



1. Einleitung

1.1 Allgemeines zu Mesokosmen

Aufgrund der Vielzahl an anthropogenen Chemikalien, die in die Umwelt gelangen, wird die Zuverlässigkeit von Prognosen über deren potentielle Auswirkungen auf die Umwelt immer wichtiger. Die Prognosen sollten dabei kurz- und langfristige, qualitative und quantitative Veränderungen im Auge behalten und wissenschaftlich fundiert sein. In den letzten Jahrzehnten sind zahlreiche biologische Testverfahren zur Erfassung und Bewertung von toxischen Wirkungen von Chemikalien entwickelt worden und werden kontinuierlich weiterentwickelt bzw. neue Verfahren kommen hinzu. Gesetzliche Regelungen wie das Chemikaliengesetz und das Pflanzenschutzgesetz schreiben den Einsatz von biologischen Testverfahren zur Risikobewertung von neu in Verkehr gebrachten Chemikalien zwingend vor. In der Umweltschutzpraxis kommt den Einzelspezies-Untersuchungen vorrangige Bedeutung zu, da definierte Toxizitätstests Grundlage der gesetzlichen Vorschriften sind (FENT 2003). Erst seit einigen Jahren werden vermehrt Modellökosysteme, sogenannten Mesokosmen, zur Prüfung und Bewertung von Chemikalien, v.a. von Pestiziden und Schwermetallen, eingesetzt (FENT 1998). In solchen Mesokosmen werden Ausschnitte aus realen Ökosystemen betrachtet. Am weitesten etabliert sind dabei Mesokosmen, die Ausschnitte aus stehenden Gewässern repräsentieren. Sie werden häufig zur Risikobewertung von Pflanzenschutzmitteln eingesetzt. Vorteile solcher Modellökosysteme sind ihre größere Naturnähe, die Erfassung von Wirkungen auf Artengemeinschaften inklusive der indirekten Effekte und das realistischere Expositionsszenario. Indirekte Effekte entstehen aufgrund der Interaktionen zwischen verschiedenen Arten und Gemeinschaften (Räuber-Beute-Effekte, Konkurrenz um Nahrungsressourcen). Nachteile sind jedoch der große Aufwand und die im Vergleich zum Labortest geringere Reproduzierbarkeit.

Die Modell-Teiche werden in der Regel mit natürlichem, möglichst unbelastetem Seesediment und Wasser (meist Leitungs- oder Brunnenwasser, seltener Wasser aus natürlichen Gewässern) befüllt. Aus Dauerstadien oder im eingebrachten Sediment lebenden Organismen entwickeln sich dann die Populationen in dem neuen künstlichen Habitat. Die entstehende relativ komplexe Lebensgemeinschaft wird nach einer bestimmten Vorlaufzeit mit einer Chemikalie behandelt. Der Anfangspunkt der Studie kann je nach Fragestellung und Verwendung der Chemikalie unterschiedlich gewählt werden. Die Veränderungen in den Teichen werden über einen längeren Zeitraum von



einigen bis mehreren Monaten – je nach Fragestellung, Anwendung und Eigenschaften der eingesetzten Chemikalie - beobachtet. Das hat den Vorteil, saisonale Effekte (z. B. Temperatur, Tageslichtdauer) und eine mögliche Erholung („Recovery“) der geschädigten Populationen unter annähernd natürlichen Verhältnissen verfolgen zu können. Von einer Wiedererholung wird gesprochen, wenn die unter Chemikalieneinfluss geschädigten Populationen erneut ein Wachstum zeigen beziehungsweise, wenn über einen verlängerten Zeitraum keine signifikanten Unterschiede in der Abundanz zwischen Kontrolle und Behandlung vorhanden sind (VAN DEN BRINK ET AL. 1996). Hierbei sei eine Wiedererholung auch dann erreicht, wenn die Behandlungen die Spannweiten der Kontrollen erreichen. Substanzen, die nach acht Wochen keine Wiedererholung anzeigen, werden dabei als problematisch eingestuft (GRÜNWALD 2003). In den letzten Jahren ist die Wiedererholung der geschädigten Populationen bei der Bewertung von Mesokosmosstudien zur zentralen Frage geworden (zum Beispiel HANAZATO & YASUNO 1990 a, VAN DEN BRINK ET AL. 1996, SHERRATT ET AL. 1999, TRAAS ET AL. 2004, BURKE ET AL. 2005, CAQUET ET AL. 2007, HANSON ET AL. 2007). Diese Studien dienen letztendlich dazu eine sog. ökologisch akzeptierbare Konzentration (EAC: ecological acceptable concentration) der untersuchten Chemikalie ableiten zu können (CAMPBELL ET AL. 1999). Bei der Bewertung der Wiedererholung müssen Charakteristiken der Landschaften und Saisonalität beachtet werden (CAQUET ET AL. 2007). Hierbei ist zu erwähnen, dass das Wiedererholungspotenzial bei den unterschiedlichen Spezies von ihrem Lebenszyklus beziehungsweise ihren Verbreitungsmechanismen (Bildung von Dauerstadien, Migration bei emergierenden Insekten etc.) entscheidend beeinflusst werden kann (VAN DEN BRINK ET AL. 1996, SHERRATT ET AL. 1999, MØHLENBERG 2001, HANSON ET AL. 2007). So könnten Daphnien beispielsweise Ehippien bilden und Perioden ungünstiger Lebensbedingungen wie z. B. toxischen Stress überdauern (HANSON ET AL. 2007). Bei emergierenden Insekten (z. B. Chaoboridae, Chironomidae) ist die Recovery grundsätzlich anders zu bewerten, weil sie keine Dauerstadien bilden. In diesem Fall kann nicht beurteilt werden, ob die Wiedererholung aus dem behandelten Teich selbst erfolgt (autochthon) oder durch Eiablage von adulten Insekten aus anderen Systemen (allochthon). Da die künstlichen Teiche im offenen Austausch mit der Umgebung stehen, kann die Recovery auch durch Eiablage durch Weibchen aus Kontrollteichen oder durch Zuflug von Weibchen weiter entfernt liegender Teiche der Umgebung und anschließender Eiablage erfolgen (MØHLENBERG 2001).



HANAZATO (1998) beobachtete eine unterschiedliche Recovery von abgedeckten und offenen mit Insektizid behandelten Teichen, welches durch fehlende bzw. vorhandene Immigration von *Chaoborus flavicans* verursacht wurde, aber auch von der Jahreszeit abhing. Weiterhin bemerkte er, dass *C. flavicans* relativ schnell neu befüllte Experimentalteiche besiedelte. Neuere qualitative Untersuchungen mit einem Insektizid von CAQUET ET AL. (2007) und HANSON ET AL. (2007) zeigten, dass sich geschädigte Populationen emergierender Insekten aus offenen Teichen schneller erholen als die aus abgedeckten Teichen. Die Ergebnisse wurden als Zuwanderung von emergierenden Insekten aus den unbehandelten Kontrollteichen gedeutet. In abgedeckten Teichen hingegen konnten sich durch eine fehlende Zuwanderung von außen die Populationen der emergierenden Insekten nur bedingt wieder erholen. Generell würde man Mikro- und Mesokosmen wegen ihrer ungenügenden Immigrations- und Rekolonisationsmöglichkeiten innerhalb der experimentellen Aufbauten als „worst-case-Szenario“ behandeln (TRAAS ET AL. 2004). Es ist aber aufgrund des Experimentes von CAQUET ET AL. (2007) und HANSON ET AL. (2007) anzunehmen, dass das Wiederholungspotenzial in Mesokosmosstudien mit offenen Teichen oftmals überbewertet wird und für diese Organismengruppe nicht dem oft für Mesokosmosstudien postulierten „worst-case-Szenario“ entspricht. Dies konnte auch von STRAUSS ET AL. (2007) anhand einer Simulationsstudie für die semiaquatische Mücke *Chaoborus crystallinus* im Rahmen der Auswertung einer Mesokosmosstudie gezeigt und das Ausmaß des Effektes ansatzweise quantifiziert werden. Zur weiteren Validierung des Modells bedarf es aber weiterer Freilandstudien.

1.2 Erste Fragestellung: Wiederholungspotenzial

Ziel dieser Untersuchung ist es an der oben genannten Recovery-Problematik anzuknüpfen und das Wiederholungspotenzial von emergierenden Insekten zu untersuchen. Als Modellorganismus für diese Untersuchung wird die Büschelmücke *Chaoborus crystallinus* gewählt. Die Larven der Chaoboriden sind aufgrund ihrer Schlüsselstellung in fischfreien Gewässern, sowie ihrer häufig hohen Sensitivität gegenüber Insektiziden, wichtige Indikatororganismen in der Bewertung von Pflanzenschutzmitteln (STEPHENSON 1982, TIDOU 1992, SHERRATT ET AL. 1999, GRÜNWALD 2003, LAURIDSEN 2003, FUNK 2004). Es gilt quantitativ und qualitativ festzustellen, in welchem Ausmaß Immigration nach



toxischer Belastung aus Kontrollteichen oder von weiter entfernt liegenden Teichen der Umgebung in die belasteten Systeme stattfinden kann. Eine Methode, dieser Fragestellung nachzugehen, war das Abdecken einiger Teiche mit Netzen, um die Migration zu unterbinden und so die Quelle der Recovery ermitteln zu können. Um die Population des zu untersuchenden Organismus vorübergehend zu schädigen, wurde das Insektizid FASTAC SC ® 100 ausgewählt, auf das *C. crystallinus* sensitiv und die potentiellen Futterorganismen weniger sensitiv reagieren.

1.3 Biologie und Ökologie von *Chaoborus crystallinus*

Die transparenten Larven der Büschelmücke *Chaoborus crystallinus*, die zu den nicht stechenden Nematocera gehören, halten in kleinen fischfreien Gewässern als pelagischer Räuber eine wichtige Schlüsselstellung im Nahrungsnetz inne (FEDERENKO 1975, DODSON 1972, LAMPERT & SOMMER 1993). *C. crystallinus* durchläuft verschiedene Entwicklungsstadien. Hierbei sind die Stadien Ei, die daraus schlüpfende L1-Larve und weitere drei Larvenstadien (L2 bis L4), die Puppe und die Imago zu nennen (SÆTHER 1996). Je nach Größe ernähren sich die vier Larvenstadien von unterschiedlichen Größenfraktionen des Zooplanktons (SWIFT 1992). Die Entwicklungszeit der Larven dauert unter optimalen Futterbedingungen 15 Tage (BÜNS & RATTE 1990). Hierbei weisen die Larvalstadien L1 und L2 mit teilweise zwei Tagen die kürzeste Entwicklungszeit auf (MEYER 2007 a). Nach abgeschlossener Entwicklung verpuppt sich die Larve. Aus dieser Puppe schlüpft das adulte flugfähige Tier, welches ohne weitere Nahrungsaufnahme einen Kopulationspartner sucht. Die Lebensdauer der adulten Insekten beträgt maximal 10 Tage, jedoch durchschnittlich 5,2 Tage (BERENDONK & BONSALE 2002). Wenn nach gelungener Kopulation ein geeignetes Habitat zur Eiablage gefunden wurde, wird ein einzelnes Eigelege abgelegt (SÆTHER 1996). Die Eigelege werden meist im Dunklen gelegt und beinhalten 60 - 350 Eier pro Gelege (PARMA 1971, SÆTHER 2002).

Innerhalb eines Jahres können zwischen Juni und Ende August drei Generationen von *C. crystallinus* auftauchen (RATTE 1986). Phasen mit weniger optimalen Bedingungen wie z.B. der Herbst/Winter überdauern die Larven mit einer Dormanz. Der Eintritt in dieses Ruhestadium ist von der Photoperiode und der Temperatur gesteuert und wird begleitet von einer geringeren Nahrungsaufnahme und einer verlangsamten Entwicklung. Es existiert eine kritische Photoperiode bei 20 °C und einem Hell-Dunkel-Phase von 11:13



Stunden und bei 14°C bei 13:11 Stunden. Wiederrum besteht auch eine kritische Temperaturschwelle bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden und circa 18,5°C (RATTE 1977).

1.4 Eingesetztes Insektizid – Wirkstoff und Anwendung

Für die Mesokosmosstudie wurde Insektizid FASTAC SC ® 100 verwendet. Es wird von der BASF Aktiengesellschaft in Ludwigshafen hergestellt und beinhaltet das synthetische Pyrethroid Alpha-Cypermethrin als aktiven Wirkstoff (100 g/ L Alpha-Cypermethrin a. i.¹). Die unterschiedliche Wirkung von Pyrethroiden auf Chaoboriden und andere Invertebraten wurde bereits in einigen Studien nachgewiesen und im Modell validiert (zum Beispiel STEPHENSON 1982, HANSON ET AL. 2007, SANDMANN 2000, GRÜNWALD 2003, SCHROER ET AL. 2004, STRAUSS PERSÖNLICHE MITTEILUNG, STRAUSS ET AL. 2007).

Solche chlorierten Kohlenwasserstoffe mit biozidem Wirkungspotenzial wirken auf die sensorischen und motorischen Nervenfasern (FENT 2003). Genauer betrachtet beeinflussen Pyrethroide die Leitfähigkeit der Nervenmembranen indem sie die Na⁺-Kanäle blockieren. Die Natrium-Ionen erfahren somit einen verlängerten Einwärtsstrom während der Erregungsphase und es erfolgt eine Dauerentladung der Nerven.

Alpha-Cypermethrin liegt in einer Racemat-Mischung von zwei Enantiomeren vor (1R Cis S und 1S Cis R; Formel 1-1).

In reiner Form hat Alpha-Cypermethrin bei 23 ± 1 °C einen Octanol-Wasser-Koeffizienten von 6,29 ± 0,02 Log K_{ow} und verfügt über eine Wasserlöslichkeit von 0,01 mg/ L bei 20 ± 0,5°C. Desweiteren besitzt dieses synthetische Pyrethroid einen Schmelzpunkt zwischen 78 und 80 °C (WHO 2006). Die Halbwertszeit von Alpha-Cypermethrin liegt bei 2,4 Tagen (STRAUSS, persönliche Mitteilung)

Das Insektizid FASTAC SC ® 100 liegt in einer wasserbasierten, lösungsmittelfreien Suspensions-Formulierung vor und besteht aus einer Mischung von Alpha-Cypermethrin (9,85 %), Alkoholethoxylatphosphatester (1 %) und Tributylphenolpolyglykoether (4 %) (BASF 2004). Die beiden letzten erwähnten Zusatzstoffe sind Detergenzien bzw. Tenside und werden als nicht-ionische Emulgatoren eingesetzt.

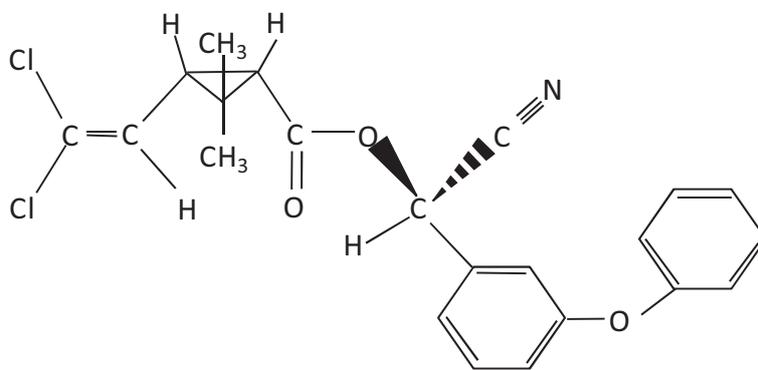
¹ a. i. = active ingredient



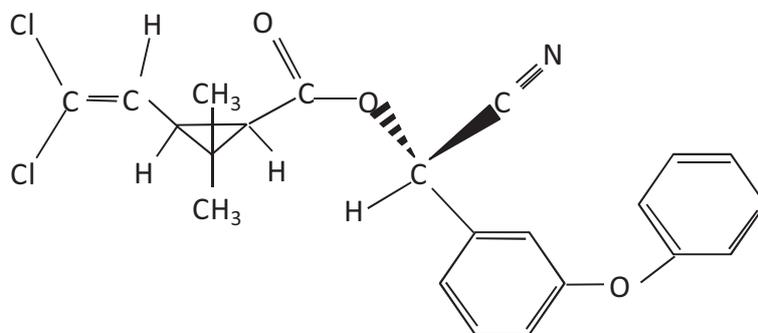
Das Biozid wirkt über Kontakt und Fraß bei Bekämpfung von Schädlingen zum Beispiel im Raps-, Rüben- und Getreidebau, und ist ebenfalls genehmigt zur Bekämpfung des Maiswurzelbohrers.

Ende der Zulassung dieses Produktes war 31.01.2005. Beim Endverbraucher vorhandene Restbestände durften allerdings bis zum 31.12.2007 aufgebraucht werden.

Formel 1-1: Nomenklatur und chemische Strukturformel von zwei Isomeren der organischen Verbindung Alpha-Cypermethrin, welches als Insektizid eingesetzt wird



(R)-alcohol (1S)-cis-acid



(S)-alcohol (1R)-cis-acid

1.5 Zweite Fragestellung: Genetik und Metapopulationskonzept

Neben dem Wiedererholungspotenzial von emergierenden Insekten sollen in dieser Arbeit die Verbreitungsmechanismen und die genetischen Populationsstruktur von *Chaoborus crystallinus* in Kleingewässern im Raum Aachen untersucht und vor dem Hintergrund des Metapopulationskonzeptes interpretiert werden. Eine Metapopulation ist definiert als eine Gruppe von Teilpopulationen (Subpopulationen). Diese sind untereinander vernetzt, d.h. es findet ein eingeschränkter Genaustausch statt. Durch



Umweltfaktoren und Größe der Subpopulationen besteht die Möglichkeit einer lokalen Extinktion. Nach einer Extinktion kann das ehemalige Habitat wiederbesiedelt werden. Immigration kann die Extinktion einer Subpopulation verhindern (HANSKI 1999).

BERENDONK & BONSALL (2002) entdeckten, dass für die beiden Schwesternarten *C. crystallinus* und *C. flavicans* zwei verschiedene Metapopulationsstrukturen existieren. *C. flavicans* ist ein Generalist und kommt auch in großen Seen mit Fischbesatz vor. Durch eine tagesperiodische Vertikalwanderung umgeht die Diptere die Gefahr von Fischen gefressen zu werden (PARMA 1971, LUECKE 1986). In seiner Verbreitungsökologie zeigt *C. flavicans* das Prinzip der Festland-Insel-Metapopulation. Hierbei existieren große, permanente Stamm-Satelliten-Populationen (z.B. großer Teich/ See), von denen kleinere Habitate zur Reproduktion angefliegen werden. *Chaoborus crystallinus* würde hingegen in einer LEVINS Metapopulation mit vielen kleinen Habitaten leben, die von einem hohen Aussterberisiko und Rekolonisation geprägt sind (BERENDONK & BONSALL 2002). Der Erfolg fischfreie Gewässer aufzusuchen, läge in der Fähigkeit der Weibchen direkt, während oder vor der Eiablage festzustellen, ob der Teich einen Fischbestand aufweist. Die Auswahl geschieht durch die Detektion sogenannter Kairomone (chemische Botenstoffe), die vom Fisch an das Wasser abgegeben werden (BERENDONK 1999).

Das theoretische Konzept der Inselökologie nach MACARTHUR & WILSON (1967) wurde in den letzten Jahren sehr erfolgreich durch das Metapopulationskonzept von LEVIN (1970) ergänzt, das insbesondere in der Naturschutzforschung zur Beurteilung von Aussterberisiken bzw. Chancen der Recovery oder Wiederbesiedlung genutzt wird. Danach sind für das Überleben von Teilpopulationen längerfristig aktive Migration und passive Verbreitungen von Individuen notwendig, um Verluste an Individuen und genetischer Diversität zu kompensieren. Es gibt allerdings bisher kaum Untersuchungen zu dieser Fragestellung (BERENDONK & BONSALL 2002).

Um festzustellen, ob es genetische Unterschiede zwischen natürlichen Teichpopulationen und der Mesokosmosteiche gibt, sollen molekularbiologische Untersuchungsmethoden herangezogen werden. Über die Analyse von DNA-Sequenzen gefangener Chaoboriden soll festgestellt werden, ob zwischen den Mesokosmosteichen ein genetischer Austausch stattfindet, ein homogener Genpool vorhanden ist oder ob bei weiter entfernt liegenden Teichen genetische Verwandtschaften auftreten. Aus den Ergebnissen könnten mögliche Flugdistanzen der Weibchen abgeleitet werden, denn die Verbreitung/ Kolonisation von *Chaoborus* sp. ist hauptsächlich über die Entfernung zu



den Teichen bestimmt (BERENDONK & BONSALL 2002). Mögliche Veränderungen im Genpool der Individuen in der Mesokosmosstudie können ebenfalls detektiert und mit den anderen Ergebnissen verglichen werden.

Zusammenfassend soll mit den zwei Hauptfragestellungen folgende Themengebiete in der vorliegenden Arbeit bearbeitet werden, um das Wiedererholungspotenzial emergierender Insekten in Mesokosmosstudien zu bewerten:

- Gibt es nach einer Insektizid-Kontamination Unterschiede im Effekt und in der Wiedererholung von einerseits isolierten einzelnen Teichen, andererseits mehreren isoliert unkontaminierten und kontaminierten Teichen im Verbund, sowie offenen kontaminierten Teichen, die im Austausch mit der Umgebung stehen?
- Entsteht durch die Insektizidkontamination eine reduzierte Fekundität der *Chaoborus*-Weibchen und kann diesbezüglich ein Unterschied zwischen den Behandlungsszenarios die Wiedererholung beeinflussen?
- Wie hoch ist der Anteil der Wiederbesiedlung durch Tiere aus den benachbarten, unbelasteten Kontrollteichen, und wie hoch ist die Immigration von Tieren aus dem Umland in Relation zu dem Wiedererholungspotenzials innerhalb belasteter Systeme für *Chaoborus crystallinus*?
- Entsteht aufgrund der Populationsreduzierung in den belasteten Teichen während der Mesokosmosstudie ein genetischer Unterschied innerhalb der Teiche?
- Und kann eine genetische Verwandtschaft von Büschelmückenpopulationen, die aus benachbarten Mesokosmosteichen beziehungsweise aus Kleingewässer im Aachener Raum stammen, detektiert werden? Welche Flugdistanzen können möglicherweise daraus abgeleitet werden, die Weibchen von *C. crystallinus* überwinden, um ein geeignetes Habitat zur Eiablage zu finden?



2. Vorversuche

Zunächst wurde ein Vorversuch durchgeführt, um die Eignung von Emergenzfallen in der Mesokosmosstudie zu überprüfen. Anschließend wurde in einem akuten Biotest die Larve von *C. crystallinus* und *Daphnia magna*, als Stellvertreter für einen potentiellen Futterorganismus, in einer Konzentrationsreihe mit dem gewählten Insektizid exponiert und ein EC_{90} -Wert² für beide Testorganismen bestimmt. Diese errechnete Effektkonzentration sollte für die Mesokosmosstudie im Hauptversuch verwendet werden, um die *Chaoborus crystallinus*-Population zu einem sehr großen Teil zu dezimieren.

2.1 Material und Methoden Vorversuch

2.1.1 Vergleich zweier quantitativer Methoden: Emergenzfalle versus Exuvien absammeln

Der Vorversuch fand im Juli und August 2004 statt. Es sollte zunächst überprüft werden, wie die Büschelmücken-Emergenz am geeignetsten quantifiziert werden kann, ohne dabei zu viele Individuen in einer bereits gestörten Population abzutöten. Es sollte die Methode von Emergenzfallen mit der Zählung von Exuvien geschlüpfter Büschelmücken-Individuen miteinander verglichen werden. Bereits HAVERTZ (1988) hat das Absammeln der *Chaoborus crystallinus* Exuvien an vor Regen geschützten Teichen erfolgreich erprobt. Auch BURKE et al. (2005) konnte in einer Mesokosmosstudie mit Insektizidkontamination eine quantitative Menge Libellen-Nymphenhäute von der Teichvegetation absammeln. Diese Nymphenhäute schwimmen nicht frei auf der Teichoberfläche wie bei *C. crystallinus*, sondern sind an Teichvegetation, teilweise in geschützter Lage, befestigt. Das Absammeln der Exuvien würde im Mesokosmosexperiment die geringste Beeinflussung auf die Abundanz darstellen. Insbesondere in isolierenden Netzsystemen, wo eine Immigration fehlt, um zu einer schnelleren Wiedererholung beizutragen, wäre diese Methode sinnvoll. Das Einsetzen von Emergenzfallen könnte hingegen eine durch Insektizide stark minimierte Population zusätzlich reduzieren und eventuell käme es zu einer Extinktion der Testorganismen. Eine Wiedererholung der Population wäre somit unmöglich.

² EC_{90} = effect concentration (englisch), errechnete Konzentration einer Chemikalie bei der bei 90 % aller Organismen im Biotest ein Effekt zu sehen ist



Im Vorversuch wurden Emergenzfallen installiert und parallel dazu acht Wochen lang Exuvien von *Chaoborus crystallinus*, Culiciden, Chironomiden, Ephemeroptera und andere Dipteren abgesammelt. Unter den Begriff „andere Dipteren“ fallen Einzelfunde aus den Taxa Sciaridae, Brachycera, Simuliidae, Psychodidae und Cecidomyiidae. Am Ende wurden die Abundanzen aus den verschiedenen Fallentypen miteinander verglichen.

2.1.1.1 Probendesign und Modifikation der Emergenzfalle

Um die schlüpfenden Insekten zu fangen, wurden Emergenzfallen auf der Wasseroberfläche der Mesokosmosteiche installiert. Die Emergenzfalle schwamm mit Hilfe kleiner Bojen auf der Wasseroberfläche (Abbildung 2-1). Sie bestand aus einem kreisförmigen Kunststoffrahmen (Durchmesser 55 cm), auf dem sich eine kegelförmig über eine Metallhalterung gespannte Gaze befand. Darauf war ein Behälter befestigt, der die aufliegenden Insekten in einer Fixierlösung fing, tötete und konservierte. Um die Falle in der gewünschten Position zu halten, wurde sie mit drei Schnüren am Tonnenrand des Mesokosmosteiches befestigt.

Die Fixierlösung bestand aus 70 prozentigem Ethanol, 40 g Saccharose/ L und 40 ml Glycerin/ L.

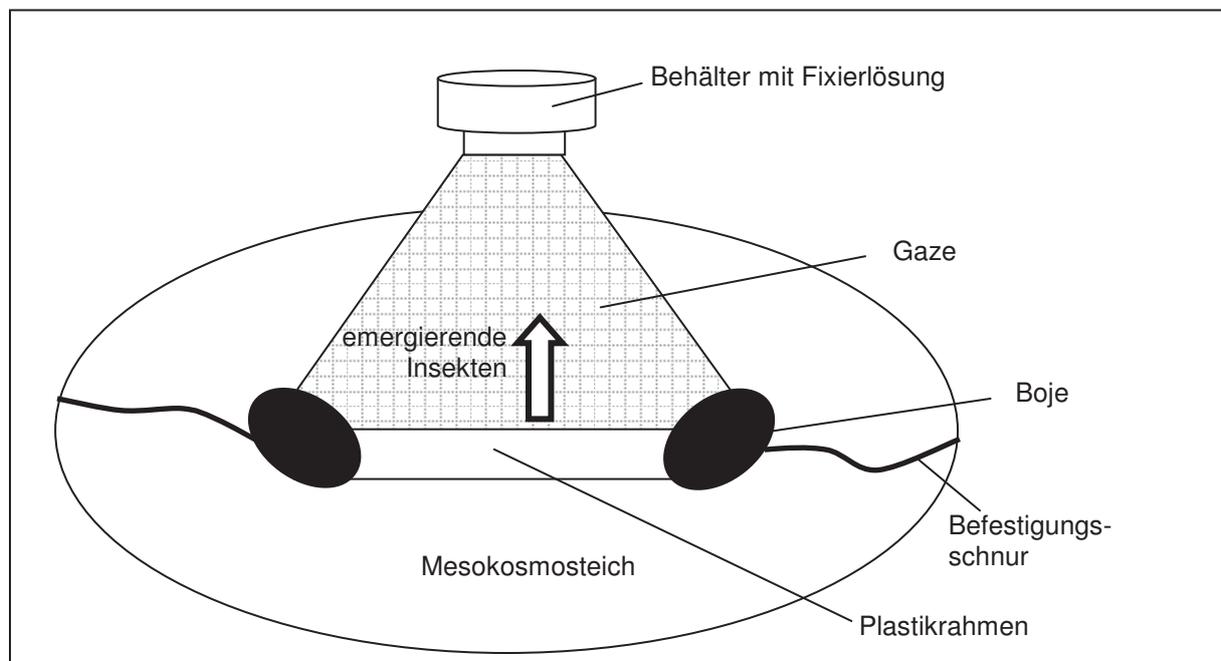


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung einer Emergenzfalle schwimmend auf einem Mesokosmosteich



Um die Exuvien abzusammeln, wurde von einigen Fallen die Gaze abgenommen. In diesen präparierten Fallen war die Wasseroberfläche innerhalb des Plastikrahmens gut einsehbar und erreichbar. Die abgesammelte Fläche einer offenen Falle war somit identisch mit der Fläche einer Emergenzfalle mit Gaze.

Die Mesokosmosteiche waren zu Beginn des Vorversuchs schon mit Wasser befüllt. Das Wasser stammte von einer Mesokosmosstudie aus dem Jahre 2002. Um sicher zu gehen, dass keine Pestizidrückstände vorhanden waren, wurden für den Vorversuch drei Kontrollteiche ausgewählt und jeweils mit sechs Fallen in einer zufälligen Anordnung bestückt (Abbildung 2-2). In jedem Teich waren drei Fallen mit Netz und drei ohne Netz (Abbildung 2-3) installiert. In der Mitte des Teiches war immer eine Falle mit Netz positioniert. Somit waren für die Auswertung zwei Vergleichsmöglichkeiten gegeben:

Fallen mit Netz	=> Vergleich zwischen Abundanz in der Teichmitte und am Teichrand
Fallen außen (mit und ohne Netz)	=> Vergleich zwischen Methode mit Emergenzfalle und Methode mit Absammeln von Exuvien

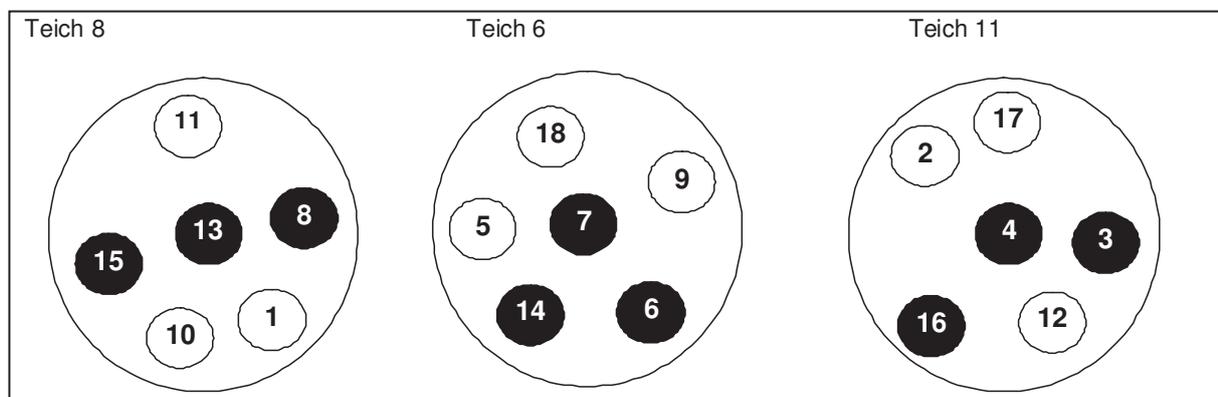


Abbildung 2-2: Schematische Aufsicht auf das Probedesign im Vorversuch (● Fallen mit Gaze, ○ Fallen ohne Gaze); Teichnummerierung stammt aus der Mesokosmosstudie aus dem Jahre 2002

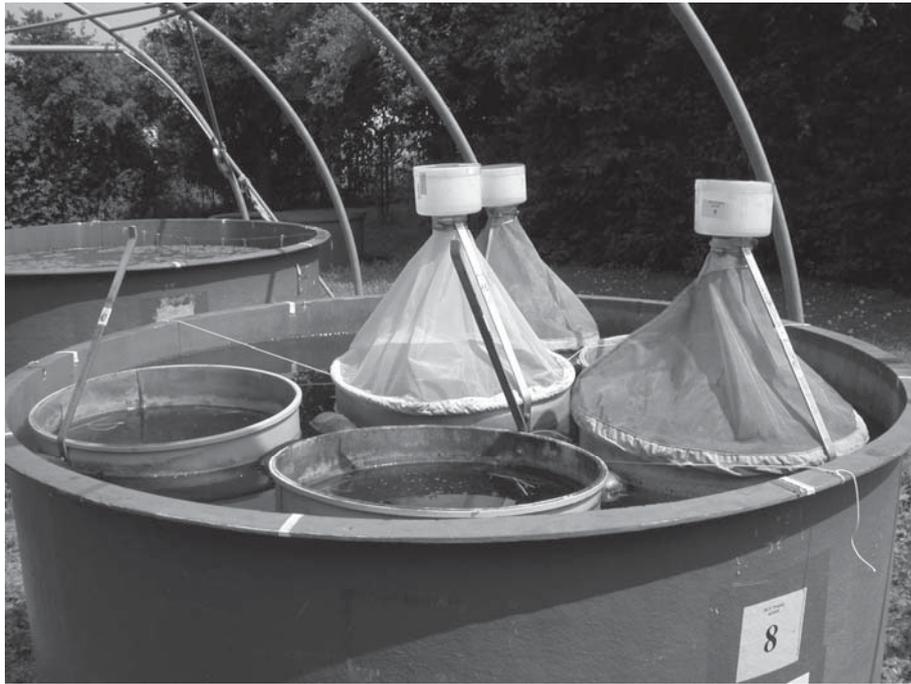


Abbildung 2-3: Anordnung der Emergenzfallen mit und ohne Gaze

Da das Absammeln der Exuvien von Niederschlägen und Zersetzungsprozessen abhängig war, wurde ein Parallelversuch gestartet. Dazu wurden drei Gefäße mit gefiltertem Teichwasser befüllt, um Exuvien von unbeprobten Teichen auf der Wasseroberfläche abzulegen. Die Gefäße wurden an der Oberfläche schwimmend im Teich und an geschützter Stelle auf der Wiese positioniert. Das dritte Gefäß stand bei konstanter Raumtemperatur (19 - 20°C) in einem Institutsbüro. In den folgenden 14 Tagen wurde beobachtet, wie viele Exuvien auf der Wasseroberfläche übrig blieben bzw. noch zu zählen waren. Exuvien, die durch mechanische Zerstörung (zum Beispiel Regen) oder biotische Faktoren (z. B. Zersetzungsprozesse) abgesunken waren, wurden nicht mitgezählt.

2.1.1.2 Probenahme

Die Probenahme der geschlossenen Emergenzfallen erfolgte wöchentlich. Die Exuvien mussten aufgrund der biologischen Abbauprozesse täglich abgesammelt werden. Dabei wurden die Exuvien mit einer Federstahlpinzette vorsichtig von unten abgehoben und in ein kleines Rollrandglas mit Fixierlösung überführt.



2.1.2 Akuter Biotest im Labor mit FASTAC (a. i. Alpha-Cypermethrin)

Um keine gravierende Futterlimitierung herbeizuführen, war es wichtig zu überprüfen, ob potentielle Futterorganismen wie Daphnien (oder anderen Cladoceren) durch das im Hauptexperiment eingesetzte Insektizid weniger beeinträchtigt werden. In der Studie soll das Insektizid FASTAC® SC 100 mit dem Wirkstoff Alpha-Cypermethrin eingesetzt werden und *Chaoborus crystallinus* und *Daphnia magna* auf ihre Reaktion untersucht werden.

Die Sensitivität der Testorganismen und die passende Insektizidkonzentration zur Populationsreduzierung wurden in einem akuten Biotest mit Hilfe einer Konzentrationsreihe untersucht. Für den Wirkstoff wurde ein LC₉₀ bzw. ein EC₉₀-Wert für Immobilität, Verpuppung und Emergenz ermittelt.

2.1.2.1 Herkunft und Vorbereiten der Testorganismen *Chaoborus crystallinus* und *Daphnia magna*

Für den akuten Biotest wurde aus der Mesokosmosanlage Melaten (Forschungsinstitut gaiac e.V., Aachen) eine Zooplanktonprobe entnommen, um ungefähr 100 große *Chaoborus crystallinus*-Individuen (möglichst L4-Larven) zu erhalten. Es wurden nur die Organismen ausgesucht, die bei einem taktilen Stimulus normal mit zuckenden Fluchtbewegungen reagierten. Um eine bessere Vergleichbarkeit bei der späteren Auswertung zu gewährleisten, mussten sämtliche Larven dasselbe Larvenstadium aufweisen. Eine Überprüfung des Larvenstadiums gelang über eine Kopfkapselvermessung der Larven (vgl. WIERTZ 1984). Für die Vermessung wurden die *Chaoborus*-Individuen vorsichtig mit einem „Drahtlöffel“ (mit aufgespannter Gaze in der Löffelmulde) aus dem Medium entnommen, auf eine Glaspetrischale gelegt und unter einem Binokular vermessen. Die Vermessung erfolgte zügig, damit die Tiere nicht unnötig Stress erlitten.

Die Daphnien-Testorganismen (*Daphnia magna* Klon 5) stammten aus der Standardzucht des Instituts für Umweltforschung (Biologie V) der Rheinisch-Westfälisch-Technischen Hochschule Aachen.

Die Daphnien zur Fütterung von *C. crystallinus* stammten ebenfalls aus der Standardzucht und aus der Mesokosmosanlage Melaten. Die Daphnien aus der Mesokosmosanlage Melaten wurden in einem 200-L-Aquarium mit ADaM-Medium (Aachener Daphnien Medium, siehe KLÜTTGEN et al. 1994) gehältert. Die Fütterung der Daphnien im Aquarium erfolgte, wie bei der Standardzucht, drei Mal pro Woche (montags, mittwochs,



freitags) mit einem Schluck abzentrifugierter Algen und freitags zusätzlich mit einer Hefelösung. Die Hefelösung bestand aus 0,2 g Bierhefe, die in 200 ml destilliertes Wasser suspendiert wurde und in einem Ultraschalbad zertrümmert wurde.

2.1.2.2 Durchführung der Tests

Folgender Versuch richtet sich nach dem akuten *Daphnia* Immobilisations-Test (OECD Guideline 202, 2004). Die eingesetzten Daphnien waren nicht älter als 24 Stunden. Dies korrespondiert sehr gut mit der Beutegröße, welche für L4-Larven von *Chaoborus crystallinus* aufgrund ihrer Maulgröße gut fressbar sind. Im dargestellten Test waren zehn Parallelen vorhanden. Im Vergleich zur OECD Guideline 202 (2004) wurden die Daphnien nicht wie beschrieben in Gruppen à fünf Individuen pro Glas, sondern einzeln in ein Rollrand-Glas à 80 ml Medium eingesetzt. Diese Veränderung sollte eine bessere Vergleichbarkeit zu dem *Chaoborus*-Toxizitätstest herstellen. Hier wurde aufgrund der Organismen-Größe ebenfalls nur ein Individuum pro Rollrandglas eingesetzt.

Für *C. crystallinus* existiert kein standardisierter akuter Immobilisationstest nach OECD. Der Testansatz orientierte sich am Daphnien Immobilisationstest und bestand aus 12 Parallelen (zwei mehr als bei den Daphnien) mit je einem Individuum angesetzt (Abbildung 2-4). Büschelmücken sind bisher kaum im akuten Biotest untersucht worden. Da nicht abzuschätzen war wie hoch die Mortalität der Büschelmücken in dieser Versuchsanordnung war, sollten die zwei zusätzlichen Parallelen eine bessere statistische Berechnung gewährleisten.

Der Versuch fand in einem klimatisierten Raum bei $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ statt und musste laut OECD eine Beleuchtungsstärke zwischen 700 - 1000 lux bei einem Tag/Nachtrhythmus von 16:8 Stunden haben. Als Medium wurde AdaM-Medium verwendet. Die gewählte Testkonzentration war 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,00011 $\mu\text{g}/\text{L}$ Alpha-Cypermethrin mit zusätzlich einer Kontrolle. Als sich die Testkonzentrationen für *C. crystallinus* als zu hoch erwiesen, wurden in einem zweiten Ansatz die Konzentrationen 0,5; 0,125; 0,031; 0,008; 0,002 $\mu\text{g}/\text{L}$ a. i. und eine Kontrolle verwendet. Nach OECD-Guideline 202 (2004) fanden die ersten 48 Stunden keine Fütterung der Daphnien statt. Bei *Chaoborus crystallinus* wurde ebenso verfahren. Danach fand eine Fütterung für beide Organismen statt, da der Versuch bis zum Schlupf von *C. crystallinus* weitergeführt werden sollte.



Die Daphnien wurden wie in der Standardzucht (siehe oben) drei Mal pro Woche gefüttert. Die Fütterung von *C. crystallinus* erfolgte ebenfalls drei Mal pro Woche mit jeweils zehn frisch geschlüpften Daphnien aus dem Aquarium. Hierzu wurden die Daphnien mit einem speziellen feinmaschigen Sieb (Maschenweite 0,575-,625 mm) abgeseibt, um nur die kleineren Daphnien zu erhalten. Es wurde sichergestellt, dass Futterreste und nicht gefressene Daphnien regelmäßig entfernt wurden. Immobilisation, Mortalität, Verpuppung und Emergenz wurden täglich kontrolliert und flossen zur Bewertung dieser Endpunkte in der statistischen Berechnung mit ein. Als immobil zu bewerten waren Individuen, die anormale Zuckungen zeigten. Der Körper war gestaucht und meist schwammen diese auf der Wasseroberfläche. Mortalität war vorhanden, wenn nach einem taktilen Stimulus keine Reaktion mehr vorhanden war. Der Test lief bis alle überlebenden *Chaoborus*-Individuen in der Kontrolle geschlüpft waren und dauerte 28 Tage.



Abbildung 2-4: Immobilisationstest mit *Chaoborus crystallinus* und *Daphnia magna* im Klimaraum bei 20°C



2.1.3 Statistische Auswertung

Die Auswertung des Vorversuches erfolgte mit Hilfe des Programmes SPSS Version 16. Es wurden die Wochensummen der Emergenz gebildet und aufgrund fehlender Normalverteilung wurzeltransformiert. Die transformierten Daten wurden nach Levene's Test auf Varianzhomogenität überprüft. Danach schloss sich ein Test mit einer einfaktoriellen ANOVA und einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ an.

Die statistische Auswertung des akuten Biotest (siehe Kapitel 2.1.2) wurde mit dem Programm ToxRat[®] Professional Version 2.10.03 der Firma ToxRat[®] Solutions GmbH durchgeführt. Ziel war es insbesondere Effektkonzentrationen (EC_x = Effect Concentration), Letale Konzentrationen (LC_x = Letal Concentration) und eine $NOEC^3$ zu berechnen. Mittels einer Probit-Analyse wurden hierbei Dosis-Wirkungsbeziehungen ermittelt. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung erfolgt grafisch und zeigt die relative Wirkung zum Logarithmus der Dosis.

³ **No-Observed-Effect-Concentration** Konzentration, bei der keine signifikanten beobachtbaren Effekte nach längerer Expositionszeit auftreten (FENT 2003)