



Aquatische Pilze in der Risikobewertung von Pflanzenschutzmitteln - unwichtig oder nur unbeachtet?

Steffen Carl¹ (Steffen.Carl@uba.de), Valeska Contardo-Jara¹ (Valeska.ContardoJara@uba.de),
Ulrike Scholz¹ (Ulrike.Scholz@uba.de), Christiane Baschien² (Christiane.Baschien@dsmz.de),
Silvia Mohr¹ (Silvia.Mohr@uba.de)

¹ Umweltbundesamt, Fachgebiet IV 2.5 Spurenanalytik, Fließ- und Stillgewässersimulation, Schichauweg 58, 12307 Berlin

² Leibniz Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Abt. Bioeconomy and Health Research, Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig

Zusammenfassung

Aquatische Pilze leisten einen wesentlichen Beitrag zur Funktion aquatischer Ökosysteme, insbesondere durch den Abbau von totem organischem Material. Trotz dieses wichtigen Beitrags werden (aquatische) Pilze bislang nicht in der Umwelt- risikobewertung von Pflanzenschutzmitteln berücksichtigt. Im UBA Fachgebiet „Spurenanalytik, Fließ- und Stillgewässersimulation“ wird daher in Kooperation mit den Stoffvollzügen der Frage nachgegangen, ob es sich hierbei um eine regulatorische Lücke handelt. Immer mehr Studien zeigen, dass eine Gefährdung der Artenvielfalt besteht und indirekte Effekte auf das höhere Nahrungsnetz nicht ausgeschlossen werden können. Im vorliegenden Artikel wird ein Überblick über den derzeitigen Kenntnisstand und die am UBA durchgeführten Studien zu der Thematik gegeben.

Aquatische Pilze – unscheinbar aber ökologisch wichtig

Aquatische Pilze verbringen per Definition mindestens einen Teil ihres Lebenszyklus im Wasser (Tsui et al., 2016), sind in der Lage ihre Sporen über die Wassersäule zu verbreiten und

kommen ubiquitär in allen Gewässern vor (Shearer et al., 2007). Sie tragen wie auch terrestrische Pilze (Runnel et al., 2024) wesentlich zur Funktion von Ökosystemen bei (Seena et al., 2023). Neben parasitierenden Pilzen (Erhalt des ökologischen Gleichgewichts) ist dabei im aquatischen Milieu vor allem der Abbau von totem organischem Material (*Saprotrophie*) als wichtige Ökosystemfunktion zu nennen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Gruppe der „aquatischen Hyphomyceten“, die vor allem für die initiale Zersetzung von Laub in Fließgewässern bekannt ist (Ingold, 1942). Diese polyphyletische (= mehrstämmige) Gruppe ist durch ihre ökologische Nische definiert (Bärlocher, 2016). Sie besteht zum Großteil aus asexuellen Schlauchpilzen (*Ascomycota*) ähnlich den Schimmelpilzen, aber mit besonderen, an die Lebensweise im Wasser angepassten Sporenformen (Abb. 1), welche die Anheftung an Laub auch bei Strömung erleichtern (Dang et al., 2007).

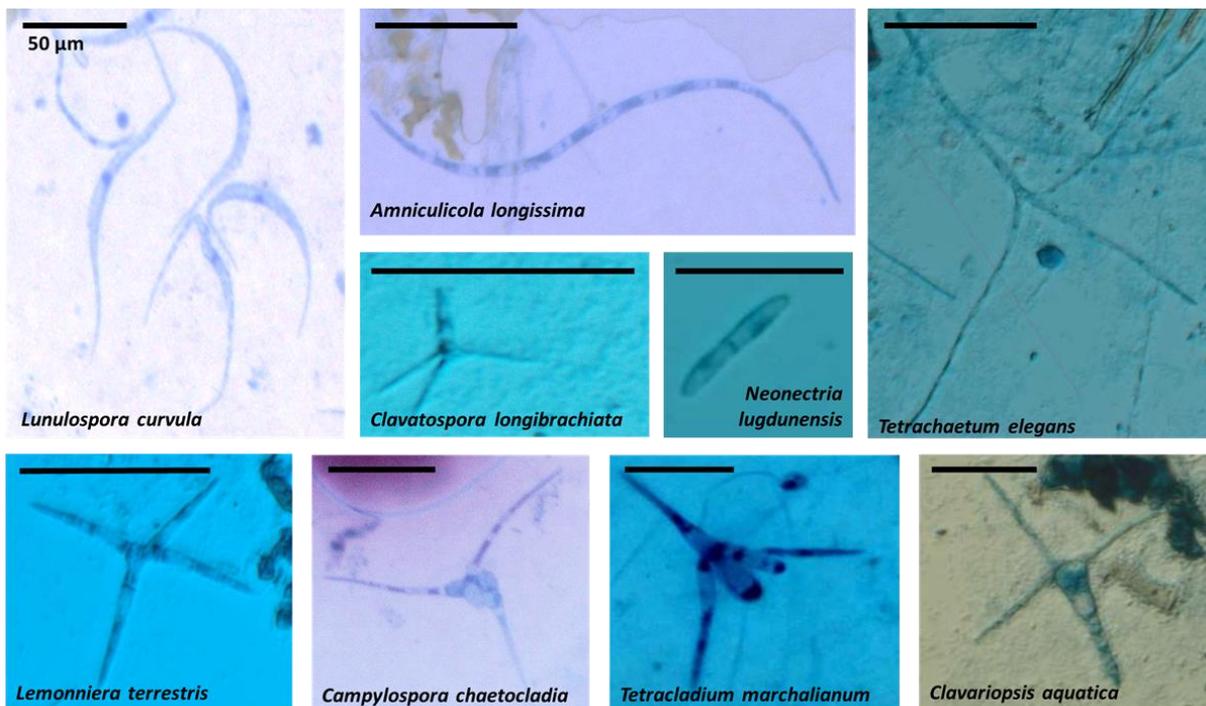


Abb. 1: Einige Beispiele asexueller Sporen (Konidien) aquatischer Hyphomyceten. Maßstab = 50 µm. Quelle: UBA, eigene Aufnahmen.

Als Saprobien befinden sich aquatische Pilze auf einer der unteren Ebenen des Nahrungsnetzes aquatischer Ökosysteme (Abb. 2), wo sie eine wichtige ‚Bottom-up‘ Funktion erfüllen (Gonçalves et al., 2014). Mit ihren Exoenzymen zerlegen sie komplexe Makromoleküle wie Cellulose, Pektin und Lignin, sodass diese auch für höhere Zersetzer wie Bachflohkrebse nahrungsvorbereitbar werden (Gessner et al., 2007). Zudem wird der Energiegehalt des Laubs zusätzlich durch die Pilzbiomasse gesteigert.

Die Pilze spielen somit eine entscheidende Rolle im gesamten Nährstoffkreislauf, unterstützen den Energietransfer zu höheren Trophieebenen und leisten einen wichtigen Beitrag zur Selbstreinigungsfunktion der Gewässer. Letzteres kann sogar den Abbau von Schadstoffen einschließen, weshalb auch die Eignung von Pilzen zur biologischen Schadstoffeliminierung diskutiert wird (Seena et al., 2023). Trotz sich überschneidender Funktionen ist die Diversität der Pilzgemeinschaft essentiell, um ihre Ökosystemfunktionen zu erhalten (Fleckler und Bundschuh, 2020; Runnel et al., 2024).

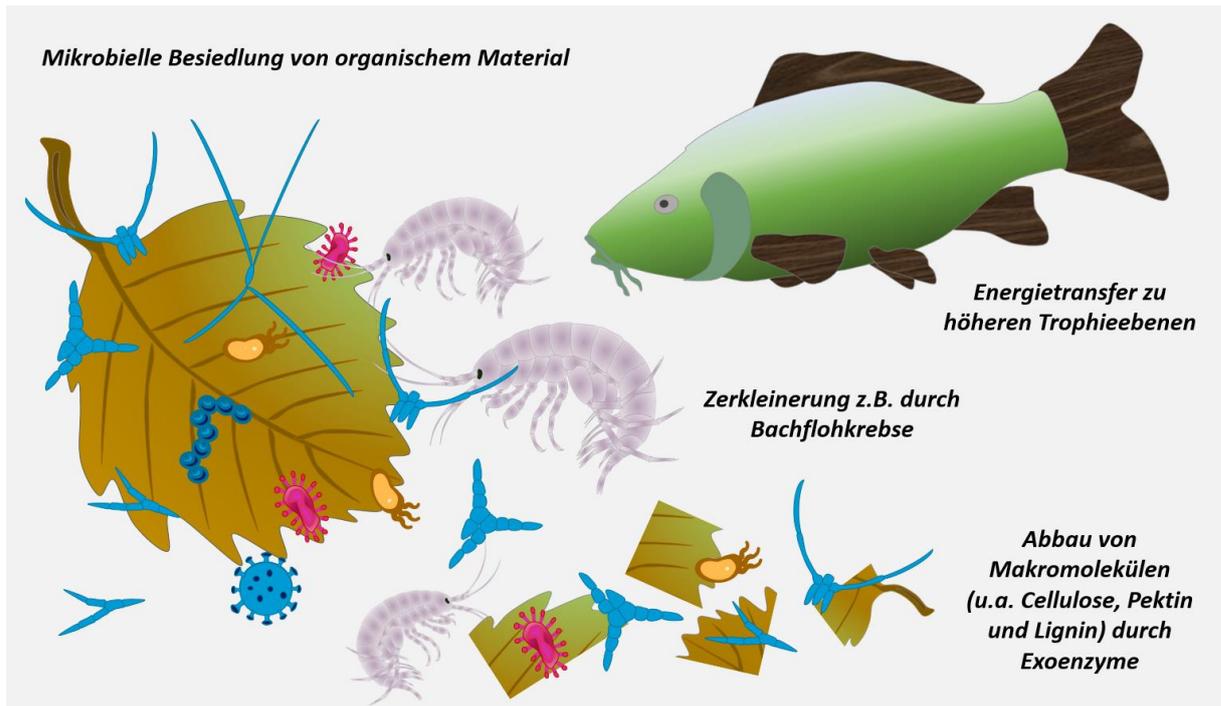


Abb. 2: Schematische Darstellung der ‚Bottom-up‘ Funktion von Mikroorganismen in Gewässern. Die Mikroorganismen besiedeln in diesem Beispiel ein Laubblatt und beginnen mit der ersten Stufe des Abbaus, sodass die Nahrungsqualität für höhere Zersetzer, wie den Bachflohkrebs steigt, der wiederum Beutetier von Fischen ist. Das organische Material wird in diesem Prozess immer kleiner, während die mikrobielle Besiedlung und Zersetzung weiter fortschreiten. Quelle: UBA, eigene Darstellung.

Aquatische Pilze in der Risikobewertung

Die Vielfalt und Funktionsfähigkeit aquatischer Pilzgemeinschaften könnten durch Umweltchemikalien wie Pflanzenschutzmittel gefährdet werden (Staley et al., 2015), die über Sprühabdrift oder Oberflächenabfluss in Gewässer gelangen (z. B. Hitzfeld et al., 2024). Dennoch wird das gesamte Reich der Pilze im Gegensatz zu Pflanzen und Tieren weder in der Umweltrisikobewertung von Pflanzenschutzmitteln der EU (EFSA, 2013) noch in anderen Stoffvollzügen Europas oder der Welt berücksichtigt.

Die EU Risikobewertung durchläuft ein mehrstufiges Bewertungsverfahren. Dabei werden für den aquatischen Bereich zunächst Labortests mit Standard-Organismen wie Wasserfloh, Alge/Wasserpflanze und Fisch durchgeführt, um mehrere Trophiestufen abzudecken. Unter Berücksichtigung eines Unsicherheitsfaktors wird dann ein möglichst konservativer RAK-Wert (regulatorisch akzeptable Konzentration) für ein Pflanzenschutzmittel oder einen anderen Wirkstoff berechnet. Jährlich

werden auf einem Hektar Acker in Deutschland etwa sieben Kilogramm Pflanzenschutzmittel (bzw. 2,4 kg aktive Wirkstoffe) eingesetzt (UBA, 2023). Rückstände von Pflanzenschutzmitteln (darunter auch viele Fungizide) sind in Oberflächengewässern im µg/L Bereich zu finden und es kommt häufig zur Überschreitung von RAK-Werten (Hitzfeld et al., 2024). Obwohl Fungizide die weltweit am zweithäufigsten angewandte Pflanzenschutzmittelgruppe ist (Pimentão et al., 2024), werden in der Risikobewertung allerdings keine spezifischen Pilztests gefordert. Stattdessen wird davon ausgegangen, dass die Standardtests mit anderen Organismen auch die Toxizität für Pilze abdecken (Maltby et al., 2009; Rico et al., 2019). Es stellt sich daher die Frage, ob die derzeitige Risikobewertung von Fungiziden auch für aquatische Pilze sicher ist oder ob Pilzpunkte im Rahmen der Zulassung Berücksichtigung finden sollten.

Vorlaufforschung am Umweltbundesamt

In der Fließ- und Stillgewässersimulationsanlage (FSA, Abb. 3) wird zu diesem blinden Fleck nunmehr bereits seit 10 Jahren im Rahmen verschiedener Mesokosmenprojekte (z. B. Talk et al., 2016) sowie der UBA Dissertation („Unravelling the effects of fungicides on the composition of the leaf litter associated

aquatic mycobiome“, S. Carl) geforscht. Seit 2022 läuft zudem das Eigenforschungsprojekt „Aqua Fungi at Risk“ (*Aquatische Pilze als neue Nichtzielorganismen in der Umweltrisikobewertung von fungiziden Wirkstoffen?* REFO Plan FKZ 3722674020).



Abb. 3: Blick auf den Außenbereich und die Halle der Fließ- und Stillgewässersimulationsanlage (<https://www.umweltbundesamt.de/themen/chemikalien/chemikalienforschung-im-uba/fluess-stillgewaesser-simulationsanlage-fsa>) des Umweltbundesamtes in Berlin-Marienfelde. Quelle: UBA, eigene Aufnahme.

Im Rahmen der UBA Dissertation wurde zunächst untersucht, wie sich die Zusammensetzung aquatischer Pilzgemeinschaften beim Transfer vom Feld ins Labor verändert und inwieweit naturnahe Gemeinschaften unter Laborbedingungen abgebildet werden können (Carl et al., 2022). Dazu wurden Blätter der Schwarzerle (*Alnus glutinosa*) in Laubsäcke eingekühlt, in einem Referenzgewässer mit aquatischen Pilzen besiedelt und in verschiedene Laboransätze transferiert. Anschließend wurde eine Gemeinschaftsanalyse mittels Hochdurchsatzsequenzierung durchgeführt („Next Generation Sequencing“, NGS), um die Zusammensetzung der Gemeinschaften aus den Laboransätzen mit der des Referenzgewässers zu vergleichen. Dabei wurde die DNA aus Blattproben extrahiert und ein bestimmter Genabschnitt mittels einer Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Es folgte die Sequenzierung und die Zuweisung der Gensequenzen zu bestimmten Pilzarten durch den Abgleich mit Datenbanken. Die Analyse zeigte nur geringe Unterschiede in der Zusammensetzung der Gemeinschaften, die im Anschluss an die Besiedelung im Referenzgewässer über mehrere Wochen in zwei verschiedenen Aquariumsansätzen mit Bachwasser oder einem Standardmedium gehalten wurden. Eine Neubesiedelung von sterilisierten Blättern mit zerkleinertem Blattmaterial, das zuvor in dem Referenzgewässer besiedelt wurde, wies jedoch verglichen mit den Feldbedingungen auf eine Verarmung der Pilzgemeinschaft hin.

In einer zweiten Studie (Carl et al., 2023, Publikation derzeit im peer-review Prozess) wurden dann die potentiellen Effekte eines Beispilfungizids (Penconazol) auf die Zusammensetzung der Pilzgemeinschaft in verschiedenen Mikrokosmen-Ansätzen untersucht. Bei der Neubesiedelung von sterilisiertem Blattmaterial wurde hier mittels NGS ein starker Effekt auf den Besiedelungserfolg und die Vielfalt der Pilzgemeinschaft in Fließgewässermikrokosmen festgestellt, auch wenn die Gemeinschaft trotz der Nutzung komplexerer Systeme erneut eine geringere Komplexität im Vergleich zum Referenzbach aufwies. Zudem wurden bei vorbesiedelten Blättern, die mit

dem Fungizid behandelt wurden, geringere Ergosterol-Gehalte beobachtet.

Ergosterol kommt vor allem in der Zellmembran höherer Pilze vor (Abb. 4) und eignet sich daher gut als Summenparameter für Pilzbiomasse. Die Hauptfunktion des Moleküls besteht in der Stabilisierung der Zellmembran. Triazol-Fungizide wie Penconazol hemmen die Ergosterol-Synthese, sodass dieser Parameter auch als ökotoxikologischer Endpunkt herangezogen werden kann (Ittner et al., 2018).

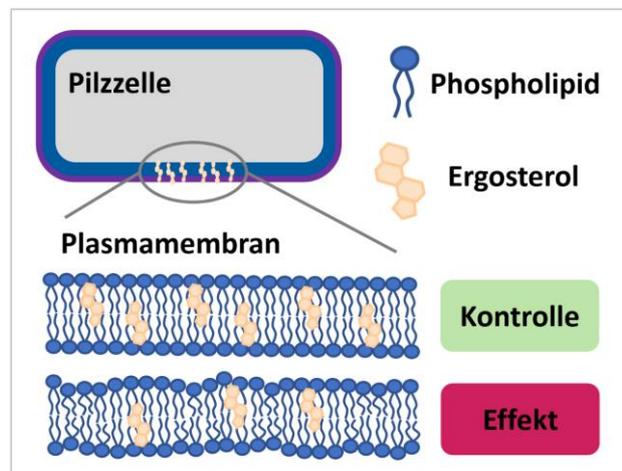


Abb. 4: Schematische Darstellung der Pilzellmembran ohne und mit Störung der Sterol-Synthese. Quelle: UBA, eigene Darstellung.

Die analytische Methode zur Bestimmung von Ergosterol wurde im Spurenanalytik-Labor an die instrumentelle Ausstattung angepasst und bestehende Methoden (Mille-Lindblom und Tranvik, 2003; Verma et al., 2002; Gessner, 2020) in einem neuen Messprotokoll vereinfacht und optimiert (Veröffentlichung der Methode in Vorbereitung). Dazu werden Blattscheiben zunächst gefriergetrocknet, unter Verwendung von Trockeneis homogenisiert und in methanolischem Kaliumhydroxid aufgeschlossen. Es folgt eine flüssig-flüssig Extraktion mit Cyclohexan sowie der Nachweis über LC-MS/MS.

Im Folgeprojekt „Aqua Fungi at Risk“ werden derzeit klassische Nicht-Zielorganismen wie Plankton, Makrophyten und Makrozoobenthos mit etablierten und neuen ökotoxikologischen Endpunkten für aquatische Pilze verglichen. Dazu wurde über 365 Tage eine Mesokosmenstudie mit durchströmten Teichen durchgeführt. Neben den Pilz-Endpunkten Biomasse (Ergosterol) und der Zusammensetzung der Pilzgemeinschaft (NGS) wird hier auch die in Studien weit verbreitete Sporulationsanalyse als weiterer ökotoxikologischer Endpunkt für die Gemeinschaftsstruktur herangezogen (Ittner et al., 2018). Dabei werden die auf den Blättern siedelnden Pilze zur Bildung von Sporen angeregt, die dann im Anschluss mikroskopisch bestimmt und gezählt werden. Als Wirkstoff für die Studie wurde Tebuconazol (TBZ) aufgrund seiner hohen Herstellungstonnage und der vergleichsweise guten Studienlage als Beispielfungizid ausgewählt. TBZ ist ebenfalls ein Triazol-Fungizid, welches in aquatischen Ökosystemen persistent, sowie toxisch für viele aquatische Organismen ist (ECHA, 2013).

Über die Mesokosmenstudie hinaus wurden zudem Reinkulturversuche mit neun aquatischen Pilzarten durchgeführt, in denen die Wirkung verschiedener TBZ Konzentrationen auf das Wachstum der Pilze in einem einfachen Hemmtest mit einem flüssigen Standardmedium für Pilze untersucht wurde. Bei den ausgewählten Pilzen handelt es sich um aquatische Hyphomyceten, die in laufenden Versuchen isoliert und am Leibniz Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) als wichtige Vertreter der aquatischen Pilzgemeinschaft identifiziert und hinterlegt wurden. Als ökotoxikologischer Endpunkt wurde zunächst das Trockengewicht der Pilze nach einer Expositionszeit von 10-20 Tagen herangezogen. Hierbei konnten die zuvor gefundenen unterschiedlichen Sensitivitäten der verschiedenen Arten gegenüber Fungizid-Stress bestätigt werden. Gleichzeitig deutet sich durch unterschiedliche TBZ Rückstände im Medium am Ende der Versuche an, dass verschiedene Pilzarten unterschiedlich auf die Fungizid-Exposition reagieren. Um Hinweise auf mögliche Ursachen dieser Unterschiede zu erhalten, werden daher derzeit Ergosterol als weiterer ökotoxikologischer Parameter der Reinkulturversuche untersucht sowie Gehalte einiger TBZ Metabolite im Medium bestimmt. Die Veröffentlichungen dieser sowie weiterer Ergebnisse aus dem Mesokosmenversuch befinden sich in Vorbereitung.

Fazit und Ausblick

Die Tatsache, dass ein ganzes Reich innerhalb der Systematik der Lebewesen in der Risikobewertung von Umweltchemikalien unberücksichtigt bleibt, ist mindestens im Bezug auf das Schutzgut Biodiversität zu überdenken. Auch außerhalb des UBA legt eine wachsende Anzahl an Studien diesbezüglich ein Umdenken im Chemikalienmanagement nahe (Ittner et al., 2018; Gonçalves et al., 2024, u. a.). Klassische Methoden der Ökotoxikologie lassen sich gut durch moderne molekulare Verfahren wie die -omics Methoden ergänzen, um potentielle Risiken abzuklären. Allerdings besteht bei der Suche nach möglichen Standardtestverfahren trotz einzelner vielver-

sprechender Ansätze (z. B. Nagai, 2020) weiterhin Forschungsbedarf. So bleibt die Frage nach der Ursache für die unterschiedliche Stressresistenz bestimmter Pilzarten nach wie vor offen, wodurch die Definition von Indikatororganismen und Standardbedingungen erschwert wird. Insgesamt sollten Pilze aber weder in der aquatischen noch in der terrestrischen Ökotoxikologie vernachlässigt werden, da nur so ein mechanistisches Verständnis biologischer Funktionen erreicht werden und das Risiko für die Vielfalt und Funktion dieser überaus wichtigen Saprobien minimiert werden kann.

Literatur

- Bärlocher, F., 2016. Aquatic hyphomycetes in a changing environment. *Fungal Ecology* 19, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.05.005>
- Carl, S., Mohr, S., Sahm, R., Baschien, C., 2022. Laboratory conditions can change the complexity and composition of the natural aquatic mycobiome on *Alnus glutinosa* leaf litter. *Fungal Ecology* 57–58, 101142. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2022.101142>
- Carl, S., Baschien, C., Mohr, S., Kusebauch, B., Sahm, R., 2023. Can the fungicide penconazole alter the community composition of the aquatic mycobiome on leaf litter? Conference Report SETAC GLB Muttentz 2023 <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.32840.70408>
- Dang, C.K., Gessner, M.O., Chauvet, E., 2007. Influence of conidial traits and leaf structure on attachment success of aquatic hyphomycetes on leaf litter. *Mycologia* 99, 24–32. <https://doi.org/10.1080/15572536.2007.11832597>
- ECHA, 2013. Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of tebuconazole. CLH-O-00002717-69-02/F, adopted 5 June 2013.
- EFSA, 2013. Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. *EFSA Journal* 11, 3290 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3290>
- Feckler, A., Bundschuh, M., 2020. Decoupled structure and function of leaf-associated microorganisms under anthropogenic pressure: Potential hurdles for environmental monitoring. *Freshwater Science* 39, 652–664. <https://doi.org/10.1086/709726>
- Gessner, M.O., 2020. Ergosterol as a Measure of Fungal Biomass, in: Bärlocher, F., Gessner, M.O., Graça, M.A.S. (Eds.), *Methods to Study Litter Decomposition*. Springer International Publishing, Cham, pp. 247–255. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30515-4_27
- Gessner, M.O., Gulis, V., Kuehn, K.A., Chauvet, E., Suberkropp, K., 2007. Fungal Decomposers of Plant Litter in Aquatic Ecosystems, in: Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. (Eds.), *Environmental and Microbial Relationships, The Mycota*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 301–324. https://doi.org/10.1007/978-3-540-71840-6_17
- Gonçalves, A.L., Chauvet, E., Bärlocher, F., Graça, M.A.S., Canhoto, C., 2014. Top-down and bottom-up control of litter decomposers in streams. *Freshwater Biology* 59, 2172–2182. <https://doi.org/10.1111/fwb.12420>

- Gonçalves, S., Pollitt, A., Pietz, S., Feckler, A., Bundschuh, M., 2024. Microbial community history and leaf species shape bottom-up effects in a freshwater shredding amphipod. *Science of The Total Environment* 912, 168926. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168926>
- Hitzfeld, K.L., Weisner, O., Müller, A., Pickl, C., 2024. Pflanzenschutzmittel-Rückstände in kleinen Gewässern der Agrarlandschaft – Handlungsbedarf besteht weiter. *Mitteilungen der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie*, 30(1), 10-13.
- Ingold, C.T., 1942. Aquatic hyphomycetes of decaying alder leaves. *Transactions of the British Mycological Society* 25, 339-IN6. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(42\)80001-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(42)80001-7)
- Ittner, L.D., Junghans, M., Werner, I., 2018. Aquatic fungi: a disregarded trophic level in ecological risk assessment of organic fungicides. *Frontiers in Environmental Science* 6, 105. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00105>
- Maltby, L., Brock, T.C.M., van den Brink, P.J., 2009. Fungicide risk assessment for aquatic ecosystems: importance of interspecific variation, toxic mode of action, and exposure regime. *Environmental Science & Technology* 43, 7556–7563. <https://doi.org/10.1021/es901461c>
- Mille-Lindblom, C., Tranvik, L.J., 2003. Antagonism between bacteria and fungi on decomposing aquatic plant litter. *Microbial Ecology* 45, 173–182. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-2030-z>
- Nagai, T., 2020. Sensitivity differences among five species of aquatic fungi and fungus-like organisms for seven fungicides with various modes of action. *Journal of Pesticide Science* 45, 223–229. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D20-035>
- Pimentão, A.R., Cuco, A.P., Pascoal, C., Cássio, F., Castro, B.B., 2024. Current trends and mismatches on fungicide use and assessment of the ecological effects in freshwater ecosystems. *Environmental Pollution* 347, 123678. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123678>
- Rico, A., Brock, T.C.M., Daam, M.A., 2019. Is the effect assessment approach for fungicides as laid down in the European Food Safety Authority Aquatic Guidance Document sufficiently protective for freshwater ecosystems? *Environmental Toxicology and Chemistry* 38, 2279–2293. <https://doi.org/10.1002/etc.4520>
- Runnel, K., Tedersoo, L., Krah, F.-S., Piepenbring, M., Scheepens, J.F., Hollert, H., Johann, S., Meyer, N., Bässler, C., 2024. Toward harnessing biodiversity–ecosystem function relationships in fungi. *Trends in Ecology & Evolution* S0169534724002556. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2024.10.004>
- Seena, S., Baschien, C., Barros, J., Sridhar, K.R., Graça, M.A.S., Mykrä, H., Bundschuh, M., 2023. Ecosystem services provided by fungi in freshwaters: a wake-up call. *Hydrobiologia* 850, 2779–2794. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-05030-4>
- Shearer, C.A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Marvanová, L., Padgett, D., Porter, D., Raja, H.A., Schmit, J.P., Thorton, H.A., Voglymayr, H., 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation* 16, 49–67. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9120-z>
- Staley, Z.R., Harwood, V.J., Rohr, J.R., 2015. A synthesis of the effects of pesticides on microbial persistence in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Toxicology* 45, 813–836. <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1065471>
- Talk, A., Kublik, S., Uksa, M., Engel, M., Berghahn, R., Welzl, G., Schloter, M., Mohr, S., 2016. Effects of multiple but low pesticide loads on aquatic fungal communities colonizing leaf litter. *Journal of Environmental Sciences* 46, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.11.028>
- Tsui, C.K.M., Baschien, C., Goh, T.-K., 2016. Biology and Ecology of Freshwater Fungi, in: Li, D.-W. (Ed.), *Biology of Microfungi, Fungal Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 285–313. https://doi.org/10.1007/978-3-319-29137-6_13
- UBA, 2023. Pflanzenschutzmittelverwendung in der Landwirtschaft. URL <https://www.umweltbundesamt.de/daten/land-forstwirtschaft/pflanzenschutzmittelverwendung-in-der#absatz-von-pflanzenschutzmitteln>, letzter Zugriff 13.11.2024.
- Verma, B., Robarts, R.D., Headley, J.V., Peru, K.M., Christofi, N., 2002. Extraction efficiencies and determination of ergosterol in a variety of environmental matrices. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 33, 3261–3275. <https://doi.org/10.1081/CSS-120014521>

Korrespondenzadresse

Steffen Carl
 FG Spurenanalytik, Fließ- und Stillgewässersimulation
 Umweltbundesamt
 12307 Berlin-Marienfelde
 Tel: 030 8903 4279
 E-Mail: Steffen.Carl@uba.de