Lebensgemeinschaft (Berechnung aller Indices, multivariate Analyse) wurde dann mit zunehmender Anzahl der bestimmten Nematoden durchgeführt. Die Reihenfolge der für die Analyse ausgewählten Nematoden hatte gerade bei der Analyse für niedrige n-Werte einen großen Einfluss. Deshalb wurde für alle Analysen (n = 10 bis n = 150) 5 zufällige Reihenfolgen gewählt und die Ergebnisse dieser Ergebnisse gemittelt. So konnte die Mindeststichprobengröße ermittelt werden, die für eine robuste und zuverlässige Analyse der verschiedenen Indices notwendig ist.

3.3.4 DNA-Extraktion und qPCR-basierte Taxonomie

Die für die DNA-Analyse bestimmte Unterprobe wurde per Übernachtskurier zum Projektpartner an die Universität Wageningen geschickt (im Fall der eingefrorenen Proben mit Trockeneis). In Wageningen wurden die Nematodensuspensionen aufkonzentriert (Abb. 2) und die DNA wurde mit einem Lysis-Puffer extrahiert, der Säugetier-DNA als externen Standard enthielt (um Verluste durch Probenbehandlung und DNA-Aufreinigung zu überprüfen; siehe auch Vervoort et al., 2012). Danach wurden die DNA-Extrakte mit einer Glasfasersäulen-basierten Methode aufgereinigt (Ivanova et al., 2006). Die gereinigten DNA-Extrakte wurden bei -20°C aufbewahrt.

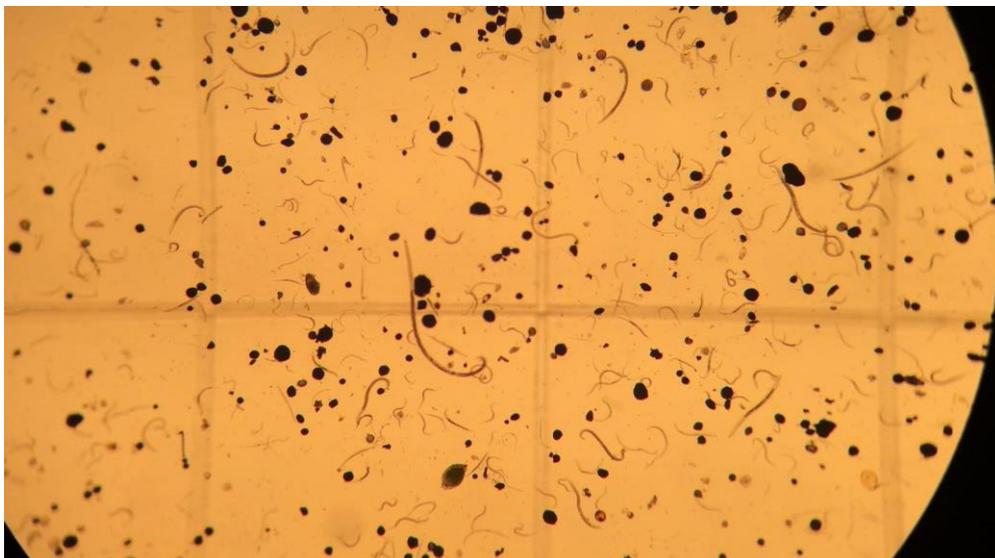


Abbildung 2: Nematodensuspension mit repräsentativen Gattungen verschiedener Ernährungstypen (Foto: Casper Quist).

Um die Nematoden-Biodiversität an den verschiedenen Standorten zu untersuchen, wurden 5 µl der DNA-Extrakte der einzelnen Replikate eines Standorts vereinigt und diese Mischungen analysiert. Durch anfängliche Analysen mit 58 Nematodentaxon-spezifischen Primerkombinationen erhielt man einen Eindruck der Nematodendiversität der Probestellen. Abhängig von der erfassten Biodiversität, wird eine passende Zahl an Primern für die Quantifizierung von spezifischen Taxa ausgewählt. Ein separater qPCR-Assay wurde verwendet, um die Gesamtabundanz der Nematoden abzuschätzen. Um Faktoren zu ermitteln, die den DNA-Verlust durch Probenbehandlung kompensieren, wurde die Säugetier-DNA als externe Kontrolle nach der Reinigung quantifiziert. Danach wurden quantitative PCR Reaktionen durchgeführt und Ct-Werte (Cycling Threshold; Abb. 3) wurden in qPCR-Counts umgerechnet: Nematodendichten wurden durch bekannte lineare Korrelationen zwischen C_t Werten und $^{10}\log$ der Ziel-Nematodentaxa abgeschätzt (Abb. 4). Die Maxima der ersten mathematischen Ableitung der Schmelzkurven wurden überprüft um die richtige Beschaffenheit der Amplikons zu bestätigen (Quist et al., 2016).

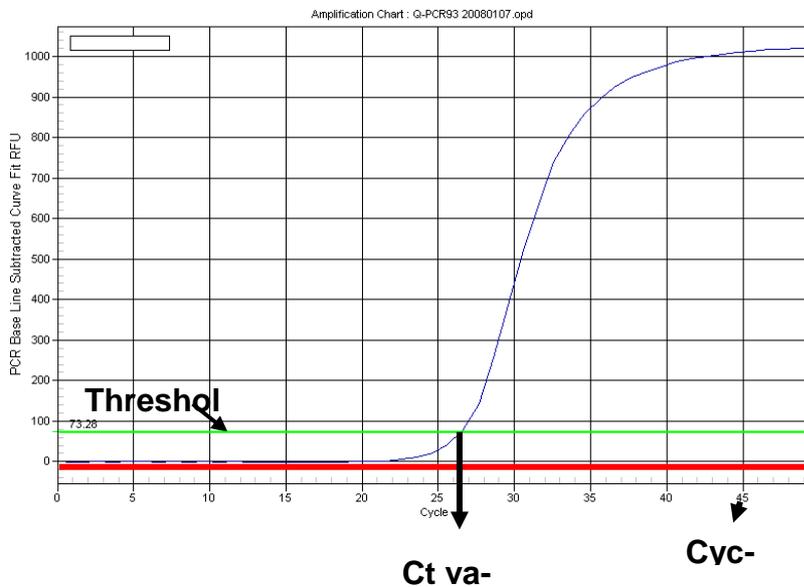
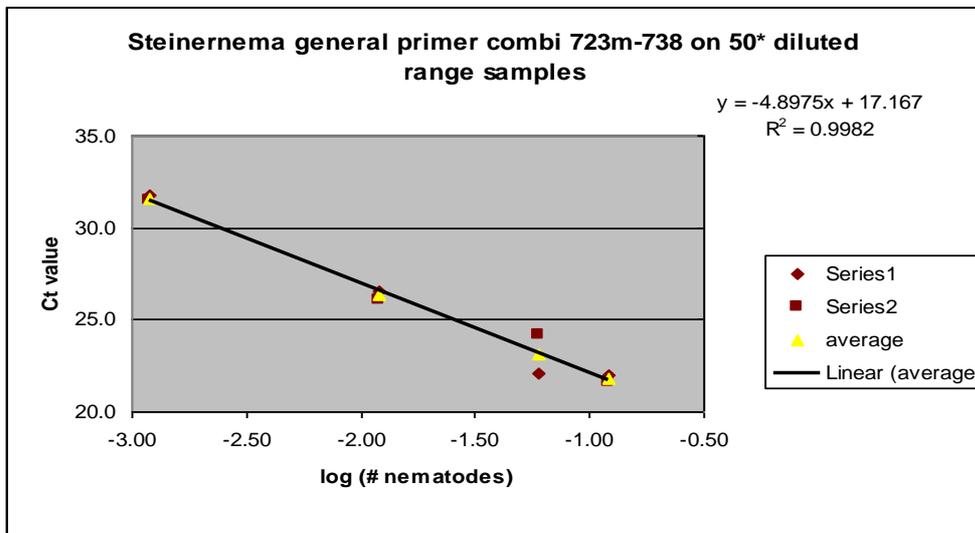


Abbildung 3: Beispiel eines einzelnen Amplifikationsplots, das den Cycling-Grenzwert (C_t) zeigt. Der Grenzwert wird vom Benutzer definiert, sollte aber im exponentiellen Bereich der Amplifikationskurve liegen. Dieser Grenzwert war für alle Analysen konstant.



Abbildungen 4: Beispiel einer linearen Korrelation der Ct-Werte und der Anzahl der Nematoden des Zieltaxons (log-Skala). Die negativen Werte auf der x-Achse entsprechen einer bestimmten Fraktion eines einzelnen Nematoden. Negative Werte kommen zustande, da nur ein Teil des gesamten Lysats analysiert wird. Die Steigung der Gerade ist negativ, da abundante Taxa ein früheres Signal ergeben (also einen niedrigen Ct-Wert), während ein seltenes Taxon ein spätes Signal produziert (hoher Ct-Wert).

3.3.5 Datenanalyse und verwendete Indices

Die Nematodenabundanzen wurden einheitlich in der Einheit Individuen/100g Boden (Trockengewicht; TG) angegeben. Alle Nematodentaxa wurden gemäß ihrer Reproduktionsstrategien (life-history strategy) in einer "colonizer-persister" (c-p) Skala von 1 bis 5 (siehe Bongers and Bongers, 1998). Der Maturity Index wurde gemäß der Gleichung von Bongers (1990) berechnet:

$$MI = \sum_{i=1}^n (f_i \times v_i)$$

wobei f_i die Fraktion eines Taxons i in einer Probe ist und v_i der $c-p$ -Wert des Taxons i ist.

Zusätzlich wurden die Nematodentaxa gemäß Yeates et al. (1993) in Ernährungstypen eingeteilt: (1) Pflanzenfresser (PF), (2) Pilz-(bzw. Hyphen)-Fresser (HF), (3) Bakterienfresser (BF), (4) Räuber (bzw. Prädatoren) (Pre), (5) omnivore Nematoden (vor allem Dorylaimiden). Basierend auf der $c-p$ - und Ernährungstypklassifikation konnten die Nematoden noch gemäß Ferris et al. (2001) funktionellen Gruppen zugeordnet werden: Ba_n , Fu_n , Ca_n , Om_n = Bakterienfresser (Ba), Pilzfresser (Fu), Räuber (Ca) und Omnivore (Om) mit $n = c-p$ -Wert. Damit konnten dann folgende Indices berechnet werden um das Bodennahrungsnetz bezüglich der Struktur und der vorwiegenden Abbaupfade näher beschreiben zu können:

Enrichment Index:

$$EI = 100 \times \frac{e}{e+b} \quad (2)$$

Structure Index:

$$SI = 100 \times \frac{s}{s+b} \quad (3)$$

wobei $b = (Ba_2 + Fu_2) \times 0.8$, $e = Ba_1 \times 3.2 + Fu_2 \times 0.8$, and $s = Ca_2 \times 0.8 + (Ba_3 + Ca_3 + Fu_3 + Om_3) \times 1.8 + (Ba_4 + Ca_4 + Fu_4 + Om_4) \times 3.2 + (Ba_5 + Ca_5 + Fu_5 + Om_5) \times 5$.

Um die Gattungszusammensetzung zu untersuchen wurden Principal Response Curves (PRCs) berechnet (CANOCO for Windows 4.55; Biometris – Plant Research International, Wageningen, The Netherlands, 1997-2006). PRC ist eine multivariate Methode zur Darstellung von komplexen Datensätzen auf Basis einer Redundanzanalyse (RDA; Van den Brink and Ter Braak, 1999). Damit können Unterschiede in der Zusammensetzung von Nematoden-Communities als Antwort auf eine Behandlung (z.B. Chemikalien) über die Zeit einfach dargestellt werden. Interaktionen zwischen Behandlung und Zeit (bzw. Probenahmezeitpunkt) werden als erklärende Variablen verwendet, wobei die Zeit als Co-Variable dient. Die lineare Kombination der Variablen (Änderungen der $\ln(2x+1)$ -transformierten relative Abundanz) wurde berechnet um die Abweichung jeder Gattungszusammensetzung in einem behandelten Mikrokosmos von der Kontrolle zu jedem Probenahmezeitpunkt zu bestimmen. Diese Abweichung wird als "First Principal Component" der durch die Behandlung erklärten Varianz (Kanonischer Koeffizient: c_{dt}) gegen die Zeit aufgetragen (PRCs). Die begleitenden Species Scores (b_k), ermöglichen die Interpretation der PRCs als relative Antwort einzelner Gattungen auf die Behandlung mit den Chemikalien (der Wert gibt das Gewicht der Gattung für die Entfernung der PRC von der Kontrolle an). Die statistische Signifikanz eines Behandlungseffekts auf die Community-Zusammensetzung wurde mittels eines Monte-Carlo Permutationstest überprüft (Van den Brink and Ter Braak, 1999).

Um die statistische Trennschärfe der verschiedenen Community-Parameter (i.e. Indices) zu beurteilen wurde für jeden Parameter (in jedem Boden, für jede Chemikalie) die minimale detektierbare Differenz (MDD; van der Hoeven, 2008) berechnet. Die MDD basiert auf der test-inhärenten Variabilität und wird als Prozentsatz von der Kontrollantwort wiedergegeben.

3.4 Experimente in Mikrokosmen: Wirkung von qualitativ unterschiedlichen Schadstoffen auf Nematoden-Communities in verschiedenen Böden

3.4.1 Verwendete Böden

Aus den sechs in Frage kommenden Böden (Vorauswahl siehe 2.1) wurden für die Mikrokosmenversuche drei Böden ausgewählt, die für die Hauptversuche zur Validierung und Optimierung der Mikrokosmensysteme verwendet werden sollten. Folgende Kriterien wurden für die Auswahl berücksichtigt:

- a) Die Böden sollten sich hinsichtlich der Nutzung am Standort unterscheiden (mindestens jeweils ein Grünland- und ein Ackerboden)
- b) Die Böden sollten sich hinsichtlich der geo-physiko-chemischen Eigenschaften unterscheiden
- c) Die Struktur der Nematodenlebensgemeinschaften sollte sich unterscheiden (siehe auch Ergebnisteil 3.1)

Für einen ersten Pilotversuch in Kooperation mit der Universität Bielefeld im Rahmen einer Masterarbeit wurde außerdem eine nahe der Universität Bielefeld gelegene Grünfläche beprobt. Alle verwendeten Böden wurden noch mal hinsichtlich der Korngrößenverteilung und des organischen Gehalts analysiert (siehe Tab. 3).

Tabelle 3: Beschreibung der Probenahmestandorte und Eigenschaften der für die Mikrokosmenversuche verwendeten Böden; OM = organisches Material; TOC = gesamter organischer Kohlenstoff.

Site	Bielefeld	De Mossel	Büchelberger Wiese	Vredepeel
Abkürzung	UB	Moss	BW	VP
Ort	Bielefeld, DE	Ede, NL	Huthurm, DE	Limburg, NL
Koordinaten	52,03 °N; 8,50 °E	52,04 °N, 5,44 °E	50,52 °N, 6,34 °E	51,55° N; 5,87° E
Bodeneigenschaften				
% Trockengewicht	85,0	89,1	89,5	91,9
% OM (Glühverlust)	3,1% TOC (~6% OM)	4,6	10,3	5,3
% Sand (63 – 2000 µm)	61,0	90,0	30,1	86,2
% Fraktion 1000 – 2000 µm		3,5	3,1	0,3
% Fraktion 630 – 1000 µm		8,3	5,4	0,9
% Fraktion 200 – 630 µm		57,1	11,6	30,2
% Fraktion 125 – 200 µm		15	5,3	37,8
% Fraktion 63 – 125 µm		6,1	4,7	17,0
% Schluff (2 – 63 µm)	30,0	8,2	44,9	10,7
% Fraktion 20 – 63 µm		4,1	14,6	5,4
% Fraktion 6.3 – 20 µm		3,3	19,2	2,9
% Fraktion 2 – 6.3 µm		0,8	11,1	2,4
% Clay (< 2 µm)	9,0	1,8	25,0	3,1

3.4.2 Dotieren (Spiken) des Bodenmaterials

Die Dotierung wurde gemäß der in Höss et al. (2014) beschriebenen Methode durchgeführt (siehe auch Abb. 5a). Ein Teil des beprobten frischen Bodens wurde über Nacht bei 105 °C getrocknet. Dieser getrocknete Boden wurde dann mit dem jeweiligen dotiert. Dazu wurden für jede Konzentrationsstufe eine geeignete Menge an trockenem Boden (18 bis 25 g) mit einem geeigneten Volumen an Schadstoff-Lösung in Wasser oder Aceton vermischt (das zugegebene Volumen an Schadstofflösung betrug den halben Wert der Masse des Bodens; z.B. 9 ml auf 18 g Boden). Die Konzentration der Schadstoffe in den dazugegebenen Lösungen war so gewählt, dass in diesem Boden die 10-fache Bodenkonzentration der Zielkonzentration erreicht wurde. Für die Negativkontrollen wurde der Boden lediglich mit reinem Wasser (demineralisiert) oder Aceton vermischt. Nach vollständigem Verdampfen des Lösungsmittels (Wasser oder Aceton), wurde der dotierte Boden noch mal gut vermischt, um dann die entsprechende Menge an dotiertem trockenem Boden (18-25g) mit frischem Boden zu vermischen. Dabei entsprach die dotierte trockene Bodenmasse 10% der Gesamtmasse (z.B. 18g dotierter trockener Boden + 162g frischer Boden = 180g Versuchsboden). Die dadurch erzielten Konzentrationen in den Versuchsböden sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Nominelle Konzentrationen (Konz) der Substanzen, mit welchen die verschiedenen Böden in vier Versuchen dotiert wurden; FDO = Fludioxonil, Zn = Zink, Pyr = Pyren, Carb = Carbendazim, Manc = Mancozeb; Rep = Anzahl der Replikate (* = gilt nur für Kontrollen); ZP = Zeitpunkte (T0 = Zeitpunkt vor Schadstoffapplikation: jeweils 8 Replikate).

Versuch	V 1			V 2			V 3		V 4
Boden	UB	Moss		BW		VP			Moss
Substanz	FDO	Zn	Pyr	Zn	Pyr	Zn	Carb	Manc	Manc
mg/kg trockener Boden									
Konz 1	75	10	2	10	2	10	1	8	7
Konz 2	150	122	20			122	2,4	18	15
Konz 3	300	245	48	245	48	245	4,5	59	30
Konz 4	600	367	96						59

Konz 5		551	144	551	144				89
Konz 6									133
Rep	3	4 (8*)	4	4	4	4	4	4	4
ZP (+T0)	2	2	2	2	2	2	2	2	3
Anzahl	38	64	48	40	32	40	32	24	104

3.4.3 Aufstellung und Beprobung der Mikrokosmen

Der dotierte Versuchsboden wurde nun in 50-ml Zentrifugenröhrchen verteilt, die als Mikrokosmen dienten (30 g Versuchsboden FG pro Mikrokosmos; siehe Abb. 5b). Die Mikrokosmen wurden dann mit Deckeln geschlossen, die ein kleines Loch in der Mitte hatten, um den Gasaustausch zu gewährleisten. Die Anzahl der befüllten Mikrokosmen richtete sich nach der Anzahl der Replikate und Probenahme-Zeitpunkte (siehe Tab. 5). Für eine methodische Überprüfung wurden für eine Versuchsreihe die Deckel entfernt (siehe 3.4.4).

Die Mikrokosmen wurden dann bei 15 (± 2) °C bis zur Probenahme in einem Klimaschrank inkubiert. Für eine methodische Überprüfung wurden die Mikrokosmen auch bei 20°C, sowie mit und ohne Befeuchtung im Klimaschrank inkubiert (siehe 3.4.4).

Zu allen Probenahmezeitpunkten fand eine destruktive Beprobung („Schlachten“ des gesamten Mikrokosmos) statt. Folgende Probenahmezeitpunkte wurden bei den verschiedenen Versuchen gewählt (siehe auch Tab. 4):

- T0 (Startprobe für alle Versuche [V]): Zu Beginn des Versuchs wurden acht (bzw. sechs für Versuch 1) unbehandelte Replikate fixiert, um die Struktur der Nematodenlebensgemeinschaft zu Beginn des Versuchs zu kennen; außerdem wurden vor der Verteilung des gespikten Bodens in die Mikrokosmen aus jeder Behandlung (Kontrollen + Konzentrationsstufen) 4 g (bzw. 6g für V1) frischen Bodens entnommen und für die chemische Analyse eingefroren.
- T1 bis 3:
 - 2 Wochen (bzw. 14 Tage): V4;
 - 4 Wochen (bzw. 28 Tage): V1, V3, V4
 - 5 Wochen (bzw. 35 Tage): V2
 - 8 Wochen (bzw. 56 Tage): V1, V3, V4
 - 10 Wochen (bzw. 70 Tage): V2

Nach Entnahme von je 1 g (bzw. 2 g für Versuch 1) frischen Bodens aus jedem Replikat für die chemische Analyse, wurden für alle Proben innerhalb von 2 Tagen die Nematoden lebend aus dem Boden extrahiert (siehe 2.3.2) und dann entsprechend der taxonomischen Methode weiterbehandelt, fixiert und bis zur weiteren Analyse gelagert (siehe 2.3.3 und 2.3.4). Die 3-4 Replikatproben für die chemische Analyse wurden zu einer Probe pro Behandlung gepoolt und bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

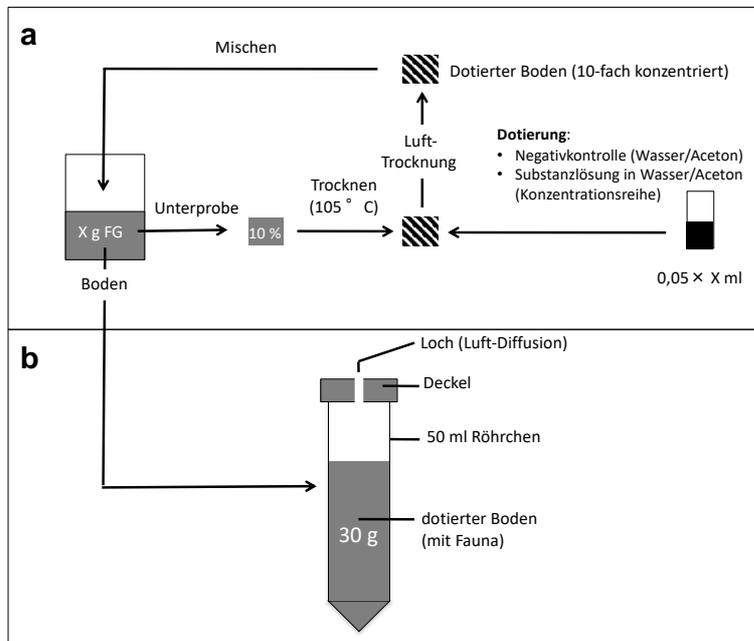


Abbildung 5: Dotieren des Bodens und Aufbau der Mikrokosmen.

3.4.4 Einfluss von Temperatur und Feuchtigkeit im Inkubator auf Abundanzen in Mikrokosmen

Der Einfluss bestimmter Versuchsbedingungen auf die Entwicklung der Nematoden-Communities in den Kontrollen sollte in einem separaten Experiment exemplarisch am Moss-Boden geklärt werden: (1) Kann die Austrocknung der Versuchsböden die Nematodendichte, sowie die Zusammensetzung der Gattungen beeinflussen? (2) Das Testsystem wurde für 20°C entwickelt (Höss et al., 2014) und erprobt (Haegerbaeumer et al., 2019). Es sollte überprüft werden, ob auch bei geringeren, realistischen Temperaturen (15 °C) geeignete Bedingungen für die Nematoden-Communities herrschen. (3) Reicht der Gasaustausch durch das kleine Loch im Deckel für die Nematoden-Communities aus?

Dafür wurden Mikrokosmen, die mit 30g frisch beprobten Moss-Boden befüllt wurden, unter folgenden Bedingungen über einen Zeitraum von 5 Wochen inkubiert:

1. 20°C bei maximaler Luftfeuchtigkeit in offenen Gefäßen
2. 15°C bei maximaler Luftfeuchtigkeit in offenen Gefäßen
3. 15°C ohne Regulieren der Luftfeuchtigkeit in geschlossenen Gefäßen (mit Loch im Deckel; gemäß Höss et al. 2014)

Um den Einfluss dieser Versuchsbedingungen zu beurteilen, wurde (1) das Trockengewicht der Versuchsböden über einen Zeitraum von 5 Wochen wöchentlich kontrolliert, (2) die Nematodendichte und (3) die Zusammensetzung der Nematoden-Community über einen Zeitraum von 5 Wochen zu 4 Zeitpunkten (0, 1, 3 und 5 Wochen) untersucht.

3.4.5 Chemische Analyse der gespikten Substanzen im Boden

Fludioxonil (FDO; analysiert von Universität Wageningen; siehe auch Haegerbaeumer et al., 2019)

FDO wurde sowohl in Bodenproben (Toxizitätstest; Mikrokosmen) als auch in wässrigen Porenwasser-Proben (nur Toxizitätstest) analysiert. Für die Proben vom Toxizitätstest wurde, nachdem die Probe aufgetaut wurde, zuerst durch Zentrifugation (2500 U/min; 8 min) die Bodenpartikel vom Po-

renwasser getrennt. Der wässrige Überstand wurde für die FDO-Analyse aufbewahrt. Das an den Bodenpartikeln gebundene FDO (sowohl für Boden aus dem Toxizitätstests als auch aus dem Mikrokosmenversuch) wurde durch die Zugabe von Acetonitril (mit 1% v/v Ameisensäure) extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand (5 ml) für die FDO-Analyse verwendet. Wässriger Überstand (Porenwasser) und Extrakt (Boden) wurden mit Acetonitril verdünnt und LC-MS/MS analysiert.

Zn und Pyren (analysiert von Institut Dr. Nowak)

Nach dem Auftauen der eingefrorenen Bodenproben, wurde der Boden bei 40°C in einem Gebläsetrockenschrank gemäß ISO 1464:2006-12 getrocknet. Um das Zn zu extrahieren, wurde der Boden gemäß EN 16174 mit Königswasser aufgeschlossen. Aus dem Extrakt wurde das Zn mittels optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) gemäß ISO 11885-E22-2009-07 bestimmt. Pyren wurde gemäß ISO 18287:2006-05 aus Bodenextrakten (beschleunigte Lösungsmittelextraktion, Hexan/Aceton 1:1) mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert.

Mancozeb (analysiert von Erofins EAG Laboratories)

Rückstände von Mancozeb (oder anderen Substanzen die „Schwefelkohlenstoff“, CS₂, freisetzen) in der Bodenprobe wurden mittels heißem, saurem/reduktivem Aufschluss mit HCl/SnCl₂ in CS₂ überführt. Nach einer Flüssig/Flüssig-Verteilung in Isooktan wurden CS₂-Rückstände mittels GC-MS/MS quantifiziert. Der endgültige Bodenextrakt wurde auf CS₂ analysiert, indem mit der GC-MS/MS die Massenübergänge 76 m/z auf 44 m/z (Quantifizierung) und 76 m/z auf 32 m/z beobachtet wurde.

4 Projektergebnisse

4.1 Nematodescreening und Auswahl der Standorte

Die Abundanzen der Nematoden in den jeweiligen Böden variierten zwischen 375 (Moss) und 2240 Ind/30g Boden (KR; Abb. 6). Hinsichtlich der Abundanzen ist es also möglich, allen Böden für die Mikrokosmenexperimente zu verwenden, da genügend Nematoden zur Auswertung zu Verfügung stehen. Die Zahl der Taxa schwankt zwischen 24 und 40, was für eine relativ hohe Nematodendiversität in allen Böden spricht (Abb. 6). Der Maturity Index (MI) liegt 2.20 und 3.07, wobei vier der Böden einen MI von > 2.4 zeigen, was einer guten Ausgangssituation für die Mikrokosmenexperimente entspricht (Abb. 6).

Die Nematoden-Communities der sechs Standorte unterscheiden sich deutlich hinsichtlich der Zusammensetzung der Ernährungstypen: Vrede und Moss zeigen eine deutliche Dominanz der Bakterienfresser, unterschieden sich aber durch einen höheren Anteil an Räubern bei Moss. S und VÖ ähneln sich stark durch die Dominanz der Pflanzenfresser, während BW einen relativ hohen Anteil an omnivoren Nematoden aufweist (Abb. 7). Klassifiziert man die Nematodenfamilien gemäß Ferris et al. (2001) in funktionelle Gruppen, die sowohl die Ernährungs- sowie die Reproduktionsstrategie der Nematoden widerspiegeln, erhält man Informationen über den Gesundheitszustand, sowie über die vorherrschenden Abbaupfade des Bodens. Trägt man den Enrichment-Index gegen den Structure-Index auf, kann man ein Nematod fauna-Profil erstellen, das sich in 4 Quadranten aufteilen lässt (Abb. 8). Ein Boden, der sich in einem der Quadranten befindet lässt sich wie folgt beschreiben: (A): gestört; geringes C:N-Verhältnis; vorwiegend bakterieller Abbau; (B) geringe Störung; strukturiertes

Nahrungsnetz; Abbau durch Pilze und Bakterien; (C) ungestört; strukturiertes Nahrungsnetz; vorwiegend Abbau durch Pilze; (D) gestört; eingeschränktes Nahrungsnetz; vorwiegend Abbau durch Pilze. Abbildung 8 zeigt, dass die meisten Böden sich in den Quadranten B und C befinden, also als ungestörte Systeme zu bewerten sind. Nur VP muss als bereits gestörtes System eingeordnet werden. BW und Moss unterschieden sich von den anderen Böden vor allem durch das höhere Vorkommen an Pilzfressern.

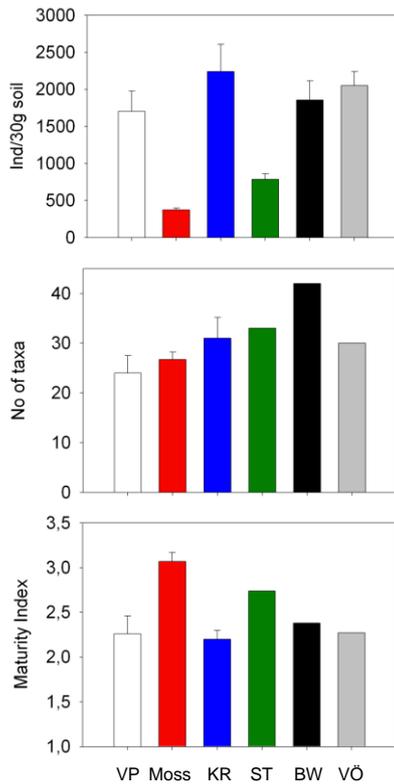


Abbildung 6: Abundanz (Individuen/30g Boden), Anzahl der bestimmten Nematodentaxa (n = 150), Maturity Index (n = 150 für VP, Moss, KR; n = 50 für ST, BW, VÖ) in Böden verschiedener Standorte, die für die Auswahl zur Verwendung in den Mikrokosmen-Experimenten als Kandidaten zur Verfügung standen; Abkürzungen: siehe Tab. 1; für ST, BW und VÖ wurden nur für 1 Replik 150 Nematoden bestimmt, weshalb hier die Fehlerbalken fehlen.

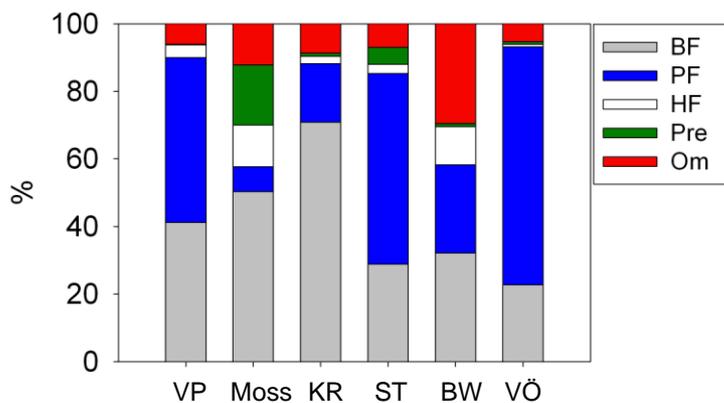


Abbildung 7: Zusammensetzung der verschiedenen Ernährungstypen (%); BF = Bakterienfresser; PF = Pflanzenfresser; HF = Pilzfresser; Pre = Räuber; Om = Omnivore; Abkürzungen: siehe Tab. 1

A

B

VP

Abbildung 8: Fauna-Profil nach Ferris et al. (2001); Enrichment-Index vs. Structure-Index für Nematoden-Communities aus Böden der sechs Standorte; Abkürzungen: siehe Tab. 1



Betrachtet man die Gattungszusammensetzung der Nematoden nach einer multivariaten Analyse (MDS), sieht man deutlich, dass sich die meisten Böden hinsichtlich der Nematoden-Community signifikant voneinander unterscheiden (SIMPROF: $p < 0.05$; Abb. 9). Nur BW und VÖ können nicht anhand Ihrer Nematodengattungszusammensetzung unterschieden werden ($p > 0.05$).

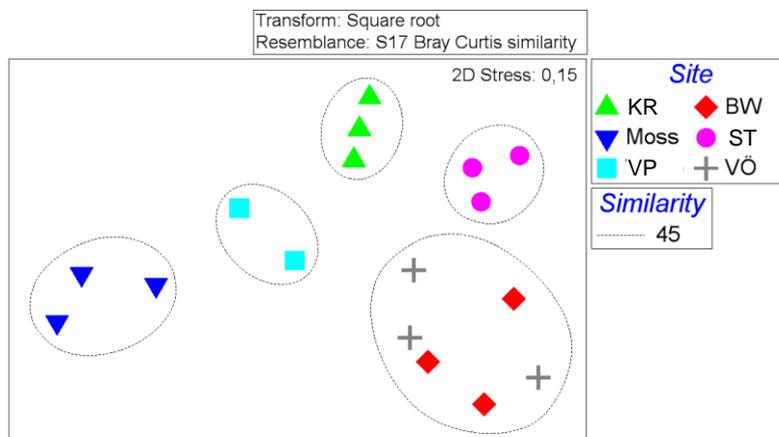


Abbildung 9: MDS-Plot (Multidimensional Scaling) basierend auf der relativen Zusammensetzung der Nematoden-gattungen in den Communities der sechs Standorte; die zusammenfassenden gestrichelten Kreise repräsentieren signifikant voneinander unterschiedliche Cluster (hierarchische Clusteranalyse mit statistischem Test: SIMPROF; $p < 0.05$); Abkürzungen: siehe Tab. 1.

Anhand der vorliegenden Informationen über die Böden und die darin lebenden Nematoden (Tab. 5), wurden 3 Böden für weitere Untersuchungen ausgewählt: Moss, BW, VP. S, KR und VÖ wurden für die weitere Verwendung ausgeschlossen. Bei S war der Boden dem des Standorts BW zu ähnlich. Als nicht-lehmiger Ackerboden ist der sandige Boden aus VP besser geeignet (höhere Bioverfügbarkeit der Schadstoffe), obwohl die Nematodenlebensgemeinschaft leicht gestört ist. Dies bietet außerdem die Möglichkeit, das Testsystem auch für bereits gestörte Bodensysteme zu prüfen.

Tabelle 5: Vergleich der Standorte anhand der Bodeneigenschaften und Nematoden-Communities.

Probestelle	Typ	Abund	Species	MI	gestört	Faunaprofil	Verwendung
Moss	Wiese (sandig)	375	27	3.1	nein	C	ja
VP	Acker (sandig)	>1000	24	2.2	leicht	D	ja
KR	Acker (schluffig)	>1000	31	2.3	nein	B	nein
ST	Acker (lehmig)	785	33	2.7	nein	B	nein
BW	Wiese (lehmig)	>1000	42	2.4	nein	C	ja
VÖ	Wiese (lehmig)	>1000	30	2.3	nein	B	nein

4.2 Toxizitätsscreening

In Tabelle 6 sind die Toxizitätsschwellenwerte für 13 Pestizide, einem polyzyklischen Aromaten (PAK: Pyren) und einem Metall (Zn) dargestellt, wie sie im Bodentoxizitätstest mit *C. elegans* ermittelt wurden. Es ist klar zu sehen, dass große Unterschiede in der Toxizität zu sehen sind. Vor allem die Herbizide zeigten so gut wie keine Wirkung auf *C. elegans*, während die Fungizide, bis auf Carbendazim ($EC_{50_{\text{Reproduktion}}}$: 10.6 mg/kg TG) eine relativ einheitliche Toxizität zeigten ($EC_{50_{\text{Reproduktion}}}$: 127 – 315 mg/kg TG). Insektizide zeigten eine große Bandbreite (Tab. 6). Das Nematizid Dazomet zählt erwartungsgemäß zu den toxischsten Substanzen (Tab. 6).

Vergleicht man die Sensitivität von *C. elegans* (ISO 10872:2020) für die untersuchten Pestizide bzw. Chemikalien mit anderen Testorganismen, sie routinemäßig zur Risikobewertung von Pestiziden herangezogen werden (Regenwürmer: *Eisenia fetida* (OECD Nr. 222); Collembolen: *Folsomia candida* (OECD Nr. 232); Milben: *Hypoaspis aculeifer* (OECD Nr. 226)), kann man erkennen, dass *C. elegans* zwar bei den Fungiziden weniger empfindlich ist als *E. fetida*, aber durchaus im Bereich von *F. candida* und *H. aculeifer* (Abb. 10A). Für Herbizide waren die Nematoden durchwegs weniger empfindlich als die anderen Testorganismen (Abb. 10B). Obwohl bei Insektiziden der Sensitivitätsbereich von *C. elegans* sehr groß ist, kann man sehen, dass, ähnlich wie bei den Fungiziden, *C. elegans* weniger empfindlich war als *E. fetida*, aber durchaus vergleichbar mit *F. candida* und *H. aculeifer* (Abb. 10C). Auch für die Umweltchemikalien Zn und Pyren scheinen die Nematoden ähnlich empfindlich zu sein wie die Regenwürmer und Collembolen (Abb. 10D).

Tabelle 6: Toxizität von Pestiziden und anderen Schadstoffen auf *Caenorhabditis elegans* in dotiertem Boden; nominelle Konzentrationen in mg/kg Trockengewicht (TG)

Chem. Substanz	Wachstum			Reproduktion		
	NOEC	EC10	EC50	NOEC	EC10	EC50
	mg/kg TG			mg/kg TG		
Fungizid						
Carbendazim	6.3	5.7	26	3.1	4.6	10.6
Fluazinam	60	97	268	102	80	142
Folpet	250	188	442	125	40	164
Fludioxonil	n.b.	n.b.	n.b.	63	30	219
Mancozeb	246	284	393	60	55	127
Tebuconazole	62.5	251	>1000	125	181	315
Insektizid						
Acetamiprid	250	649	>1000	500	580	927
Insectizid X	7.4	8.1	11.1	3.7	3.3	4.6
Cypermethrin	≥1000	>1000	>1000	≥1000	>1000	>1000
Herbizid						
Diflufenican	≥1000	>1000	>1000	≥1000	>1000	>1000
Ethofumesat	100	906	>1000	10	22	297
Glyphosate	500	>1000	>1000	500	~500	~1000
Metsulfuron-Methyl	≥1000		>1000	≥1000		>1000
Nematizid						
Dazomet	25	24	47	12.5	23	25
PAK						
Pyren	123	156	226	48	51	112
Metall						
Zn	330	256	542	195	187	322

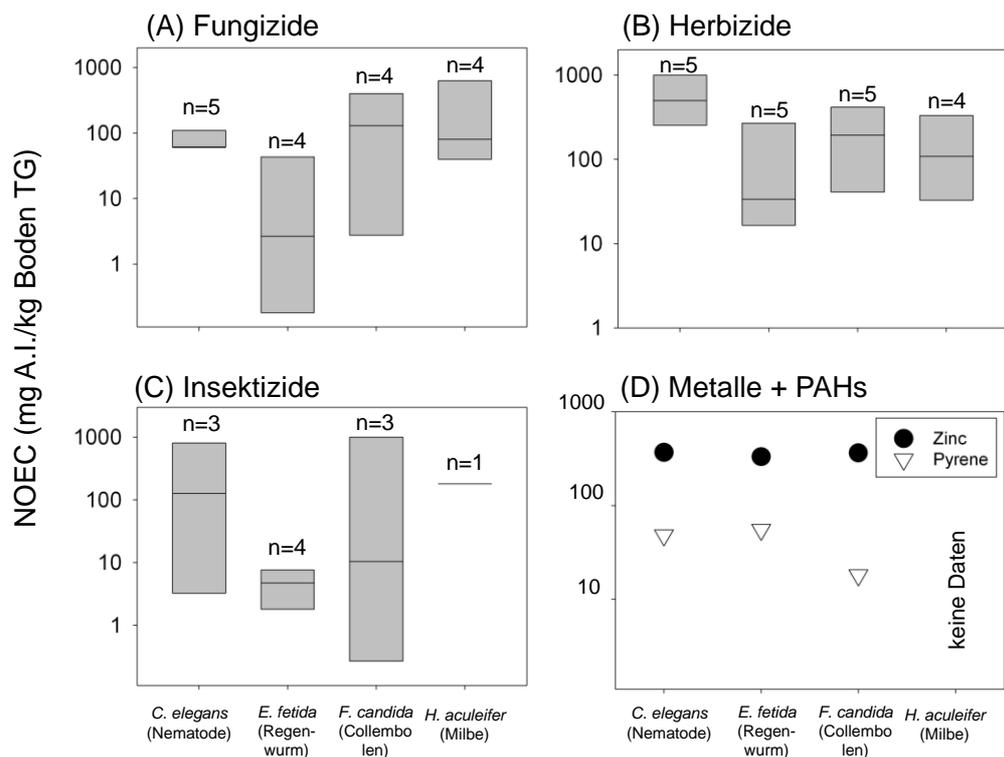


Abbildung 10: Vergleich von NOEC-Bereichen (als mg Active Ingredient/kg Boden TG) für verschiedene Pestizide (A: Fungizide; B: Herbizide; C: Insektizide) bzw. Umweltchemikalien (D) zwischen *C. elegans* und Standardtestorganismen, die für Risikobewertung von Pestiziden herangezogen werden (*Eisenia fetida*, *Folsomia candida*, *Hypoaspis aculeifer*); Boxen = 25-75% Perzentile mit Median (n ist jeweils angegeben); die Daten

stammen von aktuellen, öffentlich verfügbaren EU Dokumenten (empfindlichster Endpunkt für die jeweilige Art).

4.3 Methodische Aspekte

4.3.1 Abhängigkeit der Resultate von der Anzahl der bestimmten Nematoden

Die Ergebnisse zeigen, dass, bis auf den Parameter „Anzahl Taxa“, sich der Wert der Indices (gezeigt am Beispiel für % Bakterienfresser, Maturity Index, Structure-Index), ab eine Anzahl von 50 Nematoden nicht mehr verändert (Abb. 11 für KR; Abb. 12 für VP). Das gleiche lässt sich auch für die multivariate Analyse der Gattungszusammensetzung sagen (Abb. 13). Im MDS-Plot kann man sehen, dass ab einer Anzahl von 40-60 Nematoden es keine signifikanten Unterschiede mehr gibt.

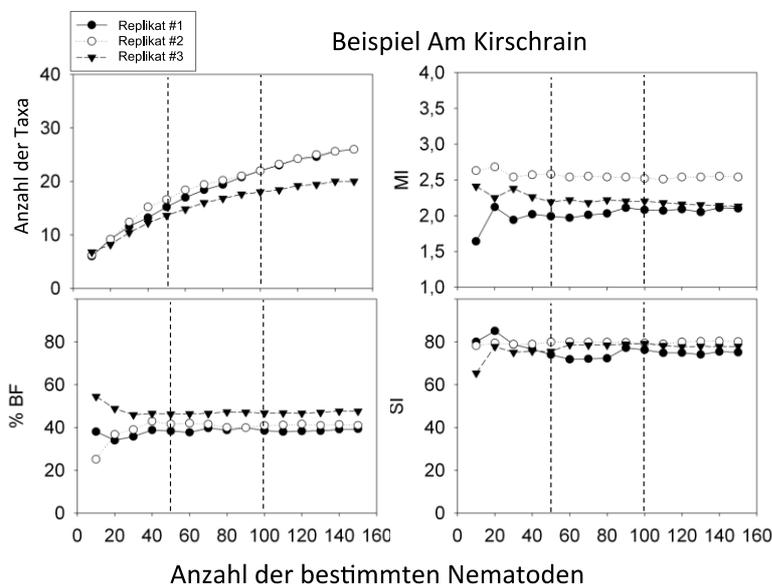


Abbildung 11: Verschiedene Indices zur Beschreibung der Nematoden-Communities im KR-Boden berechnet auf Basis einer ansteigenden Anzahl an bestimmten Individuen; MI = Maturity Index; BF = Bakterienfresser; SI = Structure Index.

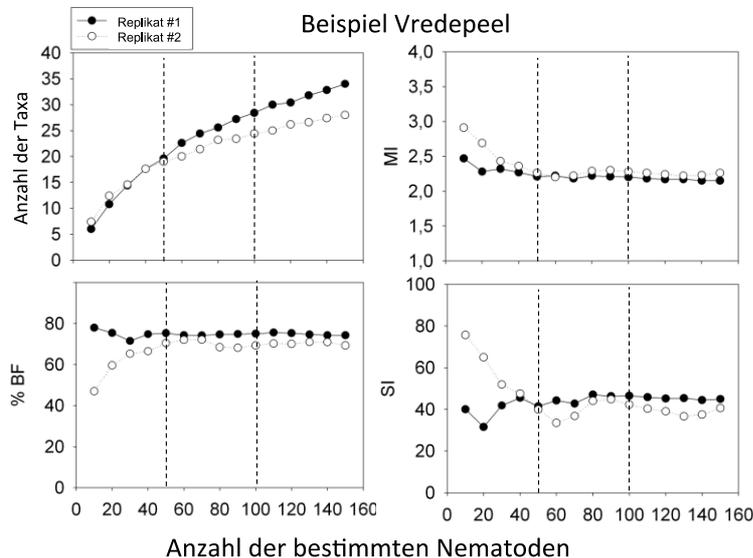


Abbildung 12: Verschiedene Indices zur Beschreibung der Nematoden-Communities im VP-Boden berechnet auf Basis einer ansteigenden Anzahl an bestimmten Individuen; MI = Maturity Index; BF = Bakterienfresser; SI = Structure Index.

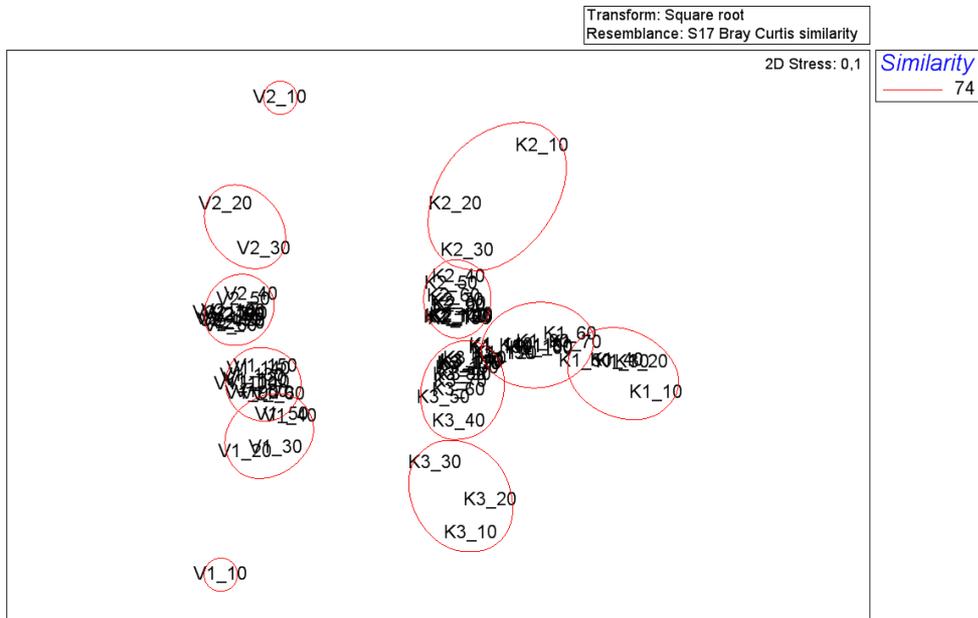


Abbildung 13: MDS-Plot auf Basis der Gattungszusammensetzung in Boden-Replikaten zwei verschiedener Bodentypen (V = Vreedepeel; K = Kirschrain); die MDS-Analyse wurde mit einer aufsteigenden Anzahl an bestimmten Nematoden durchgeführt (z.B. V1_10 = Vreedepeel Replik 1 auf Basis von 10 bestimmten Nematoden; V1_150 = Vreedepeel Replik 1 auf Basis von 150 bestimmten Nematoden); rote Kreise = signifikant unterschiedliche Cluster (hierarchische Clusteranalyse mit statistischem Test: SIMPROF; $p < 0.05$).

Für die annäherungsweise genaue Bestimmung der Anzahl der Taxa (hier Gattungen) müssten > 150 Individuen bestimmt werden. Die stufenweise Analyse mit 450 bestimmten Nematoden hat ergeben, dass man mindestens 250 Nematoden analysieren muss, um die tatsächliche Anzahl der Taxa in der Bodenprobe abschätzen zu können. Dies ist allerdings aus Zeit- und Kostengründen für Mikrokosmenstudie nicht machbar. Hier kann aber mit anerkannten statistischen Methoden die Anzahl der Taxa auf eine ausreichende Stichprobenzahl hochgerechnet (extrapoliert) werden (Hill Numbers; Hsieh et al., 2016). Für alle anderen Indices ist es ausreichend 50 Nematoden für die Analyse heranzuziehen, um vergleichbare und zuverlässige Ergebnisse zu bekommen.

4.3.2 Vergleich mikroskopische und DNA-basierte Community-Analyse

Vergleicht man die Abundanzen (mg/30g Boden), die zum einen durch Zählen unter dem Mikroskop, zum anderen durch Quantifizieren nematoden-spezifischer DNA ermittelt wurden, erhält man eine gute Korrelation der beiden Methoden (siehe Abb. 14: schwarze Symbole). Die Korrelation ist signifikant und die Vorhersagbarkeit des linearen Modells ist ausreichend gut ($r^2 = 0,70$), mit einer Steigung nahe 1 (1,15).

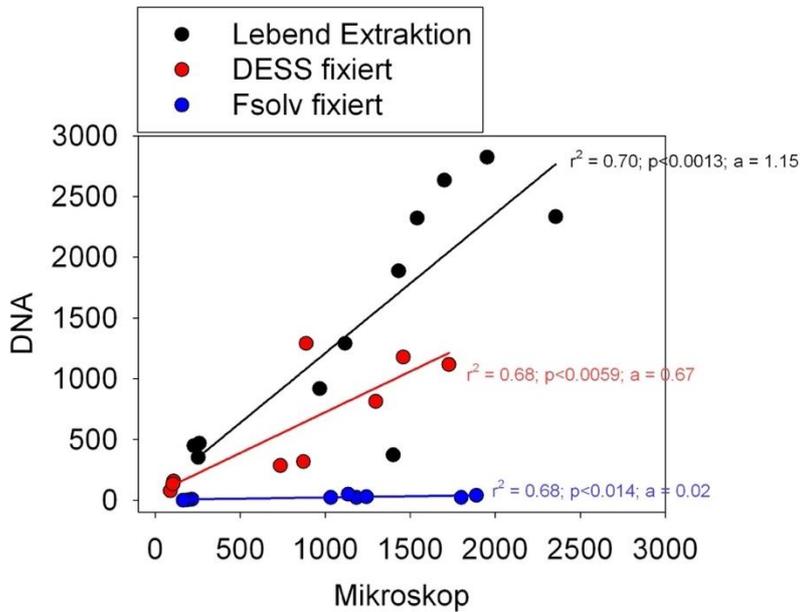


Abbildung 14: Korrelation der Nematodenabundanz (Ind/30g Boden) ermittelt durch Zählung unter dem Stereo-Mikroskop und durch DNA-basierte Analyse. Die Bodenproben waren (1) nicht fixiert (Lebendextraktion; schwarze Symbole), mit DESS fixiert (rote Symbole) und mit F-Solv fixiert (blaue Symbole).

Vergleicht man die beiden Methoden zur Community-Analyse hinsichtlich einiger Indices zur Beschreibung der Nematoden-Communities, fällt auf, dass vor allem die Anzahl der detektierten Taxa (unabhängig von deren Abundanz) bei der DNA-basierten Methoden deutlich geringer ausfällt und auch hinsichtlich des Rankings der Bodenproben zu anderen Ergebnissen kommt (Abb. 15B). Und dies, obwohl bei der DNA-Analyse deutlich mehr Nematoden zur Verfügung standen (230-2350 Individuen). Auch bei der Zusammensetzung der Ernährungstypen, kommt die DNA-basierte Community-Analyse zu anderen Ergebnissen als die morphologische Bestimmung (Abb. 15C). Die Ergebnisse zu Maturity Index, Enrichment Index und Structure Index sind allerdings gut vergleichbar (Abb. 15A und D). Man muss allerdings die Berechnung der Indices, die auf relativen Abundanzen beruhen, auf Basis der DNA-basierten Daten mit Vorsicht betrachten, da dort nur die Taxa gefunden werden, die mit den qPCR-Assays gezielt analysiert werden. Die gute Übereinstimmung mit den Indices auf Basis der morphologisch bestimmten Taxa, ist ein Indiz, dass die verwendeten qPCR-Assays tatsächlich die dominanten Gattungen getroffen haben.

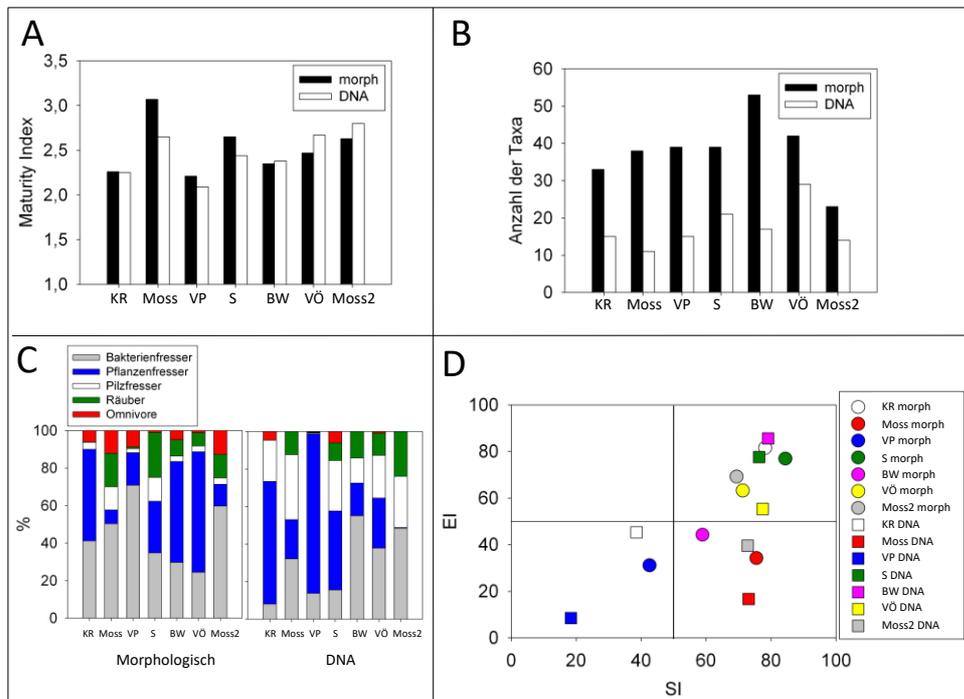


Abbildung 15: Vergleich der zwei taxonomischen Methoden (morphologisch, DNA-basiert) zur Bestimmung der Nematoden hinsichtlich von Indices zur Beschreibung der Nematoden-Communities; (A) Anzahl der Taxa, (B) Anteil der verschiedenen Ernährungstypen; (C) Maturity Index; (D) Fauna-Profil nach Ferris et al. (2001).

4.3.3 Vergleich der Fixierungsmethoden

In Abbildung 16 ist zu sehen, dass die Abundanz der Nematoden im unfixierten Boden am höchsten ist, gefolgt vom DESS-fixierten und F-solv-fixierten Boden. Dieser Trend ist für alle drei untersuchten Böden zu sehen. Dies weist darauf hin, dass die Nematoden durch DESS und F-solv nicht gut genug fixiert waren. Außerdem waren auch die Nematoden, die in DESS und F-solv noch zu finden waren, schwieriger taxonomisch zu bestimmen, da die inneren Strukturen nicht mehr gut zu erkennen waren (Abb. 17). Für die DNA-basierte Analyse waren die beiden Fixierungsmethoden (DESS, F-solv) ebenfalls nicht geeignet (siehe Abb. 14). Nach F-solv-Fixierung waren dramatisch niedrigere DNA-Ausbeuten zu verzeichnen (blaue Symbole in Abb. 14), was darauf hinweist, dass auch F-solv eine DNA-schädigende Wirkung hatte. Aber auch nach DESS-Fixierung, das laut Literatur (Yoder et al., 2006) DNA-schonend ist, waren war wesentlich weniger Nematoden-DNA vorhanden als in den lebend-extrahierten Bodenproben.

Die Ergebnisse zeigen also, dass es mit den hier getesteten Fixativen nicht empfehlenswert ist, die Bodenproben des Mikrokosmenversuchs zu fixieren. Die Proben sollten also nach der Probenahme möglichst zeitnah (max. 2 Tage Lagerung im Kühlschrank) lebend extrahiert werden. Danach kann die Probe geteilt werden und je nach taxonomischer Methode fixiert werden: Morphologische Taxonomie: 4% Formaldehyd; DNA-basierte Taxonomie: einfrieren bei -20 °C oder mit reinem Ethanol.

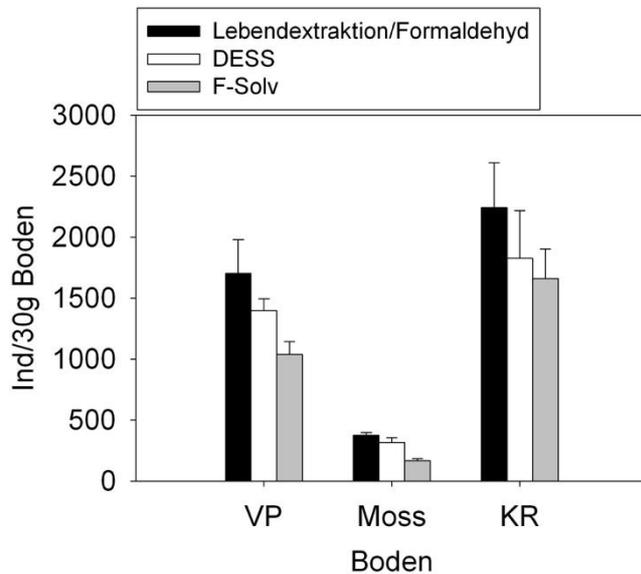


Abbildung 16: Abundanz der Nematoden (Individuen/30g Boden) in nicht-fixiertem Boden (Lebendextraktion; nach Extraktion wurden die Nematoden für die morpholog. Analyse mit Formaldehyd fixiert), in DESS fixiertem Boden und in F-Solv fixiertem Boden.

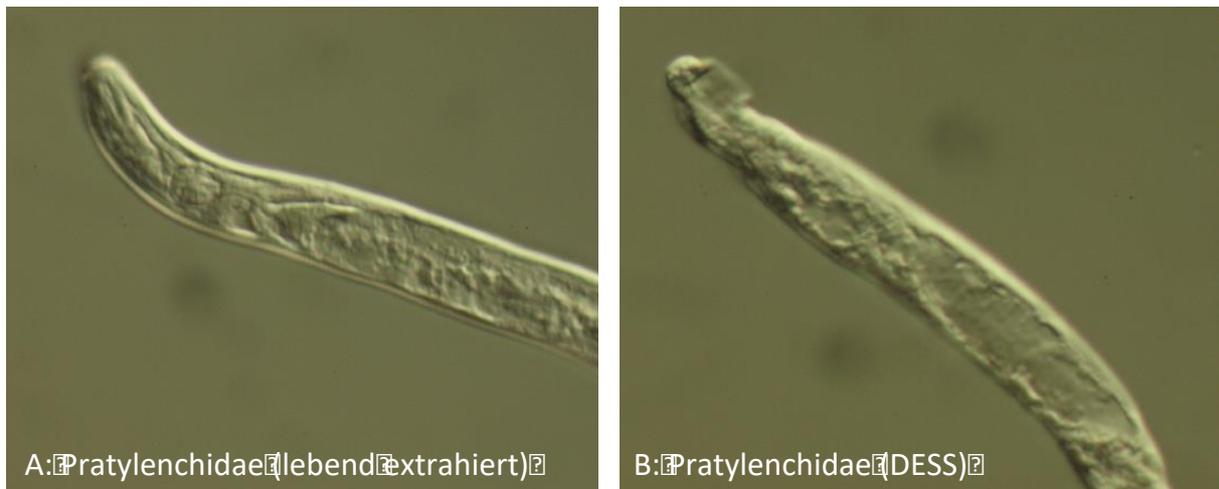


Abbildung 17: Fotos von Individuen der Familie Pratylenchidae, extrahiert aus unfixiertem (A) und DESS-fixiertem Boden (B).

4.3.4 Verbesserung der Nematodenextraktion für die molekulare Taxonomie

- a. **Baermann-Trichter:** Insgesamt wurden 624 bzw. 608 Nematoden aus dem lebenden bzw. fixierten Boden mit Ludox extrahiert. Durch die Baermann-Filtration konnte das meiste organische Material zurückgehalten werden. Die Negativkontrolle mit toten Nematoden zeigte, dass nur ein sehr geringer Anteil der toten Nematoden durch den Baermann-Trichter gelangte (11 Nematoden; <2%). Allerdings konnten auch nur 29 bzw. 31% der der lebenden Nematoden den Baermann-Trichter passieren (nach 48 bzw. 96h Filtration; 175 bzw. 190 Ne-

matoden; siehe Abb. 18). Dies ist kein zufriedenstellendes Ergebnis, weshalb die Baermann-Trichter-Methode zur Reinigung der Ludox-Extrakte verworfen wurde.

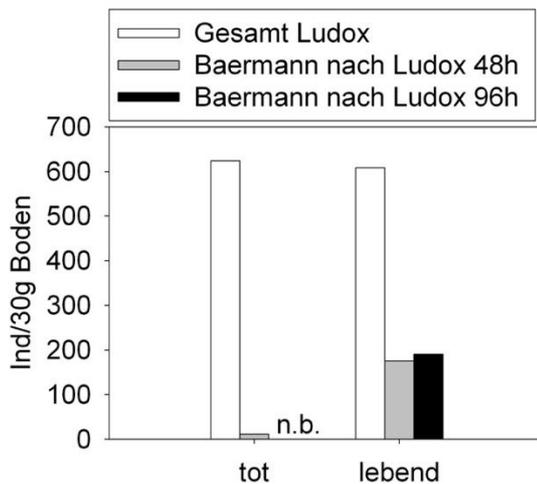


Abbildung 18: Überprüfung der Baermann-Trichter-Filtration als Methode zur Reinigung von Ludox-Extrakten unter Berücksichtigung der extrahierten Nematoden

- b. **Ludox-Extraktion:** Bei der geringsten Ludox-Dichte (1,12 g/ml) wurde am wenigsten organisches Material aus dem Boden mit den Nematoden mitextrahiert. Bei dieser Ludox-Dichte war auch die Nematoden-Extraktion am erfolgreichsten (siehe Abb. 19). Weiterhin stellte sich heraus, dass beim dritten Ludoxschritt nur noch 7-13% der extrahierten Nematoden gefunden werden. Da bei diesem Schritt aber kaum noch organisches Material mitextrahiert wurde, würde der Verzicht auf den 3. Ludox-Schritt kaum zur Reinigung des Extrakts beitragen. Es wurde daher festgelegt, die Extraktion weiterhin in 3 Schritten bei einer Ludox-Dichte von 1.12 g/ml durchzuführen.

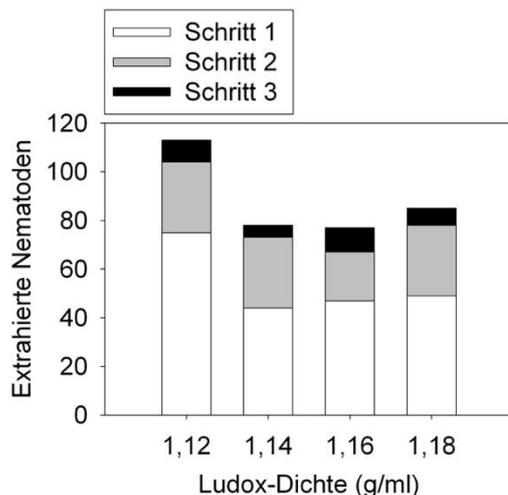


Abbildung 19: Variation der Anzahl extrahierter Nematoden aus DeMossel-Boden mit der Dichte des zur Extraktion verwendeten Ludox-Suspension.

- c. **Entfernung von organischem Material >1mm und einer Dichte von < 1 g/ml:** Weder durch die Filtration durch einen 1mm-Sieb noch durch die Beseitigung der aufschwimmenden Schicht von leichtem organischem Material (Dichte < 1 g/ml), ergaben sich nennenswerte Verluste an Nematoden (Abb. 20). Diese Schritte zur Reinigung der Ludoxextrakte sollten vorgenommen werden.

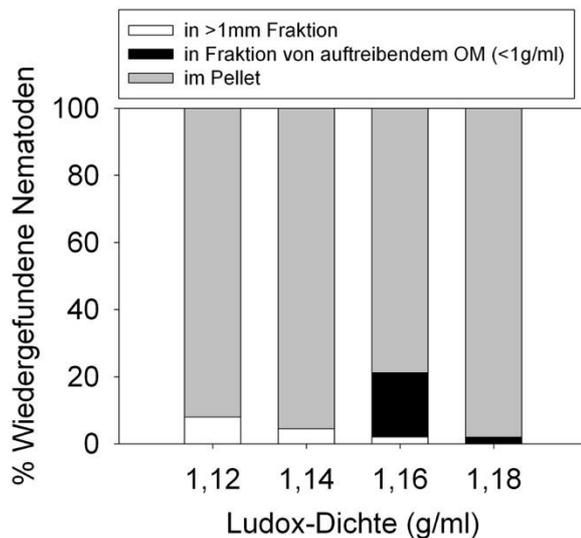


Abbildung 20: Anteil der wiedergefundenen Nematoden in verschiedenen Fraktionen von organischem Material.

4.3.5 Versuchsbedingungen (Feuchtigkeit, Temperatur)

In Abbildung 21 wird gezeigt, dass die gewünschten Gradienten von Temperatur und Feuchtigkeit in den Inkubationsräumen tatsächlich während des Experiments gegeben waren. In den 20 °C Behandlungen (Testgefäße ohne Deckel) schwankte die Temperatur zwischen 18,6 und 20,3 °C ($19,6 \pm 0,4$ °C) und die Feuchtigkeit zwischen 92 und 99% ($97,7 \pm 2,5$ %). Bei den 15 °C Behandlungen (Testgefäße ohne Deckel) schwankte die Temperatur zwischen 15,0 und 17,1 °C ($15,7 \pm 0,5$ °C) und die Feuchtigkeit zwischen 77 und 99% ($87,1 \pm 7,2$ %). Bei der niedrigeren Temperatur konnte die Feuchtigkeit also nicht konstant in der Sättigung gehalten werden. In den unbefeuchteten Inkubatoren (Testgefäße mit Deckel mit kleinem Loch) war die Temperatur sehr konstant (zwischen 14,5 und 14,9 °C ; $14,7 \pm 0,1$ °C) und die Feuchtigkeit schwankte zwischen 35 und 51 % ($44,2 \pm 3,7$).

Die Bedingungen hatten zur Folge, dass in den offenen Testgefäßen der Boden austrocknete, sobald die Luftfeuchtigkeit nicht immer gegeben war (bei 15°C; Abb. 21C). Bei 20°C (offene Gefäße) fand in den ersten 2 Wochen eine geringfügige Austrocknung des Bodens statt, blieb aber dann ziemlich konstant. Am konstantesten war die Bodenfeuchte in den geschlossenen Testgefäßen bei 15 °C (Abb. 21C). Die Nematodendichten waren in allen Behandlung ziemlich konstant (Abb. 22A). Nur im Boden der ausgetrocknet ist (15°C; offene Gefäße) war eine leichte Abnahme der Nematodendichte zu beobachten. Die Diversität, der Maturity Index, sowie die Verteilung der Ernährungstypen zeigten keinen Behandlungseffekt (Abb. 22B-D) Dadurch konnte gezeigt werden, dass weder Temperatur noch Gasaustausch (offene vs. geschlossene Gefäße), sondern nur die Abnahme der Bodenfeuchte die Nematodendichte in den Mikrokosmen beeinflusst. Für alle weiteren Versuche wurde daher das System mit geschlossenen Gefäßen zur Vermeidung des Feuchtigkeitsverlusts beibehalten.

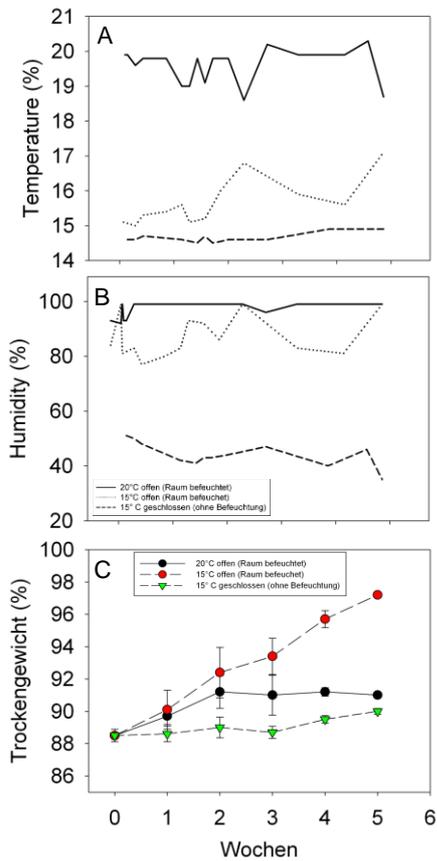


Abbildung 21: Verschiedene Parameter gemessen in Mikrokosmen mit Moss-Boden die unter unterschiedlichen Bedingungen inkubiert waren: (1) Offene Gefäße in befeuchtetem Inkubationsraum bei 20°C (durchgezogene Linie bei A/B; schwarze Symbole bei C); (2) Offene Gefäße in befeuchtetem Inkubationsraum bei 15°C (gepunktete Linie bei A/B; rote Symbole bei C); (3) Geschlossene Gefäße ohne Befeuchtung bei 15°C (gestrichelte Linie bei A/B; grüne Symbole bei C); (A) Gemessene Temperatur im Inkubationsraum; (B) Gemessene Feuchtigkeit im Inkubationsraum; (C) Trockengewicht (%) des Bodens in den Mikrokosmen.

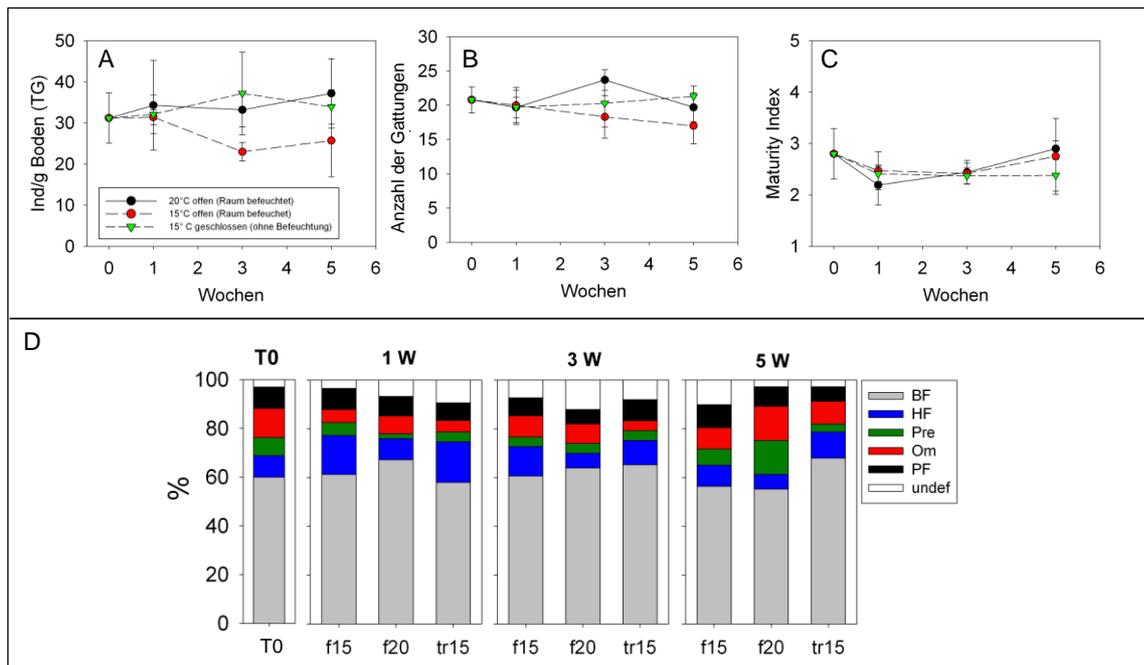


Abbildung 22: Verschiedene Parameter/Indices für die Nematoden-Communities in Mikrokosmen mit Moss-Boden die unter unterschiedlichen Bedingungen inkubiert waren: (1) Offene Gefäße in befeuchtetem Inkubationsraum bei 20°C (f20; schwarze Symbole bei A-C); (2) Offene Gefäße in befeuchtetem Inkubationsraum bei 15°C (f15; rote Symbole bei A-C); (3) Geschlossene Gefäße ohne Befeuchtung bei 15°C (tr15; grüne Symbole bei A-C); (A) mittlere Individuenzahl pro g Boden; (B) mittlere Anzahl der Gattungen pro Mikrokosmos; (C) Maturity Index; (D) Anteil der verschiedenen Ernährungstypen.

4.4 Pilotstudie Mikrokosmen mit dem Fungizid Fludioxonil (FDO)

4.4.1 Expositionskonzentrationen von FDO

Für dieses Mikrokosmen-Experiment wurden von der Universität Wageningen (Ivo Roessink) im Rahmen einer aquatischen Studie die FDO-Konzentrationen im Boden (Boden-Toxizitätstest und Mikrokosmen), im Porenwasser (Boden-Toxizitätstest) und im Wasser (Wasser-Toxizitätstest) analysiert. Die Konzentrationswerte sind in Tabelle 7 zu finden. Man kann sehen, dass trotz der Anwesenheit eines Lösungsvermittlers (Aceton), die Löslichkeitsgrenze (1,8 mg/L) nur geringfügig überschritten wurde (maximal 4.6 mg/L). Statt einem nominellen Konzentrationsbereich von 0,1 bis 40 mg/L war *C. elegans* Konzentrationen von 0.02 bis 4.6 mg/L exponiert. Dies macht natürlich einen großen Unterschied bei der Ermittlung der Toxizität aus. Außerdem fällt auf, dass die Konzentration im Porenwasser auf Grund der starken Bindung an den Boden um einen Faktor 60 bis 280 geringer ausfällt als im Gesamtboden.

Tabelle 7: Nominelle und gemessene Konzentrationen von FDO in Boden, Wasser und Porenwasser in verschiedenen Testsystemen (ISO 10872 = Toxizitätstest mit *C. elegans*; Mikrokosmen)

	Wasser ISO 10872		Boden ISO 10872			Mikrokosmen		
	mg/L		mg/kg dw		mg/L	mg/kg		
	nominell	gemessen	nominell	gemessen	PW	nominell	28T	56T
FDO1	0,08	0,02	50	63,0	1,05	75	53,8	62,4
FDO2	0,16	0,07	85	53,7	0,95	150	126,1	131,1
FDO3	0,31	0,18	114,5	104,4	0,94	300	263,3	255,3
FDO4	0,63	0,37	245,7	214,0	1,54	600	477,5	475,2
FDO5	1,25	0,48	417,6	332,0	1,86			
FDO6	2,5	1,35	709,9	537,1	2,01			
FDO7	5	2,07	1206,9	980,8	3,55			
FDO8	10	3,47						
FDO9	20	4,25						
FDO10	40	4,62						

4.4.2 Toxizität von FDO auf *C. elegans* (siehe auch Höss et al., 2020 und Haegerbaeumer et al., 2019)

Die Dosis-Wirkungskurven für die Toxizität von FDO auf die Reproduktion von *C. elegans* sind in Abb. 23 dargestellt. Daraus ergeben sich folgenden Toxizitätsschwellenwerte: Für die Exposition im Wasser bzw. im Boden ergeben sich EC50-Werte von 2.20 mg/L bzw. 219 mg/kg TG. Berechnet man den EC50-Wert der Bodenexposition auf Basis der Porenwasserkonzentration, ergibt sich ein Wert von 1.6 mg/L, was ziemlich genau dem Wert der Wassereexposition entspricht. Man kann also davon ausgehen, dass auch im Boden die Nematoden vor allem dem gelösten Anteil an FDO im Porenwasser exponiert sind. Für den Boden ergibt sich ein NOEC (No Observed Effect Concentration) von 104 mg/Kg TG. Diese Werte (NOEC, EC50) wurden als Basis für die Auswahl der Konzentrationsreihe in den Mikrokosmen genommen: 75, 150, 300 und 600 mg/Kg, wobei unterhalb von 100 mg/Kg kein Effekt und oberhalb von 300 mg/kg ein deutlicher Effekt auf die Nematoden-Community im Boden erwartet wurde.

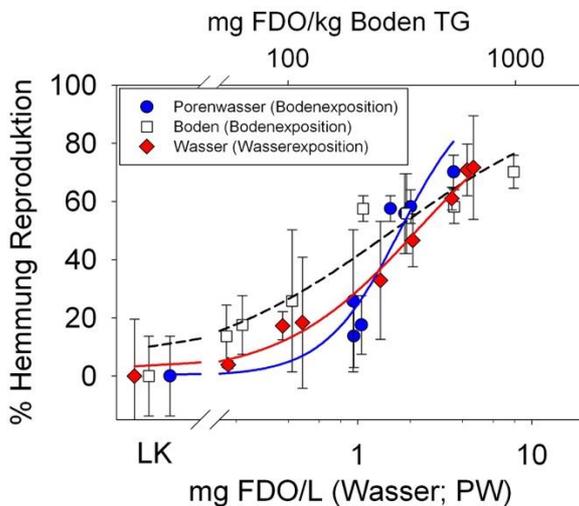


Abbildung 23: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für die Toxizität von FDO auf die Reproduktion von *C. elegans* im Toxizitätstests nach ISO 10872 nach 96h Exposition in Wasser und Boden.

4.4.3 Wirkung von FDO auf Nematoden-Communities in Mikrokosmen (siehe auch Haegerbaeumer et al., 2019)

Eine 2-way ANOVA zeigt, dass die Abundanz der Nematoden in der höchsten FDO-Konzentration (FDO 4) über die Zeit signifikant geringer war als in der Kontrolle (conc*time: $p < 0,05$, $F = 4,99$; post-hoc Games-Howell: $p = 0,006$). Betrachtet man die Abundanz über den Zeitverlauf, sieht man, dass in der Kontrolle die Abundanz ziemlich konstant blieb (Abb. 24A). In FDO3 nimmt die Abundanz in den ersten 28 Tagen ab, erholt sich dann aber nach 56 Tagen wieder auf Kontrollniveau. Nur in FDO4 kann man einen dauerhaften Einbruch der Abundanz über 56 Tage beobachten. Viele der anderen Indices (MI2-5, Anteil cp2-Nematoden, EI) zeigen augenscheinlich eine FDO-induzierte Veränderung im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 24 B-D). Bei EI (Enrichment-Index) sind die Unterschiede in den Behandlungen FDO2 bis FDO4 zur Kontrolle aber signifikant und zwar unabhängig vom Zeitpunkt (2-way ANOVA: conc: $p < 0,05$, $F = 8,161$; conc*time: $p > 0,05$, $F = 1,318$; posthoc Dunnett: FDO2-FDO4, $p < 0,05$). Der MI2-5 (Maturity Index ohne Berücksichtigung der cp-1 Nematoden) war nach 56 Tagen sogar schon in FDO1 signifikant niedriger als in der Kontrolle (2-way ANOVA: $p < 0,05$, $F = 3,52$; post-hoc Bonferroni). Die fehlende Signifikanz bei den Unterschieden der anderen Indices ist wahrscheinlich auf die geringe Replikatzahl ($n=3$) zurückzuführen.

Betrachtet man die Gattungszusammensetzung der Nematoden-Communities in den Mikrokosmen mit einer multivariaten Methode (Principle-Response-Curves, PRCs), kann man sehen, dass FDO durchaus einen Effekt über die Zeit hat, und zwar in den Behandlungen FDO2 bis FDO5 (Abb. 25). Aber auch hier gibt es keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle ($p > 0,05$, Monte-Carlo Permutationstest). Auch hier ist die fehlende Signifikanz bei den Unterschieden der anderen Indices ist wahrscheinlich auf die geringe Replikatzahl ($n=3$) zurückzuführen.

Nimmt man den empfindlichsten Parameter (MI2-5), lässt sich ein $NOEC_{Community}$ von 14,3 mg/kg Boden TG ermitteln (auf Basis der gemittelten gemessenen Bodenkonzentrationen über die zwei Zeitpunkte). Dieser Wert ist deutlich niedriger als der NOEC der mit dem Bodentoxizitätstest mit *C. elegans* (ISO 10872) ermittelt wurde (104 mg/kg Boden TG).

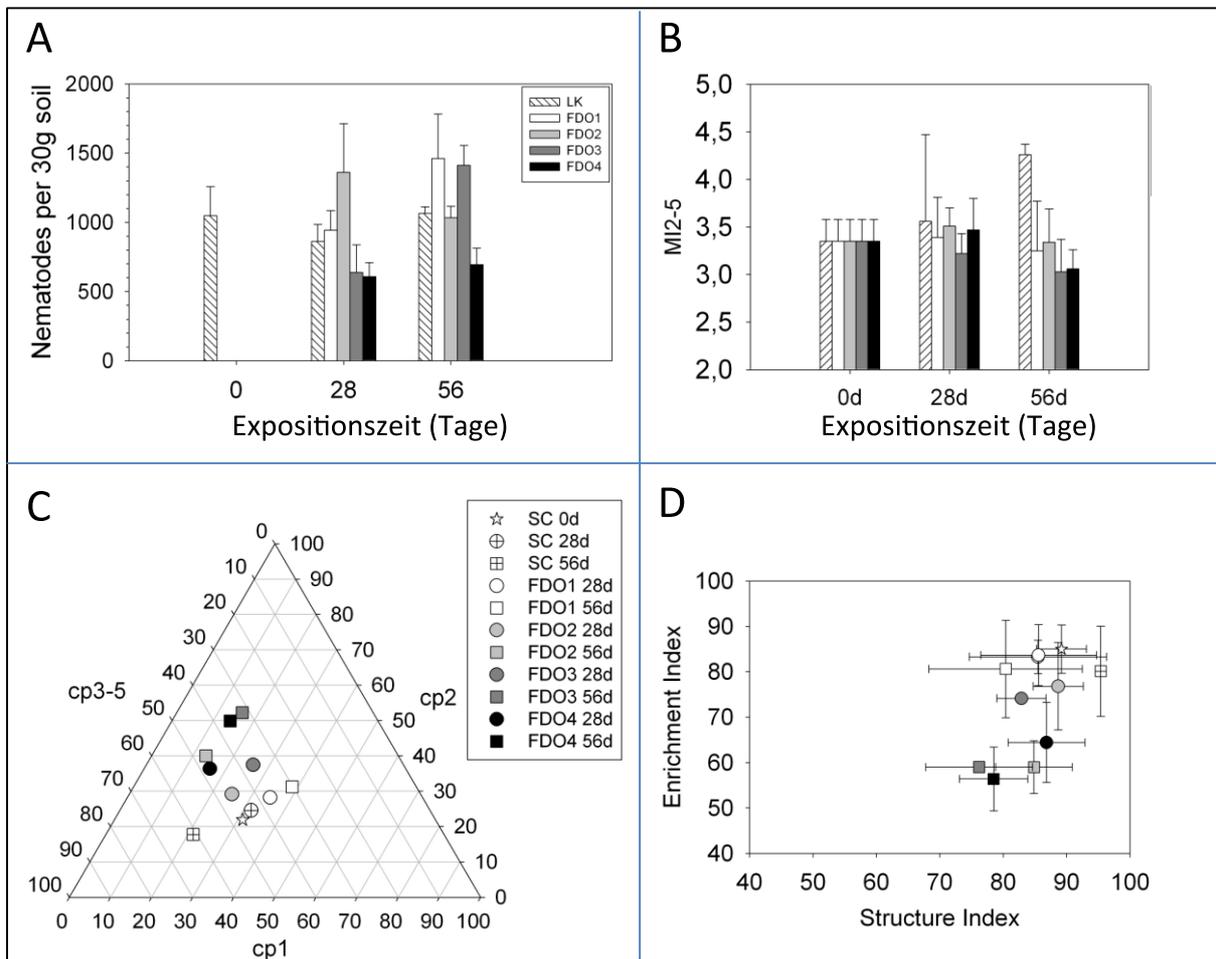


Abbildung 24: Indices, die die Nematoden-Communities in FDO-dotierten Mikrokosmen nach 0, 28 und 56 Tagen Exposition beschreiben: (A) Abundanz

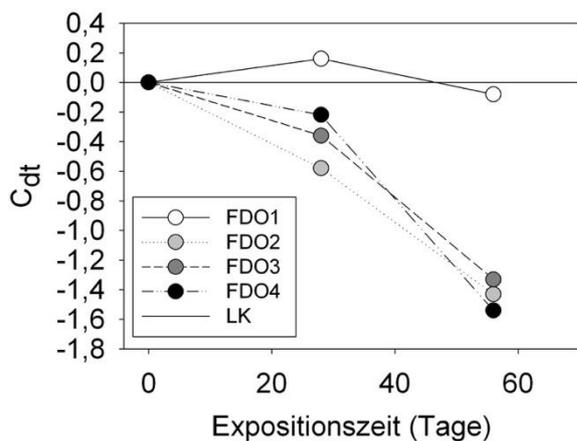


Abbildung 25: Principle-Response-Kurven (multivariate Darstellung der Nematodengattungszusammensetzung über die Zeit); je weiter sich ein Punkt von der Lösungsmittelkontrolle (LK; waagrechter Strich bei „0“) entfernt, desto unterschiedlicher ist die Gattungszusammensetzung von der der Kontrolle (Summe der Eigenwerte: 0,319; erste Achse erklärt 25,4% der Varianz).

4.5 Wirkung verschiedener Schadstoffe auf Nematoden-Communities in unterschiedlichen Bodentypen

Der Pilotversuch mit dem Fungizid Fludioxonil zeigte, dass die kleinräumigen Mikrokosmen gut zur Risikobewertung von Pestiziden verwendet werden können und dass die native Nematoden-Community empfindlicher reagiert als der Single-Species Test mit *C. elegans*. Die Ergebnisse dieses

Pilotversuchs bestätigten die prinzipielle Eignung der 2014 publizierten Methode (Höss et al., 2014) als Grundlage für die Planung der Hauptversuche dieses Projekts.

Für die eigentlichen Fragestellungen des Projekts wurden 3 Versuche in den Jahren 2018, 2019 und 2020 durchgeführt (siehe Tab. 4). Darin wurde die Wirkung vier verschiedener Chemikalien (Zn, Pyren, Carbendazim, Mancozeb) auf native Nematoden-Communities in drei verschiedenen Bodentypen untersucht.

4.5.1 Startbedingungen in den verschiedenen Böden

Betrachtet man die Struktur der Nematoden-Communities in den verschiedenen Böden zu Beginn der jeweiligen Versuche, kann man deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Böden erkennen. Am deutlichsten ist dies bei der Gattungszusammensetzung zu sehen (Abb. 26A). Die multivariate Darstellung zeigt, dass die Datenpunkte der drei Böden sich klar voneinander absetzen (die Kreise markieren signifikant voneinander trennbare Cluster: SimProf-Test: $p < 0.05$ bei 40% Ähnlichkeit). Die Analyse zeigt allerdings auch, dass innerhalb der Moss-Clusters, sich die Communities der beiden Versuche (V2: Probe Juli 2018; V4: Probe Februar 2020) signifikant voneinander unterscheiden (SimProf-Test: $p < 0.05$ bei 45% Ähnlichkeit). Hinsichtlich der Zusammensetzung der funktionellen Gruppen bei den Nematoden (Nematoden-Faunaprofil; Abb. 26B) sind die Unterschiede nicht so groß. Moss und BW beherbergen ungestörte Nematoden-Communities, was daran zu erkennen ist, dass die Datenpunkte sich im rechten, unteren Quadrat des Faunaprofils befinden (hoher SI, niedriger EI; Ferris et al., 2001). Der VP-Boden ist durch eine etwas gestörtere Nematoden-Communities (geringere SI-Werte) charakterisiert. Grundsätzlich wurden die Ergebnisse aus den Voruntersuchungen für die Auswahl der Böden (Abb. 7 bis 9) bestätigt.

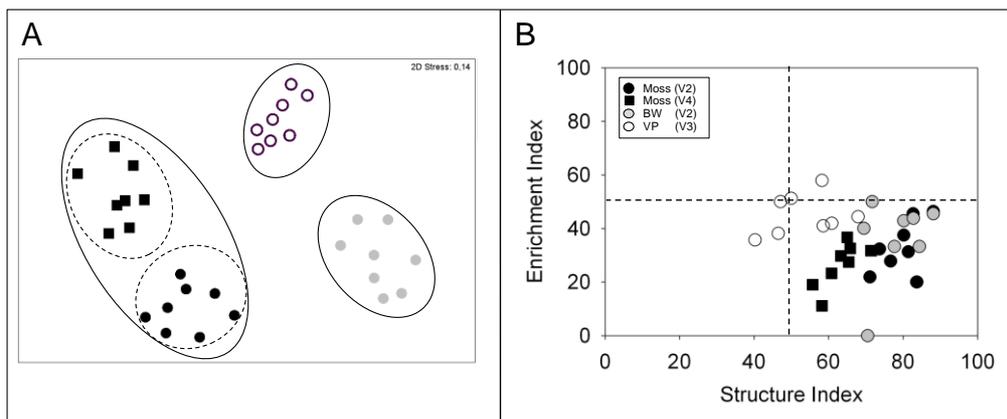


Abbildung 26: (A) nMDS-Plot (auf Basis der relativen Gattungszusammensetzung) und (B) Nematoden-Faunaprofil (Enrichment vs. Structure Index) der Nematoden-Communities zu Beginn (T0) der verschiedenen Versuche (V2, V3, V4) in den unterschiedlichen Böden (Moss; BW; VP).

4.5.2 Toxizität von Zn, Pyren und Mancozeb auf *C. elegans* in gespikten Böden

Um die Bioverfügbarkeit der verschiedenen Schadstoffe, die in den Mikrokosmen eingesetzt wurden, und somit den Einfluss der Bodenmatrix auf die beobachteten Effekte in den Mikrokosmen abschätzen zu können, wurden die vier Chemikalien (Zn, Pyren, Carbendazim und Mankozebe) hinsichtlich ihrer toxischen Wirkung in den verschiedenen Böden untersucht. Dafür wurden die in den jeweiligen Mikrokosmenversuchen verwendeten Böden (Zn: Moss, BW, VP; Pyr: Moss, BW; Carbendazim: VP; Mancozeb: Moss, VP) und der Standardboden Lufa 2.2 mit den Schadstoffen dotiert und mit dem Bodentoxizitätstest mit *C. elegans* gemäß ISO 10872 getestet. Während für Zn und Pyren nur ausge-

wählte Konzentrationsstufen getestet wurden, wurden für Carbendazim und Mancozeb Dosiswirkungskurven aufgenommen.

Für Zn und Pyren zeigten sich keine großen Unterschiede zwischen den Böden in der Toxizität (Abb. 27A). Für die geringere Zn-Konzentration (245 mg/kg TG) wurden zwar Reproduktionshemmungen von 20 (VP) bis 80% (BW) gefunden, diese unterschieden sich aber nicht signifikant voneinander. Bei der höheren Zinkkonzentration (551 mg/kg TG), war die Reproduktion von *C. elegans* in VP signifikant niedriger als in BW. Für Pyren zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei Zn. Auch hier war die Toxizität in BW am höchsten und in VP am geringsten. Dies legt nahe, dass die Bioverfügbarkeit von Zn und Pyren für die Nematoden in BW-Böden am höchsten und in VP-Böden am geringsten war.

Die Dosiswirkungskurven, die für Carbendazim und Mancozeb in drei verschiedenen Böden aufgenommen wurden (Abb. 27B), zeigen eine vergleichbare Toxizität in Lufa- und Moss-Böden (Carbendazim EC50: 10.6 bzw. 8.7 mg/kg TG; Mancozeb EC50: 127 bzw. 155 mg/kg TG), während die Toxizität im VP-Boden höher war (Carbendazim EC50: 4.5 mg/kg TG; Mancozeb EC50: 59 mg/kg TG). Dies deutet auf eine höhere Verfügbarkeit der beiden Fungizide im VP-Boden im Vergleich zu den anderen Böden hin.

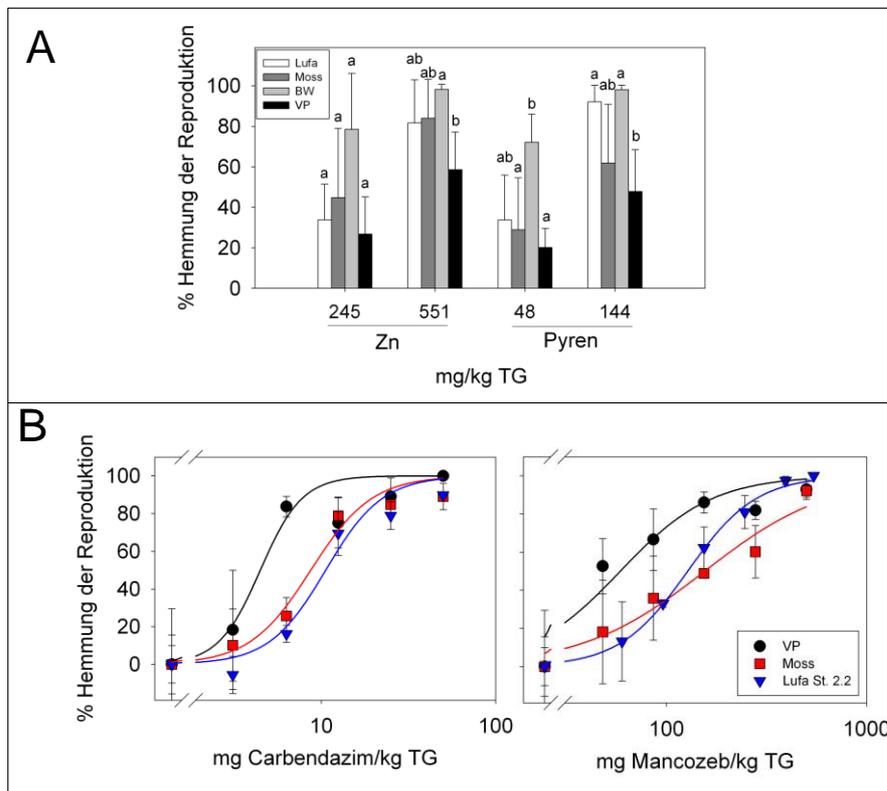


Abbildung 27: % Hemmung der Reproduktion von *Caenorhabditis elegans* nach 96h Exposition in verschiedenen Böden, die mit Zn und Pyren (A), sowie Carbendazim und Mancozeb (B) dotiert wurden.

4.5.3 Bodenkonzentrationen von Zn, Pyren und Mancozeb in den Mikrokosmen-Experimenten

Für die drei Haupt-Mikrokosmenversuche (V2-4) wurden die Konzentrationen von Zn, Pyren und Mancozeb im Boden der Mikrokosmen mittels chemischer Analyse verifiziert. Alle nominellen und gemessenen Konzentrationen sind in Tabelle 8 dargestellt. Außerdem wurden die gemessenen Konzentrationen bezüglich der Hintergrundkonzentration in den Böden (bereits vorhandene Substanz im undotierten Boden = Kontrolle) bereinigt, so dass die Wiederfindungsrate der dotierten Substanz berechnet werden konnte.

In allen Böden konnten auch in den Kontrollen sowohl Zn als auch Pyren nachgewiesen werden (Hintergrundkonzentration). Das Fungizid Mancozeb konnte hingegen nicht nachgewiesen werden (< Detektionsgrenze (LOD) von 0.05 mg/kg Trockengewicht [TG]). Die verschiedenen Böden unterschieden sich deutlich hinsichtlich der Hintergrundkonzentration von Zn und Pyren. Während der BW-Boden bereits mit 118 mg Zn/kg TG bzw. 0,23 mg Pyren/kg TG belastet waren, waren die Zn- und Pyren-Hintergrundkonzentrationen in Moss-Boden eher gering: 35 bzw. 0,047 mg/kg TG. Auch die Hintergrundwerte für Zn in VP-Böden waren mit 38 mg/kg TG eher gering.

Für Zn entsprachen die gemessenen Konzentrationen ganz gut den gewünschten nominellen Konzentrationen (mittlere Wiederfindungsraten: 95 (\pm 13)%, 86 (\pm 16)% and 92 (\pm 17)% for Moss, BW and VP) von 53 bis 118%). In allen Böden war in den verschiedenen Behandlungen der Mikrokosmen ein deutlicher Zn-Konzentrationsgradient zu finden: Von 43 (Moss), 123 (BW) und 46 mg/kg TG (VP) in der geringsten Konzentration (Zn1) bis 682 (Moss), 687 (BW) und 303 mg/kg TG (VP) in der höchsten Konzentration (Zn5; bzw. Zn3 für VP).

Auch für Pyren wurde in beiden Böden (Moss, BW) für die verschiedenen Mikrokosmosbehandlungen ein klarer Konzentrationsgradient gefunden (Moss: von 0,41 (Pyr1) bis 100 (Pyr5) mg/kg TG; BW: von 0,27 (Pyr1) bis 87 (Pyr5) mg/kg TG). Allerdings waren die gemessenen Konzentrationen oft deutlich geringer als die gewünschten nominellen Konzentrationen: Selbst zu Beginn des Versuchs (kurz nach Zugabe des Pyrens) wurden in Moss und BW nur 39-59% bzw. 30-69% der Substanz wiedergefunden. In den ersten 5 Wochen blieben dann die Pyren-Konzentrationen in beiden Böden relativ stabil und fielen dann bis zum Ende des Versuches nach 10 Wochen noch mal ab (Tab. 8).

Auch für Mancozeb wurde in beiden Böden (Moss, VP) für die verschiedenen Mikrokosmosbehandlungen ein klarer Konzentrationsgradient gefunden (Moss: von 1 (M1) bis 18 (M6) mg/kg TG; VP: von 0,8 (M1) bis 4,6 (M4) mg/kg TG) zu Beginn des Versuchs. Auch wenn die Konzentrationen in allen Konzentrationsstufen im Laufe des Versuchs abnahmen, blieb der Konzentrationsgradient erhalten (Tab. 8). Allerdings war die Wiederfindung der Substanz bereits an T0 sehr gering (Moss: 13-17%; VP: 8-10%). Die Labor-internen Wiederfindungsraten die als Positivkontrollen mitgeführt wurden, zeigten Werte von 73 -104%. Es ist bekannt, dass Mancozeb bei Raumtemperatur sehr schnell abgebaut wird (wenige Stunden). Da das Mancozeb als Suspension in Aceton auf den trockenen Boden aufgetragen wurde, musste der Boden ca. 18h bei Raumtemperatur stehen bis das Aceton vollständig abgedampft war und der Boden in die Mikrokosmen verteilt war. Ein signifikanter Abbau bis zum Zeitpunkt des Lagerns bei -20°C ist also wahrscheinlich. Dies könnte die schlechten Wiederfindungsraten für die Mikrokosmen-Proben erklären. Man kann also davon ausgehen, dass die gemessenen Konzentrationen als Maß für die Expositionskonzentrationen verwendet werden können.

Da man eine integrierte Exposition der Nematoden über die Zeit bis zum Probenahmezeitpunkt annehmen kann, wurden sogenannte Expositionskonzentrationen berechnet (= Mittelwerte aller Messwerte bis zum jeweiligen Zeitpunkt; siehe Tab. 8). Die Expositionskonzentrationen wurden dann für die Berechnung der Toxizitätsschwellenwerte (NOEC, LOEC, ECx) verwendet.

Tabelle 8: Konzentrationen (Konz.) der Substanzen Zink (Zn), Pyren (Pyr) und Mancozeb (M) in Mikrokosmenexperimenten mit drei verschiedenen Böden (Moss, BW, VP) an verschiedenen Probenahmezeitpunkten (T0 = direkt nach Dotierung); Nom = Expositionskonzentration (Exp. Konz.): Konzentrationen, welchen die Nematoden bis zum jeweiligen Zeitpunkt ausgesetzt waren = Mittelwert der gemessenen Konzentrationen bis zum jeweiligen Zeitpunkt; HG korr: = gemessene Konzentrationen abzüglich der Hintergrundkonzentration (Konzentration in Kontrollen); Wiederfindung: Prozentualer Anteil der HG-korrigierten gemessenen Konzentration verglichen mit der nominellen Konzentration; LOD = Detektionsgrenze (für Mancozeb; 0.05 mg kg⁻¹ TG).

Zink	Nominell mg kg ⁻¹ TG	De Mossel (Moss)				Büchelberger Wiese (BW)				Vredepeel (VP)			
		Gemessen	Exposition	HG korr	WF	Gemessen	Exposition	HG korr	WF	Gemessen	Exposition	HG korr	WF
		mg kg ⁻¹ TG		%		mg kg ⁻¹ TG		%		mg kg ⁻¹ TG		%	
T0													
C	0	28				118				36			
Zn1	10	43		8,0	80	125		7,3	73	48		10	100
Zn2	122	145		110	90					165		127	104
Zn3	245	314		279	114	346		228	93	283		245	100
Zn4	367	390		355	97								
Zn5	551	538		503	91	549		431	78				
T1 (28/35 Tage)													
C	0	36	32			117	118			39	38		
Zn1	10	44	44	9,0	90	126	126	8,3	83	46	47	8,0	80
Zn2	122	117	131	82	67					162	164	124	101
Zn3	245	276	295	241	99	355	351	237	97	303	293	265	108
Zn4	367	408	399	373	102								
Zn5	551	516	527	481	87	687	618	569	103				
T2 (56/70 Tage)													
C	0	41	35			118	118			39	38		
Zn1	10	46	44	11	110	123	125	5,0	53	46	47	8,0	80
Zn2	122	156	139	121	99					161	163	123	101
Zn3	245	261	284	226	92	346	349	228	93	174	253	136	56
Zn4	367	361	386	326	89								
Zn5	551	682	579	647	118	647	628	529	96				

Fortsetzung Tab. 8

Pyren	Nominell mg kg ⁻¹ TG	De Mossel (Moss)				Büchelberger Wiese (BW)				Vredepeel (VP)			
		Gemessen	Exposition	HG korr	WF	Gemessen	Exposition	HG korr	WF	Gemessen	Exposition	HG korr	WF
		mg kg ⁻¹ TG		%		mg kg ⁻¹ TG		%		mg kg ⁻¹ TG		%	
T0													
SC	0	0,018				0,20							
Pyr1	2	0,82		0,77	39	0,82		0,59	30				
Pyr2	20	9,6		9,5	48								
Pyr3	48	23		23	48	20		20	41				
Pyr4	96	52		52	54								
Pyr5	144	85		85	59	100		100	69				
T1 (28/35 Tage)													
SC	0	0,058	0,038			0,25	0,23						
Pyr1	2	0,61	0,72	0,56	28	0,50	0,66	0,27	14				
Pyr2	20	8,0	8,8	8,0	40								
Pyr3	48	23	23	23	48	20	20	20	41				
Pyr4	96	49	51	49	51								
Pyr5	144	97	91	97	67	93	97	93	64				
T2 (56/70 Tage)													
SC	0	0,064	0,047			0,24	0,23						
Pyr1	2	0,27	0,57	0,22	11	0,41	0,58	0,18	9				
Pyr2	20	2,3	6,6	2,3	11								
Pyr3	48	6,3	17	6,3	13	6,8	16	6,6	14				
Pyr4	96	15	39	15	16								
Pyr5	144	46	76	46	32	48	80	48	33				

Fortsetzung Tab. 8

Mancozeb	Nominell mg kg ⁻¹ TG	De Mossel (Moss)				Büchelberger Wiese (BW)				Vredepeel (VP)			
		Gemessen	Exposition	HG korr	WF	Gemessen	Exposition	HG korr	WF	Gemessen	Exposition	HG korr	WF
		mg kg ⁻¹ TG		%		mg kg ⁻¹ TG		%		mg kg ⁻¹ TG		%	
T0													
SC	0	<LOD		<LOD						<LOD		<LOD	
M1	7 (VP: 8)	0,98		0,98	13,3					0,78		0,78	9,8
M2	15 (VP: 18)	2,1		2,1	14,5					1,8		1,8	9,8
M3	30	4,5		4,5	15,2								
M4	59	10,2		10,2	17,3					4,6		4,6	7,8
M5	89	12,8		12,8	14,4								
M6	133	18,3		18,3	13,8								
T1 (14 Tage)													
SC	0	<LOD		<LOD									
M1	7	0,51	0,74	0,51	6,9								
M2	15	1,5	1,8	1,5	10,3								
M3	30	2,9	3,7	2,9	9,9								
M4	59	4,9	7,5	4,9	8,2								
M5	89	9,2	11,0	9,2	10,4								
M6	133	10,0	14,2	10,0	7,5								
T2 (28 Tage)													
SC	0	<LOD		<LOD						<LOD		<LOD	
M1	7 (VP: 8)	0,41	0,63	0,41	5,6					0,20	0,49	0,20	2,5
M2	15 (VP: 18)	1,20	1,62	1,20	8,2					0,40	1,1	0,40	2,2
M3	30	2,35	3,25	2,35	8,0								
M4	59	4,47	6,52	4,47	7,6					1,7	3,1	1,7	2,8
M5	89	7,39	9,79	7,39	8,3								
M6	133	5,59	11,31	5,59	4,2								
T3 (56 Tage)													
SC	0	<LOD		<LOD						<LOD		<LOD	
M1	7 (VP: 8)	0,30	0,55	0,30	4,0					0,24	0,41	0,24	2,9
M2	15 (VP: 18)	0,70	1,39	0,70	4,7					0,43	0,88	0,43	2,3
M3	30	1,01	2,69	1,01	3,4								
M4	59	1,41	5,24	1,41	2,4					1,1	2,4	1,1	1,8
M5	89	2,78	8,04	2,78	3,1								
M6	133	5,22	9,79	5,22	3,9								

4.5.4 Effekte von Zn, Pyren, Mancozeb und Carbendazim auf Nematoden-Communities unterschiedlicher Herkunft in Mikrokosmen

Die Effekte der verschiedenen Schadstoffe auf Nematoden-Communities waren deutlich beeinflusst vom Typ (1) des getesteten Schadstoffs und (2) des für die Mikrokosmen verwendeten Bodens (bzw. der darin nativen Nematoden-Community). Um diese Einflüsse diskutieren zu können, werden zunächst die Ergebnisse für die einzelnen Schadstoffe und Böden beschrieben werden. Die Ergebnisse für die verschiedenen Nematoden-Community-Parameter bzw. -Indices sind in den Tabellen 9-11 und den Abbildungen 28 und 29 dargestellt.

4.5.4.1 Zn in Moss-Boden

Zn zeigte sehr starke Wirkungen auf die Nematoden-Communities in den Mikrokosmen mit Moss-Boden. Betrachtet man die gemessenen Zn-Konzentrationen in Moss-Boden waren in den Behandlungen Zn3 bis Zn5 deutliche Effekte zu erwarten, da in diesen Konzentrationsstufen der EC20, der im Toxizitätstest mit *C. elegans* ermittelt wurde (228 mg/kg TG), deutlich überschritten war (Tab. 5). Die Gesamtabundanz der Nematoden waren zum ersten Probenahmezeitpunkt nach 35 Tagen (5 Wochen) ab der Konzentrationsstufe Zn3 signifikant niedriger (Tab. 9). Nach 70 Tagen (10 Wochen), wurden sogar bereits in der niedrigsten Konzentrationsstufe (Expositionskonzentration: 44 mg/kg TG) signifikante Effekte beobachtet (Tab. 9). Für einige trait-basierten Indices (MI, MI2-5, %Om&Pre) zeigten sich erste Effekte an beiden Probenahmezeitpunkten ab Zn2 (Expositionskonzentration: 131 bzw. 139 mg/kg TG). Auch im Faunaprofil, das Informationen zu funktionellen Gruppen der Nematoden heranzieht, kann man deutliche dosis-abhängige Verschiebungen erkennen. Mit zunehmender Zn-Konzentration verschieben sich die Datenpunkte nach links oben (Zunahme SI und EI), hin zu einem deutlich gestörten Nahrungsnetz (Abb. 28a). Die Veränderungen in der Nematoden-Community sind natürlich auch anhand der Gattungszusammensetzung zu erkennen (Principle Response Curves [PRC]; Abb. 29a). Auch hier sind nach 35 und 70 Tagen erste signifikante Effekte ab Zn2 (Expositionskonzentration: 131 bzw. 139 mg/kg TG; $p < 0.05$, Montecarlo Permutationstest) zu beobachten. Dies geht vor allem auf den Zn-induzierten Rückgang von *Aporcelaimellus*, *Anaplectus*, *Alaimus*, und Dorylaimiden (e.g. *Eucumenicus*, *Dorylaimellus*) und eine gleichzeitige Zunahme von Gattungen der Familie Protorhabditidae zurück.

Dadurch ergab sich ein stabiler NOEC_{Community} (no-observed effect concentration) von 44 mg/kg TG bzw. von 11 mg/kg, TG wenn man die Hintergrundkonzentration abzieht. Da die Nematodenabundanz am zweiten Zeitpunkt schon bei der geringsten Zn-Konzentration signifikant beeinträchtigt wurde, lässt sich für diesen Endpunkt sogar ein NOEC von <44 mg/kg berechnen.

4.5.4.2 Zn in BW-Boden

Die Effekte von Zn in BW-Boden sind deutlich geringer als im Moss-Boden, obwohl bei den höheren Konzentrationsstufen (Zn3 und Zn5) hinsichtlich der gemessenen Zn-Konzentrationen (Tab. 8) und des EC20 für *C. elegans* (228 mg/kg TG) deutliche Effekte auf die Nematoden-Communities in den Mikrokosmen zu erwarten gewesen wären. Tatsächlich gab es nur die Gesamtabundanzen der Nematoden signifikante Effekte (Tab. 10). Diese Effekte waren aber nicht mit den Expositionskonzentrationen korreliert (z.T. waren die höchsten Effekte bei der geringsten Konzentration zu finden). Dies ist auch für die Gattungszusammensetzung zu erkennen: Der einzige signifikante Effekt trat nach 35 Tagen bei der geringsten Konzentration auf (Abb. 29b). Die trait-basierten Indices (MI, Ernährungstypen) zeigten bis zur höchsten Zn-Konzentration keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 9). Das Faunaprofil zeigt nach 70 Tagen eine leichte dosisabhängige Verschiebung der Datenpunkte nach links, was auf eine leichte, nicht-signifikante Störung des Nahrungsnetzes hindeutet (Abb. 28b). Aufgrund der fehlenden klaren dosis-abhängigen Effekte von Zn auf die Nematoden-Community, kann kein NOEC_{Community} für den BW-Boden bestimmt werden (NOEC > 628 mg/kg TG [70 Tage]; bzw. 529 mg/kg nach Abzug der Hintergrundkonzentrationen).

4.5.4.3 Zn in VP-Boden

In VP-Boden waren die Effekte von Zn auf die native Nematoden-Community ebenfalls deutlich geringer als im Moss-Boden. Hier muss angemerkt werden, dass in VP-Boden nur bis zur Konzentrationsstufe von Zn3 getestet wurde. Die Auswahl dieser maximal getesteten Konzentration wurde anhand der Effekte im Moss-Boden und hinsichtlich der ähnlichen Bodenmatrix im Vergleich zum Moss-Boden (Tab. 3) getroffen. Deshalb wurden in Blick auf die nominellen Konzentrationen deutliche Effekte erwartet. Tatsächlich zeigte sich nach 28 Tagen (erster Probenahmezeitpunkt) bei der höchsten Konzentration (Zn3: Expositionskonzentration: 293 mg/kg TG) im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant geringere Gesamtabundanz der Nematoden (Tab. 11). Dieser Effekt war allerdings nach 70 Tagen (Zn3: Expositionskonzentration von 253 mg/kg TG) nicht mehr zu beobachten (Tab. 11). Einen dosis-abhängigen Effekt auf die Nematoden-Community gab es allerdings nach 70 Tagen Exposition in den Mikrokosmen Zn3 und Zn5 auf den Anteil an omnivoren und räuberischen Nematoden (% Om/Pre; Tab. 11). Dieser Effekt geht auch einher mit einer (nicht-signifikanten) Erhöhung des MI2-5, was eigentlich gemäß der Theorie des Maturity Index nicht als Stressantwort gewertet wird. Betrachtet man die Veränderungen von % Om/Pre als Effekt, kann ein NOEC_{Community} von 47 mg/kg TG bestimmt werden.

4.5.4.4 Pyr in Moss-Boden

Pyren zeigte im Moss-Boden weniger drastische Effekte auf die Nematoden-Community als Zn. Vergleicht man die gemessenen Pyren-Konzentrationen (Tab. 8) mit dem EC20, der für *C. elegans* ermittelt wurde (66 mg/kg TG), konnte man zumindest für die höchste Konzentration (Pyr5) deutliche Effekte erwarten. Obwohl Pyren leichte, aber dosis-abhängige Effekte auf einige trait-basierte Indices hatte, gab es kaum signifikante Änderungen. Dies lag wahrscheinlich an der relativen hohen Varianz der Parameter zwischen den Replikaten der Lösungsmittelkontrolle (SC; Tab. 9). Der Anteil an Bakterienfressern (% BF) war nach 70 Tagen in den Mikrokosmen mit der höchsten Pyren-Konzentration (Pyr5; Expositionskonzentration: 76 mg/kg TG) signifikant geringer als in den Kontrollen (SC; Tab. 9). Auch die Gattungszusammensetzung in Pyr5 war signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (Abb. 29d), wobei vor allem bakterienfressende Gattung (*Plectus*, *Anaplectus*) ihre Dominanz zu Gunsten von omnivoren Nematoden (*Aporcelaimellus*, *Ecumenicus*) einbüßten. Diese Veränderungen in der Ne-

matoden-Community führten auch zu einer dosis-abhängigen (aber nicht signifikanten) Erhöhung des Maturity Index nach 70 Tagen (Tab. 9). Auch im Faunaprofil machten sich diese Änderungen bemerkbar. Die Datenpunkte des zweiten Probenahmezeitpunkts bewegten sich in die rechte untere Ecke, was ein ungestörtes Nahrungsnetz anzeigt (Abb. 28d).

Betrachtet man diese „positiven“ Veränderungen als Effekt, kann ein NOEC_{Community} von 39 mg/kg TG festgelegt werden.

4.5.4.5 Pyr in BW-Boden

In BW-Boden zeigte Pyren gar keine dosis-abhängigen Effekte, obwohl man hinsichtlich der gemessenen Konzentration und der EC20-Werte für *C. elegans* (66 mg/kg TG) in den Mikrokosmen mit den höchsten Pyren-Konzentrationen (Tab. 8) durchaus Effekte auf die Nematoden-Community erwartet hatte. Die einzigen signifikanten Effekte zeigten sich nach 35 Tagen für die Gesamtabundanz der Nematoden, allerdings nur in den niedrigeren Konzentrationsstufen (Pyr1 und Pyr3), also ohne Zusammenhang zur Pyren-Konzentration (Tab. 10). Nur der Enrichment Index (EI) war nach 70 Tagen Exposition in Pyr5-Mikrokosmen signifikant geringer als in den Kontrollen. Das führte im Faunaprofil zu einem ähnlichen Bild wie auch beim Moss-Boden und indiziert einen „positiven“ Effekt in Richtung eines ungestörten Nahrungsnetzes (Abb. 28e).

Betrachtet man diese „positiven“ Veränderungen als Effekt, kann ein NOEC_{Community} von 16 mg/kg TG festgelegt werden.

4.5.4.6 Mancozeb in Moss-Boden

Mancozeb hatte in Moss-Boden klare dosis-abhängige Effekte auf die Gattungszusammensetzung, sowie auf einige der trait-basierten Indices, die für die Nematoden-Communities bestimmt wurden. Anhand der nominellen Konzentrationen von Mancozeb im Boden der Mikrokosmen und einem EC20 für *C. elegans* in Moss-Boden von 58 mg/kg TG, waren ab der Konzentrationsstufe von M4 deutliche Effekte zu erwarten. Die gemessenen Expositionskonzentrationen waren allerdings um einen Faktor 10 niedriger als die nominellen Konzentrationen (M4: 5,2 – 7,5 mg/kg TG), was deutlich unterhalb des NOECs für *C. elegans* lag (Tab. 6). Auf Grund der schnellen Abbaubarkeit von Mancozeb ist anzunehmen, dass die effektiven Konzentrationen beim Toxizitätstest mit *C. elegans* ebenfalls deutlich geringer als die nominellen waren, was einen direkten Vergleich der Effekte erschwert.

Beim ersten Probenahmezeitpunkt, nach 14 Tagen Exposition, gab es bereits signifikante Effekte von Mancozeb auf den Maturity Index und den Anteil von omnivoren und räuberischen Nematoden (Tab. 9). Allerdings standen die Effekte nicht in Beziehung zu den Konzentrationen von Mancozeb im Boden. Die Effekte wurden dann im Laufe der Versuchszeit immer deutlicher. Bei der Gesamtabundanz der Nematoden waren keine signifikanten Effekte zu erkennen. Allerdings nahmen die Nematodendichten sogar mit zunehmender Mancozeb-Konzentration zu (in M6 nach 28 und 56 Tagen um 33 bzw. 44 %; Tab. 9). Erste signifikante Effekte auf bestimmte funktionelle Gruppen der Nematoden traten nach 28 Tagen Exposition ab einer Konzentrationsstufe von M4 (MI) bzw. M3 auf (MI2-5; %Om/Pre) auf (Tab. 9). Das entspricht gemessenen Expositionskonzentrationen von 7,5 mg/kg TG (M4) bzw. 3,7 mg/kg TG (M3). Nach 56 Tagen Exposition waren für diese trait-basierten Indices (MI, MI2-5, %Om/Pre) bereits ab der Konzentrationsstufe M2 (Expositionskonzentration: 1,4 mg/kg TG; Tab. 5) zu beobachten.

Im Faunaprofil sind erste Effekte hingegen sowohl nach 28 als auch nach 56 Tagen Exposition ab M4 zu erkennen (Abb. 28f). Nachhaltige signifikante Effekte auf die Gattungszusammensetzung sind ebenfalls erst ab M4 zu beobachten (Abb. 29f). Dies ist vor allem auf eine Mancozeb-induzierte schwindende Dominanz omnivorer Gattungen (*Aporcelaimellus*, *Ecumenicus*, *Dorylaimellus*) und der

wachsenden Dominanz bakterienfressender Gattungen (*Acrobelloides*, Cephalobiden) zurückzuführen.

Insgesamt ergab sich ein $NOEC_{Community}$ von 0.55 mg/kg TG.

4.5.4.7 Mancozeb in VP-Boden

Auch in VP-Boden konnten klare dosis-abhängige Wirkungen von Mancozeb auf die native Nematoden-Community beobachtet werden. Auch hier wurden auf Grund der EC20-Werte für *C. elegans* (60 mg/kg TG) und der nominellen Konzentrationen in den Mikrokosmen ab einer Konzentrationsstufe von M4 (59 mg/kg TG) deutlich Effekte auf die Nematoden-Communities erwartet. Ähnlich wie beim Moss-Boden, waren auch im VP-Boden die gemessenen Konzentrationen deutlich geringer als die nominellen Konzentrationen (nur 2-10 %), was einen Vergleich zu den nominellen Konzentrationen im Toxizitätstest mit *C. elegans* erschwert.

Nach 28 Tagen zeigten sich erste Effekte auf die Gesamtabundanz der Nematoden (Tab. 11). Anders als beim Moss-Boden, induzierte Mancozeb in VP-Boden eine leichte, aber signifikante Reduzierung der Abundanzen in M4 (Expositions-konzentration: 3,1 mg/kg TG). An diesem Probenahmezeitpunkt waren allerdings sonst bei keinem anderen Community-Parameter Effekte zu sehen (Tab. 11). Dieses Bild ändert sich aber, wenn man die Nematoden-Communities nach 56 Tage Exposition betrachtet. Beim zweiten Probenahmezeitpunkt waren die Gesamtabundanzen bereits ab der geringsten Konzentration (M1; Expositions-konzentration: 0,41 mg/kg TG) geringer als in der Kontrolle (SC; Tab. 9). Erste signifikante Effekte auf trait-basierte Indices traten ab der Konzentrationsstufe M2 auf (MI2-5; %Om/Pre; Tab. 11), also ab einer Expositions-konzentration von 0,88 mg/kg. Diese Effekte spiegelten sich auch im Faunaprofil wider. Hier bewegten sich die Datenpunkte für M3 und M4 nach links in Richtung eines gestörten Nahrungsnetzes (Abb. 28g). Die Gattungszusammensetzung zeigte keine dosis-abhängigen Veränderungen auf die Mancozeb-Behandlung. Die beobachteten Veränderungen in der Community in M1 und M2 (Abb. 29g) sind vor allem auf Verschiebungen zweier pflanzenparasitären Gattungen zurückzuführen (*Tylenchorhynchus*; Telotylenchidae gen), die allerdings nicht in die Berechnung der Indices miteingehen.

Für die trait-basierten Indices ergab sich ein $NOEC_{Community}$ von 0.41 mg/kg TG. Für die Gesamtabundanz lag der NOEC bei < 0.41 mg/kg.

4.5.4.8 Carbendazim in VP-Boden

Carbendazim zeigte in VP-Boden zwar einige signifikante Effekte auf die Nematoden-Community (Gesamtabundanz, MI, MI2-5, %Om/Pre; Tab. 11). Diese Effekte waren allerdings nicht mit der nominellen Konzentration im Boden korreliert (effektive Konzentrationen wurden nicht per chemischer Analyse nachgeprüft). Nach 28 Tagen Exposition war lediglich die Gesamtabundanz bei Ca2 (nominelle Konzentration: 2,4 mg/kg TG) geringer als in der Kontrolle (SC; Tab. 11). Nach 56 Tagen Exposition wurden bereits bei der geringsten Konzentrationsstufe (M1: nominelle Konzentration 1 mg/kg TG) signifikant hemmende Effekte auf die Gesamtabundanz und den Anteil von omnivoren und räuberischen Nematoden (%Om/Pre) beobachtet (Tab. 11). Beim Maturity Index waren die hemmenden Effekte von Carbendazim nur in M1 (MI), bzw. in M1 und M2 (MI2-5) signifikant. Da die tatsächlichen Expositions-konzentrationen für Carbendazim im Boden nicht analysiert wurden, kann nicht aufgeklärt werden, warum die Effekte nicht dosis-abhängig waren.

Bezogen auf die nominellen Konzentrationen ergibt sich ein $NOEC_{Community}$ von <1 mg/kg TG.

Tabelle 9: Nematoden-Abundanzen (Individuen [ind]/100g Boden TG), Anzahl der Gattungen (wenn "n" ≠ 200, wurden auch die geschätzten Zahlen, extra- bzw. interpoliert auf n = 200 angegeben), Maturity Indices (MI, MI2-5), % der Ernährungstypen (BF: Bakterienfresser; HF: Pilzfresser; PF: Pflanzenfresser; Om: Omnivore; Pre: Räuber) in Mikrokosmen mit Boden aus De Mossel (Moss) dotiert mit Zink (Zn), Pyren (Pyr) und Mancozeb (M) in verschiedenen Konzentrationen (1-6; siehe Tab. 6); C = Wasserkontrolle; SC = Lösungsmittelkontrolle; gepoolt: die Daten der 4 Replikate wurden gepoolt; * = signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Kontrolle (Zn: C; Pyr und M: SC; one-way ANOVA; posthoc: Dunnett/Games-Howell; p < 0.05).

Zeit	Behandlung	Ind/100g	n	Gattungen	MI	MI25	% BF	% HF	% PF	% Om/Pre
		MW ± SA	min-max (pooled)	gepoolt (beobachtet / geschätzt)	MW ± SA	MW ± SA	MW ± SA	MW ± SA	MW ± SA	MW ± SA
V2 (Zn + Pyrene)										
T0	C	2820 ± 402	49-50 (399)	50 / 40.0	2.98 ± 0.20	3.09 ± 0.23	52.4 ± 4.6	2.3 ± 1.3	9.5 ± 5.2	33.6 ± 6.1
T1	C	518 ± 121	39-50 (380)	41 / 31.6	3.80 ± 0.48	3.95 ± 0.46	32.5 ± 14.5	0.5 ± 1.0	2.9 ± 3.2	59.2 ± 12.4
	Zn1	484 ± 116	40-50 (190)	29 / 29.5	3.34 ± 0.58	3.62 ± 0.59	38.3 ± 9.3	6.1 ± 11.0	3.1 ± 1.0	46.4 ± 17.0
	Zn2	496 ± 54	50 (199)	30 / 30.0	2.35 ± 0.15*	2.65 ± 0.22*	61.5 ± 6.2*	14.0 ± 1.6*	6.5 ± 4.1	16.5 ± 6.8*
	Zn3	57 ± 7*	6-8 (26)	13 / 24.5	2.64 ± 0.28*	3.15 ± 0.44	57.3 ± 8.6*	4.2 ± 8.3	0.0	27.1 ± 8.0*
	Zn4	140 ± 43*	8-19 (54)	19 / 33.0	2.10 ± 0.25*	2.52 ± 0.46*	37.3 ± 10.2	21.5 ± 13.2	17.3 ± 11.8	7.7 ± 5.5*
	Zn5	71 ± 29*	4-11 (30)	12 / 20.5	1.94 ± 0.50*	3.00 ± 0.82*	64.6 ± 7.5*	0.0	21.1 ± 16.1	14.4 ± 10.6*
T2	C	454 ± 67	47-50 (395)	40 / 32.6	3.72 ± 0.35	3.84 ± 0.33	33.2 ± 10.8	1.5 ± 2.1	7.8 ± 5.4	51.9 ± 10.9
	Zn1	197 ± 59*	22-40 (111)	24 / 27.7	3.23 ± 0.63	3.38 ± 0.56	50.0 ± 15.2	3.5 ± 4.4	1.1 ± 2.3	44.2 ± 19.5
	Zn2	188 ± 87*	18-45 (106)	28 / 35.0	2.12 ± 0.16*	2.41 ± 0.26*	67.2 ± 8.9*	4.7 ± 3.7	12.9 ± 5.6	7.5 ± 3.4*
	Zn3	29 ± 10*	3-6 (17)	8 / 9.4	2.23 ± 0.77	2.69 ± 0.69	66.7 ± 27.2*	0.0	25.0 ± 31.9	8.3 ± 16.7*
	Zn4	21 ± 10*	11 (11)	9 / 20.1	1.83 ^a	2.25 ^a	54.5 ^a	0.0 ^a	18.2 ^a	0.0 ^a
	Zn5	28 ± 14*	2-6 (14)	8 / 27.3	1.28 ± 0.32*	2.00 ± 0.00*	79.2 ± 25.0*	4.2 ± 8.3	4.2 ± 8.3	0.0*
T1	SC	375 ± 90	27-50 (171)	35 / 36.9	3.34 ± 0.45	3.63 ± 0.56	43.3 ± 10.8	2.0 ± 1.5	3.8 ± 5.2	48.3 ± 16.6
	Pyr1	436 ± 205	33-50 (180)	29 / 30.6	3.70 ± 0.73	3.94 ± 0.53	32.4 ± 11.8	4.7 ± 4.4	3.5 ± 11.6	58.4 ± 22.2
	Pyr2	504 ± 93	47-50 (197)	33 / 33.2	3.17 ± 0.33	3.47 ± 0.52	38.0 ± 5.6	9.8 ± 6.4	10.8 ± 7.0	36.9 ± 10.4
	Pyr3	320 ± 122	25-50 (149)	29 / 32.0	3.17 ± 0.81	3.47 ± 0.58	42.2 ± 15.6	4.1 ± 5.7	3.5 ± 5.7	45.6 ± 21.6
	Pyr4	393 ± 176	24-50 (161)	26 / 27.8	3.00 ± 0.63	3.24 ± 0.48	38.7 ± 20.6	7.9 ± 5.7	9.7 ± 7.6	26.2 ± 18.6
	Pyr5	340 ± 145	25-50 (150)	38 / 42.7	3.15 ± 0.30	3.36 ± 0.49	39.5 ± 12.0	3.0 ± 3.5	10.5 ± 4.4	31.0 ± 8.1
T2	SC	271 ± 168	13-50 (139)	23 / 27.1	3.51 ± 0.67	3.60 ± 0.63	43.5 ± 21.0	1.0 ± 2.0	1.9 ± 1.5	50.7 ± 20.3
	Pyr1	124 ± 30	13-23 (69)	18 / 22.5	2.97 ± 0.23	3.20 ± 0.33	54.9 ± 7.6	3.6 ± 7.1	5.6 ± 4.5	33.7 ± 10.4
	Pyr2	278 ± 103	26-50 (149)	32 / 35.9	3.45 ± 0.48	3.71 ± 0.36	39.8 ± 8.8	3.2 ± 4.2	3.5 ± 1.3	45.6 ± 13.7
	Pyr3	179 ± 63	17-36 (101)	17 / 21.6	3.62 ± 0.83	3.72 ± 0.71	36.7 ± 21.3	0.0	11.1 ± 6.3	42.4 ± 29.0
	Pyr4	209 ± 96	15-46 (119)	23 / 29.9	3.94 ± 0.67	4.10 ± 0.55	29.0 ± 17.4	1.7 ± 2.2	6.4 ± 2.0	61.0 ± 17.3
	Pyr5	131 ± 32	12-21 (74)	15 / 27.3	4.43 ± 0.36	4.43 ± 0.36	12.6 ± 3.4*	2.1 ± 4.2	9.8 ± 10.8	75.5 ± 17.5

Fortsetzung Tabelle 9

Zeit	Behandlung	Ind/100g	n	Gattungen	MI	MI25	% BF	% HF	% PF	% Om/Pre
		MW ± SA	min-max (pooled)	gepooled (beobachtet / geschätzt)	MW ± SA	MW ± SA	MW ± SA	MW ± SA	MW ± SA	MW ± SA
V4 (Mancozeb)										
T0	C	1733 ± 298	50-52 (404)	47 / 38.0	2,61 ± 0,08	2,67 ± 0,10	54,7 ± 4,1	13,2 ± 4,4	6,7 ± 1,5	22,3 ± 2,6
T1	C	670 ± 219	50-53 (205)	36	2,95 ± 0,14	3,02 ± 0,13	49,3 ± 2,8	5,4 ± 4,1	4,4 ± 3,4	31,2 ± 4,6
	SC	676 ± 230	50-53 (205)	38	3,02 ± 0,22	3,02 ± 0,22	45,9 ± 4,5	7,3 ± 3,0	4,8 ± 3,2	33,1 ± 2,3
	M1	780 ± 77	50-53 (204)	34	2,78 ± 0,26	2,79 ± 0,27	43,6 ± 7,4	17,6 ± 7,4*	5,0 ± 5,3	26,9 ± 10,7
	M2	825 ± 85	51-53 (207)	35	2,75 ± 0,16	2,82 ± 0,15	54,5 ± 5,2	8,7 ± 1,2	3,9 ± 2,8	26,1 ± 4,4
	M3	866 ± 201	50-51 (202)	36	2,44 ± 0,11*	2,49 ± 0,12*	57,9 ± 3,5	9,9 ± 3,5	7,4 ± 3,0	16,3 ± 3,0*
	M4	788 ± 144	50-52 (204)	42	2,50 ± 0,32*	2,54 ± 0,32*	57,8 ± 9,2	12,7 ± 3,2	5,8 ± 2,1	15,8 ± 6,0*
	M5	1204 ± 635	50 (200)	36	2,56 ± 0,45*	2,70 ± 0,29	43,0 ± 10,5	19,0 ± 3,5*	7,0 ± 3,5	18,0 ± 7,8*
M6	848 ± 136	50-51 (201)	36	3,09 ± 0,14	3,10 ± 0,13	34,8 ± 5,4	8,5 ± 1,9	5,5 ± 3,0	34,8 ± 5,3	
T2	C	819 ± 167	50-52 (205)	43	2,64 ± 0,28	2,78 ± 0,26	48,8 ± 16,5	17,1 ± 14,8	3,4 ± 2,5	27,7 ± 8,5
	SC	773 ± 96	50-54 (205)	40	2,88 ± 0,22	2,90 ± 0,21	51,8 ± 5,5	6,9 ± 2,1	4,3 ± 2,3	27,4 ± 6,5
	M1	775 ± 182	50-53 (205)	36	2,72 ± 0,28	2,73 ± 0,30	50,9 ± 10,6	10,7 ± 4,3	3,0 ± 2,6	23,6 ± 11,5
	M2	764 ± 123	50-51 (202)	36	2,82 ± 0,30	2,88 ± 0,22	49,7 ± 8,7	9,9 ± 1,5	4,5 ± 5,7	29,9 ± 6,1
	M3	803 ± 131	50-53 (207)	31	2,48 ± 0,12	2,50 ± 0,09*	63,3 ± 4,4	10,1 ± 3,8	5,3 ± 0,9	14,5 ± 4,0*
	M4	777 ± 14	50-53 (205)	34	2,21 ± 0,14*	2,25 ± 0,14*	69,2 ± 8,6*	15,2 ± 7,8	1,5 ± 1,9	9,2 ± 4,8*
	M5	1045 ± 718	50-52 (205)	31	1,96 ± 0,23*	2,13 ± 0,08*	67,3 ± 5,9*	15,5 ± 6,8	5,4 ± 0,9	4,9 ± 2,6*
M6	1093 ± 146	50 (200)	29	2,10 ± 0,09*	2,11 ± 0,08*	68,0 ± 7,3*	13,0 ± 4,8	4,0 ± 0,0	5,5 ± 4,4*	
T3	C	769 ± 75	50-51 (202)	33	2,90 ± 0,20	2,91 ± 0,22	57,0 ± 8,2	4,0 ± 4,2	1,5 ± 2,9	26,3 ± 7,2
	SC	680 ± 85	50-51 (203)	34	3,26 ± 0,10	3,27 ± 0,08	44,8 ± 2,8	4,9 ± 1,1	1,0 ± 1,1	42,3 ± 3,8
	M1	736 ± 250	50-52 (202)	34	2,91 ± 0,29	2,92 ± 0,28	52,5 ± 4,7	6,5 ± 6,4	1,0 ± 1,1	31,2 ± 8,3
	M2	952 ± 284	50-52 (202)	31	2,85 ± 0,29*	2,87 ± 0,32*	61,0 ± 11,9*	4,0 ± 2,8	2,4 ± 3,6	27,1 ± 6,5*
	M3	549 ± 211	50 (200)	32	2,94 ± 0,17*	2,95 ± 0,17	51,0 ± 6,6	7,0 ± 2,6	2,0 ± 4,0	36,0 ± 9,1
	M4	664 ± 130	50 (200)	24	2,11 ± 0,09*	2,13 ± 0,11*	85,5 ± 4,4*	5,5 ± 1,9	2,0 ± 0,0	4,5 ± 2,5*
	M5	1045 ± 293	50-52 (202)	19	2,18 ± 0,11*	2,18 ± 0,11*	82,2 ± 8,1*	3,4 ± 2,8	1,0 ± 1,1	8,9 ± 6,2*
M6	1108 ± 278	50-51 (202)	20	2,04 ± 0,08*	2,05 ± 0,06*	86,6 ± 5,4*	8,4 ± 5,6	1,5 ± 1,9	2,5 ± 3,0*	

* Keine Statistik möglich, da die Daten der Replikate wegen zu geringer Nematodendichten gepoolt wurden

Tabelle 10: Nematoden-Abundanzen (Individuen [ind]/100g Boden TG), Anzahl der Gattungen (wenn “n” ≠ 200, wurden auch die geschätzten Zahlen, extra- bzw. interpoliert auf n = 200 angegeben), Maturity Indices (MI, MI2-5), % der Ernährungstypen (BF: Bakterienfresser; HF: Pilzfresser; PF: Pflanzenfresser; Om: Omnivore; Pre: Räuber) in Mikrokosmen mit Boden aus Büchelberger Wiese (BW) dotiert mit Zink (Zn) und Pyren (Pyr) in verschiedenen Konzentrationen (1-5; siehe Tab. 6); C = Wasserkontrolle; SC = Lösungsmittelkontrolle; gepoolt: die Daten der 4 Replikate wurden gepoolt; * = signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Kontrolle (Zn: C; Pyr und M: SC; one-way ANOVA; post-hoc: Dunnett/Games-Howell; p < 0.05).

Zeit	Behandlung	Ind/100g	n	Gattungen	MI	MI25	% BF	% HF	% PF	% Om/Pre
		MW ± SA	min-max (pooled)	gepoolt (beobachtet / geschätzt)	MW ± SA	MW ± SA	MW ± SA	MW ± SA	MW ± SA	MW ± SA
T0	C	6710 ± 1068	50 (400)	44 / 36.4	3.04 ± 0.21	3.06 ± 0.22	16.0 ± 4.8	3.0 ± 1.5	60.5 ± 3.3	14.3 ± 4.1
T1	C	2939 ± 315	50 (200)	30	3.07 ± 0.18	3.15 ± 0.18	11.5 ± 6.0	5.0 ± 3.5	56.5 ± 12.4	17.0 ± 4.2
	Zn1	2258 ± 237*	50 (200)	38	3.16 ± 0.22	3.26 ± 0.34	11.0 ± 4.8	14.5 ± 9.4	49.5 ± 8.1	21.5 ± 6.6
	Zn3	2526 ± 218	50 (200)	31	2.89 ± 0.13	2.89 ± 0.13	12.0 ± 5.9	4.5 ± 1.9	59.5 ± 10.0	14.5 ± 5.3
	Zn5	2270 ± 121*	50 (200)	32	3.18 ± 0.31	3.28 ± 0.43	11.0 ± 3.8	2.0 ± 2.8	62.0 ± 4.3	13.5 ± 6.2
T2	C	1857 ± 55	50 (200)	38	3.13 ± 0.31	3.26 ± 0.32	14.0 ± 6.3	9.5 ± 4.4	53.0 ± 8.4	16.0 ± 8.2
	Zn1	1098 ± 102*	50 (200)	28	2.93 ± 0.10	2.99 ± 0.06	10.0 ± 7.5	16.0 ± 7.7	57.0 ± 14.1	11.5 ± 4.7
	Zn3	1550 ± 227*	50 (200)	34	2.73 ± 0.25	2.75 ± 0.25	11.0 ± 5.3	11.5 ± 3.0	61.5 ± 5.3	10.0 ± 5.7
	Zn5	1291 ± 95*	50 (200)	33	2.99 ± 0.34	2.99 ± 0.34	12.5 ± 5.5	9.5 ± 6.4	60.5 ± 4.1	11.0 ± 4.8
T1	SC	2801 ± 100	50 (200)	37	2.84 ± 0.45	2.92 ± 0.45	19.5 ± 6.0	7.0 ± 1.2	48.0 ± 8.5	16.5 ± 1.0
	Pyr1	2159 ± 349*	50 (200)	33	2.98 ± 0.37	3.04 ± 0.38	13.5 ± 7.0	13.0 ± 5.3	50.0 ± 14.8	15.5 ± 5.7
	Pyr3	1820 ± 212*	41-50 (191)	32 / 33.3	2.99 ± 0.15	3.08 ± 0.14	12.5 ± 5.0	5.3 ± 2.3	58.2 ± 5.3	14.5 ± 2.9
	Pyr5	2427 ± 121	50 (200)	30	3.11 ± 0.31	3.26 ± 0.43	9.5 ± 3.8	4.5 ± 2.8	63.5 ± 4.3	11.5 ± 6.2
T2	SC	1338 ± 188 ^a	50 (200)	34	3.26 ± 0.59	3.37 ± 0.56	13.0 ± 4.8	5.5 ± 4.4	53.5 ± 8.2	16.5 ± 4.4
	Pyr1	1319 ± 158	50 (200)	35	2.89 ± 0.35	2.99 ± 0.26	14.0 ± 4.0	10.5 ± 2.5	55.5 ± 6.6	13.0 ± 5.3
	Pyr3	1443 ± 214	50 (200)	33	3.22 ± 0.38	3.24 ± 0.35	12.0 ± 12.1	7.5 ± 3.4	58.0 ± 4.9	17.5 ± 6.6
	Pyr5	1359 ± 410	50 (200)	32	3.38 ± 0.21	3.45 ± 0.15	11.0 ± 3.5	1.5 ± 3.0	58.0 ± 9.1	22.5 ± 5.3

^a signifikanter Unterschied zur Wasserkontrolle (C; p < 0.05, t-Test)

Tabelle 11: Nematoden-Abundanzen (Individuen [ind]/100g Boden TG), Anzahl der Gattungen (wenn "n" ≠ 200, wurden auch die geschätzten Zahlen, extra- bzw. interpoliert auf n = 200 angegeben), Maturity Indices (MI, MI2-5), % der Ernährungstypen (BF: Bakterienfresser; HF: Pilzfresser; PF: Pflanzenfresser; Om: Omnivore; Pre: Räuber) in Mikrokosmen mit Boden aus Vredepeel (VP) dotiert mit Zink (Zn), Carbendazim (Ca) und Mancozeb (M) in verschiedenen Konzentrationen (1-5; siehe Tab. 6); C = Wasserkontrolle; SC = Lösungsmittelkontrolle; gepoolt: die Daten der 4 Replikate wurden gepoolt; * = signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Kontrolle (Zn: C; Pyr und M: SC; one-way ANOVA; posthoc: Dunnett/Games-Howell; p < 0.05).

Zeit	Behandlung	Ind/100g	n	Gattungen	MI	MI25	% BF	% HF	% PF	% Om/Pre
		MW ± SA	min-max (pooled)	gepoolt (beobachtet / geschätzt)	MW ± SA	MW ± SA	MW ± SA	MW ± SA	MW ± SA	MW ± SA
T0	C	975 ± 83	50 (400)	32 / 27,4	2.27 ± 0.14	2.46 ± 0.13	47.3 ± 7.7	3.3 ± 3.5	23.0 ± 4.7	12.3 ± 5.9
T1	C	625 ± 105	37-50 (187)	29 / 29,5	2.47 ± 0.10	2.87 ± 0.16	40.1 ± 9.8	3.7 ± 3.3	21.9 ± 9.2	16.2 ± 3.9
	Zn1	562 ± 23	50 (200)	26	2.58 ± 0.07	2.91 ± 0.10	31.0 ± 3.6	4.0 ± 2.0	25.7 ± 5.1	18.0 ± 0.0
	Zn3	632 ± 81	50 (200)	28	2.27 ± 0.15	2.83 ± 0.22	40.5 ± 5.0	6.5 ± 2.5	25.0 ± 3.5	12.5 ± 4.1
	Zn5	419 ± 119*	38-50 (180)	31 / 32,1	2.26 ± 0.21	2.76 ± 0.19	44.2 ± 4.6	6.1 ± 2.7	18.3 ± 4.8	14.7 ± 5.2
T2	C	551 ± 97	50 (200)	32	2.06 ± 0.11	2.54 ± 0.12	38.5 ± 6.4	6.0 ± 1.6	30.0 ± 6.3	7.5 ± 3.0
	Zn1	582 ± 108	50 (200)	33	2.43 ± 0.18*	2.68 ± 0.30	33.0 ± 4.8	4.5 ± 3.0	32.0 ± 1.6	9.5 ± 1.0
	Zn3	468 ± 109	49-50 (199)	29 / 29,1	2.38 ± 0.17	2.85 ± 0.37	31.1 ± 13.0	13.0 ± 19.5	27.2 ± 10.5	14.1 ± 3.6*
	Zn5	588 ± 91	50 (200)	30	2.18 ± 0.18	2.70 ± 0.14	46.5 ± 5.3	4.5 ± 3.5	22.5 ± 3.0	13.0 ± 3.5*
T1	SC	522 ± 60	50 (200)	26	2,16 ± 0,24	2,58 ± 0,27	41,5 ± 11,8	4,0 ± 1,6	27,5 ± 8,2	9,0 ± 5,3
	M1	563 ± 29	50 (200)	27	2,33 ± 0,31	2,70 ± 0,25	34,5 ± 4,4	10,0 ± 6,7	29,0 ± 8,1	11,0 ± 4,2
	M2	470 ± 53	50 (200)	33	2,28 ± 0,25	2,54 ± 0,28	43,0 ± 7,4	6,0 ± 4,3	28,0 ± 7,8	8,5 ± 5,0
	M4	432 ± 33*	35-39 (152)	26 / 28,5	1,90 ± 0,25	2,33 ± 0,14	42,6 ± 6,4	6,7 ± 4,8	19,6 ± 3,7	4,6 ± 2,5
	Ca1	426 ± 114	33-50 (180)	28 / 28,6	1,99 ± 0,13	2,46 ± 0,11	43,0 ± 3,2	5,8 ± 2,3	30,0 ± 0,2	6,3 ± 2,0
	Ca2	330 ± 81*	33-50 (163)	29 / 31,4	1,97 ± 0,34	2,38 ± 0,40	39,6 ± 2,3	4,1 ± 3,8	29,0 ± 11,7	8,4 ± 7,3
	Ca3	399 ± 48	38-50 (169)	29 / 31,3	2,03 ± 0,06	2,72 ± 0,24	43,9 ± 6,5	3,1 ± 3,4	25,9 ± 5,7	8,5 ± 4,8
T2	SC	707 ± 139	50 (200)	28	2,27 ± 0,20	2,76 ± 0,16	39,0 ± 8,1	2,0 ± 1,6	35,0 ± 9,6	12,5 ± 3,4
	M1	441 ± 126*	44-50 (142)	25 / 27,9	2,28 ± 0,10	2,51 ± 0,08	40,7 ± 4,8	5,0 ± 3,2	28,2 ± 1,2	11,3 ± 1,3
	M2	480 ± 87*	50 (200)	30	2,11 ± 0,32	2,38 ± 0,25*	37,5 ± 8,2	7,5 ± 4,1	37,5 ± 7,2	5,0 ± 3,5*
	M4	375 ± 78*	35-50 (164)	25 / 25,5	1,81 ± 0,09*	2,14 ± 0,06*	50,8 ± 6,5	6,9 ± 7,3	23,7 ± 12,0	1,8 ± 1,2*
	Ca1	344 ± 69*	28-50 (162)	26 / 27,1	1,72 ± 0,21*	2,12 ± 0,15*	50,0 ± 4,3	6,2 ± 3,7	31,6 ± 5,2	1,8 ± 3,6*
	Ca2	244 ± 44*	23-35 (116)	19 / 19,5	2,01 ± 0,08	2,26 ± 0,04*	35,5 ± 5,5	2,6 ± 1,8	42,9 ± 11,1	3,3 ± 2,4*
	Ca3	326 ± 89*	32-50 (166)	30 / 31,5	2,08 ± 0,09	2,57 ± 0,15	45,2 ± 12,0	3,2 ± 2,5	33,7 ± 11,5	6,3 ± 2,2*

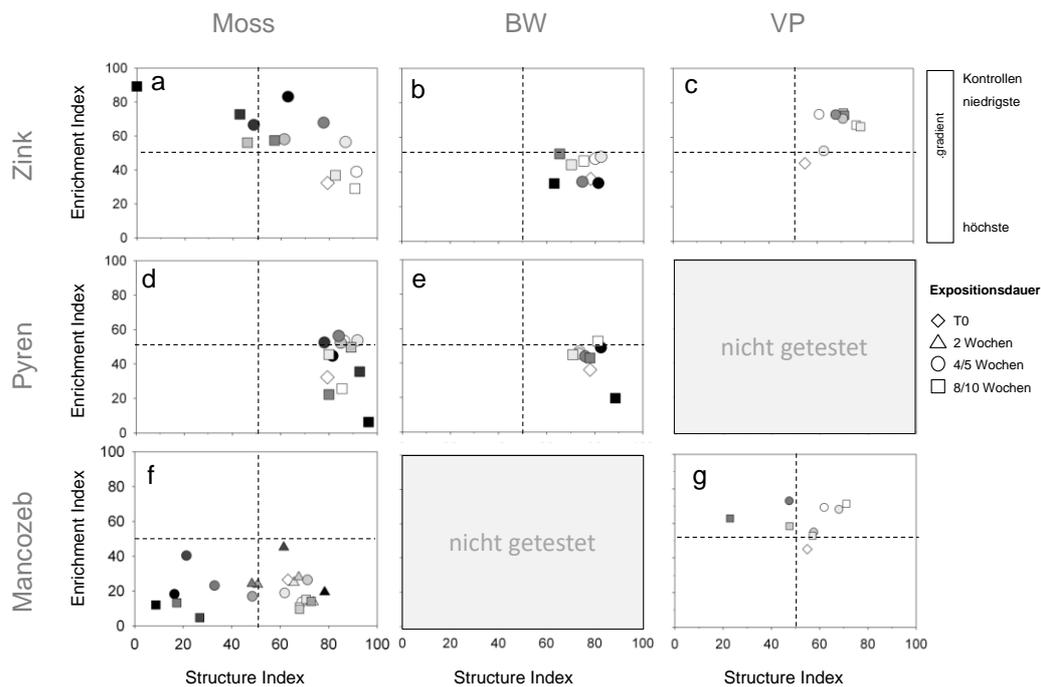


Abbildung 28: Faunaprofil (EI vs. SI; nach Ferris et al., 2001) für Nematoden-Communities aus Mikrokosmen-Experimenten mit verschiedenen Bodentypen (Moss = De Mossel; BW = Büchelberger Wiese; VP = Vredepeel), die mit unterschiedlichen Substanzen (Zn, Pyren, Mancozeb) behandelt wurden; a = V2: Zn in Moss; b = V2: Zn in BW; c = V3: Zn in VP; d = V2: Pyren in Moss; e = V2: Pyr in BW; f = V4: Mancozeb in Moss; g = V3: Mancozeb in VP.

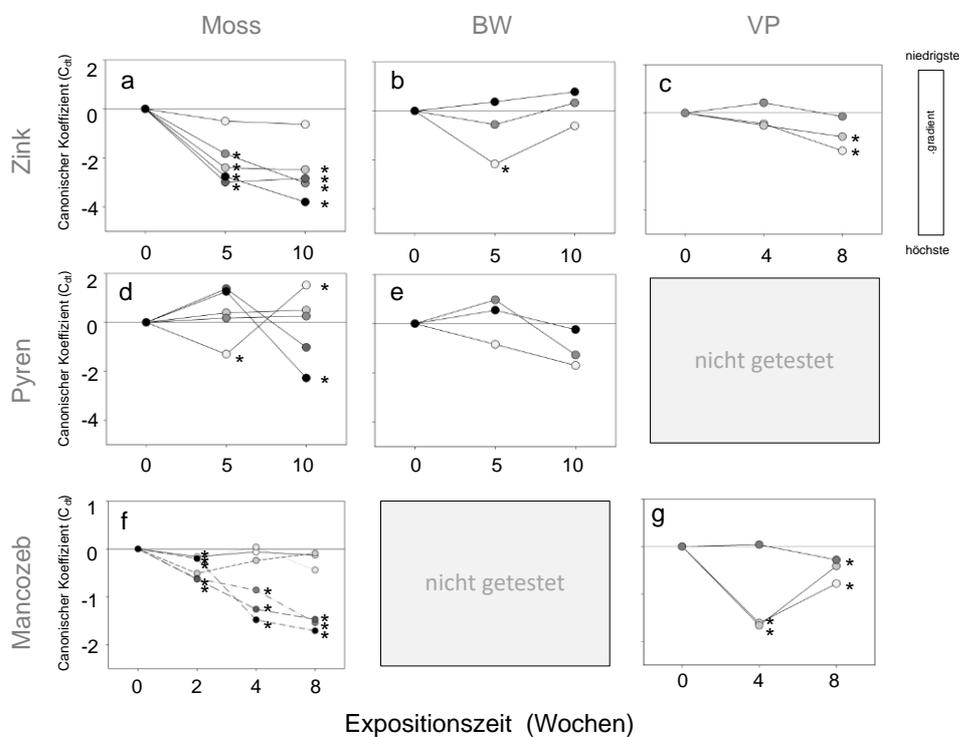


Abbildung 29: Principle Response Curves (PRCs) basierend auf der relativen Gattungszusammensetzung von Nematoden-Communities aus Mikrokosmen-Experimenten mit verschiedenen Bodentypen (Moss = De Mossel; BW = Büchelberger Wiese; VP = Vredepeel), die mit unterschiedlichen Substanzen (Zn, Pyren, Mancozeb) behandelt wurden; a = V2: Zn in Moss; b = V2: Zn in BW; c = V3: Zn in VP; d = V2: Pyren in Moss; e = V2: Pyr in BW; f = V4: Mancozeb in Moss; g = V3: Mancozeb in VP.

4.5.5 Vergleich der Wirkungen zwischen Schadstoffen und Böden

Das Design der Mikrokosmenversuche in diesem Projekt erlaubte es sowohl, die Wirkung verschiedener Chemikalien in einem Boden, als auch die Wirkung einzelner Chemikalien in verschiedenen Böden zu vergleichen. Diese Vergleiche brachten interessante Aspekte der Interpretierbarkeit und Standardisierbarkeit von Mikrokosmenstudien hervor, die hier nun erörtert werden sollen.

Vergleicht man die Wirkung von Zn, Pyren und Mancozeb auf Nematoden-Communities eines bestimmten Bodens (in diesem Fall Moss-Boden), also Nematoden-Communities mit einer charakteristischen Artenzusammensetzung, kann man erkennen, dass die Schadstoffe nicht nur hinsichtlich ihrer Wirkungsstärke (Effekt-Quantität), sondern auch hinsichtlich ihrer Wirkungsart (Effekt-Qualität) unterschiedlich verhalten (Abb. 30). Wie erwartet zeigten Zn und Mancozeb einen negativen, hemmenden Effekt auf den Maturity Index (Abb. 30A). Der Maturity Index zeigt eine direkte toxische Wirkung mit abnehmenden Werten an (Abnahme von empfindlichen Taxa mit einer hohen cp-Wert: cp 3-5). Dabei reagierte die Nematoden-Community deutlich sensibler auf Mancozeb als auf Zink. Erstaunlicherweise konnte bei der Wirkung von Pyren eine Zunahme des MI beobachtet werden (Abb. 30A), was nicht mit einer direkten toxischen Wirkung von Pyren auf die Nematoden erklärt werden kann. Hier haben wahrscheinlich indirekte Nahrungsnetzeffekte (z.B. Wirkung von Pyren auf Nahrungsquelle) eine Rolle gespielt (Blakely et al., 2002; Erstfeld and Snow-Ashbrook, 1999).

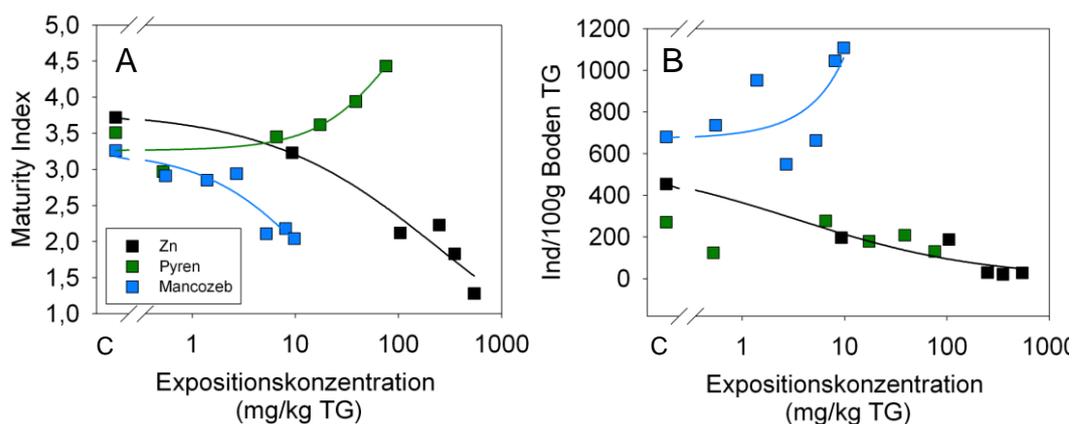


Abbildung 30: Maturity Index und Gesamtabundanz (Ind/100g Boden TG) berechnet für Nematoden-Communities in Mikrokosmen in welchen Moss-Böden mit verschiedenen Substanzen (Zn, Pyren, Mancozeb) in verschiedenen Konzentrationen behandelt wurde; die Datenpunkte wurden mit sigmoidalen Funktionen gefittet: sigmoide Funktion: MI vs Pyr: $p = 0,046$, $r^2 = 0,87$; Abund vs Mancozeb: $p = 0,29$, $r^2 = 0,45$, bzw. logistische Funktion: MI vs Zn: $p = 0,0121$, $r^2 = 0,95$; Abund vs Zn: $p = 0,026$, $r^2 = 0,91$; MI vs Mancozeb: $p = 0,0151$, $r^2 = 0,88$.

Betrachtet man den Parameter Gesamtabundanz der Nematoden, sieht man ebenfalls unterschiedliche Effekte der drei verschiedenen Substanzen. Während Zn einen klaren hemmenden Effekt auf die Gesamtabundanz hatte, zeigte Pyren keinen und Mancozeb einen tendenziell fördernden Effekt (Abb. 29B). Man kann daraus folgern, dass Zn wohl auf alle Nematoden einen direkten toxischen Effekt hatte (Abnahme der Abundanz), die empfindlichen K-Strategen (cp-3-5) aber noch stärker betroffen waren (Abnahme MI). Pyren hatte wohl einen (indirekten) Effekt auf die Community, der zu einer Verschiebung der funktionellen Gruppen der Nematoden zur Folge hatte (Förderung der K-Strategen), was sich aber nicht auf die Gesamtabundanz auswirkte. Mancozeb hingegen hatte einen selektiven direkten toxischen Effekt auf die K-Strategen (Abnahme MI). Die r-Strategen (vor allem cp-

2-Taxa) profitierten hingegen von der Mancozeb-Belastung und konnten sich stärker Vermehren als in der Kontrolle (Zunahme der Abundanz).

Es ist wichtig festzuhalten, dass komplexe Arten-Gemeinschaften auch komplexe Antworten auf die Behandlung mit Schadstoffen geben können. Die alleinige Betrachtung einzelner Community-Parametern (z.B. nur Gesamtabundanz) kann zu falschen Schlussfolgerungen führen. Deshalb ist es wichtig, die Bewertung von Effekten auf Nematoden-Communities auf mehrere, trait-basierte Indices zu stützen.

Vergleicht man die Wirkung einzelner Chemikalien in den verschiedenen Böden, kann deutliche Unterschiede erkennen (Abb. 31). Die Nematoden-Community aus dem Moss-Boden zeigte die stärkste Reaktion auf das Metall Zn. Dies ist deutlich sichtbar für die beiden Community-Parameter Gesamtabundanz (Abb. 31A) und Maturity Index (Abb. 31B). Die Reaktion der Communities aus VP-Boden fiel bereits deutlich geringer aus. Hier konnten lediglich Effekte auf die Gesamtabundanz beobachtet werden, wobei der Maturity Index keine Reaktion zeigte. In BW-Boden war der geringste Effekt auf die Nematoden zu verzeichnen. Der Vergleich von Moss- und VP-Boden hinsichtlich der Wirkung von Mancozeb zeigte keinen Unterschieden hinsichtlich der Empfindlichkeit der beiden Communities. Obwohl die Nematoden hinsichtlich der Gesamtabundanz qualitativ anders auf Mancozeb reagierten (leichter hemmender Effekt in VP; leichter fördernder Effekt in Moss), liegt der Effekt im gleichen Konzentrationsbereich (Abb. 31C). Für den MI ähneln sich die Dosis-Wirkungskurven stark (Abb. 31D). Zwei Begründungen könnten für Unterschiede in der Wirkung zwischen Böden herangezogen werden:

- (a) Unterschiede in der Bioverfügbarkeit: Da die Böden sich hinsichtlich der Textur (Korngrößenverteilung) und des organischen Gehalts voneinander unterschieden (Tab. 3), war zu erwarten, dass die Schadstoffe in unterschiedlichem Maße an die Bodenpartikel binden und somit der verfügbaren gelösten Fraktion im Porenwasser entzogen werden. Feinkörnige Böden mit hohem organischen Gehalt haben dabei wohl die beste Bindungskapazität für Metalle und organische Schadstoffe (Hodson et al., 2011). Vergleicht man die Bodeneigenschaften von Moss, BW und VP, würde man im sandigen Moss-Boden mit relativ geringem Tonanteil (1,8) und organischen Anteil (4,6%) die höchste Bioverfügbarkeit und vom schluffig-lehmigen BW-Boden mit deutlich höherem organischen Anteil (10%) die niedrigste Bioverfügbarkeit erwarten. Im VP-Boden, der als sandiger Boden eher dem Moss-Boden gleicht, aber innerhalb der Sandfraktion deutlich höhere Gehalte an feinem Sand (< 200 µm) aufwies, sollte hinsichtlich der Bioverfügbarkeit zwischen diesen beiden Böden liegen.

Die Toxizitätstests mit *C. elegans*, anhand deren Ergebnisse sich direkt die Bioverfügbarkeit der Schadstoffe ablesen lässt, zeigte für Zn und Pyren, bei gleichen Konzentrationen, erwartungsgemäß eine etwas geringere Toxizität (= Bioverfügbarkeit) in VP- als in Moss-Boden (Abb. 27A). Die Toxizität im BW-Boden war allerdings, unerwarteter Weise, höher als in den anderen Böden. Für den Unterschied der Zn-Effekte in den Mikrokosmen zwischen den Böden könnte bei VP die Bioverfügbarkeit eine Rolle gespielt haben, beim BW-Boden eher nicht. Für Mancozeb zeigten die Toxizitätstests mit *C. elegans* eine höhere Toxizität in VP- als in Moss-Boden (Abb. 27B), was auch eine höhere Bioverfügbarkeit nahelegt. Eine etwas feinere Textur scheint hier die Verfügbarkeit (partikuläre Aufnahme?) begünstig zu haben. Falls auch in den Mikrokosmen die Bioverfügbarkeit von Mancozeb im VP-Boden höher war als im Moss-Boden, muss ein anderer Faktor (siehe Punkt (b)) dagegengewirkt haben, so dass letztlich kein Unterschied in der Empfindlichkeit der Nematoden-Communities der beiden Böden zu sehen war (Abb. 31D).

- (b) Empfindlichkeit/Toleranz der Nematoden-Community: Die Struktur der Nematodenlebensgemeinschaften in den drei verschiedenen Böden unterschied sich deutlich voneinander (Abb. 6-

9; Abb. 26). Dies liegt sowohl am Bodentyp (Bodeneigenschaften, Nutzung, etc.) als auch an der Hintergrundbelastung mit Schadstoffen. Auch wenn letzteres durch die sorgfältige Auswahl der Standorte verhindert werden sollte, kann eine geogene Hintergrundbelastung mit natürlich vorkommenden Elementen, wie z.B. Zn, nicht ausgeschlossen werden. Die chemische Analyse von Zn in den Böden der Kontrollmikrokosmen ergaben deutlich erhöhte Zn-Konzentrationen im BW- im Vergleich zu den anderen beiden Böden (Tab. 8). Da eine geringere Bioverfügbarkeit von Zn im BW-Boden ausgeschlossen werden konnte (siehe Punkt (a)), ist es wahrscheinlich, dass die Nematoden-Community im BW-Boden aufgrund der Zn-Hintergrundbelastung eine höhere Toleranz gegenüber diesem Metall aufwies. Kontaminations-induzierte Community-Toleranz (PICT = pollution-induced community tolerance) konnte für Nematoden-Communities bereits experimentell nachgewiesen werden (Millward and Grant, 2000).

Vergleicht man die beiden Nematoden-Communities von Moss- und VP-Boden, kann man erkennen, dass der VP-Boden deutlich weniger Schadstoff-empfindliche Taxa enthielt (MI bei T0 = 2.3) als der Moss-Boden (MI bei T0 = 2.6 -2.9). Dies könnte beim Zn-Experiment, zusätzlich zur geringeren Bioverfügbarkeit, zur geringeren Zn-Toxizität auf die Nematoden-Community als im Moss-Boden beigetragen haben. Geht man von einer höheren Mancozeb-Bioverfügbarkeit im VP-Boden aus, könnte die höhere Stress-Toleranz der Nematoden-Community im VP-Boden (geringerer MI) erklären, warum die Nematoden im Vergleich zum Moss-Boden trotzdem nicht stärker auf Mancozeb reagierten (Abb. 31D).

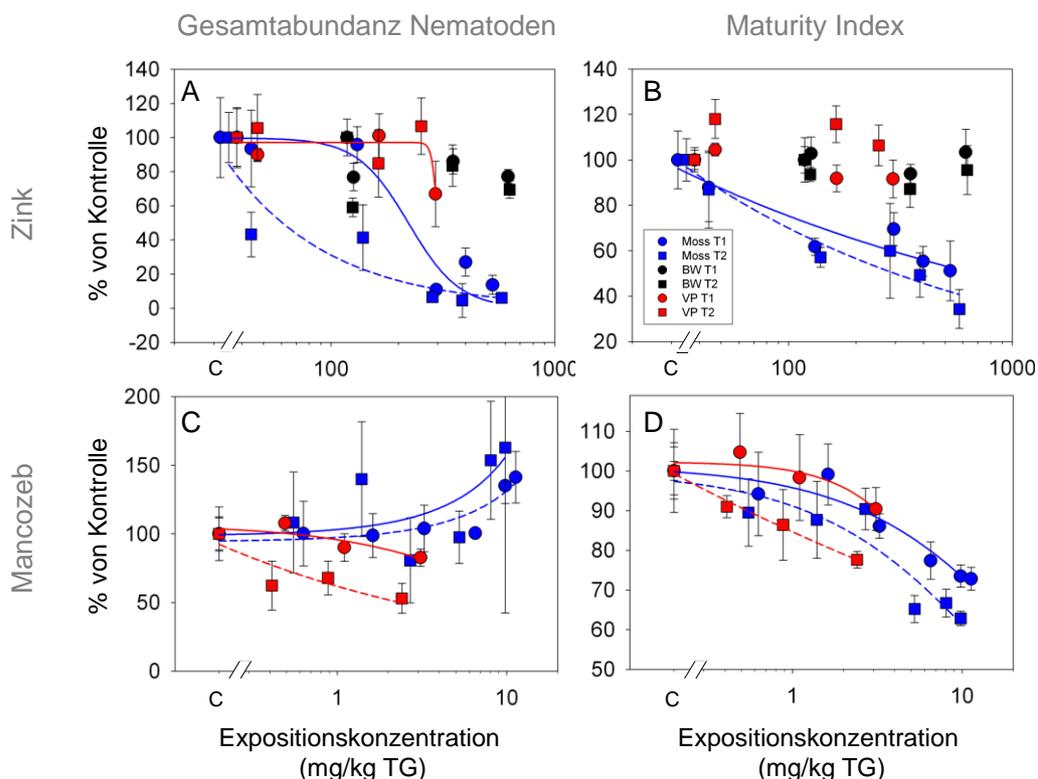


Abbildung 31: Vergleich der Reaktion verschiedener Nematoden-Communities (i.e. native Communities verschiedener Böden) auf Zn (A, B) und Mancozeb (C, D) hinsichtlich der Gesamtabundanz (A, C: als % von Kontrolle) und Maturity Index (B, D: als % von Kontrolle).

4.5.6 Sensitivität der verschiedenen Community-Parameter/Indices

Ob ein bestimmter Community-Parameter (bzw. -Index) in der Lage ist, den toxischen Effekt eines Schadstoffs für Bodennematoden darzustellen, ist nicht nur von der physiologischen Sensitivität bestimmter Indikatortaxa, bzw. der geeigneten Auswahl der Indikatoren, sondern auch von der statistischen Trennschärfe abhängig. Ein Maß für die statistische Trennschärfe ist der „minimal detektierbare Unterschied“ (MDD = Minimal Detectable Difference), welcher auf der Variabilität eines Index zwischen den Replikaten der Kontrolle und aller Behandlungen beruht (van der Hoeven, 2008).

Bis auf wenige Ausnahmen (EI) liegen die mittleren %MDD-Werte aller Indices <30 (Tab. 12). In Bezug auf die In-Field Schutzziele der EFSA können damit bereits geringe Effekte ermittelt werden (EFSA, 2017), während das für Regenwürmer und Collembolen nicht möglich war (Mack et al., 2016; Römbke et al., 2020; Scholz-Starke et al., 2013; Vollmer et al., 2016). Damit werden auch Ergebnisse früherer Studien bestätigt werden, dass Nematoden-basierte Indices in Mikrokosmen- und TME-Studien eine hohe Trennschärfe haben (Höss et al., 2014; Scholz-Starke et al., 2013). Dies kann auch an den vergleichsweise hohen Abundanzen der Nematoden im Freiland und in Mikrokosmen liegen, da es bekannt ist dass der %MDD mit der Zunahme an gezählten Individuen abnimmt (Brock et al., 2015). Allerdings variierte der %MDD deutlich (1) zwischen den verschiedenen Indices, aber auch zwischen den verschiedenen Böden und Chemikalien (Tab. 12). Dabei bestimmt die Zusammensetzung der Nematoden-Community in den verschiedenen Böden, zu mindest zum Teil, welcher Index am sensitivsten für eine bestimmte Substanz ist. Z.B. ist im Moss-Boden der EI nicht in der Lage geringe bis mittlere Effekte von Zn und Pyren zu detektieren, da der %MDD >80% liegt. Im Gegensatz dazu war der %MDD von EI im BW-Boden <40, so dass Pyren-induzierte Effekte mit dem EI ermittelt werden konnten.

Tabelle 12: %MDD (minimal detectable difference; Mittelwert \pm Standardabweichung) für Nematoden-Community-Parameter (Index), die für Mikrokosmentests berechnet wurden, die mit verschiedenen Böden und Schadstoffen durchgeführt wurden (Zn = Zink, Pyr = Pyren, M = Mancozeb, Ca = Car bendazim); für die MDD-Berechnung wurden die Wasserkontrollen (Zn), bzw. die Lösungsmittelkontrollen (Pyr, M, Ca) als Referenz verwendet; n = 4 ($t_{krit} = 1.94$); MI = Maturity Index, MI2-5 = MI ohne cp-1, EI = Enrichment Index, SI = Structure Index.

Index	De Mossel			Büchelberger Wiese		Vredepeel		
	Zn	Pyr	M	Zn	Pyrene	Zn	M	Ca
Abundanz	21 \pm 8	53 \pm 14	34 \pm 22	10 \pm 3,4	17 \pm 8,8	23 \pm 2,9	19 \pm 7,0	23 \pm 8,3
MI	15 \pm 4,6	22 \pm 5,2	9,0 \pm 3,2	11 \pm 2,5	20 \pm 3,3	8,6 \pm 1,8	14 \pm 3,3	13 \pm 3,9
MI2-5	16 \pm 4,5	21 \pm 2,3	10 \pm 2,1	11 \pm 2,8	19 \pm 2,4	9,9 \pm 3,1	11 \pm 3,5	11 \pm 4,4
EI	88 \pm 26	80 \pm 35	105 \pm 40	36 \pm 9,4	39 \pm 9,5	16 \pm 5,5	21 \pm 5,3	25 \pm 9,6
SI	23 \pm 17	17 \pm 5,7	14 \pm 4,7	15 \pm 7,1	19 \pm 3,3	17 \pm 7,6	25 \pm 9,1	35 \pm 10

Der Maturity Index (MI, MI25) erwies sich als Index mit der höchsten Trennschärfe (niedrigster %MDD) für alle Böden und Chemikalien und ist deswegen wohl der verlässlichste Endpunkt, um Effekte von Chemikalien auf Bodennematoden zu detektieren. Das stimmt auch mit der Aussage früherer Studien mit Protein-basierten Insektiziden (Höss et al., 2014) und dem Fungizid Fludioxonil (Haegerbaeumer et al., 2019; siehe auch Kapitel 4.4) in den auch hier verwendeten Mikrokosmensystemen überein.

4.5.7 Vergleich der Sensitivität von Nematoden-Communities mit anderen Organismengruppen

Um die Toxizitätsschwellenwerte (NOEC) für die Nematoden-Community dieser Studie mit anderen Nematodenstudien und mit Daten anderer Organismengruppen vergleichen zu können, wurden für jede getestete Substanz die Ergebnisse des Bodens verwendet, der die niedrigste NOEC ergab. Als Toxizitätseindpunkt wurde der jeweils empfindlichste Parameter verwendet.

Die Ergebnisse dieser Studie sind, falls vorhanden, gut mit anderen Nematodenstudien vergleichbar (Tab. 13). Vergleicht man die NOEC_{Community}-Werte der Nematoden dieser Studie mit NOEC-Werten anderer Organismengruppen sind die Werte deutlich geringer (Zn) oder vergleichbar (Pyren, Mancozeb, Carbendazim) mit den Werten für Oligochaeten oder Collembolen, beides Gruppen von Invertebraten, die routinemäßig für die Risikobewertung von Pestiziden herangezogen werden.

Tabelle 13: Vergleich von NOEC-Werten (mg/kg) verschiedener Studien mit Nematoden-Communities und anderen Organismengruppen (Single-Species und TME-Tests) für Zn, Pyren, Mancozeb und Carbendazim; a.i. = active ingredient; TG = Trockengewicht.

Organismengruppe	Zn	Pyren	Fludioxonil	Mancozeb	Carbendazim
	mg a.i. /kg Boden TG				
Nematoden	44 ^a /56 ^b /100 ^c	16 ^a	14 ^{a,g}	0,41 ^a	< 1,0 ^{a*} / 1.5 ^{j,**}
Oligochaeten	>1360 ^d	29 ^f	≥20 ^h	0,2/<2 ⁱ	1,5 ^k /4,3 ^{l,**}
Collembolen	1000 ^e	10-20 ^f	14	<2 ⁱ	0,48 ^{m,**}

^a diese Studie (* nominelle Konzentration); ^b (Smit et al., 2002); ^c (Korthals et al., 1996); ^d (Kools et al., 2005); ^e (Smit et al., 1997); ^f (Sverdrup et al., 2002); ^g (Haegerbaeumer et al., 2019); ^h (EFSA, 2007); ⁱ (Camargo Carniel et al., 2019); ^j (Moser et al., 2004a); ^k (Römbke et al., 2004); ^l (Moser et al., 2004b); ^m (Koolhaas et al., 2004); ** Konzentrationen wurden in der Originalpublikation in kg/ha angegeben und in mg/kg umgerechnet (bezogen auf die oberste 5cm-Schicht und unter Annahme eines Masse/Volumen-Verhältnis von 1,5; BVL 2021).

4.6 Standardisierung der Testsysteme

Für die routinemäßige Anwendung eines Testsystems ist es wichtig, mögliche Unsicherheitsfaktoren auszuschließen, die die Variabilität der Testergebnisse erhöhen. Kontrollierbare Testbedingungen können dabei relativ gut konstant gehalten werden, da die Versuche im Klimaschrank durchgeführt werden können. Folgende Bedingungen wurden definiert:

- Temperatur: 15 (±2) °C
- Bei geschlossenen Testgefäßen ist es nicht notwendig die Testkammer zu befeuchten.
- Ein kleines Loch im Deckel (1-2mm Durchmesser) reicht für die Sauerstoffversorgung aus.
- Die Testdauer kann bis zu 10 Wochen betragen.
- Die taxonomische Bestimmung von 50 Nematoden pro Replikat reicht für die Errechnung der meisten Indices aus (Ausnahme: Artenreichtum).

Die Versuche zeigten deutlich, dass es schwierig ist alle Unsicherheitsfaktoren auszuschalten bzw. zu standardisieren. Die Zusammensetzung der Nematoden-Community hatte einen klaren Einfluss auf deren Sensitivität des Testsystems. Da die Zusammensetzung der Nematoden-Community von Boden zu Boden verschieden ist, kann es je nach Typ des verwendeten Bodens zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen und so zu großen Schwankungen hinsichtlich der Toxizitätsschwellenwerten. Durch die Aufstellung bestimmter Kriterien könnte aber die Variabilität gesenkt werden:

- Auswahl von Bodentypen mit einem beschränkten Bereich bestimmter Eigenschaften (organischer Gehalt, Korngrößenverteilung). Dies wird auch bei Lower-Tier-Toxizitätstests verlangt. Auch hier sind die Kontrollböden, die zur Chemikalienprüfung dotiert werden, genau definiert. Sollen verschiedene Böden verglichen werden, müssen die Eigenschaften berichtet werden.
- Eine erhöhte Hintergrundsbelastung in den Böden (besonders mit der zu testenden Substanz) sollte vermieden werden, um eine bereits erworbene Toleranz der Bodenorganismen zu vermeiden.
- Die Nematoden-Communities sollten hinsichtlich ihrer strukturellen und funktionellen Zusammensetzung bestimmte Kriterien erfüllen: z.B. Maturity Index >2.5; Lage im Faunaprofil: Quadrate B/C (Structure Index >50); genaue Grenzwerte für die Kriterien müssen erst noch ermittelt werden.

4.7 Vergleich morphologische vs. DNA-basierte Community-Analysis

4.7.1 Gesamtabundanz der Nematoden

Vergleicht man die Zahlen der Gesamtabundanzen der Nematoden in den Proben der Mikrokosmen für die beiden Analysemethoden (DNA- bzw. qPCR-basiert vs. mikroskopisch), sieht man unterschiedlich gute Übereinstimmungen. Am besten ist die Übereinstimmung in den Proben von Versuch 4 (Mancozeb in Moss-Boden; Abb. 32A: weiße Symbole). Die lineare Regression ist statistisch höchst signifikant ($p < 0,001$; $r^2 = 0,54$) und die Steigung der Regressionsgerade liegt bei 0,59, was also eine leichte Unterschätzung der Abundanz mit der qPCR-basierten Methoden anzeigt. Für die Daten der Moss-Proben in Versuch 2 (Zn und Pyren; Abb. 32A: graue und schwarze Symbole) korrelieren die Datenpunkte deutlich schlechter ($r^2 = 0,31$), die Korrelation ist aber immer noch hoch signifikant ($p < 0,01$). Die geringe Steigung von 0,20 zeigt, dass in diesem Versuch die Abundanzen durch die qPCR-basierte Methode deutlich unterschätzt wurden. Nimmt man alle Datenpunkte der Moss-Proben mit in die Korrelationsanalyse, bekommt man höchst-signifikante Korrelation ($p < 0,001$; $r^2 = 0,57$) mit einer Steigung von 1,1. Für den BW-Boden (Versuch 2) gab es eine ähnliche Übereinstimmung der Abundanzdaten zwischen den beiden Methoden wie für die Moss-Proben im gleichen Versuch ($p < 0,05$; $r^2 = 0,34$; Steigung: 0,12; Abb. 32B). Für die Proben aus Versuch 3 (VP-Boden) wurde keine Übereinstimmung der Abundanzdaten gefunden (Abb. 32C).

Wie lässt sich nun z.T. fehlende bzw. mangelhafte Übereinstimmung erklären? Erstmal muss festgehalten werden, dass die Abundanzen der qPCR-basierten Analyse nicht auf der Anzahl der Individuen beruht (wie das bei der mikroskopischen Auswertung der Fall ist), sondern auf der Menge an DNA. Der DNA-Gehalt einer Probe ist aber besser mit der Biomasse als mit der Anzahl der Individuen korreliert. Da sich die einzelnen Individuen bestimmter Taxa stark hinsichtlich ihrer Biomasse unterscheiden (z.B. on average: *Acrobelloides*: 0.15 µg vs. *Anaplectus*: 1.5 µg) kann es hinsichtlich der absoluten Abundanz-Zahlen, je nach taxonomischer Zusammensetzung der Nematoden-Community, zu großen Unterschieden zwischen der qPCR-basierten und der mikroskopischen Analyse. Um trotzdem Effekte auf die Abundanz der Nematoden, bzw. einzelner Taxa zwischen den beiden Analyse-Methoden vergleichen zu können, sollten deshalb relative Werte (im Vergleich zu einer test-internen Kontrolle) herangezogen werden.

Es muss weiterhin beachtet werden, dass im Versuch 2 (Moss- und BW-Boden mit Zn und Pyren) die Nematoden, die für die qPCR-Analyse bestimmt waren, nach der Extraktion aus dem Boden nicht mit Ethanol fixiert wurden, sondern direkt in wässriger Suspension eingefroren wurden. Bei den weiteren Versuchen (V3 und 4) wurden die qPCR-Proben mit Ethanol fixiert, um die Proben bis zur Analyse

länger lagern zu können. Ob durch ungünstige Bedingungen (z.B. Auftauen während des Transports), die Qualität der Proben (bzw. der Nematoden-DNA) gelitten hat, kann nicht ausgeschlossen werden. Dies könnte die schlechtere Übereinstimmung bei den Moss-Proben aus V2 im Vergleich zu V4 erklären (Abb. 32A).

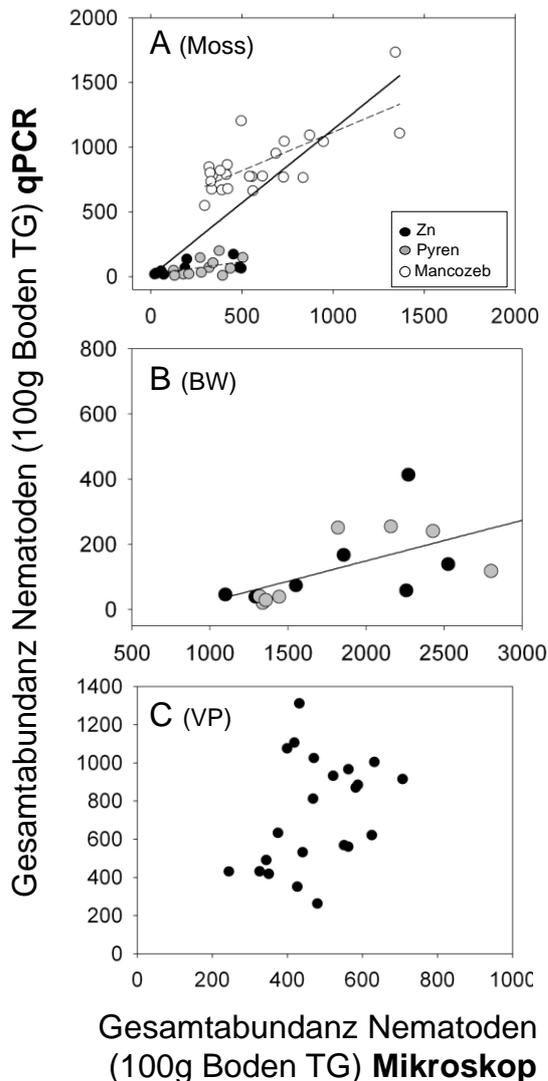


Abbildung 32: Korrelation der Nematodenabundanz (Individuen/100 g Boden), die mit zwei verschiedenen Methoden ermittelt wurde: DNA-basierte q-PCR-Methode vs. Mikroskop; (A) alle Versuche mit Moss-Boden: separate lineare Regressionen für die einzelnen Versuche (gestrichelte Linie; V2 mit Zn und Pyren: $p < 0,001$; $r^2 = 0,54$; V4 mit Mancozeb: $p < 0,001$; $r^2 = 0,54$); lineare Regression für alle Datenpunkte ($p < 0,001$; $r^2 = 0,31$); (B) Versuch mit BW-Boden (V2 mit Zn und Pyren: $p < 0,05$; $r^2 = 0,34$); (C) Versuch mit VP-Boden (kein signifikanter Zusammenhang).

Nimmt man statt der absoluten Abundanz, die relativen Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle, kann man die beiden Methoden (qPCR vs. mikroskopisch) hinsichtlich der beobachteten Effekte der verschiedenen Substanzen direkt vergleichen (Abb. 33 – 35). Grundsätzlich zeigen die beiden Methoden ähnliche Tendenzen (Ausnahme Zn in VP; Abb. 34A). Sowohl die mikroskopische als auch die DNA-basierte Analyse zeigten dosis-abhängige, chemisch-induzierte hemmende Effekte von Zn und Pyren in Moss-Boden (Abb. 33) und von Mancozeb und Carbendazim in VP-Boden. Auch der dosis-abhängige fördernde Effekt von Mancozeb in Moss-Boden konnte mit beiden Methoden abgebildet

werden (Abb. 35). Für Pyren zeigte die DNA-basierte Analyse einen deutlich stärkeren Effekt als die mikroskopische Auswertung. Dieses Ergebnis suggeriert, dass besonders größere Nematoden mit höheren DNA-Gehalten von Pyren beeinträchtigt wurden, ein Unterschied, der deutlicher von der DNA-basierten Methode wahrgenommen wird. Allerdings spricht die pyren-induzierte Zunahme des Maturity Index (Tab. 9) eher gegen diese Theorie, da eher größere Nematodentaxa zu den K-Strategen gehören.

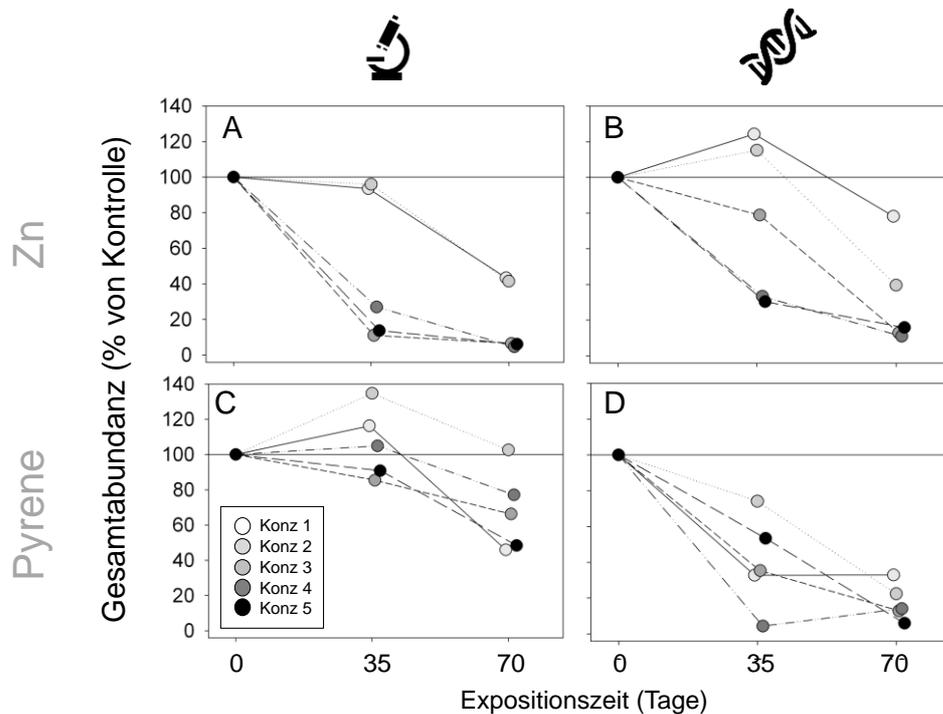


Abbildung 33: Gesamtabundanz der Nematoden in Mikrokosmenversuchen in Moss-Boden mit Zn- (A, B) und Pyrenbehandlung (C, D) mit verschiedenen Methoden ermittelt: Mikroskop (A, C); DNA-basierte q-PCR-Methode (B, D).

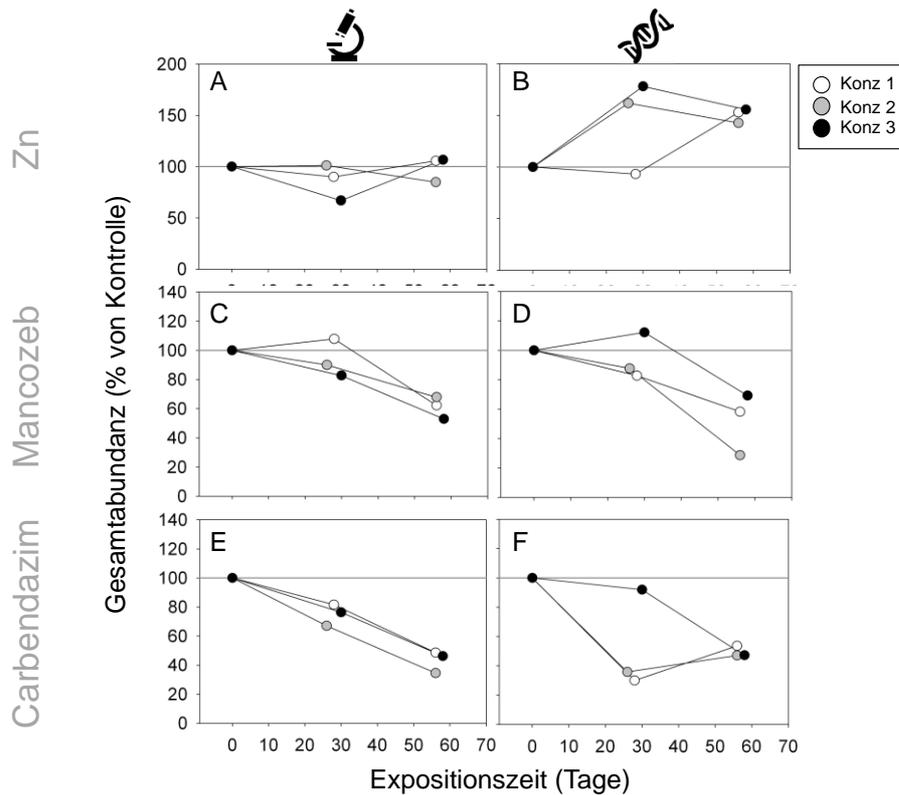


Abbildung 34: Gesamtabundanz der Nematoden in Mikrokosmenversuchen in VP-Boden mit Zn- (A, B), Mancozeb- (C, D) und Carbendazimbehandlung (E, F) mit verschiedenen Methoden ermittelt: Mikroskop (A, C, E); DNA-basierte q-PCR-Methode (B, D, F).

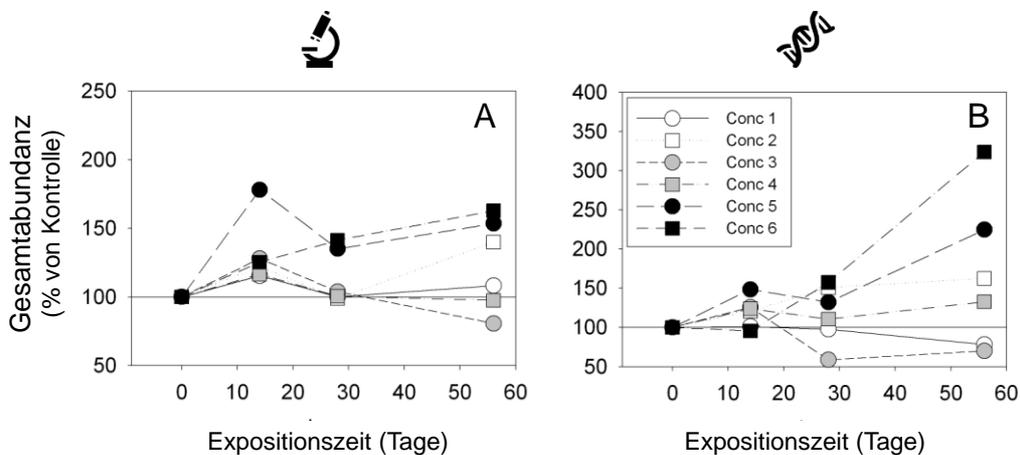


Abbildung 35: Gesamtabundanz der Nematoden in Mikrokosmenversuchen mit Mancozeb mit verschiedenen Methoden ermittelt: Mikroskop (A); DNA-basierte q-PCR-Methode (B).

4.7.2 Abundanz einzelner Taxa

Die detaillierte Gattungszusammensetzung, wie sie anhand der morphologischen Analyse vorliegt, konnte für die DNA-basierte Analyse nicht bestimmt werden, da nur die Abundanz ausgewählte Taxa mittels qPCR-Assay bestimmt werden konnte. Damit konnten auf Basis der qPCR-Daten für Mikrokosmen-Versuche (V2 – V4) auch keine trait-basierten Indices (Ernährungstypen, MI, EI, SI) berechnet werden. Der Vergleich einzelner Taxa hinsichtlich ihrer Reaktion auf die Schadstoffe in den Mikrokosmen war aber möglich. Für diesen Vergleich wurden Taxa mit hohem Informationswert herange-

zogen, wie z.B. K-Strategen mit hohem cp-Wert (cp4-5), die als empfindlich gegenüber chemischem Stress gelten.

1. Mylonchulidae: enthält räuberische/omnivore Nematoden mit einem cp-Wert von 4. Im Moss-Boden identifizierte die morphologische Analyse die Gattung *Mylonchulus* als einzigen Vertreter der Mylonchulidae, für welche ein spezifischer qPCR-Assay existiert.
2. *Aporcelaimellus* ist eine räuberische/omnivore Gattung mit einem cp-Wert von 5 und war auf Basis der morphologischen Analyse eine der dominanten Gattungen im Moss-Boden. Laut Holterman et al. (2008) ist *Aporcelaimellus* ein der dominanten Gattungen D2-Clusters unter den Dorylaimida, für die es einen spezifischen qPCR-Assay gibt.
3. *Ecumenicus* ist eine omnivore Gattung mit einem cp-Wert von 4 und machte, gemäß der morphologischen Analyse, in den Kontrollen des VP-Bodens 5-12% der Gattungen aus. Laut Holterman et al. (2008) ist *Ecumenicus* ein Repräsentant des D1-Clusters unter den Dorylaimida, für die es einen spezifischen qPCR-Assay gibt.

Im Mikrokosmenversuch mit mancozeb-behandeltem Moss-Boden (V4) war klar zu erkennen, dass vor allem K-Strategen (cp3-5) und %Om/Pre von der Behandlung mit Mancozeb betroffen waren. Dies machte sich auch an mancozeb-induzierten sinkenden Werten des MI bemerkbar (Tab. 9). An dieser Community-Reaktion der Nematoden war maßgeblich *Aporcelaimellus* und, zu einem geringeren Anteil, auch *Mylonchulus* beteiligt. Vergleicht man die Abundanzen dieser Gattungen mit den äquivalenten Taxa-Gruppen der qPCR-Analyse (Dorylaimida D2 bzw. D1), kann man einen sehr ähnlichen Trend beobachten. Vor allem in den mittleren bis höheren Konzentrationsstufen (M3-6), ist, im Vergleich zur Kontrolle, ein deutlicher toxischer Effekt von Mancozeb zu erkennen (Abb. 36). Die starken fördernden Effekte auf Mylonchulidae in den niedrigen Konzentrationen (M1, M2) an einzelnen Zeitpunkten (Abb. 36A, B) sollten nicht überbewertet werden. Bei den relativ niedrigen absoluten Abundanzen von *Mylonchulus*, reicht eine geringfügige absolute Erhöhung der Abundanzen aus, um eine relative Erhöhung von mehreren 100% zu erhalten.

Beim Mikrokosmenversuch mit VP-Boden (V3) konnte man sehen, dass die Reaktion der Nematoden-Community schadstoff-spezifisch ausfiel. Während die Zn-Behandlung eine Erhöhung des MI und des Anteils an räuberischen/omnivoren Nematoden bewirkte, wurden genau diese Indices in Anwesenheit von Mancozeb und Carbendazim gehemmt (Tab. 11). An diesem Phänomen waren unter anderem auch die Gattung *Ecumenicus* bzw. Repräsentanten des Dorylaimidae-Clusters D1 beteiligt. Die Zunahme (Zn) bzw. Abnahme (Mancozeb, Carbendazim) der Abundanz dieser Gattung konnte durch beide Analysemethoden gut detektiert werden (Abb. 37).

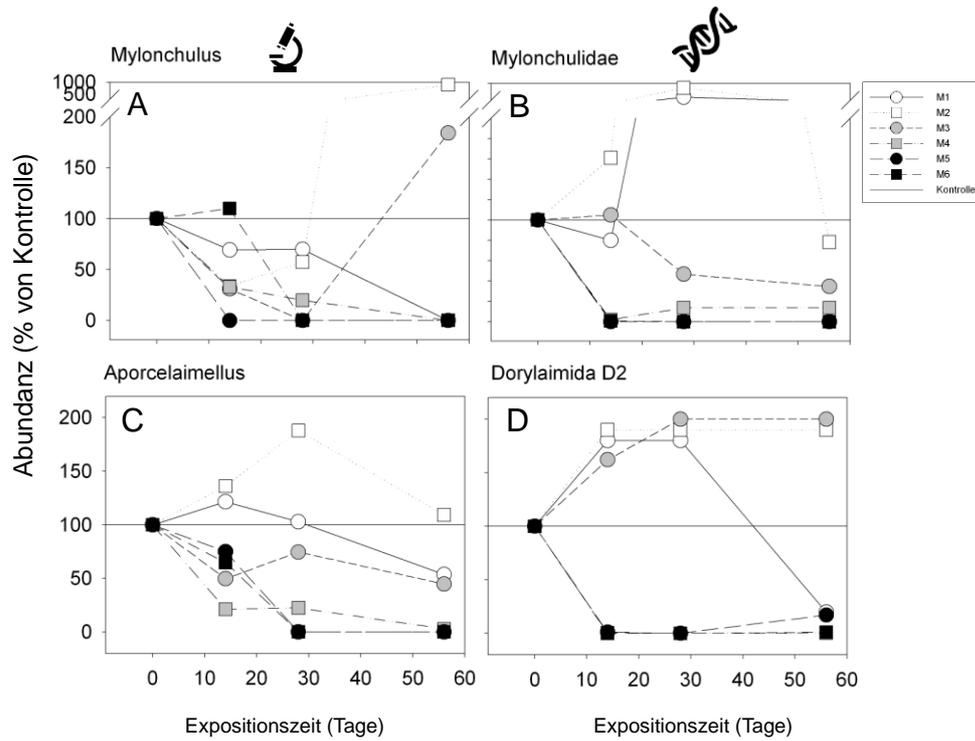


Abbildung 36: Abundanzen bestimmter omnivorer/räuberischer Nematoden-Taxa, die als K-Strategen eingeordnet werden (cp4: Mylonchulus (A) bzw. Mylonchulidae (B); cp5: Aporcelaimellus (C) bzw. Dorylaimidae D2 (D)) in Mikrokosmenversuchen mit Mancozeb mit verschiedenen Methoden ermittelt: Mikroskop (A, C); DNA-basierte q-PCR-Methode (B, D).

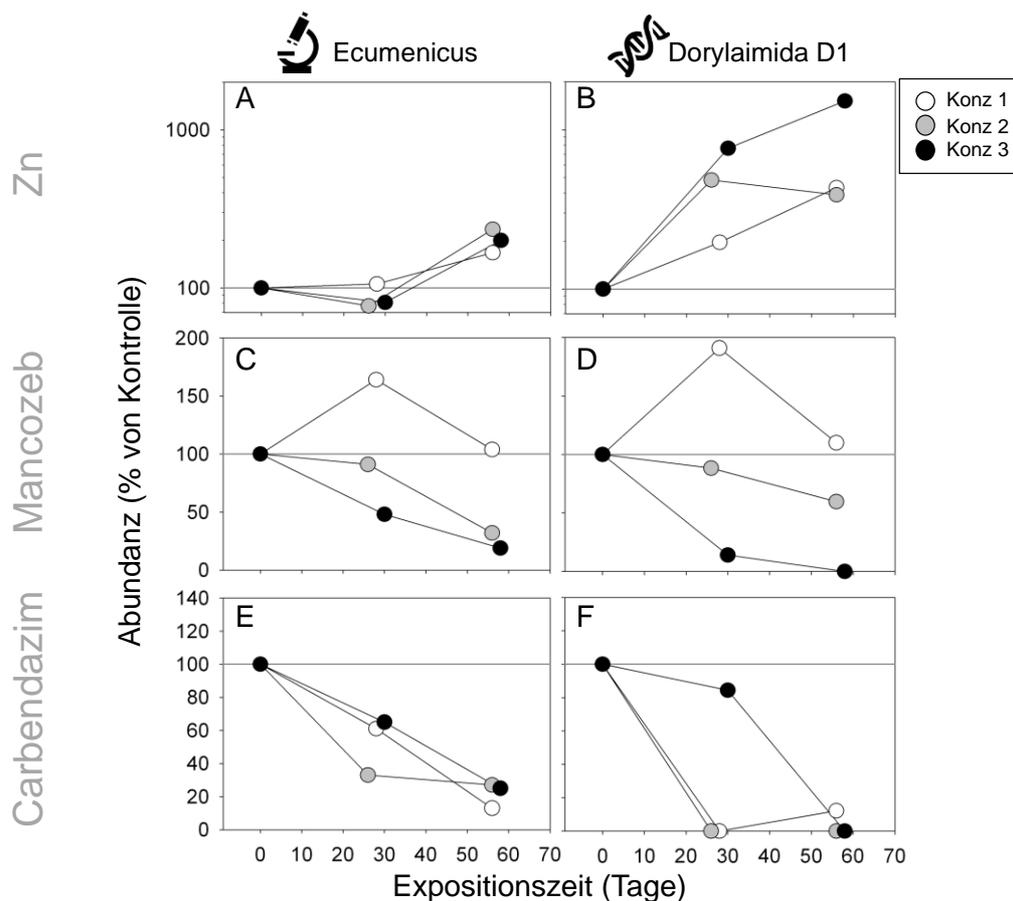


Abbildung 37: Abundanzen von Qudsianematidae (gemäß morphologischer Taxonomie; A, C, E) bzw. Dorylaimida D1 (gemäß qPCR; B, D, F), beides omnivore Nematoden, die als K-Strategen eingeordnet werden (cp4) in Mikrokosmen mit VP-Boden, die mit Zn (A, B), Mancozeb (C, D) und Carbendazim (E, F) behandelt wurden.

Alles in allem ist die Übertragung von Ergebnissen aus mikroskopisch/morphologisch gestützten Analysen von Nematoden-Communities auf ein System, das die DNA dieser Community verwendet, nicht trivial. Es muss berücksichtigt werden, dass „ein individueller Nematode“ – die Einheit, auf die sich die mikroskopische Analyse stützt – sich grundsätzlich von einer bestimmten Menge an DNA unterscheidet. Die Individuen von Nematoden unterschieden sich, je nach Art und Entwicklungsstadium, in ihrer Größe, so dass der DNA-Gehalt wohl besser mit der Biomasse, als mit der Anzahl der Individuen korreliert. Dieses Problem spielt eine weitaus geringere Rolle, wenn einzelne Taxa betrachtet werden. Je niedriger das taxonomische Niveau, desto besser sollte also die Übereinstimmung von mikroskopischen und molekularen Daten werden. Beide Phänomene - die Schwierigkeiten, Daten auf Community-Ebene zu vergleichen, als auch die gute Übereinstimmung auf Gattungsebene – konnten in diesem Projekt beobachtet werden.

5 Fazit

- (1) Die Überprüfung methodischer Details (Testgefäße, Nematodenextraktion) und bestimmter Testbedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit) stellten sicher, dass die angewandte, veröffentlichte Methode für die routinemäßige Anwendung geeignet ist. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass die relativ kleine Stichprobe von Nematoden ($n = 50$ pro Replikat), die für die taxonomische Bestimmung verwendet wird, ausreichend ist, um für die relevanten Community-Indices, die für die Bewertung von Effekten herangezogen werden, robuste und zuverlässige Ergebnisse zu erhalten.
- (2) Erste Pilotversuche zeigten, dass die Gesamtabundanzen von Nematoden im Boden, die mit DNA-basierter qPCR-Technik analysiert wurden, gut mit den Werten der klassischen mikroskopischen Auswertung übereinstimmten. Für den Vergleich der Methoden müssen die Nematoden allerdings zuerst leben extrahiert und dann getrennt mit für die jeweilige taxonomische Methoden geeignete Fixierungsmittel haltbar gemacht werden.
- (3) Mit einem Toxizitätsscreening mit dem Single-Species-Test gemäß ISO 10872:2020 konnten Pestizide ermittelt werden, auf die Nematoden empfindlich reagieren. So konnte ein Vergleich mit anderen Testorganismen angestellt werden, die routinemäßig für die Risikobewertung von Pestiziden verwendet werden (Regenwürmer, Collembolen, Milben). Außerdem konnten so interessante Kandidaten als Testsubstanzen für die Testung im Mikrokosmensystem identifiziert werden. Die Nematoden zeigten sich relativ sensitiv gegenüber allen getesteten Fungiziden. Drei Fungizide wurden deshalb für die Verwendung in den Mikrokosmos-Experimenten ausgewählt (Fludioxonil, Mancozeb, Carbendazim).
- (4) Die kleinräumigen, kostengünstigen Mikrokosmen erwiesen sich als geeignete Testsysteme um die Toxizität verschiedener Schadstofftypen (Metalle, PAKs, Pestizide) auf die native Nematodenfauna in Böden zu untersuchen. Dabei zeigten sich die Nematoden genauso empfindlich, oder sogar empfindlicher als andere Organismengruppen (Regenwürmer, Collembolen).
- (5) Für die Quantität und die Qualität des Effekts spielt eine große Rolle, welcher Boden für die Verwendung in den Mikrokosmen herangezogen wird. Dabei sind unter anderem Bodeneigenschaften zu berücksichtigen, die die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen beeinflussen können (Textur, organischer Gehalt). Als wichtiger erwies sich allerdings die Zusammensetzung der nativen Nematoden-Community in den verschiedenen Böden; z.B. waren Communities aus Böden mit einer relativ hohen Zn-Hintergrundkonzentration als deutlich toleranter gegenüber der Behandlung mit Zn als Communities aus Böden mit niedriger Hintergrundbelastung.
- (6) Bestimmte funktionelle Gruppen der Nematoden-Community reagierten unterschiedlich auf bestimmte Schadstoffe. Während als empfindlich eingestufte K-Strategen mit zunehmender Zn-Belastung deutlich an Bedeutung verloren (Abnahmen des Maturity Index), konnten sie vom Schadstoff Pyren profitieren (Zunahme des Maturity Index). Dies legt nahe, dass in den Mikrokosmen nicht nur direkte Toxizität (Zn), sondern auch indirekte Nahrungseffekte (Pyren) detektiert werden können.
- (7) Der Maturity Index erwies sich als einer der empfindlichsten Community-Parameter (Toxizitätspunkte) zur Erfassung von schadstoff-induzierten Veränderungen in Nematoden-Communities.
- (8) Auch mit einer DNA-basierter Analyse der Nematoden-Community konnten Effekte der untersuchten Schadstoffe detektiert werden. Auch wenn absolute Abundanzen aller Nematoden o-

der bestimmter Taxa, die mit qPCR ermittelt wurden, nicht direkt mit den mikroskopisch bestimmten Daten übereinstimmen, sind die relativen Veränderungen zur Kontrolle vergleichbar.

6 Ausblick

Das Testsystem der kleinräumigen Mikrokosmen erwies sich als zuverlässig, Schadstoff-induzierte Effekte auf relevante Bodenorganismen unter relativ komplexen, aber ökologisch realistischen Bedingungen anzuzeigen. Wie in den meisten Forschungsprojekten ergaben sich auch hier neue Problem- und Fragestellungen, die in zukünftigen Forschungsprojekten aufgegriffen werden sollten.

- (1) Wie können unter den komplexen Bedingungen eines Mikrokosmos-Testsystems (komplexe Bodenmatrix; native Lebensgemeinschaften) Unsicherheitsfaktoren reduziert werden?
Auch wenn es gelungen ist, die Testbedingungen zu einem gewissen Grad zu standardisieren und Kriterien aufzustellen, die Variabilität des Testsystems zu reduzieren, sollte weiter nach Wegen gesucht werden, zwei wichtige Faktoren der Toxizitätsermittlung – Bioverfügbarkeit der Schadstoffe und Toleranz der getesteten Community – getrennt voneinander zu untersuchen. Eine bereits im Bericht genannten Möglichkeiten wäre, die mit dem Schadstoff behandelte Bodenmatrix zu standardisieren und mit verschiedenen, aus unterschiedlichen Böden extrahierten Nematoden zu inokkulieren (siehe auch Wagg et al., 2014)). Dies birgt aber methodische Herausforderungen, die überprüft werden müssen.
- (2) Können die Ergebnisse aus kleinräumigen Mikrokosmen auf Feldbedingungen übertragen werden?
Auch wenn die hier verwendeten Testsysteme im Vergleich zu Single-Species-Tests deutlich realistischer sind (Multispecies-Systeme; Abbildung von indirekten Nahrungsnetzeffekten), handelt es sich doch um kontrollierte Laborsysteme, die auch nur den Blick auf einen bestimmten Ausschnitt des Nahrungsnetzes erlauben. Auch wenn genau diese Kontrolle für ein intermediate Tier Test gewollt ist, stellt sich die Frage, ob sich die Mechanismen in diesen Mikrokosmen auf größere Testsysteme (z.B. TME = Terrestrial Model Ecosystems) hochskalieren lassen, die auch noch andere Organismengruppen der Mesofauna mitberücksichtigen können. Hier wäre es sinnvoll vergleichende Untersuchungen in verschieden dimensionierten Testsystemen mit zunehmender Komplexität (vom Single-Species-Test bis zum Feldversuch) anzustellen.
- (3) Kann auch die genaue Zusammensetzung von Nematodentaxa, bzw. bestimmter funktioneller Gruppen einer Nematoden-Community in den kleinräumigen Mikrokosmen durch DNA-basierte Analyse bestimmt werden, so dass auch Stress-Indices berechnet werden können?
Prinzipiell konnte bereits gezeigt werden, dass auch trait-basierte Indices mittels DNA-basierter Taxonomie ermittelt werden können, sowohl für Süßwassersysteme (Schenk et al., 2020) als auch für terrestrische Habitats (Du et al., 2020; Geisen et al., 2018). Allerdings wurden hier andere Methoden verwendet (Next-Generation Sequencing), die bei der Planung dieses Projekts noch nicht zur Verfügung standen. Zu Beginn dieses Projekts war die Verwendung von einer Reihe von taxon-spezifischen qPCR-Assays die bestverfügbare Option, um Effekte von Schadstoffen auf Bodennematoden zu quantifizieren. An der Universität Wageningen wurde ein relativ breites Spektrum an Assays entwickelt, um Bodenproben aus dem Feld routine-mäßig zu analysieren (Quist et al., 2016; Vervoort et al., 2012). Obwohl die Palette an 75 spezifischen qPCR-Assays angewandt wurde, konnte in den Bodenproben der Mikrokosmen nur ein relativ kleiner Teil der tatsächlichen nativen Nematodentaxa gefunden werden. Mittlerweile wurden neue Hochdurchsatzverfahren entwickelt (MiSeq Sequencing; Oxford Nanopore Sequencing), die andere Möglichkeiten der Community-Analyse bieten. Im Gegensatz zu taxon-spezifischen Real-Time qPCR-Assays, die nur das Taxon finden können nach dem man sucht, sind Sequenzieretechniken in der Lage, alle Taxa in einer Probe zu identifizieren. Allerdings hat z.B. MiSeq den Nachteil das nur kurze Reads erzeugt werden, so dass eine taxonomische Auflösung auf Gattungsebene nicht immer möglich ist. Auch in diesem Projekt ist für den letzten Mikrokosmenversuch ein Pilotexperiment mit MiSeq gemacht worden. Obwohl in anderen Studien gezeigt wurde, dass mit die-

ser Methode Nematoden-Communities aus Freilandproben gut charakterisiert werden können (z.B. Geisen et al., 2018; Schenk et al., 2020), waren die MiSeq-Ergebnisse aus den Mikrokosmenproben nicht brauchbar. Wahrscheinlich aufgrund der zu geringen Probenmenge (nur 15g Boden) wurden zu wenige und zu kurze DNA-Sequenzen gefunden.

Eine für zukünftige Projekte vielversprechende, miniaturisierte Methode soll in diesem Ausblick noch erwähnt werden. Nanopore Sequencing wurde vor ca. 5 Jahren entwickelt, aber erst kürzlich zu einer zuverlässigen Methode (Baloğlu et al., 2020). Das Verfahren beruht auf der Messung von Leitfähigkeitsänderungen an einer Protein-Nanopore in einer Membran, durch die ein Einfachstrang der DNA geschleust wird. Da die vier Nukleotide der DNA (A, T, C und G) hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit unterschieden, kann so die Reihenfolge der Nukleotide abgebildet werden. Das Nanopore Sequencing erzeugt im Gegensatz zu MiSeq, lange Reads (5 – 10 kb im Vergleich zu 1,7 kb (SSU) oder 2,8 kb (LSU) bei MiSeq), was eine deutlich höhere taxonomische Auflösung ermöglicht. Diese Entwicklung ermöglicht in Zukunft kostengünstige Analysen von Nematoden-Community (sehr kleine Geräte, sog. Flongles: <100g). Erste Studien von komplexen Communities, die mit dieser Technologie analysiert wurden, sind bereits publiziert (D'Andrea et al., 2021; Matsuo et al., 2021; Urban et al., 2021). Auch die beiden Projektpartner dieser DBU-Studie (EcoSsa, Wageningen University) werden im Sommer 2021 erste Pilot-Studien mit dieser neuen Technologie zur Analyse von komplexen Nematoden-Communities starten.

7 Öffentlichkeitsarbeit/Veröffentlichungen/Vorträge

- Haegerbaeumer, A., Raschke, R., **Höss, S.**, Traunspurger, W. (2018) Comparing effects of fludioxonil on non-target invertebrates using ecotoxicological methods from single-species bioassays to model ecosystems, in: SETAC Europe 28th Annual Meeting. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Rome, Italy, p. 448.
- Haegerbaeumer, A., Raschke, R., Reiff, N., Traunspurger, W., **Höss, S.** (2019) Comparing the effects of fludioxonil on non-target soil invertebrates using ecotoxicological methods from single-species bioassays to model ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 183, 109596.
- Haegerbaeumer, A., Raschke, R., Reiff, N., Traunspurger, W., **Höss, S.** (2019) Comparing effects of fludioxonil on non-target invertebrates using ecotoxicological methods from single-species bioassays to model ecosystems, in: SETAC Europe 29th Annual Meeting. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Helsinki, Finland, p. 399.
- **Höss, S.**, Faupel, M. (2019) The sensitivity of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) to pesticides in soil compared to other standard test organisms, in: SETAC Europe 29th Annual Meeting. SETAC Europe, Helsinki, Finland, p. 317.
- **Höss, S.**, Faupel, M., Traunspurger, W., **Helder, J.A.** (2019) Nematode-based tools for assessing soil health, in: SETAC Europe 14th Special Science Symposium: Soil Biodiversity - What Do We Know and How to Protect It from Adverse Effects of Plant Production Products and Other Chemicals. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Brussels, Belgium.
- **Höss, S.**, Reiff, N., Traunspurger, W., **Helder, J.A.** (2021) On the balance between practical relevance and standardization - testing the effects of zinc and pyrene on native nematode communities in soil microcosms. *Science of The Total Environment* (under review).
- **Geplante Publikation:** Höss, S., Reiff, N., Asekunowo, J., Van den Elsen, S., Helder, J.A. (geplant): The risk of the fungicide mancozeb for soil organisms – Intermediate-tier testing in microcosms with soil nematodes.

8 Danksagung

Die Autoren danken der DBU für die Förderung dieses Projekts und vor allem Herrn Dr. Maximilian Hempel und Herrn Dr. Volker Berding für die ausgezeichnete fachliche Betreuung und die sehr inspi-

rierenden und konstruktiven Diskussionen während des Projekts. Weiterhin möchten wir uns bei Frau Heike Stock und Frau Sandra Strelow für die reibungslose verwaltungstechnische Abwicklung des Projekts bedanken.

Frau Dr. Nicola Reiff (Ecosa) und Herrn Prof. Dr. Walter Traunspurger (Universität Bielefeld) standen uns während des Projekts mit ihrer Expertise für Nematodentaxonomie mit Tat und Rat zur Seite.

9 Literatur

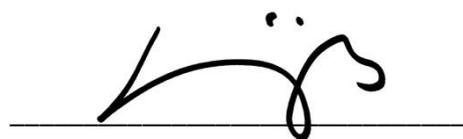
- Alphei, J., Bonkowski, M., Scheu, S., 1996. Protozoa, Nematoda and Lumbricidae in the rhizosphere of *Hordelymus europaeus* (Poaceae): faunal interactions, response of microorganisms and effects on plant growth. *Oecologia* 106, 111–126.
- Andrassy, I., 1984. Klasse Nematoda: Ordnungen Monhysterida, Desmocolocida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida, in: Franz, H. (Ed.), *Bestimmungsbücher Zur Bodenfauna Europas*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, p. 509 pp.
- Andrassy, I., 1992. A short census of free-living nematodes. *Fundamental and Applied Nematology* 15, 187–188.
- Andrassy, I., 2005. Free-living nematodes of Hungary (Nematoda errantia), Vol. 1. Hungarian Natural History Museum, Systematic Zoology Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary.
- Andrassy, I., 2007. Free-living Nematodes of Hungary (Nematode Errantia) Vol. 2. Hungarian Natural History Museum, Systematic Zoology Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary.
- Baloğlu, B., Chen, Z., Elbrecht, V., Braukmann, T., MacDonald, S., Steinke, D., 2020. A workflow for accurate metabarcoding using nanopore MinION sequencing. *bioRxiv*.
- Bardgett, R.D., Cook, R., Yeates, G.W., Denton, C.S., 1999. The influence of nematodes on below-ground processes in grassland ecosystems. *Plant and Soil* 212, 23–33.
- Beare, M.H., 1997. Fungal and bacterial pathways of organic matter decomposition and nitrogen mineralization in arable soil, in: Brussaard, L., Ferrara-Cerrato, R. (Eds.), *Soil Ecology In Sustainable Agricultural Systems*. Lewis Publisher, Boca-Raton, FL, pp. 37–70.
- Blakely, J.K., Neher, D.A., Spongberg, A.L., 2002. Microinvertebrate and microbial communities, and decomposition as indicators of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. *Applied Soil Ecology* 21, 71–88.
- Bongers, T., 1988. *De Nematoden van Nederland*. KNNV Bibliotheekuitgave 46, Pirola, Schoorl, The Netherlands.
- Bongers, T., 1990. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia* 83, 14–19.
- Bongers, T., Bongers, M., 1998. Functional diversity of nematodes. *Applied Soil Ecology* 10, 239–251.
- Bongers, T., Ferris, H., 1999. Nematode community structure as a biomonitor in environmental monitoring. *Trends in Ecology and Evolution* 14, 224–228.
- Boxall, A.B. a, Brown, C.D., Barrett, K.L., 2002. Higher-tier laboratory methods for assessing the aquatic toxicity of pesticides. *Pest management science* 58, 637–48.
- Brock, T.C.M., Hammers-Wirtz, M., Hommen, U., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Roessink, I., Strauss, T., Van den Brink, P.J., 2015. The minimum detectable difference (MDD) and the interpretation of treatment-related effects of pesticides in experimental ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 1160–1174.
- Cairns, J., Lanza, G.R., Parker, B.C., 1972. Pollution related structural and functional changes in aquatic communities with emphasis on freshwater algae and protozoa. *Proceedings of the Academy of Natural Science of Philadelphia* 124, 79–127.
- Camargo Carniel, L.S., Niemeyer, J.C., Luñes de Oliveira Filho, L.C., Alexandre, D., Gebler, L., Klauberg-Filho, O., 2019. The fungicide mancozeb affects soil invertebrates in two subtropical Brazilian soils. *Chemosphere* 232, 180–185.
- D’Andrea, S., Cuscó, A., Francino, O., 2021. Rapid and real-time identification of fungi up to species level with long amplicon nanopore sequencing from clinical samples. *Biology Methods and Protocols* 6, 1–14.
- Denton, C.S., Bardgett, R.D., Cook, R., Hobbs, P.J., 1999. Low amounts of root herbivory positively influence the rhizosphere microbial community in a temperate grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 155–165.
- Du, X.F., Li, Y., Bin, Han, X., Ahmad, W., Li, Q., 2020. Using high-throughput sequencing quantitatively to investigate soil nematode community composition in a steppe-forest ecotone. *Applied Soil Ecology* 152, 103562.

- EFSA, 2007. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fludioxonil. EFSA Scientific Report 110, 1–85.
- EFSA, 2017. Scientific Opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for in-soil organisms. EFSA Journal 15, 225.
- EFSA PPR (Panel on Plant Protection Products and their Residues), n.d. Scientific opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for in-soil organisms. EFSA Journal 248.
- Erstfeld, K.M., Snow-Ashbrook, J., 1999. Effects of chronic low-level PAH contamination on soil invertebrate communities. *Chemosphere* 39, 2117–2139.
- Ferris, H., Bongers, T., De Goede, R.G.M., 2001. A framework for soil food web diagnostics: Extension of the nematode faunal analysis concept. *Applied Soil Ecology* 18, 13–29.
- Fiscus, D.A., Neher, D.A., 2002. Distinguishing sensitivity of free-living soil nematode genera to physical and chemical disturbances. *Ecological Applications* 12, 565–575.
- Geisen, S., Snoek, L.B., ten Hooven, F.C., Duyts, H., Kostenko, O., Bloem, J., Martens, H., Quist, C.W., Helder, J.A., van der Putten, W.H., 2018. Integrating quantitative morphological and qualitative molecular methods to analyse soil nematode community responses to plant range expansion. *Methods in Ecology and Evolution* 9, 1366–1378.
- Goodey, T., 1963. *Soil and Freshwater Nematodes*, 2. Edition. ed. Methuen, Wiley, New York, NY, US.
- Haegerbaeumer, A., Raschke, R., Reiff, N., Traunspurger, W., Höss, S., 2019. Comparing the effects of fludioxonil on non-target soil invertebrates using ecotoxicological methods from single-species bioassays to model ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 183, 109596.
- Hodson, M.E., Vijver, M.G., Peijnenburg, W.J.G.M., 2011. Bioavailability in soils, in: Swartjes, F.A. (Ed.), *Dealing With Contaminated Sites: From Theory Towards Practical Application*. Springer, New York, NY, USA, pp. 721–746.
- Holterman, M., Rybarczyk, K., Van den Elsen, S., Van Megen, H., Mooyman, P., Santiago, R.P., Bongers, T., Bakker, J., Helder, J., 2008. A ribosomal DNA-based framework for the detection and quantification of stress-sensitive nematode families in terrestrial habitats. *Molecular Ecology Resources* 8, 23–34.
- Höss, S., Claus, E., Von der Ohe, P.C., Brinke, M., Güde, H., Heininger, P., Traunspurger, W., 2011. Nematode species at risk - A metric to assess pollution in soft sediments of freshwaters. *Environment International* 37, 940–949.
- Höss, S., Reiff, N., Nguyen, H.T., Jehle, J.A., Hermes, H., Traunspurger, W., 2014. Small-scale microcosms to detect chemical induced changes in soil nematode communities – Effects of crystal proteins and Bt-maize plant material. *Science of The Total Environment* 472, 662–671.
- Höss, S., Roessink, I., Brock, T.C.M., Traunspurger, W., 2020. Response of a nematode community to the fungicide fludioxonil in sediments of outdoor freshwater microcosms compared to a single species toxicity test. *Science of The Total Environment* 710, 135627.
- Hsieh, T.C., Ma, K.H., Chao, A., 2016. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution* 7, 1451–1456.
- Ingham, R.E., Trofymow, J.A., Ingham, E.R., Coleman, D.C., 1985. Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers: effects on nutrient cycling and plant growth. *Ecological Monographs* 55, 119–140.
- ISO, 2010. Water quality - Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda).
- ISO, 2020. Water and soil quality - Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda).
- Ivanova, N. V., Dewaard, J.R., Hebert, P.D.N., 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 6, 998–1002.
- Knacker, T., Van Gestel, C.A.M., Jones, S.E., Soares, A.M.V.M., Schallnass, H.-J., Förster, B., Edwards, C.A., 2004. Ring-testing and field-validation of a terrestrial model ecosystem (TME)--an instrument for testing potentially harmful substances: conceptual approach and study design. *Ecotoxicology (London, England)* 13, 9–27.
- Koolhaas, J.E., Van Gestel, C.A.M., Römbke, J., Soares, A.M.V.M., Jones, S.E., 2004. Ring-testing and field-validation of a terrestrial model ecosystem (TME)--an instrument for testing potentially harmful substances: effects of carbendazim on soil microarthropod communities. *Ecotoxicology (London, England)* 13, 75–88.
- Kools, S.A.E., Ferwerda, B., Van Gestel, C.A.M., Van Straalen, N.M., 2005. Microbial responses to zinc in soil microcosms with and without a natural assemblage of enchytraeids. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 2178–2184.
- Korthals, G.W., Van de Ende, A., Van Megen, H., Lexmond, T.M., Kammenga, J.E., Bongers, T., 1996. Short-term effects of cadmium, copper, nickel, and zinc on soil nematodes from different feeding and life-history

- strategy groups. *Applied Soil Ecology* 4, 107–117.
- Mack, P., Appeltauer, A., Illig, J., Knaebe, S., 2016. MDDs in soil living micro-arthropod field studies, in: SETAC GLB Annual Meeting. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Tübingen, Germany.
- Matsuo, Y., Komiya, S., Yasumizu, Y., Yasuoka, Y., Mizushima, K., Takagi, T., Kryukov, K., Fukuda, A., Morimoto, Y., Naito, Y., Okada, H., Bono, H., Nakagawa, S., Hirota, K., 2021. Full-length 16S rRNA gene amplicon analysis of human gut microbiota using MinION™ nanopore sequencing confers species-level resolution. *BMC Microbiology* 21, 1–13.
- Millward, R.N., Grant, A., 2000. Pollution-induces tolerance to copper of nematode communities in the severely contaminated Restronguet Creek and adjacent estuaries, Cornwall, United Kingdom. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 454–461.
- Moser, T., Schallnass, H.J., Jones, S., Van Gestel, C.A.M., Koolhaas, J.E., Rodrigues, J.M.L., Römbke, J., 2004a. Ring-testing and field-validation of a terrestrial model ecosystem (TME) - An instrument for testing potentially harmful substances: Effects of carbendazim on nematodes. *Ecotoxicology* 13, 61–74.
- Moser, T., Van Gestel, C.A.M., Jones, S.E., Koolhaas, J.E., Rodrigues, J.M.L., Römbke, J., 2004b. Ring-testing and field-validation of a terrestrial model ecosystem (TME)--an instrument for testing potentially harmful substances: effects of carbendazim on enchytraeids. *Ecotoxicology (London, England)* 13, 89–103.
- Neher, D.A., 2001. Role of nematodes in soil health and their use as indicators. *Journal of Nematology* 33, 161–168.
- Quist, C.W., Schrama, M., De Haan, J.J., Smant, G., Bakker, J., Van der Putten, W.H., Helder, J., 2016. Organic farming practices result in compositional shifts in nematode communities that exceed crop-related changes. *Applied Soil Ecology* 98, 254–260.
- Quist, C.W., Smant, G., Helder, J., 2015. Evolution of plant parasitism in the phylum Nematoda. *Annual Review of Phytopathology* 53, 289–310.
- Römbke, J., Förster, B., Jänsch, S., Kaiser, F., Scheffczyk, A., 2020. Necessary adaptations for a harmonized field testing procedure and risk assessment of earthworms (terrestrial). Dessau, Germany.
- Römbke, J., Van Gestel, C.A.M., Jones, S.E., Koolhaas, J.E., Rodrigues, J.M.L., Moser, T., 2004. Ring-testing and field-validation of a terrestrial model ecosystem (TME)--an instrument for testing potentially harmful substances: effects of carbendazim on earthworms. *Ecotoxicology (London, England)* 13, 89–103.
- Schenk, J., Höss, S., Brinke, M., Kleinbölting, N., Brüchner-Hüttemann, H., Traunspurger, W., 2020. Nematode-based bioindication of polluted sediments using metabarcoding and microscopic taxonomy. *Environment International* 143, 105922.
- Scholz-Starke, B., Beylich, a, Moser, T., Nikolakis, a, Rumpler, N., Schäffer, a, Theißen, B., Toschki, a, Roß-Nickoll, M., 2013. The response of soil organism communities to the application of the insecticide lindane in terrestrial model ecosystems. *Ecotoxicology (London, England)* 22, 339–62.
- Smit, C.E., Schouten, A.J., Van den Brink, P.J., Van Esbroek, M.L.P., Posthuma, L., 2002. Effects of zinc contamination on a natural nematode community in outdoor soil mesocosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42, 205–216.
- Smit, C.E., Van Beelen, P., Van Gestel, C.A.M., 1997. Development of zinc bioavailability and toxicity for the springtail *Folsomia candida* in an experimentally contaminated field plot. *Environmental Pollution* 98, 73–80.
- Sobanska, M.A., Cesnaitis, R., Sobanski, T., Versonnen, B., Bonnomet, V., Tarazona, J. V, Coen, W. De, 2014. Science of the Total Environment Analysis of the ecotoxicity data submitted within the framework of the REACH Regulation . Part 1 . General overview and data availability for the first registration deadline. *Science of the Total Environment, The* 470–471, 1225–1232.
- Strauss, T., Hammers-Wirtz, M., Memmert, U., 2010. How useful are aquatic indoor microcosms compared to outdoor mesocosm pond studies for risk assessment?, in: 20th Meeting of SETAC Europe. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Sevilla, Spain.
- Sverdrup, L.E., Krogh, P.H., Nielsen, T., Stenersen, J.N., 2002. Relative sensitivity of three terrestrial invertebrate tests to polycyclic aromatic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1927–1933.
- Turner, T.R., Ramakrishnan, K., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbreck, D., Osbourn, A., Grant, A., Poole, P.S., 2013. Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *The ISME journal* 7, 2248–2258.
- Urban, L., Holzer, A., Baronas, J.J., Hall, M.B., Braeuninger-Weimer, P., Scherm, M.J., Kunz, D.J., Perera, S.N., Martin-Herranz, D.E., Tipper, E.T., Salter, S.J., Stammnitz, M.R., 2021. Freshwater monitoring by nanopore sequencing. *eLife* 10, 1–27.
- Van den Brink, P.J., Tarazona, J. V, Solomon, K.R., Knacker, T., Van den Brink, N.W., Brock, T.C.M., Hoogland, J.P., 2005. The use of terrestrial and aquatic microcosms and mesocosms for the ecological risk

- assessment of veterinary medical products. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 820–829.
- Van den Brink, P.J., Ter Braak, C.J.F., 1999. Principal response curves: Analysis of time dependent multivariate responses of biological community to stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 138–148.
- van der Hoeven, N., 2008. Calculation of the minimum significant difference at the NOEC using a non-parametric test. *Ecotoxicology and environmental safety* 70, 61–6.
- Van Gestel, C.A.M., 2012. Soil ecotoxicology : state of the art and future directions. *ZooKeys* 296, 275–296.
- Vervoort, M.T.W., Vonk, J.A., Mooijman, P.J.W., Van den Elsen, S.J.J., Van, H.H.B., Veenhuizen, P., Landeweert, R., Bakker, J., Mulder, C., Helder, J., 2012. SSU ribosomal DNA-based monitoring of nematode assemblages reveals distinct seasonal fluctuations within evolutionary heterogeneous feeding guilds. *PLoS ONE* 7, 1–13.
- Vervoort, T.W., Vonk, J.A., Mooijman, P.J.W., Elsen, Sven J J Van Den, Van, H.H.B., Veenhuizen, P., Landeweert, R., Bakker, J., Mulder, C., Helder, J., Vervoort, M.T.W., Vonk, J.A., Mooijman, P.J.W., Van den Elsen, S J J, Van, H.H.B., Veenhuizen, P., Landeweert, R., Bakker, J., Mulder, C., Helder, J., 2012. SSU ribosomal DNA-based monitoring of nematode assemblages reveals distinct seasonal fluctuations within evolutionary heterogeneous feeding guilds. *PLoS ONE* 7, 1–13.
- Vollmer, T., Klein, O., Frank, S., Knaebe, S., 2016. Statistical Power and MDDs in Earthworm field testing, in: SETAC EU Annual Meeting. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Nantes, France.
- Wagg, C., Bender, S.F., Widmer, F., Van Der Heijden, M.G.A., 2014. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 5266–5270.
- Wilson, M., Kakouli-Duarte, T., 2009. Nematodes as Environmental Indicators. CABI, Wallingford, UK.
- Yeates, G.W., 1981. Nematode populations in relation to soil environmental factors: a review. *Pedobiologia* 22, 312–338.
- Yeates, G.W., Bongers, T., De Goede, R.G.M., Freckman, D.W., Georgieva, S.S., 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera - An outline for soil ecologists. *Journal of Nematology* 25, 315–331.
- Yeates, G.W., Coleman, D.C., 1982. Nematodes in decomposition, in: Freckman, D.W. (Ed.), *Nematodes in Soil Ecosystems*. University of Texas Press, Austin, TX, USA, pp. 55–80.
- Yoder, M., Tandingan De Ley, I., King, I.W., Mundo-Ocampo, M., Mann, J., Blaxter, M., Poiras, L., De Ley, P., 2006. DESS: A versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes. *Nematology* 8, 367–376.

Starnberg, 29.3.2021



Sebastian Höss