

(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **274 247 A1**4(51) E 02 B 15/00
G 01 N 33/18**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP E 02 B / 318 255 2	(22)	25.07.88	(44)	13.12.89
(71)	Friedrich-Schiller-Universität Jena, August-Bebel-Straße 4, Jena, 6900, DD				
(72)	Augsäen, Helmut, Prof. Dr., DD; Gebhard, Anette, Dipl.-Biol., DD; Chetverikov, Anatoli G., Dr. sc. nat., SU; Verenchikov, Sergej P., Dr. sc. nat., SU				
(54)	Verfahren zur Gewässerüberwachung				

(55) Gewässerüberwachung, Schwermetallbelastung, Schnellbestimmung, Quecksilber, Cadmium, Kupfer, Lemnaceen, Wasserlinsengewächse, Indikatorpflanze, photosynthetische Effektivität, Photosystem, Elektronenspinresonanz

(57) Das Verfahren zur Gewässerüberwachung beruht auf der Schnellbestimmung von Gewässerverunreinigungen durch Schwermetalle und kann in Einrichtungen des Umwelt- und Gewässerschutzes angewendet werden. Intakte Ganzpflanzen, vorzugsweise Lemnaceen (Wasserlinsengewächse), werden als Indikatorpflanze benutzt und in das zu prüfende Gewässer oder in entsprechende Wasserproben übertragen oder es werden die im Gewässer von vornherein vorhandenen Organismen untersucht. Die photosynthetische Effektivität der Indikatorpflanzen (Verhältnis von Photosystem II/Photosystem I) wird ESR (Elektronenspinresonanz)-spektroskopisch bestimmt; sie ist nach Schwermetallbelastung vermindert. Dieser Effekt ist schon nach 15 min Exposition sicher erfaßbar und von Expositionszeit und Schwermetallkonzentration abhängig. Verschiedene Schwermetalle (Quecksilber, Cadmium, Kupfer) zeigen vergleichbare Wirkungen.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Gewässerüberwachung und zur Schnellbestimmung von Gewässerverunreinigungen durch Schwermetalle, **dadurch gekennzeichnet**, daß die als Indikatorpflanze verwendeten intakten Ganzpflanzen dem zu prüfenden Gewässer entnommen werden und anschließend eine Bestimmung photosynthetischer Primärprozesse sowie ein Vergleich der Werte mit den im analogen Verfahren ermittelten Kontrollwerten erfolgen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß primäre Schwermetallwirkungen im Bereich der Photosynthese durch Ermittlung der PS II/PS I-Relation mittels ESR-Spektroskopie erfaßt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Indikatorpflanzen Vertreter aus der Familie der Lemnaceen (Wasserlinsengewächse) verwendet werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die in Nährlösung vorkultivierten Indikatorpflanzen in das zu prüfende Gewässer oder in entsprechende Wasserproben eingebracht und nach der Exposition entnommen und analysiert werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Indikatorpflanzen am Untersuchungsort eines strömenden Gewässers mittels eines verankerten Holzrahmens oder eines geeigneten, vom Wasser durchflossenen Behälters fixiert werden.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Indikatorpflanzen schon nach 15 min Exposition dem zu prüfenden Gewässer oder entsprechenden Wasserproben entnommen und analysiert werden.

Hierzu 3 Seiten Zeichnungen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewässerüberwachung und zur Schnellbestimmung von Gewässerverunreinigungen. Erfindungsgemäß werden intakte Ganzpflanzen, vorzugsweise Lemnaceen (Wasserlinsengewächse), in das zu prüfende Gewässer oder in entsprechende Wasserproben übertragen oder es werden die im Gewässer von vornherein vorhandenen, als Indikatorpflanzen geeigneten Organismen untersucht. Die photosynthetische Effektivität der Indikatorpflanzen (Verhältnis von Photosystem II/Photosystem I) wird ESR (Elektronenspinresonanz)-spektroskopisch bestimmt und mit den entsprechenden Werten des Kontrollmaterials verglichen.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Im Rahmen des Umweltschutzes kommt der Überwachung der Gewässer und der industriellen Abwässer insbesondere bezüglich ihres Schwermetallgehaltes große Bedeutung zu. Schwermetalle können aufgrund ihrer Toxizität Lebewesen schädigen; außerdem können sie in Abwässern durch Vergiftung des Belebtschlammes zum Ausfall der Kläranlagen führen. Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnostizierung und Bestimmung von Umweltschäden an Pflanzen sowie zur Ermittlung von Gewässerverunreinigungen durch Schwermetalle. Das Verfahren erlaubt die Schnellbestimmung des Schädigungszustandes der Indikatorpflanzen im Sinne eines Biomonitoring sowie die Bestimmung des Ausmaßes der Gewässerverunreinigung. Anwendungsgebiete dieses Verfahrens sind die Ermittlung von Schwermetall-bedingten Schäden an Wasserpflanzen im Rahmen von Umweltschutzuntersuchungen sowie die Erfassung entsprechender Gewässerverunreinigungen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Gewässerüberwachung sind Untersuchungsverfahren bekannt, die einzelne Wasserproben zu verschiedenen Zeiten entnehmen und im Labor mittels chemischer oder elektrochemischer Methoden auswerten. Auch Verfahren mit kontinuierlich arbeitenden Geräten zur Registrierung der Wassergüte durch Messung der Spannung, der Leitfähigkeit und der Widerstände wurden bereits vorgeschlagen. Diese bekannten Verfahren und Geräte gestatten aber wegen der diskontinuierlichen Probenahme keine exakte Feststellung der Wassergüte über einen längeren Zeitraum bzw. benötigen bei kontinuierlicher Überwachung einen großen Geräteaufwand vor Ort bei hoher Störanfälligkeit und hohem Wartungsaufwand. Außerdem bleiben die natürlichen Lebensvorgänge im Wasser unberücksichtigt.

Es ist bereits vorgeschlagen worden, zum Nachweis toxischer Substanzen in Gewässern intakte Organismen einzusetzen (z. B. kleine Wassertiere, Bakterien, Algen u. a. Wasserpflanzen) und ihr Verhalten in Reaktion auf die Schadstoffe zu überprüfen. Diese Verfahren sind ungenau und zeitaufwendig. Vorhandene Verfahren zur Bestimmung von Schadstoffen in Gewässern durch Erfassung von Primärprozessen bei Organismen sind methodisch und apparativ sehr aufwendig und als kontinuierliche arbeitende Routineverfahren ungeeignet.

Der spezielle Nachweis von Schwermetallschäden beruht auf akkumulativen (Schwermetallanreicherung) oder reaktiven (Veränderung pflanzenspezifischer Parameter) Indikationsverfahren sowie auf visueller Merkmals Erfassung (Wachstumsdepression, Ausbildung von Nekrosen u. a.). Diese Nachweismethoden sind weitgehend unspezifisch und erfordern lange Untersuchungszeiträume. Außerdem werden nicht die primären Schwermetallwirkungen, sondern nur die im Ergebnis der Langzeitwirkung auftretenden Sekundäreffekte erfaßt.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, die Verfahren zur Ermittlung von Schwermetallschäden bei Pflanzen sowie die Verfahren zur Ermittlung von Gewässerunreinigungen durch Schwermetalle unter Ausschluß der dargelegten Mängel weiterzuentwickeln.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu schaffen, das die Schnell Erfassung von primären Schwermetallschäden bei Pflanzen gestattet und bei dem sichere und miteinander vergleichbare Meßergebnisse erzielt werden. Damit soll ein Beitrag zum Aufbau standardisierter Testverfahren für das Biomonitoring von Umweltschäden geleistet werden. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß intakte Ganzpflanzen dem zu prüfenden Gewässer entnommen und als Indikator photosynthetisch bestimmt und mit den im analogen Verfahren ermittelten Kontrollwerten verglichen werden. Die Indikatorpflanzen – vorzugsweise Lemnaceen – werden dem zu prüfenden Gewässer entnommen oder in das zu prüfende Gewässer (z. B. Einleitungsstelle von Abwasser in ein Gewässer) oder in entsprechende Wasserproben eingebracht und nach 15 min Exposition wieder entnommen. Lemnaceen sind weltweit verbreitet, unter Freilandbedingungen oft massenhaft verfügbar und unter axenischen Bedingungen gut kultivierbar (AUGSTEN, H., Biol. Rdsch. 22, 225–235 1984; LANDOLT, E., Veröff. Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rübel, Zürich, 71. Heft, 1–566, 1986). Die Fixierung der Indikatorpflanzen am Untersuchungsort eines strömenden Gewässers kann mittels eines verankerten, vom Wasser allseitig durchflossenen Holzrahmens oder eines geeigneten Behälters erfolgen, der vom Wasser durchflossen wird.

Bei Schwermetallbelastung des Gewässers ist die photosynthetische Effektivität der Indikatorpflanzen (Verhältnis von Photosystem II/Photosystem I = PS II/PS I) gegenüber den Kontrollpflanzen verändert, wobei die Stärke der Schädigung in Abhängigkeit von Expositionszeit und Schwermetallkonzentration mit einer signifikanten Änderung der PS II/PS I-Relation korreliert. Diese veränderte Relation ist direkter Ausdruck eines Kurzeffektes und damit einer primären Schwermetallwirkung, die auf einer Beeinflussung der Photolyse des Wassers im Photosystem II beruht. Verschiedene Schwermetalle (Quecksilber, Cadmium, Kupfer) zeigen vergleichbare Wirkungen. Die Erfassung des PS II/PS I-Verhältnisses erfolgt durch ESR-Spektroskopie, die eine leicht und schnell durchführbare, standardisierbare Bestimmung gewährleistet.

Das Verfahren wird wie folgt durchgeführt: Das Schwermetall-belastete Pflanzenmaterial (100–150 mg Frischsubstanz) wird bei Licht (Bestrahlungsstärke 10–40 W m⁻²) durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff fixiert. Die Elektronenmagnetresonanz-Spektren werden bei Tieftemperaturen (flüssiger Stickstoff) und einer Bestrahlungsintensität von mindestens 300 W m⁻² registriert (Magnetfeldstärke des Meßgerätes 10 mW; Modularität 2 Gauß). Das ESR-Spektrum der Pflanzenprobe zeigt 2 Signale (Fig. 1). Signal 1 (ESR 1), registriert bei einem g-Faktor von 2,006, gibt die Effektivität des PS I an, (A₁), Signal 2 (ESR 2), registriert bei einem g-Faktor von 2,015, widerspiegelt die Effektivität des PS II (A₂). Aus der Höhe der Amplituden A₁ und A₂ errechnet sich der Faktor k, der das Verhältnis von PS II/PS I und damit den Anteil beider Photosysteme an der photosynthetischen Effektivität angibt:

$$PS II/PS I = k = \frac{2,75 \cdot A_2}{A_1}$$

Erfindungsgemäß bleibt das PS II/PS I-Verhältnis bei den Kontrollpflanzen konstant, während es nach Schwermetallbelastung der Pflanze vermindert wird.

Der Vorteil des dargelegten Verfahrens besteht in der Möglichkeit, Gewässerunreinigungen durch Schwermetalle und die dadurch verursachten Pflanzenschäden durch Schnellbestimmung des PS II/PS I-Verhältnisses mittels ESR-Spektroskopie innerhalb kurzer Zeit zu erfassen. Weitere Vorteile sind, daß die Erfassung der Pflanzenschäden auf der Registrierung primärer Schwermetallwirkungen beruht, daß die analysierten photosynthetischen Primärprozesse (Effektivität der Elektronentransportketten des PS I und PS II) nicht an enzymatische Folgeprozesse gekoppelt sind, daß die Untersuchungen an Ganzpflanzen durchführbar sind und daß auf eine Isolierung der Chloroplasten bzw. Thylakoidmembranen verzichtet werden kann. Es ergibt sich die Möglichkeit, das Verfahren zur Untersuchung auch großer Probemengen aus verschiedenen Gebieten, z. B. in einem methodisch-diagnostischen Zeitraum, ohne großen Zeitaufwand einzusetzen. Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel

Pflanzen des Stammes SJ von *Spirodela polyrhiza* (L.) SCHLEIDEN (Lemnaceae) werden in bekannter Weise einer Stammkultur entnommen und unter Einsatz von 2 Frönden in 50 ml-Erlenmeyer-Enghalskolben mit 25 ml Nährlösung überimpft. Die Nährlösung hat vorzugsweise folgende Zusammensetzung:

KNO ₃	8 mmol l ⁻¹
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	1 mmol l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 mmol l ⁻¹
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1 mmol l ⁻¹
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,013 mmol l ⁻¹
H ₃ BO ₃	0,0013 mmol l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,005 mmol l ⁻¹
Fe ^{III} EDTA	0,025 mmol l ⁻¹
Glukose	10 g l ⁻¹

Die Population wird vorteilhafterweise bei 8,8 Wm⁻² Dauerlicht und 25 °C ± 2 °C 9 Tage vorkultiviert (AUGSTEN, H. und A. GEBHARD, Wiss. Z. Päd. Hochschule Potsdam, i. D.) und anschließend dem Schwermetalleinfluß ausgesetzt. Tabelle 1 und die Fig. 2 und 3 belegen, daß der Faktor k (PS II/PS I) in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit und der Schwermetallkonzentration vermindert wird. Erfindungsgemäß ist dieser Effekt in der ersten Stunde des Schwermetalleinflusses am stärksten ausgeprägt, so daß bei Einsatz von Lemnaceen aus Stammkulturen eine Messung innerhalb dieses Zeitraumes besonders günstig ist; bereits nach 15 min Exposition ist die Abnahme des PS II/PS I-Verhältnisses sicher erfaßbar.

Tabelle 1

Einfluß von Quecksilber, Cadmium und Kupfer ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$) auf das PS II/PS I-Verhältnis in Abhängigkeit von der Exposition; Kontrolle (ohne Schwermetall): k (PS II/PS I) = 100.

Exposition (min)	Hg	Cd	Cu
15	23,8	87,6	89,0
30	88,4	87,8	88,7
45	86,0	86,4	87,3
60	85,7	85,4	86,9

Legenden

Fig. 1: ESR-Spektrum einer Pflanzenprobe.

H = Richtung des Magnetfeldes;

A₁ = Signal 1 (entspricht der Effektivität des PS I);

A₂ = Signal 2 (entspricht der Effektivität des PS II)

Fig. 2: Einfluß von Quecksilber (1,5 mg l⁻¹) auf das PS II/PS I-Verhältnis in Abhängigkeit von der Exposition.

V_a = PS II/PS I-Verhältnis der Kontrollpflanzen (ohne Quecksilber)

V_b = PS II/PS I-Verhältnis der Quecksilber-behandelten Pflanzen

Fig. 3: Einfluß verschiedener Quecksilber-Konzentrationen auf das PS II/PS I-Verhältnis nach: 60 min Exposition.

V_a = PS II/PS I-Verhältnis der Kontrollpflanzen (ohne Quecksilber)

V_b = PS II/PS I-Verhältnis der Quecksilber-behandelten Pflanzen

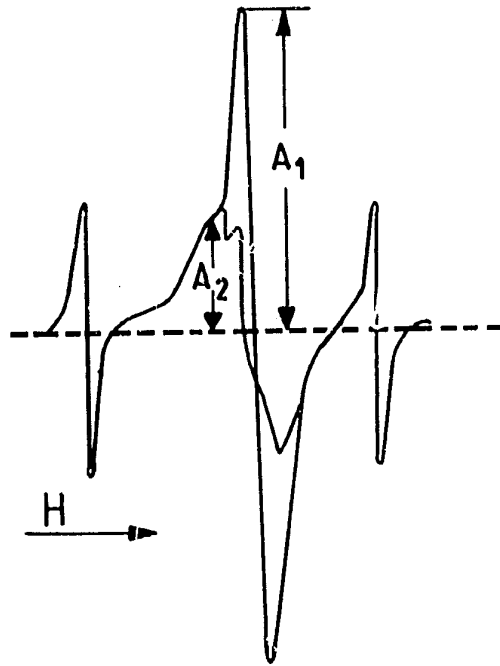


Fig. 1

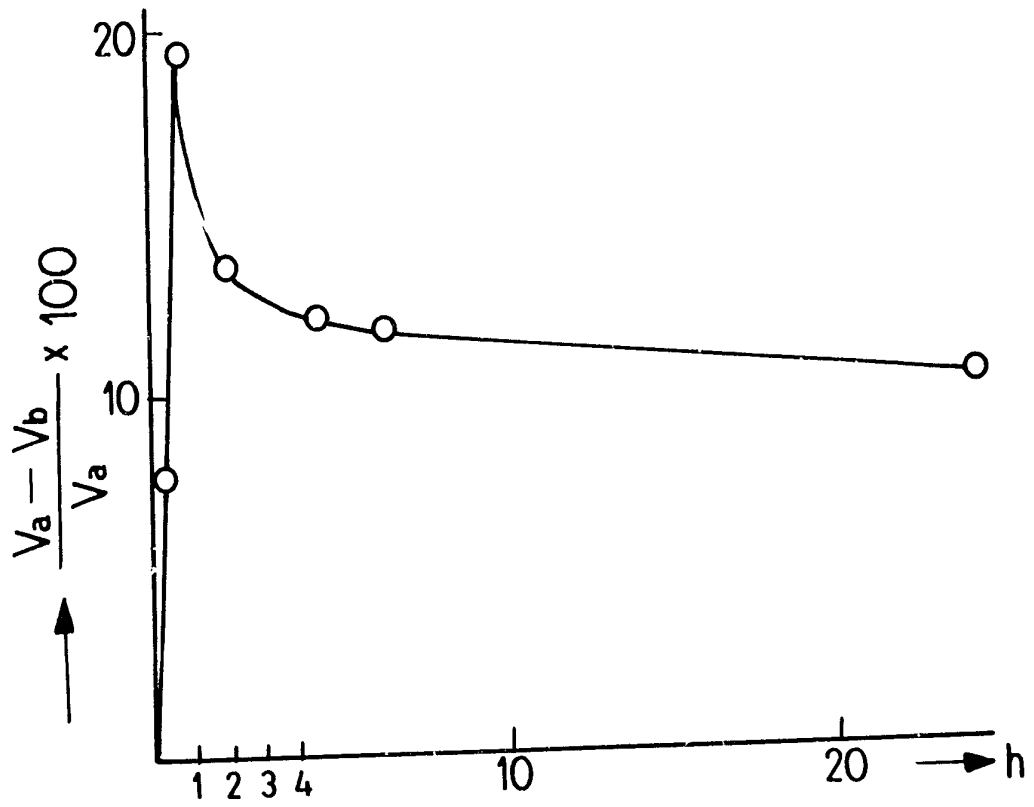


Fig. 2

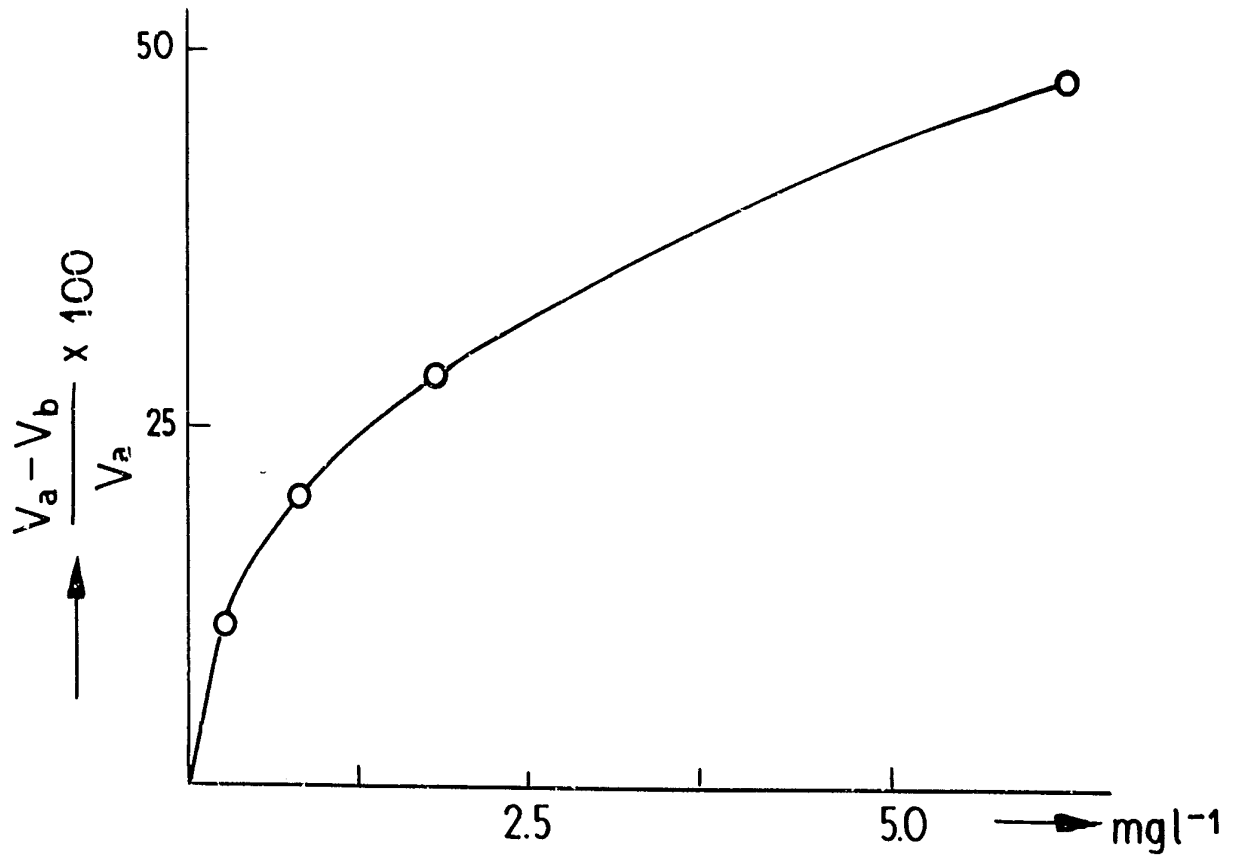


Fig. 3