

## **5. Zusammenfassung / Summary**

In der vorliegenden Arbeit wurden Nebenwirkungen verschiedener Pflanzenschutzmittel auf Collembolen unterschiedlicher Lebensformtypen in Labor- und Freilandexperimenten untersucht. Hauptziel war die Konzeption eines Wahlversuches mit Collembolen zur quantitativen Erfassung des Vermeidungsverhaltens, welches über eine Hemmung der Einwanderung in kontaminierte Areale oder über Fluchtreaktionen zu einem Populationsrückgang führen kann. Als Testsubstanzen wurden das Herbizid Betanal (Wirkstoff Phenmedipham) und die Insektizide Croneton EC 500 (Etiofencarb) und Curaterr SC 500 (Carbofuran, alles Carbamate), die synthetischen Pyrethroide Karate 5 WG ( $\lambda$ -Cyhalothrin) und Cymbush 10 EC (Cypermethrin) sowie das aus Samenextrakten des Neem-Baums gewonnene NeemAzal T/S (Azadirachtin A) verwendet. Als Grundlage für die Entwicklung des Verhaltensversuchs wurden die Produkte zunächst auf ihre akute Toxizität sowie ihre Auswirkungen auf die Lokomotionsfähigkeit von freilandrelevanten Collembolenarten nach Expositionszeiten von 24 Stunden und 7 Tagen untersucht. Dazu wurden aus Bodenproben der Freilandversuchsfläche, einer Brache, die Arten *Isotoma anglicana*, *Lepidocyrtus violaceus*, *Folsomia fimetaria*, *Heteromurus nitidus* und *Onychiurus armatus* extrahiert und in stabile, synchronisierte Laborzuchten überführt. Mit ihnen sowie der die in ökotoxikologischen Biotests standardmäßig eingesetzten Art *Folsomia candida* wurden die Versuche zur akuten Toxizität sowie die Wahlversuche durchgeführt. Der Erfassung der chronischen Toxizität dienten zudem Reproduktionsversuche mit *F. candida*, die im Gegensatz zu den anderen Arten parthenogenetisch ist. Zur Abgrenzung der Effekte von Handelsprodukten und Wirkstoffen wurden Akuttests mit *I. anglicana* und *O. armatus* sowie Wahlversuche mit allen Arten durchgeführt. Als Testsubstrat für die Versuche diente der Standardboden LUFA 2.2. Die Repellentwirkungen der Substanzen über die Gasphase wurden mit der Art *O. armatus* in einem ebenfalls neu entwickelten Versuch zur olfaktometrischen Wahrnehmung untersucht. Abschließend wurden die Ergebnisse der Wahlversuche am Beispiel von Betanal und Cymbush in einem Freilandversuch anhand der Besiedlung von kontaminierten Netzbeuteln und Streudosen überprüft.

Alle untersuchten Pflanzenschutzmittel bis auf NeemAzal T/S riefen bei den Collembolen nach 24 Stunden Lokomotionsstörungen hervor. Nach 7 Tagen lagen die  $EC_{50}$ -Werte für die Schädigung (=Lähmung und Tod) der einzelnen Arten für Betanal zwischen 9 und 31 mg aktiver Wirkstoff (ai) / kg Bodentrockengewicht (TG), für Karate zwischen 14 und 74 mg ai / kg TG, für Cymbush zwischen 23 und 185 mg ai / kg TG, für Croneton zwischen 11 und 18 mg ai / kg TG, für Curaterr zwischen 0,1 und 7,7 mg ai / kg TG und für NeemAzal T/S zwi-

schen 1 und 8 mg ai / kg TG. Es konnten keine generellen Sensibilitätsrangfolgen für einzelne Arten oder Lebensformtypen festgestellt werden. Die schädigende Wirkung von Karate, Croneton, Curaterr und NeemAzal T/S konnte eindeutig auf die jeweiligen aktiven Wirkstoffe zurückgeführt werden. Im Fall von Betanal und Cymbush wurden die Effekte auf Beistoffe der Formulierung zurückgeführt, da die aktiven Wirkstoffe in den untersuchten Konzentrationen nicht toxisch waren und die Leerformulierung von Betanal den gleichen Effekt hatte wie das Betanal selbst. Bis auf Cymbush schränkten alle untersuchten Pflanzenschutzmittel die Reproduktion von *F. candida* nach einer Exposition von 28 Tagen bereits in Konzentrationen signifikant ein, die unter den in den Akutttests ermittelten EC<sub>50</sub>-Werten für die Schädigung lagen. Cymbush führte nicht zu einem Reproduktionsrückgang.

Für die Untersuchung des Vermeidungsverhaltens von Collembolen wurde ein Testdesign entwickelt, das bei geringem Material- und Kostenaufwand und einer kurzen Testdauer Aussagen über die Repellentwirkung von Pflanzenschutzmitteln oder anderen Chemikalien zulässt. Dabei wurde in einem gemeinsamen Ansatz mit allen sechs Arten der Aufenthalt der Tiere in einem Gefäß, welches jeweils zur Hälfte kontaminierten und unkontaminierten Boden enthält, nach einer Versuchsdauer von 24 Stunden bestimmt. Voruntersuchungen zeigten, dass sich die Arten in ihrer Verteilung nicht beeinflussen. Da sich bei den Kontrollen nicht alle Arten gleichmäßig über die gesamte Fläche verteilen, konnten die Verteilungen in den Testansätzen mit Kontaminanten nur mit entsprechenden Kontrollverteilungen und nicht mit hypothetischen Verteilungsverhältnissen verglichen werden. Der Test ist je nach Einsatzort der Tiere als Einwanderungs- oder Fluchttest durchführbar. Beide Varianten führen in einigen Fällen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Eine generelle Bevorzugung eines der beiden Verfahren lässt sich auf der Grundlage der erhobenen Daten nicht rechtfertigen. Die Wahlversuche wurden nur bei Pflanzenschutzmittelkonzentrationen durchgeführt, die nach den Ergebnissen der Akutttests keine Schädigung der Versuchstiere erwarten ließen.

Mit Hilfe der Wahlversuche konnten für alle untersuchten Produkte Repellenteigenschaften nachgewiesen werden. Dabei war eine hohe interspezifische Variabilität der Meidereaktionen festzustellen. Gemessen an der Zahl der reagierenden Collembolenarten kann das Betanal als das stärkste, das Curaterr als das schwächste Repellent eingestuft werden. Die Reaktionen waren konzentrationsabhängig. Die Art *I. anglicana* zeigte am häufigsten ein signifikantes Meideverhalten, die Art *F. candida* erwies sich dagegen als besonders wenig sensitiv.

Für die aktiven Wirkstoffe der Handelsprodukte Betanal, Croneton und Curaterr konnte im Gegensatz zu den anderen Wirkstoffen keine Repellentwirkung festgestellt werden. Das

Meideverhalten wurde in diesen Fällen demnach offensichtlich von Beistoffen der Formulierung ausgelöst.

Der Vermeidungstest reagierte bei den Pflanzenschutzmitteln Betanal, Karate und Cymbush sensitiver als der Reproduktionstest. Durch die Aufdeckung von Vermeidungsreaktionen, die zu einer Abwanderung von Collembolen aus kontaminierten Arealen und damit zu einer Beeinträchtigung der Funktion der Bodenbiozönose und einer Verminderung der Bodenfruchtbarkeit führen können, liefert er zusätzliche, ökologisch relevante Informationen zu Pestizidnebenwirkungen auf Nichtzielorganismen. Das Potenzial des schnell und einfach durchführbaren Tests, in Kombination mit anderen ökotoxikologischen Biotests zu einer effektiveren und aussagekräftigeren Bewertung von Pestizidnebenwirkungen beizutragen, wird diskutiert.

Auf die Produkte Betanal, Cymbush, Croneton, Curaterr und NeemAzal T/S reagierte die untersuchte Collembolenart *O. armatus* auch ohne direkten Kontakt. Auch diese Wirkungen waren konzentrationsabhängig. Karate löste in den Versuchen zur olfaktorischen Repellenz hingegen kein Meideverhalten aus. Reines Cymbush und reines Croneton, jedoch nicht ihre Wirkstoffe, führten über die Gasphase innerhalb weniger Minuten zu einer vollständigen Lähmung der Versuchstiere. Es wird angenommen, dass diese Wirkung auf Beistoffe der Formulierung zurückgeht. Unter den aktiven Wirkstoffen konnten nur Ethiofencarb und der Neemkernextrakt NeemAzal eine olfaktorisch abschreckende Wirkung auslösen.

Durch die Ausbringung von Netzbeuteln im Freiland sollte die Besiedlung von mit Betanal und Cymbush entsprechend ihrer empfohlenen Aufwandmenge kontaminierter Streu im Vergleich zu unkontaminierten Beuteln durch Collembolen erfasst werden. Nach einer Expositionszeit von 4 Wochen wurden in allen Varianten ähnliche Besiedlungsstärken festgestellt. Die Wiederholung des Versuchs mit Streudosen über einen Versuchszeitraum von 2 Wochen mit Betanal in subletalen Konzentrationen erbrachte ebenfalls keine statistisch absicherbaren Unterschiede bei den eingewanderten Collembolen. Die Eignung der Methoden für die Erfassung von Verhaltensreaktionen von Collembolen im Freiland wird diskutiert.

## **Summary**

This study examined side-effects of various pesticides on collembolan species covering different life forms in laboratory and field experiments. The principal aim of the study was to develop choice experiments with *Collembola* for quantitative assessment of avoidance behaviour. Avoidance can potentially lead to population declines due to inhibited immigration or escape from contaminated areas. One herbicide (Betanal, active ingredient phenmedipham) and five insecticides were tested. These included two synthetic pyrethroids (Karate, a. i.  $\lambda$ -cyhalothrin and Cymbush, a. i. cypermethrin), two carbamates (Croneton, a. i. ethiofencarb and Curaterr, a. i. carbofuran) and the neem seed-kernel extract formulation NeemAzal T/S (active ingredient azadirachtin A). To determine the influence of the six pesticides on springtail mortality and mobility, acute toxicity tests over 24 hours and seven days were carried out. Tests were performed with indigenous species from the experimental fallow. For five species, *Isotoma anglicana*, *Lepidocyrtus violaceus*, *Folsomia fimetaria*, *Heteromurus nitidus* and *Onychiurus armatus* synchronized laboratory cultures were established. They were used in the acute toxicity tests as well as in the choice experiments. *Folsomia candida*, which is becoming recognized as a standard test species, was included as a sixth species because it reproduces parthenogenetically and therefore allowed the assessment of effects on reproduction. The acute toxicities of the six commercial formulations were compared with their active ingredients using the test species *I. anglicana* and *O. armatus*. Additionally, repellent effects were compared for all species. The standard soil LUFA 2.2 was used in all tests. Avoidance induced by vapours of the test substances was quantified using an innovative design for testing collembolan olfaction. Finally, the results of the choice experiments with Betanal and Cymbush were compared with field experiments. For this purpose, the colonization of contaminated litterbags and -boxes by springtails was investigated.

All pesticides except NeemAzal T/S caused inactivation of the springtails after 24 hours. After seven days,  $EC_{50}$ -values (indicating damage of test animals i.e. immobilization and death) for the different species ranged from 9 to 31 mg active ingredient (ai) / kg dry soil weight (DW) for Betanal, 14 to 74 mg ai / kg DW for Karate, 23 to 185 mg ai / kg DW for Cymbush, 11 to 18 mg ai / kg DW for Croneton, 0,1 to 7,7 mg ai / kg DW for Curaterr and 1 to 8 mg ai / kg DW for NeemAzal T/S. No general pattern of species differences in sensitivities could be detected nor could the differences be attributed to life forms. Whereas the harmful effects of Karate, Croneton, Curaterr and NeemAzal T/S could be attributed to the active ingredients, these were non-toxic in the case of Betanal and Cymbush. In addition, the formulation blank of Betanal caused the same effects as the commercial product. It is

concluded that the formulations of Betanal and Cymbush contain additional toxic compounds. Cymbush had no adverse effect on reproduction of *F. candida* after 28 days. All other pesticides affected reproduction with  $EC_{50}$ -values lower than in the acute tests.

For the study of springtail avoidance behaviour a time-, material- and cost saving test design was set up that allows the estimation of repellent properties of pesticides or other chemicals. One half of a circular test chamber was filled with contaminated soil, the other half was filled with control soil. In a combined test assay individuals of all six species were placed either on the contaminated side (escape test) or on the uncontaminated side (immigration test). After 24 hours, the number of specimens staying on each side were counted. Preliminary experiments showed that the six species did not influence each other. In dual-control tests, not all species distributed themselves randomly throughout the test chambers. Hence the proportion of springtails on each side of the test chamber may not be statistically analysed by simple comparison with a predetermined distribution ratio but can only be compared with a control distribution. Immigration and escape tests showed somewhat different results, however a general recommendation of one procedure is not possible. All pesticide concentrations tested in the choice experiments had proved harmless in the preceding acute tests.

Although the responses of the different collembolan species varied considerably, repellency could be stated for all six pesticides by means of the avoidance test. Regarding the number of responding species, Betanal can be considered the most effective repellent whereas Curaterr provoked the weakest avoidance reaction. All reactions showed to be dose-dependant. Whereas *I. anglicana* displayed significant avoidance behaviour towards five of six pesticides, *F. candida* turned out to be extremely insensitive. For the active ingredients of Betanal, Croneton and Curaterr, no repellent effects could be detected. Apparently some additional ingredients of the commercial formulations had triggered the avoidance behaviour. The endpoint avoidance behaviour proved to be more sensitive than reproduction. By means of the choice test behavioural reactions can be detected that could lead to an emigration of springtails out of contaminated areas and thereby affect the community structure of the bio-coenosis and soil fertility. Furthermore, it provides additional, ecologically important information about side effects of pesticides on non-target organisms. The potential of the avoidance tests to contribute to a more comprehensive and valuable risk assessment of pesticides as well as its possible combination with other ecotoxicological test systems is discussed.

In an olfactory experiment, *O. armatus* was able to detect Betanal, Croneton, Curaterr and NeemAzal T/S without direct contact. These effects were dose-dependent. However Karate

could not be detected in the gaseous phase. Vapours of pure Cymbush and pure Croneton led to complete immobilization of the test animals within a few minutes. Apparently, this effect was due to formulation additives. Of the active ingredients, only vapours of ethiofen-carb and the neem seed-kernel extract NeemAzal caused avoidance behaviour.

In the field, springtails colonized litterbags contaminated with Betanal- and Cymbush according to the recommended application rates and exposed for four weeks to the same extent as uncontaminated bags. The use of litterboxes contaminated with sublethal doses of Betanal and exposed for two weeks showed no significant different colonization patterns either. The suitability of the methods for assessing behavioural reactions of springtails in the field is discussed.