

Evaluation submerser und emerser Makrophyten als Indikatoren für Gewässerbelastungen

Einsatz pflanzenphysiologischer Methoden in der Ökotoxikologie

Abstract

Aquatische Makrophyten werden in der Ökotoxikologie nur bedingt durch die Wasserlinse *Lemma spec.* repräsentiert. Weder Diversität im Hinblick auf taxonomische Unterschiede, noch die Vielfalt der Lebensformen werden in Teststudien bisher ausreichend berücksichtigt. Des Weiteren werden in den etablierten Tests nur Wachstumsparameter (Spross-, Seitentriebs-, Wurzellänge, Zunahme an Biomasse, etc.) untersucht, an denen eine Reaktion auf eine Chemikalie evtl. erst nach Wochen verfolgt werden kann.

Ziel des Forschungsansatzes ist es, einerseits das Potential weiterer repräsentativer Makrophyten als Testorganismen zu evaluieren und gleichzeitig die Wachstumsparameter um physiologische Endpunkte zu ergänzen.

In diesem ersten Vorversuch wurden bisher folgende Methoden erprobt: PAM (Puls-Amplituden moduliertes Fluorometer) zur Messung der Chlorophyllfluoreszenz in einer Flüssigkeitsküvette, Sauerstoffelektrode zur Messung der Photosyntheserate im Wasser, spektralphotometrische Bestimmung der in vitro-RubisCO-Aktivität.

Folgende Makrophyten wurden bisher getestet: *Riccia fluitans* (freischwimmendes Lebermoos), *Salvinia natans* (freischwimmender Farn), *Lemma minor* (monokotyl, freischwimmend), *Nymphaoides peltata* (dikotyle Schwimmblattpflanze), *Ceratophyllum demersum* (dikotyl, submers), *Elodea densa*, *Vallisneria spiralis*, *Zannichellia palustris* (monokotyl, submers), *Mentha aquatica* (dikotyl, emers).

1 Einleitung

Der Einsatz von Pestiziden in der intensiven Landwirtschaft ist enorm und wird als notwendiges und selbstverständliches Hilfsmittel zur Sicherung des Nahrungsbedarfs angesehen. Herbizide stellen ca. 55 % der genutzten Pflanzenschutzmittel dar (European Commission, 2002). Bei der Gefahrenabschätzung der Wirkung einer Substanz auf die Umwelt wird die Bewertung der Gruppe der Wasserpflanzen nur mit Einschränkungen durchgeführt. Makrophyten spielen jedoch als Primärproduzenten eine entscheidende Rolle im aquatischen Ökosystem. Bislang wurde nur die Wasserlinse (*Lemma spec.*) in die OECD-Richtlinie aufgenommen und damit weder der Diversität von Lebensformen, noch den unterschiedlichen Eigenschaften aufgrund phylogenetischer Unterschiede bei der Bewertung von Umweltchemikalien Rechnung getragen. In dieser Studie werden anhand etablierter pflanzenphysiologischer Methoden verschiedene, sowohl sub- und emerse, als auch freischwimmende Makrophyten auf Eignung als ökotoxikologische Indikatoren getestet.

2 Material & Methoden

2.1 Messungen der Chlorophyllfluoreszenz mit der PAM

Mithilfe eines PAM (Puls-Amplituden moduliertes Fluorometer) wurde die Fluoreszenz der zentralen Chlorophyllmoleküle des Photosystems II (PSII) untersucht. Hierbei lassen sich verschiedene Fluoreszenz-Parameter ermitteln, z.B. qP (photochemische Fluoreszenz-Löschung, ein Maß für die Fähigkeit der Photosysteme Elektronen zu transportieren). Andere Parameter sind qE (energieabhängige Löschung, ein Maß für die Fähigkeit der Umwandlung von Licht in Wärmeenergie) oder qI (Löschung durch Photoinhibierung, ein Maß für die Schädigung der Photosysteme durch zu starkes Licht).

Die submersen Pflanzen können direkt mithilfe einer Flüssigkeitsküvette (WALZ; s. Abb. 1) untersucht werden. Die Küvette bietet die Möglichkeit über einen seitlichen Zugang während der Messung mithilfe einer 10 µL-Hamilton-Glasspritze Substanzen direkt zu applizieren und deren Einwirkung auf einem Schreiber zu verfolgen. Dadurch können über die Aufstellung von Konzentrations-Wirkungsbeziehungen

NOEC (no effect concentration) und LOEC (lowest effect concentration) bestimmt werden. Als Substrat wurde das Herbizid Atrazin verwendet. Bei Atrazin, das zur Gruppe der Triazine gehört, handelt es sich um einen PSII-Inhibitor, der den Elektronentransport unterbricht.



Abb. 1: Flüssigkeitsküvette PAM

2.2 Messungen der Photosyntheserate mit der Sauerstoff-Elektrode

Die Photosyntheserate von submersen Makrophyten in µmol O₂ g⁻¹ FGs⁻¹ lässt sich mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode (OXI 92, WTW) bestimmen. Gemessen wird in einer Plexiglas-Küvette, die ein Volumen von 0,6 L teiltgasertes Wasser mit 10 mM KHCO₃ fasst und seitlich mit ca. 400 µE m⁻² s⁻² belichtet wird (s. Abb. 2).



Abb. 2: Küvette für O₂-Elektrode

2.3 Bestimmung der in vitro-RubisCO-Aktivität

Die RubisCO (Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase) spielt bei der Photosynthese eine entscheidende Rolle, da sie für die CO₂-Fixierung verantwortlich ist. Die Aktivität der RubisCO in µmol CO₂ m⁻² s⁻¹ bzw. g⁻¹ FGs⁻¹ wird indirekt über den Verbrauch von NADH gemessen. Die Extinktionskinetik von NADH wird mithilfe eines spektralphotometrischen Assayverfahrens bei 366 nm bestimmt (SHARKEY et al., 1991; KANE et al., 1998).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Messungen der Chlorophyllfluoreszenz mit der PAM

In den folgenden Abbildungen (Abb. 3–6) ist die photochemische Löschkomponente der Chlorophyllfluoreszenz, qP, in Abhängigkeit von der Atrazin-Konzentration in µg/L (logarithmische X-Achse) für vier verschiedenen Makrophyten graphisch dargestellt. qE und qI wurden auch gemessen, der deutlichste Effekt ist jedoch bei qP festzustellen. C steht für Kontrolle, d.h. für eine Chlorophyllfluoreszenz-Messung ohne Atrazin-Applikation. Im Anschluss sind die LOECs und NOECs aller sechs untersuchten Pflanzen im Vergleich zusammengestellt (s. Abb. 7 & 8).

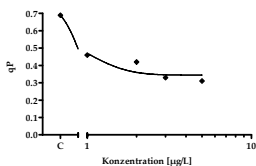


Abb. 3: Freischwimmendes Teich-Lebermoos *Riccia fluitans*.

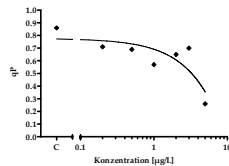


Abb. 4: Schwimmende, monokotyle Kleinen Wasserlinse, *Lemma minor*.

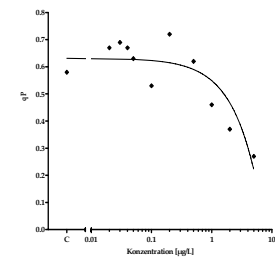


Abb. 5: Submerses, dikotyles Raues Hornblatt, *Ceratophyllum demersum*.

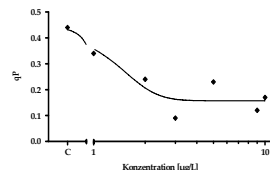


Abb. 6: Submerses, monokotyle Wasserschraube, *Vallisneria spiralis*.

Während der qP-Kontrollwert von *R. fluitans* und *L. minor* recht hoch liegt (0,69 bzw. 0,86) liegt er bei *C. demersum* und *V. spiralis* eher niedrig: 0,58 bzw. 0,44. qP sinkt mit höheren Atrazin-Konzentrationen tendenziell. Abschließend kann gesagt werden, dass sich alle untersuchten Pflanzen gut für die Chlorophyllfluoreszenz-Messung in der Flüssigkeitsküvette mit dem PAM eignen und brauchbare Ergebnisse liefern. Als besonders sensitiv haben sich die submersen Makrophyten *R. fluitans* und *C. demersum* herausgestellt. Generell eignet sich besonders qP, um direkte, durch chemische Substanzen (Direktapplikation mit der Spritze) verursachte Einflüsse während der Lichtreaktion zu erkennen und Konzentrations-Wirkungsbeziehungen aufzustellen, was Einschätzungen von LOECs und NOECs möglich machen soll.

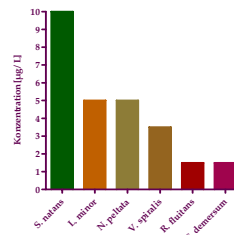


Abb. 7: LOEC (lowest effect concentration) von sechs Pflanzen im Vergleich; absteigend sortiert.

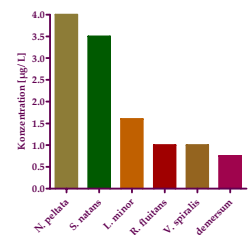


Abb. 8: NOEC (no effect concentration) von sechs Pflanzen im Vergleich; absteigend sortiert.

Die LOEC liegt bei *S. natans* mit 10 µg/L am höchsten (s. Abb. 7). Bei *L. minor* und *N. peltata* liegt sie bei 5 µg/L, bei *V. spiralis* bei 3,5 µg/L und bei *R. fluitans* und *C. demersum* liegt die LOEC bei 1,5 µg/L und damit am niedrigsten.

N. peltata hat die höchste NOEC mit 4 µg/L (s. Abb. 8), gefolgt von *S. natans* bei 3,5 µg/L. Bei *L. minor* liegt die NOEC schon bei 1,5 µg/L, bei *R. fluitans* und *V. spiralis* bei 1 µg/L und bei *C. demersum* nur bei 0,75 µg/L.

3.2 Messungen der Photosyntheserate mit der Sauerstoff-Elektrode

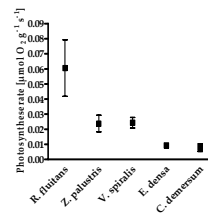


Abb. 9: Messungen der Photosyntheserate von sechs Pflanzen im Vergleich: *R. fluitans*, *Z. palustris*, *V. spiralis*, *E. densa*, *C. demersum*; absteigend sortiert; Mittelwerte & Standardabweichung.

Die Photosyntheserate von *R. fluitans* weist die höchsten Werte auf (0,06 µmol O₂ g⁻¹ s⁻¹). Die der anderen Makrophyten liegen zwischen 0,009 und 0,024 µmol O₂ g⁻¹ s⁻¹. Das Beziehen der Photosyntheserate auf das Frischgewicht birgt ein Problem: Generell sollte der Anteil an nicht assimilierendem Gewebe möglichst gering sein, um Verfälschungen zu vermeiden.

3.3 Spektralphotometrische Messungen der in vitro-RubisCO-Aktivität

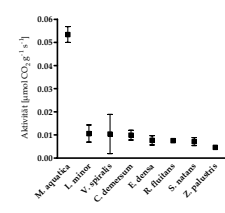


Abb. 10: RubisCO-Aktivitäten von acht Pflanzen im Vergleich: *M. aquatica*, *L. minor*, *C. demersum*, *E. densa*, *R. fluitans*, *S. natans*, *Z. palustris*; absteigend sortiert; Mittelwerte & Standardabweichung.

Die in vitro-Enzymaktivität liegt bei *M. aquatica* am höchsten (0,053 µmol CO₂ g⁻¹ s⁻¹). Alle anderen Makrophyten liegen im Bereich zwischen 0,0046 und 0,0106 µmol CO₂ g⁻¹ s⁻¹. Auch bei den Messungen der in vitro-RubisCO-Aktivität eignen sich die Pflanzen am besten, deren Anteil an assimilierendem Gewebe möglichst hoch ist.

4 Fazit und Ausblick

Dieser Vorversuch zeigt, dass alle drei angewendeten physiologischen Messmethoden für acht der bereits getesteten Makrophyten reproduzierbare Ergebnisse liefern. Die Fluoreszenz-Messungen mit dem PAM scheinen aufgrund ihrer guten Handhabbarkeit und der gezeigten Effekte bei der Löschung durch photochemische Arbeit, qP, als Indikatorermethode in der Ökotoxikologie geeignet. Auch die speziell für submersen Makrophyten entwickelte Plexiglas-Küvette zur Messung der Photosyntheserate und die Messungen der in vitro-RubisCO-Aktivität nach den Methoden von SHARKEY et al. (1991) und KANE et al. (1998) liefern valide Ergebnisse, die den Einsatz der Methoden zur Effektbeschreibung interessant machen. Die nächsten Versuchsreihen werden darauf abzielen, die Messungen der Photosyntheseraten und Enzymaktivitäten unter Herbizid-Belastung mit den Fluoreszenz-Daten und klassischen Wachstumsparametern (siehe HIDDING et al., 2006) zu vergleichen. Ziel des Forschungsprojektes ist es, über pflanzenphysiologische Endpunkte eine Vorhersagbarkeit der Vitalitätsentwicklung von aquatischen Makrophyten zu erreichen. Somit könnten ökotoxikologische Makrophyten-Tests mit physiologischen Kriterien als Ergänzung der klassischen Parameter zu aussagekräftigen Methoden entwickelt werden.

5 Literatur

EUROPEAN COMMISSION (2002): Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology, Directive 91/414/EEC. FENT, K. (2003): Ökotoxikologie - Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. HELDT, H. W. (2003): Pflanzenbiochemie. 3. Auflage, Spektrum akademischer Verlag Gustav Fischer, Heidelberg, Berlin. HIDDING et al. (2006) Poster Setac-Europe (German Language Branch). KANE et al. (1998) Plant Physiol. 117: 1059-1069. SCHEEBAUM, M. V. (2006): Biomonitoring of herbicide impact using aquatic macrophytes: Laboratory and field studies for the evaluation of potential toxicity on aquatic plants. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Dissertation. SHARKEY et al. (1991) Phot. Res. 67, 147-156. STRASBURGER, E. (2002): Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 35. Auflage, Spektrum akademischer Verlag Gustav Fischer, Heidelberg, Berlin.

Kontakt: Alexandra Botzat
Institut für Gewässerschutz -
MESOCOSM GmbH
Homberg (Ohm)
abotzat@hotmail.com