
Risikobewertung von Chemikalien anhand von Makrophytentests mit *Myriophyllum aquaticum*

Wissenschaftliche Arbeit zur Erlangung des Abschlusses
Fachökotoxikologie (GDCh/SETAC GLB)

Betreuer: Prof. Dr. Reinhard Debus (Hochschule Rhein-Main)
Prof. Dr. Klaus Peter Ebke (Institut für Gewässerschutz,
MESOCOSM GmbH)

Verfasser:
M.Sc. Christian Felten

Gießen, Juli 2013

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	ii
Abbildungsverzeichnis.....	iii
Tabellenverzeichnis.....	iv
Abkürzungsverzeichnis.....	v
1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden	3
2.1 Testsubstanzen	3
2.1.1 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	3
2.1.2 Glyphosat.....	4
2.2 Pflanzenmaterial	4
2.3 Versuchsvorbereitung	5
2.4 Analytik	7
2.4.1 Messbedingungen.....	8
3. Ergebnisse und Diskussion.....	9
3.1 HPLC Analytik.....	9
3.1.1 Berechnung der absoluten Konzentrationen.....	9
3.2 Endpunkte	10
3.2.1 Wurzellänge	10
3.2.2 Längenwachstum	12
3.2.3 Frischgewicht.....	14
3.3 Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen	15
3.4 Hormesis.....	16
3.5 Optische Betrachtung der Pflanzen.....	17
4. Abschließende Diskussion	19
4.1 Analytik.....	20
5. Zusammenfassung	22
6. Literatur.....	v
Anhang	viii

Abstract

The Aquatic macrophyte Risk Assessment for Pesticides (AMRAP) suggests *Myriophyllum aquaticum* in addition to *Lemna sp.* for testing risk assessment of herbicides. This work deals with the influence of different conditions of emergent and submergent pre-cultures of *M. aquaticum* concerning the toxicity of herbicides. Furthermore the suitability for risk assessment of various toxicity endpoints (length growth, root growth, fresh weight) should be determined. Therefore vessel experiments with the test substances 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and glyphosate were carried out. The design was subdivided into three categories (emergent, one week submergent and four weeks submergent pre-cultures).

It has become apparent that the root growth is the most sensitive endpoint for the test with 2,4-D. Moreover it was found that the submergent pre-cultures responded more sensitively to 2,4-D than the emergent pre-cultures. For the test substance glyphosate these results could not be confirmed. Due to the poor solubility of glyphosate in water it was assumed that there was no or a very small solution of the substance in water.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel 2,4-D.	3
Abbildung 2: Strukturformel Glyphosat	4
Abbildung 3: Einsetzen der Pflanzen in Testgefäße	6
Abbildung 4: Vorzucht der Pflanzen in OECD-Sediment.	6
Abbildung 5: Kalibrierreihe 2,4-D	7
Abbildung 6: Chromatogramm 2,4-D Stammlösung (14,6 mg L ⁻¹)	8
Abbildung 7: Mittlere Wachstumsraten der Wurzellänge für 2,4-D	11
Abbildung 8: Mittlere Wachstumsraten der Wurzellänge für Glyphosat.	12
Abbildung 9: Mittlere Wachstumsraten des Längenwachstums für 2,4-D	13
Abbildung 10: Mittlere Wachstumsraten des Längenwachstums für Glyphosat.	13
Abbildung 11: Mittlere Wachstumsraten des Frischgewichts für 2,4-D	14
Abbildung 12: Mittlere Wachstumsraten des Frischgewichts für Glyphosat.....	15
Abbildung 13: Konzentrations-Wirkung-Beziehungen zu 2,4-D	15
Abbildung 14: Emerse Vorkultur nach 7 Tagen	17
Abbildung 15: Einwöchige submerse Vorkultur	18
Abbildung 16: Vierwöchige submerse Vorkultur.	18
Abbildung 17: Glyphosat nach 7 Tagen.....	18
Abbildung 18: Testansatz mit vierwöchiger submerser Vorkultur und emerser Vorkultur	19
Abbildung 19: Versuchsdurchführung in 450 l Aquarium	xii
Abbildung 20: Versuchsdurchführung in Klimakammer	xii

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisse der HPLC-Messungen der höchsten Konzentrationen der Expositionslösungen mit 2,4-D.....	10
Tabelle 2: Zusammensetzung des künstlichen Sediments	viii
Tabelle 3: Zusammensetzung des Steinberg-Mediums	viii
Tabelle 4: Physikalische Parameter 2,4-D vier-Wochen-submers	ix
Tabelle 5: Physikalische Parameter 2,4-D eine-Woche-submers	ix
Tabelle 6: Physikalische Parameter 2,4-D emers	x
Tabelle 7: Physikalische Parameter Glyphosat vier-Wochen submers.....	x
Tabelle 8: Physikalische Parameter Glyphosat eine-Woche submers.....	xi
Tabelle 9: Physikalische Parameter Glyphosat emers.....	xi

1. Einleitung

Aquatische Pflanzen sind von großer Wichtigkeit in der Stabilisierung von Süßwasser-Ökosystemen. Makrophyten als Primärproduzenten spielen eine Hauptrolle im aquatischen CO₂- und Nährstoffkreislauf. Sie liefern Habitate und Nahrungsmittel für aquatische Gemeinschaften (Knauert et al., 2009).

Aquatische Pflanzen werden häufig nach ihrer Wuchsform klassifiziert. Dabei handelt es sich um emerse, submerse, frei-schwimmende und schwebend-blättrige Pflanzen (Maltby et al., 2010). Die Art ihrer Wuchsform hat auch einen Einfluss auf die Aufnahme von Nähr- oder auch Schadstoffen aus Wasser, Luft oder Sediment.

Für die Risikobewertung von Chemikalien wird derzeit nur die Wasserlinse (*Lemna sp.*), als Vertreter höherer Wasserpflanzen, genutzt.

Aussagen zur Risikobewertung von Herbiziden und die Einschätzung der Kontamination von Sedimenten, auf Grundlage von Algen- und *Lemna*- Tests, kann das potentielle Risiko einer Substanz unterbewerten (Knauert et al., 2007).

In manchen Fällen ist eine Exposition über das Sediment der Haupteintragspfad einer Schadschubstanz in die Pflanze. *Lemna sp.* bildet keine Wurzeln ins Sediment sondern schwimmt auf der Wasseroberfläche. Für den Fall von über das Sediment in die Pflanzenwurzel aufgenommene Schadstoffe sollten jedoch Methoden mit, in das Sediment wurzelnden, Pflanzen etabliert werden (Maltby et al., 2010).

Folglich kann ein Test, welcher an der Testpflanze *Lemna sp.* durchgeführt wird, zu einer zu gering ausfallenden Einschätzung der Toxizität einer Schadschubstanz führen, während die Durchführung ergänzender Tests mit wurzelbildenden submersen Makrophyten genauere Aussagen ermöglicht (Belgers et al., 2007; Arts et al., 2008).

Über AMRAP (Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides) wird für *Myriophyllum aquaticum* ein Makrophytentest zur Risikoabschätzung von Herbiziden vorgeschlagen, der in bestimmten Fällen ergänzend zum *Lemna sp.* (OECD 221) herangezogen werden soll.

Da die heterophylle Pflanze *M. aquaticum* sowohl submerse als auch emerse Blätter ausbilden kann, wird je nach der entsprechenden Vorhälterung (submers oder

emers) eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Chemikalien erwartet. Anhand der Substanzen 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und Glyphosat sollen in dieser Arbeit die Wirkung der genannten Substanzen an emersen und submersen Vorkulturen von *M. aquaticum* gezeigt werden.

In den Tests wurden für beide Prüfsubstanzen jeweils Pflanzen aus drei Varianten an Vorkulturen eingesetzt: Emerse Vorkulturen und Vorkulturen mit emersen Pflanzen die eine bzw. vier Wochen submers gehalten wurden.

Zur Bestimmung von NOEC (No Observed Effect Concentration), LOEC (Loest Observed Effect Concentration) und EC_x (Effect Concentration $_x$) betrachtet man Endpunkte, wie das Längenwachstum, das Wurzelwachstum und das Frischgewicht. Weiterhin wurden physikalische Parameter (pH, Sauerstoff und Leitfähigkeit) zu Beginn und zum Ende der Versuche in die Auswertung aufgenommen.

In einer Studie von Arts et al. (2008) wurde bereits gezeigt, dass das Wurzelwachstum als sensitivster Parameter, gegenüber der Endpunkte Längenwachstum und Frischmasse, bei der Abschätzung der Toxizität bei *M. aquaticum* gilt. Auch bei Belgers et al. (2007) erwies sich das Wurzelwachstum als ein sehr sensibler Parameter zur Bestimmung der Toxizität bei einer großen Variation an Schadstoffen.

Es wird angenommen, dass *M. aquaticum* auf sedimentgebundene Schadsubstanzen mit einer Änderung des Wachstumsverhaltens reagiert und damit als Indikator für diese gelten kann (Feiler et al., 2004).

Hypothesen:

1. Die submers gehaltenen Pflanzen zeigen aufgrund der fehlenden Wachsschicht sensitiveres Verhalten gegenüber den Testchemikalien.
2. Das Wurzelwachstum erweist sich als sensitivster Endpunkt zur Bestimmung der Toxizität.

2. Material und Methoden

Im Folgenden werden das verwendete Material, die Methoden, die Zucht der Pflanzen, der Aufbau der Versuchsanlagen und die Auswertung der Daten beschrieben.

2.1. Testsubstanzen

2.1.1. 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)

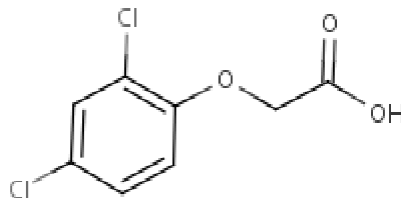


Abb. 1: Strukturformel 2,4-D
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>

2,4-D ist ein Herbizid aus der Gruppe der Chlorphenoxy-Verbindungen. Auf Unkräuter wirkt es als Pflanzenhormon und bewirkt, dass sich die Pflanze zu Tode wächst (Doeren, 2010). Es findet weltweit eine breite Nutzung für die Kontrolle von breitblättrigen Unkräutern auf Ackerkulturflächen, Wäldern, Heimgärten und Aquakulturen (Bakhtiari et al. 2012). Die 2,4-D-Jahresproduktion liegt bei rund 40.000 bis 50.000 Tonnen weltweit (Doeren, 2010). 1997 war es in den USA nach Atrazin und Metolachlor das Herbizid, welches mengenmäßig am dritt häufigsten eingesetzt wurde (Gilliom et al., 2006).

2.1.2. Glyphosat

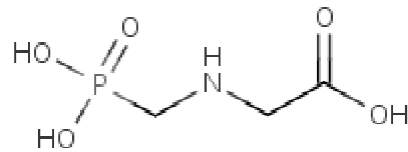


Abb. 2: Strukturformel Glyphosat
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>

Beim Wirkstoff Glyphosat handelt es sich um ein Herbizid aus der Gruppe der phosphathaltigen Herbizide, einen systemischen Wirkstoff, der über das Blatt oder den Spross aufgenommen wird. Der Wirkstoff wird als Totalherbizid eingesetzt.

Die Anwendung als Totalherbizid macht den Wirkstoff universell einsetzbar.

Glyphosat wird weltweit zur Unkrautkontrolle bei annuellen und mehrjährigen Pflanzen extensiv genutzt (Velini et al., 2010).

Schwerpunkte der Anwendung liegen im landwirtschaftlichen Bereich auf Straßen und Wegen, Gleisanlagen und in öffentlichen Anlagen z.B. auf Friedhöfen (Velini et al., 2010).

Roslychy et al. (1982) beschreibt eine Schädigung von Mikroorganismen ab etwa 1µg Wirkstoff pro Gramm Boden. Pilze zeigten keinerlei Reaktion.

Glyphosat (Roundup) steht in der Anwendungshäufigkeit und bei den Verkaufszahlen weltweit schon lange unangefochten an der Spitze aller Herbizide.

2.2. Pflanzenmaterial

Das verwendete Pflanzenmaterial von *M. aquaticum* entstammt aus einer langjährigen Zucht des Instituts für Gewässerschutz (MESOCOSM) in Homberg/Ohm.

2.3. Versuchsvorbereitung

Die Vorkultivierung des Pflanzenmaterials fand in OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development)- Sediment statt. Die Herstellung und die Inhaltsstoffe des OECD- Sediments sind in Tabelle 2 im Anhang beschrieben.

Als Medium wurde Steinberg-Medium (ISO/DIS 20079,2003), modifiziert nach Altenburger, verwendet. Das Steinberg-Medium wird in entionisiertem Wasser und aus fünf verschiedenen Stammlösungen hergestellt. Die Inhaltsstoffe des Mediums sind in Tabelle 3 im Anhang dargestellt. Das Steinberg-Medium wurde für jeden Test frisch angesetzt.

Die Vorkultivierung der Pflanzen ist in Abbildung 4 dargestellt. Die oberen sechs Zentimeter der Pflanzen wurden mit einem Skalpell abgeschnitten und die beiden untersten Wirtel in ein OECD-Sediment gedrückt. Nach ca. zwei Wochen Wachstum hatten die Pflanzen die benötigte Länge erreicht.

Es wurde darauf geachtet, dass die Versuche genauso durchgeführt wurden wie die beschriebene Versuchsdurchführung in der Diplomarbeit von Feige (2011). Mit einem Skalpell wurden Pflanzen mit einer Länge von sechs Zentimeter ($\pm 0,25$ cm) entfernt und in ein 50 ml Glas mit $50 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ OECD-Sediment gegeben. Die beiden untersten Wirtel der Pflanzen wurden mit einem Holzstäbchen in das Sediment eingedrückt und mit circa zwei Gramm Sand beschwert (siehe Abb. 3).

Die Gefäße mit den Pflanzen wurden zu je drei Gläschen in ein Probengefäß mit 1,5 L Konzentrationslösung gegeben (siehe Abb. 3). Je Konzentration wurden drei Probengefäße verwendet, um auf neun Wiederholungen zu kommen. Neben der Konzentrationsreihe mit fünf aufsteigenden Konzentrationen wurde auch eine Kontrolle in 50 %igem Steinberg-Medium hergestellt.



Abb 3.: Einsetzen der Pflanzen in Testgefäße und Überführen der Pflanzen in Expositionslösung

Die Versuche mit 2,4-D wurden in einem 450-L-Aquarium, bei Zimmertemperatur ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) durchgeführt (siehe Abb. 19). Dabei wurden die Probengefäße für den Versuchszeitraum von sieben Tagen in ein beheiztes Wasserbad gestellt. Am dritten und fünften Tag des Versuchs wurde die Anordnung der Versuchsgefäße im Aquarium geändert. Es wurde ein Hell-/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden bei einer Beleuchtungsintensität von etwa 5000 lx eingestellt.

Die Versuche mit Glyphosat wurden unter den gleichen Bedingungen, jedoch in einer Klimakammer, durchgeführt (siehe Abb. 20)



Abb. 4: Vorzucht der Pflanzen in OECD-Sediment. a: Einsetzen der Pflanzen in Sediment; b: Pflanzen nach zwei Wochen Wachstum; c: Umsetzen der Pflanzen in Testgefäße

2.4. Analytik

Die Real-Konzentrationen der Test-Medien mit 2,4-D und Glyphosat wurden mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Agilent 1200) an der Justus-Liebig-Universität Gießen analysiert. Für die Analytik-Proben wurde aus jedem Test-Medium, unmittelbar nach der Herstellung, sechs Milliliter Flüssigkeit mit einer Glas-Pipette entnommen. Je Behandlungsgruppe wurde aus diesen aliquoten Teilen separat für jedes Testsystem eine Mischprobe angefertigt, die bis zur HPLC Analyse in Glas-Vials bei -20 °C eingefroren wurden.

Die Messungen der Expositionslösungen mit der Substanz 2,4-D fanden an einem HPLC Agilent 1200 statt. Gemessen wurden jeweils die Stammlösungen und die höchste Konzentration der Konzentrationsreihen ($2.000 \mu\text{g L}^{-1}$). Die Kalibrierung wurde in Konzentrationen von 5 mg L^{-1} – 30 mg L^{-1} durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt.

Eine Messung der Expositionslösungen mit Glyphosat konnte aufgrund von technischen Problemen nicht stattfinden.

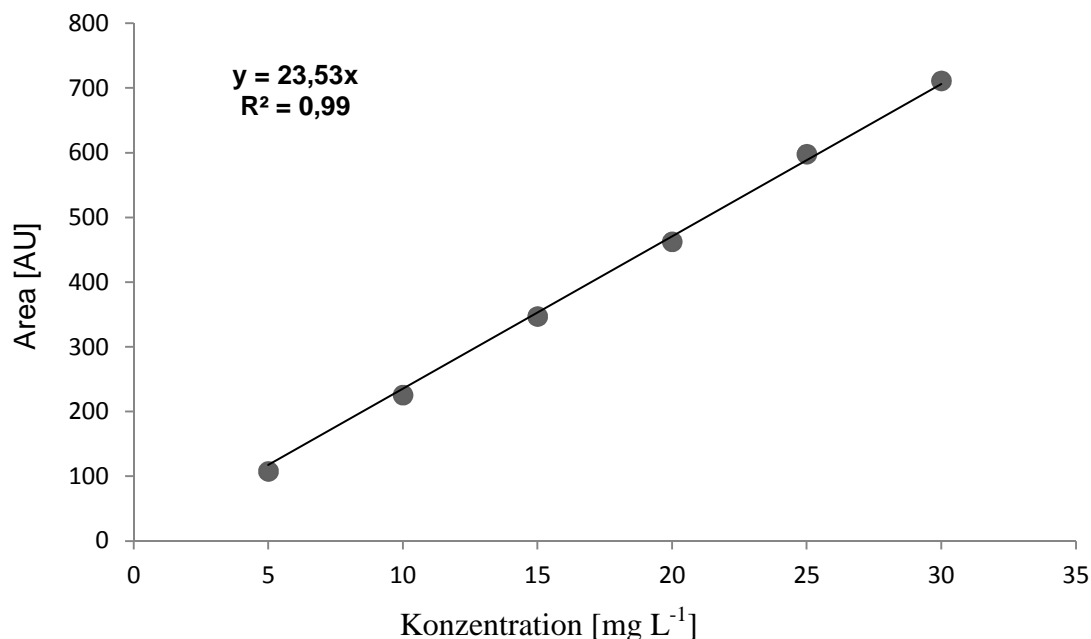


Abb.: 5: Kalibrierreihe für 2,4-D. Ermittelt aus den Mittelwerten der Peak-Flächen, aufgetragen gegen die nominale Konzentration.

2.4.1. Messbedingungen

Die Messbedingungen und Geräteeinstellungen orientierten sich an Arbeiten von Shaner et al. (2007) und Arts et al. (2006).

Als mobile Phase wurde Wasser, Acetonitril und ein Acetonitril-Puffer (pH: 2,01) in einem Gradienten von 40-70 % Acetonitril innerhalb von 15 Minuten verwendet. Die Flussrate betrug $0,35 \text{ ml min}^{-1}$. Die Ofentemperatur wurde auf $40 \text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt. Die Detektion von 2,4-D erfolgte bei einer Wellenlänge von 227 nm.

Die Mischproben wurden zu Beginn des Tests direkt entnommen und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Für die spätere HPLC-Analytik wurden sie aufgetaut und es wurden jeweils $500 \text{ } \mu\text{l}$ der Probe mit $500 \text{ } \mu\text{l}$ Methanol in einem HPLC-Vial miteinander vermengt. Darauf folgten die Messungen an dem HPLC.

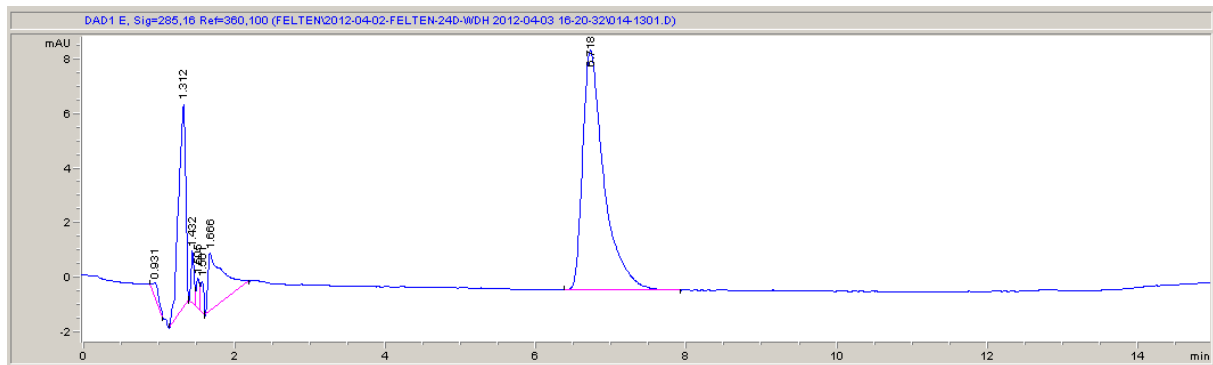


Abb.6: Chromatogramm 2,4-D Stammlösung ($14,6 \text{ mg L}^{-1}$)

3. Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der drei Testverfahren mit den Testsubstanzen Glyphosat und 2,4-D dargestellt. Vergleichend stehen für jeden physiologischen Endpunkt (Wurzelwachstum, Längenwachstum und Frischgewicht) die Ergebnisse der Versuche mit den Pflanzen aus einwöchigen submersen Vorkulturen, vierwöchigen submersen Vorkulturen und emersen Vorkulturen nebeneinander. Die physikalischen Parameter wurden in dieser Auswertung nicht betrachtet, da keine signifikanten Unterschiede zwischen betrachteten Endpunkten und den physikalischen Parametern festgestellt werden konnten. Die ermittelten Messwerte befinden sich im Anhang in den Tabellen 4-9.

Weiterhin werden die Ergebnisse der Analytik dargestellt und diskutiert.

3.1. HPLC-Analytik

3.1.1. Berechnung der absoluten 2,4-D-Konzentrationen

Die HPLC-Analytik liefert keine direkte Konzentrationsangaben, sondern Flächenwerte, die mit Hilfe einer Kalibrierungsgleichung (Formel 1) umgerechnet wurden.

$$y=23,532*x (1)$$

Zu Beginn des Tests (t_0) wurden nur die Stammlösungen und die höchste Konzentration gemessen. In der Arbeit von Belgers et al. (2006) zeigte sich 2,4-D bei einer Versuchsdauer von 28 Tagen als sehr persistent in Wasser. Somit wurde in dieser Arbeit nach sieben Tagen Versuchsdauer auf eine weitere Messung verzichtet. Die gemessenen Werte von 2,4-D sind in Tabelle 1 dargestellt. Es zeigte sich, dass die gemessenen Realkonzentrationen zu 95% mit den Nominalkonzentrationen übereinstimmen. Weiterhin zeigte sich auch, dass die Startkonzentrationen der drei Testverfahren mit $2,10 \text{ mg L}^{-1}$, $2,10 \text{ mg L}^{-1}$ und $2,11 \text{ mg L}^{-1}$ zu 99,7 % ähnlich waren.

Auf der Grundlage des vorliegenden Ergebnisses wurde darauf verzichtet in der weiteren Auswertung die Realkonzentrationen zu verwenden.

Tabelle 1: Ergebnisse der HPLC-Messungen der höchsten Konzentrationen der Expositionslösungen mit 2,4-D.

	Test 1	Test 2	Test 3
Nominalkonzentration [µg L ⁻¹]	2000	2000	2000
Realkonzentration [µg L ⁻¹]	2099	2099	2107
Differenz [%]	5,0	5,0	5,3
Differenz zwischen den Tests [%]	0,3	0,3	0,3

3.2. Endpunkte

3.2.1. Wurzellänge

Der Test an den vierwöchigen submersen Vorkulturen von *M. aquaticum* deutete mit einer LOEC von 31,25 µg L⁻¹ das sensitivste Verhalten gegen 2,4-D am Endpunkt Wurzelwachstum an. Die einwöchige submerse Vorkultur zeigte eine LOEC von 125 µg L⁻¹ und die emersen Pflanzen eine LOEC von 500 µg L⁻¹ an.

Der Indikator Wurzelwachstum lässt schon in geringen Konzentrationen von 2,4-D hoch signifikante Unterschiede zu den Kontrollen erkennen. Während in den emersen Vorkulturen erst in Konzentrationsbereichen von 500 µg L⁻¹ und 2.000 µg L⁻¹ signifikante Unterschiede gegenüber den Kontrollen auftreten, erkennt man in der einwöchigen submersen Vorkultur, nach gleicher Zeit, bei einem Konzentrationsbereich von 125 µg L⁻¹ signifikante Unterschiede. Die vierwöchigen submersen Vorkulturen zeigten bereits bei einer Konzentration von 31,25 µg L⁻¹ einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen. Mit einem NOEC von 7 µg L⁻¹ ergab sich eine um Faktor 18 sensitivere Prüfkonzentration bei den vierwöchigen submersen Vorkulturen verglichen mit den emersen Vorkulturen. Ebenso zeigten die

einwöchigen submersen Vorkulturen eine um Faktor 4,5 höhere Prüfkonzentration bei einem NOEC von $31,25 \mu\text{g L}^{-1}$ verglichen mit der vierwöchigen Vorkultur. Damit zeigt sich, dass die vierwöchigen submersen Vorkulturen am sensitivsten auf die Prüfsubstanz 2,4-D am Endpunkt Wurzelwachstum reagieren. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Arbeiten von Arts et al. (2007), Knauer et al. (2008) und Doeren (2010), welche in Biotests mit Makrophyten ebenfalls das sensitivste Verhalten am physiologischen Endpunkt Wurzelwachstum beobachten konnten.

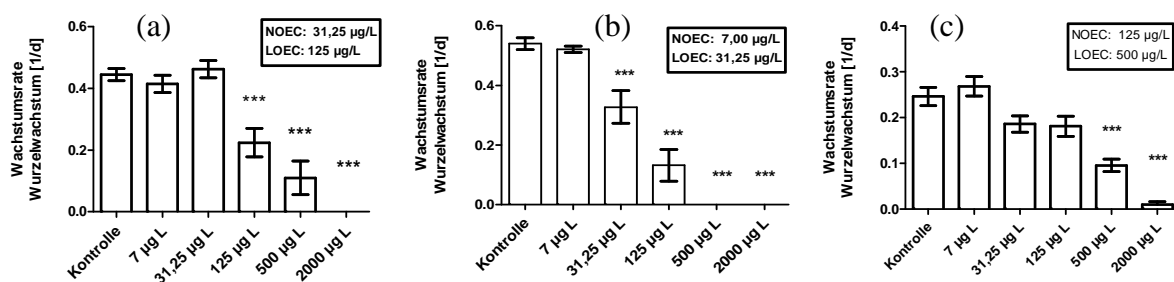


Abbildung 7: Mittlere Wachstumsraten der Wurzellänge für 2,4-D; (a)=einwöchige submerse Vorkultur, (b)=vierwöchige submerse Vorkultur, (c)=emerse Vorkultur. Standardabweichungen sind mittels Balken dargestellt. Signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Dunnett's Multiple Comparison Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$; $n = 9$. Behandlungsstufen beziehen sich auf die nominalen 2,4-D-Konzentrationen**

Die Wachstumsrate der Wurzellänge zeigte beim Zufügen der Substanz Glyphosat einen mittleren signifikanten Unterschied bei einer Konzentration von $4.000 \mu\text{g L}^{-1}$ verglichen mit der Kontrolle bei den emersen Pflanzen. Sowohl die einwöchige als auch die vierwöchige submerse Vorkultur zeigten, verglichen mit den Kontrollen, keine signifikanten Unterschiede in den Verdünnungsstufen. Die Wachstumsraten der einwöchigen submersen Vorkultur zeigten die geringsten Zunahmen im Wurzelwachstum. Demnach treten keine Effekte in den verschiedenen Behandlungsstufen mit Glyphosat auf. Es wird davon ausgegangen, dass die Effekte an den emersen Vorkulturen bei der höchsten Testkonzentration zufällig aufgetreten sind. Dort ergab sich eine NOEC von $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$, welche verglichen mit Daten von Sánchez et al. (2007) deutlich zu hoch erscheint. In deren Arbeit ergaben sich schon in einem Konzentrationsbereich von $250 \mu\text{g L}^{-1}$ gehemmte Wachstumsbedingungen an allen bestimmten Endpunkten. Nach 21 Tagen Expositionszeit konnten sie einen EC_{50} von $250 \mu\text{g L}^{-1}$ am Endpunkt Längenwachstum der Wurzel bestimmen. Auf

Grund der fehlenden Analytik konnten wir die Realkonzentrationen zu Glyphosat nicht bestimmen. Angesichts der schlechten Löslichkeit des Glyphosats in Wasser kann die Vermutung aufgestellt werden, dass sich das Glyphosat nur sehr schlecht löst und daher nur in sehr geringen Konzentrationen in den Expositionslösungen auftrat.

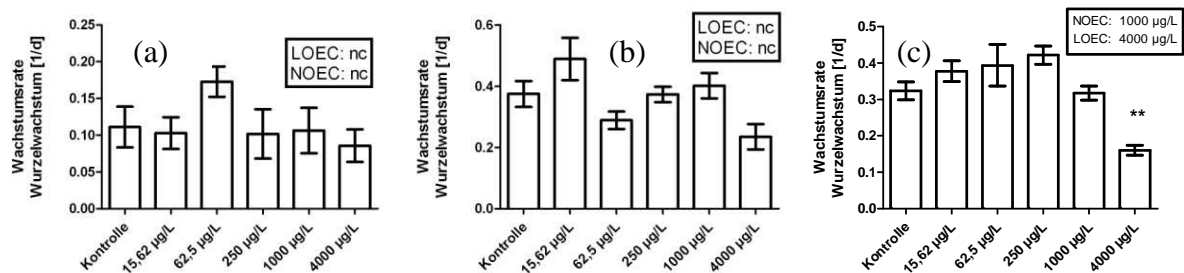


Abbildung 8: Mittlere Wachstumsraten der Wurzellänge für Glyphosat; (a)=einwöchige submerse Vorkultur, (b)=vierwöchige submerse Vorkultur, (c)=emerse Vorkultur. Standardabweichungen sind mittels Balken dargestellt. Signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Dunnett's Multiple Comparison Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$; $n = 9$. Behandlungsstufen beziehen sich auf die nominalen Glyphosat-Konzentrationen**

3.2.2. Längenwachstum

Die mittleren Wachstumsraten der Sprosslänge sind in Abbildung 9 graphisch dargestellt. Die höchste mittlere Wachstumsrate wird bei einer 2,4-D Konzentration von $125 \mu\text{g L}^{-1}$ - $500 \mu\text{g L}^{-1}$ erreicht. Es zeigte sich eine um 100 % erhöhte Wachstumsrate verglichen mit den Kontrollen. Da sich, verglichen mit den Kontrollen, ein erhöhtes Längenwachstum zeigte und nicht, wie erwartet, ein Geringeres, wurde dieser Endpunkt nicht zur Ermittlung der Toxizität herangezogen. Die erhöhte Wachstumsrate mit steigender 2-4-D Konzentration im Medium soll in Kapitel 3.4 (Hormesis) diskutiert werden.

Zu sehen ist, dass beim Endpunkt Wurzelwachstum, bei den submersen Vorkulturen signifikante Unterschiede im Konzentrationsbereich von $31,25 \mu\text{g L}^{-1}$ auftreten, während die emersen Vorkulturen erst ab $125 \mu\text{g L}^{-1}$ signifikante Unterschiede zu den Kontrollen zeigen.

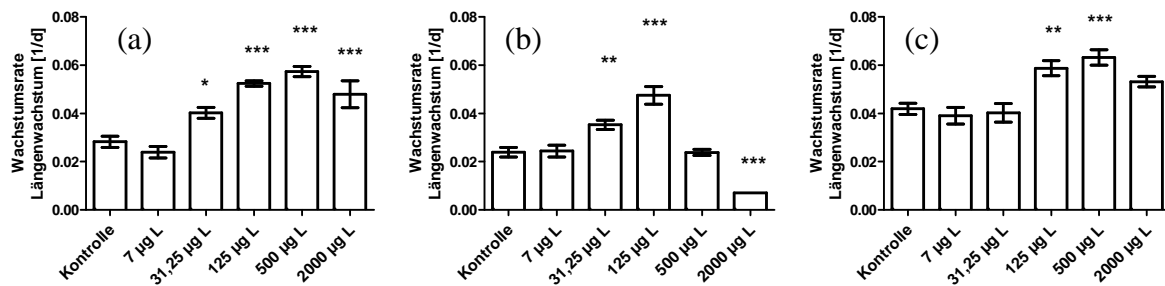


Abbildung 9: Mittlere Wachstumsraten des Längenwachstums für 2,4-D; (a)=einwöchige submerse Vorkultur, (b)=vierwöchige submerse Vorkultur, (c)=emerse Vorkultur. Standardabweichungen sind mittels Balken dargestellt. Signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Dunnett's Multiple Comparison Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$; $n = 9$. Behandlungsstufen beziehen sich auf die nominalen 2,4-D-Konzentrationen**

Die mit Glyphosat exponierten Pflanzen zeigten im Längenwachstum keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen. Das höchste Längenwachstum fand bei der emersen Vorkultur mit einer Wachstumsrate von 0.04 in der Kontrolle statt. Die Arbeit von Sánchez et al. (2007) mit *M. spicatum* zeigte am Endpunkt Längenwachstum ebenfalls bei einer Konzentration von $250 \mu\text{g L}^{-1}$ signifikante Unterschiede zu den Kontrollen bei *M. spicatum*.

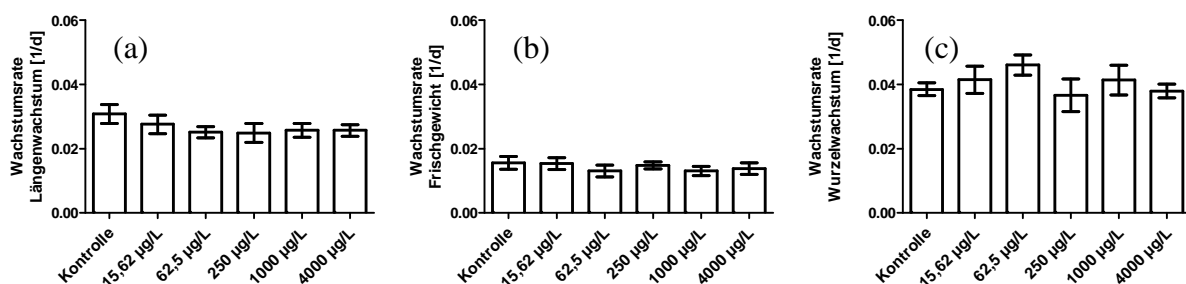


Abbildung 10: Mittlere Wachstumsraten des Längenwachstums für Glyphosat; (a)=einwöchige submerse Vorkultur, (b)=vierwöchige submerse Vorkultur, (c)=emerse Vorkultur. Standardabweichungen sind mittels Balken dargestellt. Signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Dunnett's Multiple Comparison Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$; $n = 9$. Behandlungsstufen beziehen sich auf die nominalen Glyphosat Konzentrationen**

3.2.3. Frischgewicht

Die vierwöchige submerse Vorkultur und die emersen Pflanzen zeigen eine LOEC von $2.000 \mu\text{g L}^{-1}$. Anhand der einwöchigen submerse Vorkulturen sind in den verschiedenen Behandlungsstufen keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen zu erkennen.

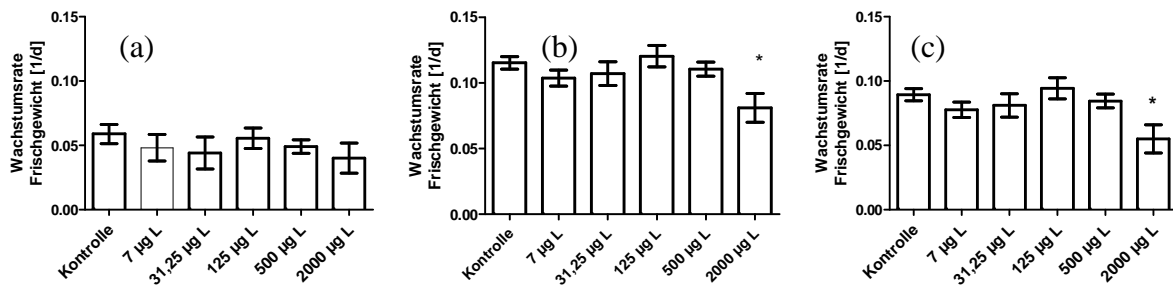


Abbildung 11: Mittlere Wachstumsraten des Frischgewichts für 2,4-D; (a)=einwöchige submerse Vorkultur, (b)=vierwöchige submerse Vorkultur, (c)=emerse Vorkultur. Standardabweichungen sind mittels Balken dargestellt. Signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Dunnett's Multiple Comparison Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$; $n = 9$. Behandlungsstufen beziehen sich auf die nominalen 2,4-D-Konzentrationen**

Mit Ausnahme der vierwöchigen submersen Vorkultur zeigten sich für die Substanz Glyphosat keine signifikanten Wachstumsunterschiede zwischen Expositionslösungen und Kontrollen. Bei der submersen Vorkultur ergaben sich jedoch bei einer Konzentration von $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ hohe signifikante Unterschiede im Wachstumsverhalten und mittlere signifikante Unterschiede zu den Kontrollen bei $250 \mu\text{g L}^{-1}$. Da sich bei weiter steigenden Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede mehr zeigten, vermuten wir, dass es sich um ein zufällig erhöhtes Wachstum an den beiden Konzentrationsstufen handelte. Der Effekt der Hormesis soll hier deswegen auf Grund des einzelnen Auftretens nicht weiter in Betracht gezogen werden.

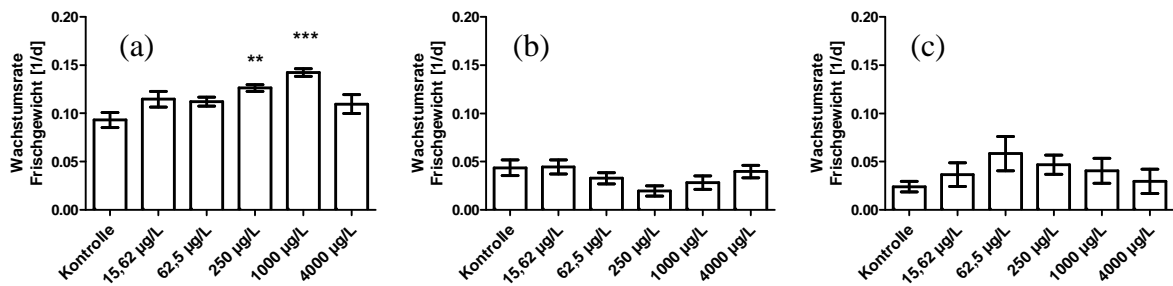


Abbildung 12: Mittlere Wachstumsraten des Frischgewichts für Glyphosat; (a)=einwöchige submerse Vorkultur, (b)=vierwöchige submerse Vorkultur, (c)=emerse Vorkultur. Standardabweichungen sind mittels Balken dargestellt. Signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Dunnett's Multiple Comparison Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; $n = 9$. Behandlungsstufen beziehen sich auf die nominalen Glyphosat- Konzentrationen

3.3. Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen

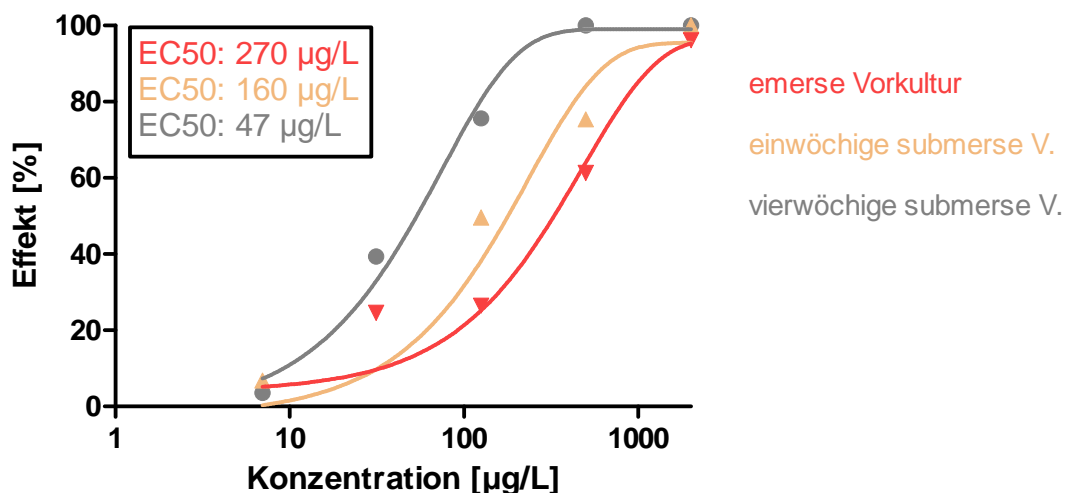


Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen zu 2,4-D. Modellierter Konzentration-Wirkungs-Kurve von 2,4-D anhand des Wurzelwachstums emerser Pflanzen, einwöchiger und vierwöchiger submersen Vorkulturen. Die x- Achse gibt die Konzentrationen die y-Achse den Effekt in % an.

Der Vergleich der EC_{50} -Werte von 2,4-D beim Wurzelwachstum zeigte den sensitivsten Wert bei der vierwöchigen submersen Vorkultur mit $47 \mu\text{g L}^{-1}$. Die einwöchige submerse Vorkultur zeigte mit $160 \mu\text{g L}^{-1}$ ein sensitiveres Verhalten, verglichen mit den emersen Pflanzen mit einem EC_{50} von $270 \mu\text{g L}^{-1}$ (siehe Abb.13). Die vierwöchige submerse Vorkultur reagiert um den Faktor 5 empfindlicher, die

einwöchige submerse Vorkultur um den Faktor 3 empfindlicher im Wurzelwachstum, verglichen mit der emersen Vorkultur.

Die drei Testverfahren zeigten EC_{50} -Werte von 47-270 $\mu\text{g L}^{-1}$ für die Substanz 2,4-D am Endpunkt Wurzelwachstum. Turgut und Formin (2002) zeigten ähnliche EC_{50} -Werte für *M. aquaticum* in einem sedimentfreien System von 50-158 $\mu\text{g L}^{-1}$. Belgers et al. (2006) führten Experimente mit 2,4-D an neun aquatischen Makrophyten durch. In einem sedimentfreien System berechneten sie nach einer Versuchsdauer von 28 Tagen die niedrigsten EC_{50} -Werte von 60-574 $\mu\text{g L}^{-1}$. Es zeigte sich, dass das von uns gewählte Testverfahren (vierwöchige submersen Vorkultur) am sensitivsten auf die Prüfsubstanz 2,4-D reagiert.

3.4. Hormesis

In vielen Experimenten in der Toxikologie und Ökotoxikologie, die mit gleichbleibender Reaktion, wie dem Wachstum, wurde für manche Substanzen in geringen Konzentrationen im Medium eine Wachstumsstimulation festgestellt, während erhöhte Konzentrationen der Substanzen im Medium toxisch wirkten (Van Ewijk, 1992). Dieses Dosis-Wirkungs-Phänomen wird für gewöhnlich Hormesis genannt und ist charakteristisch für viele Herbizide und Phytotoxine (Belz et al. 2010).

Hormesiseffekte sind bei Zugabe von 2,4-D im Längenwachstum zu beobachten. Hormesis wurde für 2,4-D von Belgers et al. (2006) unter anderem bei *M. spicatum* nachgewiesen. Eine niedrige Konzentration von 2,4-D (10 und 30 $\mu\text{g L}^{-1}$) führte bei ihren Versuchen an einigen Endpunkten zu einer Wachstumsstimulation. Auch im durchgeführten Versuch zeigte sich für alle drei Testverfahren ein signifikanter Unterschied im Längenwachstum bei steigender Konzentration von 2,4-D verglichen mit den Kontrollbedingungen. Jedoch traten auch bei höheren Konzentrationen, welche schon einen toxischen Effekt auf die Pflanze haben sollten, unter den Versuchsbedingungen Unterschiede zugunsten eines erhöhten Längenwachstums auf.

Dieser Effekt konnte jedoch nicht an den Endpunkten Wurzelwachstum und Frischgewicht beobachtet werden. Das Wurzelwachstum wird demnach nicht durch den Effekt Hormesis beeinflusst.

Die mit Glyphosat exponierten Pflanzen zeigten nach sieben Tagen keinerlei Effekte. Der Effekt der Hormesis wurde jedoch von Sánchez et al. (2007) und Velini et al. (2012) an *M. aquaticum* gezeigt. Jedoch trat er dann erst nach ca. sechs bis sieben Tagen auf.

In der Arbeit von Sánchez et al. (2007) konnte ein erhöhtes Längenwachstum und eine höhere Anzahl an Nodien bei einer Glyphosat-Konzentration von 1 mg L^{-1} festgestellt werden. Glyphosat stimuliert laterales Wachstum und hemmt die Entwicklung der Scheitelspitze (Sánchez et al. 2007).

3.5. Optische Betrachtung der Pflanzen

Die Pflanzen in der Expositionslösung mit 2,4-D zeigten mit steigenden Konzentrationen der Testsubstanz zum Teil deutliche Schädigungen (siehe Abb. 14-16). Kobraei und White (1996) berichteten von stark geschädigten Pflanzen bei einer Konzentration von $2.000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Auch in der durchgeführten Studie zeigten sich in diesem Konzentrationsbereich ähnliche Auffälligkeiten, an den Pflanzen. Die submersen Vorkulturen lassen im Vergleich zu den emersen auch allein durch eine optische Betrachtung eine starke Schädigung durch die Testsubstanz 2,4-D ersehen.

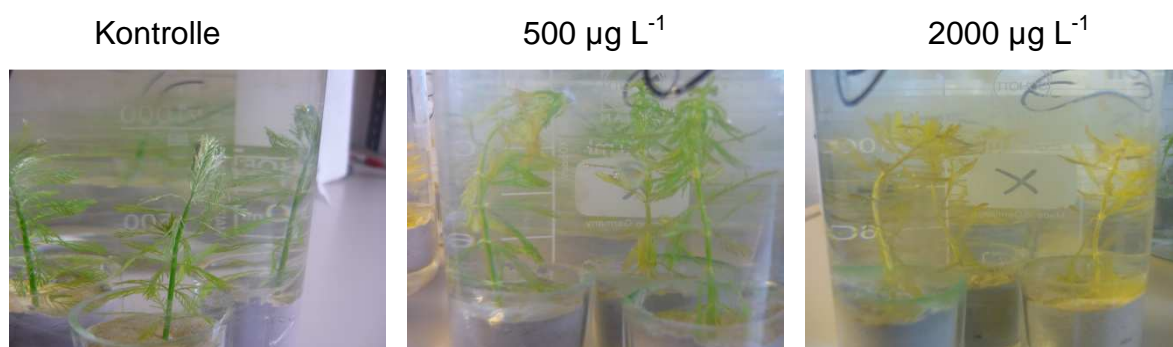


Abb.14: Emerse Vorkultur nach 7 Tagen

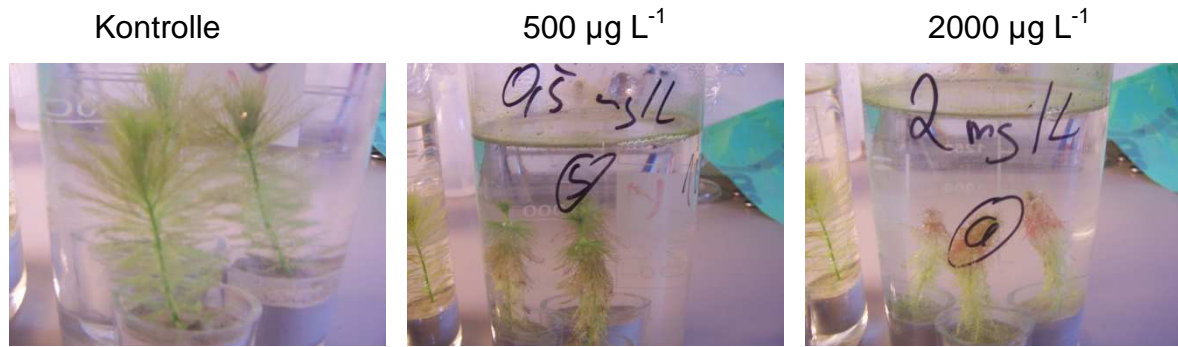


Abb.15: Einwöchige submerse Vorkultur nach 7 Tagen

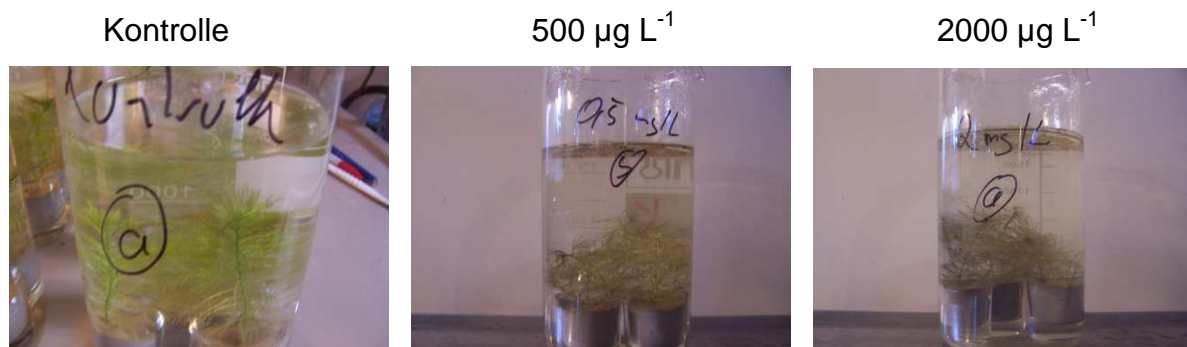


Abb.16: Vierwöchige submerse Vorkultur nach 7 Tagen

Die mit Glyphosat exponierten Pflanzen zeigten keinerlei optische Auffälligkeiten nach sieben Tagen Expositionszeit. Abbildung 17 zeigt den Vergleich der höchsten Testkonzentration ($4.000 \mu\text{g L}^{-1}$) zur Kontrolle an einer vierwöchigen submersen Vorkultur nach 18 Tagen. Wie auch an allen weiteren betrachteten Endpunkten zeigte auch eine optische Betrachtung der Pflanze keine Auffälligkeiten zu den Kontrollen. Bei Sánchez et al. (2007) starben die Pflanzen nach 21 Tagen Exposition mit Glyphosat von $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ ab.

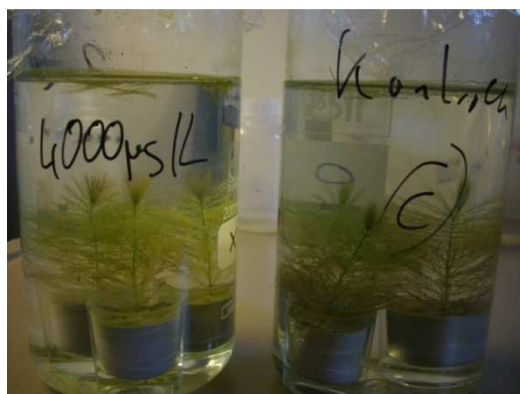


Abb.17: Vierwöchige submerse Vorkultur nach 7 Tagen in Glyphosat

4. Abschließende Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass das Wurzelwachstum in allen Testreihen als sensitivster Parameter, bei der Substanz 2,4-D, auftritt. Die signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen im Parameter „Wachstumsrate Längenwachstum“ sind auf den Effekt der Hormesis zurückzuführen und werden deswegen hier nicht für die Bestimmung der NOEC, der LOEC oder des EC₅₀ angewandt.

Die Wurzeln reagieren sehr sensitiv auf eine Vielzahl von Giftstoffen (Belgers, 2007). Arts et al. (2008) und Doeren (2010) zeigen in ihren Studien, dass das Wurzelwachstum submers wachsender Makrophyten sensitiver gegenüber toxischen Substanzen reagierte als die Sprosslänge oder das Frischgewicht. Wurzeln gehören zu den schnell wachsenden Pflanzengewebe und werden daher sehr schnell von toxisch wirkenden Substanzen beeinflusst (Arts et al. 2008). Bereits Belgers et al. (2007) erwähnen, dass die Wurzellänge als wichtiger Endpunkt für die Sensitivität von Makrophyten auf toxische Substanzen angesehen werden kann. Wurzeln sind weiterhin lebenswichtige Organe für das Wachstum von Makrophyten, weshalb sie auch ökologisch gesehen einen bedeutsamen Faktor darstellen (Arts et al. 2008). Das Wurzelwachstum reagierte in dieser Studie am sensitivsten auf die Testsubstanz 2,4-D und bestätigt damit die aufgestellte Hypothese, dass die Wurzel einer der sensitivsten Endpunkte ist.

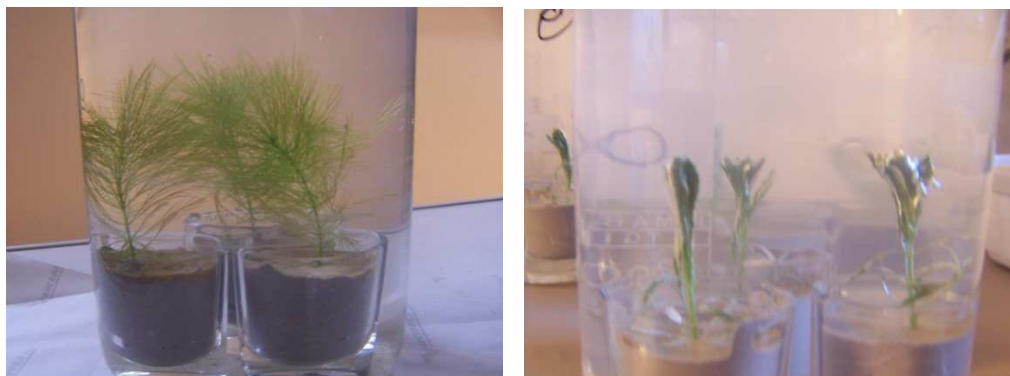


Abb. 18: Testansatz mit vierwöchiger submerser Vorkultur und emerser Vorkultur

Bei *M. aquaticum* sind nur die emersen Pflanzenteile dicht mit Wachsplättchen bedeckt. Hierdurch erhalten diese ihre hohe wasserabweisende Eigenschaft (siehe Abb. 18), aufgrund derer sich beim Eintauchen in Wasser eine Lufthülle bildet. (Neinhuis & Barthlott, 1997). Diese wasserabweisende Schicht kann als Barriere für Schadstoffe dienen und die emersen Pflanzen innerhalb der ersten Versuchswoche vor einer Schadaufnahme schützen (Feige, 2011). Abbildung 18 zeigt, das Verhalten der vierwöchigen submersen Vorkultur und der emersen Vorkultur beim Eintauchen ins Wasser. Die große Oberfläche der submersen Vorkultur und die deutlich erkennbare Lufthülle der emersen Vorkultur verdeutlichen die aufgestellte Hypothese einer erhöhten Schadstoffaufnahme an submersen Vorkulturen.

Diese Hypothese konnte im Verlauf dieser Arbeit am Endpunkt Wurzelwachstum mit der Testsubstanz 2,4-D bestätigt werden.

Auch in den Arbeiten von Doeren (2010) und Feige (2011) konnte bei submersen Vorkulturen von *M. aquaticum* mit den Testsubstanzen Atrazin und 2,4-D ein sensitiveres Verhalten der Pflanze, im Vergleich zu emersen Vorkulturen festgestellt werden.

4.1. Analytik

In dieser Arbeit konnte keine begleitende Analytik für die Versuche mit Glyphosat durchgeführt werden. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Glyphosat im Steinberg-Medium ist davon auszugehen, dass es sich um eine wesentlich geringere Realkonzentration in den Testläufen gehandelt haben muss. Eine begleitende Analytik mittels HPLC-Fluoreszenzdetektor oder HPLC-MS könnte Aufschluss über die Realkonzentrationen geben und eine Einschätzung zur Toxizität ermöglichen.

Weiter wäre die Verwendung eines Lösungsvermittlers für Glyphosat möglich. Lösungsvermittler, wie beispielweise DMSO, Methanol oder Ethanol bringen die Substanz zwar in Lösung, können jedoch schon in geringen Konzentrationen zu Effekten an den Versuchspflanzen führen. Stratton & Smith (1988) und Koch et al. (1995) zeigten bereits, dass Lösungsmittel Stress auf einen Organismus ausüben können.

Die Substanz 2,4-D lässt sich mittels HPLC in wässrigen Proben sehr gut nachweisen. Auch ein Nachweis im Spurenbereich wäre mit einem vorangegangenen Extraktionsverfahren möglich gewesen, jedoch einhergehend mit einem höheren Zeitaufwand und einer höheren Probenmenge.

5. Zusammenfassung

Über AMRAP (Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides) wird für *Myriophyllum aquaticum* ein Makrophytentest zur Risikoabschätzung von Herbiziden vorgeschlagen, der in bestimmten Fällen ergänzend zum *Lemna sp.* (OECD 221) herangezogen werden soll.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss unterschiedlicher Vorhälterungen (emerse, submerse Vorkulturen) auf die Toxizität von Herbiziden auf *M. aquaticum* geprüft werden. Weiterhin sollte die Eignung verschiedener Endpunkte (Längenwachstum, Wurzelwachstum, Frischgewicht, physikalische Parameter) zur Bestimmung von Toxizitätsbeiwerten ermittelt werden.

Dafür wurden einwöchige Gefäßversuche mit den Testsubstanzen 2,4-D und Glyphosat an emersen und submersen Vorkulturen von *M. aquaticum* in fünf verschiedenen Konzentrationsstufen und einer Kontrollstufe durchgeführt.

Nach sieben Tagen, dem Versuchsende, wurden sowohl die physikalischen Parameter (pH, Sauerstoff und Leitfähigkeit) als auch die toxikologischen Endpunkte (Längenwachstum, Wurzelwachstum und Frischgewicht) aufgenommen und die einzelnen Behandlungsstufen mit den Kontrollen verglichen.

Es zeigte sich, dass für die Prüfsubstanz 2,4-D das Wurzelwachstum als sensitivster Endpunkt reagierte. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zu den emersen Vorkulturen, die submersen Vorkulturen sensitiver auf die Behandlungsstufen reagierten.

Für die Testsubstanz Glyphosat konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. Auf Grund der schlechten Löslichkeit von Glyphosat in Wasser wurde angenommen, dass es zu keiner, bzw. zu einer sehr geringen Löslichkeit kam. Wegen technischer Probleme konnte keine begleitende Analytik der Expositionslösungen mit Glyphosat durchgeführt werden.

6. Literatur

- Arts, Gertie H.P., Belgers, J. Dick M., Hoekzema, Conny H., Thissen, Jac T.N.M. (2008). Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. *Environmental Pollution* 154, 199-206
- Arts, Gertie H.P., Buijse-Bogdan, L.L., Belgers, J.D.M., van Rhenen-Kersten C.H., van Wijngaarden, R.P.A., Roessink, I., Maund, S.J., van den Brink, P.J., Brock, T.C.M. (2006). Ecological impact in ditch mesocosms of simulated spray drift from a crop protection program for potatoes. *Integr. Environ. Assess Manag.* 2(2):105-125
- Baktheari, S., Shirvani, M., Shariatmadari, M. (2012). Characterization and 2,4-D adsorption of sepiolite nanofibers modified by N-cetylpyridinium cations. *Microporous and Mesoporous Materials* 169, 30-36
- Belgers, J. Dick M., Lieverloo, Van Ruud J., Van der Pas, Leo J.T., Van den Brink, Paul J. (2007). Effects of the herbicide 2,4-D on growth of nine aquatic macrophytes. *Aquatic Botany* 86, 260-268
- Belz, R.G., Cedergreen, N., Duke, S.O. (2011). Herbicide hormesis-can it be useful in crop production? *Weed Research* 51, 321-332
- Belz, Regina G., Cedergreen, Nina (2010). Parthenin hormesis in plants depends on growth conditions. *Environmental and Experimental Botany* 69, 293-301
- Brock, T.C.M., Lahr, J., Van den Brink, P.J. (2000). Ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems (Part 1: Herbicides). *Alterra-Rapport* 088
- Doeren, L. (2010). Entwicklung von in-Vivo Biotests mit submersen und emersen Makrophyten. Dissertation, Freiburg (Dissertation an der Fakultät für Biologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg)
- Fairchild, J. F.; Ruessler, D. S. & A. R. Carlson (1998): Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor and metolachlor. In: *Environmental Toxicology and Chemistry* 17/9. Seiten: 1830-1834.
- Feige, D. (2011). Untersuchungen verschiedener Aspekte in Makrophytentests mit *Myriophyllum aquaticum* in der Risikobewertung von Chemikalien. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- Feiler, Ute, Kirchesch, Ilona, Heininger, Peter (2004). A New Plant-based Bioassay for Aquatic Sediments. *Journal Soils and Sediments* 4 (4) 231-266

- Gilliom, R. J.; Barbash, J. E.; Crawford, C. G.; Hamilton, P. A.; Martin, J. D.; Nakagaki, N.; Nowell, L. H.; Scott, J. C.; Stackelberg, P. E.; Thelin, G. P. & D. M. Wolock (2006): The quality of our nation's waters – pesticides in the nation's streams and ground water, 1992-2001. U.S. Geological Survey Circular 1291.
- Hussner, A. (2009). Growth and photosynthesis of four invasive aquatic plant species in Europe. *Weed Research* 49, 506-515
- ISO/DIS 20079 (2003): Water quality - Determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*) - Duckweed growth Hemmung test (ISO TC 147/SC5).
- Knauer, K., Mohr, S., Feiler, U. (2007). Comparing growth development of *Myriophyllum* spp. In laboratory and field experiments for ecotoxicological testing. *Environ Sci Pollut Res* 15:322-331
- Knauert, S., Singer, H., Hollender, J., Knauer, K. (2010). Phytotoxicity of atrazine, isoproturon and diuron to submersed macrophytes in outdoor mesocosms. *Environmental Pollution* 158, 167-174
- Knauert, S., Dawo, U., Hollender J., Hommen, U., Knauer, K. (2009). Effects Of Photosystem II Inhibitors And Their Mixture On Freshwater Phytoplankton Succession In Outdoor Mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(4):836-845
- Kobraei, M.E., White, D.S. (1996). Effects of 2,4-D acid on Kentucky algae: Simultaneous laboratory and field toxicity testing. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31(4): 571-580
- KOCH, U., D. GLATZLE, F. RINGENBACH, T. DUNZ, T. STEGER-HARTMANN u. E. WAGNER (1995): Measurement of ion leakage from plant cells in response to aquatic pollutants. In: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 54, S. 606-613
- Maltby, L.; Arnold, D.; Arts, G.; Davies, J.; Heimbach, F.; Pickl, C. & V. Poulsen (Hrsg.) (2010): *Aquatic macrophyte risk assessment for pesticides*. CRC Press, New York. 156 Seiten.
- NEINHUIS, C. u. W. BARTHLOTT (1997): Characterization and Distribution of Waterrepellent, self-cleaning plant surfaces. In: *Annals of Botany* 79, S. 667-677
- OECD (2002): OECD Guidelines for the testing of chemicals. Revised proposal for a new guideline 221 - *Lemna* sp. Growth Hemmung test. Draft guideline 221. www.oecd.org (abgerufen: 12/2011)
- ROSLYCKY, E.B.(1982). Glyphosate and the response of the soil microbiota. *Soil Biology and Biochemistry Amsterdam*, v. 14, p. 87-92.

- Sánchez, D., Graca, M.A.S., Canhoto, J. (2007). Testing the Use of the Water Milfoil (*Myriophyllum spicatum* L.) in Laboratory Toxicity Assay. *Bull Environ Contam Toxicol* 78:421–426
- Shaner, D.L., Henry, W.B., Krutz, L.J., Hanson, B. (2007). Rapid assay for detecting enhanced atrazine degradation in soil. *Weed Science* 55(5): 528-535
- Stratton, G. W. u. T. M. Smith (1988): Interaction of organic solvents with the green alga *Chlorella pyrenoidosa*. In: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 40, S. 736-742
- Turgut, C., Fomin, A. (2002). Sensitivity of the rooted macrophyte *Myriophyllum Aquaticum* (Vell.) Verdcourt to seventeen pesticides determined of the basis of E50. *BULLETIN OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY* 69(4):601-608
- VanEwigh, P.H., Hokestra, J.A.(1993). Calculation of the EC50 and its confidence-interval when subtoxic stimulus is present. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 25(1):25-32
- Velini, Edivaldo D., Trindade, Maria L. B., Barberies, Luis Rodrigo M., Duke, Stephen O. (2010). Growth Regulation and other Secondary Effects of Herbicides. *Weed Science* 58:351-354
- Velini, E.D., Trindade, M.L.B., Barberies, L.R.M., Duke, S.O. (2012). Growth Regulation and Other Secondary Effects of Herbicides. *Weed Science* 58:351-354

Anhang

**Tabelle 2: Zusammensetzung des künstlichen Sediments.
OECD-Sediment modifiziert nach Feiler (2008)**

Substanz	g kg ⁻¹ Trockengewicht	Bemerkung
Quarzsand	750	F36
Kaolin	200	
Torf	50	auf < 1mm gesiebt

Je kg Trockengewicht werden 10 % CaCO₃ zur pH Anpassung zugefügt.

**Tabelle 3: Zusammensetzung des Steinberg-Mediums.
Modifiziert nach Altenburger (1998). Alle Substanzen entsprechend der Qualität pro analysi.**

	Substanz	Konzentration [g L ⁻¹]
	<i>Stammlösung 1</i>	
	KNO ₃	17,50
	KH ₂ PO ₄	4,5
Makroelemente (50fach konzentriert)	K ₂ HPO ₄	0,63
	<i>Stammlösung 2</i>	
	MgSO ₄ *7 H ₂ O	5,0
	<i>Stammlösung 3</i>	
	Ca(NO ₃) ₂ *4 H ₂ O	14,75
	<i>Stammlösung 4</i>	
	H ₃ BO ₃	120,0
	ZnSO ₄ *7 H ₂ O	180,0
Mikroelemente (1000fach konzentriert)	Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	44,0
	MnCl ₂ *4 H ₂ O	180,0
	<i>Stammlösung 5</i>	
	FeCl ₃ *6 H ₂ O	760
	Titriplex 3 (EDTA)	1500

Tabelle 4 : Physikalischen Parameter 2,4-D vier-Wochen submers

		O2 Beginn	O2 Ende	pH Beginn	pH Ende	Leitfähigkeit Beginn	Leitfähigkeit Ende
Kontrolle	1	8,03	8,11	6,13	7,86	450	495
	2	8,09	8,11	6,03	7,93	448	485
	3	8,04	8,18	6,14	7,97	448	488
7 µg/L	1	8,05	8,15	6,05	7,96	442	478
	2	8,05	8,15	6,02	7,95	444	480
	3	8,03	8,09	6,13	7,96	448	481
31,25 µg/L	1	8,25	8,34	6,14	8,12	449	498
	2	8,23	7,71	6,05	7,86	440	487
	3	8,29	8,71	6,08	8,27	440	468
125 g/L	1	8,34	8,97	6,03	8,38	443	469
	2	8,31	8,59	6,08	8,22	442	474
	3	8,41	8,25	6,09	8,14	444	476
500 µg/L	1	8,37	7,96	6,18	8,09	448	470
	2	8,42	8,36	6,20	8,57	447	441
	3	8,45	8,23	6,20	8,2	448	479
2000 µg/L	1	8,41	9,45	6,21	8,68	450	450
	2	8,41	7,95	6,23	8,16	450	469
	3	8,48	9,5	6,23	8,93	451	446

Tabelle 5: Physikalische Parameter 2,4-D eine-Woche submers

		O2 Beginn	O2 Ende	pH Beginn	pH Ende	Leitfähigkeit Beginn	Leitfähigkeit Ende
Kontrolle	1	9,31	11,22	6.176	8.199	440	486
	2	9,34	11,49	6.172	8.240	441	466
	3	9,3	11,28	6.124	8.342	439	464
7 µg/L	1	9,33	11,78	6.110	8.407	442	457
	2	0,93	11,93	6.100	8.424	440	466
	3	9,09	11,48	6.127	8.398	448	469
31,25 µg/L	1	9,11	11,49	6.092	8.381	446	466
	2	8,95	11,26	6.082	8.350	446	467
	3	8,91	11,19	6.141	8.426	448	460
125 g/L	1	9	10,78	6.129	8.212	446	476
	2	8,92	12,12	6.035	8.442	420	480
	3	8,96	11,98	6.147	8.465	418	478
500 µg/L	1	8,99	11,39	6.060	8.339	420	452
	2	8,98	11	6.059	8.297	421	484
	3	8,99	11,56	1.104	8.289	422	471
2000 µg/L	1	9,02	11,96	6.052	8.393	423	451
	2	9,09	12,64	6.036	8.345	420	453
	3	9,08	12,08	6.093	8.294	422	464

Tabelle 6: Physikalische Parameter 2,4-D emers

		O2 Beginn	O2 Ende	pH Beginn	pH Ende	Leitfähigkeit Beginn	Leitfähigkeit Ende
Kontrolle	1	8,11	7,91	6,126	7,980	452	486
	2	8	7,64	6,030	7,960	440	482
	3	7,99	7,43	6,035	8,000	450	481
7 µg/L	1	8,01	8,27	6,010	7,940	447	479
	2	8,02	7,42	6,018	8,080	451	467
	3	8,04	7,4	6,014	7,970	450	487
31,25 µg/L	1	8,35	7,74	6,148	9,720	448	479
	2	8,45	7,35	6,138	8,100	451	481
	3	8,3	8,12	6,043	8,000	448	475
125 g/L	1	8,41	7,52	6,069	7,960	451	481
	2	8,47	9,08	6,127	7,960	448	480
	3	8,43	7,42	6,135	8,230	449	462
500 µg/L	1	8,47	8,28	6,241	8,120	450	475
	2	8,41	9	6,239	8,140	450	471
	3	8,45	8,12	6,236	8,050	449	466
2000 µg/L	1	8,46	7,99	6,242	8,090	446	472
	2	8,45	8,85	6,252	7,850	448	475
	3	8,51	7,63	6,251	8,050	445	481

Tabelle 7: Physikalische Parameter Glyphosat vier-Wochen submers

		O2 Beginn	O2 Ende	pH Beginn	pH Ende	Leitfähigkeit Beginn	Leitfähigkeit Ende
Kontrolle	1	8,09	14,16	6,156	8.783	454	483
	2	8,1	13,82	6,111	8.702	440	461
	3	8,18	14,7	6,105	9.368	442	437
15,625 µg/L	1	8,2	14,34	6,074	8.939	433	451
	2	8,23	14,24	6,129	9.018	430	437
	3	8,18	15,95	6,093	9.587	440	438
62,5 µg/L	1	8,23	14,08	6,069	8.935	435	465
	2	8,29	13,52	6,078	8.895	438	462
	3	8,23	12,9	6,093	8.848	435	466
250 g/L	1	8,23	14,35	6,046	9.083	438	444
	2	8,08	13,61	6,031	8.748	441	465
	3	8,02	14,38	6,202	9.149	440	442
1000 µg/L	1	8,01	13,23	6,137	8.722	443	465
	2	8,01	14	6,090	8.981	439	464
	3	8,03	13,98	9,103	8.929	440	452
4000 µg/L	1	8,04	14,97	6,001	9.058	442	443
	2	7,97	14,97	5,919	9.121	440	439
	3	8,01	15,72	5,890	9.566	444	427

Tabelle 8: Physikalische Parameter Glyphosat eine-Woche submers

		O2 Beginn	O2 Ende	pH Beginn	pH Ende	Leitfähigkeit Beginn	Leitfähigkeit Ende
Kontrolle	1	9,33	10,45	6,11	7,93	480	517
	2	9,35	10,61	6,033	8,12	460	493
	3	9,36	11,57	6,011	7,92	458	496
15,625 µg/L	1	9,33	11,47	5,992	8,13	460	489
	2	9,35	11,34	5,982	8,81	460	?
	3	9,37	13,46	5,982	8,54	460	469
62,5 µg/L	1	9,34	11,28	5,977	7,88	452	500
	2	9,32	12,39	5,959	8,18	452	495
	3	9,33	10,95	5,963	8,20	451	514
250 g/L	1	9,33	14,14	5,951	8,45	452	479
	2	9,33	14,30	5,942	8,49	453	474
	3	9,31	14,44	5,963	8,42	452	484
1000 µg/L	1	9,27	11,90	5,883	8,10	448	480
	2	9,28	12,63	5,864	8,44	450	485
	3	9,25	13,15	5,858	8,55	450	465
4000 µg/L	1	9,17	12,28	5,576	8,23	455	482
	2	9,12	14,19	5,491	8,14	451	476
	3	9,12	11,60	5,455	8,08	452	490

Tabelle 9: Physikalische Parameter Glyphosat emers

		O2 Beginn	O2 Ende	pH Beginn	pH Ende	Leitfähigkeit Beginn	Leitfähigkeit Ende
Kontrolle	1	8,85	9,90	6,90	7,63	460	496
	2	8,85	10,84	6,90	7,89	459	496
	3	8,85	9,51	6,91	7,79	458	494
15,625 µg/L	1	8,64	9,22	6,79	7,78	465	499
	2	8,65	9,95	6,95	7,87	463	505
	3	8,60	10,24	6,89	7,94	461	497
62,5 µg/L	1	8,62	9,24	6,86	7,87	462	503
	2	8,64	9,66	6,97	7,87	464	506
	3	8,64	9,19	6,95	7,92	463	511
250 g/L	1	8,60	8,88	6,91	7,86	450	488
	2	8,59	10,01	6,87	7,90	449	491
	3	8,60	8,92	6,93	7,88	453	500
1000 µg/L	1	8,56	9,32	6,86	7,82	458	488
	2	8,54	10,55	6,82	7,92	448	484
	3	8,58	9,12	6,87	7,87	450	492
4000 µg/L	1	8,44	9,37	6,80	7,81	448	484
	2	8,42	9,43	6,78	7,84	448	486
	3	8,39	9,15	6,80	7,82	450	492



Abb.19: Versuchsdurchführung in einem 450 l Aquarium

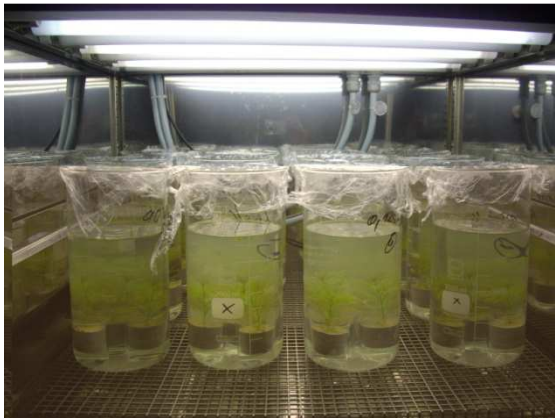


Abb.20: Versuchsdurchführung in der Klimakammer