

5 ERGEBNISSE DER LABORVERSUCHE

5.1 Vorversuch zur Ermittlung einer optimalen Versuchslaufzeit

Bei einer Versuchsdauer von 14 Tagen ergab sich mit *Enchytraeus christenseni* eine so geringe Reproduktion, dass reproduktionsbeeinflussende Effekte durch Schadstoffe oder andere Faktoren voraussichtlich nicht statistisch abgesichert werden könnten (Tab. 30). Nach der doppelten Zeit waren andererseits außer den zehn eingesetzten Adulten bereits Adulte der ersten Filialgeneration vorzufinden, womit die Mortalität der Elterntiere nicht sicher zu bestimmen wäre. Eine Versuchslaufzeit von 21 Tagen gewährleistet dagegen sowohl eine ausreichende Reproduktion als auch die sichere Identifikation der Elterngeneration zu Versuchsende. Die Reproduktion wird im Folgenden immer als Gesamtzahl der Juvenilen im Testgefäß (Mittelwert aus allen Parallelen einer Variante) angegeben.

Tab. 30: Zahl der Juvenilen und Adulten im Reproduktionstest mit *Enchytraeus christenseni* nach drei verschiedenen Testlaufzeiten. n = 5

	14 Tage	21 Tage	28 Tage
Adulte	9,8	9,6	10,8
Juvenile	9,6	130,6	317,2

5.2 Versuche zum Einfluss der Bodenfeuchte

5.2.1 Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* in Abhängigkeit vom Wassergehalt

Es wurden in drei Versuchen insgesamt zehn verschiedene Wassergehaltsstufen getestet (Abb. 32). Die Versuche überschneiden sich hinsichtlich der untersuchten Wassergehalte (20 % in Versuchen 1 und 2 bzw. 35 % in Versuchen 1 und 3). Versuchsübergreifend unterschied sich die Reproduktion der Enchytraeiden für dieselben Feuchtestufen jeweils nicht signifikant (t-Test). Die Ergebnisse der drei Versuche werden daher als direkt vergleichbar angesehen. Wassergehalte von 20-35 % (Versuch 1) ergaben keine signifikant unterschiedliche Reproduktion. Unterhalb von 20 % nahm die Reproduktion deutlich ab bis hin zu einer vollständigen Hemmung bei 5 % Wassergehalt. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Feuchtestufen sind hier teilweise signifikant, insbesondere zwischen 20 % und den

geringeren Wassergehalten. Die Reproduktion nahm in Versuch 3 mit steigendem Wassergehalt ab, wird aber auch bei der höchsten Feuchtestufe nicht ganz eingestellt. Eine erhöhte Mortalität der Adulten konnte in keinem Versuch bei keinem Wassergehalt festgestellt werden, wengleich die Tiere bei 5 % Wassergehalt einen lethargischen Eindruck machten. Während der Boden von 5-35 % in Form mehr oder weniger großer Krümel vorlag, lag das Material ab 40 % Wassergehalt als zusammenhängende Schicht, zum Teil mit Hohlräumen, auf dem Gefäßboden vor. Beim höchsten getesteten Wassergehalt (50 %) war die WHK von LUFA 2.2 erreicht.

Juvenile nach 21 Tagen

Enchytraeus christenseni

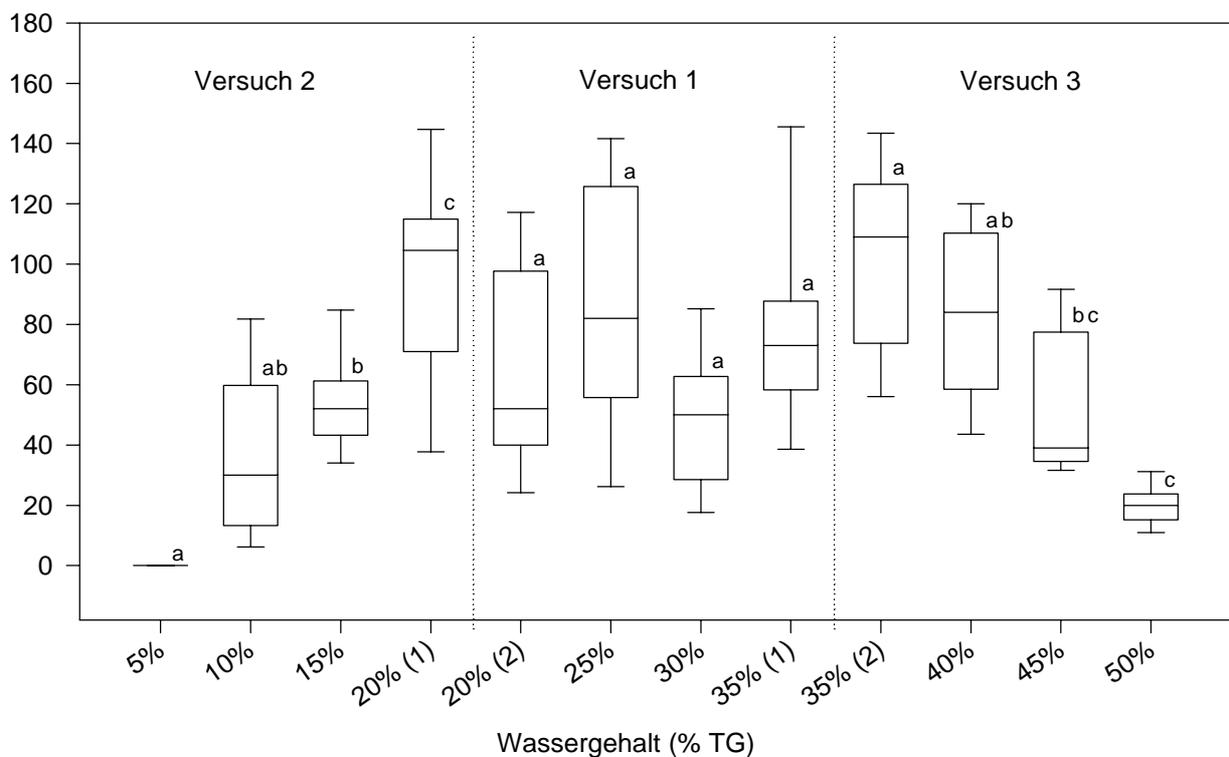


Abb. 32: Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* in Abhängigkeit vom Wassergehalt (**Reproduktionstests WG 1 – 3**). Varianten mit gleichen Buchstaben innerhalb eines Versuchs zeigen keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse (ANOVA, Tukey Test). n = 7

Einen Bezug zu den Feuchteverhältnissen im Freiland hat besonders Versuch 2, da im Freiland eher niedrige Wassergehalte gemessen wurden. Die Reproduktion ist unter Laborbedingungen bei Wassergehalten von 15 % (TG) bzw. 31,4 % (WHK) oder weniger deutlich eingeschränkt. Dieser Wert wird auf den untersuchten Rieselfeldflächen im Mineralboden häufig unterschritten (Tab. 31). Hinsichtlich der Bodenfeuchte liegen in den Freilandböden damit offenbar nicht immer optimale Bedingungen für die Reproduktion von *E. christenseni* vor.

Tab. 31: Anzahl der Termine auf den Rieselfeldflächen mit Wassergehalten, die im Laborversuch eine Reproduktionseinschränkung hervorrufen. Die drei Wassergehalte in % (WHK) entsprechen 15 % (TG) 10 % (TG) und 5 % (TG) bei LUFA 2.2. n: Gesamtzahl der Messungen

Fläche	n	< 31,4 % (WHK)	< 20,9 % (WHK)	< 10,5 % (WHK)
RefB	22	10	7	2
nPAK	23	12	4	0
T 14	23	4	0	0
nPCB(-)	19	5	2	1
gbB	5	4	2	1
T 26	3	0	0	0
Bucher Forst	3	0	0	0

5.2.2 Körperlänge von *Enchytraeus christenseni* bei zwei verschiedenen Wassergehalten

Bei Reproduktionsversuch WG 2 zur Bodenfeuchte wurde zu Testende die Körperlänge der anfangs eingesetzten Adulten bei den Wassergehalts-Varianten 5 % und 20 % bestimmt. Die Tiere der beiden Varianten unterschieden sich signifikant sowohl hinsichtlich Segmentzahl als auch Körperlänge in Millimetern (Abb. 33). Bei einem Wassergehalt von 5 % wird also nicht nur die Reproduktion eingestellt, sondern auch das Wachstum während der Testlaufzeit eingeschränkt.

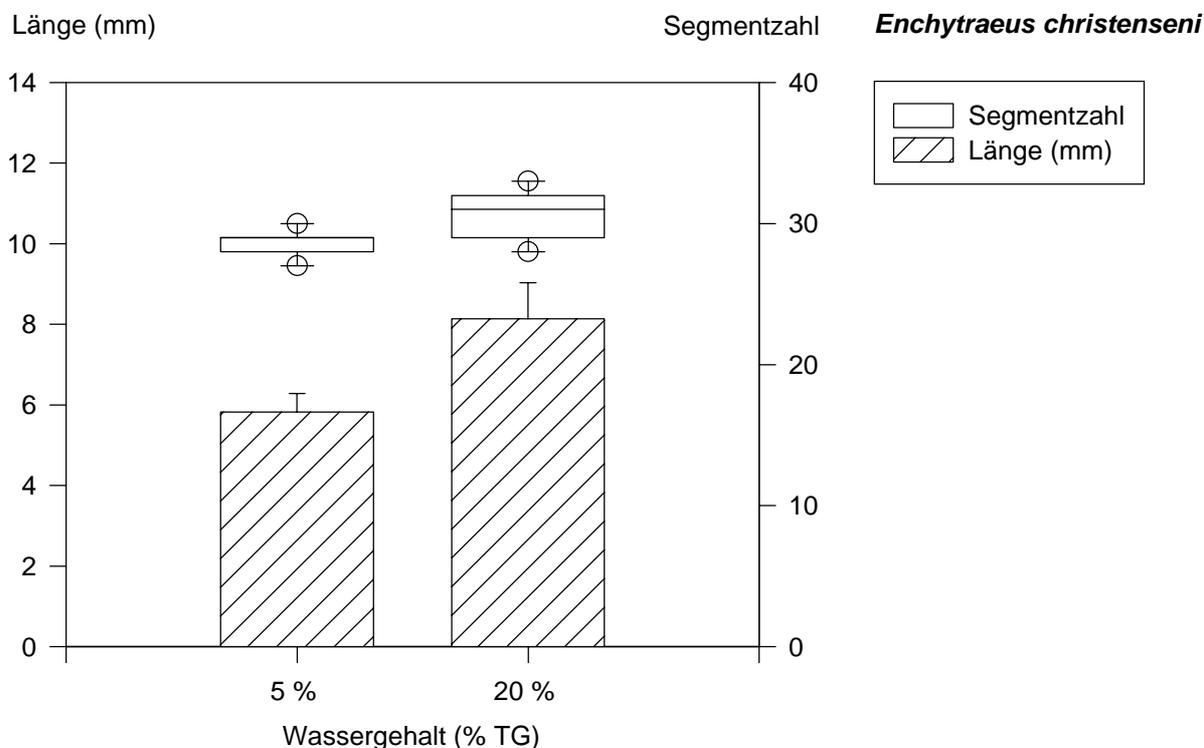


Abb. 33: Körperlänge der Adulten von *Enchytraeus christenseni* im Reproduktionsversuch WG 2 bei zwei verschiedenen Wassergehalten. Körperlänge als Segmentzahl (Boxplots) und in mm (Säulen). Unterschiede signifikant (Mann-Whitney U-Test). n = 30-34

5.2.3 Einfluss des Mixens des Bodens auf die Reproduktion von *Enchytraeus christenseni*

Bei der Betrachtung oben beschriebener Versuche zur Bodenfeuchte fällt bei einem Wassergehalt von 30 % eine, wenn auch nicht signifikant, eingeschränkte Reproduktion auf (Abb. 32). Das Mischen des Bodens mit dem Wasser führte bei dieser Feuchtestufe zur Entstehung von wenigen großen Klumpen. Durch einen ergänzenden Versuch sollte geklärt werden, ob die durch das Mischen entstehende Bodenstruktur speziell bei diesem Wassergehalt einen ungünstigen Einfluss auf die Reproduktion hat. Die Ergebnisse zeigen, dass bei allen drei daraufhin getesteten Wassergehalten jeweils in der gemixten Variante eine niedrigere Reproduktion vorliegt als in der ungemixten (Abb. 34). Dieser Unterschied ist allerdings nur bei einem Wassergehalt von 30 % signifikant. Die ungemixten Varianten zeigen mit steigendem Wassergehalt eine steigende Reproduktion, während diese Tendenz in den gemixten Varianten nicht zu erkennen ist. Die Differenz zwischen den beiden Varianten ist daher bei 30 % Wassergehalt am größten.

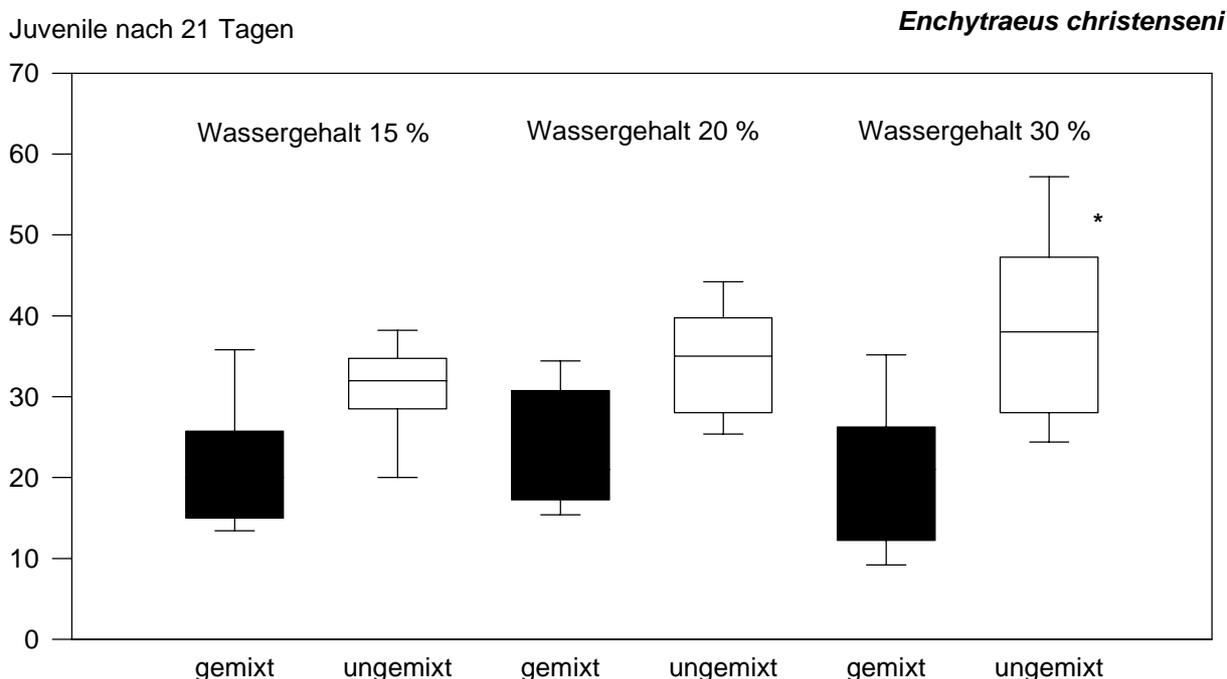


Abb. 34: Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* bei drei Wassergehalten und jeweils in den zwei Varianten gemixt (Wasserzugabe mit Mixer) und ungemixt (Wasserzugabe ohne Mixer).
 * : signifikant verschieden von der gemixten Variante (ANOVA, Tukey Test). n = 7

Das Mixen lässt sich bei den Versuchen mit Zinkchlorid allerdings nicht vermeiden, wenn eine annähernd gleichmäßige Verteilung des Schwermetalls gewährleistet sein soll. Ein Wassergehalt von 20 % scheint eine für Versuchszwecke ausreichend hohe Reproduktion von *E. christenseni* zu gewährleisten, wobei der nachteilige Effekt der Klumpenbildung bei diesem Wassergehalt geringer ausfällt als bei 30 %. Ein Wassergehalt von 20 % kommt außerdem den Verhältnissen im Freiland näher. Die weiteren Versuche wurden daher mit 20 % (TG) Wassergehalt durchgeführt ($\hat{=}$ 41,8 % WHK).

5.2.4 Reproduktion von *Enchytraeus* sp. (RefB5) bei drei verschiedenen Wassergehalten

Die Reproduktion von *Enchytraeus* sp. (RefB5) wurde nur bei niedrigen Wassergehalten untersucht, da diese für einen Vergleich mit der Freilandsituation am relevantesten schienen. Bei einem Wassergehalt von 5 % betrug die Mortalität der Adulten fast 100 %, so dass keine Reproduktion festzustellen war. Diese Art ist damit möglicherweise empfindlicher gegenüber Austrocknung als *Enchytraeus christenseni*. Allerdings muss bei einem Vergleich der beiden Arten berücksichtigt werden, dass in dem Versuch mit *Enchytraeus* sp. (RefB5) der pH-Wert etwas niedriger lag (vgl. Tab. 40 und 41). Bei 25 % Wassergehalt lag der Median der Reproduktion etwa doppelt so hoch wie bei 15 % (Abb. 35). Damit liegt die für die Reproduktion dieser Art optimale Bodenfeuchte wahrscheinlich ebenfalls oberhalb der im Freiland häufig gemessenen Wassergehalte von unter 15 % (TG) bzw. 31,4 % (WHK). Um eine Vergleichbarkeit mit den Versuchen mit *Enchytraeus christenseni* zu gewährleisten, wurden die weiteren Versuche mit *Enchytraeus* sp. (RefB5) ebenfalls bei 20 % Wassergehalt durchgeführt.

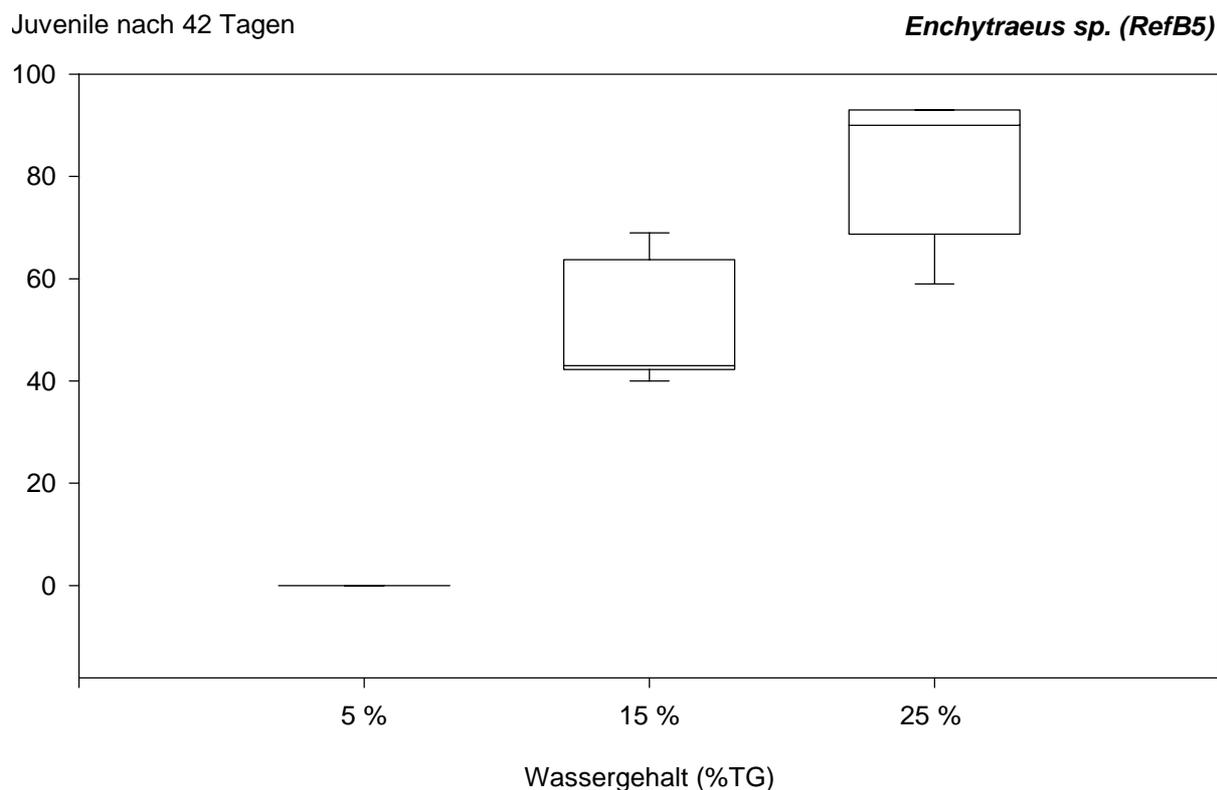


Abb. 35: Reproduktion von *Enchytraeus sp. (RefB5)* bei drei Wassergehalten. Unterschiede signifikant (ANOVA, Tukey Test). n = 5

5.3 Versuche zum Einfluss des pH-Wertes

5.3.1 Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* in Abhängigkeit vom pH-Wert

Außer dem unbehandelten LUFA 2.2-Boden wurden zwei angesäuerte und zwei aufgekalkte Varianten untersucht. Bei der unbehandelten Variante (Kontrolle) stieg der pH-Wert während der Versuchslaufzeit um 0,5 Einheiten (Tab. 32). Bei den anderen Varianten war der Anstieg, wenn überhaupt vorhanden, geringer.

Tab. 32: pH(CaCl₂)-Werte der getesteten Varianten zu Testbeginn und zu Testende (Reproduktionstest pH).

Variante	Testbeginn	Testende
LUFA 2.2 (Kontrolle)	5,3	5,8
LUFA 2.2 + 0,05 % (TG) CaCO ₃	6,6	6,6
LUFA 2.2 + 0,15 % (TG) CaCO ₃	7,0	7,0
LUFA 2.2 + 0,1 ml HCl/100g (TG)	4,8	4,8
LUFA 2.2 + 0,2 ml HCl/100g (TG)	4,2	4,4

Die Reproduktion lag in der Kontrolle (pH 5,3) und bei pH 7,0 etwa auf gleichem Niveau (Abb. 36). Bei pH 6,5 war die Reproduktion leicht, bei pH 4,8 und 4,2 stark eingeschränkt. Bei pH 4,2 trat außerdem eine leicht erhöhte Mortalität der Adulten auf (7,6 Überlebende im Mittel gegenüber 9,6 in der Kontrolle).

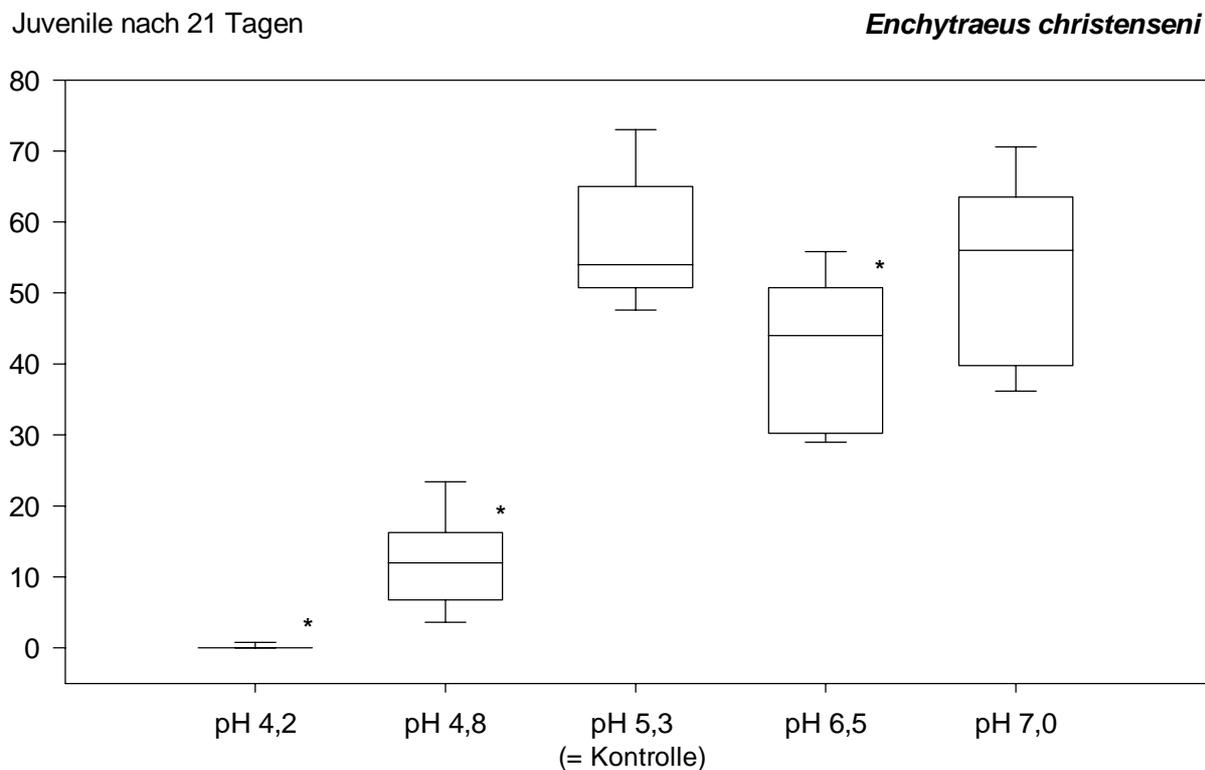


Abb. 36: Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* bei unterschiedlichen pH-Werten (**Reproduktionstest pH**). *: Unterschiede signifikant verschieden von der Kontrolle (ANOVA, Dunnett's Test)

5.3.2 Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* im Kombinationsversuch Bodenfeuchte – pH-Wert

In den vorangegangenen Versuchen waren Wassergehalt- und pH-Wert-Niveaus bestimmt worden, bei denen die Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* eingeschränkt ist, aber nicht völlig zum Erliegen kommt. Es sollte nun untersucht werden, wie sich schwach ungünstige Bedingungen hinsichtlich dieser beiden Faktoren in Kombination auswirken. Dazu wurden zwei Wassergehalte mit zwei pH-Stufen kombiniert. Da die Reproduktion im pH-Versuch bei pH 4,8 schon deutlich herabgesetzt war, wurde im Kombinationsversuch schwächer angesäuert, um noch einen eventuell vorhandenen additiven Effekt der geringeren Feuchte zu ermöglichen. Die pH-Werte der angesäuerten Varianten lagen zu Testende mit 5,2 etwas höher als zu Testbeginn mit 4,9-5,0 (Tab. 33).

Tab. 33: pH(CaCl₂)-Werte der getesteten Varianten zu Testbeginn und zu Testende (**Reproduktionstest pH – WG**).

Variante	WG %(TG)	Testbeginn	Testende
LUFA 2.2 (Kontrolle)	20	5,6	5,6
LUFA 2.2	15	5,9	5,7
LUFA 2.2 + 0,05 ml HCl/100g (TG)	20	5,0	5,2
LUFA 2.2 + 0,05 ml HCl/100g (TG)	15	4,9	5,2

Bei einem Wassergehalt von 20 % unterscheidet sich die Reproduktion der beiden pH-Wert-Stufen nicht signifikant voneinander (Abb. 37). Die beiden nicht-angesäuerten Varianten unterscheiden sich ebenfalls nicht signifikant, wenngleich die Reproduktion beim geringeren Wassergehalt etwas niedriger ist. Nur in der angesäuerten Variante mit 15 % Wassergehalt, also mit dem Zusammentreffen zweier ungünstiger Faktoren, ist die Reproduktion signifikant verringert. Eine gegenseitige Verstärkung (= Wechselwirkung) der beiden Faktoren lässt sich jedoch statistisch nicht absichern (Zweifaktorielle ANOVA).

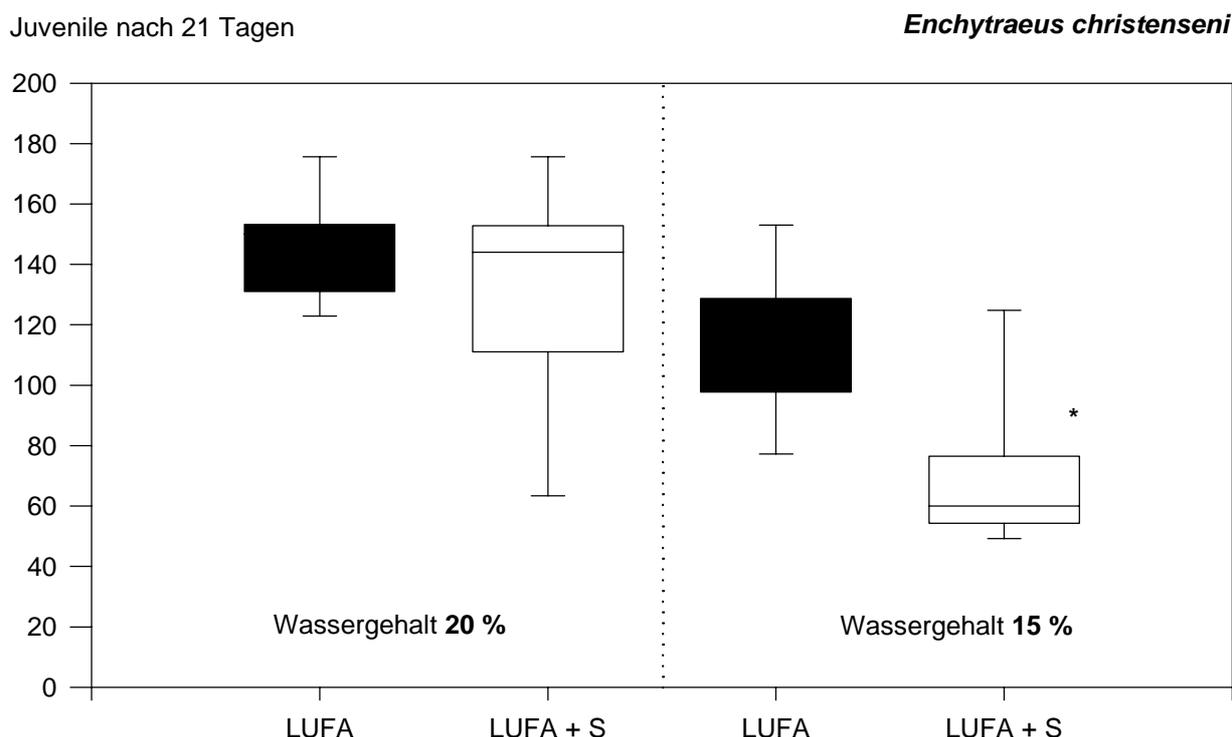


Abb. 37: Reproduktion von *Enchytraeus christensenii* bei zwei verschiedenen Wassergehalten in Kombination mit zwei pH-Werten (**Reproduktionstest pH – WG**). LUFA+S: LUFA 2.2 mit Säurezugabe; *: signifikant abweichend von allen anderen Varianten (Zweifaktorielle ANOVA, Tukey Test). n = 7

5.3.3 Segmentzahl von *Enchytraeus christenseni* im Kombinationsversuch Bodenfeuchte – pH-Wert

Im Kombinationsversuch Bodenfeuchte – pH-Wert wurde zu Versuchsende in allen Varianten die Segmentzahl der Adulten bestimmt. Im Vergleich mit den Varianten mit 20 % Wassergehalt zeigen hier beide trockeneren Varianten eine signifikant niedrigere Segmentzahl (Abb. 38). Der Parameter Segmentzahl zeigt also, im Gegensatz zur Reproduktion, bereits bei ungünstigen Bedingungen hinsichtlich eines einzelnen Faktors (Bodenfeuchte) einen Effekt. Eine Interaktion zwischen den beiden Faktoren pH-Wert und Feuchte lässt sich auch hier statistisch nicht absichern (Zweifaktorielle ANOVA).

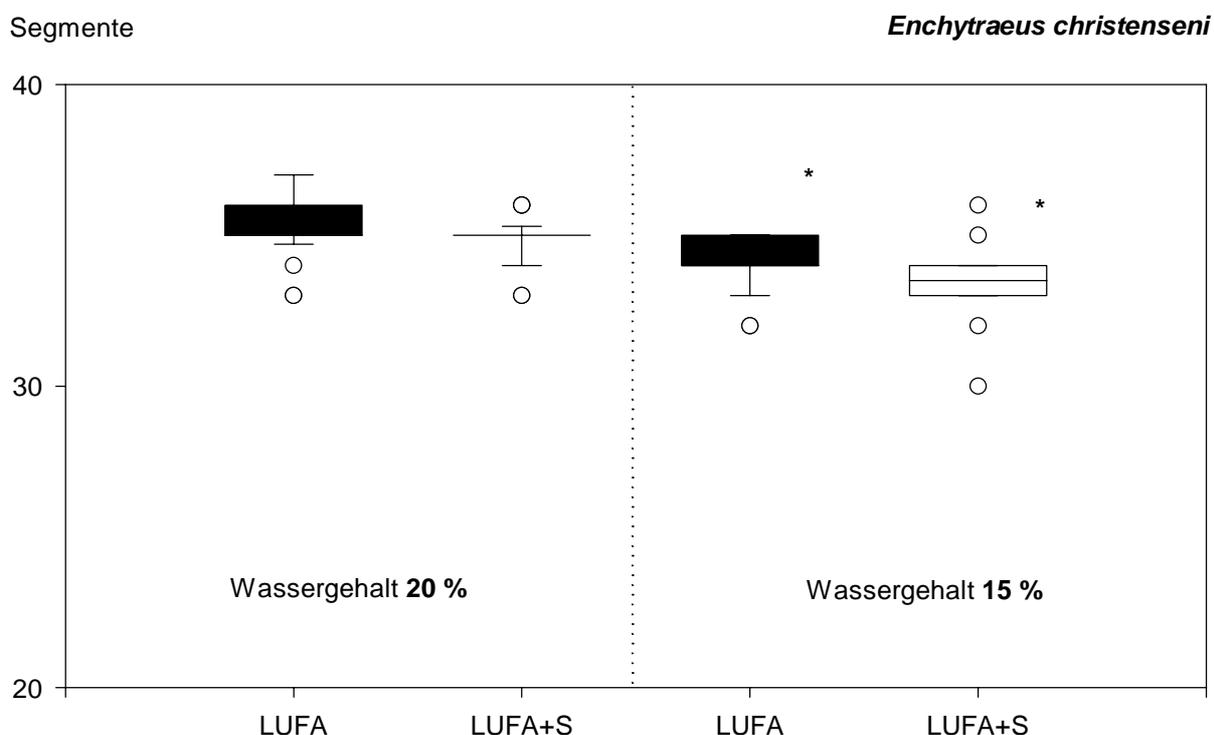


Abb. 38: Segmentzahlen der Adulten von *Enchytraeus christenseni* zu Versuchsende im Reproduktionstest bei zwei verschiedenen Wassergehalten in Kombination mit zwei pH-Werten (**Reproduktionstest pH – WG**). *: signifikant verschieden von beiden Varianten mit 20 % Wassergehalt (ANOVA, Tukey Test). n = 32

5.4 Schwermetallgehalte des Standardbodens LUFA 2.2

Bevor auf die Laborversuche mit $ZnCl_2$ eingegangen wird, sollen hier zunächst die Schwermetallgehalte von LUFA 2.2 (unbehandelt) sowie von den aufdotierten Varianten dargestellt werden (Abb. 39). Ein Vergleich mit den ehemaligen Rieselfeldböden zeigt, dass die Schwermetallgehalte des unbehandelten LUFA 2.2 Standardbodens auf ähnlichem Niveau wie bei den Flächen gbB und Forst liegen (s. Abb. 11-14). Der mobile Zinkanteil liegt mit 1,4 % vom Gesamtgehalt allerdings erheblich niedriger als bei allen Freilandböden. Bei den mit Zinkchlorid aufdotierten LUFA-Varianten wird der theoretisch zu erwartende Zinkgehalt (Gesamtgehalt LUFA + dotiertes Zink) nicht ganz erreicht. Die Messwerte liegen zwischen 91,7 % (55 mg-Variante) und 88,3 % (228 mg-Variante) der nominalen Werte. Der mobile Zinkanteil der dotierten Böden steigt mit zunehmendem Gesamtgehalt von 13,6 % auf 30,0 % an und liegt damit im Bereich der Freilandböden. Vergleicht man jeweils die angesäuerte Variante mit der Variante ohne HCl, so liegen bei gleichen Gesamtgehalten die mobilen Anteile in der angesäuerten Variante höher. Der pH-Wert betrug bei den Varianten ohne Säurezugabe 5,2 – 5,3, bei den angesäuerten Varianten 4,9 - 5,0. Bei den Versuchsergebnissen werden jeweils nur die dotierten Zinkgehalte angegeben. Der in LUFA 2.2 bereits vorhandene Zinkgehalt (28 mg/kg) wird nicht berücksichtigt.

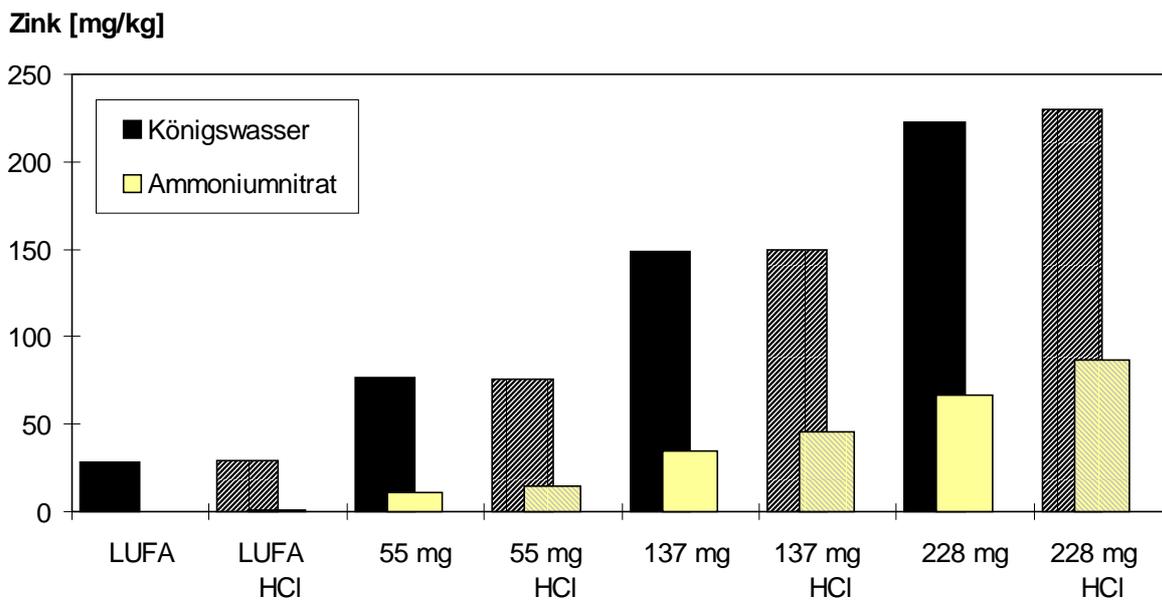


Abb. 39: Zinkgehalte von LUFA 2.2 und den aufdotierten LUFA-Varianten. Ergebnisse von Königswasser- und Ammoniumnitrat-Aufschluss. Ohne Schraffur: ohne HCl; mit Schraffur: mit HCl.

5.5 Versuche mit Zinkchlorid

5.5.1 Mortalitätstests mit *Enchytraeus christenseni*

Mit *Enchytraeus christenseni* wurden zwei Mortalitätstests durchgeführt. Im ersten Versuch (Abb. 40) konnte bis 262 mg Zn/kg kein signifikanter Effekt festgestellt werden (NOEC). Ab dem nächsthöheren Zinkgehalt (472 mg/kg) betrug die Mortalität 100 % (LOEC). Die mittels der Probit-Transformation berechnete LC₅₀ lag oberhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches. Sie wurde als nicht plausibel verworfen, zumal nur bei zwei Zinkgehalten ein Effekt ≠ 0 % oder 100 % der Kontrolle auftrat und für die Probit-Regression dadurch eine zu schmale Datenbasis vorlag. Der Versuch wurde daher mit engerer Staffelung der Konzentrationsstufen wiederholt.

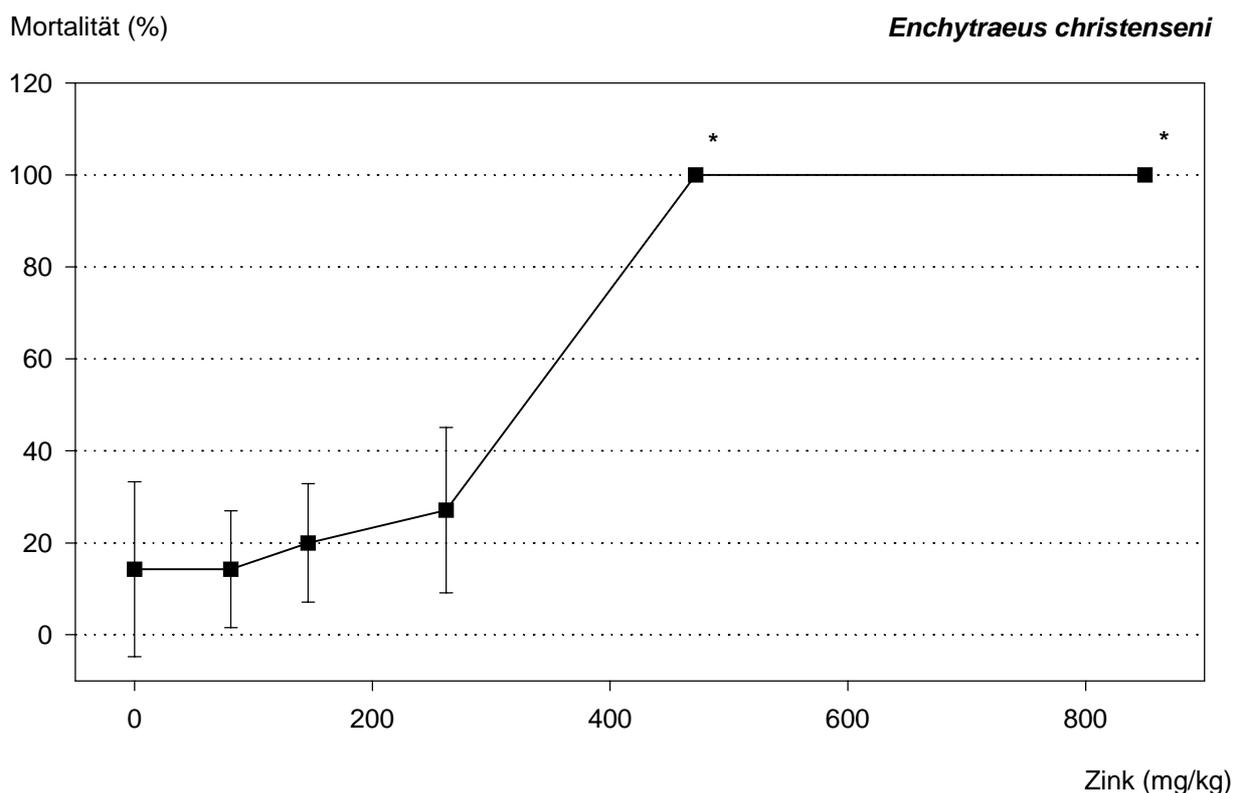


Abb. 40: Mortalität von *Enchytraeus christenseni* in Abhängigkeit von der Zinkkonzentration (**Mortalitätstest Zink 1**). Fehlerbalken: Standardabweichung; *: signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (Kruskal-Wallis Rangvarianzanalyse, Dunnett's Test). n = 7

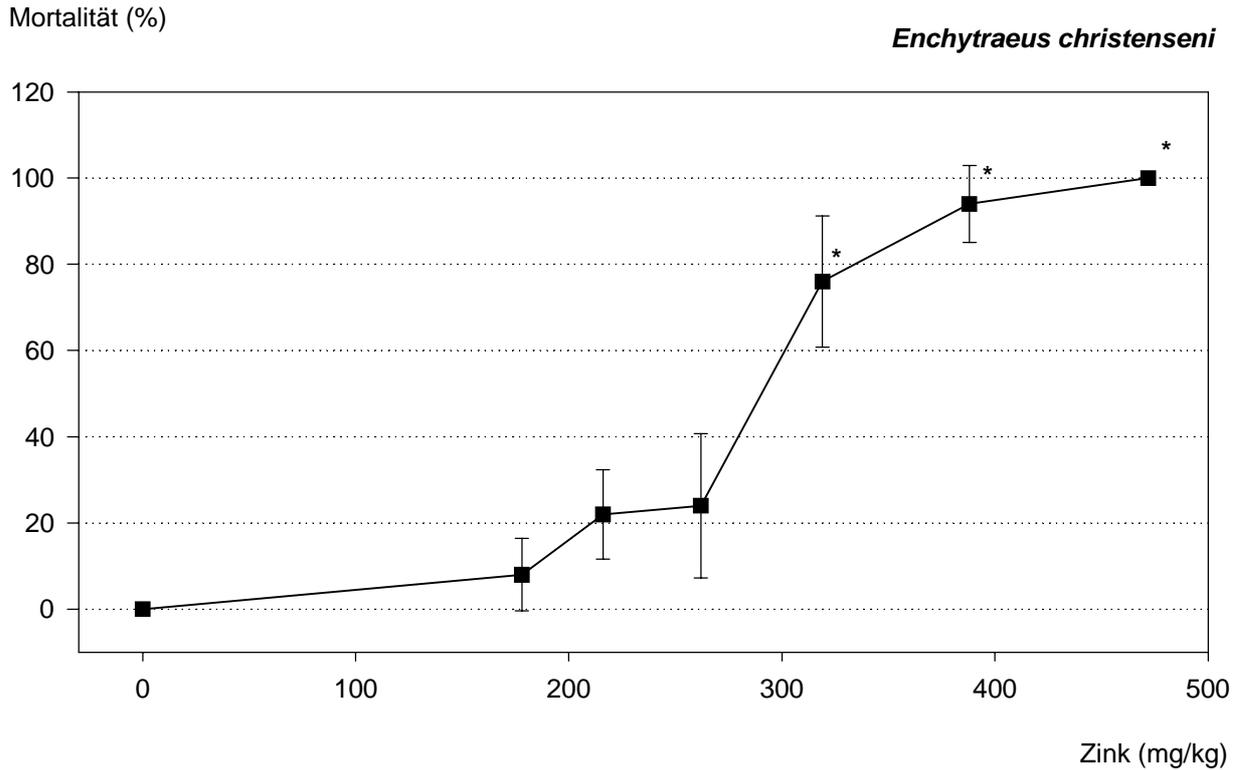


Abb. 41: Mortalität von *Enchytraeus christenseni* in Abhängigkeit von der Zinkkonzentration (**Mortalitätstest Zink 2**). Fehlerbalken: Standardabweichung; *: signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (Kruskal-Wallis Rangvarianzanalyse, Dunnett's Test). n = 7

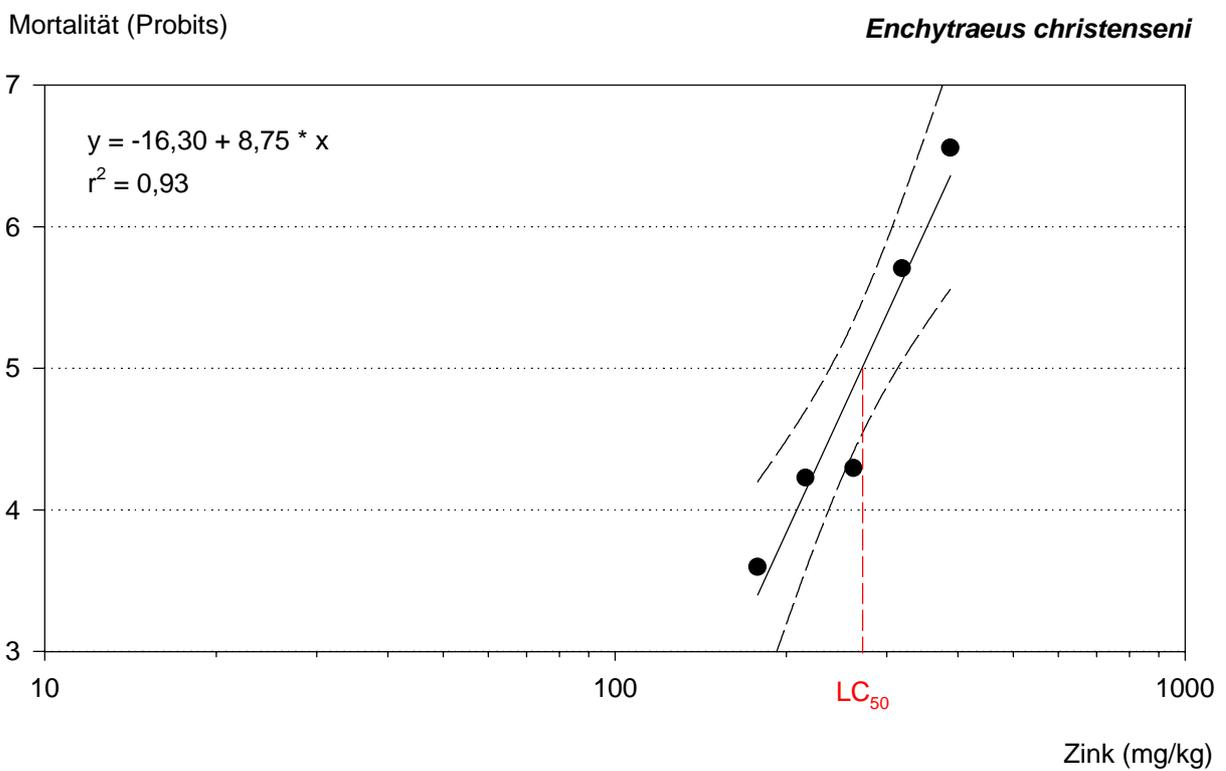


Abb. 42: Regressionsgerade zur LC₅₀-Berechnung für *Enchytraeus christenseni* (**Mortalitätstest Zink 2**) mit 95 %-Konfidenzintervall (gestrichelt).

Im zweiten Versuch gab es ebenfalls bis 262 mg/kg (NOEC) einen leichten, nicht signifikanten Anstieg der Mortalität (Abb. 41). Ab 319 mg/kg (LOEC) trat eine signifikante Mortalität auf. Für die LC_{50} wurde mit Hilfe der Probit-Transformation ein Wert von 271,8 mg/kg berechnet (Abb. 42).

5.5.2 Reproduktionstests mit *Enchytraeus christenseni*

Der Einfluss von Zinkchlorid auf die Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* wurde in drei Labortests untersucht. Dabei erfolgten die ersten beiden Versuche mit denselben Zinkgehalten, aber mit unterschiedlichen Alterungszeiten nach Kontamination des Bodens (5 Tage bzw. 26 Wochen). Im ersten Versuch zeigte sich in den niedrigsten drei Zinkgehalten ein leichter Anstieg der Reproduktion gegenüber der Kontrolle (Abb. 43). Ab dem nächsthöheren Zinkgehalt war die Reproduktion sprunghaft verringert. Da dieser Effekt gegenüber der Kontrolle statistisch jedoch nicht gesichert ist, liegt hier die NOEC (146 mg/kg). Ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle besteht erst bei 262 mg/kg (LOEC). Eine Berechnung der EC_{50} ist mit den Ergebnissen nicht möglich, da nach Ausscheiden aller Daten von 0 % und ≥ 100 % des Kontrollwertes im Rahmen der Probit-Transformation nur ein Datensatz übrig bleibt. Bei 262 mg/kg war die Mortalität der Adulten in diesem Versuch um 18,8 % gegenüber der Kontrolle erhöht (nicht signifikant). Dies lag trotz unterschiedlicher Versuchslaufzeiten im Bereich der Ergebnisse der beiden Akutttests bei dieser Konzentration (15 % bzw. 24 % Effekt gegenüber der Kontrolle). Da beim höchsten Zinkgehalt (472 mg/kg) eine erhebliche Mortalität der Adulten auftrat, wurde diese Variante beim zweiten Reproduktionstest weggelassen.

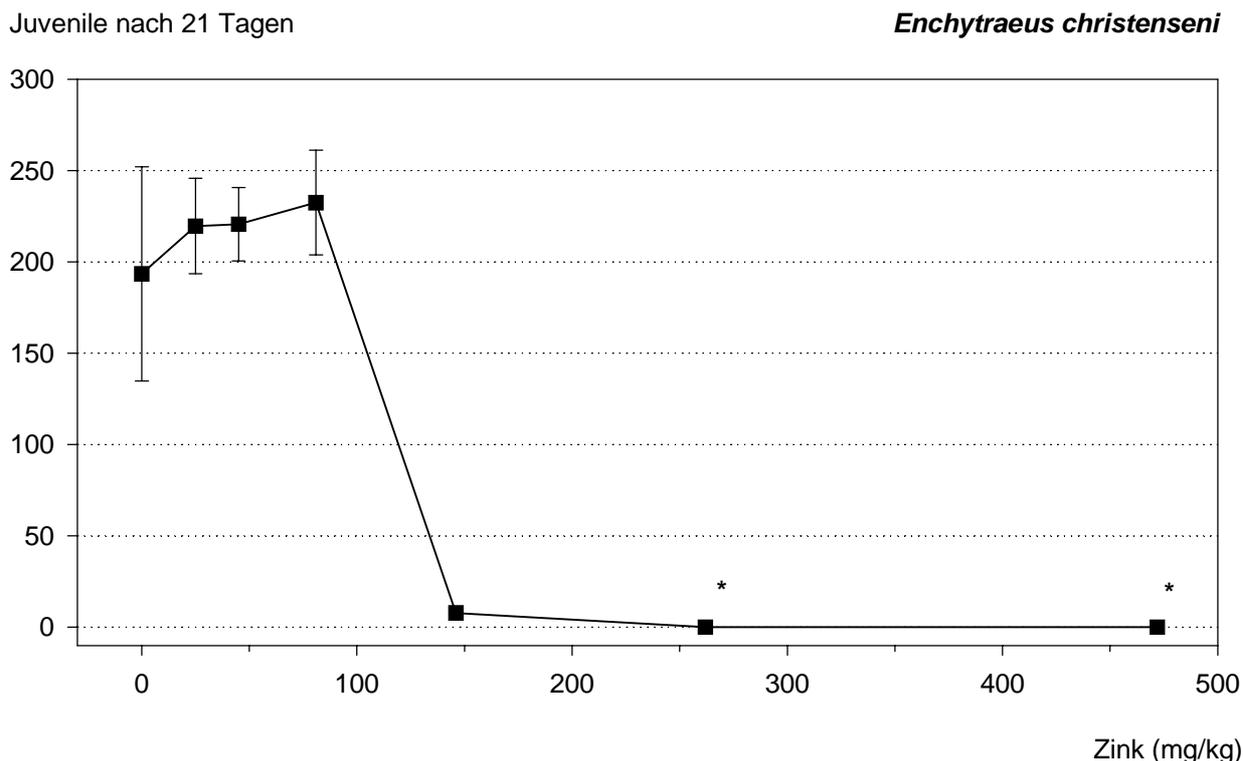


Abb. 43: Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* in Abhängigkeit von der Zinkkonzentration (**Reproduktionstest Zink 1**). Fehlerbalken: Standardabweichung; *: signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (Kruskal-Wallis Rangvarianzanalyse, Dunn's Test). n = 5-7

Im zweiten Versuch (26 Wochen Alterung) zeigte die Reproduktion in Abhängigkeit von den Zinkgehalten einen etwas anderen Verlauf. Bei den drei geringsten Gehalten schwankt die Reproduktion zwischen 78 % und 103 % der Kontrolle (Abb. 44). Zwischen 81 und 146 mg Zn/kg kommt es, ebenso wie im ersten Versuch, zu einem Abfall der Reproduktion. Hier ist der Effekt bei 146 mg Zn/kg gegenüber der Kontrolle jedoch auch statistisch absicherbar, so dass die NOEC (81 mg/kg) und die LOEC (146 mg/kg) rechnerisch niedriger liegen als im ersten Versuch. Dieser Unterschied zwischen den beiden Versuchen ist jedoch bei Betrachtung der Kurven nicht plausibel, da in beiden Fällen 146 mg/kg der niedrigste Zinkgehalt mit einem deutlich hemmenden Effekt auf die Reproduktion ist. Die Differenz zwischen berechneter und graphisch augenscheinlicher LOEC ist im Wesentlichen in der fehlenden Normalverteilung der Daten begründet, die einen nichtparametrischen statistischen Test erfordert (Kruskal-Wallis Rangvarianzanalyse). Ein parametrischer Test (ANOVA) mit denselben Daten ergibt bei beiden Versuchen eine LOEC von 146 mg/kg. Dieses Vorgehen erscheint durchaus vertretbar, da sich die ANOVA gegen eine Verletzung der Bedingung „Normalverteilung“ recht robust verhält

(ABRAHAMSEN & STRAND 1970, FOX ET AL. 1995). Eine Veränderung der Toxizität durch die längere Lagerungszeit des kontaminierten Bodens („Alterung“) ist folglich nicht erkennbar. Alle weiteren Versuche wurden mit einer Lagerungszeit von 4-6 Tagen zwischen Zinkzugabe und Einsetzen der Versuchstiere durchgeführt.

Die stark verminderte Reproduktion bei 262 mg/kg muss vor dem Hintergrund einer signifikant erhöhten Sterblichkeit der Adulten bei diesem Zinkgehalt betrachtet werden. Die EC_{50} wurde für den zweiten Versuch mit 59,6 mg Zn/kg berechnet. Das Bestimmtheitsmaß liegt mit $r^2 = 0,75$ allerdings im Vergleich zu den anderen Versuchen eher niedrig und der Zusammenhang zwischen der Zinkkonzentration und der Reproduktion lässt sich für diese Regression nicht absichern (ANOVA, $P = 0,136$) (Abb. 45). Die Ergebnisse wurden daher in einem dritten Versuch mit einem veränderten Konzentrationsbereich überprüft.

Im Gegensatz zu den vorhergehenden Versuchen war im dritten Versuch bereits bei 81 mg Zn/kg ein hemmender Einfluss auf die Reproduktion festzustellen (LOEC) (Abb. 46). Der Effekt bei 146 mg/kg mit einer Reproduktion von 2,0 - 4,1 % der Kontrolle ist dagegen in allen drei Versuchen sehr ähnlich. Für die EC_{50} wurde ein Wert von 75,9 mg Zn/kg berechnet (Abb. 47). Aufgrund des höheren r^2 -Wertes und eines signifikanten Zusammenhangs zwischen den beiden betrachteten Variablen muss diese EC_{50} als verlässlicher als die im Versuch 2 ermittelte angesehen werden.

Juvenile nach 21 Tagen

Enchytraeus christenseni

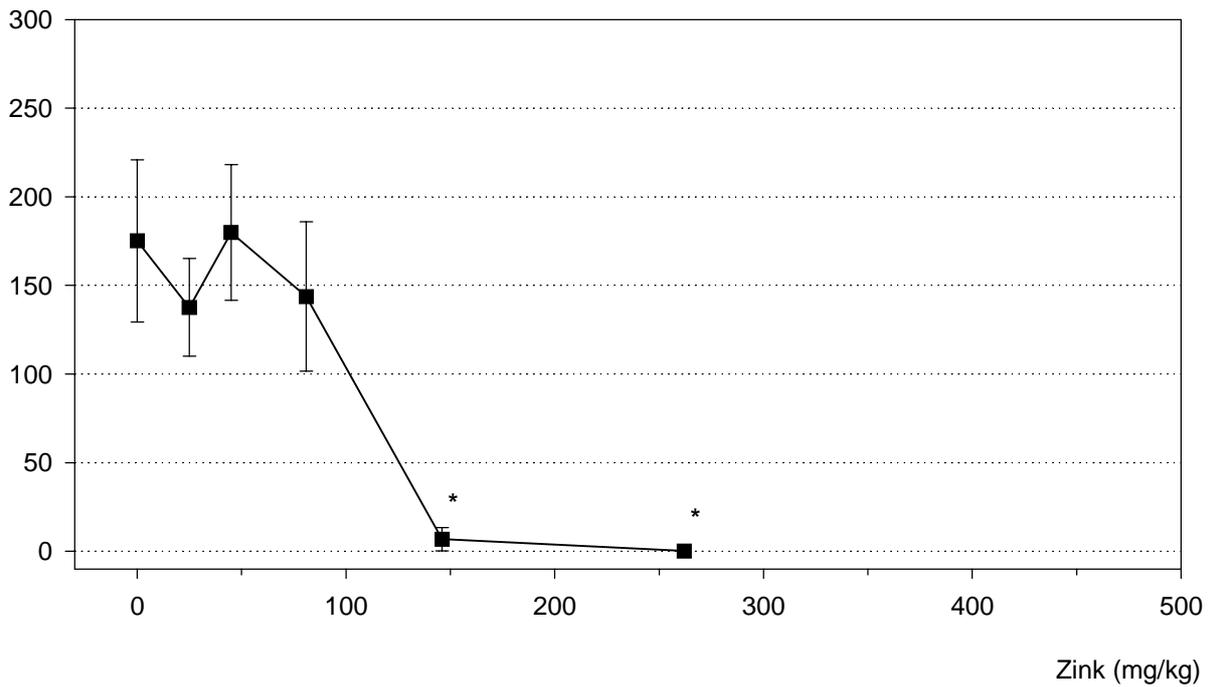


Abb. 44: Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* in Abhängigkeit von der Zinkkonzentration (**Reproduktionstest Zink 2, Alterung 26 Wochen**). Fehlerbalken: Standardabw.; *: signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (Kruskal-Wallis Rangvarianzanalyse, Dunnett's Test). n = 7

Reproduktion (Probits von % der Kontrolle)

Enchytraeus christenseni

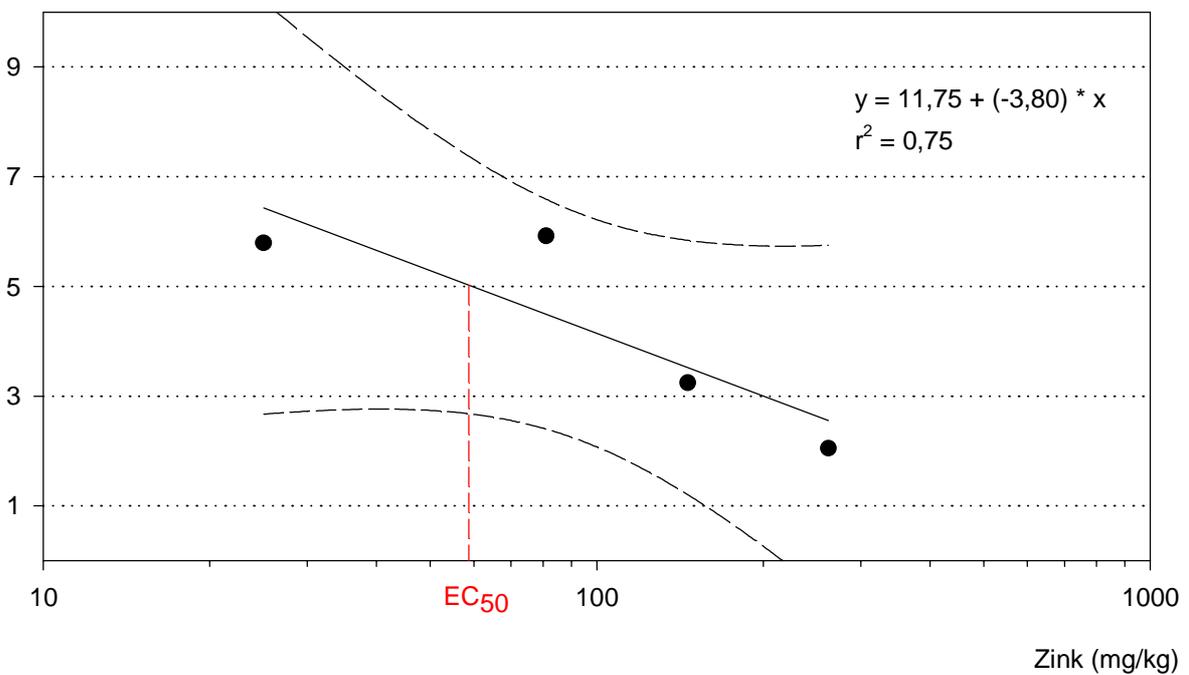


Abb. 45: Regressionsgerade zur EC₅₀-Berechnung für *Enchytraeus christenseni* (**Reproduktionstest Zink 2, Alterung 26 Wochen**) mit 95 %-Konfidenzintervall (gestrichelt).

Juvenile nach 21 Tagen

Enchytraeus christenseni

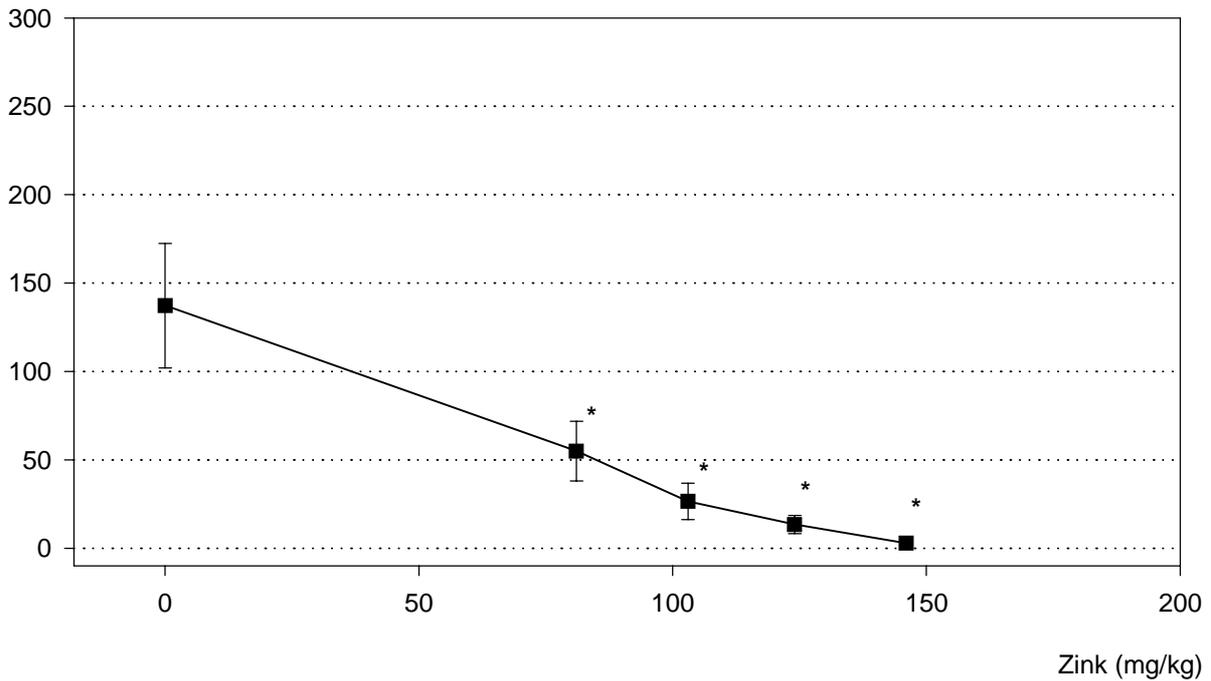


Abb. 46: Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* in Abhängigkeit von der Zinkkonzentration (**Reproduktionstest Zink 3**). Fehlerbalken: Standardabweichung; *: signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (Kruskal-Wallis Rangvarianzanalyse, Dunnett's Test). n = 7

Reproduktion (Probits von % der Kontrolle)

Enchytraeus christenseni

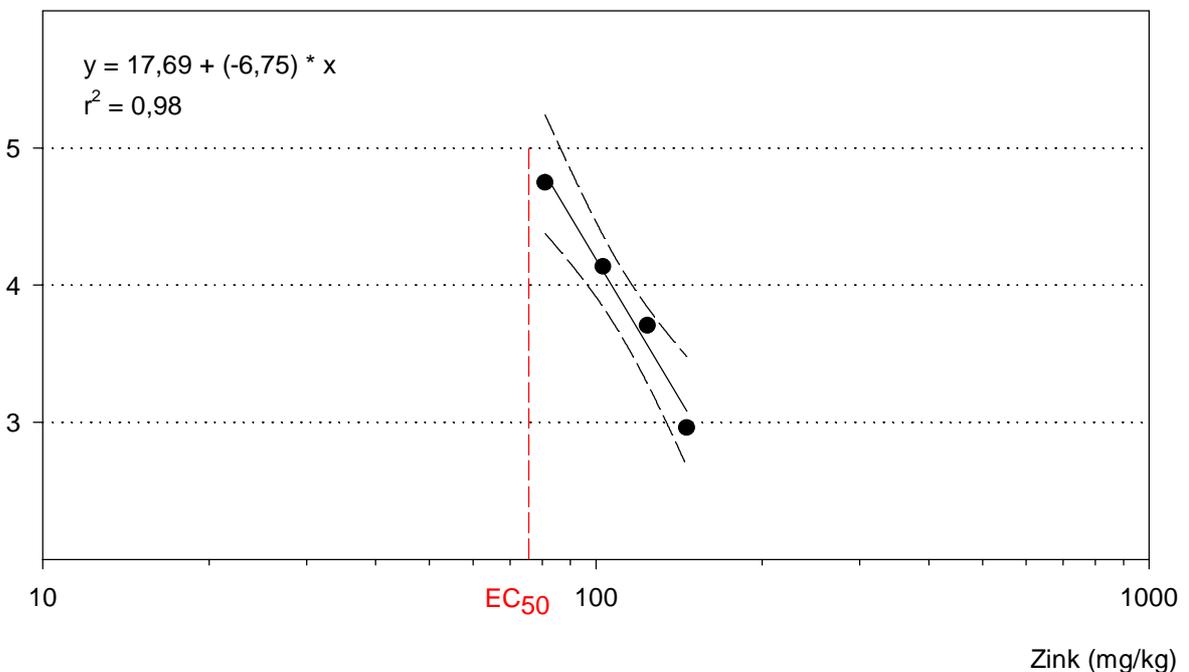


Abb. 47: Regressionsgerade zur EC₅₀-Berechnung für *Enchytraeus christenseni* (**Reproduktionstest Zink 3**) mit 95 %-Konfidenzintervall (gestrichelt).

5.5.3 Segmentzahl von *Enchytraeus christenseni* in zwei Reproduktionstests mit Zinkchlorid

In den Reproduktionstests Zink 2 und Zink 3, die im vorigen Abschnitt dargestellt wurden, wurde außer der Reproduktion auch die Segmentzahl der Adulten zu Testende ermittelt. In Test 2 erfolgte die Segmentzählung allerdings nur bei den drei höchsten getesteten Zinkgehalten und der Kontrolle. Dabei zeigte sich, dass bei 146 mg Zn/kg und 262 mg Zn/kg die Segmentzahl signifikant von der der Kontrolle abweicht (Abb. 48). Bei 81 mg Zn/kg ist dagegen kein Unterschied zur Kontrolle festzustellen (NOEC). Im Versuch 3 war die Segmentzahl bei allen getesteten Zinkgehalten signifikant niedriger als in der Kontrolle (Abb. 49). Hier liegt also die LOEC bei 81 mg Zn/kg. In beiden Versuchen entsprechen damit die Wirkschwellen der Segmentzählung denen der Reproduktion. Eine EC₅₀ lässt sich für den Parameter Segmentzahl nicht sinnvoll berechnen, da selbst signifikante Effekte nur wenige Prozent Abweichung vom Kontrollwert betragen.

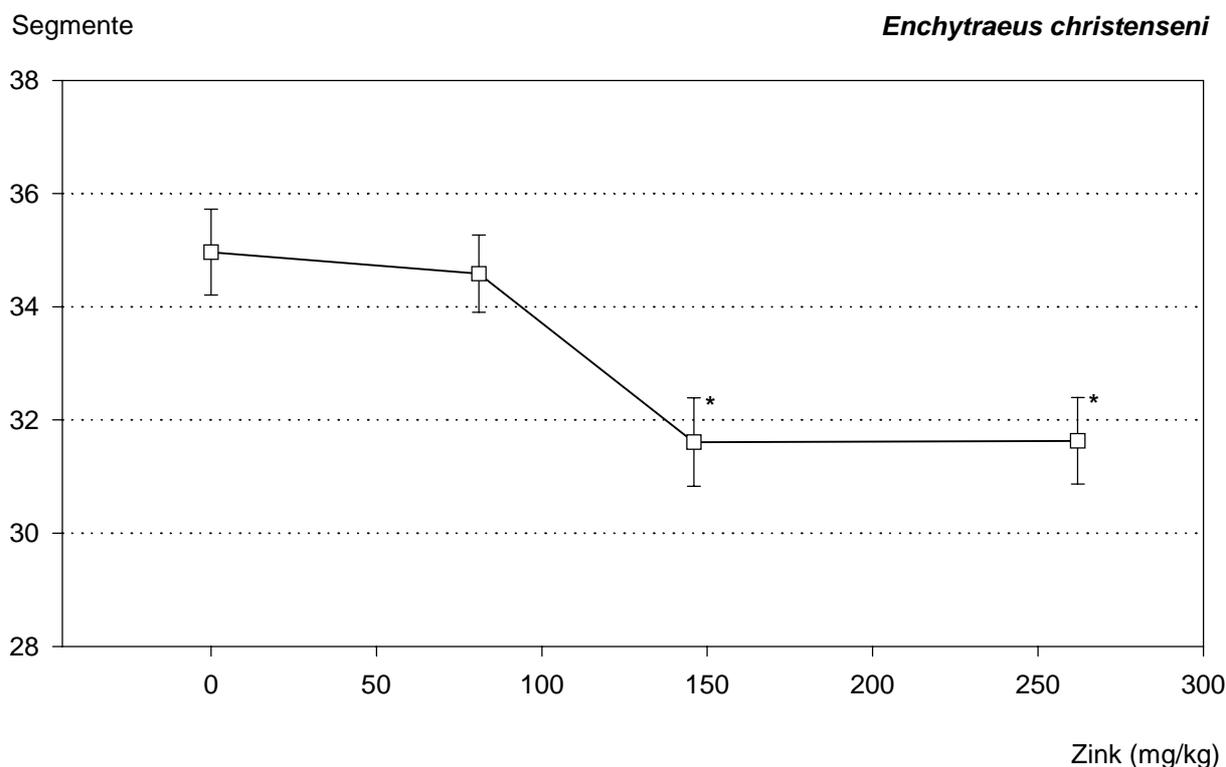


Abb. 48: Segmentzahlen der Adulten von *Enchytraeus christenseni* zu Versuchsende (**Reproduktionstest Zink 2, Alterung 26 Wochen**). Fehlerbalken: Standardabweichung; *: signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (Kruskal-Wallis Rangvarianzanalyse, Dunn's Test). n = 19-29

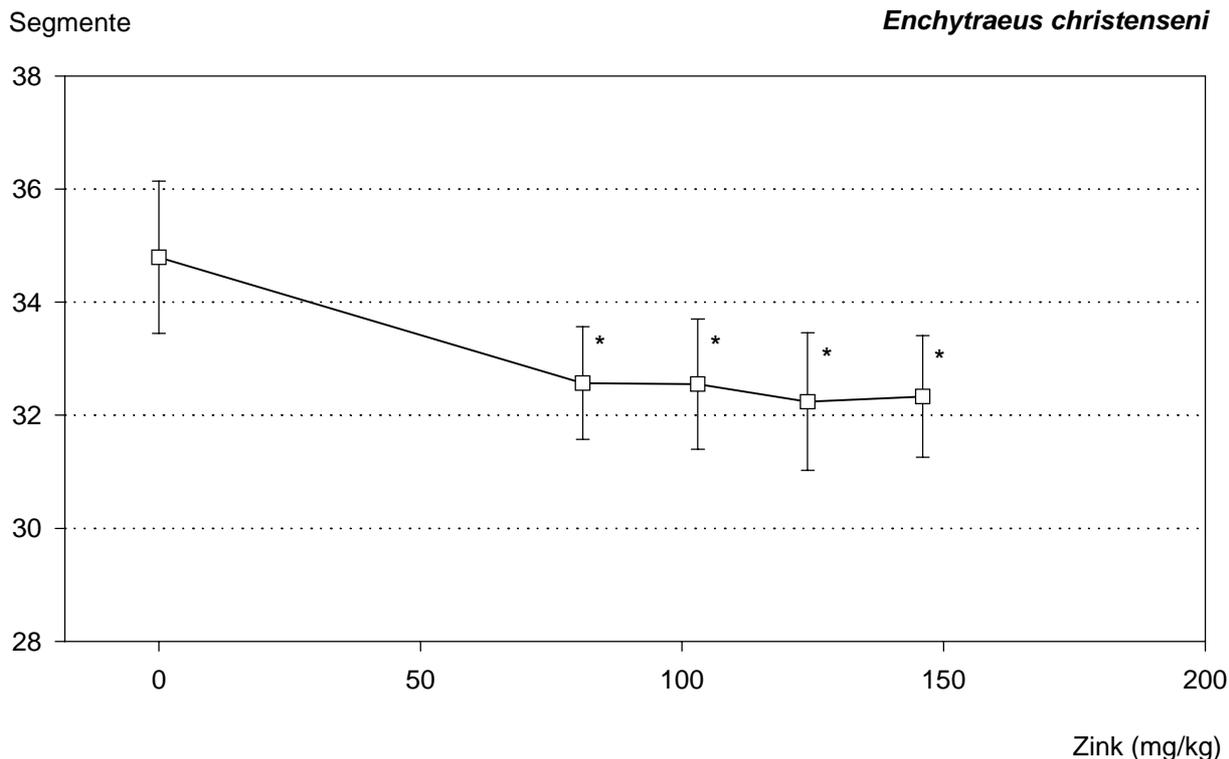


Abb. 49: Segmentzahlen der Adulten von *Enchytraeus christenseni* zu Versuchsende (**Reproduktionstest Zink 3**). Fehlerbalken: Standardabweichung; *: signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (Kruskal-Wallis Rangvarianzanalyse, Dunn's Test). n = 27-29

5.5.4 Mortalitätstests mit *Enchytraeus* sp. (RefB5)

Mit *Enchytraeus* sp. (RefB5) wurde zunächst ein Mortalitätstest in dem Konzentrationsbereich durchgeführt, der sich bei *Enchytraeus christenseni* als geeignet erwiesen hatte. Nur der höchste getestete Zinkgehalt (472 mg/kg) war jedoch signifikant unterschiedlich von der Kontrolle (LOEC) (Abb. 50). Bei 388 mg/kg war ein deutlicher, aber nicht signifikanter Effekt feststellbar (NOEC). Da die meisten untersuchten Zinkgehalte offenbar unterhalb der Wirkschwelle für die Mortalität lagen, war eine Berechnung der LC₅₀ durch eine Probit-Transformation nicht möglich. Wegen der ungünstigen Datenlage wurde ein weiterer Versuch mit einem veränderten Konzentrationsbereich durchgeführt.

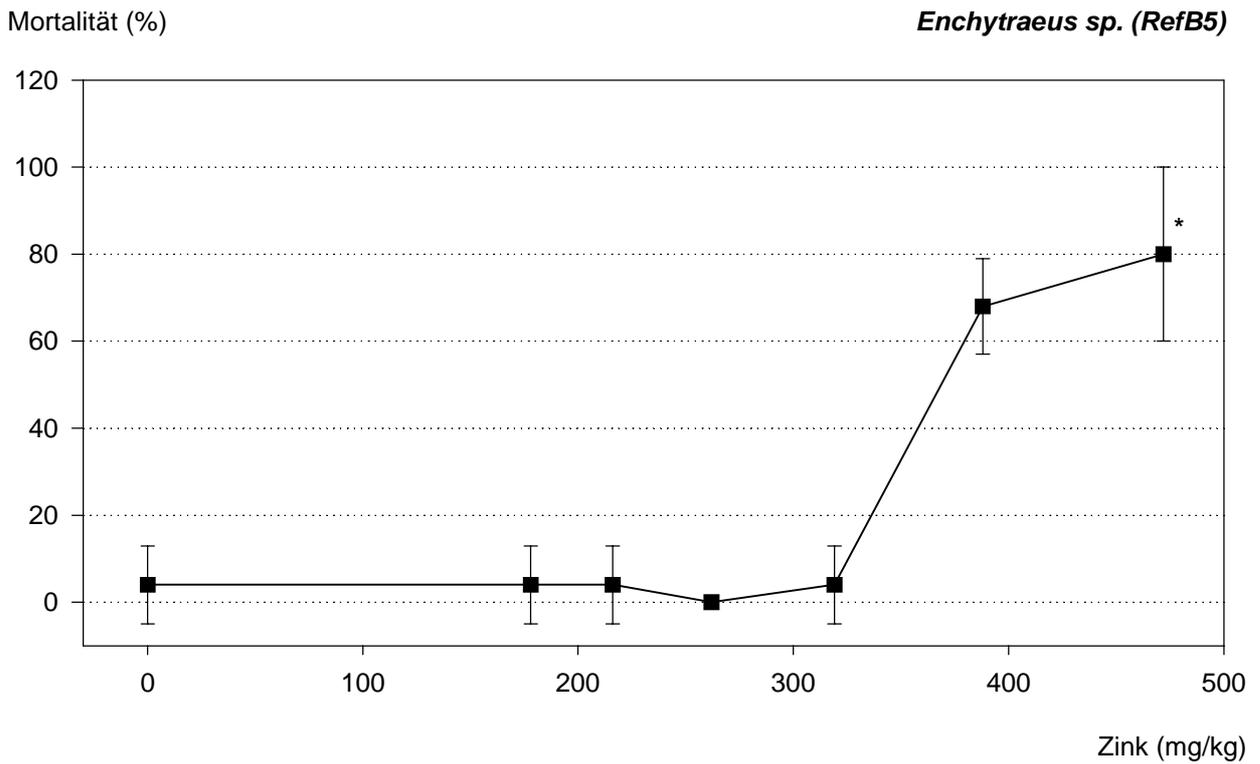


Abb. 50: Mortalität von *Enchytraeus sp. (RefB5)* in Abhängigkeit von der Zinkkonzentration (**Mortalitätstest Zink 1**). Fehlerbalken: Standardabweichung; *: signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (Kruskal-Wallis Rangvarianzanalyse, Dunnett's Test). n = 5

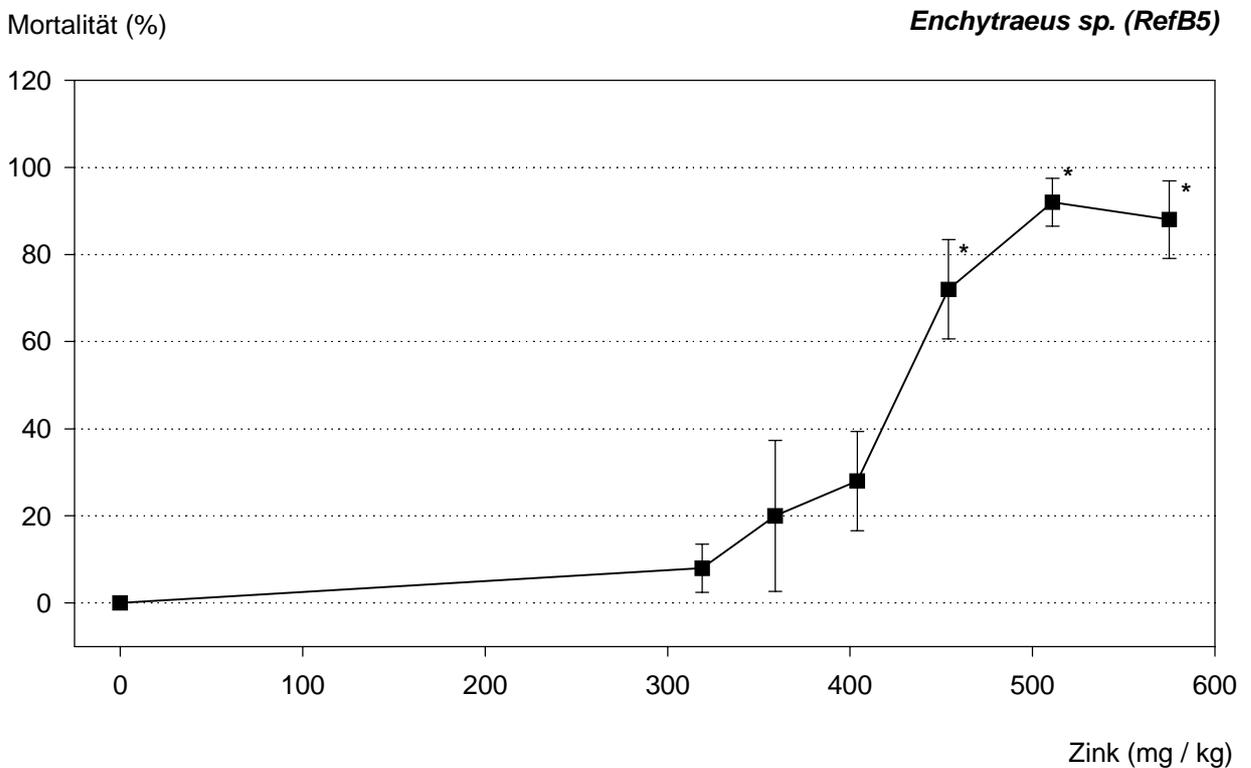


Abb. 51: Mortalität von *Enchytraeus sp. (RefB5)* in Abhängigkeit von der Zinkkonzentration (**Mortalitätstest Zink 2**). Fehlerbalken: Standardabweichung; *: signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (Kruskal-Wallis Rangvarianzanalyse, Dunnett's Test). n = 5

Im zweiten Versuch kam es bis 404 mg/kg (NOEC) zu einem nicht signifikanten Anstieg der Mortalität (Abb. 51). Ab 454 mg/kg (LOEC) trat eine signifikante Mortalität auf. Die in diesem Versuch ermittelte LC₅₀ betrug 423,6 mg/kg (Abb. 52). *Enchytraeus sp. (RefB)* reagiert damit im Mortalitätstest weniger empfindlich als *Enchytraeus christenseni*.

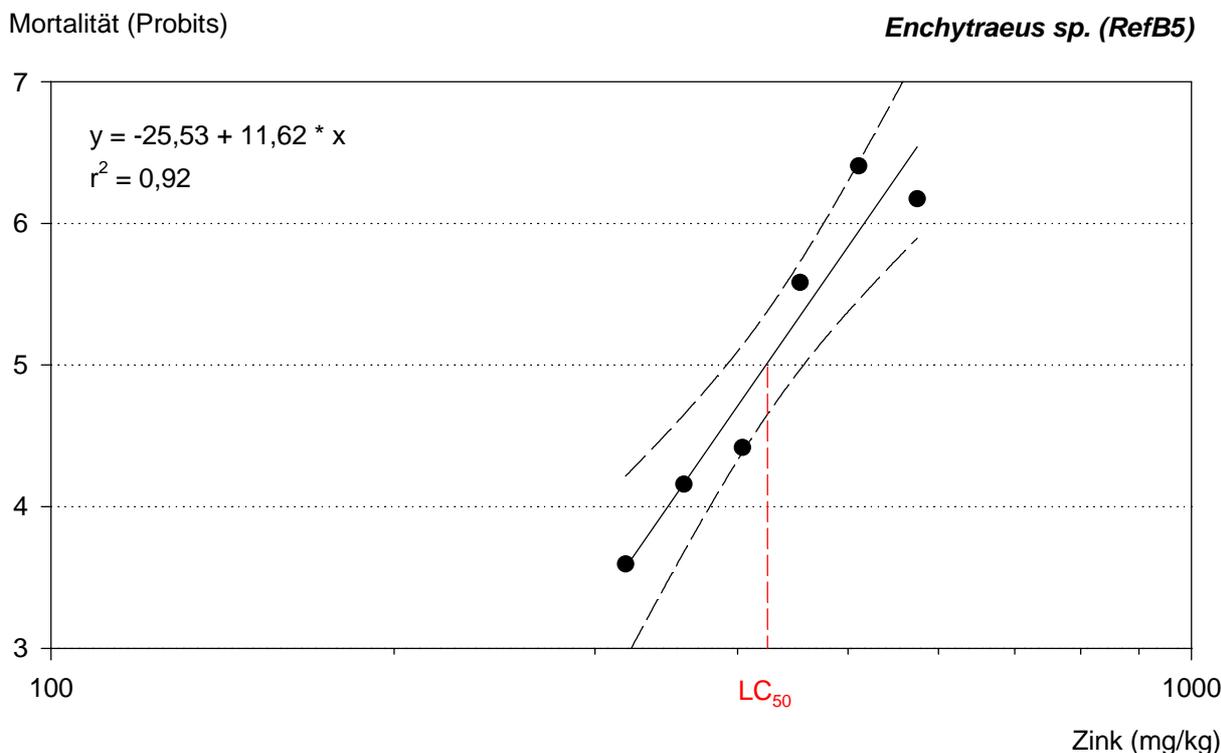


Abb. 52: Regressionsgerade zur LC₅₀-Berechnung für ZnCl₂ bei *Enchytraeus sp. (RefB5)* (Mortalitätstest Zink 2) mit 95 %-Konfidenzintervall (gestrichelt).

5.5.5 Reproduktionstest mit *Enchytraeus sp. (RefB5)*

In einem Reproduktionstest mit *Enchytraeus sp. (RefB5)* sollte geprüft werden, ob diese Art eine Reaktion in einem ähnlichen Konzentrationsbereich zeigt wie *Enchytraeus christenseni*. Bis 81 mg Zn/kg (NOEC) ergab sich keine Wirkung auf die Reproduktion (Abb. 53). Bei 146 mg Zn/kg war eine signifikante Verringerung der Reproduktion festzustellen (LOEC). Außerdem wurde aus den Daten eine EC₅₀ von 73,0 mg Zn/kg berechnet (Abb. 54). Trotz des recht hohen r²-Wertes ist der Zusammenhang zwischen den beiden Variablen der Regression auf Grund der wenigen Datensätze nicht signifikant (ANOVA, P = 0,123). Von einer Wiederholung des Versuchs wurde wegen des relativ hohen Zeitaufwands bei der Arbeit mit dieser Art abgesehen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Enchytraeus sp. (RefB5)* bezüglich der Reproduktion eine ähnliche Wirkschwelle wie *E. christenseni* zeigt.

Juvenile nach 42 Tagen

Enchytraeus sp. (RefB5)

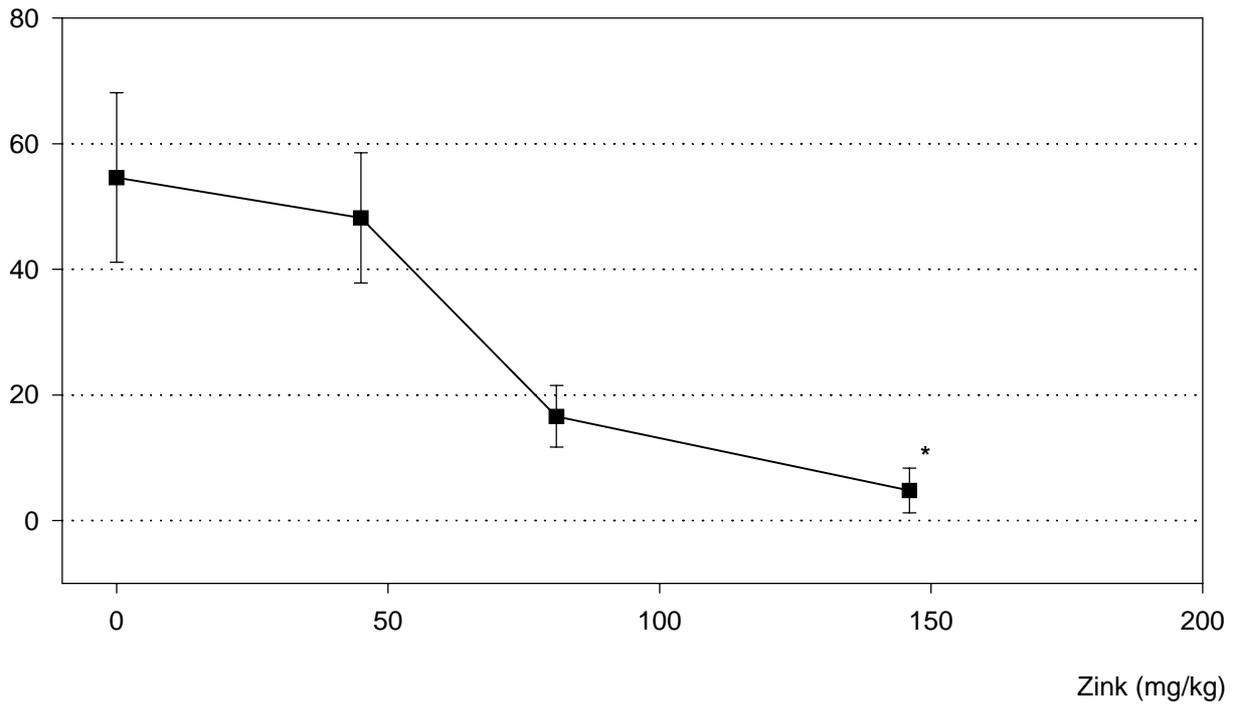


Abb. 53: Reproduktion von *Enchytraeus sp. (RefB5)* in Abhängigkeit von der Zinkkonzentration (**Reproduktionstest Zink 1**). Fehlerbalken: Standardabweichung; *: signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (Kruskal-Wallis Rangvarianzanalyse, Dunn's Test). n = 5

Reproduktion (Probits von % der Kontrolle)

Enchytraeus sp. (RefB5)

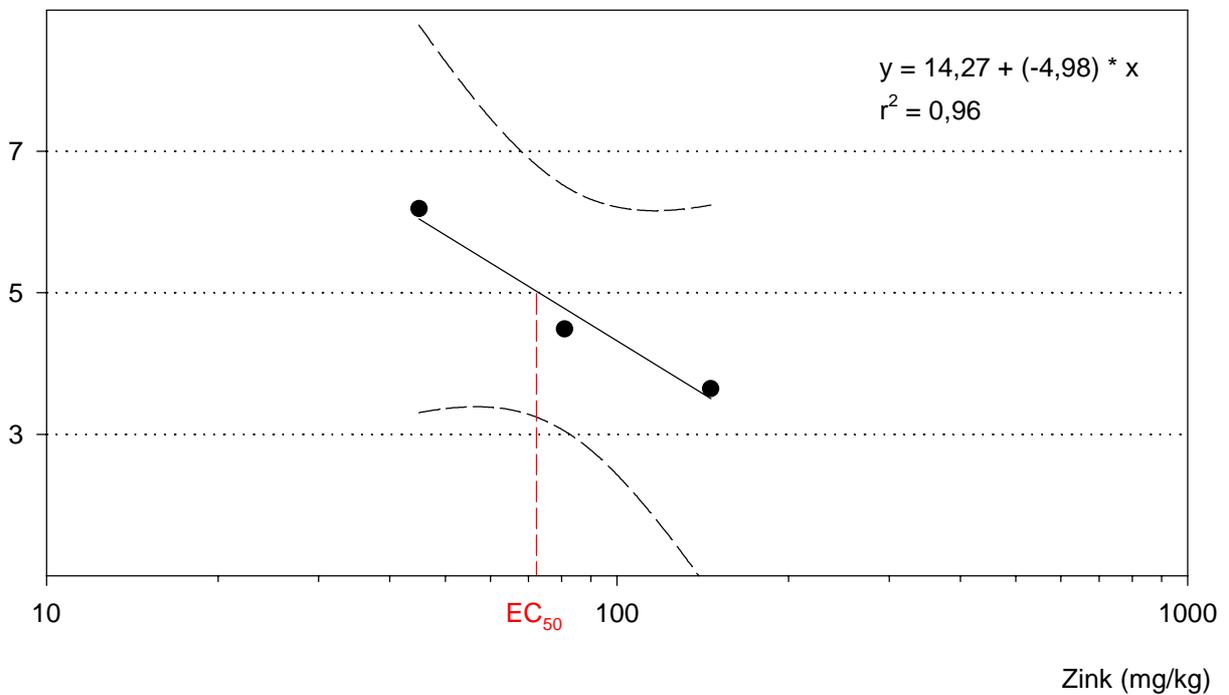


Abb. 54: Regressionsgerade zur EC₅₀-Berechnung für ZnCl₂ bei *Enchytraeus sp. (RefB5)* (**Reproduktionstest Zink 1**) mit 95 %-Konfidenzintervall (gestrichelt)

5.5.6 Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* in den Kombinationsversuchen Zinkchlorid – Bodenfeuchte

Zur Untersuchung des Zusammenwirkens von schwach toxischen Zinkgehalten und suboptimaler Bodenfeuchte wurde ein Reproduktionsversuch mit zwei Wassergehalten und drei Zinkgehalten durchgeführt. Beim höheren Wassergehalt (20 %) war die Reproduktion sowohl bei 60 mg Zn/kg als auch bei 81 mg Zn/kg signifikant gegenüber der Kontrolle eingeschränkt (Abb. 55). Bei einem suboptimalen Wassergehalt von 15 % trat dagegen nur bei 81 mg/kg ein signifikanter Effekt im Vergleich zu der zugehörigen Kontrolle auf. Auffällig ist, dass bei den Kontrollen die höhere Reproduktion beim höheren Wassergehalt auftrat, während bei 81 mg Zn/kg die höhere Reproduktion beim niedrigeren Wassergehalt gemessen wurde (beides nicht signifikant). Die Hemmung der Reproduktion bei 20 % Wassergehalt um 31,2 % bei 60 mg Zn/kg bzw. um 62,8 % bei 81 mg Zn/kg steht in einem plausiblen Verhältnis zu den im Abschnitt 5.5.2 berechneten EC_{50} -Werten. Bei 15 % Wassergehalt betragen die Effekte gegenüber der Kontrolle dagegen nur 18,9 % (60 mg) und 45,3 % (81 mg).

Die Wirkung von Zinkkontamination und niedrigem Wassergehalt ist offenbar nicht additiv. Die Toxizität nimmt mit steigendem Zinkgehalt beim höheren Wassergehalt stärker zu als beim niedrigeren Wassergehalt. Der ungünstigere Wassergehalt scheint die Wirkung des Zinkchlorids also abzuschwächen. Da dieses Ergebnis nicht den Erwartungen entsprach, wurde der Versuch mit zwei Zinkkonzentrationen (Kontrolle und 60 mg/kg) wiederholt.

Juvenile nach 21 Tagen

Enchytraeus christenseni

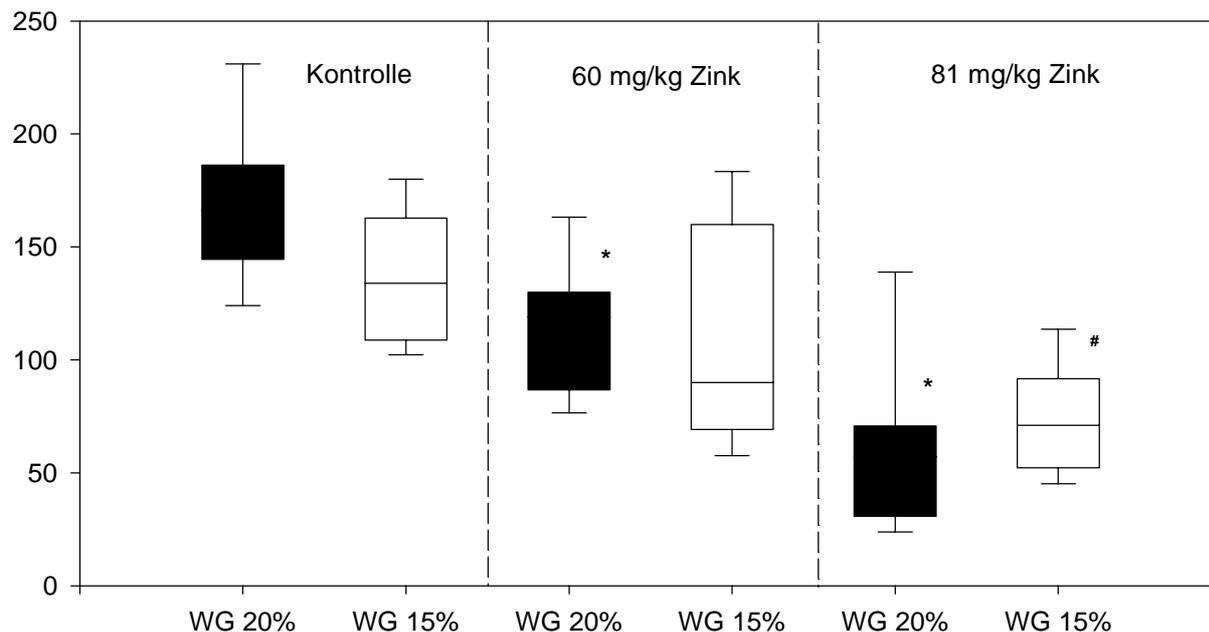


Abb. 55: Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* bei drei verschiedenen Zinkgehalten, bei 20 % und 15 % Wassergehalt (**Reproduktionstest Zink – WG 1**). *: signifikant verschieden von der Kontrolle WG 20 %; #: signifikant verschieden von der Kontrolle WG 15 % (Zweifaktorielle ANOVA, Tukey Test). n = 7

Die Wiederholung des Kombinationsversuches Bodenfeuchte – Zinkchlorid bestätigte das Ergebnis des ersten Versuches: In den beiden Kontrollen zeigte sich bei dem niedrigeren Wassergehalt eine signifikant eingeschränkte Reproduktion, während von den beiden Varianten mit 60 mg Zn/kg die trockenere eine geringfügig höhere Reproduktion zeigte (Abb. 56). Bei einem Wassergehalt von 20 % bewirkt die Zugabe von 60 mg Zn/kg einen signifikanten Effekt gegenüber der zugehörigen Kontrolle (LOEC). Dagegen wird die Reproduktion bei dem niedrigeren Wassergehalt bei insgesamt geringerer Nachkommenzahl durch die Zinkzugabe nicht eingeschränkt. Zwischen den Faktoren Wassergehalt und Zinkgehalt besteht also eine Wechselwirkung, die hier, im Gegensatz zum ersten Versuch, auch statistisch absicherbar ist (Zweifaktorielle ANOVA).

Juvenile nach 21 Tagen

Enchytraeus christenseni

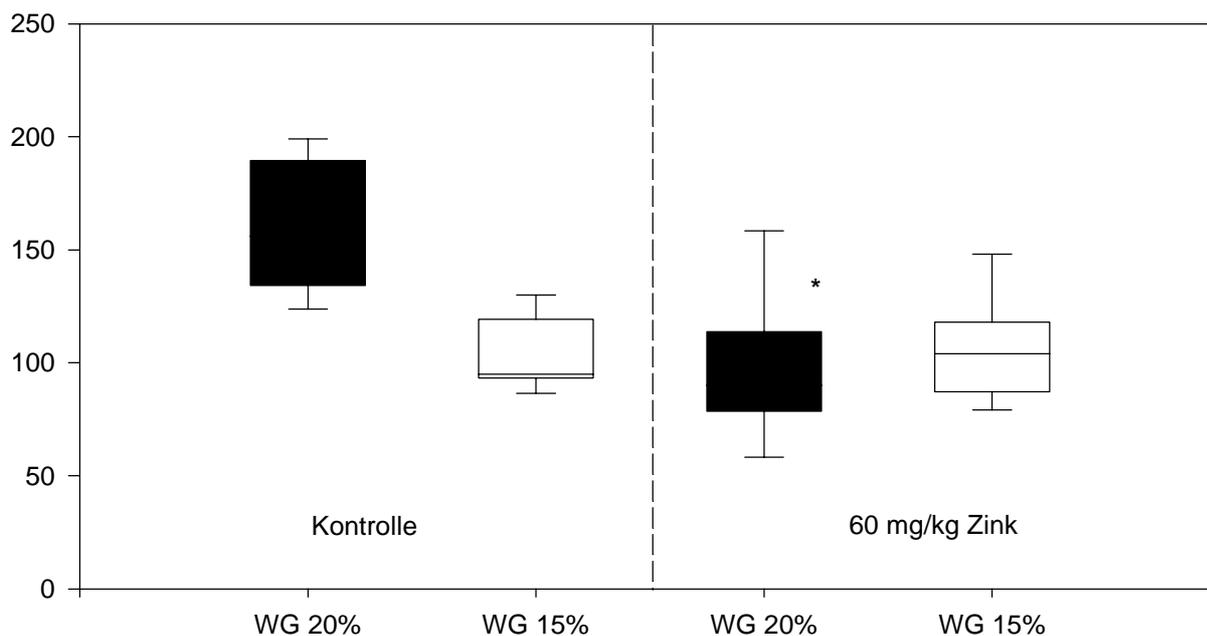


Abb. 56: Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* bei zwei Zinkgehalten, bei 20 % und 15 % Wassergehalt (**Reproduktionstest Zink – WG 2**). *: signifikant verschieden von der Kontrolle WG 20 % (Zweifaktorielle ANOVA, Tukey Test). n = 7

5.5.7 Segmentzahl von *Enchytraeus christenseni* im Kombinationsversuch Zinkchlorid – Bodenfeuchte

Im ersten Reproduktionsversuch Zinkchlorid – Bodenfeuchte wurde die Segmentzahl der Adulten als zusätzlicher Parameter bestimmt. Um zu prüfen, ob die Tiere unter ungünstigen Bedingungen überhaupt wachsen, wurde folgender Ansatz gewählt: Zu Testbeginn wurden aus einer Zuchtschale Tiere für den Reproduktionstest entnommen und bei weiteren Tieren derselben Schale die Segmentzahl bestimmt. Diese Segmentzahlen wurden mit denen der Testorganismen 21 Tage später (Testende) verglichen. Die Segmentzählung zu Testende erfolgte allerdings nur bei der Kontrolle und 60 mg/kg Zinkgehalt.

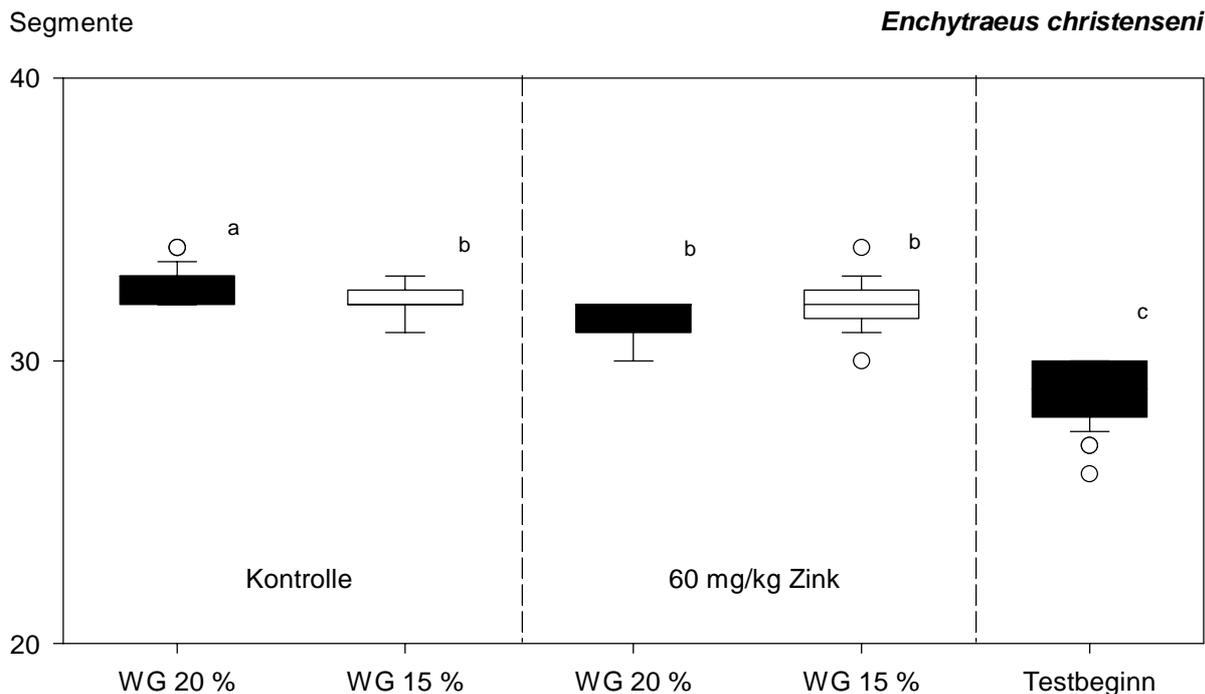


Abb. 57: Segmentzahlen der Adulten von *Enchytraeus christenseni* zu Versuchsende im Reproduktionstest bei zwei verschiedenen Zinkgehalten, bei 20 % und 15 % Wassergehalt sowie zu Testbeginn (**Reproduktionstest Zink – WG 1**). Varianten mit gleichen Buchstaben zeigen keine signifikanten Unterschiede voneinander (Kruskal-Wallis Rangvarianzanalyse, Dunn’s Test). n = 16-30

In diesem Versuch wurde zu Testende in allen Varianten eine signifikant höhere Segmentzahl ermittelt als bei den zu Testbeginn untersuchten Tieren (Abb. 57). Darüber hinaus zeigt sich bei 20 % Wassergehalt eine signifikant niedrigere Segmentzahl bei 60 mg/kg als in der Kontrolle. Bei 15 % Wassergehalt ist dagegen kein Unterschied zwischen der Kontrolle und der belasteten Variante festzustellen. Die Segmentzahl der Kontrolle WG 15 % ist im Vergleich zur Kontrolle WG 20 % signifikant herabgesetzt. Hinsichtlich der Reproduktion besteht zwischen beiden Varianten dagegen kein signifikanter Unterschied (Abb. 55).

5.5.8 Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* in den Kombinationsversuchen Zinkchlorid – pH-Wert

In einem Kombinationsversuch wurde geprüft, welchen Effekt die Ansäuerung des Bodens auf die Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* hat bei Zinkgehalten, die als alleiniger Einflussfaktor im Bereich der EC₅₀ liegen. Es wurden dieselben zwei Zinkgehalte wie beim Kombinationsversuch Zinkchlorid – Bodenfeuchte gewählt. Die pH-Werte der verschiedenen Varianten gehen aus Tabelle 34 hervor.

Tab. 34: pH(CaCl₂)-Werte der getesteten Varianten zu Testbeginn und zu Testende (Reproduktionstest Zink – pH 1). n. u.: nicht untersucht

Variante	Testbeginn	Testende
LUFA 2.2 (Kontrolle)	5,5	5,3
LUFA 2.2 + HCl	4,9	4,9
LUFA 2.2 + 60 mg Zn/kg	5,5	n. u.
LUFA 2.2 + 60 mg Zn/kg + HCl	5,0	n. u.
LUFA 2.2 + 81 mg Zn/kg	5,5	5,3
LUFA 2.2 + 81 mg Zn/kg + HCl	5,0	5,1

Die angesäuerten Varianten zeigen erwartungsgemäß jeweils eine signifikant niedrigere Reproduktion als die nicht angesäuerte Variante mit gleichem Zinkgehalt (Abb. 58). Ohne Säurezugabe ist allerdings bereits bei einem Zinkgehalt von 60 mg Zn/kg ein signifikanter Effekt gegenüber der Kontrolle festzustellen, während mit Säurezugabe erst bei 81 mg Zn/kg ein signifikanter Unterschied zur angesäuerten Kontrolle besteht. Diese Differenz hinsichtlich der statistisch absicherbaren Wirkschwelle beruht u. a. auf der hohen Standardabweichung der angesäuerten Kontrolle. Außerdem sei darauf hingewiesen, dass bei 81 mg Zn/kg mit Säurezugabe eine leichte, aber signifikante Mortalität der Adulten auftrat, die vermutlich zum niedrigen Reproduktionsergebnis mit hoher Schwankungsbreite beigetragen hat. Auffallend ist, dass in diesem Versuch die LOEC bereits bei 60 mg Zn/kg liegt, wogegen im Reproduktionstest Zink 3 (siehe 5.5.2) eine LOEC von 81 mg Zn/kg festgestellt wurde. Andererseits stimmt die hier im Kombinationsversuch gefundene Reproduktionshemmung von 50,7 % bei 81 mg/kg (ohne Säurezugabe) recht gut mit der im Reproduktionstest Zink 3 berechneten EC₅₀ von 75,9 mg/kg überein.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Wirkungen von abgesenktem pH-Wert und Zinkzugabe eingeschränkt additiv verhalten: Ohne Säurezugabe liegt die Reproduktion bei 61 mg Zn/kg bzw. bei 81 mg Zn/kg bei 71,4 % bzw. 49,3 % der Kontrolle. Mit Säurezugabe liegt die Reproduktion bei den beiden getesteten Zinkgehalten nicht nur absolut, sondern auch relativ zur angesäuerten Kontrolle niedriger, nämlich bei 63,1 % bzw. 36,2 % derselben. Eine Wechselwirkung im Sinne einer gegenseitigen Verstärkung der beiden Faktoren liegt allerdings nicht vor (Zweifaktorielle ANOVA).

Juvenile nach 21 Tagen

Enchytraeus christenseni

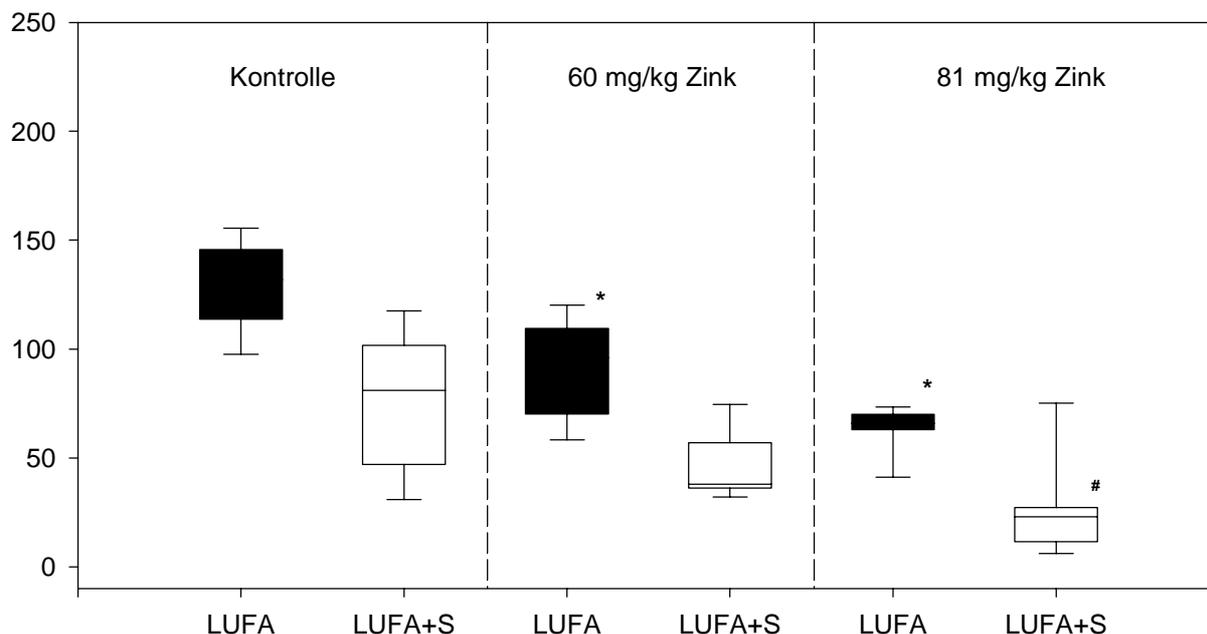


Abb. 58: Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* bei drei verschiedenen Zinkgehalten in unbehandeltem (LUFA) und in angesäuertem (LUFA+S) Boden (**Reproduktionstest Zink - pH 1**). *: signifikant verschieden von LUFA Kontrolle; #: signifikant verschieden von LUFA+S Kontrolle (Zweifaktorielle ANOVA, Tukey Test). n = 7

Um eine EC₅₀ für Zink unter Säureeinfluss berechnen zu können, wurde ein weiterer Reproduktionstest mit mehreren Zinkgehalten und Säurezugabe durchgeführt. Die pH-Werte der untersuchten Varianten gehen aus Tabelle 35 hervor.

Tab. 35: pH(CaCl₂)-Werte der getesteten Varianten zu Testbeginn und zu Testende (**Reproduktionstest Zink – pH 2**). n. u.: nicht untersucht

Variante	Testbeginn	Testende
LUFA 2.2 + HCl (Kontrolle)	4,8	4,9
LUFA 2.2 + 60 mg Zn/kg + HCl	4,9	n. u.
LUFA 2.2 + 81 mg Zn/kg + HCl	5,0	4,9
LUFA 2.2 + 103 mg Zn/kg + HCl	5,0	n. u.
LUFA 2.2 + 124 mg Zn/kg + HCl	4,9	4,9

In allen untersuchten Varianten lag die Reproduktion signifikant niedriger als in der Kontrolle (Abb. 59). Die NOEC lag bei 60 mg Zn/kg. Für die EC₅₀ wurde ein Wert von 70,6 mg Zn/kg berechnet (Abb. 60). Die EC₅₀ liegt damit bei Säurezugabe etwas niedriger als die EC₅₀ ohne Säurezugabe (75,9 mg/kg).

Juvenile nach 21 Tagen

Enchytraeus christenseni

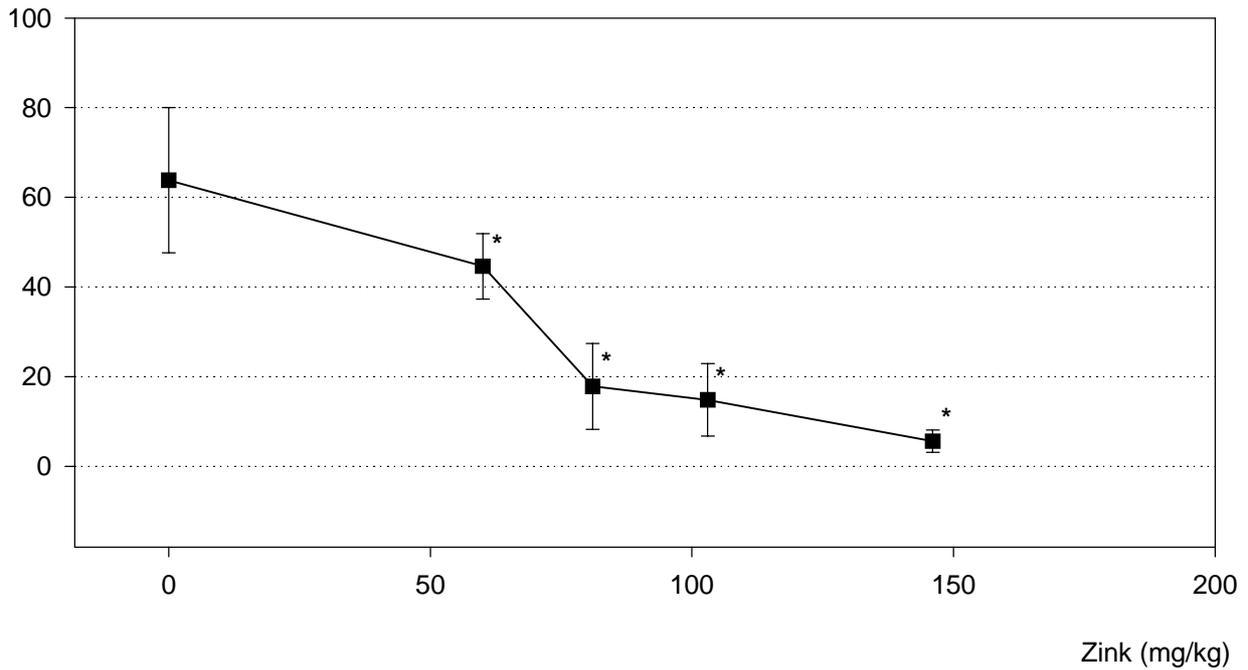


Abb. 59: Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* in Abhängigkeit von der Zinkkonzentration unter Säureeinfluss (**Reproduktionstest Zink - pH 2**). Fehlerbalken: Standardabweichung; *: signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (ANOVA, Bonferroni t-Test). n = 5

Reproduktion (Probits von % der Kontrolle)

Enchytraeus christenseni

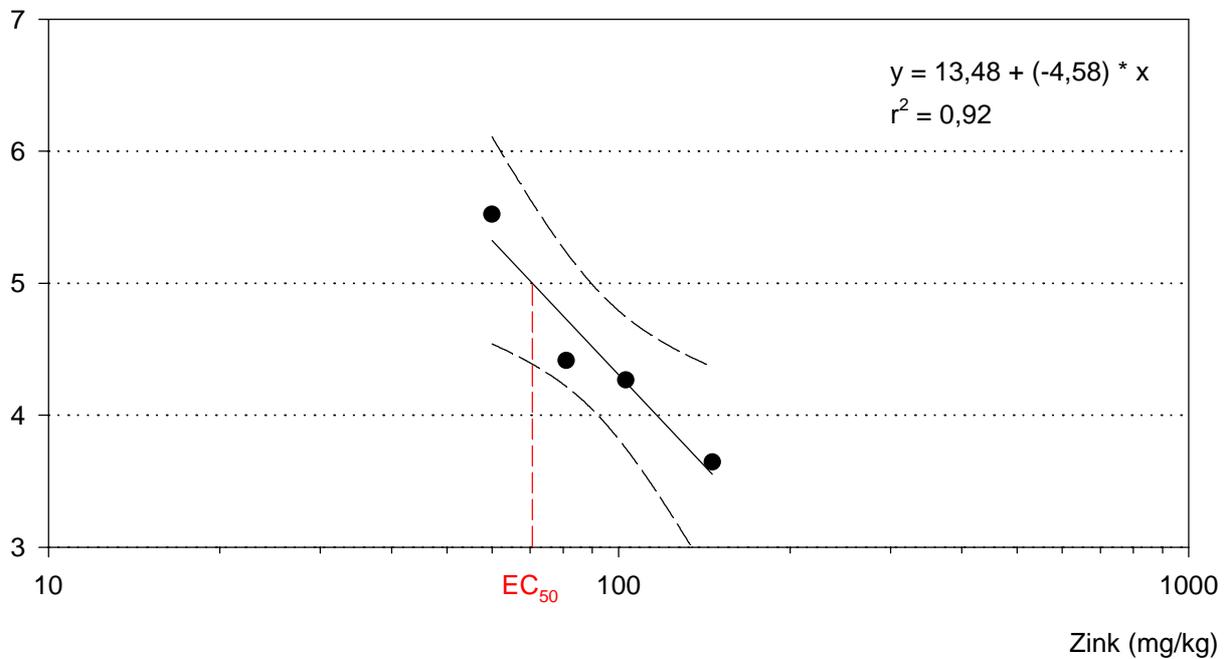


Abb. 60: Regressionsgerade zur EC₅₀-Berechnung für ZnCl₂ unter Säureeinfluss bei *Enchytraeus christenseni* (**Reproduktionstest Zink - pH 2**) mit 95 %-Konfidenzintervall (gestrichelt)

5.5.9 Segmentzahl von *Enchytraeus christenseni* im Kombinationsversuch Zinkchlorid – pH-Wert

Im Reproduktionsversuch Zink – pH 1 wurde die Segmentzahl der Adulten zu Testende als weiterer Parameter bestimmt. Ebenso wie beim Kombinationsversuch Zinkchlorid – Bodenfeuchte wurden zu Testbeginn aus einer Zuchtschale Tiere für den Reproduktionstest entnommen und bei weiteren Tieren derselben Schale die Segmentzahl schon zu Testbeginn bestimmt. Die mittlere Segmentzahl der Adulten zu Testbeginn war signifikant geringer als die Segmentzahlen sämtlicher Varianten zu Testende (Abb. 61). Darüber hinaus gab es kaum Unterschiede zwischen den Varianten. Nur bei einem Zinkgehalt von 60 mg/kg (ohne Säurezugabe) ist die Segmentzahl leicht erhöht im Vergleich zu den meisten anderen Varianten. Ein verringertes Wachstum mit Zunahme des Zink- und / oder Säuregehaltes ist nicht festzustellen. Der Parameter Segmentzahl reagiert damit in diesem Versuch anders als der Parameter Reproduktion. Das Ergebnis zeigt jedoch Ähnlichkeit mit der Segmentzählung im Reproduktionstest Zink 2 (siehe 5.5.3), wo ebenfalls bis 81 mg Zn/kg kein Effekt auf das Wachstum der Tiere erkennbar war.

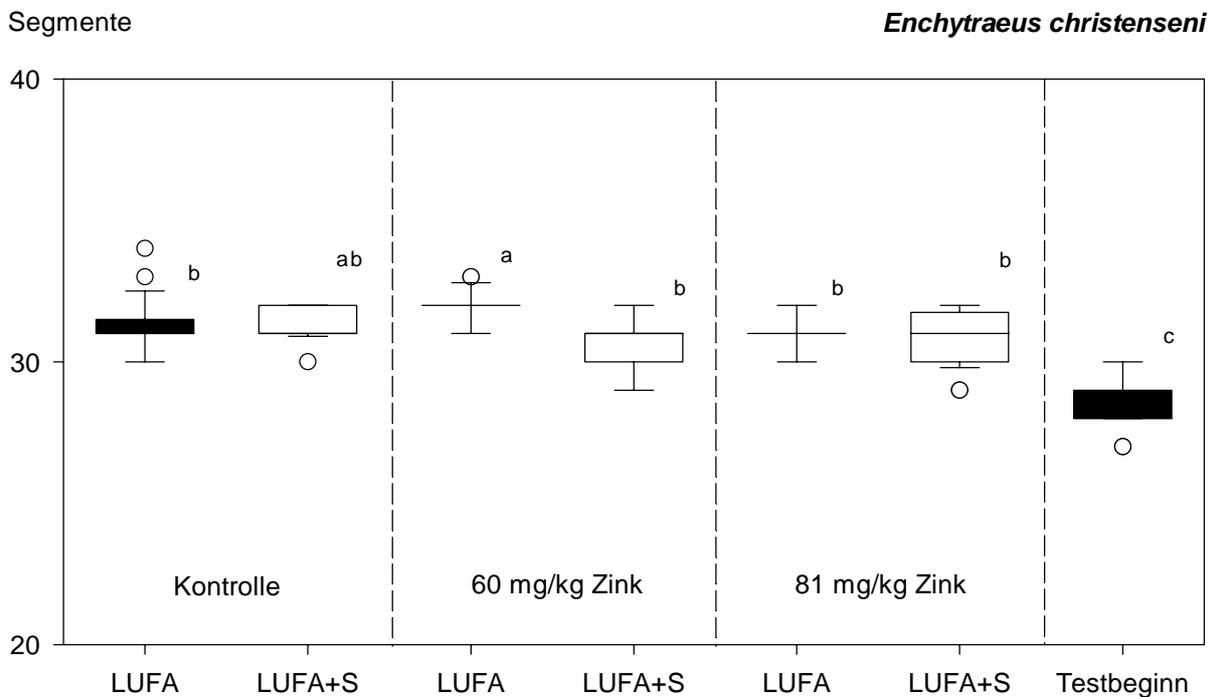


Abb. 61: Segmentzahlen der Adulten von *Enchytraeus christenseni* zu Versuchsende im Reproduktionstest bei drei verschiedenen Zinkgehalten in unbehandeltem (LUFA) und in angesäuertem (LUFA+S) Boden sowie zu Testbeginn (**Reproduktionstest Zink - pH 1**). Varianten mit gleichen Buchstaben zeigen keine signifikanten Unterschiede voneinander (Kruskal-Wallis Rangvarianzanalyse, Dunn's Test). n = 14-30

5.6 Versuche mit Natriumchlorid und Calciumchlorid

Die Versuche mit Natriumchlorid und Calciumchlorid dienen zur Abschätzung der möglichen Toxizität von Chlorid-Ionen in den Zinkchlorid-Versuchen.

5.6.1 Reproduktionstests mit *Enchytraeus christenseni*

Bei CaCl_2 ist im ersten Reproduktionstest bei 0,5 und 1 mmol/kg eine Erhöhung der Reproduktion gegenüber der Kontrolle festzustellen, bei 2 und 4 mmol dagegen eine Abnahme (Abb. 62). Diese Abweichungen sind jedoch nicht signifikant. Für NaCl ergeben sich bei allen getesteten Konzentrationen nur leichte Unterschiede gegenüber der Kontrolle. Ein weiterer Versuch wurde mit beiden Salzen bei höheren Konzentrationen durchgeführt, um die Wirkschwellen für die Reproduktion bei *Enchytraeus christenseni* festzustellen.

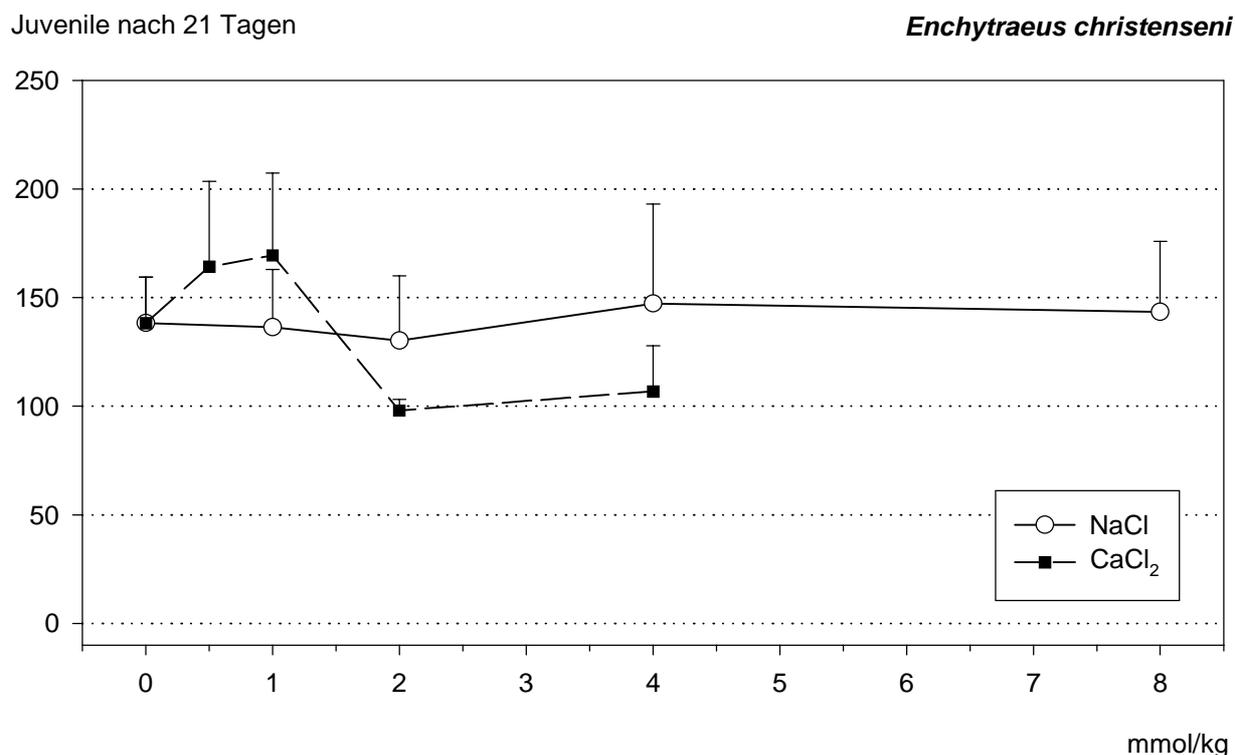


Abb. 62: Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* in Abhängigkeit von der NaCl- bzw. CaCl_2 -Konzentration (**Reproduktionstest Chloride 1**). Fehlerbalken: Standardabweichung, hier der Übersichtlichkeit halber nur einseitig dargestellt. n = 5

Im zweiten Reproduktionstest waren bei der jeweils niedrigsten getesteten Konzentration (die der höchsten Konzentration im ersten Versuch entsprach) eine Hemmung der Reproduktion durch NaCl bzw. CaCl_2 feststellbar (Abb. 63). Ein statistisch absicherbarer Effekt ergab sich für NaCl bei 16 mmol/kg (LOEC;

≈ 935,04 mg/kg) und für CaCl₂ bei 8 mmol/kg (LOEC; ≈ 887,86 mg/kg). Zum Vergleich: Ein signifikanter Effekt wurde durch Zinkchlorid bereits unter 1 mmol/kg (≈ 136,28 mg/kg) erreicht. Für CaCl₂ wurde im zweiten Versuch für die EC₅₀ ein Wert von 4,35 mmol/kg (≈ 482,78 mg/kg) berechnet (Abb. 64). Dieser Wert stimmt recht gut mit einer Einschränkung der Reproduktion um 42,3 % gegenüber der Kontrolle bei 4 mmol/kg CaCl₂ überein. Für NaCl war aufgrund der ungünstigen Datenlage keine Berechnung der EC₅₀ möglich.

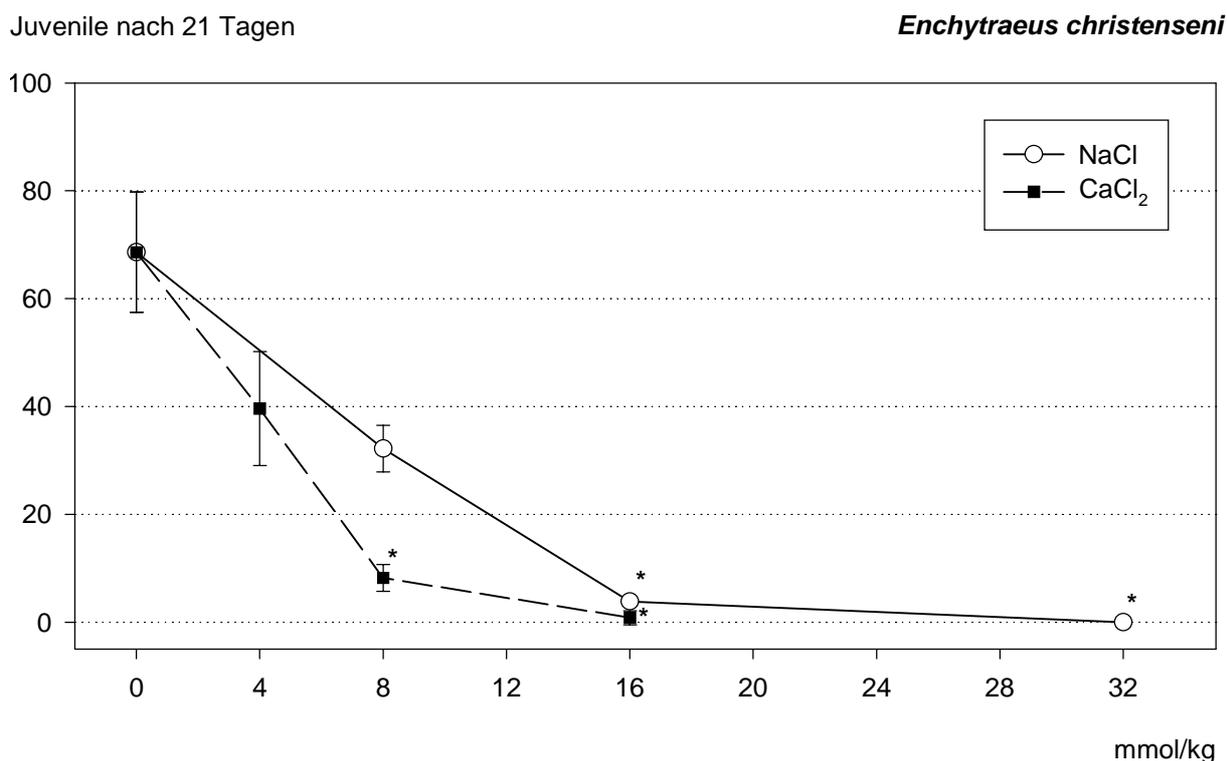


Abb. 63: Reproduktion von *Enchytraeus christenseni* in Abhängigkeit von der NaCl- bzw. CaCl₂-Konzentration (**Reproduktionstest Chloride 2**). Fehlerbalken: Standardabweichung. *: signifikant abweichend von der Kontrolle (Kruskal-Wallis Rangvarianzanalyse, Dunnett's Test). n = 5

Reproduktion (Probits von % der Kontrolle)

Enchytraeus christenseni

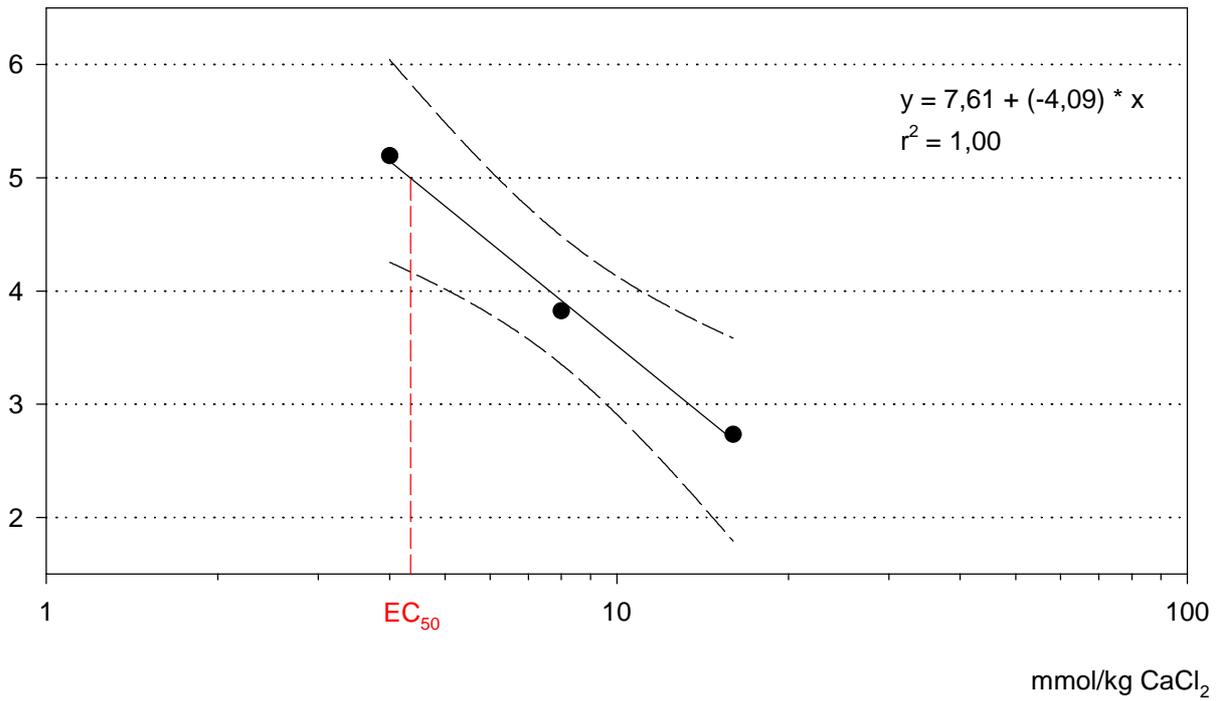


Abb. 64: Regressionsgerade zur EC₅₀-Berechnung für CaCl₂ bei *Enchytraeus christenseni* (**Reproduktionstest Chloride 2**) mit 95 %-Konfidenzintervall (gestrichelt).

Segmente

Enchytraeus christenseni

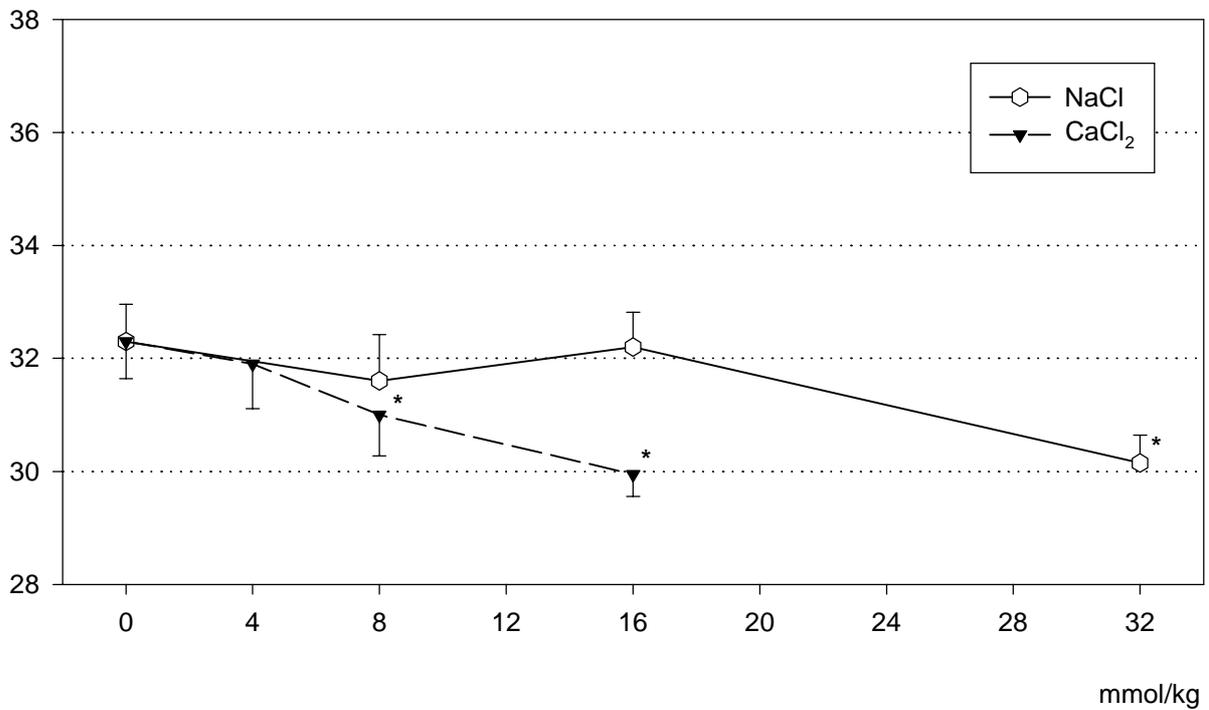


Abb. 65: Segmentzahlen der Adulten von *Enchytraeus christenseni* zu Versuchsende im Reproduktionstest mit NaCl und CaCl₂ (**Reproduktionstest Chloride 2**). *: signifikant verschieden von Kontrolle (Kruskal-Wallis Rangvarianzanalyse, Dunnett's Test). n = 20

5.6.2 Segmentzahl von *Enchytraeus christenseni* im Reproduktionstest mit Natrium- und Calciumchlorid

Im zweiten Versuch mit Calciumchlorid wurden für die Segmentzahlen der Adulten und die Reproduktion ähnliche Effekte ermittelt: Bei 8 und 16 mmol/kg CaCl₂ ist jeweils ein signifikant negativer Einfluss feststellbar (Abb. 65). Bei NaCl ist dagegen nur bei 32 mmol/kg ein Effekt nachweisbar. Die Segmentzahl reagiert damit in diesem Versuch auf Natriumchlorid weniger empfindlich als die Reproduktion.

5.7 Zusammenfassung der Effektkonzentrationen der Labortests

Die Tabellen 36 und 37 geben eine Übersicht über die in den Labortests ermittelten Effektkonzentrationen für *Enchytraeus christenseni* bzw. *Enchytraeus sp.* (RefB 5). Eine NOEC konnte nicht für alle Tests angegeben werden, da in vielen Fällen in der Variante mit dem niedrigsten Zinkgehalt bereits einen Effekt gegenüber der Kontrolle zu beobachten war. In den meisten Fällen, in denen eine EC₅₀ oder LC₅₀ berechnet werden konnte, liegt diese unter der jeweiligen LOEC. Die LC₅₀ liegt bei *Enchytraeus christenseni* um den Faktor 3,58 über der EC₅₀ (Reproduktionstest Zink 3). Bei *Enchytraeus sp.* (RefB 5) liegt dieses Verhältnis auf Grund der höheren LC₅₀ bei 5,80. Auffällig ist, dass die LOEC für Zink in den verschiedenen Reproduktionstests unterschiedlich ist.

Tab. 36: Wirkschwellen für Zinkchlorid, Natriumchlorid und Calciumchlorid hinsichtlich der Mortalität, Reproduktion (Repro) bzw. des Längenwachstums (Segm) aus den Labortests mit *Enchytraeus christenseni*. Werte in Klammern stehen in deutlichem Widerspruch zum Verlauf der Dosis-Wirkungskurve. gesamt / mobil: bezogen auf Gesamt- bzw. mobile Zinkgehalte.

Versuch	NOEC	LOEC	LC ₅₀ / EC ₅₀ (gesamt)	LC ₅₀ / EC ₅₀ (mobil)
Mortalitätstest Zink 1	262	472		-
Mortalitätstest Zink 2	262	319	271,8	81,4
Reproduktionstest Zink 1 (Repro)	(146)	(262)	-	-
Reproduktionstest Zink 2 (Repro)	81	146	(59,6)	-
Reproduktionstest Zink 2 (Segm)	81	146	-	-
Reproduktionstest Zink 3 (Repro)	-	81	75,9	16,7
Reproduktionstest Zink 3 (Segm)	-	81	-	-
Reproduktionstest Zink – pH 1 (Repro)	-	60	-	-
Reproduktionstest Zink – pH 2 (Repro)	-	60	70,6	20,2
Reproduktionstest Zink – WG 1 u. 2 (Repro)	-	60	-	-
Reproduktionstest NaCl 2 (Repro)	468	935	-	-
Reproduktionstest NaCl 2 (Segm)	935	1870	-	-
Reproduktionstest CaCl ₂ 2 (Repro)	444	888	482,8	-
Reproduktionstest CaCl ₂ 2 (Segm)	444	888	-	-

Tab.37: Wirkschwellen für Zinkchlorid hinsichtlich der Mortalität und Reproduktion aus den Labortests mit *Enchytraeus sp. (RefB5)*. Werte in Klammern stehen in deutlichem Widerspruch zum Verlauf der Dosis-Wirkungskurve. gesamt / mobil: bezogen auf Gesamt- bzw. mobile Zinkgehalte.

Versuch	NOEC	LOEC	LC ₅₀ / EC ₅₀ (gesamt)	LC ₅₀ / EC ₅₀ (mobil)
Mortalitätstest Zink 1	(388)	(472)	-	-
Mortalitätstest Zink 2	404	454	423,6	131,5
Reproduktionstest Zink 1	81	146	73,0	15,8

Aus den Ergebnissen der Laborversuche waren zunächst die Effektkonzentrationen bezogen auf die zugegebene Zinkmenge berechnet worden. Es erschien jedoch sinnvoll, die Effektkonzentrationen auch bezogen auf den mobilen Anteil anzugeben. Dazu wurde aus den Zinkanalysen der aufdotierten Böden mittels linearer Regression eine Beziehung zwischen Ammoniumnitrat-Extrakt und nominellen Gehalten hergestellt (Abb. 66). Mit Hilfe der erhaltenen Geradengleichung wurden die EC₅₀-Werte (nomineller Gehalt) auf EC₅₀-Werte (mobiler Gehalt) umgerechnet (Tab. 36 u. 37, letzte Spalte). Dieselbe Rechnung wurde für den Reproduktionsversuch mit Zink in angesäuertem Boden durchgeführt (Abb. 67). Diese Daten sollten als Orientierungswerte angesehen werden, da die Regression nur auf wenigen Datenpaaren beruht.

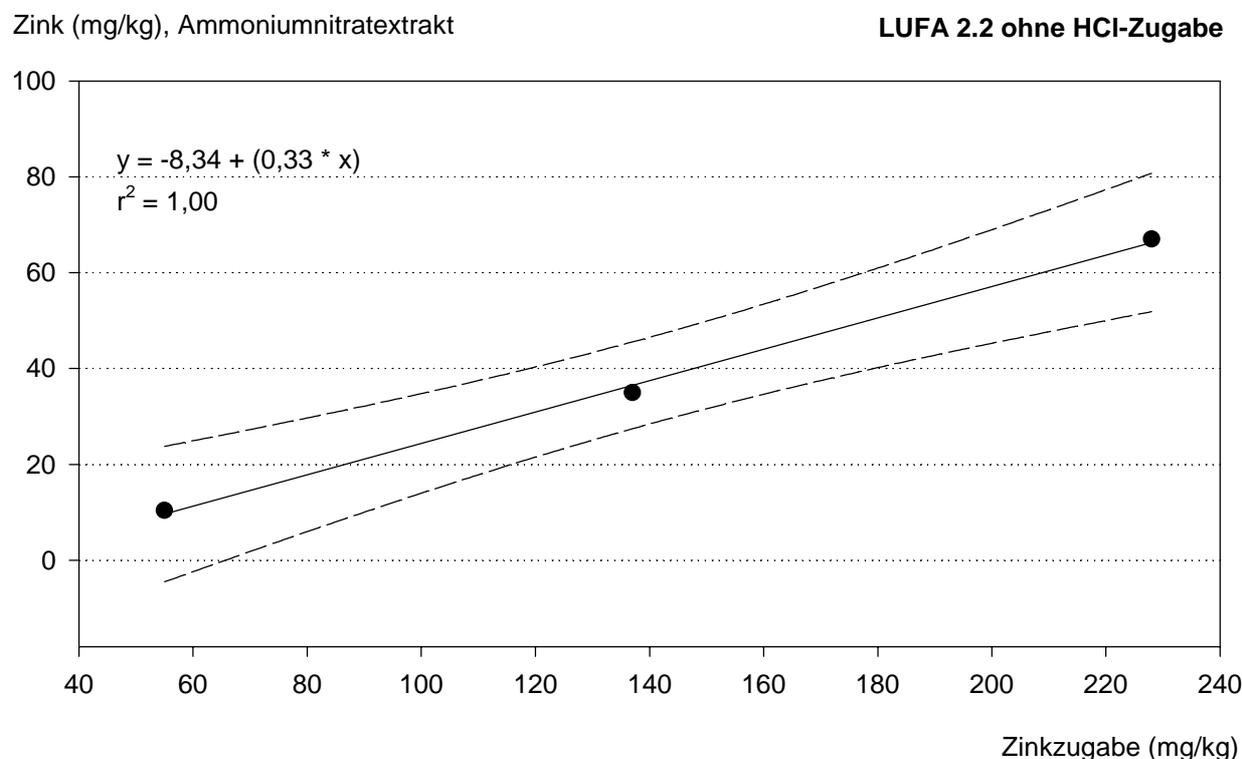


Abb. 66: Beziehung zwischen nominellem Zinkgehalt und mobilem Zinkgehalt (Ammoniumnitrat-Aufschluss) in LUFA 2.2 Standardboden.

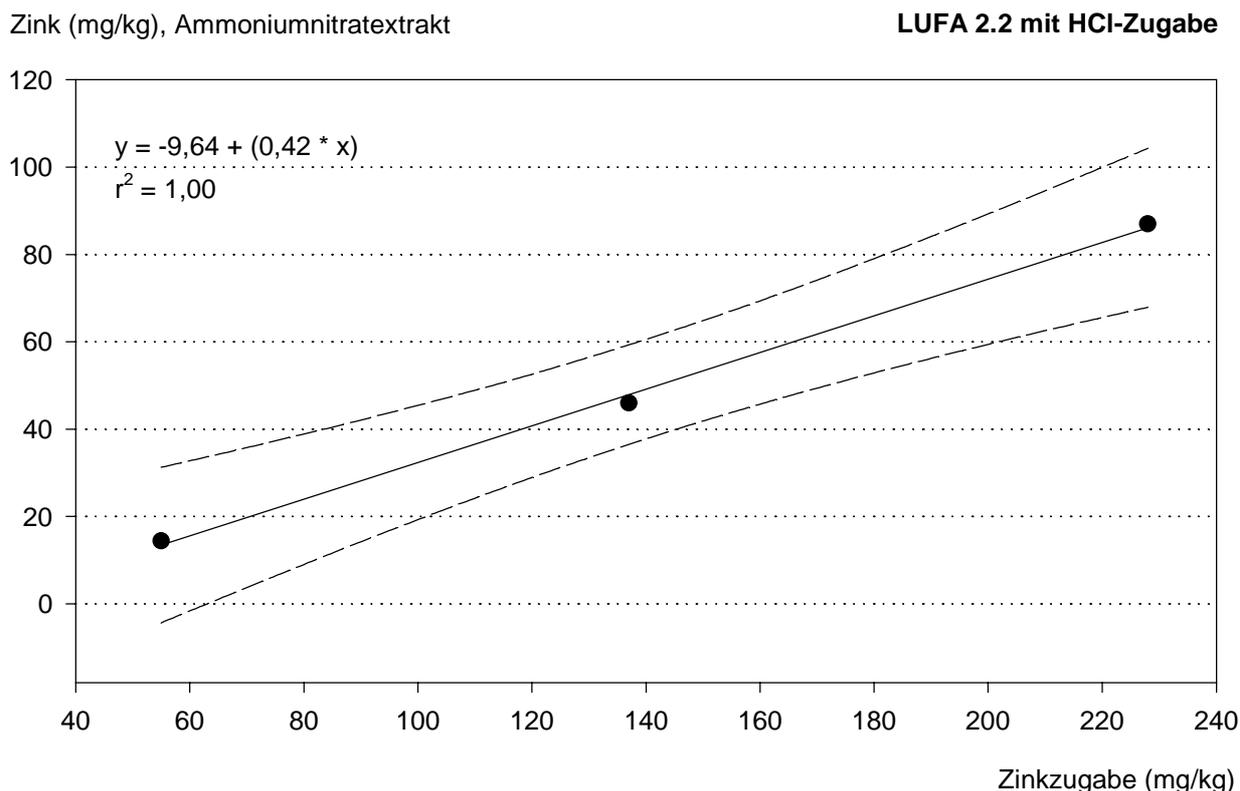


Abb. 67: Beziehung zwischen nominellem Zinkgehalt und mobilem Zinkgehalt (Ammoniumnitrat-Aufschluss) in LUFA 2.2 Standardboden mit HCl-Zugabe.

5.8 Validität der Versuche

Nach den Validitätskriterien der ISO/WD 16387 (2000) für den Enchytraeiden-Reproduktionstest ist ein Test valide, wenn in der Kontrolle die folgenden Bedingungen eingehalten werden:

1. Mortalität der Adulten im Mittel nicht > 20 %
2. Zahl der Juvenilen zu Testende im Mittel > 25
3. Variationskoeffizient der Reproduktion zu Testende nicht > 50 %.

In der genannten ISO-Norm wird das Testverfahren für *Enchytraeus albidus* beschrieben. Es wird allerdings ausdrücklich darauf hingewiesen, dass auch andere Arten verwendet werden können, das Verfahren dann aber eventuell in einigen Punkten abgewandelt werden muss (z. B. Expositionszeit, Temperatur). Das zweite Validitätskriterium muss für Arten mit einer höheren Reproduktionsrate als *E. albidus* geändert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass für *Enchytraeus christenseni* unter den hier gegebenen Versuchsbedingungen wenigstens eine Verdoppelung der geforderten Mindestnachkommenzahl auf > 50 zu Testende möglich ist, wie dies auch bei RÖMBKE ET AL. (2000) pauschal für andere Enchytraeus-Arten angegeben wird.

Für *Enchytraeus sp.* (RefB 5) liegen nicht ausreichend Daten vor, um hierzu einen begründeten Vorschlag zu machen. Es wurden daher für diese Art die in der ISO-Norm angeführten Kriterien verwendet.

Für die Überprüfung der Validität wurde in den Versuchen ohne Schadstoffzugabe die Variante mit einem Wassergehalt von 20 % und einem nicht manipulierten pH-Wert als Kontrolle betrachtet. Bei den Akutttests (Parameter Mortalität) kann nur das erste Kriterium verwendet werden.

Tab. 38: Daten zu den Validitätskriterien für die Kontrolle zu den ökotoxikologischen Tests mit *Enchytraeus christenseni*. cv: Variationskoeffizient der Nachkommenzahl zu Testende (cv % = $100 * s / |\bar{x}|$), WG: Wassergehalt

Versuch	Monat	Mortalität Adulte (%)	Juvenile	cv (%)
1 Reproduktionstest WG 1	März 98	4,3	66,7	54,8
2 Reproduktionstest WG 2	März 98	0,0	96,2	40,8
3 Reproduktionstest WG 3 ^{a)}	März 98	< 10	-	< 50,0
4 Reproduktionstest WG Mixeffekt	Juni 98	2,8	23,6	33,2
5 Reproduktionstest pH	Juni 98	4,3	58,4	17,1
6 Reproduktionstest pH – WG	Aug. 98	10,0	145,9	13,6
7 Reproduktionstest Zink 1	Sept. 98	1,4	193,4	30,3
8 Reproduktionstest Zink 3	Nov. 98	7,1	137,3	25,7
9 Reproduktionstest Zink 2 (Alterung)	März 99	1,4	175,1	26,1
10 Reproduktionstest Zink - pH 1	April 99	2,9	128,1	17,0
11 Reproduktionstest Zink - WG 1	April 99	1,4	168,4	23,4
12 Reproduktionstest Chloride 1	Juni 99	0,0	138,2	15,3
13 Reproduktionstest Zink - WG 2	Juli 99	2,9	160,1	19,0
14 Reproduktionstest Chloride 2	Feb. 00	2,0	68,6	16,3
15 Mortalitätstest Zink 1	Sept. 00	14,3	-	-
16 Mortalitätstest Zink 2	März 01	0,0	-	-
17 Reproduktionstest Zink – pH 2	Juli 01	0,0	63,8	25,4

^{a)} keine Kontrollvariante mit 20 % WG, da alle Varianten mit Wassergehalten ≥ 35 %; Angaben zu Mortalität der Adulten und cv beziehen sich auf alle getesteten Varianten

Die Mortalität der Adulten liegt bei den Versuchen mit *Enchytraeus christenseni* immer unter 20 % und meist sogar unter 10 % (Tab. 38). Die Anzahl der Juvenilen liegt in einem Fall unter 50. In einem weiteren Fall liegt der Variationskoeffizient der Reproduktion etwas über 50 %. Da jeweils die anderen beiden Validitätskriterien erfüllt waren und die Ergebnisse trotzdem einer statistischen Auswertung zugänglich waren, wurde auf eine Wiederholung dieser beiden Versuche verzichtet. Bei den Versuchen mit *Enchytraeus sp.* (RefB5) waren die Validitätskriterien in allen Fällen erfüllt (Tab. 39).

Tab. 39: Daten zu den Validitätskriterien für die Kontrolle zu den ökotoxikologischen Tests mit *Enchytraeus sp. (RefB5)*. cv: Variationskoeffizient der Nachkommenzahl zu Testende ($cv \% = 100 * s / |\bar{x}|$). WG: Wassergehalt

Versuch	Monat	Mortalität Adulte (%)	Juvenile	cv (%)
1 Reproduktionstest WG ^{a)}	Juni 99	0,0	81,4	18,8
2 Reproduktionstest Zink	Okt. 99	0,0	54,6	24,7
3 Mortalitätstest Zink 1	Feb. 01	4,0	-	-
4 Mortalitätstest Zink 2	April 01	0,0	-	-

^{a)} Wassergehalt 25 %

5.9 Vergleich der Reproduktion in den Kontrollansätzen aller Versuche

Die Anzahl der Juvenilen zu Testende in den Varianten mit einem Wassergehalt von 20 % und keiner weiteren Behandlung (= Kontrollen bei den Toxizitätstests) unterscheidet sich von Versuch zu Versuch z. T. deutlich (Tab. 40). Auffällig sind besonders die Versuche 1, 2, 4, 5 und 14 mit einer Nachkommenzahl von unter 100 Tieren, während sie bei den anderen Versuchen meist über 130 Juvenilen liegt.

Tab. 40: Rahmenbedingungen zu den Versuchen mit *Enchytraeus christenseni*. Alter: Alter der Zuchtschale, aus der die Testorganismen entnommen wurden; n. d. nicht dokumentiert.

Versuch	Monat	Juvenile Kontrolle	Alter (Tage)	pH	Charge LUFA 2.2
1 Reproduktionstest WG 1	März 98	66,7	47	5,8	Sp 24697
2 Reproduktionstest WG 2	März 98	96,2	47	5,8	Sp 24697
3 Reproduktionstest WG 3 ^{a)}	März 98	-	-	5,8	Sp 24697
4 Reproduktionstest WG Mixeffekt	Juni 98	23,6	46	5,6	Sp 24697
5 Reproduktionstest pH	Juni 98	58,4	n.d.	5,8	Sp 24697
6 Reproduktionstest pH – WG	Aug. 98	145,9	53	5,6	Sp 24697
7 Reproduktionstest Zink 1	Sept. 98	193,4	56	5,3	Sp 24697
8 Reproduktionstest Zink 3	Nov. 98	137,3	54	5,2	Sp 24697
9 Reproduktionstest Zink 2 (Alterung)	März 99	175,1	48	5,5	Sp 24697
10 Reproduktionstest Zink - pH 1	April 99	128,1	47	5,3	Sp 24697
11 Reproduktionstest Zink - WG 1	April 99	168,4	46	5,5	Sp 24697
12 Reproduktionstest Chloride 1	Juni 99	138,2	54	5,2	Sp 24697
13 Reproduktionstest Zink - WG 2	Juli 99	160,1	53	5,1	Sp 24697
14 Reproduktionstest Chloride 2	Feb. 00	68,6	46	5,0	n. d.
15 Mortalitätstest Zink 1	Sept. 00	-	48	5,0	Sp24399
16 Mortalitätstest Zink 2	März 01	-	49	5,1	Sp21999
Mittelwert		120,0	49,6	5,41	

^{a)} keine Kontrollvariante mit 20 % WG, da alle Varianten mit Wassergehalten ≥ 35 %;

Für die Versuche 1-13 wurde LUFA 2.2 derselben Lieferung (Charge Sp 24697) verwendet. Mit zunehmender Lagerungsdauer zeigte dieser Boden in den Kontrollen einen abnehmenden pH-Wert. Dieser negative Zusammenhang zwischen Testdatum und pH ist signifikant (Pearson Produkt-Moment-Korrelation, $r = -0,84$). Zwischen dem pH-Wert und der Reproduktion in der Kontrolle besteht jedoch kein signifikanter Zusammenhang. Ebenfalls kein Zusammenhang besteht zwischen dem Alter der verwendeten Zuchtschale und der Reproduktion in der Kontrolle. Für die beiden letztgenannten statistischen Tests wurden allerdings nur die Daten der Versuche 6-14 in Tabelle 40 herangezogen, da die Versuche 1, 2, 4 und 5 aufgrund gerätebedingter Probleme bei der Temperaturregulation eine geringere Reproduktion aufwiesen.

Tab. 41: Rahmenbedingungen zu den Versuchen mit *Enchytraeus sp. (RefB5)*. Alter: Alter der Zuchtschale, aus der die Testorganismen entnommen wurden

Versuch	Monat	Juvenile Kontrolle	Alter (Tage)	pH	Charge LUFA 2.2
1 Reproduktionstest WG ^{a)}	Juni 99	81,4	63	5,0	Sp24697
2 Reproduktionstest Zink	Okt 99	54,6	98	5,0	Sp24697
3 Mortalitätstest Zink 1	Feb 01	-	59	5,1	Sp21999
4 Mortalitätstest Zink 2	April 01	-	56	5,2	Sp21999
Mittelwert		68,0	69,0	5,08	

^{a)} Wassergehalt 25 %

Die Versuche mit *Enchytraeus sp. (RefB5)* sind überwiegend mit derselben Charge LUFA 2.2 durchgeführt worden wie die Tests mit *Enchytraeus christenseni* zur selben Fragestellung. Unterschiede zwischen den korrespondierenden Tests der beiden Arten gibt es allerdings beim pH-Wert (Tab. 41). Ein Vergleich der hier ermittelten Daten untereinander oder mit Literaturdaten sollte immer nur vor dem Hintergrund der jeweiligen Rahmenbedingungen vorgenommen werden.