

Tagungsbeitrag zu:
Organismische Interaktionen im Boden
Workshop Kommission III „Bodenbiologie und Bodenökologie“ der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft, 30.09.-01.10.2010 auf Frauenchiemsee
Berichte der DBG (nicht begutachtete online Publikation)
<http://dbges.de>

Biotische und abiotische Interaktionen im Boden – ein Mikrokosmos für ökotoxikologische und ökologische Untersuchungen

Stephan Hackmann^{1*} & Juliane Filser¹

Zusammenfassung

Zur ökotoxikologischen Risikoabschätzung von Chemikalien werden hauptsächlich standardisierte Einzelartentestverfahren verwendet und die daraus resultierenden Ergebnisse, mit entsprechenden Sicherheitsfaktoren versehen, auf die wesentlich komplexeren natürlichen Bedingungen übertragen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein sich aus den Testorganismen *Folsomia candida*, *Arthrobacter globiformis* und *Hypoaspis aculeifer* zusammensetzender Mikrokosmos entwickelt. Es entsteht ein terrestrisches Modellökosystem, in dem verschiedene trophische Interaktionen und deren Einfluss auf die Auswirkungen von Noxen untersucht werden können. Das System zeigt einen validen Testverlauf, stabile Ergebnisse und bei der Erprobung mit nanopartikulärem Silber eine deutlich höhere Sensitivität im Vergleich zu einem Einzelartentestverfahren.

Schlüsselwörter: terrestrische Ökotoxikologie, Einzelartenstandardtests, Mikrokosmos, nanopartikuläres Silber

Einleitung

In der ökotoxikologischen Risikoabschätzung werden für die Chemikalienbewertung u.a. aus Kosten- und Ressourcen Gründen primär standardisierte Einzelartentests verwendet. Hierbei wird ein Test-

organismus unter optimalen Lebensbedingungen gegenüber der zu prüfenden Noxe exponiert. Anschließend werden die Untersuchungsergebnisse mit einem errechneten Sicherheitsfaktor versehen und auf die natürlichen Bedingungen übertragen (Fent 2003).

Es ist aber davon auszugehen, dass Testsysteme, die näher an den natürlichen Lebensbedingungen der Organismen liegen, eine höhere Sensitivität aufweisen und so zu einer sichereren Chemikalienabschätzung führen. Mikro- und Mesokosmen stellen Modellökosysteme dar, die mehrere Arten miteinander in Beziehung setzen und die Effekte der interspezifischen Interaktionen, wie z.B. Nahrungskonkurrenz, Prädation auf die Auswirkungen der Prüfchemikalie untersuchen (Walker et al. 2006). Da durch die verschiedenen Arten auch mehr Faktoren bei der Auswertung und der Analyse der Noxenwirkung zu berücksichtigen sind, ist es notwendig, dass einerseits die Auswirkung der Noxe auf die Einzelarten bekannt ist und andererseits möglichst viele Populationsentwicklungen im System beobachtet werden können. Entsprechend ist der hier entwickelte Mikrokosmos als eine Ergänzung und nicht Ersatz für Einzelartentests zu verstehen.

Der Mikrokosmos setzt sich aus einem Schraubdeckelglas das mit Boden gefüllt wird und aktuell drei Arten, die die zu beobachtende Nahrungskette bilden. Der Collembole *Folsomia candida* steht dabei im Zentrum der Untersuchung und nutzt das Bodenbakterium *Arthrobacter globiformis* als Nahrung. Nun kann der Collembole nicht nur über den Kontakt zur Bodenmatrix in Berührung mit der Noxe kommen, sondern sie auch über die Nahrung aufnehmen. Zusätzlich zur Kontamination wird als natürlicher Stressfaktor die Raubmilbe *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* eingesetzt.

Material und Methoden

Synchronisation der Testorganismen

Die Synchronisation der Testorganismen erfolgte anhand der standardisierter Testguidelines: *F. candida* (Willem 1902) OECD 232, *A. globiformis* (Conn & Dimmick 1947) DIN 38412-48, *H. aculeifer* (Canestrini 1883) OECD 226.

¹ Universität Bremen, UFT, Abteilung 10, Allgemeine und Theoretische Ökologie

* st_ha2@uni-bremen.de

Die Menge der Bakteriensuspension wurde von der in der DIN 38412-48 vorgesehene(n) Bakterienmenge (2 ml/3 g Boden (Trockengewicht (TG))) auf die im Mikrokosmos eingesetzte Bodenmenge von 30 g (TG) auf entsprechend 20 ml erhöht.

Testchemikalie

Als Testchemikalie für die Mikrokosmenerprobung und den Einzelartentestvergleich (Reproduktionshemmung bei *F. candida* nach OECD 232) wurde nanopartikuläres Silber (AgNP) in Suspension von der Firma PlasmaChem gekauft. Partikelform: ellipsoid, Durchmesser 50 nm, Oberflächenbestandteile: Silber, Carbonsäure, Phosphat.

Die Partikel wurden mit dem zum Befeuchten des Bodens verwendeten Wasser in den Boden eingerührt. Die Konzentration betrug $18,125 \text{ mg Ag} \cdot \text{kg}^{-1}$ Boden (TG).

Versuchsböden

Als Böden wurden LUFA 2.2 und OECD-Böden mit variierendem Anteil an organischer Substanz verwendet (Tab. 3), wobei der OECD-Boden mit 2% organischem Anteil dem LUFA-Boden entsprach. Defauniert wurden sie durch zweimaliges Tiefkühlen (-20°C; 2 Tage) und jeweils angeschlossene Wärmeperiode (Raumtemperatur; 7 Tagen).

Versuchsaufbau

Je 30 g luftgetrockneter Boden wurden in Weithalsgefäße mit fest verschließbaren Deckeln eingewogen. Die Gefäße wurden auf einen Wassergehalt von 50% (LUFA) und 75% (OECD) bezogen auf die maximale Wasserhaltekapazität eingestellt und beim Verrühren darauf geachtet, dass sich ein für die Tiere gut erreichbares und stabiles Porensystem einstellte.

Für jedes Gefäß wurden jeweils 20 ml der Bakteriensuspension mit einer optischen Dichte von 0,5 (gemessen bei 620 nm) zentrifugiert (5 min; 2500 G), der Überstand abpipettiert und das Pellet resuspendiert. Dieser Schritt wurde durchgeführt um immer die gleiche Menge Bakterien zu verwenden, Bei der Beimpfung aber nur eine geringe Flüssigkeitsmenge zu verwenden. Danach wurde die Suspension gleichmäßig über die Bodenoberfläche ver-

teilt, ohne dabei das Porensystem zu zerstören.

Im letzten Schritt wurden pro Gefäß 10 Collembolen und gegebenenfalls 2 weibliche Raubmilben eingesetzt (Ansatzschema in Tab. 3). Anschließend wurden die Gefäße für 5 Wochen im Brutschrank inkubiert (20°C; hell/dunkel 16:8 h)

Tab. 3: Kombination der Organismen in Mikrokosmen mit verschiedenen Standardbodentypen und unterschiedlichen Anteilen an organischer Substanz (org.). Jede Kombination wurde sowohl mit entmin. Wasser als auch mit AgNP durchgeführt. A = ohne Milben, B = mit Milben. F = *F. candida*, H = *H. aculeifer*, A gl = *A. globiformis*

Ansatz	A gl	F	H	org [%]
A LUFA	X	X		2,36
B LUFA	X	X	X	2,36
A OECD 2%	X	X		2
B OECD 2%	X	X	X	2
A OECD 5%	X	X		5
B OECD 5%	X	X	X	5
A OECD 10%	X	X		10
B OECD 10%	X	X	X	10

Versuchsendpunkte

In der Erprobungsphase wurde die Collembolenreproduktion, anhand der juvenilen Tiere und die Körperlänge der Tiere (Vitalitätskriterium) bestimmt.

Auswertung der Mikrokosmen

Die Collembolen wurden durch Aufschwemmen (OECD 232) extrahiert und auf der Wasseroberfläche zusammen mit einem Millimeterpapier als Maßstab abfotografiert. Die Anzahl und die Größe der Tiere wurden mit der Software ImageJ ausgewertet.

Statistische Analysen

Die Auswertung erfolgte mit SPSS (Version 16). Die Normalverteilung der Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test und die Varianzenhomogenität mit dem Levene-Test geprüft. Anschließend wurde mit einem univariaten Allgemeinen Linearen Modell getestet. Wenn möglich wurde ein zusätzlicher Tukey-HSD Post-Hoc-Test durchgeführt. Die Signifikanzgrenze war in allen Fällen $p \leq 0,05$.

Ergebnisse

Evaluierung des Mikrokosmos ohne AgNP

Ein Vergleich der Reproduktion in Mikrokosmen mit *A. globiformis*-Beimpfung und ohne, zeigte, dass bei fehlender Beimpfung die Reproduktion von *F. candida* deutlich ($p < 0,01$, $df=1$, $F=276$) verringert (Abb. 2) war.

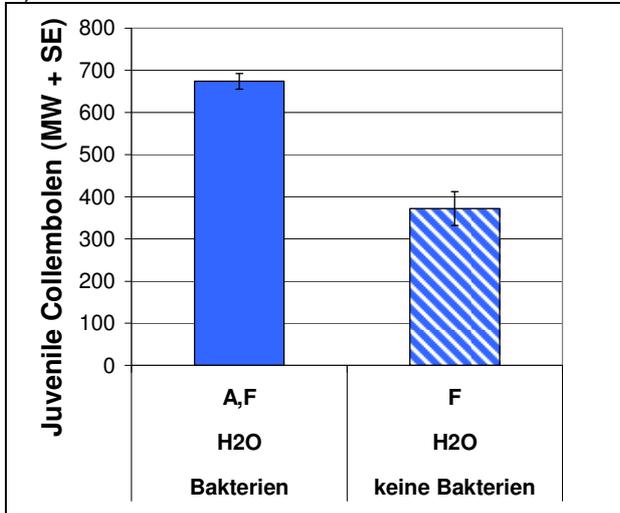


Abb. 2: Auswirkung der Beimpfung mit *A. globiformis* (A) auf die Reproduktion von *F. candida* (F). Der Versuchsboden war LUFA 2.2 $n = 5$

Die Raubmilbe hatte erwartungsgemäß einen ($p < 0,01$; $df=1$; $F=13,760$) negativen Einfluss auf die Collembolenreproduktion (Abb. 3).

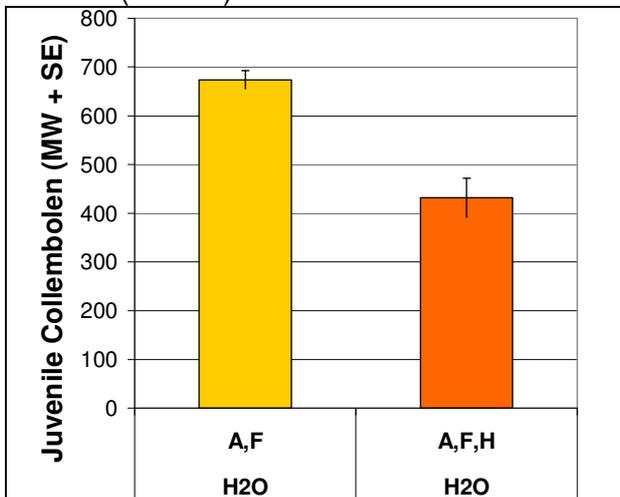


Abb. 3: Auswirkungen der Raubmilbe *H. aculeifer* (H) auf die Reproduktion des Collembolen *F. candida* (F) in Mikrokosmen mit *A. globiformis* (A). Versuchsboden = LUFA 2.2; $n = 5$

Beim Bodenvergleich fand sich kein Unterschied, bis auf eine hoch signifikant ($p < 0,01$; $df=2$; $F=8$) niedrigere Reproduktion in OECD 10%.

Die Raubmilbe hatte in den OECD-Böden mit Ausnahme des OECD5%-Bodens, einen hoch signifikant ($p < 0,01$; $df=1$;

$F=25,2$) negativeren Effekt als im LUFA-Boden (Abb. 4).

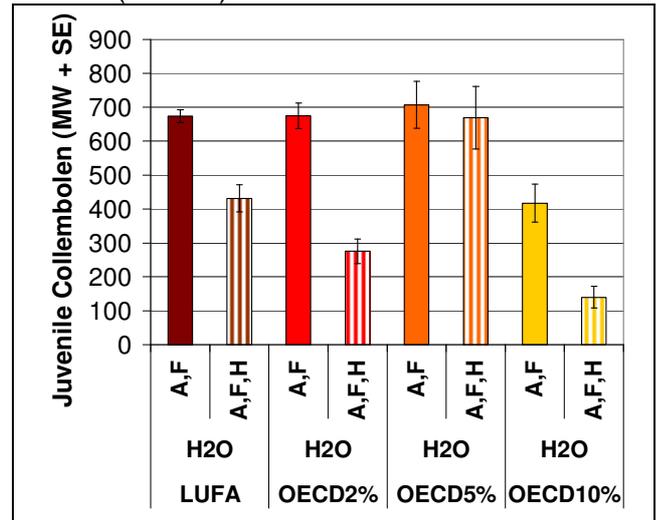


Abb. 4: Auswirkung unterschiedlicher Standardböden (OECD, LUFA) und verschiedener Mengen an organischer Substanz auf die Reproduktion der Collembolen (F), sowie die Prädationsrate von *H. aculeifer* (H) in Mikrokosmen mit *A. globiformis* (A); $n = 5$

Erprobung des Mikrokosmos mit AgNP

In LUFA-Boden zeigte sich, dass bezogen auf die unkontaminierte Kontrolle eine AgNP-Kontamination einen hormetischen Effekt auf die Collembolen-Reproduktion hatte, sie aber hoch signifikant ($p < 0,01$ $df=1$; $F=7,503$) in Anwesenheit der Milbe abnahm (Abb. 5).

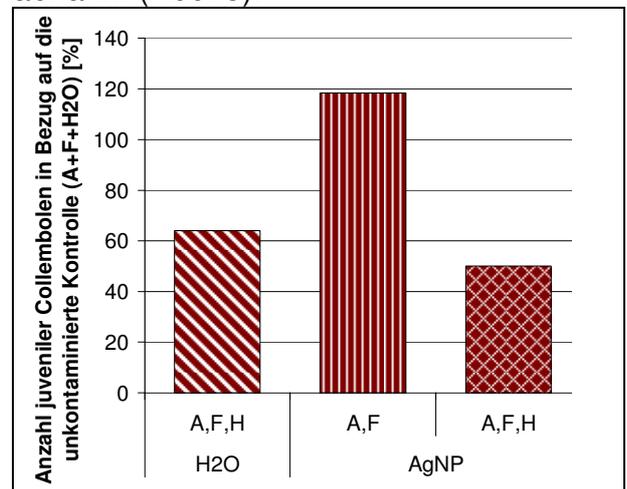
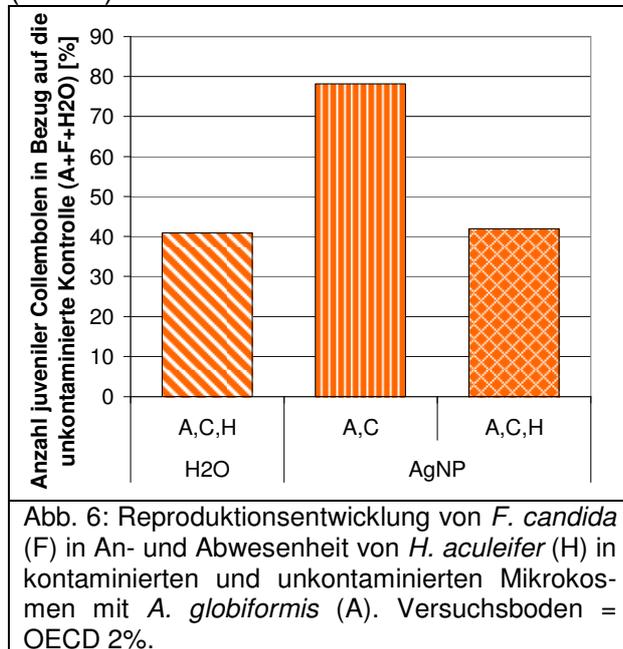


Abb. 5: Reproduktionsentwicklung von *F. candida* (F) in An- und Abwesenheit von *H. aculeifer* (H) in kontaminierten und unkontaminierten Mikrokosmen mit *A. globiformis* (A). Versuchsboden = LUFA 2.2; $n = 5$

Obwohl die Collembolenreproduktion auf den Böden LUFA und OECD2% vergleichbar war, ist der Einfluss von Milben und AgNP sehr verschieden. Auf dem OECD2%-Boden zeigten die Milben eine signifikant höhere Prädationsrate (vgl. Abb.

5 und 6). Ebenso hatte die Kontamination mit AgNP bereits in Abwesenheit der Milbe einen signifikant negativen Einfluss auf die Reproduktion der Collembolen (Abb. 6), die in Kombination mit AgNP zu keinem weiteren Reproduktionsrückgang führte (Abb.6).



Diskussion

Der in dieser Arbeit entwickelte und validierte Mikrokosmos erzielt sichere und reproduzierbare Ergebnisse. Die Reproduktion von *F. candida* liegt immer deutlich über der Validitätsgrenze von 100 juvenilen Collembolen in den unbehandelten Kontrollen (OECD 232). Entsprechend stellt *A. globiformis* eine geeignete Nahrungsquelle dar (Abb.2). Der Einsatz von *H. aculeifer* führt zu dem beabsichtigten Ergebnis, dass die Reproduktion der Collembolen verringert wird und ist so ein geeigneter natürlicher Stressfaktor (Ausnahme OECD5%).

Wie die Versuche zeigen, ist der Mikrokosmos mit verschiedenen Standardböden durchführbar, auch wenn sich hier bodenspezifische Unterschiede ergeben, die wahrscheinlich hauptsächlich in dem variierenden Anteil an organischer Substanz und der zwischen OECD und LUFA verschiedenen Korngrößenverteilung begründet liegen. Wird ein OECD-Boden mit 2 % organischem Anteil verwendet, der dem des LUFA-Bodens entspricht, so ist die Reproduktion in den Kontrollen gleich. Wird diese aber in Anwesenheit der Raubmilbe betrachtet, so verringert sich

die Reproduktion auf dem OECD-Boden stärker, da durch die geringere Korngrößenverteilung auch nicht so feine Poren entstehen können, in die sich der Collembole zum Schutz zurückziehen kann. Dies wird auch durch eine Betrachtung der Collembolengrößen unterstützt, die hier aus Platzgründen leider nicht gezeigt werden kann.

Bei der Untersuchung der AgNP-Wirkung zeigt sich eine höhere schädigende Bioverfügbarkeit des Materials auf OECD-Böden (hier als Bsp. OECD2%). Der Reproduktionsrückgang in Anwesenheit der Milbe und in Kombination mit AgNP ist ebenfalls auf OECD-Böden stärker und erreicht 80% bei OECD10% (nicht dargestellt). Damit ist das Testsystem deutlich sensitiver als der zum Vergleich herangezogene Reproduktionshemmtest mit *F. candida*, der mit einer höheren Konzentration von 25 mg Ag*Kg⁻¹ Boden (TG) lediglich ein 40% erzielte.

Ausblick

Die Arbeit zeigt deutlich, wie stark Einzelartentests die Auswirkungen von Chemikalien in der Umwelt unterschätzen und wie wichtig es ist, komplexere Systeme in den Untersuchungsfokus zu integrieren. Zusätzliche Faktoren die im Mikrokosmos neben der der Reproduktion gleichzeitig erfasst werden können, sind die Collembolengröße und die bakterielle Abundanz. Neben der Ökotoxikologie könnte sich das System ebenso für ökologische Laboranalysen, wie z.B. Auswirkungen des Klimawandels oder verschiedener Nährstoffgehalte im Boden, eignen.

Literatur

- Fent, K. (2003). *Ökotoxikologie. Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie* ; 63 Tabellen. (2nd ed.). Stuttgart. Thieme.
- Van den Brink, P.J., Tarazona, J.V., Solomon, K.R. & Knacker, T. (2005). The use of terrestrial and aquatic microcosms and mesocosms for the ecological risk assessment of veterinary medicinal products. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 820–829.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M. & Peakall, D.B. (2006). *Principles of ecotoxicology*. (3rd ed.). Boca Raton, London, New York. CRC Taylor & Francis.