



zur Erlangung des Grades
eines
Master of Engineering (M. Eng.)
von Frau Vivien Walter

geboren am: 27. März 1994

in: Leipzig

vorgelegte Abschlussarbeit: Masterthesis

Thema:

Experimentelle Untersuchung von kombiniertem Futter-, Temperatur- und Pestizidstress auf den Organismus *Daphnia magna*

Erstprüfer: Prof. Dr. rer. nat. Regina Walter (FH Merseburg)

Zweitprüfer: Dr. rer. nat. Saskia Knillmann (UFZ)

Merseburg, 13. September 2017

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einen Dank an alle Personen aussprechen, die mich während des Studiums und vor allem in der Zeit der Anfertigung meiner Masterarbeit unterstützten.

Ich danke Frau Dr. Knillmann für die außerordentlich gute Betreuung während meiner Zeit am Umweltforschungszentrum in Leipzig. Für alle Fragen und Probleme konnte ich in Zusammenarbeit mit ihr Lösungen finden und ich konnte meine Arbeit stets gut voran bringen.

Ich möchte meinen Dank gegenüber Frau Prof. Walter ausdrücken, die mich ebenfalls außerordentlich gut betreut hat. Für alle Probleme und Fragen konnte ich mit ihr zielführende Lösungen finden, die es mir letztendlich ermöglichten, meinen persönlichen Zeitplan in die Tat umzusetzen. Ich bedanke mich auch bei der Fachhochschule Merseburg, an der ich stets mit Freude gelernt habe.

Ebenso bedanke ich mich bei den Kollegen und Kolleginnen des Departements Systemökotoxikologie, mit denen die Zeit am UFZ sehr angenehm war. Mein ausdrücklicher Dank geht an Frau Ingrid Ränker, die mir jederzeit bei der praktischen Arbeit im Labor hilfsbereit und beratend zur Seite stand.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich bei allen Schwierigkeiten und in jeder Phase des Studiums tatkräftig unterstützten.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Formelverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einführung	8
1.1 Stand der ökotoxikologischen Forschung	11
1.2 Zielstellung der Arbeit	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Modellorganismus <i>Daphnia magna</i>	16
2.2 Herstellung der Medien und Lösungen	16
2.2.1 Vorbereitung der Futteralgensuspension	16
2.2.2 Das Aachener Daphnienmedium	17
2.3 Durchführung der Experimente	18
2.4 Analyse der Daten	23
2.4.1 Anwendung der Modelle EA und SAM	23
2.4.2 Modellierung der Ergebnisse mit <i>R</i>	24
2.4.3 Darstellung der Dosis-Wirkungskurven	24
3 Ergebnisse der Experimente	26
3.1 Interaktion von zwei Stressoren	26
3.1.1 Temperatur – Futter	26
3.1.2 Temperatur – Esfenvalerat	28
3.1.3 Futter – Esfenvalerat	30
3.2 Interaktion von drei Stressoren	34
4 Diskussion der Ergebnisse	38
4.1 Hoher Futterstress wirkt synergistisch mit Temperaturstress	38
4.2 Esfenvalerat wirkt mit Futterstress synergistisch, mit Temperaturstress additiv	39
4.3 SAM kann die Wirkung von drei Stressoren vorhersagen	41
5 Zusammenfassung und Ausblick	43
6 Quellenverzeichnis	45
Thesen	49
Anhang	50

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell der Stressaddition nach Liess et al. (2016)	11
Abbildung 2: Ablauf eines Experiments im Überblick	19
Abbildung 3: Mittel- und langfristige Effekte durch Temperatur- und Futterstress	27
Abbildung 4: Dosis-Wirkungskurve des mittelfristigen Effekts bei 25 °C mit Esfenvalerat...29	
Abbildung 5: Dosis-Wirkungskurve des mittelfristigen Effekts bei 28 °C mit Esfenvalerat...29	
Abbildung 6: Dosis-Wirkungskurve des mittelfristigen Effekts bei 30 °C mit Esfenvalerat...29	
Abbildung 7: Dosis-Wirkungskurve (7d nach Kontamination) von 10 % Futter mit Esfenvalerat	31
Abbildung 8: Dosis-Wirkungskurve (7d nach Kontamination) von 1 % Futter mit Esfenvalerat	32
Abbildung 9: Dosis-Wirkungskurve (7d nach Kontamination) von 1 % Futter mit Esfenvalerat bei 25 °C	32
Abbildung 10: Dosis-Wirkungskurve (7d nach Kontamination) von 10 % Futter mit Esfenvalerat in 28 °C	32
Abbildung 11: Dosis-Wirkungskurve (7d nach Kontamination) von 1 % Futter mit Esfenvalerat bei 28 °C	33
Abbildung 12: Dosis-Wirkungskurve (7d nach Kontamination) von 10 % Futter mit Esfenvalerat in 30 °C	33
Abbildung 13: Dosis-Wirkungskurve (7d nach Kontamination) von 1 % Futter mit Esfenvalerat bei 30 °C	33
Abbildung 14: Dosis-Wirkungskurve für 25 °C, 1 % Futter und Esfenvalerat mit Modellvorhersagen	35
Abbildung 15: Dosis-Wirkungskurve für 28 °C, 10 % Futter und Esfenvalerat mit Modellvorhersagen	35
Abbildung 16: Dosis-Wirkungskurve für 28 °C, 1 % Futter und Esfenvalerat mit Modellvorhersagen	36
Abbildung 17: Dosis-Wirkungskurve für 30 °C, 10 % Futter und Esfenvalerat mit Modellvorhersagen	36
Abbildung 18: Dosis-Wirkungskurve für 30 °C, 1 % Futter und Esfenvalerat mit Modellvorhersagen	36
Abbildung 19: Vorhersage-Genauigkeit von SAM in Bezug zu LC50-Werten.....	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ADaM-Salze nach Klüttgen et al. (1994)	17
Tabelle 2: Getestete Kombinationen aus Temperatur, Futtermenge und Esfenvalerat-Konzentrationen.....	18
Tabelle 3: Soll-Futterkonzentrationen für verschiedene Daphnien-Altersklassen	20
Tabelle 4: Laufende Aufgaben für die Dauer eines Experiments für jeden Wochentag	21
Tabelle 5: Auswertung der Verhältnisse nach Belden et al. (2007)	23
Tabelle 6: Effekte durch Temperatur- und Futterstress	27
Tabelle 7: LC50-Werte von Temperatur- und Esfenvaleratstress	28
Tabelle 8: Effekte durch Temperatur- und Esfenvaleratstress	28
Tabelle 9: LC50-Werte von Futter- und Esfenvaleratstress	30
Tabelle 10: Effekte durch Futter - und Esfenvaleratstress	31
Tabelle 11: LC50-Werte von Temperatur-, Futter- und Esfenvaleratstress	34
Tabelle 12: Effekte von Temperatur -, Futter - und Esfenvaleratstress.....	35

Formelverzeichnis

Formel 1: CA-Modell nach Loewe et al. (1926)	9
Formel 2: EA-Modell nach Bliss C. I. (1939)	10
Formel 3: Berechnung Futtermenge	20
Formel 4: Modellabweichungsverhältnis von der Beobachtung zu EA	23
Formel 5: Berechnung der Verhältnisse zum Vergleich von Beobachtung mit Vorhersage durch SAM	24

Abkürzungsverzeichnis

ADaM	Aachener Daphnienmedium
CA	Konzentrationsadditionsmodell (concentration addition model)
EA	Effektadditionsmodell
PSM	Pflanzenschutzmittel
SAM	Stressadditionsmodell
SL	Stocklösung
UFZ	Umweltforschungszentrum der Helmholtz – Gemeinschaft in Leipzig

1 Einführung

"Das Wasser ist ein freundliches Element für den, der [...] es zu behandeln weiß." Hinter diesem Zitat von Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832) verbirgt sich, dass der Mensch achtsam und sorgfältig mit Wasser im Allgemeinen umgehen soll. Das betrifft heutzutage nicht nur den sparsamen Gebrauch in Haushalten, sondern auch die Reinigung des vom Menschen verschmutzten Wassers und den Schutz aller Gewässer vor anthropogenen Einflüssen.

Die Öffentlichkeit und Wissenschaftler konzentrieren sich hinsichtlich des Schutzes der Gewässer besonders auf mögliche nachteilige Auswirkungen von Pestiziden. Zur richtigen Nutzung und Behandlung von Wasser gehört nach Interpretation des eingangs genannten Zitats auch eine ordnungsgemäße Beurteilung der Gefährdung von Pestiziden. Die Behandlung der landwirtschaftlich genutzten Flächen gegen Schädlinge erfolgt regelmäßig in der Wachstumsperiode der Pflanzen, wobei Insektizide, Herbizide und Fungizide angewendet werden. Deren Eintrag in angrenzende Gewässer geschieht über Abfluss vom Feld nach Regenereignissen, Abdrift bei der Ausbringung von Pflanzenschutzmitteln (PSM) und ebenso durch Straßenabläufe [1,2]. Die Folgen sind unerwünschte Kontaminationen. Die Umweltauswirkungen von Pestiziden auf Flora und Fauna in Oberflächengewässern sind sowohl von den Spitzenkonzentrationen als auch von der Dauer der Exposition abhängig [3]. Die Studien zu SPEAR zeigen immer wieder, dass die Spitzenbelastung den Effekt beeinflusst, wie es z.B. Liess und von der Ohe (2005) zeigten [4]. Im Freiland wirken neben den Schädlingsbekämpfungsmitteln auch Umweltstressoren wie beispielsweise Temperatur, geringes Nahrungsangebot und ultraviolette Strahlung. Die in Gewässern lebenden Organismen sind somit multiplen Stressoren ausgesetzt, die sich hinsichtlich der Effekte auf Nicht-Zielorganismen verstärken können. Hierbei sind beispielsweise Cadmium und Temperatur sehr gut untersuchte Stressoren. Cadmium ist in Düngemitteln enthalten und wirkt bei Kleinkrebsen, die als Versuchstiere verwendet werden, toxisch [5-9]. Der Umweltfaktor Temperatur erhöht die Sensitivität gegenüber Chemikalien und verstärkt den Effekt, sobald nicht mehr der optimale Temperaturbereich vorliegt [5-9].

Die ökotoxikologische Bewertung von Schadstoffen berücksichtigt derzeit Daten von akuten und chronischen Biotests, die mit verschiedenen Lebewesen, darunter u.a. Daphnien, Fische und Insekten, durchgeführt werden. Aufbauend auf dieser Datengrundlage, wird ein TER-Wert (Toxicity-Exposure-Ratio, zu deutsch Toxizitäts-Expositions-Verhältnis) ermittelt, der für die Zulassung eines PSM entscheidend ist [10]. Der Wert basiert auf einer Konzentration, bei der kein Effekt bei den Biotests eintrat (NOEC), und wird mit Unsicherheitsfaktoren verrechnet, um auch sensitivere Organismen zu berücksichtigen [11]. Mithilfe des TERs wird am Ende das Risiko des PSM für kleine Oberflächengewässer bestimmt, die sich am Feldrand befinden. Das Risiko wird allerdings bisher nur für eine Belastungsspitze ermittelt. Die kleinen Oberflächengewässer grenzen jedoch oftmals an mehreren Feldern und können in

kurzer Zeit mehrere Belastungsspitzen nacheinander erfahren [10]. Daher kann es zu Effekten im Freiland kommen, die um den Faktor 100 bis 1000 unter dem Laborwert liegen, der für ein Pestizid als akzeptable Effektkonzentration (EC50) festgelegt wurde [12]. Hinzu kommt, dass Mischungen von Schadstoffen sowie der Einfluss von Umweltstressoren in der Risikobewertung unbeachtet sind [2]. Diese Aspekte tragen aber maßgeblich zu dem Effekt auf einen Organismus bei. Neben dem Einfluss auf einzelne Individuen zeigen Studien in Bezug auf höhere Endpunkte auch Effekte auf eine ganze Gemeinschaft [13,14], die auch keine Rolle im Prozess der PSM-Bewertung spielen.

Aufgrund der Defizite in der PSM-Risikobewertung ist es erforderlich, Lösungen für die Integrierung aller Faktoren zu finden, die Einfluss auf Wasserlebewesen haben. Seit Jahrzehnten wird im Bereich der Ökotoxikologie an der Wirkung unterschiedlichster Pestizide und Umweltstressoren auf Wasserorganismen geforscht. Es werden vorwiegend Pestizide in den Konzentrationen getestet, die im Freiland in den Gewässern gemessen werden konnten. Hinsichtlich der Umwelteinflüsse existieren Studien zum Einfluss von beispielsweise Temperatur, Futter, Salzgehalt und Sauerstoffverfügbarkeit [1,8,15,16]. Im letzten Jahrhundert wurden Modelle entwickelt, die ursprünglich aus der Pharmakologie stammen, jedoch werden sie nun auch für die Vorhersage von Pestizidmischungen verwendet. Die Voraussetzung für die Anwendung der Modelle ist ein unabhängiger Wirkmechanismus, was bedeutet, dass Stressoren nicht chemisch miteinander interagieren und sich nicht in ihrer Toxizität beeinflussen. Es handelt sich um die Modelle Konzentrationsaddition (CA) und Effektaddition (EA).

Das CA-Modell wurde 1926 von Loewe und Muischnek entwickelt, womit seit ein paar Jahren auch Pestizidmischungen vorhergesagt werden [17]. Es gilt hauptsächlich für Stoffe mit ähnlichen Wirkmechanismen. Als Endpunkt gilt der prozentuale Effekt, der durch eine bestimmte Effektkonzentration verursacht wird. CA wurde in vielen Studien bereits erfolgreich angewendet [18] und wird mathematisch nach Formel 1 beschrieben. Die Konzentrationen zweier Chemikalien sind durch c_A und c_B beschrieben und EC_x sind die Effektkonzentrationen der jeweiligen Chemikalie, die einen Effekt von x % auslösen.

$$\frac{c_A}{EC_{xA}} + \frac{c_B}{EC_{xB}} = 1$$

Formel 1: CA-Modell nach Loewe et al. (1926)

Das EA-Modell wurde von Bliss C. I. im Jahr 1939 entwickelt [19]. Bliss arbeitete mit Testsystemen, bei denen die Mortalität als Endpunkt galt und schaffte eine weitere Möglichkeit, Stressorkombinationen zu betrachten. Mit der Grundlage von tatsächlichen Effekten auf Überleben oder Sterben kann die Wahrscheinlichkeit des Überlebens oder Sterbens, resultierend aus einer Exposition gegenüber mehreren Stressoren mit unabhängigen Wirkmechanismen, berechnet werden [19]. Das Modell EA wird mathematisch wie in Formel 2 beschrieben. Dabei ist e_3 gleich der vorhergesagte Effekt, ausgedrückt in der prozentualen

Mortalität, und e_1 und e_2 sind die Effekte, wieder ausgedrückt in Mortalitäten, die von den jeweiligen Stressoren verursacht wurden.

$$e_3 = e_1 + e_2 - (e_1 * e_2)$$

Formel 2: EA-Modell nach Bliss C. I. (1939)

Der Ansatz ermöglicht es ebenso, neben Giftmischungen die Kombination von Pestizid- und Umweltstressoren vorherzusagen, weil das Modell keine Grenzen bezüglich der Anzahl an Stressoren festlegt [18]. Es existiert kein Modell, das speziell für die Vorhersage von Kombinationen aus Chemikalien- und Umweltstressoren entwickelt wurde. Jedoch haben Coors und De Meester (2008) in ihrer Studie zur Wirkung eines Pestizids zusammen mit Umweltstressoren erfolgreich nachgewiesen, dass EA sich für solch eine Vorhersage ebenfalls eignet [20]. Im Gegensatz zu CA kann EA für solche Stressoren verwendet werden, weil es auf die Unterschiedlichkeit der Stressoren abzielt.

In der Ökotoxikologie werden drei Effekte unterschieden, die auf der Grundlage eines Modells bestimmt werden. Ist der Effekt gleich die Summe der Einzeleffekte, so wird von additivem Effekt gesprochen, der vor allem durch die beiden beschriebenen Modelle CA und EA vorhergesagt wird. Treten jedoch zwischen den Stressoren Interaktionen auf, so bleibt der Effekt nicht immer additiv, sondern tritt stärker oder schwächer auf. Im Falle eines schwächeren Effekts, wird von Antagonismus gesprochen und im Gegensatz dazu werden stärkere Effekte als Synergismus bezeichnet. Synergismus kann nur identifiziert werden, wenn die eingetretenen Effekte stärker sind als vom Nullmodell erwartet, welches z.B. CA oder EA sein kann.

Die hoch synergistischen Effekte von Schadstoffen mit einem Umweltstressor können nun quantitativ vorhergesagt werden, da von Liess et al. 2016 das Modell der Stressaddition (SAM) entwickelt wurde [21]. Dieser Ansatz ist ganz neu und wurde in einer Meta-Analyse mit verschiedenen Studien, die Kombinationen aus einer Chemikalie und einem Umweltstressor betrachteten, kalibriert. Es sollen Stressoren unterschiedlicher Wirkung auf eine gemeinsame Kapazität erfasst werden. Wie bereits erwähnt, so berücksichtigt die Pestizid-Risikobewertung nicht mehrere zeitgleich wirkende Stressoren. Die Quantifizierung der vielfachen Stress-Effekte ist demnach ausstehend. SAM geht von einer allgemeinen Belastungskapazität für jedes Individuum aus. Die Kapazität hat es gegenüber allen Arten von spezifischem Stress und sollte nicht ausgeschöpft werden. Das Modell überträgt experimentelle Stressniveaus unter Verwendung der stressbedingten Mortalität in allgemeine Belastungsniveaus. Die allgemeinen Stressniveaus von unabhängigen Stressoren sind additiv, wobei die Summe die Gesamtbelastung einer Population bestimmt [21]. SAM zielt auf die Änderung der Sensitivität aufgrund bestehender Interaktionen, welche gemeinsam auf die Gesamtkapazität wirken. Die Umwandlung der experimentellen Stressniveaus in allgemeine Belastungsniveaus kann in der Abbildung 1 nachvollzogen werden.

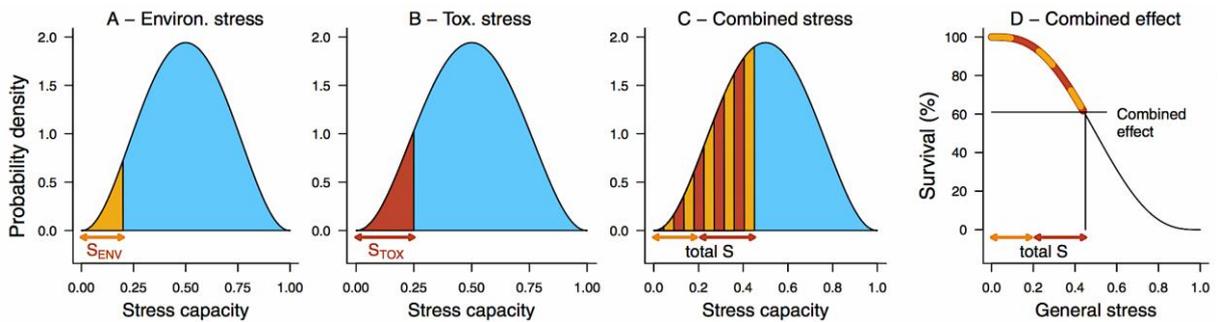


Abbildung 1: Modell der Stressaddition nach Liess et al. (2016)
 (A,B: allgemeine Stresskapazität; C: Gesamtstress; D: Kombiniertes Effekt)

1.1 Stand der ökotoxikologischen Forschung

An der Wirkung von biotischen und abiotischen Faktoren wurde im letzten Jahrhundert bereits viel geforscht. Viele Studien setzten sich mit Futterlimitierung, Temperaturstress, ultravioletter Strahlung oder auch Räubertum als Stressor bzw. Herausforderung für viele Arten auseinander. Daphnien gelten als Indikatorarten bei der Bewertung der Gewässergüte für kleine stehende Oberflächengewässer. Darum werden sie als Modellorganismen in zahlreichen Forschungsarbeiten eingesetzt, um deren Sensitivität gegenüber vielen Stressoren zu testen. Für die vorliegende Arbeit stellte sich im Besonderen die Frage, welche Erkenntnisse es bisher in der Wirkung von Futter- und Temperaturstress gibt.

Futterstress kann nicht nur durch veränderte Umweltbedingungen auftreten, sondern auch durch Konkurrenz in der Gemeinschaft, weshalb dies ein essentieller Parameter ist, den es in toxikologischen Tests zu berücksichtigen gilt. Über die Effekte von Futterstress auf die Spezies *Daphnia parvula* wurde herausgefunden, dass ein signifikanter Einfluss auf die Entwicklung, das Alter bei der ersten Reproduktion, die Brutdauer sowie Anzahl der Eier fortpflanzungsfähiger Mütter und die Anzahl der Nachkommen pro Brut und Mutter besteht [22]. Außerdem beschreiben Orcutt und Porter (1984), dass mit steigendem Futterangebot die Reproduktionsrate pro Muttertier zunimmt, jedoch konnte kein signifikanter Einfluss auf die Lebensdauer festgestellt werden [22]. Eine Studie von Smolders et al. (2005) belegt ebenfalls mit Untersuchungen von Futterstress auf den Organismus *Daphnia magna*, dass ein Mangel an Futter keinerlei signifikanten Effekt auf das Überleben zeigt. *D. magna* entwickelt sich bezüglich Größe und Reproduktion wie *D. parvula*, denn diese Parameter steigen mit steigender Futtermenge [5,7,8]. Die Quantität der Nahrungsaufnahme bestimmt die körperliche Kondition eines Organismus, wie es Heugens et al. (2001, 2006) schlussfolgert [5,7]. Smolders et al. (2005) und Filho et al. (2011) fanden zum Energiestatus von *D. magna* heraus, dass dieser mit steigendem Futter steigt, was die Aussage von Heugens et al. (2001) bestätigt [5,8,23]. Eine Studie zu Effekten von multiplen Stressoren beschreibt, dass mit steigender Futtermenge die Metabolismusrate ebenso zunimmt [5]. Dadurch kann maßgeblich die Toxikokinetik, im speziellen die Aufnahmerate und Elimination einer Chemikalie sowie die Entgiftung des Organismus beeinflusst werden [5]. Für ein Individuum bestimmen

letztendlich die genannten Vorgänge die Toxizität eines Giftes. Pieters et al. (2005) untersuchte bei *D. magna* das Insektizid Fenvalerat in Kombination mit Futterstress und fand heraus, dass wenig Nahrungsangebot die Toxizität des Giftes steigerte. Fenvalerat verursacht bereits eine Abnahme des Überlebens sowie des Wachstums und Futterstress verschlimmert diesen Effekt [1]. Einen ähnlichen Einfluss von Chemikalien konnten Barry et al. (1995) für Esfenvalerat und Endosulfan feststellen [24]. Die meisten Studien zur Kombination von Futterstress mit einem Schadstoff bestimmten nicht den Effekt auf der Grundlage eines Modells. Im Zuge der Entwicklung von SAM von Liess et al. (2016) konnten aber für einige Studien, die Futterstress als Basis beinhalteten, z.B. für die Untersuchungen von Pieters et al. (2005), synergistische Effekte zu der Stressorkombination gut vorhergesagt bzw. bestimmt werden. Zusammenfassend kann als Hauptaussage getroffen werden, dass Futter ein Schlüsselparameter in der Bestimmung der Fitness von Organismen und der Toxizität von Giften für sie darstellt [5].

Der Einfluss von erhöhter Temperatur wird immer bedeutender, weil in den nächsten Jahren die mittlere Temperatur auf der Erde weiter ansteigen wird [25,26]. In der Vergangenheit wurde Temperatur als abiotischer Faktor häufig auf Nicht-Zielorganismen untersucht. Koh et al. (1997) erzielten die Erkenntnis, dass *D. magna* in einem Temperaturbereich von 11 °C bis 30,7 °C existieren kann [16]. In anderen Studien wurde erkannt, dass mit steigender Temperatur von 10 °C bis 35 °C das Überleben der Gattung *Daphnia* allgemein abnimmt [15,22]. Korpelainen (1986) untersuchte Temperaturen zwischen 14 °C und 29 °C, wobei die Ergebnisse einen signifikanten Einfluss auf das Überleben, Wachstum und alle Reproduktionsparameter zeigten. Auch Heugens et al. (2006) bewies, dass Temperatur einen signifikanten Einfluss auf die Reproduktionsparameter hat. Burns (1969) fand bezüglich des Energiestatus heraus, dass dieser mit steigender Temperatur zunimmt, gemessen an der Filtrationsrate. Diese Erkenntnis kann durch die von Filho et al. (2010) durchgeführte Untersuchung über den Energiestatus gemessen an Fett- und Proteingehalt von *D. magna* untermauert werden. Die Individuen filtrieren ihre Nahrung und Burns (1969) fand heraus, dass bei verschiedenen Temperaturen bis 25 °C die Filtration mit steigender Temperatur zunimmt [27]. Im Zuge einer Meta-Analyse stellten Jackson et al. (2016) fest, dass der kumulative mittlere Effekt von Temperatur in Kombination mit einem zweiten Stressor, gleich ob Chemikalie oder Umweltfaktor, meist antagonistisch ist [28]. Als Schlussfolgerung stellen Heugens et al. (2001) heraus, dass die Wirkung von Temperatur auf die Toxizität eines Giftes von geringerem Einfluss ist.

Zur gemeinsamen Wirkung von Futter- und Temperaturstress haben z.B. Orcutt und Porter (1984) und Heugens et al. (2006) Untersuchungen angestellt. Sie fanden heraus, dass die Lebensdauer stark abnimmt, je wärmer die Umgebung ist und je weniger Futter zur Verfügung steht [22,7]. Die Effekte des einen Umweltstressors werden folglich durch das Hinzukommen des anderen verstärkt. Bei *D. magna* wird das Größenwachstum mit dem

Anstieg des Stresses durch genannte Stressoren gehemmt und die Reproduktion setzt viel später ein als bei optimaler Temperatur (20 °C) mit ausreichendem Futter [7,22].

Abgesehen von den Umweltstressoren sind die Nicht-Zielorganismen vielen Chemikalien wie Pestiziden, Antifouling-Mitteln und Metallen ausgesetzt. Einige von ihnen wie z.B. Cadmium sind bereits gut in ihrer Wirkung allein und zusammen mit Umweltstress auf die verschiedenen Makroinvertebraten erforscht [6,8,29]. Das Insektizid Esfenvalerat gehört zu den eher weniger untersuchten Insektiziden, wie es aus einem Vergleich von Belden et al. (2007) mit anderen Chemikalien hervorgeht. Im Gegensatz zu Esfenvalerat mit acht Studien existieren über z.B. Prochloraz 33 und Atrazin 50 verschiedene Studien [29], die von genannter Studie berücksichtigt wurden. Insektizide dürfen nicht vernachlässigt werden, denn sie sind aufgrund ihres Designs besonders relevant für aquatische Insekten. Diese sind den terrestrischen Schadinsekten sehr nahe, aber auch für andere aquatische Tiere sind Insektizide von Bedeutung. Neuere Studien zeigten, dass die Erholung von Insektiziden bis zu vier Wochen [30,31,32] und unter Konkurrenz in einer Gemeinschaft noch mehr als eine Generation [4] dauern kann. Knillmann et al. (2012) hat auch gezeigt, dass Daphnien unter Konkurrenz länger als aufgrund ihrer Generationszeit erwartet, beeinträchtigt werden. In der Risikobewertung sind diese Fakten von besonderer Relevanz, weil künftig eine Berücksichtigung der Erholungsdauer stattfinden muss [2]. Langlebige aquatische Organismen können sich bei wiederkehrenden Belastungen nicht mehr erholen. Um aber langfristig negativen Effekten auf ein ganzes Ökosystem vorzubeugen, ist es unabdinglich, die Regenerationsdauer der Organismen zu gewährleisten. Neben den fehlenden Aspekten in der Risikobewertung sind aber auch Vorhersagen für Exposition und Effekte durch Pestizide falsch, wie es z.B. Knäbel et al. (2012) und Kattwinkel et al. (2012) herausstellten.

Damit Insektizide in ihrer Wirkung auf aquatische Organismen noch besser verstanden werden können, soll im Detail nun auf das Pyrethroid Esfenvalerat eingegangen werden. Es ist für die Ausbringung zur Bekämpfung von saugenden und beißenden Insekten bestimmt und wird bei Getreide, Raps und Kartoffeln angewendet. Esfenvalerat blockiert die Natriumkanäle von *D. magna*, was in einer Lähmung der Organismen resultiert. Die Immobilisierung führt zu einer stark reduzierten Filtration und Assimilation [1,5,8,35]. Die Filtration ist allerdings ein essentieller Prozess, um Nahrungsaufnahme zu ermöglichen und damit wiederum Assimilation. Da die Filtration hochgradig koordinierte Bewegungen erfordert und dies nach Immobilisierung nicht mehr möglich ist, kann kein Futter mehr aufgenommen werden [35]. Die Individuen sterben sobald auch die letzten Energiereserven verbraucht wurden. Für die Gattung *Daphnia* wurden wenige Untersuchungen mit dem Pestizid durchgeführt. Eine Studie, bei der *Daphnia carinata* einer Exposition von Esfenvalerat ausgesetzt wurde, zeigte innerhalb von drei Tagen 100 % Mortalität bei einer Konzentration von 500 ng/L [24]. Hingegen verursachten 50 ng/L wenig Effekt auf das Überleben, dafür aber eine signifikante Wirkung auf die Reproduktion [24]. Jede Pestizid-Konzentration wirkte sich verzögernd auf das Alter bei der ersten Reproduktion aus und die

Toxizität des Insektizids steigt signifikant mit abnehmender Futtermenge [24]. Reynaldi et al. (2006) konnten für das Isomer Fenvalerat bei *D. magna* ebenfalls nachweisen, dass das Individuum bei der ersten Reproduktion mit steigender Konzentration älter ist als jenes der Kontrolle [35]. Esfenvalerat wird z.B. auch von Stampfli und Knillmann et al. (2011, 2012, 2014) in Studien über die Änderungen in einer Gemeinschaft aufgrund von Kontaminierung untersucht. Die Substanz wird im Freiland in Gewässern gemessen [36,37].

Die Effekte des Insektizids auf *D. magna* sind an sich bekannt, aber nicht in Kombination mit Umweltstressoren, was deshalb erforscht werden muss. Des Weiteren ist eine intensive Auseinandersetzung mit den Auswirkungen erhöhter Temperatur in Kombination mit Futterstress erforderlich, weil die Effekte auf die Mortalität und Reproduktion unklar sind. Es ist nicht bekannt, wie die genannten Umweltstressoren die Toxizität von Esfenvalerat beeinflussen, d.h. wie Temperatur und Futter bei *D. magna* die Sensitivität gegenüber Esfenvalerat verändern. Außerdem besteht die offene Frage, ob sich die Effekte des Insektizids in Kombination mit verschiedenen Stressoren quantifizieren lassen. Darüber hinaus ist bisher bekannt, dass SAM in der Lage ist, eine toxische Substanz mit einem Umweltstressor vorherzusagen. Dazu dient die umweltstressbedingte Mortalität zur Modellierung und Berechnung der Vorhersage. Ob durch dieses Vorgehen auch mehrere Umweltstressoren in Verbindung mit einem Pestizid vorhergesagt werden können, ist ein ausstehender Aspekt, der in der vorliegenden Arbeit untersucht wird.

1.2 Zielstellung der Arbeit

Die vorliegende Masterarbeit behandelt Experimente mit dem Organismus *D. magna*, der auf Temperatur-, Futter- und Pestizidstress im Labormaßstab getestet wurde. *D. magna* wird als Stellvertreter für aquatische Nicht-Zielorganismen standardmäßig für toxikologische Untersuchungen verwendet. Sie sind ein wichtiger Teil in der Nahrungskette und gelten als Schlüsselart (Keystone species) für mitteleuropäische Gewässer. Außerdem sind sie oftmals sehr sensitiv oder sogar am empfindlichsten gegenüber anderen Arten und sie sind einfach zu halten.

Die zwei wichtigsten Umweltparameter Futter und Temperatur wurden ausgewählt, weil sie laut erwähnter Studien abhängig voneinander auf den Organismus *D. magna* wirken. In dieser Arbeit soll herausgestellt werden, wie die Stressoren über einen Gradienten auf das Überleben und die Reproduktion wirken. Dafür wurden die Temperaturen 20 °C, 25 °C, 28 °C und 30 °C in Kombination mit 100 %, 10 % und 1 % Futter untersucht. Es wurden nicht mehr Futterlevel ausgewählt, da vorherige Untersuchungen im Rahmen von Abschlussarbeiten am Umweltforschungszentrum gezeigt haben, dass erst ab einer Futtermenge von lediglich 10 % offensichtliche Effekte auf die Reproduktion auftreten. Zusätzlich wurde das Insektizid Esfenvalerat in den drei für das Freiland realistischen Konzentrationen 0,03 µg/L, 0,3 µg/L und 3 µg/L als toxischer Stress durch Kurzzeitexposition angewendet. Im Freiland wurden in

fließenden Gewässern Konzentrationen bis zu 0,002 µg/L gemessen [36], aber für stehende Gewässer konnte kein spezifischer Wert recherchiert werden.

Neben dem Verständnis der Wirkmechanismen genannter Stressoren soll in dieser Arbeit gezeigt werden, ob eine Paarweise- und eine Dreifach-Interaktion von Stressoren durch die beschriebenen Modelle EA und SAM vorhergesagt werden kann. Für Mischungstoxizität wurde die Funktionalität von EA zwar bereits bewiesen, allerdings ist unbekannt ob Vorhersagen für Mehrfachinteraktionen von Umweltstressoren zusammen mit einem Schadstoff möglich sind. Derselbe Sachverhalt soll auch für SAM untersucht werden. Um diese Frage zu klären, wurden die Vorhersagen der Modelle mit den beobachteten Werten verglichen. Die Effekte wurden hinsichtlich Antagonismus, Additivität und Synergismus bestimmt. Die Begriffe sind in der Einleitung erklärt und essentiell für die Auswertung der Ergebnisse.

Für das Verständnis der Ergebnisse sind im folgenden Teil der experimentelle Aufbau sowie die Anwendung der Modelle und Durchführung der Modellierung beschrieben. Darauf folgen die Ergebnisse, die im Anschluss diskutiert werden. Die Masterarbeit endet mit den schlussfolgernden Aussagen und Hinweisen auf weiterführende notwendige Forschung auf diesem Themengebiet.

2 Material und Methoden

2.1 Modellorganismus *Daphnia magna*

Die für die Experimente verwendeten Individuen der Art *Daphnia magna* stammen von der Kultur, die am UFZ im Departement System-Ökotoxikologie gehältert wird. Die Kultur besteht aus fünf Altersklassen, d.h. es werden Daphnien von der ersten bis zur fünften Woche gehältert und das bei einer konstanten Temperatur von etwa 20 °C. In vier 2 L Bechergläsern sind von jeder Alterswoche jeweils 15 bis 25 adulte Daphnien im Glas. Das Medium (Aachener Daphnienmedium), in dem die Daphnien gehältert werden, wird wöchentlich zwei Mal gewechselt. Außerdem erfolgen täglich die Fütterung mit einer Futteralgensuspension (Art *Desmodesmus subspicatus*) und einmal wöchentlich zusätzlich eine Verabreichung von Nährstoffen in Form von gelöster Trockenhefe. Von allen Muttertieren werden täglich die Nachkommen, sprich Jungtiere mit einem Alter von < 24 h, abfiltriert, wovon ein Teil zur Erhaltung der Kultur dient und die Übrigen für Experimente genutzt werden.

Es liegen für die Kultur folgende Bedingungen vor:

- 20 °C ± 1 °C
- 16:8 h Tag:Nacht Rhythmus (größte Lebensdauer und Reproduktion; Generationszeit am kürzesten [15])
- normales Licht (entspricht rund 1400 lux [1])
- Haltung in Aachener Daphnienmedium (ADaM)
- Tägliche Fütterung mit Futteralgensuspension
- einmal wöchentliche Verabreichung von gelöster Trockenhefe

2.2 Herstellung der Medien und Lösungen

2.2.1 Vorbereitung der Futteralgensuspension

Die Futteralgensuspension dient als Futter für die Daphnien und wird ebenfalls frisch im Labor hergestellt. Es wird die Algenart „*Desmodesmus subspicatus*“ verwendet. Die Algenkultivierung erfolgt in einem Grimme und Boardmann – Wachstumsmedium [38], wobei von vorherigen gewachsenen Algensuspensionen ein Teil zum Animpfen für die neuen Algensuspensionen genutzt wird. In der Woche wachsen die Algen mit Belüftung (Kohlenstoffdioxid und Pressluft) über zwei Tage, über das Wochenende drei Tage. Die Suspension nimmt mit der Zeit eine dunkelgrüne Farbe an, was bedeutet, dass die Algen sich bereits ausreichend geteilt haben. Das Wachstum wird dann abgebrochen, sodass die Herstellung der fertigen Futteralgensuspension für die Daphnien erfolgen kann. Das Wachstumsmedium wird abzentrifugiert und die Algen bleiben in abgetrennten Pellets übrig. Das Wachstumsmedium darf nicht mit den Daphnien in Berührung kommen, weil es zu salzhaltig ist. Das Pellet wird in ADaM aufgenommen und auf eine Rührplatte gestellt. Nach zwei Stunden wird die Algensuspension in einem CASY-1-Gerät (von Schärfe System

GmbH, Reutlingen) gemessen. Es arbeitet mit einem Widerstandsprinzip aus der Partikelmesstechnik und kombiniert dieses Verfahren mit der Pulsflächenanalyse, die eine Methode der Signalauswertung darstellt. Von der Algensuspension werden das Teilchenvolumen und die Größe der Algenzelle gemessen. Das Teilchenvolumen pro Milliliter ist essentiell, um die Futtermenge zu errechnen, die einerseits für die verschiedenen Altersklassen der Daphnien in der Kultur und andererseits aber auch je nach verwendeten Futtermengen in den Experimenten variiert.

2.2.2 Das Aachener Daphnienmedium

Das Aachener Daphnienmedium (ADaM) wurde an der technischen Universität Aachen entwickelt und 1994 von Klüttgen B. et al. veröffentlicht. Es basiert auf deionisiertem Wasser, zu welchem synthetisches Meersalz, Calciumchlorid-Lösung, Natriumhydrogen-carbonat-Lösung und Selendioxid-Lösung hinzugegeben werden. ADaM wurde mit anderen Medien, die zur Hälterung und Kultivierung von Zooplankton geeignet sind, in einem Reproduktionstest mit *Daphnia magna* verglichen. In ADaM wurden für die Daphnien die besten Ergebnisse bezüglich Überleben und Reproduktion erzielt. Aufgrund der schnellen und simplen Herstellung wird es im Labor für die Daphnienkultur und Experimente verwendet.

Das Medium muss ausreichend mit Sauerstoff belüftet werden. Aus diesem Grund wurde es einen Tag vor Gebrauch angesetzt. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente erfolgte für jeden Mediumwechsel eine Vorbereitung von 20 L ADaM. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Mengen und Gehalte der Salze, die im ADaM enthalten sind.

Tabelle 1: ADaM-Salze nach Klüttgen et al. (1994)

Salz	Konzentration Stammlösung	Volumen auf 20 L	Endkonzentration in ADaM
Synthetisches Meersalz	Einwaage	6,666 g / 20 L	0,3333 g/L
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	294 g/L ; 2 mol/L	18,4 mL / 20 L	1,84 mmol/L
NaHCO ₃	84 g/L ; 1 mol/L	13,2 mL / 20 L	0,66 mmol/L
SeO ₂	7,2 mg/500 mL ; 0,13 mmol/L	2 mL / 20 L	0,013 µmol/L

Für die Herstellung wurden als erstes 6,666 g des Meersalzes in einem Becherglas (z.B. 300 mL) abgewogen. Da das Salz aufzulösen war, wurde es mit 150 mL deionisiertem Wasser aufgefüllt und mithilfe eines Rührfisches auf einer Rührplatte für 20 min gerührt. Die Drehzahl wurde auf 500-600 min⁻¹ eingestellt, um das Salz in der vorgegebenen Zeit optimal zu lösen.

Während sich das Salz löste, wurde der 20 L Behälter mit 19 L deionisiertem Wasser befüllt. Die dem Wasser hinzugefügten Mengen der drei Lösungen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Von

der SeO_2 -Lösung wurden 2 mL entnommen, sowie von der CaCl_2 -Lösung 18,4 mL und von der NaHCO_3 -Lösung 13,2 mL.

Nach 20 min Rührzeit war mit dem Magnetstab der Rührfisch zu entfernen und das in Wasser gelöste Salz in den Behälter zu geben. Der an einer Pumpe angeschlossene Belüftungsschlauch wurde zuletzt in den Behälter gehangen. Er reichte bis auf den Grund des Behälters, damit das Medium weiter durchmischt wird und die Belüftung optimal läuft. Zum Ende galt es, die Leitfähigkeit zu überprüfen und es ergab sich ein Wert von 1050-1100 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Das Medium hatte nach der Herstellung die folgenden Eigenschaften:

- $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
- 1050 – 1100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ Leitfähigkeit
- $\text{pH} \approx 7,5$
- 8,5 mg/L Sauerstoffgehalt (100% Sättigung)
- verschiedene Salzkonzentrationen wie in Tabelle 1 bereits angegeben

2.3 Durchführung der Experimente

Die nachstehenden Beschreibungen zu einem Experimentaufbau und dessen Ablauf gelten für alle Experimente, die für die vorliegende Arbeit durchgeführt wurden. Futter- und Esfenvalerat-Konzentrationen blieben jeweils unverändert, darüber hinaus wurden die Temperaturen 20 °C , 25 °C , 28 °C und 30 °C untersucht. Das ergab für spätere Auswertungen insgesamt 44 Kombinationen. Es wurden drei verschiedene Experimente durchgeführt und jedes davon einmal wiederholt. In allen Experimenten erfolgte der Ansatz der optimalen Temperatur von 20 °C und zusätzlich jeweils einer zweiten Temperatur mit gleicher Anzahl an Versuchstieren für die zu untersuchenden Stressorkombinationen. Der Tabelle 2 können die Kombinationen nochmals ausführlich entnommen werden.

Tabelle 2: Getestete Kombinationen aus Temperatur, Futtermenge und Esfenvalerat-Konzentrationen

Temperatur [°C]	Futter [%]	Insektizid Esfenvalerat			
		0 $\mu\text{g}/\text{L}$	0,03 $\mu\text{g}/\text{L}$	0,3 $\mu\text{g}/\text{L}$	3 $\mu\text{g}/\text{L}$
20	100	x	x	x	x
	10	x	x	x	x
	1	x	x	x	x
25	100	x	x	x	x
	1	x	x	x	x
28	100	x	x	x	x
	10	x	x	x	x
	1	x	x	x	x
30	100	x	x	x	x
	10	x	x	x	x
	1	x	x	x	x

Aus Tabelle 2 ist zu erkennen, dass durch das Kreuzdesign einige Replikate lediglich einem Stressor ausgesetzt werden, um die alleinige Wirkung zu testen, z.B. 1 % Futter und 20 °C mit 0 µg/L Esfenvalerat. Da im Zuge der ersten Experimente zu 20 °C und 25 °C genug Daten für die mit Esfenvalerat kontaminierten Daphnien bei 20 °C vorlagen, geschah für die Experimente zu 28 °C und 30 °C keine Kontamination der Versuchstiere bei 20 °C. In diesen Experimenten wurden bei 20 °C nur die drei Futterlevel ohne Kontamination als Kontrolle angesetzt, die immer als Vergleich dienen muss, ob es den Daphnien im Allgemeinen gut ging. Wenn es den Daphnien in der Kontrolle nicht gut ging, so muss ein Experiment verworfen werden, da die Untersuchungen nur mit gesunden Tieren erfolgen sollte.

Zwischen den verschiedenen Experimenten variierte die Anzahl der angesetzten Daphnien. Insgesamt wurden für ein Experiment aber nicht mehr als 240 Daphnien in Einzelhaltung, die nicht älter als 24 h waren, angesetzt. Mit Versuchsbeginn erfolgte eine Zuordnung der einzelnen Daphnien zu den einzelnen Stressorkombinationen. Bei dem Aufbau war folgendes zu beachten:

- jede Stressorkombination wurde mit 12 Replikaten getestet → Kombinationen aus Temperatur, Futtermengen und dem Insektizid Esfenvalerat
- es dienten in den ersten sieben Tagen des Experiments für jede Temperatur- Futter-Kombination zusätzlich zu den 12 Replikaten noch 6 Daphnien der Größenmessung

Ein Überblick zu den drei essentiellen Phasen eines Experiments ist in Abbildung 2 dargestellt.

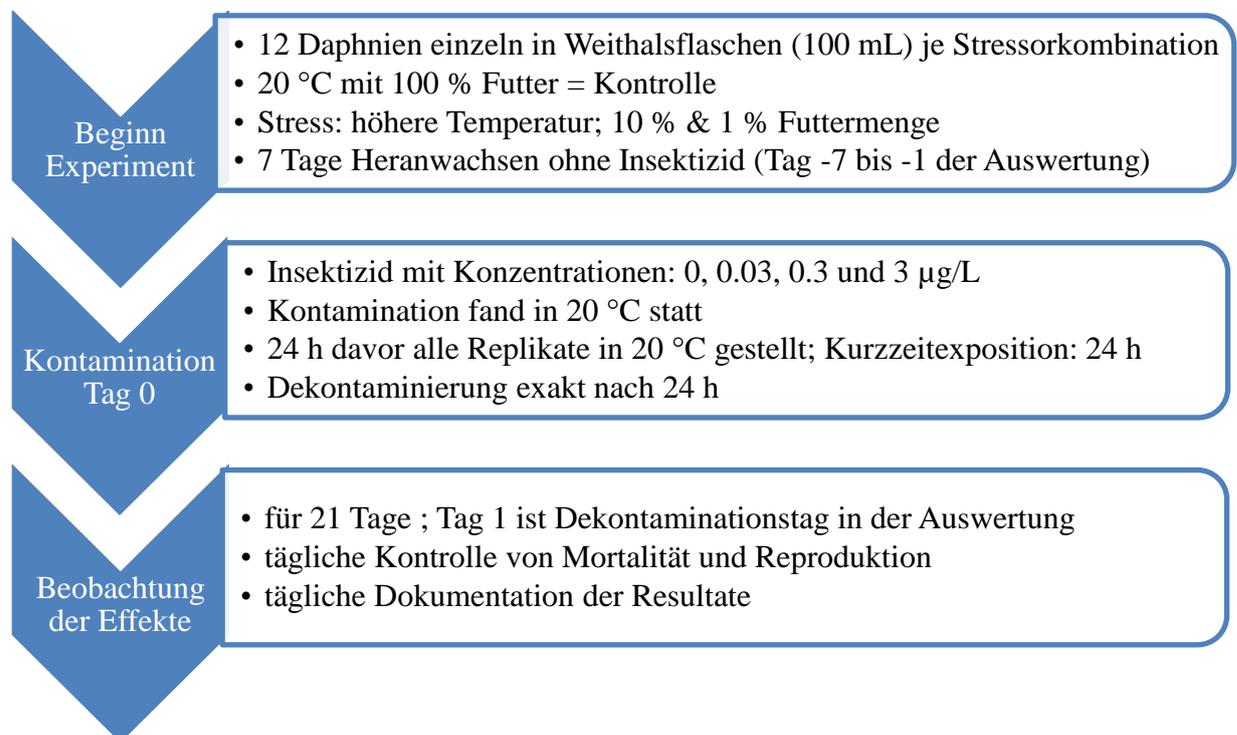


Abbildung 2: Ablauf eines Experiments im Überblick

Für den Start des Experiments wurden die Weithalsflaschen (100 mL) beschriftet, um die Kombinationen unterscheiden zu können, und anschließend mithilfe eines Dispensers (Fortuna Optifix Basic, 100 mL) mit 80 mL ADaM befüllt. Bevor die Daphnien in die Flaschen gegeben wurden, war es wichtig, das Futter zu berechnen und die entsprechenden Mengen in die Flaschen zu pipettieren, um eine Verletzung der Daphnien zu vermeiden. Die Berechnung der Menge stellte sicher, dass das Futter an die Größe der Daphnien angepasst wurde. Für die Futterberechnung waren Soll-Konzentrationen vorgegeben, die für die verschiedenen Altersklassen in der Tabelle 3 aufgeführt sind.

Tabelle 3: Soll-Futterkonzentrationen für verschiedene Daphnien-Altersklassen

Altersklasse	Montag & Mittwoch	Freitag
1. Woche	$1,0 \times 10^9 \text{ fL/mL}$	$1,5 \times 10^9 \text{ fL/mL}$
2. Woche	$2,3 \times 10^9 \text{ fL/mL}$	$3,5 \times 10^9 \text{ fL/mL}$
3. Woche	$2,7 \times 10^9 \text{ fL/mL}$	$4,1 \times 10^9 \text{ fL/mL}$

Mit folgender Formel 3 war die Futtermenge von 100 % zu berechnen:

$$\frac{\text{Soll - Konzentration} \left[\frac{\text{fL}}{\text{mL}} \right] * 1 \text{ mL}}{\text{Ist - Konzentration}_{\text{gemessen}} \left[\frac{\text{fL}}{\text{mL}} \right]} * 1000 = \text{Futtermenge} [\mu\text{L}]$$

Formel 3: Berechnung Futtermenge

Für den Beginn des Experiments wurde die Futterkonzentration der 1. Woche genommen. Beispielhaft ist eine Rechnung für die erste Woche gezeigt:

$$\frac{1,0 * 10^9 \text{ fL/mL} * 1 \text{ mL}}{4,903 * 10^9 \text{ fL/mL}} * 1000 = 203,956 \mu\text{L} \hat{=} 100 \% \text{ Futter}$$

Bei den anderen Futterlevels von 10 % und 1 % wurde entsprechend nur ein Teil der 100 %igen Menge pipettiert. Nach der Zugabe der errechneten Futtermengen, konnten die 24 h alten Daphnien aus einer weißen Keramischale einzeln in die Weithalsflaschen pipettiert werden. Abschließend waren die Gestelle mit den Flaschen in die jeweilige Temperaturkammer zu stellen, in der sie gehältert wurden. Die Weithalsflaschen wurden mit Papiertüchern abgedeckt, um Verunreinigungen vorzubeugen und das Licht zu dimmen (Vorbeugung der Phototaxis).

Nach dem Start eines Experiments folgten regelmäßig Mediumwechsel, Fütterung, Zugabe von Hefe, Kontrolle der Mortalität und Zählung der Nachkommen. Jeder Tag der Woche hatte immer exakt die gleichen Aufgaben, die in Tabelle 4 aufgelistet sind. Für den Wechsel des ADaMs und die damit einhergehende Fütterung erfolgten immer die Schritte, wie bereits

erläutert. Mortalität wurde dokumentiert, sobald keine Bewegungen einer Daphnie mehr zu beobachten waren. Im Falle des Zählens von Neonaten, dem Nachwuchs des Versuchs-/Muttertiers, waren diese immer aus der Weithalsflasche zu entnehmen. Die Anzahl wurde täglich bestimmt.

Tabelle 4: Laufende Aufgaben für die Dauer eines Experiments für jeden Wochentag

Wochentag	Aufgaben
Montag	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Kontrolle der Mortalität ✓ Neonaten zählen (wenn vorhanden) ✓ ADaM-Wechsel ✓ Fütterung
Dienstag	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Kontrolle der Mortalität ✓ Neonaten zählen ✓ Vorbereitung ADaM für Mittwoch
Mittwoch	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Kontrolle der Mortalität ✓ Neonaten zählen ✓ ADaM-Wechsel ✓ Fütterung
Donnerstag	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Kontrolle der Mortalität ✓ Neonaten zählen ✓ Vorbereitung ADaM für Freitag
Freitag	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Kontrolle der Mortalität ✓ Neonaten zählen ✓ ADaM-Wechsel ✓ Fütterung ✓ Zugabe von gelöster Trockenhefe (250 µL pro Flasche) ✓ Vorbereitung ADaM für Montag
Samstag	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Kontrolle der Mortalität ✓ Neonaten zählen
Sonntag	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Kontrolle der Mortalität ✓ Neonaten zählen

In den ersten sieben Tagen des Experiments sollten die Daphnien heranwachsen. Für die Kontaminierung wurden die Daphnien aus den höheren Temperaturen (> 20 °C) in 20 °C gestellt, weil für die Kontamination eine Umstellung auf die gleiche Temperatur erfolgte. Pyrethroide sind bei höheren Temperaturen weniger toxisch und dieser toxikologische Unterschied sollte vermieden werden. Am achten Tag wurde schließlich die Kontamination vollzogen. Diese lief folgendermaßen ab:

- 1) Stocklösung (SL) für die Konzentration von 3 µg/L herstellen → SL1
 - 2 mg des Feststoffes Esfenvalerat in ein Probenaufbewahrungsglas abwiegen
 - 10 mL Dimethylsulfoxid (DMSO) in das Probenaufbewahrungsglas zugeben (Lösungsvermittler)
 - für 30 min mit einem Rührfisch auf einer Rührplatte lösen bzw. mischen lassen

- 2) SL für die Konzentration von 0,3 µg/L herstellen → SL2
 - 3 mL von SL1 in ein Probenaufbewahrungsglas geben
 - 7 mL von DMSO zugeben
 - für 30 min mit einem Rührfisch auf einer Rührplatte lösen bzw. mischen lassen
- 3) SL für die Konzentration von 0,03 µg/L herstellen → SL3
 - 0,3 mL von SL1 in ein Probenaufbewahrungsglas geben
 - 9,7 mL von DMSO zugeben
 - für 30 min mit einem Rührfisch auf einer Rührplatte lösen bzw. mischen lassen

Die drei Stocklösungen waren nach dem Rühren fertig. Aus den drei Probenaufbewahrungsgläsern konnten nun die entsprechenden Mengen in ADaM pipettiert werden, um die drei verschiedenen Endkonzentrationen an Esfenvalerat zu erzielen. Das Vorgehen war folgendes:

- 3 Bechergläser mit einem Volumen von 2 L mit 2 L ADaM füllen
- Bechergläser wurden mit Aluminiumfolie abgedunkelt
- jedes gefülltes Becherglas enthielt einen ausreichend großen Rührfisch
- aus den Stocklösungen wurden die nachstehenden Mengen entnommen und in das Becherglas pipettiert
 - SL1: 30 µL in 2 L ADaM → 3µg/L Esfenvalerat
 - SL2: 10 µL in 2 L ADaM → 0,3 µg/L Esfenvalerat
 - SL3: 10 µL in 2 L ADaM → 0,03 µg/L Esfenvalerat
- Jede Lösung für 1 h rühren lassen

Waren die kontaminierten ADaM-Lösungen vollständig nach angegebener Rührzeit durchmischt, so wurden die Weithalsflaschen unter Berücksichtigung der jeweiligen Stressorkombinationen damit befüllt. Während der Kontamination wurden alle Weithalsflaschen mit 50 mL der jeweiligen Esfenvalerat-Konzentration befüllt, weil die hergestellten Mengen darauf abgestimmt waren, um die Chemikalien sparsam zu verwenden. Damit der Dispenser nicht kontaminiert wird, erfolgte das Befüllen mithilfe eines geeigneten Messzylinders. Die Daphnien wurden danach aus dem unkontaminierten ADaM in die vorbereiteten Pestizidkonzentrationen umgesetzt, um 24 h exponiert zu werden. Futter wurde während der Exposition mit Esfenvalerat nicht gegeben.

Am neunten Tag des Experiments erfolgte nach der 24 h-Exposition die Dekontamination. Dafür wurden wieder saubere Weithalsflaschen mit 80 mL frischem ADaM befüllt und die entsprechenden Futtermengen hinzugegeben. Die Prozedur ist die gleiche, wie sie ausführlich unter diesem Abschnitt anfangs beschrieben ist. Im Anschluss an die Dekontaminierung folgen 21 Tage der Beobachtung von Überleben und Anzahl der Nachkommen (Tabelle 4).

2.4 Analyse der Daten

2.4.1 Anwendung der Modelle EA und SAM

Das EA-Modell wurde zur Vorhersage der eintretenden Effekte unter der Anwendung der Formel 2 genutzt. Mithilfe der Einzel-Testungen kann das Modell Vorhersagen für Stressorkombinationen berechnen, die am Ende mit den beobachteten Effekten verglichen wurden.

Aufbauend auf der Arbeit von Liess et al. (2016) [21] wurde die Software „SAM-Calculator“ entwickelt, mit welcher die Effekte einer Kombination aus toxischem und Umweltstress für jeden einfach vorherzusagen sind. Die Software existiert zur Zeit in einer Beta-Version, jedoch kann sie bereits angewendet werden. Auf der Website des UFZ wird von dem Departement Systemökotoxikologie unter Effektmontoring der „SPEAR-Calculator“ zur Verfügung gestellt, worin auch das Tool für die SAM-Kalkulation zu finden ist. Im „SAM-Calculator“ (Version 072017) werden die verwendeten Konzentrationen der chemischen Substanz, das prozentuale Überleben zu einem spezifischen Zeitpunkt, das nach der Exposition zu beobachten war, sowie das prozentuale Überleben zum gleichen Zeitpunkt, das nach der Exposition plus dem Umweltstress zu beobachten war, eingetragen. Für diese Arbeit wurde eine zusätzliche Konzentration von 30 µg/L Esfenvalerat angenommen, bei der kein Individuum überlebt, damit die Effektmmodellierung bis auf Null realisiert werden kann. Als Ergebnisse werden die Vorhersagen von SAM, EA und CA ausgegeben und zugehörige Dosis-Wirkungskurven gezeichnet, die direkt miteinander verglichen werden können. Darin liegt der Vorteil der Software. Darüber hinaus werden die Werte für LC10 und LC50 für jede Dosis-Wirkungskurve mit angezeigt.

Eine erste Aussage zu einem Effekt wurde nach dem Vergleich der ausgegeben Dosis-Wirkungskurven getroffen. Für eine sichere Aussage wurden die LC50-Verhältnisse geprüft. Dazu wurden die Quotienten aus dem vorhergesagten Wert von EA und dem der Beobachtung gebildet, wie es in der Formel 4 nachzuvollziehen ist. Einerseits können dafür die LC50-Werte herangezogen werden, andererseits die Wahrscheinlichkeiten des Überlebens bzw. der Mortalität [29].

$$\frac{EA_{LC50}}{Beobachtung_{LC50}} = \text{Verhältnis oder} = \frac{EA_{\text{Überlebenswahrscheinlichkeit}}}{Beobachtung_{\text{Überlebenswahrscheinlichkeit}}}$$

Formel 4: Modellabweichungsverhältnis von der Beobachtung zu EA

Die Auswertung des Verhältnisses erfolgt nach Tabelle 5.

Tabelle 5: Auswertung der Verhältnisse nach Belden et al. (2007)

Modellabweichungsverhältnis	Effekt
< 0,5	Antagonistisch
0,5 ≤ Verhältnis ≤ 2	Additiv

> 2	Synergistisch
-----	---------------

Damit die Anwendung von SAM zur Vorhersage der Kombinationseffekte aus den drei Stressoren Temperatur, Futter und Esfenvalerat überprüft werden kann, wurde einerseits das Verhältnis aus dem LC50-Wert der Kontrolle zu dem des Stress-Wertes aus der Beobachtung gebildet. Andererseits wurde das Verhältnis aus dem LC50-Wert der Kontrolle zu dem vorhergesagten Wert einer Stressorkombination von SAM gebildet. Die zwei Verhältnisse (eins aus Beobachtungswert und eins aus SAM-Wert; Berechnung siehe Formel 5) wurden anschließend miteinander auf Ähnlichkeit verglichen.

$$\frac{LC50_{Kontrolle (Beobachtung)}}{LC50_{Stress (Beobachtung)}} (= oder < oder >) \frac{LC50_{Kontrolle (Beobachtung)}}{LC50_{Stress (SAM-Vorhersage)}}$$

Formel 5: Berechnung der Verhältnisse zum Vergleich von Beobachtung mit Vorhersage durch SAM

2.4.2 Modellierung der Ergebnisse mit R

Die Auswertung der Ergebnisse wurde teilweise auch mit der Software „R“ in der Version 3.3.3 vorgenommen [40]. Zusätzlich zu Standardfunktionen, wurde das Paket „drc“ mit seinen Funktionen zur Erstellung und Auswertung von Dosis-Wirkungsbeziehungen herangezogen [41]. Die Effekte der Umweltstressoren ohne Esfenvalerat wurden in R modelliert. Es wurde zusätzlich eine Temperatur von 35 °C in die Modellierung eingebunden, um die Dosis-Wirkungskurven bis auf den Endpunkt 0 % Überleben zu modellieren. Diese Annahme erfolgte in Anlehnung an Goss (1978), der nachwies, dass 35 °C für *D. magna* zum Überleben zu hoch sind [42].

Des Weiteren wurde zur Analyse der signifikanten Unterschiede in der Reproduktion ein dreifacher ANOVA-Test durchgeführt. Zunächst wurde überprüft, welche Stressoren die Reproduktion signifikant beeinflussen und auch, ob die Kombination der Stressoren (Temperatur, Futter, Esfenvalerat) signifikanten Einfluss hat. Waren die Ergebnisse für die einzelnen Stressoren signifikant, so wurde ein multipler T-Test angeschlossen, um zu analysieren, ob es z.B. zwischen den verschiedenen Futterlevels signifikante Unterschiede in der Wirkung auf die Reproduktion gibt.

2.4.3 Darstellung der Dosis-Wirkungskurven

Zunächst ist zu klären, welche Effekte von zwei Stressoren zusammen verursacht werden, um am Ende die Frage zu beantworten, ob sich diese Interaktionen ändern, sobald ein dritter Stress hinzu kommt. Unter dem Punkt 3.1 wird deshalb erst untersucht wie ein Stressor die Sensitivität von *D. magna* gegenüber einem zweiten Stressor, wie z.B. Esfenvalerat, verändert.

Im folgenden Ergebnis-Teil sind die Ergebnisse u.a. in Dosis-Wirkungskurven dargestellt (Abbildungen 3 bis 18). Abgesehen von den Diagrammen zum Umweltstress (Abbildung 3), wurden die Graphen, die die Esfenvaleratkonzentrationen auf der x-Achse abbilden, mit der

Software „SAM-Calculator“ erstellt (Abbildungen 4 bis 18). In diesen Fällen beschreibt die Kurve ‚Überleben TOX‘ das Überleben ohne Einfluss von Umweltstressoren und die Kurve ‚Überleben TOX+UMW‘ das Überleben mit Umweltstress. Eine Besonderheit besteht in den Diagrammen, welche die Effekte von Futter und Esfenvalerat zusammen zeigen (Abbildungen 7 bis 13), weil sich hier die Referenz immer ändert (Wie verändert Futterstress die Sensitivität gegenüber Esfenvalerat ungeachtet der im Hintergrund stehenden Temperatur?). Hier gilt als Referenz die Kombination von 100 % Futter mit der jeweils dargestellten Temperatur. Zum besseren Verständnis ist zu diesen Fällen in den Diagrammen vermerkt, welche Kombination der Kurve ‚Überleben TOX‘ entspricht.

3 Ergebnisse der Experimente

Für die Umweltstressoren wurden Mittel- und Langzeiteffekte ausgewertet, um zu zeigen, wann diese die höchsten Effekte erzielen. Die Auswertungen, die Esfenvalerat mit einbeziehen, beschränken sich auf den siebten Tag nach der Kontamination, da sich in allen Experimenten gezeigt hat, dass nach dem siebten Tag keine zusätzlichen Effekte mehr durch das Pestizid zu beobachten waren. Nach diesem Zeitraum sind die Individuen entweder bereits gestorben oder haben sich von der Pestizidexposition erholt. Die aufgetretenen Effekte wurden hinsichtlich Antagonismus, Additivität und Synergismus ausgewertet. Die Definition der Begriffe erfolgte bereits in der Einleitung im Zuge der Beschreibung der Modelle.

3.1 Interaktion von zwei Stressoren

3.1.1 Temperatur – Futter

Überleben

Die Kontrolle (20 °C, 100 % Futter und kein Pestizid) zeigte beim mittelfristigen Effekt kaum Mortalität (6 %) wie in Abbildung 3, Bild A zu sehen. Die Stressorkombinationen von verschiedenen Temperaturen und Futterlevel zeigten mit steigender Temperatur (20 °C bis 30 °C) zunehmende Mortalität. Die geringste Futterkonzentration von 1 % verursacht in der optimalen Temperatur (20 °C) höhere Mortalität als größere Futtermengen (Abbildung 3, Bild A). Den mittelfristigen Effekt betrachtend, wirken 10 % Futter additiv auf die Sensitivität gegenüber der Temperatur bei *D. magna*. Das beweisen zum einen die errechneten Verhältnisse, in Tabelle 6 dargestellt. Zum anderen ist in Abbildung 3, Bild A zu erkennen, dass das Überleben ähnlich dem ist, was Daphnien mit 100 % Futter zeigen (keine Mortalität durch 10 % Futter). Die letale Temperatur, bei der 50 % Mortalität eintritt, ist für 10 % Futter bei etwa 11 °C Abweichung von 20 °C nach 15 Tagen Lebensdauer abzulesen (Abbildung 3, Bild A), was auch dem Wert für die volle Futtermenge entspricht. 1 % Futter (bewirkt bei 20 °C 12,5 % Mortalität) verursacht mittelfristig einen additiven Effekt auf die Sensitivität gegenüber der Temperatur, jedoch wird der Effekt mit Temperaturen ab 28 °C synergistisch. Hier liegt die letale Temperatur für 50 % Mortalität bei rund 7,5 °C Abweichung von 20 °C.

Je länger die Individuen den Stressoren ausgesetzt waren, desto stärker wirkten diese (Vergleich in Abbildung 3 von Bild A und B). Die langfristigen Effekte zeigen den gleichen Trend, dass mit zunehmender Temperatur (20 °C bis 30 °C) die Mortalität steigt und der größte Futterstress diese Wirkung verstärkt (z.B. bewirkt 28 °C mit 100 % Futter eine Mortalität von 8,4 %, aber mit 1 % Futter 70,84 % Mortalität). Der Effekt von 10 % Futter mit Temperaturen bis 28 °C auf die Sensitivität bleibt additiv, jedoch wirken 10 % Futter mit 30 °C zusammen langfristig gesehen synergistisch, demnach auch bei Daphnien mit dem höchsten Futterstress. Außerdem verursachen auch 28 °C kombiniert mit 1 % Futter

langfristig (Daphnien sind 29 Tage alt) einen synergistischen Effekt (vergleiche Verhältnis in Tabelle 6). Es haben sich auch die letalen Temperaturen, bei denen 50 % der Individuen sterben, verschoben. Für 100 % Futter liegt der Wert nun bei 8 °C, für 10 % Futter bei 9,5 °C und für 1 % Futter bei 6,5 °C Abweichung von 20 °C, was der Abbildung 3 in Bild B entnommen werden kann. Eine Übersicht der Effekte gibt die folgende Tabelle 6. Dabei wird offensichtlich, dass die Interaktion zwischen Futter und Temperatur sich mit steigender Temperatur (> 20 °C) ändert.

Tabelle 6: Effekte durch Temperatur- und Futterstress
(Verhältnis-Berechnung nach Formel 4, Effekt-Bestimmung wie in Tabelle 5 erklärt)

Futter	Temperatur	Mittelfristig		Langfristig	
		Verhältnis	Effekt	Verhältnis	Effekt
10 %	28 °C	1	additiv	1,03	additiv
	30 °C	1,24		2,58	
1 %	25 °C	1,12	additiv	1,43	additiv
	28 °C	3,39	synergistisch	5,32	synergistisch
	30 °C	2,94		73	

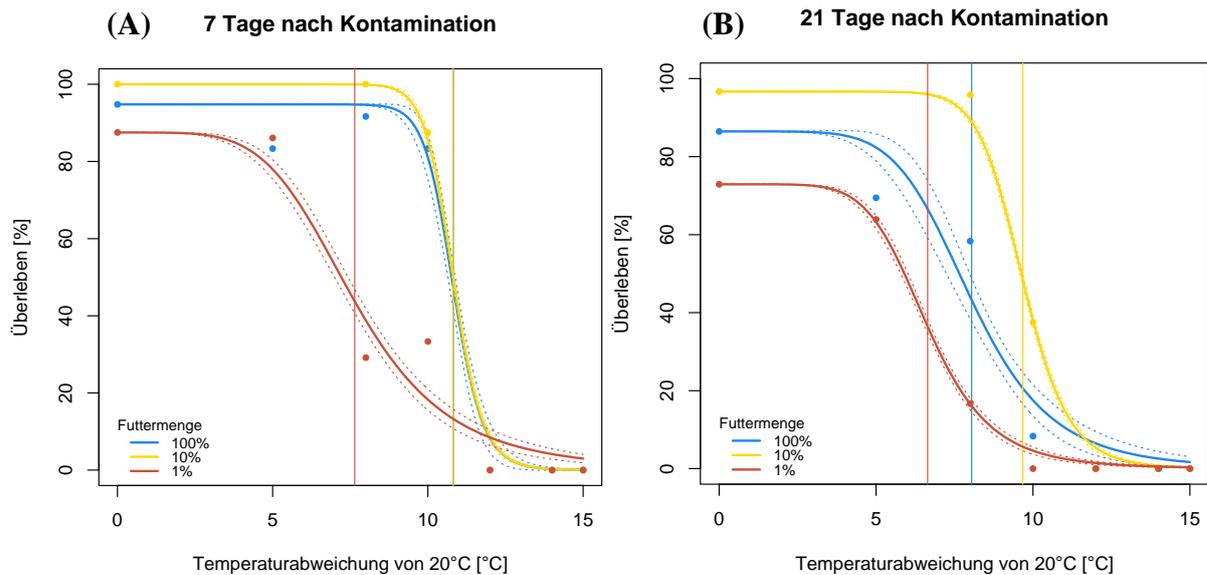


Abbildung 3: Mittel- und langfristige Effekte durch Temperatur- und Futterstress
(A: mittelfristiger Effekt; B: langfristiger Effekt; Punkte stellen die beobachteten Werte dar; Intervalle um die Kurven sind Konfidenzintervalle; Vertikale Linien zeigen die Temperaturabweichung bei der 50 % der Individuen starben; Fit der Kurven mit LL.3 nach Ritz (2007))

Reproduktion

Die Kontrolle (20 °C, 100 % Futter und kein Esfenvalerat) zeigte eine für gesunde Daphnien übliche Reproduktion. Es wurde die totale Anzahl der Nachkommen pro Tag betrachtet. Mit steigender Temperatur (20 °C bis 30 °C) sowie auch mit abnehmender Futtermenge (100 % bis 1 %) reproduzierten sich die Muttertiere weniger (z.B. in der zweiten Lebenswoche produzierten alle lebenden Muttertiere der Kontrolle im Durchschnitt 16 Nachkommen, aber Muttertiere bei 30 °C mit 1 % Futter produzierten keinen Nachwuchs). Mit Hilfe eines

ANOVA-Tests wurde überprüft, ab welcher Futtermenge und Temperatur die Stressoren einen signifikanten Einfluss auf die Reproduktion haben. Temperatur und Futter haben mittelfristig (zweite Lebenswoche der Daphnien) einzeln einen signifikanten Einfluss ($p < 0,002$; $R^2 = 0,29$) auf die Anzahl der Nachkommen pro Muttertier, wobei Futterstress erheblich mehr Einwirkung aufweist als Temperatur (Daten nicht gezeigt). Die Kombination von Temperatur- und Futterstress wirkt zu diesem Zeitpunkt ebenfalls signifikant auf die Reproduktion ($p < 0,004$; $R^2 = 0,29$). Die Anzahl der Nachkommen pro Muttertier nahm mit 10 % und mit 1 % Futter signifikant zur Futterkontrolle bei 20 °C ab (multipler T-Test, $p < 0,001$). Im Vergleich dazu konnte für keine Temperatur ein signifikanter Unterschied in der Anzahl an Nachkommen zur Kontrolle festgestellt werden (multipler T-Test, $p > 0,05$). Bei der Betrachtung des langfristigen Effekts (vierte Lebenswoche der Daphnien) besteht ebenfalls ein signifikanter Einfluss auf die Anzahl der Nachkommen (multipler T-Test, Temperatur und Futter mit $p < 0,001$; $R^2 = 0,43$). Verweis auf Anhänge 5 und 6.

3.1.2 Temperatur – Esfenvalerat

Überleben

Die Kontrolle (20 °C, 100 % Futter und kein Pestizid) wies beim mittelfristigen Effekt (sieben Tage nach Kontamination) kaum Mortalität (6 %) auf wie in Abbildung 4 bis 6 zu sehen. Die Wirkung von Temperatur ist wie im vorherigen Abschnitt geklärt. Esfenvalerat bewirkt mit zunehmender Konzentration eine Reduktion der überlebenden Individuen (siehe Abbildung 4 bis 6). Die höchste Konzentration von 3 µg/L ist am stärksten in ihrer Letalität (Mortalität zwischen 70 % und 100 %). Die LC50-Werte der Beobachtungen und Modelle sind in Tabelle 7 aufgelistet. Sie sind vergleichbar mit der Vorhersage von EA, wobei angenommen wird, dass sich der LC50-Wert unter Umweltstress im Vergleich zum Wert ohne Umweltstress nicht ändert. Der Effekt von Temperatur auf die Sensitivität gegenüber Esfenvalerat ist additiv (Tabelle 8).

Tabelle 7: LC50-Werte von Temperatur- und Esfenvaleratstress
(LC50-Wert auf Basis von Berechnung und Vorhersagen im SAM-Calculator ermittelt)

Temperatur	LC50 – Wert Beobachtung [µg/L]	LC50 – Wert EA [µg/L]	LC50 – Wert SAM [µg/L]
20 °C	0,8	0,8	0,8
25 °C	0,772	0,8	0,264
28 °C	1,008	0,8	0,408
30 °C	0,691	0,8	0,167

Tabelle 8: Effekte durch Temperatur- und Esfenvaleratstress
(Verhältnis-Berechnung nach Formel 4, Effekt-Bestimmung wie in Tabelle 5 erklärt)

Temperatur	Verhältnis	Effekt	Mortalität durch Temperatur
25 °C	1,036	Additiv	16,7 %
28 °C	0,793	Additiv	8,4 %
30 °C	1,157	Additiv	16,67 %

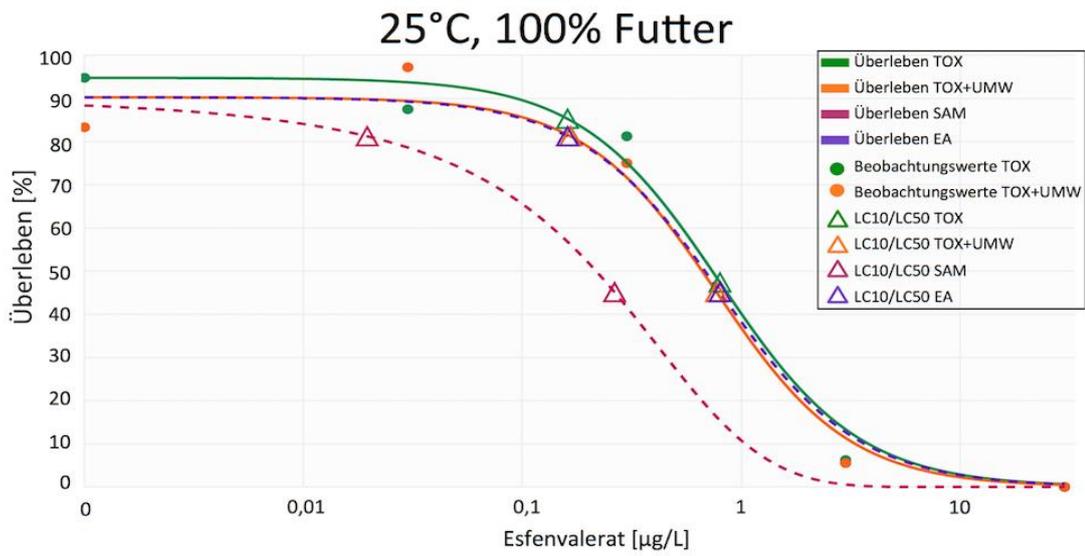


Abbildung 4: Dosis-Wirkungskurve des mittelfristigen Effekts bei 25 °C mit Esfenvalerat

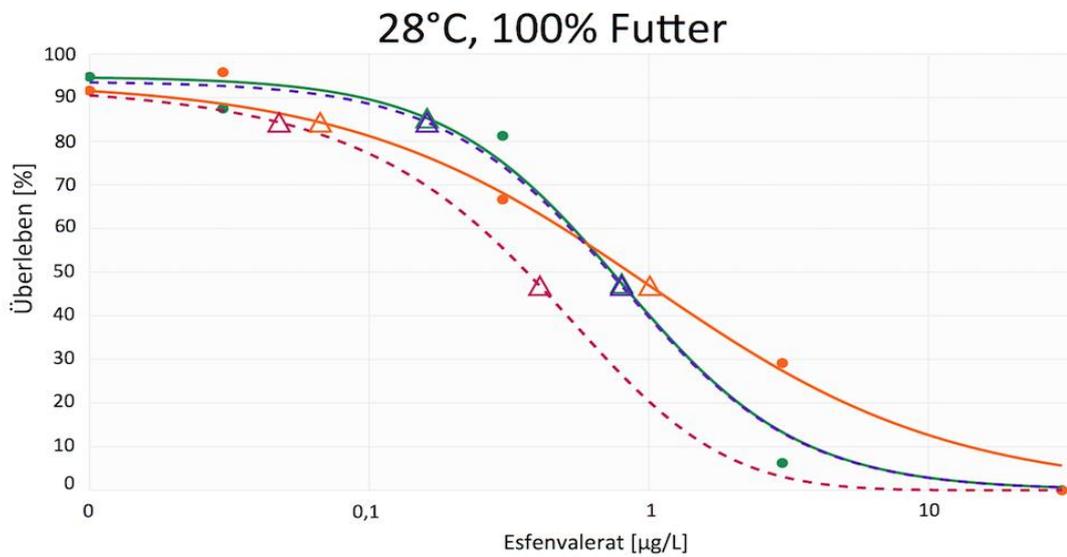


Abbildung 5: Dosis-Wirkungskurve des mittelfristigen Effekts bei 28 °C mit Esfenvalerat

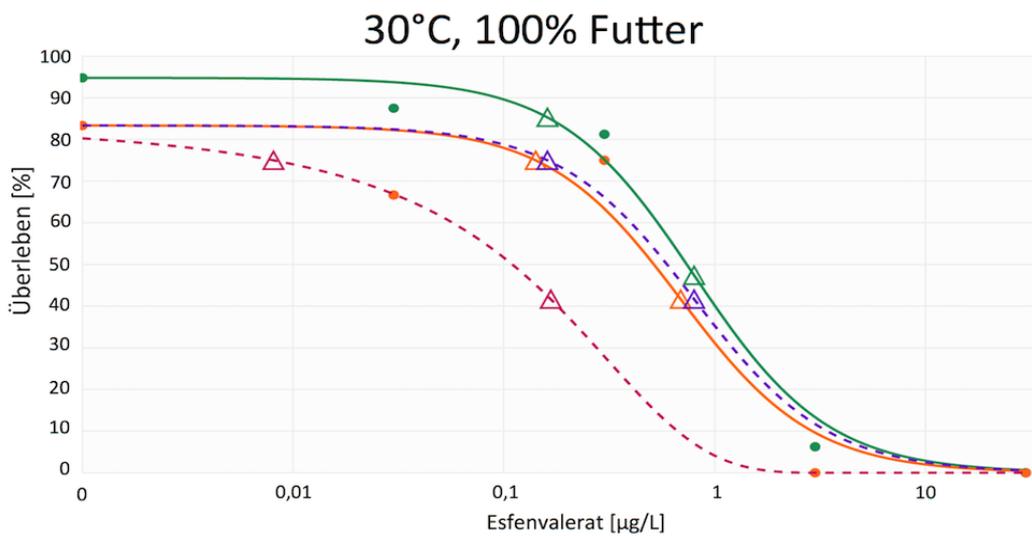


Abbildung 6: Dosis-Wirkungskurve des mittelfristigen Effekts bei 30 °C mit Esfenvalerat

Reproduktion

Die Kontrolle (20 °C, 100 % Futter und kein Esfenvalerat) wies für gesunde Daphnien übliche Reproduktion auf. Auch hier wurde die totale Anzahl der Nachkommen pro Tag betrachtet. Steigende Temperatur (20 °C bis 30 °C) bewirkt wie im vorigen Abschnitt erklärt eine Abnahme der Reproduktion (z.B. bei 20 °C im Durchschnitt 16 Nachkommen pro Muttertier und bei 30 °C im Durchschnitt 3 Nachkommen). *D. magna*, die mit Esfenvalerat exponiert wurden, zeigten jedoch oft in den Kombinationen der höheren Temperaturen mit Pestizid eine höhere Reproduktionsrate als die nicht kontaminierten Individuen (siehe Anhang 4). Ebenso wie die Umweltstressoren hat auch für Esfenvalerat der ANOVA-Test einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Nachkommen pro Muttertier ergeben ($p < 0,001$; $R^2 = 0,29$). Im statistischen Vergleich mithilfe des ANOVA-Tests von Temperatur und Esfenvalerat ergab sich, dass das Pestizid mehr Einfluss als die Temperatur hat (Daten nicht gezeigt). Die Kombination des Insektizids mit der Temperatur bewirkt allerdings keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Nachkommen pro Muttertier ($p > 0,05$; $R^2 = 0,29$), weil, wie bereits erwähnt, die kontaminierten Individuen in derselben Temperatur mehr Nachkommen produzierten als die nicht kontaminierten. Der multiple T – Test ergab für Esfenvalerat, dass die Konzentrationen (0,03 µg/L; 0,3 µg/L und 3 µg/L) nicht signifikant voneinander verschieden wirken ($p > 0,05$). Verweis auf Anhänge 4 bis 6.

3.1.3 Futter – Esfenvalerat

Überleben

Die Kontrolle (20 °C, 100 % Futter und kein Pestizid) wies beim mittelfristigen Effekt (sieben Tage nach Kontamination) kaum Mortalität (6 %) auf wie in Abbildung 7 und 8 zu sehen. Mit 10 % und 1 % Futter wurde die Sensitivität der Daphnien gegenüber Esfenvalerat erhöht (Abbildungen 7 und 8). Diese Effekte waren insbesondere mit 1 % Futter synergistisch (Tabelle 10). Es wurde außerdem ausgewertet, wie steigende Temperaturen (25 °C, 28 °C und 30 °C) die Interaktion zwischen Futterstress und Insektizid beeinflusst haben. Vor allem mit der geringsten Futtermenge von 1 % konnte beobachtet werden, dass erhöhte Temperatur die Sensitivität gegenüber Esfenvalerat nochmal verstärkt (siehe Abbildungen 9 bis 13). Bei den Abbildungen ist jeweils zu beachten, dass sich die Referenz ändert, aber in den Diagrammen ist vermerkt, welche Referenz in der TOX-Kurve (grün) dargestellt ist. Die LC50-Werte der einzelnen Stressorkombinationen sowie die vorhergesagten Werte der Modelle EA und SAM sind in der Tabelle 9 gezeigt.

Tabelle 9: LC50-Werte von Futter- und Esfenvaleratstress
(LC50-Wert auf Basis von Berechnung und Vorhersagen im SAM-Calculator ermittelt)

Temperatur	Futter	LC50 – Wert Beobachtung [µg/L]	LC50 – Wert EA [µg/L]	LC50 – Wert SAM [µg/L]
20 °C	10 %	1,067	0,8	0,739
	1 %	0,356	0,8	0,214

25 °C	1 %	0,236	0,772	0,236
28 °C	10 %	0,246	1,009	0,861
	1 %	0,110	1,009	0,002
30 °C	10 %	0,34	0,691	0,643
	1 %	0,053	0,691	0,026

Aus der Tabelle 9 kann entnommen werden, dass die Temperatur den Effekt verstärkt, weil die LC50-Werte für eine Futtermenge abnehmen je höher die Temperatur wird. 10 % Futter bei 20 °C verhält sich in etwa wie die Vorhersage von EA. Die Beobachtungen der anderen Stressorkombinationen von 20 °C und 1 % Futter bis 30 °C und 1 % Futter (siehe Tabelle 9) nähern sich den Werten von SAM an. Somit wirken 10 % Futter auf die Sensitivität gegenüber Esfenvalerat additiv, wenn 20 °C als Umgebungstemperatur vorliegen. In den höheren Temperaturen (> 20 °C) wirken 10 % Futter synergistisch auf die Sensitivität gegenüber dem Insektizid. 1 % Futter bewirkt ebenfalls einen synergistischen Effekt auf die Sensitivität. Die Effekte können anhand der Verhältnisse von dem LC50-Wert von EA zu dem der Beobachtung, aufgeführt in Tabelle 10, nachvollzogen werden.

Tabelle 10: Effekte durch Futter - und Esfenvaleratstress
(Verhältnis-Berechnung nach Formel 4, Effekt-Bestimmung wie in Tabelle 5 erklärt)

Temperatur	Futter	Verhältnisse	Effekt	Mortalität durch Umweltstress
20 °C	10 %	0,749	Additiv	0 %
	1 %	2,247	Synergistisch	12,5 %
25 °C	1 %	3,271		13,89 %
28 °C	10 %	4,101	Synergistisch	0 %
	1 %	9,172		70,84 %
30 °C	10 %	2,032	Synergistisch	12,5 %
	1 %	13,037	Synergistisch	66,66 %

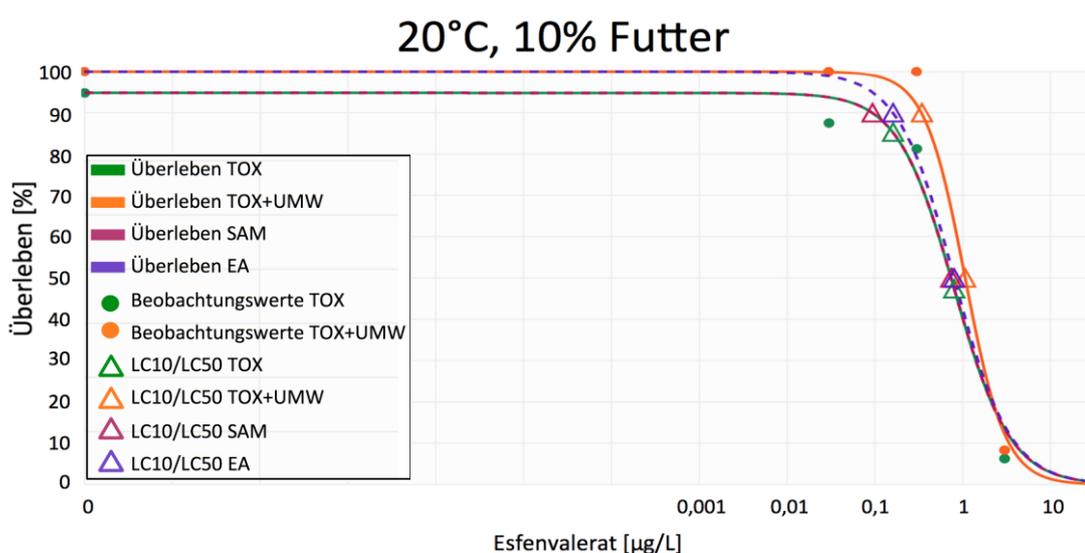


Abbildung 7: Dosis-Wirkungskurve (7d nach Kontamination) von 10 % Futter mit Esfenvalerat

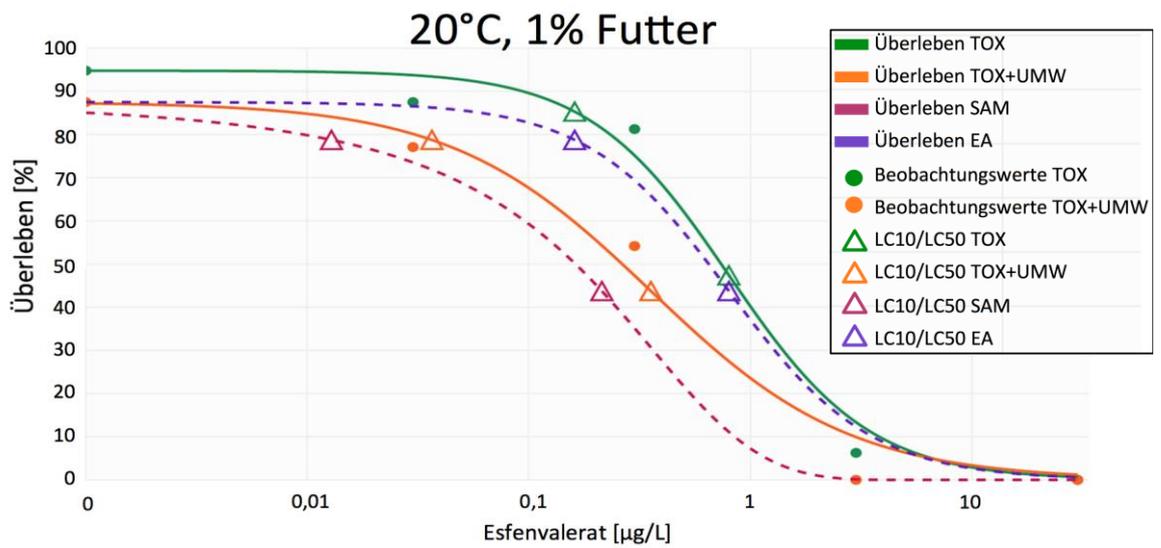


Abbildung 8: Dosis-Wirkungskurve (7d nach Kontamination) von 1 % Futter mit Esfenvalerat

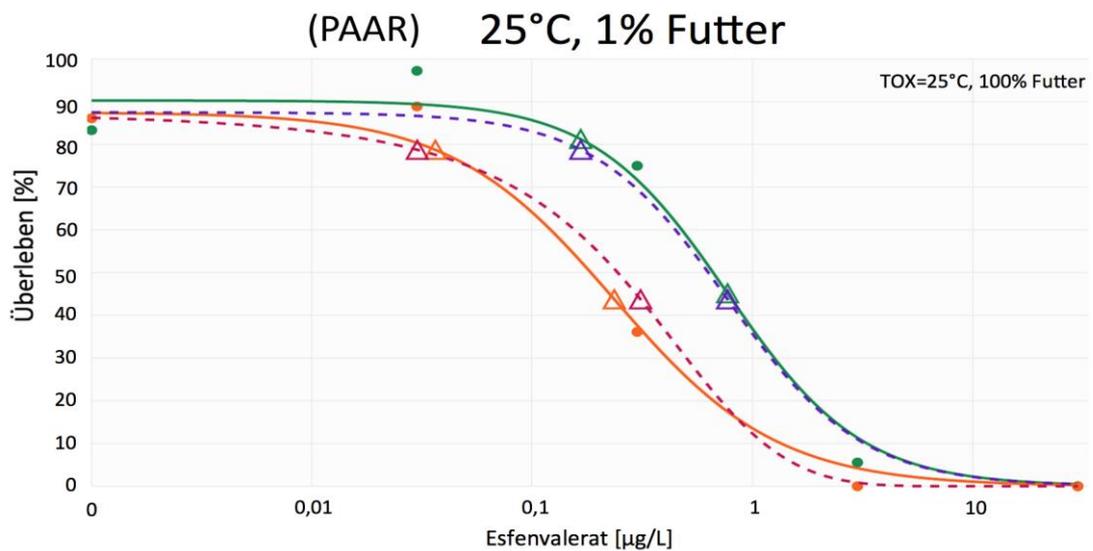


Abbildung 9: Dosis-Wirkungskurve (7d nach Kontamination) von 1 % Futter mit Esfenvalerat bei 25 °C

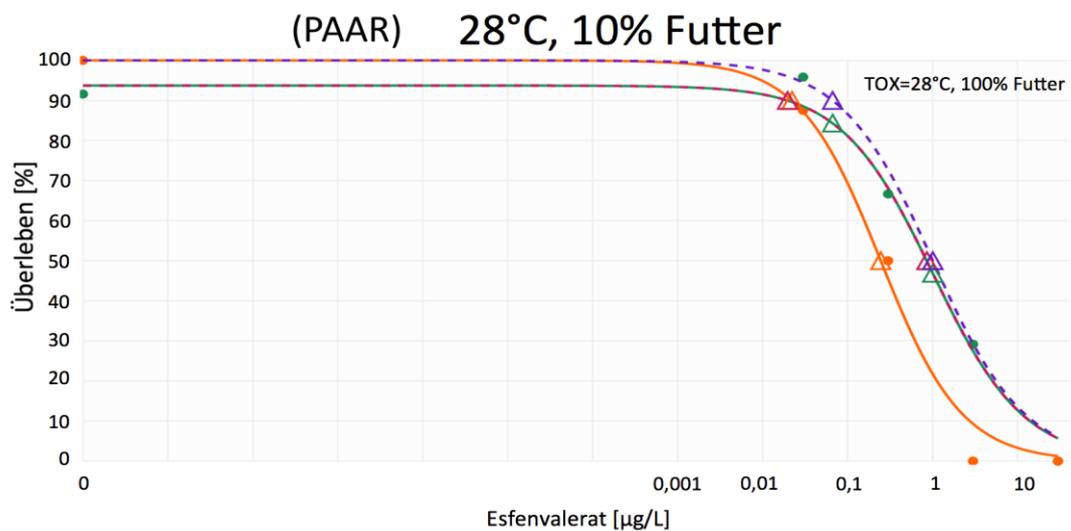


Abbildung 10: Dosis-Wirkungskurve (7d nach Kontamination) von 10 % Futter mit Esfenvalerat in 28 °C

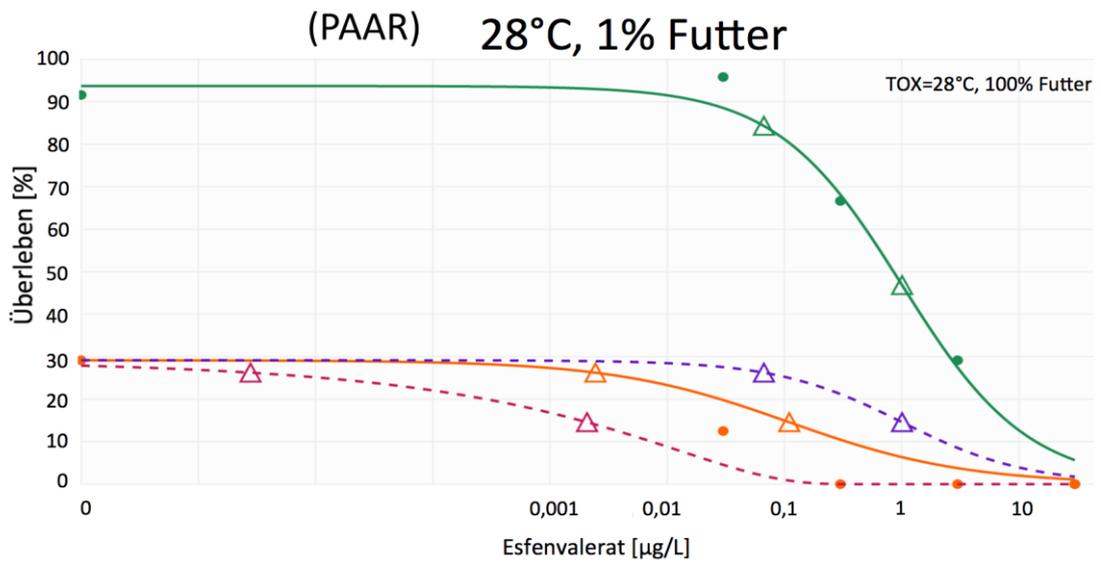


Abbildung 11: Dosis-Wirkungskurve (7d nach Kontamination) von 1 % Futter mit Esfenvalerat bei 28 °C

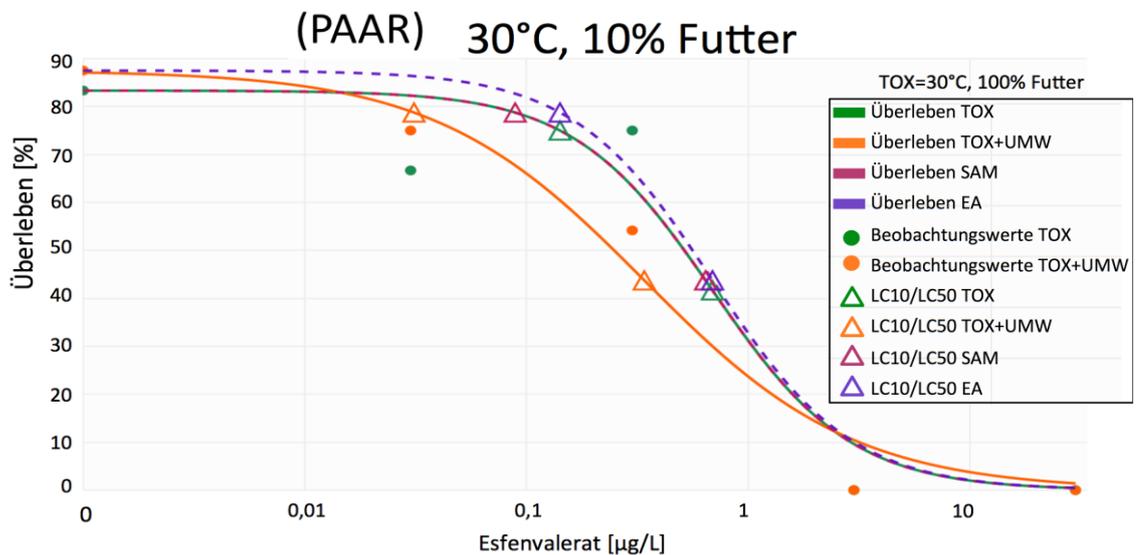


Abbildung 12: Dosis-Wirkungskurve (7d nach Kontamination) von 10 % Futter mit Esfenvalerat in 30 °C

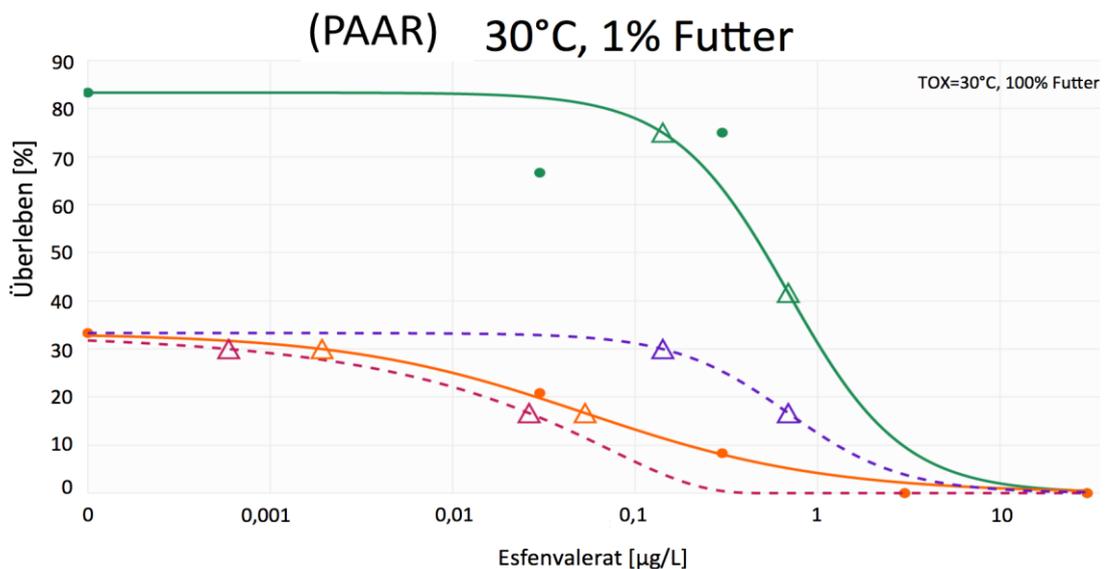


Abbildung 13: Dosis-Wirkungskurve (7d nach Kontamination) von 1 % Futter mit Esfenvalerat bei 30 °C

Reproduktion

Die Kontrolle (20 °C, 100 % Futter und kein Esfenvalerat) zeigte für gesunde Daphnien übliche Reproduktion. Als Endpunkt galt ebenfalls die totale Anzahl der Nachkommen pro Tag. Es wurde bereits erwähnt, dass der ANOVA-Test für Esfenvalerat und Futter einzeln einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Nachkommen ergab. Die Kombination der Stressoren Futter und Esfenvalerat wirkt sich ebenfalls signifikant aus ($p < 0,001$; $R^2 = 0,29$), weil Futter den größten Einfluss auf die Reproduktion hat (Daten nicht gezeigt). Verweis auf Anhänge 5 und 6.

3.2 Interaktion von drei Stressoren

Nun werden die Ergebnisse der Kombinationen aus den getesteten drei Stressoren gezeigt. Die nachfolgenden Diagramme mit Dosis-Wirkungskurven stellen im Prinzip die gleichen orangenen Kurven dar, wie die Abbildungen 9 bis 13, aber nun ist die Referenz gleich der Kontrolle (20 °C, 100 % Futter und kein Esfenvalerat) und damit ändern sich auch die Vorhersage-Werte der Modelle.

Überleben

Die Kontrolle (20 °C, 100 % Futter und kein Pestizid) wies beim mittelfristigen Effekt (sieben Tage nach Kontamination) kaum Mortalität (6 %) auf wie in Abbildung 14 bis 18 zu sehen und wie schon in den vorherigen Abschnitten öfters beschrieben. Die Betrachtung der dreifachen Interaktion zeigt wieder eine Abnahme des Überlebens mit steigender Esfenvalerat-Konzentration in allen gezeigten Kombinationen (Tabelle 11 und Abbildungen 14 bis 18). Außerdem wirken erhöhte Temperatur und Futterstress zusammen mit dem Insektizid synergistisch. Die Tabelle 11 führt die LC50-Werte auf, die für die Beobachtungen und die Modelle durch den „SAM-Calculator“ errechnet wurden.

Tabelle 11: LC50-Werte von Temperatur-, Futter- und Esfenvaleratstress

Temperatur	Futter	LC50 – Wert Beobachtung [$\mu\text{g/L}$]	LC50 – Wert EA [$\mu\text{g/L}$]	LC50 – Wert SAM [$\mu\text{g/L}$]
25 °C	1 %	0,263	0,8	0,214
28 °C	10 %	0,246	0,8	0,739
	1 %	0,11	0,8	0,02
30 °C	10 %	0,34	0,8	0,214
	1 %	0,053	0,8	0,024

Aufgrund der Näherung von den Beobachtungen zu SAM wirken alle Kombinationen synergistisch, was auch durch die Verhältnisse, gezeigt in Tabelle 12, bewiesen wird. Die höchsten Synergismen lassen sich in den Kombinationen 28 °C und 30 °C mit 1 % Futter und Esfenvalerat beobachten, denn wenn der Stress durch beide Umweltstressoren zunimmt, dann nimmt auch die Abweichung von EA zu. Es steigt außerdem die Sensitivität gegenüber der toxischen Substanz um einen bestimmten Faktor an (z.B. der Umweltstress durch 30 °C und

1 % Futter steigert die Sensitivität um den Faktor von etwa 15; vergleiche Tabelle 12 oder auch Anhang 7).

Tabelle 12: Effekte von Temperatur -, Futter - und Esfenvaleratstress
(Verhältnis-Berechnung nach Formel 4, Effekt-Bestimmung wie in Tabelle 5 erklärt)

Temperatur	Futter	Verhältnisse	Effekt	Mortalität durch Umweltstress
25 °C	1 %	3,041	Synergistisch	13,89 %
28 °C	10 %	3,252		0 %
30 °C	1 %	7,272	Synergistisch	70,84 %
	10 %	2,353	Synergistisch	12,5 %
	1 %	15,094	Synergistisch	66,66 %

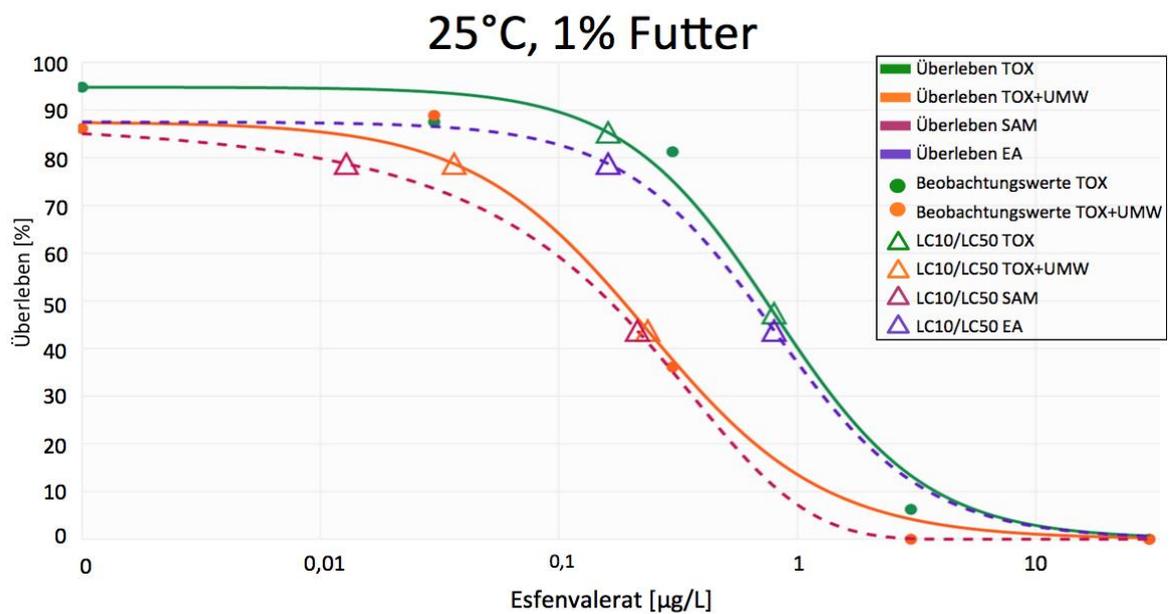


Abbildung 14: Dosis-Wirkungskurve für 25 °C, 1 % Futter und Esfenvalerat mit Modellvorhersagen

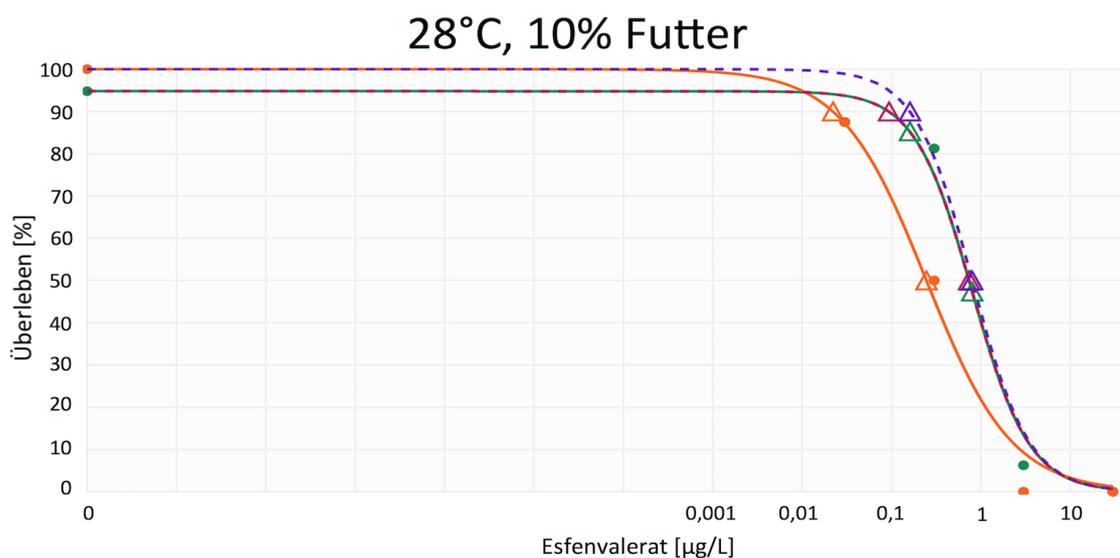


Abbildung 15: Dosis-Wirkungskurve für 28 °C, 10 % Futter und Esfenvalerat mit Modellvorhersagen

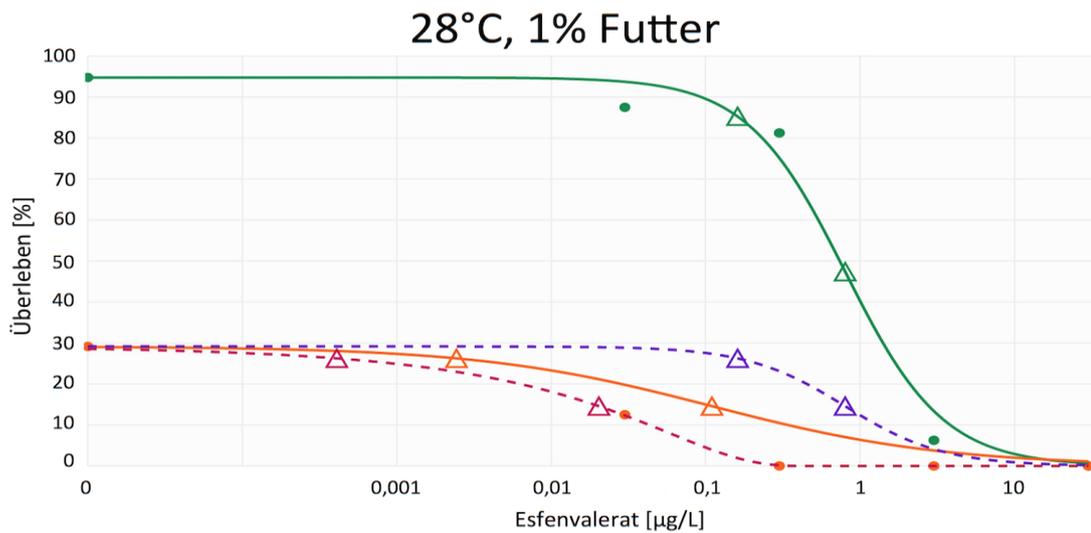


Abbildung 16: Dosis-Wirkungskurve für 28 °C, 1 % Futter und Esfenvalerat mit Modellvorhersagen

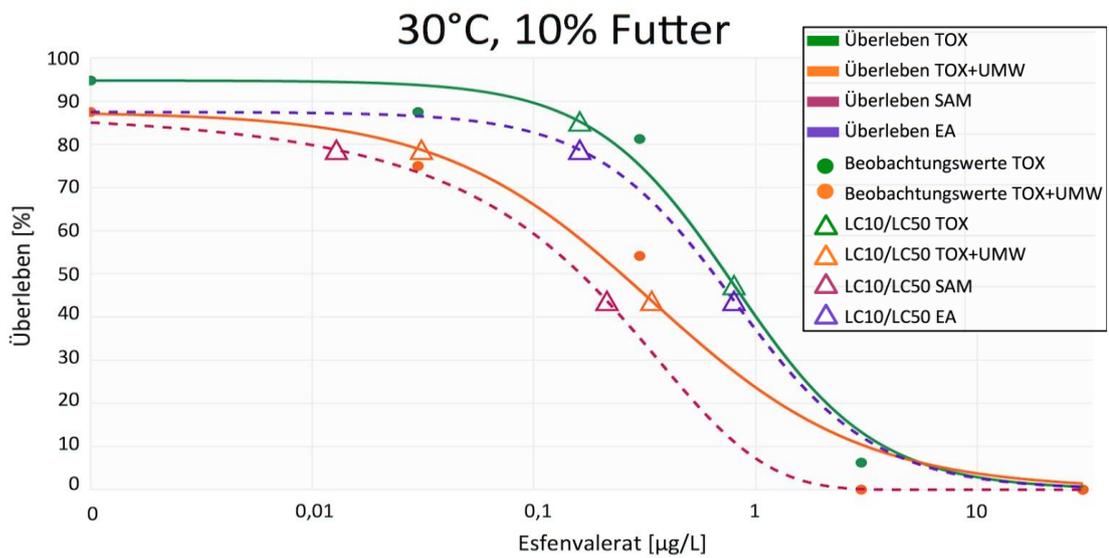


Abbildung 17: Dosis-Wirkungskurve für 30 °C, 10 % Futter und Esfenvalerat mit Modellvorhersagen

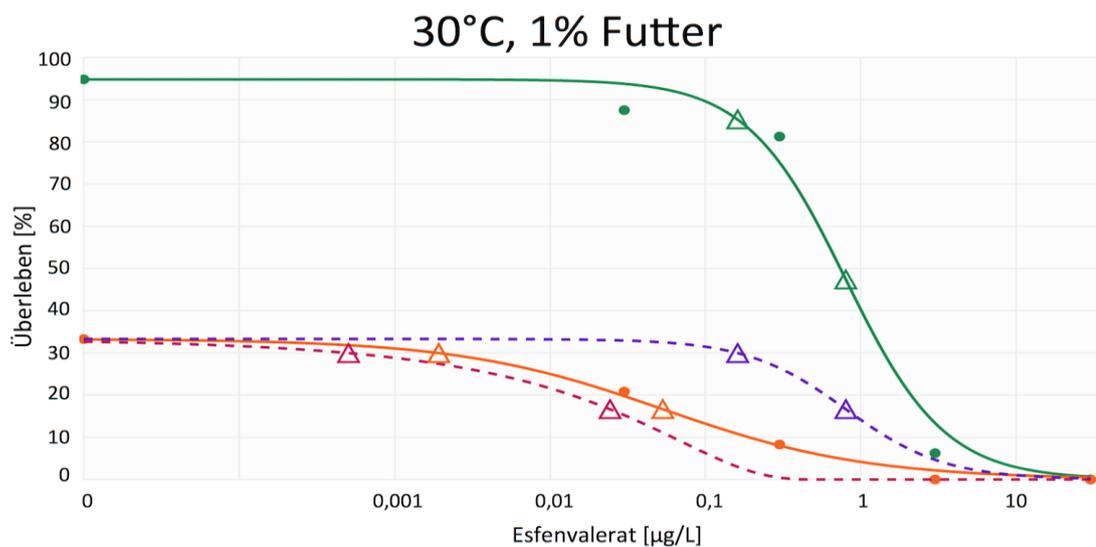


Abbildung 18: Dosis-Wirkungskurve für 30 °C, 1 % Futter und Esfenvalerat mit Modellvorhersagen

Reproduktion

Wie die einzelnen Stressoren sich auf die Reproduktion auswirken, wurde bereits erläutert. Für die Interaktion aller Stressoren wurde erneut die Anzahl der Nachkommen pro Muttertier in den ersten sieben Tagen nach der Kontamination ausgewertet. Dafür kam erneut der ANOVA-Test in der Software „R“ zur Anwendung. Es ergab sich, dass der Einfluss der Kombination aus Temperatur-, Futter- und Esfenvaleratstress nicht signifikant ist ($p > 0,05$; $R^2 = 0,29$). Verweis auf Anhänge 5 und 6.

Vorhersage der Wirkung von 3 Stressoren

Das Stressadditionsmodell kann die Wirkung von drei Stressoren, im Speziellen zwei Umweltstressoren und ein Pestizid, vorhersagen. Die Berechnung der in Abbildung 19 dargestellten Verhältnisse zum Vergleich der Beobachtung mit der Vorhersage durch SAM wurde mit Formel 5 (erklärt unter Punkt 2.4.1) durchgeführt. Die Annäherung der linearen Regression an die Winkelhalbierende, an der die Vorhersage gleich der Beobachtung entspricht, beweist, dass SAM zur Quantifizierung des Synergismus geeignet ist. Im Detail ergab die lineare Regression, dass die Vorhersagen von SAM signifikant sind ($p < 0,01$; $R^2 = 0,6243$).

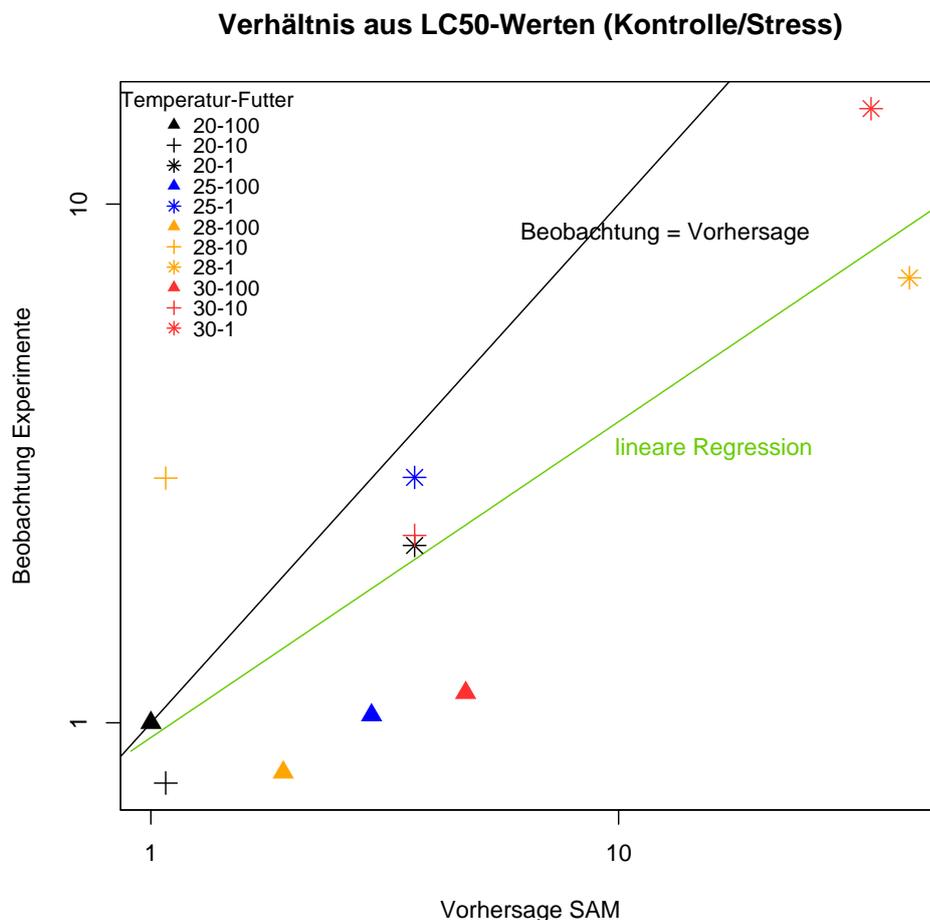


Abbildung 19: Vorhersage-Genauigkeit von SAM in Bezug zu LC50-Werten

4 Diskussion der Ergebnisse

4.1 Hoher Futterstress wirkt synergistisch mit Temperaturstress

Hoher Futterstress wirkt mittelfristig synergistisch in Kombination mit Temperatur, da es die Sensitivität gegenüber Temperatur stark erhöht (Faktor 3). Der langfristige Kombinationseffekt von Temperatur- und Futterstress ist additiv bis synergistisch und hier wird die durch hohen Futterstress erhöhte Sensitivität gegenüber Temperatur noch deutlicher (bis Faktor 73). In der optimalen Temperatur von 20 °C können die Individuen hohen Futterstress noch über die Reproduktion kompensieren und dadurch ähnliche Lebensdauer erreichen wie Daphnien ohne Futterstress. Im Gegensatz dazu tritt bei gleicher Futtermenge aber steigender Temperatur zunehmend und auch früher in der Lebensgeschichte von Daphnien Mortalität ein (siehe Anhänge 1 bis 3). Die hier untersuchten Temperaturen wirken letal bei einer Temperatur ab 28 °C, wie es auch von Heugens et al. (2003) in einer Studie zu temperaturabhängigen Cadmium-Effekten gezeigt wurde.

Futter und Temperatur sind als Stressoren bereits oft in Studien untersucht worden, allerdings wurde selten ein Kombinationseffekt in Form von Additivität oder Synergismus bestimmt. Stattdessen wurde ausführlich beschrieben, inwiefern Futterstress oder auch nicht optimale Temperaturen (entweder unter oder über 20 °C) sich auf das Überleben, das Größenwachstum und die Reproduktionsparameter auswirken. Dabei wurden vor allem ANOVA-Tests angestellt, um signifikante Einflüsse der Stressoren Temperatur und Futter auf genannte Parameter zu analysieren [1,15,24]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde lediglich eine Studie gefunden, die beschreibt, dass Temperatur- und Futterstress einen synergistischen Effekt (Definition bzw. Nullmodell zu diesem Effekt nicht in Studie beschrieben) auf Reproduktionsparameter von *Daphnia parvula* haben [22]. Orcutt und Porter (1984) untersuchten drei Temperaturen und drei Futterlevel auf ihre Auswirkungen auf das Leben genannter Spezies. Die Autoren beobachteten, dass erhöhte Temperaturen bei begrenztem Nahrungsangebot signifikant synergistisch das Überleben und die Reproduktion der Individuen beeinflussen. Das Ergebnis des synergistischen Effekts auf das Überleben konnte durch die Experimente dieser Masterarbeit bestätigt werden.

Hinsichtlich anderer Endpunkte, wie z.B. Energiegehalt und Metabolismus haben einige andere Studien die Einflüsse von Temperatur und Futter auf *D. magna* untersucht. Sie können zur Erklärung des zahlreichen Überlebens der Daphnien mit 100 % und 10 % Futter in den getesteten Temperaturen größer als 20 °C beitragen. Burns (1969) testete den Einfluss von drei Temperaturen (15 °C, 20 °C, 25 °C) auf die Filtrationsrate von *D. magna* und fand heraus, dass diese mit steigender Temperatur zunimmt. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam Filho et al. (2011), die wiederum denselben Organismus auf seinen Energiegehalt bei Temperaturen zwischen 16 °C und 26 °C bei mehreren Futterkonzentrationen untersuchten, wobei der Zucker-, Protein- und Lipidgehalt gemessen wurde. Filho et al. (2011)

schlussfolgert, dass dadurch die Energiereserven mit genügendem Futterangebot bei höheren Temperaturen größer sind. Im Gegensatz dazu sind die Energiereserven bei hohem Futterstress nicht mehr ausreichend, um alle Prozesse aufrechtzuhalten. Da die konstante Filtration und Verdauung von Futter bereits zu hohem Energieverbrauch führen [23], werden folglich Prozesse wie Reproduktion und individuelles Wachstum stark reduziert [1,23]. Daher ist für die Ergebnisse dieser Arbeit für den höchsten Futterstress zu vermuten, dass mit 1 % Futter die Reserven über die Reproduktion nicht mehr kompensiert werden konnten und deswegen dann auch Futterstress allein letal gewirkt hat.

Ein weiterer zu berücksichtigender Aspekt ist ein aktiverer Metabolismus bei steigender Temperatur [6,7,35]. Es ist bekannt, dass ein höherer Metabolismus mehr Energie von einem Individuum abverlangt [7]. Heugens et al. (2006) erläutert, dass mit zu niedrigem Nahrungsangebot dieser Energiebedarf nicht mehr vollständig gedeckt werden kann. Dadurch müssen Daphnien ihre Energiereserven ausschöpfen, was letztendlich zum Tod führt. Die Ergebnisse zum Überleben über die Zeit der Kombinationen 28 °C mit 1 % Futter und 30 °C mit 1 % Futter (siehe Anhang 2 und 3) machen deutlich, dass vermutlich eben beschriebene Zusammenhänge zur vollständigen Ausschöpfung der Energiereserven bei den in hohem Maße futtergestressten Daphnien bei 28 °C und 30 °C eingetreten sind. Der gleiche Effekt wurde auch für den Endpunkt Reproduktion beobachtet, da bei Temperaturen von 28 °C und 30 °C höher signifikante Effekte auf die Reproduktion (Anzahl der Nachkommen pro lebendes Muttertier) beobachtet wurden. Die Beobachtungen bestätigen Ergebnisse aus vorangegangenen Arbeiten, wie z.B. von Korpelainen (1986) oder Orcutt und Porter (1984). Des Weiteren konnte durch Orcutt und Porter (1984) der signifikante Einfluss des Futters auf die Reproduktion erkannt werden. Sie stellten zusätzlich einen signifikanten Einfluss der Interaktion von Futter und Temperatur heraus [22], was aus den Experimenten der vorliegenden Arbeit ebenso resultierte. Auf der einen Seite konnte durch diese Arbeit bestätigt werden, dass Reproduktion durch Futter- und Temperaturstress signifikant beeinflusst wird. Andererseits konnte zu diesen Umweltstressoren als neuer Aspekt herausgestellt werden, dass ihre Interaktion einen additiven bis synergistischen Effekt hat, je nachdem welche Intensitäten Temperatur- und Futterstress aufweisen. Der additive Effekt kann durch das Modell EA nach Bliss (1939) vorhergesagt werden.

4.2 Esfenvalerat wirkt mit Futterstress synergistisch, mit Temperaturstress additiv

Die Ergebnisse zur Änderung der Sensitivität durch Umweltstress gegenüber dem Insektizid Esfenvalerat der hier vorliegenden Masterarbeit bestätigen vorangegangene Arbeiten (z.B. Liess et al. (2016)), dass Esfenvalerat kombiniert mit Futterstress synergistisch wirkt, aber kombiniert mit Temperaturstress wirkt es additiv. Im Falle der höheren Temperaturen belegen die hier vorgestellten Ergebnisse eine Steigerung der Toxizität von Esfenvalerat und somit eine sensitivere Reaktion von *D. magna* auf die Exposition, wenn das Überleben als Endpunkt

gilt. Zu einem ähnlichen Ergebnis sind auch Koh et al. (1997) und Heugens et al. (2001, 2006) gekommen, die verschiedene Chemikalien wie Pestizide und Schwermetalle auf ihre temperaturabhängigen Effekte untersuchten [16,5,7]. Doch auch wenn erhöhte Temperatur die Toxizität von Giften für Makroinvertebraten nachweislich steigern kann, ist dieser Einfluss zu vernachlässigen [5], weil die hier vorgestellten Ergebnisse lediglich einen additiven Effekt von Temperatur auf die Sensitivität gegenüber von Esfenvalerat belegen. Jackson et al. (2016) zeigten mit einem überwiegend antagonistisch festgestellten Effekt von Wärme in Kombination mit einem zweiten Stressor, dass die Aussage von Heugens et al. (2001) zur Vernachlässigung des Temperatureinflusses gerechtfertigt ist. Im Vergleich zur Temperatur, welche höchstens einen additiven Effekt auf das Überleben bewirkt, konnte für Futter- und Pestizidstress eine synergistische Interaktion festgestellt werden, d.h. dass der Stressor Futter keineswegs zu vernachlässigen ist.

Viele Studien kamen zu dem Ergebnis, dass futtergestresste Daphnien viel sensitiver auf Chemikalien reagieren als wenn sie ausreichendes Nahrungsangebot vorfinden würden [1,5,8,35], wobei bisher allerdings keine faktorielle Verstärkung der Sensitivität bestimmt wurde. Im Besonderen bei größeren Konzentrationen ($\mu\text{g/L}$ - bis mg/L -Bereich) der Chemikalien tritt verstärkt Mortalität ein. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ebenfalls, dass bei der höchsten Konzentration von $3 \mu\text{g/L}$ Esfenvalerat fast alle Daphnien in den ersten sieben Tagen nach der Kurzzeitexposition starben. Es konnte auch während der Experimente beobachtet werden, wie die stark kontaminierten Organismen sehr schnell ihre Mobilität verloren hatten. Die Beobachtungen bestätigen die in der Einleitung bereits erläuterten Wirkmechanismen, dass Esfenvalerat die Natriumkanäle von *D. magna* blockiert, was in einer Lähmung der Individuen resultiert [1,5,8,35]. Dadurch sind Filtration und die Aufnahme von Futter reduziert, was die Energiereserven ebenfalls reduziert und dadurch Entgiftungsprozesse nicht vollständig ausgeführt werden können [35]. Deshalb wirkt die hohe Konzentration von Esfenvalerat mit Futterstress kurz nach der Exposition schon letal auf *D. magna*, weil die beiden Stressoren sich in ihrer Wirkung verstärken.

Futterstress wirkt zusammen mit Esfenvalerat immer synergistisch, gleich ob Temperatur als zusätzlicher Stress präsent ist oder nicht. Futterstress erhöht demnach die Sensitivität der Individuen um ein Vielfaches mehr als Temperatur. Da Temperatur dennoch die Sensitivität der Daphnien gegenüber Esfenvalerat geringfügig verstärkt, sind noch größere Effekte in den Kombinationen der drei Stressoren zu beobachten. Das beweist ein Vergleich der Verhältnisse, die angeben, um welchen Faktor sich die Sensitivität der Daphnien gegenüber dem Stress verstärkt. So ist z.B. der Faktor der Kombination aus $30 \text{ }^\circ\text{C}$ mit Esfenvalerat ohne Futterstress gleich 1,157, aber mit hohem Futterstress (nur 1 % Futter) gleich 15. Das unterstreicht nochmal die Aussage von Heugens et al (2001), dass Futter ein Schlüsselparameter in der Bestimmung der Toxizität von Schadstoffen ist.

Der Endpunkt Überleben zeigt jedoch auch bei geringeren Konzentrationen an Esfenvalerat, dass überlebende Individuen sich nach ein paar Tagen wieder erholen können. Dieser Sachverhalt erklärt u.a., warum in den vorliegenden Experimenten die höchsten Kombinationseffekte kurz nach der Exposition detektiert wurden. Eine Erholung war allerdings nicht immer möglich. Deren Erfolg ist einerseits von dem anwesenden Stress abhängig und ob die Individuen genügend Kapazitäten besitzen, diesen zu verkraften. Andererseits kommt es auch darauf an, wie Daphnien ihre Energiereserven einteilen [1,8]. Die Beobachtungen der besonders gestressten Daphnien (Stress durch erhöhte Temperatur (ab 28 °C), Futtermangel (10 % und 1 % Futter) und Esfenvalerat) zeigten, dass nur jene Daphnien bis zum Ende des Experiments erfolgreich überleben konnten, die die Reproduktion fast vollständig einstellten. Besonders hoher Futterstress reduzierte die Reproduktion bis auf Null (siehe Anhang 4). Wurde die Reproduktion nach der Kurzzeitexposition von Daphnien mit 100 % Futter in 28 °C und 30 °C nicht eingestellt, so starben die Individuen kurz nach der Reproduktion. Aus den Beobachtungen heraus ist zu vermuten, dass Reproduktion die letzten Energiereserven in Anspruch nehmen kann, aber auch, dass Daphnien ihr Überleben über die Reproduktion kompensieren können. Ähnliche Ergebnisse zeigt eine Studie, in der *D. magna* einer Exposition mit Cadmium und zusätzlichem Futterstress ausgesetzt wurde [8]. Smolders et al. (2005) beschreiben eine Veränderung der Lebensgestaltung bei dieser Spezies, indem diese nach einer Exposition entweder überlebt oder sich reproduziert aber anschließend stirbt. Daher schlussfolgern Smolders et al. (2005), dass die Sensitivität gegenüber toxischen Substanzen nicht weniger ist, je mehr Futter *D. magna* hat. Anstatt zuerst die ganze Energie, die aus Futter gewonnen werden kann, in den Entgiftungsprozess zu investieren, reproduzieren sie sich weiter und können die Entgiftung nicht abschließen, was letale Folgen für die Organismen haben kann.

Zur Wirkung von Esfenvalerat mit Umweltstress konnten im Zuge der Experimente dieser Masterarbeit als neue Erkenntnisse gewonnen werden, dass Futterstress mit Esfenvalerat synergistisch wirkt und erhöhte Temperatur mit dem Pestizid additiv. Außerdem konnte erwiesen werden, dass mit steigendem Umweltstress die Sensitivität gegenüber Esfenvalerat faktoriell zunimmt (siehe Anhang 7). Das wiederum bedeutet für die Interaktion der drei Stressoren Futter, Temperatur und Insektizid, dass nachweislich deren Kombinationseffekt synergistisch ist.

4.3 SAM kann die Wirkung von drei Stressoren vorhersagen

Der Synergismus durch Umweltstress und ein Pestizid sollte mithilfe des von Liess et al. (2016) kalibrierten Stressadditionsmodells (SAM) quantifiziert werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse bestätigen, dass SAM den Synergismus durch den Umweltstressor Futtermangel mit dem Insektizid Esfenvalerat vorhersagen kann, wie es auch die Autoren in der Meta-Analyse für Futterstress kombiniert mit einem Pestizid zeigten [21]. Allerdings wurde besonders die Temperatur allein mit Esfenvalerat (bei 100 % Futter) überschätzt, was daran

liegt, dass Temperatur nur einen additiven Effekt auf die Sensitivität von *D. magna* gegenüber Esfenvalerat hat. Darüber hinaus hatte die vorliegende Arbeit zum Ziel, SAM auf die Vorhersage-Genauigkeit von zwei Umweltstressoren mit einem Pestizid zu testen. Die Vorhersage von SAM für die Kombination von 30 °C mit 1 % Futter und dem Insektizid liegt gar nicht weit weg von der Winkelhalbierenden und damit der Beobachtung, wie in Abbildung 19 gezeigt (siehe Ergebnisteil Punkt 3.2). Allerdings wird die Kombination aus 28 °C mit 1 % Futter und Esfenvalerat sehr überschätzt, was auf die hohe Mortalität (70,84 %), die nur durch den Umweltstress hervorgerufen wird, zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu wird als einzige die Kombination von 28 °C mit 10 % Futter und Esfenvalerat unterschätzt. Bei dieser Kombination war zum mittelfristigen Effekt keine Mortalität durch den Umweltstress zu beobachten, deshalb geht SAM hier nicht von Synergismus aus.

Die Anwendung in dieser Arbeit sollte ein erster Versuch sein, ob SAM ohne weiteres für mehrere Umweltstressoren in Kombination mit einem Schadstoff anzuwenden ist. Eine Annäherung der Dosis-Wirkungskurven von den SAM-Vorhersagen zu denen der Beobachtungen bestand in allen Kombinationen der drei Stressoren. Die Vorhersagen für die Überlebenswahrscheinlichkeiten sind bereits sehr realistisch, so wie es in den Diagrammen aus Punkt 3.2 zu sehen ist. Die Abbildung 19 zeigt die Verhältnisse der LC50-Werte, woraus eine suboptimale Berechnung des LC50 zu vermuten ist. An dieser Stelle sollte der „SAM-Calculator“ geprüft werden. Allerdings ist es auch möglich, dass die Angabe des Umweltstress und des reinen toxischen Stress mit ihren Überlebenswahrscheinlichkeiten nicht ausreichend sind, um eine exakte Vorhersage zu treffen. Die Effekte werden oft überschätzt, wenn der Umweltstress allein nicht synergistisch mit dem Schadstoff wirkt, wie z.B. bei Temperatur.

Eine Vorhersage von Kombinationseffekten nur durch Umweltstress ist mit SAM derzeit nicht möglich, da im „SAM-Calculator“ immer Überlebenswahrscheinlichkeiten für einen Schadstoff angegeben werden müssen und diese Werte verschiedenen Konzentrationen (z.B. in µg/L) zugeordnet werden. Eine Transformation von getesteten Umweltstress-Werten (z.B. Temperaturen von 20 °C, 25 °C, 28 °C, 30 °C) auf eine Konzentration war nicht möglich, weshalb auch keine Vorhersage getroffen werden konnte.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurden experimentelle Untersuchungen mit multiplen Stressoren auf *Daphnia magna* durchgeführt. Die Umweltparameter Temperatur und Futter dienten als natürliche Stressoren und das Insektizid Esfenvalerat wurde als anthropogener Stressor ausgewählt. Natürliche Einflüsse müssen in der Pflanzenschutzmittel-Risikobewertung noch intensiver Beachtung finden, weshalb sich die Forschung der Ökotoxikologie seit vielen Jahrzehnten mit den Wirkungen von Umweltfaktoren zusammen mit einem Schadstoff auseinandersetzt. Temperatur- und Futterstress wurden zwar oft als Umweltstress in Untersuchungen für die Forschung genutzt, aber sie wurden selten über Gradienten getestet und es wurde nicht versucht, die Wirkungen zu quantifizieren. Es ist aber viel darüber bekannt, was die einzelnen Stressoren auf das Überleben und die Reproduktion von *Daphnia magna* bewirken. Die Experimente sollten einerseits die Wirkungen bestätigen und andererseits die Datengrundlage liefern, mit welcher am Ende durch die Anwendung von geeigneten Modellen Effekte bestimmt werden konnten. Die beobachteten Effekte wurden mit Effektvorhersagen der Modelle Effektaddition (EA) und Stressaddition (SAM) verglichen. EA basiert auf der Annahme, dass die Stressoren unabhängig voneinander wirken. SAM sagt dasselbe, nimmt aber an, dass multiple Stressoren immer auf die gleiche Grundkapazität wirken.

Die essentiellen Fragen für die vorliegende Arbeit waren, welcher Kombinationseffekt von Futterstress und Temperaturstress erwartet und vorhergesagt werden kann. Außerdem sollte verstanden werden, wie die Umweltstressoren die Sensitivität von *Daphnia magna* gegenüber der Chemikalie Esfenvalerat verändern. Zuletzt sollte geprüft werden, ob eine Vorhersage von Effekten aus drei Stressoren möglich ist.

Für die Wirkung der Umweltstressoren hat sich ergeben, dass mithilfe von EA der Kombinationseffekt teilweise vorhergesagt werden kann. Die Kombination von beiden Umweltparametern wirkt additiv bis synergistisch. Die synergistischen Effekte bei 30 °C und 10 % Futter bzw. 1 % Futter ab 28 °C können nicht mehr durch EA vorhergesagt werden, da der Futterstress hier die Sensitivität der Individuen gegenüber Temperatur sehr verstärkt. Eine Vorhersage von nur Umweltstress-Interaktionen ist mit SAM derzeit nicht möglich.

In der Kombination von Futter und Temperatur mit Esfenvalerat ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse. Temperatur und Esfenvalerat zusammen wirken additiv, obwohl steigende Temperatur die Toxizität von Esfenvalerat verstärkt und damit auch die Sensitivität von *Daphnia magna* gegenüber dem Insektizid erhöht. Futter wirkt zusammen mit Esfenvalerat synergistisch, gleich ob Temperatur als zusätzlicher Stress präsent ist oder nicht. Futterstress erhöht demnach die Sensitivität der Individuen um ein Vielfaches mehr als Temperatur.

Der synergistische Effekt durch Futterstress und Pestizid konnte durch SAM gut bestimmt werden. Die Vorhersagen für die entsprechenden Überlebenswahrscheinlichkeiten bei den genutzten Konzentrationen an Esfenvalerat näherten sich den Beobachtungen. Allerdings ist zu überprüfen, ob der LC50 – Wert passend dazu berechnet wird. Teilweise sagt SAM einen doppelt oder fünffach höheren Effekt vorher als beobachtet wurde.

Abschließend ist festzuhalten, dass weitere experimentelle Untersuchungen erforderlich sind, um SAM umfangreicher zu testen und bisherige Grenzen des Modells festzustellen. Des Weiteren sollte zukünftig überprüft werden, ob Modelle wie EA bereits Anwendung in der Risikobewertung von Pflanzenschutzmitteln finden, damit noch realistischere Einschätzungen der Pestizide getroffen werden können. Bjergager et al. zeigten, dass erprobte Synergien im Labor zwischen zwei Pestiziden im Freiland ähnlich erwartet werden können [43]. So kann vermutet werden, dass es für andere Stressoren ebenso gilt.

6 Quellenverzeichnis

1. Pieters, B. J. et al. Influence of food limitation on the effects of fenvalerate pulse exposure on the life history and population growth rate of *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 2254-2259 (2005).
2. Ashauer, R. Ökotoxikologische Bewertung: Schwankende Stoffkonzentrationen und wiederholte Konzentrationspitzen in Gewässern. *Eawag Aqua & Gas* N°**11**, 24-31 (2012).
3. Kreuger, J. Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990-1996. *The Science of the total Environment* **216**, 227-251 (1998).
4. Liess, M. und von der Ohe, P. C. Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 954-965 (2005).
5. Heugens, E. H. W. A Review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. *Crit Rev Toxicol* **31**, 247-284 (2001).
6. Heugens, E. H. W. et al. Temperature-Dependent Effects of Cadmium on *Daphnia magna*: Accumulation versus Sensitivity. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 2145-2151 (2003).
7. Heugens, E. H. W. et al. Population growth of *Daphnia magna* under multiple stress conditions: joint effects of temperature, food, and cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.* **25**, 1399-1407 (2006).
8. Smolders, R. et al. Relationship between the energy status of *Daphnia magna* and its sensitivity to environmental stress. *Aquatic Toxicology* **73**, 155-170 (2005).
9. Muysen, B., Messiaen, M. & Janssen, C. R. Combined cadmium and temperature acclimation in *Daphnia magna*: Physiological and sub-cellular effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **73**, 735-742 (2010).
10. Junghans, M. et al. Qualitätskriterien für Pflanzenschutzmittel. *Eawag Aqua & Gas* N°**11**, 16-22 (2012).
11. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2017): Schutz des Naturhaushaltes bei der Zulassung von Pflanzenschutzmitteln. URL: www.bvl.bund.de
12. Schäfer, B. et al. Thresholds for the Effects of Pesticides on Invertebrate Communities and Leaf Breakdown in Stream Ecosystems. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 5134-5142 (2012).
13. Stampfli, N. C., Knillmann, S. et al. Environmental context determines community sensitivity of freshwater zooplankton to a pesticide. *Aquatic Toxicology* **104**, 116-124 (2011).
14. Liess, M., Foit, K. Intraspecific competition delays recovery of population structure. *Aquatic Toxicology* **97**, 15-22 (2010).

15. Korpelainen, H. The effects of temperature and photoperiod on life history parameters of *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera). *Freshwater Biology* **16**, 615-620 (1986).
16. Koh, H. et al. Combined effects of environmental and chemical stressors on a model *Daphnia* population. *Ecological Modelling* **103**, 19-32 (1997).
17. Loewe, S. & Muischnek, H. In *Naunyn-Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* **Vol. 114**, 313–326 (1926). ^[1]_{SEP}
18. Cedergreen, N. Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicity. *PLOS ONE* **9** (2014).
19. Bliss, C. I. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology* **26**, 585-615 (1939).
20. Coors, A. & Meester, L. Synergistic, antagonistic and additive effects of multiple stressors: predation threat, parasitism and pesticide exposure in *Daphnia magna*. *Journal of Applied Ecology* **45**, 1820-1828 (2008).
21. Liess, M. & Foit, K. & Knillmann S. Predicting the synergy of multiple stress effects. *Scientific reports* **6**, 32965 (2016).
22. Orcutt, J. & Porter, K. The synergistic effects of temperature and food concentration on life history parameters of *Daphnia*. *Oecologia* **63**, 300-306 (1984).
23. Filho, T. U. B. et al. Energy budget in *Daphnia magna* exposed to natural stressors. *Environ. Sci. Pollut. Res* **18**, 655-662 (2011).
24. Barry, M.J. et al. Effect of Algal Food Concentration on Toxicity of Two Agricultural Pesticides to *Daphnia carinata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **32**, 273-279 (1995).
25. IPCC (2007) *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge.
26. Knillmann et al. Elevated temperature prolongs long-term effects of a pesticide on *Daphnia spp.* due to altered competition in zooplankton communities. *Global Change Biology* **19**, 1598-1609 (2013).
27. Burns, C. W. Relation between filtering rate, temperature, and body size in four species of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* **14**, 693-700 (1969)
28. Jackson, M. C. et al. Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis. *Global Change Biology* **22**, 180-189 (2016).
29. Belden, J. B. et al. How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integr. Environ. Assess. Manag.* **3**, 364-372 (2007).
30. Ashauer, R. et al. Environmental Risk Assessment of Fluctuating Diazinon Concentrations in an Urban and Agricultural Catchment Using Toxicokinetic-Toxicodynamic Modeling. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 9783–9792 ^[1]_{SEP} (2011).
31. Ashauer, R. et al. Simulating toxicity of carbaryl to *Gammarus pulex* after sequential pulsed exposure. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 5528–5534 (2007).

32. Ashauer, R. et al. Toxicokinetic - toxicodynamic modeling explains carry-over toxicity from exposure to diazinon by slow organism recovery. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 3963–3971 (2010).
33. Knäbel, A. et al. Regulatory FOCUS surface water models fail to predict insecticide concentrations in the field. *Environmental science & technology* **46** (15), 8397-8404 (2012).
34. Kattwinkel, M., Römbke, J. and Liess, M. Ecological recovery of populations of vulnerable species driving the risk assessment of pesticides. *EFSA Supporting Publications* 9.9 (2012).
35. Reynaldi, S. et al. Linking feeding activity and maturation of *Daphnia magna* following short-term exposure to fenvalerate. *Environ. Toxicol. Chem.* **25**, 1826-1830 (2006).
36. Münze, R. et al. Pesticides from wastewater treatment plant effluents affect invertebrate communities. *Science of the total environment* **599-600**, 387-399 (2017).
37. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (2000): Pflanzenschutzmittel-Belastung und Lebensgemeinschaften in Fließgewässern mit landwirtschaftlich genutztem Umland; Texte 65/01; Forschungsbericht 296 24 511.
38. Grimme LH, Boardmann NK. Photochemical activities of ^[LSEP]particle fraction P1 obtained from the green algae *Chlorella fusca*. ^[LSEP]*Biochem Biophys Res Commun* **49**,1617–1623 (1972).
39. Klüttgen, G. et al. ADaM, an artificial freshwater for the culture of zooplankton. *Wat. Res.* **28**, 743-746 (1994).
40. R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
URL <https://www.R-project.org/>.
41. Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., Gerhard, D. (2015) Dose-Response Analysis. Using R PLOS ONE, 10(12), e0146021.
42. Goss, L.B., 1978. The effects of temperature on *Daphnia pulex* Leydig and *Daphnia magna* Straus. Ph.D. Dissertation. University of Tennessee, Knoxville.
43. Bjergager, M.A. et al. Synergy between prochloraz and esfenvalerate in *Daphnia magna* from acute and subchronic exposures in the laboratory and microcosms. *Aquatic Toxicology* **110-111**, 17-24 (2011).

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Merseburg, den 13.09.2017

Vivien Walter

Thesen

Experimentelle Untersuchung von kombiniertem Futter-, Temperatur- und

Pestizidstress auf den Organismus *Daphnia magna*: Walter, Vivien. – Masterarbeit. –

Leipzig, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ), 2017. – 57 S., 19 Abb., 12 Tab., 7 Anl., Thesen sind formuliert

These 1: Temperatur- und Futterstress haben einen additiven bis synergistischen Effekt.

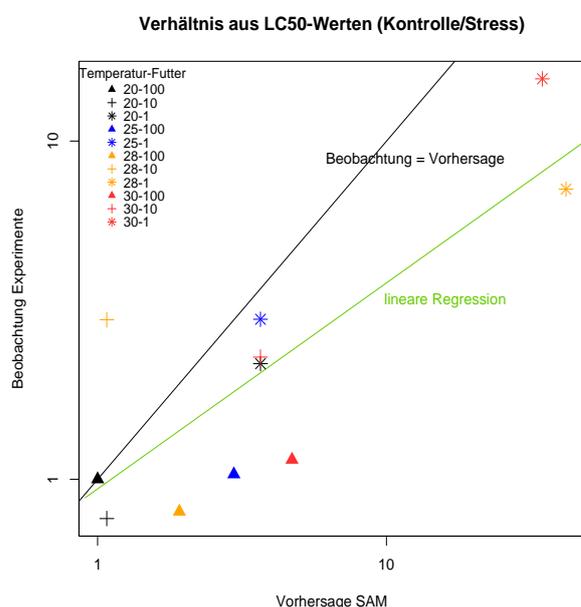
Die Umweltstressoren wurden experimentell auf *Daphnia magna* untersucht und nach umfangreicher Datenaufnahme konnte über das Modell der Effektaddition und einem Modellabweichungsverhältnis für die Kombination von Temperatur- und Futterstress ein additiver bis synergistischer Effekt bestimmt werden. Die Wirkung wird synergistisch, wenn die Temperatur auf 28 °C und 30 °C steigt, und/ bzw. das Futter auf eine Menge von 1 % begrenzt wird. Hoher Futterstress verstärkt die Sensitivität von *D. magna* gegenüber Wärme.

These 2: Esfenvalerat wirkt mit Temperaturstress additiv, aber mit Futterstress wirkt das Pestizid synergistisch.

Die Kombination von einem Umweltparameter mit dem Insektizid Esfenvalerat ergab für Temperatur einen additiven und für Futterstress einen synergistischen Effekt auf die Sensitivität gegenüber Esfenvalerat. Erhöhte Temperatur lässt die Daphnien sensitiver auf Esfenvalerat reagieren. Einen viel größeren Einfluss auf die Sensitivität hat jedoch Futterstress. Erhalten Daphnien 1 % Futter, so wird die Toxizität stark erhöht und Mortalität tritt besonders schnell nach einer Kontaminierung ein. Wärme verstärkt diesen Effekt und dadurch wird ersichtlich, dass das Nahrungsangebot und die Temperatur eine entscheidende Rolle in der Risikobewertung von Pflanzenschutzmitteln spielen.

These 3: Das Stressadditionsmodell kann die Wirkung von drei Stressoren vorhersagen.

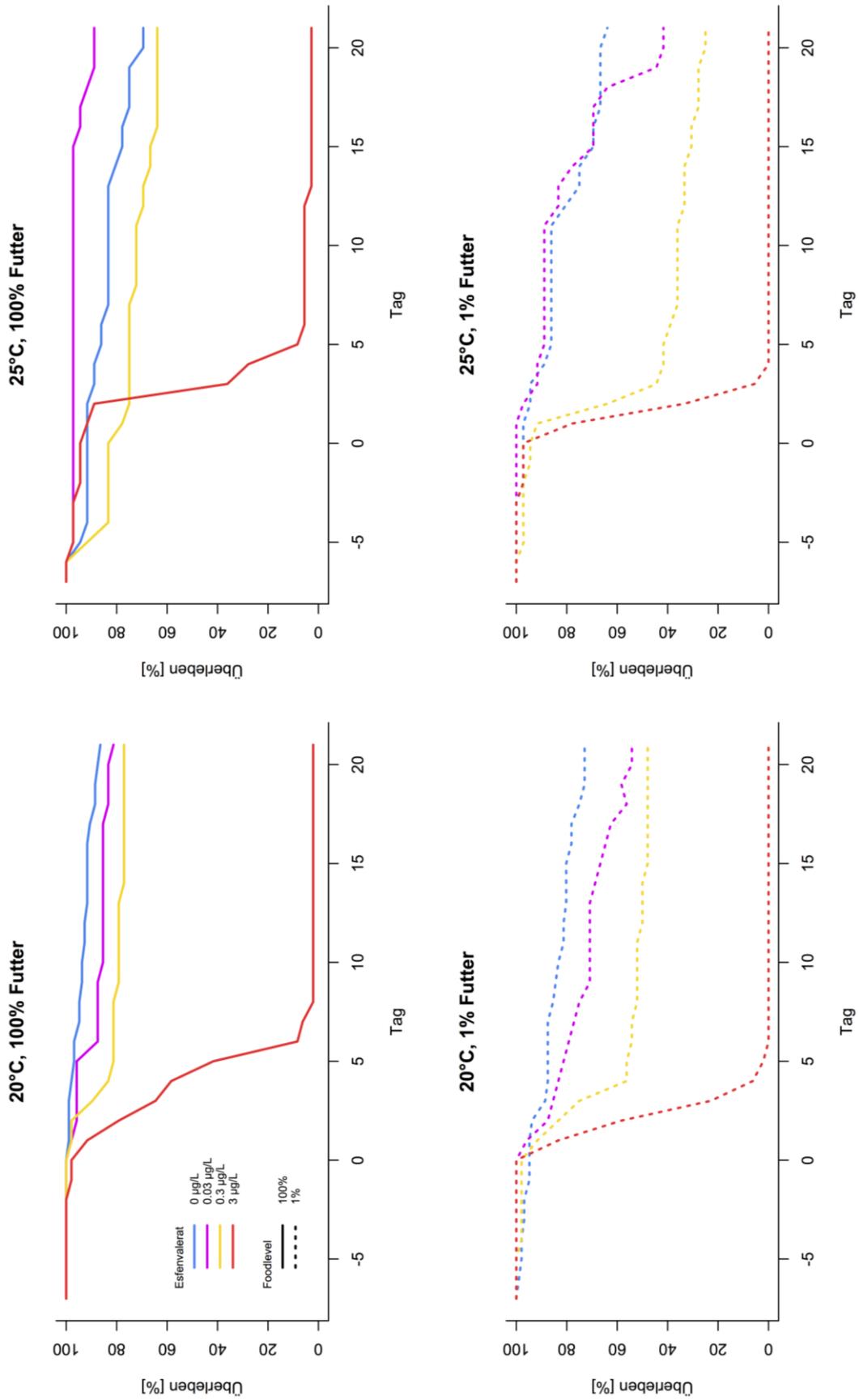
Synergismus kann in jedem zutreffenden Fall durch das Stressadditionsmodell (SAM)



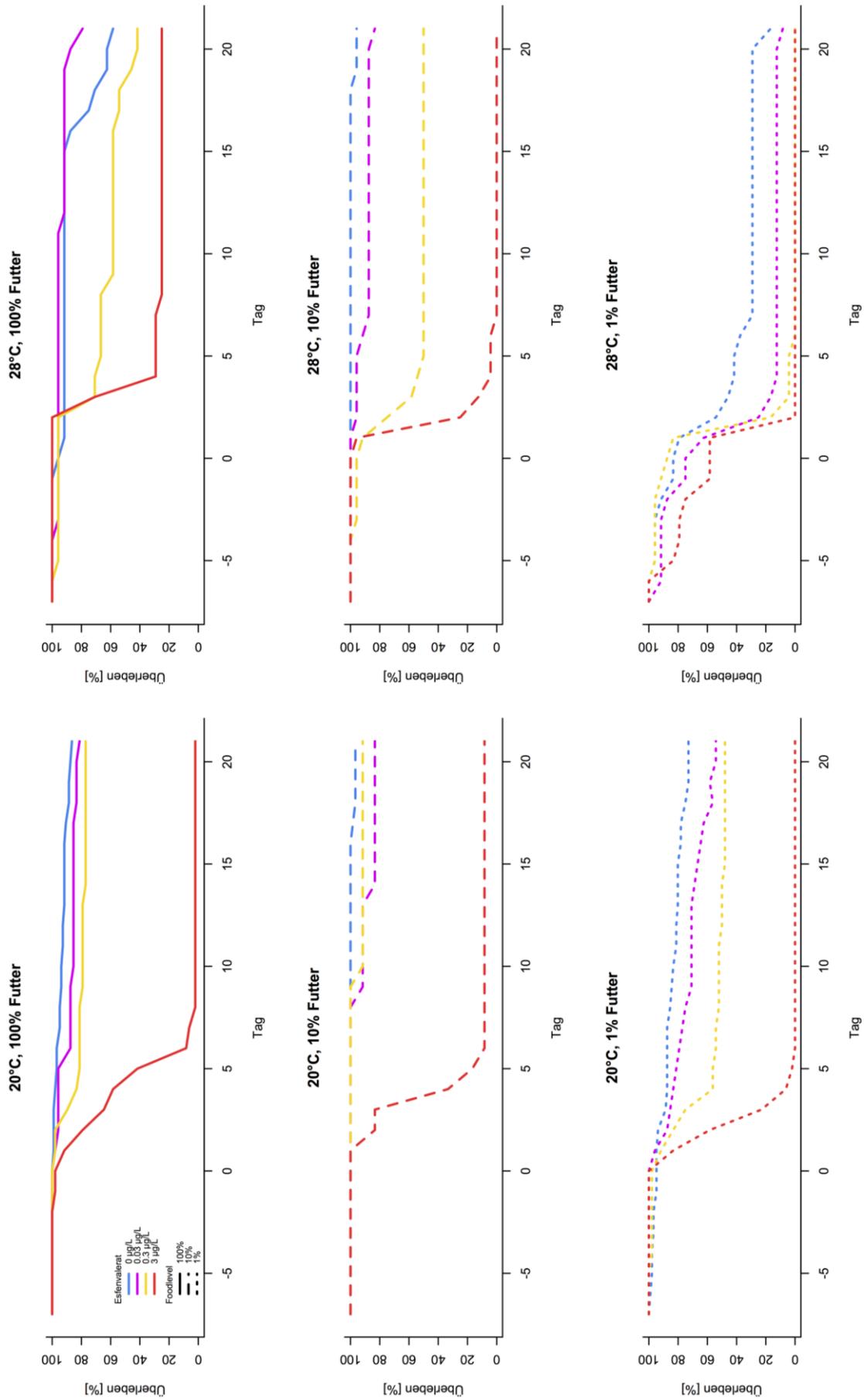
bestimmt werden. Die Experimente dieser Arbeit dienen zur Quantifizierung des Synergismus mit SAM. Die Überlebenswahrscheinlichkeiten für die Konzentrationen an Esfenvalerat kombiniert mit Umweltfaktoren näherten sich sehr gut den Beobachtungen aus den Experimenten an. Trotz dessen, dass das Modell den Effekt von manchen Kombinationen überschätzt, kann es angewendet werden. Nebstehende Abbildung zeigt die faktoriellen Unterschiede von der Beobachtung zur Vorhersage mit SAM.

Anhang

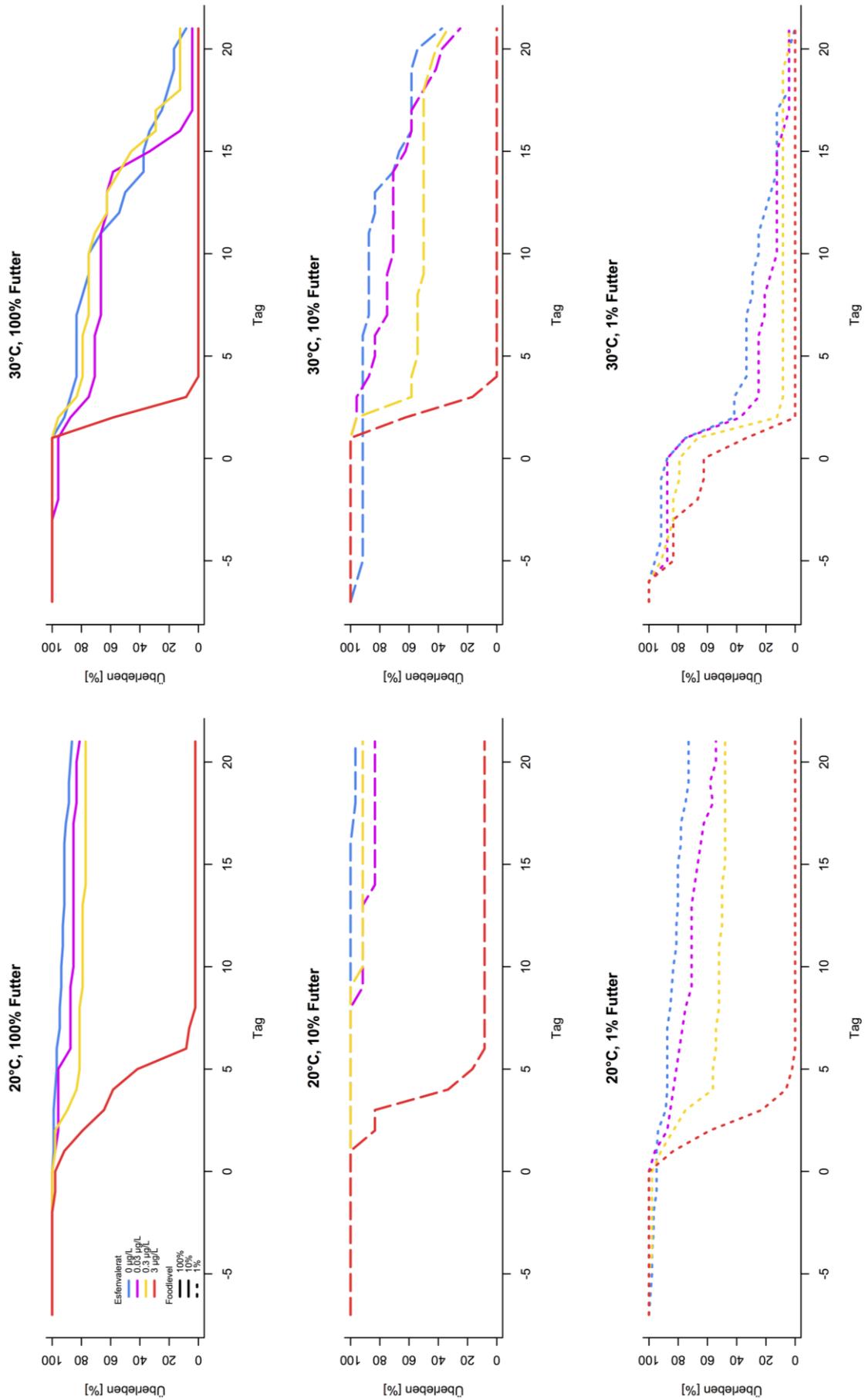
Anhang 1: Überleben über 29 d von 25 °C im Vergleich zu 20 °C für die Futterlevel 100 %, 10 % und 1 %	51
Anhang 2: Überleben über 29 d von 28 °C im Vergleich zu 20 °C für die Futterlevel 100 %, 10 % und 1 %	52
Anhang 3: Überleben über 29 d von 30 °C im Vergleich zu 20 °C für die Futterlevel 100 %, 10 % und 1 %	53
Anhang 4: Übersicht der täglichen Reproduktionsrate aller Kombinationen aufsummiert pro Woche.....	54
Anhang 5: Standardabweichung der Reproduktion (mittelfristiger Effekt) mit Signifikanzkennzeichnung.....	55
Anhang 6: Standardabweichung der Reproduktion (langfristiger Effekt) mit Signifikanzkennzeichnung.....	56
Anhang 7: Stressadditionsmodell: Faktorielle Änderung der Sensitivität gegenüber Esfenvalerat mit steigendem Umweltstress.....	57



Anhang 1: Überleben über 29 d von 25 °C im Vergleich zu 20 °C für die Futterlevel 100 %, 10 % und 1 % (Tag -7 bis -1 generell ohne Esfenvalerat, am Tag 0 war Kontamination, am Tag 1 war Dekontamination)

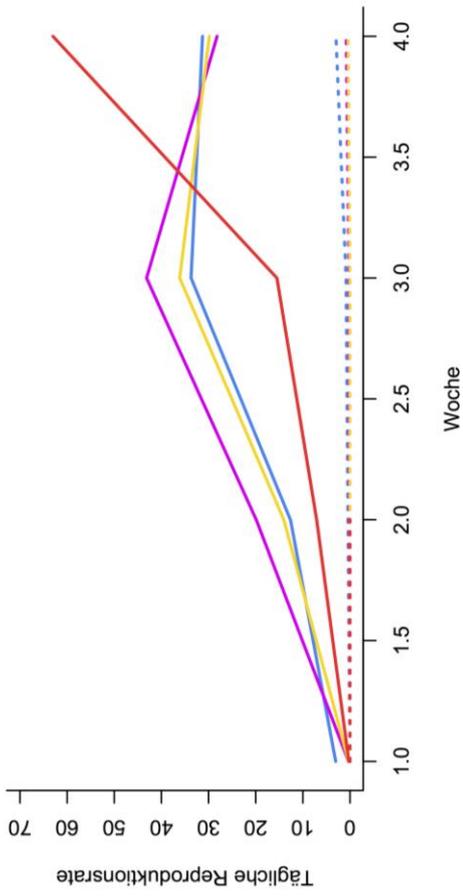


Anhang 2: Überleben über 29 d von 28 °C im Vergleich zu 20 °C für die Futterlevel 100 %, 10 % und 1 % (Tag -7 bis -1 generell ohne Esfenvalerat, Tag 0 war Kontamination, Tag 1 Dekontamination)

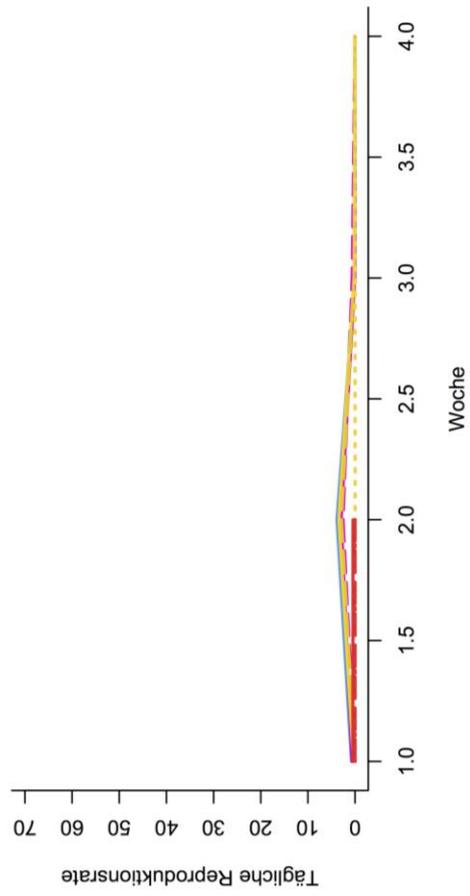


Anhang 3: Überleben über 29 d von 30 °C im Vergleich zu 20 °C für die Futterlevel 100 %, 10 % und 1 % (Tag -7 bis -1 generell ohne Esfenvalerat, Tag 0 war Kontamination, Tag 1 Dekontamination)

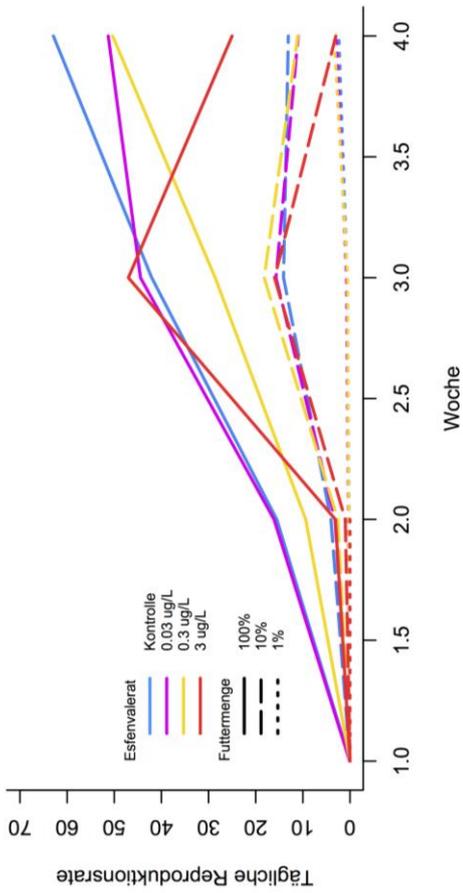
25°C



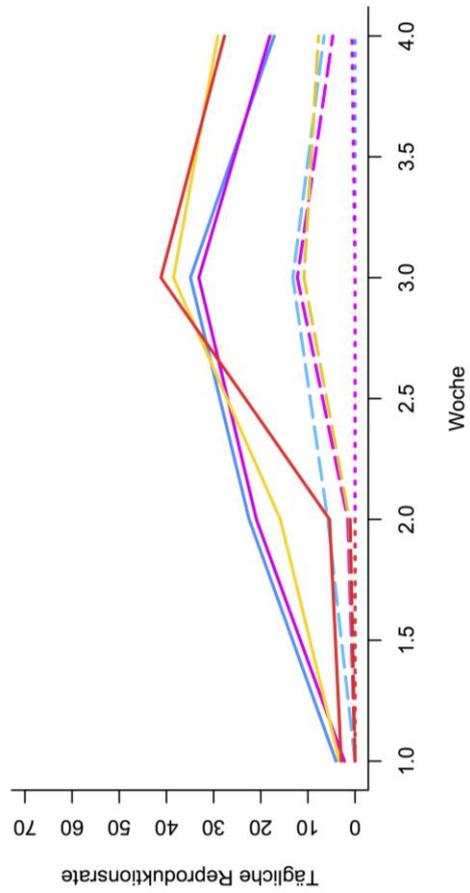
30°C



20°C

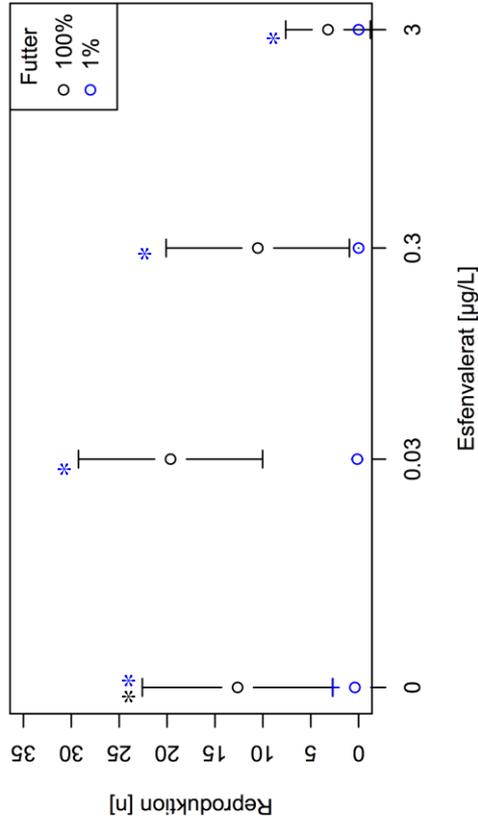


28°C

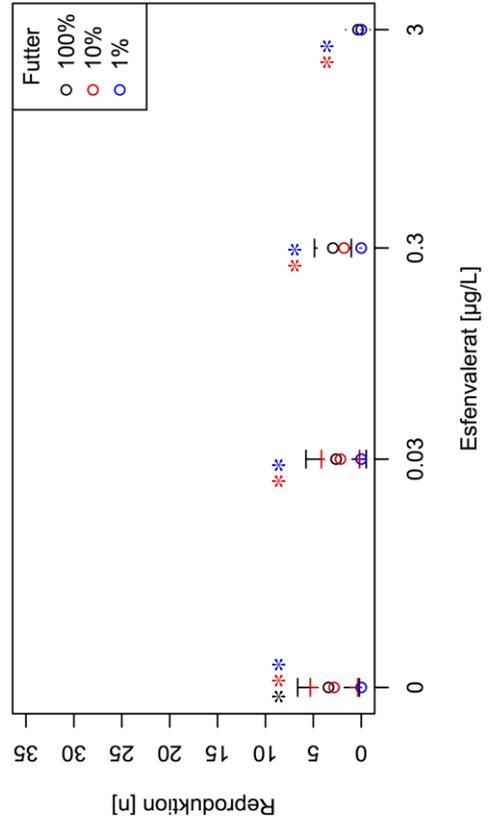


Anhang 4: Übersicht der täglichen Reproduktionsrate aller Kombinationen aufsummiert pro Woche

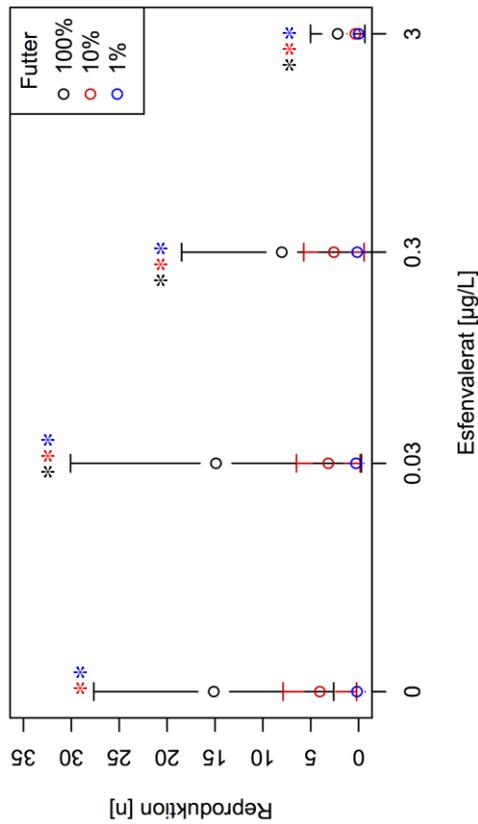
25 °C, 2. Woche



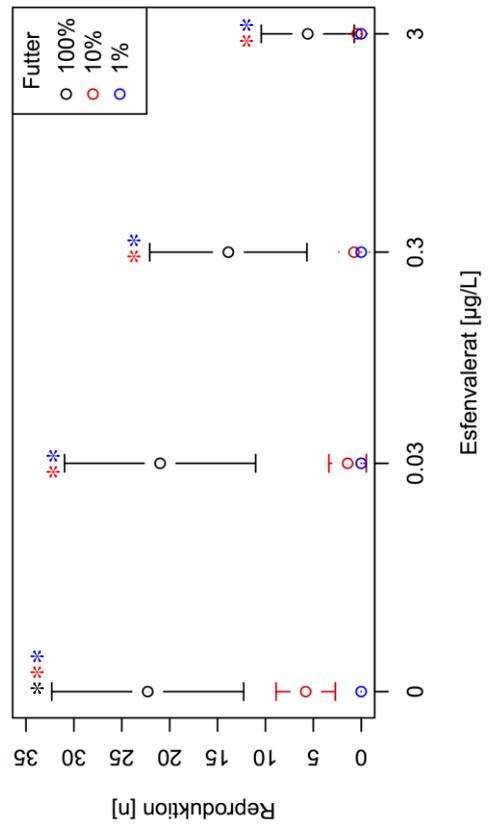
30 °C, 2. Woche



20 °C, 2. Woche



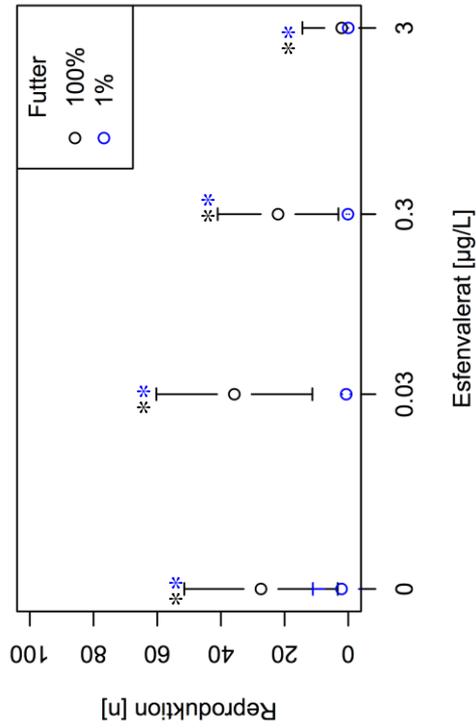
28 °C, 2. Woche



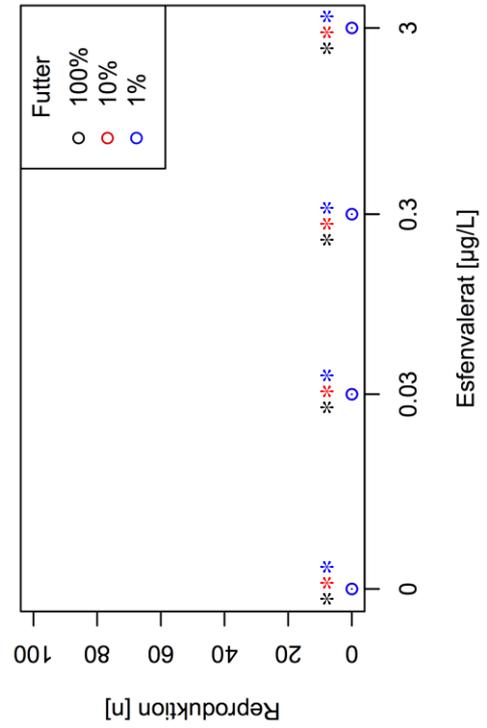
Anhang 5: Standardabweichung der Reproduktion (mittelfristiger Effekt) mit Signifikanzkennzeichnung

(* Kombination mit 100 % Futter signifikant; * Kombination mit 10 % Futter signifikant; * Kombination mit 1 % Futter signifikant)

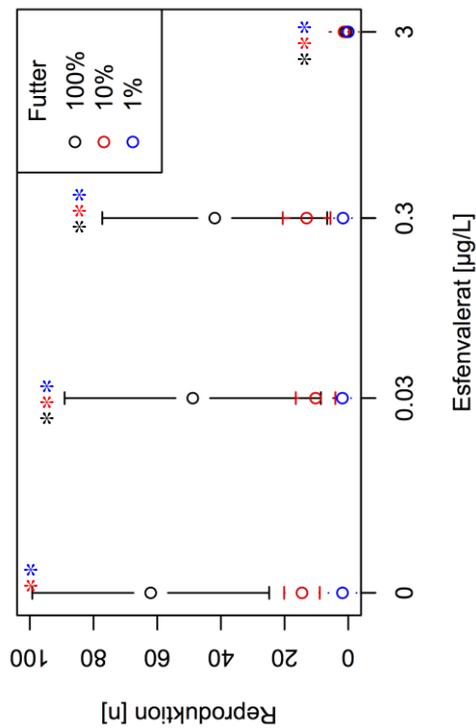
25 °C, 4. Woche



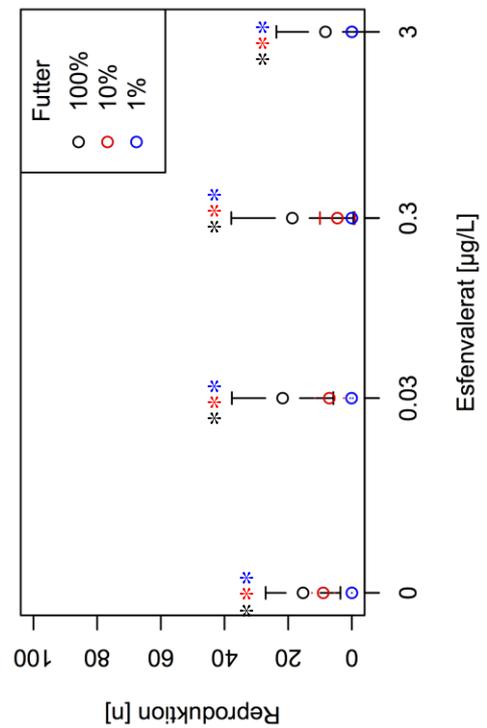
30 °C, 4. Woche



20 °C, 4. Woche



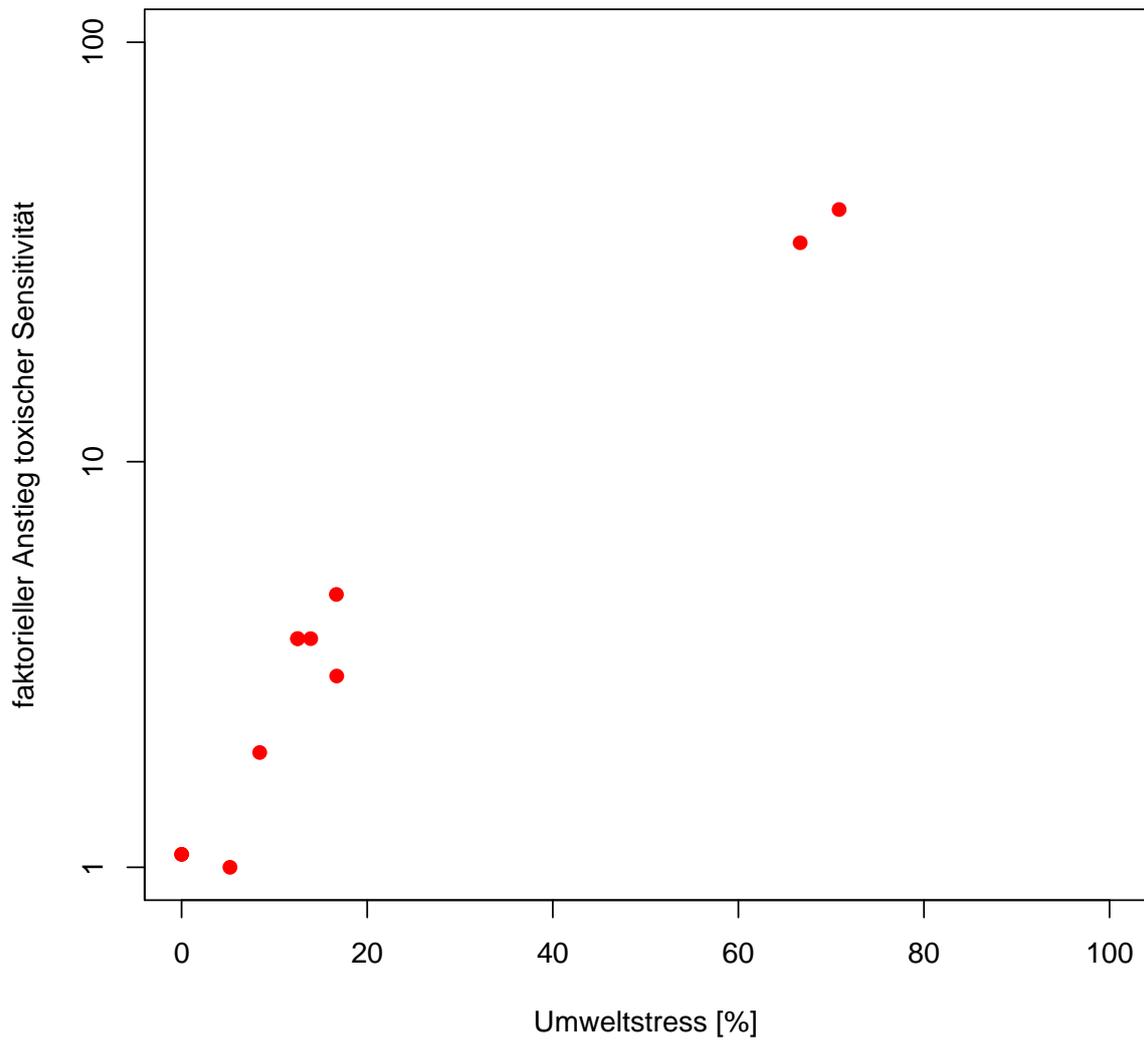
28 °C, 4. Woche



Anhang 6: Standardabweichung der Reproduktion (langfristiger Effekt) mit Signifikanzkennzeichnung

(* Kombination mit 100 % Futter signifikant; * Kombination mit 10 % Futter signifikant; * Kombination mit 1 % Futter signifikant)

Stressadditionsmodell



Anhang 7: Stressadditionsmodell: Faktorielle Änderung der Sensitivität gegenüber Esfenvalerat mit steigendem Umweltstress