

Characeen als Objekte ökotoxikologischer Untersuchungen

ANETTE KÜSTER & ROLF ALTENBURGER

Zusammenfassung

Ein fluoreszenzbasiertes Imaging-PAM wurde angewandt, um ein schnell einsetzbares Biotestsystem für Makroalgen und Makrophyten zu entwickeln. Durch den Einsatz von Multiwell-Titerplatten ermöglicht das Imaging-PAM die gleichzeitige Messung von bis zu 24 Proben. Die Fluoreszenzwerte der Characeenart *Chara canescens* nach verschiedenen Inkubationszeiten des Herbizides Atrazin zeigten bereits nach 5-24 Stunden konstant bleibende Werte, die mit bereits veröffentlichten Werten an anderen Makrophytenarten vergleichbar sind. Dadurch kann das Imaging-PAM als erfolgsversprechendes Messgerät diskutiert werden, dass schnelle Schadstoffuntersuchungen für hohe Probenanzahlen möglich machen kann.

Abstract

A fluorescence-based measuring device (Imaging-PAM) was applied to establish a spontaneous and fast bioassay for macroalgae and macrophytes. The Imaging-PAM enables the parallel measurement of up to 24 samples in multiwell-plates. Different incubation times with the herbicide atrazine on the charophyte species *Chara canescens* showed constant median effect concentrations (EC50) after 5-24 h and were in accordance with literature findings for other macrophyte species. Hence, the Imaging-PAM is a promising tool to allow fast chemical effect screening for high amounts of samples with little time and material basis.

Keywords: Characeen, Biotestung, Imaging-PAM, Fluoreszenz

1 Einleitung

Die ökotoxikologische Risikoabschätzung von Schadstoffen wird heutzutage im pflanzlichen Bereich vorwiegend an Mikroalgen oder an in Gewässern häufig verbreiteten Makrophytenarten der Gattungen *Elodea*, *Potamogeton*, *Ceratophyllum* und *Myriophyllum* durchgeführt (CEDERGREEN & al. 2004, GEOFFROY & al. 2004, MARWOOD & al. 2001). Im Bereich der Makrophyten existiert bis heute nur ein standardi-

siertes Testsystem der aquatischen höheren Pflanze *Lemna minor* (ISO/DIS 20079). Die bestehenden Textsysteme für Makroalgen und Makrophyten sind jedoch aufgrund langsamer Wachstumsraten der Organismen sehr zeitaufwendig. Häufig werden umfangreiche experimentelle Aufbauten von Aquarien, Mesokosmen oder Fließgerinnen mit Wasservolumina von 1-200 L aufgebaut, in die große Mengen an Schadstoffen eingebracht werden müssen, um effektive Testkonzentrationen zu erreichen. Aufgrund der langsamen Wachstumsraten der makroskopischen Organismen kann die Expositionszeit der Schadstofftestung bis zu drei Wochen betragen, in denen konstante Testbedingungen wie stabile Nährstoff- und pH-Bedingungen eingehalten werden müssen. Eine schnelle und routinemäßig einsetzbare Analyseverfahren zur Indikation von Schadstoffwirkungen auf Makroalgen und Makrophyten wurde bisher jedoch nicht entwickelt. Ein weitverbreiteter Ansatz zur Untersuchung der toxischen Wirkung von Schadstoffen ist die Beobachtung der Hemmung von biologischen Parametern wie der Photosynthese oder des mitochondrialen Elektronentransportes. Ist der Photosyntheseapparat durch Umweltschadstoffe gehemmt, so zeigen sich Änderungen der Physiologie der Pflanzenzelle, des Wachstums und des Biomassezuwachses. Chemische Stressoren können den Elektronentransport der Photosysteme, des Cytochrom-b6/f-Komplexes unterbrechen, die Chloroplastenstruktur ändern oder die Chlorophyllkonzentration verringern (HILL & al. 2004, HUANG & al. 1997). Daher wird heute die praktische Anwendung der Chlorophyll-a-Fluoreszenz als schneller und sensitiver Biomarker für Pflanzenstress in Abhängigkeit von verschiedenen chemischen Faktoren intensiv untersucht. Ein entscheidender Vorteil dieser fluoreszenz-basierten Messtechnik ist, dass sie eine nicht-invasive in vivo Untersuchung

von Veränderungen im Photosyntheseapparat ermöglicht, die wesentlich früher detektierbar ist als das Auftreten von sichtbaren Effekten. Während der letzten Jahrzehnte wurden daher die fluoreszenz-basierten Messtechniken stetig weiterentwickelt und die verwendeten Messprinzipien reichen heute von relativ einfachen Lichtmodulationsansätzen bis hin zu fortgeschrittenen Bildsystemen zur Untersuchung von Pflanzenproben (Imaging-PAM). Ein entscheidender Vorteil des Imaging-PAMs ist die Erfassung sehr großer Probenanzahlen innerhalb kürzester Zeit. Hierzu können bis zu 96 Proben in Multiwell-Platten inkubiert und parallel gemessen werden. In dieser Arbeit werden erste Ergebnisse zur Entwicklung und Anwendung des Imaging-PAMs als Testsystem für Schadstoffeinwirkungen mit kurzen Inkubationszeitent und großer Probenanzahl präsentiert. Als Testorganismen wurden Exemplare der bundesweit unter Schutz stehenden Characeenart *Chara canescens* (Desv. et Loisel. in Loisel.) verwendet. Ergebnisse zu Untersuchungen mit weiteren in Deutschland verbreiteteren Characeenarten werden folgen.

2 Methoden

2.1 Probenaufbereitung und Schadstofftestung

Die Characeen wurden im Gebiet des Mansfelder Landes, Sachsen Anhalt, entnommen und nach KRAUSE (1997) bestimmt. Exemplare der Art *Chara canescens* wurden in Sediment und Wasser des Fundortes in Glassaquarien (5 L) gepflanzt und in eine Klimakammer mit einer konstanten Lufttemperatur von 20 °C überführt (VB1514, Vötsch, Deutschland).

Um die Fluoreszenzhemmung der Proben zu untersuchen, wurden apikale Wirtel von *Chara canescens* in 24 well Titerplatten überführt und mit je 2 ml des Herbizides Atrazin inkubiert. Die phytotoxische Wirkung dieses Herbizides basiert auf der Störung des Elektronentransportes im Photosystem II. Atrazin wird weltweit zur Unterdrückung von annuellen Gräsern und Unkräutern eingesetzt und konnte in vielen Oberflächengewässern und im Grundwasser nachgewiesen werden (SOLOMON & al. 1996). Daher liefert es idea-

le Referenzbedingungen zum Verstehen der Beziehung von Schadstoffeinwirkungen unter realen Umweltbedingungen (SCHMITT-JANSEN & al. 2005). Das Herbizid Atrazin wurde in einer seriellen Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor 1:2) von 0,015-1,921 mg/L zugegeben. Die Inkubationszeiten lagen im Zeitraum von 1 h, 5h und 24 h, um die notwendige Zeitskala für die Gefahrenbeurteilung des Schadstoffes auf *Chara canescens* zu definieren.

2.2 Fluoreszenzmessungen mittels Imaging-PAM und Validierung der Ergebnisse

Die Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen wurden mittels eines Maxi-Imaging-PAM Chlorophyll-Fluorometers (Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland) durchgeführt (detaillierte Beschreibung der Messmethode siehe GRUNWALD & KÜHL 2004). Die Kalkulation des Fluoreszenzparameters $\Delta F/F_m'$ (effektiver Quantenyield des PSII) wurde gemäß GENTY & al. (1989) und KROMKAMP & FORSTER (2003) durchgeführt. Anhand der Beziehung von Fluoreszenzhemmung zu den Kontrollansätzen konnten Konzentrations-Effekt Beziehungen durch die log-logistische Analyse $[Y = A_2 + (A_1 - A_2)/(1 + (x/x_0)^p)]$ berechnet werden, wobei A_1 maximaler Effekt, A_2 minimaler Effekt, x die Konzentration, p die Steigung und y den Effekt bezeichnen. Anhand der Konzentration bei der 50 % des maximal erreichbaren Effektes zu verzeichnen war (x_0 , häufiger als EC50 bezeichnet), wurde abschließend ein Vergleich der Inkubationszeiten vorgenommen.

3 Ergebnisse und Diskussion

Das Imaging-PAM wurde eingesetzt um zu beurteilen, ob es im Rahmen von ökotoxikologischen Untersuchungen als Detektionssystem für Schadstoffauswirkungen in Biotesten mit i) großer Probenanzahl und ii) kurzen Inkubationszeiten angewendet werden kann.

Zur Untersuchung der routinemäßig einsetzbaren Probenanzahl wurden maximal 24 Exemplare (je 2-3 apikale Wirtel) der Characeenart *Chara canescens* in seriellen Verdünnungen des Herbizides Atrazin in multiwell-Platten inkubiert (Abb. 1).

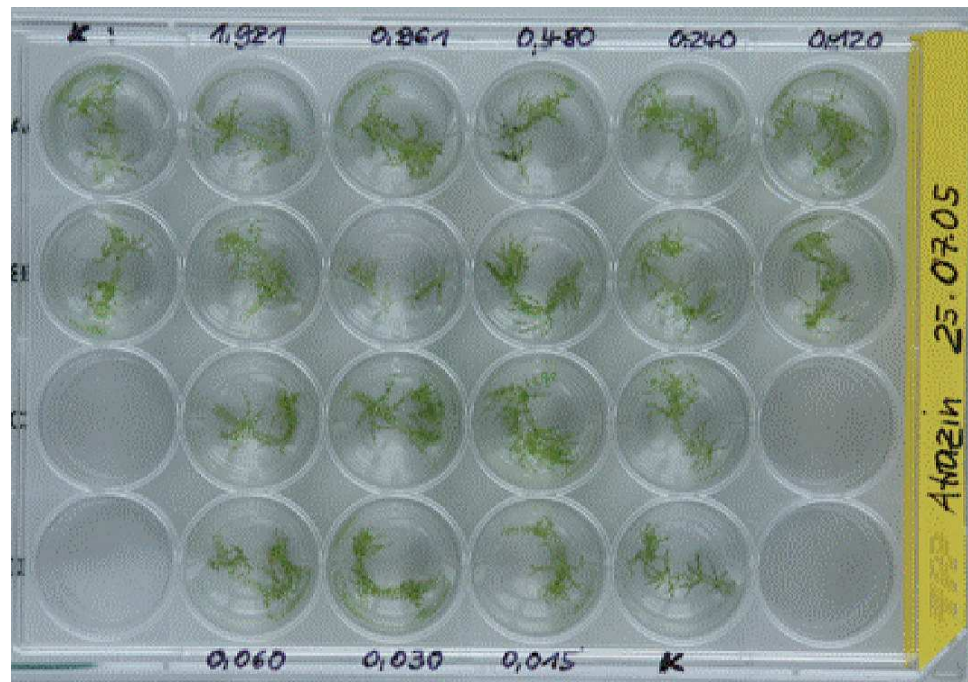


Abb. 1: Aufbau eines Plattentestes mit *Chara canescens*. Das Herbizid Atrazin wurde in serieller Verdünnung von 0,015–1,921 mg/L in je zwei untereinanderliegenden Wells appliziert. Die vier Kontrollansätze sind durch K gekennzeichnet.

Der Ansatz dieser Atrazin-Testreihe in 24-well Platten zur Imaging-PAM Testung (Abb. 1) macht deutlich, dass das üblicherweise zur Makrophytentestung verwendete Testvolumen pro Konzentration (250 mL - 50 L, CEDERGREEN & al. 2004) auf ein Testvolumen von 2 mL pro Well verringert werden konnte. Ebenfalls minimiert werden konnte die für einen Testansatz erforderliche Schadstoff- bzw. Umweltprobenmenge, um effektive Testkonzentrationen und konstante Testbedingungen aufrecht zu halten. Die fluoreszenz-basierten Messungen mit dem Imaging-PAM umfassten bei einer dreimaligen Wiederholung der Messung pro Platte einen Zeitrahmen von maximal 30 Minuten. Das Imaging-PAM ermöglicht somit die maximale Messung von sieben Schadstoffkonzentrationen plus einem Kontrollansatz mit dreimaliger Wiederholung in weniger als einer halben Stunde und repräsentiert somit ein auch kurzfristig einsetzbares Messgerät zur Quantifizierung von Schadstoffwirkungen auf Makroalgen und Makrophyten.

Die Fluoreszenzparameter von *Chara canescens* wurden nach minimal 1 h Inkubation mit dem Herbizid Atrazin mittels der Sättigungspulsmethode durch das Imaging-PAM vermessen. Die Abbildung 2 zeigt die durch

das Photosystem II Herbizid verursachte Fluoreszenzvariabilität der inkubierten Proben.

Die Applikation von Atrazin in einer seriellen Konzentrationsreihe zeigte bereits nach 1 h deutliche Effekte auf den untersuchten Fluoreszenzparameter $\Delta F/F_m'$ (Abb. 2). Die Kontrollansätze von *C. canescens* zeigten einen effektiven Quantenyield von 0.69 ($\pm 0,02$). Dieser Wert der Kontrollen ist in Übereinstimmung mit früheren PAM Untersuchungen an Characeen (KÜSTER & al. 2005) und zeigt, dass die Proben nicht durch experimentelle Bedingungen oder vorhergehende mechanische Manipulationen beeinträchtigt waren. Mit zunehmenden Herbizidkonzentrationen nahm der effektive Quantenyield $\Delta F/F_m'$ bis 0.3 ab und zeigt somit eine bis zu 70 prozentige Hemmung unter den höchsten applizierten Atrazinkonzentrationen. Um die für die Fluoreszenzmessung mit dem Imaging-PAM notwendigen Zeitskalen ermitteln zu können, wurden die Messungen nach 5 h bzw. 24 h Inkubation wiederholt. Die anhand der Ergebnisse berechneten EC50-Konzentrationen (Konzentrationen, unter denen 50 % des maximal erreichbaren Effektes zu verzeichnen war) der unterschiedlichen Inkubationszeiten betragen 0,069 mg/L für 1 h, 0,029 mg/L für 5 h und 0,028 mg/L für 24 h. Die Ergebnisse zeigen, dass eine weitere Abnahme der Fluoreszenzhemmung bis zu einer Inkubationszeit

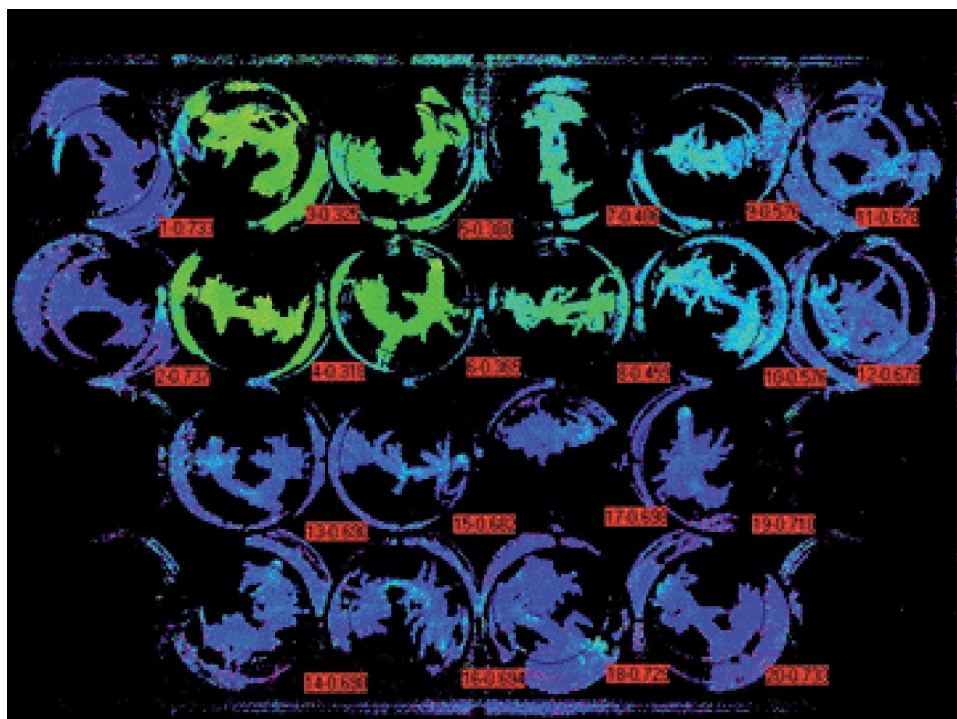


Abb. 2: Der effektive Quantenyield $\Delta F/F_m'$ des Photosystem II nach einem Sättigungspuls mittels Imaging-PAM auf den in Abb. 1 gezeigten Plattenansatz mit *C. canescens* in einer 24-well Platte.

von 5 h nachweisbar wurde. Nach einer längeren Exposition bis zu 24 h von *C. canescens* gegenüber dem Herbizid Atrazin zeigte die Fluoreszenzhemmung jedoch einen konstanten Wert. Die EC50 Werte für *C. canescens* nach 5–24 h stündiger Inkubation lagen im Bereich von 0,0285 mg/L. Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit den durch Langzeittests an verschiedenen Makrophytenarten erhaltenen EC50 Werten. Fairchild & al. (1998) untersuchten die Schadstoffeinwirkung von Atrazin auf verschiedene Makrophytenarten nach 14 tägiger Inkubationszeit und wiesen EC50 Werte von 0,022 mg/L an *Ceratophyllum spec.*, 0,024 mg/L für *Najas spec.* und 0,021 mg/L für *Elodea spec.* nach. Reduzierte Wachstumsraten konnten ebenfalls in Atrazinkonzentrationen von 0,020 mg/L an den Makrophytenarten *Myriophyllum spicatum* und *Potamogeton spec.* nachgewiesen werden (GRAYMORE & al. 2001). Die anhand der fluoreszenz-basierten Messtechnik mit dem Imaging-PAM ermittelten Ergebnisse zeigen somit eine sehr gute Übereinstimmung mit internationalen Langzeituntersuchungen zur Schadstoffwirkung des Herbizids Atrazin auf Makroalgen deutlich. Aufgrund des schnell zu erfassenden Messparameters Fluoreszenz repräsentiert das Imaging-PAM somit eine erfolgsversprechende Messtechnik, um die

Inkubationszeiten für Schadstofftests auf eine Zeitskala um die 24 h zu verkürzen.

4 Ausblick

Die hier vorgestellten Untersuchungen der Schadstoffeinwirkung des Herbizides Atrazin auf Exemplare der Characeenart *Chara canescens* stellen erste Ergebnisse einer geschützten Makroalgenart als Biotestorganismen dar. Um die Ergebnisse mit einem die Photosynthese hemmenden Schadstoff zu sichern, sind jedoch Untersuchungen an unterschiedlichen Schadstoffgruppen mit verschiedenen Wirkorten notwendig. Die laufenden Untersuchungen im Department Bioanalytische Ökotoxikologie werden zeigen, ob diese erfolgsversprechenden Ergebnisse auf unterschiedlichste Schadstoffgruppen übertragbar sind und das Imaging-PAM somit als eine schnelle und routinemäßig einsetzbare Analysemethode zur Indikation von Schadstoffwirkungen auf Makroalgen und Makrophyten in der Stoffprüfung als auch in der Umweltanalyse dienen kann.

5 Literatur

- CEDERGREEN N., SPLIID N.H., & STREIBIG C. 2004: Species-specific sensitivity of aquatic macrophytes towards two herbicides. – *Ecotox. Environ. Safe.* 58: 314-323.
- FAIRCHILD J. F., RUESSLER D. S. & CARLSON A. R. 1998: Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor and metolachlor. – *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 1830-1834.
- GENTY B., BRIANTAIS J. M. & BAKER N. R. 1989: The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. – *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87-92.
- GEOFFROY L, FRANKART C. & EULLAFFROY P. 2004: Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to the herbicide flumioxazin. – *Environ. Pollut.* 131: 233-241.
- GRAYMORE M., STAGNITTI F. & ALLINSON G. 2001: Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. – *Environment International* 26: 483-495.
- GRUNWALD B. & KÜHL M. 2004: A system for imaging variable chlorophyll fluorescence of aquatic phototrophs. – *Ophelia* 58: 79-89.
- HILL R., SCHREIBER U., GADEMANN R., LARKUM A. W. D., KÜHL M. & RALPH P. J. 2004: Spatial heterogeneity of photosynthesis and the effect of temperature-induced bleaching conditions in three species. – *Mar. Biol.* 144: 633-640.
- HUANG X. D., DIXON D. G. & GREENBERG B. M. 1995: Increased polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity following their photomodification in natural sunlight: Impacts on the duckweed *Lemna gibba*. – *Ecotox. Environ. Safe.* 32: 194-200.
- HUANG X.D., MCCONKEY B.J., BABU T.S. & GREENBERG B.M. 1997: Mechanisms of photoinduced toxicity of photomodified anthracene to plants: Inhibition of photosynthesis in the aquatic higher plant *Lemna gibba* (duckweed). – *Environ. Toxicol. Chem.* 16(8): 1707-1715.
- ISO/DIS 20079. 2003. Water quality – Determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test (ISO TC 147/SC5).
- KRAUSE W. 1997: Charales (Charophyceae). – *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 18. 1. Aufl., 202 S.; Gustav Fischer Verlag.
- KROMKAMP J. C. & FORSTER R. M. 2003: The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. – *Europ. J. Phyc.* 38: 103-112.
- KÜSTER A., SCHAIBLE R., & SCHUBERT H. 2005: Sex-specific light acclimation of *Chara canescens* (Charophyceae). – *Aquat. Bot.* 83/2: 141-153.
- MARWOOD C. A., SOLOMON K. R. & GREENBERG B. M. 2001: Chlorophyll fluorescence as a bioindicator of effects on growth in aquatic macrophytes from mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. – *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 890-898.
- SCHMITT-JANSEN M. & ALTENBURGER R. 2005: Predicting and observing responses of algal communities to photosystem II-herbicide exposure using pollution-induced community tolerance and species-sensitivity distributions. – *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 304-312.
- SOLOMON K. R., BAKER D. B., RICHARDS R. P., DIXON D. R., KLAINÉ S. J., LAPOINT T. W., KENDALL R. J., WEISSKOPF C .P., GIDDINGS JLM., GIESY J. P., HALL L. W. & WILLIAMS W. M. 1996: Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. – *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 31-74.

Anschrift der Verfasser:

Dr. Anette Küster
 Umweltbundesamt Fachgebiet IV 2.2
 Umweltbewertung Arzneimittel
 Wörlitzer Platz 1
 06844 Dessau-Roßlau

Dr. Rolf Altenburger
 Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle,
 Abteilung Bioanalytische Ökotoxikologie
 Permoserstrasse 15
 04318 Leipzig

