

Sonderdruck: Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie, Saarbrücken 1973.

PHORMIDIUM AUTUMNALE ALS INDIKATORORGANISMUS FÜR ALGIZIDE SUBSTANZEN IM WASSER

M. NOLL & U. BAUER

Abstract

Inhibition of *Phormidium* trichome-migration is used for detection of herbicides. It is applied to 22 herbicides from 6 different chemical classes (phoxycarbonic acids, urea derivatives, triazines, carbamates, naphthoquinones, dipyridylum derivatives). The detection limit lies in the range of 0,3 to 15,0 μg . The test can be carried out within 3 hours by simple techniques.

Die Motivierung zur Suche nach einem einfachen, schnellen und empfindlichen Herbizidtest ergibt sich aus den Tatsachen, dass 1. in der Bundesrepublik etwa 50% aller verwendeten Schädlingsbekämpfungsmittel Herbizide sind und dass sich 2. Herbizide im Gegensatz zu Insektiziden durch eine Vielzahl chemisch verschiedener Gruppen auszeichnen. Die Palette reicht von Triazinen über Harnstoffverbindungen, Phoxycarbonsäuren, aliphatische chlorierte Säuren bis zu den Carbamaten. Daraus folgt eine sehr differenzierte chemisch-physikalische Analytik.

Die Frage nach einem alle Herbizide erfassenden Biotest ist deshalb begründet. An sich stehen schon einige Methoden zur Verfügung, die auch empfindlich genug sind. Sie nutzen die Hemmung der Vermehrungsrate oder der Sauerstoffproduktion verschiedener Algen, z.B. *Chlorella*, *Ankistrodesmus* und *Scenedesmus*, aus. Beim Keimungstest mit keimfähigen Samen von Blütenpflanzen, z.B. *Sinapis alba*, gelten das Durchbrechen der Keimwurzel durch die Samenschale, die Wurzellänge sowie die Hypokotyllänge der Keimlinge als Kriterien. Ihr Wert sei unbestritten, aber alle diese Verfahren erfordern entweder einen grossen apparativen oder zeitlichen Aufwand. Wir glauben, dass unser Algentest demgegenüber einige Vorteile aufweist. Er bedient sich der Wanderung von Trichomen der Blaualge *Phormidium autumnale* auf einer angefeuchteten Unterlage.

Die Bewegungen der Algenfäden lassen sich mikroskopisch sehr gut verfolgen. Der Mechanismus ist noch nicht ganz geklärt; er hängt aber nach Untersuchungen von NULTSCH & JEEJI-BAI (1966) eng mit der Elektronentransportkette der Photosynthese zusammen. Dies ist von den genannten Autoren durch Versuche mit den verschiedensten Photosynthesehemmstoffen bewiesen worden. Es tritt ausser einer phototaktischen Bewegung, deren Energiequelle die oxidative Phosphorylierung ist, die phototaktische und photokinetische Bewegung hervor, bei der das ATP durch Assimilation gewonnen wird. Sie ist, wie von NULTSCH (1961) nachgewiesen wurde, von solchen Wellenlängen abhängig, die im Absorptionsbereich der bei den Blaualgen photosynthetisch aktiven Pigmente liegen. Ausser vom Licht ist die Bewegung noch von dem Feuchtigkeitsangebot der Umgebung abhängig. Sie unterbleibt, auch bei günstigen Lichtbedingungen, wenn das Substrat trocken ist. Nach SCHWABE (1964) ist die kompakte Wanderung ganzer Trichome, die das Phänomen makroskopisch sichtbar werden lässt, auf das Bestreben jedes einzelnen Blaualgenfadens zurückzuführen, auf engem Raum zu irgendeinem Zeitpunkt in die günstigste Position zum Licht zu gelangen. Die Wanderung auf künstlichen Substraten hat THOMAS (1970) mit Agar-Nährböden verschiedener Konzentration untersucht.

Bei der Untersuchung der möglichst reproduzierbar zu gestaltenden Bedingungen stellten wir fest, dass das Ausmass der Wanderung sehr von der Art der Unterlage abhängt. Die besten Wanderungsergebnisse – nämlich 28 bzw. 25 mm in 24 Stunden – wurden auf Cellulose Dünnschicht-Alufolien und auf Papierfiltern erzielt. Polyamid-, Al_2O_3 -, Kieselgel- und Kieselgur-Dünnschichtfolien, Membran- und Glasfaserfilter sowie Glasplatten, unbeschichtete Alufolien und Agar-Nährböden eigneten sich weniger gut. In Anbetracht der kurzen Versuchsdauer ist es weder notwendig, noch im Hinblick auf die obigen Versuche angezeigt, Agar als Unterlage zu verwenden. Die guten Ergebnisse mit Cellulose führen wir darauf zurück, dass diese möglicherweise ein Wasserreservoir darstellt. Im Gegensatz zu anderen Unterlagen ist die Saugfähigkeit besser und die Verdunstung offensichtlich geringer.

Bei pH-Werten unter 5 ist die Wanderung naturgemäss gehemmt. Eine optimale Wanderung war im pH-Bereich von 5 bis 11 zu beobachten. Zur Feuchthaltung der Unterlage diente ein Grundwasser von pH 6,6 und einer Gesamthärte von $8,5^\circ\text{d}$ mit einem Sauerstoffgehalt von 4,4 mg/l und 23,3 mg/l CO_2 . Zur Belichtung wurden die Algen einer Beleuchtungsstärke von 1.100–1.300 Lux ausgesetzt. Hierfür wurden handelsübliche Leuchtstoffröhren verwendet. Beim Vergleich von drei zur Verfügung stehenden Leuchtstoffröhren verschiedener Lichtfarben zeigte sich, dass mit De Luxe PHILIPS und Universal OSRAM eine bessere Wanderung zu beobachten war als mit Warmton ASTRA. Dies ist auf die vergleichsweise hohen Anteile dieser Typen an photosynthetisch wirksamen violetterem, blaugrünem und gelbgrünem Licht zurückzuführen.

Da die zu testenden Substanzen oder Extrakte in organischen Lösungsmitteln auf die mit den Algen zu belegenden Unterlagen aufgebracht werden sollten, erschien es sinnvoll, den Einfluss einiger Lösungsmittelrückstände auf die Trichom-Wanderung zu untersuchen: das Hundertfache der beim Test üblichen Auftragemengen an Aceton, Hexan, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Äther, Benzol und Methanol bewirkte nach dem Abdampfen keine Hemmung der Wanderung.

Die Blaualgen lassen sich bei 30°C und 1.100–1.300 Lux in üblichen Nährmedien, z.B. nach HUGHES und Mitarbeitern (1958) kultivieren. Sie werden als grobe Suspension membranfiltriert und durch Korkbohrer aus dem Filtrerrückstand ausgestochen. Die Mengenbemessung erfolgte dadurch, dass ein bestimmtes Volumen sedimentierter Algen im Nährmedium geschüttelt und dann membranfiltriert wird, sodass aus dem Filtrerrückstand 1 mm dicke Scheiben ausgestochen werden können.

Die zu testenden Substanzen oder Extrakte – in Aceton oder Chloroform gelöst – werden auf vorgezeichnete "Startflecken" der Unterlagen, normalerweise einfaches Rundfilterpapier, aufgetragen. Das Lösungsmittel lässt sich mit Hilfe eines Föhns entfernen. Die Unterlage wird dann in einer Petrischale mit 2 ml Wasser gleichmässig befeuchtet – ohne dass die Algenscheiben aufschwimmen – und geschlossen. Die Schalen werden bei 18°C mit einer Leuchtstoffröhre belichtet. Aufgrund des sehr schnell sichtbaren Effekts bringt eine Beobachtung nach 1–3 Stunden bereits Ergebnisse. Eine Nachbeobachtung nach 24 Stunden ist sinnvoll. Die Abb. 1 zeigt die ungehemmte Wanderung nach 1, 3 und 24 Stunden.

Bei mikroskopischer Beobachtung lassen sich Symptome feststellen, die auch bei anderen Schädigungen, wie durch Lichtentzug, Wärme und Feuchtigkeitseutzug, sichtbar werden.

Spezifischere Wirkungen konnten bisher nicht gefunden werden. Eine Dosis-Wir-

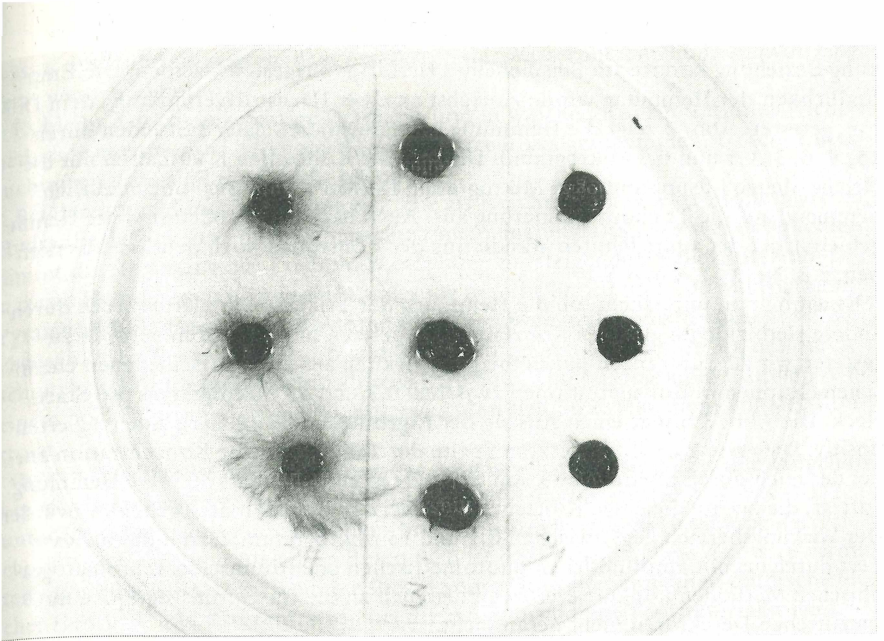


Abb. 1: Wanderung von *Phormidium autumnale* nach 1, 3 und 24 Stunden.

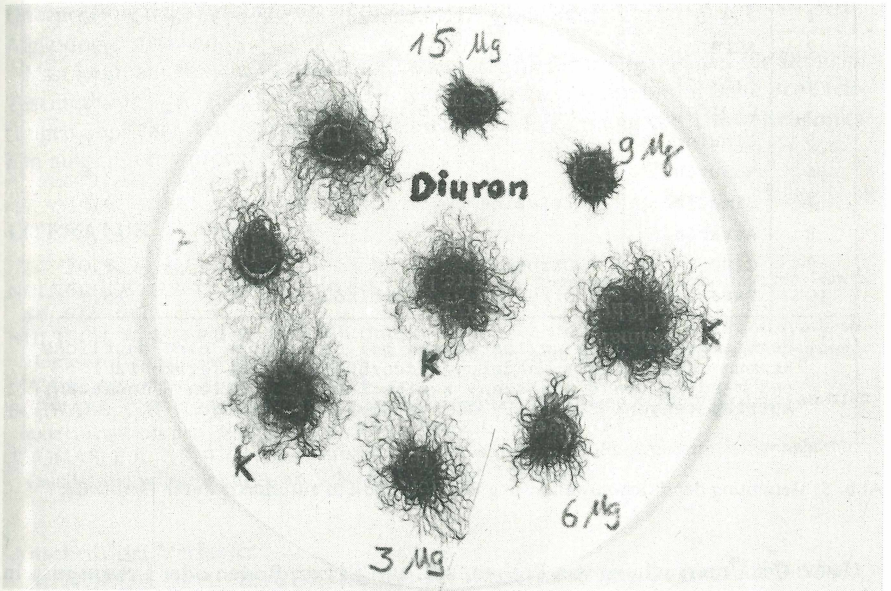


Abb. 2: Hemmung der Wanderung durch Diuron.

kung-Beziehung konnte am Beispiel eines Herbizids aufgestellt werden. Die Empfindlichkeit der Hemmung wurde zunächst an einer Harnstoffverbindung, dem Diuron, getestet. Abb. 2 zeigt die Hemmung von Phormidien nach 3 Stunden durch 15, 9, 6, 3, 1,5 und 0,3 Mikrogramm Diuron. Die Kontrollen K enthalten nur die gleiche Menge Lösungsmittel. 6 Mikrogramm Diuron wirken sich noch deutlich hemmend auf die Trichom-Wanderung aus. Auch nach 24 Stunden sind die Hemmgebiete trotz der ausgedehnten Wanderung der Kontrollen noch deutlich zu erkennen, z.B. Nr. 1, 2, 4 und 5.

Es wurde nun untersucht, ob die Hemmung der Trichom-Wanderung auch durch andere Herbizide im gleichen Konzentrationsbereich hervorgerufen wird. Dazu testeten wir 22 Substanzen mit herbizider Wirkung aus sechs verschiedenen chemischen Gruppen in Konzentrationen zwischen 0,3 und 15 Mikrogramm pro Startfleck. Die Abb. 3 bringt einen Auszug der Ergebnisse: alle 22 Herbizide reagierten positiv. Die erste Zahl in der letzten Spalte der Tabelle gibt die Konzentration an, bei der noch durch mindestens 3 von 6 Ansätzen eine mehr als 50%-ige Hemmung auftrat, die zweite diejenige Konzentration, bei der alle 6 Ansätze gehemmt wurden. Der Wirkungsbereich liegt zwischen 0,3 und 15 Mikrogramm. Damit kann dieser Test durchaus mit empfindlichen photometrischen oder dünn-schichtchromatographischen Methoden konkurrieren, wenn er auch an die Gaschromatographie mit spezifischen Detektoren nicht heranreicht.

lfd. Nr.	Herbizid	Gruppe	Nachweisgrenze [†] µg/Testfleck
1	2,4-D	Phenoxy-carbonsäuren	0,3 - 9,0
2	MCPA	"	6,0 - 9,0
3	2,4,5-T	"	0,3 - 6,0
4	Diuron	Harnstoffverbindungen	6,0 - 15,0
5	Linuron	"	3,0 - 6,0
6	Monuron	"	6,0 - 9,0
7	Simazin	Triazine	1,2 - 3,0
8	Atrazin	"	0,3 - 15,0
9	CIPC	Carbamate	6,0 - 9,0
10	Paraquat	Dipyridylum-Verbindungen	6,0 - 15,0

[†]) Herbizid-Mengen in µg/Testfleck, bei denen noch eine deutliche Hemmung der Trichom-Wanderung nachzuweisen war (erste Zahl: bei mind. 3 von 6 Ansätzen; zweite Zahl: bei allen 6 Ansätzen). Auftragemengen: 0,3; 1,5; 3,0; 6,0; 9,0; 15,0 µg.

Abb. 3: Hemmung der Trichomwanderung von *Phormidium autumnale* durch Herbizide.

Da bei der Untersuchung von Proben, z.B. aus Wasser, Boden oder Lebensmitteln, die gewonnenen Extrakte unter völliger Entfernung des Lösungsmittels aufgetragen und untersucht werden können, sind Herbizide schon im Sub-ppb-Bereich nachweisbar. Erste Untersuchungen mit 20-Liter-Proben von herbizid-unbelastetem Grund-

wasser des Ruhrtals zeigten, dass der Test in der Wasseruntersuchung sinnvoll eingesetzt werden könnte.

Es bleibt jedoch die wichtige Frage, ob und in welchen Konzentrationen Nicht-herbizide ebenfalls die Trichom-Wanderung der Blaualgen hemmen. Unsere Untersuchungen dazu sind noch nicht beendet.

Bei den polychlorierten Biphenylen, die als Weichmacher, Elektroisoliermaterial, Hydraulikflüssigkeiten und Flammschutzmittel mannigfaltige Verwendung finden, nimmt die Hemmung der Trichom-Wanderung mit steigendem Chlorgehalt ab. Die stärkste Hemmung der Trichom-Wanderung besteht bei 20 und 100 Mikrogramm Pyraléne 1500, das etwa 1–2 Atome Chlor pro Biphenyl-Molekül enthält; schwächer wirkt die Behandlung mit 6 und 200 Mikrogramm Clophen A-30, das durchschnittlich 3 Chlor pro Molekül aufweist. 20 bzw. 200 Mikrogramm Clophen A-60, einem hochchlorierten Biphenyl, unterscheiden sich im Effekt nicht von der Kontrolle.

In der Literatur ist eine Hemmung des Algenwachstums durch die den Polychlorbiphenylen verwandten insektiziden Halogenkohlenwasserstoffe, z.B. das DDT, unter Stressbedingungen bereits beschrieben worden. Unsere Hemmung der Trichom-Wanderung von Blaualgen durch PCB ist dazu eine Parallele. Es ist zu vermuten, dass eine grosse Zahl weiterer Biozide oder Umweltchemikalien unterschiedlicher Herkunft und Konzentration bei diesem Phormidium-Test miterfasst wird. Weiterführende Untersuchungen werden darüber Klarheit verschaffen. Zum jetzigen Zeitpunkt betrachten wir die Methode als einen einfachen, empfindlichen, qualitativen Gruppentest auf herbizid wirkende Stoffe, der als Voruntersuchung für eine genaue chemische Identifizierung und quantitative Bestimmung einzelner Herbizide oder Herbizid-Gruppen dient. Weitere Anwendungen können sich auf die Überprüfung der Wirkung von Herbizid-Metaboliten oder neuen Herbiziden bzw. Algiziden erstrecken.

Man kann annehmen, dass eine Reihe anderer niederer Organismen für ähnliche Testmethoden geeignet sind. Es wäre wünschenswert, wenn biologische Beobachtungen ähnlicher Art in verstärktem Umfang zur Erkennung von Umweltchemikalien ausgenutzt würden.

LITERATUR

NULTSCH, W. (1961): Der Einfluss des Lichtes auf die Bewegung der Cyanophyceen. *Planta* 56: 632–647.

NULTSCH, W. & JEEJI-BAI (1966): Untersuchungen über den Einfluss von Photosynthese-Hemmstoffen auf das phototaktische und photokinetische Reaktionsverhalten blaugrüner Algen. *Z.Pflanzenphysiol.* 54: 84–98.

SCHWABE, G.H. (1964): Lagerbildungen hormogonaler Blaualgen in thermalen und anderen extremen Biotopen. *Verb.Internat.Verein.Limnol.* 15: 772–781.

THOMAS, E.A. (1970): Beobachtungen über das Wandern von Phormidium autumnale und Oscillatoria princeps auf Agar. *Schweiz.Z.Hydrol.* 32: 523–531.

Anschrift der Verfasser:

M. NOLL & Dr. U. BAUER, Institut für Wasserforschung Dortmund, D-5841 Geisecke/Ruhr.