

Leuphana Universität Lüneburg
Fakultät Nachhaltigkeit
Institut für Nachhaltige Chemie und Umweltchemie

DISSERTATION

Beeinflussung der Mykorrhizierung aufgrund von Fungizid- und
Herbizidexposition durch Maßnahmen zum Pflanzenschutz in der Land-
und Forstwirtschaft am Beispiel der Rotbuche
(*Fagus sylvatica* L.)

Eine ökotoxikologische Bewertung des Einflusses von Fungiziden
auf den Endpunkt Myzelwachstum

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)

vorgelegt von

Dipl. Umweltwiss. Isabell Zunker geb. Winck



Die praktischen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden an der Leuphana Universität Lüneburg im Zeitraum Januar 2010 bis Dezember 2013 am Institut für Nachhaltige Chemie und Umweltchemie unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Wolfgang Ruck durchgeführt.

Erstgutachter: Prof. Dr.-Ing. Wolfgang K.L. Ruck - Leuphana Universität Lüneburg

Zweitgutachter: PD Dr. Karin Pritsch - Helmholtzzentrum München

Drittgutachter: Jun.-Prof. Dr. Ralf B. Schäfer - Universität Koblenz-Landau

“We know more about the movement of the celestial bodies
than about the soil underfoot”

Leonardo da Vinci

I. Inhaltsverzeichnis

I.	<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	<u>V</u>
II.	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>XI</u>
III.	<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>XIII</u>
IV.	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>XIV</u>
	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>1</u>
	<u>ABSTRACT</u>	<u>3</u>
1	<u>EINLEITUNG</u>	<u>5</u>
2	<u>ZIELSETZUNG</u>	<u>6</u>
2.1	<u>ÜBERSICHT ÜBER DAS VERSUCHSDESIGN</u>	<u>8</u>
	Ziel- und Nichtzielflächen Szenario	8
	Untersuchungen zu den ökotoxikologischen Effekten	9
	Untersuchungen zur Exposition	9
	Zusammenführung der Ergebnisse und Bewertung der ökotoxikologischen Auswirkungen	10
3	<u>FACHLICHER HINTERGRUND</u>	<u>11</u>
3.1	<u>MYKORRHIZA</u>	<u>11</u>
3.1.1	<u>DAS KOMPARTIMENT „WURZELNAHER BODEN“</u>	<u>12</u>
3.1.2	<u>BEDEUTUNG DER MYKORRHIZA FÜR DIE SYMBIONTEN</u>	<u>14</u>
3.1.3	<u>BEDEUTUNG MYKORRHIZA ALS NETZWERK IM BODEN</u>	<u>15</u>
3.1.4	<u>MYKORRHIZA: CHANCEN EINER NACHHALTIGEN NUTZUNG DER RESSOURCE BODEN</u>	<u>16</u>
3.2	<u>BESTIMMUNG DES MYKORRHIZIERUNGSGRADS VON BUCHENWURZELN</u>	<u>17</u>
3.2.1	<u>BIOMARKER ERGOSTEROL</u>	<u>18</u>
3.2.2	<u>ANALYTISCHE METHODEN ZUR BESTIMMUNG VON PILZLICHER BIOMASSE MITTELS ERGOSTEROL</u>	<u>19</u>

3.2.3	HERAUSFORDERUNGEN AN DAS PROBENDESIGN	20
3.3	PESTIZIDE	21
3.3.1	EINTRÄGE VON PESTIZIDEN IN ANGRENZENDE ÖKOSYSTEME.....	22
3.3.2	AUSWIRKUNGEN VON PESTIZIDEN AUF DIE SYMBIOSE	24
3.4	UMWELT UND ÖKOTOXIKOLOGISCHE RISIKOANALYSE	27
3.5	AUSWAHL UND DEFINITION DES SYSTEMS	28
3.5.1	PHYTOBIONT BUCHE	28
3.5.2	MYKOBIONT	29
3.5.3	AUSWAHL DER PESTIZIDE	30
4	<u>EXPERIMENTELLES DESIGN UND METHODEN</u>	36
4.1	MATERIAL	36
4.1.1	MYKOBIONT	36
	Nährmedium	37
	ECM Inokulum.....	37
4.1.2	PHYTOBIONTEN	38
4.1.3	PESTIZIDE: STANDARDS UND FORMULIERUNGEN	39
4.1.4	ERGOSTEROL STAMMLÖSUNG.....	39
4.1.5	SONSTIGE MATERIALIEN	39
4.2	UNTERSUCHUNG ZU DEN ÖKOTOXIKOLOGISCHEN EFFEKTEN VON PFLANZENSCHUTZMITTEL AUF MYKOBIONTEN.....	40
4.2.1	<i>IN VITRO</i> VERSUCHE: KOMBINIERTE SYSTEME AUS PHYTOBIONT UND MYKOBIONT	40
4.2.1.1	Biomarker Ergosterol	41
	Geräteparameter	41
	Standard-Lösungen	41
	Kalibration und Verfahrenspräzision	42
	Probenvorbereitung.....	42
4.2.1.2	Vorschrift zur Extraktion von Ergosterol aus Myzel.....	43
4.2.2	<i>IN VITRO</i> VERSUCHE: MYKOBIONTEN SYSTEME	44
4.2.2.1	Effekte auf den Endpunkt Myzelwachstum: Qualitative Methode Tube Strip-Methode.....	44
	Versuchslösungen	45
	Versuchsvorschrift	45
	Auswertung	45
4.2.2.2	Effekte auf den Endpunkt Myzelwachstum: Quantitative Methoden	46
4.2.2.2.1	Wachstumskontrollen ohne Exposition.....	46

Auswertung	47
4.2.2.2.2 Mash-Bag Methode.....	47
Versuchsvorbereitung	48
Aufbau-Schema	48
Versuchslösungen.....	50
Versuchsdurchführung	50
Auswertung	50
4.2.2.2.3 Platten Methode	51
Versuchslösungen.....	51
Versuchsdurchführung	53
Auswertung	53
Anpassung der Plattenversuche zur Bestimmung der Konzentrations-Wirkungskurven .	54
Anpassung der Methode für die Bestimmung der Aufnahme von Tebuconazol in das Myzel von <i>Pisolithus arhizus</i>	54
4.3 EXPOSITIONSVERSUCHE UND KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PESTIZIDEN IN DEN KOMPARTIMENTEN BODEN, WURZELNAHER BODEN UND WURZELN.....	56
4.3.1 AUFZUCHT UND INOKULATION DER BUCHENJUNGPFLANZEN	56
4.3.2 KULTIVIERUNG DER BUCHENJUNGPFLANZEN IM GEWÄCHSHAUS	57
4.3.3 EXPOSITION.....	58
Übersicht über die Treatments	59
4.3.4 PROBENAHEME	60
4.3.5 QUANTIFIZIERUNG DER PHYSIKALISCHEN UND BIOMETRISCHEN PFLANZEN-PARAMETER UND BESTIMMUNG DER PESTIZIDKONZENTRATIONEN IN DEN KOMPARTIMENTEN.....	61
4.3.5.1 Physikalische und biometrische Pflanzenparameter	61
Biomarker Ergosterol.....	61
Trockenmassebestimmung	62
Pflanzenparameter	62
4.3.5.2 Bestimmung der Pestizidkonzentrationen in den Kompartimenten.....	63
4.3.5.2.1 Geräteparameter	63
4.3.5.2.2 Massenübergänge und Messparameter	63
4.3.5.2.3 Referenzstandards, Interner Standard und Kalibrationslösungen.....	68
4.3.5.2.4 Kalibration, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	69
Lösungsmittelkalibration für Boden- und Wurzelproben	69
Matrixkalibration für Boden- und Wurzelproben	70
Nachweis und Bestimmungsgrenzen für die Matrixkalibrationen.....	72
Kalibration für die Extraktion von Tebuconazol aus dem Myzel von <i>Pisolithus arhizus</i> ...	73
4.3.5.2.5 Qualitätssicherung	74

4.3.5.2.6	Wiederfindungsversuche	74
	Wiederfindung: Boden	75
	Wiederfindung: Wurzelnahe Bodenbereich	75
	Wiederfindungen: Wurzel	76
	Wiederfindung für Tebuconazol aus exponiertem Myzel	76
4.3.5.2.7	Vorschrift zur Extraktion von Fungiziden aus Boden- und Wurzelproben	76
	Probenvorbereitung	76
	Extraktion	79
	Messlösungen	79
4.3.5.2.8	Vorschrift zur Extraktion von Tebuconazol aus dem Myzel der Hemmversuche	80
	Probenvorbereitung:	80
	Extraktion	80
	Messlösungen	80
4.4	STATISTISCHE METHODEN	80
4.4.1	STATISTISCHE AUSWERTUNG DER MYZELFLÄCHEN	80
4.4.2	AUSWERTUNG DER KONZENTRATIONS-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN	81
5	<u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</u>	<u>82</u>
5.1	ÖKOTOXIKOLOGISCHE EFFEKTE VON PFLANZENSCHUTZMITTELN AUF MYKOBIONTEN	82
5.1.1	UNTERSUCHUNGEN IN KOMBINIERTEN <i>IN VITRO</i> SYSTEMEN AUS MYKOBIONT UND PHYTOBIONT	82
5.1.2	UNTERSUCHUNGEN IN MYKOBIONTEN SYSTEMEN	83
5.1.2.1	Effekte auf den Endpunkt Myzelwachstum: Qualitative Methode Tube Strips-Methode	83
5.1.2.2	Effekte auf den Endpunkt Myzelwachstum: Quantitative Methoden	84
5.1.2.2.1	Wachstumsversuche auf unbehandeltem Nährmedium	84
5.1.2.2.2	Mash-Bag Methode	85
5.1.2.2.3	Platten Methode	86
	Wirkung von Azoxystrobin, Tebuconazol, Boscalid und Quinoxifen auf <i>Pisolithus</i>	
	<i>arhizus</i> und <i>Cenococcum geophilum</i>	86
	Zusammenfassung	91
	Wirkung der Formulierung Orius® und des Wirkstoff Tebuconazol auf ECM	93
	Zusammenfassung	97
5.1.2.2.4	Konzentrations- Wirkungskurven	99
	<i>Cenococcum geophilum</i>	99
	<i>Pisolithus arhizus</i>	100
5.1.2.2.5	Bestimmung von Tebuconazol im Myzel von <i>Pisolithus arhizus</i>	102

5.2	EXPOSITIONSVERSUCHE ZUR KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PESTIZIDEN IN DEN	
	KOMPARTIMENTEN BODEN, WURZELNAHER BODEN UND WURZEL.....	104
	Trockenmassebestimmung des verwendeten Substrates	104
5.2.1	BIOMETRISCHE PFLANZENPARAMETER	104
	Bestimmung des Ergosterolgehaltes in Wurzelproben	104
	Sprosslänge und Sprossbiomasse	106
	Wurzellänge und Wurzelgewicht	106
5.2.2	PESTIZIDKONZENTRATIONEN IN DEN KOMPARTIMENTEN BODEN, WURZELNAHER BODEN UND	
	WURZELN NACH EXPOSITION	108
5.2.2.1	Kontrollen zu den Treatments der Gewächshausversuche.....	108
5.2.2.2	Vergleich der absoluten Wirkstoffgehalte der Kontrollen mit Exposition zu den	
	kumulierten Gehalten von Boden, Wurzelnaher Boden und Wurzeln der Treatments .	108
5.2.2.3	Kompartiment Boden	110
5.2.2.4	Wurzelnaher Boden.....	111
5.2.2.5	Wurzeln	112
5.2.3	BERECHNUNG DER PROZENTUALEN VERTEILUNG IN DEN KOMPARTIMENTEN	113
	KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZEN IN DEN KOMPARTIMENTEN	114
5.3	UMWELT- UND ÖKOTOXIKOLOGISCHE RISIKOANALYSE DER SUBSTANZEN	116
5.3.1	BERECHNUNG DER ÖKOTOXIKOLOGISCHEN KENNGRÖßEN: EC ₁₀ , EC ₅₀ UND EC ₉₀	116
	Zusammenfassung und Übersicht über die Kenngrößen EC _x	119
5.3.2	BERECHNUNG DES ÖKOTOXIKOLOGISCHEN RISIKOS	120
5.3.3	BEURTEILUNG DES ÖKOTOXIKOLOGISCHEN RISIKOS	122
6	<u>HANDLUNGSEMPFEHLUNGEN UND OFFENE FRAGEN.....</u>	124
7	<u>REFERENCES.....</u>	127
7.1	ERGÄNZENDE ARBEITEN	134
8	<u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</u>	135

9	<u>ANHANG</u>	136
9.1	GERÄTE UND MATERIALIEN	136
9.1.1	REZEPTE DER NÄHRMEDIEN.....	136
9.1.2	STAMMZERTIFIKAT BUCHENSAMEN.....	138
9.1.3	TONSUBSTRAT (KLASMANN-DEILMANN GMBH)	138
9.1.4	VERWENDETE CHEMIKALIEN, VERBRAUCHSMATERIAL UND LABORGERÄTE.....	139
9.1.4.1.1	Effektversuche	139
9.1.4.1.2	Expositionsversuche	140
9.1.5	PHYSIKALISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DER PESTIZIDE.....	141
9.1.5.1	Unterlagen zu den Wirkstoffen.....	141
9.1.5.2	Unterlagen zu den Formulierungen	147
9.2	EKTOMYKORRHIZA UND PESTIZIDE IN DER LITERATUR - EINE NICHTREPRÄSENTATIVE ANALYSE	149
9.3	GEHALT VON ERGOSTEROL BEI UNBEHANDELTEM MYZEL	149
9.4	VERGLEICH DES WACHSTUMSPOTENZIALS DER NULLKONTROLLEN IM VERGLEICH ZU DEN WACHSTUMSKURVEN	150
9.5	DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE AUS DEN MASH-BAG VERSUCHEN	152
9.6	ERGÄNZENDE ERGEBNISSE DER ANALYTIK	154
9.6.1	UV-SPEKTREN VON ERGOSTEROL AUS WURZELMATRIX EXTRAHIERT UND EINES KALIBRATIONSTANDARDS.....	154
9.6.2	ERGOSTEROLGEHALTE IN DEN WURZELPROBEN DER GEWÄCHSHAUSVERSUCHE	155
9.6.3	WIEDERFINDUNGEN	155
9.6.3.1.1	Ergänzende Darstellungen zur Wiederfindung im Boden	157
9.6.3.1.2	Ergänzende Darstellungen zur Wiederfindung Wurzelnaher Bodenbereich	157
9.6.3.1.3	Ergänzende Darstellungen zur Wiederfindung in der Wurzel	158
9.6.4	KALIBRATIONEN.....	160
9.6.5	ANALYTISCHE KONZENTRATIONEN DER EXPOSITIONSLÖSUNGEN	161
9.7	GEWÄCHSHAUSPLAN	163
9.8	BERECHNUNGEN DES EVA MODELLS FÜR TEBUCONAZOL	163
10	<u>DANKSAGUNG</u>	163

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gegenüberstellung der Szenarien: Nichtzielpflanze und Zielpflanze	9
Abbildung 2: Schema zur Untersuchung der ökotoxikologischen Effekte	9
Abbildung 3: Schema zur Expositionsanalyse	10
Abbildung 4: Zusammenführung der Daten und Abschätzung des ökotoxikologischen Risikos	10
Abbildung 5: <i>Cenococcum geophilum</i> (links) und <i>Amanita rubescens</i> (rechts)	11
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Mykorrhizosphäre, Rhizosphäre und Hyphosphäre	13
Abbildung 7: Buchenwald bei Lüneburg. Schematische Darstellung des Mykorrhiza-Netzwerkes im Boden	15
Abbildung 8: Ergosterol	18
Abbildung 9: Inlandsabgabe von Wirkstoffen in Pflanzenschutzmitteln 2012	21
Abbildung 10: Tebuconazol - Enantiomere [BVL 2009])	32
Abbildung 11: Azoxystrobin [EU Commission 1998a]	32
Abbildung 12: Boscalid [European Commission 2008a]	33
Abbildung 13: Kresoxim-Methyl [EU Commission 1998b]	33
Abbildung 14: Quinoxifen [European Commission 2003]	34
Abbildung 15: Glufosinat [European Commission 2007]	35
Abbildung 16: Buchenjüngpflanzen in Baumschulpaletten.	38
Abbildung 17: Buchenjüngpflanze im Aufzuchtssystem-Petrischale.	41
Abbildung 18: Mikrotiterplatte mit Tube – Strips	45
Abbildung 19: <i>Pisolithus arhizus</i> auf BAF-Nährmedium	47
Abbildung 20: Versuchsschema der Mash-Bag Methode	49
Abbildung 21: Anormales Wachstum von <i>Pisolithus arhizus</i> (links) im Vergleich zu normalem Wachstum (rechts).	54
Abbildung 22: <i>Pisolithus arhizus</i> aus dem Medium entnommen (a) und <i>Cenococcum geophilum</i> in Flüssigkultur (b)	57
Abbildung 23: Gewächshauszelle in Braunschweig	57
Abbildung 24: Vergleich Ergosterolstandard und Wurzelprobe	61
Abbildung 25: Vergleich der Extraktionsmittel Methanol und Acetonitril	65
Abbildung 26: Vergleich einer SCAN und TIC Messung einer aufgestockten Wurzelprobe.	66
Abbildung 27: Massenspuren einer aufgestockten Methanol-Wurzelmatrix	67
Abbildung 28: Dargestellt werden zwei Kalibrationspunkte des Analyten Boscalid in einer Lösungsmittelkalibration (hier Methanol) und eines methanolischen Wurzelextraktes	70
Abbildung 29: Dargestellt werden zwei Kalibrationspunkte des Analyten Tebuconazol in einer Lösungsmittelkalibration (hier Methanol) und eines methanolischen Wurzelextraktes	71
Abbildung 30: Dargestellt werden zwei Kalibrationspunkte des Analyten Kresoxim-Methyl in einer Lösungsmittelkalibration (hier Methanol) und eines methanolischen Wurzelextraktes	71
Abbildung 31: Wurzel mit Waschwasser	77
Abbildung 32: Schema der Probenvorbereitung für die Analytik der Proben aus den Gewächshausversuchen	78

Abbildung 33: Tube Strips behandelt mit Boscalid	83
Abbildung 34: Radialer Myzelzuwachs auf unbehandeltem Nährmedium	84
Abbildung 35: Myzelzuwachs von <i>Pisolithus arhizus</i> in Anhängigkeit von der Konzentration von Pestiziden im Nährmedium	88
Abbildung 36: Myzelzuwachs von <i>Cenococcum geophilum</i> in Anhängigkeit von der Konzentration von Pestiziden im Nährmedium	90
Abbildung 37: Myzelzuwachs in Anhängigkeit der Konzentration von Pestiziden im Nährmedium	94
Abbildung 38: Myzelzuwachs in Anhängigkeit der Konzentration von Pestiziden im Nährmedium	96
Abbildung 39: Konzentrations-Wirkungskurve für <i>Cenococcum geophilum</i> (A,B) und <i>Pisolithus arhizus</i> (C-F) mit Wirkstoffen und Formulierungen behandelt	101
Abbildung 40: Myzelfläche <i>Pisolithus arhizus</i> auf Glasfaserfilter kultiviert	102
Abbildung 41: Gemessene Wirkstoffgehalte von Tebuconazol im Myzel von <i>Pisolithus arhizus</i> sowie der Myzel Biomasse	103
Abbildung 42: Vergleich Treatmentprobe(10 TP) und Kontrollprobe	105
Abbildung 43: Biometrische Pflanzenparameter nach 14 Tagen Versuchszeitraum	107
Abbildung 44 Wirkstoffgehalte im Topfsystem nach einmaliger Exposition und Wartezeit von 14 Tagen	109
Abbildung 45: Wurzel von <i>Fagus sylvatica</i> , inokuliert mit <i>Cenococcum geophilum</i>	112
Abbildung 46: Prozentuale Verteilung der Pestizide in den Kompartimenten	114
Abbildung 47: Ökotoxikologische Kenngrößen	118
Abbildung 48: Anzahl der Einträge bei Elsevier B.V.: ScienceDirect	149
Abbildung 49: Vergleich des Wachstums für <i>Pisolithus arhizus</i> (A,B) und <i>Lyophyllum</i> (C).....	151
Abbildung 50: Vergleich Myzelflächen im Bodentest mit Tebuconazol und Orius [®] exponiert.....	153
Abbildung 51: UV-Spektren von Ergosterol aus Wurzelmatrix extrahiert und eines Kalibrationsstandards	154
Abbildung 52: Ergosterolgehalte der Wurzelproben	155
Abbildung 53: Wiederfindungen in den Kompartimenten	159
Abbildung 54: Kalibration Tebuconazol	160
Abbildung 55: Kalibration: Wurzeln 10% Boscalid und <i>Cenococcum geophilum</i>	160
Abbildung 56: Kalibration Tebuconazol für die Myzelproben.....	161
Abbildung 57: Probenplan Gesamt Versuch.....	163

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wirkung von Pestiziden auf Mykorrhiza	26
Tabelle 2: Eingesetzte Wirkstoffe	31
Tabelle 3: Verwendete Ektomykorrhiza Stämme.....	36
Tabelle 4: Kalibration Ergosterol	42
Tabelle 5: Kultivierungsmedien und Einwaagen in mg Frischgewicht der Isolate für die Ergosterolbestimmung	43
Tabelle 6: Übersicht über die eingesetzten Wirkstoffe und Formulierungen	44
Tabelle 7: Übersicht über die Mash-Bag Methode.....	48
Tabelle 8: Versuchsübersicht über die Mash-Bag Methode.....	49
Tabelle 9: Übersicht Plattenversuche	52
Tabelle 10: Aufnahme von Tebuconazol in das Myzel von Pisolithus arhizus durch die Exposition mit Orius® mittels behandelten Nährmediums	55
Tabelle 11: Übersicht über die Applikation	58
Tabelle 12: Probenahmeplan der Treatments nach Zeitpunkt T=14 Tage	60
Tabelle 13: Getestete LC-MSMS Säulen	64
Tabelle 14: Massenübergänge der analysierten Substanzen mittels LC - MSMS	64
Tabelle 15: In Lösungsmittel angesetzte Kalibration der Analyten	69
Tabelle 16: Matrixkalibration sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Analyten für die Gewächshausversuche	73
Tabelle 17: Kalibration für die Extraktion von Tebuconazol aus exponiertem Myzel von Pisolithus arhizus	74
Tabelle 18: Hemmwirkung von ausgewählten Fungiziden auf das Myzelwachstum von Pisolithus arhizus und Cenococcum geophilum im Plattentest	92
Tabelle 19: Auswirkung der Formulierung und des Wirkstoffes auf vier ECM-Myzelkulturen	98
Tabelle 20: Gehalte an Substanzen im Bodenkompartment.....	111
Tabelle 21: Gehalte an Substanzen: Wurzelnahe Bodenkompartment	112
Tabelle 22: Gehalte an Substanzen: Wurzelkompartment	113
Tabelle 23: Analytische Konzentrationen der Substanzen in den einzelnen Kompartimenten	115
Tabelle 24: Übersicht über die Kenngrößen.....	119
Tabelle 25: Risikoanalyse der Substanzen Tebuconazol und Boscalid.....	121
Tabelle 26: Aufgestockte Konzentrationen der Wiederfindungen zum 100% AM Treatment.	156
Tabelle 27: Aufgestockte Konzentrationen der Wiederfindungen zum 10% AM Treatment.	156
Tabelle 28: Wiederfindungen (WF) für die Bodenproben	157
Tabelle 29: Wiederfindungen (WF) für den Wurzelnahe Boden	158
Tabelle 30 Wiederfindungen (WF) für das Kompartiment Wurzel	158
Tabelle 31: Aufstockung der Proben.....	161

IV. Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
AM	Applikationsmenge
BI	Behandlungsindex
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
c	Konzentration
CAS	Chemical Abstract Service
CE	Collision Energy
DIN	Deutsches Institut für Normung
DW	Trockengewicht
EC	Effect concentration
ECM	Ektomykorrhiza
EC _x	Effect concentration x
ED	Electrochemical Detection
EG	Erfassungsgrenze
ESI	Electrospray Ionization
EU	Europäische Union
EVA	Exposure Via Air
F	Fungizid
FG	Feuchtgewicht
FOCUS	Surface Water Scenario Group
Frag	Fragmentor
GC-MS	Gaschromatograph mit Massenspektrometer
H	Herbizid
HPLC	High Pressure Liquid Chromatograph
IS	Interner Standard
JKI	Julius Kühn Institut
KOW	Verteilungsgleichgewicht zwischen Oktanol und Wasser
LC-DAD	Flüssigchromatograph mit Diodenarraydetektor
LC-MSMS	Flüssigchromatograph mit triple-Massenspektrometer
m	Steigung
M	Masse
MAF	Multiple Application Factor
MEC	Measured Environmental Concentration
MeOH	Methanol
Mg	Milligramm
NWG	Nachweisgrenze
NG	Nassgewicht
nm	Nanometer
NOEC	No Observed Effect Concentration
OECD	Organisation für europäische wirtschaftliche Zusammenarbeit
PAPA	P anel P flanzenschutzmittel- A nwendungen
PCR	Polymerase Chain Reaction
pD	Dampfdruck
PEC	Predicted Environm. Concentration
PNEC	Predicted No Effect Concentration
PTFE	Polytetrafluorethylen
QC	Qualitäts Kontrolle
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
QR	Quotient Ratio
RT	Retentionszeit
S/N	Signal-to-Noise Ratio
t	Zeit
TER	Toxic Exposure Ratio
US-EPA	Umweltbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika
V	Volumen

Zusammenfassung

Durch die fortschreitende Intensivierung der landwirtschaftlich genutzten Flächen in Deutschland wird im Rahmen der Ertragsteigerung oftmals ein erhöhter Einsatz von Düngemitteln und Pestiziden beobachtet. Da bislang nur wenige Abstandsauflagen zu Saumbiotopen bei der Zulassung von Substanzen festgelegt wurden und darüber hinaus durch Abdrift, vor allem in Hauptwindrichtung von Agrarflächen, eine ungewollte Applikation ausgebrachter Fungizide auf Waldsäume (hier: Nichtzielfläche) anzunehmen ist, kann eine Gefährdung von Nichtzielorganismen nicht ausgeschlossen werden. Durch einen zulässigen Einsatz von Fungiziden im Forst und in Baumschulen werden Bestände auch unmittelbar mit Pestiziden exponiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Symbiose zwischen Bäumen als Nichtzielpflanzen und Ektomykorrhiza-Pilzen (ECM) als Nichtzielorganismen unter Fungizid- und Herbizid-Exposition untersucht. Als Modellsubstanzen wurden sowohl Pestizide mit einer Zulassung für Forstwirtschaft und Baumschulen wie auch mit Ackerbauzulassung gewählt. Die Anwendungsbereiche werden durch Konzentrationsniveaus (100% bzw. 10% der empfohlenen Aufwandmenge, AM) abgebildet.

Buchen, welche eine intakte Symbiose mit Ektomykorrhiza aufweisen, sind besser an ihre Umwelt angepasst und verfügen über Standortvorteile aufgrund einer effektiveren Nährstoff- und Wasseraufnahme. Diese Symbiose reagiert sensibel auf anthropogene Störungen wie Pestizidanwendungen. Die Substanzen können dabei sowohl über eine direkte Wirkung auf die Mykorrhiza-Pilze, wie auch über eine indirekt schädigende Wirkung auf die Wirtspflanze, die Symbiose beeinflussen.

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob und welche Auswirkungen auf den Endpunkt Myzelwachstum von Ektomykorrhiza Pilzen durch eine Exposition zu beobachten sind. Zur Gefährdungsabschätzung wurden gemessene Pestizidkonzentrationen (MEC) in Gewächshausversuchen bestimmt; EC_x Werte aus Konzentrations-Wirkungskurven ermittelt und die daraus resultierenden ökotoxikologischen Kenngrößen QR (Quotient Ratio) und TER (Toxic Exposure Ratio) berechnet.

Dazu wurden zunächst *in vitro* Hemmversuche unter definierten Laborbedingungen durchgeführt. Als Endpunkt wurde das Myzelwachstum von Ektomykorrhiza-Pilzen definiert und entsprechende Kenngrößen wie EC_{10} , EC_{50} und EC_{90} Werte für verschiedene Pestizid-ECM Modelle ermittelt. Als Modellorganismen wurden *Pisolithus arhizus*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Lyophyllum* sp. und *Cenococcum geophilum* eingesetzt. Als Pestizide wurden

die Wirkstoffe Quinoxifen, Boscalid, Tebuconazol, Azoxystrobin sowie die Formulierungen Orius[®], Collis[®] und Basta[®] untersucht.

Ergänzend dazu wurden Expositionsversuche im Gewächshaus durchgeführt und die Konzentrationen und Verteilungen der Wirkstoffe Tebuconazol und Boscalid in den Kompartimenten Boden¹, Wurzelnaher Boden² und Wurzel bestimmt. Hierzu wurde eine Methode zur Aufbereitung, Extraktion und Analyse mittels LC- MSMS in den verschiedenen Kompartimenten entwickelt. Ebenfalls wurde eine Methode zur Messung der Substanz Tebuconazol im Myzel von *Pisolithus arhizus* entwickelt.

Aufgrund der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass

- die Toleranz der Mykobionten auf eine Exposition von dem untersuchten Testorganismus und dem eingesetzten Wirkstoff sowie dessen Konzentration abhängt. Hierbei wurde für den sensibelsten Testorganismus im Versuch, *Pisolithus arhizus*, ein EC₅₀ Wert kleiner 0,026 ng g⁻¹ für eine Exposition mit Orius[®] ermittelt. Für eine Exposition von *Pisolithus arhizus* mit dem Herbizid Basta[®] wurde ein EC₅₀ Wert von 0,4% AM entsprechend 6 g ha⁻¹ Glufosinat berechnet.
- in dem für die Symbiose relevanten Kompartiment Wurzelnaher Boden Wirkstoffkonzentrationen im Bereich von 100 - 500 ng g⁻¹ für Boscalid und 150 - 700 ng g⁻¹ für Tebuconazol bestimmbar sind.
- in dem Kompartiment Wurzel sowohl der Wirkstoff Tebuconazol wie auch Boscalid nachgewiesen werden konnte.
- im exponierten Myzel von *Pisolithus arhizus* der Wirkstoff Tebuconazol nachgewiesen werden konnte. Es wird somit von einer Bioverfügbarkeit der Substanz Tebuconazol ausgegangen.
- aufgrund der Datenlage und einer Berücksichtigung eines TER-Wertes < 5, für nahezu alle Kombinationen ein erhöhtes ökotoxikologisches Risiko anzunehmen ist. Einzig für eine Exposition mit 10% AM Boscalid auf den Testorganismus *Cenococcum geophilum* konnte ein TER > 9 ermittelt werden.

Somit erscheinen weitere Untersuchungen bezüglich der Auswirkung von Pestiziden auf die Nichtzielorganismengruppe Ektomykorrhiza sinnvoll und notwendig. Für die Bewertung muss ein geeignetes Testsystem für Bodenmikroorganismen wie Mykorrhiza-Pilze standardisiert und validiert werden. Die entwickelte und angewendete Plattenmethode als Standardmesssystem erscheint dafür geeignet. Im Rahmen der Pestizidzulassungen müssen in Zukunft

¹ Der Begriff Boden wird in dieser Arbeit als Oberbegriff und synonym auch für die verwendeten Substrate definiert.

² Wurzelnaher Boden kennzeichnet hier ein Kompartiment vgl. Abschnitt 3.1.3

möglicherweise Mykorrhiza-Symbiosen bedacht werden und Schutzmaßnahmen wie Anwendungsbeschränkungen oder Abstandsregelungen zu Saumbiotopen überdacht werden.

Abstract

The increased demand for foodstuffs, as well as the expansion of energy production from energy crops, leads to the intensification of agriculturally used areas in Germany. The increase in crop yields is often associated with a higher fertiliser and pesticide application. To date, only few distance requirements to biotopes bordering agricultural areas are being imposed at product approval. In view of the fact, furthermore, that fungicides administered on agricultural lands reach woodland margins (here: non-target areas) by unintentional airborne application, particularly in prevailing wind direction, exposure of non-target organisms cannot be excluded. Administering fungicides into forestry and tree nurseries also directly exposes tree populations to pesticides.

This work investigates the symbiosis between trees as non-target plants and Ectomycorrhizal fungi (ECM) as non-target organisms exposed to fungicides and herbicides. Pesticides approved for forestry and tree nursery use, as well as for tilled land, serve as model substances. The application domains are represented by concentration levels (100% or 10% respective, of the recommended rate of application).

Beeches, which exhibit an intact symbiosis with Ectomycorrhizal fungi, are better adapted to their environment. Furthermore, their effective nutrient and water uptake provides them with locational advantages. This symbiosis is sensitive to anthropogenous disturbances, such as pesticide applications. These substances can also interfere into the symbiosis not only by direct effect on mycorrhizal fungi, but also by indirect contamination of the host plant.

This study aims at investigating if such effects can be observed on the end point of mycelial growth of ectomycorrhizal fungi by exposition, and if so, which ones. For risk assessment, the pesticide concentrations measured (MEC, Measured Environmental Concentration) was determined in greenhouse experiments and the EC_x s determined from concentration-response curves and the resulting ecotoxicological indicators, such as QR (Quotient Ratio) and TER (Toxic Exposure Ratio) values were computed.

In order to do so, inhibition experiments were conducted first *in-vitro* under specific laboratory conditions. Mycelium growth of Ectomycorrhizal fungi was defined as end point and corresponding indicators, such as EC_{10} , EC_{50} and EC_{90} values were calculated for various pesticide ECM-models. *Pisolithus arhizus*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Lyophyllum* sp. und *Cenococcum geophilum* were used as model organisms. As pesticides, the active ingredients

quinoxifen, boscalid, tebuconazole, azoxystrobin, as well as the formulations Orius[®], Collis[®] and Basta[®] were investigated. In addition, exposure trials were carried out in greenhouses and the concentrations and distributions of the active agents tebuconazole and boscalid in the compartments soil, rhizospheric soil and roots determined. In order to do so, methods consisting of preparation, extraction and analysis using LC- MSMS in the various compartments was elaborated. A measurement method for the substance tebuconazole in the mycelium of *Pisolithus arhizus* was also developed.

The results provided the basis to the following findings:

- The tolerance of the mycobiont to exposition depends on the test organisms and the active agent used, as well as its concentration. An EC₅₀ value lower than 0.026 ng g⁻¹ for exposition to Orius[®] was established for *Pisolithus arhizus*, the most sensitive test organism of the study. For an exposition of *Pisolithus arhizus* to the herbicide Basta[®], an EC₅₀ value of 0.4% AM corresponding to 6 g ha⁻¹ glufosinate was computed.
- A combination of active agents within the 100-500 ng g⁻¹ range for boscalid and 150-700 ng g⁻¹ for tebuconazole was established in the compartment relevant for the symbiose (rhizospheric soil).
- In the root compartment, not only the active agent tebuconazole, but also boscalid were detected in treatment.
- In the exposed mycelium of *Pisolithus arhizus*, the active agent tebuconazole was detected. This suggests a bioavailability of the substance tebuconazole.
- Based on available data and taking a TER value <5 into consideration, an increased ecotoxicological risk must be assumed. It has been possible to detect only one TER>9 on the test organism *Cenococcum geophilum* for exposure to 10% AM boscalid.

Thus, further studies on the impact of pesticides on ectomycorrhizal, a non-target group of organisms, appear reasonable and necessary. For these types of evaluations, a suitable test system for soil microorganisms such as mycorrhizal fungi must be standardized and validated. The plate method developed and applied here as a standard measurement system appears suitable. Future pesticide certification procedures should take mykorrhiza symbioses into account as well as reconsider protective measures, such as application restrictions or distance regulations to ecotons.

1 Einleitung

Ein nachhaltiger Umgang mit der Ressource Boden wird in Zukunft eine zunehmende Herausforderung darstellen. Aufgrund der gesteigerten Nachfrage an Nahrungs- und Futtermitteln, sowie durch den Ausbau der Energiegewinnung durch Energiepflanzen wird eine Intensivierung der landwirtschaftlich genutzten Flächen prognostiziert und somit von einer kontinuierlichen Erhöhung der landwirtschaftlichen Erträge ausgegangen. Ertragssteigerungen gehen jedoch oftmals mit einem höheren Einsatz von Düngemitteln und Pestiziden einher [Knäbel et al. 2013, OECD 2012].

Bei vielen Geländestrukturen in Deutschland befinden sich Saumbiotope und Wälder unmittelbar angrenzend zu landwirtschaftlich genutzten Flächen. Durch den Einsatz von Pestiziden auf landwirtschaftlichen Flächen kann es durch Volatilisation, Run off oder Abdrift zu einer Beeinträchtigung angrenzender Ökosysteme kommen [BMELV 2013a, UBA 2014a]. Ein Eintrag von Pestiziden kann trotz neuer Ausbringtechniken und modernerer Substanzen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Laut Julius Kühn-Institut [JKI 2010] sind Abdriftwerte in einem Meter Entfernung von bis zu 3% der Aufwandmenge im Ackerbau zu erwarten. An etwa 70% der landwirtschaftlichen Flächen in Deutschland müssen, aufgrund ausreichender kleinteiliger Geländeanteile in der Region, zu Saumbiotopen und anders als zu Oberflächengewässern, keine Abstandsaufgaben eingehalten werden. Somit kann bis unmittelbar an den Saumbereich gearbeitet werden [Institut für Agrarökologie 2012].

Ein Eintrag von Herbiziden in angrenzende Waldökosysteme konnte in den von Bernhardt durchgeführten Messungen an Buchen, welche in unmittelbarer Nähe zu behandelten Ackerflächen wuchsen, beobachtet werden. Die ausgebrachten Substanzen konnten im Stammablaufwasser sowie im Waldboden unterhalb der Kronen nachgewiesen werden [Bernhardt 2004].

Im Waldzustandsbericht des Jahres 2012 wurde dokumentiert, dass - trotz einer leichten Erholung im Vergleich zum Jahr 2011 - immer noch jede dritte Buche von einer deutlichen Kronenverlichtung betroffen war [BMELV 2013b]. Bereits 1999 vermuteten Hampp et al. [1999] aufgrund der Dimension der Laubverluste an Buchen, dass veränderte Standortbedingungen wie Veränderungen in der Stickstoff- und Wasserversorgung, diesen Laubverlust mit beeinflussen. In der Vergangenheit wurde jedoch bei der Suche nach den Ursachen zunächst das Bodenkompartment ausgeklammert. Buchen gehen Symbiosen mit Ektomykorrhiza Pilzen ein. Aufgrund

einer verbesserten Nährstoff- und Wasserversorgung von mykorrhizierten Wirtspflanzen könnte eine intakte Mykorrhiza eine zunehmende Bedeutung an Wassermangelstandorten erlangen.

Eine anthropogene Beeinträchtigung der Boden-Mikroorganismengesellschaften von Wäldern, welche auf ehemaligen Ackerflächen aufgeforstet wurden, wurde von Fichtner et al. [2014] gezeigt. Eine Veränderung in der Artenzusammensetzung konnte auch 100 Jahre nach den Wiederaufforstungsmaßnahmen nachgewiesen werden.

Studien zeigten zudem, dass die Symbiose sehr empfindlich auf anthropogene Einflüsse wie zum Beispiel Pestizidapplikationen reagiert [Abd-Alla et al. 2000, Cudlín et al. 1983, Diedhiou et al. 2004, Garcia et al. 2008, Greg 2009, Imfeld und Vuilleumier 2012, Kjölller und Rosendahl 2000 und Marin 2011]. In wieweit diese Symbiose auch durch moderne Pestizide beeinflusst wird, ist bislang ungenügend erforscht (vgl. 9.2, S. 149).

Zur Abschätzung der Umweltauswirkungen von Substanzen - zum Beispiel auf die Diversität von Bodenorganismengemeinschaften - werden im Rahmen der Umwelt- und Risikobewertung sowohl eine Abschätzung der Exposition, wie auch der Effekte vorgenommen. Liegt eine erhöhte Umweltkonzentration im Vergleich zur tolerierbaren Effektkonzentration vor, sind Auswirkungen für die Umwelt wahrscheinlich und weitere Maßnahmen notwendig [European Commission 2002, Fent 2013].

2 Zielsetzung

Im Rahmen der Arbeit wurde der Einfluss von vier Fungizid-Wirkstoffen, zwei Fungizid-Formulierungen und einem Herbizid auf die Mykorrhizierung von Buchenjungpflanzen untersucht. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der ökotoxikologischen Effekte der ausgewählten Pestizide auf den Endpunkt Myzelwachstum von Ektomykorrhiza-Pilzen. Als Endpunkt wird in dieser Arbeit, in Anlehnung an die Definition des Umweltbundesamtes, ein konkret gemessener biologischer Effekt (hier: Myzelwachstum) auf eine Prüffart (hier: Ektomykorrhiza-Pilze) - in Abgrenzung zum statistischen Endpunkt, welcher eine statistische Kenngröße wie EC_x Werte definiert - verstanden [UBA 2009].

Im Rahmen von ökotoxikologischen Studien zur Auswirkung von Pestiziden wurden bislang verstärkt landwirtschaftliche Nutzflächen oder angrenzende Gewässer untersucht. Bislang gibt es wenige Studien zur Auswirkung von Pestiziden auf Wälder

oder Baumschulen [Diaz et al. 2003]. Fungizide werden jedoch in Baumschulen häufig und routinemäßig angewendet, um hochwertige Pflanzenzüchtungen zu sichern [Carrillo et al. 2011]. Im Versuchsdesign wurde daher das tatsächliche Applikationsniveau einer Zielapplikation in Baumschulen und Forst, für die im Forst zugelassenen Substanzen Boscalid und Quinoxifen sowie die Formulierung Collis[®] untersucht. Die Formulierung Basta[®] wurde als Herbizid aufgenommen. Darüber hinaus wurde ergänzend untersucht, ob durch Nichtzieleinträge von den in der Landwirtschaft zugelassenen Substanzen Tebuconazol und Azoxystrobin sowie der Formulierung Orius[®] Auswirkungen auf das Myzelwachstum zu erwarten sind.

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob der Nichtzielorganismus Ektomykorrhiza-Pilz durch Fungizidexpositionen beeinflusst wird, wurden sowohl analytisch-chemische wie auch mikrobiologische *in vitro* Methoden entwickelt und angewandt.

Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

- 1) Wie kann der Mykorrhizierungsgrad der Buchenwurzeln bestimmt werden?
 - Methodenentwicklung: Biomarker Ergosterol (vgl. Kap. 4.2.1.1)
 - Entwicklung einer sterilen Inokulationsmethode zwischen Ektomykorrhiza und Buchenjungepflanze (vgl. Kap.4.2.1)
 - Berechnung des Ergosterolgehalts in Reinkulturen der ECM- Pilze (vgl. Kap. 9.3)
- 2) Untersuchung zu den ökotoxikologischen Effekten - Wie wird das Myzelwachstum der Ektomykorrhiza durch die Fungizidexposition im Laborversuch beeinflusst?
 - Entwicklung von *in vitro* Modellsystemen (vgl. Kap. 4.2.2)
 - Experimente im Modellsystem, die eine Beeinflussung des Myzelwachstums im Vergleich zu einer Kontrollgruppe abbilden. Hierbei wurden Verdünnungsstufen von Applikationsmenge (100%AM) bis zu Interzeptionskonzentration (10%AM) untersucht (vgl. Kap. 4.2 und 5.1.2).
 - Berechnung von Konzentrations-Wirkungskurven (vgl. Kap.5.1.2.2.4)
 - Berechnung von statistischen Endpunkten (EC_x Werte) (vgl. Kap. 5.3.1)

3) Untersuchung der Exposition: Welche Konzentrationen der Substanzen werden in den Kompartimenten Boden, Wurzelnahe Boden und Wurzel im Gewächshausversuch gefunden?

- Methodenentwicklung: Pestizidanalytik in den Kompartimenten (vgl. Kap. 5.2.2)
- Experiment Gewächshausversuch (Buchenjungpflanze, Mykorrhiza, Pestizid) (vgl. Kap. 4.3 und 5.2)
- Bestimmung der messbaren Pestizidkonzentration (MEC) in den Kompartimenten (vgl. Kap. 5.2.2)
- Bestimmung der Pestizidkonzentration im exponierten Myzel von *Pisolithus arhizus* (*in vitro* Versuche) (vgl. Kap. 5.1.2.2.5)

Aus den Daten der Effektversuche (vgl. Kap. 5.1) und den Expositionsversuchen (vgl. Kap. 5.2) wurden zur Abschätzung des Umweltrisikos QR Werte [Fent 2013] und TER Werte [European Commission 2002] (vgl. Kap. 5.3) bestimmt und bewertet.

2.1 Übersicht über das Versuchsdesign

Das Versuchsdesign wird im Folgenden zur besseren Übersicht in Form von Schaubildern dargestellt.

Ziel- und Nichtzielflächen Szenario

Im Rahmen der Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche Applikationsszenarien (vgl. Abbildung 1), entsprechend einer Ziel- und Nichtzielflächenbehandlung untersucht. Eine Zielapplikation für Baumschulen und Forst wurde mit den Substanzen Boscalid und Quinoxifen, sowie für die Formulierung Collis[®] und Basta[®] untersucht. Hierbei wurde eine an die empfohlene Aufwandmenge angepasste Versuchskonzentration (hier 100% AM) berücksichtigt.

Eine Beeinflussung von Nichtzielpflanzen und Nichtzielorganismen auf Nichtzielflächen durch Abdrift oder Volatilität der Substanzen von Ackerflächen wurde mit den Substanzen Tebuconazol und Azoxystrobin sowie für die Formulierung Orius[®] untersucht. Dies wird in dieser Arbeit durch eine reduzierte Applikationsmenge von 10% der empfohlenen Aufwandmenge untersucht.

	Nichtzielpflanze	Zielpflanze
		
Fläche	Nichtzielfläche	Zielfläche
Eintrag ins System	Abdrift, Volatilität	Ausbringung
Anwendung	Landwirtschaft	Forstwirtschaft, Baumschulen
Substanzen	Tebuconazol (W/F) Orius (F/F) Azoxystrobin (W/F)	Boscalid (W/F) Collis (F/F) Basta 200(F/H) Quinoxifen (W/F)
Aufwandmenge	10% AM	100% AM

Abbildung 1: Gegenüberstellung der Szenarien: Nichtzielpflanze und Zielpflanze

Untersuchungen zu den ökotoxikologischen Effekten

Zur Untersuchung der ökotoxikologischen Effekte (vgl. Abbildung 2) wurde der Endpunkt Myzelwachstum für die Mykobionten nach Exposition mit den ausgewählten Wirkstoffen und Formulierungen in verschiedenen Konzentrationsstufen untersucht. Dazu wurden verschiedene Testsysteme (Tube-, Mash-Bag - und Plattenmethode) entwickelt und die Effekte auf das Myzelwachstum untersucht. Aus den Daten wurden Konzentrations-Wirkungskurven sowie ökotoxikologische Kennwerte ermittelt.

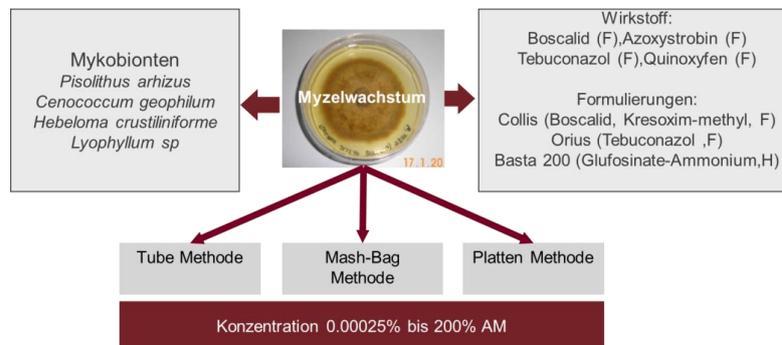


Abbildung 2: Schema zur Untersuchung der ökotoxikologischen Effekte

Untersuchungen zur Exposition

Für die Expositionsversuche wurden Buchenjungepflanzen mit *Pisolithus arhizus* und *Cenococcum geophilum* inokuliert und mit den ausgewählten Formulierungen Collis[®] und Orius[®] in zwei Konzentrationsstufen (vgl. Abbildung 3) exponiert. In den Kompartimenten Boden, Wurzelnahe Boden und Wurzeln wurde die Fungizid- (und Ergosterol-) Konzentrationen bestimmt. Die Methoden sind in Kap. 4.3 und die Ergebnisse der Versuche unter Kap. 5.3 dargestellt. Ergänzend wurde die Ergosterolkonzentration in den Wurzeln ermittelt.

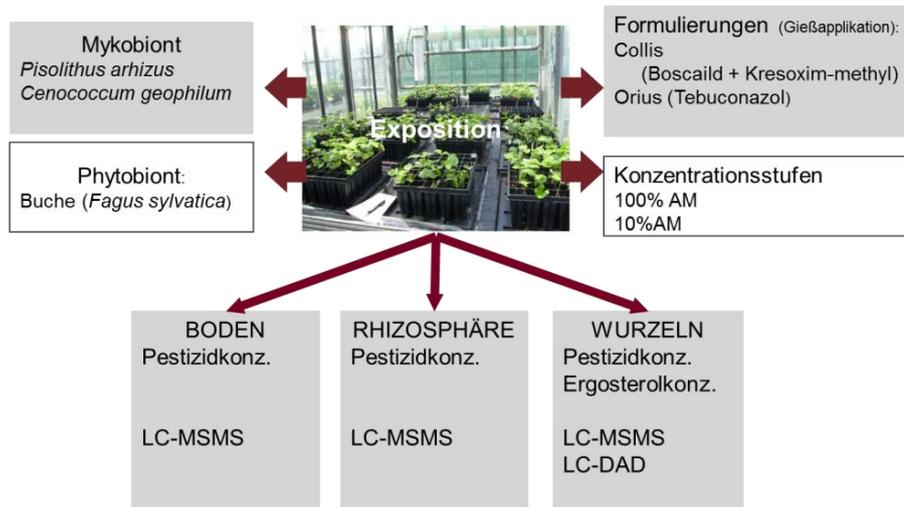


Abbildung 3: Schema zur Expositionsanalyse

Zusammenführung der Ergebnisse und Bewertung der ökotoxikologischen Auswirkungen

Die Ergebnisse aus den Effektversuchen für den Endpunkt Myzelwachstum und die gemessenen Wirkstoff-Konzentrationen (MEC) für das Kompartiment Wurzelnahe Boden aus den Expositionsversuchen wurden ins Verhältnis zueinander gesetzt. Eine Abschätzung des Gefährdungspotenzials wird für beide Szenarien (Zielpflanzen und Nichtzielpflanzen) angestrebt.



Effekt

Wie wird das Myzelwachstum von ECM durch Fungizide beeinflusst?
Laborversuche/Modellsystem

Exposition

Welche Konzentrationen werden an der Wurzel gefunden?
Gewächshausversuch

Besteht ein **Gefährdungspotenzial** für Nichtzielorganismen (auf Nichtzielflächen)?
Handlungsempfehlungen wie Abstandsregelungen?

Abbildung 4: Zusammenführung der Daten und Abschätzung des ökotoxikologischen Risikos

3 Fachlicher Hintergrund

3.1 Mykorrhiza

Das symbiontische Zusammenleben von Pflanzenwurzeln und Pilzen wird als Mykorrhiza bezeichnet. Mehr als 80% aller Pflanzen sind fakultativ oder obligat fähig diese Symbiose einzugehen, die sowohl für den pflanzlichen Symbiose Partner (Phytobiont) wie auch für den Pilz als Mykobiont in der Regel von Vorteil ist [Donges 2008, Siddiqui et al. 2008].

Bei der Endomykorrhiza oder arbuskulären Mykorrhiza dringt der Pilz direkt in die Zellen ein und bildet dort Vesikel und Arbuskel aus. Die arbuskuläre Mykorrhiza wird von etwa 80% aller Landpflanzen ausgebildet. Dies sind zumeist krautige Pflanzen, aber auch einige Holzpflanzen (z.B. aus der Familie der Acareaceae). Diese Strukturen werden in dieser Arbeit nicht untersucht.

Etwa 3% der Landpflanzen bilden Ektomykorrhiza aus, deren charakteristisches Merkmal eine Ummantelung der Feinwurzeln des Baumes ist. Einige holzige Arten, zum Beispiel aus der Ordnung der Fagales (Buchenartigen) sind typische Vertreter unserer Hauptbaumarten in gemäßigten und borealen Zonen und bilden Ektomykorrhiza aus. Deren Mantelstrukturen, wie in Abbildung 5 dargestellt, sind meist visuell erkennbar.



Abbildung 5: *Cenococcum geophilum* (links) und *Amanita rubescens* (rechts)

Projekt goe-fungi. Dr. Christa Lang [2013] Vergrößerung Binokular

Die pilzlichen Strukturen dringen hierbei nicht in die Pflanzenzellen ein, sondern im Apoplast, zwischen den Wurzelrindenzellen, wird ein sog. Hartig'sches Netz (Pilz-Pflanzen Interface) ausgebildet. Durch extraradikales Myzel wird zusätzlich ein Boden-Pilz Interface gebildet.

Viele Ektomykobionten sind aufgrund von auffallenden Fruchtkörpern bekannt, so gehören Speisepilze wie Steinpilz (*Boletus edulis*) oder Trüffel (*Tuber melanosporum*)

aber auch humantoxische Arten wie Fliegenpilz (*Amanita muscaria*) oder der gelbe Knollenblätterpilz (*Amanita citrina*) zu den Mykobionten vieler Baumarten [Donges 2008].

3.1.1 Das Kompartiment „Wurzelnaher Boden“

Die Wurzelsysteme der Phytobionten stehen im direkten Kontakt mit dem Bodenkörper, in dem diese Systeme wachsen. Die Versorgung der Pflanzen erfolgt durch eine Nährstoffaufnahme aus dem umgebenden Boden. Dieser Grenzbereich ist für die optimale Versorgung der Pflanze und damit auch für die Gesundheit der Pflanzen wichtig. Wurzeln sondern als Exsudate u.a. Aminosäuren, Carbonsäuren und Kohlenhydrate ab. Etwa die Hälfte der Kohlenstoffassimilationen wird von der Pflanze in die Wurzeln verlagert und dort für Wurzelwachstum, Wurzelatmung und Wurzelexsudate eingesetzt [Olsson 1998, 2011]. Hierbei ist der Transfer von Assimilaten von mykorrhizierten Pflanzen im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Pflanzen erhöht [Siddiqui et al. 2008]. Diese organischen Verbindungen dienen Mikroorganismen in der Rhizosphäre als Nahrung.

Als Rhizosphäre wird der Bereich des Bodens definiert, der physikalisch, chemisch oder biologisch von der lebenden Wurzel beeinflusst wird [Olsson 1998, 2011]. Für diesen Bodenbereich können spezifische Wirkungen eines isolierten Faktors nur unzureichend untersucht oder beschrieben werden. Daher wird dies als polyfaktorielles Ökosystem verstanden, in welchem es zu synergetischen, antagonistischen oder kumulativen Auswirkungen durch verschiedene Faktoren kommt [Johansson et al. 2004, Ottow 2011].

Die Zusammensetzung der Rhizosphäre in natürlichen Systemen besteht aus Bakterien, Archaea, Pilzen, Oomyceten sowie Protozoen, Nematoden und Algen. Die dort lebenden Mikroorganismen können die Rhizosphäre, und somit indirekt auch die Symbiose-Partner, nachteilig oder positiv beeinflussen [Peterson et al. 2004]. Damit dieses komplexe Nahrungsnetz funktionsfähig bleibt, sollte die Rhizosphärendeposition (d.h. der Eintrag an organischer Substanz über die Pflanzenwurzeln in den Boden) nicht anthropogen, zum Beispiel durch Pestizide, beeinflusst werden. Das Verhältnis der Anzahl von rhizosphären Mikroorganismen zur Anzahl der Mikroorganismen im Boden wird als Indikator für Verschiebungen der Organismengesellschaften aufgrund von umwelt- und/ oder anthropogenen Einflüssen eingesetzt [Ottow 2011].

Das Wurzelwachstum im Frühjahr und Sommer wird durch eine Verlängerung an der Wurzelspitze als primäres Wachstum durch die kontinuierliche Neubildung von Wurzelzellen auf Grundlage von Zellstreckungen realisiert. Somit dringen Wurzelspitzen in entferntere Bodenbereiche vor und erschließen neue Nähr- und Wasserreservoirare. Die Nährstoffaufnahme auf armen Böden über Interzeption (d.h. die Aufnahme von Nährstoffen durch das Erschließen von Nährstoffen durch die Pflanzenorgane [Gisi 1997]) zu decken, ist begrenzt. Durch die Besiedlung von Wurzelspitzen mit Mykorrhiza werden Wurzelhaare durch Emissionshyphen ersetzt und somit die Interzeptionsaufnahme von Nährstoffen deutlich erhöht [Ottow 2011].

Als Mykorrhizosphäre wird das Kompartiment verstanden, welches als Bereich sowohl von den Wurzeln wie auch von den Ektomykorrhiza-Pilzen beeinflusst wird, in Unterscheidung zu dem Bereich, der von der einzelnen Pilzhyphe beeinflusst wird (Hyphosphäre, vgl. Abbildung 6) und dem Bodenbereich, welcher von der Wurzel beeinflusst wird (Rhizosphäre)[Olsson 1998, Ottow 2011, Siddiqui et al. 2008].

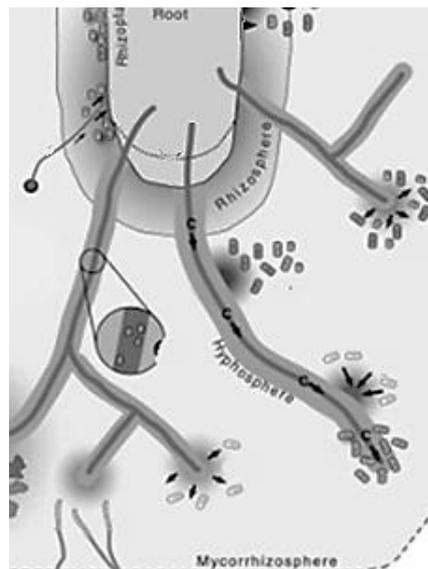


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Mykorrhizosphäre, Rhizosphäre und Hyphosphäre

Grafik entnommen aus:[Johansson et al. 2004] (Darstellung angepasst)

Da in dieser Arbeit aufgrund des experimentellen Designs keine Unterscheidung von Rhizosphäre, Mykorrhizosphäre oder Hyphosphäre vorgenommen werden konnte, wird von „Wurzelnahem Bodenbereich“ gesprochen, um den Bereich zu kennzeichnen, welcher den Wurzeln im Versuch anhaftete (vgl. Kap. 4.3.5.2.7) und in dem die Symbiose verortet ist.

3.1.2 Bedeutung der Mykorrhiza für die Symbionten

Der Pilz kann aufgrund seiner feinen Hyphen von wenigen Mikrometern (μm) in weiter entfernte Bodenregionen und kleinste Bodenporen vordringen und in diesen zusätzliche Nährstoffe (Stickstoff, Phosphor, Zink, Mangan und Kupfer) mobilisieren und pflanzenverfügbar machen. Olsson [1998] konnte zeigen, dass Mykorrhiza Verwitterungsprozesse durch das Freisetzen von Exsudaten, zum Beispiel von organischen Säuren, beeinflussen kann. Durch die Freisetzung der Säuren kommt es zu einem Absenken des pH Wertes im Boden, so dass die Mobilität von Mineralien erhöht werden kann [Kreuzwieser und Rennenberg 1998].

Neben der verbesserten Nährstoffaufnahme wird aufgrund der vergrößerten Oberfläche und des geringeren Hyphendurchmessers auch die verfügbare Oberfläche zur Wasserentnahme vergrößert. Ein größerer Bodenbereich wird für die Pflanze erschlossen [Ottow 2011].

In Laborversuchen konnte gezeigt werden, dass die Inokulation von Kiefernsetzlingen zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Umweltstressoren wie zum Beispiel dem Sauren Regen führte. Ektomykorrhizierte Pflanzenwurzeln sind durch die Mantelstruktur gegenüber Pathogenen besser geschützt und in einigen Fällen ist ebenfalls eine Erhöhung der Toleranz gegenüber Schwermetallen beobachtet worden. Ebenfalls wurde gezeigt, dass eine Inokulation in der frühen Wachstumsperiode von Pflanzen das Wachstum der Wirtspflanzen beeinflussen kann [Smith und Read 2008].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es durch die Symbiose mit Ektomykorrhiza Forst- und Baumschulpflanzen ermöglicht wird, auch an Standorten mit nicht optimalen Umwelt- und Bodenbedingungen zu wachsen. Der Mykobiont bezieht über die Pflanze organische Photosyntheseprodukte wie Kohlenhydrate. Für die Pflanze ergibt sich aufgrund der Symbiose eine erhöhte Effizienz in der Nährstoff- und Wasserverfügbarkeit. Als Konsequenz könnte möglicherweise der Einsatz von Düngemittel gesenkt, die Trockenstresstoleranz und die Resistenz gegenüber Schadorganismen positiv beeinflusst und die Schädigung der Pflanze durch Schwermetalle bzw. andere Schadstoffe verringert werden [Siddiqui et al. 2008].

3.1.3 Bedeutung Mykorrhiza als Netzwerk im Boden

Die Mykorrhizierungsrate von Pflanzen in Waldökosystemen beträgt nach Jonsson [1998] etwa 95%. Mykorrhizierte Pflanzen sind über pilzliche Hyphen miteinander verbunden und bilden so ein Netzwerk zwischen Bäumen aus, über welches Nährstoffe zwischen Individuen ausgetauscht werden können [Read 1997, Siddiqui et al. 2008, Southworth et al. 2005].

Während Pflanzen als Individuen oder „Knoten“ im Netz fungieren, stellen bei der phytozentrischen Sichtweise des Netzwerkes Hyphen den „Link“ zwischen den Pflanzen dar (vgl. Abbildung 7). Ein Pilz kann somit durch sein Myzel unterschiedliche Pflanzen- Individuen miteinander verbinden. Einzelne Pflanzen sind dabei zumeist von verschiedenen Pilzen besiedelt. Somit bildet sich ein umfassendes Netzwerk zum Austausch von Nährstoffen, wie zum Beispiel Kohlenstoff, auch zwischen den Pflanzen aus [Read 1997, Simard et al. 1997]. Ektomykorrhizen erhöhen die Diversität in Pflanzengesellschaften und beeinflussen weiterhin auch die Beziehungen zwischen Pflanzen [Compant et al. 2010, Sanders et al. 1998, van der Heijden et al. 1998].

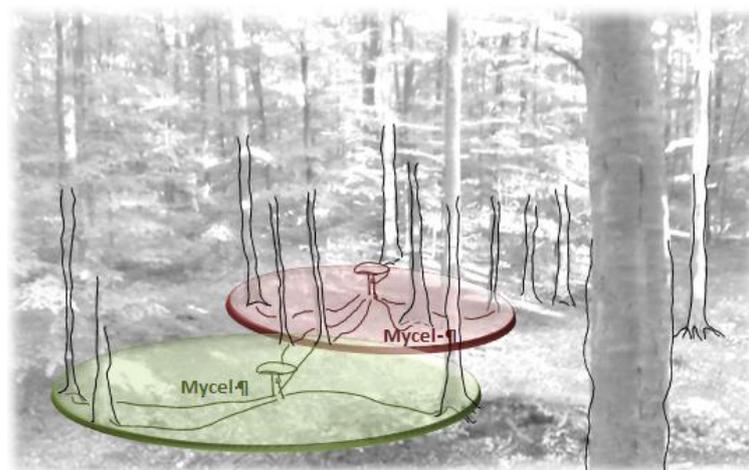


Abbildung 7: Buchenwald bei Lüneburg. Schematische Darstellung des Mykorrhiza-Netzwerkes im Boden

(verändert nach [Fester et al. o.J.])

Dieses entstehende Netzwerk ist in der Regel für alle Symbiose-Partner von Vorteil. Über das Hyphengeflecht können Pflanzen andere, schlechter versorgte Pflanzen mit Nährstoffen versorgen. Diese Versorgung konnte unter anderem für junge Setzlinge gezeigt werden, welche über das Pilzmyzel von älteren Bäumen mit Assimilaten versorgt wurden [Simard et al. 1997, Selosse et al. 2006]. Aufgrund der Beziehungen und Verbindungen zwischen den Individuen kann von einem „sozialen Netzwerk“ im Boden gesprochen werden [Müller-Jung 2012].

3.1.4 Mykorrhiza: Chancen einer nachhaltigen Nutzung der Ressource Boden

Da mykorrhizierte Pflanzen besser an die umgebende Umwelt angepasst sind und über eine effektivere Nähr- und Wasseraufnahme verfügen, ist die integrierte Betrachtung zwischen Pflanzenschutz, Düngemiteleinsetz und Mykorrhiza ein möglicher Ansatzpunkt auf dem Weg zu einer nachhaltigeren Bodennutzung [Auge 2001, Donges 2008, Ottow 2011, Simard et al. 1997]. Darüber hinaus reagieren mykorrhizierte Pflanzen insgesamt weniger sensibel auf abiotische Stressoren wie ungünstige pH-Werte im Boden, Trockenheit und hohe Temperaturen. Vor diesem Hintergrund sind mykorrhizierte Pflanzen an die Herausforderungen des Klimawandels besser angepasst. Möglicherweise werden bislang fakultativ in Symbiose lebende Bäume aufgrund der Klimaveränderungen gezwungen sein, eine Symbiose auszubilden, um besser an die Herausforderungen angepasst zu sein [Chakraborty et al. 2000, Compant et al. 2010, Cudlin et al. 2007, Donges 2008, Siddiqui et al. 2008, Simard et al. 1997].

Aufgrund von biochemischen und physiologischen Merkmalen können Ektomykorrhiza Pilze sehr effizient im Bereitstellen von organischem Stickstoff und Phosphor in oberen Bodenhorizonten sein. Einen Beitrag zur Funktion von Ökosystemen liefern Mykorrhiza-Symbiosen, indem diese Nährstoffkreisläufe steuern und die Artenzusammensetzung beeinflussen [Kuhnert et al. 2012]. Die Pilzsymbionten können nach Read et.al [2004] als wichtige Treiber für den Ernährungsprozess ihres Bioms angesehen werden. In der nördlichen Hemisphäre werden etwa 70% der terrestrischen Oberfläche entweder von Heidelandschaften oder von borealen Wäldern bedeckt. Aufgrund der großen Kohlenstoffbestände in den Böden müssen die Wechselwirkungen zwischen den Pflanzen dieses Bioms und ihren mikrobiellen Symbionten beobachtet und verstanden werden. Eine Freisetzung dieses gebundenen Kohlenstoffes würde den Klimawandel durch eine Beeinflussung des atmosphärischen CO₂ Levels nachteilig beeinflussen.

Bei Wiederaufforstungen unter Berücksichtigung einer nachhaltigen Forstwirtschaft ist eine hohe Diversität von Ektomykorrhiza-Pilzen Voraussetzung für ein gesundes Gleichgewicht im Wald. Bei Wiederaufforstungsmaßnahmen zeigte sich eine verbesserte Anwachswahrscheinlichkeit von mykorrhizierten Setzlingen im Vergleich zur Kontrollgruppe und ein schnelleres Anwachsen umgesiedelter Setzlinge [Siddiqui et al. 2008]. An Altlaststandorten werden mykorrhizierte Pflanzen zur Bioremediation von belasteten Flächen gepflanzt. Für Ektomykorrhiza-Pilze konnte gezeigt werden, dass 33

von 42 untersuchten Taxa ein Abbaupotenzial für mindestens eine Substanzklasse aufweisen [Meharg und Cairney 2000].

Durch den wachsenden Nahrungsmittelbedarf ist wie bereits beschrieben neben dem steigenden Pestizideinsatz auch ein erhöhter Bedarf von Düngemitteln zu erwarten. Vor allem der Eintrag von Phosphorverbindungen in die Umwelt hat ungünstige Auswirkungen auf Gewässer (Eutrophierung) und auf die Biodiversität von Böden. Zusätzlich entstand 2007 eine kontrovers geführte Diskussion, ob die begrenzten Vorkommen von Phosphor einen ähnlichen Effekt wie beim Peak Öl (Peak Phosphorus) hervorrufen können [Rosemarin 2010, Schläfli 2011]. Zurzeit ist der Einsatz von phosphorhaltigen Mineraldüngern schwer aus der landwirtschaftlichen Praxis wegzudenken. Sollte durch den Einsatz mykorrhizierter Pflanzen der Bedarf an phosphathaltigen Düngern gesenkt werden können, wäre dies sowohl ökonomisch wie auch ökologisch ein interessanter Ansatz hin zu einer nachhaltigeren Landwirtschaft und Bodennutzung.

3.2 Bestimmung des Mykorrhizierungsgrads von Buchenwurzeln

Um eine Beeinflussung der Symbiose durch Stressoren zu ermitteln, wird eine Kenngröße zur Quantifizierung der Beeinflussung benötigt. Zur Bestimmung des Mykorrhizierungsgrads einer inokulierten Wurzel werden in der Literatur verschiedene Techniken vorgestellt. Neben einer visuellen Auswertung, unter anderem in Kombination mit Färbemethoden [Vierheilig et al. 1998] oder der Grid-Methode [Giovannetti M. und Mosse B. 1980], sind analytische Verfahren [Martin et al. 1990, Olsson et al. 2003] sowie in den letzten Jahren mikrobiologische Methoden mittels PCR [Lang-Yona et al. 2012] entwickelt worden. Die Bestimmung von pilzlicher Biomasse über qPCR wurde von Lang-Yona et al. [2012] mit dem Biomarker Ergosterol verglichen und diskutiert. Eine Korrelation zwischen dem Ergosterolgehalt und der qPCR Methode konnte für den Frühling gezeigt werden.

Während die visuellen Methoden einen erprobten Anwender benötigen, wird bei den analytischen Methoden, hierzu zählt die Analytik des Biomarker Chitin oder Ergosterol, ein höherer instrumenteller Aufwand notwendig.

3.2.1 Biomarker Ergosterol

Im Gegensatz zu herkömmlichen visuellen Auswertemethoden mit und ohne Färbung [Abd-Alla et al. 2000, Hampp et al. 1999, Prados- Ligeró et al. 2002, Vierheilig et al. 1998] wurde in dieser Arbeit ein analytisch-chemisches Verfahren zur Bestimmung des Biomarkers Ergosterols mittels HPLC-DAD angewendet.

Ergosterol wurde in Bakterien oder höheren Pflanzen nicht nachgewiesen [Smith und Read 2008]. In Ascomyceten und Basidiomyceten wurde Ergosterol als dominantes Sterol identifiziert und ist für das Wachstum der Pilzzellen essenziell [Olsson et al. 2003, van Meer et al. 2008]. Somit wird Ergosterol für die metabolisch aktive Wachstumsphase des Pilzes durch die Ergosterolsynthese ständig nachgeliefert [Anderson et al. 1994, Pühse 2009]. Ergosterol wird in die Doppelmembran als Stabilisator eingebaut und erfüllt aufgrund seiner hohen Spezifität die Anforderungen eines Biomarkers für pilzliche Biomasse.

Historisch wurde der Biomarker erstmalig zur Identifikation eines Schimmelpilzbefalls von Getreidekörnern angewendet [Schwadorf und Müller 1989, Seitz et al. 1977, West A.W. et al. 1987]. Ergosterol (vgl. Abbildung 8) wird unter anderem als Parameter für pilzlicher Biomasse in Lebensmitteln [Anderson et al. 1994, Kadakal und Artik 2008], in Gewässern [Schäfer et al. 2012] oder im Zusammenhang mit Diversitätsuntersuchungen erfasst [Hampp et al. 1999].

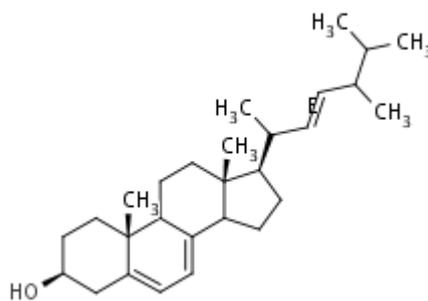


Abbildung 8: Ergosterol

ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol, (C₂₈H₄₄O);
CAS: 57-87-4, Molekulargewicht 396.657 g mol⁻¹ [Reaxys]

3.2.2 Analytische Methoden zur Bestimmung von pilzlicher Biomasse mittels Ergosterol

Nach Extraktion der Probe mit einem organischen Lösungsmittel wie zum Beispiel Methanol, kann die Ergosterolkonzentration im Extrakt unmittelbar bestimmt werden. Als Extraktion wird zumeist eine Ultraschall-Extraktion durchgeführt und der Gehalt an Ergosterol mittels GC-MS oder HPLC-DAD analysiert [Anderson et al. 1994, Martin et al. 1990, Olsson et al. 2003, Robine et al. 2005, Salmanowicz und Nylund 1988].

Sollte aufgrund von Matrixbestandteilen ein Aufreinigungsschritt durchgeführt werden müssen, kann dieser über einen Lösungsmittelwechsel in Kombination mit einem Trocknungs- und Anreicherungsschritt erfolgen oder aber eine Festphasenextraktion durchgeführt werden [Martin et al. 1990, Newell 1988, Zelles et al. 1987].

Ergosterol zeigt ein sehr spezifisches UV-Spektrum mit einem Adsorptionsmaximum bei $\lambda = 282,5$ nm. Nach Martin et al. [1990] kann Ergosterol in Pilzen als freies Ergosterol (ca. 80%) und als Ergosterol-Ester (20%) vorliegen. Der Vorteil der Ergosterolbestimmung liegt, gegenüber der Bestimmung von Chitin, unter anderem in der höheren Sensitivität. Daher wurde in dieser Arbeit zur Quantifizierung der pilzlichen Biomasse von Ektomykorrhiza der Biomarker Ergosterol ausgewählt.

Von Martin et al. [1990] und Antibus und Sinsabaugh [1993] wurden in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts der Ergosterolgehalt von *Pisolithus arhizus*, *Laccaria laccata* sowie für *Hebeloma crustuliniforme* und *Cenococcum geophilum* bestimmt.

Bei der Methode nach Martin et al. [1990] wurde auf einen Verseifungsschritt verzichtet. Die Konzentrationen lagen für *Pisolithus arhizus* bei $1,58 \pm 0,25 \mu\text{g mg}^{-1}\text{DW}$. Antibus und Sinsabaugh [1993] konnten für *Cenococcum geophilum* eine Konzentration von $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g mg}^{-1}\text{DW}$ analysieren.

3.2.3 Herausforderungen an das Probendesign

Den Einsatz von Biomarkern zur Detektion von (lebender) pilzlicher Biomasse wird von Millelindblom et al. [2004], Robine et al. [2005], Salmanowicz und Nylund [1988], Wallander et al. [2001] und Zhao [2005] diskutiert. Speziell der Einsatz von Ergosterol wird in ebendieser Literatur kontrovers diskutiert.

Einer der Hauptkritikpunkte ist, dass gerade im Boden kein signifikanter abiotischer Abbau der Substanz (zum Beispiel durch Photolyse) beobachtet werden kann. Daher muss dieser Marker im Boden als persistent angenommen werden. Daher ist es notwendig, im Versuchsaufbau zu berücksichtigen, dass ein Zuwachs an Ergosterol im Zusammenhang mit einer Zunahme des Wurzelgewichtes gemessen werden muss, um eine tatsächlich zunehmende Mykorrhizierung anzunehmen. Durch abgestorbene Pilz- und Hyphenbestandteile wird der Ergosterolgehalt positiv beeinflusst. Eine Unterscheidung zwischen lebendem und abgestorbenem Pilzgewebe ist somit nicht möglich [Kadalkal und Artik 2008]. Messungen von Martin et al. [1990] zeigen, dass nach einer Inokulationsdauer ab 4 Tagen eine maximale Konzentration an Ergosterol, im Vergleich zur Kontrolle, nachgewiesen werden kann.

Darüber hinaus ist der Ergosterolgehalt stark abhängig von der untersuchten Ektomykorrhiza Spezies. Hierbei beeinflussen neben taxonomischen Eigenschaften auch der metabolische Status das Ergebnis [Kuhnert et al. 2012]. Liegen in einer Probe verschiedene Taxa von Ektomykorrhiza-Pilzen vor, kann daher eine Abschätzung der pilzlichen Biomasse mittels Ergosterol nicht vorgenommen werden. Somit ergibt sich für das gewählte Probendesign die Einschränkung nur mit einer isolierten Spezies pro Treatment zu arbeiten [Olsson et al. 2003].

Das gewählte Versuchsdesign muss somit sicherstellen, dass Buchenjungepflanzen vor Versuchsbeginn noch keine Mykorrhizierung aufweisen und während der Versuchsdauer keine Kontamination durch Fremdpilze vorliegt. Ebenfalls muss die Bewertung des Ergosterolgehalts in Relation zu einer nicht-mykorrhizierten Versuchskontrolle erfolgen.

3.3 Pestizide

Pestizide werden eingesetzt, um Kulturpflanzen vor Schadorganismen wie Tiere, Pflanzen, Pilze, Bakterien oder Viren zu schützen. „Pro Jahr werden auf einem Hektar landwirtschaftlicher Nutzfläche durchschnittlich etwa neun Kilogramm Pflanzenschutzmittel beziehungsweise 2,5 Kilogramm Wirkstoffe eingesetzt“ [UBA 2014a].

Der Inlandsabsatz an Wirkstoffen betrug 45.527 Tonnen für das Jahr 2012, wobei die Mengen an Pflanzenschutzmitteln als Zubereitungen bei 111.405 Tonnen im Jahr 2012 lag. Die prozentualen Anteile der Wirkstoffmengen nach Anwendungsbereichen werden in Abbildung 9 dargestellt. Nach den Herbiziden und dem Vorratsschutz stellt der Anwendungsbereich Fungizide den drittgrößten Anwendungsbereich [BVL 2013a].

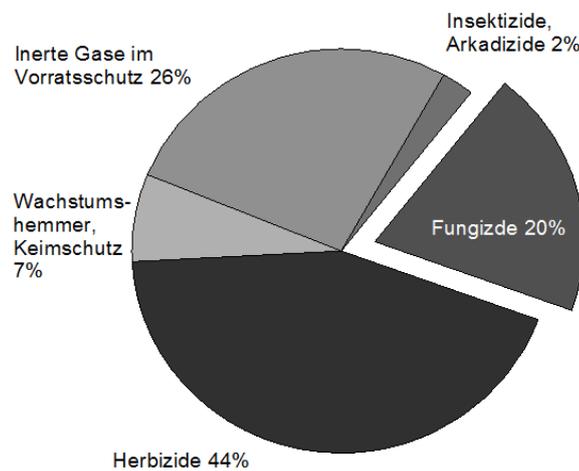


Abbildung 9: Inlandsabgabe von Wirkstoffen in Pflanzenschutzmitteln 2012

Daten entnommen aus [BVL 2013a]

Die Anzahl der zugelassenen Pestizide in Deutschland stieg mit sieben neu zugelassenen Wirkstoffen im Jahr 2012 auf 261 Wirkstoffe an. Diese Wirkstoffe werden in 729 zugelassenen Mitteln eingesetzt.

Während der letzten 10 Jahre ist der Absatz an Pestizid-Wirkstoffen insgesamt um etwa 37% angestiegen [BVL 2013a]. Für Fungizide lag in den letzten Jahren ein nahezu unveränderter Trend im Inlandsabsatz vor, der jedoch im Jahr 2012 eine Reduzierung um 13%, auf das Niveau von 2004, aufwies. Eine Schwankung durch die vorherrschenden Witterungsbedingungen in dem Jahr wäre möglich, da für die Verbreitung, den Befallsverlauf und das Ausmaß von Blattkrankheiten wie Echter

Mehltau die Witterung zu den zeitlichen und regionalen Unterschieden beiträgt [Roßberg et al. 2013].

Trotz des Nationalen Aktionsplans zur nachhaltigen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln von 2008 [BMELV] zeigt sich, dass es sowohl zu einer Erhöhung der Absatzmengen bei einer gleichzeitigen Verringerung in den benötigten Aufwandmengen Wirkstoff pro Hektar kam. Eine Neubewertung des ökotoxikologischen Potenzials von Pflanzenschutzmitteln ist daher sinnvoll und eine Betrachtung von Wirkungsäquivalenten erscheint notwendig, um eine ökotoxikologische Abschätzung vornehmen zu können [UBA 2011]. Ein Ansatz dazu bietet die Betrachtung des Behandlungsindex (BI), welcher ein quantitatives Maß zur Beschreibung der Intensität des chemischen Pflanzenschutzes darstellt und online unter dem PAPA-Portal (Panel Pflanzenschutzmittel-Anwendungen [JKI 2013]) öffentlich zugänglich gemacht werden soll.

Grundlegende Informationen bezüglich der Chromatographie und Detektion der Substanzen mittels LC-MS/MS, können in Standardwerken zur Analytik wie Cammann [2010], Schwedt [2001] und Skoog [2013] nachgelesen werden.

3.3.1 Einträge von Pestiziden in angrenzende Ökosysteme

Die Pestizidabsätze deuten darauf hin, dass ein erheblicher Anteil der landwirtschaftlichen Flächen regelmäßig mit Pflanzenschutzmitteln behandelt werden. Dabei kann, trotz Zulassungs- und Anwendungsaufgaben, nicht immer sichergestellt werden, dass es zu keiner Beeinträchtigung der angrenzenden Flächen und Ökosysteme kommt [BMELV 2013a].

Aufgrund des Einsatzzwecks von Pestiziden werden diese in großen Mengen in die Umwelt eingetragen, um über eine toxische Wirkung Schadorganismen zu schädigen und Kulturorganismen zu schützen. Gelangen die Mittel über Spritznebel und Abriebstäube in andere Landschaftssysteme wie z.B. Saumbiotop oder angrenzende Waldbestände, können auch andere Organismen wie Nichtzielorganismen beeinträchtigt werden. Verfügen Fungizide über einen Wirkmechanismus, welcher etwa in die Zellerneuerung oder die Stoffwechselaktionen eingreift, muss bedacht werden, dass diese Mechanismen auch auf Nichtzielorganismen schädigend wirken können [Knäbel et al. 2013]. Wirken Fungizide auf die Hemmung der Ergosterolsynthese, wird diese Synthese vermutlich auch bei Nichtziel-Pilzen geschädigt. Eine Wirkung der Substanzen auf Nichtzielorganismen kann somit nicht ausgeschlossen werden. Für eine

Zulassung des Wirkstoffes müssen diese Auswirkungen in einem tolerierbaren Bereich liegen [UBA 2014a].

Aspekte des Naturhaushaltes werden seit *Rachel Carson* Buch „Silent spring“ [Carson 1968] wahrgenommen. Die Notwendigkeit einer Vertretbarkeit der Auswirkungen und die Reduktion des Einsatzes der Substanzen sind unstrittig und werden in Deutschland unter anderem seit 2008 durch den Nationalen Aktionsplan zur nachhaltigen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln und in der Neufassung von 2013 [BMELV 2008, 2013a], durch den Einsatz neuer Düsentchnik sowie durch das Einrichten von ökologischen Vorrangflächen [UBA 2014b] vorangetrieben. Jedoch kann der Eintrag auf Nichtzielflächen und Nichtzielorganismen nur verringert, nicht jedoch verhindert werden. Zur Abschätzung des Risikos werden verschiedene Simulationsmodelle eingesetzt. Vertretbar können Auswirkungen nur dann sein, wenn der Nutzen des Pflanzenschutzmittels gegenüber möglichen nachteiligen Auswirkungen auf die Umwelt signifikant überwiegt. Für Pestizide liegen umfangreiche Datenbanken bezüglich Nachweis- und Rückstandsanalytik und ökotoxikologische Daten vor [BfR 2014, EPA 2014, EU 2014]. Ökotoxikologische Daten werden nicht für jeden Organismus untersucht, sondern anhand von Stellvertreterorganismen abgeschätzt.

Bei der Zulassung von Pestiziden wird erwartet, dass aufgrund eines EU- Ministerrat Beschlusses von 2009 in Zukunft auch Effekte betrachtet werden müssen, welche durch die Kombination oder Chemikalienmischungen auf Nichtzielorganismen zu erwarten sind. Eine Betrachtung von synergetischen Effekten erscheint sinnvoll, da Studien belegen, dass Organismen in einem höheren Maße durch Mischungen als gegenüber Einzelsubstanzen exponiert werden. Diese Mischungen können durch die Kombination von mehreren Wirkstoffen innerhalb einer Formulierung oder aber durch ein den Fruchtfolgen angepasstes Ausbringen von Pestiziden gebildet werden [Altenburger et al. 2014].

Bei der europaweiten Zulassung von Pestiziden werden Simulationsmodelle wie das FOCUS Modell eingesetzt, um die Konzentrationen der Substanzen im Gewässer abzuschätzen. Eine Abschätzung der Konzentrationen bei der Anwendung unter Berücksichtigung der Auflagen ist notwendig für die Zulassung der Substanzen, da die vorhergesagte Umweltkonzentration PEC (Predicted Environmental Concentration) unterhalb einer als unbedenklich eingeschätzten Wirkschwelle (PNEC, Predicted No Effect Concentration) liegen muss [Fent 2013]. Knäbel et al. [2012, 2013] konnten zeigen, dass in Gewässern Fungizide und Insektizide nachweisbar waren. Die

gemessenen Konzentrationen für Fungizide lagen zwischen 13-23% über den prognostizierten Werten des entsprechenden Simulationsmodells (hier FOCUS). Somit führen die über das Modell vorhergesagten PEC Konzentrationen zu einer deutlichen Unterbewertung des ökotoxikologischen Risikos der untersuchten Substanzen.

Ein Eintrag der Herbizide Prosulfocarb, Terbutylazin, Metolachlor und Isoproturon in Buchenwälder, welche in unmittelbarer Nähe zur Ackerfläche wachsen, konnte von Bernhardt gezeigt werden. Hierbei wurden Depositionen auf den Waldboden in der Größenordnung von $10 - 100 \mu\text{g m}^{-2}\text{a}^{-1}$ gemessen. Ebenfalls wurde gezeigt, dass die erste Vegetationsreihe eine Filterfunktion für das Waldökosystem darstellt [Bernhardt 2004].

3.3.2 Auswirkungen von Pestiziden auf die Symbiose

Heitefuss [1997] beschrieb bereits vor mehr als 25 Jahren, dass durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln eine Verschiebung ganzer Lebensgemeinschaften möglich ist, da die Applikation von Pestiziden meist direkt oder indirekt auch Nichtzielorganismen oder Nützlinge beeinflusst. Im Vergleich zu Insektiziden und Herbiziden ist über die Auswirkungen von Fungiziden auf Ökosysteme noch wenig bekannt [Knäbel et al. 2013].

Die Mykorrhiza- Symbiose reagiert sensibel auf anthropogene Störungen. Bekannt sind vor allem Effekte durch die Emission von Stickoxiden, die zu Stickstoff-Überdüngungen von Waldböden führen können. Die Mykorrhiza-Symbiose ist jedoch an Stickstoffmangelbedingungen angepasst. Wurde in Experimenten der Stickstoffgehalt erhöht, konnte eine Reduzierung in der Artenvielfalt und Ausprägung der Ektomykorrhiza- Pilze beobachtet werden. Somit könnten sich hohe Stickstoffkonzentrationen negativ auf die Baumgesundheit auswirken [Egli und Brunner 2011]. Ebenfalls zeigt eine Studie von Fichtner et al. [2014], dass bei Wiederaufforstungsmaßnahmen auf ehemaligen Ackerstandorten sich die Zusammensetzungen der Mikroorganismen auch nach über 100 Jahren noch von historischen Standorten unterscheiden und dass die Trockenstressresistenz deutlich reduziert war. Neben den Einträgen von Nährstoffen könnte die Diversität der Ektomykorrhiza-Pilze auf den ehemaligen Agrarflächen durch Pflanzenschutzmittel beeinträchtigt sein.

Es gibt Hinweise darauf, dass der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln wie Fungizide, auch den gewünschten Mykobiont beeinflusst [Carrillo et al. 2011, Diedhiou et al. 2004,

Laatikainen und Heinonen-Tanski 2002, Marin 2011]. Die Schädigung der Mykorrhiza durch Herbizide kann sowohl über eine unmittelbare Wirkung auf den Mykobionten selbst erfolgen als auch indirekt über eine primäre Schädigung der Wirtspflanzen. Herbizide schädigen zunächst den Phytobionten im Blatt, was die Photosyntheseleistung beeinträchtigt. Aufgrund dieser Beeinträchtigung verändern sich die durch die Wurzel der geschädigten Wirtspflanze abgegebenen Exsudate, was unmittelbare Auswirkungen auf die Artenzusammensetzung der Mikroorganismen in der Rhizosphäre hat [Ottow 2011]. Abd-Alla et al. [2000] zeigten zum Beispiel, dass der Einfluss der Substanzen auf das Pflanzenwachstum unmittelbar mit einer Unterdrückung von wachstumsfördernden Mikroorganismen in der Rhizosphäre zusammenhängen könnte.

In der Literatur wird eine Beeinflussung der Mykorrhiza durch Pestizidbehandlung beschrieben (vgl. Tabelle 1 und Anhang 9.2). Dabei geht es vor allem um den Einfluss von Pestiziden auf arbuskuläre Mykorrhiza. So beschreibt Abd-Alla et al. [2000] einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum verschiedener Gemüsesorten. Ebenfalls wurden geringere Anreicherungen von Stickstoff, Phosphor und Kalium in den behandelten Pflanzen im Gegensatz zur Kontrollgruppe gefunden.

O'Neill und Mitchell [2000] untersuchten die Auswirkungen von Benomyl und Captan auf das Wurzelwachstum und die Mykorrhizierung von Fichte (*Picea sitchensis*) und Esche (*Fraxinus excelsior*) in Baumschulen. Für Benomyl konnte gezeigt werden, dass die Besiedlung von Fichten mit Ektomykorrhiza und die Besiedlung mit arbuskulärer Mykorrhiza an Eschen gehemmt wurde. Eine einmalige Behandlung mit Captan hingegen stimulierte die Besiedlung mit Ektomykorrhiza und erhöhte die Trockenmasse der Wurzeln von Eschen. Aufgrund der Ergebnisse der Studien schlugen Diaz et al. [2003] und Laatikainen und Heinonen-Tanski [2002] vor, dass stimulierende Effekte möglicherweise darauf zurückgeführt werden können, dass Mykobionten fähig sind, diese Substanzen abzubauen und als Kohlenstoffquelle zu verstoffwechseln. Ebenfalls zeigte Gadd [2001], dass für Standorte, die mit organischen Substanzen belastet waren, durch eine Bepflanzung der Flächen mit mykorrhizierten Pflanzen eine Biodegradation erreicht wurde.

Um die direkte Beeinflussung des Mykobionten durch Fungizide im Laborversuch mit ausgewählten Fungiziden zu untersuchen, wurde in Studien das Myzelwachstum verschiedener Ektomykorrhiza-Pilze beobachtet. Der Einfluss der Substanzen wurde durch den Koloniedurchmesser, die Biomasse oder Morphologie in Reinkulturen bestimmt [Ahmed et al. 2009, Carrillo et al. 2011, Diaz et al. 2003, Iotti und Zambonelli

2006, Laatikainen und Heinonen-Tanski 2002, Read et al. 2004]. Durch sterile *in vitro* Testsysteme lassen sich erste Voraussagen zur Abschätzung der Auswirkungen *in vivo* treffen. Bei *in vivo* Testsystemen ist nicht auszuschließen, dass Veränderungen in der Mykorrhizierung nicht ausschließlich auf einen direkten Einfluss durch das Pestizid herbeigeführt werden [Diaz et al. 2003, Trappe et al. 1984]. Ebenfalls können in natürlichen Systemen die vorherrschenden Bodenorganismen einen Einfluss auf die Ursachen-Wirkungsinterpretation haben [Trappe et al. 1984]. Obwohl es schwierig ist, Ergebnisse aus Laborversuchen in natürliche Systeme zu übertragen, können diese Studien doch aufgrund der unterschiedlichen Sensitivitäten der Mykobionten auf eine Fungizid Exposition, zu einer ersten Bewertung der Gefahren herangezogen werden [Trappe et al. 1984, Ingestad T. und Agren G.I. 1995].

Tabelle 1: Wirkung von Pestiziden auf Mykorrhiza

ZL bedeutet hierbei: Substanzen sind zugelassen für: GB: Gartenbau, BS: Baumschule, AK: Ackerbau
AM: Arbuskuläre Mykorrhiza, ECM: Ektomykorrhiza

Wirkstoff	Absatz- menge / t [BVL 2008]	Literatur	ZL	Mykorrhiza	Konzen- tration [nach Quelle]	Auswirkungen Tendenz
Azoxystrobin	100-250	[Diedhiou et al. 2004]	GB	AM (Mais)	50 – 1500 mg/L	früh hemmend; später wenige Auswirkungen
Benomyl	Aufgehoben	[O'Neill und Mitchell 2000]	BS	AM Esche ECM Fichte	Nach Hersteller	hemmend hemmend
Chlorthalonil	250-1000	[Laatikainen Heinonen-Tanski 2002]	BS	ECM (in vitro)	1 ppm 10 ppm	hemmend hemmend
Fenpropimorph	250-1000	[Kjölller und Rosendahl 2000]	GB	AM (Gurke)	Nach Hersteller + Faktor 100	hemmend (Hyphen)
Kresoxim-Methyl	10-25	[Feldmann o.J.]	GB	AM (Mais/ Tagetes)	nach Hersteller	hemmend + stimulierend
Prochloraz	100-250	[Alten et al. 1993]	AB	AM	1,5 g/l	Indifferent
Propiconazol	100-250	[Teste et al. 2006]	k.A.	ECM (Douglasie)	0,5 mg/l 1 mg/l 1,5 g/l	hemmend
		[Kjölller und Rosendahl 2000]	GB	AM (Gurke)	Nach Hersteller + Faktor 100	hemmend (Hyphen)
Tebuconazol	250-1000	[Gerken 2007]	GB	AM	Nach Hersteller	sehr indifferent

3.4 Umwelt und ökotoxikologische Risikoanalyse

Wie bereits beschrieben, wird im Rahmen dieser Arbeit mit dem Endpunkt Hemmung des Myzelwachstums, als konkret gemessenen biologischen Effekt für eine Prüffart, gearbeitet. Aufgrund einer (meist) logarithmischen Verdünnungsreihe der Konzentrationen wurden statistische Endpunkte wie EC_{10} , EC_{50} und EC_{90} ermittelt [UBA 2009]. Hierbei wurde die Hemmwirkung durch die Substanz auf das Myzelwachstum beobachtet und auf das Wachstum einer Kontrollgruppe normiert. Dabei wurde mit einer nominalen Konzentration im Testmedium gearbeitet.

Aufgrund der Diskussion um NOEC Werte, wurde in dieser Arbeit mit EC_X Werten gearbeitet. Als NOEC wird die höchste Konzentration bezeichnet, welche noch keine signifikante Wirkung der Substanz, bezogen auf eine Kontrollgruppe im Versuch, zeigt. Dieser Wert stellt aufgrund von methodischen Ansprüchen nicht unbedingt auch den Unbedenklichkeitsschwellenwert dar [OECD 2006, Warne und Dam v 2008].

Zur Zulassung von Pestiziden werden, für eine ökotoxikologische Risikobewertung, zurzeit Studien für die Nichtzielorganismen Terrestrische Vertebraten, Wasserorganismen, Nützlinge und Bienen, Bodenorganismen und Terrestrische Nichtzielorganismen durchgeführt. Für die einzelnen Nichtzielorganismengruppen werden oftmals Stellvertreterorganismen untersucht [Garcia et al. 2008]. Zur Abschätzung der Gefährdung werden in dem Entwurf „Draft Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology“ [European Commission 2002] Testsysteme vorgeschlagen. Für eine Beurteilung der Gefährdung für Bodenmikroorganismen wird vorgeschlagen, dass eine Veränderung des gewählten Parameters, wie zum Beispiel die Stoffwechselaktivität, nach 100 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger als 25% betragen sollte. Werden größere Unterschiede beobachtet, sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

Die Exposition für Nichtzielflächen wird aus Standardtests abgeschätzt [European Commission 2002]. Bei dem BVL [2014a] wird mit EVA (Exposure Via Air) ein Expositions Modell vorgestellt, welches u.a. die Einträge durch Abdrift und Volatilisation auf Nichtzielflächen abschätzt. Es werden PEC (Predicted Environmental Concentration) und TER Werte (Toxic Exposure Ratio) berechnet.

Zur Bewertung des Risikos werden aktuell zwei Vorgehensweisen verfolgt, welche aber beide auf dem gleichen Grundsatz beruhen. Es wird in beiden Konzepten eine Umweltkonzentration mit einer als unbedenklich angenommenen Effektkonzentration in

Beziehung gesetzt. Der TER- Wert setzt den niedrigsten, als unbedenklich eingestuften statistischen Effektwert in Bezug zur gemessenen oder berechneten Umweltkonzentration. Hierbei ist die Gefährdung umso größer, je kleiner der berechnete Zahlenwert ausfällt. Bei dem Konzept des Risiko- Quotientens (QR) werden die Umweltkonzentrationen über den PEC oder MEC (Measured Environmental Concentration) in Beziehung zu einem Unbedenklichkeitsschwellenwert, ggf. unter Einbeziehung eines Sicherheitsfaktors, gesetzt. Ein Wert größer eins stellt ein Risiko für die untersuchte Spezies dar [Fent 2013]. Als Unbedenklichkeitsschwellenwert wird in dieser Arbeit in Anlehnung an die Empfehlungen der OECD Richtlinien der EC₁₀ Wert verwendet [OECD 2006].

3.5 Auswahl und Definition des Systems

3.5.1 Phytobiont Buche

In Deutschland beträgt der Anteil an Waldflächen mit 11.1 Millionen Hektar etwa 30% der Gesamtfläche Deutschlands. Neben einem hohen Anteil von Fichte (26%) und Kiefer (23%) ist die Buche mit 16% der Laubbaum mit der höchsten Verbreitung in Waldbeständen [SDW 2014]. Waldökosysteme stellen aufgrund der Kohlenstoffeinlagerung eine wichtige Kohlenstoffsene dar [LWF 2011]. Die Besiedlung und die Bedeutung der Mykorrhiza für Buchen wurde in Studien von Börner [2003] und Hampp et al. [1999] untersucht. In der Studie von Börner wurde die Mykorrhizierung von Buchenfeinwurzeln untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass der Feinwurzelraum von Buchen dicht von Mikroorganismen besiedelt und die Mykorrhizierung für die Wurzelgesundheit von großer Bedeutung ist.

Hampp et al.[1999] untersuchten, inwieweit sich Trockenstress von 7 – 8 jährigen Buchen auf die Artenzusammensetzung der Mykorrhiza auswirkt. Es konnte gezeigt werden, dass sich durch eine Etablierung einer gut adaptierten Pilz-Wirtkombination der Trockenstress von Buchen verringern lässt. Trockenstress führte zu Einbrüchen in dem Gehalt von eingespeicherten Polysacchariden in den Wurzeln und verringert damit wahrscheinlich die Nettophotosyntheserate der Buche, so dass es insgesamt zu einer schlechteren Kohlenhydratversorgung der Mykorrhiza kam [Shi et al. 2002].

Aufgrund des Verbreitungsmusters und der Besiedlungsfähigkeit mit Ektomykorrhiza wurde die Buche (*Fagus sylvatica L.*) als Pflanzenpartner ausgewählt. Für Saumbiotop wird die Buche als Baum 1. Ordnung für an Agrarflächen angrenzende Waldaußenränder bewertet [Kühne et al. 2002, Kühne und Freier o.J.].

3.5.2 Mykobiont

Als Mykobionten wurden *Pisolithus arhizus*, *Cenococcum geophilum*, *Hebeloma crustuliniforme* und *Lyophyllum* sp. für die Inokulationsversuche und die ökotoxikologischen Versuche auf Nährmedium kultiviert. Bei der Auswahl der Mykobionten wurde berücksichtigt, dass die gewählten Spezies potenzielle Symbiose-Partner für Gehölze darstellen und darüber hinaus eine Kultivierung im Labor möglich war.

In Diversitätsstudien konnten Münzenberger et al. [2004] zeigen, dass *Cenococcum geophilum* und *Pisolithus arhizus* mit guten Mykorrhizierungsraten in den untersuchten Bodenkompartmenten gefunden werden konnten.

Pisolithus arhizus (syn. *P. tinctorius* und *P. arenarius*) wird in der Literatur als Symbiont für verschiedene Bäume mit internationalem Verbreitungsmuster beschrieben. *Pisolithus arhizus* wurde bereits in verschiedenen Forst-Inokulationsprogrammen erfolgreich verwendet [Blaschke und Helfer 2007, Cairney und Chambers 1997]. Aufgrund einer guten *in vitro* Kultivierbarkeit wird *Pisolithus arhizus* als Ektomykorrhiza Symbiont in Inokulation-Präparaten verwendet [INOQ o.J.]. *Pisolithus arhizus* weist bezüglich Wirtsspezifität und Physiologie eine intraspezifische Heterogenität auf. Jedoch wurde beobachtet, dass *Pisolithus arhizus* gegenüber konkurrierenden Spezies kein dominanter Pilz ist. Somit sollte, vor einer Inokulation das zu beimpfende Saatgut von anderen Pilzen befreit werden [Smith und Read 2008]. Darüber hinaus wurde *Pisolithus arhizus* ausgesucht, da von Diaz et al. [2003] bereits eine signifikante Reduktion im Koloniedurchmesser gezeigt wurde, und das Isolat somit sensitiv auf die anthropogenen Stressoren reagierte.

Cenococcum geophilum (syn. *Cenococcum graniforme*) wird in der Literatur als sehr widerstandsfähig mit globalem Verbreitungsmuster beschrieben [Kuhnert et al. 2012, Münzenberger et al. 2004]. In borealen Wäldern wurde in Diversitätsstudien *Cenococcum geophilum* mit höchster Häufigkeit auf den untersuchten Versuchsstandorten gefunden [Dahlberg 2001]. Bezüglich seiner Symbiose - Partner weist *Cenococcum geophilum* ein großes Spektrum auf und zeichnet sich durch eine hohe Pionierfähigkeit aus. Darüber hinaus wurde *Cenococcum geophilum* auf gestressten Standorten nachgewiesen [Aučina et al. 2010]. Mit *Cenococcum geophilum* wurde somit eine Spezies mit hohem Anpassungspotenzial an Lebensräume gewählt [Herzog et al. 2013, Ottow 2011, Smith und Read 2008].

Hebeloma crustuliniforme wurde ausgewählt, da in Versuchen gezeigt werden konnte, dass auf diesen Symbionten anthropogene Effekte nachweisbar waren [Chakravarty und Sidhu 1987, Diaz et al. 2003]. Mit *Lyophyllum* sp. wurde ein Isolat eingesetzt, für welches mit der Japanischen Rotkiefer Inokulationsversuche in Topfsystemen untersucht wurden. Die Japanische Rotkiefer wird in Japanischen Gärten gepflanzt und in Deutschland als Baumschulware kultiviert [Yamanda und Ogura 2001].

3.5.3 Auswahl der Pestizide

Die Modellsubstanzen wurden aufgrund hoher Inlandsabsatzzahlen ausgewählt. Darüber hinaus bestand der Anspruch, die Fragestellung der Ziel- und Nichtzielapplikation durch Modellsubstanzen abzudecken. Somit wurden sowohl Fungizide aus der landwirtschaftlichen Nutzung (Ackerbau), wie auch für Baumschulen und Forst ausgewählt. Da in den Expositionsversuchen die Konzentrationen der Substanzen in den drei Kompartimenten bestimmt werden sollten, wurden Substanzen ausgesucht, welche analytisch mittels LC MSMS quantifizierbar waren.

Für den Anwendungsbereich Forst sind insgesamt vier Wirkstoffe als Fungizide zugelassen: Schwefel, Boscalid und Kresoxim-Methyl als Mischung (Collis[®]) und Quinoxifen. Für die Fragestellung der Applikation in Forst und Baumschulen wurden die Formulierung Collis[®], Basta^{®3} (als Herbizid) und die Wirkstoffe Boscalid und Quinoxifen untersucht.

Für die Fragestellung der Nichtzielflächenapplikation wurden Substanzen aus dem Anwendungsbereich Ackerbau ausgewählt. Hierbei wurde Azoxystrobin und Tebuconazol sowie die Formulierung Orius[®] (Wirkstoff Tebuconazol) ausgewählt.

Für die Substanzen Azoxystrobin [Diedhiou et al. 2004], Kresoxim-Methyl [Feldmann o.J.] und Tebuconazol [Gerken 2007] wurden bereits Wechselwirkungen mit Mykorrhiza-Symbionten, zumeist jedoch mit Endomykorrhiza, untersucht (vgl. Tabelle 1). In Tabelle 2 werden die Absatzmengen und Aufwandempfehlungen vorgestellt, welche in dieser Arbeit verwendet wurden. Ergänzende und nicht im Anhang dargestellte Stoffdaten können über Tomlin [2003] oder die EU Pestizide Datenbank [2014] eingesehen werden.

³ Die Forstzulassung von Basta[®] wurde 2013 widerrufen BVL [2013b]

Tabelle 2: Eingesetzte Wirkstoffe

Beispiel für Formulierungen mit ebendiesen Wirkstoffen 1: Ortiva®; 2: Collis® 3 Basta® 4:Fortress 250® 5: Orius® Daten zusammengestellt aus [BVL 2013a, BVL 2014b, BVL 2014a]

*Die Forstzulassung wurde am 13.11.2013 widerrufen. Die Aufwandmenge für Baumschulen um die Hälfte auf 3,75 l ha⁻¹ reduziert.

<i>Wirkstoff</i>	<i>Absatz in t</i>	<i>Wirkstoff in g l⁻¹</i>	<i>Aufwand menge in l ha⁻¹</i>	<i>Herbizid (H) Fungizid (F)</i>	<i>Acker- bau</i>	<i>Forst</i>
Azoxystrobin¹	100-250	250	0,5	F	X	
Boscalid²	100-250	200	0,6	F	X	X
Glufosinat³	25-100	200	7,5*	H	X	X*
Kresoxim- Methyl²	250-100	100	0,6	F	X	X
Quinoxifen⁴	2,5-10	250	0,6	F	X	X
Tebuconazol⁵	250-1000	200	1,5	F	X	

Tebuconazol (Ackerbau)

Tebuconazol ist in der EU als ein systemisch wirksames Fungizid für den Ackerbau (Wintergetreide und Raps) zugelassen. Tebuconazol wirkt biochemisch hemmend auf die Ergosterolsynthese. Aufgrund seiner Struktur existieren zwei Enantiomere (vgl. Abbildung 10), welche in der Formulierung als Racemat vorliegt. Welches der beiden Enantiomere für die fungizidale Wirkung verantwortlich ist, wird in der Zulassung nicht definiert. Orius® als Formulierung mit dem Wirkstoff Tebuconazol, wird von den Pflanzenteilen schnell absorbiert und akropetal in dem Pflanzengewebe verteilt.

Tebuconazol wird nach Laborstudien als stabil im Boden angenommen. Die Studien belegten eine Kinetik 1. Ordnung mit DT₅₀ größer 365 Tagen. Aufgrund der geringen Abbauraten wird von einem Akkumulationspotenzial ausgegangen. Der angegebene PEC_{Accu} beträgt $c = 0,2681 \mu\text{g g}^{-1}$. Nach dem EXPOSIT 3.0 Model wurde ein Eintrag aufgrund von Spray Drift in einem Meter Entfernung von $c = 1,85 \mu\text{g l}^{-1}$ berechnet [BVL 2013c]. Einträge aufgrund von Leaching oder Volatilisation werden aufgrund der physikalisch-chemischen Eigenschaften als untergeordnet eingestuft [European Commission 2008b, Tomlin 2003].

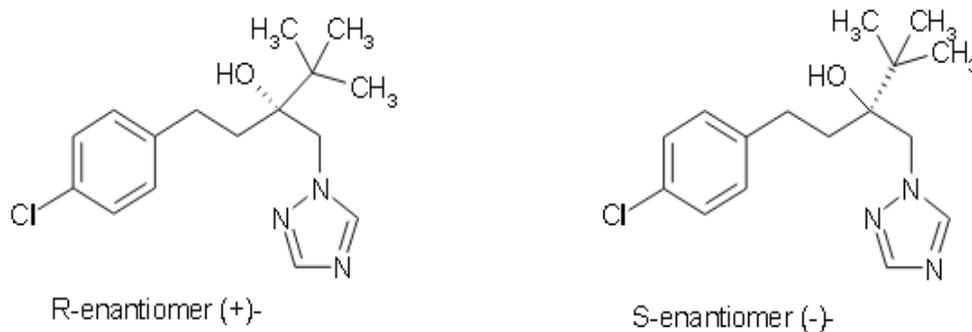


Abbildung 10: Tebuconazol - Enantiomere [BVL 2009]

CAS: 107534-96-3, Molekulargewicht 307,82g mol⁻¹ [Reaxys]

Azoxystrobin (Ackerbau)

Azoxystrobin (vgl. Abbildung 11) wird als Fungizid für die Kulturen Kartoffel, Zuckerrübe und verschiedene Gemüse sowie im Zierpflanzen- und Ziergehölz-Anbau eingesetzt. Es wirkt aufgrund von systemischen und translaminaren Eigenschaften, indem es biochemisch in die Mitochondrien-Atmung der Pilze eingreift.

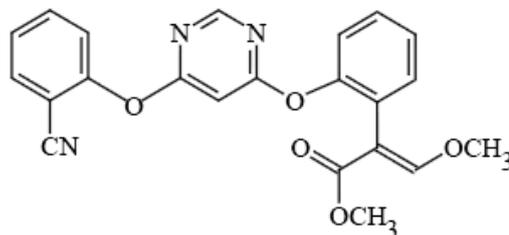


Abbildung 11: Azoxystrobin [EU Commission 1998a]

CAS: 131860-33-8, Molare Masse 403.4 g mol⁻¹ [Reaxys]

Für die Zulassung wurden mittels des EXPOSIT 3.0 Modells Konzentrationen in einem Meter Entfernung von $c = 1.11 \mu\text{g l}^{-1}$ modelliert. Ein Eintrag in die Atmosphäre wird aufgrund der Eigenschaften als nicht dominanter Eintragspfad gewertet [BVL 2013c]. Azoxystrobin wird ebenfalls mit geringen Raten im Boden abgebaut ($DT_{50} > 365$ Tage) und eine Akkumulation wird als wahrscheinlich angenommen. Es wurden drei Boden-Metaboliten identifiziert, von denen zwei eine beschleunigte Abbaubarkeit im Boden aufwiesen [Tomlin 2003].

In dem zur Zulassung vorgelegten Bericht zur Gefährdungsbeurteilung wird ein PEC_{accu} für Azoxystrobin (ohne Metabolit) von $c = 0,0689 \mu\text{g g}^{-1}$ [BVL 2013c] berechnet. In der EU Database wurden Daten, bezogen auf Rückstände im Boden, in der Größenordnung von $c = 0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ in 0 bis 20 cm Bodentiefe hinterlegt [EU Commission 1998a].

Boscalid und Kresoxim-Methyl (Mischung; Zulassung Forst)

Während Boscalid (vgl. Abbildung 12) hemmend auf die Succinat-Dehydrogenase wirkt und somit in die Elektronentransportkette der Mitochondrien am Komplex II eingreift, greift Kresoxim-Methyl (vgl. Abbildung 13) in die Elektronentransportkette in den Mitochondrien am Komplex III ein.

Kresoxim-Methyl bindet fest an die Kutikula der Pflanze und stellt somit gebundene Wirkstoffdepots bereit. Durch diese Depots wird über einen langen Zeitraum kontinuierlich Wirkstoff abgegeben. Boscalid wird direkt in die Pflanze aufgenommen und systemisch verlagert.

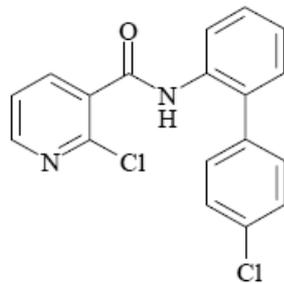


Abbildung 12: Boscalid
[European Commission 2008a]

CAS: 188425-85-6, Molare Masse 343,21 g mol⁻¹
[Reaxys]

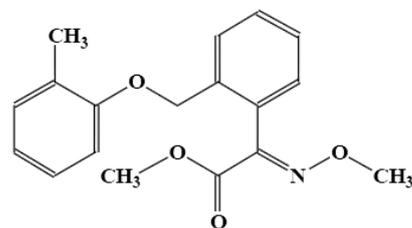


Abbildung 13: Kresoxim-Methyl
[EU Commission 1998b]

CAS 143390-89-0, Molare Masse 313,35 g mol⁻¹
[Reaxys]

Boscalid wird bei Eintrag in die Luft an der partikulären Phase gebunden und kann durch nasse oder trockene Deposition ausgewaschen werden. Im Boden ist aufgrund des K_{OC} von 970 von einer geringen Mobilität auszugehen. Einträge durch Volatilisation werden aufgrund der Henry Konstante als nicht signifikanter Eintragspfad eingestuft. Die Biodegradation (DT_{50}) liegt zwischen 108 Tagen bis zu einem Jahr [BVL 2003, European Commission 2008a, Tomlin 2003]. Aufgrund der physikalischen-chemischen Eigenschaften von Boscalid muss eine Persistenz der Substanz im Boden angenommen werden. Somit wurden PEC_{accu} Berechnungen für die Zulassung durchgeführt. In den in der EU Database hinterlegten Daten wurden für Boscalid zwei Studien in Deutschland für Wein und Gemüse vorgelegt, bei denen 138% bzw. 150% der Aufwandmenge gefunden wurden [European Commission 2008a]. Ein PEC_{accu} wurde mit $c = 0,9 \text{ mg kg}^{-1}$ als worst case Szenario angenommen [BVL 2006]. In einer weiteren Studie ergaben sich für Boscalid nach 21 Tagen ein PEC_{soil} von $c = 0,419 \text{ mg Wirkstoff kg}^{-1}$ und für Kresoxim-Methyl von $c = 0,0031 \text{ mg Wirkstoff kg}^{-1}$ [ctgb 2010].

Quinoxifen (Forst):

Das in der Forstwirtschaft zugelassene Fungizid wird vorbeugend aufgetragen und lagert sich auf der Wachsschicht der Pflanzenteile an. Quinoxifen (vgl. Abbildung 14) wirkt aufgrund von Signaltransduktion.

Für die Substanz wird von keinem Akkumulationspotenzial im Boden ausgegangen. Rückstandsuntersuchungen in England, Deutschland, Frankreich und Griechenland wurden bei der Zulassung vorgelegt und eine Konzentration von $c = 0,02 - 0,07 \text{ mg kg}^{-1}$ in Bodenbereich von 0 bis 10 cm angenommen [European Commission 2003]. Ein Verdunstungspotenzial (15%) der Substanz von der Blattoberfläche wird von Wolters [2006] beschrieben.

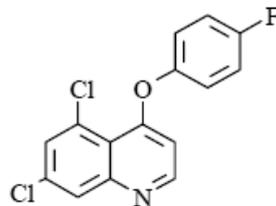


Abbildung 14: Quinoxifen [European Commission 2003]

CAS 124495-18-7, Molare Masse $308,13 \text{ g mol}^{-1}$ [Reaxys]

Glufosinat (Basta[®]- Ackerbau und Forst)

Das nicht selektiv wirkende Herbizid Basta[®] mit dem Wirkstoff Glufosinat-Ammonium wirkt als Glutamin Synthetase Hemmer und stört den Ammoniumstoffwechsel und hemmt somit die Photosynthese. Das Blattherbizid wirkt sowohl über das Blatt wie auch systemisch [Bayer Crop Science Deutschland 2013].

Als Glufosinat (vgl. Abbildung 15) wird das DL Racemat bezeichnet. Hierbei ist das L-Enantiomer das herbizidal wirkende Enantiomer. Das D - Enantiomer hingegen ist inaktiv. Ebenfalls wird das L-Enantiomer als Phosphinothricin bezeichnet und in Kombination mit anderen Wirkstoffen als Herbizid eingesetzt.

Aufgrund der ökotoxikologischen Eigenschaften wurden Forschungen betrieben, um gentechnisch modifizierte, herbizidresistente Nutzpflanzen wie Mais, Reis, Raps oder Salat zu erzeugen [Mac Lachlan 2012, Schmidt 2000].

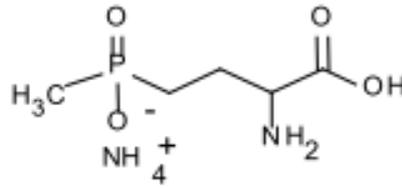


Abbildung 15: Glufosinat [European Commission 2007]

CAS 77182-82-2 , Molare Masse 198.19 g mol⁻¹ [Reaxys]

Obwohl Phosphinothricin als natürliches Toxin für mikrobielle Gemeinschaften angesehen wird, wurden zunächst die Auswirkungen auf Mikroorganismen - Populationen des Bodens bei der Bewertung des ökotoxikologischen Risikos unberücksichtigt gelassen [PAN 2001]. Jedoch wurde bereits von Ahmad und Malloch [1995] gezeigt, dass die Anzahl der isolierbaren Pilze um 20% und die Bakterienanzahl um 40% in Böden der landwirtschaftlichen Nutzung reduziert wurden. Aber auch für Bakterien in Böden aus borealen Wäldern konnte eine Reduktion von etwa 20% gezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits 2012 die Auswirkungen des Herbizides auf das Myzelwachstum von Ektomykorrhiza- Pilze für eine Forstapplikation durch *in vitro* Versuche untersucht. Im Jahr 2013 wurde eine Zulassungsbeschränkung des Wirkstoffes Glufosinat von der EU beschlossen. Die Durchführungsverordnung Nr. 365/2013 [EU Kommission 2013] wurde in Deutschland vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit umgesetzt und die Zulassung teilweise widerrufen. Unter anderem wurde die Zulassung für die Forstanwendung an Laub- und Nadelbäumen aufgehoben. Für alle anderen, noch zulässigen Anwendungen wurde die Aufwandmenge auf maximal 3,75 l ha⁻¹ beschränkt. Für Ziergehölze wurde eine NS-Auflage (NS: Naturhaushalt, sonstige: hier Geräte mit Spritzschirm) erlassen. Grund für diesen Teilwiderruf waren die als unzureichend eingestuften Studien im Bereich der Risikoabschätzung bezüglich Säugetiere und Nichtzielarthropoden [European Commission 2013].

4 Experimentelles Design und Methoden

In dieser Arbeit werden sowohl mikrobiologische Methoden wie auch analytische Methoden eingesetzt. Durch Laborversuche zum Wachstums- bzw. Hemmverhalten der ECMs wurden Daten zur Effektabschätzung gewonnen. Durch instrumentelle Analytik wurden Konzentrationen der applizierten Fungizide in den Kompartimenten Boden, Wurzelnahe Boden und in den Wurzeln bestimmt. Durch die Kombination der Effektkonzentrationen mit den Expositionsdaten soll eine Bewertung der Gefährdung vorgenommen werden.

4.1 Material

4.1.1 Mykobiont

Die eingesetzten Isolate wurden aus referenzierten Ektomykorrhiza Stämmen *Pisolithus arhizus*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Cenococcum geophilum* und *Lyophyllum* sp. des Leibniz Institutes „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“ (DSMZ) gewonnen (vgl. Tabelle 3). Die Kultivierung erfolgte in sterilen Petrischalen (Sarstedt®) auf DSMZ Medium Nr. 392 (BAF) im Dunkeln, für *Pisolithus arhizus* und *Hebeloma crustuliniforme* bei 26°C und für *Cenococcum geophilum* und *Lyophyllum* sp. bei 20°C. Die Umsetzung der Isolate erfolgte kontinuierlich für alle Versuche während der Wachstumsphase der Kulturen. Zur Qualitätskontrolle der Stammlinien wurde das Wachstumsverhalten über die gesamte Versuchsdauer dokumentiert und verglichen (vgl. Anhang 9.4). Darüber hinaus wurden ausgewählte Isolate mittels Sequenzierung überprüft. Die eingesetzten Isolate wiesen keine signifikanten Veränderungen zu den Stammissolaten auf.

Tabelle 3: Verwendete Ektomykorrhiza Stämme

Klassifizierung und Kulturbedingungen der eingesetzten ECM-Stämme. Die Kultivierung erfolgt für alle Stämme im Dunkeln.

^a: Sequenzierung zur Qualitätskontrolle (JKI Braunschweig) ^b: Zusammensetzung Medium siehe Anhang

<i>ECM-Stamm</i>	<i>Klassifizierung</i>	<i>Nährmedium^b</i>	<i>Temperatur</i>
<i>Pisolithus arhizus</i>	DSM Nr. 4271	Medium 392 DSMZ	T=26°C
<i>Hebeloma crustuliniforme^a</i>	DSM Nr. 4283	Medium 392 DSMZ	T=26°C
<i>Cenococcum geophilum^a</i>	DSM Nr. 4284	Medium 392 DSMZ	T=20°C
<i>Lyophyllum</i> sp.	DSM Nr. 2979	Medium 392 DSMZ	T=20°C

Für die mikrobiologischen Versuche zu den Effekten von Pflanzenschutzmitteln auf Mykobionten (vgl. Kap. 4.1) wurden aus diesen Stammlinien Flüssigkulturen (BAF-Flüssigmedium) oder Plattenkulturen angesetzt. Die Erhaltungskulturen wurden speariert von den Versuchskulturen inkubiert.

Nährmedium

Die Kultivierung der ECM-Stämme erfolgte auf einem von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) empfohlenem Standardmedium für ECM-Pilze. Dieses BAF-Medium (Zusammensetzung siehe Anhang 9.1.1, [DSMZ]) wurde für alle *in vitro* Effekt-Versuche und Erhaltungskulturen verwendet. Für die Wachstumsversuche wurden zusätzlich Versuche auf Malz-, Haferflocken- und ATCC Medien durchgeführt (Zusammensetzung siehe Anhang 9.1.1 [DSMZ]). Für die Versuche zur Bestimmung des Ergosterolgehaltes in den Isolaten wurde mit Flüssigkulturen gearbeitet. Bei diesen wurde auf den Zusatz von Agar als Verdickungsmittel verzichtet. In allen Medien wurden die hitzesensiblen Inhaltstoffe, wie Vitamine oder ggf. Pestizide, erst nach dem Autoklavieren sterilfiltriert (Spritzenvorsatzfilter, 0,2 µm) hinzugegeben. Für alle Nährmedien galt, dass diese unter Lichtausschluss gelagert wurden. Flüssigmedien wurden in verschlossenen Erlenmeyerkolben mit Alufolie umwickelt und auf einem Horizontalschüttler (Jürgens HS 250:50 Mot min⁻¹) mit gleichmäßiger Bewegung bei Raumtemperatur (T=20 ±2°C) kultiviert. Plattenmedien wurden im Inkubator bei 20°C oder 26°C dunkel und invertiert gelagert. Alle Thermostateinstellungen wurde mittels Datenlogger stichprobenhaft überprüft. Petrischalen wurden zum Schutz vor Kontaminationen aus der Raumluft mit Parafilm verschlossen.

ECM Inokulum

Für die Mykorrhizierung der Gewächshauspflanzen (vgl. Kap. 4.3, S. 55) wurden aus den entsprechenden Erhaltungskulturen Versuchslinien kultiviert. Dazu wurde Inokulum auf Vermiculite als Trägermaterial hergestellt, indem zwei Platten der entsprechenden ECM-Pilze zerkleinert und in 2l Vermiculite (steril) überführt wurden. Die Glasgefäße wurden mit Alufolie und Parafilm verschlossen und dunkel bei Raumtemperatur (T = 20 ± 2°C) gelagert. Zum Versuchszeitpunkt der Gewächshausversuche war in den Gefäßen ein deutliches Myzelwachstum erkennbar.

Neben dem substratgetragendem Inokulum wurden die Buchenjungepflanzen der Gewächshausversuche zusätzlich noch mit einem Flüssig-Inokulum beimpft. Dafür

wurden 2-5 Isolate der Plattenkulturen der ECM- Pilze *Pisolithus arhizus* und *Cenococcum geophilum* in BAF-Flüssigmedien vorkultiviert.

4.1.2 Phytobionten

Als Phytobionten wurden aus Rotbuchensamen (*Fagus sylvatica* L.) Jungpflanzen gezogen (vgl. Abbildung 16). Das referenzierte Saatgut aus dem Reifejahr 2012 wurde durch das Niedersächsische Forstamt Oerrel bezogen. Es handelt sich dabei um Saatgut aus dem Herkunftsgebiet Heide, Altmark (Stammzertifikat: Anhang 9.1.2).

Als Substrat für die Vorkultivierung wurde Perlite (Isoshelf®) genutzt. Des Weiteren wurde Substrat der Klasmann-Dielmann GmbH für die Topfversuche in Braunschweig verwendet. Die genaue Klassifikation ist im Anhang 9.1.3 dargestellt. Das Umpflanzen der Phytobionten aus den Keimshalen erfolgte in Baumschulpaletten QuickPot QP 35T (50x50x115) der Hermann Meyer KG.



Abbildung 16: Buchenjungpflanzen in Baumschulpaletten.

4.1.3 Pestizide: Standards und Formulierungen

Für die Expositions- wie auch Effektversuche wurden die Wirkstoffstandards Boscalid (98,4% Dr. Ehrenstorfer, Germany, Fungizid), Quinoxifen (99,0% Dr. Ehrenstorfer, Germany, Fungizid), Azoxystrobin (99,5% Dr. Ehrenstorfer, Germany, Fungizid), Kresoxim-Methyl (99%, Dr. Ehrenstorfer, Germany, Fungizid) und Tebuconazol (99,0% Dr. Ehrenstorfer, Germany, Fungizid) verwendet. Standards ($c = 1 \text{ g l}^{-1}$) wurden in Acetonitril (CH_3CN) in Braunglasvials angesetzt und bei $T = -18^\circ\text{C}$ gelagert. Die genaue Herstellung der Standards ist für die Expositionsversuche unter Kap. 4.3.5.2.3 und für die Effektversuche unter Kap. 4.3.3 beschrieben. Als Formulierungen wurden handelsübliche Formulierungen mit den jeweiligen Wirkstoffen Tebuconazol (Orius[®]), Glufosinat-ammonium (Basta[®]), Azoxystrobin (Ortiva[®]) sowie ein Kombinationspräparat der Wirkstoffe Boscalid/Kresoxim-Methyl (Collis[®]) eingesetzt. Diese wurden bei $T = 4^\circ\text{C}$ dunkel gelagert.

4.1.4 Ergosterol Stammlösung

Ergosterol-Stammlösung (99%, Dr. Ehrenstorfer, Germany) der Konzentration $c = 300 \text{ mg l}^{-1}$ wurde in Methanol (CH_3OH) angesetzt und bei $T = -18^\circ\text{C}$ gelagert.

4.1.5 Sonstige Materialien

Eine ausführliche Darstellung der verwendeten Materialien ist im Anhang 9.1.4 aufgeführt. Für mikrobiologische Experimente wurde grundsätzlich mit sterilen Instrumenten gearbeitet. Diese wurden entweder bei 121°C für 21 min autoklaviert (Tuttauer, 3150 EL) oder bei 180°C über 2 h im Trockenschrank hitzesterilisiert. Bei den Arbeiten mit den ECM-Stämmen wurde unter der Sterilbank (Ehret, ET 130) gearbeitet. Alle verwendeten Lösungen für die mikrobiologischen Experimente wurden bei 121°C für 21 min unter Einsatz von Stützdruck autoklaviert. Vitamine wurden dem Nährmedium sterilfiltriert (Spritzenvorsatzfilter $0.2\mu\text{m}$) und nach Abkühlung auf $T < 80^\circ\text{C}$ hinzugefügt. Wurde mit exponiertem Medium gearbeitet, wurden die Wirkstoffe und Formulierungen ebenfalls bei $T < 80^\circ\text{C}$ hinzugegeben. Alle verwendeten Gefäße und Materialien für die mikrobiologischen Versuche wurden sterilisiert. Alle sonstigen Glasgeräte für die Expositionsversuche wurden vor der Verwendung in der Laborspülmaschine gespült und im Muffelofen bei 400°C ausgeglüht.

4.2 Untersuchung zu den ökotoxikologischen Effekten von Pflanzenschutzmitteln auf Mykobionten

Es werden *in vitro* Methoden vorgestellt, um sterile Buchenjungepflanzen zu mykorrhizieren sowie Methoden, um das Myzelwachstum in isolierten sterilen Reinkultur-Modellsystemen zu untersuchen. Während in den kombinierten Systemen aus Mykobiont und Phytobionten Ergosterol als Biomarker analysiert wurde, um die Auswirkungen auf die Mykorrhizierung zu untersuchen, wurde in den Mykobionten-Systemen das Myzelwachstum analysiert.

4.2.1 *In vitro* Versuche: Kombinierte Systeme aus Phytobiont und Mykobiont

Es wurden mit den Isolaten *Lyophyllum* sp. und *Cenococcum geophilum* verschiedene Inokulationsmethoden für Buchenjungepflanzen getestet. Ziel war es ein steriles und komplexes Inokulationssystem aus Mykobiont und Phytobiont zu entwickeln, um die Zunahme an Ergosterol bei zunehmender Mykorrhizierung zu untersuchen. Dazu wurden Buchenjungepflanzen unter Laborbedingungen in Perlite aufgezogen und anschließend in Rhizotrone umgepflanzt. Die Methode wurde in Anlehnung an die von de Vries [2000] beschriebene Methode entwickelt. Dazu wurden zunächst die Samen bzw. Wurzeln vor dem Umpflanzen in die Rhizotrone (vgl. Abbildung 17) mit 30% Wasserstoffperoxid [Carrillo et al. 2011] oder Natriumhypochlorit oder mit 70% Ethanol oberflächensterilisiert.

Es wurden Versuche sowohl mit festem Nährmedium in Petrischalen sowie auch mit Flüssigkulturen durchgeführt. Bei den Versuchen mit festem Nährmedium wurde auf ein BAF- Nährmedium entweder direkt oder durch eine Schicht mit Aktivkohlepapier oder Filterpapier (in Anlehnung an Chilvers et al. [1986]) eine Wurzel aufgelegt.

Die Inokulation erfolgt entweder über das Filterpapier, welches zuvor mit einem ECM-Isolat beimpft worden war oder durch das unmittelbare Aufbringen von Isolaten an die Wurzeln.

Bei den Versuchen mit Flüssigmedium wurde auf das Medium ein Drahtnetz mit 5 mm Maschenweite gelegt und das Gefäß anschließend autoklaviert. In diesen Aufbau wurde nach dem Autoklavieren die Wurzel der Buchenjungepflanze eingehangen und das Medium mit Isolaten von *Cenococcum geophilum* oder *Lyophyllum* sp. beimpft. Die Anzahl der Replikate betrug in der Regel N=3. Im Verlauf der Versuche wurden einige Replikate aufgrund von Fremdpilzbewuchs ausgesondert [Hensen 2011].

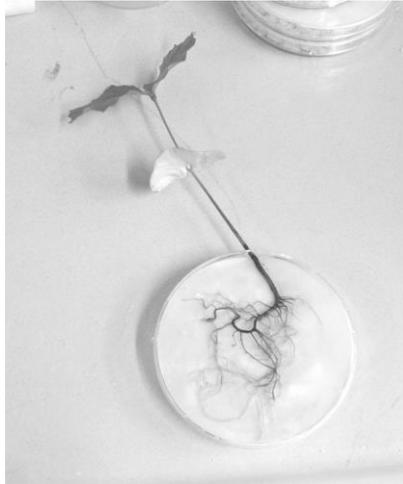


Abbildung 17: Buchensjungpflanze im Aufzuchtssystem-Petrischale.

4.2.1.1 Biomarker Ergosterol

Die Gehalte des Biomarkers Ergosterol in den verwendeten ECM- Isolaten sowie die Bestimmung der Gehalte in Buchenwurzeln wurden mittels HPLC-DAD analysiert.

Geräteparameter

Flüssigchromatograph:	Agilent 1100 Series LC System (G1311A Degasser, G1311A Quaddpump, G1313A ALS Autosampler)
Detektor:	G1315A DAD
Trennsäule:	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8, 5 μ m, 4,6 x 150 mm
Vorsäule:	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8 (Narrow-Bore Guard COLUMN, 5 μ m, 2,1 x 12,5 mm)
Injektionsvolumen:	30 μ l
Eluent:	A: H ₂ O, B: Methanol, 95:05, isokratisch
Fluss:	1 ml min ⁻¹

Standard-Lösungen

Es wurde eine Ergosterol-Stammlösungen der Konzentration $c = 300 \text{ mg l}^{-1}$ in Methanol (CH₃OH) angesetzt, indem 5-6 mg der Reinsubstanzen (Dr. Ehrenstorfer, 99%, Germany) in ein Braunglasvial eingewogen wurden (Mettler Toledo 261 Delta Range). Anschließend wurde durch Wägung mit Methanol (Raumtemperatur $T = 20^\circ\text{C}$) auf eine Konzentration von $c = 300 \text{ mg l}^{-1}$ aufgefüllt.

Kalibration und Verfahrenspräzision

Aus der Ergosterol-Stammlösung wurden für die quantitative Messungen Kalibrationsstandards im Konzentrationsbereich von 99 $\mu\text{g l}^{-1}$ bis 9020 $\mu\text{g l}^{-1}$ in Methanol angesetzt und in 1,5 ml Braunglas-Rollrandvials überführt. Zur Bestimmung der Kalibrationsfunktion wurden mindestens sechs Konzentrationslevels gemessen und die Peakflächen gegen die Konzentrationen aufgetragen. Das Bestimmtheitsmaß R^2 der erhaltenen Kalibrationsfunktionen lag bei $> 0,997$. In Tabelle 4 wird eine Kalibration mit den entsprechenden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie der Regressionsparameter in Anlehnung an DIN 32645 mittels DINTEST [Institut für Rechtsmedizin und Verkehrsmedizin der Universität Heidelberg 2003] dargestellt.

Tabelle 4: Kalibration Ergosterol

Nachweisgrenze (NWG), Erfassungsgrenze (EG) und Bestimmungsgrenze (BG) wurden mit der Software DINTest [Institut für Rechtsmedizin und Verkehrsmedizin der Universität Heidelberg 2003] bestimmt. Aus den Kalibrationspunkten wurde die Kalibrationsfunktion mittels linearer Regression bestimmt. Injektionsvolumen 30 μl bei $\lambda=282,5\text{nm}$.

<i>Verbindung</i>	<i>N</i>	<i>C_{min}</i> <i>$\mu\text{g l}^{-1}$</i>	<i>C_{max}</i> <i>$\mu\text{g l}^{-1}$</i>	<i>Steigung</i>	<i>Achsenab</i> <i>schnitt</i>	<i>R²</i>	<i>NWG</i> <i>$\mu\text{g l}^{-1}$</i>	<i>EG</i> <i>$\mu\text{g l}^{-1}$</i>	<i>BG</i> <i>$\mu\text{g l}^{-1}$</i>
Ergosterol	10	99	9020	0,037	-1,134	1,00	66,24	123,54	228,82

Um die Verluste über das Verfahren zu quantifizieren wurden Wiederfindungsversuche durchgeführt [Reers 2010]. Die Verluste lagen bei $<5\%$ für das gewählte Extraktionsverfahren.

Probenvorbereitung

Zur Bestimmung der Gehalte an Ergosterol in verschiedenen ECM- Isolaten wurden aus Flüssigkulturen Isolate gewonnen. Es wurde mit Flüssigkulturen gearbeitet, um eine Verfälschung des Myzelgewichtes durch anhängendes Nährmedium zu minimieren.

Das Myzel im Flüssigmedium wurde steril entnommen, zweimal mit autoklaviertem Wasser gewaschen und vorsichtig auf eine sterile Gaze abgelegt und trockengetupft. Anschließend wurden Myzelplugs entsprechend der in Tabelle 5 angegebenen Mengen in ein 25 ml Rollrandvial eingewogen (Mettler Toledo 261 Delta Range).

Da für die Gewächshausversuche, neben dem Ergosterolgehalt auch der Gehalt an Pestiziden in den Wurzeln ermittelt werden sollte, wird auf den in der Literatur beschriebenen Verseifungsschritt, um als Ester chemisch gebundenes Ergosterol als freies Ergosterol zu bestimmen [Martin et al. 1990], verzichtet. Damit wird jedoch

akzeptiert, dass bei den Analysen nur der Anteil des freien Ergosterols detektiert werden konnte.

Tabelle 5: Kultivierungsmedien und Einwaagen in mg Frischgewicht der Isolate für die Ergosterolbestimmung

Die verwendeten Nährmedien wurden alle ohne den Zusatz von Agar hergestellt. Die Zusammensetzung der Medien ist im Anhang nachzulesen.

<i>ECM</i>	<i>N</i>	<i>Medium</i>	<i>Einwaage mg</i>
<i>Lyophyllum</i>	3	BAF	27 ±3
<i>Lyophyllum</i>	18	Schmelzflocken	49±11
<i>P. arhizus</i>	6	BAF	44±2
<i>P. arhizus</i>	6	MMN	59±13
<i>H. crustuliniforme</i>	3	MMN	59±12
<i>C. geophilum</i>	3	BAF	26±11
<i>C. geophilum</i>	3	MMN	34±11

4.2.1.2 Vorschrift zur Extraktion von Ergosterol aus Myzel

Die Extraktion des Ergosterols erfolgte unter Lichtausschluß, um einen photochemischen Abbau der Substanz zu verhindern.

- 1) Es wurden ca. 15-70 mg Myzel (abhängig vom Isolat) in ein 25 ml Rollrandvial eingewogen.
- 2) Zugabe von 2 ml Methanol als Extraktionsmittel mittels Kolbenhubpipette (Eppendorf 5000µl).
- 3) Homogenisieren des Myzels mittels Glasstempels.
- 4) Zugabe von 1 ml Methanol zum Spülen des Stempels.
- 5) Luftdichtes Verschließen der Vials mit PTFE-Bördeldeckeln.
- 6) Extraktion im Ultraschallbad für 5 min (HF-Frequenz 35 kHz, HF-Leistung 320 W).
- 7) Überstand in Mikrozentrifugentube überführen und 5 min bei 14.000 min⁻¹ zentrifugieren.
- 8) Überstand in ein 1,5 ml Rollrandvial überführen und verschließen

Die Extraktion des Ergosterols aus den Wurzelproben im Gewächshausversuch wurde zeitgleich mit der unter Kap. 4.3.5.2.7 beschriebenen Pestizidextraktion aus den Wurzelproben durchgeführt.

4.2.2 *In Vitro* Versuche: Mykobionten Systeme

Ergänzend zu den Versuchen mit beimpften Phytobionten wurden Methoden entwickelt, um den Mykobionten in einem sterilen Modellsystem isoliert zu untersuchen. Um die Hemmwirkung von Pestiziden auf das Wachstum der Myzelien zu untersuchen, wurden eine Qualitative Methode und zwei Quantitative Methoden entwickelt und getestet.

Für alle Hemmversuche wurde die empfohlene Aufwandmenge der Hersteller (1 ha^{-1}) in die Wirkstoffkonzentration g ha^{-1} umgerechnet (vgl. Tabelle 6). Die Berechnung der einzusetzenden Substanzmenge in den Experimenten wurde jeweils auf die Fläche des Versuches vorgenommen. Hierbei entsprechen 100% Applikationsmenge (AM) der vergleichbaren, tatsächlich ausgebrachten Konzentration des Pestizids auf einer Zielfläche.

Tabelle 6: Übersicht über die eingesetzten Wirkstoffe und Formulierungen

Daten übernommen von den Zulassungsinhabern, bzw. vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit Die errechnete Applikationsmenge von g ha^{-1} entspricht im Weiteren dieser Arbeit dem mit 100%AM gekennzeichneten Applikationsniveau. Eine Umrechnung auf die tatsächlichen Flächen wurde bei der Versuchsdurchführung vorgenommen.

<i>Formulierung</i>	<i>Wirkstoff</i>	<i>Konzentration g l^{-1}</i>	<i>Aufwandmenge l ha^{-1}</i>	<i>Applikationsmenge g ha^{-1}</i>
Orius®	Tebuconazol	200	1,5	300
Collis®	Boscalid / Kresoxim- Methyl	200/ 100	0,6	120/ 60
Basta®	Glufosinat- ammonium	200	7,5	1500
	Tebuconazol	200	1,5	300
	Boscalid	200	0,6	120
	Azoxystrobin	250	1,0	250
	Quinoxifen	250	0,6	150

4.2.2.1 Effekte auf den Endpunkt Myzelwachstum: Qualitative Methode Tube Strip-Methode

Bei diesem Testsystem wurde die Methode mit dem Mykobionten *Pisolithus arhizus* getestet. Die Exposition erfolgte mit dem Wirkstoff Boscalid. Als Konzentrationsstufen wurden Verdünnungen im Bereich von 1 % bis 100 % der empfohlenen Applikationsmenge (AM) für die Anwendung in Forst/Baumschulen angesetzt. Hierbei wurde für eine Applikationsmenge von 100% die absolute Menge von 240 ng Boscalid pro Strip, aufgrund der vorhandenen Fläche, eingesetzt. Die qualitative Auswertung erfolgte nach 28 Tagen visuell.

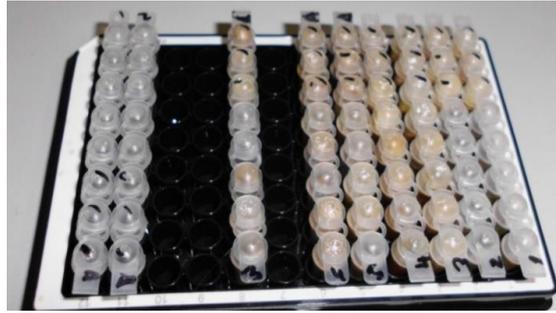


Abbildung 18: Mikrotiterplatte mit Tube – Strips

Versuchslösungen

Aus der Boscalid Stammlösung ($c = 1 \text{ g l}^{-1}$) wurde eine Zwischenverdünnung der Konzentration $c = 400 \text{ mg l}^{-1}$ angesetzt. Aus dieser Zwischenverdünnung wurden durch logarithmische Verdünnungsschritte die benötigten Verdünnungsstufen 100% AM ($c = 4 \text{ mg l}^{-1}$), 10% AM ($c = 400 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$) und 1 % AM ($c = 40 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$) erhalten.

Versuchsvorschrift

Zunächst wurden Reaktionsgefäße (Multi[®]-UltraStrips 8er) im Autoklaven sterilisiert. Als Nährmedium wurde sterilisiertes Malz-Medium verwendet. Das Medium wurde mittels steriler Einmalspritze in die einzelnen Strips (Dosierung: 1,5 ml) eingefüllt und verschlossen.

Diese Verdünnungsstufen der Versuchslösungen wurden sterilfiltriert und 60 μl der Verdünnung in die Strips 1-6 der -Reaktionsgefäße eingefüllt. Die Strips 7-8 wurden für Lösungsmittelkontrollen mit 60 μl eines der Pestizidlösung entsprechenden Acetonitril/ Wasser Gemisch exponiert. Für jede Applikationsstufe wurde eine 8er Reihe angesetzt.

Nach 10 min wurden in jeden Strip ein mit dem Korkbohrer steril ausgestochenes Myzelstück aufgebracht und die Strips verschlossen. Auf Mikrotiterplatten wurden die Strips für 28 Tage bei 26°C im Dunkeln inkubiert.

Auswertung

Nach 28 Tagen wurden die Strips qualitativ ausgewertet, indem visuell bewertet wurde, ob es zu einem Myzelwachstum im Strip gekommen war.

4.2.2.2 Effekte auf den Endpunkt Myzelwachstum: Quantitative Methoden

4.2.2.2.1 Wachstumskontrollen ohne Exposition

In Kontrollversuchen sollte zunächst das Myzel-Wachstum der in Tabelle 3 vorgestellten ECM-Pilze ohne Beeinträchtigung durch Chemikalien ermittelt werden. Dieser Wert galt als optimales Wachstum des Myzels und wurde mit dem Wachstum der Nullkontrollen (Kontrollen ohne jegliche Exposition) in den Platten Versuchen verglichen. Da bei jedem durchgeführten Experiment gesonderte Nullkontrollen als Qualitätskontrolle angesetzt wurden, konnte eine Verfälschung der Ergebnisse, wie etwa durch saisonale Wachstumsschwankungen, nahezu vollständig ausgeschlossen werden.

Um das optimale Wachstum des Myzels zu erfassen, wurde zunächst untersucht, inwieweit die Isolate auf verschiedenen Medien signifikante Unterschiede im Myzel-Wachstum aufweisen. Dazu wurden Platten mit BAF-Nährmedium, Schmelzflockenmedium und Malzmedium angesetzt und Isolate der ECM *Pisolithus arhizus*, *Cenococcum geophilum*, *Lyophyllum* sp. und *Hebeloma crustuliniforme* steril aufgesetzt und die Platten mit Parafilm verschlossen und dunkel bei T= 20°C (*Cenococcum geophilum*, *Lyophyllum* sp.) bzw. T= 26°C (*Pisolithus arhizus*, *Hebeloma crustuliniforme*) invertiert gelagert. Darüber hinaus wurden bei den jeweiligen Expositionsversuchen für alle vier ECM-Pilze entsprechende Wachstumskontrollen angesetzt. Es wurden mindestens drei Replikate pro ECM-Pilz auf Nährböden aufgesetzt und das Wachstum in regelmäßigen Zeitabständen digital erfasst und ausgewertet. Hierbei zeigte sich, dass durch die Verwendung eines Korkbohrers ein homogeneres Ausgangsisolat aufgesetzt werden konnte als bei der Verwendung eines Skalpells. Dabei wurde das mit dem Korkbohrer ausgestochene Isolat immer von der erhaltenen Myzel - Fläche subtrahiert, um das Wachstum zu dokumentieren.

Für *Pisolithus arhizus* wurden zum Vergleich des Wachstumsverhaltens unterschiedlichen Nährmedien (BAF-Medium (N=15), Schmelzflocken (N=1); Malz pH 5 (N=1); Malz pH 7 (N=1)) angesetzt. Für *Cenococcum geophilum* wurden die Medien BAF-Medium (N=1); ATCC pH 5 (N=1); ATCC pH 7 (N=1) Haferflocken (N=1) verglichen. Für *Lyophyllum* wurde nur das Schmelzflockenmedium (N=19) getestet und für *Hebeloma crustuliniforme* ausschließlich das BAF-Medium (N=11). Im Verlauf der Effekt-Versuche wurden jedoch auch für *Cenococcum geophilum* und *Lyophyllum* Wachstumskurven auf BAF-Medium aufgenommen. Die Vorgehensweise ist für diese ECM-Pilze bei den jeweiligen Versuchen dokumentiert.

Auswertung

Nach dem anfänglichen Bestimmen des Durchmessers mittels Lineal wurden im weiteren Verlauf der Arbeit auch die Softwareprogramme FotoFix[®] [Koopmann 2002-2012] und ImageJ[®] [Rasband o.J.] zur Auswertung der Flächeninhalte genutzt. Hierbei wurde die Kamera in ein Stativ eingespannt und bei einem konstant gehaltenen Abstand Fotos aufgenommen. Somit konnte die externe Kalibration mittels einer Skala auf die Bilder angewandt werden. Hierzu wurden mit einer herkömmlichen Digitalkamera (Medion 12 Megapixel) Fotos und eine externe Skalierung aufgenommen und diese dann digital mittels der Software ausgewertet.



Abbildung 19: *Pisolithus arhizus* auf BAF-Nährmedium

Zu erkennen ist der radial verlaufende Myzelzuwachs des überimpften Isolates.
Wachstum ohne Exposition

4.2.2.2.2 Mash-Bag Methode

Aufgrund der ausschließlich qualitativen Auswertungsmöglichkeit der Strip-Methode sollte eine Methode getestet werden, welche neben der Quantifizierung der Effekte zwischen ECM, Substrat und Pestiziden in unterschiedlichen Konzentrationsstufen auch eine der Realität angenäherte Analysemethode unter Berücksichtigung von Tiefengradienten ermöglicht.

Die Exposition erfolgte mit den Wirkstoffen Boscalid, Azoxystrobin, Tebuconazol und Quinoxifen jeweils in Kombination mit *Pisolithus arhizus*, *Cenococcum geophilum*, *Lyophyllum sp.* und *Hebeloma crustuliniforme*.

Als Konzentrationsstufen wurden Verdünnungen im Bereich von 1% bis 200% der empfohlenen Aufwandmenge für eine Anwendung in Forst/Baumschulen für Boscalid und Quinoxifen, sowie im Ackerbau für die Substanzen Tebuconazol und Azoxystrobin angesetzt. Hierbei wurden eine Applikationsmenge nach Tabelle 7 pro Gaze aufgrund der vorhandenen Fläche eingesetzt. Zu jeder Konzentrationsstufe wurde eine

entsprechende Lösungsmittelkontrolle (N=3) angesetzt. Für die Lösungsmittelkontrolle wurden die Isolate mit Acetonitril als Lösungsvermittler im identischen Volumenverhältnis wie die dazugehörige Wirkstoffprobe behandelt. Für jeden ECM-Pilz wurde eine unbehandelte Nullkontrolle (N=3) mitgeführt. Als Nullkontrollen wurden mehrere Isolate der Stammkulturen auf unbehandelten Nährboden übertragen und das flächenmäßige Myzelwachstum dokumentiert und ausgewertet.

Um einen Tiefgradienten zu simulieren wurde mit Blumenerde oder Waldboden oder mit einem Sand + Vermiculite Gemisch gearbeitet.

Die qualitative und quantitative Auswertung der Myzelflächen erfolgte nach 28 Tagen digital.

Tabelle 7: Übersicht über die Mash-Bag Methode

Es wurde eine Versuchsfläche von 6.2×10^{-8} ha für die Berechnung der 100% AM zugrunde gelegt.

	<i>Konz. in g l⁻¹</i>	<i>Aufwand- menge in l ha⁻¹</i>	<i>Applikations- Menge(AM) in g ha⁻¹</i>	<i>absolute Wirkstoff- menge pro Fläche bei 100% AM in µg</i>	<i>Volumen in ml</i>	<i>Konz. in mg l⁻¹</i>
Boscalid	200	0,6	120	7,20	5,00	1,44
Tebuconazol	200	1,5	300	18,60	5,00	3,72
Azoxystrobin	250	1,0	250	15,00	5,00	3,00
Quinoxifen	250	0,66	150	9,00	5,00	1,80

Versuchsvorbereitung

Es wurde mit verschiedenen Substraten gearbeitet. Zunächst wurde ein Versuch mit autoklaviertem Waldboden bzw. Blumenerde durchgeführt. Hierbei zeigt es sich, dass das einmalige Autoklavieren nicht alle Mikroorganismen im Boden erfolgreich abtötete und ein Fremdpilzwachstum beobachtet wurde. Daher wurde im weiteren Verlauf der Methodenentwicklung auf das artifizielle Substratgemisch aus Sand und Vermiculite zurückgegriffen. Sowohl der verwendete Sand wie auch das Vermiculite wurden vor Gebrauch über 1,5 Stunden bei 180°C im Trockenschrank sterilisiert. Anschließend wurden die Gläser mit Vermiculite und Sand befüllt und nochmals autoklaviert. Die benötigten Isolate wurden als Plattenkulturen auf BAF Medium vorkultiviert.

Aufbau-Schema

Es wurden verschiedene Testvarianten untersucht. Sowohl die Substrate als auch die Anordnung der Isolate wurde verändert. In Tabelle 8 wird übersichtsartig das

Versuchsdesign dargestellt. Beim Waldboden erfolgte die Anordnung der vier ECM-Isolate auf einer Gaze, um mögliche Wechselwirkungen auf die jeweiligen Isolate zu untersuchen. Bei den anderen beiden Substraten wurde nur jeweils eine ECM-Spezies pro Versuchsgefäß beprobt.

Tabelle 8: Versuchsübersicht über die Mash-Bag Methode

Unter „Gaze“ wird beschrieben, ob die Isolate isoliert voneinander (E: Einzeln) oder in Gemeinschaft zueinander (Z: Zusammen) in das System eingebracht wurden.

<i>Substrat</i>	<i>ECM</i>	<i>Gaze</i>	<i>Azoxystrobin</i>	<i>Tebuconazol</i>	<i>Quinoxifen</i>	<i>Boscalid</i>
Blumenerde	<i>C. geophilum</i>	E	x	x	x	x
	<i>P. arhizus</i>	E	x	x	x	x
Waldboden	<i>H. crustuliniforme</i>		x	x	x	x
	<i>C. geophilum</i>	Z	x	x	x	x
	<i>P. arhizus</i>		x	x	x	x
	<i>Lyophyllum sp.</i>		x	x	x	x
Artifizieller Boden	<i>C. geophilum</i>	E	x	x	x	x
	<i>P. arhizus</i>	E	x	x	x	x

Die sterilen Gefäße wurde nach dem im Abbildung 20 gezeigtem Aufbau gefüllt.

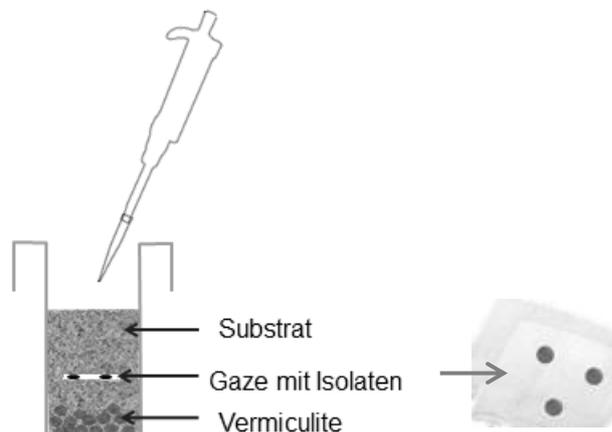


Abbildung 20: Versuchsschema der Mash-Bag Methode

Versuchslösungen

Es wurden Verdünnungsstufen von 1% bis 200% der empfohlenen Aufwandmenge nach Tabelle 8 angesetzt.

Versuchsdurchführung

Die Versuche wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt.

Tag 1:

- 1) Zunächst wurden die sterilen Glasgefäße nach dem oben skizzierten Aufbau (vgl. Abbildung 20) mit Vermiculite und Substrat befüllt.
- 2) Die Isolate wurden steril mit einem Korkbohrer ausgestochen und in die Gaze eingelegt. Die Gaze wurde auf die Substratschicht gelegt. Im Versuch wurden verschiedene Isolate auf einer Gaze, wie auch separate Gaze für jedes ECM-Isolat getestet.
- 3) Es erfolgte eine weitere Zugabe von Substrat nach Volumen (20 ml). Die Isolate waren anschließend vollständig bedeckt.
- 4) Auf die oberste Substratschicht wurde die Fungizidlösung aufgebracht. Für die jeweiligen Konzentrationslevel wurden mehrere Replikate (mindestens N=3) angesetzt. Ebenfalls wurden Lösungsmittelkontrollen (N=3) und unbehandelte Nullkontrollen (N=3) angesetzt.
- 5) Die Gefäße wurden verschlossen und dunkel bei Raumtemperatur gelagert.

Tag 2:

- 1) Die Gaze mit den Isolaten wurde mit einer Pinzette steril aus dem Gefäß entnommen und die Isolate zweimalig mit sterilisiertem Leitungswasser gewaschen und anschließend vorsichtig mit einer sterilen Gaze getrocknet. Hierbei ist wichtig, die verwendete Kompresse zum Trocknen für jedes Isolat zu wechseln.
- 2) Die so gereinigten Isolate wurden auf unbehandeltem Nährmedium in Petrischalen aufgesetzt und die Schalen mit Parafilm verschlossen.

Auswertung

Die Kulturen wurden für 4 Wochen bei der optimalen Wachstumstemperatur dunkel gelagert und während dieser Zeit wurde an mehreren Zeitpunkten die flächenmäßige Ausdehnung des Myzels auf dem Kulturmedium mittels Analysesoftware (FotoFix, ImageJ) digital erfasst.

4.2.2.2.3 Platten Methode

Um Effekte zwischen ECM und Pestiziden in unterschiedlichen Konzentrationsstufen bei unterschiedlichen Expositionsdauern durch eine robuste Analysemethode zu quantifizieren, wurde die Platten Methode etabliert.

Die Exposition erfolgte mit dem Wirkstoffen Boscalid, Azoxystrobin, Tebuconazol und Quinoxyfen. Darüber hinaus wurden auch handelsübliche Formulierungen mit den Wirkstoffen Tebuconazol (Orius[®]), Glufosinat-ammonium (Basta[®]) sowie ein Kombinationspräparat der Wirkstoffe Boscalid/Kresoxim-Methyl (Collis[®]) ausgetestet.

Die Hemmwirkung der Substanzen wurde für *Pisolithus arhizus*, *Cenococcum geophilum*, *Lyophyllum sp.* und *Hebeloma crustuliniforme* untersucht.

Die verwendeten Konzentrationsstufen sind in Tabelle 9 dargestellt. Die maximal eingesetzten Konzentrationen wurden anhand der empfohlenen Aufwandmenge, unter Berücksichtigung der Versuchsfläche, berechnet. Um für die untersuchten Substanzen eine Hemmung zu sehen, wurden als höchste Konzentrationsstufe in der Regel 200 % AM als positiv Kontrolle angesetzt. Zu jeder Konzentrationsstufe wurden spezifische Lösungsmittelkontrollen (mind. N = 3) und unbehandelte Nullkontrollen (mind. N = 3) mitgeführt. Die Lösungsmittelkontrollen waren mit dem identischen Volumenanteil an Acetonitril versetzt, entsprechend des Formulierungszusatzes in den Platten mit Pestizidzugabe. Es wurde sowohl ein Versuchsdesign getestet, bei welchem das Fungizid auf die Platte appliziert wurde sowie ein solches, bei dem das Fungizid in das Nährmedium eingearbeitet wurde.

Versuchslösungen

Es wurden Verdünnungsstufen der empfohlenen Aufwandmenge (vgl. Tabelle 9) angesetzt. Bei den Versuchen, bei denen die Substanz direkt auf die Platte aufgebracht wurde, wurden 200 µl aufgebracht und die Konzentration entsprechend der benötigten Substanzmenge im Versuchsaufbau berechnet. Für die Versuche, bei denen die Substanz in das Medium eingearbeitet wurde, wurde die entsprechende Konzentration pro Platte berechnet.

Tabelle 9: Übersicht Plattenversuche

^a Es wurde eine Versuchsfläche von 6.4×10^{-7} ha für die Berechnung zugrunde gelegt. Bei der absoluten Wirkstoffmenge der eingesetzten Wirkstoffe entsprechend einer 100% Applikationsmenge (AM) bezogen auf das Testsystem, wurde die Fläche des Systems berücksichtigt.

Arbeiten durchgeführt von ^b Hillebrecht [Hillebrecht 2011], ^c Melichar [Melichar 2012] ^d Griefahn [Griefahn 2013]

Applikationsart a: Auf das Medium und i: In das Medium eingearbeitet

<i>Wirkstoff/ Formulierung</i>	<i>Konzentration in g l⁻¹</i>	<i>P. arhizus C. geophilum H. crustuliniforme Lyophyllum sp.</i>	<i>Aufwandmenge in l ha⁻¹</i>	<i>Applikationsmenge in g ha⁻¹</i>	<i>Volumen pro Test-gefäß in ml</i>	<i>absolute Wirkstoffmenge pro Fläche^c bei 100% AM in µg</i>	<i>Konzentration in mg l</i>	<i>Konzentration pro Platte bei 100%AM in ng/g</i>	<i>Applikationsmengen in %</i>	<i>Verdünnungsstufen Applikationsart</i>
Boscalid	200	x x	0.6	120		78.00	390.00	3800	0.1-200	5 a
Tebuconazol	200	x x	1.5	300		195.00	975.00	10830	0.1-200	5 a
Azoxystrobin	250	x x	1,0	250		162.00	810.00	9000	0.1-200	5 a
Quinoxifen	250	x x	0.6	150		97.50	487.50	4875	0.1-200	5 a
Orius[®]	200	x x x x	1.5	300	18	195.00	10.83	10833	0.1-200	5 i
Tebuconazol	200	x x x x	1.5	300	18	195.00	10.83	10833	0.1-200	5 i
Boscalid^b	200	x x	0.6	120	20	76.00	3.80	3800	0.1 – 25	6 i
Quinoxifen^b	250	x x	0.6	150	20	97.50	4.88	4875	0.2 -80	6 i
Collis^{®c}	200	x	0.6	120	20	76.00	3.80	3800	0,001- 214	9 i
Basta^{®c}	200	x	7.5	1500	20	954.00	47,70	47700	0,01-214	9 i
Orius^{®d}	200	x x	1.5	300	15	199.00	13,27	13267	0,000025- 100	8 i

Versuchsdurchführung

- 1) Isolate der einzusetzenden ECMs wurden auf BAF Medium vorkultiviert.
- 2) Das Medium wurde entsprechend der Vorschrift angesetzt und autoklaviert.
- 3) Die Fungizidlösungen wurden angesetzt und entweder auf das Medium mit einem Drigalki Spatel ausplattiert oder in das Nährmedium nach dem Autoklavieren eingearbeitet. Das definierte Volumen des Nährmediums (15-20 ml, je nach Versuchsdesign) wurde mit einer Dispensette® in sterile Petrischalen gefüllt.
- 4) Isolate wurden aus den vorkultivierten ECM-Platten ausgestochen (Korkbohrer 0,55 cm²) und auf das behandelte Medium ausgebracht.
- 5) Für 28 Tage wurden die Platten im Dunkeln bei definierter Temperatur inkubiert.
- 6) Während der Versuchszeit wurden wöchentliche Auswertungen der Flächen über digitale Verfahren mittels Analysesoftware (FotoFix, ImageJ) vorgenommen.
- 7) Für einige Experimente wurden Isolate ohne Wachstum nach der Versuchsdauer auf unbehandelte Platten überimpft um zu untersuchen, ob es sich um reversible Schäden am Myzel handelt.

Auswertung

Das Myzelwachstum wurde durch die flächenmäßige Ausdehnung des Myzels auf dem Kulturmedium durch digitale Verfahren mittels Analysesoftware (FotoFix, ImageJ) erfasst. Bei dieser Variante konnten auch inhomogen gewachsene Myzelflächen exakt bestimmt werden. Der Verfahrensfehler, welcher durch die Verwendung eines Korkbohrers und der digitalen Auswertung der Myzelflächen entstand, betrug < 16% (Daten nicht gezeigt).

Die jeweiligen Isolate der entsprechenden Dosen wurden auf die zugehörige Lösungsmittelkontrolle normiert.

Alle Versuche wurden statistisch mittels One-Way Analysis of Variance (Anova) analysiert. Hierbei wurde die Holm-Sidak Methode ($P \leq 0,001$, $\alpha=0,05$) angewandt (vgl. Kap. 4.4.1).

Durch die Beschränkung der Auswertung des zweidimensionalen Flächenwachstums wurden Proben, wie unter Abbildung 21 dargestellt, nicht für eine Auswertung verwendet. Das gezeigte Isolat wies ein dreidimensionales Wachstumsverhalten auf. Vermutlich wuchs das Myzel zunächst auf dem Ursprungsnährmedium (welches in kleinen Teilen mitüberimpft wurde) und breitete sich erst danach flächenmäßig aus. Dieses Verhalten wurde nur bei *Pisolithus arhizus* für hohe Tebuconazol Verdünnungsstufen im Versuch mit Glasfaserfilter (vgl. 54) beobachtet. Für die

Auswertung wurden in dieser Arbeit nur zweidimensional gewachsene Isolate verwendet.

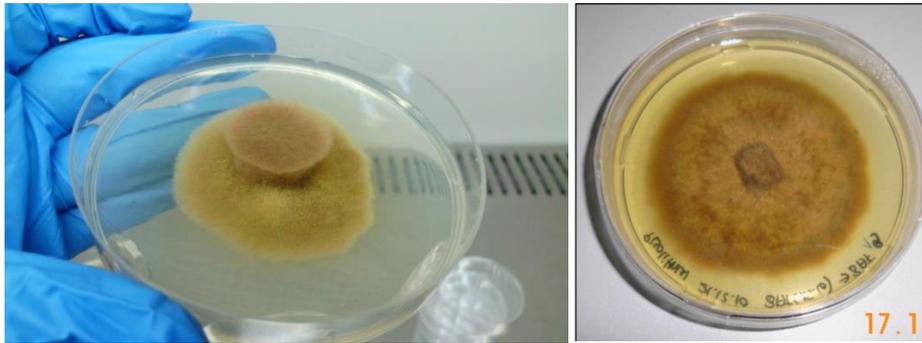


Abbildung 21: Anormales Wachstum von *Pisolithus arhizus* (links) im Vergleich zu normalem Wachstum (rechts).

Ebenfalls ergab sich bei *Cenococcum geophilum* ein inhomogenes, sehr fedriges Myzelwachstum, wenn gleichzeitig eine plan-konkave Verformung der verschlossenen Petrischale auftrat. Mögliche Ursachen für diesen Unterdruck in den Platten sind unbekannt, deshalb wurden betroffene Platten von der Auswertung ausgeschlossen. Die so ausgeschlossene Probenanzahl lag unter 25% pro Versuch.

Anpassung der Plattenversuche zur Bestimmung der Konzentrations-Wirkungskurven

Für die Versuche zur Bestimmung der Konzentration-Wirkungskurven wurden aufgrund der Beobachtungen bei der Auswertung als Methodenoptimierung mit Myzelplugs aus dem Randbereich des Stammisolates gearbeitet, die Anzahl der Replikate erhöht und die Substanzen grundsätzlich in das Nährmedium eingearbeitet. Darüber hinaus wurden nur Platten in die Auswertung einbezogen, welche in den nachfolgenden 7 Tag nach der Messung keine Auffälligkeiten im Wachstumsverhalten oder in der Myzelstruktur aufwiesen. Für die Formulierungen Collis® und Basta® wurden Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für *Pisolithus arhizus* aufgenommen und für Orius® sowohl für *Pisolithus arhizus* und *Cenococcum geophilum*.

Anpassung der Methode für die Bestimmung der Aufnahme von Tebuconazol in das Myzel von *Pisolithus arhizus*

Die Plattenmethode wurde dahingehend modifiziert, dass eine Entnahme des Myzels von dem Nährmedium möglich wurde. Dazu wurde das Isolat nicht direkt auf das Nährmedium aufgelegt, sondern auf einem Glasfaserfilter (Millipore weiß HA Porengröße: 0,45µm) kultiviert. Das Nährmedium wurde mit der tebuconazolhaltigen Formulierung Orius® in den Konzentrationsstufen 0,00025% bis 100% AM exponiert (vgl. Tabelle 10). Anschließend wurde ein sterilisierter Glasfaserfilter aufgelegt und mit

einem Myzelstück beimpft. Über einen definierten Zeitraum wurde das Myzelwachstum dokumentiert. Nach Versuchsablauf (34 Tage) wurde der Glasfaserfilter mit dem Myzel entnommen und in einer neuen Petrischale (Sarstedt) bei $T = -18^{\circ}\text{C}$ bis zur Analyse tiefgefroren gelagert.

Tabelle 10: Aufnahme von Tebuconazol in das Myzel von *Pisolithus arhizus* durch die Exposition mit Orius[®] mittels behandelten Nährmediums

^a Es wurde eine Versuchsfläche von 6.4×10^{-7} ha zur Berechnung angenommen.

Wirkstoff/Formulierung	Tebuconazol/Orius [®]
Konzentration in g l^{-1}	200
ECM	<i>Pisolithus arhizus</i>
Aufwandmenge in l ha^{-1}	0,6
Applikationsmenge in g ha^{-1}	120
Volumen pro Testgefäß in ml	15
absolute Wirkstoffmenge pro Fläche ^a bei 100% AM in μg	78
Applikationsmengen in %	0,00025-100
Verdünnungsstufen	10
Replikate pro Verdünnungsstufe	6
Nullkontrollen	3-6
Lösungsmittelkontrollen	6

Ebenfalls wurden Nullkontrollen ohne Zugabe von Formulierungen oder Lösungsmitteln angesetzt sowie Lösungsmittelkontrollen (Acetonitril) zu den Pestizidkonzentrationen. Die Angaben zur Extraktion des Wirkstoffes und zur analytischen Methode sind unter 4.3.5.2.8 nachzulesen.

4.3 Expositionsversuche und Konzentrationsbestimmung von Pestiziden in den Kompartimenten Boden, Wurzelnahe Boden und Wurzeln

Zur Risikobewertung werden die in den Kompartimenten messbaren Gehalte der applizierten Fungizide (MEC) ermittelt. Dazu wurden Expositionsversuche als Gewächshausversuche in Braunschweig am Julius Kühn Institut im Frühjahr 2012 durchgeführt.

4.3.1 Aufzucht und Inokulation der Buchenjungpflanzen

Aus dem referenzierten Saatgut wurden in Lüneburg im Labor Buchenjungpflanzen in autoklavierter Perlite[®] zunächst in Keimschalen vorgezogen. Nachdem die Pflanzen ein Zweiblattstadium erreicht hatten, wurden diese in Lüneburg in Tonsubstrat (Klasmann-Dielmann GmbH, zweimal autoklaviert) umgetopft. In das Substrat wurde vorher entweder mit *Cenococcum geophilum* oder mit *Pisolithus arhizus* substratgebundenes Inokulum eingearbeitet (vgl. Kap. 4.1.1, S.37).

Aufgrund der sehr abweichenden Konzentrationen von Ergosterol der analysierten ECM auf nicht exponiertem Myzel (Daten zur Ergosterolkonzentration sind im Anhang unter 9.3 S.149 dargestellt) wurde im Gewächshausversuch pro Treatment nur eine Spezies pro Topf zur Inokulation verwendet.

Für *Cenococcum geophilum* wurde im Verhältnis 10:1 Inokulum (m = 1,18 kg) mit dem Tonsubstrat (m = 11,21 kg) vermengt, während für *Pisolithus arhizus* ein Verhältnis von 12:1 Substrat (m = 11,02 kg) zu Inokulum (m = 943,3 g) eingearbeitet wurde. Nach dem Zugeben des Inokulums wurde das Substrat 10 Minuten vorsichtig homogenisiert. Die Buchensetzlinge wurden einzeln in die Multitopfpaletten gepflanzt. Es wurden etwa 40 g Substrat pro Pflanze eingesetzt und mit 5 ml Leitungswasser bewässert und unter einer Lichtperiode (OSRAM, L 58W/640: Cool white) von 10 h Tag zu 14 h Nacht kultiviert bei $T = 20 \pm 3$ °C. Die Temperatur und die rel. Luftfeuchte wurden mittels Datenlogger aufgezeichnet und kontrolliert.

Nach zwei Tagen erfolgte eine zusätzliche Inokulation mit Flüssig-Inokulum. Dazu wurden die gewachsenen Isolate aus dem BAF-Flüssigmedium entnommen und mit autoklaviertem Leitungswasser dreimal gewaschen. Nach Abtrocknen und Entfernen des Waschwassers wurden 103,36 g *Pisolithus arhizus* in 500 ml Leitungswasser (autoklaviert) überführt und mit einem Stabmixer (Ultra Turrax) auf Stufe 1 homogenisiert. Entsprechend wurden 52,58 g *C. geophilum* in 500 ml sterilem Leitungswasser homogenisiert.

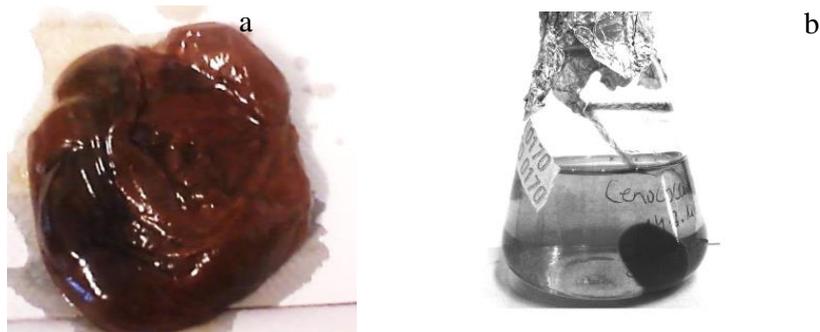


Abbildung 22: *Pisolithus arhizus* aus dem Medium entnommen (a) und *Cenococcum geophilum* in Flüssigkultur (b)

Von den enthaltenden Suspensionen wurden entsprechend des Treatmentplans jeweils 2 ml mit der Kolbenhubpipette auf die Buchenjungepflanzen 1 cm vom Stamm entfernt zugegeben.

4.3.2 Kultivierung der Buchenjungepflanzen im Gewächshaus

Anschließend wurden die Buchenjungepflanzen nach Braunschweig in das Gewächshaus transportiert und dort unter natürlichen Lichtbedingungen in einer Kammer aufgestellt. Die Nachttemperatur wurde auf $T = 15^{\circ}\text{C}$ und die Tagtemperatur auf $T = 20^{\circ}\text{C}$ geregelt. Eine aktive Kühlung der Gewächshauskammer erfolgte nicht, jedoch wurde bei Überschreiten der Temperatur die Dachlüftung geöffnet. Die Bewässerung erfolgte nach Bedarf durch manuelle Wässerung. Hierbei wurde darauf geachtet, dass ein Überwässern der Pflanzen über die Feldkapazität hinaus vermieden wurde. Über den Probenahmezeitraum betrug die Temperatur $T = 23 \pm 4^{\circ}\text{C}$ bei einer rel. Luftfeuchte von $60 \pm 12\%$. Die Temperatur wurde mittels Datenlogger kontrolliert.



Abbildung 23: Gewächshauszelle in Braunschweig

4.3.3 Exposition

Die Exposition wurde durch eine simulierte Gießapplikation der Formulierungen vorgenommen. Dazu wurden 1,5 ml/Topf der vorbereiteten Expositionslösung mittels Kolbenhubpipette in Stammnähe (ca. 1 cm Entfernung zum Stamm) dosiert.

Es wurde Collis[®] (Boscalid $c = 200 \text{ g l}^{-1}$ und Kresoxim-Methyl $c = 100 \text{ g l}^{-1}$) und Orius[®] (Tebuconazol $c = 200 \text{ g l}^{-1}$) in zwei Applikationsniveaus (100% AM und 10% AM) verwendet. Es wurde mit einer Applikationsmenge von 300 g ha^{-1} für Orius[®] und 120 g ha^{-1} für Boscalid in der Formulierung Collis[®] gearbeitet. Diese Applikationsmenge entspricht 100 % der vom Hersteller empfohlen Aufwandmenge pro ha.

Die Lösungen wurden in 500 ml deionisiertem Wasser hergestellt. Dazu wurde das in Tabelle 11 dargestellte Volumen der Formulierungen dem Wasser hinzugefügt. Die nominellen Konzentrationen berücksichtigen nicht die Verdünnung durch das Volumen der zugesetzten Formulierung. Der Fehler durch das Zusetzen der Formulierung betrug maximal 0,01 % und wird bei den weiteren Berechnungen vernachlässigt. Eine analytische Bestimmung der applizierten Konzentration zum Expositionszeitpunkt erfolgte nicht⁴.

Tabelle 11: Übersicht über die Applikation

Nominelle Konzentrationen auf 500 ml Wasser

		<i>AM</i>	<i>Absolute Wirkmenge pro Topfoberfläche in μg</i>	<i>Wirkstoff- konzentration in g/l</i>	<i>Konz in Fungizid- lösung in mg l^{-1}</i>	<i>Benötigtes Volumen Formulier- ung in μl</i>
Orius[®]	Tebuconazol	100 %	75	200	50	125
	Tebuconazol	10 %	7,5	200	5	12,5
Collis[®]	Boscalid/	100 %	30/	200/	20/	50
	Kresoxim Methyl		15	100	10	
	Boscalid/	10 %	3/	200/	2/	5
Kresoxim Methyl	1,5		100	1		

⁴ Aufgrund späterer Ergebnisse wurde eine analytische Bestimmung der Lösungen nach etwa 12 Monaten durchgeführt. Die Lösungen waren in der Zwischenzeit dunkel und bei Raumtemperatur gelagert.

Übersicht über die Treatments

Es wurden Kontrollen mit und ohne Exposition der zu untersuchenden Fungizide vangesetzt. Die Kontrollen ohne Exposition wurden gemessen, um zu zeigen, dass ein Eintrag in das System ausgeschlossen werden konnte und das System keine Hintergrundkonzentrationen der Wirkstoffe enthielt. Ergänzend wurden noch Kontrollproben mit Exposition, entsprechend den unterschiedlichen Konzentrationsniveaus von 100% AM und 10% AM, untersucht, um die Gehalte der Substanzen in den Kompartimenten ohne Phytobionten zu bestimmen.

Kontrollen ohne Exposition: Es wurden verschiedene Kontrollen zu den Treatments beprobt (vgl. Tabelle 12).

- *Pisolithus* blank: Buchenjungpflanze mit *Pisolithus arhizus* inokuliert, ohne Exposition
- *Cenococcum* blank: Buchenjungpflanze, inokuliert mit *Cenococcum geophilum* und ohne Exposition
- Buchen blank: Buchenjungpflanze, ohne Inokulation und ohne Exposition
- Boden blank: unbehandelter Boden⁵

Kontrollen mit Exposition: Neben den Kontrollen zu den Expositionsexperimenten (Kontrollen 3-6, Tabelle 12) wurden unterschiedliche Applikationsmengen der jeweiligen Formulierung auf Substrat, jedoch ohne Phytobiont aufgebracht. Es sollte gezeigt werden, dass keine Quer-Kontaminationen zwischen den Treatments mit Collis[®] und Orius[®] vorlagen.

⁵ Der Begriff Boden wird in dieser Arbeit als Oberbegriff und Synonym für die verwendeten Substrate definiert.

Tabelle 12: Probenahmeplan der Treatments nach Zeitpunkt T=14 Tage

	<i>Buche</i>	<i>Substrat</i>	<i>Orius</i> [®]	<i>Collis</i> [®]	<i>P. arhizus</i>	<i>C. geophilum</i>	<i>Ergosterol</i>	<i>Fungizide</i>	N
1.Treatment	x	x	100 %		x		✓	✓	10
2.Treatment	x	x	10 %		x		✓	✓	10
3.Treatment	x	x	100 %			x	✓	✓	10
4.Treatment	x	x	10 %			x	✓	✓	10
5.Treatment	x	x		100 %	x		✓	✓	10
6.Treatment	x	x		10 %	x		✓	✓	10
7.Treatment	x	x		100 %		x	✓	✓	10
8.Treatment	x	x		10 %		x	✓	✓	10
Kontrolle 1	x	x			x		✓	✓	10
Kontrolle 2	x	x				x	✓	✓	10
Kontrolle 3		x	100 %					✓	3
Kontrolle 4		x		100 %				✓	3
Kontrolle 5		x	10 %					✓	3
Kontrolle 6		x		10 %				✓	3
Kontrolle 7	x	x					✓	✓	3
Kontrolle 8		x						✓	3

4.3.4 Probenahme

Es wurde eine Probenahme nach 2 Tagen mit dem Ziel durchgeführt, die Ausgangskonzentrationen in den Bodenproben (Tonsubstrat) zu bestimmen. Daher wurden nicht alle Treatments beprobt und analysiert.

Für einen zweiten Zeitpunkt nach 14 Tagen wurden pro Treatment 10 Pflanzen randomisiert zum Ernten ausgewählt. Die Pflanzen wurden dazu vorsichtig aus der Multitopfpalette entnommen und in oberirdischen Spross und unterirdischen Wurzelbereich aufgetrennt. Dazu wurde mit einer Schere der Spross unmittelbar über dem Substrat abgeschnitten. Die Wurzel wurde vorsichtig mit dem anhaftenden Substrat aus dem Topf entnommen und in eine Aluminiumschale überführt. Anschließend wurde das restliche Substrat möglichst vollständig aus dem Topf entnommen. Die Schalen wurden verschlossen, beschriftet und, innerhalb von 2 h nach Lüneburg transportiert und bei T = -18°C bis zur Aufbereitung gelagert.

Die Probenahme erfolgte 14 Tage nach Exposition, da dieser Zeitpunkt mit den Konzentrations-Wirkungsbeziehungen im *in vitro* Laborversuch korrespondierte. Im Anhang (vgl. S. 163) ist der Plan für die Behandlungen in den Gewächshausversuchen dargestellt.

4.3.5 Quantifizierung der physikalischen und biometrischen Pflanzenparameter und Bestimmung der Pestizidkonzentrationen in den Kompartimenten

In den Topfversuchen aus Braunschweig wurden die Konzentrationen der eingesetzten Wirkstoffe in den Kompartimenten Wurzel, Wurzelnahe Boden und Boden mittels LC - MSMS bestimmt. Ergänzende biometrische Pflanzenparameter wie Sprosswachstum und Sprossbiomasse wurden erfasst und im Wurzelkompartiment die Ergosterolkonzentrationen analysiert.

4.3.5.1 Physikalische und biometrische Pflanzenparameter

Biomarker Ergosterol

Im Rahmen der Gewächshausversuche wurde der Biomarker Ergosterol, in Anlehnung an Kap. 4.2.1.1, in den Wurzelproben extrahiert und analysiert. In Abbildung 24 ist eine hohe Matrixbelastung der Wurzelproben zu erkennen. Ein minimaler Peak konnte bei $RT = 3,831$ min könnte aufgrund der Spektrumanalyse (Abbildung 51; Anhang S. 154) möglicherweise als Ergosterol identifiziert werden. Jedoch war die Peakfläche deutlich unterhalb der Bestimmungsgrenzen. Eine Erhöhung des Injektionsvolumens führte zu keiner ausreichenden Steigerung des Ergosterol-Signales sondern nur zu einer zusätzlichen Matrixbelastung des Messsystems.

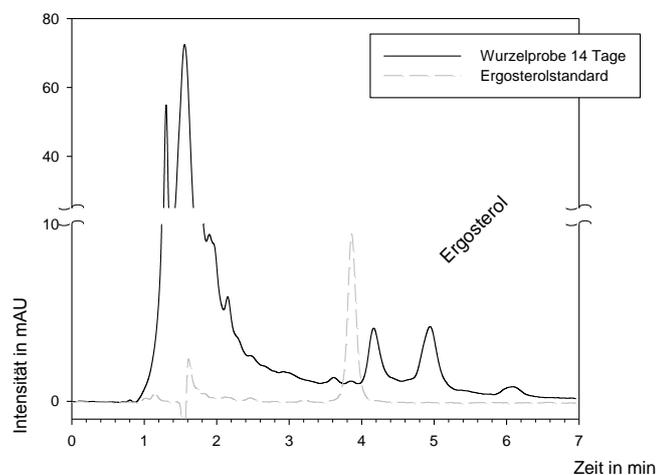


Abbildung 24: Vergleich Ergosterolstandard und Wurzelprobe

Konzentration des Standard $c = 0,28 \text{ mg l}^{-1}$. Die Peaks um 1,5 Minuten sind polare Bestandteile der Wurzelmatrix und die Peaks in der Wurzelprobe ab einer Retentionszeit von 4 Minuten konnten nicht identifiziert werden.

Trockenmassebestimmung

Es wurde die Trockenmasse des im Gewächshausversuch eingesetzten Substrats bestimmt um die Feldkapazität zu berechnen. Zur Bestimmung des Frischgewichtes, des Nassgewichtes und der Feldkapazität wurden vier Stechzylinder mit Substrat gefüllt und gewogen. Anschließend wurden die Zylinder für 24 Stunden gewässert und danach gewogen. Dieses Gewicht entsprach per Definition dem Nassgewicht. Zur Bestimmung der Trockenmasse wurde bei $T = 105^{\circ}\text{C}$ im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Proben wurden vor dem Wiegen im Exsikkator auf Raumtemperatur ($T = 20^{\circ}\text{C}$) abgekühlt.

Pflanzenparameter

Das Wurzelwachstum und Sprosswachstum wurde bei den Gewächshausversuchen über eine metrische Messskala (Messgenauigkeit: 0.1 cm) bestimmt. Dazu wurde jeweils der längste Spross beziehungsweise Wurzelspross nach Streckung ausgemessen. Analog dazu wurden die Wurzel- und Sprossgewichte gewogen. Die Blätteranzahl wurde visuell bestimmt.

4.3.5.2 Bestimmung der Pestizidkonzentrationen in den Kompartimenten

Die Bestimmung der Konzentrationen der untersuchten Pestizide in den Matrices Boden, Wurzelnahe Boden und Wurzeln wurde mittels LC- MSMS durchgeführt.

4.3.5.2.1 Geräteparameter

Flüssigchromatograph: Agilent 1200 Infinity LC-System

Massenspektrometer: Agilent 6430 Triple Quad

Trennsäule: Eclipse XDB-C8, Agilent 100 mm x 2,1 mm 3,5 micron
Partikelgröße

Vorsäule: XDB-C8, Agilent 12.5mm x 2.1 mm 5 micron Partikelgröße

Säulenofentemperatur: 40 °C

Injektionsvolumen: 5 µl

Eluent: Eluent A: Acetonitril (VWR, Hypersolv
Chromanorm)

Eluent B: Ammoniumacetat 1mM in Wasser (pH6,9)

Gradient: 50 % B → 10 % B in 0,5 min, 10% B für 0.1 min, 10% B
→ 50 % B in 4.4 min

Fenster : 0 bis 2 min (to waste)-ab 2 min (to MS)- ab 5 min (to
waste)

Ionisierung: electrospray ionization (positiv)

Kollisionsgas: Stickstoff 5.0 (Air Products)

Trocknungsgas: Stickstoff (aus N₂-Generator)

Gastemperatur: 325 °C

Gasfluss: 8 l min⁻¹

Nebulizer: 50 psi

4.3.5.2.2 Massenübergänge und Messparameter

Alle Verbindungen wurden vollständig getrennt bzw. konnten über verschiedene Massenübergänge quantifiziert werden. Zunächst wurde durch die Wahl einer geeigneten Säule für alle Substanzen versucht, eine vollständige chromatographische Trennung zu erzielen. In Tabelle 13 sind die getesteten Säulen aufgelistet. Im Expositionsversuch wurde aufgrund der Trennleistung und Performance die Eclipse XDB C8 mit Vorsäule eingesetzt.

Tabelle 13: Getestete LC-MSMS Säulen

<i>Säulenbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Partikelgröße</i>	<i>Abmessungen</i>
Nucleodur C18 ISIS	Macherey- Nagel	1.8 µm	100mm x 2,0 mm
Nucleodur Sphinx	Macherey- Nagel	1.8 µm	100mm x 2,0 mm
Eclipse XDB- C8	Agilent	3,5 µm	200mm x 2,1mm
Zorbax SB C18	Agilent	1,8 µm	50mm x 2,1mm

Die verwendeten Massenübergänge der Substanzen sind in Tabelle 14 dargestellt. Es wurden zwei Übergänge gemessen und ebenfalls das Verhältnis der Peakflächen zueinander bestimmt. Der Massenübergang mit dem höheren Signal/Rausch - Verhältnis wurde als Quantifier bei der Analytik verwendet, während der andere Massenübergang als Qualifier ausgewertet wurde.

Tabelle 14: Massenübergänge der analysierten Substanzen mittels LC - MSMS

Fett unterlegt ist der als Quantifier verwendete Massenübergang der Substanz.

Prec. Ion. kennzeichnet das protonierte Vorläufer-Ion.

Prod. Ion kennzeichnet die entsprechenden Produkt-Ionen der Substanz

<i>Substanz</i>	<i>Prec. Ion</i>	<i>Prod. Ion</i>	<i>Prod. Ion</i>	<i>Dwell</i>	<i>Frag (V)</i>	<i>Ce(V)</i>
Boscalid	343,1	307,0	140,0	100	140	14
Tebuconazol D6	314,2	125,2	72,2	100	120	46
Kresoxim-Methyl	314,1	206,1	115,9	100	120	13
Tebuconazol	308,2	124,9	70,9	100	120	46

Aufgrund der vorliegenden Matrices von Boden- und Pflanzenmaterialproben wurden zunächst Messungen im SCAN-Modus durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob und im welchem Ausmaß co-eluierende Matrixbestandteile bei den gewählten Messbedingungen die Messungen beeinflussen. Dazu sollte zunächst bestimmt werden, in welchen Zeitbereichen hohe Co-Elutionen zu erwarten sind.

Hierzu wurde im SCAN - Modus im Massenbereich von 50 bis 1000 m/z ein Chromatogramm aufgezeichnet. Wurzelextrakte der Methanol-Extraktion wurden mit zwei Wurzelextrakten der Extraktion mittels Acetonitril verglichen. In Abbildung 25 wird dargestellt, dass sowohl durch die Extraktion mit Acetonitril wie auch die Extraktion mit Methanol Matrixbestandteile extrahieren. Für die Extraktion mit Methanol fällt auf, dass vor allem im Bereich um eine Minute mehr Matrixbestandteile

aus den Wurzeln extrahiert werden. Aufgrund der frühen Retentionszeit wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei vor allem um sehr polare Wurzelbestandteile handelt.

Da die Analyten zunächst auf der Säule retardiert werden und erst um 2 Minuten detektiert werden, wurde die Methode dahingehend angepasst, dass diese polaren Matrixbestandteile nicht in das Massenspektrometer injiziert werden. Aufgrund von säulenabhängigen Anpassungen und Gerätemodifikationen im Dämpfer der LC wurde bei den Vorversuchen zunächst das Fenster bei 1,6 Minuten angesetzt und bei den Messungen der Realproben auf 2,0 Minuten verschoben. Ebenfalls wurde bei den Vorversuchen nach 3,3 Minuten ein neues Fenster gesetzt. Danach wurde die Probe verworfen. Auch hier musste das Fenster aufgrund der Verschiebung der Retentionszeiten im Zuge der Geräteanpassung auf 5 Minuten verschoben werden.

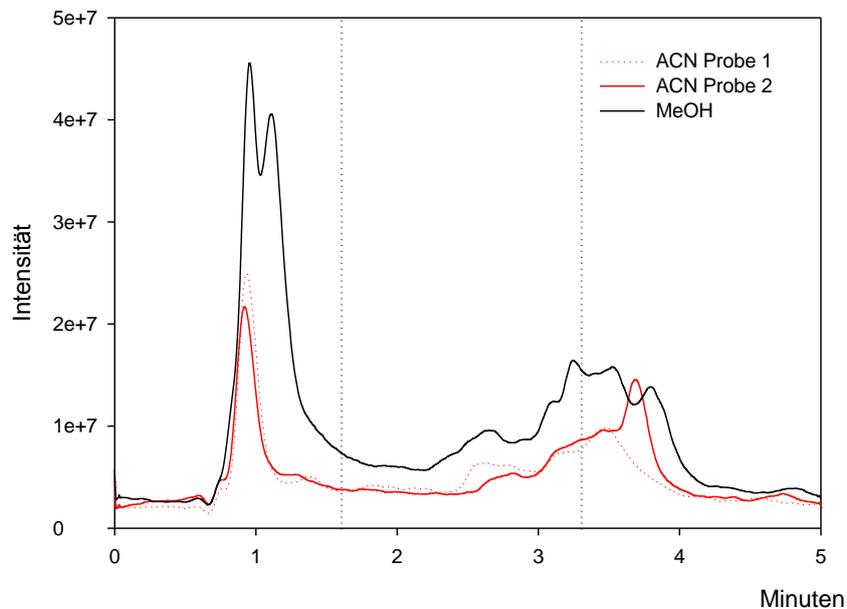


Abbildung 25: Vergleich der Extraktionsmittel Methanol und Acetonitril

Wurzelproben ohne Exposition wurde mit Methanol bzw. Acetonitril extrahiert und im SCAN-Modus mittels LC-MSMS gemessen. Die senkrechten Linien geben die Fenster im MRM-Modus an. Nur der mittlere Messzeitraum wurde im MRM-Modus über das MSMS detektiert.

Für Abbildung 26 ist neben der SCAN Messung eines Methanolextrakts aus Wurzeln auch eine aufgestockte Wurzelprobe gemessen worden. Es wurde mit Tebuconazol ($c = 25 \mu\text{g l}^{-1}$), Boscalid ($c = 10 \mu\text{g l}^{-1}$) und Kresoxim-Methyl ($c = 5 \mu\text{g l}^{-1}$) aufgestockt. Es wird deutlich, dass aufgrund des MRM Messmodi das Signal der Analyten mit ausreichend hoher Empfindlichkeit gemessen werden konnte. Die fehlende Spur bis 1,6 min und ab 3,3 min ist aufgrund des Schneidens im Chromatogramm (in diesem Zeitbereichen wurde zur Geräteschonung die Messlösungen (vgl. Abbildung 25) nicht in das Massenspektrometer geführt) zu erklären. Auch wenn bei dem dargestellten TIC aus

Abbildung 26 nur zwei von drei Substanzen getrennt erscheinen, konnte doch über die Massenübergänge auch der frühere Peak um 2 min aufgetrennt werden. In Abbildung 27 sind die Massenspuren (Quantifierer) der Substanzen Tebuconazol, Boscalid und Kresoxim-Methyl dargestellt. Die erkennbaren, unterschiedlichen Intensitäten sind begründet in den unterschiedlichen Konzentrationen der Substanzen in der Standardlösung. Der gemischte Standard wurde im Verhältnis der Applikationsmengen zueinander entsprechend angesetzt (vgl. Kap. 4.3.5.2.3; S. 68).

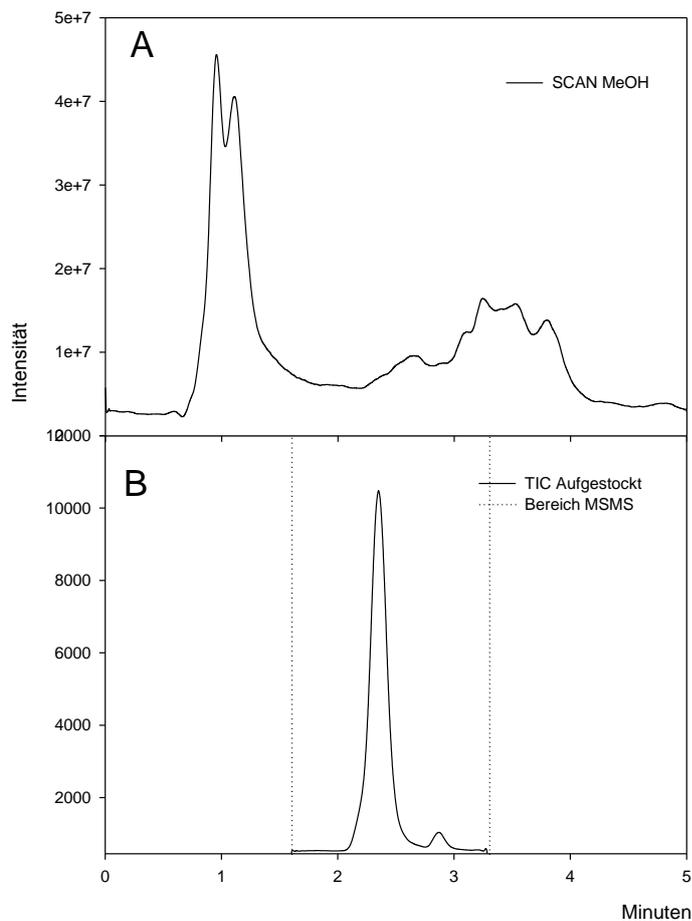


Abbildung 26: Vergleich einer SCAN und TIC Messung einer aufgestockten Wurzelprobe.

Die Probe wurde mit Methanol extrahiert und mit Tebuconazol ($c = 25 \mu\text{g l}^{-1}$), Boscalid ($c = 10 \mu\text{g l}^{-1}$) und Kresoxim-Methyl ($c = 5 \mu\text{g l}^{-1}$) aufgestockt.

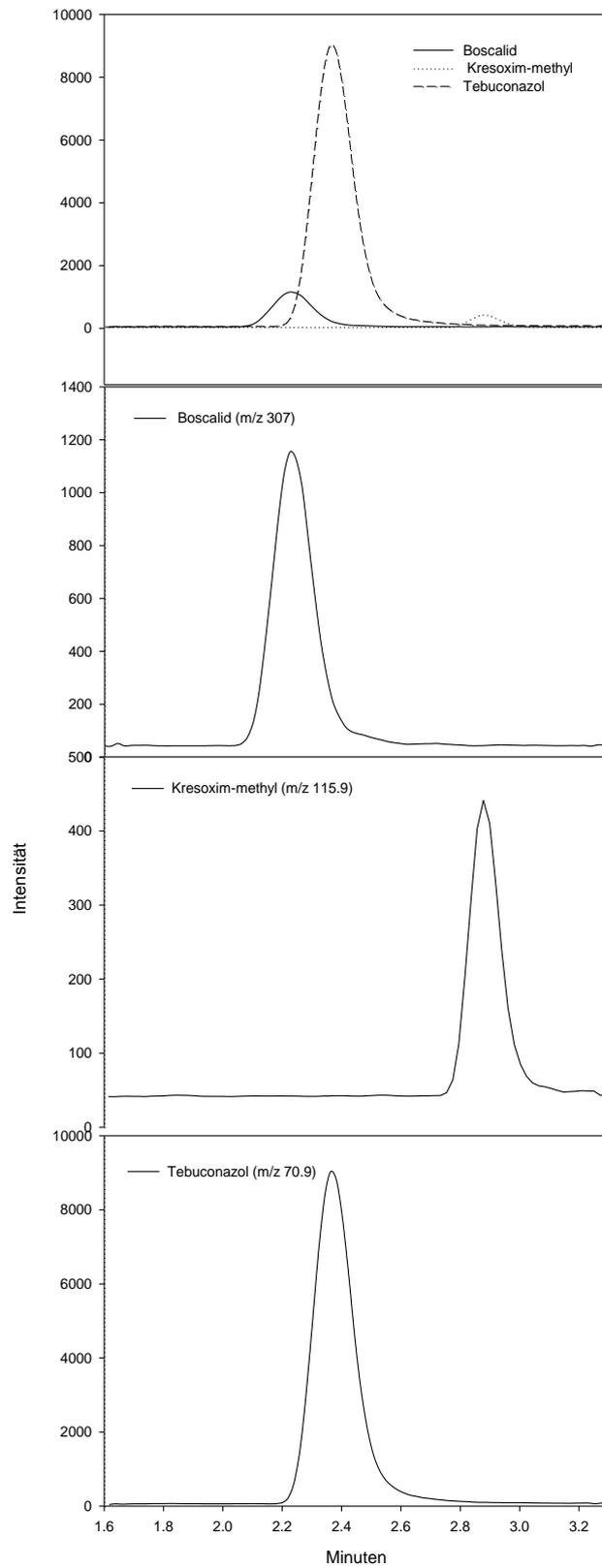


Abbildung 27: Massenspuren einer aufgestockten Methanol-Wurzelmatrix

Die Methanol-Wurzelmatrix wurde mit Tebuconazol ($c = 25 \mu\text{g l}^{-1}$), Boscalid ($c = 10 \mu\text{g l}^{-1}$) und Kresoxim-Methyl ($c = 5 \mu\text{g l}^{-1}$) aufgestockt

Die Retentionszeiten der Substanzen bei den unter Kap. 4.3.5.2.1 beschriebenen Messparametern liegen für Boscalid bei 2.742 min; für Tebuconazol bei 2.904 min und für Kresoxim Methyl bei 3.927 min. Der Interne Standard Tebuconazol D6 retardierte entsprechend der undeuterten Substanz.

Die hier beschriebenen Messoptimierungen wurden im Rahmen der Methodenentwicklung erprobt und alle weiteren Pestizidmessungen wurden unter diesen Messparametern durchgeführt.

4.3.5.2.3 Referenzstandards, Interner Standard und Kalibrationslösungen

In den Versuchen mit Pestizidwirkstoffen wurden folgende Standards angesetzt.

STAD: Von den Pestizidwirkstoffen Tebuconazol, Boscalid und Kresoxim-Methyl wurden jeweils separate Stammlösungen der Konzentration $c = 1 \text{ g l}^{-1}$ in Braunglasvials angesetzt. In Braunglasvials wurden 5-10 mg der Reinsubstanzen eingewogen (Mettler Toledo 261 Delta Range) und mittels Gewichtsbestimmung mit Acetonitril ($T = 20^\circ\text{C}$) aufgefüllt.

GSTD3: Aus den Substanzen Tebuconazol, Boscalid und Kresoxim-Methyl wurde aus den Stammlösungen STAD ein gemischter Standard der Konzentration $c = 10 \text{ mg l}^{-1}$ hergestellt. Hierzu wurde jeweils 50 μl der STAD Lösungen auf 5000 μl Acetonitril aufgefüllt. Aus diesem Mix wurden die Verdünnungen für die Kalibrationen mit Acetonitril oder Methanol hergestellt.

GSTD4: Der gemischte Standard wurde aus den Stammlösungen STAD hergestellt. Die Konzentrationen betragen: Tebuconazol $c = 150 \text{ mg l}^{-1}$; Boscalid $c = 60 \text{ mg l}^{-1}$; Kresoxim-Methyl $c = 30 \text{ mg l}^{-1}$ und Bifenazate⁶ $c = 48 \text{ mg l}^{-1}$. Aus diesem Mix wurden die Verdünnungen für die Matrix-Kalibrationen hergestellt. Die unterschiedlichen Konzentrationen entsprechen den Verhältnissen der Wirkstoffmengen in den eingesetzten Formulierungen.

IS-LC-MSMS: Die Stammlösung Tebuconazol D6 wurde aus dem Referenzstandard ($c = 100 \text{ mg l}^{-1}$) in einer Konzentration von $c = 1 \text{ mg l}^{-1}$ hergestellt. Für die Messungen wurden Zwischenverdünnungen der Konzentration $c = 100 \mu\text{g l}^{-1}$ in Acetonitril für die Kalibrationen mit reinen Lösungsmitteln bzw. mit einer

⁶ Die analytische Bestimmung von Bifenazate ist nicht Bestandteil dieser Arbeit, wohl aber wurde die Substanz in den Standard mit eingewogen.

Konzentration von $c = 250 \mu\text{g l}^{-1}$ in Acetonitril für die Expositionsproben (Gewächshausproben) und Matrix-Kalibrationen hergestellt.

4.3.5.2.4 Kalibration, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Aus dem gemischten Standard GSTD3 wurden Kalibrationslösungen für die Bodenmatrix in Acetonitril oder für die Wurzelmatrix in Methanol angesetzt. Aus dem GSTD4 wurden die Kalibrationslösungen für die Matrix - Kalibrationen Boden und Wurzeln hergestellt.

Lösungsmittelkalibration für Boden- und Wurzelproben

Aus der Stammlösung GSTD3 wurden 10 Verdünnungsstufen angesetzt.

In Tabelle 15 sind die Konzentrationsbereiche für die einzelnen Wirkstoffe dargestellt. Es wurde so zum Beispiel für Tebuconazol in einem Konzentrationsbereich von $0,47 \mu\text{g l}^{-1}$ bis $243 \mu\text{g l}^{-1}$ gearbeitet. Die Konzentrationslevels wurden durch eine 1:2 Verdünnung angesetzt. Für die Messlösungen wurden $150 \mu\text{l}$ der jeweiligen Verdünnungsstufe in ein $200 \mu\text{l}$ Braunglasvial mit Inserts überführt und $50 \mu\text{l}$ des internen Standards IS-LC-MSMS der Konzentration $c = 100 \mu\text{g l}^{-1}$ ($50 \mu\text{l}$ Lösung Tebuconazol D6, entspricht $c = 25 \mu\text{g l}^{-1}$ im Vial) hinzugegeben. Für die Erstellung der Kalibrationsfunktionen wurden die relativen Flächen bezogen auf den internen Standard mittels der Agilent Software Masshunter ausgewertet. Das Bestimmtheitsmaß lag für die genutzten Kalibrationen bei $R^2 > 0,9992$.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden mittels DINtest [Institut für Rechtsmedizin und Verkehrsmedizin der Universität Heidelberg 2003] erstellt und sind in Tabelle 15 dargestellt. Hierbei wurden alle Kalibrationspunkte berücksichtigt.

Tabelle 15: In Lösungsmittel angesetzte Kalibration der Analyten

Es wurden Kalibrationen für die jeweiligen Lösungsmittel (Methanol oder Acetonitril) angesetzt. Hier dargestellt werden exemplarische Kalibrationen für die Substanzen Tebuconazol, Boscalid und Kresoxim-Methyl. Bei allen zur Auswertung genutzten Kalibrationen betrug $R^2 > 0,9992$. NWG: Nachweisgrenze; EG: Erfassungsgrenze; BG: Bestimmungsgrenze ermittelt nach [DINtest, 2003], GSTD3 bezeichnet den eingesetzten Pestizidstandard.

<i>Substanz</i>	<i>Konz GSTD₃, mg l⁻¹</i>	<i>C_{min} μg l⁻¹</i>	<i>C_{max} μg l⁻¹</i>	<i>N</i>	<i>R²</i>	<i>NWG μg l⁻¹</i>	<i>EG μg l⁻¹</i>	<i>BG μg l⁻¹</i>
Tebuconazol	10	0,47	243	10	0,9996	6,59	13,18	22,63
Boscalid	10	0,38	97,2	9	0,9992	4,11	8,22	14,04
Kresoxim-Methyl	10	0,38	48,6	8	0,9998	1,05	2,10	3,65

Matrixkalibration für Boden- und Wurzelproben

Die SCAN Messungen zeigten (vgl. Abbildung 25), dass ein großer Anteil an sonstigen Matrixbestandteilen in der Probematrix vorhanden war. Somit sollte zunächst untersucht werden, ob aufgrund von Signalsuppression oder Signalenhancement mit reinen Lösungsmittelkalibrationen valide Konzentrationen berechnet werden können. Es wurden entsprechende Matrixkalibrationen in Acetonitril für die Bodenproben und wurzelnahen Bodenproben angesetzt, sowie für die Wurzelproben eine Matrixkalibration in Methanol angesetzt. Für diese wurde ein Extrakt aus Wurzeln bzw. Boden entsprechend der jeweiligen Extraktionsmethode (vgl.0) gewonnen und dieser als Verdünnungsextrakt für die Kalibrationen eingesetzt. Der höchste Kalibrationspunkt entsprach Faktor 2 der entsprechenden Lösungsmittelkalibration (vgl. Tabelle 15). Da nur für Tebuconazol ein entsprechender Interner Standard vorlag, sollte untersucht werden, inwieweit über diesen auch eine zuverlässige Korrektur der Substanzen Boscalid und Kresoxim-Methyl ermöglicht wird.

In Abbildung 28 bis Abbildung 30 werden für die Kalibrationsstandards mit $c_{\text{Tebuconazol}} = 243 \mu\text{g l}^{-1}$; $c_{\text{Boscalid}} = 97,2 \mu\text{g l}^{-1}$, $c_{\text{Kresoxim-Methyl}} = 48,6 \mu\text{g l}^{-1}$ und die Kalibrationsstandards mit $c_{\text{Tebuconazol}} = 15,2 \mu\text{g l}^{-1}$, $c_{\text{Boscalid}} = 6,1 \mu\text{g l}^{-1}$, $c_{\text{Kresoxim-Methyl}} = 3,0 \mu\text{g l}^{-1}$ der Response des Analyten in Methanol als entsprechendes Lösungsmittel für die Wurzelproben bzw. des Analyten in einem Matrixextrakt dargestellt (Bild A). In Bild B wird jeweils dargestellt, wie sich die Flächenverhältnisse nach einer Korrektur mittels des Internen Standards Tebuconazol D6 sowohl bei den Kalibrationspunkten in Methanol wie auch im Matrixextrakt zueinander verhalten. Bei einer ausreichenden Korrektur mittels des internen Standards sollten die Kurven deckungsgleich sein.

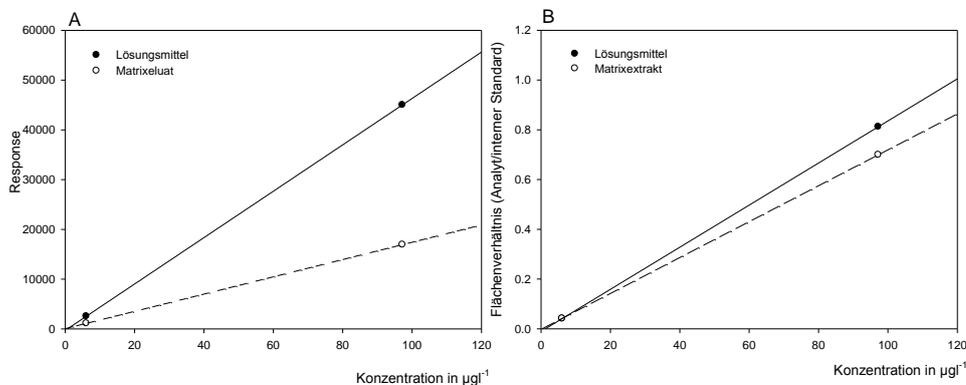


Abbildung 28: Dargestellt werden zwei Kalibrationspunkte des Analyten Boscalid in einer Lösungsmittelkalibration (hier Methanol) und eines methanolischen Wurzelextraktes

A: Dargestellt ist Response für Boscalid mit zwei Konzentrationsstufen eines Wurzelextraktes bzw. eines Lösungsmittels

B: Korrektur mittels Internen Standards Tebuconazol D6

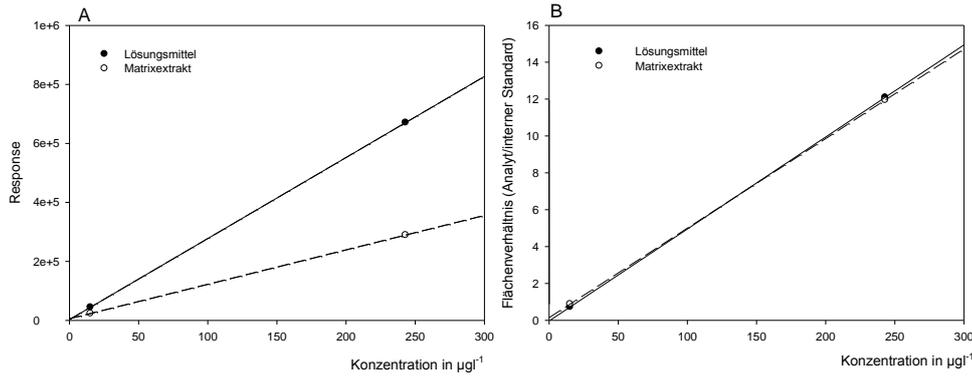


Abbildung 29: Dargestellt werden zwei Kalibrationspunkte des Analyten Tebuconazol in einer Lösungsmittelkalibration (hier Methanol) und eines methanolischen Wurzelextraktes

A: Dargestellt ist Response für Tebuconazol mit den zwei Konzentrationsstufen eines Wurzelextraktes bzw. eines Lösungsmittels

B: Korrektur mittels Internen Standards Tebuconazol D6

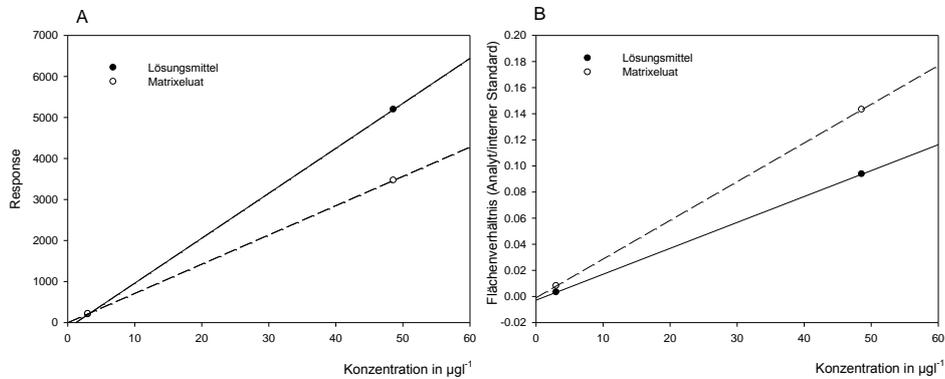


Abbildung 30: Dargestellt werden zwei Kalibrationspunkte des Analyten Kresoxim-Methyl in einer Lösungsmittelkalibration (hier Methanol) und eines methanolischen Wurzelextraktes

A: Dargestellt ist Response für Kresoxim-Methyl für zwei Konzentrationsstufen eines Wurzelextraktes bzw. eines Lösungsmittels

B: Korrektur mittels Internen Standards Tebuconazol D6

Für die Substanz Tebuconazol konnte gezeigt werden, dass die Korrektur mit dem Internen Standard Tebuconazol D6 aufgrund der Ähnlichkeiten der Substanzeigenschaften zufriedenstellend gelang. Die unterschiedlichen Responseflächen der Lösungsmittelkalibration und Matrixkalibration konnten durch den Internen Standard ausgeglichen werden, wie der übereinstimmende Verlauf der Ausgleichgrade in der Abbildung 29 B zeigt. Die Korrektur der Responseflächen der Substanzen Boscalid und Kresoxim-Methyl mittels des Internen Standards erwies sich als unzureichend, obwohl aufgrund der geringen Differenz in den Retentionszeiten, vor allem für Tebuconazol und Boscalid (Δ 0,2 min), von einer exakteren Korrektur der Flächen angenommen wurde. Für Boscalid zeigt sich ein höheres Flächenverhältnis für die Lösungsmittelkalibration, wohingegen sich für Kresoxim-Methyl ein größeres Flächenverhältnis für die Matrixkalibration ergab.

Für Bodenproben bestand das Problem entsprechend, so dass in der weiteren Arbeit mit den oben diskutierten Matrixkalibrationen entsprechend dem zu verwendenden Extraktionsmittel gearbeitet wurde.

Für die benötigten Matrixkalibrationen Boden und Wurzelnahe Boden der Treatments in den Gewächshausversuchen wurden aus der Kontrollgruppe 7 (Bodenkontrolle mit Phytobiont aber ohne Exposition, vgl. Tabelle 12) pro Replikat jeweils zwei zusätzliche Extraktionen à 2 g Bodeneinwaage vorgenommen, die gewonnenen Extrakte in einem Headspace Vial vereinigt und als Lösungsmittel-extrakt für die Matrixkalibration verwendet. Für die Wurzelproben wurden aus der Kontrollgruppe 7 (Bodenkontrolle mit Phytobiont, aber ohne Exposition, vgl. Tabelle 12) Matrixextrakte gewonnen.

Nachweis und Bestimmungsgrenzen für die Matrixkalibrationen

Bei der Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen muss berücksichtigt werden, dass die gewonnenen Extrakte ohne Auf- oder Anreicherungsschritte direkt analysiert wurden. Aufgrund der vorliegenden Konzentrationen im tatsächlichen Applikationsniveau von 100% der tatsächlichen Aufwandmenge, wurden die Bodenproben für die Messungen 100% AM vor der Messung 1:10 mit Acetonitril verdünnt.

Blindwerte: Für die Matrixkalibrationen wurden die gewonnenen Extrakte aus dem Boden beziehungsweise aus Wurzeln verwendet. Alle Messvials zur Bestimmung der Blindwerte wurden direkt vor der Messung mit Tebuconazol D6 versetzt.

Es wurden zu allen Kalibrationen Blindwerte gemessen und mit der jeweils entsprechenden Analyse-methode ausgewertet. Bei der Betrachtung der unterschiedlichen Treatments und Kalibrationen konnte gezeigt werden, dass alle spezifischen Blindwerte für die jeweiligen Treatments in stets der gleichen Größenordnung vorlagen. Somit konnte bei der Bestimmung der Nachweisgrenzen der Blindwert einbezogen werden.

Für die Matrix-Kalibrationen wurde als Nachweisgrenze (NWG) angenommen: $NWG = \text{Blindwert} + 3 \cdot \text{Rauschen}$ und als Bestimmungsgrenze $BG = \text{Blindwert} + 3 \cdot NWG$. Hierbei wurde der Blindwert immer aus dem unbehandelten Extrakt, mit internem Standard versetzt, ermittelt.

Die Nachweisgrenzen (vgl. Tabelle 16) sind als gemittelte Werte angegeben, da die Nachweisgrenzen je nach Treatment und Matrix schwankten. Zu jedem Treatment

wurde eine individuelle Kalibration unmittelbar vor oder nach den Proben gemessen. Das Bestimmungsmaß lag für jede verwendete Kalibration bei $R^2 > 0,999$.

Es wurden zu jedem Treatment und zu jeder Kontrolle der Gewächshausversuche (vgl. Tabelle 12) sowie auch innerhalb eines jeden Treatments gesonderte Matrixkalibrationen für die Matrices Boden, Wurzelnaher Boden und Wurzeln erstellt. Exemplarische Matrixkalibrationen für Tebuconazol im 100% AM und 10% AM werden im Anhang (9.6.4) dargestellt.

Tabelle 16: Matrixkalibration sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Analyten für die Gewächshausversuche

GST4 bezeichnet den eingesetzten Pestizidstandard. NWG: Nachweisgrenze und BG: Bestimmungsgrenze; Schwankungen aufgrund der unterschiedlichen Treatments.

Substanz	Konz GST4. mg l ⁻¹	C _{min} µg l ⁻¹	C _{max} µg l ⁻¹	N	R ² ≥	NWG µg l ⁻¹	BG µg l ⁻¹
Tebuconazol	150	0,25	510	13	0,999	0,47±0,32	1,40±0,95
Boscalid	60	0,10	204	13	0,999	1,00±0,72	3,00±2,16
Kresoxim-Methyl	30	0,05	102	13	0,999	2,25±0,42	6,75±1,25

Kalibration für die Extraktion von Tebuconazol aus dem Myzel von *Pisolithus arhizus*

Aus der Stammlösung GSTD4 wurden 12 Verdünnungsstufen angesetzt. In Tabelle 17 sind die Konzentrationsbereiche für den Wirkstoff Tebuconazol dargestellt. Es wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,10 µg l⁻¹ bis 210 µg l⁻¹ gearbeitet. Es wurden 1:2 Verdünnungen angesetzt. Für die Messlösungen wurden 50 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe in ein 200 µl Braunglasvial mit Insert überführt und 5 µl des internen Standards IS-LC-MSMS der Konzentration c = 250 µg l⁻¹ hinzugegeben. Für die Erstellung der Kalibrationsfunktionen wurden die relativen Flächen bezogen auf den internen Standard mittels der Agilent Software Masshunter ausgewertet. Das Bestimmtheitsmaß lag bei $R^2 > 0,9996$.

Als Nachweisgrenze wurde ein S/R Verhältnis von 3 und für die Bestimmungsgrenze ein S/R Verhältnis von 9 angenommen. Bei der Extraktion aus dem Myzel von *Pisolithus arhizus* wurde kein Blindwert auf den Massenspuren des Qualifieres oder Quantifieres gemessen. In Tabelle 17 sind die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie die Kalibration für Tebuconazol aus Myzel extrahiert dargestellt. Im Anhang (vgl. Abbildung 56) wird die entsprechende Grafik dargestellt.

Tabelle 17: Kalibration für die Extraktion von Tebuconazol aus exponiertem Myzel von *Pisolithus arhizus*

NWG: Nachweisgrenze und BG: Bestimmungsgrenze; Schwankungen aufgrund der unterschiedlichen Treatments.

<i>Verbindung</i>	<i>N</i>	<i>C_{min}</i> <i>µg l⁻¹</i>	<i>C_{max}</i> <i>µg l⁻¹</i>	<i>Steigung</i>	<i>Achsenabschnitt</i>	<i>R²</i>	<i>NWG</i> <i>µg l⁻¹</i>	<i>BG</i> <i>µg l⁻¹</i>
Tebuconazol	12	0,10	210	1,423	0,0287	0,9996	0,4986	1,6621

4.3.5.2.5 Qualitätssicherung

Da zu jedem Treatment der Gewächshausversuche (vgl. Tabelle 12) jeweils Proben in den Matrices Boden, Wurzelnaher Boden und Wurzeln analysiert werden sollten, wurden den jeweiligen Matrices entsprechende Matixkalibrationen mit mindestens 5 Levels sowie dem entsprechenden Blindwert angesetzt.

Während der Messung der 10 Replikate pro Treatment wurden nach der 5. Probe immer Qualitätskontrollen (QC) gemessen und mit dem entsprechenden Kalibrationspunkt verglichen.

Um die Anwendbarkeit der Matixkalibration zu verifizieren, wurde jede 5. und 6. Probe in dem Konzentrationsbereich der zu erwartenden Konzentrationen im Treatment aufgestockt. Im Anhang werden in Tabelle 31 (S. 161) die Aufstockungskonzentrationen dargestellt. Die Abweichungen der gemessenen Proben vom Zielwert lagen für die Bodenproben über alle Treatments bei < 12%. Für die Wurzelproben lag die Aufstockungskonzentration für Kresoxim-Methyl im Bereich der Bestimmungsgrenze und somit wurde die Abweichung nicht bestimmt, für Boscalid betrug die Abweichung über alle Messungen < 40%, ebenso wie für die Wurzelnahen Bodenproben.

4.3.5.2.6 Wiederfindungsversuche

Es wurden Wiederfindungsversuche in den unterschiedlichen Lösungsmitteln und für unterschiedliche Konzentrationslevels entsprechend der erwarteten Konzentration in den Kompartimenten vorgenommen. Es wurden getrennte Wiederfindungsversuche für die Kompartimente Boden, Wurzelnaher Boden und Wurzeln durchgeführt. Dies war aufgrund der erwarteten großen Differenzen in den Konzentration für Boden und Wurzeln notwendig, sowie auch aufgrund unterschiedlicher Lösungsmittel zur Extraktion. Für jedes Kompartiment wurden mindestens vier Konzentrationsstufen für die Wiederfindungsversuche angesetzt und ausgewertet. Es wurden Wiederfindungen

als Verfahrenskontrollen aus dem jeweiligen Lösungsmittel mit Pestiziden aufgestockt angesetzt. Als Referenz diente eine reine Lösungsmittelkontrolle, welche erst unmittelbar vor der Messung aufgestockt wurde. Die Daten zu den aufgestockten Konzentrationen für die 100% AM und 10% AM für die Substanzen Tebuconazol, Boscalid und Kresoxim-Methyl sind in Tabelle 26 und Tabelle 27 im Anhang (S. 155 ff) dargestellt.

Wiederfindung: Boden

Bei den Wiederfindungsversuchen für die Bodenproben wurde, entsprechend der Aufbereitung der Gewächshausproben, nur mit einem Aliquot gearbeitet. Bei der Aufarbeitung der Bodenproben wurde 2 g von etwa 40 g extrahiert. Auch die einzusetzenden Wirkstoffgehalte wurden auf dieses Aliquot berechnet. Somit ergab sich zum Beispiel für Tebuconazol eine theoretische Konzentration von 75 µg im gesamten Topf. Für Treatments der hohen Applikationsbereiche (100% AM) wurde aufgrund der erwarteten hohen Substanzkonzentration in den Proben jeweils eine 1:10 Verdünnung in Acetonitril gemessen. Damit sollte eine Übersättigung der LC-MSMS vermieden und eine Messung im Messbereich der Kalibration erreicht werden. Für die Treatments im geringen Applikationsniveau um 10% AM konnte ohne Verdünnung gemessen werden. Im Anhang (vgl. Kap. 9.6.3.1.1, S. 157ff) werden ergänzende Daten dargestellt. Es wurden keine signifikanten Konzentrationsunterschiede durch die Verdünnung der Proben beobachtet. Die Messung von verdünnten Proben war somit zulässig. Die Wiederfindungen lagen im relevanten Applikations- bzw. Konzentrationsbereich für Bodenproben zwischen 95% und 105%. Die verwendeten Korrekturfaktoren sind im Anhang (vgl. Kap. 9.6.3; S. 155) dargestellt.

Wiederfindung: Wurzelnaher Bodenbereich

Für die Berechnung der Wurzelnahen Bodenproben wurde nicht mit einem Aliquot gearbeitet, da angenommen wurde, dass das gesamte Probevolumen Wurzelnaher Boden analysiert werden wird. Für die Proben des wurzelnahen Bodenbereichs wurden ebenfalls Verdünnungsstufen (1:100 bzw. 1:10) gemessen. Aufgrund der Übereinstimmungen der Ergebnisse in den Verdünnungsmessungen (vgl. Abbildung 53, Anhang 9.6.3.1.2, S.157), wurde davon ausgegangen, dass eine Verdünnung der Proben aus wurzelnahe Boden zulässig war. Die Wiederfindungen lagen somit im relevanten Applikations- bzw. Konzentrationsbereich für Wurzelnahe Bodenproben zwischen 93% und 96%. Die verwendeten Werte zur Korrektur sind im Anhang (vgl. Kap. 9.6.3; S. 155) dargestellt.

Wiederfindungen: Wurzel

Die Wurzelproben wurden mit Methanol extrahiert, da für diese Proben der Gehalt an Ergosterol ebenfalls ermittelt werden sollte. Im Anhang (Anhang 9.6.3.1.3, S. 158) werden für die erwarteten Konzentrationsniveaus die Wiederfindung für das Wurzelkompartiment graphisch dargestellt. Für Kresoxim-Methyl fällt auf, dass die Konzentrationen sich im Bereich der Bestimmungsgrenzen der Substanz befinden. Die Wiederfindungen lagen im relevanten Applikations- bzw. Konzentrationsbereich zwischen 87% und 90%. Die verwendeten Korrekturfaktoren sind im Anhang (vgl. Kap. 9.6.3; S. 155) dargestellt.

Wiederfindung für Tebuconazol aus exponiertem Myzel

Der Vergleich mit der Matrixkalibration zeigte für Tebuconazol eine sehr ähnliche Steigung der Ausgleichsgeraden der Matrixkalibration zur Lösungsmittelkalibration (vgl. Abbildung 29). Für die Wiederfindung im Myzel wurde ohne Wiederfindungsfaktoren, nur über den Internen Standard, korrigiert. Hierbei wird davon ausgegangen, dass mögliche Einflüsse der Matrix sich sowohl auf den Internen Standard wie auch auf den Analyten gleichermaßen auswirken.

4.3.5.2.7 Vorschrift zur Extraktion von Fungiziden aus Boden- und Wurzelproben

Das Schema der Probenaufbereitung für die Gewächshausversuche wird in Abbildung 32 dargestellt.

Probenvorbereitung

Die Proben aus den Gewächshausversuchen (vgl. Kap. 4.3.4, S. 60) wurden bis zur Weiterverarbeitung in verschließbaren Aluschalen bei $T = -18^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren gelagert. Zur Probenaufarbeitung wurden die Proben auf Raumtemperatur temperiert. Nach der Bestimmung der Vitalparameter (vgl. Kap. 5.2.1) wurden die Proben in die Kompartimente Boden, Wurzelnahe Boden und Wurzel separiert.

Die Massenverluste durch die Probenaufarbeitung des Bodens betragen maximal 0.5% des Gesamtgewichtes des Bodenkörpers. Für die Aufarbeitung der Wurzelproben wurde der Wurzelballen nochmals in Wurzelnahe Bereich und Wurzel getrennt. Hierbei betragen die maximalen Verluste in den Treatments 6%. Diese höheren Verluste sind durch Waschverluste beim Waschen der Wurzeln (vgl. Abbildung 31) zu begründen.

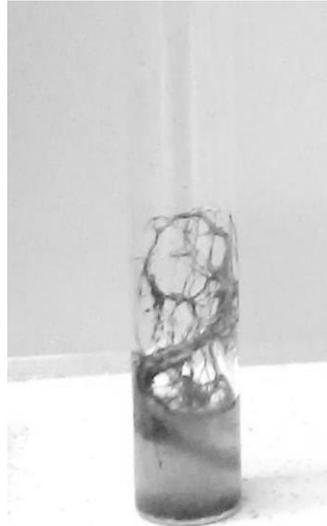


Abbildung 31: Wurzel mit Waschwasser

Die verbleibende Wurzel wurde nach dem Wiegen in ein Headspace Vial überführt und zweimal mit 5 ml Wasser durch leichtes Überkopfschütteln gewaschen. Das Waschwasser wurde aufgehoben, um es auf Pestizidrückstände zu untersuchen. Die gewaschene Wurzel wurde nochmals gewogen und unter dem Binokular auf Mantelstrukturen untersucht. Anschließend wurde die Wurzel durch vorsichtiges Tupfen von Wasserrückständen befreit und ebenfalls in ein Headspace Vial eingewogen, verschlossen und dunkel gelagert. Die Extraktion der vorbereiteten Proben wurde immer am selben Tag vorgenommen.

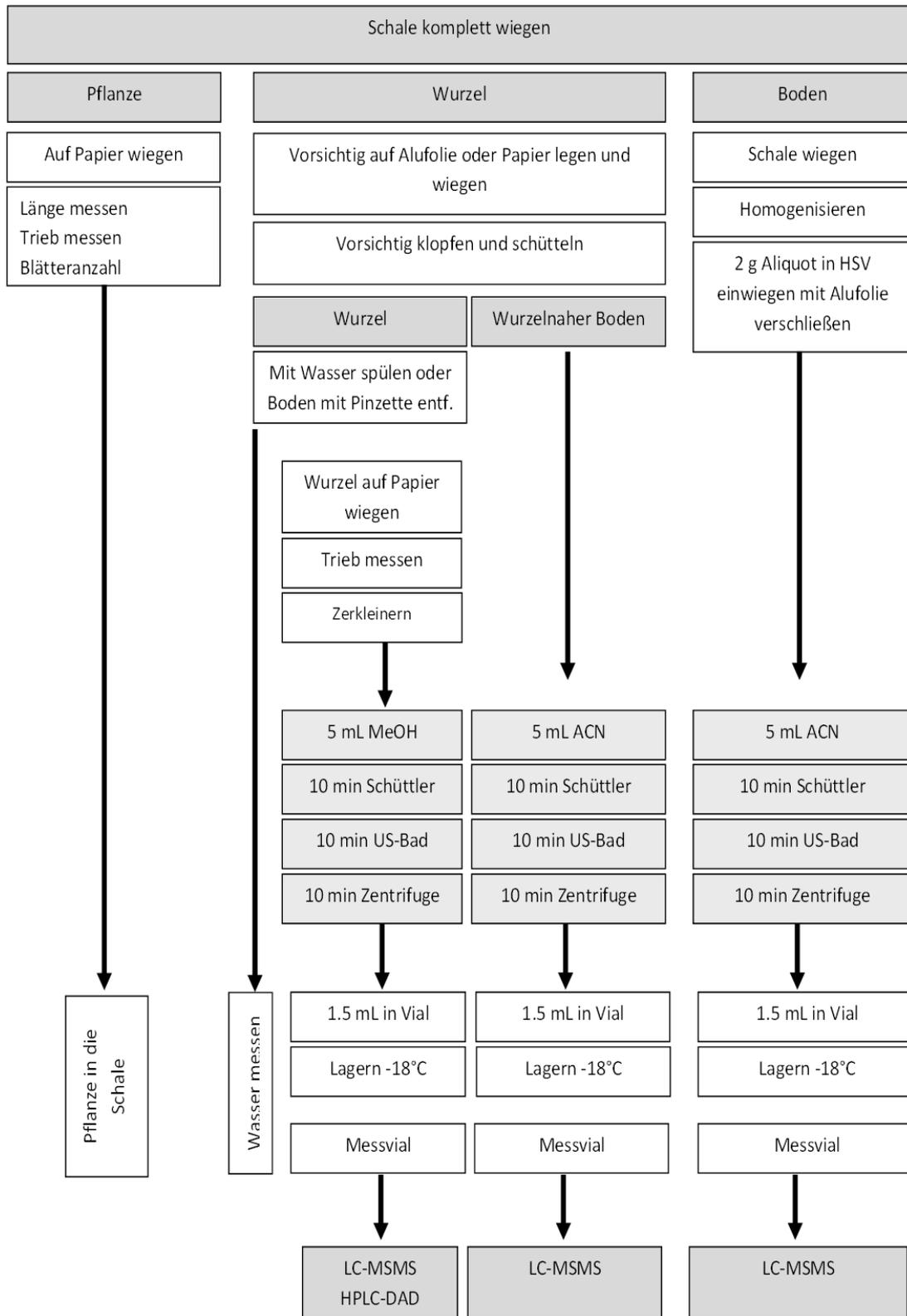


Abbildung 32: Schema der Probenvorbereitung für die Analytik der Proben aus den Gewächshausversuchen

Extraktion

Während der gesamten Extraktion wurden die Proben vor direktem Sonnenlicht geschützt. Für jedes Treatment wurden 10 Replikate analysiert. Ebenfalls wurden die Kontrollproben entsprechend aufgearbeitet.

- 1) Zu den eingewogenen Proben wurde jeweils 5 ml des Extraktionsmittels hinzugegeben und das Vial mit PTFE-Bördeldeckeln dicht verschlossen.
- 2) Die Vials wurden im Dunkeln für 10 min bei $U = 10 \text{ min}^{-1}$ im Überkopfschüttler geschüttelt.
- 3) Extraktion der Pestizide und optional die Extraktion des Biomarkers Ergosterol erfolgt im Ultraschallbad (HF-Frequenz 35 kHz, HF-Leistung 320 W) über 10 min bei $T = 20^\circ\text{C}$
- 9) Es wurden etwa 1,5 ml des Überstandes in ein Mikrozentrifugen - Röhrchen überführt und 10 min bei $14.000 \text{ U min}^{-1}$ zentrifugiert.
- 4) Anschließend wurde der Überstand in ein 1.5 ml Braunglasvial überführt und bis zur Messung bei $T = -18^\circ\text{C}$ gelagert.

Ein weiterer Extraktionsschritt lieferte eine Extraktionsausbeute von kleiner 2% und wurde daher nicht durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Messlösungen

Direkt vor der Messung mittels LC-MSMS wurde aus den vorbereiteten Extrakten die Messlösung hergestellt. Dazu wurden 50 μl der Extrakte in ein Braunglas-Rollrandvial mit Insert überführt und mit 5 μl Internem Standard ($c = 250 \mu\text{g l}^{-1}$) versetzt. Alle Messvials wurden direkt vor der Messung in den Autosampler gegeben. Zur Validierung wurde nach jeweils 5 Proben immer ein QC in mindestens zwei Konzentrationsstufen gemessen sowie die Proben 5 und 6 mit und ohne Aufstockung analysiert.

Für die Proben aus dem Bodenkompartment mit einer Applikationsmenge von 100% AM wurde mit einer 1:10 Verdünnung gearbeitet.

4.3.5.2.8 Vorschrift zur Extraktion von Tebuconazol aus dem Myzel der Hemmversuche

Um die Aufnahme von Tebuconazol in das Myzel eines ECM-Isolates zu untersuchen, wurden Versuche mit auf behandeltem Nährmedium gewachsenen Isolaten von *Pisolithus arhizus* Kulturen durchgeführt.

Probenvorbereitung:

Das Myzel des auf Glasfaserfilter kultivierten *Pisolithus arhizus* konnte zur Extraktion mit einer Pinzette vom Nährmedium getrennt und unmittelbar extrahiert werden.

Extraktion

Die Proben sowie die Nullkontrolle wurden jeweils in 3 Replikaten analysiert.

- 1) Es wurde ein Aliquot des Myzels mittels Skalpell von dem Glasfaserfilter abgelöst und in ein 25 ml Headspace Vial überführt.
- 2) Zu den eingewogenen Proben wurden 2 ml des Extraktionsmittels Acetonitril hinzugegeben und das Vial mit PTFE-Bördeldeckeln dicht verschlossen.

Die eigentliche Extraktion der Pestizide aus dem Myzel erfolgte wie oben beschrieben (vgl. Kap 4.3.5.2.7). Zur verbleibenden Probe wurden nochmals 2 ml des Extraktionsmittels Acetonitril hinzugegeben und im Ultraschallbad extrahiert und zentrifugiert. Anschließend wurde auch der zweite Überstand in ein 1.5 ml Braunglasvial überführt und bis zur Messung bei $T = -18^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Messlösungen

Direkt vor der Messung mittels LC-MSMS wurde aus den vorbereiteten Extrakten der Myzelien die Messlösung hergestellt. Dazu wurden 50 μl der Extrakte in ein Braunglas-Rollrandvial mit Insert überführt und mit 5 μl Internem Standard ($c = 250 \mu\text{g l}^{-1}$) versetzt. Alle Messvials wurden direkt vor der Messung in den Autosampler gegeben.

4.4 Statistische Methoden

4.4.1 Statistische Auswertung der Myzelflächen

Der Einfluss des Pestizids auf das Myzelwachstum der ECM wurde statistisch mit dem Softwareprogramm SigmaPlot 11 [Systat Software 2008] ausgewertet. Dabei wurden die gewonnenen Daten zu den Myzelflächen mit den jeweiligen Lösungsmittelkontrollflächen bzw. mit den unbehandelten Nullkontrollflächen verglichen. Die Auswertung geschah mittels „One Way Anova“ und dem Sidak-Holms

Test. Hierbei wurden die Treatments und die Kontrollen verglichen. Wenn die Unterschiede zwischen den Gruppen mit einer Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,001$ ($\alpha = 0,050:1,00$) größer sind als per Zufall zu erwarten, werden die Unterschiede als signifikant gekennzeichnet [Stahel 2008, Lozán und Kausch 2007].

4.4.2 Auswertung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen

Aus den Effekt-Versuchen mittels Plattentests wurden durch das Softwareprogramm SigmaPlot 11.0 [Systat Software 2008] Konzentrations-Wirkungsbeziehungen ermittelt.

Hierbei wurde eine halblogarithmische Darstellung der Wertepaare vorgenommen. Die optimale Kurvenanpassung wurde zunächst aus 200 Fits ermittelt. Die Kurvenanpassung mittels „Vier Parameter logistischer Kurve“ konvergierte optimal. Daher wurden die Daten mit folgender Gleichung angepasst:

$$y = \min + \frac{(max - \min)}{1 + \left(\frac{x}{ED_{50}}\right)^{-Steigung}} \quad (1)$$

Wobei folgende Parameter berechnet wurden:

min:	Tiefpunkt der Kurve (Minimum der Kurve)
max.:	Hochpunkt der Kurve (Maximum der Kurve)
Steigung :	Steigung am Wendepunkt der Kurve
EC ₅₀ :	Konzentrationswert oder Applikationsniveau, bei dem das Myzelwachstum um 50% gehemmt ist.

Da um die Verwendung des NOEC- Wertes eine kritische Diskussion herrscht, wurde in dieser Arbeit der EC₁₀ Wert verwendet, um die Konzentration beziehungsweise das Applikationsniveau zu beschreiben, für welches von keinen signifikanten Auswirkungen auf das Myzelwachstum ausgegangen wird [OECD 2006, Warne und Dam v 2008]. Darüber hinaus wurde noch ergänzend der EC₉₀ Wert bestimmt, bei dem eine nahezu komplette Hemmung des Myzelwachstums beobachtet werden konnte, sowie der EC₅₀ Wert. Die Berechnungen der Werte wurden ebenfalls mittels des Softwareprogramms SigmaPlot 11.0 durchgeführt.

5 Ergebnisse und Diskussion

Es wurden Versuche zur Bestimmung von ökotoxikologischen Effekte von Pflanzenschutzmitteln auf Mykobionten zur Bestimmung der ökotoxikologischen Kenngrößen und Expositionsversuche zur Bestimmung der vorliegenden Konzentrationen der applizierten Substanzen in den Kompartimenten Boden, Wurzelnahe Boden und Wurzeln nach einmaliger Applikation (MEC) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden zur ökotoxikologischen Risikoanalyse in Beziehung zueinander gesetzt.

5.1 Ökotoxikologische Effekte von Pflanzenschutzmitteln auf Mykobionten

5.1.1 Untersuchungen in kombinierten *in vitro* Systemen aus Mykobiont und Phytobiont

Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl nach der Methode von de Vries wie auch nach der Paper-Sandwich Technique kein steriles System etabliert und somit keine Aussagen zur Mykorrhizierung von Buchenjungepflanzen getroffen werden konnten.

Trotz der Behandlung der Samen mit verschiedenen Reagenzien zur Sterilisation wurde ein Schimmelpilzbefall beobachtet. Zwar zeigte sich ein Anstieg der Ergosterolkonzentration über den Versuchszeitraum, aber die großen Varianzen zwischen den Messungen sowie der Befall der Proben mit Schimmelpilzen verhinderten, gesicherte Aussagen über den Mykorrhizierungsgrad. Darüber hinaus konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der Anstieg der Ergosterolkonzentration im Versuch auf bereits entstehenden, jedoch noch nicht sichtbaren, Schimmelpilzbefall zurückzuführen war. Auch Schimmelpilze enthalten Ergosterol (vgl. [Tardieu et al. 2007]) und können so die Messungen bereits beeinflussen, bevor Myzelstrukturen sichtbar werden.

Die gewählten Sterilisationsmethoden in Anlehnung an Carrillo et al. [2011] führten zu keiner ausreichenden Sterilität des Systems. Hierbei ist anzumerken, dass diese Technik für andere Samen, wie für Kiefern (hier: *Pinus halepensis*) und für Douglasien bereits erfolgreich eingesetzt und beschrieben wurde [Duponnois, Garbaye, 1991]. Andere Vorgehensweisen zur Oberflächensterilisation durch Fungizide in Kombination mit Tetracycline erwiesen sich in der Literatur auch für Buchensamen erfolgreich, wurden

aber aufgrund der gewählten Fragestellung nicht weiter verfolgt [Kreuzwieser, Rennenberg 1998].

Aufgrund der beschriebenen Probleme erwies sich ein komplexes Modellsystem mit Phytobiont/Mykobiont zur Mykorrhiza-Synthese als nicht zielführend und wurde verworfen.

5.1.2 Untersuchungen in Mykobionten Systemen

5.1.2.1 Effekte auf den Endpunkt Myzelwachstum: Qualitative Methode Tube Strips-Methode

Es wurden Reaktionsgefäße mit unterschiedlichen Gehalten des Wirkstoffes Boscalid behandelt und im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle betrachtet. Die Auswertung in diesem Versuch erfolgte qualitativ über eine visuelle Betrachtung der Reaktionsgefäße.

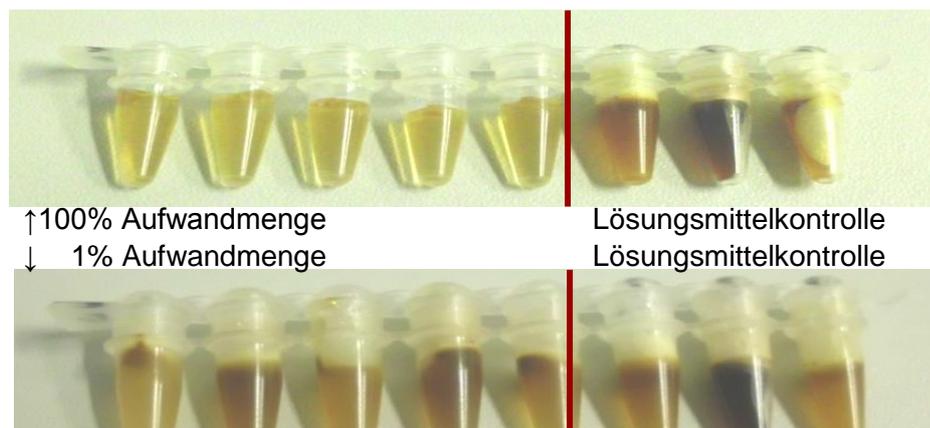


Abbildung 33: Tube Strips behandelt mit Boscalid.

In Abbildung 33 ist für beide Versuchsansätze bei den Lösungsmittelkontrollen eine deutliche Myzelentwicklung erkennbar. Im Ansatz mit 100% Applikationsmenge war kein Wachstum nachweisbar. Für die geringe Applikationsmenge von 1% der empfohlenen Ausbringungsmenge wurde ein Myzelwachstum ähnlich dem der Kontrollen identifiziert. Aufgrund der visuell qualitativen Auswertung wurde keine statistische Auswertung vorgenommen.

Die Tube Stripe Methode ist als Screening-Methode geeignet, um Effekte nach Exposition mit Pflanzenschutzmitteln in verschiedenen Konzentrationslevels auf verschiedene ECM zu identifizieren. Die Stärke dieser Methode liegt in den geringen Mengen an benötigtem Myzel und dem geringen Platzbedarf der Versuchsgefäße. Die Tubes wurden in dieser Arbeit rein qualitativ ausgewertet und sind somit als Methode

nicht geeignet, um Konzentrations - Wirkungskurven zu beschreiben. Eine Weiterentwicklung der Methode und Auswertung mittels Auslesegerät könnte eine quantitative Auswertung ermöglichen.

5.1.2.2 Effekte auf den Endpunkt Myzelwachstum: Quantitative Methoden

5.1.2.2.1 Wachstumsversuche auf unbehandeltem Nährmedium

Als Wachstumskontrolle der Myzelien ohne Wirkstoffzugabe, wurde zunächst nur die Zunahme des mittels Lineal vermessenen radialen Myzelwachstums gegen die Zeit aufgetragen (vgl. Abbildung 34)

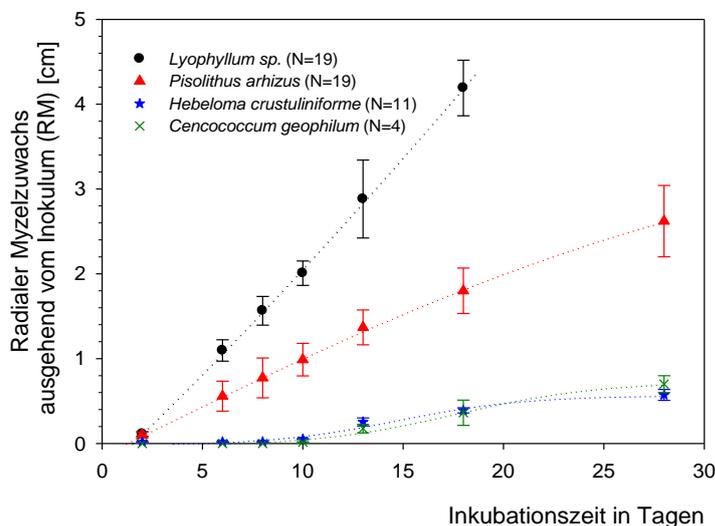


Abbildung 34: Radialer Myzelzuwachs auf unbehandeltem Nährmedium

Die Wachstumsverläufe in Abbildung 34 zeigen, dass für *Lyophyllum sp.* und *Pisolithus arhizus* keine erkennbare Anpassungsphase an das Nährmedium zu beobachten war. Das Myzelwachstum für *Lyophyllum* folgte einem annähernd linearen Wachstum über den Versuchszeitraum und wurde v.a. durch die gewählte Plattengröße limitiert. Für *Hebeloma crustuliniforme* und *Cenococcum geophilum* wurde zunächst eine Lag-Phase von etwa 8 Tagen beobachtet. Insgesamt verlief das Wachstum gegenüber *Lyophyllum* und *Pisolithus arhizus* langsamer. Somit wird für das Design der Hemmversuche mit einer längeren Versuchszeit gerechnet, wenn diese Isolate eingesetzt werden. Aufgrund der geringen Abweichungen im Wachstum der Isolate auf verschiedenen Nährmedien wurde im weiteren Verlauf für alle Isolate mit dem BAF Medium gearbeitet.

Zur Qualitätssicherung der Versuche zur Beeinflussung des Myzelwachstums durch Pestizide (vgl. Kap. 4.2.2; S.44 ff) wurde jeweils das Wachstum von Nullkontrollen mit dem Wachstum der Stammissolate aus den Erhaltungskulturen verglichen. Die Daten werden im Anhang (vgl. Kap. 9.4, S. 150ff) dargestellt. Für die Nullkontrollen wurden keine signifikanten Unterschiede im Myzelwachstum über die gesamten Versuchsreihen festgestellt, somit kann eine anhaltende Vitalität der Isolate für den gesamten Versuchszeitraum angenommen werden. Zusätzlich wurde während jedes Plattenversuchs eine individuelle Nullkontrolle mitgeführt.

5.1.2.2.2 Mash-Bag Methode

Die Mash-Bag Methode wurde entwickelt, um ein Prüfsystem zu etablieren, mit welchem der Gradient der Pestizidkonzentration im Boden berücksichtigt werden kann. Bei der Substratwahl wurde, wie unter 4.2.2.2.2 beschrieben, im Versuchsverlauf mit einem artifiziellen Substratgemisch aus Sand und Vermiculite gearbeitet, um Fremdkontaminationen zu vermeiden. Entscheidend für die Sterilität des Versuchsansatzes war hierbei, dass das verwendete Substrat in Anlehnung an Abd-Alla [2000] sowohl trockensterilisiert wie auch mehrmalig autoklaviert wurde. Inwieweit aufgrund der Vorbehandlung des Bodens von einem natürlichen System ausgegangen werden kann, muss kritisch hinterfragt werden. So zeigten Razavi und Lakzian [2007], das Autoklavieren im Vergleich zu anderen Sterilisationsmethoden zu einer signifikanten Absenkung des pH Werts im Boden führte.

Es wurden verschiedene Teilversuche, auch unter Berücksichtigung von Diversitätsaspekten durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der Isolate führte jedoch vor allem *Lyophyllum* zu einem Überwuchern der langsamer wachsenden Spezies wie *Cenococcum geophilum* oder *Hebeloma crustuliniforme* in den Systemen.

Beim gewählten Versuchsaufbau konnte die spezifische Wirkung der Pestizidexposition als isolierter Faktor nur unzureichend beschrieben werden. Ähnlich wie bei Johansson et al. [2004] und Ottow [2011] beschrieben, könnten kumulative Auswirkungen verschiedener Faktoren wie Bodentiefe und veränderte Bodenparameter des polyfaktoriellen Ökosystems die Ergebnisse beeinflusst haben. Hauptkritikpunkt der Mash-Bag Methode ist somit, dass die Versuchsbedingungen nicht ausreichend standardisierbar waren, um die anliegende Effektkonzentration auf das Isolat eindeutig über die Hemmwirkung auf den Endpunkt Myzelwachstum zu bestimmen. Hierzu

müssten als Weiterentwicklung mindestens die Konzentration der Substanzen im Substrat in verschiedenen Tiefen und beschreibende Bodenparameter bestimmt werden (vgl. Anhang. 9.5; S. 152ff). Das hier beschriebene System war für die Untersuchung von Konzentrations- Wirkungsbeziehungen nicht valide und sensibel genug, um den Effekt auf das Myzelwachstum so isoliert zu untersuchen und Schwellenwerte bestimmen zu können und wurde daher nicht weiterentwickelt.

5.1.2.2.3 Platten Methode

Für das Aufstellen der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen wurde eine Bewertung des ökotoxikologischen Endpunktes Myzelwachstum im Hinblick auf verschiedene Konzentrationsstufen, Pestizide und Expositionsdauern benötigt. Mit der Plattenmethode konnte eine robuste sterile Standardmethode etabliert werden, welche den Anforderungen genügt.

Wirkung von Azoxystrobin, Tebuconazol, Boscalid und Quinoxifen auf *Pisolithus arhizus* und *Cenococcum geophilum*

Pisolithus arhizus behandelt mit Azoxystrobin

Für alle Zeit- und Konzentrationspunkte waren keine signifikanten Unterschiede im Wachstum der unbehandelten Kontrolle im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen zu beobachten. Eine Beeinflussung aufgrund der Lösungsmittelzugabe lag somit nicht vor (vgl. Abbildung 35-a).

Für die mit dem Wirkstoff Azoxystrobin behandelten Proben entsprechend 200 % AM bis 10% AM war für den Auswertungszeitpunkt 6 Tage eine signifikante Hemmung ($p < 0,001$) im Verhältnis zu den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen zu sehen. Nach einer Versuchsdauer von 8 Tagen wurde diese signifikante Hemmung für alle Konzentrationsstufen beobachtet. Für die Versuchsdauer von 29 Tagen wurden keine signifikanten Abweichungen im Wachstumsverhalten bezogen auf die Kontrollen für vier der fünf Konzentrationsniveaus beobachtet.

Pisolithus arhizus behandelt mit Tebuconazol

Für alle Versuchsdauern wies das Myzelwachstum der Lösungsmittelkontrollen keine signifikanten Unterschiede zur Nullkontrolle auf. Somit konnte eine Beeinträchtigung des Wachstums für diese Niveaus aufgrund des Zusatzes von Acetonitril für diese Proben ausgeschlossen werden.

Die Behandlung mit Tebuconazol führte bei einer Expositionsdauer ≤ 8 Tagen zu einer totalen Hemmung des Myzelwachstums für alle Applikationsmengen oberhalb von 0,1% AM (Abbildung 35-b) Für das Myzelwachstum im Treatment entsprechend 0,1 % AM konnten keine signifikanten Unterschiede verglichen mit der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle für 6 und 8 Versuchstage gezeigt werden. Nach 29 Tagen begann das Wachstum von Isolat, welche mit 1% AM behandelt wurden.

Pisolithus arhizus behandelt mit Boscalid

Für alle drei Zeitpunkte der Datenaufnahme zeigten sich keine signifikanten ($p < 0,001$) Unterschiede im Wachstumsverhalten der Lösungsmittelkontrollen der entsprechenden Treatments im Vergleich zu den unbehandelten Nullkontrollen (vgl. Abbildung 35-c). Somit wurde eine Hemmwirkung des Lösungsmittels ausgeschlossen.

Im Vergleich des Myzelwachstums der behandelten Proben zur entsprechenden Lösungsmittelkontrolle war nach 6 und 8 Versuchstagen für die 200 % AM bis 10 % AM eine signifikante Hemmung des Myzelwachstums ($p < 0,001$) zu beobachten. Eine Inhibition des Myzelwachstums konnte ebenfalls für die Versuchsdauer von 29 Tagen für 200 % AM und 100 % AM gezeigt werden.

Pisolithus arhizus behandelt mit Quinoxifen

Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Myzelwachstum der behandelten Proben bezogen auf die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen oder der unbehandelten Nullkontrolle gezeigt. Die behandelten Proben 10%AM und 1%AM zeigten ab dem 8 Versuchstag keinen weiteren Myzelzuwachs. Da die Ursachen für das Einstellen des Myzelwachstums nicht geklärt werden konnten wurde für die Plattenversuche zur Aufstellung von Konzentrations-Wirkungsbeziehung nur Platten für die Auswertung zugelassen, die ein stetiges Wachstumsverhalten auch in der Folgewoche nach der Analyse aufwiesen (vgl. Abbildung 35-d).

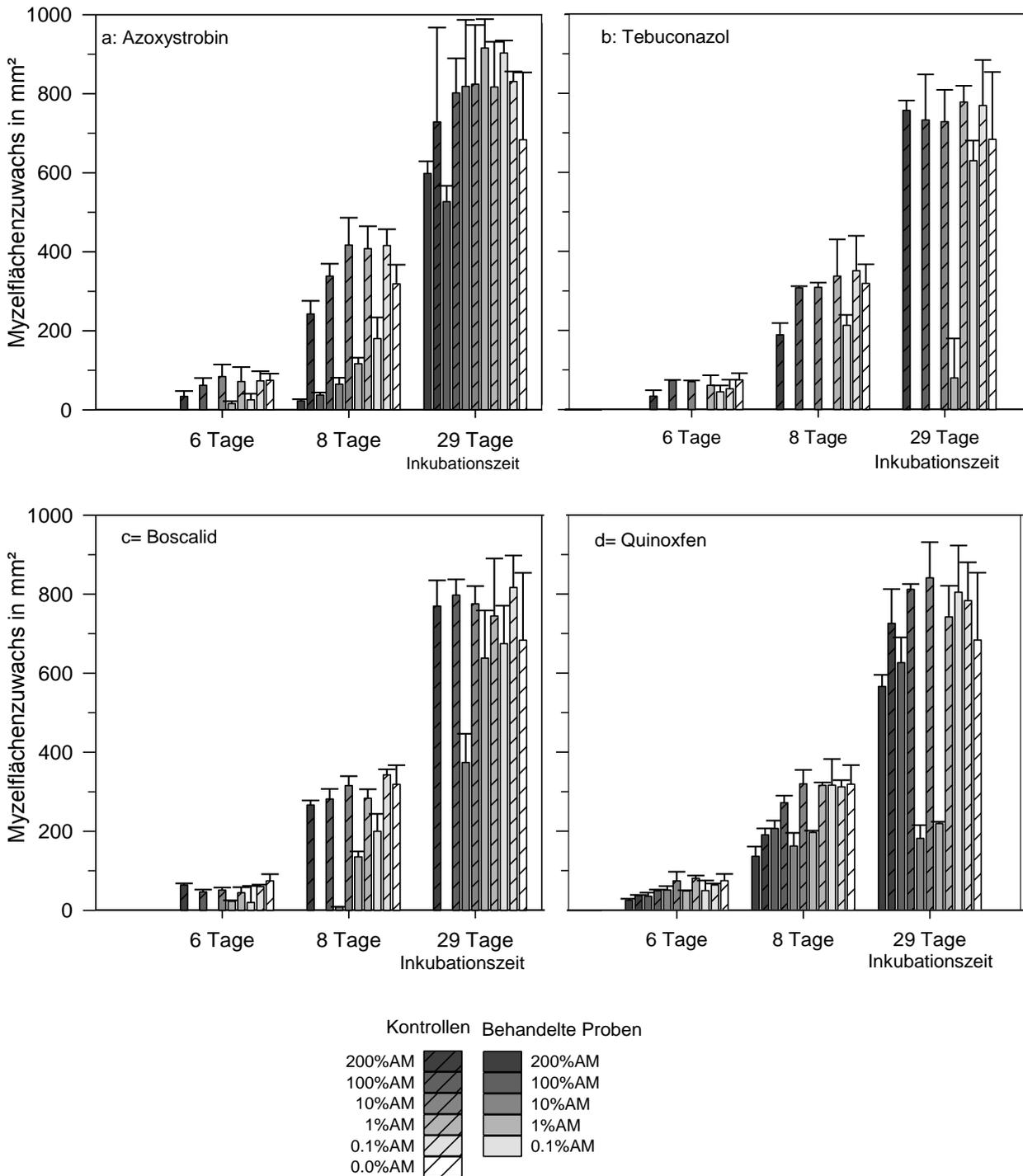


Abbildung 35: Myzelzuwachs von *Pisolithus arhizus* in Anhängigkeit von der Konzentration von Pestiziden im Nährmedium

Behandlung mit a: Azoxystrobin; b: Tebuconazol; c: Boscalid; d: Quinoxifen

Die Dosis korreliert mit der Intensität der Färbung. Kontrollproben: Null- und Lösungsmittelkontrollen sind mit Schraffur dargestellt. Fehlende Balken bedeuten eine absolute Hemmung des Myzelwachstums im Modellsystem. Das Wachstum der exponierten Isolate wurde normiert auf das Wachstum der Lösungsmittelkontrollen. (N=3, BAF Medium)

Cenococcum geophilum behandelt mit Quinoxyfen

Für beide Versuchszeitpunkte und alle Konzentrationslevels wurden keine signifikanten Beeinflussungen des Lösungsmittels auf das Myzelwachstum im Vergleich zur unbehandelten Nullkontrolle nachgewiesen. Auch die behandelten Proben der Konzentrationsniveaus sind nach 8 Tagen nicht signifikant im Myzelwachstum gehemmt. Nach 29 Tagen Versuchsdauer zeigten lediglich die entsprechend 1 % AM behandelten Proben eine Wachstumshemmung gegenüber der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 36-a).

Cenococcum geophilum behandelt mit Boscalid

Nach 29 Tagen zeigte sich ein verlangsamtes Myzelwachstum der Lösungsmittelkontrollen K 200 % AM und K 100 % AM (Abbildung 36-b). Das Myzelwachstum dieser Lösungsmittelkontrollen war signifikant gehemmt ($p < 0,001$) gegenüber den anderen Lösungsmittelkontrollen und der unbehandelten Nullkontrolle. Als möglicher Grund hierfür wird die Applikation von Acetonitril auf das Nährmedium vermutet. In den weiteren Plattenversuchen wurde das Verfahren, wie beschrieben, dahingehend modifiziert, dass die Substanzen in das Medium eingearbeitet wurden.

Eine Hemmwirkung durch den Wirkstoffes wurde für 200 % AM und 100 % AM beobachtet. Jedoch wurde für den Versuchszeitraum 29 Tage für 200% AM ebenfalls beobachtet, dass ein Isolat ein leichtes Wachstum aufwies.

Unabhängig von der Versuchsdauer wurde für eine Behandlung entsprechend 10 % AM, sowie den geringeren Applikationsniveaus 1 % und 0.1 %, keine signifikante Hemmung ($p < 0,001$) des Myzelwachstums beobachtet.

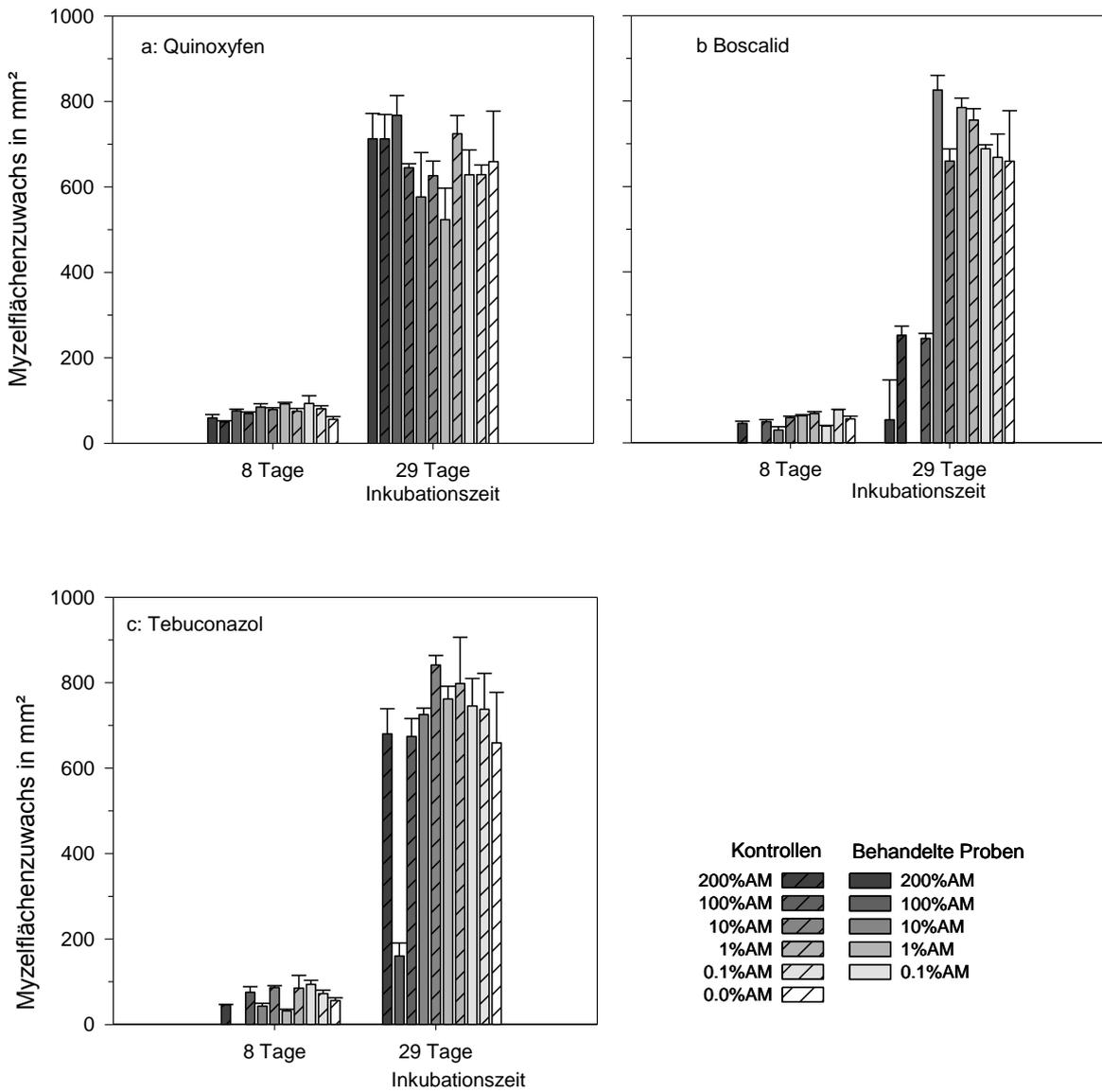


Abbildung 36. Myzelzuwachs von *Cenococcum geophilum* in Anhängigkeit von der Konzentration von Pestiziden im Nährmedium

Behandlung mit a: Quinoxifen; b: Boscalid; c: Tebuconazol

Die Dosis korreliert mit der Intensität der Färbung. Kontrollproben: Null- und Lösungsmittelkontrollen sind mit Schraffur dargestellt. Fehlende Balken bedeuten eine absolute Hemmung des Myzelwachstums im Modellsystem. Das Wachstum der exponierten Isolate wurde normiert auf das Wachstum der Lösungsmittelkontrollen. (N=3, BAF Medium)

Cenococcum geophilum behandelt mit Tebuconazol

Cenococcum geophilum wies keine signifikante Hemmung mit $p \leq 0,001$ im Wachstumsverhalten der Nullkontrolle bezogen auf das Wachstumsverhalten der Lösungsmittelkontrollen pro Treatment auf (vgl. Abbildung 36-c).

Nach 8 Tagen konnte für die Behandlungen von 200% AM bis 1% AM ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zur entsprechenden Lösungsmittelkontrolle ermittelt werden. Die mit 0,1% AM behandelten Proben zeigten ein leicht signifikant erhöhtes Myzelwachstum ($p = 0,025$) bezogen auf die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen.

Nach 29 Tagen konnte ein höchst signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten der behandelten Proben zu den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen nur noch für die Treatments 200 % AM und 100 % AM gezeigt werden. Für die Proben mit 10 % AM zeigte sich eine signifikante Beeinflussung im Bereich von $p = 0,037$. Für die geringen Konzentrationslevels von 1 % AM und 0.1 % AM waren keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,5$) im Myzelwachstum bezogen auf die entsprechende Lösungsmittelkontrolle zu identifizieren.

Zusammenfassung

In Tabelle 18 wird die Wirkung der Substanzen auf *Pisolithus arhizus* und *Cenococcum geophilum*, normiert auf das Wachstum der Lösungsmittelkontrollen, dargestellt. Rot unterlegte Felder zeigen eine signifikante Hemmung ($p < 0,001$) des Myzelwachstums (bezogen auf die Lösungsmittelkontrollen) und grün unterlegt sind die Isolate, die unter der Exposition mit Pflanzenschutzmitteln ein nicht signifikant abweichendes Wachstumsverhalten zur Lösungsmittelkontrolle aufwiesen.

Die Applikationsmengen wurden über die Fläche des Modellsystems (hier Petrischale) zur empfohlenen Aufwandmenge pro Hektar Feld berechnet. 100 % AM entsprechen dabei der tatsächlich im Feld applizierten Aufwandmenge. Aufgrund der Ergebnisse wurden im weiteren Verlauf der Versuche die Substanzen in das Nährmedium eingearbeitet. Ebenfalls wurden nur Platten in die Auswertung einbezogen, welche auch im folgenden Auswertungszeitraum ein stetiges Wachstumsverhalten aufwiesen.

Zusammenfassend lässt sich eine Tendenz in der Sensibilität der beiden eingesetzten Spezies auf die Exposition mit den Wirkstoffen zeigen. *Pisolithus arhizus* zeigte sich über alle Wirkstoffe betrachtet als sensibler Organismus im Vergleich zu *Cenococcum geophilum*.

Auch bei den eingesetzten Wirkstoffen konnten unterschiedliche Hemmungen auf den gewählten Endpunkt beobachtet werden. Werden die Fungizide aus der landwirtschaftlichen Nutzung (Tebuconazol und Azoxystrobin) verglichen, so fällt auf, dass Tebuconazol gegenüber Azoxystrobin auf das Myzelwachstum einen deutlich stärkeren Inhibitionseffekt ausübt. Dieses gilt sowohl für *Pisolithus arhizus* als auch für *Cenococcum geophilum*. Werden die beiden Wirkstoffe mit einer Zulassung im Forst- und Baumschulbereich miteinander verglichen, zeigte Boscalid gegenüber Quinoxifen eine größere Hemmwirkung auf das Myzelwachstum der beiden ausgewählten ECMs.

Tabelle 18: Hemmwirkung von ausgewählten Fungiziden auf das Myzelwachstum von *Pisolithus arhizus* und *Cenococcum geophilum* im Plattentest

Applikation der Substanzen und des Lösungsmittels auf das Medium. (Es wurde das Verhältnis der Myzelflächen des behandelten Isolats zu Lösungsmittelkontrolle gebildet.)
 Es wird das Verhältnis zwischen exponierten Myzelflächen und Lösungsmittelkontrolle dargestellt. Hierbei entspricht 1 einem unbeeinträchtigten Wachstumsverhalten des Treatments bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle und Null einer absoluten Hemmung des Myzelwachstums.

- Signifikante Wachstumshemmung bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle ($p < 0,001$)
- Wachstumshemmung bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle $0,05 \leq p < 0,001$
- Keine signifikante Wachstumshemmung bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle ($p > 0,05$),
- a: Ein Isolat ist nicht gewachsen,
- b: Lösungsmittelkontrolle zeigt Wachstumshemmung gegenüber der Nullkontrolle
- : Dosierungsfehler

<i>Pisolithus arhizus</i>																
Applikationsmenge (AM) in %	200			100			10			1			0,1			0
Tag	6	8	29	6	8	29	6	8	29	6	8	29	6	8	29	
Azoxystrobin	0.0	0.1	0.8	0.0	0.1	0.7	0.0	0.2	1.0	0.2	0.3	1.1	0.3	0.4	1.1	1.0
Boscalid	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	0.5	0.9	0.3 ^a	0.6	0.8	1.0
Tebuconazole	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.8	0.6	0.8	1.0
Quinoxifen	0.7	0.7	0.8	0.7	0.8	0.8	0.7	0.5 ^b	0.2 ^b	0.6	0.6 ^b	0.3 ^b	0.8	1.0	1.0	1.0
Unbehandelte Kontrollgruppe																
Nullkontrollen	0.9±0.2			0.9±0.1			1.0±0.0			1.0±0.1			1.0±0.1			
<i>Cenococcum geophilum</i>																
Applikationsmenge (AM) in %	200		100		10		1		0,1		0					
Tag	8	29	8	29	8	29	8	29	8	29	8	29				
Azoxystrobin																
Boscalid	0.0	0.0 ^a	0.0	0.2	0.5	1.3	0.9	1.0	0.5	1.0	1.0	1.0				
Tebuconazole	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.9	0.4	1.0	1.3	1.0	1.0	1.0				
Quinoxifen	1.2 ^b	1.0	1.1	1.2 ^b	1.0	0.9	1.2 ^b	0.7	1.2 ^b	1.0	1.0	1.0				
Unbehandelte Kontrollgruppe																
Nullkontrollen	1.0±0.1		1.1±0.1		1.1±0.1		1.1±0.1		1.1±0.1		1.1±0.1					

Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des Myzelwachstums sowohl von dem gewählten Mykobionten als auch dem gewählten Wirkstoff und der eingesetzten Konzentration im Treatment abhing. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in einem weiterführenden Experiment der Einfluss von Formulierungsadditiven dahingehend untersucht, ob eine zusätzliche Hemmwirkung des Myzelwachstums durch die Zusätze in der Formulierung im Gegensatz zum reinen Wirkstoff festzustellen war.

Wirkung der Formulierung Orius[®] und des Wirkstoff Tebuconazol auf ECM

Es wurden Isolate von *Pisolithus arhizus*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Lyophyllum* sp. und *Cenococcum geophilum* sowohl mit dem Wirkstoff Tebuconazol sowie mit einer tebuconazolhaltigen Formulierung (Orius[®]) behandelt.

Pisolithus arhizus behandelt mit Tebuconazol oder Orius[®]

Beide Behandlungen (Wirkstoff und Formulierung) zeigen ein sehr ähnliches Muster im Hemmverhalten auf. Im Vergleich zur Behandlung mit Orius[®] konnte für die Behandlung mit Tebuconazol bei 0,1%AM noch ein geringes Myzelwachstum gezeigt werden. Dieses war jedoch ebenfalls bereits signifikant im Vergleich zur entsprechenden Lösungsmittelkontrolle gehemmt. Für alle anderen Konzentrationslevels konnte kein Myzelwachstum beobachtet werden. Alle Lösungsmittelkontrollen und Nullkontrollen zeigten einen stetigen Myzelzuwachs über den gesamten Versuchszeitraum.

Cenococcum geophilum behandelt mit Tebuconazol oder Orius[®]

Für das Konzentrationslevel 100%AM Tebuconazol wurde zu Beginn eine totale Hemmung des Wachstums beobachtet. Auf den Platten dieses Konzentrationsniveaus wurde jedoch nach 22 Tagen ein sehr leichtes und feines Myzelwachstum beobachtet. Die Struktur des Myzels war sehr viel feingliedriger als die Myzelstruktur der dazugehörigen Lösungsmittelkontrolle. Die Lösungsmittelkontrollen 100%AM und 200%AM Orius[®] konnten aufgrund von Dosierungsproblemen nicht zur Auswertung der exponierten Proben herangezogen werden. Daher konnte keine Normierung durchgeführt und die Daten für Orius[®] nicht ausgewertet werden.

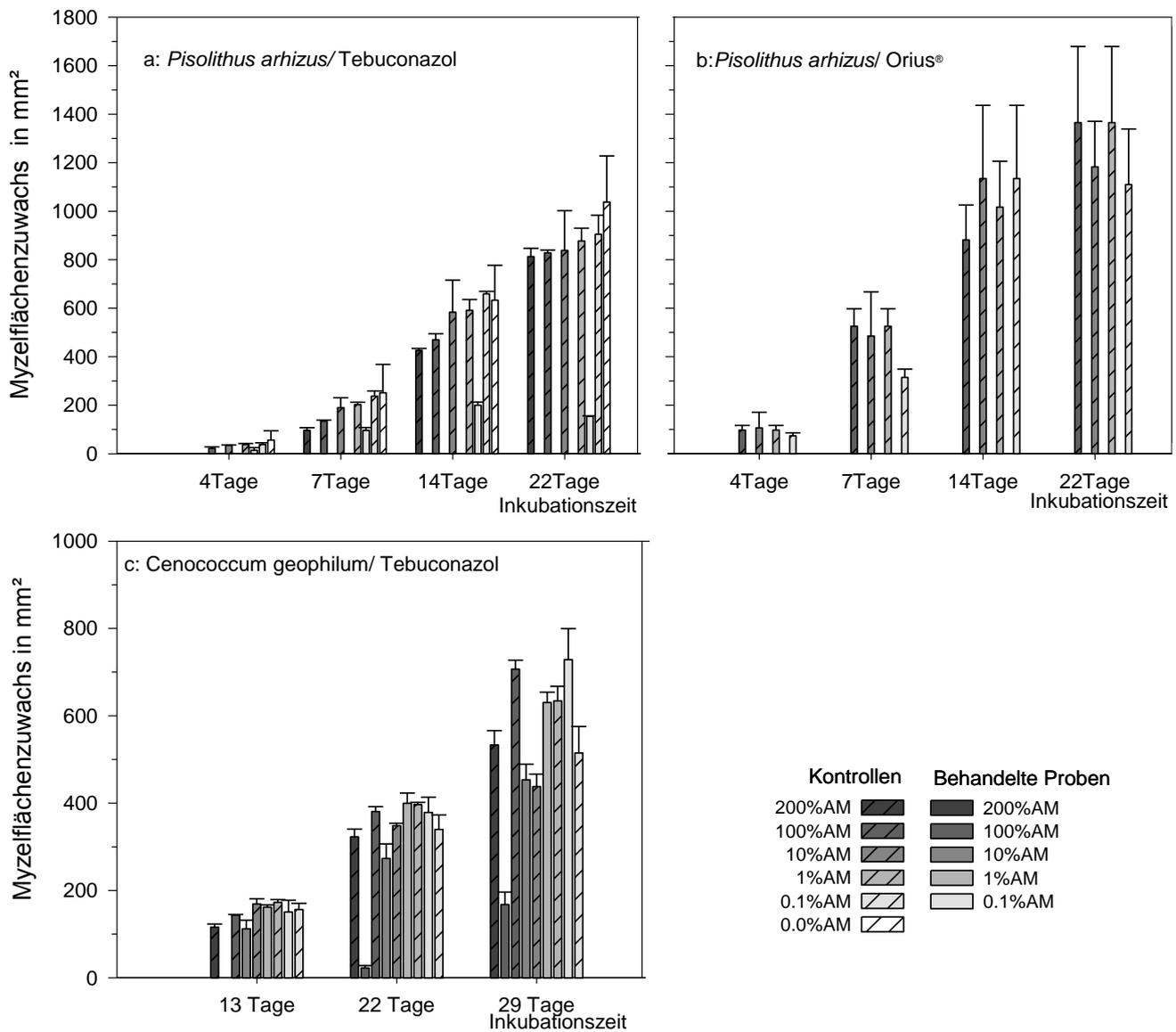


Abbildung 37: Myzelzuwachs in Anhängigkeit der Konzentration von Pestiziden im Nährmedium

a: *Pisolithus arhizus*/ Tebuconazol; b: *Pisolithus arhizus*/ Orius®; c: *Cenococcum geophilum*/ Tebuconazol;

Die Dosis korreliert mit der Intensität der Färbung. Kontrollproben: Null- und Lösungsmittelkontrollen sind mit Schraffur dargestellt. Fehlende Balken bedeuten eine absolute Hemmung des Myzelwachstums im Modellsystem. Das Wachstum der exponierten Isolate wurde normiert auf das Wachstum der Lösungsmittelkontrollen. (N=3, BAF Medium)

Hebeloma crustuliniforme behandelt mit Tebuconazol oder Orius®

Für den Zeitpunkt 7 Tage wurde ein nahezu identischer Mittelwert für das Myzelwachstum bei 0,1% AM sowohl für die Exposition mit Orius® wie auch mit Tebuconazol ermittelt.

Alle Lösungsmittel- und Nullkontrollen weisen ein durchgängiges Wachstum auf. Bis zu einer Versuchsdauer von 22 Tagen waren alle behandelten Proben im Vergleich zu den jeweiligen Lösungsmittelkontrollen signifikant ($p < 0,001$) gehemmt. Für Tebuconazol wurde eine totale Hemmung über alle Versuchszeiträume bereits bei 1% AM beobachtet. Diese wurde für Orius® erst größer 10% AM beobachtet.

Lyophyllum sp. behandelt mit Tebuconazol oder Orius®

Die entsprechend 100% und 200% AM Proben wiesen eine komplette Wachstumshemmung auf.

Die Nullkontrollen und Lösungsmittelkontrollen wiesen signifikante ($p < 0,001$) Unterschiede im Myzelwachstum ab einer Versuchsdauer von 7 Tagen auf. Die zu beobachtende Stimulanz des Myzelwachstums bei 0,1% AM für Orius® und Tebuconazol, bzw. 1% bei Orius® war bezogen auf die dazugehörige Lösungsmittelkontrolle nicht aber bei einem Bezug auf die Nullkontrolle zu sehen. Somit konnte gegenüber der Nullkontrolle eine Hemmung beobachtet werden. Die Lösungsmittelkontrollen zeigten ab 13 Tage, dass das Myzelwachstum bezogen auf die Nullkontrollen um etwa die Hälfte reduziert war. Dieser Trend zeichnete sich bereits nach 7 Versuchstagen ab. Es scheint somit zu einer Beeinträchtigung des Myzelwachstums von *Lyophyllum* durch die Zugabe von Acetonitril in der Lösungsmittelkontrolle zu kommen. Für alle Versuchszeiten konnte somit eine Beeinflussung des Myzelwachstums durch die Zugabe von Acetonitril zu den Lösungsmittelkontrollen im Vergleich zur unbehandelten Nullkontrolle gezeigt werden. Somit wies für *Lyophyllum* bereits die Zugabe von Acetonitril eine wachstumsreduzierende Eigenschaft auf.

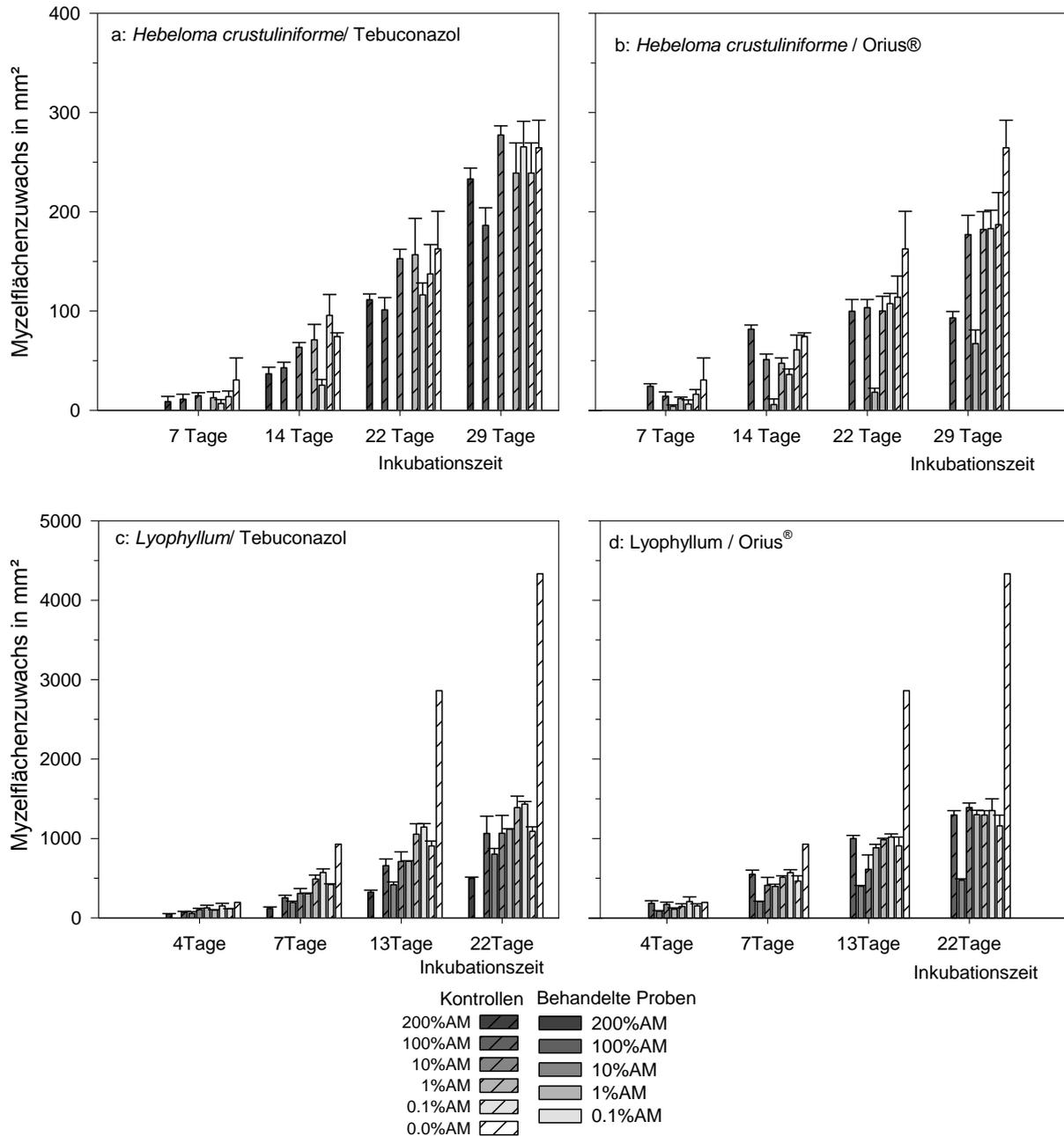


Abbildung 38: Myzelzuwachs in Anhängigkeit der Konzentration von Pestiziden im Nährmedium

a: *Hebeloma crustuliniforme* / Tebuconazol; b: *Hebeloma crustuliniforme* / Orius®; c: *Lyophyllum* / Tebuconazol; d: *Lyophyllum* / Orius®

Die Dosis korreliert mit der Intensität der Färbung. Kontrollproben: Null- und Lösungsmittelkontrollen sind mit Schraffur dargestellt. Fehlende Balken bedeuten eine absolute Hemmung des Myzelwachstums im Modellsystem. Das Wachstum der exponierten Isolate wurde normiert auf das Wachstum der Lösungsmittelkontrollen. (N=3, BAF Medium)

Zusammenfassung

Bei der gewählten Platten-Methode war die Bewertung der Beeinflussung des Myzelwachstums einer behandelten Probe im Vergleich zur Kontrolle quantitativ unmittelbar möglich.

In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der Versuche bezüglich der Auswirkungen auf die Applikation mit dem Wirkstoff Tebuconazol und der Formulierung Orius® auf *Pisolithus arhizus*, *Cenococcum geophilum*, *Hebeloma crustuliniforme* und *Lyophyllum* dargestellt. Die farbigen Unterlegungen zeigen, ob eine signifikante Hemmung im Myzelwachstum im Vergleich zur gewählten Kontrolle gezeigt werden konnte (rot, $p < 0,001$) oder ob das Wachstum bezogen auf die gewählte Kontrolle nicht signifikant beeinträchtigt war (grün, $p > 0,05$). Orange wurde gewählt, um eine signifikante Hemmung im Bereich von $0,05 \leq p \leq 0,001$ darzustellen. Wenn die Lösungsmittelkontrollen im Bezug zur Nullkontrolle bereits eine Hemmung im Myzelwachstum aufwiesen, wurden die entsprechenden Farben durch Farbverläufe gekennzeichnet.

Die gewählte Plattenmethode eignete sich für eine Auswertung des Einflusses auf den Endpunkt Myzelwachstum.

Die Versuche wurden dahingehend ausgewertet, welche ECM-Symbionten in den Expositionsversuchen verwendet werden sollten. Zunächst wurde mit der Plattenmethode das Myzelwachstum von *Pisolithus arhizus* und *Cenococcum geophilum* nach einer Exposition mit jeweils einem der Wirkstoffe aus der landwirtschaftlichen Zulassung (Tebuconazol und Azoxystrobin) mit zwei Wirkstoffen aus der Forst/Baumschulzulassung (Boscalid und Quinoxifen) verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Hemmwirkung der Wirkstoffe artspezifisch und konzentrationsabhängig sind. Die stärkste Hemmwirkung zeigte dabei der Wirkstoff Tebuconazol auf das Myzelwachstum von *Pisolithus arhizus*. Für Azoxystrobin konnte in Kombination mit *Pisolithus arhizus* gezeigt werden, dass die anfängliche Hemmung über den Versuchszeitraum abnimmt, folglich nicht von einer Abtötung des Myzels auszugehen ist. Möglicherweise ist eine Anpassung des Organismus an die Lebensbedingungen die Ursache.

Tabelle 19: Auswirkung der Formulierung und des Wirkstoffes auf vier ECM-Myzelkulturen

Applikation der Substanzen und des Lösungsmittels in das Medium. Dabei sind Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der Lösungsmittelkontrollen zu beobachten. Daher wurde für die folgenden Versuche die Substanz in das Nährmedium eingearbeitet.

Die unterschiedlichen Applikationsmengen entsprechend der tatsächlichen Applikation auf dem Feld und wurden auf die Applikation pro Versuchsfläche berechnet. 100% AM entsprechen einer Applikation auf dem Feld mit der vom Hersteller empfohlenen Aufwandmenge pro Hektar.

Es wird das Verhältnis der exponierten Myzelflächen zur Lösungsmittelkontrolle dargestellt. Null bedeutet hierbei eine absolute Hemmung, 1 keine Hemmung und Werte >1 ein stimuliertes Wachstum bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle.

- Signifikante Wachstumshemmung bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle ($p < 0,001$)
- Wachstumshemmung bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle $0,05 \leq p \leq 0,001$
- Keine signifikante Wachstumshemmung bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle ($p > 0,05$),
- Lösungsmittelkontrolle zeigt Wachstumshemmung gegenüber der Nullkontrolle und ggf. Myzelwachstum stimuliert gegenüber der Lösungsmittelkontrolle, nicht jedoch auf die Nullkontrolle.
- Ausfall von Platten im Versuch. Auffälliges Myzelwachstum

Applikationsmenge (AM) in %	200					100					10					1					0.1					0	
<i>Pisolithus arhizus</i>																											
days	4	7	13	22	29	4	7	13	22	29	4	7	13	22	29	4	7	13	22	29	4	7	13	22	29		
Tebuconazole _{a.i.}	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.4	0.3	0.2	0.0	1.0
Tebuconazole _{Formulierung}	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0
<i>Lyophyllum ssp.</i>																											
days	4	7	13	22	29	4	7	13	22	29	4	7	13	22	29	4	7	13	22	29	4	7	13	22	29		
Tebuconazole _{a.i.}	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.4	0.4	0.6	0.8	1.1	0.7	0.8	1.0	1.2	1.3	1.4	1.3	1.3	1.4	1.0	1.0
Tebuconazole _{Formulierung}	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.6	0.6	0.8	1.0	1.3	0.6	0.7	0.8	0.9	1.3	1.4	1.3	1.3	1.4	1.0	1.0
<i>Hebeloma crustuliniforme</i>																											
days		7	13	22	29		7	13	22	29		7	13	22	29		7	13	22	29		7	13	22	29		
Tebuconazole _{a.i.}		0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0		0.5	0.3	0.8	1.1	1.0	1.0
Tebuconazole _{Formulierung}							0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.1	0.2	0.4		0.4	0.6	0.9	1.0	1.0	1.0
<i>Cenococcum geophilum</i>																											
days			13	22	29			13	22	29			13	22	29			13	22	29			13	22	29		
Tebuconazole _{a.i.}			0.0	0.0	0.0			0.0	0.1	0.2			0.7	0.8	1.0			0.9	1.0	1.0			1.0	1.1	1.4	1.0	1.0
Tebuconazole _{Formulierung}																											

Aus den Versuchen wurden folgende Wirkstoffe und Organismen für die Gewächshausversuche ausgewählt:

Tebuconazol, ein häufig in der Landwirtschaft eingesetztes Fungizid, wurde als Modellsubstanz für die Nichtzielapplikation ausgewählt, da ein erheblicher Einfluss der Substanz auf den gewählten Endpunkt (Hemmung des Myzelwachstums) gezeigt werden konnte.

Des Weiteren wurde für die Zielanwendung in Baumschulen und Forstwirtschaft das Fungizid Boscalid als Modellsubstanz ausgewählt, da dieser Wirkstoff im Vergleich mit Quinoxifen ein höheres Schädigungspotenzial aufwies.

Eine hohe Absatzmenge und ein potentes Schädigungsverhalten der Substanzen waren wichtige Auswahlkriterien, da im weiteren Verlauf der Versuche auch das Gefährdungspotenzial der Substanzen im Hinblick auf das Myzelwachstum abgeschätzt werden sollte.

Aufgrund der beschriebenen Versuche wurden *Pisolithus arhizus* als ein sensibler Organismus sowie *Cenococcum geophilum* als ein robuster Organismus für das Gewächshaus-Testsystem ausgewählt. *Hebeloma crustuliniforme* wie auch *Lyophyllum* zeigten ein deutlich reduziertes Myzelwachstum bereits aufgrund des Zusatzes von Acetonitril als Lösungsvermittlers und wurden u.a. deshalb aus den Effektversuchen ausgeschlossen.

Aufgrund der besseren Übertragbarkeit wurde in den Gewächshausversuchen mit der Formulierung anstatt mit den Reinsubstanzen gearbeitet.

5.1.2.2.4 Konzentrations- Wirkungskurven

Zur Vergleichbarkeit der Konzentrations - Wirkungskurven untereinander, werden in diesem Abschnitt die Applikationsmengen bezogen auf die Versuchsflächen in Prozent auf der Konzentrationsachse dargestellt. Somit können die Substanzen in Beziehung zueinander betrachtet werden und die Steigungen der Kurvenverläufe im Wendepunkt verglichen werden. Die Steigung wird neben dem Wendepunkt als Kenngröße für die Beurteilung der Wirkung der Substanz auf den jeweiligen Testorganismus ausgewertet. Eine Berechnung und Bewertung der ökotoxikologischen Kennzahlen wird unter Kapitel 5.3 dargestellt und diskutiert.

Cenococcum geophilum

Wirkstoff Tebuconazol und Formulierung Orius®: In Abbildung 39–A sind die Steigungen der Proben mit Tebuconazol und Orius® dargestellt. Die Steigungen im linearen Bereich der beiden Kurven sind mit $m = 2,04$ für die mit Wirkstoff behandelten Isolate und mit $m = 2,08$ für die Isolate mit Orius® behandelt, vergleichbar. Jedoch wurde eine Verschiebung der Kurve beobachtet. Die Formulierung zeigte eine stärkere Hemmwirkung auf das Myzelwachstum als Tebuconazol als Reinsubstanz.

Boscalid: Die Konzentrations - Wirkungskurve für eine Behandlung mit Boscalid ($t = 12$ Tage) ist in Abbildung 39–B dargestellt. Die Steigung der Kurve im linearen Bereich beträgt $m = 1,17$.

Pisolithus arhizus

Formulierung Orius® mit und ohne Glasfaserfilter: Aufgrund der Versuche zur Aufnahme der Substanz in das Myzel für die Proben mit und ohne Glasfaserfilter wurde das Flächenwachstum dokumentiert. Es fiel auf, dass Isolate die auf dem Glasfaserfilter wuchsen, eine geringere Hemmung aufwiesen. Die gezeigten Konzentrations- Wirkungsverläufe Abbildung 39-C zeigen, dass trotz der gewählten geringen Applikationsmengen für keine Verdünnungsstufe ein ungehemmtes Myzelwachstum erreicht werden konnte. Somit war der Verdünnungsbereich für dieses Modellsystem ungünstig gewählt, wurde aber aus Handhabungsgründen nicht geringer angesetzt. Die Fehlerbalken resultieren aus dem Wachstum eines Isolats im Treatment.

Formulierung Collis®: In Abbildung 39-D werden für die Versuchszeitpunkte 14 Tage und 21 Tage die Konzentrations- Wirkungsbeziehungen dargestellt. Die Steigung der Kurve im linearen Bereich für $t = 14$ Tage beträgt $m = 1,11$. Für den Versuchszeitraum $t = 21$ Tage war ein fast identischer Kurvenverlauf ($m = 1,03$) zu beobachten. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die zu beobachtende Hemmung im Myzelwachstum von einer dauerhaften Beeinflussung des Wachstums herbeigeführt wurde.

Herbizid Basta®: Neben den untersuchten Fungiziden wurde auch ein Herbizid untersucht (Abbildung 39-E). Zu beobachten war der nahezu identische Kurvenverlauf für die Behandlungsdauer von 14 und 21 Tagen und somit zeigte sich auch für beide Zeitpunkte eine ähnliche Steigung im linearen Bereich. So betrug die Steigung für die Versuchsdauer von 14 Tagen $m = 1,02$ und für 21 Tage $m = 1,03$.

In Abbildung 39-F sind die Konzentrations - Wirkungskurven für das Fungizid Collis® und das Herbizid Basta® aufgetragen. Es wird ersichtlich, dass trotz ähnlicher Steigungen der beiden Kurven eine nicht unerhebliche Verschiebung der Graphen zu beobachten ist. Aufgrund der EC_{50} Werte (vgl. Kap. 5.3.1) geht von dem Herbizid Basta® ein größerer ökotoxikologischer Effekt aus.

Eine Bewertung der Konzentrations-Wirkungskurven wird in Kap. 5.3 vorgenommen.

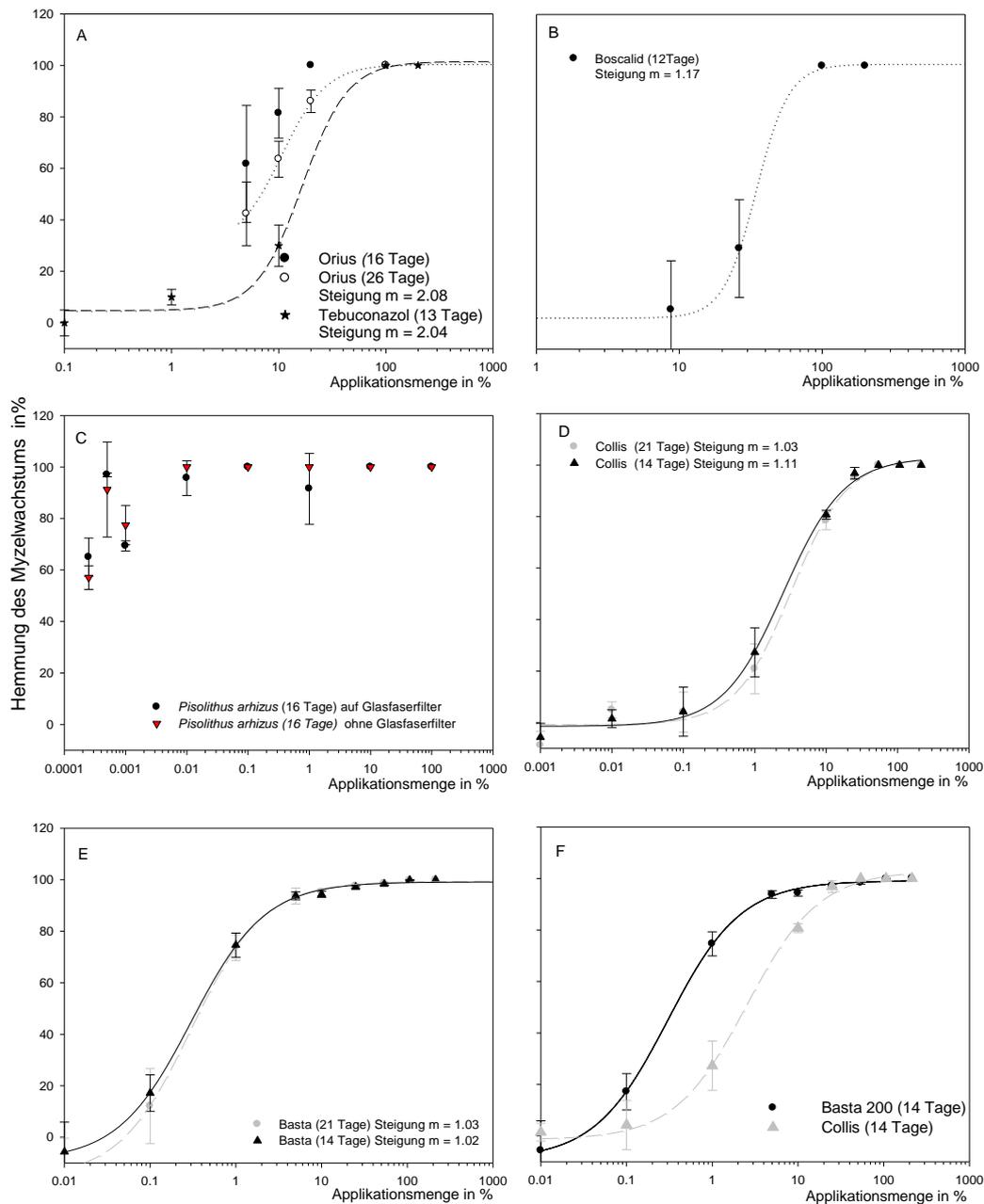


Abbildung 39: Konzentrations-Wirkungskurve für *Cenococcum geophilum* (A,B) und *Pisolithus arhizus* (C-F) mit Wirkstoffen und Formulierungen behandelt.

Die exponierten Proben wurden auf BAF Nährmedium kultiviert und auf die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen. Versuchsdauer: VD

A: Tebuconazol und Formulierung Orius®

Tebuconazol: VD: 13 Tage (N=3) $R^2 = 0.9949$; Orius: VD: 16 und 26 Tage (N=6);

B: Boscalid VD: 12 Tage (N=3) $R^2 = 0.9949$.

C: Orius® VD: 16Tage mit und ohne Glasfaserfilter (N=6) kultiviert)

D: Collis® VD 14 $R^2 = 0.994$ und 21 Tage $R^2 = 0.998$ (N=9);

E: Basta® VD 14 $R^2 = 0.9998$ und 21 Tage $R^2 = 0.9995$. Die leichte Stimulanz des Myzelwachstums (ersichtlich anhand der negativen Hemmwirkung) ist auf eine nicht signifikante Wachstumssteigerung des Myzels begründet;

F Vergleich Collis® und Basta® VD: 14 Tage

5.1.2.2.5 Bestimmung von Tebuconazol im Myzel von *Pisolithus arhizus*

Es wurden Messungen von Tebuconazol im Myzel von ECM Isolaten nach Exposition durchgeführt, um zu untersuchen ob die Wirkstoffe bioverfügbar im Nährmedium für das Isolat vorliegen. Aufgrund des Wachstumsverhaltens des auf den Filtern wachsenden Myzels, wie in Abbildung 40 dargestellt, war nicht die gesamte Myzelfläche in Kontakt mit dem Nährmedium und somit der Exposition ausgesetzt. Die Kontaktstellen sind stark örtlich begrenzt und weisen auch nur eine punktuelle Berührungsstelle mit dem Medium auf. Die für *Pisolithus arhizus* charakteristische Absonderung von Exsudaten ist auf ein Minimum reduziert.

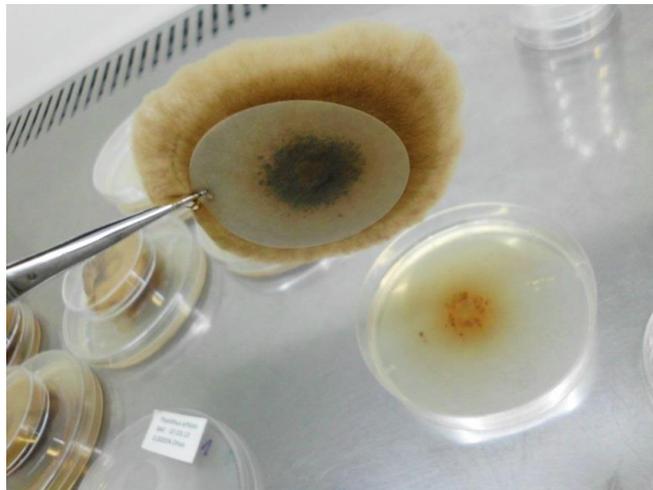


Abbildung 40: Myzelfläche *Pisolithus arhizus* auf Glasfaserfilter kultiviert

Zu sehen ist, dass das Myzel nur eine kleine Kontaktfläche zum behandelten Nährmedium aufweist. Ebenfalls ist auf dem Medium zu sehen, dass die für *Pisolithus arhizus* typische Verfärbung des Myzels aufgrund von Exsudaten stark eingeschränkt ist und sich nur auf ganz vereinzelte, punktförmige Bereiche begrenzt.

In Abbildung 41 werden die gemessenen Wirkstoffgehalte, die Gesamtmassen der Isolate (FG) und die zur Extraktion eingesetzten Massen in Abhängigkeit zur Applikationsmenge dargestellt. Es wurde für theoretische Aufwandmengen größer 0,01% AM eine absolute Inhibition des Wachstums beobachtet. Der Fehlerbalken im Bereich von 0,001% Applikationsniveau wird durch ein abweichendes Wachstumsverhalten eines Isolates im Treatment begründet. Dargestellt wird der Wirkstoffgehalt im tatsächlich extrahierten Myzel.

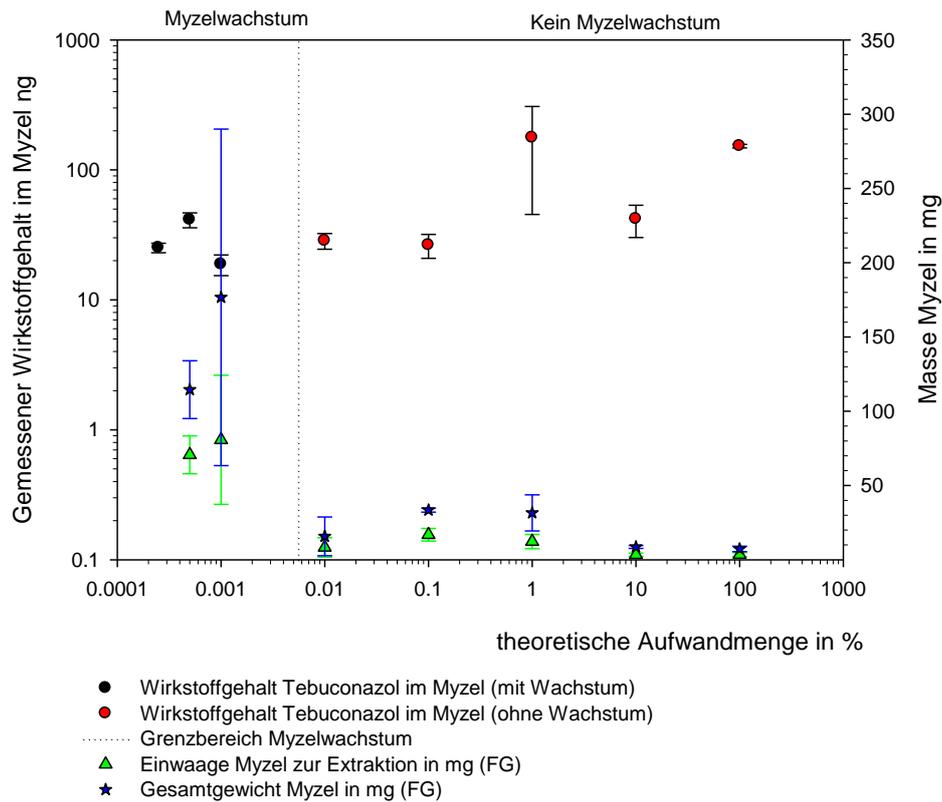


Abbildung 41: Gemessene Wirkstoffgehalte von Tebuconazol im Myzel von *Pisolithus arhizus* sowie der Myzel Biomasse

Es wurde auf Glasfaserfilter gewachsenes Myzel nach 34 Tagen extrahiert. Es werden neben den gemessenen Wirkstoffgehalten von Tebuconazol die Einwaagen des Myzeliums und das Gesamtgewicht der Isolate dargestellt.

Wurden die ermittelten Gehalte an Tebuconazol auf das gesamte Myzelium des Isolates berechnet, so zeigte sich, dass ein rechnerischer Überbefund der Gehalte im Vergleich zur tatsächlich ins System eingebrachten Substanzmenge vorliegen würde. Es wird davon ausgegangen, dass keine homogene Verteilung der Substanzen im Myzel gegeben war. Somit wurden nur die Gehalte im Myzel des tatsächlich analysierten Myzels in der graphischen Darstellung verwendet. Da die gemessenen Konzentrationen sich in der Größenordnung der Nachweisgrenze für die Substanz bewegten, wird auf eine quantitative Bewertung der gefundenen Konzentrationen verzichtet. Jedoch zeigte dieser Nachweis von Tebuconazol im Myzel von *Pisolithus arhizus*, dass für diese Substanz eine Bioverfügbarkeit angenommen werden muss. Die genauen Verteilungsvorgänge im Myzel sind jedoch noch unbekannt. Möglicherweise war der Mykobiont fähig, Tebuconazol als Kohlenstoffquelle zu nutzen und zu verstoffwechseln. Das Potenzial organische Verbindungen zu nutzen wurde bereits von Diaz et al. [2003] und Laatikainen und Heinonen-Tanski [2002] vermutet.

5.2 Expositionsversuche zur Konzentrationsbestimmung von Pestiziden in den Kompartimenten Boden, Wurzelnaher Boden und Wurzel

Für die Expositionsversuche wurden Topfversuche mit einer simulierten Gießapplikation im Gewächshaus durchgeführt. Die untersuchten Formulierungen Collis[®] und Orius[®] werden unter Realbedingungen nicht per Gießapplikation ausgebracht, dieses abweichende Vorgehen wurde jedoch gewählt, um eine Massenbilanz für die Wirkstoffe vornehmen zu können.

Trockenmassebestimmung des verwendeten Substrates

Die Trockenmassebestimmung (vgl. unter 4.3.5.1 S. 61) für das untersuchte und im Gewächshausversuch verwendete Substrat betrug $11,0 \pm 0,8$ g während das Frischgewicht $30,6 \pm 2,1$ g betrug. Somit ergibt sich ein Wassergehalt von etwa 36 %. Die Feldkapazität betrug 2,8 g Wasser pro Gramm Substrat. Im Folgenden wird mit dem Frischgewicht der Böden gearbeitet.

Aufgrund der Feldkapazität und der Tatsache, dass für die Gewächshausversuche eine Trockenperiode von einem Tag nach Exposition von 1,5 ml Flüssigkeit eingehalten wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass keine signifikanten Substanzmengen bereits zu Beginn des Versuches aus dem System ausgetragen wurden. Die Messungen der Konzentrationen im Bodenbereich zeigten zudem zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Substanzverluste aus dem Bodenkörper.

5.2.1 Biometrische Pflanzenparameter

Alle Pflanzen waren an dem gewählten Probenahmezeitpunkt nach 14 Tagen im Blattstadium 2-3 Blätter und Knospenansätze.

Bestimmung des Ergosterolgehaltes in Wurzelproben

Abbildung 42 zeigt zwei Chromatogramme auf der Wellenlänge $\lambda = 282,5$ nm, sowohl für eine Kontrollprobe (mit *Pisolithus arhizus* inokulierte Wurzel einer Buchenjungpflanze ohne Pestizidexposition) wie auch für eine Probe aus dem Treatment Buchenjungpflanze (mit *Pisolithus arhizus* inokuliert und mit dem Konzentrationslevel 10 % AM mit Orius[®] behandelt). Im Retentionsbereich von 1-3 min zeigt sich ein nahezu identisches Muster im Chromatogramm. In der Vergrößerung des Messbereichs von 3-6 Minuten zeigte sich für die Kontrollprobe ein kleiner Peak auf der Retentionszeit von Ergosterol. Die Fungizide Tebuconazol und Boscalid zeigen keine Substanzpeaks auf der zur Detektion von Ergosterol eingesetzten Wellenlänge von $\lambda = 282,5$ nm.

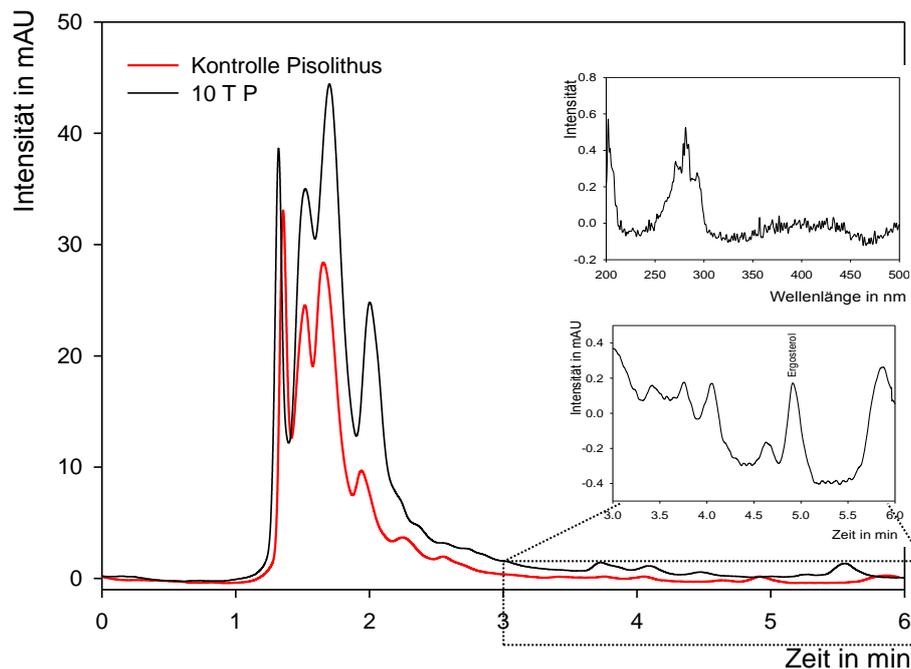


Abbildung 42: Vergleich Treatmentprobe(10 TP) und Kontrollprobe

10 TP: Wurzelprobe mit *Pisolithus arhizus* inokuliert. Behandelt mit 10% AM Orius®. Die Kontrolle wurde nur mit *Pisolithus arhizus* behandelt ohne Exposition. Ebenfalls ist der Ausschnitt von 3-6 min im Chromatogramm vergrößert dargestellt und das Spektrum des Ergosterolpeaks bei 4.914 min der Kontrolle.

Die gemessenen Ergosterolgehalte der Proben werden im Anhang (Abbildung 52 , S. 155) dargestellt. Für fast alle Proben lag die gemessene Ergosterolkonzentration unterhalb der Bestimmungsgrenze. Der über alle behandelten Proben ermittelte Ergosterolgehalt betrug für *Pisolithus arhizus* $4.5 \pm 1.6 \mu\text{g g}^{-1}$ DW und für *Cenococcum geophilum* $3.2 \pm 1.5 \mu\text{g g}^{-1}$. Eine signifikante Zunahme des Ergosterolgehaltes konnte nicht gezeigt werden.

Wie im Anhang (vgl. 9.3) gezeigt variiert jedoch bereits der Ergosterolgehalt aufgrund des eingesetzten Nährmediums. Ein unmittelbarer Vergleich der Gehalte über verschiedene Versuchsaufbauten ist somit nicht zulässig. Darüber hinaus wird davon ausgegangen, dass der Versuchszeitraum von 14 Tagen nicht ausreichend war, um eine quantifizierbare Mykorrhizierung der Buchenjungpflanzen über diesen Biomarker nachzuweisen. Der Zuwachs an neuer pilzlicher Biomasse war demnach nicht ausreichend, um signifikante Zunahmen am Ergosterolgehalt zu identifizieren. Martin et al [1990] untersuchten für eine Kolonisation von *Eucalyptus globulus* mit *Pisolithus tinctorius* den Ergosterolgehalt während der ersten 7 Tage nach Exposition und zeigten, dass die Besiedlung der Wurzeln innerhalb von einem Tag nach Infektion nachweisbar war und nach 4 Tagen ein Maximum erreicht. Jedoch wird in der Literatur für

Feldversuche auch gezeigt, dass für den Ergosterolgehalt möglicherweise eine Abhängigkeit von Vegetationszeiten und eine jahreszeitenabhängige Dynamik für Buchenfeinwurzeln beobachtet werden kann [Börner 2003]. Kreuzwieser und Rennenberg [1998] konnten für 18-20 Wochen alte, inokulierte (*L. laccata* und *P. involutus*) Buchenjüngpflanzen einen Ergosterolgehalt von 90 – 125 $\mu\text{g g}^{-1}$ ermitteln. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte eine Quantifizierung der Beeinflussung der Mykorrhizierung mittels Biomarkers nicht etabliert werden. Möglicherweise könnte ein Aufreinigungsschritt zu einer Verbesserung der Detektion und Reduzierung der Nachweisgrenzen für den Analyten führen.

Die mikroskopische Untersuchung der Wurzeln ergab für *Cenococcum geophilum* jedoch eindeutige mykorrhizale Mantelstrukturen an den Feinwurzeln.

Sprosslänge und Sprossbiomasse

Für die Kontrollansätze und die Treatments konnten keine signifikanten Veränderungen im Sprosswachstum oder im Sprossgewicht gezeigt werden. Das mittlere Sprosswachstum über alle Treatments betrug $9,8 \pm 1,8$ cm (Abbildung 43-a). Die durchschnittliche Sprossbiomasse über alle Treatments betrug $0,79 \pm 0,2$ g Frischgewicht (Abbildung 43-c)

Wurzellänge und Wurzelgewicht

Für die Kontrollansätze und die behandelten Treatments konnten keine signifikanten Veränderungen der Wurzellänge oder im Wurzelgewicht gezeigt werden. Die mittlere Wurzellänge über alle Treatments betrug $13,99 \pm 3,27$ cm (Abbildung 43-b). Das mittlere Wurzelgewicht über alle Treatments betrug $0,29 \pm 0,13$ g Frischgewicht (Abbildung 43-d). Obwohl in den Daten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der behandelten Proben zu den Kontrollen gezeigt werden konnte, zeichnete sich doch für den Parameter Wurzelgewicht ein Trend ab. Die Kontrollen von nicht-mykorrhizierten Buchenwurzeln wiesen im Vergleich zu mykorrhizierten Treatments um etwa 50 % weniger Gewicht auf. Ob dieses auf eine Mykorrhizierung der Feinwurzeln zurückzuführen ist, kann aufgrund der kurzen Versuchsdauer und der nicht eindeutigen Ergebnisse aus der Ergosterolbestimmung nicht abschließend geklärt werden.

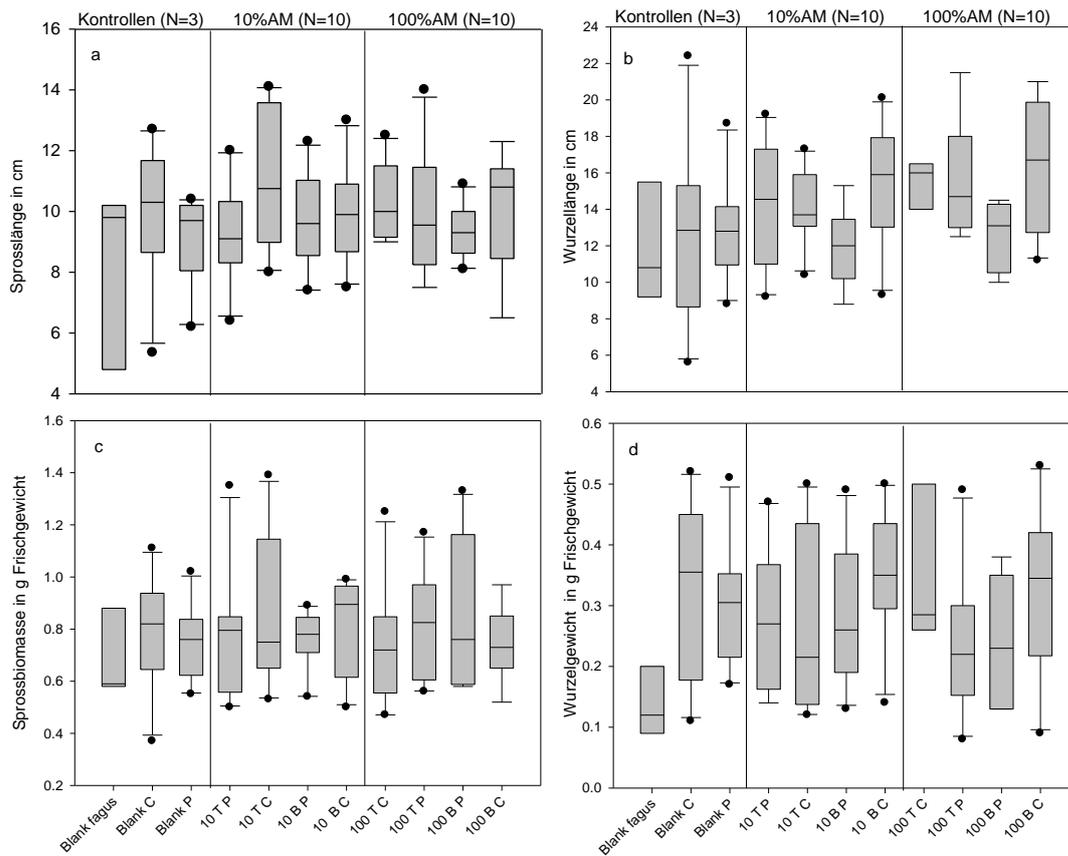


Abbildung 43: Biometrische Pflanzenparameter nach 14 Tagen Versuchszeitraum

**a: Sprosslänge der Buchenjungpflanzen; b: Wurzellänge der Buchenjungpflanzen
c: Sprossbiomasse der Buchenjungpflanzen ; d: Wurzelgewicht der Buchenjungpflanzen**

mit C: *Cenococcum geophilum*, P: *Pisolithus arhizus*, B: Boscalid (mit Collis® behandelte Proben), T: Tebuconazol (mit Orius® behandelte Proben) 10: Applikationsniveau entsprechend 10%AM, 100: Applikationsniveau entsprechend 100%AM. Als Blank sind die Kontrollproben ohne Fungizidapplikation bezeichnet.

5.2.2 Pestizidkonzentrationen in den Kompartimenten Boden, Wurzelnaher Boden und Wurzeln nach Exposition

5.2.2.1 Kontrollen zu den Treatments der Gewächshausversuche

In den Kontrollen 10% AM und 100% AM Collis[®] konnten die Wirkstoffe Boscalid und Kresoxim-Methyl nachgewiesen werden. Für die entsprechenden Kontrollen zu 10% AM und 100% AM Orius[®] war Tebuconazol als Wirkstoff nachweisbar. Eine Quer-Kontamination zwischen den Proben wurde somit ausgeschlossen. In allen Kontrollen ohne Exposition konnten keine Substanzen nachgewiesen werden. Eine Hintergrundbelastung der Systeme konnte somit ebenfalls ausgeschlossen werden.

5.2.2.2 Vergleich der absoluten Wirkstoffgehalte der Kontrollen mit Exposition zu den kumulierten Gehalten von Boden, Wurzelnaher Boden und Wurzeln der Treatments

In den Abbildung 44-(A-C) werden die gemessenen Gehalte für die entsprechenden Wirkstoffe in den Bodenkontrollproben ohne Phytobiont aus den Gewächshausversuchen (Kontrolle 3-6) sowie die kumulierten Gehalte aus den Kompartimenten Boden, Wurzelnaher Boden und Wurzeln der entsprechenden Treatments (vgl. Tabelle 12) dargestellt.

Collis[®]-10% AM

In Abbildung 44-A sind die Gehalte für die Exposition mit Collis[®] (Wirkstoffe: Boscalid und Kresoxim-Methyl) für das Applikationslevel 10% AM dargestellt. Die Mittelwerte der Kontrollen zeigen für Boscalid mit $8,42 \pm 2,6 \mu\text{g}$ pro Topf keine signifikanten Unterschiede zu den kumulierten Gehalten der inokulierten Treatments. Wohl aber ist eine Abweichung gegenüber dem rechnerischen 10 % AM Gehalt zu sehen. Für Kresoxim-Methyl konnten in den Bodenproben mit Exposition $1,65 \pm 0,4 \mu\text{g}$ pro System nachgewiesen werden. Diese Kontrollproben sowie die inokulierten Bodenproben zeigen keine signifikanten Unterschiede im Wirkstoffgehalt.

Collis[®]-100% AM

Für die Versuche des höheren Applikationsniveaus (100 % AM) konnte gezeigt werden, dass die berechneten Wirkstoffgehalte für die Treatments mit *Cenococcum geophilum* inokuliert schwach signifikant ($p = 0,02$) und zu den Treatments mit *Pisolithus arhizus* inokuliert sehr stark signifikant ($p < 0,001$) unterschiedlich sind zur Substratkontrolle (vgl. Abbildung 44-B).

Für die Kontrolle im Substrat wurden in drei Töpfe die Wirkstoffgehalte bestimmt sowie aus einem Topf eine Dreifachbestimmung vorgenommen. Zwischen den beiden inokulierten Treatments lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

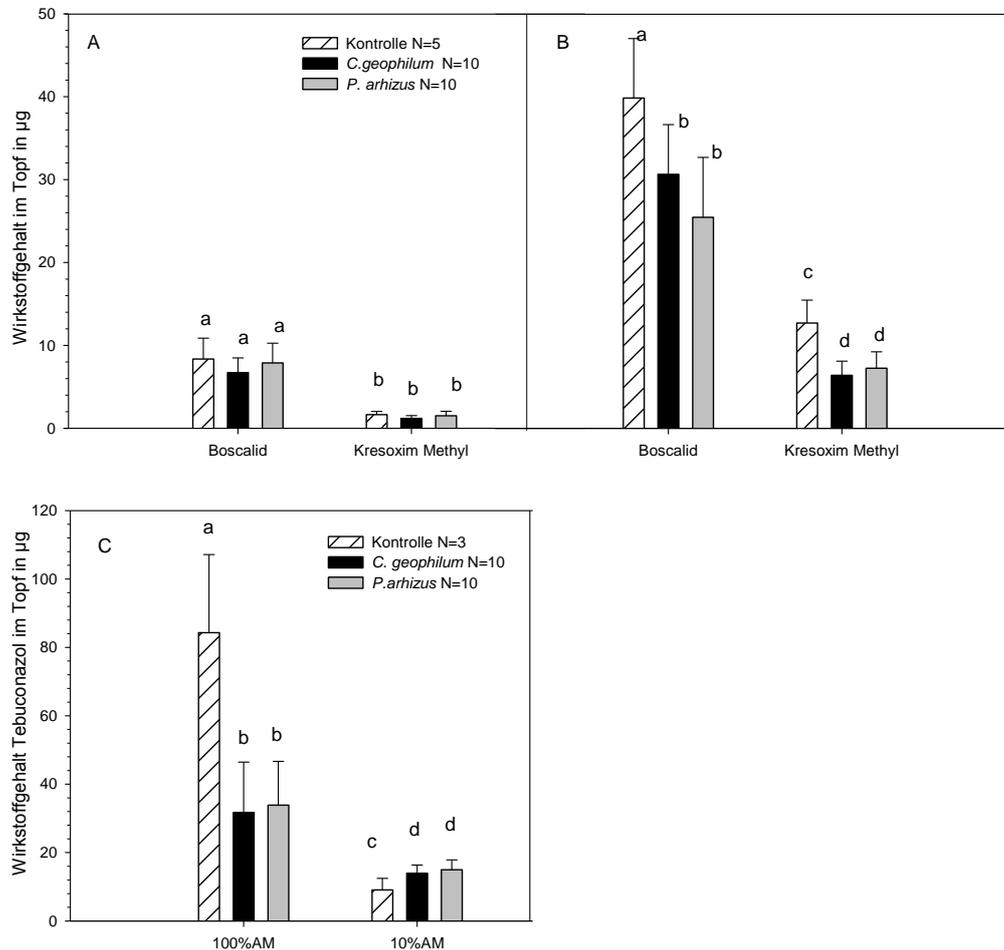


Abbildung 44 Wirkstoffgehalte im Topfsystem nach einmaliger Exposition und Wartezeit von 14 Tagen

A: Boscalid und Kresoxim-Methyl im Applikationsniveau von 10%AM
B: Boscalid und Kresoxim-Methyl im Applikationsniveau von 100%AM
C: Tebuconazol im Applikationsniveau von 100% AM bzw. 10% AM

Kontrolle kennzeichnet die Substratkontrolle ohne Phytobionten nach Exposition. Es wurden für die mit *Cenococcum geophilum* und *Pisolithus arhizus* inokulierten Treatments mit Phytobionten die gemessenen Gehalte in allen drei Kompartimenten aufsummiert. Gleiche Buchstaben sind nicht signifikant unterschiedlich.

Die rechnerischen Wirkstoffgehalte für Boscalid und Kresoxim-Methyl lagen bei einem Applikationsniveau von 100% AM bei 30 µg Boscalid und 15 µg Kresoxim-Methyl pro Probentopf und somit im Bereich der gemessenen Wirkstoffgehalte.

Orius® 10% AM und 100% AM

Für die Exposition mit der Formulierung Orius® sind in Abbildung 44-C für beide Applikationsniveaus sowohl die Kontrollen ohne Phytobionten wie auch die Treatments mit Phytobionten und Mykobionten dargestellt. Die inokulierten Stichproben, welche mit 10% AM behandelt wurden, weichen in ihrem berechneten Wirkstoffgehalt nicht signifikant voneinander ab.

Die Versuche mit dem höheren Applikationsniveau von 100% AM zeigten für Tebuconazol, dass die gemessenen Wirkstoffgehalte in den Töpfen mit *Cenococcum geophilum* und *Pisolithus arhizus* sehr stark signifikant ($p < 0,001$) unterschiedlich sind bezogen auf die Kontrolle im Substrat (vgl. Abbildung 44-C). Zwischen den beiden Pilz-Spezies lagen keine signifikanten Unterschiede vor. Die rechnerischen Wirkstoffgehalte für Tebuconazol lagen bei einem Applikationsniveau von 100 % AM bei 75 µg Tebuconazol pro Probentopf und somit im Bereich der gemessenen Wirkstoffgehalte. Auffällig bei der 100% AM Kontrollgruppe Boden war, dass die ermittelten Gehalte signifikant höher liegen als die Gehalte in den inokulierten Töpfen mit Phytobionten. Die Ursache für diese Abweichung kann durch das gewählte Versuchsdesign nicht eindeutig nachvollzogen werden. Ob, wie von in der Literatur [Meharg und Cairney 2000] beobachtet, eine Bioremediation durch Verstoffwechslung durch den Mykobionten vorliegt, müsste durch weitergehende Forschungen untersucht werden. Aufgrund der Substanzeigenschaften wird Tebuconazol jedoch sowohl als stabil im Boden mit Akkumulationspotenzial sowie als Substanz mit geringem Leaching- und Volatilisations-Potenzial angenommen [European Commission 2008b, Tomlin 2003]. Daher scheint ein Austrag aus dem System unwahrscheinlich.

5.2.2.3 Kompartiment Boden

Es wurden die vorgestellten Extraktions- und Analysemethoden (vgl. Kap.4.3.5.2.7) angewendet und mit einer 1:10 Verdünnung der Extrakte gearbeitet. Diese Verdünnung wurde auch in der Wiederfindung berücksichtigt. Zu jedem Treatment der Bodenprobenbestimmung wurden unmittelbar eine entsprechende Matrixkalibration und entsprechende QC-Standards gemessen. Es wurde jeweils ein Aliquot von etwa 2 g Boden extrahiert und der Wirkstoffgehalt für die gesamte Bodenmasse berechnet.

In Tabelle 20 sind die ermittelten Wirkstoffgehalte pro Topf für die entsprechenden Treatments dargestellt.

Tabelle 20: Gehalte an Substanzen im Bodenkompartment

Es wurden jeweils 10 Replikate der mit *Cenococcum geophilum* und *Pisolithus arhizus* inokulierten Systeme analysiert. Die Exposition erfolgte in Gießapplikation

Nominell	Boscalid in µg pro Topf		Kresoxim Methyl in µg pro Topf		Tebuconazol in µg pro Topf	
	<i>C. geophilum</i>	<i>P. arhizus</i>	<i>C. geophilum</i>	<i>P. arhizus</i>	<i>C. geophilum</i>	<i>P. arhizus</i>
100%AM	29,93±6,33	23,98±6,77	6,29±1,76	7,09±1,98	33,82±10,65	33,89±12,78
10%AM	6,53±1,88	7,73±2,39	1,16±0,35	1,79±1,17	14,49±2,89	13,74±2,38

Für alle analysierten Proben zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Mittelwerte der *Cenococcum geophilum* Treatments im Vergleich zu den *Pisolithus arhizus* Treatments. Im Versuch lagen alle Messergebnisse im Kompartiment Boden oberhalb der jeweiligen Bestimmungsgrenze.

Für die exponierten Gewächshautreatments konnte gezeigt werden, dass die berechneten Wirkstoffgehalte in den Proben für *Cenococcum geophilum* und *Pisolithus arhizus* sich nicht signifikant voneinander unterschieden.

Für Kresoxim-Methyl wurde bei dem geringen 10% Applikationsniveau im Bereich der Bestimmungsgrenzen gemessen. Aufgrund der Unsicherheit in der Analytik von etwa 10 % bei Doppelbestimmungen sind die Fehlerbereiche von 16-35 % im Gewächshausversuch vertretbar. Die Versuche zum Kompartiment Boden zeigten insgesamt eine zufriedenstellende Homogenität der untersuchten Proben.

5.2.2.4 Wurzelnahe Boden

Beim Kompartiment Wurzelnahe Boden wurde mit dem gesamten Bodenmaterial gearbeitet, wenn dieses unter einer Einwaage von 2 g lag. Wurde mehr Bodenmaterial entnommen, wurde ein Aliquot von 2 g extrahiert und der Wirkstoffgehalt berechnet. In Tabelle 21 sind die Ergebnisse in ng pro Topf dargestellt. Ebenfalls wurden Qualitäts-Kontrollstandards (QC) mitgemessen.

Tabelle 21: Gehalte an Substanzen: Wurzelnahes Bodenkompartment

Es wurden Replikate der mit *Cenococcum geophilum* und *Pisolithus arhizus* inokulierten Systeme analysiert. Die Exposition erfolgte in Gießapplikation. (N = 10 für alle Treatments) a: N=3 und b: N=5

Nominell	<i>Boscalid</i> in ng pro Topf		<i>Kresoxim Methyl</i> in ng pro Topf		<i>Tebuconazol</i> in ng pro Topf	
	<i>C. geophilum</i>	<i>P. arhizus</i>	<i>C. geophilum</i>	<i>P. arhizus</i>	<i>C. geophilum</i>	<i>P. arhizus</i>
100%AM	609,5±365,4	1401,3±1073,9	125,4±71,5	155,8±96,3	1122,6±954,0	828,4±478,4
10% AM	214,2±169,3	183,7±184,3	73,8±25,4 ^a	18,1 ±5,5 ^b	146,9±133,1	192,2±145,9

Die Wirkstoffgehalte sind für eine Applikation von 100% der empfohlenen Aufwandmenge bezogen auf die Versuchsfläche noch gut messbar, wenn auch die prozentuale Abweichung um den Mittelwert schwankt.

5.2.2.5 Wurzeln

Im Wurzelkompartment der beprobten Wurzeln wurden die zu analysierenden Substanzen nachgewiesen.



Abbildung 45: Wurzel von *Fagus sylvatica*, inokuliert mit *Cenococcum geophilum*

Wurzeln aufgenommen durch Binokular nach zweimaligen Waschen mit Wasser

Rückstände, welche nach zweimaligem Waschen an der Wurzel verblieben, wurden per Definition dem Wurzelsystem zugerechnet. Eine Trennung in Wurzel und Ektomykorrhiza-Strukturen wurde nicht vorgenommen. Die mykorrhizalen Strukturen wurden komplett der Wurzel zugerechnet.

Tabelle 22: Gehalte an Substanzen: Wurzelkompartiment

Es wurden Replikate der mit *Cenococcum geophilum* und *Pisolithus arhizus* inokulierten Systeme analysiert. Die Exposition erfolgte in Gießapplikation. (N \geq 7 für alle Treatments) NWG= Nachweisgrenze

Nominell	<i>Boscalid</i> in ng pro Topf		<i>Kresoxim Methyl</i> in ng pro Topf		<i>Tebuconazol</i> in ng pro Topf	
	<i>C. geophilum</i>	<i>P. arhizus</i>	<i>C. geophilum</i>	<i>P. arhizus</i>	<i>C. geophilum</i>	<i>P. arhizus</i>
100%AM	97,6 \pm 67,6	80,1 \pm 56,2	11,6 \pm 5,5	18,8 \pm 5,8	152,6 \pm 147,5	120,5 \pm 130,4
10% AM	21,8 \pm 9,9	10,0 \pm 0,4	< NWG	< NWG	8,19 \pm 4,1	25,4 \pm 22,0

Für das Kompartiment Wurzel konnten noch bestimmbare Substanzpeaks für die Substanzen Boscalid und Tebuconazol gemessen werden. Für die Substanz Kresoxim-Methyl lagen bei dem geringen Applikationsniveau alle Proben unterhalb der Nachweisgrenze und wurden somit nicht berücksichtigt. Im Washwasser konnten keine Substanzen nachgewiesen werden.

Die Chromatogramme zeigten deutliche Substanzpeaks für die Substanzen Tebuconazol und Boscalid. Für diese beiden Substanzen ist eine Aufnahme in die Wurzel wahrscheinlich.

5.2.3 Berechnung der prozentualen Verteilung in den Kompartimenten

Aufgrund der gemessenen Wirkstoffgehalte wurde die prozentuale Verteilung der Wirkstoffe in dem Modellsystem berechnet. Es konnte gezeigt werden, dass 94-98% der Wirkstoffe im Boden Kompartiment nachgewiesen werden konnten. Im Wurzelnahen Bodenbereich konnten 2-6 % und in den Wurzeln 0,01-1 % der Substanzen nachgewiesen werden. Dieses Verteilungsmuster wurde sowohl für die hohen Applikationslevel (100 % AM) der Substanzen wie auch für die geringen Level beobachtet werden.

Die gefundenen Ergebnisse liegen im Bereich der von Gerken bestimmten prozentualen Verteilungen des Herbizids Dimethomorph im Boden- und Wurzelsystemen von Zierpflanzen [Gerken 2007].

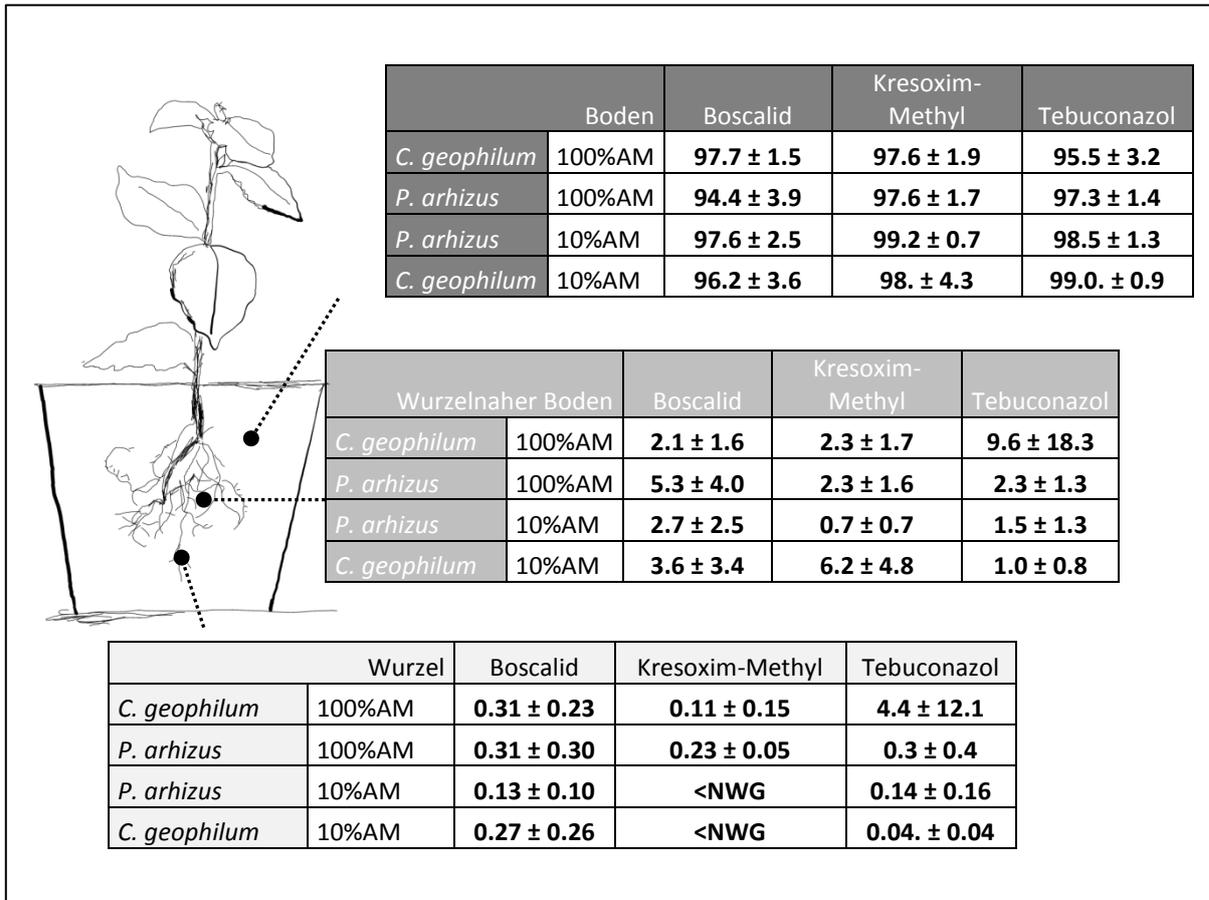


Abbildung 46: Prozentuale Verteilung der Pestizide in den Kompartimenten

Für alle Kontrollproben konnte gezeigt werden, dass keine Fungizide vor der Exposition im System nachweisbar waren und somit keine Hintergrundbelastung durch die Substanzen vorlag. Die gemessenen Konzentrationen in den Treatments (N = 10) wurden berechnet aus den Massen der Substanzen bezogen auf die Massen der einzelnen Kompartimente Boden, Wurzelnaher Boden und Wurzeln.

Obwohl die absoluten Gehalte der Wirkstoffe in den Kompartimenten Wurzel und im Wurzelnahen Bodenbereich sehr gering sind, sind die analytischen Konzentrationen im Vergleich zu den gemessenen Konzentrationen der Bodenproben hoch. Für beide Kompartimente (Boden und Wurzelnaher Boden) wurden Konzentrationen in der gleichen Größenordnung gefunden.

Eine ausführliche Bewertung und Diskussion der gefundenen Konzentrationen erfolgt bei der Risikoanalyse der Substanzen (vgl. 5.3). Dazu werden die experimentell gemessenen Gehalte mit den angegebenen PEC_{accu} Zulassungswerten verglichen.

Tabelle 23: Analytische Konzentrationen der Substanzen in den einzelnen Kompartimenten

Die Angabe der 100%AM und 10%AM dienen lediglich zur Orientierung und sind als nominelle Konzentrationen zu verstehen. Die tatsächlichen, analytischen Konzentrationen in den Kompartimenten wurden über LC-MSMS bestimmt.

Boscalid in ng/g		Boden	Wurzelnaher Boden	Wurzel
<i>C. geophilum</i>	100%AM (nominell)	831 ± 262	337 ± 274	202 ± 145
<i>P. arhizus</i>		667 ± 240	567 ± 335	380 ± 410
<i>C. geophilum</i>	10%AM (nominell)	164 ± 49	74 ± 54	78 ± 23
<i>P. arhizus</i>		225 ± 75	110 ± 91	42 ± 16
Kresoxim Methyl in ng/g		Boden	Wurzelnaher Boden	Wurzel
<i>C. geophilum</i>	100%AM (nominell)	177 ± 70	103 ± 104	42 ± 27
<i>P. arhizus</i>		196 ± 68	123 ± 83	86 ± 53
<i>C. geophilum</i>	10%AM (nominell)	29 ± 10	22 ± 10	<NG
<i>P. arhizus</i>		50 ± 26	16 ± 21	<NG
Tebuconazol in ng/g		Boden	Wurzelnaher Boden	Wurzel
<i>C. geophilum</i>	100%AM (nominell)	937 ± 434	707 ± 794	460 ± 339
<i>P. arhizus</i>		903 ± 488	542 ± 392	523 ± 411
<i>C. geophilum</i>	10%AM (nominell)	360 ± 102	149 ± 155	29 ± 28
<i>P. arhizus</i>		360 ± 71	182 ± 299	97 ± 64

5.3 Umwelt- und ökotoxikologische Risikoanalyse der Substanzen

Um das Umwelt- und ökotoxikologische Risiko einer Substanz zu bestimmen, wird die erwartete Umweltkonzentration der Substanz (PEC) oder die gemessenen Umweltkonzentrationen (MEC) bestimmt und in Beziehung mit einem Unbedenklichkeitsschwellenwert gesetzt. Aufgrund der ermittelten Konzentrations-Wirkungskurven wurde im Gewächshausversuch 14 Tage nach Exposition eine Probenahme durchgeführt. Somit liegen EC_x Werte, wie auch gemessene Wirkstoffkonzentrationen als Measured Environmental Concentration (MEC) nach 14 Versuchstagen vor.

5.3.1 Berechnung der ökotoxikologischen Kenngrößen: EC_{10} , EC_{50} und EC_{90}

Die Verwendung von sterilen *in vitro* Testsystemen kann dazu beitragen, die Effekte zunächst unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen und den Einfluss der Substanzen unter natürlichen *in vivo* Bedingungen abzuschätzen [Diaz et al. 2003].

Zur Bestimmung der Effektkonzentration wurden als Mykobionten Isolate von *Pisolithus arhizus* und *Cenococcum geophilum* auf Nährböden ausgebracht. Dazu wurden die zu untersuchenden Formulierungen oder Wirkstoffe in verschiedenen Verdünnungsstufen direkt in das Nährmedium eingearbeitet und Konzentrations-Wirkungsbeziehungen aufgestellt. Auf deren Grundlage wurden zunächst die ökotoxikologischen Kennwerte als statistische Endpunkte berechnet. Charakteristisch für den Kurvenverlauf der Hemmkurve ist der EC_{50} Wert. Mit dem EC_{50} wird in dieser Arbeit der Punkt charakterisiert, an dem eine Hemmung im Myzelwachstum um 50% in Bezug zur Kontrollgruppe beobachtet werden konnte. Durch die Kurvenanpassung wurden darüber hinaus EC_{10} und EC_{90} Werte berechnet. Der EC_{10} Wert wird, nach Empfehlung der OECD Richtlinie [OECD 2006], bei der Berechnung des Gefährdungspotenzials berücksichtigt (vgl. Kap. 3.4) und wird in dieser Arbeit als Schwellenwert definiert.

Anhand des Vergleichs der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen (vgl. Abbildung 47) konnte gezeigt werden, dass Orius[®] im Vergleich zum Wirkstoff Tebuconazol einen stärkeren Einfluss auf die Hemmung des Myzelwachstums von *Cenococcum geophilum* aufweist. Für das Aufstellen der Konzentrations-Wirkungskurve für *Cenococcum geophilum* behandelt mit Orius[®] war der gewählte Bereich des Konzentrationsniveaus ab 5%AM nicht optimal. Bei den Plattenversuchen zur Wirkung von Orius[®] auf das Myzelwachstum von *Pisolithus arhizus* wurden als geringstes Applikationsniveaus

0,00025% AM angesetzt. Durch die hohe Hemmwirkung des Fungizids auf das Myzelwachstum konnte auch für diese hohe Verdünnungsstufe kein ungehemmtes Wachstum beobachtet werden. Daher sind die in Abbildung 47 gezeigten Werte für die Kenngrößen EC_{50} und EC_{10} durch Kurvenanpassung ermittelt worden. Unterhalb des EC_{50} Wert kann der Kurvenverlauf nicht mehr gesichert angenommen werden und ein modellierter Kurvenverlauf wird dargestellt.

Ergänzend zu den Hemmversuchen mit Fungizid-Formulierungen wurde ein Testsystem mit *Pisolithus arhizus* und dem Herbizid Basta[®] untersucht. Dargestellt in Abbildung 47 wird die Hemmung des Myzelwachstums aufgrund der Behandlung mit Basta[®] in $ng\ g^{-1}$. Die negative Hemmung ergibt sich, da die Lösungsmittelkontrolle durch den Zusatz des Lösungsvermittlers Acetonitril stärker beeinträchtigt wurde, als die Isolate durch die Zugabe der Formulierung. Da eine Normierung auf die Lösungsmittelkontrolle erfolgte, wurde eine leichte „Stimulanz“ berechnet.

Bei der Auswertung der Hemmkurven für *Pisolithus arhizus* nach der Exposition mit dem Herbizid Basta[®] zeigte sich eine höhere Hemmwirkung, als bei dem Fungizid Collis[®]. Das Herbizid könnte somit auch eine indirekte Schädigung der Symbiose durch Schädigung der Wirtspflanze hervorrufen, welche unter Umständen nicht mehr ausreichend Photosynthese-Produkte an den Mykobionten weitergeben kann und damit auch eine indirekte Schädigung des Pilzes anzunehmen wäre [Abd-Alla et al. 2000, Ottow 2011]. Ottow beschreibt, dass das Verhältnis von Mikroorganismen in der Rhizosphäre zur Anzahl der Mikroorganismen im Boden (R/S Verhältnis) als Indikator für ein intaktes Rhizosphären-System genutzt wird. Bei Untersuchungen mit Breitbandherbiziden wurde die Veränderung im Verhältnis untersucht und eine Abnahme des Verhältnisses R/S durch den Einsatz von Herbiziden dokumentiert. Es wurde im Detail eine starke Abnahme im R/S für heterotrophe Pilze bei einer gleichzeitigen, wenn auch geringeren Erhöhung des R/S Verhältnisses für Bakterien beobachtet [Ottow 2011, Trappe et al. 1984]. Die Zulassung von Basta[®] wurde im November 2013 stark eingeschränkt, beziehungsweise für die Forstanwendung vollständig widerrufen, aufgrund eines nicht auszuschließenden Risikos für Säugetiere und Nichtzielarthropoden [EU Kommission 2013]. Die gefundenen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen für einen weiteren Nichtzielorganismus ebenfalls ein stark erhöhtes Risiko auf.

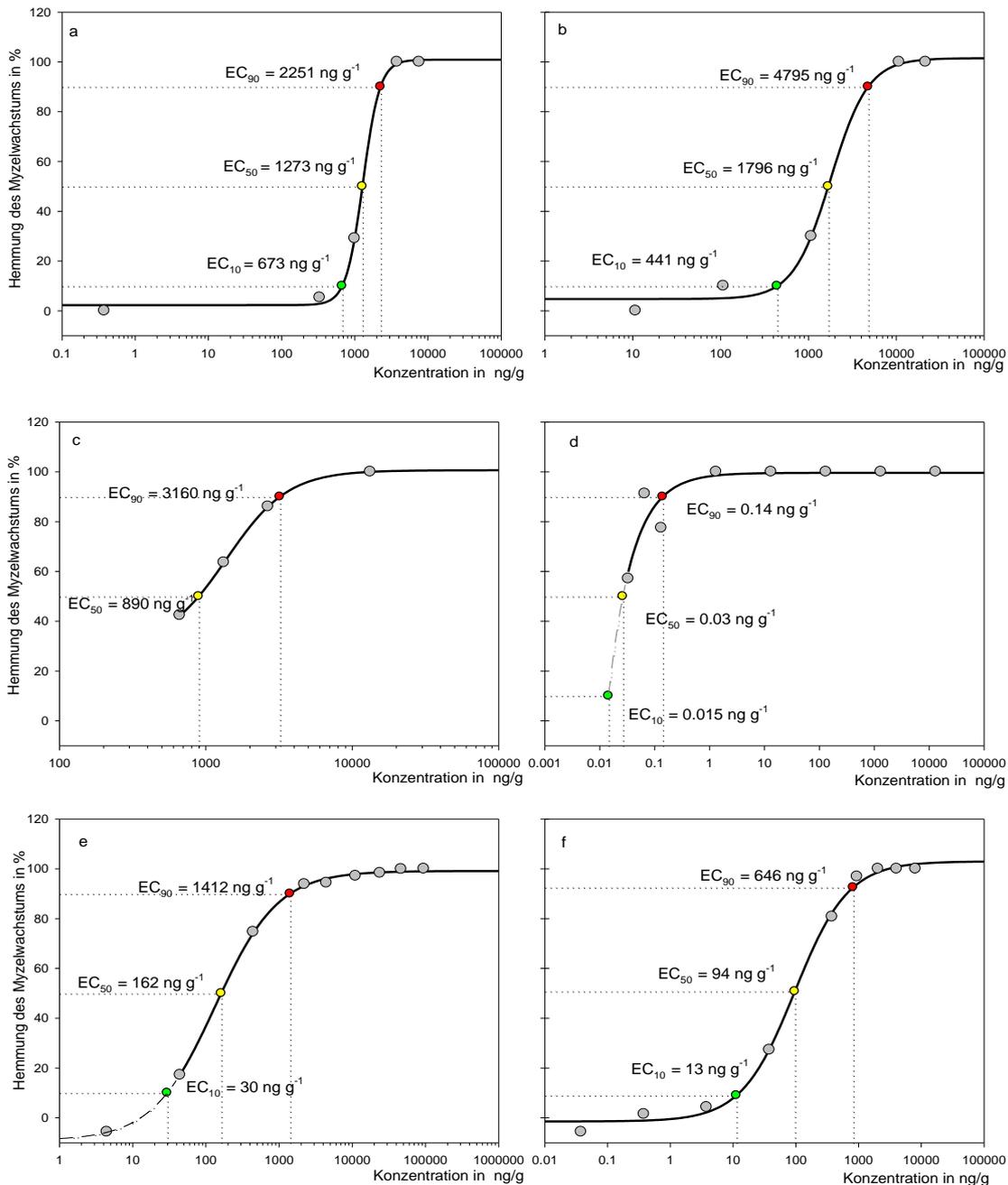


Abbildung 47: Ökotoxikologische Kenngrößen

Die exponierten Proben wurden auf die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen normiert (ausgefüllte, große Kreissymbole). Dargestellt sind die Werte für EC₁₀ (grün), EC₅₀ (gelb) bis EC₉₀ (rot).

Cenococcum geophilum :

a: Behandelt mit Boscalid: Versuchsdauer 12Tage auf BAF Nährmedium (N=3); b: Behandelt mit Tebuconazol Versuchsdauer 13Tage auf BAF Nährmedium (N=3); c: Behandelt mit Orius® Versuchsdauer 26Tage auf BAF Nährmedium (N=3) Unterhalb von 5%AM wurden keine Verdünnungsstufen mehr untersucht.

Pisolithus arhizus :

d: Behandelt mit Orius®: Versuchsdauer 14 Tage auf BAF Nährmedium (N=6); e: Basta® Versuchsdauer 14 Tage auf BAF Nährmedium (N=9) Die negative Hemmung ist als leichte, jedoch nicht signifikante Stimulanz im Myzelwachstum zu bewerten; f: Behandelt mit Collis®: Versuchsdauer 14Tage auf BAF Nährmedium (N=9)

Zusammenfassung und Übersicht über die Kenngrößen EC_x

Die Hemmung des Myzelwachstums war abhängig vom untersuchten Ektomykorrhiza Symbionten und von dem eingesetzten Pestizid. Dieses wurde bereits durch Studien von Trappe [1984] beobachtet, jedoch nicht für moderne Substanzklassen und Ektomykorrhiza.

Die EC_{50} Werte für das empfindlichste Modellsystem mit *Pisolithus arhizus* lagen im gewählten Versuchsaufbau bei $c = 0,026 \text{ ng g}^{-1}$ bei einer Behandlung mit Orius[®] gegenüber einem robusteren System mit *Cenococcum geophilum* mit EC_{50} Werten von $c = 1796 \text{ ng g}^{-1}$ für die Behandlung mit Tebuconazol. In Tabelle 24 werden für die beiden untersuchten Mykobionten und die eingesetzten Substanzen die EC_x Kennwerte sowohl in Aufwandmengen (in %AM und g ha^{-1}) wie auch in ng g^{-1} dargestellt. Um die EC_x Werte als Konzentrationsangaben in $\mu\text{g g}^{-1}$ darzustellen, wurde die Dichte des Nährmediums vereinfacht mit $\rho = 1 \text{ kg l}^{-1}$ angenommen. Die Steigung der Kurven im Wendepunkt zeigt an, inwieweit eine Veränderung in der Konzentration eine größere oder geringere Auswirkung auf die Wachstumshemmung der Isolate aufweist [Fent 2013].

Tabelle 24: Übersicht über die Kenngrößen

Die Steigung der Kurve bezieht sich auf den linearen Kurvenabschnitt der Konzentrations-Wirkungskurve. Hierbei wurde eine Dichte von $\rho = 1 \text{ kg l}^{-1}$ angenommen. 1: Die EC_{10} Werte für diese Modellsysteme wurden aufgrund von Modellierungen des Kurvenverlaufs angenommen.

ECM	Substanz/ Formulierung	Steigung der Kurve	EC_{10}		
			in %AM	in g ha^{-1}	in ng g^{-1}
<i>P. arhizus</i>	Collis [®]	1,03	0,3	0,3	13
	Orius ^{®1}	0,98	$1,1 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-4}$	0,015
	Basta [®]	1,06	0,1	1,5	30
<i>C. geophilum</i>	Tebuconazol	2,04	4	12	441
	Boscalid	3,78	18	22	673
ECM	Substanz/ Formulierung	Steigung der Kurve	EC_{50}		
			in %AM	in g ha^{-1}	in ng g^{-1}
<i>P. arhizus</i>	Collis [®]	1,03	2,5	3	94
	Orius [®]	0,98	$2,0 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$	0,03
	Basta [®]	1,06	0,4	6	162
<i>C. geophilum</i>	Tebuconazol	2,04	16	48	1796
	Orius [®]	2,08	10	30	890
	Boscalid	3,78	34	41	1273
ECM	Substanz/ Formulierung	Steigung der Kurve	EC_{90}		
			in %AM	in g ha^{-1}	in ng g^{-1}
<i>P. arhizus</i>	Collis [®]	1,03	17	20	646
	Orius [®]	0,98	$1,1 \times 10^{-3}$	$3,3 \times 10^{-3}$	0,14
	Basta [®]	1,06	3	45	1412
<i>C. geophilum</i>	Tebuconazol	2,04	44	132	4795
	Orius [®]	2,08	23	68	3160
	Boscalid	3,78	59	71	2251

5.3.2 Berechnung des ökotoxikologischen Risikos

Aufgrund der vorliegenden Daten aus den Versuchen zu den Effekten der Substanzen auf den Endpunkt Myzelwachstum sowie durch die gewonnenen Konzentrationsdaten aus den Expositionsversuchen, lässt sich eine Risikoanalyse der Substanzen für die entsprechenden Ektomykorrhizen, bezogen auf den Endpunkt Myzelwachstum, vornehmen [Fent 2013, OECD 2006]. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass es sich um zwei unabhängige Modellsysteme handelt. Dieses Vorgehen ist jedoch im Bereich der ökotoxikologischen Abschätzung eines Risikos üblich [European Commission 2002].

Durch die Messungen im Myzel von *Pisolithus arhizus* konnte der Wirkstoff Tebuconazol im Myzel nachgewiesen werden und somit muss von einer Bioverfügbarkeit der Substanz ausgegangen werden.

Der Quotient aus der Measured Environmental Concentration (MEC) und dem EC₁₀ Wert der Substanzen wurde gebildet für das Kompartiment Wurzelnahe Boden, als unmittelbare Schnittstelle zwischen Ektomykorrhiza und Boden.

Der Quotient zur Risikobewertung wurde wie folgt ermittelt:

$$QR = \frac{MEC}{EC_{10}}$$

Mit: QR: Quotient Risikobewertung

MEC: Measured environmental concentration

EC₁₀: Effect concentration (eine Hemmung im Myzelwachstum um 10% gegenüber der Kontrolle ist zu beobachten)

Hierbei sollte der Wert kleiner eins betragen, um ein Risiko weitestgehend auszuschließen.

Darüber hinaus wurde in Anlehnung an das TER (Toxizitäts-Expositionsverhältnis) der TER_{MEC} wie folgt errechnet:

$$TER_{MEC} = \frac{EC_{10}}{MEC}$$

mit: TER_{MEC}: Toxizitäts-Expositionsverhältnis berechnet aus dem MEC

Aufgrund der in Tabelle 25 dargestellten QR Werte zeigte sich, dass *Pisolithus arhizus* für die Substanzen Boscalid und Tebuconazol in allen Modellen und Applikationsniveaus einen Quotienten >1 aufwies. Entsprechend gilt für den TER_{MEC} Wert, dass dieser annähernd Null für diese Kombination wird.

Für *Cenococcum geophilum* ergab sich bei einer Applikationsmenge von 100%AM ein QR Wert > 1 für Tebuconazol. Im Vergleich der beiden Substanzen Boscalid und Tebuconazol zueinander konnte gezeigt werden, dass Tebuconazol einen höheren Effekt auf den gewählten Endpunkt Myzelwachstum aufwies als Boscalid. Die TER_{MEC} Werte für *Cenococcum geophilum* liegen für alle Modellkonstellationen, außer bei einer direkten Applikation der empfohlenen Aufwandmenge von Tebuconazol im Bereich >1 .

Tabelle 25: Risikoanalyse der Substanzen Tebuconazol und Boscalid

MEC wurde in Topfversuchen (Kompartiment Wurzelnah) ermittelt. EC_{10} Werte durch Plattentests bestimmt. Die Berechnung der QR und TER_{MEC} Werte geschah in Anlehnung an empfohlene Testmethoden. Die Berechnung für Tebuconazol und *Pisolithus arhizus* wurde noch ergänzend mit dem EC_{90} Wert durchgeführt.

Boscalid		MEC in $ng\ g^{-1}$	EC_{10} in $ng\ g^{-1}$	$\frac{MEC}{EC_{10}}$	QR	TER_{MEC}
<i>C. geophilum</i>	100%AM	337 ± 274	673	0,5	<1	2
<i>P. arhizus</i>		567 ± 335	13	44	>1	0,02
<i>C. geophilum</i>	10%AM	74 ± 54	673	0,1	<1	9
<i>P. arhizus</i>		110 ± 91	13	8	>1	0,1
Tebuconazol		MEC in $ng\ g^{-1}$	EC_{10} in $ng\ g^{-1}$	$\frac{MEC}{EC_{10}}$	QR	TER_{MEC}
<i>C. geophilum</i>	100%AM	707 ± 794	441	1,6	>1	0,6
<i>P. arhizus</i>		542 ± 392	0,01	5×10^4	>>1	2×10^{-5}
<i>C. geophilum</i>	10%AM	149 ± 155	441	0,3	<1	2,9
<i>P. arhizus</i>		182 ± 299	0,01	2×10^4	>>1	5×10^{-5}
Tebuconazol		MEC in $ng\ g^{-1}$	EC_{90} in $ng\ g^{-1}$	$\frac{MEC}{EC_{90}}$	QR	TER_{MEC}
<i>P. arhizus</i>	100%AM	542 ± 392	0,14	4×10^3	>>1	2×10^{-4}
<i>P. arhizus</i>	10%AM	182 ± 2991	0,14	1×10^3	>>1	7×10^{-4}

5.3.3 Beurteilung des ökotoxikologischen Risikos

Ziel dieser Arbeit war eine Bewertung des Einflusses der untersuchten Substanzen auf das Myzelwachstum ausgewählter ECMs. Hierbei wurde die Fähigkeit des Myzelaufbaus als Indikator für die Vitalität und die Fähigkeit, Wurzelspitzen zu besiedeln, als Endpunkt gewählt. Aufgrund der Besiedlungen von Feinwurzeln mit Ektomykorrhiza wird der Mykorrhizierungsgrad einer Pflanze sukzessive erhöht. Sollte das Myzel durch Substanzen in dieser Fähigkeit gehemmt werden, kann somit der Mykorrhizierungsgrad nicht erhöht werden. Die Neubesiedlung von Feinwurzeln wird beeinflusst und die Pflanze mit Nährstoffen nicht optimal versorgt.

In dieser Arbeit wurde das Kompartiment Wurzelnaher Boden als der Bereich klassifiziert, in dem die Symbiose von Feinwurzeln und Mykobionten verortet ist. In diesem Interface wurden Substanzkonzentrationen zwischen 100-500 ng g⁻¹ für Boscalid und 150-700 ng g⁻¹ für Tebuconazol nachgewiesen. Werden diese Konzentrationen (MEC) in Beziehung zur ermittelten Effektkonzentrationen der Plattenversuche gesetzt, zeigte sich, dass sich die gefundenen Konzentrationen im Wurzelnahen Bodenbereich zum Teil oberhalb der Größenordnung der EC_X-Werte für die Systeme befinden. Für die weiteren Berechnungen wurde als tolerierbare Konzentration der EC₁₀ Wert für die ECMs angenommen.

Die bei der Zulassung angegebenen PEC Werte für Tebuconazol liegen bei $c = 268 \text{ ng g}^{-1}$ und bei $c = 420 \text{ ng g}^{-1}$ für Boscalid [European Commission 2008a, European Commission 2008b]. Werden diese Konzentrationsangaben mit den experimentell gemessenen Werten im Expositionsversuch (MEC) für das Kompartiment Boden und Wurzelnaher Boden verglichen, liegen die Werte in derselben Größenordnung vor. Diese Ergebnisse sind umso alarmierender, wenn beachtet wird, dass aufgrund des gewählten Versuchsdesigns für die Topfversuche (Gießapplikation) von einem worstcase Szenario ausgegangen wurde.

Eine Abschätzung des Eintrags über das EVA Modell für Tebuconazol, ergab eine Konzentration von $c = 500 \text{ g ha}^{-1}$ im Bereich der Zielapplikation und einen Eintrag von $c = 12 \text{ g ha}^{-1}$ in einem 1m Abstand zum Applikationsort (Daten im Anhang). Hierbei wurden Abdriftwerte im Modell berücksichtigt. Bei diesem Eintrag und dem Vergleich der ermittelten EC₁₀ Werte z.B. von 12 g ha^{-1} für *Cenococcum geophilum*, liegt somit der Eintrag im Bereich des Schädigungsschwellenwertes. Für *Pisolithus arhizus* liegen die EC₁₀ Werte deutlich unterhalb dieses Schwellenwertes, somit muss für diesen Pilz mit einer Beeinträchtigung gerechnet werden. Dieses gilt sowohl für das Szenario einer

Nichtzielapplikation mit dem Wirkstoff Tebuconazol, wie auch für die im Forst und Baumschulen zugelassene Formulierung Collis[®]. Darüber hinaus konnten aus den Untersuchungen zur Aufnahme der Substanz Tebuconazol in das Myzel Hinweise darauf gewonnen werden, dass eine Bioverfügbarkeit der Substanz für das Myzel anzunehmen ist.

Für die unempfindlichste Modellkonstellation *Cenococcum geophilum* behandelt mit Orius[®] ergab sich für die Applikationsmenge entsprechend 10% AM (Szenario der Nichtzielapplikation durch ein Fungizid mit landwirtschaftlicher Zulassung) ein QR < 1 und ein TER_{MEC} = 9. Somit könnte bei einer isolierten Betrachtung der Ergebnisse zunächst eine tolerierbare Beeinflussung dieser Spezies bei Nichtzielapplikation angenommen und aufgrund des TER_{MEC} Wertes < 10 möglicherweise weiterführende Untersuchungen nur empfohlen werden. Eine integrierte Betrachtung des Bodenkörpers als „soziales Netzwerk“ (vgl. 3.1.3) zeigt jedoch die zwingende Notwendigkeit von weiteren Untersuchen auf. Die Artenzusammensetzung der Rhizosphäre beeinträchtigt die dort lebenden Mikroorganismen [Peterson et al. 2004] und eine Veränderung in der Zusammensetzung oder in der Anzahl der Mikroorganismen verschiebt ganze Organismengesellschaften [Ottow 2011]. Ectomycorrhizae bilden ein Netzwerk zwischen Pflanzen aus und erhöhen die Diversität in Pflanzengesellschaften [Compant et al. 2010, Read 1997, Simard et al. 1997]. *Cenococcum geophilum* kommt in der Natur somit in Artengemeinschaften vor und unter Diversitäts- und Ökosystemfunktionalitätsaspekten ist die Beeinflussung für sensiblere Organismen dieser Artengemeinschaft nicht mehr tolerierbar. Die gefundene Unempfindlichkeit von *Cenococcum geophilum* gegenüber anthropogen eingetragenen Substanzen, wie hier die Fungizide Collis[®] und Orius[®] passt sich in die beschriebenen Eigenschaften von *Cenococcum geophilum* als widerstandsfähig gegenüber Stressoren, Generalist und dominante Spezies in borealen Wäldern ein [Aučina et al. 2010; Dahlberg 2001, Kuhnert et al. 2012]. Sollte aber nicht losgelöst von Organismengesellschaften bewertet werden.

6 Handlungsempfehlungen und offene Fragen

Aufgrund der berechneten QR und TER_{MEC} Werte (vgl. Tabelle 25) liegt für die meisten untersuchten Kombinationen der Verdacht eines umwelt- und ökotoxikologisches Risikos vor. Fent [2013] fordert, dass bei Überschreitung der Quotienten entsprechend weiterführende Untersuchungen zur Risikoanalyse durchzuführen oder sonstige Maßnahmen zur Risikominimierung abzuwägen sind. Ebenfalls ist bei der Bewertung von ökotoxikologischen Auswirkungen gefordert, die Konsequenzen für den sensibelsten Organismus zu untersuchen. Dieses war in dem gewählten Versuchsaufbau *Pisolithus arhizus*.

Bei der Zulassung von Pflanzenschutzmitteln werden zur Bewertung der Auswirkungen auf Bodenorganismen wie Regenwürmer oder Springschwänze (*Collembola*) Streuabbaustests durchgeführt. Ab einem TER < 5 für Regenwürmer oder Springschwänze sollen ergänzende Studien wie zum Beispiel Feldversuche durchgeführt werden [European Commission 2002]. Bodenmikroorganismen werden zurzeit durch einen Test zur Erfassung der Veränderung der Stoffwechselaktivität der Gesamtheit aller Bodenmikroorganismen berücksichtigt. Bei dem Test werden weitere Untersuchungen notwendig, wenn eine Veränderung um 25% nach 100 Tagen beobachtet werden kann [European Commission 2002]. Die Organismenzusammensetzung des Bodenkompartmentes beträgt, nach Angaben des BVL, für Wiesenboden in Gewichtsprozent etwa 25% pilzliche Mikroorganismen, 50% Bakterien und 25% entfallen auf sonstige Organismen [BVL 2012]. Somit könnte bei der bisherigen Bewertung die Organismengruppe Pilze vollständig geschädigt werden und trotzdem ein tolerierbares Ausmaß an Beeinträchtigungen auf Bodenorganismen vorliegen. Ottow konnte zeigen, dass es zu einer Verschiebung in der Organismengesellschaft, gekennzeichnet durch das R/S Verhältnis (vgl. Kap. 3.1.3), durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln in dem untersuchen Modellsystem kam [Ottow 2011]. Da mit einer Verarmung der Rhizosphäre gleichzeitig auch eine generelle Verarmung in der biologischen Vielfalt sowohl in Bezug auf Lebensräume, Artenvielfalt und genetische Vielfalt verbunden sein kann [Kleinschmidt et al. 2008], ist eine Ausweitung und Standardisierung der Testsysteme bezogen auf Substanzen und Organismen eine notwendige Handlungsempfehlung. So sollte das bestehende Testsystem für Bodenorganismen überdacht und ggf. erweitert werden, da hierbei Biodiversitätsaspekte nur unzureichend Berücksichtigung finden.

Eine weitere Maßnahme wäre eine Anwendungsbeschränkung im Rahmen einer NS oder NT Auflage (NS: Naturhaushalt Sonstige; NT: Naturhaushalt Terrestrik) zum Schutz von Nichtzielpflanzen in Saumbiotopen und Nichtzielorganismen. Mögliche Anwendungsbeschränkungen könnten die Ausweitung der Abstandsflächenregelung für Neuzulassungen sein. Bisher sind für die untersuchten Formulierungen Collis[®] und Orius[®] keine Auflagen im NS-Bereich zum Schutz der Saumbiotope (Waldränder und Gehölzpflanzungen) erlassen worden. Zur Vermeidung einer Exposition von Nichtzielpflanzen und/oder - Organismen auf Nichtzielflächen müssen bei der Zulassung auch geeignete Maßnahmen zum Schutz der Saumbereiche überdacht werden. In Deutschland sind Abstandsregelungen zu Saumbiotopen für die untersuchten Formulierungen, bis auf die seit November 2013 geltende NS 647 Auflage für Basta[®], nicht gegeben, da aufgrund der ausreichenden Anzahl an regionalisierten Kleinststrukturen in Deutschland auf etwa 70% der Flächen keine Abstandsregelungen bei der Ausbringung von Pflanzenschutzmitteln zu Saumbiotopen zu beachten sind [BVL 2012]. Nach Abdrifteckwerten des JKI in Braunschweig sind für Tebuconazol im Ackerbau bei einem Abstand von 1 m etwa 3 % der Aufwandmenge im Bodensediment zu finden. Da jedoch oftmals bis direkt zum Saumbiotop behandelt werden darf, sind höhere Einträge der Substanzen auf diese Nichtzielflächen zu erwarten. Somit liegen die erwarteten Einträge bei einem Abstand von etwa 1 m zum Waldrand für *Pisolithus arhizus* oberhalb des EC₁₀ Wert im Modellsystem. Für *Cenococcum geophilum* liegt der EC₁₀ Wertes für Tebuconazol im Bereich von 4% der Applikationsmenge und somit in der gleichen Größenordnung wie der erwartete Abdrifteckwert im Ackerbau.

Im Bereich der Zielapplikation muss möglicherweise über eine Kennzeichnung der sensibelsten Systemkombinationen nachgedacht werden. Dies wäre für die Anwender von Mykorrhiza-Produkten eine sinnvolle Information, um den Nutzen der Mykorrhiza nicht durch eine Pestizidgabe zu minimieren. So wird der sensible Organismus *Pisolithus arhizus* vielen Präparaten beigesetzt und gerne für Wiederaufforstungen mit beimpften Wirtspflanzen verwendet [Blaschke und Helfer 2007].

Im Zusammenhang mit der Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit wurden folgende Fragen und Aufgabenfelder aufgeworfen, welche in weiteren Arbeiten untersucht werden sollten:

- Eine Etablierung und Standardisierung eines *in vitro* Testsystems für Ektomykorrhiza auf Grundlage der vorgestellten Plattenmethode und Ausweitung der Testungen für weitere Pestizide und Ektomykorrhiza-Pilze, um geeignete Stellvertreterorganismen für die Mykobionten zu identifizieren.
- Inwieweit wird durch eine Exposition mit anderen Xenobiotika, wie zum Beispiel Einträge von Tierarzneimitteln durch Gülleausbringung in Saumbereiche, das Myzelwachstum beeinflusst?
- Müssen Inhibitions- und Absterbeprozesse des Mykobionten bei der Bewertung der Standfestigkeit von Bäumen berücksichtigt werden? Da aufgrund der Symbiose die Anzahl der Feinwurzel zugunsten von Emissionhyphen reduziert wird, könnte die Feinwurzelmasse insgesamt reduziert werden. Möglicherweise wird dieser Prozess durch eine Infektion mit robusteren Mykobionten, wie *Cenococcum geophilum* kompensiert. Hier sollten Messungen der Expositionen und Konzentrationen von Pestiziden in Saumbiotopen sowie eine Bestandsaufnahme der vorhandenen, aktiven Mykobionten-Strukturen durchgeführt werden.
- In *in vitro* Versuchen mit Glasfaserfilter konnte die Aufnahme der Substanz Tebuconazol ins Myzel von *Pisolithus arhizus* gezeigt werden. Möglicherweise übernimmt die Mykorrhiza hier eine Filterfunktion für den Phytobionten. Werden Substanzen durch Akkumulation im Myzel nicht an die Pflanze weitergegeben, wäre das unter dem Gesichtspunkt der Biosicherheit und Bioremediation von beeinträchtigten (Acker-) Böden ein entscheidender Aspekt. Untersuchungen im Mantel und Hyphengewebe der Symbionten wären notwendig um die Verteilung spezifischer zu differenzieren.

7 References

- ABD-ALLA, M., OMAR, S.A., UND KARANXHA, S. 2000. The impact of pesticides on arbuscular mycorrhizal and nitrogen-fixing symbioses in legumes. *Applied Soil Ecology* 14, 3, 191–200.
- AHMAD, I., UND MALLOCH, D. 1995. Interaction of soil microflora with the bioherbicide phosphinothricin. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 54, 3, 165–174.
- AHMED, S., MAHJABIN, T., KHAN, A., MOONMOON, M., UND SARKER N.C. 2009. Effect of Media and Environmental Factors on Mycelial Growth of *Boletus edulis*, *Morchella esculenta* and *Pleurotus geesternaus*. *Bangladesh J. Mushroom* 3, 1, 47–52.
- ALTEN, H., LINDEMANN, A., UND SCHÖNBECK, F. 1993. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza by fungicides or rhizosphere bacteria. *MYCORRHIZA* 2, 4, 167–173.
- ALTENBURGER, R., ARRHENIUS, A., BACKHAUS, T., COORS, A., FAUST, M., UND ZITZKAT, D. 2014. *Ecotoxicological combined effects from chemical mixtures. Part 1: Relevance and adequate consideration in environmental risk assessment of plant protection products and biocides*. Umweltbundesamt 1862-4804.
- ANDERSON, P., DAVIDSON, C., LITTEJOHN, D., UND URE, A. 1994. Extravtion of Ergosterol from peaty soils and determination by High Permormanve Liquid Chromatography. *Talanta* 41, 5, 711–720.
- ANTIBUS, R.K., UND SINSABAUGH, R.L. 1993. The extraction and quantification of ergosterol from ectomycorrhizal fungi and roots. *Mycorrhiza* 3, 3, 137–144.
- ATCC. o.J. 325 Malt Extract Agar (o.J.).
- AUČINA, A., RUDAWSKA, M., LESKI, T., RYLIŠKIS, D., PIETRAS, M., UND RIEPŠAS, E. 2010. Ectomycorrhizal fungal communities on seedlings and conspecific trees of *Pinus mugo* grown on the coastal dunes of the Curonian Spit in Lithuania. *MYCORRHIZA*, Short Note.
- AUGE, R. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, 3–42.
- BAYER CROP SCIENCE DEUTSCHLAND. 2013. *Basta®*. Accessed 13 March 2014.
- BERNHARDT, A. 2004. *Ermittlung von Pestizidstoffströmen im Ökosystem Buchenwald*. Dissertation, Leuphana Universität Lüneburg.
- BFR. 2014. *Liste der Pestizide zu denen methodische Informationen verfügbar sind*. Bundesinstitut für Risikobewertung.
- BLASCHKE, M., UND HELFER, W. 2007. *Pilze an der Kiefer*. LWF.
- BMELV. 2008. *Nationaler Aktionsplan zur nachhaltigen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln*. Risikominderung im Pflanzenschutz. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz.
- BMELV. 2013a. *Nationaler Aktionsplan zur nachhaltigen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln*. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz.
- BMELV. 2013b. *Waldzustand-2012 - Ergebnisse Waldzustandserhebung 2012*. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz.
- BÖHME, M. 2012. *Methodenentwicklung zur Analyse der Fungizide Collis und Orius im Substrat von Buchenjungepflanzen (Fagus sylvatica) nach einmaliger Exposition*. Bachelorarbeit, Leuphana Universität Lüneburg.
- BÖRNER, E. 2003. *Saisonale Dynamik der Mykorrhizierung und des Vorkommens von Endophyten und potentiellen Pathogenen an Buchenfeinwurzeln auf zwei Kalkstandorten bei unterschiedlicher Hiebsintensität*. Dissertation, Freiburg.
- BVL. 2003. *Datenbatt: Boscaild*.
http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/04_Pflanzenschutzmittel/01_neue_wirkst/neue_wirkst_Boscalid.pdf?__blob=publicationFile#. Accessed 8 March 2014.
- BVL. 2006. *Addendum 1 to the Draft Assessment Report Boscalid*.
http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/04_Pflanzenschutzmittel/02_eu_berichte/Boscalid-ADD.pdf?__blob=publicationFile. Accessed 12 March 2014.
- BVL. 2009. *PSM Zulassungsbericht Tebuconazol SE 043*. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.
- BVL. 2012. *Schutz von terrestrischen Organismen*.
- BVL. 2013a. *Absatz an Pflanzenschutzmitteln in der Bundesrepublik Deutschland. Ergebnisse der Meldungen gemäß § 64 Pflanzenschutzgesetz für das Jahr 2012*.
- BVL. 2013b. *BVL - Fachmeldungen - Änderung der Zulassung des Pflanzenschutzmittels Basta*.
http://www.bvl.bund.de/DE/04_Pflanzenschutzmittel/05_Fachmeldungen/2013/2013_11_08_Fa_%C3%84nderung_Zulassung_Pflanzenschutzmittels_Basta.html?nn=1471850. Accessed 13 March 2014.

- BVL. 2013c. *Registration Report Part A Risk Management. MCW 710 SC Azoxystrobin, Tebuconazole*.
http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/04_Pflanzenschutzmittel/01_zulassungsbericht_e/007537-00-00.pdf?__blob=publicationFile&v=3. Accessed 11 March 2014.
- BVL. 2014a. *Aktuelle Bekanntmachungen - Neue Version des Expositionsmodells EVA (Exposure Via Air)*.
http://www.bvl.bund.de/DE/04_Pflanzenschutzmittel/03_Antragsteller/01_Bekanntmach_und_Hinweise/psm_bekannt_hinw_neueVersionEVA.html?nn=1400366. Accessed 13 March 2014.
- BVL. 2014b. *Pflanzenschutzmittel Verzeichnis 2014. Teil 1 Ackerbau- Wiesen und Weiden- Hopfenbau- Nichtkulturland*. <http://www.bvl.bund.de>. Accessed 8 March 2014.
- BVL. 2014c. *Pflanzenschutzmittel Verzeichnis 2014. Teil 4 - Forst 0178-062X*. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.
- CAIRNEY, J.W., UND CHAMBERS, S. 1997. Interactions between *Pisolithus tinctorius* and its hosts: a review of current knowledge. *Mycorrhiza*, 7, 117–131.
- CAMMANN, K., Ed. 2010. *Instrumentelle Analytische Chemie. Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg.
- CARRILLO, C., DIAZ, G., UND HONRUBIA, M. 2011. Testing the effect of routine fungicide application on ectomycorrhiza formation on *Pinus halepensis* seedlings in a nursery. *Forest Pathology* 41, 1, 70–74.
- CARSON, R. 1968. *Der stumme Frühling*. dtv 476. Dt. Taschenbuch Verl., München.
- CHAKRABORTY, S., TIEDEMANN, A.V., UND TENG, P.S. 2000. Climate change: potential impact on plant diseases. *Environmental Pollution* 108, 3, 317–326.
- CHAKRAVARTY, P., UND SIDHU, S.S. 1987. Effect of glyphosate, hexazinone and triclopyr on in vitro growth of five species of ectomycorrhizal fungi. *Forest Pathol* 17, 4-5, 204–210.
- CHILVERS, G., DOUGLASS, P., UND LAPERYRIE, F. 1986. A PAPER-SANDWICH TECHNIQUE FOR RAPID SYNTHESIS OF ECTOMYCORRHIZAS. *New Phytol* 103, 2, 397–402.
- COMPANT, S., VAN DER HELDEN, M.G., UND SESSITSCH, A. 2010. Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. *FEMS Microbiology Ecology*, 73, 197–214.
- CTGB. 2010. *Collis*. http://www.ctb.agro.nl/ctb_files/12504_16.html. Accessed 12 March 2014.
- CUDLIN, P., KIELISZEWSKA-ROKICKA, B., RUDAWSKA, M., GREBENC, T., ALBERTON, O., LEHTO, T., BAKKER, M.R., BØRJA, I., KONÓPKA, B., LESKI, T., KRAIGHER, H., UND KUYPER, T.W. 2007. Fine roots and ectomycorrhizas as indicators of environmental change. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 141, 3, 406–425.
- CUDLÍN, P., MEJSTRÍK, V., UND SKOUPÝ, J. 1983. Effect of pesticides on ectomycorrhizae of *Pinus sylvestris* seedlings. *Plant Soil* 71, 1-3, 353–361.
- DAHLBERG, A. 2001. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytol* 150, 3, 555–562.
- DE VRIES T. 2000. *Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades von Pinus sylvestris mit unterschiedlichen ektotrophen Pilzpartnern. Vergleichende Bewertung biochemischer wie bildanalytischer Methoden*. Diplomarbeit, Universität Bremen.
- DIAZ, G., CARRILLO, C., UND HONRUBIA, M. 2003. Differential responses of ectomycorrhizal fungi to pesticides in pure culture. *Cryptogamie, Mycologie* 24, 3, 199–211.
- DIEDHIOU, P., OERKE, E.-C., UND DEHNE H.-W. 2004. Effects of the strobilurin fungicides azoxystrobin and kresoximmethyl on arbuscular mycorrhiza. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 111, 5, 545–556.
- R. DUPONNOIS, R., GARBAYE, J. 1991: Techniques for controlled synthesis of the Douglas-fir - *Laccaria laccata* ectomycorrhizal symbiosis. *Ann. For. Sci.*, 48 (6), 641.
- Donges, K. 2008. *Influence of ectomycorrhiza (ECM) on the stability of forest ecosystems following windthrow events*. Dissertation, Universität Marburg.
- DSMZ. *BAF-Medium (392)*. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH-Leibnitz Institut.
- DSMZ. *Maltextract/Charcoal Medium (801)*. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH- Leibnitz Institut.
- DSMZ. *Oat Flake Medium (189)*. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH- Leibnitz Institut.
- EGLI, S., UND BRUNNER, I. 2011. *Mykorrhiza. Eine faszinierende Lebensgemeinschaft im Wald*. Merkblatt für die Praxis 35. Eidg. Forschungsanstalt WSL.
- ELSEVIER B.V ScienceDirect. <http://www.sciencedirect.com/>. Accessed 23 Mai 2015.
- EPA. 2014. *Ecotox Database*. U.S. Environmental Protection Agency.
- EU. 2014. *EU Pesticides database*.

- EU COMMISSION. 1998a. *Review report for the active substance azoxystrobin*. http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/list2-01_en.pdf. Accessed 12 March 2014.
- EU COMMISSION. 1998b. *Review report for the active substance kresoxim-methyl*. http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/list2-02_en.pdf. Accessed 12 March 2014.
- EU KOMMISSION. 2013. *Durchführungsverordnung (EU) Nr. 365/2013 der Kommission vom 22. April 2013 zur Änderung der Durchführungsverordnung (EU) Nr. 540/2011 hinsichtlich der Bedingungen für die Genehmigung des Wirkstoffs Glufosinat* Text von Bedeutung für den EWR - LexUriServ.do. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:111:0027:0029:DE:PDF>. Accessed 13 March 2014.
- EUROPEAN COMMISSION. 2002. *Draft Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology Under Council Directive 91/414/EEC*. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General, Health & Consumer Protection Directorate-General.
- EUROPEAN COMMISSION. 2003. *Review report for the active substance quinoxyfen*. <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/quinoxyfen.pdf>. Accessed 12 March 2014.
- EUROPEAN COMMISSION. 2007. *Review report for the active substance glufosinate*. <http://www.fytoweb.fgov.be/NL/doc/Reviewglufosinate.pdf>. Accessed 13 March 2014.
- EUROPEAN COMMISSION. 2008a. *Review report for the active substance boscalid*. <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/boscalid.pdf>. Accessed 12 March 2014.
- EUROPEAN COMMISSION. 2008b. *Review report for the active substance tebuconazole*. http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=activesubstance.detail. Accessed 12 March 2014.
- EUROPEAN COMMISSION. 2013. *Review report for the active substance glufosinate*. Accessed 13 March 2014.
- FELDMANN, F. o.J. *Nebenwirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf arbuskuläre Mykorrhizapilze als Nichtzielorganismen*.
- FENT, K. 2013. *Ökotoxikologie. Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie*. Thieme, Stuttgart.
- FESTER, T., PEERENBOOM, E., WEIß, M., UND STRACK, D. o.J. *Mykorrhiza*. <http://www.ipb-halle.de/myk/start/X6/index.html>. Accessed 6 March 2014.
- FICHTNER, A., OHEIMB, G. VON, HÄRDITL, W., WILKEN, C., UND GUTKNECHT, J. 2014. Effects of anthropogenic disturbances on soil microbial communities in oak forests persist for more than 100 years. *Soil Biology and Biochemistry* 70, 79–87.
- GADD, G.M. 2001. *Fungi in bioremediation*. Cambridge University Press, Cambridge [etc.].
- GARCIA, M., RÖMBKE, J., BRITO, M.T. DE, UND SCHEFFCZYK, A. 2008. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. *Environmental Pollution* 153, 2, 450–456.
- GERKEN, I. 2007. *Untersuchungen der Auswirkung von Fungiziden auf arbuskuläre Mykorrhiza*. Diplomarbeit, Leuphana Universität Lüneburg.
- GIOVANNETTI M., UND MOSSE B. 1980. An Evaluation of Techniques for measuring Vesicular Arbuscular Mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84, 3, 489–500.
- GISI, U. 1997. *Bodenökologie. [mit] 56 Tabellen*. Flexibles Taschenbuch. Thieme, Stuttgart [u.a.].
- GREG, L. 2009. *Fungicide effects on Mycorrhizal Fungi and Root Colonization 8-2009*. Plant Health Care Inc.
- GRIEFAHN, N. 2013. *Auswirkungen der Fungizidformulierung Orius® auf das Myzelwachstum der Ektomykorrhizapilze Pisolithus arhizus und Cenococcum geophilum sowie die Anreicherung des Wirkstoffs Tebuconazol im Myzel von Pisolithus arhizus*. Bachelorarbeit, Leuphana Universität Lüneburg.
- HAMPP, R., SHI, L., GUTTENBERGER, M., UND NEHLS, U. 1999. Mykorrhizierung und Stresstoleranz von Ökotypen der Buche (*Fagus sylvatica* L.): "Conventwaldprojekt".
- HEITEFUSS, R. 1987. *Pflanzenschutz. Grundlagen der praktischen Phytomedizin*. Flexibles Taschenbuch. New York; Thieme, Stuttgart.
- HENSEN, B. 2011. *Methodenentwicklung zur Mykorrhizierung von Buchenjungepflanzen und Messung des Ergosterolgehalts*. Bachelorarbeit, Leuphana Universität Lüneburg.
- HERZOG, C., PETER, M., PRITSCH, K., GÜNTHARDT-GOERG, M.S., UND EGLI, S. 2013. Drought and air warming affects abundance and exoenzyme profiles of *Cenococcum geophilum* associated with *Quercus robur* Q. *petraea* and Q. *pubescens*. *Plant Biology* 15, 230–237.
- HILLEBRECHT, C. 2011. *In Vitro-Tests: Fungizidwirkung auf Mykorrhiza-Pilze am Beispiel von Boscaclid und Quinoxyfen*. Bachelorarbeit, Leuphana Universität Lüneburg.

- IMFELD, G., UND VUILLEUMIER, S. 2012. Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review. *European Journal of Soil Biology* 49, 22–30.
- INGESTAD T., UND AGREN G.I. 1995. Plant nutrition and growth: Basic principles. *Plant and Soil*, 15-20, 168–169.
- INOQ. o.J. *Qualitätsmerkmale des Mykorrhizapilzinokulums INOQ Spezial Forst*. <http://www.inoq.de/downloads/Forst.pdf>. Accessed 9 March 2014.
- INSTITUT FÜR AGRARÖKOLOGIE. 2012. *Naturhaushalt & Pflanzenschutz. Foliensatz*. <http://www.folienserie.agrosience.de/>. Accessed 9 March 2014.
- INSTITUT FÜR RECHTSMEDIZIN UND VERKEHRSMEDIZIN DER UNIVERSITÄT HEIDELBERG. 2003. *DINTest*. Berechnung analytischer Grenzwerte nach DIN 32645.
- IOTTI, M., UND ZAMBONELLI, A. 2006. A quick and precise technique for identifying ectomycorrhizas by PCR. *Mycol. Res.* 110, Pt 1, 60–65.
- JKI. 2010. *ABDRIFT-ECKWERTE*. http://www.jki.bund.de/no_cache/de/startseite/institute/anwendungstechnik/abdrift-eckwerte.html. Accessed 9 March 2014.
- JKI. 2013. *Panel Pflanzenschutzmittel-Anwendungen*. <http://papa.jki.bund.de/index.php?menuid=1>. Accessed 8 March 2014.
- JOHANSSON, J.F., PAUL, L.R., UND FINLAY, R.D. 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology* 48, 1, 1–13.
- JONSSON, L. 1998. *Community structure of ectomycorrhizal fungi in Swedish boreal forests*. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Silvestria 75. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- KADAKAL, C., UND ARTIK, N. 2008. Degradation kinetics of ergosterol in tomato paste serum. *EUR FOOD RES TECHNOL* 227, 3, 683–688.
- KJÖLLER, R., UND ROSENDAHL, S. 2000. Effects of fungicides on arbuscular mycorrhizal fungi: differential responses in alkaline phosphatase activity of external and internal hyphae. *Biology and Fertility of Soils* 31, 5, 361–365.
- KLEINSCHMIDT, J., RAU, H.-M., UND GEBHARDT, K. 2008. Schutz durch Nutzung forstlicher Genressourcen der Buche (*Fagus sylvatica* L.) in Nordwestdeutschland. *Beiträge aus der NW-FVA, Band 3, 2008*, Band 3, 69–86.
- KNÄBEL, A., MEYER, K., RAPP, J., UND SCHULZ, R. 2013. Fungicide Field Concentrations Exceed FOCUS Surface Water Predictions: Urgent Need of Model Improvement. *Environ. Sci. Technol.*, 131212134336007.
- KNÄBEL, A., STEHLE, S., SCHÄFER, R.B., UND SCHULZ, R. 2012. Regulatory FOCUS Surface Water Models Fail to Predict Insecticide Concentrations in the Field. *Environ. Sci. Technol.* 46, 15, 8397–8404.
- KOOPMANN, J. 2002-2012. *FixFoto*. Joachim Koopmann Software.
- KREUZWIESER, J., UND RENNENBERG, H. 1998. Sulphate uptake and xylem loading of mycorrhizal beech roots. *New Phytol* 140, 2, 319–329.
- KÜHNE, S., ENZIAN S., JÜTTERSONKE, B., FREIER, B., FORSTER, R., UND ROTHERT H. 2002. *Beschaffenheit und Funktion von Saumstrukturen in der Bundesrepublik Deutschland und ihre Berücksichtigung im Zulassungsverfahren im Hinblick auf die Schonung von Nichtzieltarthropoden*. <http://www.bba.de/veroeff/mitt/pdfs/mitt378.pdf>. Accessed 09.03.2014 OECD.
- KÜHNE, S., UND FREIER, B. *Saumbiotope und ihre Bedeutung für Artenvielfalt und biologischen Pflanzenschutz. Workshop „Biological Diversity in Agricultural Landscapes“*. Julius Kühn-Institut, Berlin-Dahlem.
- KUHNERT, R., OBERKOFER, I., UND PEINTNER, U. 2012. Fungal Growth and Biomass Development is Boosted by Plants in Snow-Covered Soil. *Microb Ecol* 64, 1, 79–90.
- LAATIKAINEN, T., UND HEINONEN-TANSKI, H. 2002. Mycorrhizal growth in pure cultures in the presence of pesticides. *Microbiological Research* 157, 2, 127–137.
- LANG, C. 2013. *Projekt goe-fungi*. <http://www.uni-goettingen.de/en/goe-fungi/92389.html>. Accessed 6 March 2014.
- LANG-YONA, N., DANNEMILLER, K., YAMAMOTO, N., BURSHEIN, N., PECCIA, J., YARDEN, O., UND RUDICH, Y. 2012. Annual distribution of allergenic fungal spores in atmospheric particulate matter in the Eastern Mediterranean; a comparative study between ergosterol and quantitative PCR analysis. *Atmos. Chem. Phys.* 12, 5, 2681–2690. <http://www.atmos-chem-phys.net/12/2681/2012/acp-12-2681-2012.pdf>.
- LOZÁN, J.L., UND KAUSCH, H. 2007. *Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler. Mit 39 Tabellen*. Wissenschaftliche Auswertungen, Hamburg.

- LWF. 2011. *Kohlenstoffspeicherung von Bäumen*.
<http://www.lwf.bayern.de/veroeffentlichungen/lwf-merkblaetter/mb-27-kohlenstoffspeicherung.pdf>. Accessed 9 March 2014.
- MAC LACHLAM, D. 2012. *GLUFOSINATE AMMONIUM (175)*.
http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation12/Glufosinate.pdf. Accessed 13 March 2014.
- MARIN, M. 2011. Effects of Pesticides on the Growth of Ectomycorrhizal Fungi and Ectomycorrhiza Formation. In *Soil Biology*, M. RAI UND A. VARMA, Eds. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 323–346.
- MARTIN, F., DELARUELLE, C., UND HILBERT, J.-L. 1990. An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. *Mycological Research* 94, 8, 1059–1064.
- MEHARG, A.A., UND CAIRNEY, J.W. 2000. Ectomycorrhizas — extending the capabilities of rhizosphere remediation? *Soil Biology and Biochemistry* 32, 11-12, 1475–1484.
- MELICHAR, P. 2012. *Einfluss von Pestiziden auf das Myzelwachstum von Ektomykorrhizapilzen. Untersuchung der Wirkungen unterschiedlicher Verdünnungsstufen von Collis® und Basta 200® anhand von In-Vitro Tests*. Bachelorarbeit, Leuphana Universität Lüneburg.
- MILLELINDBLUM, C., VON WACHENFELDT, E., UND TRANVIK, L. 2004. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. *Journal of Microbiological Methods* 59, 2, 253–262.
- MÜLLER-JUNG, J. 2012. Die sozialen Netze, die im Boden boomen. *FAZ*, 13.03.2012 (2012).
- MÜNZENBERGER, B., GOLLDACK, J., ULLRICH, A., SCHMINCKE, B., UND HÜTTL, R.F. 2004. Abundance, diversity, and vitality of mycorrhizae of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in lignite recultivation sites. *MYCORRHIZA* 14, 3, 193–202.
- NEWELL, S.Y. 1988. Fundamental procedures for determining Ergosterol content of decaying plant Material by Liquid Chromatography. *APPL ENVIRON MICROB* 54, 7, 1876–1879.
- OECD. 2006. *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application*. *OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT Number 54*.
- OECD. 2012. *OECD- Umweltausblick bis 2050. Die Konsequenzen des Nichthandelns*. Zusammenfassung. <http://www.oecd.org/berlin/49907296.pdf>. Accessed 28 December 2012.
- OLSSON, P., LARSSON, L., UND BAGO B. 2003. Ergosterol and fatty acids for biomass estimation of mycorrhizal fungi. *New Phytol* 159, 1, 7–10.
- OLSSON, P.A. 1998. Interactions between ectomycorrhizal fungi and the bacterial community in soils amended with various primary minerals. *FEMS MICROBIOL ECOL* 27, 2, 195–205.
- O'NEILL, J.J., UND MITCHELL, D.T. 2000. Effects of benomyl and captan on growth and mycorrhizal colonization of Sitka-spruce (*Picea sitchensis*) and ash (*Fraxinus excelsior*) in Irish nursery soil. *Forest Pathology* 30, 3, 165–174.
- OTTOW, J.C.G. 2011. *Mikrobiologie von Böden. Biodiversität, Ökophysiologie und Metagenomik*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- PAN. 2001. *Health and environmental impacts of glufosinate ammonium*.
http://www.foe.co.uk/sites/default/files/downloads/impacts_glufosinate_ammon.pdf. Accessed 13 March 2014.
- PETERSON, R.L., MASSICOTTE, H.B., UND MELVILLE, L.H. 2004. *Mycorrhizas. Anatomy and cell biology*. NRC Research Press; CABI Pub., Ottawa, Wallingford, Oxon, UK.
- PRADOS- LIGERO, A.M., BASCON- FERNANDEZ, J., CALVENT-PINOS, C., CORPAS HERVIAS, C., LARA RUIZ, A., MELERO J. M., UND BASALLOTE- UREBAR, M.J. 2002. Effect of different soil and clove treatments in the control of white rot of garlic. *Ann Applied Biology* 140, 3, 247–253.
- PÜHSE, M. 2009. *Auswirkung hoher hydrostatischer Drücke auf Modelllipidmembranen, Proteine und proteinmimetische Polymere*. Dissertation, Technischen Universität Dortmund.
- RAI, M., UND VARMA, A., Eds. 2011. *Soil Biology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- RASBAND, W. o.J. *ImageJ*. National Institutes of Health.
- RAZAVI S., LAKZIAN A., 2007: Evaluation of chemical and biological consequences of soil sterilization methods *Caspian J. Env. Sci.* 5, (2), 87.
- READ, D. 1997. Mycorrhizal fungi: The ties that bind. *Nature* 388, 6642, 517–518.
- READ, D.J., LEAKE, J.R., UND PEREZ-MORENO, J. 2004. Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. *Can. J. Bot* 82, 8, 1243–1263.
- REAXYS. *Chemical Database*. Elsevier.
- REERS, A. 2010. *Method development for the quantification of ergosterol as biomarker in mycorrhizal roots*, Leuphana Universität Lüneburg.
- ROBINE, E., LACAZE, I., MOULARAT, S., RITOUX, S., UND BOISSIER, M. 2005. Characterisation of exposure to airborne fungi: Measurement of ergosterol. *Journal of Microbiological Methods* 63, 2, 185–192.

- ROSEMARIN, A. 2010. *Peak Phosphorus. The Next Inconvenient Truth*. Mini- Seminar Phosphorus-Shortage: European Challenges.
- ROßBERG, D., VASEL, E.-H., UND LADEWIG, E. 2013. *NEPTUN*.
- SALMANOWICZ, B.B., UND NYLUND, J.-E. 1988. High performance liquid chromatography determination of ergosterol as a measure of ectomycorrhiza infection in Scots pine. *Forest Pathol* 18, 5, 291–298.
- SANDERS, I.R., VAN DER HEIJDEN, M.G.A., KLIRONOMOS, J.N., URSIC, M., MOUTOGLIS, P., STREITWOLF-ENGEL, R., BOLLER, T., UND WIEMKEN, A. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *NATURE* 396, 6706, 69–72.
- SCHÄFER, R.B., BUNDSCHUH, M., ROUCH, D.A., SZÖCS, E., OHE, P.C. VON DER, PETTIGROVE, V., SCHULZ, R., NUGEGODA, D., UND KEFFORD, B.J. 2012. Effects of pesticide toxicity, salinity and other environmental variables on selected ecosystem functions in streams and the relevance for ecosystem services. *Science of The Total Environment* 415, 69–78.
- SCHLÄFLI, S. 2011. Unbekannte Grundlage des Wohlstands. *ETH Life* (2011).
- SCHMIDT, B. 2000. *Glufosinat: Metabolismus in transgenen und nicht-transgenen Pflanzengewebe sowie Schicksal im Boden (UBC)*. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.
- SCHWADORF, K., UND MÜLLER, H. 1989. Determination of ergosterol in cereals, mixed feed components and mixed feeds by liquid-chromatography. *J Assoc Off Anal Chem* 72, 3, 457–462.
- SCHWEDT, G. 2001. *Analytische Chemie. Grundlagen, Methoden und Praxis ; 158 Tabellen*. Thieme, Stuttgart, New York.
- SDW. 2014. *Waldanteil in Deutschland*. <http://www.sdw.de/waldwissen/wald-in-deutschland/waldanteil/>. Accessed 9 March 2014.
- SEITZ, L., BURROUGHS R., MOHR H.E., UND SAUER D.B. 1977. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chemists* 54, 6, 1207–1217.
- SELOSSE, M.-A., RICHARD, F., HE, X., UND SIMARD, S.W. 2006. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends in Ecology & Evolution* 21, 11, 621–628.
- SHI, L., GUTTENBERGER, M., KOTTKE, I., HAMPP, R., UND DIGER. 2002. The effect of drought on mycorrhizas of beech (*Fagus sylvatica* L.): changes in community structure, and the content of carbohydrates and nitrogen storage bodies of the fungi. *MYCORRHIZA* 12, 6, 303–311.
- SIDDIQUI, Z.A., AKHTAR, M.S., UND FUTAI, K. 2008. *Mycorrhizae: sustainable agriculture and forestry*. Springer, Dordrecht.
- SIMARD, S.W., PERRY, D.A., JONES, M.D., MYROLD, D.D., DURALL, D.M., UND MOLINA, R. 1997. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *NATURE* 388, 579–582.
- SKOOG, D.A. 2013. *Instrumentelle Analytik. Grundlagen - Geräteanwendung*. Springer.
- SMITH, S.E., UND READ, D.J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, Amsterdam, Boston.
- SOUTHWORTH, D., HE, X.-H., SWENSON, W., BLEDSOE, C.S., UND HORWATH, W.R. 2005. Application of network theory to potential mycorrhizal networks. *Mycorrhiza* 15, 8, 589–595.
- STAHEL, W.A. 2008. *Statistische Datenanalyse. Eine Einführung für Naturwissenschaftler*. Studium. Vieweg, Wiesbaden.
- SYSTAT SOFTWARE, I. 2008. *SigmaPlot*. 11.0.0.75.
- TARDIEU, D., BAILLY, J.D., UND BENARD, G. 2007. Comparison of two extraction methods for ergosterol determination in vegetal feeds 158, 8-9, 442–446.
- TESTE, F.P., KARST, J., JONES, M.D., SIMARD, S.W., UND DURALL, D.M. 2006. Methods to control ectomycorrhizal colonization: effectiveness of chemical and physical barriers. *MYCORRHIZA* 17, 1, 51–65.
- TOMLIN, C. 2003. *The pesticide manual. A world compendium*. British Crop Protection Council, Alton.
- TRAPPE, J., MOLINA, R., UND CASTELLANO, M. 1984. Reactions of Mycorrhizal Fungi and Mycorrhiza Formation to Pesticides. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 22, 331–359.
- UBA. 2009. *Glossar. Informationssystem Ökotoxikologie und Umweltqualitätsziele*. <http://webetox.uba.de/webETOX/info/Downloads/glossar/glossar.pdf;jsessionid=168C9D5F2CF754EB2B16DCC13C0E8110>. Accessed 9 March 2014.
- UBA. 2011. *Pflanzenschutzmittelabsatz in der Landwirtschaft*. <http://www.umweltbundesamt.de/search/content/Pflanzenschutzmittelabsatz%2520in%2520der%2520Landwirtschaft>. Accessed 13 September 2012.
- UBA. 2014a. *Pflanzenschutzmittel*. <http://www.umweltbundesamt.de/themen/chemikalien/pflanzenschutzmittel>. Accessed 8 March 2014.
- UBA, B. 2014b. *Ökologische Vorrangflächen- unverzichtbar für die biologische Vielfalt in der Agrarlandschaft*.

- http://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/klu_oekologische_vorrangflaechen_januar_2014_0.pdf. Accessed 8 March 2014.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A., KLIRONOMOS, J.N., URSIC, M., MOUTOGLIS, P., STREITWOLF-ENGEL, R., BOLLER, T., WIEMKEN, A., UND SANDERS, I.R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396, 6706, 69–72.
- VAN MEER, G., VOELKER, D.R., UND FEIGENSON, G.W. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 2, 112–124.
- VARMA, A. 2008. *Mycorrhiza. State of the art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics*. Springer-Verlag, Berlin.
- VIERHEILIG, H., COUGHLAN A., WYSS, U., UND PICHÉ, Y. 1998. Ink and Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. *APPL ENVIRON MICROB* 64, 12, 5004.
- WALLANDER, H., NILSSON, L.O., HAGERBERG, D., UND BAATH, E. 2001. Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytol* 151, 3, 753–760.
- WARNE, M., UND DAM V, ... 2008. NOEC AND LOEC DATA SHOULD NO LONGER BE GENERATED OR USED. *Australasian Journal of Ecotoxicology* 14, 1–5.
- WEST A.W., GRANT W.D., UND SPARLING G.P. 1987. USE OF ERGOSTEROL, DIAMINOPIMELIC ACID. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 5, 607–612.
- WOLTERS, A. 2006. *Pesticide Volatilization from Soil and Plant Surfaces: Measurements at Different Scales versus Model Predictions*, Rheinisch-Westfälische Technischen Hochschule Aachen.
- YAMANDA, A., UND OGURA, T.O.M. 2001. Cultivation of mushrooms if edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal synthesis. *Mycorrhiza*, 11, 67–81.
- ZELLES, L., HUND, K., UND STEPPER, K. 1987. Methoden zur relativen Quantifizierung der pilzlichen Biomasse im Boden. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk* 150, 4, 249–252.
- ZHAO, X., LIN, Q., UND BROOKES, P. 2005. Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass? *Soil Biology and Biochemistry* 37, 2, 311–317.

7.1 Ergänzende Arbeiten

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit wurden sechs Abschlussarbeiten am Institut für Nachhaltige Chemie und Umweltchemie an der Leuphana Universität Lüneburg betreut. Im Rahmen der folgenden Bachelorarbeiten wurde ein Beitrag zu den praktischen Arbeiten dieser Promotion geleistet:

- Reers A. (2010) Method development for the quantification of ergosterol as biomarker in mycorrhizal roots
- Hillebrecht C.(2011) In Vitro-Tests: Fungizidwirkung auf Mykorrhiza-Pilze am Beispiel von Bosacilid und Quinoxifen.
- Hensen B. (2011) Methodenentwicklung zur Mykorrhizierung von Buchenjungepflanzen und Messung des Ergosterolgehalts.
- Melichar P. (2012) Einfluss von Pestiziden auf das Myzelwachstum von Ektomykorrhizapilzen. Untersuchung der Wirkungen unterschiedlicher Verdünnungsstufen von Collis[®] und Basta 200[®] anhand von *In-Vitro* Tests
- Böhme M. (2012) Methodenentwicklung zur Analyse der Fungizide Collis und Orius im Substrat von Buchenjungepflanzen (*Fagus sylvatica*) nach einmaliger Exposition.
- Griefahn N. (2013) Auswirkungen der Fungizidformulierung Orius[®] auf das Myzelwachstum der Ektomykorrhizapilze *Pisolithus arhizus* und *Cenococcum geophilum* sowie die Anreicherung des Wirkstoffs Tebuconazol im Myzel von *Pisolithus arhizus*

8 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt:

- Ich habe noch nie eine Dissertation anderweitig eingereicht.
- Ich habe keinen Dissertationsentwurf anderswo vorgelegt.
- Ich habe noch nie an anderer Stelle einen Antrag auf Zulassung zur Promotion gestellt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Abhandlung in der gegenwärtigen oder einer anderen Fassung noch nie einem anderen Fachbereich vorgelegt habe.

Hiermit gebe ich an Eides statt folgende Versicherung ab:

„Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel verfasst habe. Anderer als der von mir angegebenen Hilfsmittel und Schriften habe ich mich nicht bedient. Alle wörtlich oder sinngemäß den Schriften anderer Autorinnen oder Autoren entnommenen Stellen habe ich kenntlich gemacht.“

Isabell Zunker

Datum, Ort

Unterschrift

9 Anhang

9.1 Geräte und Materialien

Im Folgenden werden ergänzende Angaben zu den Daten unter Kapitel 4.1 Material, Seite 36ff dargestellt.

9.1.1 Rezepte der Nährmedien

Chemikalien

Chemikalie, Verbrauchsmaterial Laborgeät
Agar (KolbeI- Roth)
Biotin (98,5%- Roth)
Calciumchlorid-Dihydrat (Merk 90-102%)
Di-Kaliumhydrogenphosphat (VWR-100,1%)
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat (Merck-90-102%)
Folsäure (Roth- $\geq 96\%$)
Glukose (Merck)
Hefeextrakt (AppiChem)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Merck- $\geq 99,5\%$)
Mangan(II)-sulfat-1-hydrat (Merck- $\geq 99,0\%$)
Meso-Inositol (Roth- $\geq 99,0\%$)
Pepton (Merck)
Thiamin-Hydrochlorid (Roth- $\geq 98,5\%$)
Zinksulfat-Heptahydrat (VWR- -100,4%)

BAF-Nährmedium [DSMZ]

Microorganisms			
392. BAF Medium			
Glucose	30.0	g	
Peptone	2.0	g	
Yeast extract	0.2	g	
KH ₂ PO ₄	0.5	g	
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.5	g	
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	10.0	mg	
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1.0	mg	
MnSO ₄	5.0	mg	
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	100.0	mg	
Thiamin HCl	50.0	µg	
Biotin	1.0	µg	
Folic acid	100.0	µg	
Inositol	50.0	µg	
Agar	15.0	g	
Distilled water	1000.0	ml	
pH 5.8 - 6.3.			

Maltextrakt/Charcoal Medium [DSMZ]**Microorganisms****801. MALTEXTRACT/CHARCOAL MEDIUM**

Malt extract	30.0	g
Charcoal (medical)	3.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1000.0	ml

Sterilize at 121°C for 10 min.

Haferflockenmedium [DSMZ]**Microorganisms****189. OAT FLAKE MEDIUM**

Oat flakes	30.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1000.0	ml

Boil oat flakes in water for 10 min; fill up to 1 l and add agar. Autoclave 20 min at 121°C. Shake before pouring.

ATCC Medium 325 [ATCC o.J.]**ATCC Medium: 325 Malt Extract Agar (Blakeslee's formula)**

Malt Extract.....	20.0 g
Glucose.....	20.0 g
Peptone.....	1.0 g
Agar.....	20.0 g
DI Water.....	1000 ml

Add glucose prior to sterilization. Autoclave at 121°C.

9.1.2 Stammzertifikat Buchensamen

21335 Lüneburg

Datum 22.05.2012
 Ad.-Nr. 10656
 Telefon 04131-677-2885
 Fax 04131-677-2822

Anlage zur Rechnung

Seite 1 von 1

Lieferung vom 08.05.2012 laut Lieferschein-Nr. 141
 Auftrag-Nr.: 169 vom 02.05.2012

Pos.	Menge	EH	Bezeichnung	EP / EUR	%	GP / EUR
1	0,500	Kg	Rothuche Botanisch: <i>Fagus sylvatica</i> Herkunftsgebiet: 81003 Heide, Altmärk Ernteforstamt: Correl Forst.FFVnummer: 1061 Registerzeichen: 033 81003 081 2 Stammzertifikat-Nr.: D-03 001 2 0002 11 Reifejahr: 2011 Kategorie: AG Autochthonie: autochthon Ausgangsmaterial: EB Zweck: Multifunktionale Forstwirtschaft Tausendkorngewicht: 334,8 g Absolute Reinheit: 99,9 % Spezifische Reinheit: 100 % Keimfähigkeit: 86 % Wassergehalt: 32,8 % Zahl lebender Keime pro Kg: 2327 Nr. und Datum letzte Keimprüfung: 2012-18 01.02.2012 Prüfstellung: SP8 05, fab Correl, 29633 Munster Mischung aus: D-03 003 1 0021 11 D-03 003 1 0022 11	29,000		14,50 (2)
2	1 St.		Versandkostenpauschale	5,000		5,00 (2)

9.1.3 Tonsubstrat (Klasmann-Deilmann GmbH)



Tonsubstrat ist ein Universalsubstrat aus hochwertigen Weißtorfen (Sodentorf), durchfrenem Schwarztorf und sorptionsstarkem Tongranulat.

D/A Warendecklaration gemäß Düngemittelgesetz Kultursubstrat*)	
Typ 1:	Kultursubstrat für Pflanzen mit geringem und mittlerem Nährstoffbedarf
Art und Herkunft der Ausgangsstoffe:	Hochmoortorf (H ₂ - H ₂ und H ₂ - H ₂), Tongranulat, kohlenaurer Kalk, mineralischer Mehrnährstoffdünger
Organische Substanz:	80 % im Trockenrückstand
Anwendung:	Weiterkultur von Zierpflanzen
Verfügbare Nährstoffe:	160 - 260 mg/l N - Stickstoff (CaCl ₂ -Extrakt) 180 - 280 mg/l P ₂ O ₅ - Phosphat (CAL-Extrakt) 200 - 350 mg/l K ₂ O - Kaliumoxid (CAL-Extrakt) 80 - 150 mg/l Mg - Magnesium (CaCl ₂ -Extrakt)
Salzgehalt:	1,5 g KCl/l
pH-Wert (CaCl₂):	5,5
Füllmenge:	70 Liter
Lagerung:	Vor Witterungseinflüssen wie Sonne und Regen geschützt lagern.
Verantwortlicher Inverkehrbringer im Inland:	Klasmann-Deilmann GmbH · 49744 Geeste · Deutschland
Erzeugungsland:	Deutschland
Verantwortlicher Inverkehrbringer in Österreich:	Gartenhilfe Ges.m.b.H · Estermannstr. 6 · 4020 Linz · Österreich

*) Spezialrezepturen auf Kundenwunsch können abweichende Werte aufweisen, bitte beachten Sie den Lieferschein, mitgeltende Produktinformationen und den Aufdruck auf der Seitenfalte der Verpackung.

9.1.4 Verwendete Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Laborgeräte

9.1.4.1.1 Effektversuche

Chemikalien zur Herstellung der Nährmedien werden unter Kapitel 9.1.1: Rezepte der Nährmedien, Seite 136 ff genannt.

Chemikalie, Verbrauchsmaterial Laborgeräte
Acetonitril (ROTISOLV® 6130A Roth; sterilfiltriert/ 99,98 % - CAS 75-05-8)
Aluschalen (Roth, 250 ml)
Analytikwaage (Mettler Toledo- AT 261 Delta Range)
Autoklav (Tuttnauer, 3150L)
Bördelwerkzeug
Braunglasvials 1,5 ml mit Rollrand (Macherey-Nagel GmbH & CoKG)
Brutschrank (BK5060E Heraeus)
Butyl/PTFE 20mm Crimpdeckel (Macherey-Nagel GmbH & CoKG)
Dispensette Organic (Analog, 2,5-25ml- BRAND GmbH&CoKG)
Drigalskispatel
Einmal-Injektions-Kanüle (Sterican® B.Braun Melsungen AG)
ES-Kompresse (Hartman 7,5 cm REF 401723=)
Filter (Millipore weiß Type HA Porengröße: 0,45µm)
Glas Pasteurpipetten (VWR, Kalk-Soda Glas, 230 mm)
Headspace-Vials, 22,4 ml mit Rollrand (Perkin Elmer)
Heizplatte (Rommelsbacher)
HPLC-MS/MS
Agilent 1200 Series HPLC
Agilent 6400 Series Triple Quadrupole
(Agilent Technologies GmbH)
Kolbenhuppipetten (Eppendorf Research und Thermo Fisher)
(10-100µl; 100-1000µl, 500-5000µl)
Korkbohrer (0,55cm ²)
Kugelsterilisator Tau Quartz 500 Tau Steril
Magnetrührplatte (MSH-20A- IDL)
Mikroinsert 200µl(Macherey-Nagel GmbH & CoKG)
Muffelofen (Fa. Gerhardt)
Multitopfpaletten + Untersetzer (QuickPot 35T HerkuPlast Kubern GmbH)
Parafilm (M Bemis Flexible Packaging)
Perlite (Isoself- Knauf Perlite)
Petrischalen (Steril, Ø 90 mm- Sarstedt)
Pinzetten
Plastikspritze (5 ml- BD Discordit)
PTFE 11mm Crimpdeckel (Macherey-Nagel GmbH & CoKG)
Reinstwasseranlage (SG, Ultraclear)
Safe-Lock Gefäß 2,0 ml (Eppendorf AG)
Schottflaschen (Schott)
250 ml
500 ml
1000ml
Skalpell Steril (Griff u. Klängen) BAYHA®
Sterilbank (ET 130V Ehret Reinraumtechnik)
Tonsubstrat (Klasmann-Deilmann GmbH)
Überkopfschüttler (Heidolph Reax 2)
Ultraschallbad (Bandelin, Sonorex Super 10P)
Zentrifuge (Centrifuge 5415C- Eppendorf AG)

9.1.4.1.2 Expositionsversuche

Pestizidstandards sind unter Kapitel 4.1.3 Seite 38 und unter Kapitel 9.1.5 Seiten 141 genannt.

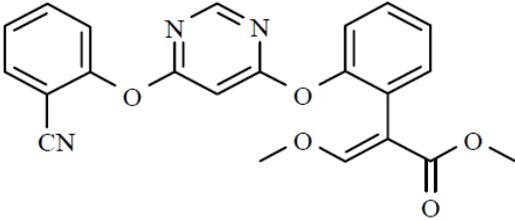
Chemikalie, Verbrauchsmaterial Laborgeät
Acetonitril (ROTISOLV® 6130A Roth; sterilfiltriert/ 99,98 %- CAS 75-05-8)
Aluschalen (Roth, 250 ml)
Analytikwaage (Mettler Toledo- AT 261 Delta Range)
Autoklav (Tuttnauer, 3150L)
Bördelwerkzeug
Braunglasvials 1,5 ml mit Rollrand (Macherey-Nagel GmbH & CoKG)
Butyl/PTFE 20mm Crimpdeckel (Macherey-Nagel GmbH & CoKG)
Deuterierter Standard Tebuconazol D6 (Dr. Ehrenstorfer)
Glas Pasteurpipetten (VWR, Kalk-Soda Glas, 230 mm)
Headspace-Vials, 22,4 ml mit Rollrand (Perkin Elmer)
HPLC-MS/MS Agilent 1200 Series HPLC Agilent 6400 Series Triple Quadrupole (Agilent Technologies GmbH)
Kolbenhuppipetten (Eppendorf Research und Thermo Fisher) (10-100µl; 100-1000µl, 500-5000µl)
Methanol (Merck, Suprasolv für die Gaschromatographie- CAS 67-56-1)
Mikroinsert 200µl (Macherey-Nagel GmbH & CoKG)
Muffelofen (Fa. Gerhardt)
Multitopfpaletten + Untersetzer (QuickPot 35T HerkuPlast Kubern GmbH)
Perlite (Isoself- Knauf Perlite)
PTFE 11mm Crimpdeckel (Macherey-Nagel GmbH & CoKG)
Reinstwasseranlage (SG, Ultraclear)
Safe-Lock Gefäß 2,0 ml (Eppendorf AG)
Schottflaschen 500 ml (Schott)
Tonsubstrat (Klasmann-Deilmann GmbH)
Überkopfschüttler (Heidolph Reax 2)
Ultraschallbad (Bandelin, Sonorex Super 10P)
Zentrifuge (Centrifuge 5415C- Eppendorf AG)

9.1.5 Physikalisch-Chemische Eigenschaften der Pestizide

9.1.5.1 Unterlagen zu den Wirkstoffen

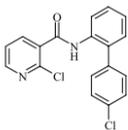
9.1.5.1.1 Azoxystrobin

Daten entnommen aus [EU Commission 1998a]

Common name (ISO)	Azoxystrobin
Chemical name (IUPAC)	Methyl (E)-2-{2[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy] phenyl}-3-methoxyacrylate
Chemical name (CA)	Methyl (E)-2-{2 [6-(2-cyanophenoxy)-4-pyrimidinyl]oxy}-alpha-(methoxymethylene)benzeneacetate (9CI)
CIPAC No	571
CAS No	131860-33-8
EEC No	Not allocated
FAO SPECIFICATION	-
Minimum purity	930g/kg (Z isomer max.25g/kg)
Molecular formula	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅
Molecular mass	403.4 g/mol
Structural formula	
Melting point	116 °C (purity: 990 g/kg)
Boiling point	Above 360 °C (from Summary Data Sheet)
Appearance	White crystalline powder, tech. as (962 g/kg) pale brown crystalline powder
Relative density	1.34 g/cm ³ (purity: 990 g/kg) at 20 °C
Vapour pressure	1.1 · 10 ⁻¹⁰ Pa at 20 °C
Henry's law constant	7.3 · 10 ⁻⁹ Pa · m ³ · mol ⁻¹
Solubility in water	pH 5.2: 6.7 mg/l at 20 °C ; pH 7.0: 6.7 mg/l at 20 °C; pH 9.2: 5.9 mg/l at 20 °C
Solubility in organic solvents	All results in g/l at 20 °C: Methanol: 20, Acetonitrile: 340
Partition co-efficient (log P_{ow})	2.5 at 20 °C, without pH dependence
Hydrolytic stability (DT₅₀)	25 °C, pH 5-9: stable , 50 °C, pH 5-7: stable
Dissociation constant	Neither acidic nor basic properties
UV/VIS absorption (max.)	202.6 nm, 242.7 nm, 295 nm:
Photostability in water (DT₅₀)	8.7 - 13.9 d at pH 7

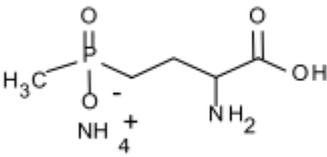
9.1.5.1.2 Boscalid

Daten entnommen aus [European Commission 2008a]

Common name (ISO)	Boscalid
Development Code	BAS 510 F
Chemical name (IUPAC)	2-Chloro-N-(4'-chlorobiphenyl-2-yl)nicotinamide
Chemical name (CA)	2-Chloro-N-(4'-chloro[1,1'-biphenyl]-2-yl)-3-pyridinecarboxamide
CIPAC No	673
CAS No	188425-85-6
EEC No	not assigned
FAO SPECIFICATION	not assigned
Minimum purity	960 g/kg
Molecular formula	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O
Molecular mass	343.21 g/mol
Structural formula	
Melting point	143 – 144 °C (capillary method, 99.7 %) 145 °C (DSC method, 99.7 %)
Boiling point	none
Appearance	white crystalline solid, odourless (min 99.4 %)
Relative density	d ₂₀ 4204 = 1.381 (99.7 %)
Vapour pressure	7.2 x 10 ⁻⁷ Pa at 20 °C
Henry's law constant	5.178 x 10 ⁻⁵ Pa m ³ /mol
Solubility in water	4.6 mg/L at 20 °C (99.4 %) No dissociation in water, therefore no pH dependency
Solubility in organic solvents	Solubility at 20°C in g/L (99.4 %) Methanol 40-50 g/L Acetonitrile 40-50 g/L
Partition co-efficient (log Pow)	2.96 (pH 7.1, 21 °C) No dissociation in water, therefore no pH dependency
Hydrolytic stability (DT50) Dissociation constant	Stable between pH 4 and pH 9
Partition co-efficient (log Pow)	No dissociation in water
Quantum yield of direct photo-transformation in water at λ >290 nm	Smaller than 2.45 x 10 ⁻⁴
Flammability	not highly flammable No auto-flammability was observed up to 400 °C
Explosive properties	None (statement)
UV/VIS absorption (max.)	207 nm , 228 nm , 290 nm , 300 nm
Photostability in water (DT50)	Stable, no degradation observed

9.1.5.1.3 Glufosinat

Daten entnommen aus [European Commission 2007, European Commission 2013]

Common name (ISO)	Glufosinate
Chemical name (IUPAC)	(unless otherwise stated the following data relate to the variant glufosinate-ammonium)
Chemical name (CA)	ammonium(DL)-homoalanin-4-yl(methyl)phosphinate 2-amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)butanoic acid, monoammonium salt
CIPAC No	437.007
CAS No	77182-82-2
EEC No	278-636-6
FAO SPECIFICATION	None
Minimum purity	950
Molecular formula	C ₅ H ₁₂ NO ₄ P.H ₃ N
Molecular mass	198.19
Structural formula	

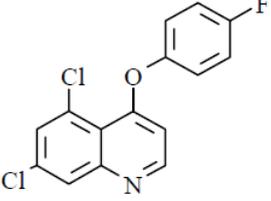
9.1.5.1.4 Kresoxim-Methyl

Daten entnommen aus [EU Commission 1998b]

Common name (ISO)	Kresoxim-Methyl
Chemical name (IUPAC)	Methyl (E)-2-methoxyimino-2-[2-(o-tolyloxymethyl) phenyl]acetate
Chemical name (CA)	(E)- α -(methoxyimino)-2-[(2-methylphenoxy)methyl] benzeneacetic acid methyl ester
CIPAC No	568
CAS No	143390-89-0
EEC No	Not assigned
FAO SPECIFICATION	Not assigned
Molecular formula	$C_{18}H_{19}NO_4$
Molecular mass	313.3
Structural formula	
Melting point	101.6-102.5 °C (99.7 %)
Boiling point	Decomposition at 310°C (99.7 %)
Appearance	White crystals (99.7 %)
Relative density	1.258 kg/l at 20°C (99.7 %)
Vapour pressure	$2.3 \cdot 10^{-6}$ Pa at 20°C (99.6 %)
Henry's law constant	$3.6 \cdot 10^{-7}$ kPa·m ³ ·mol ⁻¹ at 20°C
Solubility in water	2 mg/l at 20°C (99.4 %); effect of pH not required since no dissociation takes place
Solubility in organic solvents	At 20 °C (99.7 %): methanol: 14.9 g/l solvent, ethyl acetate: 123 g/l solvent
Partition coefficient (log P_{ow})	3.4 at 25°C (99.4%)
Hydrolytic stability (DT₅₀)	pH 5: 875 d, pH 7: 34 d, pH 9: 7 h (degradation product BF 490-1)
Dissociation constant	At 20°C no dissociation in aqueous phase
UV/VIS absorption (max.)	204 nm (99.7 %), absorption occurs above 290 nm
Photostability (DT₅₀)	30 d

9.1.5.1.5 Quinoxifen

Daten entnommen aus [European Commission 2003]

Common name (ISO)	Quinoxifen
Developmental Code	XDE-795
Chemical name (IUPAC)	5, 7-dichloro-4 (p-fluorophenoxy) quinoline
Chemical name (CA)	5, 7-dichloro-4 (fluorophenoxy) quinoline
CIPAC No	566
CAS No	124495-18-7
EEC No -	Not assigned
FAO SPECIFICATION -	Not assigned
Minimum purity	970 g/kg maximum. 0.2% (wet basis), 0.25% (dry basis) of the impurity: 4,5,7-trichloroquinoline, (TCQ)
Molecular formula	C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO
Molecular mass	308.14 g/mol
Structural formula	
Melting point Boiling point Not determined	100 - 106 °C (as manufactured, purity 97.4 %)
Appearance	Off white flocculent solid (purified as)
Relative density	1.49 (97.4 % purity), 1.56 (99.7 % purity)
Vapour pressure	1.2 x 10 ⁻⁵ Pa at 20 °C, 2.0 x 10 ⁻⁵ Pa at 25 °C (purified a.s.)
Henry's law constant	3.19 x 10 ⁻² Pa·m ³ ·mol ⁻¹
Solubility in water	pH 6.45 0.116 mg/l, pH 5 0.128 mg/l, pH 7 0.047 mg/l, pH 9 0.036 mg/l
Solubility in organic solvents	Methanol 24,6 g/l, Acetonitrile 22.8 g/l
Partition coefficient (log POW)	log Kow = 4.66 ± 0.002 at 20 °C and pH 6.6
Hydrolytic stability (DT50)	At all pH values the hydrolysis was < 10 % .DT50 > 1 y
Dissociation constant	At pH values greater than 3.6, quinoxifen does not contain an ionisable proton. pKa of protonated quinoxifen = 3.56 equivalent Ka = 2.77 x 10 ⁻⁴
Quantum yield of direct phototransformation in water at ε >290 nm	0.012 (± 0.002)
Flammability	non-flammable
UV/VIS absorption (max.)	298 nm
Photostability (DT50)	1.7 - 23 hours

9.1.5.1.6 Tebuconazol

Daten entnommen aus[BVL 2009, European Commission 2008b],

Common name (ISO)	Tebuconazole
Chemical name (IUPAC)	(RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)- pentan-3-ol
Chemical name (CA)	(±)-α-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-α-(1,1-dimethylethyl)-1H-1,2,4-triazole-1-ethanol
CIPAC No	494
CAS No	107534-96-3
EEC No	403-640-2
FAO SPECIFICATION	minimum 905 g/kg (AGP:CP/ 369, 2000)
Minimum purity	≥ 905 g/kg (Racemat)
Molecular formula	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O
Molecular mass	307.8 g/mol
Structural formula [BVL 2009]	
<p>R-enantiomer (+)-</p> <p>S-enantiomer (-)-</p>	

9.1.5.2 Unterlagen zu den Formulierungen

9.1.5.2.1 Forstzulassung

Boscalid+ Kresoxim-Methyl: Collis® [BVL 2014c]**Collis (025203-00/BAS)**

Wirkstoffgehalt: 200 g/l Boscalid
100 g/l Kresoxim-methyl
Formulierung: Suspensionskonzentrat
GefStoffV: N, Xn | R 40, R 50/53, S 2, S 13, S 35, S 46, S 57, S 36/37, SP001
Anwenderschutz: E0005-1, SB001, SB110, SS110, SS210, SS610
Gewässerschutz: NW262, NW264, **NW468**
Bienenschutz: NB6641
Nutzorganismen: NN130, NN134, NN160, NN165, NN170, NN1842
Sonstiges: -
Zulassungsende: 31.12.2018

Laubholz [Kämpfe und Baumschulen]	Echte MehltauPilze	Freiland bei Befallsbeginn bzw. bei Sichtbarwerden der ersten Symptome max. Zahl Behandl.: 2, in der Kultur/je Jahr: 2; Abstand: 7 bis 10 Tage spritzen, Pflanzengröße bis 50 cm: 0,6 l/ha in 600 l Wasser/ha Wartezeit: N NW609 (5 m)	*
---	--------------------	--	---

Quinoxyfen: Fortress 250 [BVL 2014c]**FORTRESS 250 (024966-00/DOW)**

Wirkstoffgehalt: 250 g/l Quinoxyfen
Formulierung: Suspensionskonzentrat
GefStoffV: N, Xi | R 43, R 50/53, S 2, S 24, S 35, S 46, S 57, S 36/37, SP001
Anwenderschutz: E0005-1, SB001, SE110, SS110, SS210, SS610
Gewässerschutz: NW262, NW264, **NW468, NW604**
Bienenschutz: NB6641
Nutzorganismen: NN134, NN160, NN165, NN1842, NN191
Sonstiges: VH332
Zulassungsende: 31.12.2016

Eiche	Echter Mehltau (Microsphaera alphitoides)	Kämpfe und Forstpflanzgärten bei Befallsbeginn bzw. bei Sichtbarwerden der ersten Symptome max. Zahl Behandl.: 2, in der Kultur/je Jahr: 2; Abstand: 8 bis 12 Tage spritzen, Pflanzengröße bis 50 cm: 0,6 l/ha in max. 400 l Wasser/ha Wartezeit: N NT104, NW607 (50%: 20 m, 75%: 15 m, 90%: 10 m)	*
-------	--	--	---

Glufosinat: Basta® [BVL 2014b]: Bis November 2013 auch für Forst zugelassen- NS 647: Anwendung nur mit Geräten mit Spritzschirm (Neu)**Glufosinat****Basta (043570-00/BAY)****HYGANEX-flüssig (043570-65/BAY; HYG)****RA-200-flüssig (043570-64/BAY; HEN)**

Wirkstoffgehalt: 183 g/l Glufosinat (als 200 g/l Ammonium-Salz)
Formulierung: Wasserlösliches Konzentrat
GefStoffV: T | R 36, R 60, R 63, R 20/21/22, R 48/22, S 2, S 13, S 45, S 53, S 36/37/39, SP001
CLP-Verordnung: Gefahr | GH507, GH508 | EUH 401, H302, H312, H319, H332, H360Fd, H373
Anwenderschutz: SB001, SB110, SE110, SF1891, SS110, SS120, SS2101, SS2202, SS610, ST1102, ST1203
Gewässerschutz: NW261, NW265, **NW468**
Bienenschutz: NB6641
Nutzorganismen: NN161, NN164, NN167, NN330, NN335
Sonstiges: VH300
Zulassungsende: 31.12.2015

Ziergehölze [Ab 1. Standjahr]	Einjährige einkeimblättrige Unkräuter, Einjährige zweikeimblättrige Unkräuter	Freiland Frühsommer und Sommer max. Zahl Behandl.: 2, in der Kultur/je Jahr: 2 spritzen, Zwischenreihenbehandlung, mit Abschirmung, 3,75 l/ha in 400 bis 1000 l Wasser/ha Wartezeit: N NS647, NT109 , NW642-1, VH9161	
Baumschulgehölz- pflanzen [In Baumschulversuch- beeten]	Einjährige einkeimblättrige Unkräuter, Einjährige zweikeimblättrige Unkräuter	Freiland während der Vegetationsperiode; bei Unkrauthöhe bis max. 25 cm max. Zahl Behandl.: 2, in der Kultur/je Jahr: 2; Abstand: 6 bis 14 Tage spritzen, Zwischenreihenbehandlung, mit Abschirmung, 3,75 l/ha in 300 bis 600 l Wasser/ha Wartezeit: N NS647, NT109 , NW642-1, VH9161	

9.1.5.2.2 Ackerbau

Tebuconazol: Orius® [BVL 2014b]

Orius (006341-00/FSG1)

Wirkstoffgehalt: 200 g/l Tebuconazol
 Formulierung: Emulgierbares Konzentrat (Emulsionskonzentrat)
 GefStoffV: Xn | R 63, R 52/53, S 2, S 13, S 35, S 46, S 36/37, SP001
 Anwenderschutz: SB001, SB110, SF245-01, SS110, SS2101, SS610
 Gewässerschutz: NW262, NW264, NW265, **NW468**
 Bienenschutz: NB6641
 Nutzorganismen: NN160, NN165, NN270, NN3842
 Sonstiges: -
 Zulassungsende: 31.12.2020

Auswahl:

Gerste (32-61)	Blattfleckenkrankheit (<i>Rhynchosporium secalis</i>): Echter Mehitau (<i>Erysiphe graminis</i>); Netzfleckenkrankheit (<i>Pyrenophora teres</i>); Zwergrost (<i>Puccinia hordei</i>)	Freiland ab Frühjahr bei Befallsbeginn/Sichtbarwerden der ersten Symptome max. Zahl Behandl.: 2, in der Kultur/je Jahr: 2; Abstand: 7 bis 10 Tage spritzen, 1,5 l/ha in 200 bis 400 l Wasser/ha Wartezeit: F NW605 (50%: 5 m, 75%: 5 m, 90%: *), NW606 (10 m), NW701
Roggen (32-69) Triticale (32-69)	Braunrost (<i>Puccinia recondita</i>)	Freiland ab Frühjahr bei Befallsbeginn/Sichtbarwerden der ersten Symptome max. Zahl Behandl.: 2, in der Kultur/je Jahr: 2; Abstand: 7 bis 10 Tage spritzen, 1,5 l/ha in 200 bis 400 l Wasser/ha Wartezeit: F NW605 (50%: 5 m, 75%: 5 m, 90%: *), NW606 (10 m), NW701
Roggen (32-61)	Blattfleckenkrankheit (<i>Rhynchosporium secalis</i>) Echter Mehitau (<i>Erysiphe graminis</i>)	Freiland ab Frühjahr bei Befallsbeginn/Sichtbarwerden der ersten Symptome max. Zahl Behandl.: 2, in der Kultur/je Jahr: 2; Abstand: 7 bis 10 Tage spritzen, 1,5 l/ha in 200 bis 400 l Wasser/ha Wartezeit: F NW605 (50%: 5 m, 75%: 5 m, 90%: *), NW606 (10 m), NW701
Triticale (32-61)	Echter Mehitau (<i>Erysiphe graminis</i>) Septoria-Arten (<i>Septoria</i> spp.)	Freiland ab Frühjahr bei Befallsbeginn/Sichtbarwerden der ersten Symptome max. Zahl Behandl.: 2, in der Kultur/je Jahr: 2; Abstand: 7 bis 10 Tage spritzen, 1,5 l/ha in 200 bis 400 l Wasser/ha Wartezeit: F NW605 (50%: 5 m, 75%: 5 m, 90%: *), NW606 (10 m), NW701
Weizen (32-61)	Echter Mehitau (<i>Erysiphe graminis</i>)	Freiland ab Frühjahr bei Befallsbeginn/Sichtbarwerden der ersten Symptome max. Zahl Behandl.: 2, in der Kultur/je Jahr: 2; Abstand: 7 bis 10 Tage spritzen, 1,25 l/ha in 200 bis 400 l Wasser/ha Wartezeit: F NW605 (50%: 5 m, 75%: 5 m, 90%: *), NW606 (10 m), NW701

9.2 Ektomykorrhiza und Pestizide in der Literatur - eine nichtrepräsentative Analyse

Die nicht repräsentative Darstellung in Abbildung 48 zeigt als Tendenz, dass die Anzahl der Veröffentlichungen im Bereich „Pestizide“ angestiegen ist, im Bereich der Mykorrhiza jedoch seit Jahren nahezu auf identischem Niveau liegt. Die Datenlage für neue Substanzen (hier Beispiel Tebuconazol) und dem Suchbegriff „ectomykorrhiza“ ist sehr unbefriedigend.

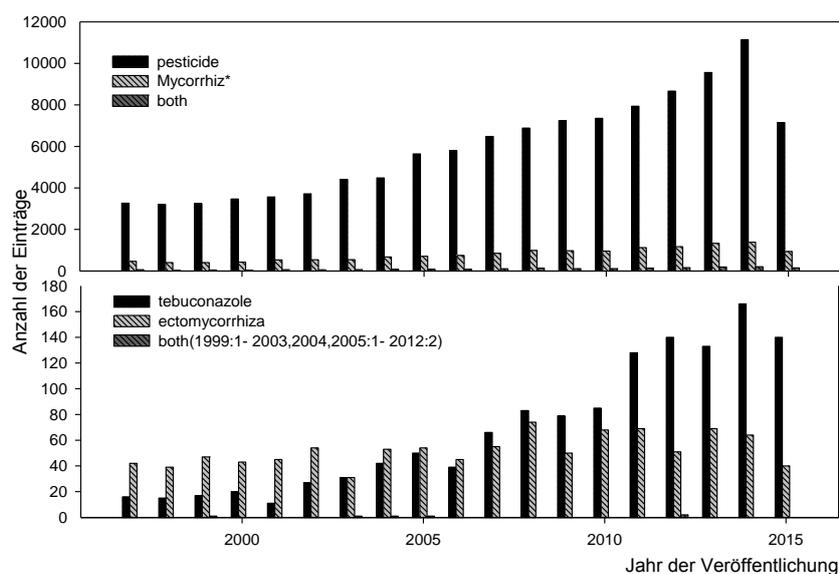


Abbildung 48: Anzahl der Einträge bei Elsevier B.V.: ScienceDirect

Es wurden im Suchfeld von ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com/>) die in der Legende beschriebenen Suchbegriffe eingegeben bzw. eine Kombination und die Anzahl der angezeigten Treffer pro Jahr ohne weitere Analyse der gefundenen Daten dokumentiert.

9.3 Gehalt von Ergosterol bei unbehandeltem Myzel

Die Gehalte an Ergosterol variierten nach dem eingesetzten Nährmedium und extrahierten Ektomykorrhiza-Pilz. Während *Lyophyllum* in einer BAF- Flüssigkultur (N = 3) $342,51 \pm 102 \text{ ng mg}^{-1}$ Ergosterol enthielt, betrug der Gehalt an Ergosterol bei *Lyophyllum* auf Schmelzflockenmedium (N = 18) $253,40 \pm 40 \text{ ng mg}^{-1}$. Alle Angaben beziehen sich auf das Frischgewicht des Myzels, um Substanzverluste durch einen Trocknungsvorgang aufgrund der Substanzeigenschaften (photochemischer und thermischer Abbau) zu vermeiden. Für *Pisolithus arhizus* wurde für in BAF Nährmedium gewachsenes Myzel (N = 6) ein Ergosterolgehalt von $477,95 \pm 87 \text{ ng mg}^{-1}$ FG und für *Pisolithus arhizus* in MNN Nährmedium gewachsenes Isolat (N = 6) von $113,32 \pm 52 \text{ ng mg}^{-1}$ ermittelt. Für *Hebeloma crustuliniforme* wurde ein Ergosterolgehalt

von $603,89 \pm 85 \text{ ng mg}^{-1}$ auf MMN Nährmedium (N = 3) und für *Cenococcum geophilum* auf BAF-Flüssignährmedium (N = 3) ein Ergosterolgehalt von $182,89 \pm 85 \text{ ng mg}^{-1}$ analysiert.

9.4 Vergleich des Wachstumspotenzials der Nullkontrollen im Vergleich zu den Wachstumskurven

Um auszuschließen, dass die Stammisolate deutliche Vitalitätsveränderungen über den Versuchszeitraum aufwiesen, wurde das Wachstumsverhalten der Isolate über den Versuchszeitraum dieser Arbeit immer mit den Ausgangswachstumsraten verglichen.

In Abbildung 49 –A wird das Myzelwachstum für *Pisolithus arhizus* auf BAF Medium (ohne Zugabe von Pestiziden oder Lösungsmittel: Nullkontrollen) dargestellt. Alle Platten wurden mittels Software ausgewertet und die Flächenzunahme ermittelt. Die Nullkontrollen in den einzelnen Versuchen, also die Nullkontrollen zum Expositionsversuch mit den Formulierungen Collis[®], Basta[®] oder Orius[®], wurden analog angesetzt. Aufgrund des ähnlichen Wachstumsverhaltens im Versuchszeitraum von 14 Tagen wird davon ausgegangen, dass die verwendeten Klone in den Expositionsversuchen zur Konzentrations- Wirkungsbestimmung über vergleichbare Wachstumsvoraussetzungen wie die Stammisolate verfügen. Die Nullkontrollen zu Collis[®] und Basta[®] wurden im Sommer 2012 angesetzt und die Nullkontrollen zu Orius[®] für die Hemmversuche im Sommer 2013 als Kontrollen verwendet. Der Vergleich der jeweiligen Nullkontrolle der Hemmversuche (vgl. Kap. 5.1.2) mit den dargestellten Wachstumskurven ermöglichte es zu zeigen, dass sich das Isolat nicht in einer vegetativen Ruhephase während der Versuche befand und somit keine andere Hemmwirkung als durch Pestizidexposition vorlag. Als zusätzliche Sicherheit wurde im Versuchsdesign der Hemmversuche jeweils neben den Lösungsmittelkontrollen auch immer Nullkontrollen angesetzt und gemessen.

Für *Lyophyllum* wurde, wie in Abbildung 49-C dargestellt, gezeigt, dass das flächenmäßige Myzelwachstum unabhängig vom Nährmedium bis zu einer Versuchszeit von 16 Tagen nicht signifikant unterschiedlich verlief. Bei den Hemmversuchen wurde auch für *Lyophyllum* mit dem Nährmedium BAF, entgegen dem von der DSMZ vorgeschlagenen Nährmedium, gearbeitet. Um Versuchsbedingungen für alle eingesetzten ECMs einheitlich definieren zu können, wurde ein Medium favorisiert, welches in der Mehrzahl der Substanzen eindeutig bestimmbar war.

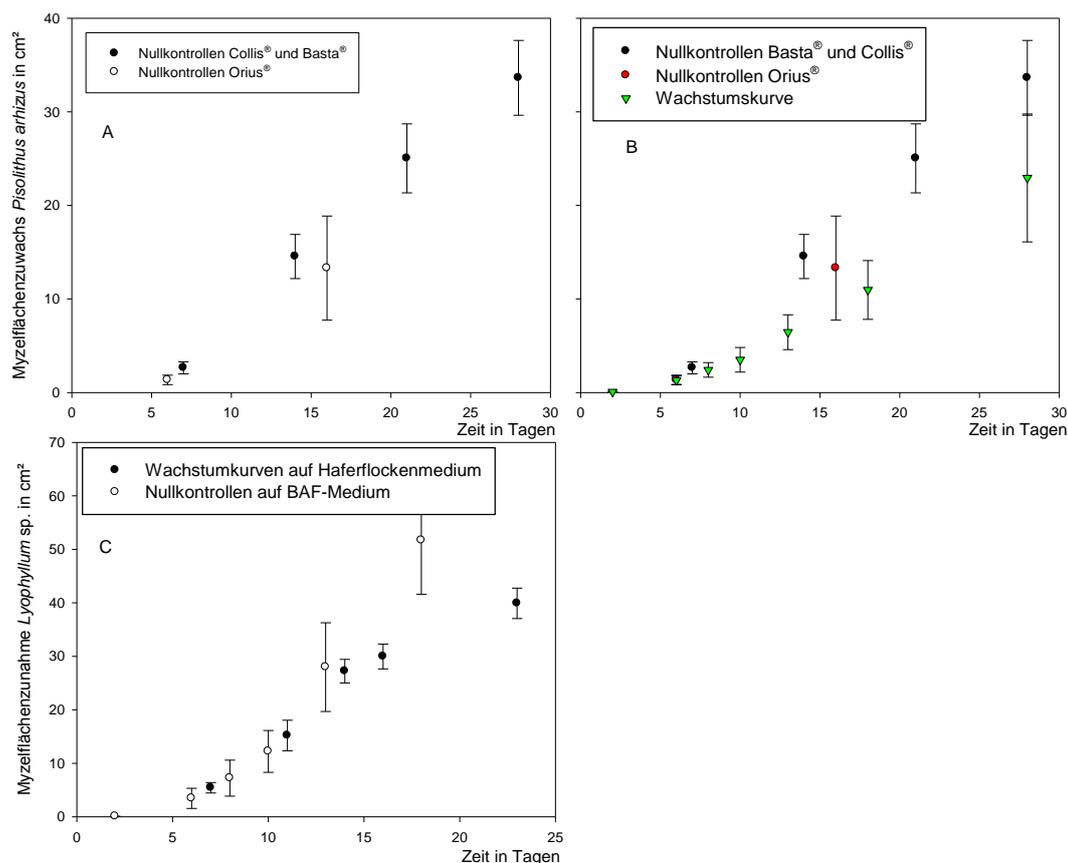


Abbildung 49: Vergleich des Wachstums für *Pisolithus arhizus* (A,B) und *Lyophyllum* (C)

- A- Vergleich der Nullkontrollen für *Pisolithus arhizus* im Versuch von Orius®, Basta® und Collis®.** Zwischen den Versuchsreihen lag etwa ein Jahr. Der auffällig große Fehlerbalken bei 16 Tagen der Nullkontrollen zum Treatment mit Orius® wurde durch eine Platte hervorgerufen, welche ein deutlich reduziertes Wachstum aufwies. Die verwendeten Nährmedien sind unter 9.1.1 nachzulesen.
- B- Vergleich der Wachstumskinetik der *Pisolithus arhizus* Nullkontrollen der Versuche sowie der Wachstumskurven.** Zwischen den Versuchen lagen 2 Jahre. Für die Nullkontrollen Orius®, Basta® und Collis® wurde BAF Nährmedium angewendet. Für das Wachstumsverhalten der unbehandelten Wachstumskurve sind die verwendeten Nährmedien unter 0 nachzulesen.
- C- Wachstumskurven der unbehandelten Kontrollen für *Lyophyllum* auf Haferflocken- bzw. BAF Nährmedium.**

Aufgrund der in Abbildung 49 gezeigten Wachstumskurven konnte ausgeschlossen werden, dass für einen Versuchszeitraum kleiner 18 Tagen die verwendeten Nährmedien einen signifikanten Einfluss auf das Wachstumsverhalten über den Versuchszeitraum aufweisen. Somit wurde das Nährmedium BAF für die angewendeten Isolate als geeignetes Nährmedium gewählt.

9.5 Darstellung der Ergebnisse aus den Mash-Bag Versuchen

Pisolithus arhizus

Ein Myzelwachstum von *Pisolithus arhizus* war in allen Behandlungen vorhanden. Tebuconazol zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum von *Pisolithus arhizus*. Hingegen fand eine Hemmung des Myzelwachstums für 10 % und 100 % AM Orius[®] nach 22 Tagen statt. Ein verlangsamtes Wachstum konnte für die Lösungsmittelkontrolle (K 1% Tebuconazol) nach 17 Tagen für einzelne Isolate der Kontrollgruppe beobachtet werden. Über den gesamten Verlauf betrachtet normalisierte sich diese Wachstumshemmung.

Hebeloma crustuliniforme

Hebeloma crustuliniforme zeigte vor allem für die Lösungsmittelkontrollen K 1% (Orius) ab achten Versuchstag ein auffälliges Wachstumsverhalten und für K 200% (Tebuconazol) und 1% %AM Tebuconazol Isolate zeigte sich eine Hemmung im Myzelwachstum ab dem 26. Versuchstag.

Lyophyllum sp.

Das Myzelwachstum von *Lyophyllum sp.* wurde durch die Behandlung mit 1 % AM (Tebuconazol) ab dem achten Versuchstag zu einer signifikant im Vergleich zur entsprechenden Lösungsmittelkontrolle gehemmt. Auch die Lösungsmittelkontrolle für die mit Orius[®] behandelten Isolate zeigte sich bei der Verdünnungsstufe 1%AM ein Wachstumsstopp.

Lyophyllum sp. zeigte ein sehr schnellwachsendes Myzelwachstum. Ab dem 22. Versuchstag konnte das Myzelwachstum nicht mehr erfasst werden, da die verwendeten Petrischalen, aufgrund der nicht ausreichenden Fläche, der wachstumslimitierende Faktor waren.

Cenococcum geophilum

Bei *Cenococcum geophilum* wurde eine Lag Phase von etwa 8 Tagen beobachtet. Dieses entsprach den Werten aus den Wachstumsversuchen. Für alle Behandlungen konnte ein stetiges Myzelwachstum beobachtet werden, welches jedoch für 200 % (Orius) ab dem 22. Versuchstag signifikant gehemmt war.

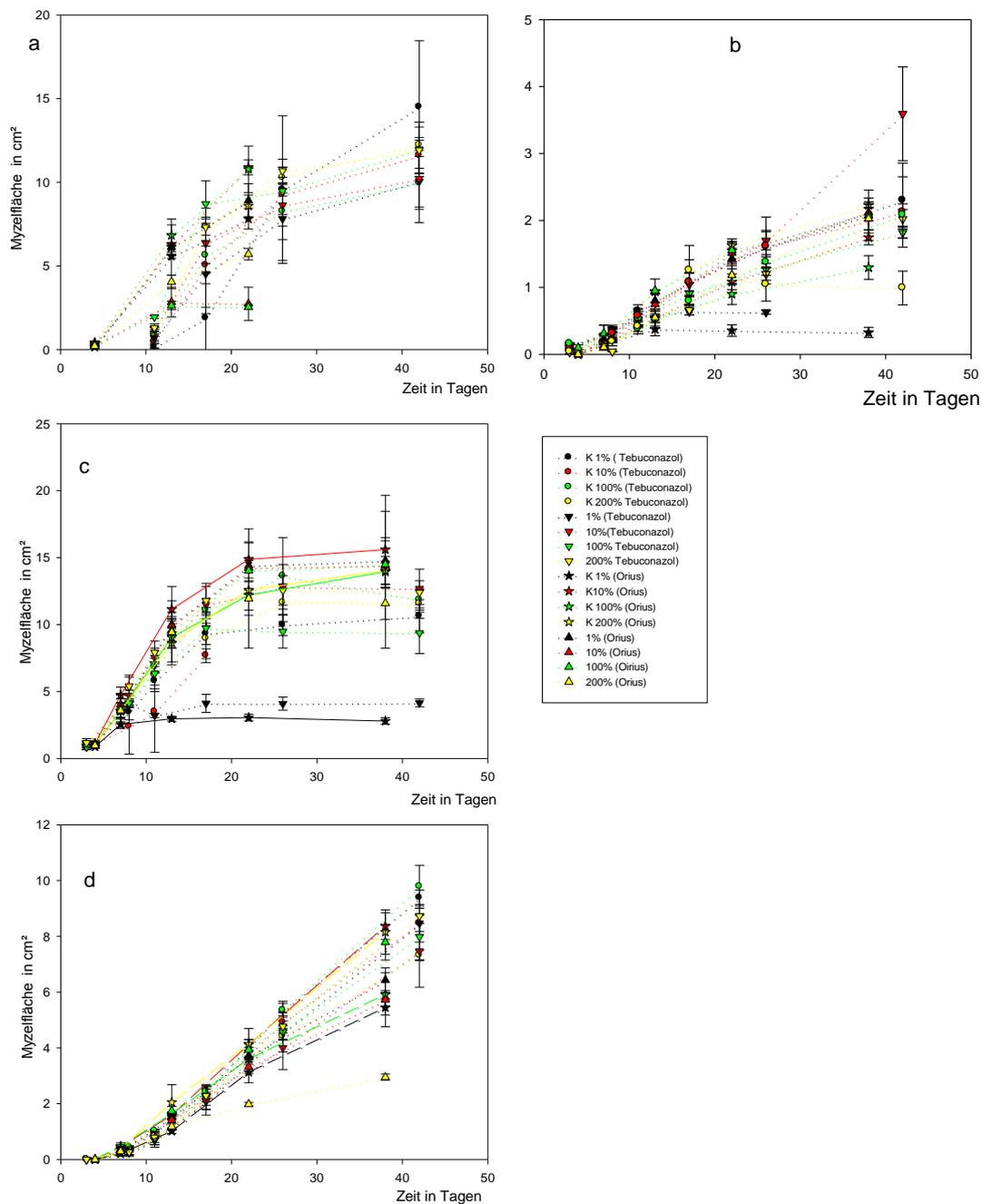


Abbildung 50: Vergleich Myzelflächen im Bodentest mit Tebuconazol und Orius® exponiert

Dargestellt sind die Lösungsmittelkontrollen (K) für Tebuconazol und Orius® sowie die Treatments mit logarithmischen Verdünnungen 200% AM bis 1% AM.

a: *Pisolithus arhizus*: Die Versuchszeiten betragen für Orius® 4, 13 und 22 Tagen und für Tebuconazol nach 11, 17, 26, 42 Tagen.

b: *Hebeloma crustuliniforme*. Die Versuchszeiten betragen 4,8,13,23 und 37 Tage für Orius® und 4,8,11,17, 26 und 42 Tagen für Tebuconazol.

c: *Lyophyllum* Die Versuchszeiten betragen für Orius® 4, 13 und 22 Tage und für Tebuconazol 11,17,26,42 Tage.

d *Cenococcum geophilum*: Die Versuchszeiten betragen für Orius® 4,7, 13 22,38 Tage und für Tebuconazol 3,8, 11,17,26,42 Tage.

9.6 Ergänzende Ergebnisse der Analytik

In diesem Anhang werden Daten und Ergebnisse ergänzend zu den vorne gezeigten Daten zur Methodenentwicklung und Analytik dargestellt.

9.6.1 UV-Spektren von Ergosterol aus Wurzelmatrix extrahiert und eines Kalibrationsstandards

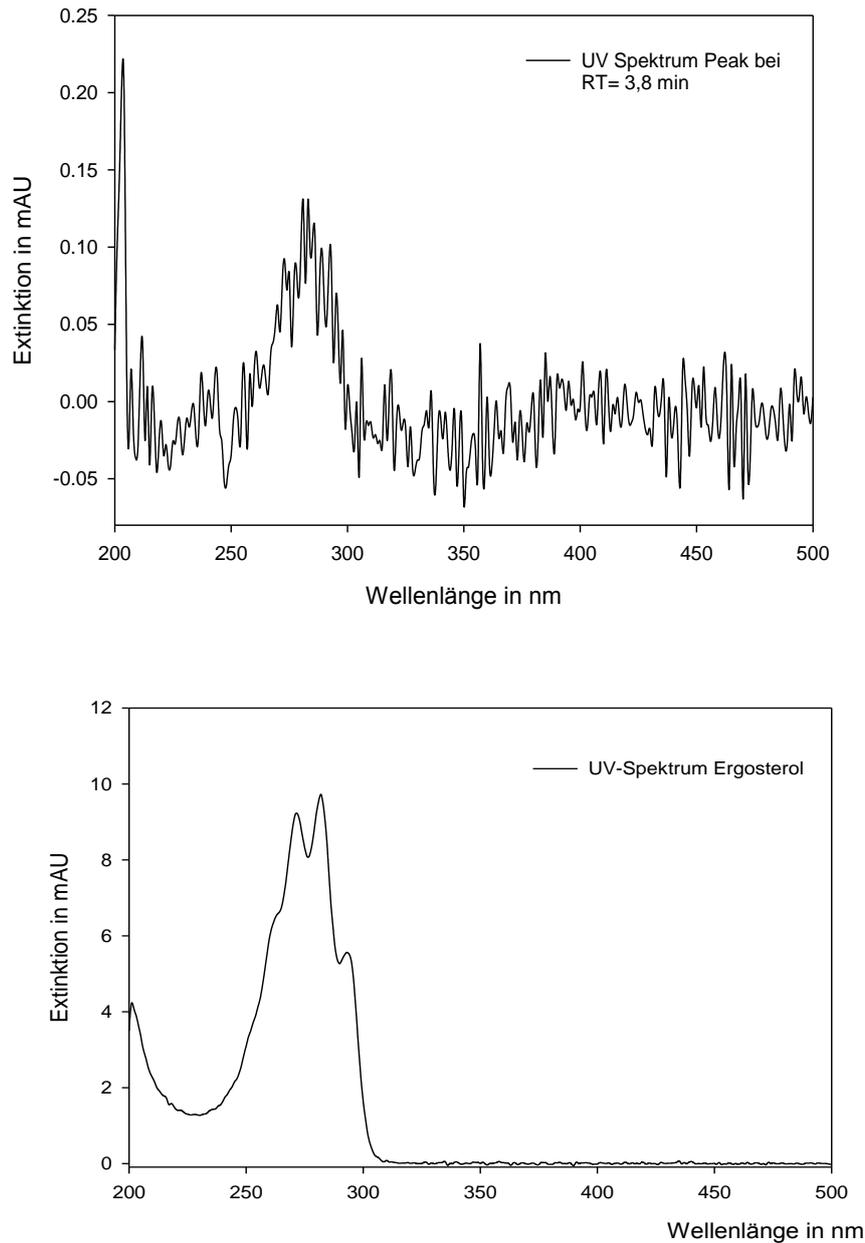


Abbildung 51: UV-Spektren von Ergosterol aus Wurzelmatrix extrahiert und eines Kalibrationsstandards

Oben: UV-Spektrum einer Wurzelprobe (Chromatogramm dargestellt unter Abbildung 24)
Unten: UV-Spektrum eines Kalibrationsstandards ($c = 0,28 \text{ mg l}^{-1}$).

9.6.2 Ergosterolgehalte in den Wurzelproben der Gewächshausversuche

In die Auswertung aufgenommen wurden Flächen, welche oberhalb der Nachweisgrenze lagen und aufgrund des Spektrums dem Biomarker zugeordnet werden konnten.

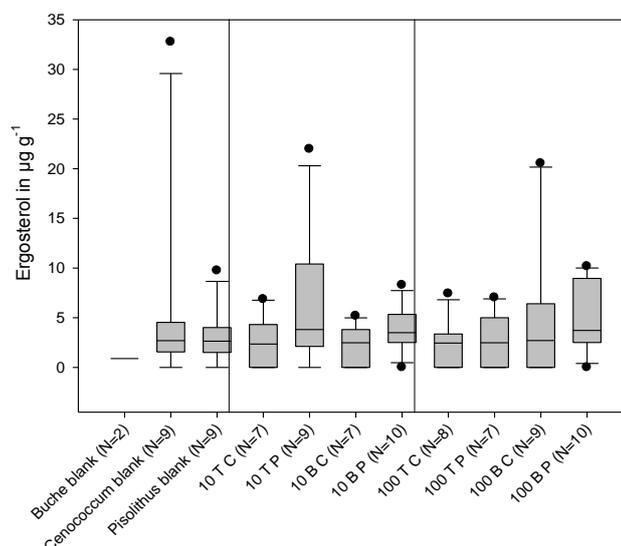


Abbildung 52: Ergosterolgehalte der Wurzelproben

Es wurden jeweils 10 Replikate (Buche blank: 3 Replikate) untersucht. Die Abweichung der N Werte ergeben sich daraus, dass in den nicht berücksichtigten Proben kein Ergosterol nachgewiesen werden konnte. Wurde kein Ergosterol größer der Nachweisgrenze gefunden wurden die Werte Null gesetzt. Wurden Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze ermittelt, wurden diese verwendet. Nahezu alle ermittelten Gehalte lagen jedoch unterhalb der Bestimmungsgrenze.

9.6.3 Wiederfindungen

In Tabelle 26 und Tabelle 27 sind die angesetzten Konzentrationsstufen jeweils mit Bezug zur Applikationsmenge (100% bzw. 10%) angegeben. Bei die Wiederfindungsversuchen für die Bodenproben wurde, wie bei den Gewächshausproben, nur mit einem Aliquot von 1:20 gearbeitet. Bei der Aufarbeitung der Bodenproben wurde ebenfalls nur 2 g von etwa 40g extrahiert. Auch die einzusetzenden Wirkstoffgehalte wurden auf dieses Aliquot berechnet. Somit ergibt sich zum Beispiel für Tebuconazol eine theoretische Konzentration von 75 µg im gesamten Topf. Für die Berechnung der Wurzelnahen Bodenproben und Wurzelproben wurde nicht mit einem Aliquot gerechnet, da angenommen wird, dass das gesamte Probevolumen (gesamte Wurzel oder gesamter Wurzelnaher Boden) analysiert werden wird. Somit ergibt sich hier eine Konzentration für Tebuconazol für 100%AM von 15000 µg l⁻¹. Aufgrund der hohen Wirkstoffgehalte wurde für das 100% AM Level mit

einer 1:100 Verdünnung gearbeitet, für 10%AM mit einer 1:10 Verdünnung. Somit liegen aufgrund der Verdünnungen drei voneinander unabhängige Ansätze für das 1%AM Level vor.

Die Wiederfindungen, welche sich an der tatsächlich empfohlenen Applikationsmenge (AM) des Anwenders orientiert wurde mit 100% empfohlene Applikationsmenge definiert. Für die Treatments mit der verringerten Applikationsmenge wird in Tabelle 27 die Konzentrationsstufen angegeben.

Tabelle 26: Aufgestockte Konzentrationen der Wiederfindungen zum 100%AM Treatment.

Fett hervorgehoben sind die erwarteten Konzentrationsbereiche für die entsprechenden Kompartimente Die Verhältnisse entsprechen den Aufwandmengenempfehlungen von 300 g ha⁻¹ Tebuconazol und 120 g ha⁻¹ Boscalid und 60 g ha⁻¹ Kresoxim-Methyl.

		100%	10%	1%	0.1%	0%
<i>Boden (Aliquot)</i>	<i>Lsmittel</i>	$\mu\text{g l}^{-1}$				
Tebuconazol	ACN	750	75	7,5	0,75	0
Boscalid	ACN	300	30	3,0	0,30	0
Kresoxim-Methyl	ACN	150	15	1,5	0,15	0
<i>Wurzelnaher Boden</i>		$\mu\text{g l}^{-1}$				
Tebuconazol	ACN	15000	1500	150		0
Boscalid	ACN	6000	600	60		0
Kresoxim-Methyl	ACN	3000	300	30		0
<i>Wurzeln</i>		$\mu\text{g l}^{-1}$				
Tebuconazol	MeOH		1500	150	15	0
Boscalid	MeOH		600	60	6	0
Kresoxim-Methyl	MeOH		300	30	3	0

Tabelle 27: Aufgestockte Konzentrationen der Wiederfindungen zum 10%AM Treatment.

Fett hervorgehoben sind die erwarteten Konzentrationsbereiche für die entsprechenden Kompartimente entsprechend einer Reduzierung der tatsächlichen Aufwandmenge um den Faktor 10.

		10%	1%	0,1%	0%
<i>Boden (Aluquot)</i>		$\mu\text{g l}^{-1}$	$\mu\text{g l}^{-1}$	$\mu\text{g l}^{-1}$	$\mu\text{g l}^{-1}$
Tebuconazol	ACN	75	7,5	0,75	0
Boscalid	ACN	30	3,0	0,30	0
Kresoxim Methyl	ACN	15	1,5	0,15	0
<i>Wurzelnaher Boden</i>		$\mu\text{g l}^{-1}$	$\mu\text{g l}^{-1}$	$\mu\text{g l}^{-1}$	$\mu\text{g l}^{-1}$
Tebuconazol	ACN	1500	150	15	0
Boscalid	ACN	600	60	6	0
Kresoxim Methyl	ACN	300	30	3	0
<i>Wurzeln</i>		$\mu\text{g l}^{-1}$	$\mu\text{g l}^{-1}$	$\mu\text{g l}^{-1}$	$\mu\text{g l}^{-1}$
Tebuconazol	MeOH	1500	150	15	0
Boscalid	MeOH	600	60	6	0
Kresoxim Methyl	MeOH	300	30	3	0

9.6.3.1.1 Ergänzende Darstellungen zur Wiederfindung im Boden

In Abbildung 53 -a sind die gefundenen Konzentrationen der Substanzen für den hohen Applikationsbereich (100%AM) hochgerechnet aus den 1:10 Verdünnungen dargestellt. Da zusätzlich zu den Proben des hohen Applikationsniveaus (100%AM) auch Proben im geringeren Applikationsbereich von 10% AM gemessen wurden, sollten diese direkt vermessenen Proben mit den verdünnten Proben des hohen Applikationsniveau im gemessenen Konzentrationswert identisch sein. Dieses ist in Abbildung 53-B Abbildung 54 entsprechend dargestellt. In Tabelle 28 sind die in der Arbeit verwendeten Wiederfindungen und Korrekturfaktoren für das Bodenkompartment dargestellt.

Tabelle 28: Wiederfindungen (WF) für die Bodenproben

Das geringe Applikationsniveau liegt um den Faktor 10 unter dem der hohen Applikationsmenge. Daher ist das in der Tabelle dargestellte 10% Niveau identisch mit dem 100% Niveau der hohen Applikationsmenge, da diese Proben in einer 1:10 Verdünnung gemessen wurden. Im oberen Bereich der Tabelle sind die prozentualen Wiederfindungen dargestellt. Im unteren Teil der Tabelle befinden sich die daraus berechneten Wiederfindungsfaktoren. Die verwendeten Faktoren sind fett unterlegt dargestellt.

WF Boden (Aliquot) in %	LSM	100%	10%	1%	0.1%	AM
Tebuconazol	ACN	102	102	129	105	%
Boscalid	ACN	102	105	121	82	%
Kresoxim Methyl	ACN	95	105	116	<NG	%
<i>Wiederfindungsfaktoren zur Korrektur</i>						
Tebuconazol	ACN	0,98	0,98	0,78	0,95	%
Boscalid	ACN	0,98	0,95	0,83	1,22	%
Kresoxim Methyl	ACN	1,05	0,95	0,86	<NG	%

9.6.3.1.2 Ergänzende Darstellungen zur Wiederfindung Wurzelnaher Bodenbereich

In Abbildung 53- C ist für die Wiederfindungen im Wurzelnahen Bereich der Bereich der 1% Applikationsmenge dargestellt. Die Proben 10% AM und 100%AM wurden jeweils als Messlösung auf 1% AM verdünnt. Es liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben vor. In Tabelle 29 sind die verwendeten Korrekturfaktoren entsprechend den ermittelten Wiederfindungen dargestellt.

Tabelle 29: Wiederfindungen (WF) für den Wurzelnahen Boden

Das geringe Applikationsniveau liegt um den Faktor 10 unter dem der hohen Applikationsmenge. Daher ist das in der Tabelle dargestellte 10% Niveau identisch mit dem 100% Niveau der hohen Applikationsmenge, da diese Proben in einer 1:10 Verdünnung gemessen wurden. Im oberen Bereich der Tabelle sind die prozentualen Wiederfindungen dargestellt. Um unteren Teil der Tabelle die daraus berechneten Wiederfindungsfaktoren. Die verwendeten Faktoren sind Fett unterlegt dargestellt.

WF Wurzelnahe Boden in %	LSM	100%	10%	1%	0,1%	AM
Tebuconazol	ACN	110	99	93	96	%
Boscalid	ACN	109	101	93	99	%
Kresoxim-Methyl	ACN	111	99	96	96	%
<i>Wiederfindungsfaktoren zur Korrektur</i>						
Tebuconazol	ACN	0.91	1.01	1.08	1.04	
Boscalid	ACN	0.92	0.99	1.07	1.01	
Kresoxim-Methyl	ACN	0.90	1.01	1.04	1.05	

9.6.3.1.3 Ergänzende Darstellungen zur Wiederfindung in der Wurzel

Die erwarteten Konzentrationen lagen für das Kompartiment Wurzel im Bereich von 15-150 $\mu\text{g l}^{-1}$ für den Analyten Tebuconazol. Da die weiteren Substanzen im entsprechenden Verhältnis im Standard enthalten sind, wird exemplarisch die Konzentration von Tebuconazol verwendet.

In Abbildung 53-e ist der Bereich von 0,1% AM entsprechend einer exemplarischen Konzentration von $c = 15 \mu\text{g l}^{-1}$ Tebuconazol dargestellt. In diesem Konzentrationsbereich konnte ebenfalls für fast alle Substanzen beobachtet werden, dass der tatsächliche Konzentrationswert überschritten wird. In Tabelle 30 sind die Wiederfindungen für das Wurzelkompartiment dargestellt.

Tabelle 30 Wiederfindungen (WF) für das Kompartiment Wurzel

Im oberen Bereich der Tabelle sind die prozentualen Wiederfindungen dargestellt. Um unteren Teil der Tabelle die daraus berechneten Wiederfindungsfaktoren. Die verwendeten Faktoren sind Fett unterlegt dargestellt.

WF Wurzelnahe Boden in %	LSM	10%	1%	1%	0,1%	AM
Tebuconazol	ACN	119	106	99	90	%
Boscalid	ACN	111	102	96	89	%
Kresoxim Methyl	ACN	108	105	97	87	%
<i>Wiederfindungsfaktoren zur Korrektur</i>						
Tebuconazol	ACN	0.84	0.94	1.01	1.11	
Boscalid	ACN	0.90	0.98	1.04	1.12	
Kresoxim Methyl	ACN	0.92	0.95	1.04	1.15	

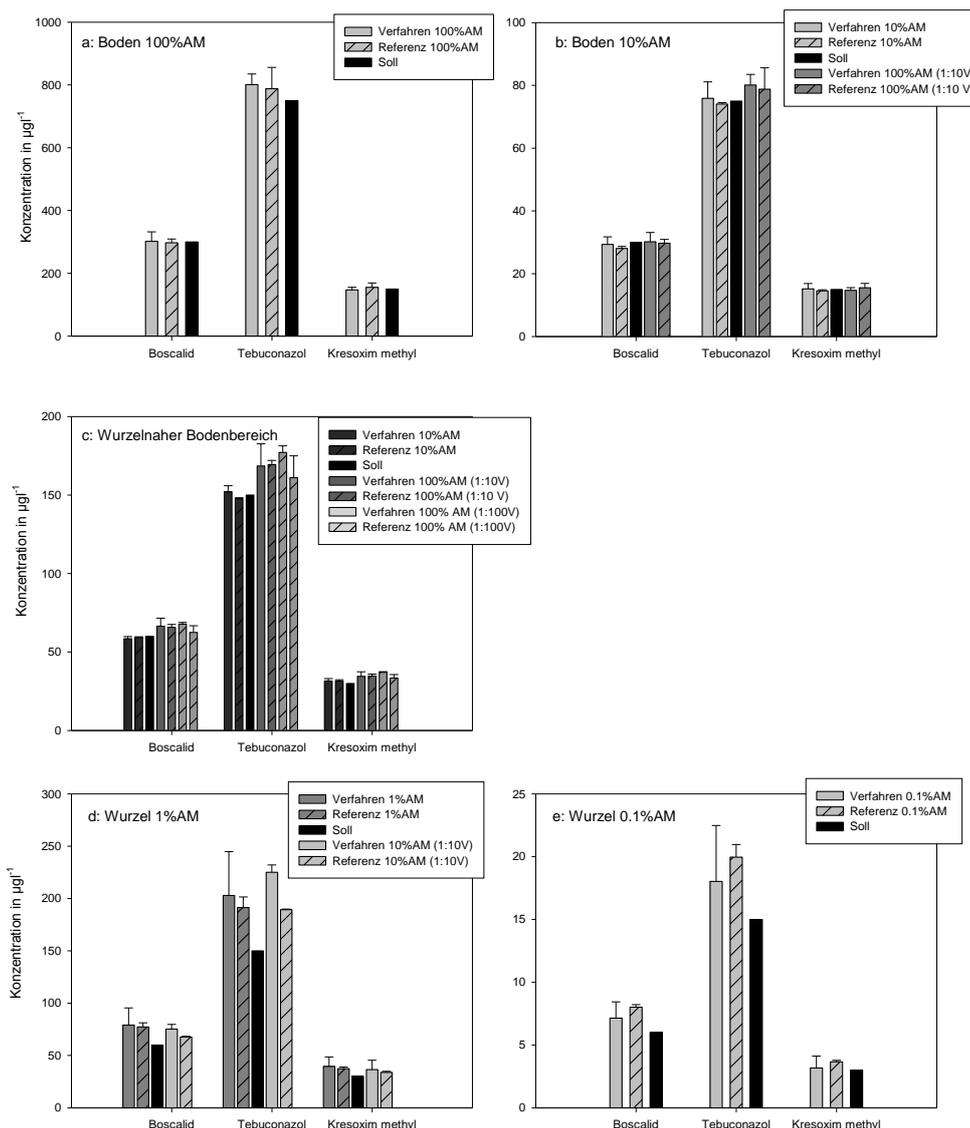


Abbildung 53: Wiederfindungen in den Kompartimenten

Als Verfahren sind die gemessenen Konzentrationen über das Verfahren bezeichnet. Der Soll-Wert ist durch den schwarzen Balken Soll gekennzeichnet.

- a: Wiederfindung Boden- 100%AM:** Die dargestellten Konzentrationen wurden aus der 1:10 Verdünnung unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors gemessen.
- b: Wiederfindungen im Boden- 10%AM:** Vergleich der direkt gemessenen unverdünnten Proben mit den verdünnten Proben der 100% AM. Die Balken mit Verfahren 100%AM (1:10V) sind die nicht korrigierten Ergebnisse des hohen Applikationsniveaus.
- c: Wiederfindungen Wurzelnaher Bodenbereich:** Die Wiederfindungen wurden als Messlösungen entsprechend 1% AM gemessen. Dazu wurden die Messlösungen um den Faktor 10 bzw. 100 verdünnt und mit der direkten Messlösung 1% AM verglichen. Die Balken mit Verfahren 10%AM (1:10V) und Verfahren 100% (1:100V) sind Messwerte der entsprechenden Proben.
- d: Wiederfindungen Wurzel 1%AM:** Die Wiederfindungen wurden für das 1% AM entsprechende Konzentrationslevel gemessen. Ebenfalls wurden Messlösungen aus dem 10% AM Level um den Faktor 10 verdünnt und ebenfalls gemessen. Auffällig ist der Mehrbefund gegenüber dem Sollwert. Die Balken mit Verfahren 10%AM (1:10V) sind Messwerte der entsprechenden Proben, welche in Verdünnung gemessen wurden.
- e: Wiederfindung Wurzel 0.1%AM:** Die Wiederfindungen wurden für das 0,1%AM entsprechende Konzentrationslevel gemessen.

9.6.4 Kalibrationen

9.6.4.1.1 Matrixkalibrationen

Im Folgenden werden Beispielkalibrationen für die Treatments im Gewächshausversuch dargestellt. Hierbei wird in Abbildung 54 exemplarisch eine Kalibration für die Applikation von 100% AM Orius® für den Wurzelnahen Bereich der Replikate, welche mit *Cenococcum geophilum* inokuliert wurden, dargestellt. Es wurden die relative Konzentration der Substanz im Verhältnis zum Internen Standard gegen den relativen Response der Substanz im Verhältnis zum internen Standard aufgetragen.

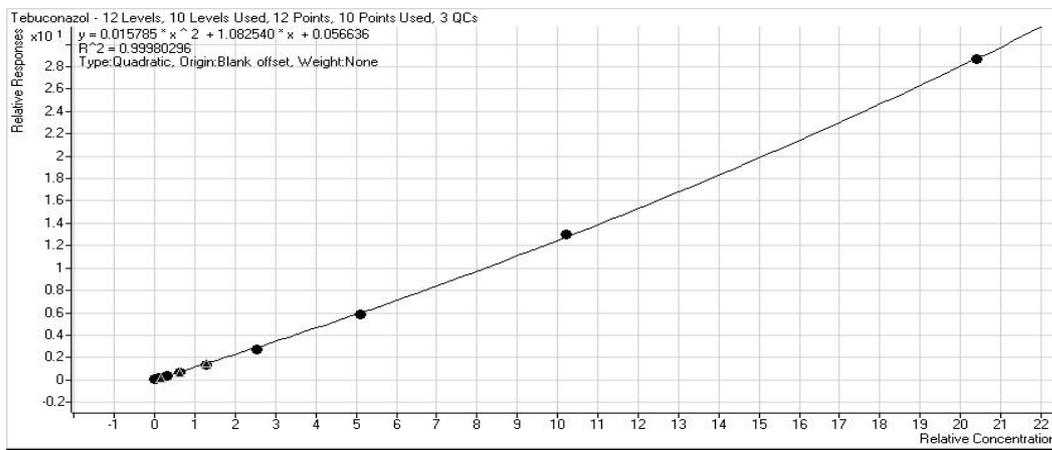


Abbildung 54: Kalibration Tebuconazol

Beispiel Kalibration für das Kompartiment Wurzelnahe Bodenbereich. Hier Kalibration für 100 %AM mit Orius ® behandelt. Buchenjungepflanzen wurden mit *Cenococcum geophilum* inokuliert.

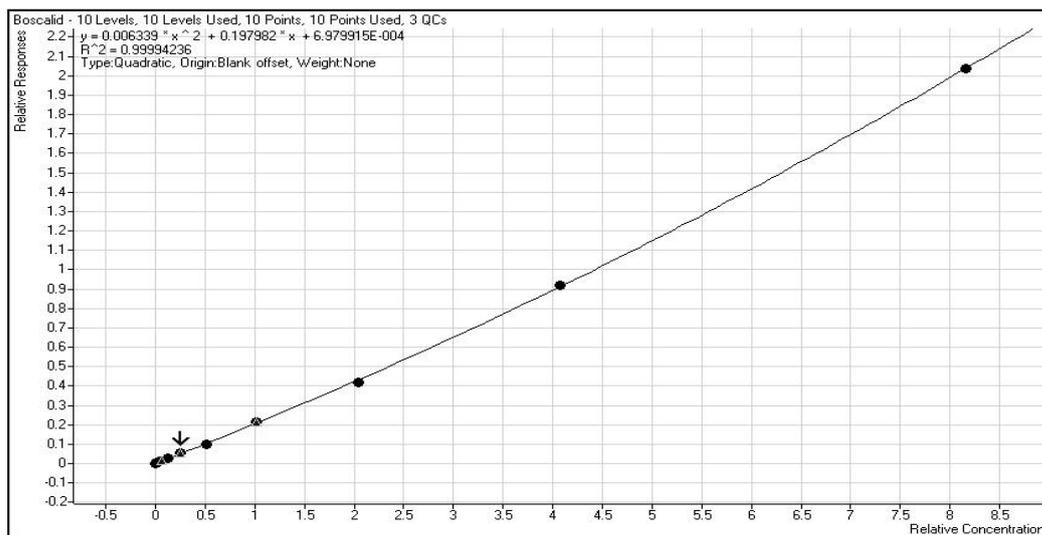


Abbildung 55: Kalibration: Wurzeln 10% Boscalid und *Cenococcum geophilum*

Beispiel Kalibration für das Kompartiment Wurzel (Extraktionsmittel Methanol). Hier Kalibration für 10 %AM mit Collis ® behandelt. Buchenjungepflanzen wurden mit *Cenococcum geophilum* inokuliert.

9.6.4.1.2 Kalibration für Tebuconazol im Myzel von *Pisolithus arhizus*

In Abbildung 56 wird die Kalibration entsprechend der Kalibrationspunkte dargestellt.

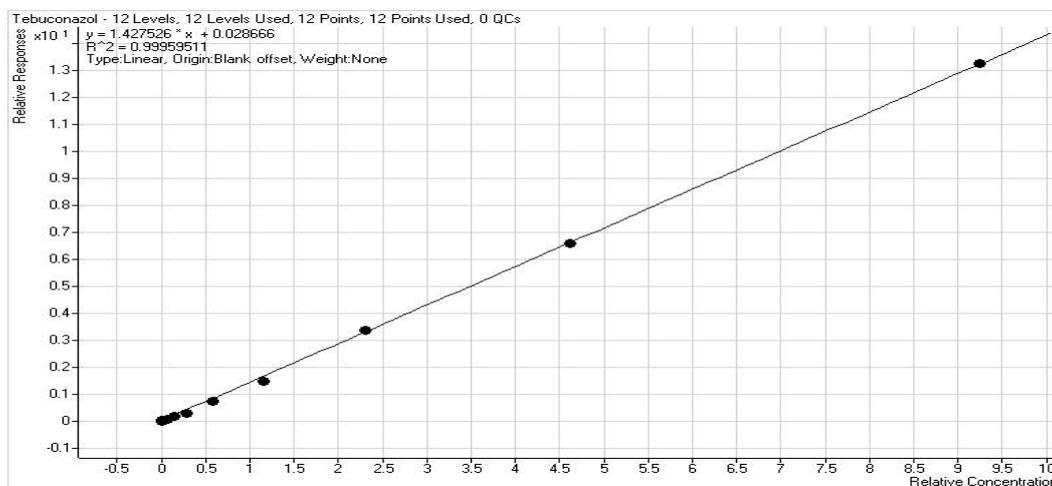


Abbildung 56: Kalibration Tebuconazol für die Myzelproben

Aufstockung der QC für die Matrixkalibrationen

Dabei wurde für die tatsächlichen Applikationsmengen für die Bodenproben und die Proben aus dem Wurzelnahen Bodenbereich aus dem GSTD4 eine Zwischenverdünnung ZV 100 ($c = 1,5 \text{ mg l}^{-1}$) für die Aufstockung der Proben hergestellt. Für die Proben der geringeren Applikationsmenge wurde für den Boden und den Wurzelnahen Boden sowie für alle Wurzelproben aus dem GSTD4 eine Zwischenverdünnung ZV 1000 ($c = 150 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$) angesetzt. Zur Aufstockung wurden jeweils 5 μl der entsprechenden Zwischenverdünnung direkt in das Messvial gegeben.

Tabelle 31: Aufstockung der Proben

Substanz	ZV1000 $\mu\text{g l}^{-1}$	ZV 100 $\mu\text{g l}^{-1}$
Tebuconazol	13,64	136,4
Boscalid	5,45	54,5
Kresoxim-Methyl	2,73	27,3

9.6.5 Analytische Konzentrationen der Expositionslösungen

Die Lösungen, welche zur Exposition der Gewächshausversuche eingesetzt wurden, wurden nicht zum Zeitpunkt der Exposition analytisch bestimmt. Für die zeitlich versetzt gemessenen Konzentrationen wurde mit der unter 4.3.5.2 beschriebenen Methode gearbeitet und es ergab sich für die 10% AM der Formulierung Orius® eine Konzentration von $c = 3,75 \text{ mg l}^{-1}$ Tebuconazol und somit eine Abweichung von 25% zur nominellen Konzentration von $c = 5 \text{ mg l}^{-1}$. Für die 100%AM ergaben die

Messungen eine Konzentration von $c = 58,5 \text{ mg l}^{-1}$ Tebuconazol. Hier beträgt die Abweichung zur nominellen Sollkonzentration von $c = 50 \text{ mg l}^{-1}$ etwa 17%. Für beide Lösungen wird im Rahmen dieser Arbeit mit der nominellen Konzentration gearbeitet, da die genaue Konzentration bei Exposition nicht gemessen wurde.

Für Collis[®] wurde die Konzentration von Boscalid und Kresoxim-Methyl in der 100%AM Lösung bestimmt. Die beiden Substanzen sollen in der Formulierung im Verhältnis 2:1 vorliegen. In den Messungen bestätigte sich dieses Verhältnis. Die Konzentration von Boscalid in der Lösung betrug $c = 1,67 \text{ mg l}^{-1}$ im Vergleich zur Sollkonzentration von $c = 2 \text{ mg l}^{-1}$ und somit etwa 17% Abweichung vom Sollwert. Die Konzentration von Kresoxim-Methyl betrug $c = 0,85 \text{ mg l}^{-1}$. Dies entspricht einer Abweichung von 15% vom Sollwert.

Substrat: Für die mit Orius[®] behandelten Substratproben ergab sich für das 100% Applikationsmengen Niveau mit $71,7 \pm 8,1 \mu\text{g}$ gegenüber des nominellen Gehaltes von $75 \mu\text{g}$ eine Abweichung von 4% gegenüber dem tatsächlichen Gehalt. Für Collis[®] konnte von Böhme [2012] $33,4 \pm 0,8 \mu\text{g}$ Boscalid und $12,8 \pm 1,2 \mu\text{g}$ Kresoxim-Methyl pro Topf ermittelt werden. Somit weichen die tatsächlich ausgebrachten Konzentrationen gegenüber den theoretischen Konzentrationen zwischen 4 und 15% für das 100%AM-Level ab. Die Messungen für das 100%AM Niveau der Orius[®]-Lösung lagen ebenfalls mit 17% Abweichung in der gleichen Größenordnung.

Für das niedrigere Applikationsniveau wurden für Orius[®] mit $12,3 \pm 0,1 \mu\text{g}$ Gehalt pro Topf gegenüber eines Sollgehaltes von $7,5 \mu\text{g}$ also ein 1,6 fach höheren Wirkstoffgehalt im System ermittelt. Dieses konnte für die gealterte Ausgangslösung nicht bestätigt werden. Hier lag die berechnete Konzentration bei $3,75 \mu\text{g l}^{-1}$ unterhalb der theoretischen Konzentration von $5 \mu\text{g l}^{-1}$. Für Collis[®] wurde die Wirkstoffkonzentration bestimmt. Hier betrug die Boscalid-Konzentration in der Lösung $1,67 \mu\text{g l}^{-1}$ im Vergleich zur Sollkonzentration von $2 \mu\text{g l}^{-1}$. Für Kresoxim-Methyl betrug die gemessene Konzentration in der Lösung $0,85 \mu\text{g l}^{-1}$ gegenüber dem Sollwert von $1 \mu\text{g l}^{-1}$.

Aufgrund der Daten konnte gezeigt werden, dass für die 100%AM die Ausgangskonzentration im Treatment nicht signifikant abweichend war von der berechneten Sollkonzentration. Die ermittelten Konzentrationen von Böhme wurden nur im Substrat und mit einer leicht variierenden Extraktionsmethode (Wasseranteil bei der Extraktion) gemessen [Böhme 2012].

9.7 Gewächshausplan

Aus jedem der gezeigten Treatments wurden 10 Proben randomisiert entnommen und analysiert. Für die Kontrollen wurden jeweils 3 Proben entnommen.

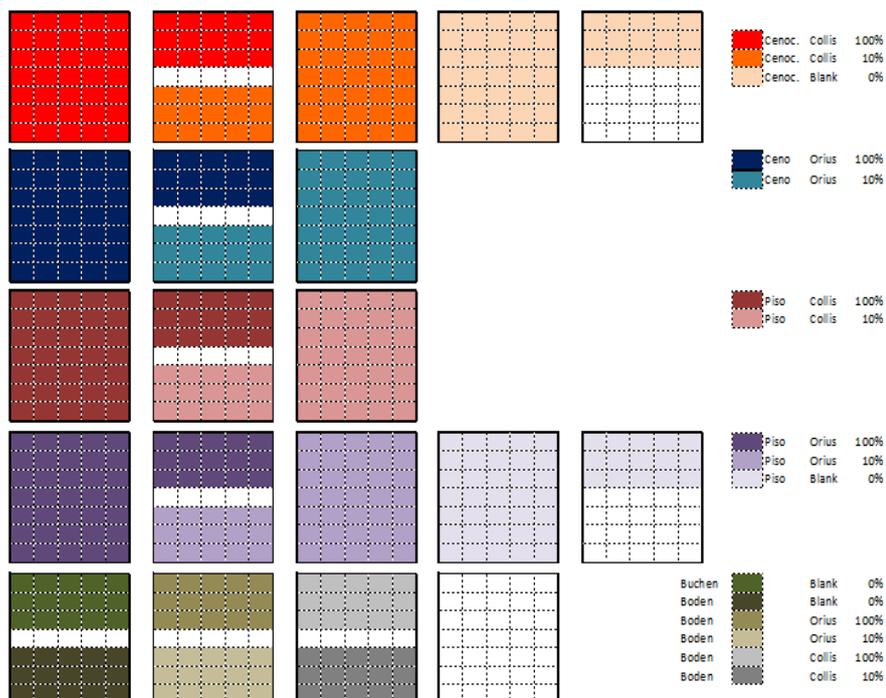
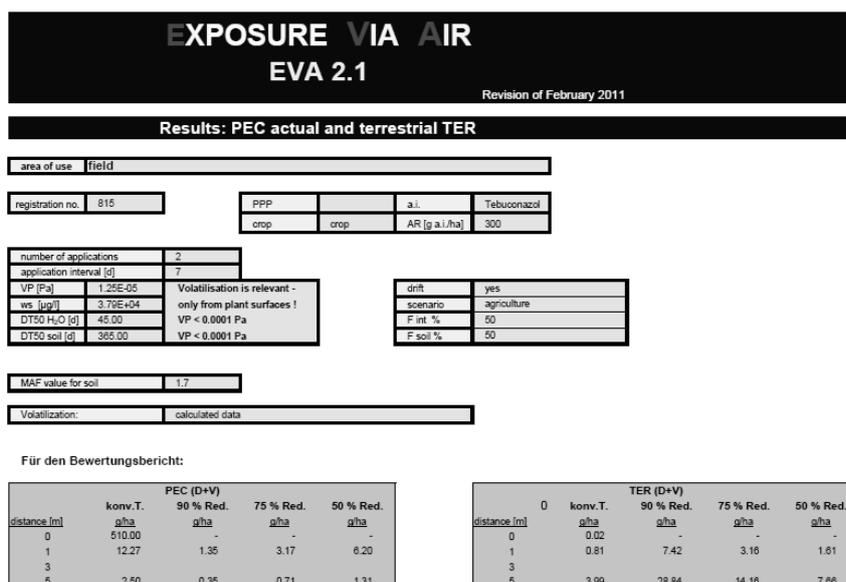


Abbildung 57: Probenplan Gesamtversuch

Inokuliert wurde mit Cenoc.: *Cenococcum geophilum*; Piso: *Pisolithus arhizus*.

9.8 Berechnungen des EVA Modells für Tebuconazol



Mein Dank gilt:

PROF. DR. ING W.-K. RUCK

Für das Vertrauen, durch welches mir die Erstellung dieser Arbeit am Institut für Nachhaltige Chemie und Umweltchemie an der Leuphana Universität Lüneburg ermöglicht wurde

PD. DR. KARIN PRITSCH

Für die Übernahme des Co-Referates und die bereichernden Anregungen und Diskussionen in Schleyern

JUN.-PROF. DR. RALF SCHÄFER

Für die Übernahme des Co-Referates und das Interesse an der Fragestellung

DR. W.-U. PALM

Für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Die vielen konstruktiven Diskussionen bei einer Tasse Cappuccino im Café 9 haben zu wertvollen Anregungen geführt. Vielen Dank!

DR. SCHNEIDER, DR. HUTTER, DR. DÖHRING UND DEN MITARBEITERN DER INOQ

Für die Einführung in die spannende Thematik sowie die wertvollen praktischen Tipps.

DR. FELDMANN, DR. WAGNER, FR. KAROLCZAK-KLEKAMP UND FR. HÖFERVOM JKI

Für die wissenschaftliche Beratung und die Betreuung während der Gewächshausversuche.

A. REESE, B. HENSEN, C. HILLEBRECHT, P. MELICHAR, M. BÖHME UND N. GEIFHAN

*Deren akademischen und privaten Werdegang ich für ein kleines Stück begleiten durfte.
Ihr habt diese Arbeit bereichert.*

MEINEM BÜRO 13.233

*DANKE- für die vielen Stunden des Austausches unter Kolleginnen und Kollegen.
Ihr seid die Besten!*

ALLEN MITARBEITERN DES INSTITUTS NACHHALTIGE CHEMIE UND UMWELTCHEMIE

*Für die tolle Zusammenarbeit und das sehr angenehme Arbeitsklima.
Ich habe mich sehr wohl bei euch gefühlt.*

ANJA GRUHN, CHRISTINA SCHULZE UND DR. ANNETTE HAISS

Für die vielen freundschaftlichen Gespräche zu ganz anderen Themen

DEN MENSCHEN

*Die diese Arbeit Korrektur gelesen haben.
Alle verbleibenden Fehler habe ich vollständig eigenständig
wieder hineingezaubert.*

ZULETZT DANKE ICH MICHAEL, SANDRINE, JEAN-MICHEL UND ANJULI