

***Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol**

Dirk Maletzki · Andreas Hünken · Ines Hübner · Carola Kussatz

Eingegangen: 30. Juni 2010 / Akzeptiert: 22. September 2010 / Online veröffentlicht: 21. Oktober 2010
© Springer-Verlag 2010

Zusammenfassung *Hintergrund und Ziel* In der modernen Land- und Forstwirtschaft ist die Verwendung von Pflanzenschutzmitteln (PSM) weit verbreitet. Ihr Einsatz birgt jedoch auch Risiken für die Umwelt, da im Rahmen ihrer bestimmungsgemäßen Verwendung auch ein Eintrag in Nichtzielflächen nicht auszuschließen ist. So kann z. B. durch Abdrift, durch Niederschlagswasser sowie durch Runoff und Dränagen von behandelten Flächen ein Eintrag in Oberflächengewässer erfolgen.

Obwohl wurzelnde dikotyle Makrophyten einen wichtigen Bestandteil des Ökosystems darstellen, werden sie bei der Bewertung des Risikos von PSM-Anwendungen für Wasserorganismen im Rahmen der Eingangsuntersuchung standardmäßig nicht berücksichtigt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines standardisierten Einphasentestsystems mit dem zweikeimblättrigen Ährigen Tausendblatt *Myriophyllum spicatum* (Haloragaceae).

Methoden Um substanzspezifische Daten zur Ökotoxizität zu erhalten, wurde ein sedimentfreies Einphasentestsystem gewählt, das Bedingungen bietet, die unabhängig vom Verteilungsverhalten der Testsubstanzen zwischen der Sediment- und Wasserphase sind. Die ausschließliche Exposition der Pflanzen über die Wasserphase beschränkt den analytischen Aufwand und erleichtert die Modellierung der Ergebnisse, da nur die Wasserphase berücksichtigt werden muss. Zudem ermöglicht diese Methode den direkten Vergleich mit Testergebnissen mit der monokotyledonen Wasserlinse *Lemna* sp. (OECD-Prüfrichtlinie 221, OECD

2006); Studien zur Toxizität gegenüber *Lemna* stellen eine Standardtestanforderung für Herbizide dar.

Ergebnisse, Diskussion, Schlussfolgerungen Die Exposition von *Myriophyllum spicatum* erfolgt über 14 Tage unter axenischen Bedingungen im Klimaschrank. Mit dem Test wird die Ökotoxizität gegenüber *Myriophyllum spicatum* bezogen auf die Wachstumshemmung in Form einer Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelt. Zur Auswertung werden die Endpunkte Zunahme der Hauptsprosslänge, Wachstum der Seitentriebe, Zunahme der Gesamtsprosslänge (Summe aus Hauptsprosslänge und Seitentrieben) und Wachstum der Wurzeln sowie die Zunahme des Frisch- und Trockengewichtes der Pflanzen herangezogen. In dieser Arbeit werden das Testdesign beschrieben und Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol vorgestellt.

Schlüsselwörter *Myriophyllum spicatum* · Risikobewertung von Pflanzenschutzmitteln · Sedimentfreies Testsystem · Submerse Makrophyten

***Myriophyllum spicatum* as a test organism: development of a sediment free test system and first results with 3,5-Dichlorophenol**

Abstract *Background, aim, and scope* The use of plant protection products is common practice in modern agriculture and forestry. Their use, however, may result in risks for the environment because even correct application can not always prevent a possible contamination of the off-field environment. A contamination of surface waters may occur through driftage, precipitation, run-off and drainage from treated surfaces. Dicotyledonous macrophytes are not part of the initial risk assessment of plant protection products in the aquatic environment although they are an important

Verantwortliche Herausgeber: Jan Ahlers · Bettina Hitzfeld · Tobias Frische

D. Maletzki (✉) · A. Hünken · I. Hübner · C. Kussatz
Umweltbundesamt, Ökotoxikologielabor,
Schichauweg 58, 12307 Berlin, Deutschland
E-Mail: dirk.maletzki@uba.de

part of the ecosystem. This paper presents a standardised single-phase test system with the dicotyledonous water milfoil *Myriophyllum spicatum* (Haloragaceae).

Methods In order to obtain substance-specific ecotoxicity data, a single-phase test system without sediment was chosen, in order to obtain results that are independent of the distribution of the test substances between water and sediment. The exposure of the test-plants only in the water phase reduces time and effort for analytics and facilitates modelling of the results. Also, a direct comparison with results from investigations with the monocotyledonous duckweed *Lemna spec.* (OECD Guideline 221) is possible: Ecotoxicity tests on *Lemna spec.* represent a standard test system for herbicides.

Results, discussion, conclusions *Myriophyllum spicatum* is exposed for 14 days under axenic conditions in a climatised incubator. Ecotoxicity in terms of growth inhibition in *Myriophyllum spicatum* is determined as a dose-response-curve.

Growth inhibition is determined by measuring the length of the main shoots, the side shoots and the roots as well as determining the plants' fresh and dry weight.

This paper describes the design of the *Myriophyllum spicatum* test system and includes results with 3,5-Dichlorophenol.

Keywords *Myriophyllum spicatum* · Risk assessment of plant protection agents · Sediment free test system · Submerse macrophytes

1 Einleitung

Dikotyle Makrophyten stellen eine wichtige funktionelle Komponente aquatischer Ökosysteme dar (Wetzel 2001), finden aber im Rahmen der Risikobewertung zum Beispiel von Pflanzenschutzmitteln in der Einganguntersuchung keine Berücksichtigung (SANCO 2002). Lediglich einzellige Algen und die monokotylen Wasserlinsen *Lemna* sp. repräsentieren die aquatische Flora in den Standarddatenanforderungen. Erst in höherstufigen Tests wie z. B. Mesokosmenstudien, einer verfeinerten („higher tier“) Risikobewertung, werden dikotyle Makrophyten betrachtet. Durch einen standardisierten Monospezies-test mit dikotylen, submersen Makrophyten könnte diese Unsicherheit bei der Extrapolation der Wirkung auf die gesamte aquatische Flora im Rahmen der Risikobewertung erheblich vermindert werden (Maltby et al. 2010).

Für Makrophyten existiert zurzeit nur eine standardisierte Guideline für *Myriophyllum* sp. (ASTM 2004), nach der Tests unter Verwendung von künstlichem Sediment durchgeführt werden. In diesem Zweiphasentestsystem (Wasser–Sediment) beeinflussen jedoch Verteilungsvorgänge zwischen der Sediment- und der Wasserphase die Exposition

der zu testenden Stoffe. So können zwar möglicherweise wichtige Zusatzinformationen gewonnen werden, aber die Auswertung und Analytik wird komplexer, was durch ein sedimentfreies Einphasentestsystem ausgeschlossen werden kann. Ein sedimentfreier Test ermöglicht zudem einen direkten Vergleich der ermittelten Wirkwerte mit Ergebnissen, die mit *Lemna* sp. entsprechend der OECD-Prüfrichtlinie 221 gewonnen werden.

Ziel der vorliegenden Versuche war die Entwicklung einer sedimentfreien Methode als zusätzliche standardisierte Testmethode für die Einganguntersuchung der Stufe 1 der Risikobewertung von Pflanzenschutzmitteln auf die aquatische Umwelt. Als Testorganismus wird *Myriophyllum spicatum* (L.) (Haloragaceae) gewählt. *M. spicatum* ist eine zweikeimblättrige, submers wachsende Pflanze, die auf der Nordhalbkugel zirkumpolar verbreitet ist. Sie wächst in nicht belasteten, eher kalkhaltigen, stehenden Gewässern mit schlickigem Untergrund. Besonders häufig ist *M. spicatum* im Süßwasser anzutreffen, tritt aber auch im Brackwasser auf (Aiken et al. 1979; Couch und Nelson 1985; Thomé 1885). Mit dieser Arbeit werden die Testmethode und die Ergebnisse der Untersuchungen mit 3,5-Dichlorphenol vorgestellt.

2 Methode

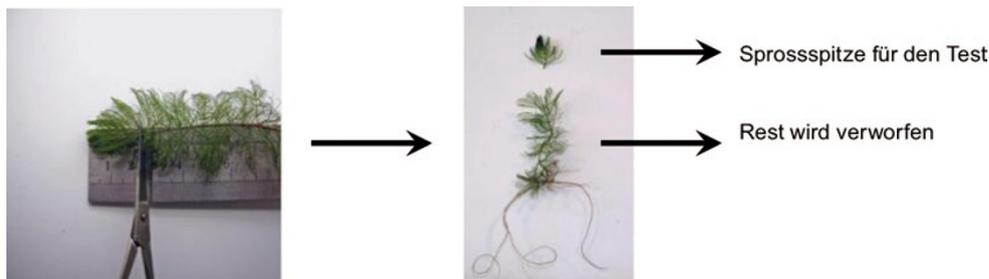
2.1 Testdesign

Die Tests werden in Anlehnung an den ASTM-Standard E 1913-04 durchgeführt. Für die Kultivierung wird Andrews Medium verwendet, das mit 3% Saccharose als Kohlenstoffquelle angereichert wird (Roshon et al. 1996). Aufgrund der Verwendung von Saccharose erfolgt die Kultivierung der Pflanzen unter axenischen Bedingungen, um ein Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern. Abweichend vom ASTM-Standard E 1913-04 wird kein künstliches Sediment verwendet. Dadurch erfolgen die Nährstoffversorgung und die Exposition der Pflanzen mit der zu testenden Substanz ausschließlich über die Wasserphase.

Die Haltung der Stammkultur von *M. spicatum* erfolgt in Erlenmeyer-, bzw. Fernbachkolben bei 20 ± 2 °C mit Beleuchtung von oben bei ca. $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Hierfür werden sowohl Sprossspitzen als auch mittlere Sprossabschnitte der Pflanzen verwendet. Bei einem 3-wöchigen Wechsel des Nährmediums werden gleichzeitig alle bewurzelten, blühenden und abgestorbenen Pflanzenteile aus der Stammhaltung entfernt.

Vor der eigentlichen Expositionsphase der Pflanzen wird eine Vorkultur angelegt. Dafür werden Sprossabschnitte mit je zwei Blattwirteln aus der Stammhaltung kultiviert, aus denen sich über 3 Wochen ein bis zwei neue Seitentriebe entwickeln. Die Beleuchtung erfolgt im Hell/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden bei einer Beleuchtungsintensität von durchschnittlich 100 bis $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Leuchtstofflampen, Licht-

Abb. 1 Vorbereitung von *Myriophyllum spicatum* für die Tests



farbe weiß). Die Temperatur beträgt 25 °C während der Hellphase und wird in der Dunkelphase auf 20 °C abgesenkt.

Vor Beginn der Expositionsphase werden die gebildeten Seitentriebe der Vorkultur auf ca. 2,5 cm Länge an ihrer Basis gekürzt, sodass die Pflanzen weder Seitentriebe noch Wurzeln besitzen (Abb. 1). Für die eigentliche Exposition der Pflanzen werden 10 Kontrollansätze (ohne Testsubstanz) und je Konzentrationsstufe der zu testenden Substanz 5 Parallelansätze hergestellt. Als Testgefäße dienen 20 cm lange Reagenzgläser mit einem Innendurchmesser von 2 cm. Diese werden mit 50 ml Nährmedium (Kontrollen) bzw. 50 ml Nährmedium incl. der Testsubstanz in entsprechender Konzentration befüllt. Anschließend werden die Reagenzgläser mit ca. 2,5 cm langen homogenen Sprossspitzen aus der Vorkultur besetzt, mit Aluminiumkappen verschlossen und über 14 Tage exponiert.

Die Länge der Hauptsprosse wird zu Beginn der Exposition, alle 3 bis 4 Tage und zum Ende des Tests indirekt fotografisch vermessen. Am Ende der Exposition erfolgen darüber hinaus direkte Messungen der Längen der Seitentriebe und der Wurzeln per Lineal. Die Biomasse (Frisch- und Trockengewicht) wird zu Beginn der Exposition anhand von zehn repräsentativen Sprossspitzen und am Ende in allen Ansätzen erfasst. Das Frischgewicht wird nach dem Abtupfen der Pflanzen mit Zellstoff erhoben und das Trockengewicht nach Trocknung über 48 h bei 60 °C. Darüber hinaus werden auffällige Vergilbungen bzw. weiße oder braune Verfärbungen die chlorotische und nekrotische Veränderungen der Pflanzen erkennen lassen, sowie andere Wachstumsanomalien dokumentiert.

Von Juni 2008 bis März 2010 wurden im Rahmen der Entwicklung und Etablierung der Methode 13 unabhängige Tests mit *M. spicatum* durchgeführt. Seit Juli 2009 wurden neben den Endpunkten der Zunahme der Hauptsprosslänge und der Zunahme des Frisch- und Trockengewichtes zusätzlich das Wachstum der Seitentriebe und der Wurzeln (als Summe der Länge aller Seitentriebe bzw. Wurzeln) aufgenommen und ausgewertet. Darüber hinaus wurden im Juli und im November/Dezember 2009 zwei unabhängige Ökotoxizitätstests mit 3,5-Dichlorphenol in einem Konzentrationsbereich von 0,48 bis 64 mg/l durchgeführt (Stammlösung 80 mg/l ohne Lösungsvermittler über 24 h gerührt). Bei den Tests erfolgte nach 7 Tagen ein Wechsel der Medien (semistatischer Test).

2.2 Auswertung

Zur Auswertung werden die Endpunkte Zunahme der Hauptsprosslänge, Wachstum der Seitentriebe, Zunahme der Gesamtsprosslänge (Summe aus Hauptsprosslänge und Seitentrieben) und Wachstum der Wurzeln sowie die Zunahme des Frisch- und Trockengewichtes der Pflanzen herangezogen. Für alle betrachteten Endpunkte wird die absolute Zunahme Y nach folgender Formel berechnet:

$$[1] \quad Y = X_n - X_0,$$

mit

X_0 = Wert des Endpunktes zum Zeitpunkt $t = 0$ Tag (Beginn des Tests) und

X_n = Wert des Endpunktes zum Zeitpunkt $t = n$ Tag (Ende des Tests).

Für die Endpunkte der Zunahme der Hauptsprosslänge sowie der Zunahme der Gesamtsprosslänge wird darüber hinaus die Wachstumsrate μ nach folgender Formel berechnet:

$$[2] \quad \mu = \frac{(\ln X_n - \ln X_0)}{(t_n - t_0)}$$

mit

t_0 = Zeitpunkt $t = 0$ Tag (Beginn des Tests) und

t_n = Zeitpunkt $t = n$ Tag (Ende des Tests).

Anhand der Wachstumsraten können Ergebnisse aus verschiedenen Untersuchungen und Publikationen zum Wachstum der Pflanzen verglichen werden.

Als Maß für die Streuung der Daten zu den einzelnen Endpunkten kann neben der Standardabweichung auch der Variationskoeffizient ($\text{Var}K_i$) wie folgt berechnet werden:

$$[3] \quad \text{Var}K_i = \frac{\text{STABW}_i}{\text{MW}_i} \times 100 \%,$$

mit

STABW_i = Standardabweichung des Endpunktes im Ansatz i und

MW_i = Mittelwert des Endpunktes im Ansatz i .

Aus den Daten zu den einzelnen Endpunkten (sowohl Wachstumsraten als auch Zunahmen) wird deren mittlere

Tab. 1 Entwicklung der betrachteten Endpunkte in den Kontrollen und deren Streuungen (Mittelwerte aus jeweils zehn Parallelansätzen und deren Standardabweichungen)

Durchführung der Tests	Zunahme der Hauptsprosslänge (HSP) in mm	Zunahme des Frischgewichts (FG) in mg	Zunahme des Trockengewichts (TG) in mg	Wachstum der Seitentriebe (ST) in mm	Zunahme der Gesamtsprosslänge (GSP) in mm	Wachstum der Wurzellänge (W) in mm
Juni 2008	49,3 ± 6,2	464,6 ± 110,8	60,3 ± 13,9	–	–	–
Juli 2008	52,0 ± 4,4	322,7 ± 49,6	37,0 ± 6,5	–	–	–
März 2009	41,3 ± 6,4	300,0 ± 46,8	41,0 ± 6,3	–	–	–
März/April 2009	44,8 ± 3,5	315,6 ± 55,6	40,4 ± 6,2	–	–	–
Mai 2009	49,6 ± 7,9	352,4 ± 42,2	40,9 ± 5,2	–	–	–
Juni 2009	50,1 ± 6,9	279,8 ± 46,9	47,9 ± 9,4	–	–	–
Juli 2009	48,2 ± 3,7	297,2 ± 47,4	40,8 ± 11,3	8,4 ± 7,8	56,6 ± 9,2	206,0 ± 41,8
Juli/August 2009	45,2 ± 5,5	320,7 ± 55,9	47,9 ± 13,5	12,1 ± 13,2	57,3 ± 12,8	269,6 ± 50,8
August/September 2009	47,7 ± 5,5	373,3 ± 49,0	50,1 ± 7,5	17,9 ± 14,3	65,6 ± 10,8	283,2 ± 100,0
Oktober/November 2009	50,7 ± 4,1	304,3 ± 66,4	42,0 ± 7,7	0,6 ± 0,9	51,3 ± 4,4	262,5 ± 51,6
November/Dezember 2009	43,4 ± 6,6	303,8 ± 61,7	46,3 ± 11,6	23,2 ± 21,3	66,6 ± 19,5	188,2 ± 76,3
Januar/Februar 2010	46,8 ± 4,0	279,9 ± 52,7	34,0 ± 7,2	0,5 ± 1,6	47,3 ± 4,9	170,7 ± 20,6
März 2010	41,1 ± 5,1	243,5 ± 45,7	35,0 ± 6,6	13,1 ± 14,3	54,2 ± 10,9	164,2 ± 28,2
Variationskoeffizient über alle Tests	7,7–18,5 %	12,0–23,8 %	12,8–28,3 %	80–316 %	8,6–31,9 %	12,1–40,5 %

Hemmung im Vergleich zur Kontrolle nach folgender Formel berechnet:

$$[4] \quad H_i = \frac{(Z_K - Z_i)}{(Z_K)} \times 100 \%,$$

mit

H_i = mittlere Hemmung des Endpunktes im Ansatz i im Verhältnis zur Kontrolle,

Z_i = mittlerer Wert (Wachstumsrate oder Zunahme) des Endpunktes im Ansatz i und

Z_K = mittlerer Wert (Wachstumsrate oder Zunahme) des Endpunktes in der Kontrolle.

Aus den berechneten Hemmungen der einzelnen Konzentrationsansätze werden mithilfe von Interpolationsverfahren die Konzentration mit 50 % Wirkung (EC_{50} ; negative

Hemmungen werden hierbei nicht Berücksichtigt) bezogen auf die beobachteten Endpunkte und bei Bedarf auch die höchste Konzentration ohne beobachtete Wirkung (NOEC mit Welch-Test bzw. Williams-Test) ermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Berechnungen mit dem Statistik-Programm Tox Rat Professional XT Version 2.09 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung der einzelnen Endpunkte in der Kontrolle

In Tab. 1 wird die Entwicklung der einzelnen Endpunkte in den Kontrollansätzen während der Expositionsphase als

Tab. 2 Mittlere Hemmungen von 3,5-Dichlorphenol auf das Wachstum von *Myriophyllum spicatum* im Verhältnis zur Kontrolle (Test I vom Juli 2009, Test II November/Dezember 2009)

3,5-Dichlorphenol in mg/l	Hemmung der Zunahme der Hauptsprosslänge in %		Hemmung der Zunahme des Frischgewichts in %		Hemmung der Zunahme des Trockengewichts in %		Hemmung des Wachstums der Seitentriebe in %		Hemmung der Zunahme der Gesamtsprosslänge in %		Hemmung des Wachstums der Wurzellänge in %	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Test												
0,48	-0,9	-7,0	-7,2	1,9	-7,0	8,3	26,2	9,5	3,1	-1,3	-9,3	-12,3
0,96	4,0	-3,9	-0,7	5,0	2,0	10,4	76,2	21,6	14,7	5,0	4,2	-18,0
1,92	-1,8	-5,2	-7,8	-3,3	0,8	6,1	38,1	37,9	4,1	9,8	2,7	2,9
4,00	6,7	-2,2	21,0	14,2	26,4	20,3	64,3	20,7	15,2	5,8	41,2	38,4
8,00	60,6	54,8	79,9	83,0	88,3	94,5	54,8	98,3	59,7	69,9	100,0	100,0
16,00	93,2	91,4	96,2	101,0	98,4	103,8	95,2	100,0	93,5	94,4	100,0	100,0
32,00	100,0	98,3	97,8	102,7	97,3	106,1	100,0	100,0	100,0	98,9	100,0	100,0
64,00	100,8	99,5	98,2	102,0	97,9	104,2	100,0	100,0	100,6	99,6	100,0	100,0

Mittelwert und deren Standardabweichung aus 13 unabhängigen Tests von Juni 2008 bis März 2010 zusammengefasst dargestellt. Die Daten geben Auskunft über das Wachstum bzw. die Zunahme der betrachteten Endpunkte ohne den Einfluss einer ökotoxischen Testsubstanz.

Während der 14-tägigen Testdauer nahm die Hauptsprosslänge im Mittel um 41,1 bis 52,0 mm zu. Für die Gesamtsprosslänge (unter Einbeziehung der Seitentriebe) lag die mittlere Längenzunahme bei 47,3 bis 66,6 mm. Es zeigte sich, dass der Variationskoeffizient des Längenwachstums des Hauptsprosses mit 7,7 bis 18,5 % wesentlich geringer ausfiel als die der Seitentriebe mit 80 bis 316 % (Tab. 1). Die sich daraus ergebenden Wachstumsraten der Hauptsprosslänge lagen zwischen 0,058 und 0,074 d⁻¹ und die der Gesamtsprosslänge zwischen 0,070 bis 0,087 d⁻¹. Das Wurzelwachstum lag zwischen 164,2 bis 283,2 mm und zeigte mit 12,1 bis 40,5 % einen höheren Variationskoeffizienten als die Zunahme der Hauptsprosslänge. Geringe Variationskoeffizienten zeigten die betrachteten Endpunkte der Biomasse. So nahm das Frischgewicht während des Testzeitraums im Mittel um 243,5 bis 464,6 mg zu (Variationskoeffizient 12,0 bis 23,8 %) und das Trockengewicht um 34,0 bis 60,3 mg (Variationskoeffizient 12,8 bis 28,3 %) (Tab. 1). Zudem belegt der Vergleich zwischen den einzelnen Tests eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für diese Endpunkte.

3.2 Ergebnisse der Tests mit 3,5-Dichlorphenol

Im Juli und November/Dezember 2009 wurden zwei unabhängige Tests durchgeführt, in denen *M. spicatum* gegenüber 3,5-Dichlorphenol (in einer geometrischen Reihe von 0,48 bis 64,00 mg/l mit dem Faktor 2) exponiert wurde. In den jeweils zehn parallelen Kontrollansätzen pro Test erfolgte über die 14-tägige Kultivierung ein kontinuierliches Wachstum der Pflanzen mit Wachstumsraten von 0,067 bis 0,072 d⁻¹ bezogen auf die Zunahme der Hauptsprosslänge. Bereits am dritten Tag der Exposition traten in beiden Tests ab einer Konzentration von 16 mg/l 3,5-Dichlorphenol erste vereinzelte Braunfärbungen der Pflanzen (Nekrosen) auf. Nach 14 Tagen Exposition konnten ab einer Konzentration von 8 mg/l nekrotische Bereiche beobachtet werden und ab 16 mg/l waren alle Pflanzen vollständig nekrotisch (Abb. 2).

Aus Tab. 2 und den Abb. 3 und 4 sind die mittleren Hemmungen von 3,5-Dichlorphenol auf das Wachstum von *Myriophyllum spicatum* aus den beiden Tests zu entnehmen. Im untersuchten Konzentrationsbereich traten für die Endpunkte Hauptspross-, Seitentrieb- und Wurzelwachstum Hemmungen im Vergleich zu den Kontrollen von bis zu 100 % auf. Hemmungen von teilweise über 100 % für die Endpunkte Zunahme des Frisch- bzw. des Trockengewichtes sind darauf zurückzuführen, dass zu Beginn der Tests diese Endpunkte nur anhand von zehn repräsentativen Sprossspitzen bestimmt wurden und nicht direkt an den im Test

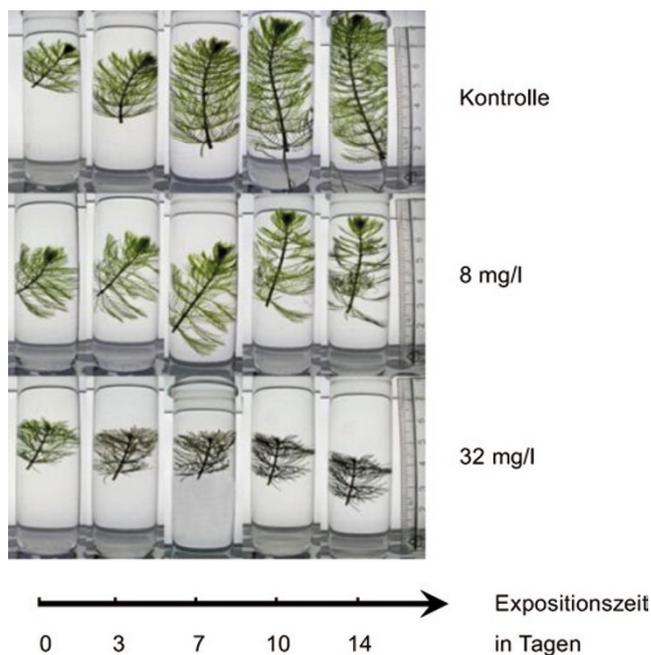


Abb. 2 Entwicklung von *Myriophyllum spicatum* über die 14-tägige Exposition in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz 3,5-Dichlorphenol

eingesetzten Pflanzen. Die damit berechneten Hemmungen resultieren aus Ungenauigkeiten aufgrund geringfügiger Biomasseunterschiede zwischen den einzelnen Pflanzen und der fast vollständigen Hemmung dieser Endpunkte in Konzentrationen >16,0 mg/l. Vereinzelt Wachstumssteigerungen in den unteren Konzentrationen gegenüber den Kontrollen können hingegen ursächlich auf Messungenauigkeiten und hormetische Effekte zurückgeführt werden.

Für die statistische Ableitung der EC₅₀- und NOEC-Werte für 3,5-Dichlorphenol wurden die Einzelwerte aller Testansätze (zehn Kontrollen und jeweils fünf parallele Ansätze je Konzentrationsstufe der zu testenden Substanz) herangezogen (Tab. 3). Für die Seitentriebe und Wurzeln waren jedoch aufgrund der großen Streuung im Wachstum (Abschn. 3.1) die Vertrauensbereiche der EC₅₀-Werte mathematisch nicht bestimmbar.

Als empfindlichster Endpunkt dieser Untersuchungen erwies sich die Hemmung des Wachstums der Wurzeln (EC₅₀-Werte von 4,4 bzw. 4,2 mg/l), gefolgt von der Hemmung der Zunahme des Trockengewichts (EC₅₀-Werte von 5,1 bzw. 4,9 mg/l) und der Hemmung der Zunahme des Frischgewichtes (EC₅₀-Werte von 5,6 bzw. 5,8 mg/l). Für diese Endpunkte wurde der NOEC-Wert mit jeweils 1,92 mg/l bestimmt. Geringfügig unempfindlicher waren die Endpunkte, die als Maß die Sprosslänge berücksichtigen (Zunahme der Hauptsprosslänge mit 7,2 bzw. 7,5 mg/l und die Zunahme Gesamtsprosslänge mit 6,9 bzw. 6,7 mg/l). Für diese Endpunkte wurde der NOEC-Wert mit 4,0 mg/l bestimmt.

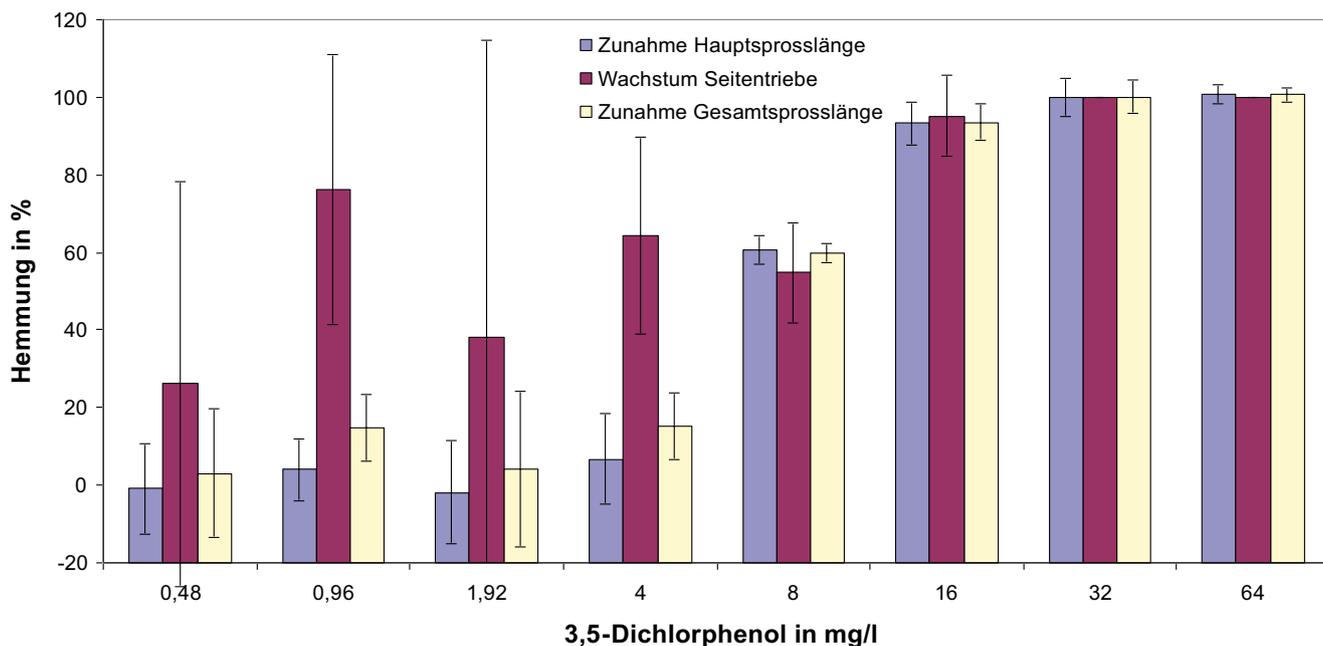


Abb. 3 Hemmungen von 3,5-Dichlorphenol und deren Streuung auf das Wachstum von *Myriophyllum spicatum* (Zunahme der Hauptsprosslänge, Wachstum der Seitentriebe und Zunahme der Gesamtsprosslänge des Tests vom Juli 2009)

Da für die statistische Ableitung der NOEC-Werte die Streuung der Endpunkte in den Kontrollen einen großen Einfluss hat, ist deren signifikante Bestimmung mit einer Ungenauigkeit behaftet, die größer als die Streuung in den

Kontrollen ist. Damit ergeben sich für den Endpunkt des Wachstums der Seitentriebe NOEC-Werte von >64 mg/l (größer als die höchste geprüfte Konzentration der getesteten Substanz) obwohl für diesen Endpunkt EC₅₀-Werte von

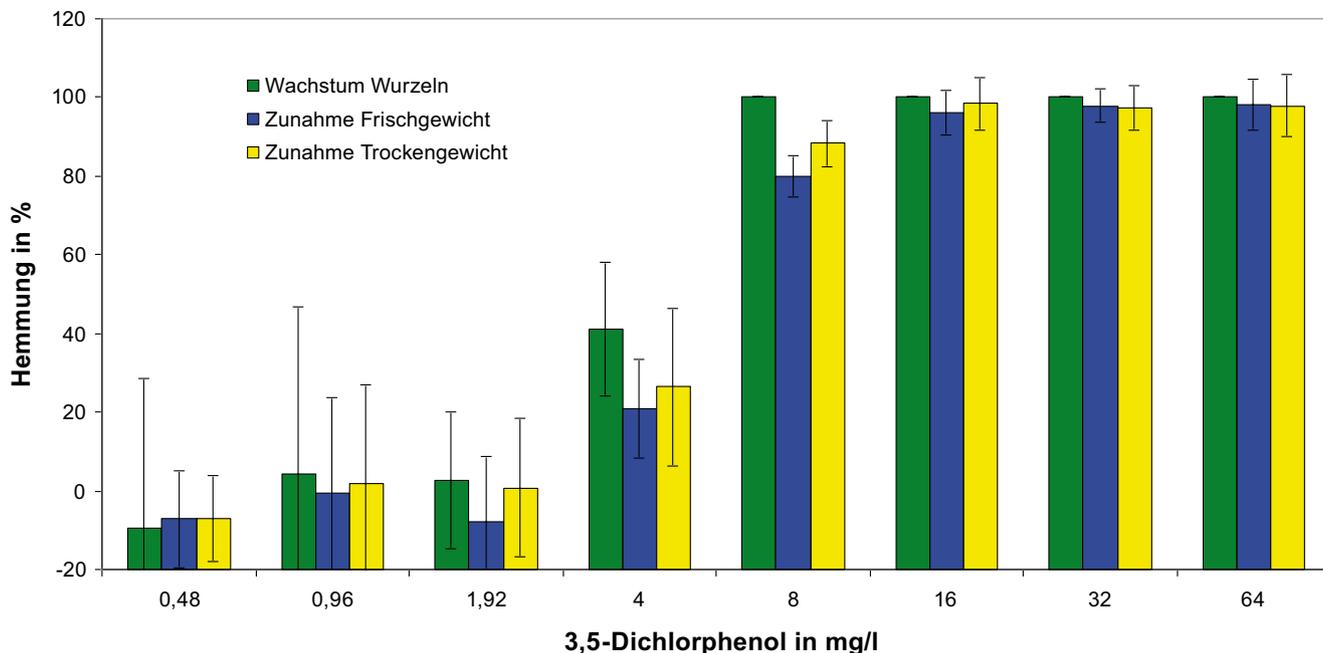


Abb. 4 Hemmungen von 3,5-Dichlorphenol und deren Streuung auf das Wachstum von *Myriophyllum spicatum* (Wachstum der Wurzellänge, Zunahme des Frischgewichts und Zunahme des Trockengewichts des Tests vom Juli 2009)

Tab. 3 EC₅₀- und NOEC-Werte für 3,5-Dichlorphenol für die ausgewerteten Endpunkte

Endpunkt	Test I vom Juli 2009		Test II vom November/Dezember 2009	
	EC ₅₀ -Wert	NOEC-Wert	EC ₅₀ -Wert	NOEC-Wert
Zunahme der Hauptsprosslänge	7,2 mg/l (5,6–9,0 mg/l)	4,0 mg/l	7,5 mg/l (6,9–7,9 mg/l)	4,0 mg/l
Wachstum der Seitentriebe	1,3 mg/l (n. d.)	>64,0 mg/l	3,6 mg/l (n. d.)	>64,0 mg/l
Zunahme der Gesamtsprosslänge	6,9 mg/l (5,0–9,6 mg/l)	4,0 mg/l	6,7 mg/l (5,4–7,6 mg/l)	4,0 mg/l
Wachstum der Wurzeln	4,4 mg/l (n. d.)	1,92 mg/l	4,2 mg/l (n. d.)	1,92 mg/l
Zunahme des Frischgewichtes	5,6 mg/l (5,2–6,1 mg/l)	1,92 mg/l	5,8 mg/l (4,8–6,9 mg/l)	1,92 mg/l
Zunahme der Trockenmasse	5,1 mg/l (4,8–5,3 mg/l)	1,92 mg/l	4,9 mg/l (2,6–15,4 mg/l)	1,92 mg/l

n. d.: statistisch nicht bestimmbar.

1,3 mg/l bzw. 3,6 mg/l berechnet wurden. Bedingt durch die starke Streuung ist dieser Endpunkt für die Auswertung der Tests nicht geeignet und die berechneten EC₅₀-Werte nicht gesichert, sodass dieser Endpunkt für die Auswertung der Tests nicht berücksichtigt werden kann.

4 Diskussion

Für Tests mit dikotylen submersen Makrophyten werden in der Literatur Testdesigns für Zweiphasentestsysteme mit Sediment beschrieben (Roshon 1997; ASTM 2004; Maltby et al. 2010). Für einen Test in einem Einphasentestsystem ohne Sediment existiert bisher eine Methodenbeschreibung von Knauer et al. (2006, 2008). Wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Testdesigns ist, dass mit einem Einphasensystem die reine substanzspezifische aquatische Ökotoxizität ermittelt wird, ohne den Einfluss von Verteilungsprozessen zu berücksichtigen. Gleichzeitig muss die Kinetik der Aufnahme einer Testsubstanz durch im Sediment wurzelnde Pflanzen im Laufe der relativ kurzen Expositionszeit von 14 Tagen nicht berücksichtigt werden. Darüber hinaus ist der methodische Aufwand der Tests in einem Einphasentestsystem ohne Sediment wesentlich geringer. Da die Exposition der Pflanzen ausschließlich über die Wasserphase erfolgt, minimiert sich der analytische Aufwand und die Interpretation der Ergebnisse wird vereinfacht. Ein derartiges Einphasentestsystem ist demnach vorteilhaft für die Risikobewertung zum Beispiel von Pflanzenschutzmitteln im Rahmen der Eingangsuntersuchung. Davon unberührt bleibt der Bedarf von Testverfahren mit Sediment (Zweiphasentestsystem) in höherstufigen Prüfungen bei entsprechenden Eigenschaften der Testsubstanzen (z. B. Testsubstanzen mit starkem Adsorptionspotenzial).

Das Nährmedium nach Andrews mit 3 % Saccharose wird bereits im Rahmen von Zweiphasentestsystemen (Wasser–Sediment) eingesetzt (Roshon 1997; ASTM 2004). Wie Ergebnisse von Roshon et al. (1996) zeigen, kann durch Saccharose ein kontinuierliches Pflanzenwachstum erzielt werden, was auch durch unsere Ergebnisse bestätigt wird (Tab. 1).

Durch die sterile Arbeitsweise konnte das Wachstum von Mikroorganismen im saccharosehaltigen Nährmedium ausgeschlossen werden. Andererseits haben Untersuchungen von Ashton et al. (1966) an Grünalgen (*Chlorella vulgaris*) gezeigt, dass 2 % Glukose im Nährmedium die Wirkung des Fotosynthesehemmers Atrazin deutlich kompensieren können. In wie weit dieser Effekt von Zuckern auf die Empfindlichkeit von *M. spicatum* gegenüber die Fotosynthese hemmenden Substanzen übertragbar ist, ist noch zu klären.

Mit dem modifizierten Andrews-Medium konnten Wachstumsraten, bezogen auf die Gesamtsprosslänge der Pflanzen, von 0,070 bis 0,087 d⁻¹ erzielt werden, was einer Zunahme bis >200 % entspricht. Die Zunahme der Biomasse als Trockengewicht lag bei bis zu 300 % und mehr (Abschn. 3.1). Knauer et al. (2006) führten Untersuchungen mit *M. spicatum* in einem anderen sedimentfreien Testdesign (M4 Prüfmedium ohne Saccharose, 1000 ml Bechergläser) durch. Über einen Zeitraum von 20 Tagen wurde eine Zunahme der Gesamtsprosslänge um 70 bis 80 % und der Biomasse um ca. 100 % erzielt, was für die Gesamtsprosslänge einer Wachstumsrate von 0,028 d⁻¹ entspricht. Entgegen diesen Ergebnissen konnte mit dem Andrews-Medium ein mehr als doppelt so hohes Wachstum der Pflanzen erreicht werden. Besonders im Hinblick auf ein optimiertes Wachstum der Pflanzen scheint die Zugabe von Saccharose förderlich zu sein.

Unter den erfassten Endpunkten haben sich die Zunahme der Hauptsprosslänge, die Zunahme der Gesamtsprosslänge sowie die Zunahme des Frisch- und Trockengewichtes der Pflanzen als Endpunkte mit den geringsten Streuungen in den Kontrollen (Variationskoeffizient zwischen 8 und <32 %) erwiesen (Tab. 1). Die geringen Variationskoeffizienten verweisen auf statistisch gesicherte Endpunkte, die für die Auswertung geeignet sind. Geringfügig höher fielen die Streuungen des Wachstums der Wurzeln aus (Variationskoeffizient 12 bis 40 %). Der Endpunkt des Wachstums der Seitentriebe ergab die größten Streuungen (Variationskoeffizient 80 bis >300 %).

Neben der Streuung der betrachteten Endpunkte spielt aber auch dessen Empfindlichkeit gegenüber der Testsub-

stanz eine wesentliche Rolle bei deren Auswahl (Arts et al. 2008), was durch die Tests mit 3,5-Dichlorphenol untersucht werden sollte. 3,5-Dichlorphenol gilt im Rahmen von akuten Tests als polar narkotisch wirksam (Schultz et al. 1989) und wird in Tests mit *Lemna* sp. entsprechend der OECD-Prüfrichtlinie 221 als Referenzsubstanz empfohlen. Unsere Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol zeigen eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung mit der entwickelten sedimentfreien Testmethode für *M. spicatum* (Tab. 2, Abb. 3 und 4). Der Endpunkt der Hemmung des Wachstums der Seitentriebe zeigte eine hohe Empfindlichkeit. Bedingt durch die äußerst hohe Streuung des Endpunktes erweist sich dieser aber als nicht stabil (Streuungen in den Kontrollen 80 bis 316 %) und ist für die Auswertung der Untersuchungen nicht geeignet.

Unter den anderen ausgewerteten Endpunkten ist die Hemmung des Wachstums der Wurzellänge der empfindlichste Endpunkt (Tab. 2). Die Hemmung der Zunahme des Trockengewichtes und die Hemmung der Zunahme des Frischgewichtes liegen in derselben Größenordnung. Für diese drei Endpunkte wurde der NOEC-Wert mit jeweils 1,92 mg/l bestimmt (Tab. 3). Damit liegen drei ökotoxikologisch relevante Endpunkte mit einer akzeptablen Streuung vor, die für die Auswertung von Tests mit *M. spicatum* herangezogen werden können.

Für die Hemmung der Zunahme der Hauptsprosslänge und für die Hemmung der Zunahme Gesamtsprosslänge wurde ein NOEC-Wert von 4,0 mg/l bestimmt (Tab. 3). Die beiden Endpunkte, die als Maß die Sprosslänge berücksichtigen, sind geringfügig (um den Faktor 2) unempfindlicher als die zuvor genannten drei Endpunkte, weisen aber geringere Streuungen auf und sind ebenfalls für die Auswertung von Tests mit *M. spicatum* geeignet.

Vergleicht man die Ergebnisse der Ökotoxizität von 3,5-Dichlorphenol auf *M. spicatum* mit denen von Untersuchungen mit *Lemna minor*, zeigen sich vergleichbare Empfindlichkeiten. So wurden im Rahmen von acht Referenzprüfungen mit *Lemna minor* entsprechend der OECD-Prüfrichtlinie 221 EC₅₀-Werte für die Hemmung der Biomassezunahme (Zunahme des Trockengewichtes) von 2,4 mg/l und für die Hemmung der Ablegerbildung (Blätter) von 2,6 mg/l ermittelt (eigene unveröffentlichte Daten der Autoren). Die EC₅₀-Werte beider Testsysteme für 3,5-Dichlorphenol liegen im Bereich von 1–10 mg/l. Das legt nahe, 3,5-Dichlorphenol zukünftig auch als Referenzsubstanz für *M. spicatum* in dem sedimentfreien Testsystem zu verwenden.

Trotz dieser vergleichbaren Ergebnisse für die Ökotoxizität des narkotisch wirksamen 3,5-Dichlorphenol, können zwischen monokotylen und dikotylen Makrophyten deutliche Unterschiede in der Ökotoxizität bestehen, wenn Testsubstanzen spezifische Wirkungen (z. B. Wuchsstoffherbizide) aufweisen (Grossmann und Hansen 2003).

5 Schlussfolgerungen

Mit der entwickelten sedimentfreien Testmethode mit *M. spicatum* liegt ein Testsystem vor, um für Testsubstanzen einen direkten Vergleich zu Tests mit einkeimblättrigen Wasserpflanzen wie *Lemna* sp. entsprechend OECD-Prüfrichtlinie 221 durchzuführen. Durch die reproduzierbaren Ergebnisse für das Wachstum von *M. spicatum* in den Kontrollen und die starke Übereinstimmung der Ergebnisse bei den Tests mit 3,5-Dichlorphenol hat sich die beschriebene Testmethode als reproduzierbarer und standardisierbarer Monospeziesstest mit dikotylen, submersen Makrophyten erwiesen. Weitere Tests mit Wuchsstoffherbiziden sollen Aufschluss über artspezifische Sensitivitäten zwischen *Lemna minor* und *M. spicatum* unter sedimentfreien Testbedingungen geben. Durch Tests mit Fotosynthese hemmenden Substanzen soll darüber hinaus der Einfluss von Saccharose auf die Empfindlichkeit von *M. spicatum* untersucht werden. Zudem soll ein Vergleich mit Ergebnissen aus einem Zweiphasentestsystem mit künstlichem Sediment dazu dienen, den Einfluss von Sediment im Prüfsystem auf die Ökotoxizität von Testsubstanzen zu verifizieren.

Danksagung Unser Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die Durchführung der Untersuchungen im Rahmen der Methodenentwicklung und der Etablierung der Testmethode im Ökotoxikologielabor des Umweltbundesamtes.

Literatur

- Aiken SG, Newthro PR, Wile I (1979) The biology of Canadian weeds, 34, *Myriophyllum spicatum* L. Can J Plant Sci 59:201–215
- Arts GHP, Belgers JDM, Hoekzema CH, Thissen JTNM (2008) Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. Environ Pollut 153(1):199–206
- Ashton FM, Bisalputra T, Risley EB (1966) Effect of atrazine on *Chlorella vulgaris*. Am J Bot 53(3):217–219
- ASTM Designation E 1913-04 (2004) Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov
- Couch R, Nelson E (1985) *Myriophyllum spicatum* in North America. In: Anderson LWJ (Hrsg) Proceedings of the First International Symposium on Watermilfoil (*Myriophyllum spicatum*) and related Haloragaceae species, 23–24. Juli 1985, Vancouver, British Columbia. Aquatic Plant Management Society, Vicksburg, Mississippi
- Grossmann K, Hansen H (2003) Auxin-Herbizide Wirkstoffe mit Janusgesicht. Biol Zeit 33(1):12–20
- Knauer K, Vervliet-Scheebaum M, Dark RJ, Maund SJ (2006) Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants. Pest Manag Sci 62(8):715–722
- Knauer K, Mohr S, Feiler U (2008) Comparing growth development of *Myriophyllum* spp. in laboratory and field experiments for ecotoxicological testing. Environ Sci Pollut Res 15(4):322–331
- Maltby L, Arnold D, Arts G, Davies J, Heimbach F, Pickl C, Poulsen V (2010) Aquatic macrophyte risk assessment for pesticides. SETAC Europe Workshop AMRAP, Wageningen, The Netherlands,

- SETAC Press and CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton London New York
- OECD (2006) Guidelines for the Testing of Chemicals No. 221. *Lemna* sp. Growth Inhibition Test; March 2006
- Roshon RD (1997) A toxicity test for the effects of chemicals on the non-target submersed aquatic macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov. Ottawa National Library of Canada. <http://www.nlc-bnc.ca/obj/s4/f2/dsk2/ftp02/NQ33321.pdf>. Letzter Zugriff 8. 10. 2010
- Roshon RD, Stephenson GR, Horton R (1996) Comparison of five media for the axenic culture of *Myriophyllum sibiricum*. *Hydrobiol Suppl* 340:17–22
- SANCO (2002) Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology in the context of the Directive 91/414/EEC. SANCO/3268/2001, rev. 4 final 17. 10. 2002
- Schultz TW, Wesley SK, Baker LL (1989) Structure-activity relationships for Di and Tri Alkyl and/or Halogen Substituted Phenols. *Environ Contam Toxicol* 43:192–198
- Thomé OW (1885) *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. Untermyhaus, Gera. <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/thome/index.html>. Letzter Zugriff 8. 10. 2010
- Wetzel RG (2001) *Limnology: lake and river ecosystems*, 3. Aufl. Academic, New York