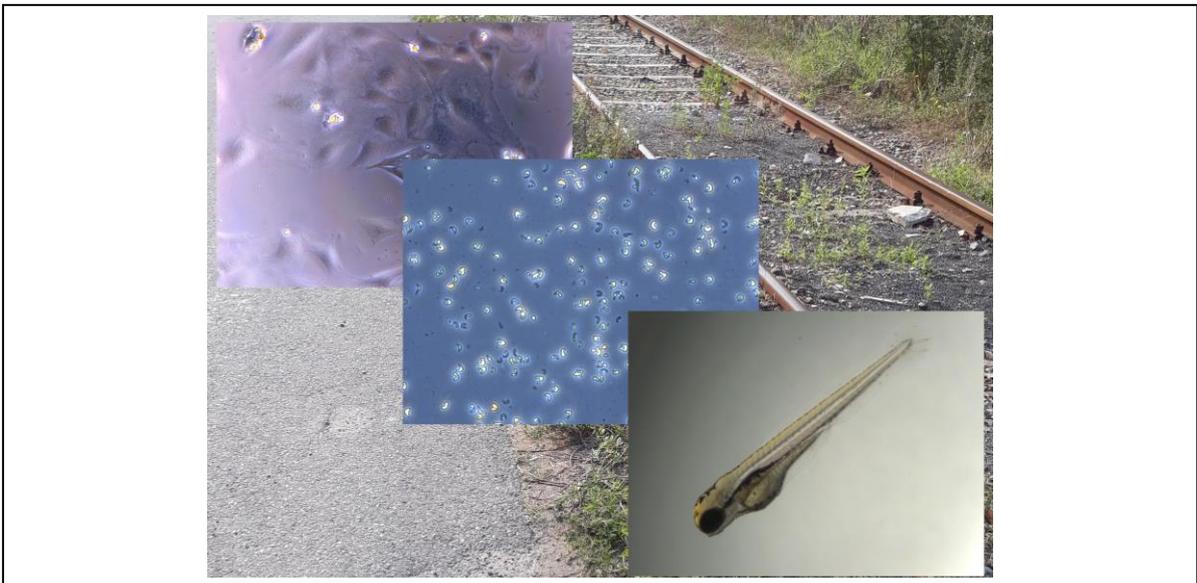


# Vegetationskontrolle an Straßen und Schienenwegen Green-LOGIX

Ein Projekt finanziert im Rahmen der  
Verkehrsinfrastrukturforschung 2016  
(VIF 2016)

November 2020



## Impressum:

### Herausgeber und Programmverantwortung:

Bundesministerium für Klimaschutz  
Abteilung Mobilitäts- und Verkehrstechnologien  
Radetzkystraße 2  
1030 Wien

 **Bundesministerium**  
Klimaschutz, Umwelt,  
Energie, Mobilität,  
Innovation und Technologie

ÖBB-Infrastruktur AG  
Praterstern 3  
1020 Wien

 **ÖBB**  
INFRA

Autobahnen- und  
Aktiengesellschaft  
Rotenturmstraße 5-9  
1010 Wien

 **ASFiNAG**

**Für den Inhalt verantwortlich:**

FH Technikum Wien  
Hochstättdplatz 6  
1200 Wien

**Programmmanagement:**

Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft mbH  
Thematische Programme  
Sensengasse 1  
1090 Wien



# **Vegetationskontrolle an Straßen und Schienenwegen Green-LOGIX**

Ein Projekt finanziert im Rahmen der  
Verkehrsinfrastrukturforschung  
(VIF2016)

**AutorInnen:**

**Christoph Olscher, MSc**  
**DI Dr. Barbara Gepp,**  
**Katharina Wiessner, MSc**  
**Ingrid Kolar, BSc**  
**Ing. Bettina Dekrout**  
**Mag. Dr. Martina Ortbauer**  
**FH-Prof. DI Dr. Carina Huber-Gries**

**Auftraggeber:**

Bundesministerium für Klimaschutz  
ÖBB-Infrastruktur AG  
Autobahnen- und Schnellstraßen-Finanzierungs-Aktiengesellschaft

**Auftragnehmer:**

FH Technikum Wien

## Danksagung:

Die Fachhochschule Technikum Wien bedankt sich bei der ÖBB und der ASFINAG für die Einbindung in das Projekt Green-LOGIX, sowie bei der FFG und der Republik Österreich für die Förderungen.

Weiters bedanken wir uns bei allen weiteren Projekt-Partnern: der FH-Kärnten, biohelp Garten & Bienen GmbH, E.C.O. Institut für Ökologie und Schimetta Consulting.

Ein persönliches Dankeschön gehört: Hr. Martin Schneider, Fr. Elisabeth Wiegele, Hr. Heinz Kietabl, Hr. Erich Kolb, Fr. Ewelina Klein ehem. Orłowska, Hr. Florian Saliger, Hr. Thomas Schuh, Fr. Judith Welicky, Hr. Peter Druml, Hr. Maxim Grigull, Hr. Tobias Köstl, Hr. Hans Kirchmeier, Hr. Hannes Gottschlich, Fr. Michaela Stolz, Fr. Johanna Balatka, Hr. Gerald Wurm, Hr. Josef Gattringer sowie Hr. Maximilian Koch der Zasso GmbH.

## KURZFASSUNG:

Die Bekämpfung von unerwünschtem Aufwuchs an Straßen- und Gleiskörpern durch den Einsatz von Herbiziden ist unumgänglich, da sonst der manuelle Aufwand der Straßen und Gleiswegpflege übermäßig steigen würde. Dabei ist es wichtig, mögliche Effekte und Auswirkungen von Herbiziden auf die Umwelt sowie die Gesundheit des Menschen zu berücksichtigen. Dies reicht von akuten Effekten wie Vergiftungen von Nichtzielorganismen bis zur langfristigen Akkumulation und Änderung der Artenvielfalt.

Im Zuge des Green-LOGIX Projektes (Vegetationskontrolle an Straßen und Schienenwegen) war es das Ziel der Fachhochschule Technikum Wien, eine ökotoxikologische Einschätzung verschiedener ausgewählter Herbizide durchzuführen. Dazu wurde eine Test-Batterie ausgewählt, die Tests nach OECD-Richtlinien zur Bestimmung der akuten Toxizität an Embryos des Zebrafisches *Danio rerio* (FET-Test), an der Fibroblasten-Zelllinie Linie BALB/c 3T3 (*Mus musculus*; NRU-Test) und an Algen der Spezies *Raphidocelis subcapitata* (AGI-Test) beinhaltet. Getestet wurden verschiedene Mischungen der Herbizide biohelp Finalsan® Plus, Touchdown® Quattro, Nozomi®, Valdor® Flex, Chikara® sowie der Adjuvantien Wetcit®, Karibu®, Grounded® und verschiedene Größenfraktionen der Unkrautbarriere BSW.

Vergleiche der erhaltenen EC<sub>50</sub>-Werte von Touchdown® Quattro (NRU: 0,73 g/L; AGI: 0,45 g/L; FET: 0,038 g/L) und biohelp Finalsan® Plus (NRU: 1,37 g/L; AGI: 0,37 g/L; FET: 0,21 g/L) zeigten, dass Touchdown® Quattro mit Ausnahme der Algen stärker toxisch wirkte als biohelp Finalsan® Plus. Die EC<sub>50</sub>-Werte der Herbizide Valdor® Flex, Chikara® und Nozomi® lassen eine sehr schwache bzw. keine Toxizität für Zellen und *Danio rerio*-Embryonen erkennen, allerdings wirken diese Herbizide stark toxisch auf Algen. Tests mit der wachstumshemmenden Regupol-Matte Typ 767 zeigten bei keinem der Modellorganismen eine akute Toxizität.

Basierend auf den erzielten Ergebnissen und den verfügbaren Informationen aus bereits publizierter Literatur wird biohelp Finalsan® Plus mit den Wirkstoffen Pelargonsäure und Maleinsäurehydrazid für den Einsatz an Gleisanlagen empfohlen. Pelargonsäure wies im Vergleich zu den Wirkstoffen der anderen getesteten Formulierungen die geringste Toxizität auf und zeigt laut Literaturangaben ebenso die geringste Persistenz (< 1 Tag) in der Umwelt (z.B. Persistenz von Glyphosat: 15-1000 Tage).

## ABSTRACT:

The vegetation control on roads and railway tracks using herbicides is essential, as otherwise the manual effort of road and track maintenance would increase excessively. It is important to consider the possible effects and impacts of herbicides on the environment and human health. This ranges from acute effects such as poisoning of non-target organisms to long-term accumulation and changes in biodiversity.

During the Green-LOGIX project (vegetation control on roads and railroads), it was the aim of the University of Applied Sciences Technikum Wien to perform an ecotoxicological assessment of various selected herbicides. For this purpose, a test battery was selected, which includes tests according to OECD guidelines for the determination of acute toxicity on embryos of the zebrafish *Danio rerio* (FET test), the fibroblast cell line BALB/c 3T3 (*Mus musculus*; NRU test) and algae of the species *Raphidocelis subcapitata* (AGI). Various mixtures of the herbicides biohelp Finalsan® Plus, Touchdown® Quattro, Nozomi®, Valdor® Flex, Chikara® and the adjuvants Wetcit®, Karibu®, Grounded® and various size fractions of the weed barrier BSW were tested.

Comparisons of the EC<sub>50</sub> values of Touchdown® Quattro (NRU: 0.73 g/L, AGI: 0.45 g/L, FET: 0.038 g/L) and biohelp Finalsan® Plus (NRU: 1.37 g/L, AGI: 0.37 g/L, FET: 0.21 g/L) showed that Touchdown® Quattro was more toxic to cells and fish embryos than biohelp Finalsan® Plus. This was not the case for algae. The EC<sub>50</sub> values of the herbicides Valdor® Flex, Chikara® and Nozomi® indicate very weak to absent toxicity to cells and *Danio rerio* embryos but showed very strong toxicity to algae. Tests with the Regupol growth-inhibiting mat type 767 showed no acute toxicity on any of the model organisms.

Based on the results obtained and available information from already published literature, biohelp Finalsan® Plus with the active substance pelargonic acid and maleic acid hydrazide for the usage on railways is recommended. Pelargonic acid exhibited the lowest toxicity and according to literature also the lowest persistence (< 1 day) compared to the active substances of the other formulations tested (e.g. persistence of glyphosate: 15-1000 days).

## Inhaltsverzeichnis:

1. EINLEITUNG:	10
1.1. Formulierungen und deren Wirkmechanismen:	10
1.1.1. Wirkungsweise (Mode of Action [MoA]):	10
2. METHODEN:	12
2.1. Fraktionierung und Leaching der BSW bewuchshemmenden Matte:	12
2.2. Durchführung der ökotoxikologischen Tests:	13
2.2.1. OECD Richtlinie No. 129:	14
2.2.2. OECD Richtlinie No. 201:	14
2.2.3. OECD Richtlinie No. 236:	15
2.2.4. Chemische Analytik:	15
2.3. Statistik:	15
3. RESULTATE:	17
3.1. BSW Regupol bewuchshemmende Matte Typ 767:	17
3.2. Effektive Konzentrationen der Herbizide:	19
3.3. Visuelle Beobachtungen:	24
3.3.1. Ödeme des Herzbereichs:	24
3.3.2. Farbloses Blut:	25
3.3.3. Auflösung der Larven:	25
3.3.4. Zell-Morphologie:	26
3.4. Verbleib in der Umwelt:	27
4. DISKUSSION:	28
4.1. BSW Regupol bewuchshemmende Matte Typ 767:	28
4.2. Vergleich der Herbizide:	29
4.3. Adjuvantien und Mischungen:	32
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:	33
LITERATURVERZEICHNIS:	34

TABELLEN-VERZEICHNIS: .....	37
ABBILDUNGS-VERZEICHNIS:.....	38
ANHANG I: .....	40
ANHANG II: .....	73
ANHANG III: .....	78
ANHANG IV.....	84
ANHANG V.....	85

# 1. EINLEITUNG:

## 1.1. Formulierungen und deren Wirkmechanismen:

Im Rahmen des Green-LOGIX Projekts wurden Herbizide mit unterschiedlichen aktiven Substanzen gewählt und getestet (siehe Tabelle 1). Für einige wie z.B. Touchdown® Quattro liegen bereits Zulassungen auf Gleisanlagen vor, für andere z.B. biohelp Finalsan® Plus wird eine Zulassung angedacht. Jedes Herbizid enthält andere aktive Substanzen, die unterschiedliche Wirkweisen (Mode of Action = MoA) aufweisen.

### 1.1.1. Wirkungsweise (Mode of Action [MoA]):

- Glyphosat: Dieser Wirkstoff inhibiert ein Enzym (EPSP-Synthase) des Shikimat-Säure Stoffwechselweges. Dieser Stoffwechselweg existiert nur in Pflanzen, weswegen Glyphosat zu den systemischen Pestiziden gezählt wird und generell als nicht toxisch für Tiere betrachtet wird. Es gibt jedoch eine Vielzahl an Publikationen die potentielle Effekte von glyphosathaltigen Formulierungen auf Nicht-Zielorganismen beschreiben.<sup>1</sup>
- Pelargonsäure: Diese C9-Fettsäure wird in die Zellmembran eingebaut und führt dort zur Erhöhung der Durchlässigkeit der Membran. Zellflüssigkeit läuft aus der Zelle und gekoppelt mit Sonneneinstrahlung kommt es zu einem „Burn-Down“ Effekt.<sup>2</sup>
- Maleinsäurehydrazid: Die genaue Wirkweise von Maleinsäure-Hydrazid ist noch unbekannt. Die Effekte von Maleinsäure-Hydrazid auf Pflanzen sind die Hemmung einiger Aminosäure-Stoffwechselwege sowie das Initiieren von Chromosomenzerfall.<sup>3,4</sup>
- Flumioxazin: Das Herbizid inhibiert die Häm- und Chlorophyll-Synthese. Dies führt zur Ansammlung von Porphyrinen und Sauerstoff-Radikalen, welche die Zelle schädigen.<sup>5</sup>
- Iodosulfuron und Flazasulfuron: Diese Wirkstoffe inhibieren die Aceto-Lactat Synthase (ALS)-Enzym Synthase und damit Wurzel,- sowie Sprosswachstum. Bisher sind von dem Enzym sowohl ein bakterielles als auch ein humanes Homolog bekannt.<sup>6</sup>
- Diflufenican: Diese Substanz inhibiert die Carotinoid-Synthese und damit Teile der Photosynthese. Außerdem können Sauerstoff-Radikale nicht mehr ausreichend abgebaut werden.<sup>7,8</sup>

**Tabelle 1: Liste der getesteten Herbizide und Adjuvantien.** Registrationsnummern sind nur für Herbizide allerdings nicht für Adjuvantien verfügbar. Alle Daten über Herbizide wurden dem Pflanzenschutzmittelregister entnommen.<sup>9</sup> Daten zu den Adjuvantien Wetcit®, Grounded® und Karibu® stammen aus den jeweiligen Sicherheitsdatenblätter.<sup>10-12</sup>

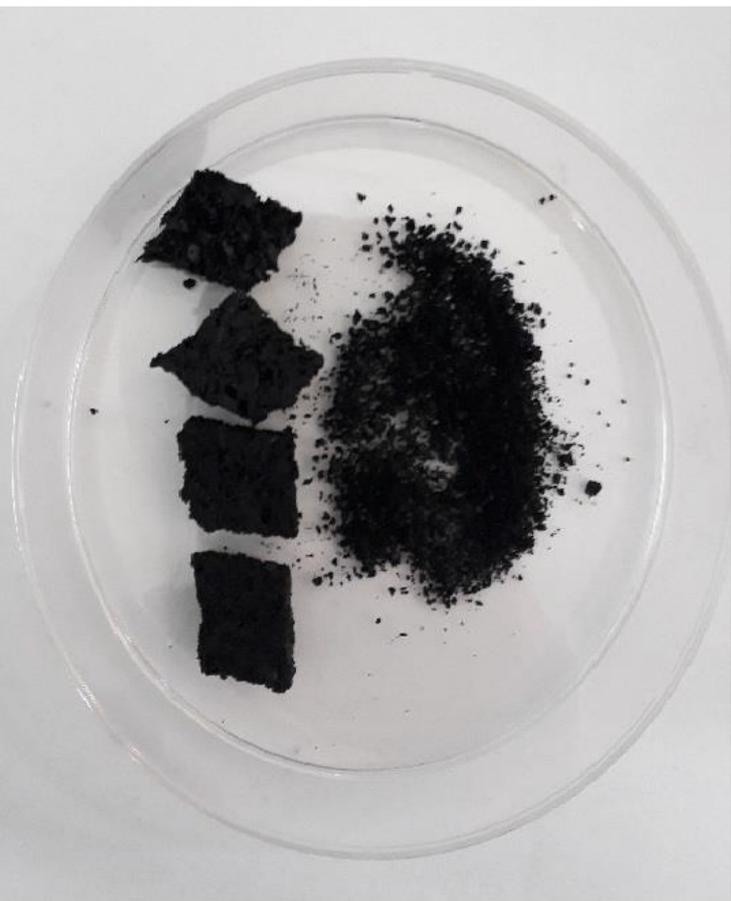
<b>Produkt + Registrationsnummer</b>	<b>Aktiver Wirkstoff</b>	<b>Konzentration des aktiven Wirkstoffs</b>	<b>Volumen / Masse des Produkts in V H<sub>2</sub>O pro ha an Zielfläche</b>
Touchdown® Quatro (2809-0)	Glyphosat vorliegend als Glyphosat Ammoniumsalz	360 g/L, (435 g/L)	7,5 L/ha in 100-600 L/ha
Biohelp Finalsan® Plus (3056-901)	Pelargonsäure (Nonansäure)	186,7 g/L	167 L/ha in 1000 L/ha
	Maleinsäurehydrazid	30 g/L	
Nozomi® (3013-0)	Flumioxazin	500 g/kg	1,2 kg/ha in 200-800 L/ha
Valdor® Flex (3775-0)	Iodosulfuron	9,31 g/kg	0,5 kg/ha in 300-500 L/ha
	Diflufenican	360 g/kg	
	Iodosulfuron Methylester- Natriumsalz	10 g/kg	
Chikara® (3106-0)	Flazasulfuron	250 g/kg	200 g/ha in 200-400 L/ha
Wetcit®	Terpene aus der Orange, alkoholische C12-C14 ethoxylisierte Sulfat- Ammoniumsalze, sekundär ethoxylisierte C11-C15 Alkohole	Keine Angabe im Herstellerblatt	0,3 % des Mixtur- Volumen
Grounded®	aliphatische Kohlenwasserstoff-Öle	Keine Angabe im Herstellerblatt	0,4 L in 500 L
Karibu®	Polyether- Polymethylsiloxan-Co- Polymere	1030 g/L	200 ml/ha

## 2. METHODEN:

### 2.1. Fraktionierung und Leaching der BSW bewuchshemmenden Matte:

Die BSW Regupol bewuchshemmende Matte Typ 767 wurde in 2 Größenfraktionen verarbeitet (siehe Abbildung 1), um das Herauswaschen von Substanzen aus dem Mattenkörper als auch aus dem Abrieb zu testen. Für die Fraktion 1 oder auch Fraktion „grob“ wurde die BSW-Wurzelbarriere in 1 cm<sup>3</sup> Würfel geschnitten. Fraktion 2 oder auch Fraktion „fein“ wurde erhalten, indem Würfel der BSW-Wurzelbarriere mit flüssigem Stickstoff gefroren und dann gemahlen wurden. Das Einfrieren der Matte wurde durchgeführt, um ein Verbrennen des Kunststoffes durch Reibungshitze zu vermeiden. Durch das Zerkleinern konnten kleine Fragmente (< 2,5 mm) erhalten werden, welche den Abrieb der BSW-Wurzelbarriere durch z.B. Fußgänger simulieren sollen.

<b>Hersteller</b>	<b>BSW</b>
<b>Produktname</b>	Regupol Bewuchshemmende Matte Typ 767
<b>Rohstoff</b>	PUR gebundene Elastomere auf SBR- Kautschuk Basis
<b>Faser</b>	Elastomerkorn, gehäckselte Autoreifen
<b>Höchstzugkraft</b>	0,75 N/mm <sup>2</sup>
<b>Wasserdurchlässigkeit</b>	7,05
<b>Gewicht</b>	6320 - 7900
<b>Temp.beständigkeit</b>	minus 40 bis 115°C
<b>Brandverhalten</b>	normal entflammbar
<b>Nutzungsdauer</b>	-
<b>Dicke</b>	8 bis 10, oder dicker a. Anfr.
<b>Farbe</b>	Schwarz
<b>Preis (netto)exkl. Lieferung</b>	15,5
<b>Vorrat</b>	60 (10mm stark)
<b>Format/ Abmessungen</b>	6 Rollen 1,5*10
<b>Verlegung</b>	1 lagig, mit Erdnägeln fixiert



**Abbildung 1: BSW Regupol bewuchshemmende Matte Typ 767.** Links: Technische Daten. Rechts: BSW Regupol bewuchshemmende Matte Typ 767 in den 2 verwendeten Fraktionen.

Um ökotoxikologische Tests durchzuführen wurden beide Fraktionen mit dem jeweiligen Testmedium in einem 50 ml-Gefäß vermischt und mindestens 24 Stunden lang auf einem Schüttler inkubiert, um eventuelle lösliche Stoffe aus der Matte zu extrahieren. Die Exposition der Organismen wurde dann mit diesem Medium durchgeführt.

## 2.2. Durchführung der ökotoxikologischen Tests:

Die Methoden, die zur Auswertung der Toxizität der unterschiedlichen Herbizid-Mixturen während des Projektes Green-LOGIX von der FH Technikum Wien angewendet wurden, basieren alle auf Richtlinien der Organisation für Wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD; siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2: Übersicht der verwendeten OECD-Richtlinien**

<b>OECD-Richtlinie No.</b>	<b>Benennung der Richtlinie</b>	<b>Testbezeichnung/ Abkürzung</b>
129	Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests	Neutralrot-Test (Neutral Red Uptake [NRU])
201	Freshwater algae and cyanobacteria, growth inhibition assay	Algen-Wachstumshemmungstest (Algal growth Inhibition [AGI])
236	Fish embryo acute toxicity (FET) test	Fischembryo-Toxizitätstest (FET)
54	Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicological data: a guidance to application	Statistische Datenauswertung

Die folgenden Unterpunkte geben eine kurze Beschreibung des Ablaufs jedes Tests. Eine detaillierte Auflistung des Ablaufs kann in den OECD-Richtlinien gefunden werden, weiters werden Abweichungen von den jeweiligen Richtlinien in Anhang IV (Seite 83) beschrieben.<sup>13-</sup>

Zur Bestimmung des Konzentrationsbereiches der Testsubstanzen wurden jeweils Vortests mit dem Verdünnungsfaktor 5 durchgeführt. Zur genaueren Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Werte wurden Haupttests mit einem Verdünnungsfaktor von 1-3 durchgeführt.

#### 2.2.1. OECD Richtlinie No. 129:

Für den Neutralrot-Test wurde die Zelllinie BALB/c 3T3 für 6 Tage in T75-Kulturflaschen mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % Glutamin (2 mM) und 1 % Pen-Strep (DMEM + Zusätze = DMEM<sup>+++</sup>) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

An Tag 1 des Tests wurden die kultivierten Zellen aus den T75-Flaschen mit Trypsin gelöst, gezählt, in 96-Well-Platten ausgesät und mit DMEM<sup>+++</sup> für 24 Stunden inkubiert, um ein Anwachsen der Zellen zu garantieren. An Tag 2 wurde zuerst die Herbizid-Mischung in DMEM mit 1 % Glutamin (2 mM) und 1 % Pen-Strep allerdings ohne FCS hergestellt. Die Herstellung der Herbizid-Mixturen wurde außerhalb einer sterilen Werkbank durchgeführt. Diese Mixturen wurden dann in einer sterilen Werkbank sterilfiltriert, indem sie durch einen 45 µm-Filter und nachfolgend durch einen 22 µm-Filter gefiltert wurden. An Tag 3 erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen. An Tag 4 wurden die Platten zuerst mittels eines Lichtmikroskops kontrolliert. Danach wurde die Neutralrot-Lösung (25 g/L Neutralrot in DMEM<sup>+++</sup>) nach den Angaben der OECD-Richtlinie hergestellt. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 4 Stunden auf 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und das von den Zellen aufgenommene Neutralrot mittels einer Desorb-Lösung (49 Teile H<sub>2</sub>O, 50 Teile Ethanol [100 %] und 1 Teil Eisessigsäure) aus den Zellen gelöst. Schließlich wurde die Absorption der entstandenen Lösung mittels eines Spektrometers bei 540 nm mit einer Referenzwellenlänge bei 650 nm (Tecan SUNRISE) gemessen.

#### 2.2.2. OECD Richtlinie No. 201:

Für den Algen-Wachstumshemmungstest wurde eine *Raphidocelis subcapitata*-Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Dazu musste die Kultur 6 Tage vor Testbeginn im Testmedium verdünnt werden. Ein steriler Erlenmeyerkolben wurde dafür mit 149 ml Bold Modified Basal Freshwater Nutrient Solution (BMBF)-Medium (pH = 7,5) gefüllt und 1 ml der älteren Algenkultur hinzugefügt.

Zu Testbeginn wurden die Herbizid-Mischungen mit einem Verdünnungsfaktor von 5 für Vortests und 2 für Haupttests im BMBF-Medium hergestellt. Die Algen wurden mit einer Konzentration von 5000 Zellen pro Well (96-well Platte; 100 µL pro Well) ausgesät. Zu den

Zeitpunkten 0h, 24h, 48h und 72h wurde zur Bestimmung der Algendichte die Fluoreszenz mittels eines Fluorometers (Glomax PROMEGA) gemessen.

### 2.2.3. OECD Richtlinie No. 236:

Um den Fischembryo-Toxizitätstest zu beginnen sind frisch befruchtete Eier des Zebrafisches *Danio rerio* notwendig. Dazu wurde am Tag vor dem Testbeginn ein Brut-Setup mit adulten Individuen durchgeführt. Männchen und Weibchen wurden durch einen Separator getrennt für 8 Stunden in einen Zuchtank gesetzt, welcher in ein gewärmtes Brut-Aquarium (ca. 26°C) gestellt wurde. Am nächsten Morgen wurden die Separatoren entfernt und den Individuen wurde 1-1,5 Stunden zur Fortpflanzung gegeben.

In diesen 1-1,5 Stunden wurden die Herbizid-Mischungen sowie deren Verdünnungen in Erlenmeyerkolben hergestellt. Nach der Brutzeit wurden die befruchteten Eier gesammelt und mit den verschiedenen Konzentrationen der Herbizid-Mischungen exponiert. Befruchtete Eier wurden dann mit der dazugehörigen Konzentration der Mischungen in 24-Well-Platten inkubiert. Ein befruchtetes Ei wurde mit 2 ml der Herbizid-Mischung in einem Well der Platte platziert und darin für 5 Tage inkubiert. Die Entwicklung der Embryos wurde alle 24 Stunden unter einem Lichtmikroskop beobachtet und nach den Kriterien der OECD-Richtlinie bewertet.

### 2.2.4. Chemische Analytik:

Von den in den Richtlinien vorgeschlagenen analytischen Tests wurde das Messen des pH-Wertes vor jedem Test durchgeführt. Die Auflistung der pH-Messungen sind in Anhang III (Seite 77-82) zu finden.

## 2.3. Statistik:

Die OECD-Richtlinie No. 129 gibt keine genauen statistischen Auswertungen an, daher wurde für die Zelltests eine Dosis-Wirkungskurve generiert. Dazu wurden auf der x-Achse die Konzentration der Prüfsubstanz in logarithmischem Maßstab gegen die gemessene Wirkung (Absorptionswerte normalisiert durch die Negativkontrolle) auf der y-Achse aufgetragen.

Zur Charakterisierung der Wirkungsstärke wurde diejenige Konzentration verwendet, die eine halbmaximale Wirkung erzeugt. Der erhaltene  $EC_{50}$ -Wert gibt also an, bei welcher Effektkonzentration eine 50%ige Wirkung beobachtet bzw. gemessen wurde.

Der Richtlinie No. 201 folgend, wurde für die Algen die durchschnittliche Wachstumsrate, die Inhibition sowie die Inhibition der Biomassezunahme berechnet. Die dafür verwendeten Formeln findet man in der OECD-Richtlinie 201.

Laut Richtlinie No. 236 ist der Prozentsatz der Fische zu berechnen, welcher eines oder mehrere der in der Richtlinie spezifizierten Symptome (Koagulation des Embryos/Eies, Somiteformation, Schwanzablösung vom Dottersack, fehlender Herzschlag) zeigten. Diese Prozentzahl wurde dann für die Dosis-Wirkungskurve verwendet.

Als statistisches Modell im Programm GraphPad Prism v6. wurde eine nicht-lineare Regression unter Annahme eines sigmoidalen Kurvenverlaufs mit Werten der x-Achse = logarithmisch sowie mind. 4 Werten (4PL) verwendet.

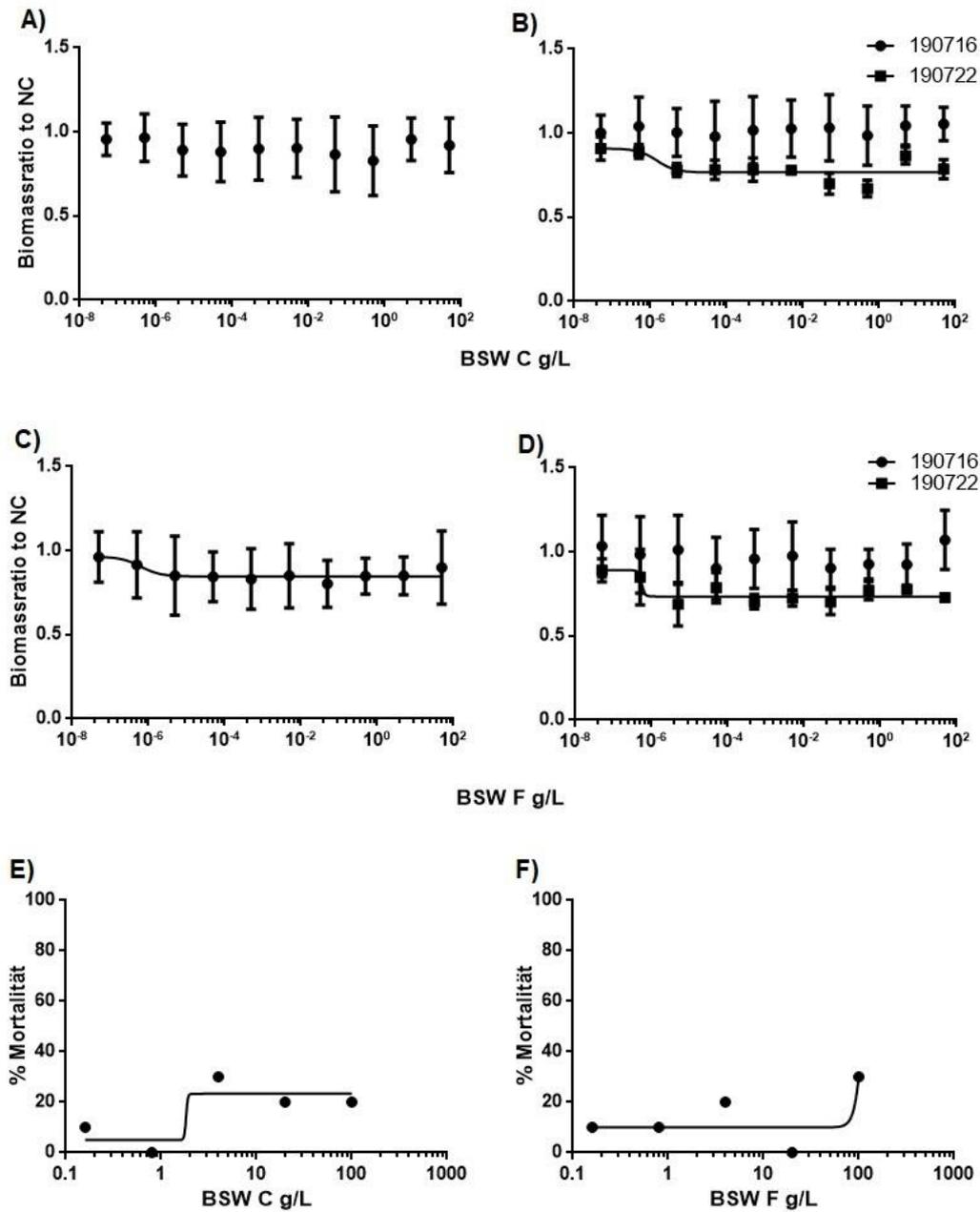
### 3. RESULTATE:

#### 3.1. BSW Regupol bewuchshemmende Matte Typ 767:

Die 24h-Extrakte der beiden Größenfraktionen (grob/eng.: coarse – C; fein/eng.: fine – F) der BSW Regupol bewuchshemmenden Matte wurden mit Algen und Fischembryos getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt. Die Algendichte der verschiedenen Konzentrationen auf einer Testplatte wurde gegen die Algendichte der Negativkontrolle normalisiert, um einen besseren Vergleich zu ermöglichen. In den Graphen wird es als „Biomassratio to NC“ (siehe Abbildung 2, A-D) angegeben. Liegt dieser Wert bei ~ Eins, dann konnte keine Hemmung des Algenwachstums durch Einfluss von Testsubstanzen im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet werden.

In Abbildung 2 B und D sind jeweils die Werte der einzelnen Testdurchgänge ersichtlich, in Abb. 2 A und C sind die gepoolte Werte daraus (Mittelwerte der Einzeltests) dargestellt. Abbildung 2 A - D (Algen-Wachstumshemmungstest) zeigen, dass sowohl Algen behandelt mit dem Extrakt der Feinfraktion (Abb.2, A und B) als auch der Grobfraktion (Abb. 2, C und D) keine bedeuteten Unterschiede in der Algendichte (y-Achse) zwischen den einzelnen Konzentrationen (x-Achse) aufwiesen. Somit konnten keine Dosis-Wirkungskurven mit sigmoidalen Verlauf berechnet werden.

Wie aus den Ergebnissen der Fischembryo-Toxizitätstests im Graphen E und F der Abbildung 2 ersichtlich, konnten auch hier keine sigmoidalen Dosis-Wirkungskurven erstellt werden. Die Mortalität zeigt keine größere Abweichung in den unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zu Negativkontrolle. Die Mortalität der Negativkontrollen aller in diesem Projekt durchgeführten Fischembryo-Toxizitätstests ist in Anhang V, Tabelle 35, Seite 84, aufgelistet. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch herausgelöste Substanzen (24h-Extrakte) der BSW Regupol bewuchshemmende Matte Typ 767 keine akut-toxischen Effekte auf Algen oder Fischembryos beobachtet werden konnten.



**Abbildung 2: Dosis-Wirkungskurven der AGI-Tests mit den 2 Größenfraktionen der BSW Regupol bewuchshemmenden Matte Typ 767. A-D Algen-Wachstumshemmungstest , E,F Fischembryo-Toxizitätstest. Gepoolte Daten von zwei durchgeführten AGI Tests der BSW C-Fraktion (A) und der F-Fraktion (C). Werte der einzelnen AGI-Tests mit der BSW C-Fraktion (B) und F-Fraktion (D). FET-Test mit der BSW C-Fraktion (E) und der F-Fraktion.**

### 3.2. Effektive Konzentrationen der Herbizide:

Vergleicht man bei den Fischembryos- und Zelltests die  $EC_{50}$ -Werte von Touchdown® Quattro (NRU: 0,73 g/L; FET: 0,038 g/L) und biohelp Finalsan® Plus (NRU: 1,37 g/L; FET: 0,21) g/L) in Tabelle 2, ist erkennbar, dass Touchdown® Quattro niedrigere Werte aufweist und damit in geringeren Konzentrationen toxisch wirkt als biohelp Finalsan® Plus. Bei Algen weisen die  $EC_{50}$ -Werte von Touchdown® Quattro (0,45 g/L) und biohelp Finalsan® Plus (0,37 g/L) einen umgekehrten Effekt auf.

Generell zeigen die Herbizide Nozomi® ( $EC_{50}$ -Wert = 0,000012), Valdor® Flex ( $EC_{50}$ -Wert = 0,0000018) und Chikara® ( $EC_{50}$ -Wert = 0,000026) stärkere Effekte auf Algen im Vergleich zu Touchdown® Quattro ( $EC_{50}$ -Wert = 0,45) oder biohelp Finalsan® Plus ( $EC_{50}$ -Wert = 0,37). Bei *Danio rerio*-Embryos konnte dieser Effekt zumindest bei Nozomi® ( $EC_{50}$ -Wert = 0,54) und Chikara® ( $EC_{50}$ -Wert = 1,4) jedoch nicht beobachtet werden. Bei dem Herbizid Valdor® Flex wurde bis zu einer Höchstkonzentration von 0,1 g/L getestet, bis zu dieser Konzentration konnten keine negativen Effekte festgestellt werden (siehe Anhang I, Abbildung 24, Seite 65).

Weiters kann man erkennen, dass bei den Herbiziden Nozomi® und Touchdown® Quattro eine Zugabe von Wetcit® zur Mischung zu einer Erhöhung der Toxizität führte, erkennbar durch eine Verringerung des  $EC_{50}$ -Wertes um den Faktor 2-10 (z.B. AGI-Test: Nozomi® ohne Wetcit®  $EC_{50}$ -Wert = 0,000012 vs. Nozomi® + Wetcit® = 0,0000014).

Falls Effekte beobachtet wurden, konnte bei den durchgeführten Tests weitgehend keine grobe Abweichung vom sigmoidalen Kurvenverlauf beobachtet werden (Anhang I, Seite 40-72).

Bei Zelltests mit den Herbizidmischungen biohelp Finalsan® Plus mit Chikara® und biohelp Finalsan® Plus mit Nozomi® kam es aufgrund einer unzureichenden Anzahl von Testpunkten im 100%- bzw. 0%-Effekt Bereich zu unzuverlässigen Berechnungen des  $EC_{50}$ -Wertes, was bei den jeweiligen Ergebnissen durch einen Stern (\*) in Tabelle 2 angegeben wird. Die Werte der Einzeltests sind im Anhang I (Abbildung 12B und 13B, Seite 50 und Seite 51) ersichtlich. Für die Berechnung des  $EC_{50}$ -Wertes wurden nur Werte der Dosis-Wirkungskurve mit sigmoidalen Verlauf herangezogen (z.B. bei Abbildung 12B, Seite 50 im Anhang I wurde nur die Datenreihe 200724 für die Berechnung herangezogen).

Wurde generell der 100%- oder 0%-Effektbereich bei den Tests nicht erreicht, dann konnte keine genaue Berechnung des  $EC_{50}$ -Wertes durchgeführt werden. Dies wurde in Tabelle 2 mit der Bemerkung „unzureichende Daten“ eingetragen. Bei Gemischen aus mehreren Herbiziden wurde der  $EC_{50}$ -Wert des Hauptwirkstoffes angegeben. Sind also beispielsweise biohelp

Finalsan® Plus oder Touchdown® Quattro in der Mischung enthalten, dann bezieht sich der EC<sub>50</sub>-Wert im Fall von biohelp Finalsan® Plus auf Pelargonsäure (PA) und im Fall von Touchdown® Quattro auf Glyphosat (GL). Bei Gemischen, die nur die Herbizide Valdor® Flex, Chikara®, Nozomi® und Adjuvantien (Wetcit®, Grounded®) beinhalten, wurde der EC<sub>50</sub>-Wert von Nozomi® angegeben, da dieses Herbizid immer in einer höheren Konzentration als Chikara® und Valdor® Flex vorlag. Die Angabe der genauen Konzentrationen aller Inhaltsstoffe in den Gemischen ist in den Tabellen der detaillierteren Auflistung im Anhang I (Seite 40-72) zu finden.

**Tabelle 3: EC<sub>50</sub>-Werte der Herbizide bzw. Herbizidmischungen.** Unterteilt wurde die Tabelle in Konz. [g/L] der Formulierung (F) und Konz. [g/L] der aktive Substanz (AS). Für Wetcit® und Grounded® wurde die Konzentration in Volumenprozent (% v/v) angegeben. Da die Hersteller keine Angabe über die Konzentration der aktiven Substanzen in Wetcit® und Grounded® lieferten, konnten keine EC<sub>50</sub>-Werte für die aktiven Substanzen berechnet werden. Dies wurde mit „keine Angabe“ notiert. Die jeweils niedrigsten Werte im Vergleich der drei Tests sind rot markiert.

Mischungen	Neutralrot-Test		Algen-Wachstumshemmungstest		Fischembryo-Toxizitätstest	
	Konz. (g/L) F	Konz. (g/L) AS	Konz. (g/L) F	Konz. (g/L) AS	Konz. (g/L) F	Konz. (g/L) AS
Touchdown® Quattro	0,73	0,21	0,45	0,13	<b>0,038</b>	<b>0,0011</b>
Touchdown® Quattro + Wetcit®	0,33	0,096	0,0052	0,0015	<b>0,0028</b>	<b>0,0008</b>
Touchdown® Quattro + Karibu®	0,035	0,01	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
biohelp Finalsan® Plus	1,37	0,26	0,37	0,071	<b>0,21</b>	<b>0,041</b>
biohelp Finalsan® Plus + Wetcit®	1,11	0,21	<b>0,17</b>	<b>0,033</b>	0,31	0,059
biohelp Finalsan® Plus + Chikara®	0,90*	0,17*	<b>0,0079</b>	<b>0,0015</b>	unzureichende Daten	unzureichende Daten

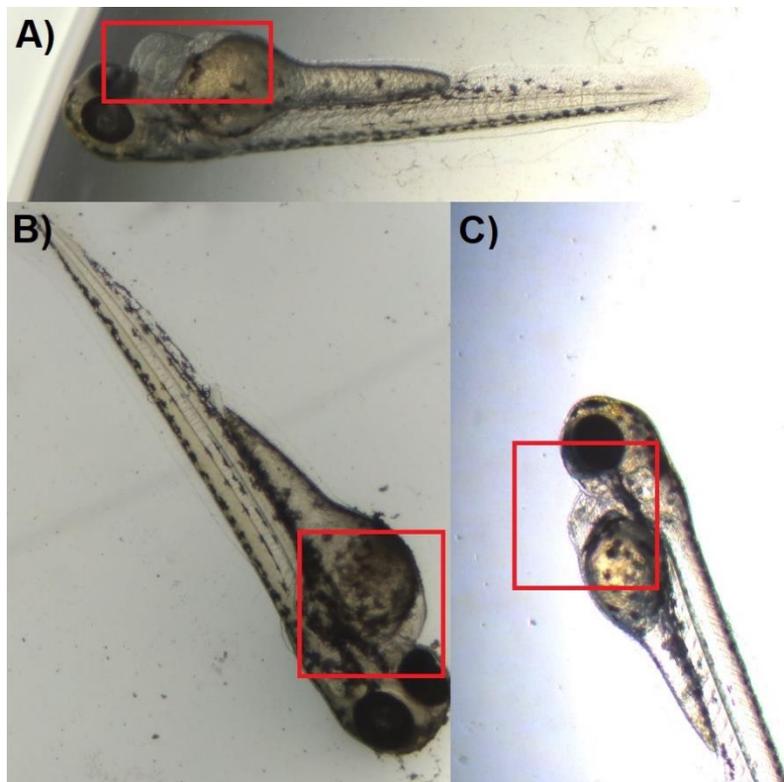
Mischungen	Neutralrot-Test		Algen-Wachstumshemmungstest		Fischembryo-Toxizitätstest	
	Konz. (g/L) F	Konz. (g/L) AS	Konz. (g/L) F	Konz. (g/L) AS	Konz. (g/L) F	Konz. (g/L) AS
biohelp Finalsan® Plus + Nozomi®	0,84*	0,16*	<b>0,00023</b>	<b>0,000044</b>	0,29	0,056
biohelp Finalsan® Plus + Nozomi® + Wetcit®	0,84	0,16	<b>0,00047</b>	<b>0,000090</b>	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
biohelp Finalsan® Plus + Valdor® Flex + Wetcit®	0,079	0,15	<b>0,0011</b>	<b>0,00022</b>	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Nozomi®	unzureichende Daten	unzureichende Daten	<b>0,000012</b>	<b>0,000006</b>	0,54	0,27
Nozomi® + Wetcit®	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	0,0000014	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Nozomi® + Grounded®	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	0,0000062	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Nozomi® + Chikara®	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	<b>0,0000021</b>	<b>0,00000105</b>	0,52	0,26

Mischungen	Neutralrot-Test		Algen-Wachstumshemmungstest		Fischembryo-Toxizitätstest	
	Konz. (g/L) F	Konz. (g/L) AS	Konz. (g/L) F	Konz. (g/L) AS	Konz. (g/L) F	Konz. (g/L) AS
Nozomi® + Chikara® + Wetcit®	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	0,0000014	0,0000007	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Chikara®	unzureichende Daten	unzureichende Daten	<b>0,000026</b>	0,0000065	1,4	0.35
Chikara® + Wetcit®	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	0,000023	0,00000575	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Chikara® + Karibu®	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	0,000015	0,00000375	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Valdor® Flex	unzureichende Daten	unzureichende Daten	0,0000018	0,000000648	unzureichende Daten	unzureichende Daten
Valdor® Flex + Wetcit®	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	0,0000025	0,0000009	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Valdor® Flex + Karibu®	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	0,0000018	0,000000648	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Karibu®	0.0000194	0,0002	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
<b>Adjuvantien</b>	<b>Konz. % v/v F,</b>	<b>Konz. % v/v AS</b>	<b>Konz. % v/v F</b>	<b>Konz. % v/v AS</b>	<b>Konz. % v/v F</b>	<b>Konz. % v/v AS</b>
Wetcit®	0,028	keine Angabe	0,011	keine Angabe	<b>0,0014</b>	keine Angabe
Grounded®	0,08	keine Angabe	0,80	keine Angabe	<b>0,005</b>	keine Angabe

### 3.3. Visuelle Beobachtungen:

#### 3.3.1. Ödeme des Herzbereichs:

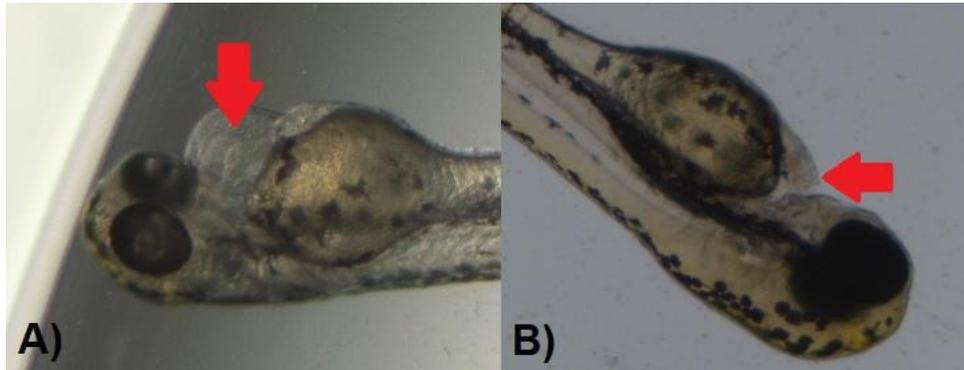
In den getesteten Formulierungen und Mischungen der Herbizide biohelp Finalsan® Plus und Nozomi® konnte die Bildung von Ödemen um den Herzmuskel beobachtet werden (Abbildung 3). Ähnliches konnte auch bei einigen Individuen beobachtet werden, die mit Nozomi® oder mit einer Mischung aus biohelp Finalsan® Plus und Wetcit® sowie mit Grounded® behandelt wurden, die Ausmaße des Ödems waren in diesen Fällen aber um einiges geringer. Es konnte in den Versuchen beobachtet werden, dass Larven, die in frühen Entwicklungsstadien (24h-48h) ein Ödem hatten, dieses mit Dauer des Tests zurückbildeten.



**Abbildung 3: *Danio rerio*-Larven, 72 Stunden nach Befruchtung (hpF) mit Ödem in unterschiedlicher Größe (rot markierte Zone).** A) Behandelt mit einer Gesamtkonzentration von 0,21 g/L biohelp Finalsan® Plus und 0,003 g/L Nozomi®, Ödem stark ausgeprägt. B) Behandelt mit 0,5 g/L Nozomi®, Ödem mittelmäßig ausgeprägt. C) Behandelt mit 0,16 g/L biohelp Finalsan® Plus und 0.00029 %v/v Wetcit®, Ödem leicht ausgeprägt.

### 3.3.2. Farbloses Blut:

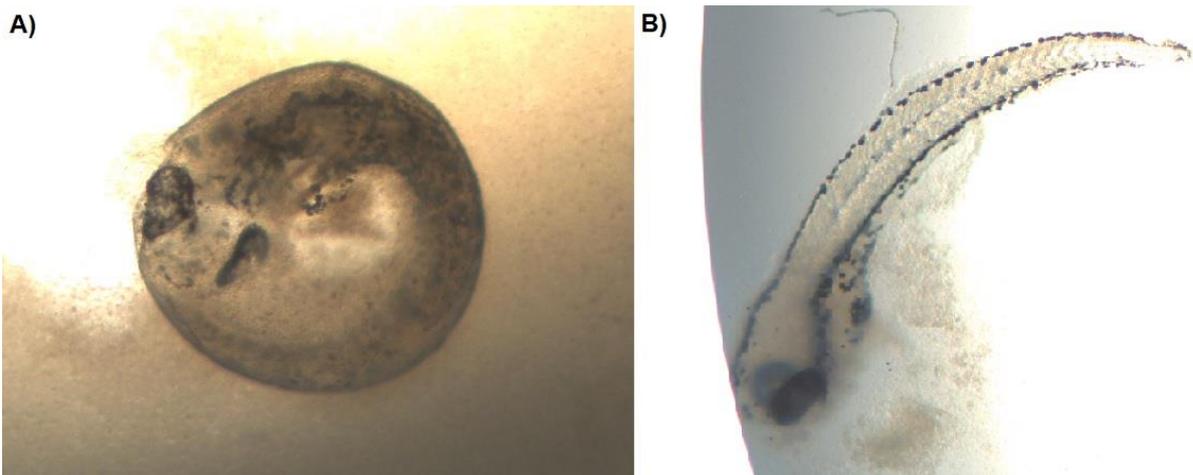
*Danio rerio*-Larven, die einer Konzentration von mindestens 0.00016 g/L Nozomi® ausgesetzt wurden, bildeten farbloses Blut. Die entfärbten Blutplättchen waren auch unter der 20-fachen Vergrößerung des Mikroskops kaum sichtbar (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** *Danio rerio*-Larven 72 hpF. A) Larve behandelt mit einer Gesamtkonzentration von 0,21 g/L biohelp Finalsan® Plus und 0,003 g/L Nozomi®. Im Herz können durch die Entfärbung des Blutes keine Blutplättchen erkannt werden, die Blutflüssigkeit sieht farblos aus. B) In Vergleich dazu ist eine Larve der Negativkontrolle abgebildet, die Färbung des Blutes im Herz ist sichtbar.

### 3.3.3. Auflösung der Larven:

In höheren Konzentrationen (0,5 g/L bis 12,5 g/L) des Herbizids Chikara® als auch im Adjuvant Grounded® bei einer Mindestkonzentration von 0,004 % v/v konnte beobachtet werden, dass diese Substanzen in der Mischung den Körper der Larven bereits im Ei, spätestens nach dem Schlüpfen angreifen und auflösen, dargestellt in Abbildung 5.

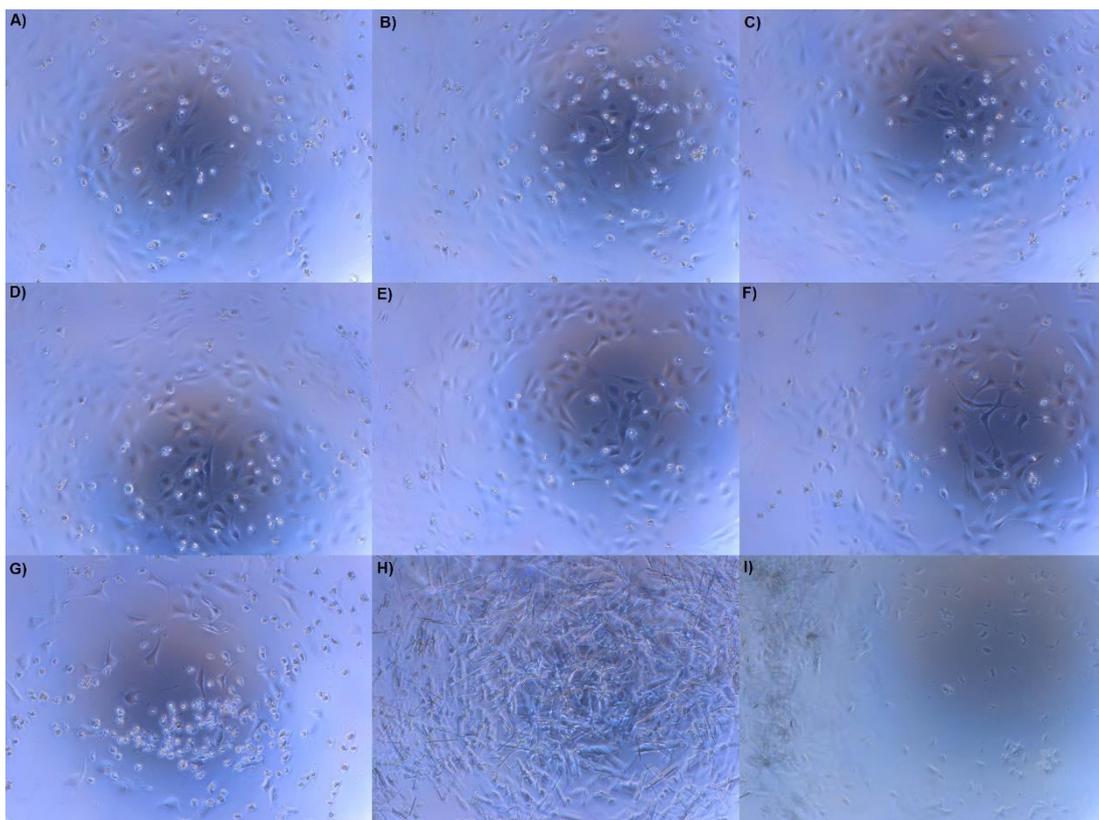


**Abbildung 5:** *Danio rerio*-Larven aufgelöst von dem Herbizid Chikara® und Adjuvant Grounded®. A) 72 hpF, exponiert mit einer Gesamtkonzentration von 2,5 g/L Chikara®. B) 96 hpF, exponiert mit 0,02 % v/v Grounded®.

### 3.3.4. Zell-Morphologie:

Abbildung 6 zeigt die Morphologie der Zellen auf einer Zellkultur-Platte in unterschiedlichen Konzentrationen von biohelp Finalsan® Plus (0,000128 g/L - 10 g/L Pelargonsäure in biohelp Finalsan® Plus). Es ist sehr gut sichtbar, dass sich ab 0,08 g/L biohelp Finalsan® Plus (Abb. 6; F) die Zahl der angehefteten Zellen reduziert, ab 0,4 g/L (Abb. 6; G) schon mehr gelöste Zellen vorliegen und ab 2,0 g/L (Abb. 6; H und I) die Zellen bereits aufgelöst sind. Die kristallinen Strukturen in H) und I) sind Stoffe aus der Mischung, die nicht näher identifiziert werden konnten. Der gezeigte Verlauf der Zellmorphologie ist repräsentativ für alle Tests, welche die Herbizide biohelp Finalsan® Plus bzw. Touchdown® Quattro (Testkonzentration ebenfalls von 0,000128 g/L – 10 g/L Glyphosat in Touchdown® Quattro) beinhalteten.

Die Zellen inkubiert mit den Herbiziden Nozomi®, Chikara® und Valdor® Flex (getestete Maximalkonzentration: 0,1 g/L) zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle nur teilweise Unterschiede, jedoch waren die Effekte so gering, dass keine Dosis-Wirkungskurven generiert werden konnten.



**Abbildung 6: Aufnahme der Zellen mit einem Lichtmikroskop mit 20-Facher Vergrößerung.** Negativkontrolle (A), Biohelp Finalsan® Plus in den Konzentrationen 0,000128 g/L (B); 0,00064 g/L (C); 0,0032 g/L (D); 0,016 g/L (E); 0,08 g/L (F); 0,4 g/L (G); 2 g/L (H) und 10 g/L (I).

### 3.4. Verbleib in der Umwelt:

Die Persistenz der Substanzen (siehe Tabelle 4) zeigt, dass die aktive Wirksubstanz Pelargonsäure in Biohelp Finalsan® Plus innerhalb weniger Tage abgebaut wird, die Wirksubstanzen in den Herbiziden Nozomi®, Chikara® und Valdor® Flex jedoch eine höhere Persistenz in der Umwelt aufweisen.

Vergleicht man die Persistenz der aktiven Substanzen in den Herbiziden Nozomi®, Chikara® und Valdor® Flex, so zeigt sich, dass Flumioxazin (Nozomi®) und Flazasulfuron (Chikara®) beide eine mittlere Verweildauer aufweisen, Iodosulfuron und Diflufenican in Valdor®Flex allerdings eine mittlere bis hohe Persistenz zeigen.

Betrachtet man in weiterer Folge ebenso die Persistenz der Metaboliten von Flumioxazin und Flazasulfuron (siehe Anhang II, Seite 73-74, Tabelle 30-31), so ist zu erkennen, dass die verfügbaren Daten zur Persistenz der Metaboliten von Flumioxazin (Nozomi®) eine geringe Verweildauer in der Umwelt angeben. Demgegenüber ist eine sehr hohe Persistenz einiger Metabolite von Flazasulfuron (Chikara®) wie z.B. von 3-(Trifluoromethyl)pyridin-2-sulfonamid bekannt.

**Tabelle 4: Persistenz der aktiven Substanzen inklusive ihrer Metaboliten nach Evaluierung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA).** Diese ordnete jeder aktiven Substanz nach Betrachtung und Peer-Review verschiedener eingereicherter Tests eine Persistenz zu, die die Verbleibdauer in der Umwelt charakterisiert. Eine detaillierte Auflistung der aktiven Substanzen in den verschiedenen Umweltbedingungen sowie der Metaboliten kann in Anhang II (Seite 73-77) gefunden werden.

Formulierung	Aktive Substanz	Persistenz (nach EFSA)
Touchdown® Quattro	Glyphosat	niedrige bis sehr hohe Persistenz
Biohelp Finalsan® Plus	Pelargonsäure	nicht persistent
Biohelp Finalsan® Plus	Maleinsäurehydrazid	niedrige bis mittlere Persistenz
Nozomi®	Flumioxazin	mittlere Persistenz
Chikara®	Flazasulfuron	mittlere Persistenz
Valdor® Flex	Iodosulfuron	mittlere bis hohe Persistenz
Valdor® Flex	Diflufenican	hohe Persistenz

## 4. DISKUSSION:

### 4.1. BSW Regupol bewuchshemmende Matte Typ 767:

Sowohl bei ökotoxikologischen Tests mit Extrakten größerer Mattenstücke als auch des Feinabriebs konnten keine negativen Effekte auf die Testorganismen beobachtet werden (siehe Abbildung 2, Seite 18). Ein Großteil der möglicherweise gelösten Stoffe aus den Matten sind einfache Kohlenwasserstoff-Verbindungen oder Spuren von Metallen. Die Metalle liegen laut Selbes *et al.*<sup>16</sup> in so geringen Mengen vor, dass keine akuten toxischen Effekte zu erwarten sind, chronische Effekte können durch Akkumulation jedoch nicht ausgeschlossen werden. Allerdings könnte das potentielle Verhalten des Mattenabriebs als Schadstoffvehikel zu ungewollten Effekten führen. Dabei könnte sich das Verhalten des Abriebs / Mikrogummis an das Verhalten von Nano-Partikeln annähern.

Auch wenn in den letzten Jahren der Anteil der Erdöl-basierenden Inhaltsstoffe in Autoreifen reduziert wurde, könnten die Geruchssignale dieser Stoffe dazu führen, dass Tiere die Matte als mögliche Nahrung in Betracht ziehen. Ähnliche Effekte wurden bereits bei Vögeln, Meeressäugern, Fischen und Amphibien beobachtet, die Plastik als Nahrung aufnehmen.<sup>17</sup> Letzteres könnte durch kontinuierliche Kontrolle der Matten auf Fraßschäden leicht überprüft werden.

## 4.2. Vergleich der Herbizide:

Die amerikanische Environmental Protection Agency (EPA) ordnet die EC<sub>50</sub>-Werte aus ökotoxikologischen Tests in verschiedene Kategorien der Toxizität. In Tabelle 5 ist ersichtlich, welchen Kategorien die getesteten Herbizide aufgrund der Ergebnisse der FET- und AGI-Tests zugeordnet wurden. NRU-Ergebnisse wurden nicht berücksichtigt, da zytotoxikologische Tests für die Einordnung nicht von der EPA vorgesehen sind.

**Tabelle 5: EPA-Klassifizierung von Herbiziden.** Die obersten Reihen geben die Klassifizierung nach der Konzentration [mg/L] an. Die getesteten Formulierungen wurden aufgrund der erhaltenen EC<sub>50</sub>-Werte nach der Klassifizierung eingeteilt.<sup>18</sup> F...Formulierung; AS...aktive Substanz

EPA-Klassifizierung: Akute Tests aquatischer Organismen in mg/L					
Sehr stark toxisch: <0,1	Stark toxisch: 0,1-1	Moderat toxisch: >1-10	Leicht toxisch: >10 - 100	Praktisch nicht toxisch: > 100	
Klassifizierung:					
	AGI		FET		
	Konz. F	Konz. AS	Konz. F	Konz. AS	
Touchdown® Quattro	praktisch nicht toxisch	praktisch nicht toxisch	moderat toxisch	moderat toxisch	
biohelp Finalsan® Plus	leicht toxisch	praktisch nicht toxisch	praktisch nicht toxisch	leicht toxisch	
Nozomi®	sehr stark toxisch	sehr stark toxisch	praktisch nicht toxisch	praktisch nicht toxisch	
Chikara®	sehr stark toxisch	sehr stark toxisch	praktisch nicht toxisch	praktisch nicht toxisch	
Valdor® Flex	sehr stark toxisch	sehr stark toxisch	unzureichende Daten	unzureichende Daten	
Wetcit®	moderat toxisch	keine Angabe im Herstellerblatt	moderat toxisch	keine Angabe im Herstellerblatt	
Grounded®	praktisch nicht toxisch	keine Angabe im Herstellerblatt	moderat toxisch	keine Angabe im Herstellerblatt	

Bezieht man die Persistenz der aktiven Wirksubstanzen sowie ihrer Metabolite (Kapitel 3.4. sowie Anhang II [Seite 73-77], Tabelle 29 und 30) in die Wahl der einzusetzenden Herbizide mit ein, dann kann man biohelp Finalsan® Plus sowie Nozomi® als vielversprechende Alternativen zu dem bereits in Verwendung befindlichen Touchdown® Quattro aufstellen, auch wenn sowohl in der Praxis als auch während den durchgeführten Versuchen das Produkt biohelp Finalsan® Plus zweimal ausgebracht wurde, während Touchdown® Quattro nur einmal ausgebracht wurde. Dies entspricht den zugelassenen Behandlungen laut Pflanzenschutzmittelregister für beide Formulierungen. Aus ökotoxikologischer Sicht ist die Behandlung von Bewuchs an Gleiskörpern mit biohelp Finalsan® Plus dennoch zu bevorzugen, da die Halbwertszeit von Glyphosat in Touchdown® Quattro von bis zu 1000 Tagen unter anaeroben Bedingungen die Halbwertszeit von Pelargonsäure von ca. einem Tag, sowie die Halbwertszeit von Maleinsäurehydrazid von 50-250 Tagen, je nachdem ob aerobe oder anaerobe Bedingungen herrschen, weit überschreitet.

Die Herbizide Valdor® Flex und Chikara® wurden aus ökotoxikologischer Sicht nicht als mögliche Alternativen in Betracht gezogen. Die Ergebnisse der ökotoxikologischen Tests mit Valdor® Flex, Chikara® und Nozomi® wiesen zwar eine ähnliche akute Toxizität auf, die Literaturrecherche ergab jedoch, dass die aktiven Substanzen von Valdor® Flex und Chikara® und ihrer Metaboliten eine höhere Persistenz im Vergleich zu den bis jetzt bekannten Daten von Nozomi® und seinen Metaboliten aufweisen (siehe Anhang II, Seite 73-74, Tabelle 30-31). Dies lässt eine Akkumulation der aktiven Substanzen und ihrer Metaboliten nicht ausschließen.<sup>19-21</sup>

Zu Nozomi® muss angemerkt werden, dass eine Einbringung in Wasserkörper möglichst ausgeschlossen werden sollte, da es aufgrund seiner starken Wirksamkeit auf Algen ungewollte Effekte auf das trophische Netz der Wasserkörper haben kann. Von einem Einsatz in der Nähe von Wasserkörpern wird von ökotoxikologischer Seite also abgeraten. Diese Empfehlung bezieht sich auf die direkte Einbringung der Flumioxazin-haltigen Spritzmischung in Fließ- und Standgewässer. Die Kontamination des Grundwassers erscheint unrealistisch, da dieses Szenario bereits untersucht und etwaige Rückstände von Flumioxazin sowie ihrer Metaboliten laut EFSA unter den festgelegten Grenzwerten befanden.<sup>19</sup> Nachvollziehen lässt sich dies durch die Suszeptibilität von Flumioxazin gegenüber Hydrolyse und dem biologischen Abbau durch Mikroorganismen, welche einen raschen Abbau auch unter lichtlosen, anaeroben Bedingungen nahelegt. Des Weiteren können bei Nozomi® Effekte auf Wirbeltiere nicht ganz ausgeschlossen werden. Auch wenn bei den durchgeführten Tests letale Effekte erst bei Konzentrationen auftraten, die in der Natur sehr unwahrscheinlich

erreicht werden, bleibt die Hemmung der Häm-Synthese durch den aktiven Wirkstoff Flumioxazin ein Risikofaktor. Im Fall der durchgeführten Tests waren die *Danio rerio*-Larven noch so klein, dass ein Sauerstoff-Austausch primär noch über Diffusion der Haut oder der Zellen stattfinden kann. Bei adulten Individuen könnte die Hemmung der Häm-Synthese allerdings zu Sauerstoff-Unterversorgung führen, die gesundheitliche Defekte einschließlich des Todes haben könnte. Ein LC<sub>50</sub>-Wert von 0,05 g/L eines akuten Fisch-Toxizitätstests mit der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), publiziert im Sicherheitsdatenblatt von Nozomi® (Firma Certis) unterstützt diese Annahme, da der LC<sub>50</sub>-Wert hierbei um einiges geringer ist als der LC<sub>50</sub>-Wert des im Rahmen dieses Projekts durchgeführten Fischembryo-Toxizitätstest von 0,54 g/L. <sup>22</sup>

Bei den beobachteten Ödemen muss angemerkt werden, dass diese laut der OECD-Richtlinie 236 nicht als Letalitätskriterium gelten, weswegen Individuen mit Ödem auch nicht zur Mortalität gezählt werden. Wie bereits erwähnt, ist eine Rückbildung des Ödems im Laufe der weiteren Entwicklung auch relativ häufig. Bleibende Schäden konnten aufgrund der kurzen Testdauer nicht festgestellt werden.

Die vorangehenden Überlegungen und Empfehlungen basieren nur auf dem ökotoxikologischen Standpunkt. Parameter wie Effizienz des Herbizides auf die Zielpflanzen, die damit verbundene Häufigkeit der Ausbringung und der personelle und finanzielle Aufwand müssen ebenfalls in Betracht gezogen werden.

### 4.3. Adjuvantien und Mischungen:

Wie in Tabelle 6 dargestellt, führt die Zugabe von Wetcit® zu den Formulierungen Biohelp Finalsan® Plus, Touchdown® Quattro und Nozomi® zu einer Erhöhung der Toxizität der Mischung ( $EC_{50}$  sinkt was bedeutet, dass größere Effekte bei niedrigeren Konzentrationen auftreten). Der stärkere Anstieg der Toxizität nach Zugabe von Wetcit® (welches die Durchlässigkeit der Zellmembran erhöht) bei den Herbiziden Nozomi® und Touchdown® Quattro, könnte daran liegen, dass Glyphosat und Flumioxazin in der Zelle wirken, während Pelargonsäure auf die Zellmembran wirkt.<sup>5,23</sup>

**Tabelle 6:  $EC_{50}$ -Werte der AGI- und FET-Tests der Formulierungen Finalsan, Touchdown® und Nozomi® sowie der Mischungen mit Wetcit®.** PA ... Pelargonsäure; GL ... Glyphosat; N ... Nozomi®

	Formulierung		Formulierung + Wetcit®	
	AGI	FET	AGI	FET
Biohelp Finalsan® Plus (g /L PA)	0,071	0,041	0,033	0,059
Touchdown® Quattro (g/L GL)	0,13	0,0011	0,0015	0,0008
Nozomi® (g/L N)	0,000012	0,54	0,0000014	nicht durchgeführt

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

AGI.....	Algal Growth Inhibition
ALS.....	Acetolactat-Synthase
BMBF.....	Bold Modified Basal Freshwater Nutrient Solution
DMEM.....	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
EFSA.....	European Food & Safety Agency
EPA.....	Environmental Protection Agency
EPSP.....	Enolpyruvylshikimate-3-phosphate
FCS.....	Fetal Calf Serum
FET.....	Fish Embryo Toxicity
GL.....	Glyphosat
mAU.....	milli Absorption Units
MoA.....	Mode of Action
NCS.....	Newborn Calf Serum
NRU.....	Neutral Red Uptake
OECD.....	Organisation
PA.....	Pelargonsäure
PPs.....	Polyether-Polymethylsiloxan- Copolymer
hpF.....	hours post Fertilisation / Stunden nach Befruchtung
SDS.....	Natriumlaurylsulfat
UAS.....	University of Applied Sciences
% v/v.....	Volumsprozent

## LITERATURVERZEICHNIS:

1. Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J. & Séralini, G. E. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem. Toxicol.* **84**, 133–153 (2015).
2. Ciriminna, R., Fidalgo, A., Ilharco, L. M. & Pagliaro, M. Herbicides based on pelargonic acid: Herbicides of the bioeconomy. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **13**, 1476–1482 (2019).
3. Noodén, L. D. The Mode of Action of Maleic Hydrazide: Inhibition of Growth. *Physiologia Plantarum* **22**, 260–270 (1969).
4. Venezian, A. *et al.* The Influence of the Plant Growth Regulator Maleic Hydrazide on Egyptian Broomrape Early Developmental Stages and Its Control Efficacy in Tomato under Greenhouse and Field Conditions. *Front Plant Sci* **8**, (2017).
5. Schumacher, D. M. & Lambre, C. Flumioxazin, Toxicology of Pesticied and their Metabolites. (2016).
6. Magné, C., Saladin, G. & Clément, C. Transient effect of the herbicide flazasulfuron on carbohydrate physiology in *Vitis vinifera* L. *Chemosphere* **62**, 650–657 (2006).
7. Ashton, I. P., Abulnaja, K. O., Pallett, K. E., Cole, D. J. & Harwood, J. L. Diflufenican, a carotenogenesis inhibitor, also reduces acyl lipid synthesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **43**, 14–21 (1992).
8. Haynes, C. & Kirkwood, R. C. Studies on the mode of action of diflufenican in selected crop and weed species: Basis of selectivity of pre- and early post-emergence applications. *Pesticide Science* **35**, 161–165 (1992).
9. Pflanzenschutzmittel-Register.  
[https://psmregister.baes.gv.at/psmregister/faces/main?\\_afLoop=1197982587641841&\\_afWindowMode=0&\\_adf.ctrl-state=jpca5g22i\\_4](https://psmregister.baes.gv.at/psmregister/faces/main?_afLoop=1197982587641841&_afWindowMode=0&_adf.ctrl-state=jpca5g22i_4).

10. ORO Agri International. Wetcit® Product guide. (2012).
11. Agrian - Label Search.  
<https://www.agrian.com/labelcenter/results.cfm?quicksearch=Grounded®>.
12. Certis Europe. Sicherheitsdatenblatt Karibu®. (2019).
13. OECD. OECD Guideline No. 129 Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. (2010).
14. OECD. OECD Guidelines for the testing of Chemicals, No. 201, Freshwater Alga and Cyanobacteria growth inhibition test. (2011).
15. OECD. OECD Guidelines for the testing of chemicals, No. 236, Fish embryo acute toxicity (FET) assay. (2013).
16. Khan, I., Saeed, K. & Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* **12**, 908–931 (2019).
17. Savoca, M. S., Wohlfeil, M. E., Ebeler, S. E. & Nevitt, G. A. Marine plastic debris emits a keystone infochemical for olfactory foraging seabirds. *Sci Adv* **2**, (2016).
18. US EPA, O. Technical Overview of Ecological Risk Assessment - Analysis Phase: Ecological Effects Characterization. *US EPA* <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0> (2015).
19. EFSA. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flumioxazin. *EFSA Journal* **12**, 3736 (2014).
20. EFSA. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance Iodosulfuron-methyl-sodium. *European Food Safety Authority* <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4453> (2016).
21. EFSA. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance diflufenican. *European Food Safety Authority* <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/rn-122> (2008).
22. Certis Europe. Sicherheitsdatenblatt Nozomi®. (2018).

23. Boocock, M. R. & Coggins, J. R. Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. *FEBS Lett.* **154**, 127–133 (1983).
24. EFSA. Peer Review of the pesticide risk assessment of the active substance fatty acids C7 to C18. *European Food Safety Authority*  
<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3023> (2013).
25. EFSA. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal* **13**, 4302 (2015).
26. EFSA. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flazasulfuron - - 2016 - EFSA Journal - Wiley Online Library.  
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2016.4575>.
27. EFSA. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance maleic hydrazide. *European Food Safety Authority*  
<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4492> (2016).
28. Pubchem. glyphosate | C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>5</sub>P - PubChem.  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/glyphosate> (2017).
29. Pubchem. NONANOIC ACID | C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub> - PubChem.  
[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/nonanoic\\_acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/nonanoic_acid) (2017).
30. PubChem. Maleic hydrazide. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/21954>.
31. PubChem. Flazasulfuron. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/93539>.

## TABELLEN-VERZEICHNIS:

Tabelle 1: Liste der getesteten Herbizide und Adjuvantien.....	11
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten OECD-Richtlinien .....	13
Tabelle 3: EC <sub>50</sub> -Werte der Herbizide bzw. Herbizidmischungen.....	21
Tabelle 4: Persistenz der aktiven Substanzen inklusive ihrer Metaboliten nach Evaluierung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA).....	27
Tabelle 5: EPA-Klassifizierung von Herbiziden. ....	29
Tabelle 6: EC <sub>50</sub> -Werte der AGI- und FET-Tests der Formulierungen Finalsan, Touchdown® und Nozomi® sowie der Mischungen mit Wetcit®.....	32
Tabelle 7: Details der Tests mit der Mischung Touchdown® Quattro. ....	42
Tabelle 8: Details der Toxizitätstest mit der Mischung Touchdown® Quattro + Wetcit®.....	44
Tabelle 9: Details zu dem NRU Vortest der Mischung Touchdown® + Karibu®. ....	45
Tabelle 10: Details zu den toxikologischen Tests mit der Substanz biohelp Finalsan® Plus.	47
Tabelle 11: Details der Toxizitätstests mit der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Wetcit®.	49
Tabelle 12: Details der Toxizitätstests mit der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Chikara®. ....	50
Tabelle 13: Details der Toxizitätstests mit der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Nozomi®. ....	52
Tabelle 14: Details der Toxizitätstests mit der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Nozomi® + Wetcit®.....	53
Tabelle 15: Details der Toxizitätstests der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Chikara® + Wetcit®.....	54
Tabelle 16: Details der Toxizitätstests der Substanz Nozomi®. ....	56
Tabelle 17: Details zum AGI-Test mit der Mischung Nozomi®+Wetcit®.....	57
Tabelle 18: Details der Toxizitätstests mit der Mischung Nozomi® + Grounded®. ....	58
Tabelle 19: Details zu den Toxizitätstests mit der Mischung Nozomi®+Chikara®. ....	59
Tabelle 20: Details zum AGI-Test mit der Mischung Nozomi® + Chikara® + Wetcit®.....	60
Tabelle 21: Details zu den Toxizitätstests mit dem Herbizid Chikara®. ....	62
Tabelle 22: Details des AGI Vortests mit der Mischung Chikara® + Karibu®. ....	63
Tabelle 23: Details zu den Toxizitätstests mit der Mischung Chikara® + Wetcit®. ....	64
Tabelle 24: Details zu den Toxizitätstests mit der Substanz Valdor® Flex. ....	65
Tabelle 25: Details zu den Toxizitätstests mit der Mischung Valdor® Flex + Wetcit®.....	66
Tabelle 26: Details des AGI Test mit der Mischung Valdor® Flex + Karibu®. ....	67
Tabelle 27: Details zu den Toxizitätstests mit der Substanz Wetcit®. ....	69

Tabelle 28: Details zu den Toxizitätstests der Substanz Grounded®. ....	71
Tabelle 29: Details zu den Toxizitätstests mit der Substanz Karibu®. ....	72
Tabelle 30: Halbwertszeit der aktiven Substanzen der getesteten Herbizide unter unterschiedlichen Bedingungen. ....	73
Tabelle 31: Metaboliten der aktiven Substanzen. ....	74
Tabelle 32: pH-Werte der Mischungen des NRU Tests. ....	78
Tabelle 33: pH Werte der Mischungen des AGI Tests. ....	80
Tabelle 34: pH-Werte der Mischungen des FET-Tests. ....	83
Tabelle 35: Mortalität der <i>Danio rerio</i> -Embryos in der Negativkontrolle aller durchgeführten Tests. ....	85

## ABBILDUNGS-VERZEICHNIS:

Abbildung 1: BSW Regupol bewuchshemmende Matte Typ 767. ....	12
Abbildung 2: Dosis-Wirkungskurven der AGI-Tests mit den 2 Größenfraktionen der BSW Regupol bewuchshemmenden Matte Typ 767. ....	18
Abbildung 3: <i>Danio rerio</i> -Larven, 72 Stunden nach Befruchtung (hpF) mit Ödem in unterschiedlicher Größe (rot markierte Zone). ....	24
Abbildung 4: <i>Danio rerio</i> -Larven 72 hpF. ....	25
Abbildung 5: <i>Danio rerio</i> -Larven aufgelöst von dem Herbizid Chikara® und Adjuvant Grounded®. ....	25
Abbildung 6: Aufnahme der Zellen mit einem Lichtmikroskop mit 20-Facher Vergrößerung. ....	26
Abbildung 7: Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstests mit Touchdown® Quattro. ....	41
Abbildung 8: Dosis-Wirkungskurven der Tests mit der Mischung Touchdown® Quattro + Wetcit®. ....	43
Abbildung 9: Dosis-Wirkungskurve des NRU Vortests mit der Mischung Touchdown® + Karibu®. ....	45
Abbildung 10: Dosis-Wirkungskurven der NRU und AGI Tests mit der Substanz biohelp Finalsan® Plus. ....	46
Abbildung 11: Dosis-Wirkungskurven aus den Daten der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Wetcit®. ....	48
Abbildung 12: Dosis-Wirkungskurven der Tests mit der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Chikara®. ....	50

Abbildung 13: Dosis-Wirkungskurven der Toxizitäts Tests mit der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Nozomi®.....	51
Abbildung 14:Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstests mit der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Nozomi® + Wetcit®. ....	53
Abbildung 15: Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstest mit der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Chikara® + Wetcit®. ....	54
Abbildung 16: Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstests mit der Mischung Nozomi®.....	55
Abbildung 17:Dosis-Wirkungskurve des AGI Tests mit der Mischung Nozomi®+Wetcit®. ...	57
Abbildung 18: Dosis-Wirkungskurve des AGI-Tests mit der Mischung Nozomi® + Grounded®. ....	58
Abbildung 19: Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstests mit der Mischung Nozomi® + Chikara®. ....	59
Abbildung 20: Dosis-Wirkungskurve des AGI-Vortests mit der Mischung Nozomi® + Chikara® + Wetcit®.....	60
Abbildung 21:Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstests mit dem Herbizid Chikara®.....	61
Abbildung 22: Dosis-Wirkungskurve des AGI Vortests mit der Mischung Chikara® + Karibu®. ....	63
Abbildung 23: Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstests mit der Mischung Chikara® + Wetcit®.....	64
Abbildung 24:Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstests mit der Substanz Valdor® Flex. ....	65
Abbildung 25:Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstests mit der Mischung Valdor® Flex +Wetcit®.....	66
Abbildung 26: Dosis-Wirkungskurve des AGI Haupttests mit der Mischung Valdor® Flex + Karibu®. ....	67
Abbildung 27: Dosis-Wirkungskurven aus den Daten der Substanz Wetcit®. ....	68
Abbildung 28: Dosis-Wirkungskurven aus den Daten der Substanz Grounded®.....	70
Abbildung 29: Dosis-Wirkungskurve ders NRU Vortests mit der Substanz Karibu®.....	72

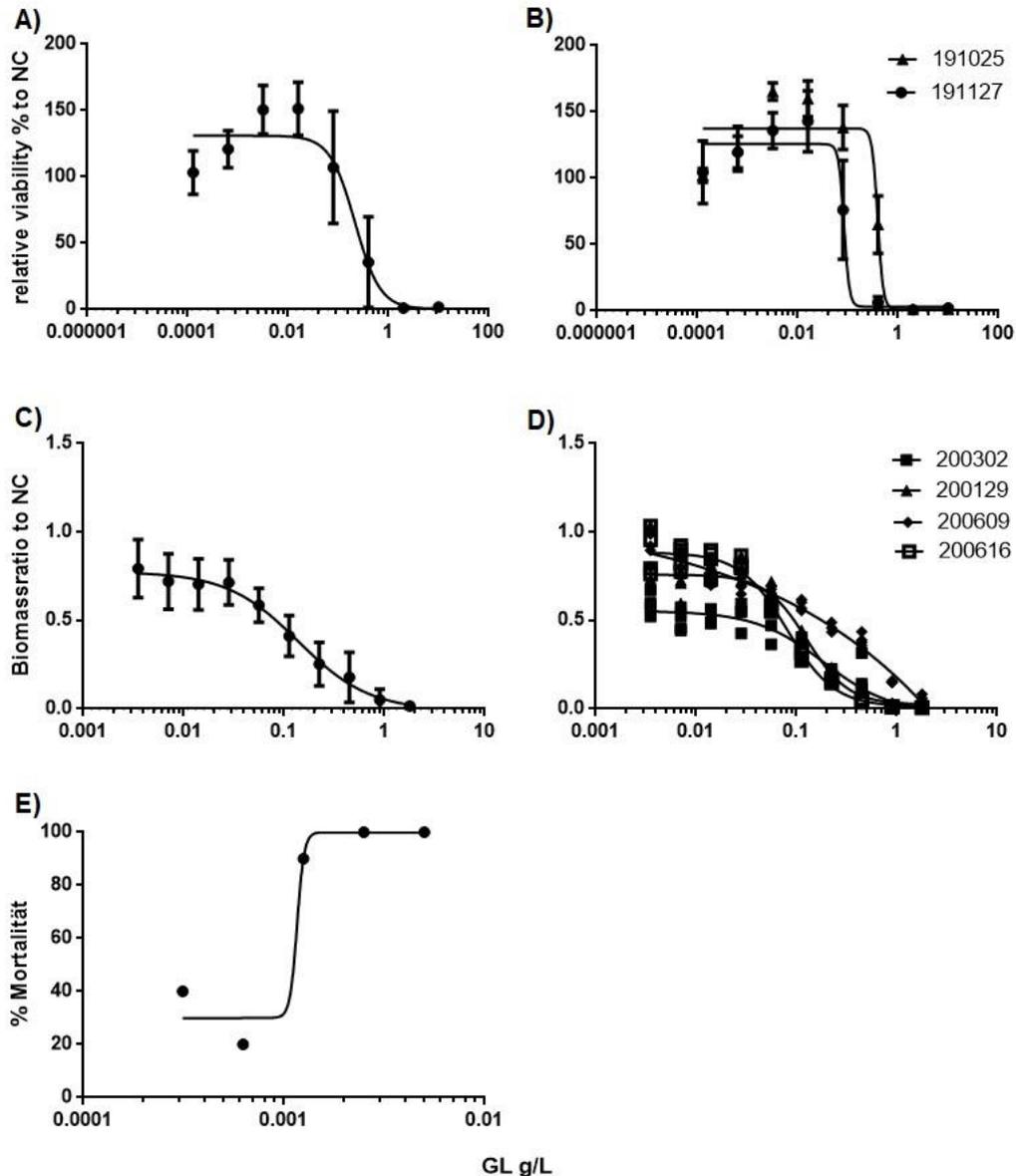
## ANHANG I:

### Detaillierte Übersicht:

Die folgenden Abbildungen und Tabellen zeigen die Dosis-Wirkungskurven, die aus den Daten der jeweiligen Tests berechnet und dargestellt wurden. Wenn mehrere Durchgänge desselben Tests mit den gleichen Mischungen durchgeführt wurden, dann werden sowohl die Dosis-Wirkungskurve der gepoolten Daten als auch die der einzelnen Tests dargestellt. Genaue Details finden sich in den Abbildungslegenden.

Die Vortests dienten dazu, den richtigen Konzentrationsbereich zu definieren. Daher wurden bei diesen Tests die Konzentrationen der Herbizide um den Faktor 5 verringert, also zum Beispiel 10, 2, 0.4, *etc.* Bei Haupttests wurden die Konzentrationen bei NRU-Tests um den Faktor 1.3 verringert, bei FET und AGI-Tests um den Faktor 2, mit dem Ziel, den  $EC_{50}$ -Wert so genau als möglich zu bestimmen.

**Detailergebnisse des Herbizides Touchdown® Quattro:**

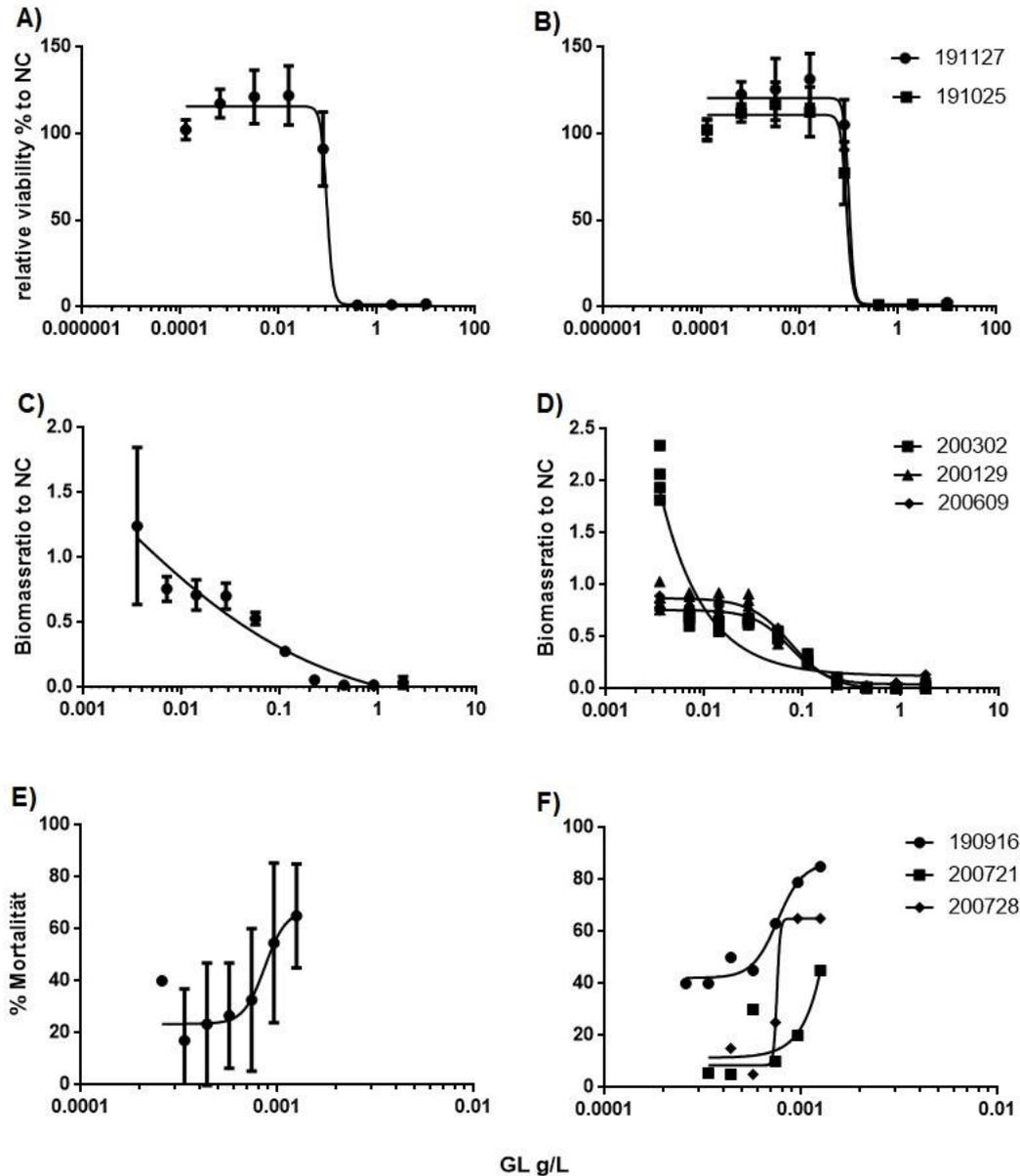


**Abbildung 7: Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstests mit Touchdown® Quattro** A) Dosis-Wirkungskurve aus den gepoolten Daten der NRU Test mit Touchdown® Quattro. B) Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der beiden NRU Touchdown® Quattro-Tests. C) Dosis-Wirkungskurve aus den gepoolten Daten der AGI Tests mit Touchdown® Quattro. D) Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der beiden AGI Haupttests mit Touchdown® Quattro. E) Dosis-Wirkungskurve des FET Tests mit Touchdown® Quattro aus den 96 Stunden Beobachtungen.

**Tabelle 7: Details der Tests mit der Mischung Touchdown® Quattro. GL...Glyphosat**

	Neutral Uptake	Red	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub> (g/L GL)	0,21		0,13	0,0011
R <sup>2</sup>	0,82		0,84	0,96
Testart	Vortest		Haupttest	Vortest

Detailergebnisse der Mischung Touchdown® Quattro mit Wetcit®:

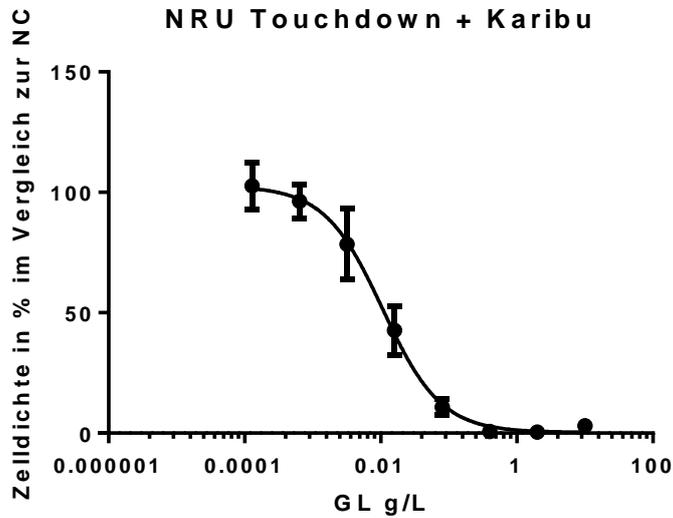


**Abbildung 8: Dosis-Wirkungskurven der Tests mit der Mischung Touchdown® Quattro + Wetcit®.** A) Dosis-Wirkungskurve aus den gepoolten Daten der NRU Test mit Touchdown® Quattro. B) Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der beiden NRU Touchdown® Quattro-Tests. C) Dosis-Wirkungskurve aus den gepoolten Daten der AGI Tests mit Touchdown® Quattro. D) Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der beiden AGI Haupttests mit Touchdown® Quattro. E) Dosis-Wirkungskurve aus den gepoolten Daten der FET Tests mit Touchdown® Quattro aus den 96 Stunden Beobachtungen. F) Vergleich der einzelnen Dosis-Wirkungskurven aller FET Haupttests mit Touchdown® Quattro aus den 96 Stunden Beobachtungen.

**Tabelle 8: Details der Toxizitätstest mit der Mischung Touchdown® Quattro + Wetcit®. GL ...  
 Glyphosat; W ... Wetcit®**

	Neutral Uptake	Red GL + W	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub>	0,096 g/L GL + 0,001 % v/v W	0,0015 g/L GL + 0,000033 % v/v W	0,0008 g/L GL + 0,0000089 % v/v W	
R <sup>2</sup>	0,94	0,75	0,40	
Testart	Vortest	Haupttest	Haupttest	

**Detailergebnisse der Mischung Touchdown® Quattro mit Karibu®:**

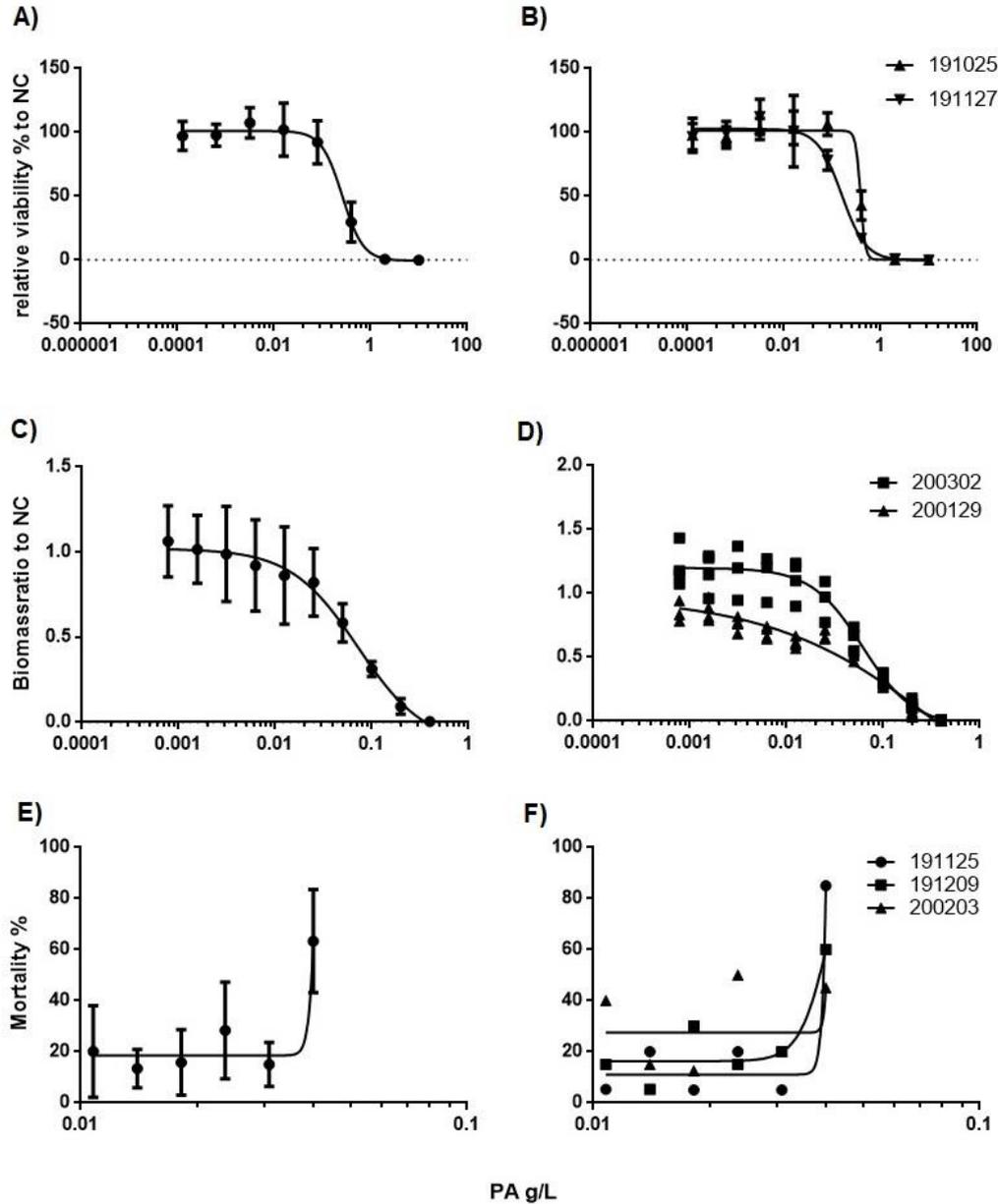


**Abbildung 9: Dosis-Wirkungskurve des NRU Vortests mit der Mischung Touchdown® + Karibu®.**

**Tabelle 9: Details zu dem NRU Vortest der Mischung Touchdown® + Karibu®.** GL...Glyphosat; PPs ... Polyether-Polymethylsiloxan-Copolymer (aktive Substanz in Karibu®)

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub> (g/L)	0,01 g/L GL + 0,00012 g/L PPs	Nicht durchgeführt	Nicht durchgeführt
R <sup>2</sup>	0,97	Nicht durchgeführt	Nicht durchgeführt
Testart	Vortest	Nicht durchgeführt	Nicht durchgeführt

**Detaillierergebnisse des Herbizides biohelp Finalsan® Plus:**

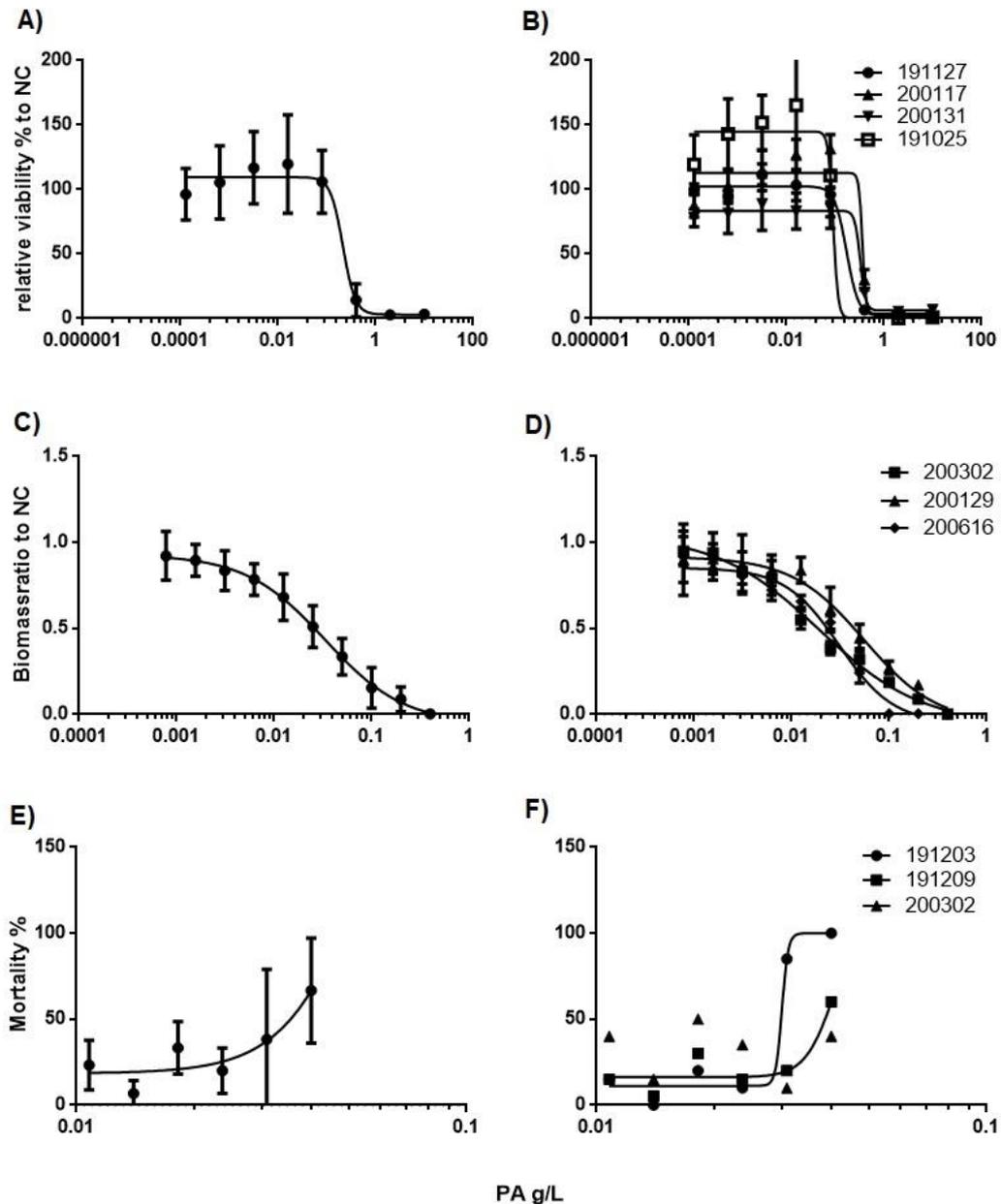


**Abbildung 10: Dosis-Wirkungskurven der NRU und AGI Tests mit der Substanz biohelp Finalsan® Plus.** A) Dosis-Wirkungskurve aus den gepoolten Daten der NRU Tests. B) Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der beiden NRU Vortests. C) Dosis-Wirkungskurve aus den gepoolten Daten der AGI Tests. D) Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der beiden AGI Haupttests. E) Dosis-Wirkungskurve aus den gepoolten Daten der FET Tests. F) Vergleich der einzelnen Dosis-Wirkungskurven aller FET Haupttests.

**Tabelle 10: Details zu den toxikologischen Tests mit der Substanz biohelp Finalsan® Plus. PA ... Pelargonsäure**

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub> (g/L PA)	0,26	0,071	0,041
R <sup>2</sup>	0,92	0,80	0,61
Testart	Vortest	Haupttest	Haupttest

**Detailergebnisse der Mischung biohelp Finalsan® Plus mit Wetcit®:**

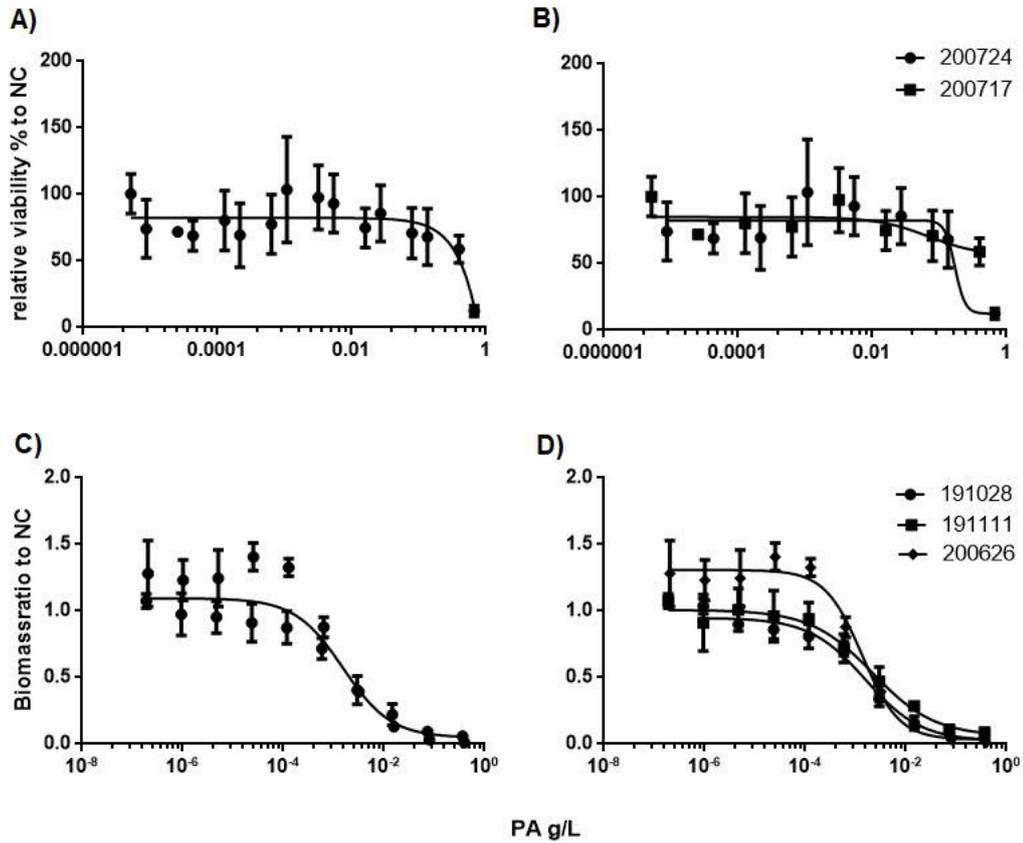


**Abbildung 11: Dosis-Wirkungskurven aus den Daten der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Wetcit®.** A) Dosis-Wirkungskurve aus den gepoolten Daten der NRU Tests. B) Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der NRU Tests. C) Dosis-Wirkungskurve aus den gepoolten Daten der AGI Tests. D) Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der AGI Haupttests. E) Dosis-Wirkungskurve aus den gepoolten Daten der FET-Haupttests, aus den 96 Stunden Beobachtungen. F) Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der FET-Haupttests.

**Tabelle 11: Details der Toxizitätstests mit der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Wetcit®. PA ... Pelargonsäure; W... Wetcit®**

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub>	0,21 g/L PA + 0,0019 % v/v W	0,033 g/L PA + 0,00031 % v/v W	0,059 g/L PA + 0,00074 % v/v W
R <sup>2</sup>	0,81	0,91	0,4
Testart	Vortest	Haupttest	Haupttest

**Detailergebnisse der Mischung biohelp Finalsan® Plus mit Chikara®:**

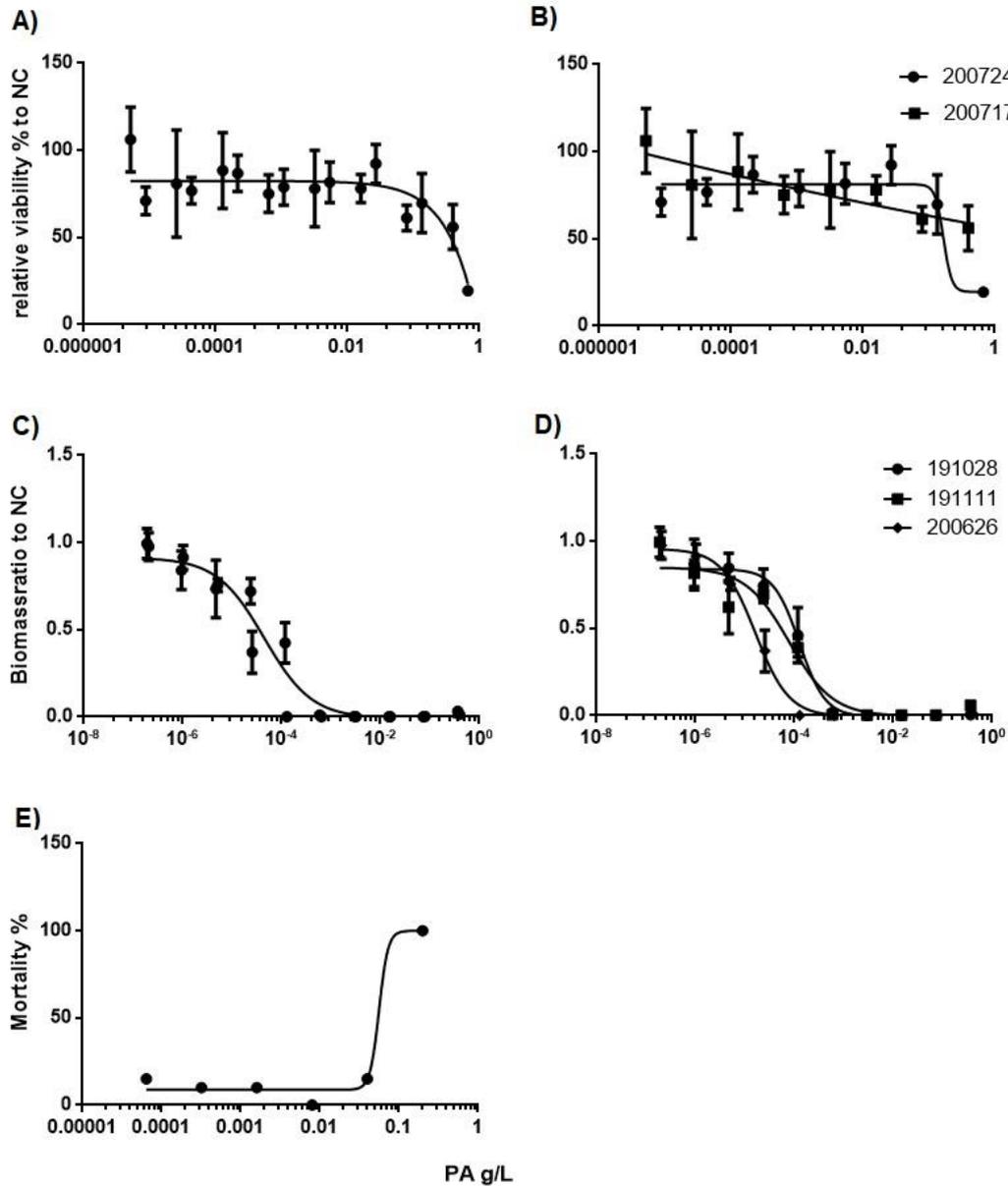


**Abbildung 12: Dosis-Wirkungskurven der Tests mit der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Chikara®.** A) Dosis-Wirkungskurve der gepoolten Daten der NRU Vortests. B) Einzelne Dosis-Wirkungskurven der NRU Vortests. C) Dosis-Wirkungskurve der gepoolten Daten der AGI Vortests. D) Einzelne Dosis-Wirkungskurven der AGI Vortests.

**Tabelle 12: Details der Toxizitätstests mit der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Chikara®.** PA ... Pelargonsäure; Ch ... Chikara® \*Hier wurde nur Datenreihe 200724 für die Bestimmung des EC<sub>50</sub>-Wertes und des Bestimmtheitsmaß R<sup>2</sup> herangezogen.

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub>	0,17 g/L PA + 0,00088 g/L Ch*	0,0015 g/L PA + 0,000018 g/L Ch	Nicht durchgeführt
R <sup>2</sup>	0,48*	0,87	Nicht durchgeführt
Testart	Vortest	Vortest	Nicht durchgeführt

**Detailergebnisse der Mischung biohelp Finalsan® Plus mit Nozomi®:**



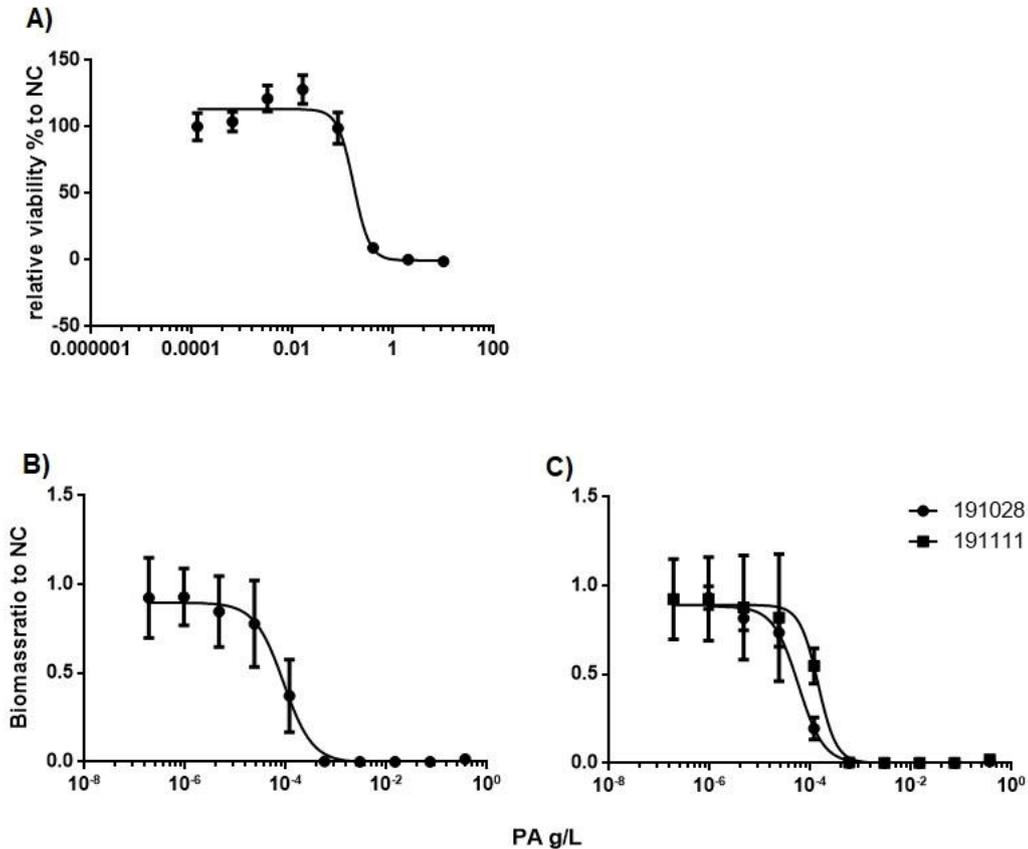
**Abbildung 13: Dosis-Wirkungskurven der Toxizitäts Tests mit der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Nozomi®.** A) Dosis-Wirkungskurve der gepoolten Daten aller NRU Vortests. B) Einzelne Dosis-Wirkungskurven der NRU Vortests. C) Dosis-Wirkungskurve der gepoolten Daten der AGI Vortests. D) Einzelne Dosis-Wirkungskurven der AGI Vortests. E) Dosis-Wirkungskurve des FET Vortests.

**Tabelle 13: Details der Toxizitätstests mit der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Nozomi®.**

\*Bei einer unzureichenden Anzahl von Testpunkten im 100%- bzw. 0%-Effekt Bereich führte dies zu einer unzuverlässigen Berechnung des EC<sub>50</sub>-Wertes. Daher wurde der EC<sub>50</sub>- sowie der R<sup>2</sup>-Wert nur anhand der Datenreihe 200724 erstellt. PA ... Pelargonsäure; N...Nozomi®

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub>	0,17 g/L Pa + 0,012 g/L N*	0,000044 g/L PA + 0,0000033 g/L N	0,056 g/L PA + 0,0042 g/L N
R <sup>2</sup>	0,76*	0,91	0,98
Testart	Vortest	Vortest	Vortest

**Detailergebnisse der Mischung biohelp Finalsan® Plus mit Nozomi® und Wetcit®:**

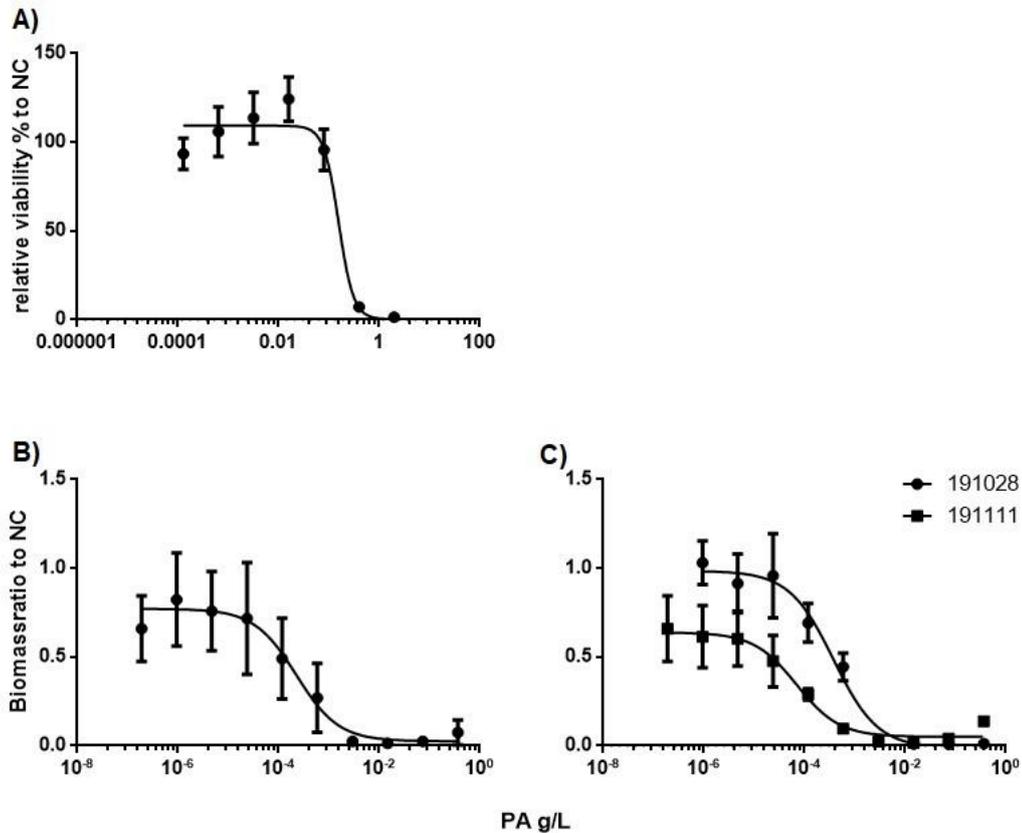


**Abbildung 14:** Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstests mit der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Nozomi® + Wetcit®. A) Dosis-Wirkungskurve des NRU Vortests. B) Dosis-Wirkungskurve der gepoolten Daten der AGI Vortests. C) Dosis-Wirkungskurven der einzelnen AGI Vortests.

**Tabelle 14:** Details der Toxizitätstests mit der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Nozomi® + Wetcit®. PA...Pelargonsäure; N...Nozomi®; W...Wetcit®

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub>	0,16 g/L PA + 0,0026 g/L N + 0,0014 % v/v W	0,000090 + 0,0000068 g/L N + 0,0000087 % v/v W	Nicht durchgeführt
R <sup>2</sup>	0,95	0,89	Nicht durchgeführt
Testart	Vortest	Vortest	Nicht durchgeführt

**Detailergebnisse der Mischung biohelp Finalsan® Plus mit Valdor® Flex und Wetcit®:**

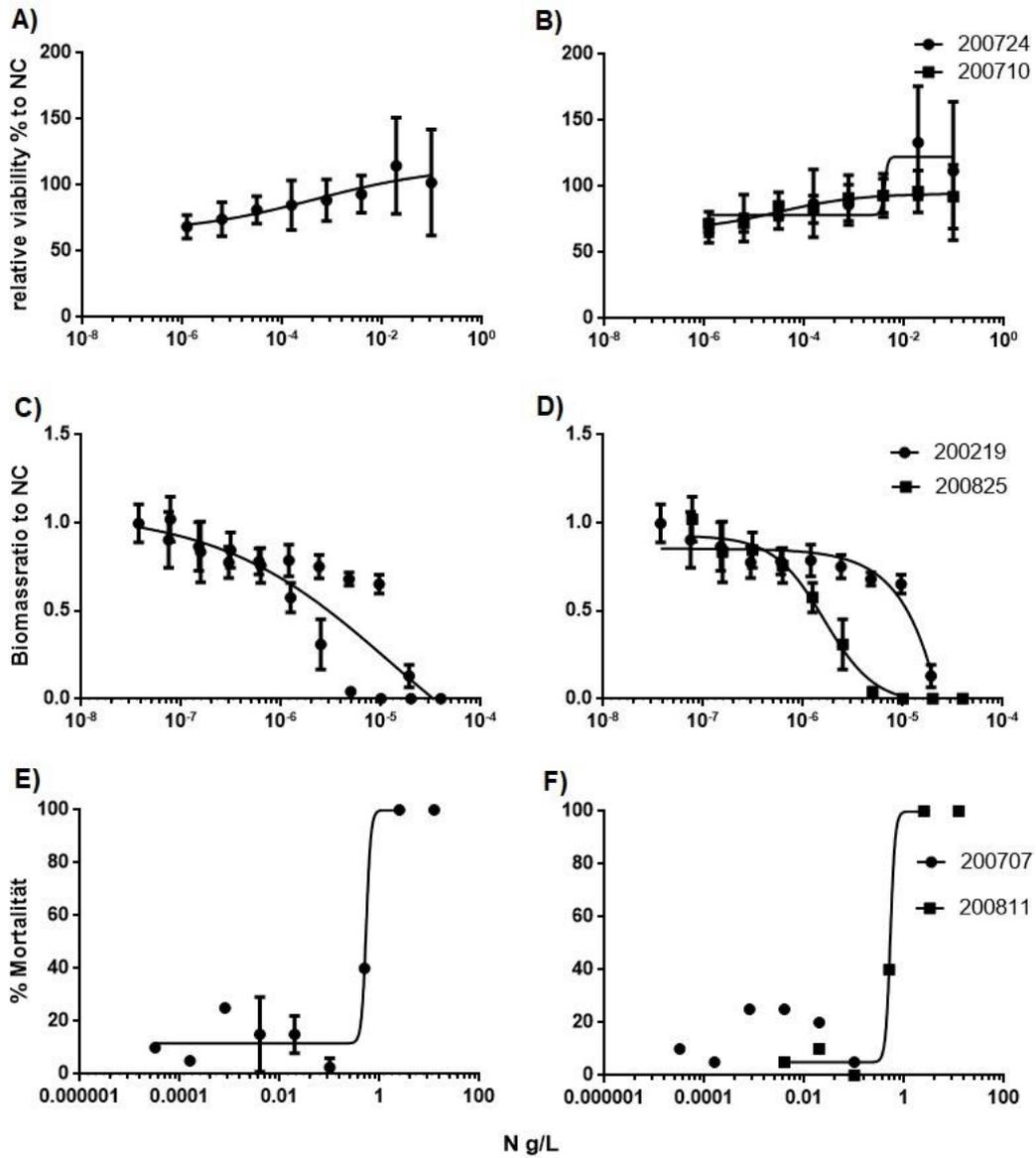


**Abbildung 15: Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstest mit der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Chikara® + Wetcit®.** A) Dosis-Wirkungskurve des NRU Vortests. B) Dosis-Wirkungskurve der gepoolten Daten der AGI Vortests. C) Dosis-Wirkungskurven der einzelnen AGI Vortests.

**Tabelle 15: Details der Toxizitätstests der Mischung biohelp Finalsan® Plus + Chikara® + Wetcit®.** PA...Pelargonsäure; V ... Valdor® Flex; W... Wetcit®

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub>	0,15 g/L PA + 0,005 g/L V + 0,0014 % v/v W	0,00022 g/L PA + 0,0000067 g/L V + 0,0000021 % v/v W	Nicht durchgeführt
R <sup>2</sup>	0,94	0,76	Nicht durchgeführt
Testart	Vortest	Vortest	Nicht durchgeführt

Detailergebnisse des Herbizides Nozomi®:

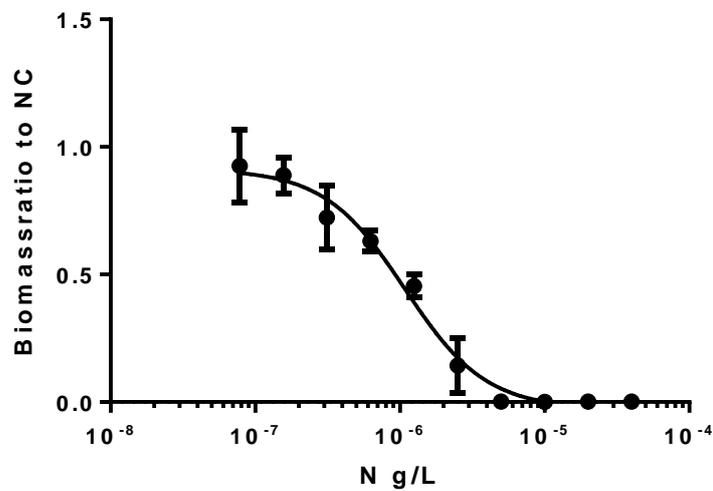


**Abbildung 16: Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstests mit der Mischung Nozomi®.** A) Dosis-Wirkungskurve der gepoolten Daten der NRU Vortests. B) Dosis-Wirkungskurven der einzelnen NRU Vortests. C) Dosis-Wirkungskurve der gepoolten Daten der AGI Haupttests. D) Dosis-Wirkungskurven der einzelnen AGI Haupttests. E) Dosis-Wirkungskurve der gepoolten Daten der FET Vortests. F) Dosis-Wirkungskurven der einzelnen FET Vortests.

**Tabelle 16: Details der Toxizitätstests der Substanz Nozomi®. N... Nozomi®**

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub> (g/L N)	Unzureichende Daten	0,000012	0,54
R <sup>2</sup>	Unzureichende Daten	0,72	0,94
Testart	Vortest	Haupttest	Vortest

**Detailergebnisse der Mischung Nozomi® mit Wetcit®:**

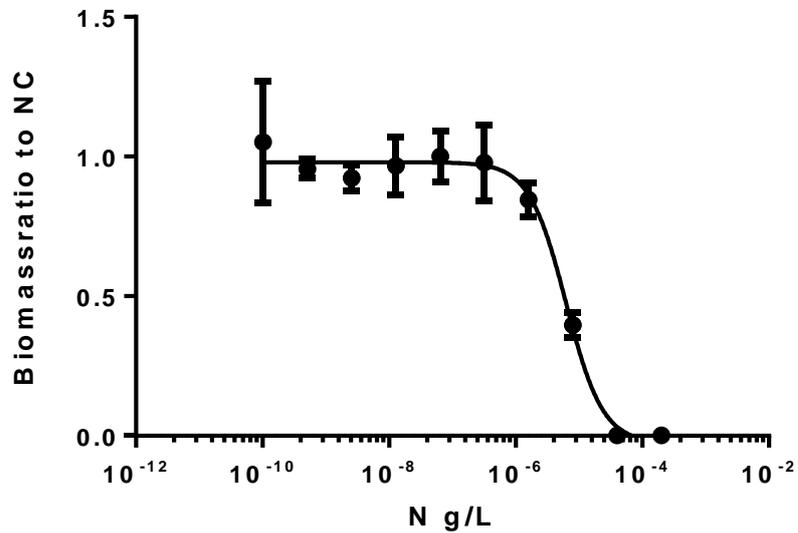


**Abbildung 17:**Dosis-Wirkungskurve des AGI Tests mit der Mischung Nozomi®+Wetcit®.

**Tabelle 17: Details zum AGI-Test mit der Mischung Nozomi®+Wetcit®.** N ... Nozomi®; W...Wetcit®

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub>	Nicht durchgeführt	0,0000014 g/L N+ 0,00000013 % v/v W	Nicht durchgeführt
R <sup>2</sup>	Nicht durchgeführt	0,95	Nicht durchgeführt
Testart	Nicht durchgeführt	Haupttest	Nicht durchgeführt

**Detailergebnisse der Mischung Nozomi® und Grounded®:**

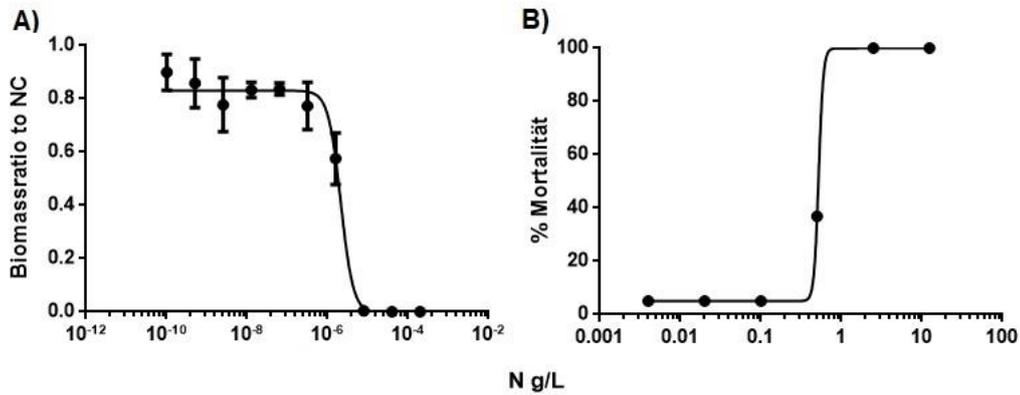


**Abbildung 18: Dosis-Wirkungskurve des AGI-Tests mit der Mischung Nozomi® + Grounded®.**

**Tabelle 18: Details der Toxizitätstests mit der Mischung Nozomi® + Grounded®.** N...Nozomi®; G...Grounded®

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub>	Nicht durchgeführt	0,0000062 g/L N + 0,0000002 % v/v G	Nicht durchgeführt
R <sup>2</sup>	Nicht durchgeführt	0,95	Nicht durchgeführt
Testart	Nicht durchgeführt	Vortest	Nicht durchgeführt

**Detailergebnisse der Mischung Nozomi® mit Chikara®:**

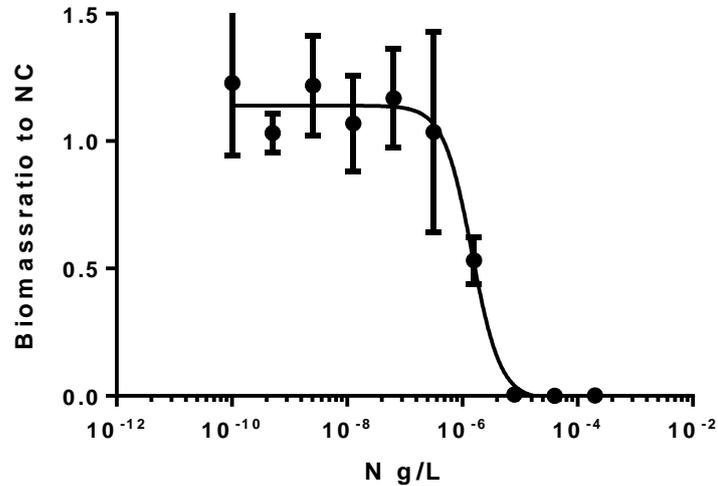


**Abbildung 19: Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstests mit der Mischung Nozomi® + Chikara®.**  
A) Dosis-Wirkungskurve des AGI Vortests. B) Dosis-Wirkungskurve des FET Vortests.

**Tabelle 19: Details zu den Toxizitätstests mit der Mischung Nozomi®+Chikara®.** Das Programm GraphpadPrism konnte für die Kurve des FET-Tests keinen R<sup>2</sup> berechnen. N...Nozomi®; Ch...Chikara®

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub>	Nicht durchgeführt	0,0000021 g/L N + 0,00000035 g/L Ch	0,52 g/L N + 0,083 g/L Ch
R <sup>2</sup>	Nicht durchgeführt	0,96	Nicht berechnet
Testart	Nicht durchgeführt	Vortest	Vortest

**Detailergebnisse der Mischung Nozomi® mit Chikara® und Wetcit®:**



**Abbildung 20: Dosis-Wirkungskurve des AGI-Vortests mit der Mischung Nozomi® + Chikara® + Wetcit®.**

**Tabelle 20: Details zum AGI-Test mit der Mischung Nozomi® + Chikara® + Wetcit®.** N ... Nozomi®; Ch ... Chikara®; W ... Wetcit®

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub>	Nicht durchgeführt	0,0000014 g/L N+ 0,00000024 g/L Ch + 0,00000018 % v/v W	Nicht durchgeführt
R <sup>2</sup>	Nicht durchgeführt	0,89	Nicht durchgeführt
Testart	Nicht durchgeführt	Vortest	Nicht durchgeführt

Detailergebnisse des Herbizides Chikara®:

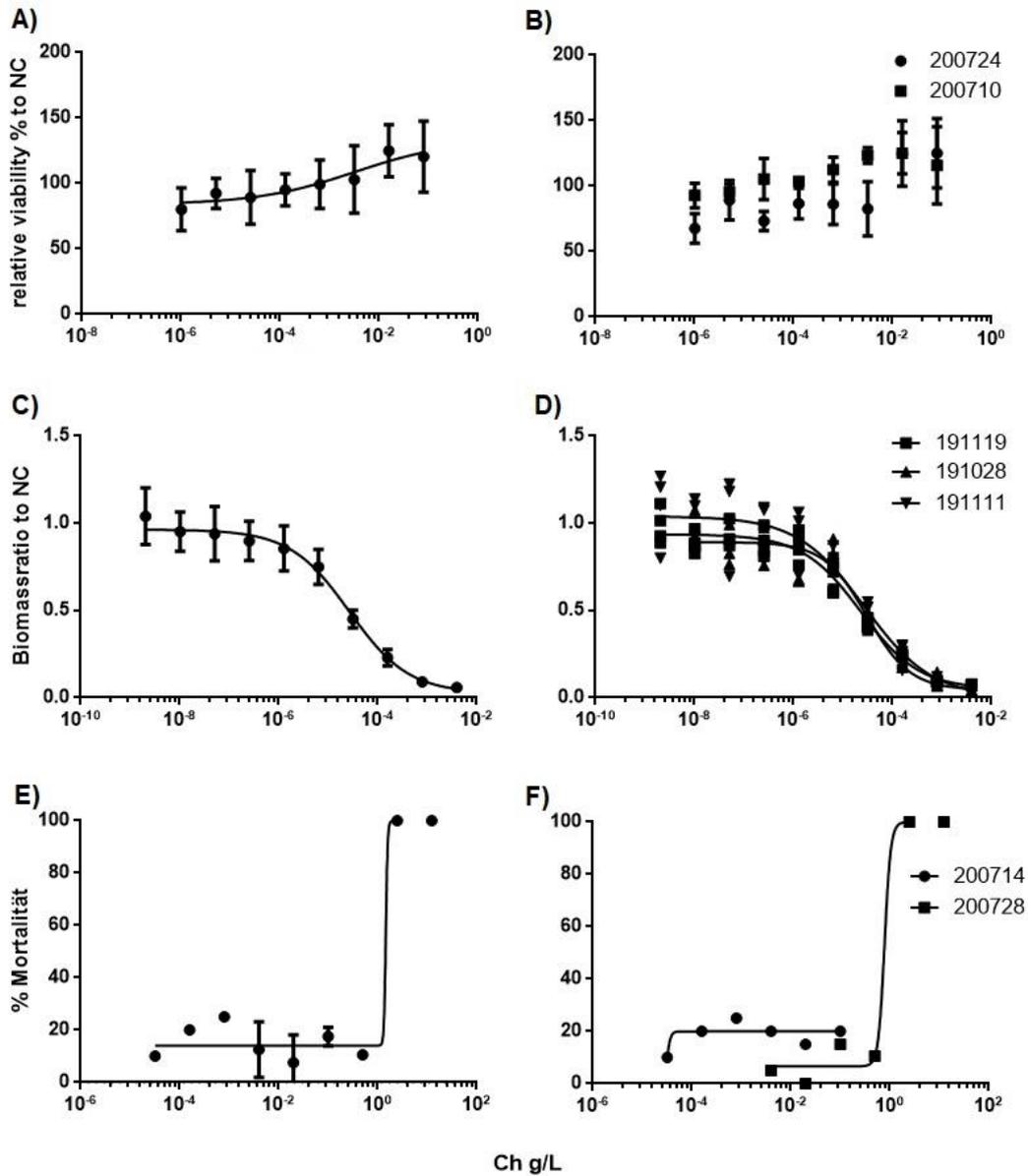
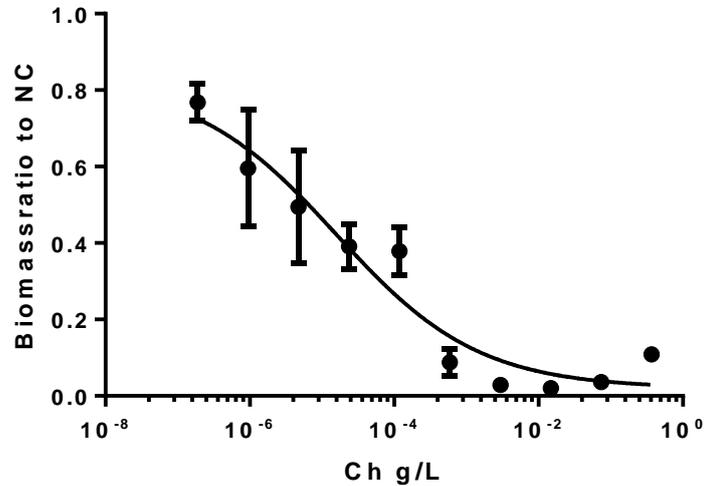


Abbildung 21: Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstests mit dem Herbizid Chikara®. A) Dosis-Wirkungskurve der gepoolten Daten der NRU Vortests. B) Dosis-Wirkungskurven der einzelnen NRU Vortests. C) Dosis-Wirkungskurve der gepoolten Daten der AGI-Vortests. D) Dosis-Wirkungskurven der einzelnen AGI Vortests. E) Dosis-Wirkungskurve der gepoolten Daten der FET-Vortests. F) Dosis-Wirkungskurven der einzelnen FET Vortests.

**Tabelle 21: Details zu den Toxizitätstests mit dem Herbizid Chikara®. Ch ... Chikara®**

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub> (g/L Ch)	Unzureichende Daten	0,000026	1,4
R <sup>2</sup>	Unzureichende Daten	0,92	0,95
Testart	Vortest	Vortest	Vortest

**Detailergebnisse der Mischung Chikara® mit Karibu®:**

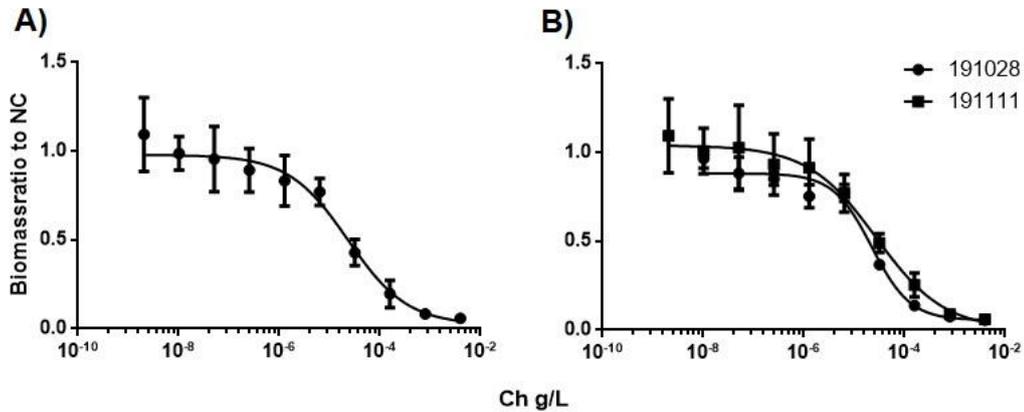


**Abbildung 22: Dosis-Wirkungskurve des AGI Vortests mit der Mischung Chikara® + Karibu®.**

**Tabelle 22: Details des AGI Vortests mit der Mischung Chikara® + Karibu®.** Ch ... Chikara®; PPs ... Polyether-Polymethylsiloxan-Copolymer

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub>	Nicht durchgeführt	0,000015 g/L Ch + 0,00000015 g/L PPs	Nicht durchgeführt
R <sup>2</sup>	Nicht durchgeführt	0,88	Nicht durchgeführt
Testart	Nicht durchgeführt	Haupttest	Nicht durchgeführt

**Detailergebnisse der Mischung Chikara® mit Wetcit®:**

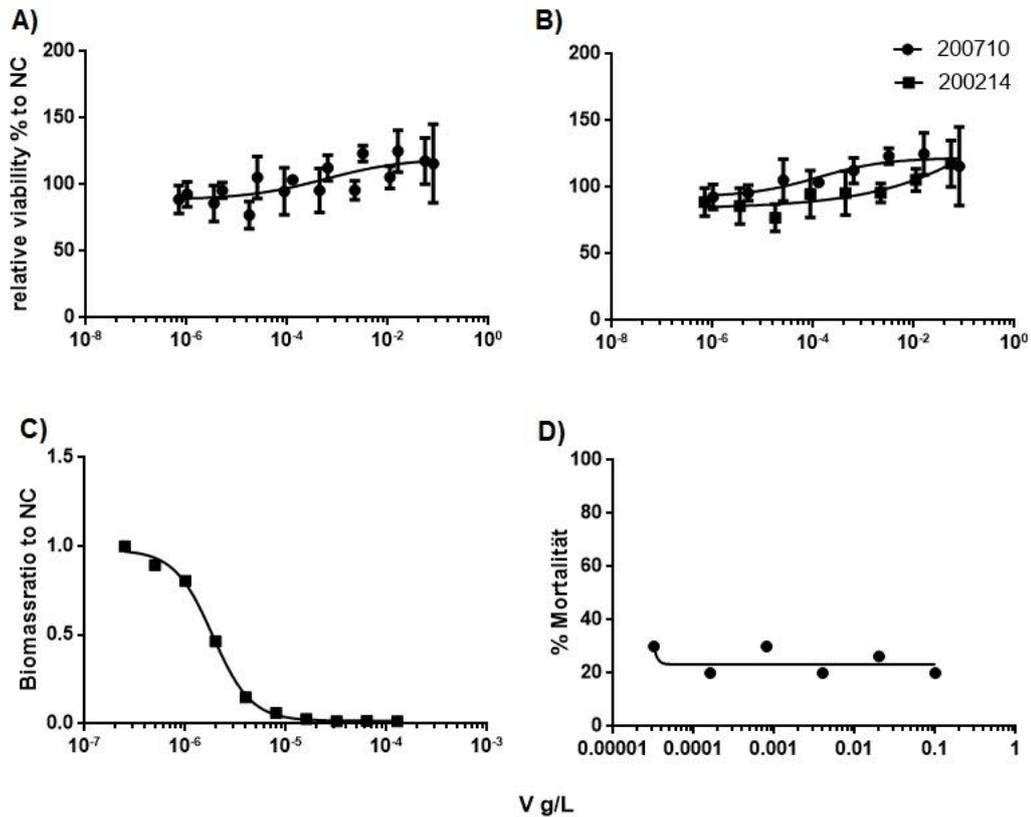


**Abbildung 23: Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstests mit der Mischung Chikara® + Wetcit®.**  
A) Dosis-Wirkungskurve der gepoolten Daten der AGI Vortests. B) Dosis-Wirkungskurven der einzelnen AGI Vortests.

**Tabelle 23: Details zu den Toxizitätstests mit der Mischung Chikara® + Wetcit®.** Ch ... Chikara®;  
W ... Wetcit®

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub>	Nicht durchgeführt	0,000023 g/L Ch + 0,00002 % v/v W	Nicht durchgeführt
R <sup>2</sup>	Nicht durchgeführt	0,91	Nicht durchgeführt
Testart	Nicht durchgeführt	Vortest	Nicht durchgeführt

**Detailergebnisse des Herbizides Valdor® Flex:**

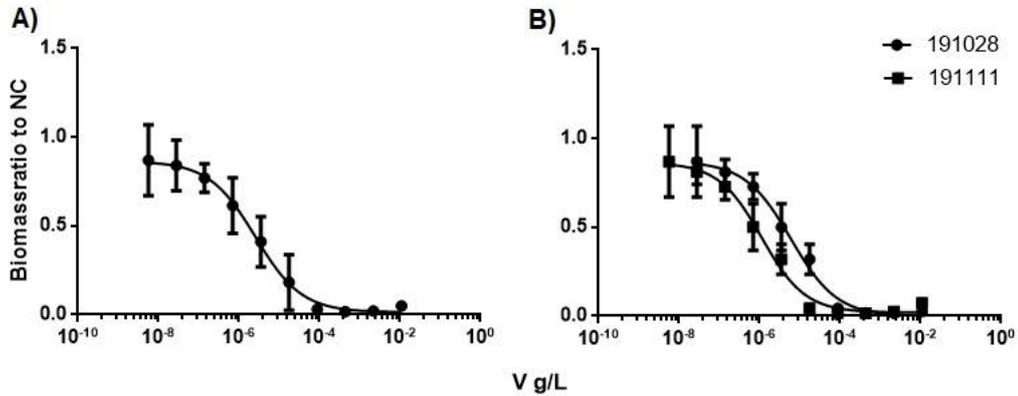


**Abbildung 24: Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstests mit der Substanz Valdor® Flex.** A) Dosis-Wirkungskurve für die gepoolten Daten der NRU Vortests. B) Dosis-Wirkungskurven der einzelnen NRU Vortests. C) Dosis-Wirkungskurve des AGI Haupttests. D) Dosis-Wirkungskurve des FET Vortests.

**Tabelle 24: Details zu den Toxizitätstests mit der Substanz Valdor® Flex.** V ... Valdor® Flex

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub> (g/L V)	Unzureichende Daten	0,0000018	Unzureichende Daten
R <sup>2</sup>	Unzureichende Daten	0,96	Unzureichende Daten
Testart	Vortest	Haupttest	Vortest

**Detailergebnisse der Mischung Valdor® Flex mit Wetcit®:**

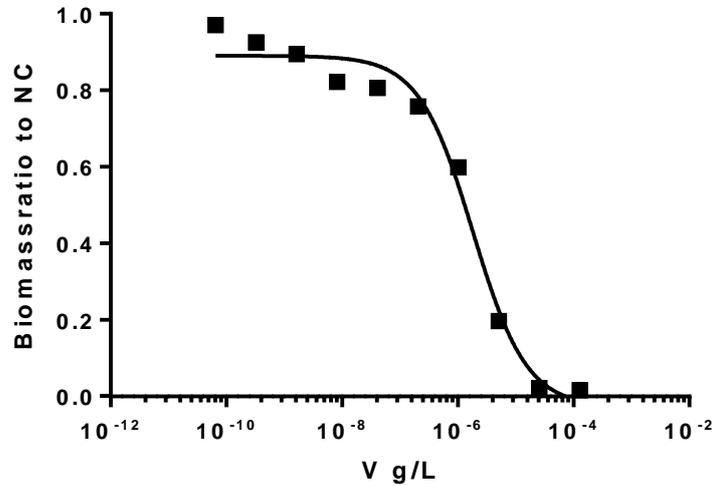


**Abbildung 25:**Dosis-Wirkungskurven der Toxizitätstests mit der Mischung Valdor® Flex +Wetcit®. A) Dosis-Wirkungskurve der gepoolten Daten der AGI Vortests. B) Dosis-Wirkungskurven der einzelnen AGI Vortests.

**Tabelle 25:** Details zu den Toxizitätstests mit der Mischung Valdor® Flex + Wetcit®. V ... Valdor® Flex; W ... Wetcit®

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub>	Nicht durchgeführt	0,0000025 g/L V + 0,00000081 % v/v W	Nicht durchgeführt
R <sup>2</sup>	Nicht durchgeführt	0,91	Nicht durchgeführt
Testart	Nicht durchgeführt	Vortest	Nicht durchgeführt

**Detailergebnisse der Mischung Valdor® Flex mit Karibu®:**

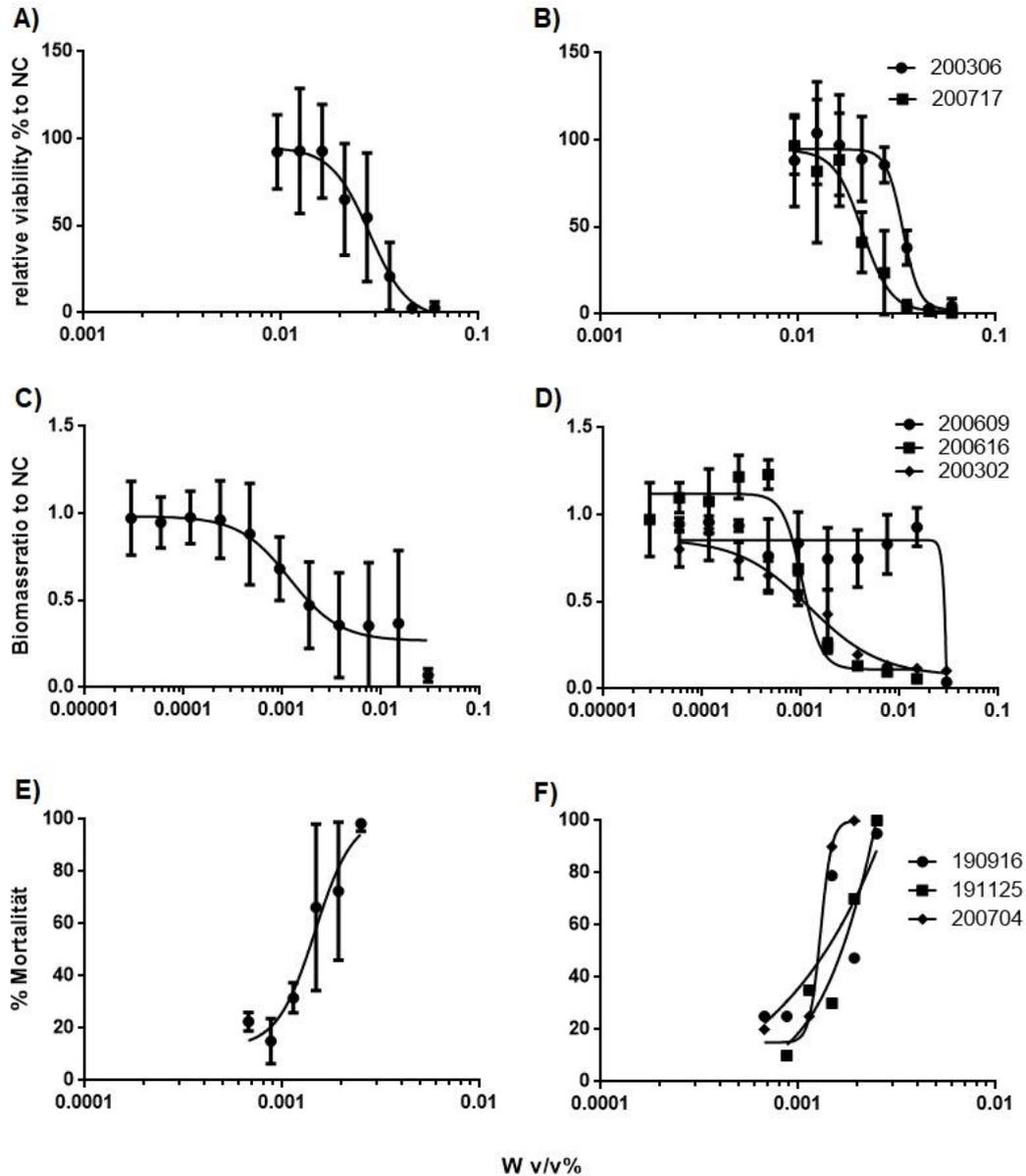


**Abbildung 26: Dosis-Wirkungskurve des AGI Haupttests mit der Mischung Valdor® Flex + Karibu®.**

**Tabelle 26: Details des AGI Test mit der Mischung Valdor® Flex + Karibu®.** V ... Valdor® Flex; PPs ... Polyether-Polymethylsiloxan-Copolymer

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub>	Nicht durchgeführt	0,0000018 g/L V + 0,0000058 g/L PPs	Nicht durchgeführt
R <sup>2</sup>	Nicht durchgeführt	0,90	Nicht durchgeführt
Testart	Nicht durchgeführt	Haupttest	Nicht durchgeführt

Detailergebnisse des Netzmittels Wetcit®:

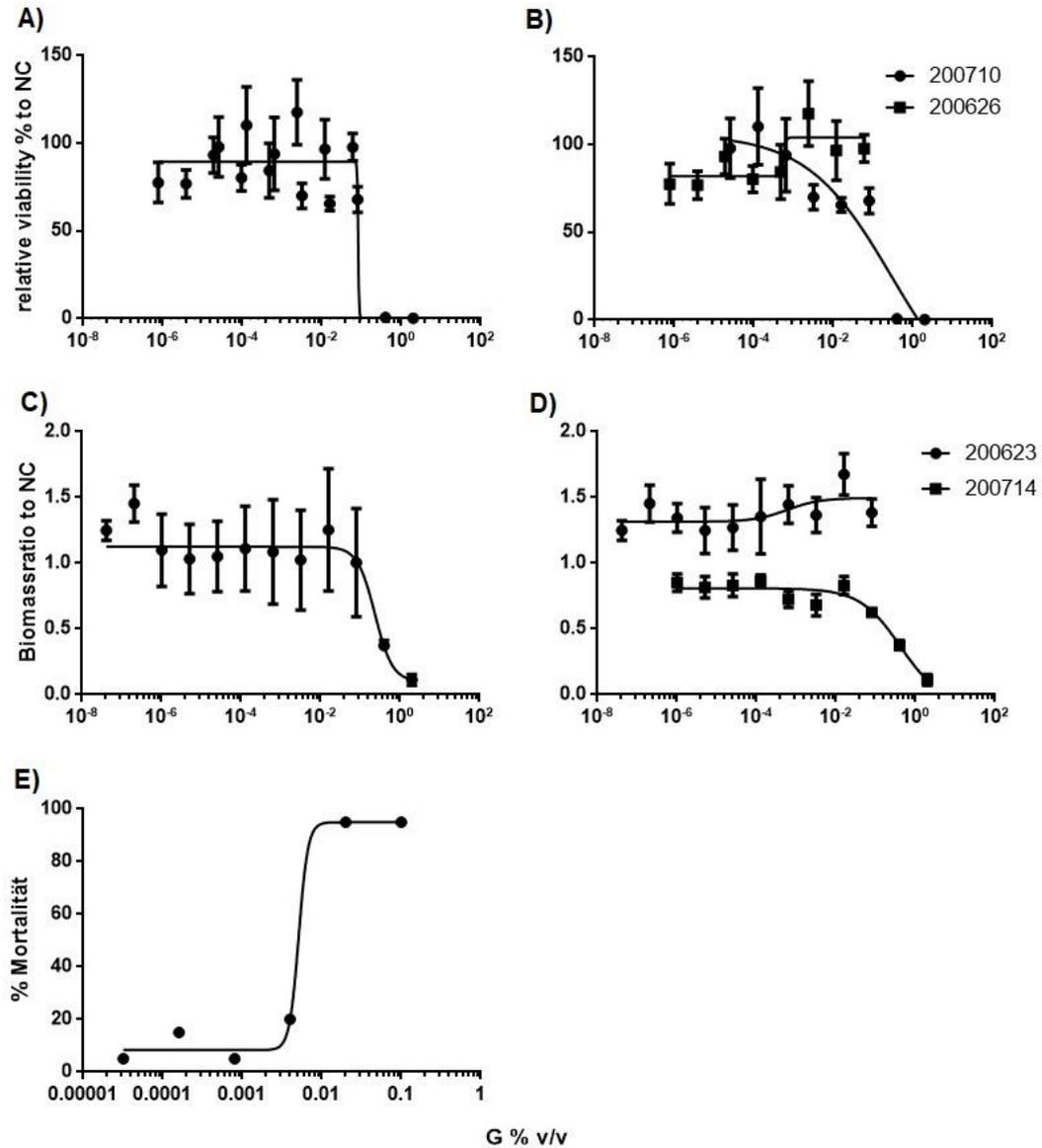


**Abbildung 27: Dosis-Wirkungskurven aus den Daten der Substanz Wetcit®.** A) Dosis-Wirkungskurve aus den gepoolten Daten der NRU Tests. B) Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der NRU Tests. C) Dosis-Wirkungskurve aus den gepoolten Daten der AGI Tests. D) Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der AGI Haupttests. E) Dosis-Wirkungskurve aus den gepoolten Daten der FET-Haupttests, aus den 96 Stunden Beobachtungen. F) Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der FET-Haupttests, aus den 96 Stunden Beobachtungen.

**Tabelle 27: Details zu den Toxizitätstests mit der Substanz Wetcit®. W ... Wetcit®**

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub> (% v/v W)	0,028	0,011	0,0014
R <sup>2</sup>	0,68	0,55	0,76
Testart	Haupttest	Haupttest	Haupttest

**Detailergebnisse des Netzmittels Grounded®:**

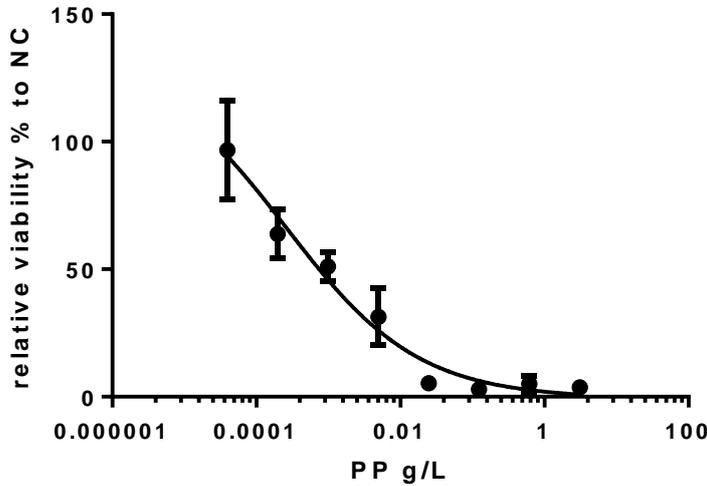


**Abbildung 28: Dosis-Wirkungskurven aus den Daten der Substanz Grounded®.** A) Dosis-Wirkungskurve aus den gepoolten Daten der NRU Tests. B) Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der NRU Tests. C) Dosis-Wirkungskurve aus den gepoolten Daten der AGI Tests. D) Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der AGI Haupttests. E) Dosis-Wirkungskurve aus des FET-Haupttests, aus den 96 Stunden Beobachtungen.

**Tabelle 28: Details zu den Toxizitätstests der Substanz Grounded®. G ... Grounded®**

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub> (% v/v G)	0,08	0,80	0,005
R <sup>2</sup>	0,73	0,82	0,99
Testart	Vortest	Haupttest	Vortest

**Detailergebnisse des Netzmittels Karibu®:**



**Abbildung 29: Dosis-Wirkungskurve ders NRU Vortests mit der Substanz Karibu®.**

**Tabelle 29: Details zu den Toxizitätstests mit der Substanz Karibu®.** PPs ... Polyether-Polymethylsiloxan-Copolymer

	Neutral Red Uptake	Algal Growth Inhibition	Fish embryo toxicity
EC <sub>50</sub> (g/L PPs)	0,0002	Nicht durchgeführt	Nicht durchgeführt
R <sup>2</sup>	0,91	Nicht durchgeführt	Nicht durchgeführt
Testart	Vortest	Nicht durchgeführt	Nicht durchgeführt

## ANHANG II:

**Tabelle 30: Halbwertszeit der aktiven Substanzen der getesteten Herbizide unter unterschiedlichen Bedingungen.** Die Daten sind den Publikationen der EFSA entnommen worden bzw. stammen aus der Datenbank Pubchem.<sup>19–21,24–31</sup>

<i>Substanz</i>	<i>Halbwertszeit</i>	<i>Substrat</i>	<i>Konditionen</i>	<i>Photolyse</i>	<i>Hydrolyse</i>
Glyphosat	135-1000 Tage	Boden	anaerob	stabil	stabil
	13.8–301 Tage	Wasser	aerob	photolysierbar	stabil
Pelargonsäure	< 1 Tag	Boden	aerob	stabil	Keine Angabe
	1 Tag	Wasser	aerob	stabil	Keine Angabe
Maleinsäurehydrazid	50 Tage	Wasser	aerob	photolysierbar	stabil
	>200 Tage	Wasser	anaerob	photolysierbar	stabil
	2-6 Tage *	Boden	aerob	photolysierbar	stabil
Flumioxazin	14 – 8 Tage	Boden	aerob	photolysierbar	rapide
	5 Tage -1 Tag (pH abhängig)	Wasser	aerob	photolysierbar	rapide
Flazasulfuron	16 Tage – 1 Tage (pH abhängig)	Wasser	aerob	photolysierbar	rapide
	Bis zu 30 Tage (pH und Feuchtigkeits abhängig)	Boden	aerob	photolysierbar	rapide
Iodosulfuron	1-20 Tage	Boden	aerob	stabil	keine Angabe
	5 - 200 tage (stark pH abhängig)	Wasser	aerob	photolysierbar	keine Angabe
Diflufenican	44 - 248 Tage	Boden	aerob	stabil	stabil
	87-400 Tage	Boden	anaerob	stabil	stabil
	139 Tage	Wasser	aerob	stabil	stabil

In Tabelle 30 ist die detaillierten Aufzeichnungen der EFSA zu der Persistenz der aktiven Substanzen unter unterschiedlichen Umweltbedingungen zu sehen. Dabei zeigen die Substanzen Pelargonsäure, Flumioxazin und Flazasulfuron vergleichsweise die geringste Halbwertszeit. Außerdem zeigt Tabelle 31 zusätzlich die Persistenz bekannter Metabolite der aktiven Substanzen, bewertet nach EFSA. Pelargonsäure weist keine Metabolite auf, da sie komplett in organischen Kohlenstoff umgewandelt wird, weiters zeigen die Metabolite von Maleinsäurehydrazid, Glyphosat und Flumioxazin eine niedrige Persistenz auf. Aufgrund mangelnder Berichte und Forschung, gab es bei mehreren Metaboliten der Substanz Flumioxazin keine Angabe zu der Persistenz in dem Bericht der EFSA.<sup>19</sup>

**Tabelle 31: Metabolite der aktiven Substanzen.** Alle Informationen über die angegebenen Metaboliten und ihrer Persistenz stammen aus den öffentlichen Publikationen der EFSA.<sup>19–21,24–27</sup>

Substanzen	Metaboliten	Persistenz (nach EFSA)
Glyphosat	(aminomethyl)phosphonic acid	Niedrige Persistenz
	(hydroxymethyl)phosphonic acid	Niedrige Persistenz
Pelargonsäure	/	/
Maleinsäurehydrazid	Maleinsäure	Niedrige Persistenz
	Salpetersäure	Niedrige Persistenz
	Ameisensäure	Niedrige Persistenz
	Fumarsäure	Niedrige Persistenz
	Bernsteinsäure	Niedrige Persistenz
Flumioxazin	cyclohex-1-ene-1,2-dicarboxylic acid	Niedrige Persistenz
	4,5,6,7-tetrahydro-2-benzofuran-1,3-dione	Niedrige Persistenz
	6-amino-7-fluoro-4-(prop-2-yn-1-yl)-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i> )-one	Keine Angabe
	2-[[7-fluoro-3-oxo-4-(prop-2-yn-1-yl)-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-6-yl]carbamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylic acid	Keine Angabe
	N-(2-propynyl)-4-[4-carboxy-3-fluoro-2-(3,4,5,6-	Keine Angabe

Substanzen	Metaboliten	Persistenz (nach EFSA)
	tetrahydrophthalimido)-2-butenylidene]azetidine-2-one	
	N-(2-propynyl)-4-[4-carboxy-3-fluoro-2-(2-carboxy-1-cyclohexencarbonylamino)-2-butenylidene]azetidine-2-one	Keine Angabe
	(1S,2S)-2-[[7-fluoro-3-oxo-4-(prop-2-yn-1-yl)-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-6-yl]carbamoyl]cyclohexanecarboxylic acid	Keine Angabe
Flazasulfuron	3-(Trifluoromethyl)pyridine-2-sulfonamide	Sehr hohe Persistenz
	4,6-Dimethoxypyrimidin-2-amine	Mittlere Persistenz
	1-(4,6-Dimethoxypyrimidin-2-yl)-1-[3-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]urea	Hohe – sehr hohe Persistenz
	4,6-Dimethoxy-N-[3-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]pyrimidin-2-amine	Hohe – sehr hohe Persistenz
	N-[(4-Methoxy-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)carbamoyl]-3-(trifluoromethyl)pyridine-2-sulfonamide	Niedrige Persistenz
	6-Methoxy-2-[[3-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]amino]pyrimidin-4-ol	Niedrige – mittlere Persistenz
	N-(Carbamimidoylcarbamoyl)-3-(trifluoromethyl)pyridine-2-sulfonamide	Niedrige – mittlere Persistenz
	1-(4-Hydroxy-6-methoxypyrimidin-2-yl)-1-[3-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]urea	Sehr niedrige – Niedrige Persistenz

Substanzen	Metaboliten	Persistenz (nach EFSA)
	3-(Trifluoromethyl)pyridin-2	Niedrige – Hohe Persistenz
Iodosulfuron	methyl 2-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-ylcarbamoylsulfamoyl)benzoate	Niedrige – Mittlere Persistenz
	4-iodo-2-[(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)carbamoyl]sulfamoyl}benzoic acid	Mittlere – Hohe Persistenz
	methyl 4-iodo-2-[(4-methyl-6-oxo-1,6-dihydro-1,3,5-triazin-2-yl)carbamoyl]sulfamoyl}benzoate	Niedrige – Hohe Persistenz
	Methyl 2-[(4-methyl-6-oxo-1,6-dihydro-1,3,5-triazin-2-yl)carbamoyl]sulfamoyl}benzoate	Niedrige – Mittlere Persistenz
	1-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)urea	Niedrige – Hohe Persistenz
	methyl2-[(N-carbamoylcarbamimidoyl)carbamoyl]sulfamoyl}benzoate	Mittlere – Hohe Persistenz
	4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-amine	Mittlere – Sehr hohe Persistenz
	methyl 4-hydroxy-2-[(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)carbamoyl]sulfamoyl}benzoate	Niedrige – Mittlere Persistenz
Diflufenican	2-[3-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridine-3-carboxylic acid	Niedrige – Mittlere Persistenz
	2-[3-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridine-3-carboxamide	Mittlere Persistenz

Substanzen	Metaboliten	Persistenz (nach EFSA)
	<i>N</i> -(2,4-difluorophenyl)-2-oxo- <i>N</i> -[3-(trifluoromethyl)phenyl]-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide	Keine angabe
	2,4-difluoroaniline	Keine Angabe

## ANHANG III:

### pH-Werte der NRU Tests:

Tabelle 32: pH-Werte der Mischungen des NRU Tests. SDS ... Natriumlaurylsulfat

Test	Tag	Substanz/Mischung	Konzentration	pH	Medium
NRU	25.10.2019	Finalsan	10 g/L	7,5	DMEM++
NRU	25.10.2019	Touchdown®	10 g/L	7	DMEM++
NRU	25.10.2019	Wetcit®	0,3 % v/v	7,9	DMEM++
NRU	25.10.2019	Touchdown® + Wetcit®	10 g/L + 0,11% v/v	7	DMEM++
NRU	25.10.2019	Finalsan + Wetcit®	10 g/L + 0,09 % v/v	7,6	DMEM++
NRU	31.10.2019	SDS	100 g/L	8,3	DMEM++
NRU	31.10.2019	Touchdown® + Wetcit®	10 g/L + 0,11% v/v	7,1	DMEM++
NRU	31.10.2019	Finalsan + Wetcit®	10 g/L + 0,09 % v/v	7,8	DMEM++
NRU	31.10.2019	Finalsan + Valdor® Flex + Wetcit®	10 g/L + 0,32 g/L + 0,09 % v/v	7,85	DMEM++
NRU	31.10.2019	Finalsan + Chikara® + Wetcit®	10 g/L + 0,12 g/L + 0,09 % v/v	7,81	DMEM++
NRU	31.10.2019	Finalsan + Nozomi® + Wetcit®	10 g/L + 0,16 g/L + 0,09 % v/v	7,86	DMEM++
NRU	03.03.2020	Karibu®	0,012% v/v	7,7	DMEM++
NRU	03.03.2020	Wetcit®	0,06% v/v	7,64	DMEM++
NRU	03.03.2020	Finalsan + Wetcit®	0,4 g/L + 0,00384% v/v	7,94	DMEM++
NRU	15.09.2019	Wetcit®	0,3% v/v	7,84	DMEM++
NRU	15.09.2019	Finalsan	0,04% v/v =	7,87	DMEM++
NRU	15.09.2019	Touchdown®	0,0006 g/L	7,72	DMEM++
NRU	15.09.2019	Touchdown® + Wetcit®	0,0006 g/L+ 0,000006%v/v	7,6	DMEM++
NRU	15.09.2019	Finalsan + Wetcit®	0,04%v/v + 0,00068%v/v	7,77	DMEM++
NRU	15.09.2019	SDS	200 g/L	8,25	DMEM++
NRU	15.11.2019	Touchdown®	10 g/L	7,2	DMEM++
NRU	15.11.2019	Finalsan	10 g/L	7,46	DMEM++
NRU	15.11.2019	Wetcit®	0,3 % v/v	7,68	DMEM++
NRU	15.11.2019	Finalsan + WtCit	10 g/L + 0,09% v/v	7,5	DMEM++
NRU	15.11.2019	Touchdown® + Wetcit®	10 g/L + 0,11% v/v	6,99	DMEM++
NRU	15.11.2019	SDS	100 g/L	7,9	DMEM++
NRU	15.11.2019	Finalsan + Nozomi® + Wetcit®	10 g/L+ 0,16 g/L+ 0,09% v/v	7,61	DMEM++
NRU	15.11.2019	Finalsan + Valdor® Flex + Wetcit®	10 g/L+ 0,32 g/L + 0,09%v/v	7,55	DMEM++

Test	Tag	Substanz/Mischung	Konzentration	pH	Medium
NRU	31.01.2020	Finalsan + Wetcit®	10 g/L + 0,09% v/v	7,42	DMEM++
NRU	17.06.2020	SDS	10 g/L	7,83	DMEM++
NRU	23.06.2020	Nozomi® + Chikara® + Wetcit®	0,0002 g/L N + 0,000033 g/L Ch + 0,000025 % v/v	7,54	DMEM++
NRU	23.06.2020	Nozomi® + Chikara®	0,0002 g/L N + 0,000033 g/L Ch	7,5	DMEM++
NRU	23.06.2020	Nozomi® + Wetcit®	0,0002 g/L N + 0,000025 % v/v	7,5	DMEM++
NRU	23.06.2020	Grounded®	0,06 % v/v	7,54	DMEM++
NRU	23.06.2020	SDS	1,5 g/L SDS	7,92	DMEM++
NRU	30.06.2020	Grounded®	2 % v/v	7,9	DMEM++
NRU	30.06.2020	Nozomi®	0,096 g/L	7,8	DMEM++
NRU	30.06.2020	Chikara®	0,08 g/L	8,1	DMEM++
NRU	30.06.2020	Valdor® Flex	0,04 g/L	7,7	DMEM++
NRU	30.06.2020	SDS	1,5 g/L	7,8	DMEM++
NRU	30.06.2020	Touchdown® + Wetcit®	0,18 g/L GL in TD + 0,00199% v/v	7,8	DMEM++
NRU	15.07.2020	Grounded®	0,4 % v/v	7,41	DMEM++
NRU	15.07.2020	Wetcit®	0,06 % v/v	7,35	DMEM++
NRU	15.07.2020	Touchdown® + Wetcit®	0,16 g/L GL + 0,0019 % v/v W	7,45	DMEM++
NRU	15.07.2020	Finalsan + Chikara®	0,4 g/L PA + 0,0051 g/L Ch	7,46	DMEM++
NRU	15.07.2020	Finalsan + Nozomi®	0,4 g/L PA + 0,03 g/L N	7,47	DMEM++
NRU	15.07.2020	SDS	2 g/L	7,56	DMEM++

## pH-Werte der AGI Tests

**Tabelle 33: pH-Werte der Mischungen des AGI Tests.** DMSO ... Dimethylsulfoxid

Test	Tag	Substanz/Mischung	Konzentration	pH	Medium
AGI	10.07.2019	Finalsan	ohne Verdünnung	8,59	Algal media (BMPF)
AGI	10.07.2019	Touchdown®	5 % v/v	6,4	Algal media (BMPF)
AGI	10.07.2019	Wetcit®	0,3 % v/v	7,58	Algal media (BMPF)
AGI	10.07.2019	Nozomi®	6 g/L	7,47	Algal media (BMPF)
AGI	10.07.2019	Valdor® Flex	1,66 g/L	8,23	Algal media (BMPF)
AGI	10.07.2019	Chikara®	1 g/L (200g in 200L)	4,75	Algal media (BMPF)
AGI	28.10.2019	Valdor® Flex	0,022 g/L	7,41	Algal media (BMPF)
AGI	28.10.2019	Valdor® Flex + Wetcit®	0,022 g/L + 0,007% v/v	7,5	Algal media (BMPF)
AGI	28.10.2019	Finalsan + Valdor® Flex	0,74 g/L + 0,022 g/L	7,4	Algal media (BMPF)
AGI	28.10.2019	Finalsan + Valdor® Flex + Wetcit®	0,74 g/L + 0,022 g/L + 0,007% v/v	7,4	Algal media (BMPF)
AGI	28.10.2019	Chikara®	0,008 g/L	7,52	Algal media (BMPF)
AGI	28.10.2019	Chikara® + Wetcit®	0,008 g/L + 0,007 % v/v	7,54	Algal media (BMPF)
AGI	28.10.2019	Finalsan + Chikara®	0,74 g/L + 0,008 g/L	7,47	Algal media (BMPF)
AGI	28.10.2019	Finalsan + Chikara® + Wetcit®	0,74 g/L + 0,008 g/L + 0,007 % v/v	7,44	Algal media (BMPF)
AGI	28.10.2019	Finalsan + Nozomi®	0,74 g/L + 0,056 g/L	7,4	Algal media (BMPF)
AGI	28.10.2019	Finalsan + Nozomi® + Wetcit®	0,74 g/L + 0,056 g/L + 0,007 % v/v	7,4	Algal media (BMPF)
AGI	28.10.2019	DMSO	30 % v/v	8,5	Algal media (BMPF)
AGI	29.01.2020	Touchdown®	1,8 g/L	6,64	Algal media (BMPF)
AGI	29.01.2020	Touchdown® + Wetcit®	1,8 g/L + 0,004 % v/v	6,66	Algal media (BMPF)
AGI	29.01.2020	Finalsan	0,4 g/L	7,17	Algal media (BMPF)
AGI	29.01.2020	Finalsan + Wetcit®	0,4 g/L + 0,00384 % v/v	7,14	Algal media (BMPF)
AGI	12.02.2020	Karibu®	0,3 % v/v	7,34	Algal media (BMPF)

Test	Tag	Substanz/Mischung	Konzentration	pH	Medium
AGI	12.02.2020	Touchdown® + Karibu®	1,8 g/L + 0,004 % v/v	6,63	Algal media (BMPF)
AGI	12.02.2020	Finalsan + Karibu®	0,4 g/L + 0,00384 % v/v	7,07	Algal media (BMPF)
AGI	12.02.2020	DMSO	30% v/v	8,15	Algal media (BMPF)
AGI	02.03.2020	Touchdown® + Wetcit®	1,8 g/L + 0,004 % v/v	6,69	Algal media (BMPF)
AGI	02.03.2020	Finalsan + Wetcit®	0,4 g/L + 0,00384 % v/v	7,12	Algal media (BMPF)
AGI	02.03.2020	Wetcit®	0,03 % v/v	7,72	Algal media (BMPF)
AGI	02.03.2020	Finalsan	0,4 g/L	6,65	Algal media (BMPF)
AGI	02.03.2020	Touchdown®	1,8 g/L	7,28	Algal media (BMPF)
AGI	02.03.2020	DMSO	30% v/v	8,45	Algal media (BMPF)
AGI	19.02.2020	Valdor® Flex	0,000256 g/L	7,81	Algal media (BMPF)
AGI	19.02.2020	Nozomi®	0,0000384 g/L	7,86	Algal media (BMPF)
AGI	19.02.2020	Chikara®	0,0008 g/L	7,82	Algal media (BMPF)
AGI	19.02.2020	Valdor® Flex + Karibu®	0,000256 g/L + 0,000081%v/v	7,81	Algal media (BMPF)
AGI	19.02.2020	Nozomi® + Karibu®	0,0000384 g/L + 0,0000048% v/v	7,86	Algal media (BMPF)
AGI	19.02.2020	Chikara® + Karibu®	0,0008 g/L+0,0007% v/v	7,82	Algal media (BMPF)
AGI	09.06.2020	Finalsan + Wetcit®	0,4 g/L PA + 0,00384 % v/v W	7,12	Algal media (BMPF)
AGI	09.06.2020	Touchdown® + Wetcit®	1,8 g/L GL+ 0,04 % v/v	6,53	Algal media (BMPF)
AGI	09.06.2020	Touchdown®	1,8 g/L GL	6,5	Algal media (BMPF)
AGI	09.06.2020	Wetcit®	0,015 % v/v	7,26	Algal media (BMPF)
AGI	16.06.2020	Finalsan + Wetcit®	0,4 g/L PA + 0,00384 % v/v W	7,01	Algal media (BMPF)
AGI	16.06.2020	Touchdown® + Wetcit®	1,8 g/L GL + 0,2 % v/v W	6,53	Algal media (BMPF)
AGI	16.06.2020	Touchdown®	1,8 g/L GI	6,47	Algal media (BMPF)
AGI	16.06.2020	Wetcit®	0,015 % v/v	7,2	Algal media (BMPF)

Test	Tag	Substanz/Mischung	Konzentration	pH	Medium
AGI	23.06.2020	Nozomi® + Chikara® + Wetcit®	0,0002 g/L N + 0,000033 g/L Ch + 0,000025 % v/v	7,37	Algal media (BMPF)
AGI	23.06.2020	Nozomi® + Chikara®	0,0002 g/L N + 0,000033 g/L Ch	7,32	Algal media (BMPF)
AGI	23.06.2020	Finalsan + Chikara®	0,4 g/L PA + 0,0051 g/L Ch	7,1	Algal media (BMPF)
AGI	23.06.2020	Finalsan + Nozomi®	0,4 g/L PA + 0,03 g/L N	7,05	Algal media (BMPF)
AGI	23.06.2020	Nozomi® + Wetcit®	0,0002 g/L N + 0,000025 % v/v	7,35	Algal media (BMPF)
AGI	23.06.2020	Grounded®	0,08 % v/v	7,31	Algal media (BMPF)
AGI	14.07.2020	Grounded®	2 % v/v	7,37	Algal media (BMPF)
AGI	14.07.2020	Nozomi® + Grounded®	0,0002 g/L N + 0,0000066 % v/v	7,52	Algal media (BMPF)
AGI	21.07.2020	Nozomi®	0,000128 g/L N	7,61	Algal media (BMPF)
AGI	21.07.2020	Grounded®	2 % v/v	7,3	Algal media (BMPF)
AGI	21.07.2020	DMSO	30% v/v	8,11	Algal media (BMPF)
AGI	15.08.2020	Finalsan + Nozomi®	0,4 g/L PA + 0,03 g/L N	7,07	Algal media (BMPF)
AGI	15.08.2020	Nozomi® + Chikara®	0,00004 g/L N + 0,0000066 g/L Ch	7,44	Algal media (BMPF)
AGI	15.08.2020	Nozomi® + Wetcit®	0,00004 g/L N + 0,000005 % v/v W	7,44	Algal media (BMPF)
AGI	15.08.2020	Nozomi®	0,00004 g/L	7,48	Algal media (BMPF)

## pH-Werte der FET-Tests:

Tabelle 34: pH-Werte der Mischungen des FET-Tests.

Test	Tag	Substanz/Mischung	Konzentration	pH	Medium
FET	16.07.2019	Finalsan	0,16% v/v [0,29 g/L]	7,48	Fish system water
FET	16.07.2019	Finalsan + Wetcit®	0,16% v/v [0,29 g/L] + 0,3% v/v	7,43	Fish system water
FET	17.07.2019	Touchdown®	0,138% v/v [0,005 g/L]	7,35	Fish system water
FET	17.07.2019	Touchdown® + Wetcit®	0,138% v/v + 0,3% v/v [0,005 g/L]	7,38	Fish system water
FET	08.08.2019	BSW-C	100 mg/L	7,25	Fish system water
FET	08.08.2019	BSW-F	100 mg/L	7,17	Fish system water
FET	03.02.2020	Finalsan + Wetcit®	0,04 g/L PA + 0,00038% v/v	7,3	Fish system water
FET	03.02.2020	Touchdown® + Wetcit®	0,00125 g/L GL + 0,0000012% v/v	7,4	Fish system water
FET	14.07.2020	Valdor® Flex	0,1g/L	8	Fish system water
FET	14.07.2020	Chikara®	0,1 g/L	7,28	Fish system water
FET	21.07.2020	Touchdown®	0,0125 g/L GL	7,61	Fish system water
FET	21.07.2020	Touchdown® + Wetcit®	0,0125 g/L GL + 0,000013% V/v W	7,78	Fish system water
FET	28.07.2020	Touchdown® + Wetcit®	0,0125 g/L GL + 0,000013% V/v W	7,78	Fish system water
FET	11.08.2020	Nozomi®	12,5 g/L N	7,3	Fish system water
FET	11.08.2020	Nozomi® +Chikara®	12,5 g/L N + 2 g/L Ch	6,78	Fish system water
FET	11.08.2020	Finalsan + Nozomi®	0,2 g/L PA + 0,015 g/L N	7,2	Fish system water

## ANHANG IV

Abweichungen von der OECD Richtlinie No. 129:

Anders als in Paragraph 52 vorgegeben wurde Medium mit 10% Fetal Calf Serum (FCS) im Gegensatz zu den angegebenen 5% Newborn Calf Serum (NCS) verwendet.

Abweichungen von der OECD Richtlinie 201:

Im Gegensatz zu der Richtlinie wurden die Algen nur als Stammkultur in Glass-Messbechern gehalten und für die Herbizid Exposition in 96-Mikrotiterplatten transferiert.

Abweichungen von der OECD Richtlinie No. 236:

Es konnte die 20% nominale chemische Konzentration in den Lösungen nicht bestimmt werden, da passendes Equipment nicht zur Verfügung stand. Die Well-Plates wurden nicht 24 Stunden vor Test-Beginn mit der Mixtur vor-inkubiert.

## ANHANG V

Tabelle 35: Mortalität der *Danio rerio*-Embryos in der Negativkontrolle aller durchgeführten Tests.

Datum:	Mortalität (%) nach 48 Stunden	Mortalität (%) nach 96 Stunden
2019_07_16	5	5
2019_07_17	0	0
2019_07_23	10	10
2019_08_08	20	20
2019_09_16	16,66	16,66
2019_11_25	0	0
2019_12_02	5,26	5,26
2019_12_09	20	20
2000_02_03	25	25
2000_06_30	0	0
2000_07_07	25	25
2000_07_14	20	20
2000_07_21	10	10
2000_07_28	10	10
2000_08_11	10	10
<b>Mittelwert</b>	<b>11,79</b>	<b>11,79</b>

In Tabelle 35 ist die Mortalität der Negativkontrolle in den durchgeführten FET Tests jeweils zum Zeitpunkt 48h und 96h zu sehen. Es wurde der Mittelwert gebildet.