Sensitivität der Makrophyten *Ceratophyllum demersum, Elodea canadensis* und *Riccia fluitans* gegenüber Atrazin im Vergleich zum OECD-Standardtest mit *Lemna* spec.

Facharbeit zur Erlangung des Abschlusses
„Fachökotoxikologe GDCh/Setac GLB“

Diplom Biologe Daniel Zeyher

November 2008

Betreuer: Prof. Dr. J. Oehlmann (Universität Frankfurt)
Dr. K. P. Ebke (Institut für Gewässerschutz MESOCOSM GmbH)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abbildungsverzeichnis III
Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis IV
Abstract V
1 Einleitung 1
2 Material und Methoden 3
2.1 Testorganismen 3
2.1.1 *Ceratophyllum demersum* 3
2.1.2 *Elodea canadensis* 3
2.1.3 *Riccia fluitans* 4
2.1.4 *Lemna minor* 4
2.2 Beschreibung des Testsystems 5
2.2.1 Pflanzenmaterial 5
2.2.2 Medium 5
2.2.3 Versuchsaufbau 5
2.2.4 Beleuchtung 7
2.2.5 Atrazin 8
2.2.6 Applikation 9
2.3 Endpunkte 10
2.3.1 Chemikalisch-physikalische Wasserparameter 10
2.3.2 Wachstumsparameter 10
2.3.3 Bestimmung der Gesamtchlorophyllkonzentration im Testmedium als Maß für die Algenkonzentration 11
2.3.3.1 Theoretische Grundlagen 11
2.3.3.2 Methodik zur Bestimmung der Gesamtchlorophyllkonzentration 13
2.4 Auswertung der Daten 13
3. Ergebnisse 15
3.1 Versuchsphase I 15
3.1.1 *Ceratophyllum demersum* 15
3.1.1.1 Physikalische Wasserparameter 15
3.1.1.2 Wachstumsparameter 16
3.1.2 *Elodea canadensis* 18
3.1.2.1 Physikalische Wasserparameter 18

3.1.2.2 Wachstumsparameter 20
3.1.3 *Riccia fluitans* 21
3.1.3.1 Physikalische Wasserparameter 21
3.1.3.2 Wachstumsparameter 23
3.1.4 Algen 24
3.1.5 Beobachtungen 24
3.2 Versuchsphase II 26
3.2.1 *Ceratophyllum demersum* 26
3.2.1.1 Physikalische Parameter 26
3.2.1.2 Wachstumsparameter 28
3.2.2 *Elodea canadensis* 33
3.2.2.1 Physikalische Parameter 33
3.2.2.2 Wachstumsparameter 35
3.2.3 Algen 39
3.2.4 Beobachtungen 40
3.3 *Lemna*-Standard-Test 41
3.3.1 Physikalische Wasserparameter 41
3.3.2 Wachstumsparameter 42
3.3.3 Beobachtungen 43
4. Diskussion 44
4.1 Einführung in die Diskussion 44
4.2 Submerse Makrophyten 44
4.2.1 Physikalische Parameter 44
4.2.1 Wachstumsparameter 47
4.2.1.1 *Ceratophyllum demersum* 47
4.2.1.2 *Elodea canadensis* 49
4.2.1.3 *Riccia fluitans* 50
4.3 *Lemna*-Standard-Test 51
4.4 Algen 52
4.5 Methodenkritik 54
4.6 Zusammenfassende Diskussion 55
5. Zusammenfassung 58
6. Literatur 60
7. Anhang 63

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	*Ceratophyllum demersum*	3
Abb. 2:	*Elodea canadensis*	3
Abb. 3:	*Riccia fluitans*	4
Abb. 4:	*Lemna minor*	4
Abb. 5:	Single-Spezies-Test in Bechergläsern.	7
Abb. 6:	Rotationsschema der Testgefäße mit *Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis* und *Riccia fluitans*.	8
Abb. 7:	Rückreaktion der Elektronen während der Dunkeladaptionsphase.	12
Abb. 8:	pH-Wert und Sauerstoffgehalt im Testmedium von *Ceratophyllum demersum*.	16
Abb. 9:	Wachstumsrate und Entwicklung des Frischgewichts von *Ceratophyllum. demersum*.	17
Abb. 10:	Wachstumsrate und Entwicklung der Sprosslänge von *Ceratophyllum demersum*.	18
Abb. 11:	pH-Wert und Sauerstoffgehalt im Testmedium von *Elodea canadensis*.	19
Abb. 12:	Leitfähigkeit im Testmedium von *Elodea canadensis*.	20
Abb. 13:	Wachstumsrate und Entwicklung des Frischgewichts von *Elodea canadensis*.	21
Abb. 14:	Wachstumsrate und Entwicklung der Sprosslänge von *Elodea canadensis*.	22
Abb. 15:	Leitfähigkeit im Testmedium von *Riccia fluitans*.	23
Abb. 16:	Wachstumsrate und Entwicklung des Frischgewichts von *Riccia fluitans*.	23
Abb. 17:	Entwicklung der Chlorophyllkonzentration in den Testgefäßen von *Ceratophyllum demersum*.	24
Abb. 18:	Darstellung zweier Individuen von *Ceratophyllum demersum*, mit und ohne Belastung.	25
Abb. 19:	pH-Wert und Sauerstoffgehalt im Testmedium von *Ceratophyllum demersum*.	27
Abb. 20:	Leitfähigkeit im Testmedium von *Ceratophyllum demersum*.	28
Abb. 21:	Aufs Frischgewicht bezogene Wachstumsrate von *Ceratophyllum demersum*.	29
Abb. 22:	Entwicklung des Frischgewichts von *Ceratophyllum demersum*.	30
Abb. 23:	Auf die Sprosslänge bezogene Wachstumsrate von *Ceratophyllum demersum*.	31
Abb. 24:	Entwicklung der Sprosslänge von *Ceratophyllum demersum.*	32
Abb. 25:	Entwicklung des Gewichts-Längen-Verhältnis bei *Ceratopyhllum demersum.*	32
Abb. 26:	pH-Wert und Sauerstoffgehalt im Testmedium von *Elodea canadensis*.	34
Abb. 27:	Leitfähigkeit im Testmedium von *Elodea Canadensis.*	35
Abb. 28:	Aufs Frischgewicht bezogene Wachstumsrate von *Elodea canadensis*.	36

Abb. 29: Entwicklung des Frischgewichts von *Elodea canadensis*. 37
Abb. 30: Auf die Sprosslänge bezogene Wachstumsrate von *Elodea canadensis*. 38
Abb. 31: Entwicklung der Chlorophyllkonzentration in den Testgefäßen von *Ceratophyllum demersum*. 39
Abb. 32: Darstellung von fünf Individuen von *Elodea canadensis* mit und ohne Belastung. 40
Abb. 33: Darstellung von fünf Individuen von *Ceratophyllum demersum* mit und ohne Belastung. 41
Abb. 34: Wachstumsrate und deren Hemmung bezogen auf die Frondzahl von *Lemna minor*. 43
Abb. 35: Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung beim *Lemna*-Standard-Test. 43

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Physikalisch-chemische Charakterisierung von Atrazin. 9
Tab. 2: Nominale Atrazinkonzentrationen in der Kontrolle und den belasteten Testmedien. 10
Tab. 3: Frondzahl und pH-Werte beim *Lemna*-Standard-Test. 42

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CO_2	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
EC50	effect concentration, engl. Effektkonzentration, bei der 50% der Individuen einen Effekt zeigen
EtOH	Ethanol
H	Hemmung
ln	natürlicher Logarithmus
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration, niedrigste Konzentration, bei der ein Effekt beobachtet wird
Mt.-M.	Makrophytenteichmedium
mm HG	Millimeter Quecksilbersäule
NOEC	No Observed Effect Concentration, höchste Konzentration, bei der kein Effekt beobachtet wird
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
Q_A (-Komplex)	erster Chinon-Elektronenakzeptor
Q_B (-Komplex)	zweiter Chinon-Elektronenakzeptor
S	Siemens (Maß für die Leitfähigkeit)
Sl	Stammlösung
St.-M.	Steinbergmedium
t	Zeit
$t_{½}$	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
vgl.	vergleiche
WR	Wachstumsrate

Abstract

Although macrophytes together with algae play an important role in ecosystems as primary producers, they are underrepresented in the risk assessment of chemicals. So far only one standardised test with duckweed (*Lemna* spec.) is existing. Generally it is questionable if the *Lemna*-Standard-Test (OECD 221) is sufficient for testing the effects of herbicides or other pesticides. So it is difficult to estimate the effects of chemicals which are situated in deeper water stratums or bound to the sediment under the usage of *Lemna* spec. An additional problem is that several herbicides used in agriculture have a specific toxic effect on dicotyle plants and do no harm monocotyle plants like *Lemna* spec. The aim of this study is to contribute to the project "Development of new methods for the risk assessment of environmental chemicals with macrophytes". Therefore the herbizide atrazine, a synthetic photosynthesis inhibitor was chosen as model substance to test effects on the macrophytes *Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis* and *Riccia fluitans*. For comparability of the results the *Lemna*-Standard-Test was performed under parallel conditions. As test parameters were used physical parameters (pH-value, electrical conductance, oxygen content) and growth parameters like shootlength and fresh weight. The analysis of the gained growth parameters showed no measurable negative effect of the test substance atrazine on the three macrophytes used, although higher atrazine concentrations caused negative morphological effects on the two macrophytes *C. demersum* and *E. canadensis*. Furthermore higher atrazine concentrations caused measurable decrease of pH-value and oxygen content in the media of the macrophytes, which is an indication for the photosynthesis inhibiting effect of atrazine, although these parameters were influenced by the used solvent EtOH. Beside this, *C. demersum* reacted on rising atrazine concentrations with an increased growth rate, which could be measured by fresh weight and shoot length. Such effects did not appear under the use of the same testmedia by the *Lemna*-Standard-Test. Here higher concentrations of atrazine lead to significant inhibiting growth effects with a complete inhibition at the highest concentration. In summary the results based on growth parameters showed two different tendencies. In case of the L*emna*-Standard-Test rising atrazine concentrations lead to a decreasing growth rate, while they had no or an increasing effect on the growth rate of the three macrophytes. These results lead to the question if growth rates always can be used as ideal effect-parameters or if additional endpoints like physical or physiological parameters should be used to gain a more differentiated insight into the effects of chemicals.

1 Einleitung

Obwohl Makropyhten[*1] in aquatischen Systemen einen bedeutenden Teil der Biomasse stellen und sie zusammen mit den Algen als Primärproduzenten die Nahrungsgrundlage für viele aquatische Organismen bilden, kommt ihnen im Rahmen der Risikoabschätzung von Chemikalien bislang nur eine untergeordnete Rolle zu. So werden die zahlreichen, morphologisch und ökologisch verschiedenen Arten der Makropyhten in standardisierten Biotestsystemen bislang nur durch die Wasserlinse (*Lemna* spec.) vertreten. Ob *Lemna* als Testorganismus Makropyhten in ausreichender Form repräsentierten kann, ist fragwürdig und wird diskutiert (US EPA 2001, VERVLIET-SCHEEBAUM 2006, AMRAP in Druck). Dagegen spricht, dass sich *Lemna* als frei-schwimmender „Bewohner" der Grenzschicht Wasser-Luft von den meisten anderen Makrophyten unterscheidet. So kann die Wirkung von Substanzen, die sich in tieferen Wasserschichten befinden oder an Sedimente gebunden sind, mit Hilfe von *Lemna* spec. nur schwer bzw. gar nicht erfasst werden. Weiterhin besteht das Problem, dass viele in der Landwirtschaft eingesetzte Herbizide selektiv auf zweikeimblättrige Pflanzen wirken, die Gattung *Lemna* jedoch zu den einkeimblättrigen Pflanzen gehört.

In vorliegender Arbeit soll ein Beitrag zum Projekt des Instituts für Gewässerschutz Mesocosm GmbH „Entwicklung neuer Methoden für die Risikobewertung von Umweltchemikalien in aquatischen Ökosystemen anhand von Makrophyten" geleistet werden. In vorausgegangenen Studien wurden bereits mehrere Makrophyten mit Zugehörigkeit zu unterschiedlichen Lebensformen (submers, emers, schwimmend) und taxonomischen Gruppen getestet. Von diesen Arten erwiesen sich nach BOTZAT (2007) bislang neun als geeignet für die Kultivierbarkeit unter Laborbedingungen. Weiterhin wurden Testbedingungen evaluiert, die zu einem ausreichenden Wachstum der Makropyhten, bei gleichzeitig geringer Algenentwicklung führen sollten. Hier zeigte sich bislang eine Überlegenheit natürlicher Medien (Teichwasser) gegenüber künstlichen Nährstoffmedien (HEINRICH 2008).

Im Rahmen vorliegender Versuche wurde das Herbizid Atrazin, ein synthetischer Photosynthesehemmer, als Modellsubstanz ausgewählt, um Effekte auf die submersen Makrophyten *Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis* und *Riccia fluitans*

* Der Ausdruck Makrophyte wird nur im Zusammenhang mit aquatischen Pflanzen gebraucht und folgt der Definition nach CASPER & KRAUSCH (1981). Er umfasst sowohl submerse, emerse und schwimmende Höhere Pflanzen, als auch Schwimmfarne, Moose und Makroalgen.

abschätzen zu können. Als Versuchsparameter dienten neben den Wachstumsparametern Sprosslänge und Frischgewicht, die im jeweiligen Testmedium gemessenen physikalischen Parameter pH, Sauerstoffgehalt und Leitfähigkeit. Zusätzlich wurde der Gesamtchlorophyllgehalt, als Indikator für die Algendichte im Medium mit Hilfe verzögerter Fluoreszenzmessung erfasst. Die Versuche erfolgten als Single-Spezies Tests und wurden in zwei Versuchsphasen durchgeführt. In der ersten Versuchsphase wurden alle drei genannten Makrophyten über einen Versuchszeitraum von vier Wochen getestet, in der zweiten Versuchsphase wurde nur mit den zwei Arten *C. demersum* und *E. canadensis* in höherer Individuenzahl pro Replikat gearbeitet und der Versuchszeitraum auf fünf Wochen verlängert. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde der *Lemna*-Standard-Test (OECD 221, 2002) unter vergleichbaren Bedingungen parallel durchgeführt. Die eingesetzten Methoden dienten zur Beantwortung folgender Fragen:

- Wie reagieren die eingesetzten Testorganismen auf die Wirkung des Photosynthesehemmers Atrazin?
- Welche möglichen Endpunkte eignen sich zur Bewertung ökotoxikologischer Effekte?
- Welches Ergebnis liefert der *Lemna*-Standard-Test im Vergleich zu den Tests mit *C. demersum*, *E. canadensis* und *R. fluitans*?
- Welche methodischen Änderungen können zu einem verbesserten Versuchsdesign führen?

2 Material und Methoden

2.1 Testorganismen

2.1.1 *Ceratophyllum demersum*

Abb. 1: *Ceratophyllum demersum*

Das Raue Hornblatt *Ceratophyllum demersum* (siehe Abb. 1), zur Familie der Hornblattgewächse (Ceratophyllaceae) gehörend, ist eine submerse, dikotyle, meist freischwimmende, stellenweise auch im Boden verankerte Wasserpflanze mit weltweiter Verbreitung in stehenden oder langsam fließenden, nährstoffreichen Gewässern. Die Wasserpflanze bildet keine echten Wurzeln aus, besitzt jedoch wurzelähnliche Gebilde (umgewandelte Sprosse), mit denen sie sich im Sediment verankern kann (STRASBURGER 2002). Die Blütezeit liegt in den Monaten Juni bis September, die Bestäubung findet im Wasser statt, und die Verbreitung verläuft meist über Wasservögel (ROTHMALER 2005). Nach WENDELBERGER (1986) werden Früchte und Blüten nur selten gebildet, die Vermehrung findet vor allem auf vegetativem Wege über Sprossbruchstücke statt. Weiterhin wird von HABERER (2006) beschrieben, dass *Ceratophyllum demersum* in Teichen als Sauerstofflieferant eingesetzt wird.

2.1.2 *Elodea canadensis*

Abb. 2: *Elodea canadensis*

Elodea canadensis, die kanadische Wasserpest (siehe Abb. 2) gehört zur Familie der Froschbissgewächse (Hydrocharitaceae), stammt ursprünglich aus dem amerikanischen Raum und ist seit Ende des 19. Jahrhunderts in ganz Mitteleuropa verbreitet (STRASBURGER 2002). Die monokotyle, submerse Wasserpflanze, deren Stauden im Boden wurzeln, hat dicht beblätterte Sprosse, lanzettliche, grün- bis dunkelgrüne Blätter, die in 3-zähligen Quirlen stehen und 6-13 mm lang werden. Sie kommt in stehenden und langsam fließenden, meso- bis eutrophen Gewässern vor und findet auch Verwendung als Aquarienpflanze (ROTHMALER 2005).

Die Blütezeit liegt in den Monaten Mai bis September, die Blüte ist zweihäusig, erblüht über dem Wasser und ist unscheinbar, weiß. Die Bestäubung und die Ausbreitung der Samen findet über das Wasser statt, überwiegend breitet sich die kanadische Wasserpest, jedoch vegetativ über Fragmentation aus (HABERER 2006).

2.1.3 *Riccia fluitans*

Das Schwimmende Sternlebermoos (siehe Abb. 3) gehört zur Familie der Sternlebermoosgewächse (Ricciaceae) und ist ein gelb- bis blaugrünes wurzelloses submerses freischwimmendes Moos. Die Thalli sind schmalbandförmig, 0,5-1 mm breit, bis 5 cm lang und mehrfach gabelig verzweigt. Es ist nahezu weltweit verbreitet und kommt vorzugsweise in kalk-armen, verschieden großen stehenden Gewässern (z.B. Fischteiche, Moore, kleine Tümpel) im Flachland vor (LUDWIG 2003). Die Vermehrung findet nach HABERER (2006) weitgehend vegetativ über Sprossung statt.

Abb. 3: *Riccia fluitans*

2.1.4 *Lemna minor*

Die Kleine Wasserlinse ist eine monokotyle, zur Familie der Wasserlinsengewächse (Lemnaceae) gehörende Schwimmpflanze, die in stehenden oder langsam fließenden, meso- bis eutrophen Gewässern vorkommt und weltweit verbreitet ist (ROTHMALER, 2005). Die Sprossglieder sind linsenförmig, 2-4 mm lang und 1-3 mm breit. Die Glieder (Fronds) sind einzeln oder zu 2-6 zuammenhängend, wobei jedes Glied Eine 1-4 mm lange Wurzel hat. Häufig bildet die Art große flächenhafte Schwimm-decken aus. *Lemna minor* ist einhäusig, die männliche Blüte besteht nur aus einem Staubblatt und die Weibliche aus einem Stempel. Zur Blütenbildung kommt es selten, die Vermehrung findet hauptsächlich vegetativ über Sprosse statt (LUDWIG 2003). Nach WENDELBERGER (1986) wird im Herbst in den Sprossen Stärke gespeichert, mit der Folge, dass die Pflanze schwerer wird und auf den frostfreien Grund sinkt

Abb. 4: *Lemna minor*

2.2 Beschreibung des Testsystems

2.2.1 Pflanzenmaterial

Für den ersten Versuchsteil wurden kultivierte Wasserpflanzen aus dem Makrophytenlabor des Instituts für Gewässerschutz – Mesocosm GmbH, Homberg (Ohm) entnommen. Die Kultivierung der Wasserpflanzen erfolgte bei Raumtemperatur (ca. 18°C) in Aquarien, mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16:8 Stunden. Für den zweiten Versuchsteil wurden Pflanzen aus dem Bestand der Forschungsteiche, des Institutsgeländes in Homberg (Ohm) verwendet, die eine Woche vor Versuchsbeginn in die Aquarien des Makrophytenlabors überführt wurden und dort unter den eben genannten Bedingungen vorkultiviert wurden. Die Testorganismen für den *Lemna*-Standard-Test wurden unter einheitlichen Bedingungen im Klimaschrank des Instituts für Gewässerschutz vorkultiviert.

2.2.2 Medium

Als Medium für die submersen Wasserpflanzen *Ceratophyllum demersum, Elodea canadensis* und *Riccia fluitans* diente Teichwasser. In der ersten Versuchsphase wurde Wasser aus dem Makrophytenteich, in der zweiten Versuchsphase Wasser aus dem Referenzteich des Instituts für Gewässerschutz – Mesocosm GmbH in Neu- Ulrichstein verwendet. Vor Beginn der Versuche wurde das jeweilige Teichwasser mit Hilfe eines Zooplanktonsiebes (63 µm) gesiebt. Für den *Lemna*-Standard-Test wurde Nährstoffmedium nach Steinberg (verändert nach Altenburger; Rezeptur - siehe Anhang) verwendet.

2.2.3 Versuchsaufbau

Bei den Versuchen handelte es sich um Single-Spezies-Tests, d.h. dass alle vier Wasserpflanzenarten unabhängig voneinander, einzeln untersucht wurden. Je Wasserpflanze wurde mit einer Kontrolle und vier Herbizid-Konzentrationen mit jeweils drei Replikaten gearbeitet. Somit ergaben sich für jeden Versuch 15 Testeinheiten (Testgefäße bzw. Bechergläser).

Für die Versuche wurden bei der Art *Ceratophyllum demersum* Sprosse mit einer Länge zwischen 6 und 8,5 cm verwendet, bei *Elodea canadensis* Sprosse mit einer Länge von 10 cm und bei *Riccia fluitans* eine Menge von 0,2 g pro Testgefäß. Für den vergleichenden *Lemna*-Standard-Test wurden in jedes Testgefäß zehn Fronds eingesetzt. In der ersten Versuchsphase wurde mit allen drei beschriebenen submersen Wasserpflanzenarten, in der zweiten Versuchsphase nur mit den zwei submersen Wasserpflanzenarten C. *demersum* und *E. canadensis* gearbeitet. Im Unterschied zur ersten Versuchsphase wurde hier die Anzahl der Individuen pro Testgefäß auf fünf erhöht. Um die einzelnen Pflanzen in den Testgefäßen auseinander-halten zu können, wurden sie mit Hilfe von farbigen Drahtklammern markiert. Zusätzlich wurde in der zweiten Versuchsphase mit einer Vorlaufzeit von einer Woche gearbeitet, d.h. dass die Wasserpflanzen eine Woche vor dem Versuchsbeginn bereits in den Testeinheiten unter einheitlichen Bedingungen (Licht, Temperatur, Medium) gehalten wurden. Nach Ablauf der ersten Woche, am 16. Mai 2008 wurden aus 18 Testeinheiten, die 15 Testeinheiten mit dem homogensten Wachstum ausgewählt. Anschließend wurde die Testsubstanz appliziert.

Als Testgefäße für die Wasserpflanzen dienten unterschiedlich große Bechergläser. Die Tests mit *C. demersum* wurden in hohen 2-l-Bechergläsern mit 1,5 l Medium durchgeführt, die Tests mit *E. canadensis* in 500 ml Bechergläsern, welche in der ersten Versuchsphase mit 400 ml befüllt waren und in der zweiten Versuchsphase mit 450 ml. Für *R. fluitans* wurden 400 ml Bechergläser verwendet, deren Füllhöhe auf 300 ml eingestellt wurde und beim *Lemna*-Standard- Test 250 ml Bechergläser mit einer Füllhöhe von 200 ml. Alle verwendeten Bechergläser wurden mit perforierter Klarsichtfolie abgedeckt und in Aquarien gestellt, die soweit mit Wasser befüllt waren, dass die Bechergläser etwa zu einem Drittel im Wasser standen (siehe Abb. 5). Das Wasser in den Aquarien wurde mit Hilfe von Heizstäben auf Temperaturen zwischen 22-24°C eingestellt und mit Pumpen umgesetzt.

Um die Temperaturschwankungen klein zu halten, und eine möglichst hohe Lichtausbeute zu gewährleisten, wurden mit Alufolie verkleidete Aquarien verwendet. Auftretende Wasserverluste, sowohl in den Aquarien als auch in den Testmedien wurden mit dem jeweiligen Teichwasser bzw. Leitungswasser ausgeglichen. Hierbei standen die Bechergläser mit *C. demersum* in einem 450 l großen Aquarium, die von *E. canadensis* in einem 100 l großen Aquarium und die Bechergläser mit *R. fluitans* in

einem 60 l Aquarium. Der *Lemna*-Standard-Test, wurde in einem Klimaschrank durchgeführt, die Temperatur wurde an die Bedingungen in den Aquarien angepasst.

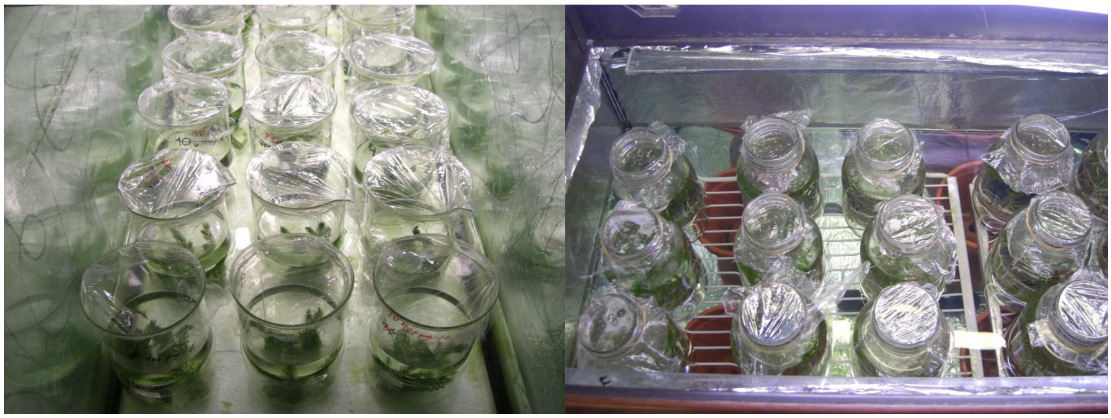

Abb. 5: Single-Spezies-Test in Bechergläsern, links Testgefäße mit *Ceratophyllum demersum*, rechts mit *Elodea canadensis*.

2.2.4 Beleuchtung

Für die Beleuchtung des großen 400 l Aquariums wurden Strahler mit 18 Watt-Energiesparlampen (Sylvania, LYNX D, Colour 840) eingesetzt, die auf vorgefassten Löchern dem Aquariumdeckel auflagen. Bei den beiden anderen Aquarien und im Klimaschrank erfolgte die Beleuchtung unter Verwendung von Leuchstoffröhren (Sun Glo, 46 cm, 15W / Osram L, 18W / 25), die unterseits des Aquariendeckels bzw. der Klimaschrankdecke angebracht waren. Die Lichtstärke in den einzelnen Testgefäßen wurde mit einem Luxmeter gemessen und lag auf Höhe der Testgefäße zwischen 3000-5000 Lux. Die Beleuchtung wurde, mit Ausnahme des *Lemna*-Standard-Tests (Dauerlicht nach OECD-Standard), auf einen Lichtrhythmus von 16:8 Stunden eingestellt. Um die Lichtverhältnisse für alle Testsysteme in den jeweiligen Aquarien im Mittel konstant zu halten, wurden die Testgefäße jeden zweiten Werktag nach dem folgenden Schema (Abb. 6) rotiert.

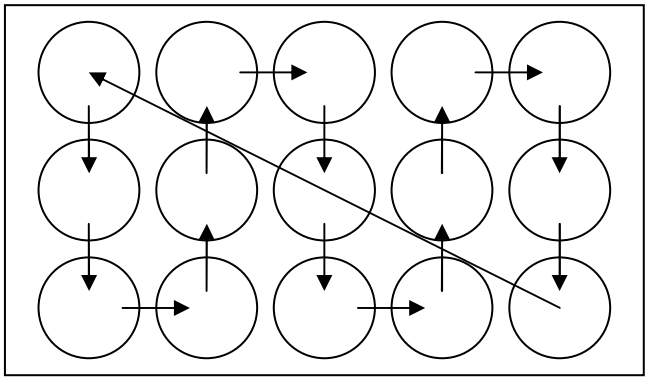

Abb. 6: Rotationsschema der Testgefäße mit *Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis* und *Riccia fluitans* in den jeweiligen Aquarien.

2.2.5 Atrazin

Als Testsubstanz wurde das Herbizid Atrazin in einer Reinheit von 96% verwendet. Es gehört zur Gruppe der s-Triazine und wirkt bei Pflanzen als Photosystem II-Inhibitor.
Letztendlich beruht die Wirkung von Atrazin auf der Unterbindung des Elektronentransports im Photosystem durch Abkopplung des Elektronenakzeptors Plastochinon vom Photosystem II. Es wurde im Jahre 1958 durch die Firma Geigy Chemical Company (Basel, Schweiz) patentiert und erlangte weltweite Bedeutung als Pflanzenschutzmittel. 1991 wurde Atrazin in Deutschland die Zulassung entzogen, weil im Grundwasser Konzentrationen auftraten, die um eine Zehnerpotenz höher lagen, als der Trinkwassergrenzwert von 0,1 µg/l der EU (HOCK & ELSTNER 1995). Nach SOLOMON et al. (1995) wird es unter anderem in den USA als eines der häufigsten Herbizide eingesetzt. Dort findet es vor allem Verwendung im Maisanbau und in geringeren Ausmaßen beim Anbau von Hirse und Zuckerrüben.
Atrazin ist mäßig wasserlöslich, besitzt eine niedrige Henry-Konstante und einen geringen Dampfdruck (siehe Tabelle 1). In gelöster Form ist die Verdampfung von Atrazin in die Umgebungsluft vernachlässigbar und die Adsorption an Sediment-Partikel schwach. Generell ist mit einer hohen Persistenz von Atrazin zu rechnen, da die Hydro- und Photolyseraten gering sind und der s-Triazin-Ring des Atrazins eine Resistenz gegen mikrobiellen Abbau aufweist.

Tab. 1: Physikalisch-chemische Charakterisierung von Atrazin.

CAS-Nummer	1912-24-9
Chemischer Name	2-Chlor-4-etylamino-6-isopropyl-amino-1,3,5-triazin
Molekulargewicht	215,7 g mol^{-1}
Summenformel	$C_8H_{14}N_5Cl$
Schmelzpunkt	175-177°C
Wasserlöslichkeit	33 g L^{-1} bei 22°C
Dampfdruck	2,89 x 10^{-7} mm Hg bei 25°C
Henry-Konstante	2,48 x 10^{-9} atm m^3 mol^{-1}
Log K_{OW}	2,68 bei 25°C
Hydrolyse	stabil für 30 d bei pH 5 bis 9 und 25°C
Photolyse im Wasser	Natürliches Licht: $t_{½}$ 355 d bei pH 7
Anaerobe Metabolisierung im Wasser	$T_{½}$ 608 d (sandiger Lehm)

* verändert nach SOLOMON *et. al* (1995), aus CIBA-GEIGY CORPORATION (1994).

2.2.6 Applikation

Da Erfahrungen gezeigt haben, dass die gewünschte Wasserlöslichkeit von Atrazin nicht so leicht erreicht werden kann (BOTZAT 2007), wurde für die Versuchsansätze Alkohol (Ethanol, 90%) als Lösungsvermittler in einer Volumenkonzentration von 0,1% verwendet. Sowohl für die Versuchsansätze mit den submersen Makrophyten, als auch beim *Lemna*-Standard-Test wurde eine frische Stammlösung mit den entsprechenden Mengen an Medium, Testsubstanz und Alkohol angesetzt. Als Konzentrationsstufen wurden die in Tab. 2 angegebenen Konzentrationen gewählt. In der ersten Versuchsphase und beim *Lemna*-Standard-Test wurden die verwendeten Testorganismen direkt in das mit Atrazin versetzte Wasser gesetzt. In der zweiten Versuchsphase wurde die Testsubstanz Atrazin zusammen mit dem Lösungsvermittler Alkohol, erst nach einer Woche Vorlaufzeit appliziert. Hierzu wurde vor der Applikation, das entsprechende Volumen an Medium aus den jeweiligen Testgefäßen entnommen und durch die Applikationslösung ersetzt.

Tab. 2: Nominale Atrazinkonzentrationen in der Kontrolle und den belasteten Testmedien I-IV und Angabe der Konzentrationen des Lösungsvermittlers EtOH.

Testmedium	Konzentration des Lösungsvermittlers EtOH [ml L^{-1}]	Nominale Atrazin-konzentration [µg L^{-1}]
C	0	0
I	0.016	25
II	0.063	100
III	0.25	400
IV	1	1600

2.3 Endpunkte

2.3.1 Physikalische Wasserparameter

Als physikalische Testparameter wurden in beiden Versuchsphasen wöchentlich in allen Testgefäßen, der pH-Wert, die Temperatur, der Sauerstoffgehalt und die Leitfähigkeit mit einem Multiparameter-Messgerät (WTW, Weilheim) gemessen. In der ersten Versuchsphase wurde die erste Messung nachmittags, einen Tag nach Versuchsbeginn, in der zweiten Versuchsphase wurden die Messungen nachmittags am Tag des Versuchsbeginns in den Testgefäßen der jeweiligen Arten durchgeführt und wöchentlich wiederholt. Beim *Lemna*-Standard-Test wurden nur der pH-Wert und die Leitfähigkeit zu Beginn und am Ende des Versuches aufgenommen.

2.3.2 Wachstumsparameter

Als Wachstumsparameter dienten in der ersten und zweiten Versuchsphase, die Sprosslänge (Summe aus Haupt- und Seitensprossen) und das Frischgewicht der Pflanzen. Generell wurde darauf geachtet, dass die verwendeten Pflanzen nur kurze Zeit außerhalb der Testgefäße waren. Beim vergleichenden *Lemna*-Standard-Test wurde die Änderung der Anzahl der Individuen (Frondzahl) als Maß für das Wachstum bzw. die Vermehrung verwendet.

Frischgewicht

Die Messung der Frischgewichte wurde zu Beginn der Versuche durchgeführt und danach in wöchentlichen Abständen wiederholt. In Vorbereitung für die Gewichtsbestimmung wurden die Pflanzen mit einem Papiertuch (erste Versuchsphase) bzw. durch zehnmaliges Abklopfen in einem Sieb (zweite Versuchsphase) weitest-

gehend von dem anhaftenden Wasser befreit. Anschließend wurde das Frischgewicht auf einer Tafelwaage (Kern GS 620-2 LMOM 1203, d = 0,01 g) bestimmt.

Sprosslänge

Die Vermessung der Pflanzen erfolgte mit Hilfe eines Lineals und wurde mit einer Genauigkeit von 0,5 cm durchgeführt. Hierbei wurde die Länge der Hauptsprosse und die der Seitensprosse getrennt erfasst und anschließend aufaddiert. Die Messungen wurden bei *Ceratophyllum demersum* von Beginn der Versuche an, bei *Elodea canadensis* nach Ablauf der ersten Woche (einheitliche Sprosslänge aller eingesetzter Individuen) durchgeführt und anschließend bis Versuchsende wöchentlich wiederholt.

2.3.3 Bestimmung der Gesamtchlorophyllkonzentration im Test-medium als Maß für die Algenkonzentration

2.3.3.1 Theoretische Grundlagen

Werden Chlorophyll- oder andere Pigmentmoleküle durch Licht angeregt, gehen sie kurzfristig auf ein höheres Energieniveau über und kehren dann unter Energieabgabe wieder in ihren Grundzustand zurück. Diese Energie kann auf drei Wegen abgegeben bzw. weitergeleitet werden. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Energie als Wärme oder teils als Wärme und teils als langwelliges Licht (Fluoreszenz) abgegeben werden kann. Als zweiter Weg kommt die Energieübertragung auf benachbarte Chlorophyllmoleküle in Frage, ein Vorgang der als Resonanz-Energieübertragung bezeichnet wird. Die letzte Möglichkeit besteht darin, dass die Energie auf ein benachbartes Molekül, einen Elektronenakzeptor übertragen wird, der Bestandteil der Elektronentransportkette ist. Als Folge wird das Chlorophyllmolekül oxidiert und der Elektronenakzeptor reduziert. Bei intakten photosynthetisch aktiven Chloroplasten läuft die Energieübertragung über die zwei letztgenannten Prozesse (RAVEN et al. 2005). Bei der Rückreaktion der Photosynthese verlaufen die Redoxreaktionen in der Elektronentransportkette in umgekehrter Reihenfolge, d.h. dass zuvor reduzierte

Elektronenakzeptoren wieder oxidiert werden, die Elektronen wandern wieder in umgekehrter Richtung zurück. Da Teilreaktionen der Rückreaktion nur anhand thermischer Einwirkungen verlaufen, ist die Geschwindigkeit gegenüber der Hinreaktion deutlich herabgesetzt und temperaturabhängig. Die verzögerte Fluoreszenz, die man beispielsweise dann beobachten kann, wenn belichtete Algenzellen in die Dunkelheit gebracht werden, ist noch im Zeitraum einiger Minuten als abklingendes dunkelrotes Nachleuchten messbar. Dieses Nachleuchten ist Folge der Energieabstrahlung eines angeregten Chlorophyllmoleküls (siehe Abb. 7), welches in den Grundzustand übergeht. Dass das Nachleuchten relativ lange anhält, liegt neben den langsameren temperaturabhängigen Rückreaktionen daran, dass zuvor größere „Reserven“ an Elektronen im Zuge der Hinreaktion angehäuft wurden. Dies können z.B. reduzierte Elektronenakzeptoren sein, aber auch weiter entfernte Elektronen auf der Außenseite der Thylakoidmembran, die nach und nach wieder zum Reaktionszentrum wandern, das dortige Chlorophyllmolekül anregen, bei dessen Rückkehr in den Grundzustand die verzögerte Fluoreszenz entsteht (V. TÜMPLING et al. 1999).

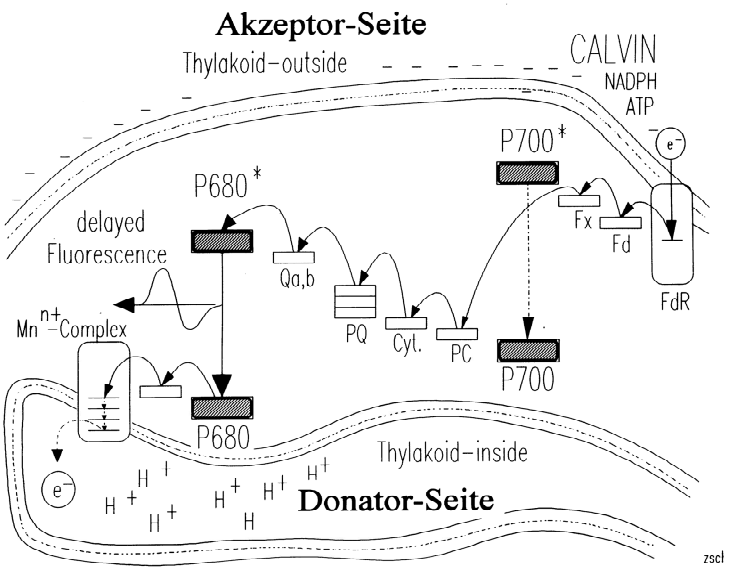

Abb. 7: Rückreaktion der Elektronen während der Dunkeladaptionsphase (GERHARD unveröffentlicht).

2.3.3.2 Methodik zur Bestimmung der Gesamtchlorophyllkonzentration

Im ersten und zweiten Versuchsteil wurde mit jeweils 300 ml Testmedium aus allen Testgefäßen von *Ceratophyllum demersum* wöchentlich eine Messung der Gesamtchlorophyllkonzentration durchgeführt. Anschließend wurde die Probe wieder zurück in das Testmedium gegeben. Die Messung der Gesamtchlorophyllkonzentration beruht auf der Erfassung der verzögerten Fluoreszenz photosynthetisch aktiver Pigmente mit Hilfe eines DF-Anregungsspektrometers (GERHARDT & BODEMER 2000). Im Verlauf der Messung werden zehnminütig, dunkeladaptierte Proben mit monochromatischem Licht unterschiedlicher Wellenlängen bestrahlt. Nach V. TÜMPLING et al. (1999) wird das Spektrum der Anregungswellenlänge (400-730 nm) innerhalb von 165 Sekunden abgestrahlt und zeitverzögert nach ca. 0,2 Sekunden als Emissionsspektrum der verzögerten Fluoreszenz erfasst. Das resultierende Spektrum wird automatisch mit einer entsprechenden Software unter Berücksichtigung von Kalibrierspektren weiter-verarbeitet. Als Ergebnis der Messung werden Konzentrationen verschiedener Algentaxa (Blaualgen, Grünalgen, Kieselalgen, Kryptomonaden) und der Gesamtchlorophyllgehalt ausgegeben, welcher als indirektes Maß für die Konzentration an Algen angesehen werden kann.

2.4 Auswertung der Daten

Alle aufgenommenen Daten wurden in das Programm Microsoft® Excel eingegeben, teilweise graphisch dargestellt und teilweise in das Programm Graph Pad Prism® für Windows, Version 4.02 überführt. Mit Hilfe dieses Programms wurden die statistischen Auswertungen durchgeführt und weitere Graphiken erstellt. Zur Darstellung der physikalischen Parameter wurden die Replikate der Kontrollen und der einzelnen Konzentrationsstufen auf einen Wert gemittelt und anschließend, mit Ausnahme der Temperatur in einem wöchentlichen Verlaufsdiagramm abgebildet. Aus den Daten aller Wachstumsparameter (Sprosslänge, Frischgewicht, Frondzahl) wurden unter Anwendung folgender Formel Wachstumsraten (WR) ermittelt (verändert nach PRASZCZY et al., 1999).

$$WR = (\ln W_n - \ln W_0) / t_d$$

W_n = Größe des Wachstumsparameters am Testanfang (Sprosslänge, Frischgewicht, Frondzahl)
W_0 = Größe des Wachstumsparameters am Testende (Sprosslänge, Frischgewicht, Frondzahl)
t[d] = Testdauer in Tagen

Die Berechnung der prozentualen Hemmung (H) der Wachstumsrate bei *Lemna minor* erfolgte darauf aufbauend mit Hilfe folgender Formel.

$H = (\mu_K - \mu_T) / \mu_K * 100$, [%]
μ_K = Mittelwert der Wachstumsrate der Kontrolle
μ_T = Wachstumsrate der Testansätze

In der ersten Versuchsphase wurde jeweils eine Pflanze pro Testgefäß eingesetzt. Drei Replikate pro Konzentrationsstufe bzw. Kontrolle gingen in die Berechnung des Mittelwerts und der dazugehörigen Standardabweichung ein. Im Unterschied hierzu wurden in der zweiten Versuchsphase, wie bereits unter Kapitel 2.2.3 erwähnt, fünf Pflanzen pro Testgefäß eingesetzt. Hier wurden die gemessenen Werte der Einzelpflanzen pro Testgefäß gemittelt. Soweit möglich wurde anschließend eine einfaktorielle Varianzanalyse (One-Way ANOVA) mit Posttest (Bonferroni`s Multiple Comparison Test) durchgeführt und die EC_{50} ermittelt.

3 Ergebnisse

In diesem Abschnitt wird zunächst auf die Ergebnisse der ersten Versuchsphase eingegangen, im Anschluss werden die Ergebnisse der zweiten Versuchsphase dargestellt und zum Schluss die Ergebnisse des vergleichenden *Lemna*-Standard-Tests. Generell wird den Ergebnissen der zweiten Versuchsphase mehr Gewicht beigemessen, weil dort ein aufwendigeres und aussagekräftigeres Versuchsdesign gewählt wurde.

3.1 Versuchsphase I

3.1.1 *Ceratophyllum demersum*

3.1.1.1 Physikalische Wasserparameter

a) pH und Sauerstoffgehalt

Wie anhand Abb. 8a erkennbar ist, lag der pH-Wert der Kontrolle am Versuchsbeginn bei ca. 7,5, nahm im Testverlauf stetig zu und erreichte nach vier Wochen ein Maximum bei etwa 9,5. Bei den mit 25 µg/l und 100 µg/l belasteten Gruppen, deren pH-Werte anfangs auch einen Wert von 7,5 hatten, lag ein ähnlicher Verlauf vor, mit dem Unterschied, dass die pH-Werte nach einer Woche niedriger als zu Beginn des Versuchs lagen. Bei den beiden am höchsten belasteten Gruppen war der Abfall des pH-Wertes nach einer Woche am deutlichsten. Im Unterschied zu allen anderen Gruppen stieg der pH-Wert bis Versuchsende nicht mehr und erreichte einen Wert von ca. 6,5. Allgemein ist im Versuchszeitraum ein konzentrationsabhängiger pH-Wert-Verlauf erkennbar, mit deutlichen Abweichungen zwischen den zwei höchstbelasteten und allen anderen Gruppen.

Der Sauerstoffgehalt (siehe Abb. 8b) korreliert bei allen Konzentrationsstufen und der Kontrolle relativ stark mit dem pH-Wert-Verlauf. Ausgehend von Sauerstoffgehalten bei etwa 9 mg/l, zeigten die Kontrolle und die zwei niedrigsten Konzentrationsstufen einen konzentrationsabhängigen Abfall nach einer Woche und einen anschließenden Anstieg auf Sauerstoffgehalte von etwa 10 bis 11 mg/l. Bei den beiden Gruppen mit den höchsten Belastungen gab es eine stetige Abnahme mit Werten für Sauerstoffgehalte, die nach vier Wochen zwischen 0 und 0,5 mg/l lagen. Wie beim pH-Wert ist ein konzentrationsabhängiger Verlauf des Sauerstoffgehaltes erkennbar mit deutlichen Abweichungen zwischen den zwei am höchsten belasteten und allen anderen Gruppen.

a) **b)**

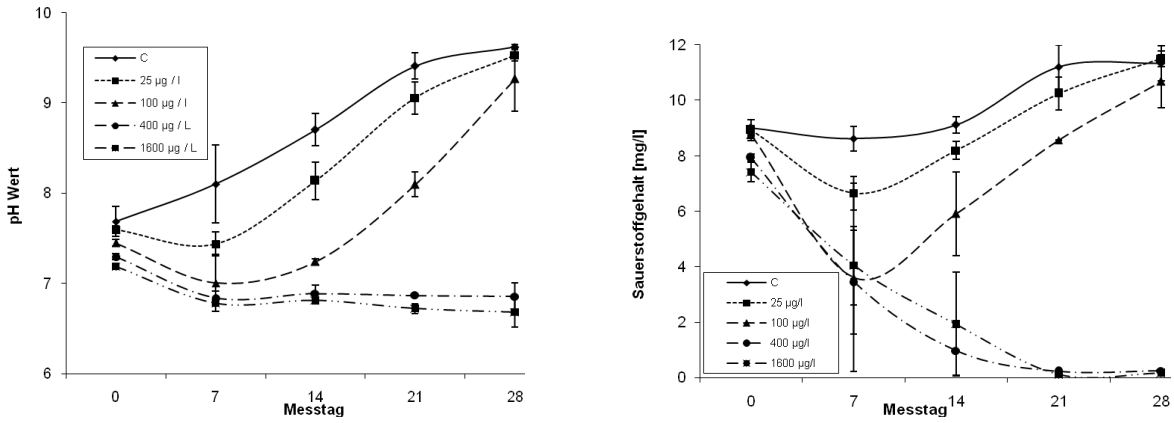

Abb. 8: Entwicklung von **a)** ph-Wert **b)** Sauerstoffgehalt im vierwöchigen Verlauf im Testmedium von *Ceratophyllum demersum*. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle.

c) Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeit lag zu Beginn des Versuches (Tag 0) bei allen Gruppen zwischen 78 und 80 µS/cm und am Ende zwischen 69 und 78 µS/cm. Insgesamt waren keine konzentrationsabhängigen Tendenzen erkennbar. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren gering.

3.1.1.2 Wachstumsparameter

a) Frischgewicht

Die Wachstumsrate des Frischgewichts von *C. demersum* lag bei der Kontrolle nach vier Wochen bei 0,017 (siehe Abb. 9a). Bei der niedrigsten Konzentrationsstufe lag die Wachstumsrate mit 0,142 unter dem Kontrollniveau. Ausgehend von der niedrigsten bis zur Konzentrationsstufe mit 400 µg/l, zeigte sich bei zunehmender Atrazinkonzentration eine steigende Wachstumsrate. Weiterhin bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und der zweithöchsten Konzentrationsstufe (400 µg/l). Die mit 1600 µg/l belastete Gruppe lag mit einer Wachstumsrsate von 0,019 leicht über dem Kontrollniveau.

Der Verlauf des relativen Frischgewichts war bei allen Gruppen, mit Ausnahme der Konzentrationsstufe mit 400 µg/l, relativ ähnlich (siehe Abb. 9b); ausgehend vom ersten Messtag erreichten die vier Gruppen, bei mehr oder weniger stetigem Wachstum, nach vier Wochen Werte, die zwischen 145% (25 µg/l) und 185% (100 µg/l) lagen. Das relative Frischgewicht der Gruppe mit der zweithöchsten Belastung (400 µg/l) nahm im Verlauf der ersten zwei Wochen relativ stark und in der dritten Woche etwas abgeschwächt zu. Zwischen der dritten und vierten Woche gab es dann eine Abnahme auf einen Wert von 322%.

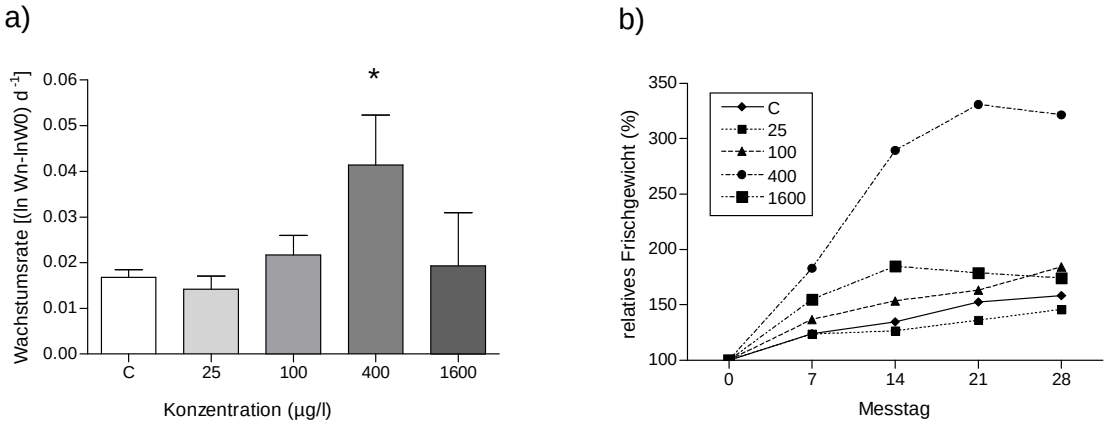

Abb. 9: a) Durchschnittliche Wachstumsrate bezogen auf das Frischgewicht von *Ceratophyllum demersum* als [(ln W_n-lnW_0) /t], wobei t[d] = 28 Wn = Größe des Wachstumsparameter am Testanfang, W_0 = Größe des Wachstumsparameters am Testende und t[d] = 28 von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle nach vier Wochen; zusätzlich angegeben ist die Standardabweichung. **b)** Durchschnittliche Entwicklung des relativen Frischgewichts (*Ceratophyllum demersum*) von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle im Verlauf von vier Wochen; zusätzlich angegeben ist die Standardabweichung vom Mittelwert und das Signifikanzniveau: * < 0,05.

b) Sprosslänge

Für die Wachstumsrate der Sprosslänge von *C. demersum* ergaben sich nach vier Wochen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den vier Konzentrationsstufen (siehe Abb. 10a). Eine leichte Konzentrationsabhängigkeit bestand im Bereich der Konzentrationsstufen von 25 bis 400 µg/l; mit steigender Konzentration nahm auch die Wachstumsrate zu. Die Wachstumsrate lag bei der Kontrolle bei 0,019, hatte bei einer Konzentration von 25 µg/l ihr Minimum (0,017) und mit einem Wert von 0,047 ihr Maximum bei einer Belastung von 400 µg/l.

Die relative Sprosslänge bei der Konzentrationsstufe mit 400 µg/l nahm innerhalb der ersten drei Woche stark zu und fiel in der nächsten Woche auf einen Wert von 393%

(siehe Abb. 10b). Bei allen anderen Gruppe lag ein flacherer Verlauf vor; nach vier Wochen lag die relative Sprosslänge bei Werten zwischen 165% und 240%.

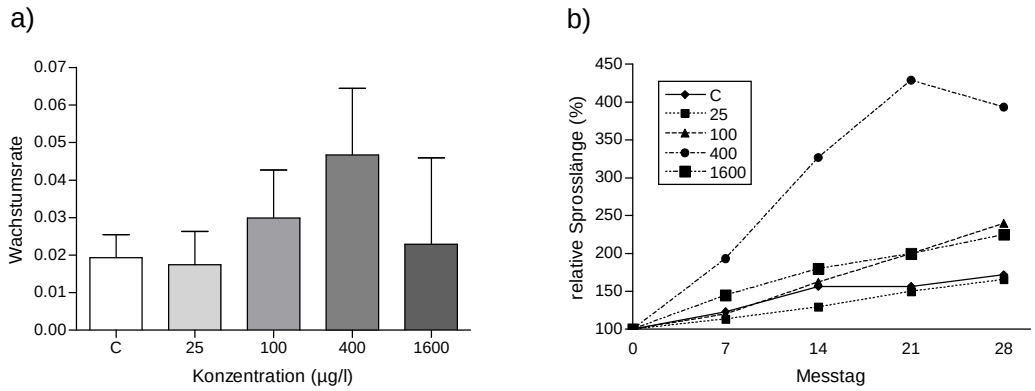

Abb. 10: **a)** Durchschnittliche Wachstumsrate bezogen auf die Sprosslänge von *Ceratophyllum demersum* als [(ln W_n-lnW_0) /t], wobei t[d] = 28 Wn = Größe des Wachstumsparameter am Testanfang, W_0 = Größe des Wachstumsparameters am Testende und t[d] = 28 von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle nach vier Wochen; zusätzlich angegeben ist die Standardabweichung vom Mittelwert. **b)** Durchschnittliche Entwicklung der relativen Sprosslänge (*Ceratophyllum demersum*) von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle im Verlauf von vier Wochen.

3.1.2 *Elodea canadensis*

3.1.2.1 Physikalische Wasserparameter

a) pH und Sauerstoffgehalt

Der pH-Wert der Kontrolle lag zu Beginn des Versuchs bei etwa 7,5, stieg innerhalb der ersten Woche deutlich an, blieb dann mehr oder weniger auf einem Niveau und erreichte nach vier Wochen einen Wert von ca. 9 (siehe Abb. 11a). Bei der Konzentrationsstufe mit 25 µg/l ergab sich ein nahezu identischer, geringfügig niedrigerer Verlauf. Die nächsthöhere Konzentrationsstufe wich deutlich von der Kontrolle ab und zeigte im vierwöchigen Verlauf, ausgehend von einem pH-Wert bei etwa 7,5, nur einen geringen Anstieg. Die beiden Gruppen mit den höchsten Atrazinbelastungen (400 und 1600 µg/l) verliefen nahezu parallel. Ausgehend von einem pH-Wert zwischen 7,2 und 7,3 zeigte sich nach einer Woche ein leichter Abfall, innerhalb der nächsten zwei Wochen ein leichter Anstieg und nach vier Wochen wiederholt eine leichte Senkung auf Werte zwischen 6,9 und 7,1. Grundsätzlich lag ein deutlich konzentrationsabhängiger Verlauf des pH-Wertes vor, mit den jeweils zwei beschriebenen Gruppen, die auf einem ähnlichem Niveau lagen.

Wie anhand Abb. 11b erkennbar ist, unterlagen auch die Sauerstoffgehalte innerhalb der Versuchsdauer einem konzentrationsabhängigen Verlauf. Die Sauerstoffgehalte der Kontrolle zeigten ausgehend von einem Wert bei etwa 8 mg/l innerhalb der ersten drei Wochen einen stetig steigenden Verlauf und eine leichte Abnahme in der darauffolgenden Woche. Im Unterschied dazu gab es bei der am geringsten belasteten Gruppe (25 µg/l) nach der ersten Woche einen leichten Abfall des Sauerstoffgehaltes, ansonsten jedoch eine sehr ähnliche, geringfügig niedrigere Verlaufskurve. Bei den drei anderen Gruppen, lagen die Sauerstoffgehalte am Messtag 0 bei Werten zwischen 6,4 und 7,2 mg/l und fielen dann nach der ersten Woche mehr oder weniger deutlich ab. Innerhalb der nächsten drei Wochen zeigte sich bei allen Gruppe ein relativ wechselhafter Verlauf, wobei sich die Sauerstoffgehalte der Gruppe, die mit 100 µg/l Atrazin belastet wurde, wieder auf das Ausgangsniveau bewegten. Der Sauerstoffgehalt der zweithöchstbelasteten Gruppe lag nach vier Wochen bei etwa 4,6 mg/l und bei der am höchsten belasteten Gruppe bei 0,6 mg/l.

a) **b)**

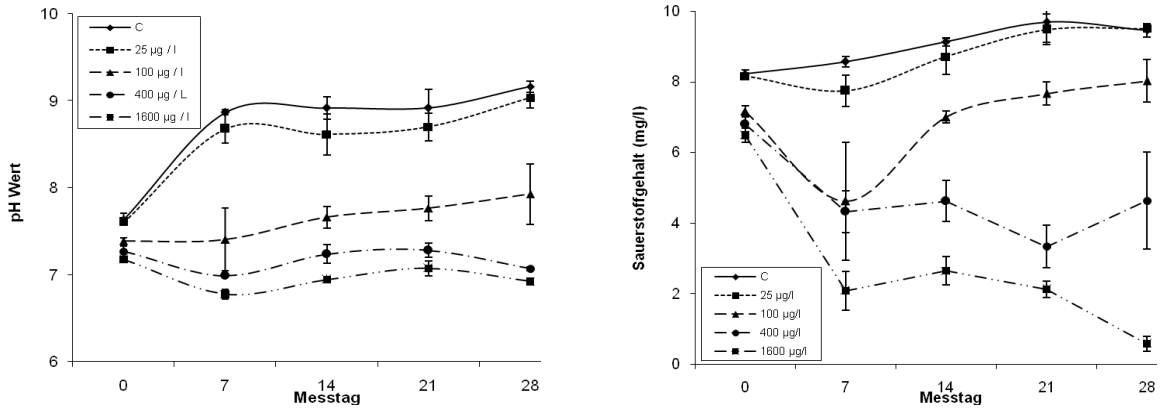

Abb. 11: Entwicklung von **a)** pH-Wert und **b)** Sauerstoffgehalt im vierwöchigen Verlauf im Testmedium von *Elodea canadensis*. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle.

c) Leitfähigkeit

Die mittlere Leitfähigkeit stieg bei der höchsten Konzentrationsstufe im vierwöchigen Verlauf von 84 auf ca. 89 µS/cm an (siehe Abb. 12). Bei allen anderen Gruppen sank die Leitfähigkeit nach vier Wochen von Werten im Bereich von 79 bis 82 µS/cm auf Werte zwischen 77 und 80 µS/cm. Eine Konzentrationsabhängigkeit der Leitfähigkeit ist nicht erkennbar die höchste Konzentrationsstufe lag oberhalb, die niedrigste unterhalb der Kontrolle.

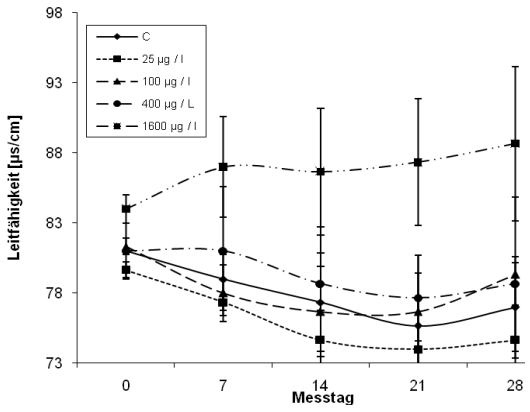

Abb. 12: Entwicklung der Leitfähigkeit im vierwöchigen Verlauf im Testmedium von *Elodea canadensis*. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von je drei Replikaten in den einzelnen Konzentrationsstufen und der Kontrolle.

3.1.2.2 Wachstumsparameter

a) Frischgewicht

Die Wachstumsraten des Frischgewichts von *Elodea canadensis* lagen nach vier Wochen bei allen Gruppen bei Werten um 0,04 vergleichsweise hoch (siehe Abb. 13a). Konzentrationsabhängige Effekte oder signifikanten Unterschiede der einzelnen Konzentrationsstufen zur Kontrolle konnten nicht ermittelt werden. Die relative durchschnittliche Zunahme des Frischgewichts lag bei den zwei höchsten Konzentrationsstufen drei Wochen nach Applikation bei Werten im Bereich von 450%, bei der dritthöchsten Konzentrationnstufe bei einem Wert von 311% und bei der niedrigsten Konzentrationsstufe und der Kontrolle bei Werten um 255%. Nach vier Wochen sank das relative Frischgewicht bei den drei höchsten Konzentrationsstufen wieder mehr oder weiniger deutlich ab. Am Versuchsende lag die Zunahme des relativen Frischgewichts bei den belasteten Gruppen zwischen 255% (25 µg/l) und 322% (1600 µg/l). Die Kontrolle erreichte im selben Zeitraum ein Frischgewicht von 288% (siehe Abb. 13b).

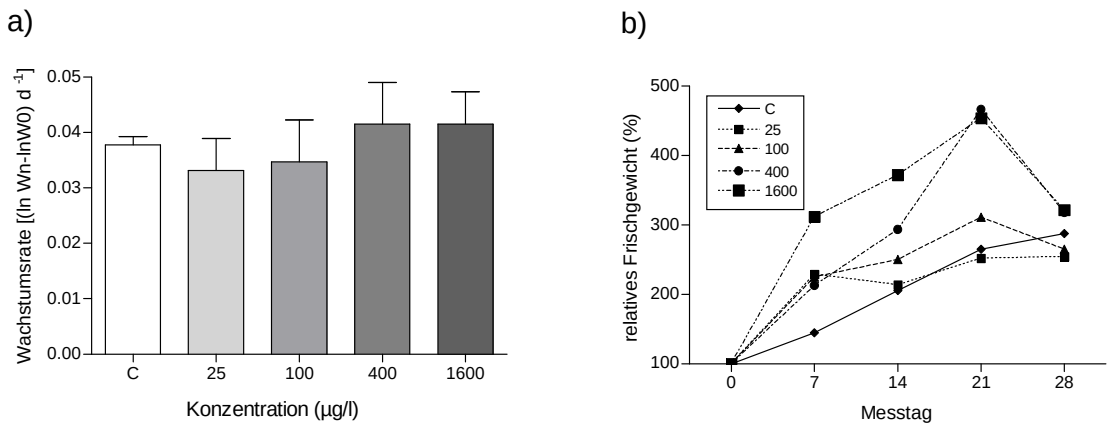

Abb. 13: a) Durchschnittliche Wachstumsrate bezogen auf das Frischgewicht von *Elodea canadensis* als [(ln W_n-lnW_0) /t], wobei Wn = Größe des Wachstumsparameter am Testanfang, W_0 = Größe des Wachstumsparameters am Testende und t[d] = 28 von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle nach vier Wochen; zusätzlich angegeben ist die Standardabweichung. **b)** Durchschnittliche Entwicklung der relativen Frischgewichts (*Elodea canadensis*) von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle im Verlauf von vier Wochen.

b) Sprosslänge

Auch für die Wachstumsrate der Sprosslänge von *E. canadensis* ergaben sich nach vier Wochen keine konzentrationsabhängigen Effekte und keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen und der Kontrolle. Die rel. Zunahme der Sprosslänge lag nach vier Wochen bei Werten zwischen 162% (25 µg/l) und 183% bei der Kontrolle und der zweithöchsten Konzentrationsstufe (400 µg/l).

3.1.3 *Riccia fluitans*

3.1.3.1 Physikalische Wasserparameter

a) pH und Sauerstoffgehalt

Wie anhand Abb. 14a deutlich wird, liegen die Verläufe der Kontrolle und der Gruppe mit der geringsten Atrazinbelastung (25 µg/l) relativ eng zusammen. Ausgehend von pH-Werten im Bereich von 7,7 bis 7,9 erreichte die Kontrolle nach vier Wochen einen Wert von etwa 8,4, die geringstbelastete Gruppe einen Wert von ca. 8,6. Die mit 100 und 400 µg/l belasteten Gruppen erreichten, ausgehend von einem pH-Wert von 7,7, nach vier Wochen pH-Werte zwischen 8 und 8,3. Die am höchsten belastete Gruppe lag nach leichten pH-Schwankungen im vierwöchigen Verlauf am letzten Messtag mit einem pH-Wert von etwa 8,6 leicht über dem Ausgangsniveau.

Die Entwicklung der Sauerstoffgehalte, die in Abb. 14b dargestellt sind, zeigten bei allen Gruppen, mit Ausnahme der höchsten Konzentrationsstufe, ähnliche, weitgehend konzentrationsabhängig verschobene Verläufe. Ausgehend von Sauerstoffgehalten zwischen 8 und 8,5 lagen die Werte nach der ersten Woche deutlich unter dem Ausgangsniveau und stiegen dann wieder auf Werte zwischen 8 und 8,9, Bei der am höchsten belasteten Gruppe fiel der Sauerstoffgehalt im vierwöchigen Verlauf von einem Wert bei etwa 7,5 auf einen Wert von ca. 5,6.

a) **b)**

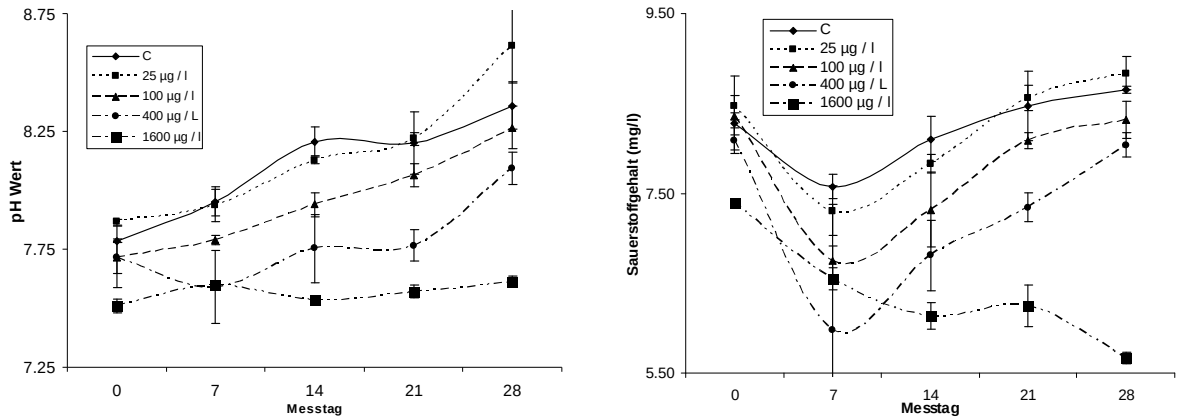

Abb. 14: Entwicklung von **a)** ph-Wert und **b)** Sauerstoffgehalt im vierwöchigen Verlauf im Testmedium von *Riccia fluitans*. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle.

b) Leitfähigkeit

Im Hinblick auf die Leitfähigkeit der einzelnen Gruppen liegen weitgehend parallele, mehr oder weniger verschobene, steigende Verläufe vor (Abb. 15). Der Anstieg der Leitfähigkeit war bei allen Gruppen nach der ersten Woche am höchsten und verblieb innerhalb der nächsten drei Wochen mehr oder weniger auf einem Niveau. Ausgehend von Werten zwischen 86 und 93 µS/cm erreichte die Leitfähigkeit nach vier Wochen Werte zwischen 110 und 120 µS/cm. Eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit ist nicht erkennbar, die zwei höchsten Konzentrationsstufen (400 und 1600 µg/l) lagen oberhalb der Kontrolle, die niedrigste ab der zweiten Woche unterhalb der Kontrolle.

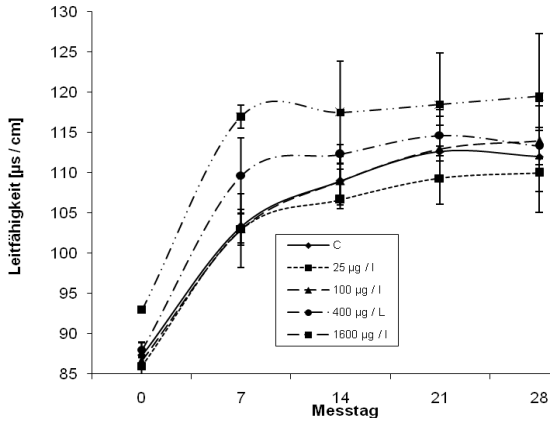

Abb. 15: Entwicklung der Leitfähigkeit im Testmedium von *R. fluitans* im Verlauf von vier Wochen. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von je drei Replikaten in den einzelnen Konzentrationsstufen und der Kontrolle.

3.1.3.2 Wachstumsparameter

Die Wachstumsrate des Frischgewichts von R. *fluitans* zeigte nach vier Wochen keine konzentrationsabhängigen Effekte auf und keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den belasteten Gruppen (siehe Abb. 16a). Die relative Zunahme an Frischgewicht von *R. fluitans* zeigte nach vier Wochen keine konzentrationsabhängigen Effekte (siehe Abb. 16b). Sie fiel am Versuchsende mit Zunahmen zwischen 10% (100 µg/l) und 40% (400 µg/l) gering aus. Die Kontrollgruppe erreichte im selben Zeitraum einen relativen Zuwachs an Frischgewicht von 23%.

a) Frischgewicht

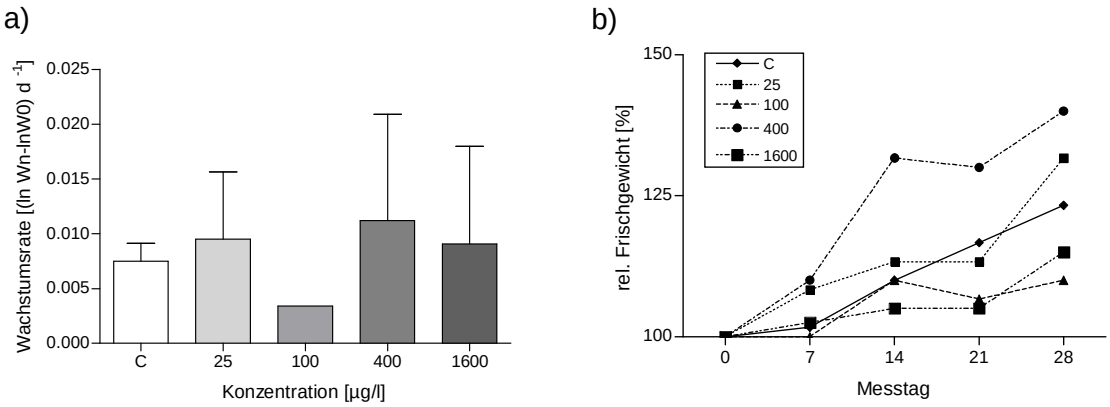

Abb. 16: a) Durchschnittliche Wachstumsrate bezogen auf das Frischgewicht von *Riccia fluitans* als [(ln W_n-lnW_0) /t], wobei Wn = Größe des Wachstumsparameter am Testanfang, W_0 = Größe des Wachstums-parameters am Testende und t[d] = 28 von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle nach vier Wochen; zusätzlich angegeben ist die Standardabweichung. **b)** Durch-schnittliche Entwicklung der relativen Frischgewichts (*Riccia fluitans*) von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle im Verlauf von vier Wochen.

3.1.4 Algen

Die vierwöchigen Verläufe der Chlorophyllkonzentrationen in den Testmedien sind in Abb. 17 dargestellt. In den ersten zwei Versuchswochen waren die Chlorophyll-konzentrationen aller Gruppen auf einem niedrigen Niveau mit Werten zwischen 0 und 2 µg/l. Innerhalb der nächsten zwei Wochen stiegen die Chlorophyllkonzentrationen, mit Ausnahme der höchsten Konzentrationsstufe, auf Werte zwischen 4 und 7 µg/l an. Hierbei erreichte die Kontrolle nach vier Wochen mit durchschnittlich 6,47 µg/l den höchsten Wert. Dagegen blieb die Chlorophyllkonzentration der höchsten Konzentrationsstufe im gesamten Versuchsverlauf mit Werten unter 1 µg/l auf sehr niedrigem Niveau. Ein eindeutiger konzentrationsabhängiger Verlauf der Algenentwicklung ist nicht erkennbar.

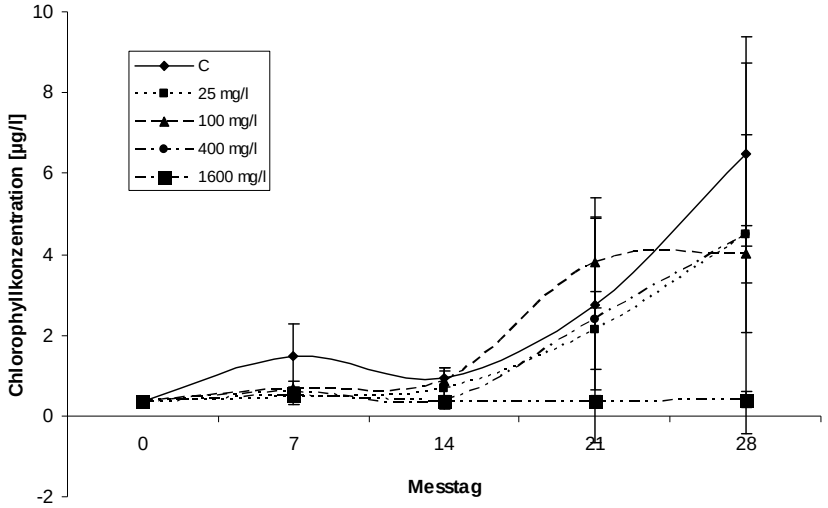

Abb. 17: Entwicklung der Chlorophyllkonzentration in den Testgefäßen von *Ceratophyllum demersum* im Verlauf von vier Wochen. Angegeben sind die Mittelwerte von je drei Replikaten in den einzelnen Konzentrationsstufen und der Kontrolle.

3.1.5 Beobachtungen

Riccia fluitans

Abgesehen von einem leichten Algenwachstum in den Testmedien von *Riccia fluitans* konnten keine morphologischen Veränderungen am Testorganismus beobachtet werden.

Elodea canadensis

Bei *Elodea canadensis* kam es hin und wieder zu leichten Aufhellungen, schwärzlichen Verfärbungen und absterbenden Sprossteilen. Diese morphologischen Auffälligkeiten

konnten jedoch nicht mit den erhöhten Atrazinkonzentrationen in Verbindung gebracht werden, sondern traten vereinzelt bei den verschiedenen Gruppen (Kontrolle & Konzentrationsstufen) auf.

Ceratophyllum demersum

Bei *Ceratophyllum demersum* konnte bei höheren Konzentrationen eine deutliche Internodienstreckung, eine zunehmende Spross- und Blattbrüchigkeit, eine leichte Aufhellung der Blätter und eine zunehmende Anzahl an Neusprossen beobachtet werden. Wie anhand Abb. 18 deutlich wird, war die beobachtbare Zunahme der Internodienlänge bzw. der Testorganismen bei hohen Konzentrationen teilweise beträchtlich. Sie trat nur, jedoch nicht immer bei den zwei höchsten Konzentrationsstufen mit 400 und 1600 µg/l auf.

Abb. 18: Darstellung eines Individuums von *Ceratophyllum demersum*. Pflanzen der Kontrolle eine Woche nach Versuchsbeginn (links oben) und am Versuchsende (rechts oben). Pflanzen der höchsten Konzentrationsstufe eine Woche nach Versuchsbeginn (links unten) und am Versuchsende (rechts unten).

3.2 Versuchsphase II

3.2.1 *Ceratophyllum demersum*

3.2.1.1 Physikalische Parameter

a) pH und Sauerstoffgehalt

Wie anhand Abb. 19a deutlich wird, stiegen die pH-Werte im Verlauf der ersten Woche vor der Applikation bei allen Gruppen sehr einheitlich von etwa 8,5 auf 9,5 an. Nach Applikation ist im vierwöchigen Versuchszeitraum ein konzentrationsabhängiger Verlauf des pH-Wertes mit leicht steigendem und weitgehend ähnlichem Verhalten der Kontrolle und der niedrigsten Konzentrationsstufe erkennbar. Die mit 100 µg/l belastete Gruppe zeigt nach der ersten Woche einen leichten Abfall auf einen Wert von etwa 9,2 und in den drei folgenden Wochen eine anschließende „Erholung“ auf einen Wert von 9,5. Die pH-Verläufe der zwei höchsten Konzentrationen zeigten ein ähnlichen, konzentrationsabhängig verschobenen Verlauf. Eine Woche nach der Applikation sanken die pH-Werte deutlich, blieben dann bis zur dritten Woche mehr oder weniger auf einem Niveau und fielen dann nach der vierten Woche auf pH-Werte von etwa 7,9 (400 µg/l) und 6,9 (1600 µg/l).

Der Sauerstoffgehalt der Kontrolle lag eine Woche vor der Applikation mit einem Wert von 13,4 mg/l deutlich über dem Wert von 11,5 mg/l bei der niedrigsten Konzentrationsstufe und der drei anderen Konzentrationsstufen, die am 7. Tag vor Applikation Sauerstoffgehalte um 9,9 mg/l hatten (siehe Abb. 19b). Am Tag der Applikation lagen die Sauerstoffgehalte dann mit Werten zwischen 14 und 15 mg/l etwa auf einen Niveau und divergierten in der folgenden Woche konzentrationsabhängig auseinander. Hierbei ergab sich bei der Kontrolle und der niedrigsten Konzentrationsstufe ein nahezu identischer, weitgehend leicht abfallender Verlauf mit einem Sauerstoffgehalt von etwa 14,1 mg/l am Versuchsende. Die Konzentrationsstufe mit 100 µg/l Atrazinbelastung fiel im Verlauf der ersten beiden Wochen nach Applikation auf einen Sauerstoffgehalt von 9,5 mg/l und erreichte nach weiteren zwei Wochen einen Sauerstoffgehalt von 13,5 mg/l. Die beiden am höchsten belasteten Konzentrationsstufen fielen nach einer Woche deutlich und erreichten nach drei Wochen Sauerstoffgehalte um 0,5 mg/l. Anschließend stieg die mit 400 µg/l belastete Konzentrationsstufe wieder auf einen Wert von 4,5 mg/l und die am höchsten belastete Gruppe verblieb mit einem Sauerstoffgehalt von 0,3 mg/l auf niedrigem Niveau.

a) **b)**

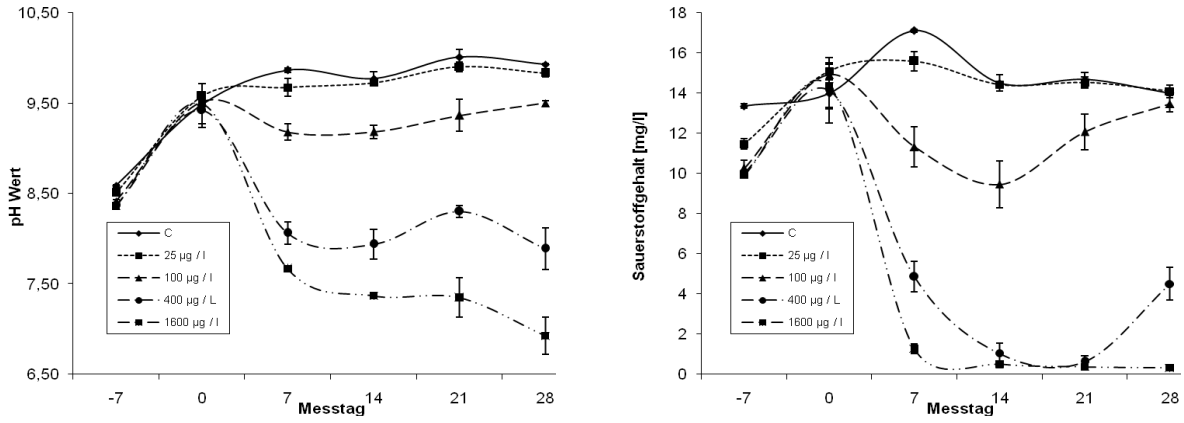

Abb. 19: Entwicklung von **a)** ph-Wert und **b)** Sauerstoffgehalt im fünfwöchigen Verlauf im Testmedium von *Ceratophyllum demersum*. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von je drei Replikaten in den einzelnen Konzentrationsstufen und der Kontrolle.

c) Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeit lag zu Beginn des Versuches (Tag -7) bei allen Gruppen bei Werten um 450 µS/cm und fiel dann bis zum Tag der Applikation auf Werte im Bereich von 270 µS/cm (siehe Abb. 20). Im Verlauf der nächsten vier Wochen divergierten die Werte für die Leitfähigkeiten deutlich, wobei die Kontrolle und die zwei niedrigsten Konzentrationsstufen relativ einheitlich sanken und am Versuchsende eine Leitfähigkeit zwischen 233 und 251 µS/cm erreichten. Die mit 400 µg/l belastete Gruppe stieg innerhalb der ersten zwei Wochen deutlich an und sank dann in den nächsten zwei Wochen auf einen Wert von 297 µS/cm. Bei der höchsten Konzentrationsstufe kam es nach der Applikation zu einem deutlichen und konstanten Anstieg der Leitfähigkeit auf einen Wert von 414 µS/cm.

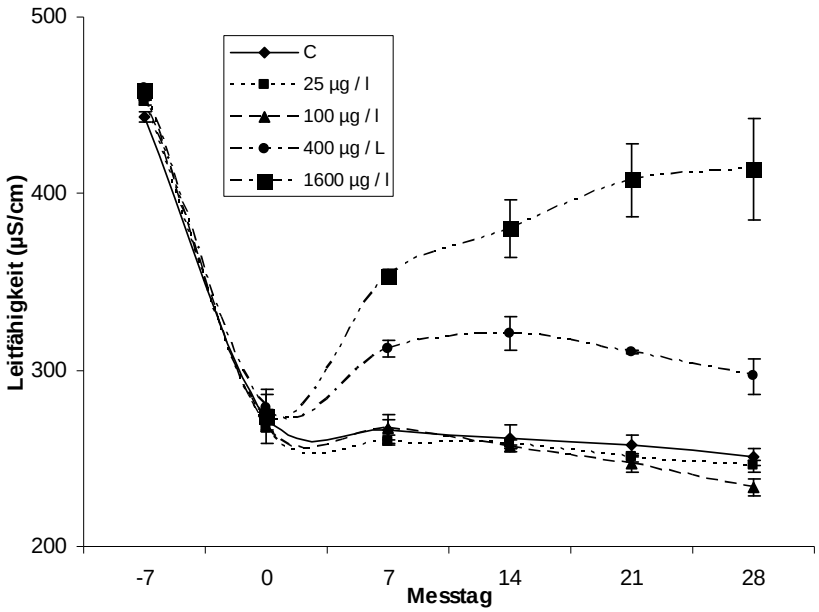

Abb. 20: Entwicklung der Leitfähigkeit im fünfwöchigen Verlauf im Testmedium von Ceratophyllum *demersum*. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von je drei Replikaten in den einzelnen Konzentrationsstufen und der Kontrolle.

3.2.1.2 Wachstumsparameter

a) Frischgewicht

Wie Abb. 21a zeigt, lag die Wachstumsrate des Frischgewichts von *C. demersum* bei der Kontrolle nach einer Woche bei etwa 0,016 und bei der niedrigsten Konzentrationsstufe bei ca. 0,02. Statistisch nachweisbare Unterschiede zur Kontrolle ergaben sich bei den Konzentrationsstufen mit 100 und 1600 µg/l Atrazinbelastung mit einem Signifikanzniveau (p) $< 0{,}001$ und bei der zweithöchsten Konzentrationsstufe mit $p < 0{,}01$. Nach der zweiten Woche (siehe Abb. 21b) wiesen die drei höchsten Konzentrationsstufen einen signifikanten Unterschied mit $p < 0{,}001$ auf. Im Unterschied zur Vorwoche lagen die Wachstumsraten aller Gruppen, mit Ausnahme der zweithöchsten Belastungsstufe (400 µg/l) niedriger als in der Vorwoche. Wie anhand der Abbildungen 21c und d erkennbar ist, setzte sich dieser Trend in der dritten und vierten Woche fort, wobei die Abweichungen der einzelnen Konzentrationsstufen von der Kontrolle geringer wurden. Nach der vierten Woche lag nur noch ein signifikanter Unterschied ($p < 0{,}001$) zwischen der Kontrolle und der zweithöchsten Konzentrationsstufe vor.

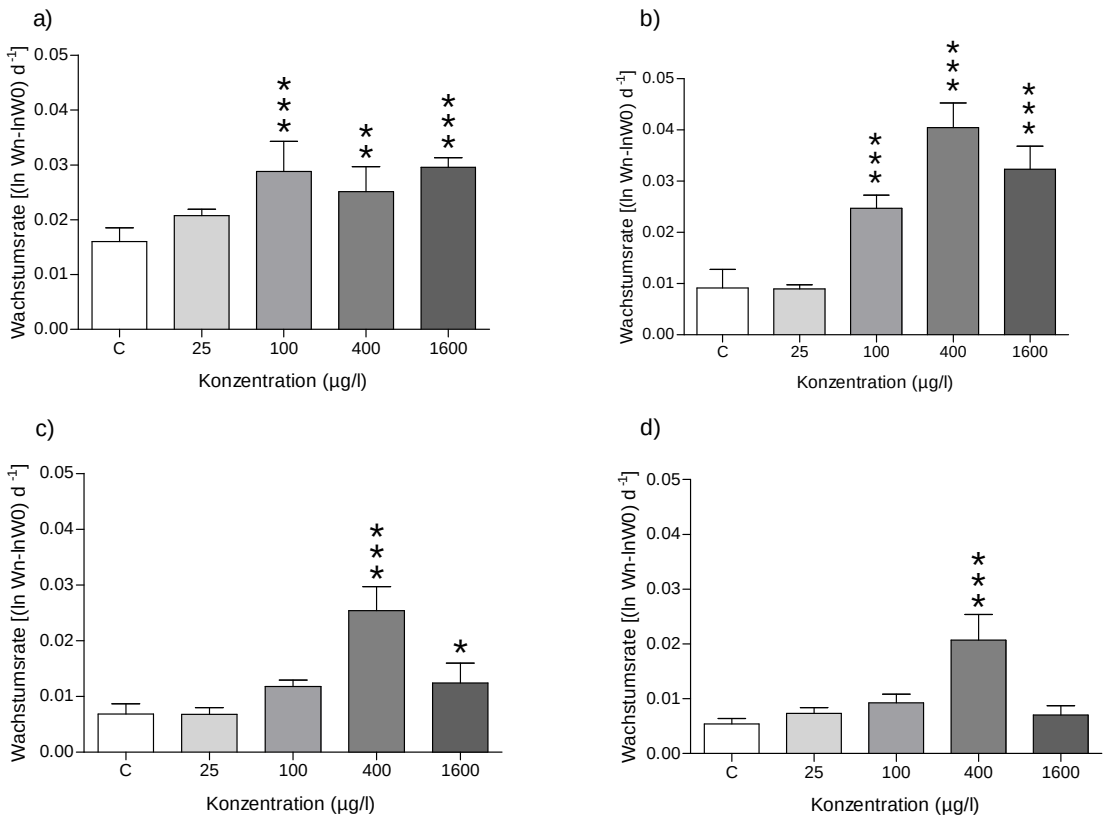

Abb. 21 Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate bezogen auf das Frischgewicht von *Ceratophyllum demersum* als [(ln W_n-lnW_0) /t], wobei Wn = Größe des Wachstumsparameter am Testanfang, W_0 = Größe des Wachstumsparameters am Testende und t[d] = 28 von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle a) eine Woche b) zwei Wochen c) drei Wochen d) vier Wochen nach Applikation; zusätzlich angegeben ist die Standardabweichung vom Mittelwert und das Signifikanzniveau: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

In der ersten Woche vor Applikation entwickelten sich alle Gruppen, ausgehend von Werten zwischen 82 und 85% relativem Frischgewicht (*C. demersum*), recht einheitlich (siehe Abb. 22). In der ersten Woche nach Applikation trennten sich die Verläufe der einzelnen Gruppen leicht auf, nach zwei Wochen waren deutliche Unterschiede erkennbar. Die Pflanzen der Kontrolle und der niedrigsten Belastungsstufe erreichten zu diesem Zeitpunkt ein relatives Frischgewicht von 113%. Die mit 100 µg/l belastete Konzentrationsstufe erreichte einen Wert von 142%, die zweithöchste Konzentrationsstufe einen Wert von 177% und die höchste Konzentrationsstufe einen Wert von 158%. In der nächsten Woche fielen die Werte für die relativen Frischgewichte der drei höchsten Konzentrationsstufen deutlich ab und erreichten mit Ausnahme der zweithöchsten Konzentrationsstufe relative Frischgewichte von ca. 130%. Am Versuchsende lag die mit 400 µg/l belastete Konzentrationsstufe bei einem Wert von 178% und alle anderen Gruppen bei Werten zwischen 115 und 130%.

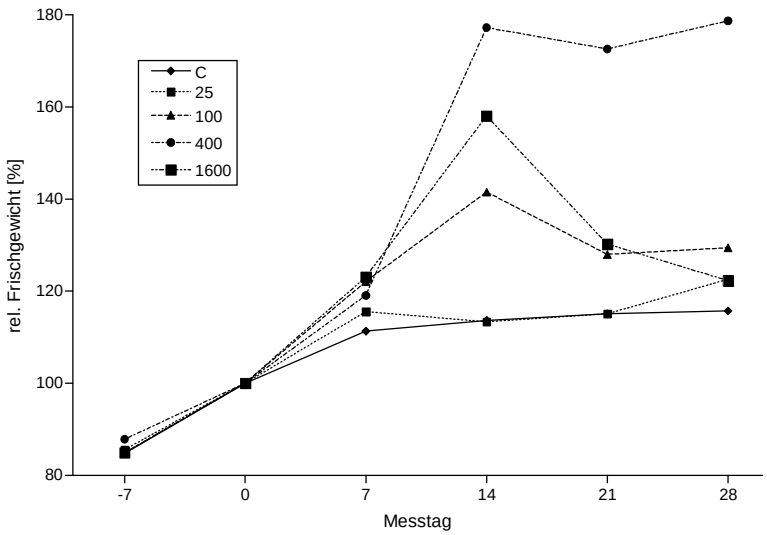

Abb. 22: Durchschnittliche Entwicklung des relativen Frischgewichts von *Ceratophyllum demersum* (Tag 0 = 100%) von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle im Verlauf von fünf Wochen.

b) Sprosslänge

Für die Wachstumsrate der Sprosslänge von *C. demersum* ergab sich eine Woche nach Applikation ein deutlich konzentrationsabhängiger Effekt, mit steigenden Atrazinkonzentrationen nahm auch die Wachstumsrate zu. Hierbei lagen bei den beiden höchsten Konzentrationen signifikante Unterschiede ($p<0,001$) zur Kontrolle vor (siehe Abb. 23a). Im Verlauf der nächsten drei Wochen zeigt sich bei allen Gruppen eine Abnahme der Wachstumsrate, wobei diese bei der höchsten Belastungsstufe (1600 µg/l) am deutlichsten ausfiel (siehe Abb. 23b-d). Insgesamt lagen bei den drei höchsten Konzentrationsstufen signifikante Unterschiede zur Kontrolle vor, mit einem $p<0,01$ bei 100 µg/l und einem $p<0,001$ bei den Konzentrationsstufen mit 400 und 1600 µg/l Belastung.

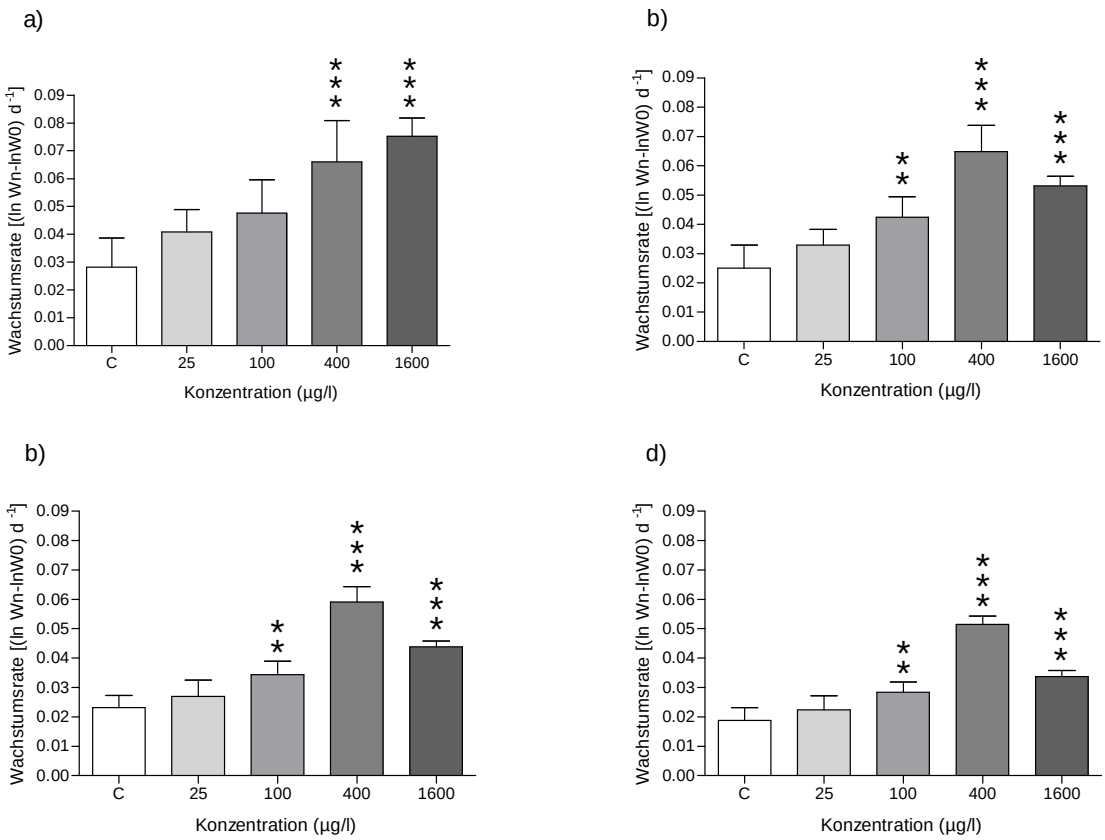

Abb. 23: Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate bezogen auf die Sprosslänge von *Ceratophyllum demersum* als [(ln W_n-lnW_0) /t], wobei Wn = Größe des Wachstumsparameter am Testanfang, W_0 = Größe des Wachstumsparameters am Testende und t[d] = 28 von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle a) eine Woche b) zwei Wochen c) drei Wochen d) vier Wochen nach Applikation; zusätzlich angegeben ist die Standardabweichung und das Signifikanzniveau:
** < 0,01, *** < 0,001.

In der ersten Woche nach Versuchsbeginn entwickelte sich die relative Sprosslänge von *C. demersum* bei allen Gruppen, ausgehend von Werten bei etwa 50%, nahezu identisch (siehe Abb. 24). Eine Woche nach der Applikation fächerten sich die Verläufe konzentrationsabhängig auf. Die Kontrolle erreichte einen Wert von 121%, die höchste Konzentrationsstufe einen Wert von 169%. In den folgenden drei Wochen stieg die relative Sprosslänge bei allen Gruppen weiter an, eine sehr deutliche Zunahme ist bei der mit 400 µg/l belasteten Gruppe zu erkennen. Bis zum Versuchsende blieb die konzentrationsabhängige Staffelung der Verläufe, mit Ausnahme der zweithöchsten Konzentration, bestehen.

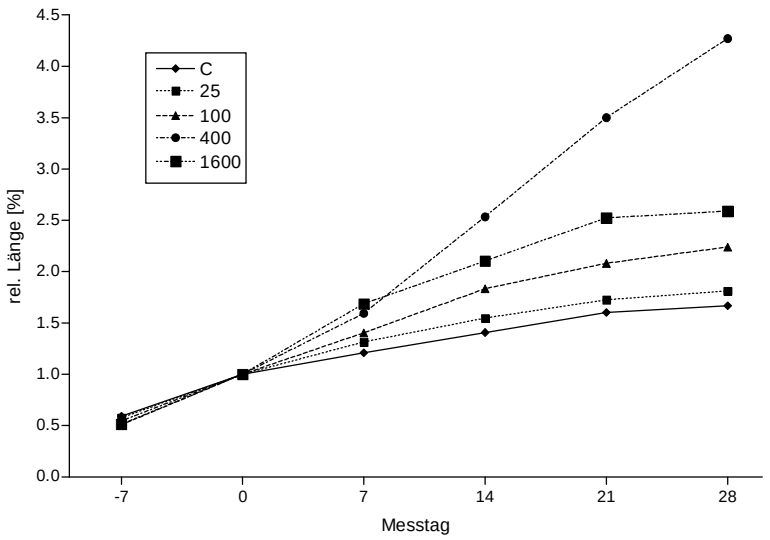

Abb. 24: Mittlere Entwicklung der relativen Sprosslänge (*Ceratophyllum demersum*, Tag 0 = 100%) dreier Replikate in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle im fünfwöchigen Verlauf.

c) Frischgewicht/Länge

Wie anhand Abb. 25 deutlich wird, sinkt der Wert für das Gewicht pro Längeneinheit bei allen Gruppen im Versuchsverlauf deutlich ab; zu Beginn des Versuches am Tag -7 lagen die Werte zwischen 0,29 und 0,33 g/cm, am Ende des Versuches zwischen 0,08 und 0,15 g/cm. Die Werte für das Gewicht pro Längeneinheit sanken in der ersten Woche vor Applikation am deutlichsten und zeigten im weiteren Versuchverlauf eine flachere, leicht konzentrations-abhängige Abnahme. Am Versuchsende lagen die Werte der Kontrolle und der niedrigsten Konzentrationsstufe bei ca. 0,15 g/cm, der Wert der mit 100 µg/l belasteten Gruppe bei 0,11 g/cm und die Werte der zwei höchsten Konzentrationsstufen zwischen 0,8 und 0,9 g/cm.

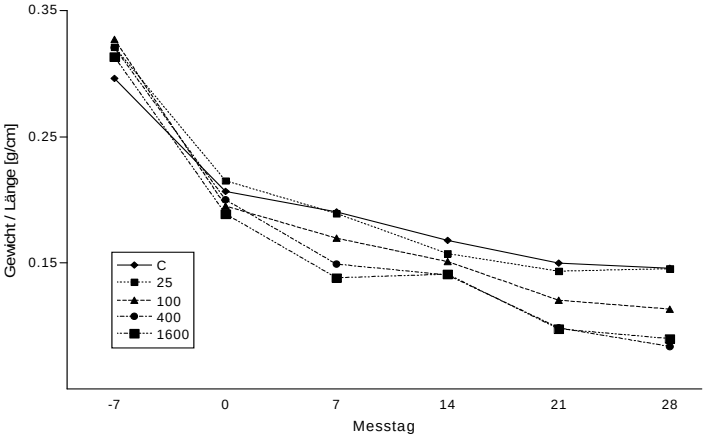

Abb. 25: Durchschnittliche Entwicklung des relativen Verhältnis von Gewicht/Länge (*Ceratophyllum demersum*; Tag 0 = 100%) von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle im fünfwöchigen Verlauf.

3.2.2 *Elodea canadensis*

3.2.2.1 Physikalische Parameter

a) pH und Sauerstoffgehalt

Innerhalb der ersten Woche (-7 bis 0) war der pH-Wert-Verlauf bei allen Gruppen relativ einheitlich (siehe Abb. 26a). Ausgehend von pH-Werten im Bereich von 8,4 fand ein Anstieg auf Werte um 9,5 statt. Im Verlauf der ersten Woche nach Applikation trennten sich die durchschnittlichen pH-Wert-Verläufe der einzelnen Gruppen dann deutlich auf. Die Kontrolle stieg bis zwei Wochen nach der Applikation an und sank gegen Versuchsende auf einen Wert von 9,69. Bei den belasteten Gruppen lag ein weitgehend paralleler, konzentrationsabhängig verschobener Verlauf vor. In der ersten Woche nach Applikation fielen die pH-Werte, in den nächsten zwei Wochen stiegen sie und fielen dann nach vier Wochen wieder mehr oder weniger deutlich ab. Nach vier Wochen ergaben sich folgende pH-Werte für die einzelnen Konzentrationsstufen: 9,15 (25 µg/l), 8,82 (100 µg/l), 7,80 (400 µg/l), 6,02 (1600 µg/l).

Zu Beginn des Versuches, eine Woche vor der Applikation, lagen die Sauerstoffgehalte aller Gruppen zwischen 12 und 15 mg/l und sanken dann in der nächsten Woche auf Werte zwischen 10 und 12 mg/l (Abb. 26b). Eine Woche nach Applikation zeigte sich, wie bereits beim pH-Wert, ein konzentrationsabhängiger Verlauf. Hierbei ergab sich für die Kontrolle und die mit 25 µg/l belastete Gruppe ein sehr ähnlicher und relativ wechselhafter Verlauf. Vier Wochen nach der Applikation lag der mittlere Sauerstoffgehalt der Kontrolle bei 12,8 mg/l und bei der mit 25 µg/l belasteten Gruppe bei 10,9 mg/l. Die mit 100 µg/l belastete Gruppe fiel eine Woche nach Applikation auf einen mittleren Sauerstoffgehalt von 4,93 mg/l und erreichte, nach deutlichem Anstieg in der zweiten und dritten Woche, am Versuchsende einen Wert von 10,8 mg/l. Bei den zwei höchsten Konzentrationsstufen, sank der mittlere Sauerstoffgehalt eine Woche nach Applikation deutlich und blieb bis zur dritten Woche (400 µg/l) bzw. bis zur vierten Woche (1600 µg/l) auf niedrigem Niveau (< 1 mg/l). Am Versuchsende lag der mittlere Sauerstoffgehalt bei der zweithöchsten Konzentrationsstufe bei 4,33 mg/l und bei der höchsten Konzentrationsstufe bei 0,67 mg/l.

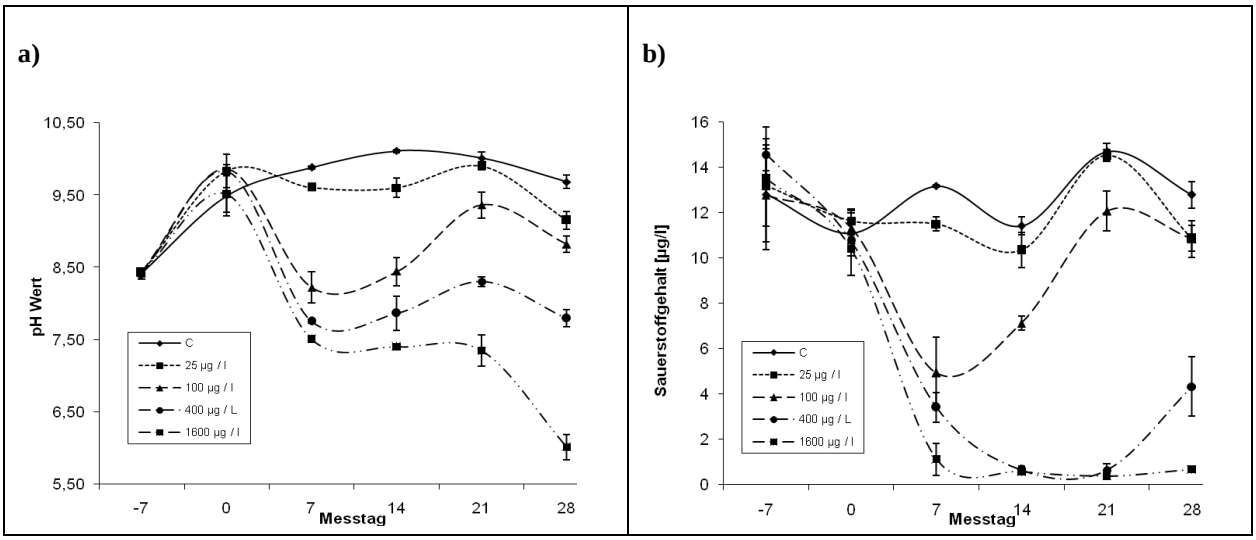

Abb. 26: Entwicklung von **a)** ph-Wert und **b)** Sauerstoffgehalt im fünfwöchigen Verlauf im Testmedium von *Elodea canadensis*. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von je drei Replikaten in den einzelnen Konzentrationsstufen und der Kontrolle

c) Leitfähigkeit

Wie Abb. 27 zeigt, lag die Leitfähigkeit zu Beginn des Versuches bei allen Gruppen im Bereich zwischen 370 und 420 µS/cm und sank dann in der folgenden Woche einheitlich auf Werte um 250 µS/cm. Nach der Applikation fächerten sich die einzelnen Verläufe konzentrationsabhängig auf, wobei die Kontrolle und die mit 25 µg/l belastete Gruppe bis zum Versuchsende einheitlich um ein Niveau von ca. 250 µS/cm schwankten. Bei allen anderen Gruppen war ein starker Anstieg der Leitfähigkeit in der ersten Woche und ein verminderter Anstieg in der zweiten Woche nach Applikation zu beobachten. In der dritten Woche fiel die Leitfähigkeit bei den Konzentrationsstufen mit 100 µg/l und 400 µg/l deutlich ab und stieg gegen Versuchsende auf Werte von 247µS/cm (100 µg/l) und 386 µS/cm (400 µg/l). Bei der höchsten Konzentrationsstufe setzte sich der Anstieg der Leitfähigkeit über den gesamten Versuchszeitraum fort, zu Versuchsende lag die mittlere Leitfähigkeit dort mit 469 µS/cm deutlich über dem Ausgangswert von 387 µS/cm.

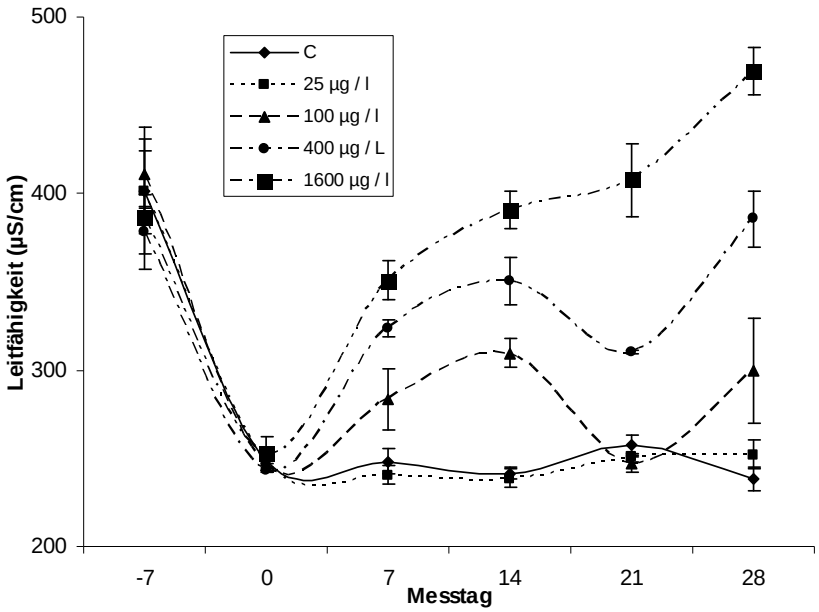

Abb. 27: Entwicklung der Leitfähigkeit im fünfwöchigen Verlauf im Testmedium von *Elodea canadensis* (Tag 0 = Tag der Applikation). Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von je drei Replikaten in den einzelnen Konzentrationsstufen und der Kontrolle.

3.2.2.2 Wachstumsparameter

a) Frischgewicht

Wie anhand der Abbildungen 28a-d deutlich wird, ergaben sich für die spez. Wachstumsraten von *E. canadensis* eine Woche nach Applikation keine signifikanten Unterschiede und keine konzentrationsabhängigen Effekte. Die spez. Wachstumsrate lag bei der Kontrolle nach einer Woche bei 0,019, bei der mittleren Konzentrationsstufe mit 100 µg/l Belastung bei 0,029 und bei der höchsten Konzentrationsstufe (1600 µg/l) bei 0,018. Mit zunehmender Versuchsdauer sank die spez. Wachstumsrate. Am Versuchsende lag die vierwöchige Wachstumsrate unter 0,01.

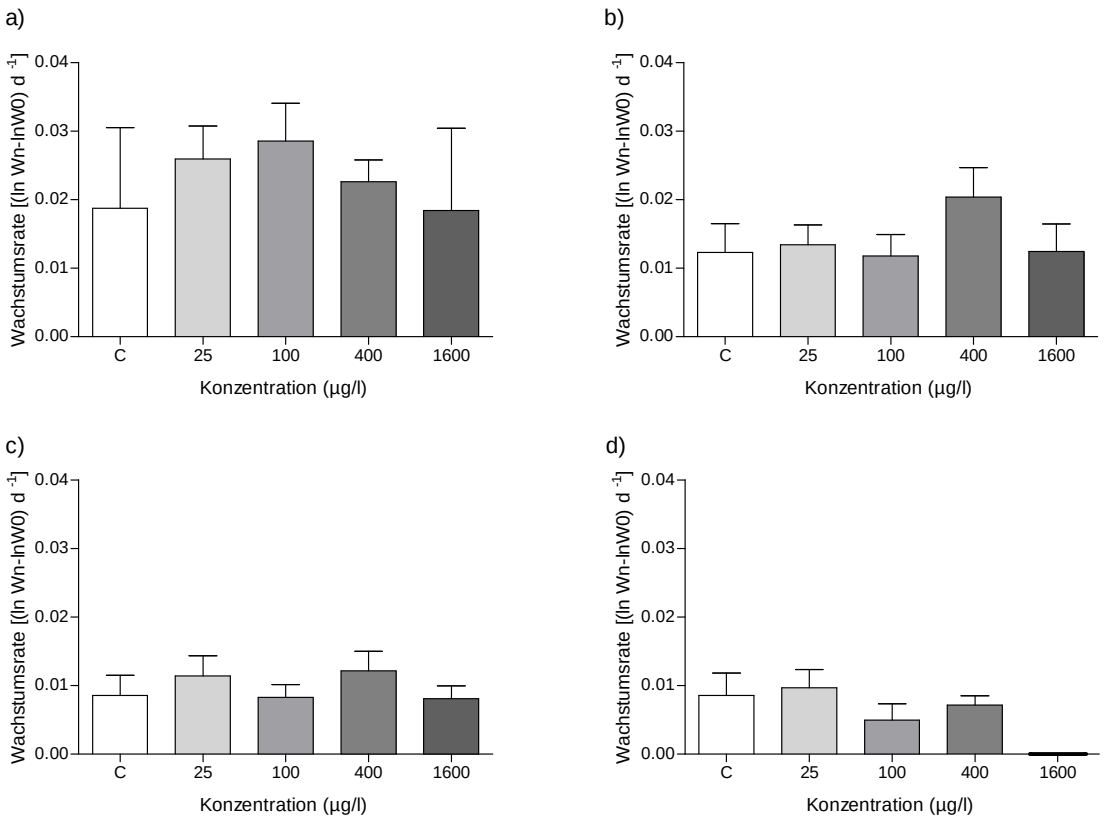

Abb. 28: Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate bezogen auf das Frischgewicht von *Elodea canadensis* als [(ln W_n-lnW_0) /t], wobei Wn = Größe des Wachstumsparameter am Testanfang, W_0 = Größe des Wachstumsparameters am Testende und t[d] = 28 von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle a) eine Woche b) zwei Wochen c) drei Wochen d) vier Wochen nach Applikation; zusätzlich angegeben ist die Standardabweichung.

Ausgehend von Werten um die 60%, ist in der ersten Woche vor Applikation eine nahezu einheitliche und starke Zunahme des relativen Frischgewichts von *E. canadensis* erkennbar (siehe Abb. 29). In der ersten Woche nach Applikation stieg das Frischgewicht aller Gruppen auf Werte zwischen 110 bis 120%. Ausgehend von der zweiten Woche nach Applikation bis zum Versuchsende waren zwei grundsätzliche Trends erkennbar; bei den drei am höchsten belasteten Konzentrationsstufen sank das relative Frischgewicht, bei der Kontrolle und der niedrigsten Konzentrationsstufe (25 µg/l) stieg es. Bei der höchsten Konzentrationsstufe mit 1600 µg/l wurde der Wert für die Zunahme auf Null gesetzt, weil aufgrund des Zerfalls des Pflanzenmaterials keine Auswertung möglich war.

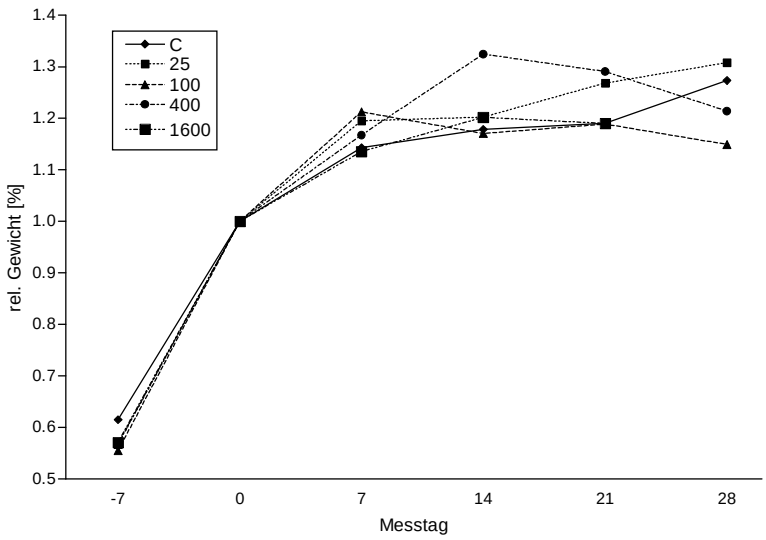

Abb. 29: Entwicklung des relativen Frischgewichts von *Elodea canadensis* (Tag 0 = 100%) in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle im Verlauf von vier Wochen (Auswertung bei der höchsten Konzentrationsstufe nach vier Wochen nicht möglich). Dargestellte Punkte sind Mittelwerte aus je drei Replikaten.

b) Sprosslänge

Für die spez. Wachstumsrate der Sprosslänge von *Elodea canadensis* ergaben sich keine konzentrationsabhängigen Effekte und keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den einzelnen Konzentrationsstufen (siehe Abb. 30a-d). Im zeitlichen Versuchsverlauf ist bei allen Gruppen eine Abnahme der spezifischen Wachstumsrate erkennbar; in der ersten Woche nach Applikation lag die spezifische Wachstumsrate aller Gruppen über 0,01 (siehe Abb. 30a), nach vier Wochen lagen alle Werte unter 0,01 (siehe Abb. 30d).

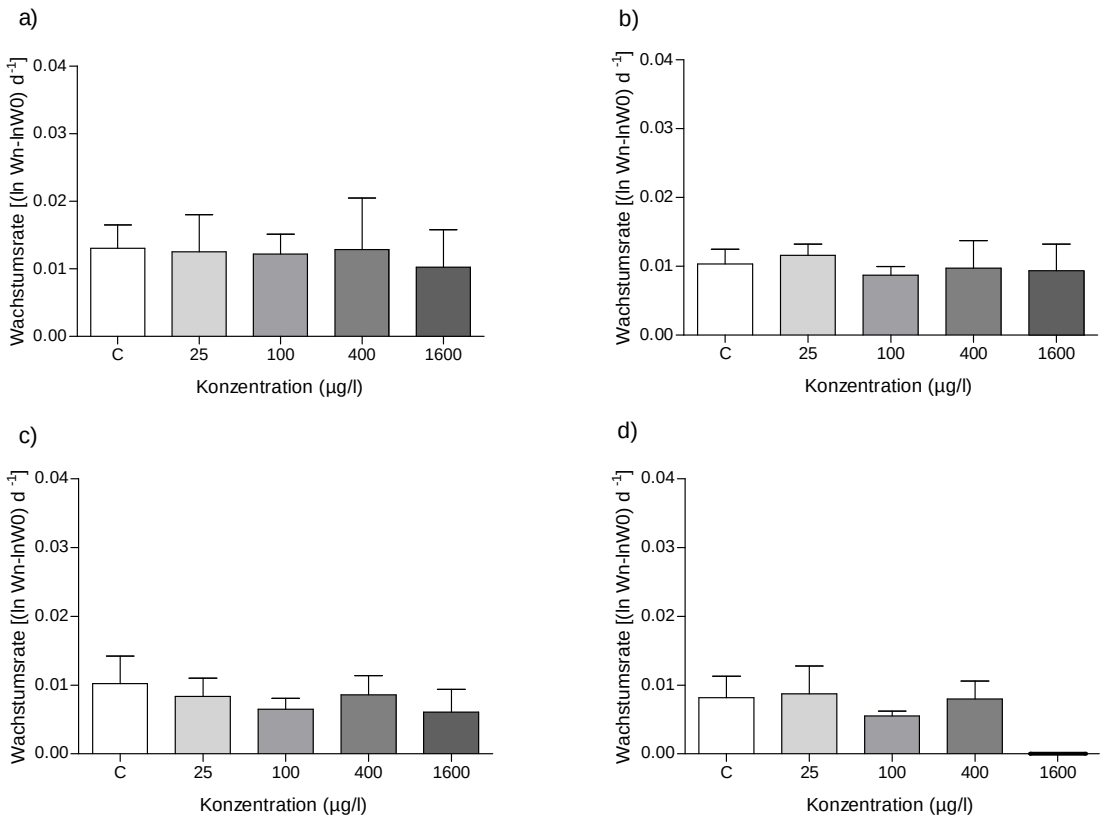

Abb. 30: Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate bezogen auf die Sprosslänge von *Elodea canadensis* als [(ln W_n-lnW_0) /t], wobei Wn = Größe des Wachstumsparameter am Testanfang, W_0 = Größe des Wachstumsparameters am Testende und t[d] = 28 von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle nach a) einer Woche b) zwei Wochen c) drei Wochen d) vier Wochen nach Applikation; zusätzlich angegeben ist die Standardabweichung.

Bei der Entwicklung der relativen Sprosslänge von *Elodea canadensis* waren keine konzentrationsabhängigen Tendenzen der Verläufe erkennbar. Ausgehend von Werten aller Gruppen zwischen 60 bis 70% zu Versuchsbeginn, stiegen die Werte der Sprosslänge in der ersten Woche am deutlichsten, lagen bis zwei Wochen nach der Applikation weitgehend auf gleicher Höhe und differierten dann im weiteren Versuchsverlauf leicht. Am Versuchsende erreichte die mit 100 µg/l belastete Gruppe mit 108% den niedrigsten Wert und die mit 400 µg/l belastete Gruppe mit 114% den höchsten Wert. Bei der höchsten Konzentrationsstufe mit 1600 µg/l wurde der Wert für die Zunahme auf Null gesetzt, weil aufgrund des Zerfalls des Pflanzenmaterials keine Auswertung möglich war.

c) Frischgewicht/Länge

Das Frischgewicht pro Längeneinheit lag bei *Elodea canadensis* zu Beginn des Versuches bei allen Gruppen zwischen 0,025 bis 0,035 g/cm und am Versuchsende leicht erhöht zwischen 0,03 und 0,035 g/cm. Insgesamt waren keine konzentrations-abhängige Tendenzen erkennbar, die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren gering.

3.2.3 Algen

Wie anhand Abb. 31 deutlich wird, sank die mittlere Chlorophyllkonzentration in der ersten Woche bei allen Gruppen ab. In den nächsten zwei Wochen blieben die einzelnen Gruppen mehr oder weniger auf einem Niveau. In der dritten Woche nach Applikation kam es dann zu einer Auffächerung der Verläufe infolge deutlicher Zunahmen der Kontrolle und der zwei niedrigsten Konzentrationsstufen. Am Versuchsende sank die Chlorophyllkonzentration bei diesen drei Gruppen wieder ab und die mit 400 µg/l belastete Gruppe zeigte einen starken Anstieg auf einen Wert von 32,4 mg/l. Die Konzentrationsstufe mit 1600 µg/l Atrazinbelastung blieb im gesamten Zeitraum nach der Applikation mit Werten unter 2 µg/l auf sehr niedrigem Niveau. Insgesamt war im Zeitraum des Versuches kein deutlicher Zusammenhang zwischen der Algenbildung (Chlorophyllkonzentration) und der jeweiligen Belastungsstufe erkennbar.

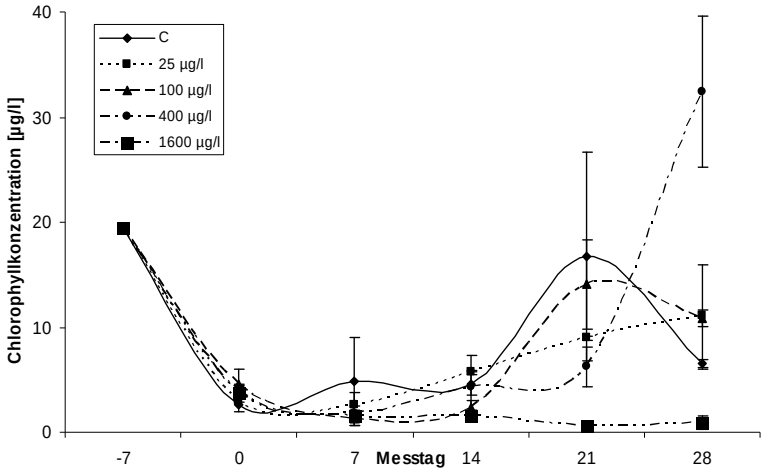

Abb. 31: Entwicklung der Chlorophyllkonzentration in den Testgefäßen von *Ceratophyllum demersum* im Verlauf von fünf Wochen. Angegeben sind die Mittelwerte in den einzelnen Konzentrationsstufen und der Kontrolle (mit Ausnahme des Wertes beim Tag -7, Einzelwert).

3.2.4 Beobachtungen

Elodea canadensis

Wie in der ersten Versuchsphase, waren bei den Testorganismen hin und wieder leichte Aufhellungen, schwärzliche Verfärbungen und absterbende Sprossteile zu beobachten, die in allen Gruppen auftraten. Im Gegensatz zur ersten Versuchsphase, kam es jedoch bei der höchsten Konzentrationsstufe mit 1600 µg/l Atrazinbelastung nach vier Wochen zu deutlichen Verfärbungen und Zerfallsprozessen (siehe Abb. 32), sodass die Sprosslänge und das Frischgewicht der einzelnen Testorganismen nicht mehr bestimmt werden konnten.

Abb. 32: Darstellung von je fünf Individuen von *Ceratophyllum demersum der höchsten Kon*zentrationsstufen eine Woche nach Versuchsbeginn (links) und am Versuchsende (rechts).

Ceratophyllum demersum

Die Effekte, die bei *Ceratophyllum demersum* bei höheren Konzentrationen beobachtet werden konnten, entsprachen weitgehend denen der ersten Versuchsphase, mit dem Unterschied, dass das Wachstum bei allen Testorganismen in der zweiten Versuchsphase deutlich erhöht war. Bei höheren Konzentrationen kam es zu deutlichen Internodienstreckungen (siehe Abb. 33), einer zunehmende Spross- und Blattbrüchigkeit, einer leichten Aufhellung der Blätter und einer zunehmenden Anzahl an Neusprossen. In der dritten Woche nach Applikation konnte ein schleimiger Bakterienfilm auf den eingesetzten Testorganismen der drei höchsten Konzentrationsstufen beobachtet werden, der in der darauffolgenden Woche weitgehend verschwunden war.

Abb. 33: Darstellung von je fünf Individuen von *Ceratophyllum demersum*. Pflanzen der Kontrolle eine Woche nach Versuchsbeginn, am Tag der Applikation (links oben) und am Versuchsende (rechts oben). Pflanzen der höchsten Konzentrationsstufe eine Woche nach Versuchsbeginn, am Tag der Applikation (links unten) und am Versuchsende (rechts unten).

3.3 *Lemna*-Standard-Test

Die Auswertung der Ergebnisse für den Standardversuch mit *Lemna minor* wurden anhand der OECD-Richtlinie 221 durchgeführt.

3.3.1 Physikalische Wasserparameter

Für den Standardversuch mit *Lemna minor* wurde nur der pH-Wert bestimmt. Dieser Parameter wurde vor dem Einsetzen der Fronds und am Versuchsende gemessen. Die Ergebnisse des Versuches sind in Tab. 3 dargestellt. Der pH-Wert lag zu Beginn des Versuches in allen Testgefäßen zwischen 5,7 und 5,9. und stieg im Verlauf von einer Woche um 1 bis $2^1/_2$ Einheiten an.

Tab. 3: Frondzahl und pH-Werte zu Beginn und am Ende des Versuches in den einzelnen Gefäßen.

Gefäß		pH		Fronds	
		Tag 0	Tag 7	Tag 0	Tag 7
1	K	5,99	7,01	10	137
2	K	5,98	7,04	10	180
3	K	5,94	7.14	10	163
4	25	5,93	7.64	10	180
5	25	5,81	7.49	10	192
6	25	5,75	7.54	10	168
7	100	5,78	7.89	10	120
8	100	5,73	8,02	10	78
9	100	5,73	7.99	10	118
10	400	5,76	8,04	10	46
11	400	5,77	8,17	10	48
12	400	5,76	8,3	10	38
13	1600	5,9	7.62	10	10
14	1600	5,9	7.84	10	10
15	1600	5,91	7.86	10	10

3.3.2 Wachstumsparameter

Die durchschnittliche Wachstumsrate, gemessen als Zunahme an Fronds, lag bei der Kontrolle bei einem Wert von etwa 0,4 (siehe Abb. 34a). Bei der niedrigsten Konzentrationsstufe lag die Wachstumsrate leicht über dem Kontrollniveau. Ausgehend von dieser Konzentrationsstufe bestand eine konzentrationsabhängige Wachstumsrate; mit steigender Konzentration sank die durchschnittliche Wachstums-rate der jeweiligen Konzentrationsstufen. Hierbei ergaben sich bei der Konzentrations-stufe mit 100 µg/l Atrazin signifikante, bei den beiden nächsthöheren Konzentrationen hoch signifikante Unterschiede zur Kontrolle. Die Hemmung der Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle fiel bei der ersten Konzentrationsstufe mit einer Belastung von 25 µg/l leicht negativ aus, d.h., dass bei dieser Konzentrationsstufe ein höheres Wachstum im Vergleich zur Kontrolle vorlag. Bei der nächsthöheren Konzentrations-stufe mit einem Wert von 15,7% im positiven Bereich (siehe Abb. 34b). Bei der Konzentrationsstufe mit einer Atrazinbelastung von 400 µg/l erreichte die Hemmung einen Wert von 46,7% und bei der höchsten Konzentration eine Hemmung von 100%, d.h. dass es bei einer Atrazinbelastung von 1600 µg/l kein Wachstum bzw. keine Zunahme an Fronds gab. Damit liegt die NOEC beim *Lemna*-Standard-Test bei 25 µg/l und die LOEC bei einem Wert von 100 µg/l. Der unter Verwendung der Wachstumsrate bzw. der Hemmung ermittelte EC_{50} lag bei 393 µg/l (siehe Abb. 35). Das zugehörige 95%ige Konfidenzintervall hatte eine obere Grenze bei 315 µg/l und eine untere Grenze bei 490 µg/l.

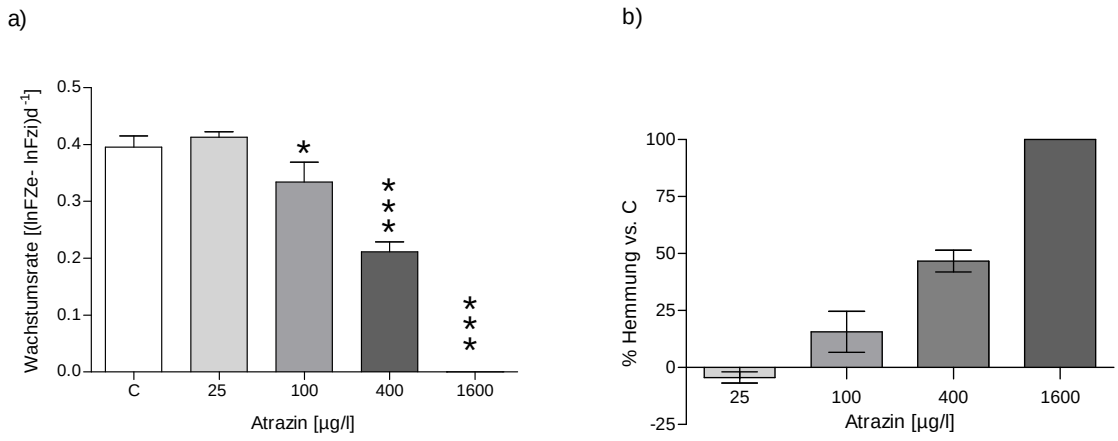

Abb. 34: a) Wachstumsrate (Frondzahl) von *Lemna minor* bei je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen und der Kontrolle nach vier Wochen; zusätzlich angegeben ist die Standardabweichung und das Signifikanzniveau: * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$ b) Hemmung von je drei Replikaten in den einzelnen Atrazinkonzentrationen gegenüber der Kontrolle nach einer Woche.

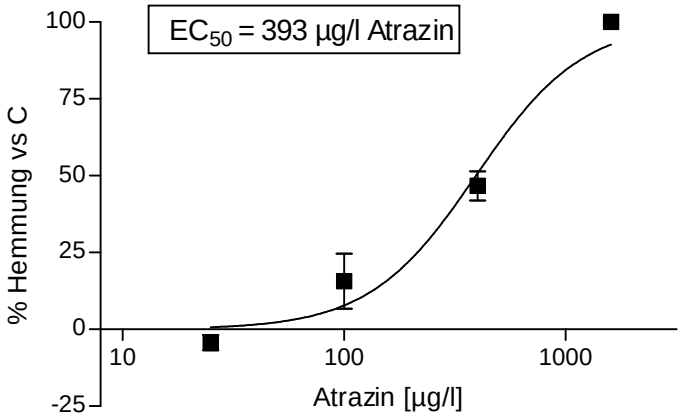

Abb. 35: Dosis-Wirkungs-Beziehung des *Lemna minor* Standard-Tests mit logarithmierter x-Achse unter Angabe des EC_{50}-Wertes: Hemmung der Replikate in den einzelnen Atrazinkonzentrationen gegenüber der Kontrolle nach einer Woche; zusätzlich angegeben ist die Standardabweichung.

3.3.3 Beobachtungen

Während des Versuches konnte in allen Testgefäßen ein Algenwachstum beobachtet werden. Bei den zwei höchsten Konzentrationsstufen mit 400 und 1600 µg/l kam es zu einer deutlichen Ausbleichung der meisten eingesetzten Fronds.

4. Diskussion

4.1 Einführung in die Diskussion

Im Rahmen der Diskussion wird zunächst auf die Testergebnisse, die mit den submersen Makropyhten erzielt wurden, eingegangen (4.2) Hierbei werden die Ergebnisse beider Versuchsphasen zusammenfassend diskutiert. Anschließend erfolgt die Diskussion des Standard-*Lemna*-Tests (4.3) und der Vergleich mit den Ergebnissen der submersen Makrophytentests. In Abschnitt 4.4 wird auf die Algenentwicklung eingegangen. Abschließend werden die verwendeten Methoden kritisch diskutiert (4.5) und die Ergebnisse zusammengefasst (4.6).

4.2 Submerse Makrophyten

4.2.1 Physikalische Parameter

pH-Wert

Da der gemessene pH-Wert in den Testgefäßen mit *Ceratophyllum demersum* und *Elodea canadensis* in beiden Versuchsphasen (siehe Kapitel 3.1 & 3.2) bei der Kontrolle und den zwei niedrigsten Konzentrationsstufen über den Versuchszeitraum anstieg und bei den beiden höchsten eingesetzten Versuchskonzentrationen stagnierte, deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass die photosynthetische Aktivität der Makrophyten mit zunehmender Belastung gehemmt wurde.

Photosynthetisch aktivere Makrophyten verbrauchen mehr CO_2, sodass die hiermit verbundene Verlagerung des Carbonat-Puffer-Systems zu einem Anstieg des pH-Werts in den jeweiligen Medien führt. Weiterhin kann davon ausgegangen werden, dass die mit steigenden Konzentrationen zunehmende Menge an EtOH als Lösungsvermittler zu den Unterschieden zwischen den einzelnen Belastungen beigetragen hat. So kann das energiereiche EtOH durch heterotrophe Bakterienkolonien der Gattung *Acetobacter* oxidativ zu Essigsäure umgewandelt werden (NULTSCH 2000). Dies erklärt auch den Einbruch der pH-Werte in den höheren Atrazinkonzentrationen innerhalb der ersten Woche, als Folge der Aktivität der eben erwähnten Mikroorganismen. Umgekehrt konnte in der Vorlaufzeit der zweiten Versuchsphase bei beiden eingesetzten Makrophyten, ein deutlicher Anstieg der pH-Werte beobachtet werden. Dies stützt die

Annahme, dass die Makrophyten über den Entzug von gelöstem CO_2 aus dem Medium maßgeblich zum Anstieg des pH-Wertes beitragen.

Die auftretenden Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen beruhen daher auf dem Zusammenspiel der photosynthesehemmenden Wirkung von Atrazin und der pH-senkenden Wirkung des bakteriellen EtOH-Abbaus. Wie hoch der Beitrag der Atrazinbelastung zu den unterschiedlichen pH-Wert-Verläufen ist, lässt sich auf Grundlage vorliegender Ergebnisse nicht abschätzen. Vergleichbare Ergebnisse von BOTZAT (2007) weisen jedoch daraufhin, dass die indirekte pH-senkende Wirkung von Atrazin in dem verwendeten Konzentrationsbereich detektierbar ist. So lag der pH-Wert der Lösungsmittelkontrolle (EtOH) bei *C. demersum* bzw. *E. canadensis* als eingesetzten Versuchsorganismen nach 21 Tagen bei 8,6 (8,5) und bei der mit 500 µg/l belasteten Versuchskonzentration bei 7,8 (7,8).

Da der pH-Wert in den Testgefäßen von *Riccia fluitans* über den Versuchszeitraum bei allen Gruppen anstieg, wenngleich der Anstieg bei der höchsten Konzentration nur noch minimal war, ist anzunehmen, dass *Riccia fluitans* weniger sensitiv auf Atrazin reagiert, als die beiden eingesetzten submersen Makrophyten. Dass die eingesetzten Testmedien einen Einfluss auf *Riccia fluitans* hatten, lässt sich aber an den weitgehend konzentrationsabhängigen Verläufen der pH-Werte erkennen (siehe Abb. 14a).

Sauerstoffgehalt

Der Sauerstoffgehalt zeigte grundsätzlich eine enge Kopplung mit dem pH-Wert, wenngleich die Effekte zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen bei allen drei submersen Makropyhten deutlicher ausfielen. Wie schon beim pH-Wert beschrieben, spielen hier die Photosyntheserate der eingesetzten Makrophyten und die mikrobielle Sauerstoffzehrung beim oxidativen Abbau von EtOH die entscheidende Rolle (vgl. FEURTET-MAZEL et al. 1996). Die im Gegensatz zum pH-Wert deutlicheren Effekte sind darauf zurückzuführen, dass gelöster Sauerstoff relativ schnell abgebaut bzw. gebildet werden kann, während die Bildung von z.B. Essigsäure oder die Entfernung von CO_2 aus dem Medium nur einen begrenzten Effekt auf den pH-Wert hat.

Leitfähigkeit

Die Höhe der Leitfähigkeit wird vor allem durch zwei gegenläufige Effekte beeinflusst. So wird die Leitfähigkeit einerseits bei der Zerstörung von Zellen durch Ionenfreigabe erhöht und andererseits durch den Nährstoffverbrauch der Pflanzen im Wasser verringert (DETENBECK et al. 1996).

Da die Leitfähigkeit in der ersten Versuchsphase relativ gering war, konnten hier nur geringe Effekte zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. So sank die Leitfähigkeit in den Testgefäßen von *C. demersum* (siehe Kapitel 3.1.1.1) in allen Versuchsgruppen, und bei *E. canadensis* (siehe Kapitel 3.1.2.1) war eine leichte Erhöhung bei der höchsten eingesetzten Konzentration erkennbar. Bei *R. fluitans* (siehe Kapitel 3.1.3.1) konnte bei allen Gruppen eine deutliche Zunahme der Leitfähigkeit innerhalb der ersten Woche beobachtet werden. Da die Leitfähigkeit auch bei der unbelasteten Kontrolle anstieg, ist anzunehmen, dass die Versuchsbedingungen einen gewissen Anpassungsstress bei *R. fluitans* erzeugten; hier könnte die erhöhte Temperatur oder die erhöhte Einstrahlung im Vergleich zum Kultivierungsbecken eine Rolle gespielt haben.

Der beobachtete Abfall der Leitfähigkeit in der ersten Woche der zweiten Versuchsphase in allen Testgefäßen von *C. demersum* (siehe Kapitel 3.2.1.1) ist somit darauf zurückzuführen, dass die Versuchsorganismen in diesem Zeitraum besonders viele Nährstoffe aufgenommen haben. Dass die Leitfähigkeit in den darauffolgenden Wochen bei den Kontrollen und den niedrigeren Konzentrationsstufen weitgehend auf einem Niveau blieben, lässt sich damit begründen, dass die Testorganismen bereits die essentiellen Nährstoffe aus dem Medium entzogen haben. Die beobachtbare Wiedererholung der Leitfähigkeit bei den höheren Konzentrationsstufen, die in den Testgefäßen von *E. canadensis* (siehe Kapitel 3.2.2.1) stärker ausfiel als bei *C. demersum*, hat ihre Ursache nach der These von DETENBECK et al. (1996) darin, dass durch die Zerstörung von Pflanzengewebe Ionen freigesetzt wurden.

4.2.1 Wachstumsparameter

4.2.1.1 *Ceratophyllum demersum*

Die Annahme, dass steigende Atrazinkonzentrationen aufgrund ihrer photosynthese-hemmenden Wirkung zu geringeren Wachstumsraten bei *Ceratophyllum demersum* führen würden, konnte durch die vorliegenden Ergebnisse nicht gestützt werden. Vielmehr reagierten die eingesetzten Individuen in beiden Versuchsphasen zunächst mit einem deutlich gesteigerten Wachstum (Sprosslänge, Frischgewicht) auf die höheren Konzentrationsstufen (siehe Kapitel 3.1.1.2 & 3.2.1.2) im Vergleich zur Kontrolle.
Während dieser Trend in der ersten Versuchsphase sowohl beim Frischgewicht als auch bei der Sprosslänge über den gesamten Versuchszeitraum von vier Wochen anhielt, zeigte sich zumindest in der zweiten Versuchsphase in der dritten Woche nach Applikation ein deutlicher Abfall der Wachstumsrate des Frischgewichts in den Konzentrationsstufen mit 100 und 1600 µg/l Belastung (siehe Abb. 21). Dies ist neben möglichen Gewichtsabnahmen der Testorganismen durch Zerfallsprozesse, die nicht ausgeschlossen werden können, vor allem darauf zurückzuführen, dass sich in den drei höchsten Konzentrationsstufen in der zweiten Woche nach Applikation ein schleimiger Bakterienfilm bildete, der durch das zehnmalige Ausschwenken mit dem Sieb nicht entfernt werden konnte und damit zur Erhöhung des Frischgewichts bei den Testorganismen beitrug. In der darauf folgenden Woche war diese Bakterienschicht auf den Testorganismen weitgehend verschwunden. Dass das relative Frischgewicht bei der Konzentrationsstufe mit 400 µg/l Belastung von der zweiten bis zur dritten Woche nur leicht abfiel, liegt darin begründet, dass dieser Effekt durch das deutliche Wachstum (siehe Abb. 24, rel. Sprosslänge) der Testorganismen in diesem Zeitraum überdeckt wird.
Dass der Quotient aus Gewicht und Länge in der zweiten Versuchsphase bei allen Gruppen und vor allem bei den höher belasteten Konzentrationsstufen deutlich abnahm (siehe Abb. 25), lässt sich wahrscheinlich einerseits darauf zurückführen, dass die Testorganismen bedingt durch ihr rasches Wachstum (Zugriff auf Speicherstoffe/ Einlagerung von Wasser) relativ an Gewicht verloren haben. Andererseits führt die deutliche beobachtbare Internodienstreckung bei den höheren Konzentrationen zu einem relativen Gewichtsverlust pro Sprosslänge, da sich das Gewicht der Blattwirtel auf eine längere „Strecke“ verteilt. Der leichte Anstieg des Quotienten bei den höheren Konzentrationsstufen in der zweiten Woche nach Applikation, kann durch die oben

erwähnte Beeinflussung durch die Bakterienschicht erklärt werden und verursacht nur temporär eine Verzerrung der Ergebnisse.

Dass deutliche Wachstum (Sprosslänge, Frischgewicht) der eingesetzten Individuen von *Ceratophyllum demersum* bei höheren Konzentrationen beschränkt sich, wie bereits angedeutet, vor allem auf eine deutliche Streckung der Internodien (siehe Abb.18 u. 33) und geht einher mit zunehmender Brüchigkeit des Pflanzengewebes (Internodien, Blattwirtel). Grundsätzlich wurde beim morphologischen Vergleich der unbelasteten mit den belasteten Individuen deutlich, dass es sich hierbei um kein „normales" Wachstum handelt, sondern dass die Wirkung der höherkonzentrierten Testmedien einen gewissen Stress bei den Pflanzen hervorrief. Ein solches Stresswachstum lässt sich ggf. durch die in Kapitel 2.1.1 beschrieben Verbreitungsstrategie von *Ceratophyllum demersum* über Sprossbruchstücke erklären. Ein erhöhtes Sprosswachstum, einhergehend mit einer zunehmenden Sprossbrüchigkeit, führt unter natürlichen Bedingungen in Fließgewässern dazu, dass einzelne Individuen in strömungsexponiertere Wasserschichten gelangen und somit über Bruchstücke effektiver verbreitet werden bzw. in geeignetere Umgebungsbedingungen gelangen.

Grundsätzlich sollten vorliegende Ergebnisse jedoch mit Vorsicht betrachtet werden, da beim Versuchsdesign der Fehler gemacht wurde, keine Lösungsmittelkontrolle zu verwenden und die einzelnen Konzentrationsstufen nicht dieselben sondern konzentrationsabhängig ansteigend gestaffelte Ethanolgehalte hatten. In wie weit die Wirkung des Ethanols zu den Ergebnissen beiträgt, lässt sich daher schwer abschätzen. In der Literatur findet man eine vergleichbare Studie von DETENBECK et al. (1996), die nach sechs Tagen einen signifikanten Effekt von 50 µg/l Atrazin auf das Sprosslänge / Trockengewichtsverhältnis von *C. demersum* feststellen konnten, während bei den genannten einzelnen Parametern keine Effekte gefunden wurden. FAIRCHILD et al. (1998) ermittelten sogar einen EC_{50} von 22 µg/l Atrazin für die Hemmung der Zunahme des Frischgewichts von *Ceratophyllum* spec. Diese Angaben deuten auf eine hohe Sensitivität von *C. demersum* hin. Sie lassen sich jedoch mit den vorliegenden Ergebnissen nicht in Deckung bringen, weil keine wachstumshemmenden Effekte von Atrazin auf *C. demersum* ermittelt werden konnten.

4.2.1.2 *Elodea canadensis*

Da die nach vier Wochen ermittelten Wachstumsraten für das Frischgewicht und die Sprosslänge von *Elodea canadensis* sowohl in der ersten als auch in der zweiten Versuchsphase nah beieinander lagen (siehe Kapitel 3.1.2.2 & 3.2.2.2), konnten keine signifikanten Unterschiede und keine konzentrationsabhängigen Effekte ermittelt werden. Damit war auch die Ermittlung von Werten für die NOEC/LOEC und der EC_{50}-Werte nicht möglich.

Der deutliche Abfall des relativen Frischgewichts von *E. canadensis* von der dritten auf die vierte Woche (Versuchsphase I) nach Applikation bei den zwei höchsten Konzentrationsstufen könnte jedoch ein Hinweis auf die Schädigung der eingesetzten Testorganismen sein. Möglicherweise wären die Ergebnisse im Verlauf der nächsten Woche noch deutlicher ausgefallen und hätten statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle aufgezeigt. Da die Auswertung der Daten erst nach Versuchsende durchgeführt wurde und eine vierwöchige Versuchsdauer vorgesehen war, wurde der Versuch zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht verlängert.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann vorerst nur geschlussfolgert werden, dass die eingesetzten Atrazinkonzentrationen zu gering waren, um Effekte auf das Wachstum von *Elodea canadensis* hervorzurufen. Hierzu gibt HUBER (1993) an, dass eine Konzentration von 75 µg/l Atrazin über einen Expositionszeitraum von drei bis vier Wochen in seinen Versuchen zu einer 53% Inhibierung des Wachstums von *Elodea canadensis* führte. Auch vergleichbare Ergebnisse von BOTZAT (2007) mit einer vierwöchigen Versuchsdauer weisen auf eine höhere Sensitivität von *E. canadensis* hin und zeigten konzentrationsabhängig ansteigende Hemmungen bei den Konzentrationsstufen mit 50, 150 und 500 µg/l Atrazinbelastung.

Eine mögliche Erklärung der vorliegenden Ergebnisse ist schwierig in wie weit die mit steigenden Atrazinkonzentrationen zunehmenden Alkoholkonzentrationen eine Rolle spielen, lässt sich schwer abschätzten. Generell sollten bei weiteren Versuchen unter Einsatz von mehreren Individuen pro Testgefäß jedoch größere Testgefäße gewählt werden. Einerseits könnten die eingesetzten Testorganismen aus einem größeren Nährstoffreservoir schöpfen, eine Voraussetzung für ein längerfristiges gleichmäßiges Wachstum, bei Verwendung natürlicher Medien ohne zusätzliche Düngung. Andererseits hätten die eingesetzten Testorganismen auch mehr Raum für ihr Wachstum. Dies könnte erklären, warum die Kontrolle in der zweiten Versuchsphase von *E. candadensis* in der ersten Woche ein deutliches Wachstum aufwies, in der

zweiten nur noch leicht wuchs und anschließend mehr oder weniger auf einem Niveau blieb. Somit wäre eine Hemmung gegenüber den eingesetzten Konzentrationen auch schwieriger detektierbar, da die Kontrolle aus eben genannten Gründen auch einer gewissen Hemmung unterläge.

Abgesehen von den messbaren Wachstumsparametern konnte ein negativer Einfluss der Atrazinwirkung auf die Vitalität von *E. canadensis* in der zweiten Versuchsphase beobachtet werden. So kam es drei Wochen nach Applikation in den beiden höchsten Konzentrationsstufe (400 und 1600 µg/l) zu deutlichen Schwarzfärbungen der eingesetzten Testorgansimen. Am Versuchsende waren die Sprosse in der höchsten Atrazinkonzentration dann in mehrere Teile zerfallen (siehe Abb. 32), sodass eine richtige Zuweisung der Wachstumsparameter nicht mehr möglich war.

4.2.1.3 *Riccia fluitans*

Da *Riccia fluitans* im vierwöchigen Versuchsverlauf sowohl in den Kontrollen, als auch in den einzelnen Konzentrationsstufen nur einen geringen Zuwachs (15-40 %) erreichte und generell keine konzentrationsabhängigen Effekte auf die Testorganismen nachgewiesen werden konnten (siehe Kapitel 3.1.3.2), war es nicht möglich, eine EC_{50} oder NOEC bzw. LOEC zu errechnen. Das geringe Wachstum von *R. fluitans* lässt sich vermutlich durch die geringe Leitfähigkeit, welche nach DETENBECK et al. (1996) Aufschluss über den Nährstoffgehalt geben kann, erklären. Bei vergleichbaren Versuchen von BOTZAT (2007), bei denen ein Medium eingesetzt wurde, dessen Leitfähigkeit zu Versuchsbeginn zwischen 460 und 480 µS/cm lag, erreichte *Riccia fluitans* in der Kontrolle nach vier Wochen eine mittlere Zuwachsrate von 257%; bei dieser Studie konnte für *R fluitans* eine EC_{50} von 46,2 µg/l ermittelt werden. Dieser Wert deutet daraufhin, dass *R. fluitans* unter geeigneten Bedingungen als Testorganismus eingesetzt werden kann. In vorliegender Studie wurde jedoch aus Zeitgründen auf weitere Versuche mit *R. fluitans* verzichtet.

4.3 *Lemna*-Standard-Test

Im Unterschied zu den Ergebnissen der drei als Testorganismen eingesetzten Makrophyten, bei denen Atrazin keine bzw. wachstumsfördernde Effekte hervorrief, konnte anhand des *Lemna*-Standard-Tests eine deutlich hemmende Wirkung von Atrazin auf das Wachstum nachgewiesen werden. Die ermittelte NOEC für *Lemna minor* lag bei 10 µg/l, die LOEC bei 100 µg/l und die EC_{50} mit 393 µg/l im Bereich der zweithöchsten Konzentration. Bei der höchsten Konzentration mit 1600 µg/l wurde das Wachstum von *L. minor* zu 100% gehemmt. Weiterhin konnten in den beiden höchsten Konzentrationsstufen deutliche Chlorose- bzw. Zerfallserscheinungen beobachtet werden. Beim Vergleich der Ergebnisse, die unter Einsatz der drei eingesetzten Makropyhten gewonnen wurden, mit den Ergebnissen des *Lemna*-Standard-Tests sollte berücksichtigt werden, dass bei ersteren das Wachstum einzelner Individuen betrachtet wird, während beim *Lemna*-Standard-Test Ergebnisse auf Populationsebene erfasst werden. Diese Problematik, einzelne Organismen mit Populationen zu vergleichen, und daraus jeweils Endpunkte im Risikomanagement abzuleiten, wurde bereits von SUTER et al. (2005) angesprochen.

Grundsätzlich konnten die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass *L. minor* im Hinblick auf die Wachstumsparameter ein sensitiver Testorganismus ist und gute Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen liefert. Vergleichend stellt sich jedoch die Frage, ob die alleinige Betrachtung von Wachstumsparametern immer ausreichenden Aufschluss für die Risikoabschätzung liefert. So zeigen die Versuche, trotz des problematischen Testdesigns, dass es unter dem Einsatz gleicher Atrazinkonzentrationen, bezogen auf die Wachstumsparameter von *L. minor* und der eingesetzten Makrophyten, zu verschiedenen Ergebnissen kommt. Ein vergleichbares Ergebnis erhielt HEINRICH (2008) in Versuche unter Einsatz des Auxinherbizids 2,4-D. Geringe Konzentrationen von 10 und 100 µg/l führten zu einer deutlichen Internodienstreckung bei *Ceratophyllum demersum* und zu einer Wachstumshemmung bei *L. minor*. Somit deuten vorliegende und vergleichbare Ergebnisse von HEINRICH (2008) darauf hin, dass die Detektierung von Herbizideffekten auf Makrophyten anhand der alleinigen Betrachtung von Wachstumsparametern zu Schwierigkeiten führen kann. Einerseits treten signifikante Wachstumshemmungen im Vergleich zum *Lemna*-Standard-Test erst bei höheren Konzentrationen auf, andererseits kann es, wie hier z.B. bei *C. demersum* zu „wachstumsfördernden“ Effekten einer Testsubstanz kommen.

4.4 Algen

Bevor genauer auf die Algenentwicklung, die ausschließlich in den Testgefäßen von *Ceratophyllum demersum* gemessen wurde, eingegangen wird, sollte erwähnt werden, dass die Wirkung von Atrazin darauf beruht, dass der Elektronentransport zwischen dem Photosystem II und I gehemmt wird. Da die Messung der Gesamtchlorophyll-konzentration auf der Erfassung der verzögerten Fluoreszenz photosynthetisch aktiver Pigmente beruht, kann angenommen werden, dass die Messergebnisse dadurch beeinflusst werden könnten.

Hierzu merkt GERHARDT (2007, zitiert in LOIDOLD 2007) an, dass bei Algen aus Kontrollsystemen etwa 20% der sog. ersten Chinon-Elektronenakzeptoren (Q_A-Komplex) besetzt sind. Da Atrazin den Elektronenfluss zwischen dem Q_A- und Q_B-Komplex, dem sog. zweiten Chinon-Elektronenakzeptor unterbricht, kommt es bei voller Wirkung des Atrazins zu einer Besetzung der Q_A- Komplexe im Bereich von 60 bis 90%. Als Folge liegen die messbaren Intensitäten der verzögerten Chlorophyllfluoreszenz bei belasteten Systemen vergleichsweise erhöht, sodass die abgeleitete Algendichte dort höhere Werte erreicht, als tatsächlich vorliegen.

Die niedrige Chlorophyllfluoreszenz, die bei der eingesetzten Atrazinkonzentration von 1600 µg/l in beiden Versuchsphasen gemessen wurde, ist somit auf die Hemmung des Algenwachstums durch die Atrazinwirkung zurückzuführen. Da die gemessenen Chloropyhllkonzentrationen bei den drei niedrigsten Konzentrationsstufen mit 25, 100 und 400 µg/l Atrazinbelastung in beiden Versuchsphasen nahe bzw. teilweise über dem Kontrollniveau lagen, kann davon ausgegangen werden, dass die Chlorophyll-fluoreszenz in den „niedrigeren“ Konzentrationen nur teilweise gehemmt wurde. Generell entwickelte sich die Algendichte in der Kontrolle und den drei niedrigsten Konzentrationsstufen in der ersten Versuchsphase recht einheitlich. In den ersten zwei Wochen zeigte sich bei diesen vier Gruppen keine Entwicklung, in den zwei folgenden Wochen stiegen die Chlorophyllgehalte und damit die Algendichte deutlich an. Die Gesamtchlorophyllgehalte von 3-7 µg/l entsprechen etwa Verhältnissen, die in mesotrophen Gewässern vorherrschen. Generell spricht man hier von einer mäßigen Phytoplanktonentwicklung (LAWA 1998). Diese mäßige Algenentwicklung, die auch in der Kontrolle vorherrschte, lässt sich vermutlich auf die geringe Verfügbarkeit von Nährstoffen zurückführen. Dass die Algendichte in der zweiten Versuchsphase innerhalb der ersten Woche bei allen Gruppen deutlich abfiel, lässt sich wahrscheinlich

darauf zurückführen, dass die Algen sich erst an die neuen Bedingungen (z.B. Licht, Temperatur) anpassen musste und durch die „künstlich“ hohe Makropyhtendichte einer hohen Konkurrenz ausgesetzt waren, die im Referenzteich in diesem Maße nicht vorherrschte. Vier Wochen nach Versuchsbeginn lag der Chlorophyllgehalt, bei der Kontrolle und den drei niedrigsten Konzentrationsstufen bei Werten zwischen 5 und 20 µg/l, dies entspricht meso- bis eutrophen Bedingungen in Gewässern. Eutrophe Bedingungen in Gewässern deuten auf eine hohe Verfügbarkeit von Nährstoffen in Gewässern hin (vgl. LAWA 1998) und gehen normalerweise mit einer erhöhten Sauerstoffproduktion einher. Dass die Chloropyhllkonzentration bzw. die Algendichte in der fünften Woche nach Versuchsbeginn in der mit 400 µg/l belasteten Gruppe am höchsten lag, könnte ein Hinweis auf die Schwächung der eingesetzten Testorganismen sein. So geht SCHWOERBEL (1999) davon aus, dass Makropyhten in Konkurrenz mit Algen stehen. Ob die Algen sensitiver auf Atrazin reagieren, als die eingesetzen Makropyhten, lässt sich schwer beurteilen. Einerseits stellten FAIRCHILD et al. (1998) in ihren Versuchen unter Einsatz fünf verschiedener Makropyhten und sechs Arten von Algen fest, dass diese in drei von vier Fällen weniger sensitiv reagierten als die Makropyhten, andererseits sprechen Literaturdaten dafür, dass Algen sehr sensitiv auf Atrazin reagieren. So liegt die EC_{50} für Atrazin bei *Scenedesmus subspicatus* bei einem Wert von 43 µg/l und bei *Selenastrum* c*apricornutum* bei 130 µg/l **(**EUROPEAN CHEMICAL SUBSTANCES INFORMATION SYSTEM 2008). Da das Testmedium jedoch aus natürlichen Teichen stammte, und somit ein Mix aus unbekannten Algen vorlag, kann angenommen werden, dass im Zuge der Atrazinwirkung sensitivere Algen durch weniger sensitive Algen ersetzt wurden. Da die Gesamtchlorophyllkonzentration nur in der zweiten Versuchsphase in den letzten zwei Wochen höhere Werte >10 µg/l erreichte, und in den Testgefäßen visuell keinerlei Algenentwicklung beobachtet werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass der Einfluss der Algen auf die physikalischen Parameter gering ist. Daher wird hierauf bei der Diskussion nicht näher eingegangen, wenngleich der Einfluss der Algen auf die physikalischen Parameter, aufgrund fehlender vergleichbarer Daten nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann.

4.5 Methodenkritik

Frischgewicht

Wie bereits im Abschnitt 2.3.2 beschrieben wurde, erfolgte die Frischgewichts-bestimmung nach Entfernen möglichst großer Mengen an anhaftendem Wasser. Generell kann davon ausgegangen werden, dass die Entfernung von anhaftendem Wasser, sei es durch ein Sieb oder mit Hilfe von Papiertüchern, fehlerbehaftet ist. Da die Fehler jedoch gleichmäßig über alle Testorganismen verteilt gemacht wurden, liegt hier ein systematischer Fehler vor, der bei der Auswertung der Daten damit keine falschen Schlüsse hervorrufen sollte. Problematisch wurde die Bestimmung des Frischgewichts jedoch bei gleichzeitigem Auftreten einer schleimigen Bakterienschicht auf den Pflanzen in den höheren Konzentrationsstufen zwei Wochen nach Versuchsbeginn. Da diese durch die Methodik relativ schlecht entfernt werden konnte, sind hierbei mit hoher Sicherheit gruppenspezifische Fehler entstanden. Es ist anzunehmen, dass die Bildung der Bakterienschicht Folge der relativ hohen Menge an eingesetztem Alkohol war. Daher sollte aus diesen und weiteren Gründen (z.B. Einfluss auf physikalische Parameter) in weiteren Versuchen mit einer geringeren Alkoholkonzentration gearbeitet werden. Weiterhin kann durch die Bestimmung des Frischgewichts und die damit einhergehende Methodik unter Umständen Stress für die Pflanze entstehen; die Frischgewichts-bestimmung sollte daher möglichst zügig erfolgen.

Physikalische Parameter

Die physikalischen Parameter wurden in der zweiten Versuchsphase unter anderem kurz nach der Applikation gemessen. Hier wäre es von Vorteil gewesen, die Parameter kurz vor und nach der Applikation zu messen, um einen „unbelasteten“ Ausgangswert zu erhalten, und um mögliche schnelle Veränderungen detektieren zu können.

Testmedium

Wie die Ergebnisse der ersten Versuchsphase gezeigt haben, führte der Einsatz von Teichwasser (Makrophytenteich) mit Leitfähigkeiten unter 100 µS/cm nur zu geringen Wachstumsraten. Daher wurde für die zweite Versuchsphase, Teichwasser (Referenzteich) mit einer höheren Leitfähigkeit (ca. 400 µS/cm) gewählt. Dies führte zu deutlich erhöhten Wachstumsraten, die jedoch zusammen mit der Leitfähigkeit im

Verlaufe des Versuches stagnierten. Hier könnte eventuell eine regelmäßige Nährstoffzugabe mit einem geeigneten Düngemittel (z.B. Aquarienpflanzendünger) zu einer dauerhaften hohen Wachstumsrate führen.

Testdesign

Die in Versuchsphase II eingeführte einwöchige Vorlaufzeit mit anschließender Auswahl der geeignetsten Versuchsorganismen sollte in weiteren Versuchen eingebaut werden. Mit dieser Methode kann gewährleistet werden, dass alle Pflanzen zu Versuchsbeginn an die Versuchsbedingungen adaptiert sind, und dass die Testorganismen in den verschiedenen Bechergläsern ein ähnliches Wachstum aufweisen. Auch die Aufstockung der Individuen von einem auf fünf Organismen pro Replikat macht im Hinblick auf die statistische Auswertung Sinn. Grundsätzlich wäre es von Vorteil gewesen, neben der Kontrolle eine Lösungsmittelkontrolle einzuführen, um die Wirkung von EtOH auf die Testorganismen bzw. die indirekte Wirkung über Mikroorganismen auf das Testmedium abschätzen zu können. Weiterhin sollte in weiteren Versuchen darauf geachtet werden, dass das verwendete Lösungsmittel in allen Testgefäßen, mit Ausnahme der Kontrolle, in gleicher Konzentration vorliegt.

4.6 Zusammenfassende Diskussion

Zusammenfassend konnten bei den drei eingesetzten Makrophyten *Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis* und *Riccia fluitans* keine deutlichen hemmenden Effekte des Atrazins festgestellt werden. Während bei den zwei eingesetzten Versuchsorganismen *E. canadensis* und *R. fluitans* keine signifikanten Unterschiede zwischen den belasteten und unbelasteten Gruppen feststellbar waren und sich auch keine konzentrationsabhängigen Effekte zeigten, kam es bei *C. demersum* mit steigenden Atrazinbelastungen bis zu einer Konzentration von 400 µg/l zeitweise bzw. dauerhaft zu deutlichen Zunahmen der Wachstumsparameter Frischgewicht und Sprosslänge. Zumindest bei den zwei eingesetzten Testorganismen *E. canadensis* und *C. demersum* führten höhere Konzentrationen des eingesetzten Herbizids in der dritten bis vierten Woche nach Applikation zu negativen morphologischen Effekten, wie anhand der Abbildungen 18, 32 und 33 deutlich wird. Unabhängig von den Ergebnissen der Wachstumsparameter, zeigte der Verlauf der physikalischen Parameter, dass die Testmedien mit höheren Atrazinkonzentrationen deutliche Effekte auf die

Testorganismen hatten. Mit steigender Herbizidbelastung sank sowohl der pH-Wert, als auch der Sauerstoffgehalt in den belasteten Testmedien deutlich ab. Dieser Effekt könnte einerseits darin begründet liegen, dass Atrazin in steigenden Konzentrationen, einen zunehmend hemmenden Effekt auf die Photosynthese der Testorganismen ausübt und damit indirekt den pH-Wert und den Sauerstoffgehalt in den Medien beeinflusst. Andererseits kann auch der oxidative Abbau des eingesetzten Lösungsmittel Ethanol zu Essigsäure durch heterotrophe Bakterien der Gattung *Acetobacter*, zu einer pH- und Sauerstoffabnahme führen. Vergleichende Ergebnisse von BOTZAT (2007) und LOIDOLD (2007) unter Verwendung einer Lösungsmittelkontrolle mit EtOH als Lösungsmittel, weisen jedoch darauf hin, dass solche Effekte vor allem in der ersten Woche auftreten, und dass die nicht erfolgte Wiedererholung in den Gruppen mit höheren Atrazinkonzentrationen eher auf die Atrazinwirkung zurückzuführen ist. Dass die eingesetzten belasteten Testmedien auch deutliche Effekte auf Wachstumsparameter haben können, konnte jedoch mit dem Standard-*Lemna* Test gezeigt werden. Hier ergab sich eine deutlich negative Konzentrations-Wirkungsbeziehung und eine hundert-prozentige Wachstumshemmung bei der höchsten eingesetzten Konzentrationsstufe.

Vergleichend stellt sich somit die Frage, ob die alleinige Betrachtung von Wachstumsparametern immer gut interpretierbare Ergebnisse liefert. So führten die vorliegenden Versuche, trotz des problematischen Testdesigns unter Einsatz gleicher Atrazinkonzentrationen, bezogen auf die Wachstumsparameter zu grundsätzlichen verschiedenen Ergebnissen. Auch die bereits angesprochenen Versuche von HEINRICH (2008) zeigten beim Testorganismus *C. demersum* bei Herbizidkonzentrationen von 10 und 100 µg/l 2,4-D deutliche Wachstumssteigerungen im Vergleich zur Kontrolle, während *L. minor* auf die gleichen Konzentrationen mit einer deutlichen Wachstums-hemmung reagierte. Zumindest bei *C. demersum* ist dieser Effekt leicht nachvoll-ziehbar, weil bekannt ist, dass natürliche und synthetische Auxine, wie z.B. 2,4-D, in geringen Dosen das Zellstreckungswachstum anregen, während sie in hohen Dosen hemmend wirken (TAIZ & ZEIGER 2000).

Somit bleibt allgemein die Frage bestehen, ob sich Wachstumsparameter immer als geeignete und sensitive Endpunkte eignen, ob toxische Effekte zumindest zeitweise in niedrigeren Konzentrationsbereichen durch ein stress- bzw. hormoninduziertes Wachstum überdeckt werden können, oder ob jegliche statistische Abweichung vom Kontrollwachstum, sei sie negativ oder positiv, als Effekt gewertet werden sollte. Da die Vitalität einer Pflanze anhand der alleinigen Betrachtung von Wachstumsparametern

unter Umständen nicht immer richtig eingeschätzt werden kann, sollten bei solchen Testsystemen, solange diese noch nicht ausreichend validiert sind, weitere Parameter berücksichtigt werden. Bei Wasserpflanzen bieten sich hier physikalische Parameter an. Darüber hinaus könnten auch direkte physiologische Parameter wie z.B. die Erfassung der Photosyntheserate und die Stressproteinsynthese zur Bewertung von Effekten herangezogen werden. Erste Ansätze in dieser Richtung wurden bereits von KÜSTER & ALTENBURGER, (2006) sowie SIESKO et al. (1997) durchgeführt.

Im Hinblick auf das Versuchsdesign machte die Einführung einer einwöchigen Vorlaufzeit Sinn und sollte in weiteren Versuchen beibehalten werden. Zum Einen haben die eingesetzten Testorganismen dann die Möglichkeit, sich an die Versuchsbedingungen anzupassen, sodass im weiteren Versuchsverlauf die Reaktion der Testorganismen auf die Applikation besser eingeschätzt werden kann. Zum Anderen können Testorganismen mit besonders hohem oder niedrigem Wachstum vor Beginn der Applikation aussortiert werden, um einheitlichere Bedingungen zu gewährleisten. In gleicher Weise führt die Aufstockung der Individuen von einem auf fünf Organismen pro Replikat zu einem stabileren Testdesign und damit zu einer leichteren Aufdeckung von signifikanten Unterschieden zwischen einzelnen Behandlungsstufen.

5 Zusammenfassung

Obwohl Makrophyten in aquatischen Systemen einen bedeutenden Teil der Biomasse stellen und sie zusammen mit den Algen als Primärproduzenten eine wichtige Rolle spielen, kommt ihnen im Rahmen der Risikoabschätzung von Chemikalien bislang nur eine untergeordnete Rolle zu. Zur Zeit werden standardisierte Biotests nur mit der Wasserlinse (*Lemna* spec.) durchgeführt.

Mit der vorliegenden Arbeit soll ein Beitrag zum Projekt des Institus für Gewässerschutz Mesocosm GmbH „Entwicklung neuer Methoden für die Risikobewertung von Umweltchemikalien in aquatischen Ökosystemen anhand von Makrophyten“ geleistet werden.

Hierzu wurde das Herbizid Atrazin, ein synthetischer Photosynthesehemmer, als Modellsubstanz ausgewählt, um Effekte auf die Makrophyten *Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis* und *Riccia fluitans* abschätzen zu können. Die Versuche wurden in zwei Versuchsphasen durchgeführt, wobei in der ersten Versuchsphase mit allen drei genannten Arten über einen Zeitraum von vier Wochen gearbeitet wurde. In der zweiten Versuchsphase wurden nur *C. demersum* und *E. canadensis* verwendet und der Versuchszeitraum auf fünf Wochen verlängert. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde der *Lemna*-Standard-Test (OECD 221) unter parallelen Bedingungen durchgeführt. Als Versuchsparameter, die wöchentlich aufgenommen wurden, dienten neben den Wachstumsparametern (Sprosslänge & Frischgewicht), die physikalischen Parameter pH, Leitfähigkeit und Sauerstoffgehalt.

Anhand der statistischen Auswertung der Wachstumsparameter konnten keine signifikanten hemmenden Effekte der Testsubstanz Atrazin auf die drei eingesetzten Makrophyten nachgewiesen werden. Während bei den zwei Versuchsorganismen *E. canadensis* und *R. fluitans* keine signifikanten Unterschiede zwischen belasteten und unbelasteten Gruppen feststellbar waren und auch keine konzentrationsabhängigen Effekte auftraten, führten steigende Atrazinbelastungen bei *C. demersum* bis zur zweithöchsten eingesetzten Atrazinkonzentration zu deutlichen Zunahmen der Wachstumsparameter. Obwohl weder bei *E. canadensis* noch bei *C. demersum* hemmende Effekte auftraten, führten höhere Atrazinkonzentrationen zu negativen morphologischen Effekten (Brüchigkeit, Zerfall, unnatürliches Erscheinungsbild). Darüber hinaus wiesen die physikalischen Parameter pH und Sauerstoffgehalt auf eine

photosynthesehemmende Wirkung von Atrazin hin, wenngleich diese Parameter auch stark durch das Lösungsmittel EtOH beeinflusst sein können.

Der unter Einsatz der gleichen Atrazinkonzentrationen laufende Standard-*Lemna*-Test zeigte eine deutliche Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mit einer hundertprozentigen Wachstumshemmung bei der höchsten eingesetzten Atrazinkonzentration. Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse der submersen Makrophyten verglichen mit dem Standard-*Lemna*-Test zwei unterschiedliche Trends. Während bei ersteren steigende Atrazinkonzentrationen zumindest bei *C. demersum* zu deutlichem Wachstum führten, reagierten letztere Testorganismen erwartungsgemäß auf den Einsatz des Herbizids.

Allgemein werfen die vorliegenden Ergebnisse die Frage auf, ob Wachstumsparameter für Wasserpflanzen, wie in der Literatur beschrieben (AMRAP in Druck), in jedem Fall sinnvolle Endpunkte sind, oder ob weiteren, z.B. physikalischen oder physiologischen Parametern, mehr Gewicht beigemessen werden sollte, um eine tatsächliche Schädigung zu identifizieren. Abschließend werden die in der zweiten Versuchsphase eingesetzten Methoden kritisch diskutiert und mögliche Verbesserungsvorschläge genannt.

6. Literatur

AMRAP - Aquatic Macrophyte Risk Assesment for Pesticides (in press): Guidance from the Amrap Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.

BOTZAT, A. (2007): Evaluierung physiologischer Parameter für die ökotoxikologische Untersuchung von submersen und emersen Makrophyten.- Unveröffentliche Diplomarbeit; Institut für Ökologie, Evolution und Diversität der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

CASPER, S.J. & H.-D. KRAUSCH (1981): Pteridophyta und Anthophyta, Teil 2. – In: ETTL, H., GERLOFF,J. & HEYNIG, , H.: Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 23 u. 24 – G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York: 404 – 942.

CIBA-GEIGY CORPORATION (1994): Environmental Fate Reference Data Source Book for Atrazine. Greensboro, NC, USA

DETENBECK, N.E., HERMANUTZ, R., ALLEN, KATHLEEN und SWIFT, M.C. (1996): Fate and effects of the herbicide atrazine in flow-through wetland mesocosms. Environ. Toxicol. Chem. 15 (6): 937-946.

EUROPEAN CHEMICAL SUBSTANCES INFORMATION SYSTEM (2008): http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/ (11.11.2008)

FAIRCHILD, J.F.; RUESSLER, D.S. & A. R. CARLSON (1998): Comparative sensitivity of five species of makrophytes and six species of algae to Atrazine, Metribuzin, Alachlor and Metolachlor ; Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 17, No. 9, pp. 1830–1834.

FEURTET-MAZEL, A., GROLLIER, T., GROUSELLE, M., RIBEYRE, F. und BOUDOU, A. (1996): Experimental study of bioaccumulation and effects of the herbicide isoproturon on freshwater rooted macrophytes (*Elodea densa* and *Ludwigia natans*). Chemosphere 32 (8): 1499-1512.

GERHARDT V, BODEMER U (2000) Delayed fluorescence spectroscopy: a methode for determining phytoplankton composition. Archiv für Hydrobiologie Special Issues Advances in Limnology 55, 101-120

HABERER, M. (2006): Taschenatlas Wasserpflanzen. Verlag Eugen Ulmer

HEINRICH, J. (2008): Entwicklung von Biotestsystemen mit den Makrophyten *Riccia fluitans*, *Elodea canadensis* und *Ceratophyllum demersum*. Unveröffentliche Diplomarbeit; Fachhochschule Wiesbaden, Fachbereich Ingenieurwissenschaften, Studiengang Umwelttechnik.

HOCK,B., ELSTNER, E.F. (1995): Schadwirkungen auf Pflanzen. 3. Auflage, Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

HUBER, W. (1993): Ecotoxicological relevance of atrazine in aquatic systems. Environ. Toxicol. Chem. 12: 1865-1881

KÜSTER, A. & R. ALTENBURGER (2006): Development and validation of a new fluorescence-based bioassay for aquatic macrophyte species; UFZ – Centre for Environmental Research.

LAWA – Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (1999): Gewässerbewertung stehende Gewässer. Vorläufige Richtlinie für eine Erstbewertung von natürlich entstandenen Seen nach trophischen Kriterien. Kulturbuch-Verlag, Berlin.

LOIDOLD, J. (2007): Etablieren von Testsystemen mit Wasserpflanzen in der Ökotoxikologie – Verzögerte Fluoreszenz als Endpunkt bei der Bewertung von Umweltchemikalien an submersen und schwimmenden Makrophyten. Diplom-Arbeit. Fachhochschule Wiesbaden – Standort Rüsselsheim.

LUDWIG, W. H. (2003): Tiere und Pflanzen unserer Gewässer. 1, Auflage, BLV Verlagsgesellschaft mbh, München, Wien, Zürich

NULTSCH, W. (2000): Allgemeine Botanik. 11. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

OECD (Organisation for Economic Cooperation and Develoment) (2002): OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Revised Proposal for a New Guideline 221: *Lemna* Growth Inhibition Test. November 2003. 22 S.

PRASZCZYK, B; ALTENBURGER, R.; OEHLMANN, J.; MARKERT, B. & G. SCHÜÜRMANN (1999): Brauchen wir einen Biotest mit höheren Pflanzen in der aquatischen Toxikologie? In: OEHLMANN, J. & B. MARKERT (Hrsg.): Ökotoxikologie – Ökosystemare Ansätze und Methoden. Ecomed. Landsberg. S. 151-163.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & S.E. EICHHORN (2005): Biologie der Pflanzen. 4. Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin – New York.

ROTHMALER, W. (2005): Exkursionsflora von Deutschland. 10, Aufl., Elsevier Verlag, München

SCHWOERBEL, J. (1999): Einführung in die Limnologie. 8. Auflage, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.

SIESKO, M.M.; FLEMING, W.J. & R.M. GROSSFELD (1997): Stress protein synthesis and peroxidase activity in a submersed aquatic macrophyte exposed to cadmium, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 16, No. 8, pp. 1755–1760,

SOLOMON, K. R., BAKER, D. B., RICHARDS, R. P., DIXON, K. R., KLAINE, S. J., LA POINT, T. W., KENDALL, R. J., WEISSKOPF, C. P., GIDDINGS, J. M., GIESY, J. P., HALL JR., L. W. und WILLIAMS, W. M. (1996): Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. Environ. Toxicol. Chem. 15 (1): 31-76

STRASBURGER, E. (2002): Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 35. Auflage, Spektrum akademischer Verlag Gustav Fischer, Heidelberg, Berlin

SUTER, G.W.; NORTON, S.B. & A., FAIRBROTHER (2005): Individuals versus Organisms versus Populations in the Definition of Ecological Assessment Endpoints; Integrated Environmental Assessment and Management — Volume 1, Number 4—pp. 397–400,

TAIZ, T.& ZEIGER, E. (2000): Physiologie der Pflanzen. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg – Berlin.

US EPA (Environmental Protection Agency) (2001): Review of Non-Target Plant Toxicity Tests Under the North American Free Trade Agreement (NAFTA). FIFRA (Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act) Scientific Advisory Panel (SAP) Meeting. SAP Report No. 2001-18. Arlington, VA, USA. 52 S.

V.TÜMPLING, W.; FRIEDRICH, G.; GERHARDT, V. & U. BODEMER (1999): DF-Anregungsspektrometer. In: V.TÜMPLING, W.; FRIEDRICH (Hrsg.): Biologische Gewässeruntersuchung. Gustav Fischer Verlag Jena.

VERVLIET-SCHEEBAUM, M. (2006): Biomonitoring of Herbicide Impact Using Aquatic Macrophytes: Laboratory and Field Studies for the Evaluation of Potential Toxicity on Aquatic Plants. Dissertation. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.

WENDELBERGER, E. (1986): Pflanzen der Feuchtgebiete – Gewässer, Moore, Auen. 1. Auflage, Spektrum der Natur, Büchergilde Gutenberg, München