

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

# AWARE

## Verbleib von Pestiziden und in Effluenten enthaltenen Schadstoffen in landwirtschaftlichen Systemen vor dem Hintergrund der möglichen Nutzung von Brauchwässern

Förderkennzeichen: 2816ERA04W

Vorhabenlaufzeit: 07.2017 bis 07.2020

### KURZDARSTELLUNG

Bis 2050 wird die Weltbevölkerung bei 9 Mrd. Menschen liegen. Damit steigt die Nachfrage nach Lebensmitteln und nachwachsenden Rohstoffen für die energetische und stoffliche Nutzung. Die Entwicklung und Aufrechterhaltung einer leistungsfähigen, effizienten und nachhaltigen Landwirtschaft im ländlichen Raum ist essenziell. Dazu müssen gesundheitlich unbedenkliche und nährstoffreiche Nahrungsmittel gesichert sein. Vor allem wird die zunehmende Verknappung von Boden, Wasser und Nährstoffen infolge des Klimawandels und der Verlust an Bodenfruchtbarkeit die Sicherung der Lebensqualität im ländlichen Raum beeinträchtigen. AWARE steht mit seinem Ziel, die schwindenden Wasserreserven zu bewahren und eine Kontamination von Nahrungsmitteln mit Pharmazeutika und Pflegeprodukten zu verhindern, im Mittelpunkt von Aktivitäten, die die Produktion und Nutzung biogener Ressourcen nachhaltig, umweltgerecht und dem Vorsorgeprinzip entsprechend sicher ausgestalten wollen.

### VORHABENSCHWERPUNKT UND ERA-NET

Bereits heute werden behandelte Abwässer zur Bewässerung landwirtschaftlicher Flächen in den südlichen Ländern Europas genutzt. Diese Praxis stellt einen großen Vorteil dar, da nicht auf knappe Frischwasserreserven zurückgegriffen werden muss. Die Nutzung des behandelten Abwassers birgt jedoch auch das Risiko des Eintrags bzw. der Akkumulation von Kontamination in Form von Arzneimitteln und Pflegeprodukten (PPCPs) in Grund- und Oberflächenwasser, in Böden und letztlich auch in landwirtschaftlich genutzte Pflanzen. In den Pflanzen können PPCPs und deren Metaboliten einerseits akkumulieren und so durch den Menschen aufgenommen werden, andererseits können diese Xenobiotika auch pflanzliche Antworten auslösen, die zu verschiedenen Stressreaktionen führen. Diese pflanzlichen Antworten entscheiden dann über Gesundheitszustand, Anfälligkeit und Performance der Pflanzen. Im AWARE- Teilprojekt konnte

der Einfluss umweltrelevanter Konzentrationen von zwei hochgradig persistenten Pharmazeutika (Diclofenac und Lamotrigin) auf die Physiologie und Biochemie von Kopfsalat qualitativ und quantitativ erfasst werden. Eine Beeinflussung der zirkadianen Expression verschiedener Stressgene durch die beiden Pharmazeutika wurde dabei festgestellt. Dieses und weitere Ergebnisse tragen maßgeblich zum Verständnis der in der Pflanze und im pflanzenassoziierten Mikrobiom ablaufenden Stressreaktionen bei und bieten einen Anknüpfungspunkt für weitere Forschung.

### ERGEBNISSE

Die beiden Pharmazeutika Diclofenac und Lamotrigin wurden von den Salatpflanzen (*Lactuca sativa*) absorbiert (Behandlung mit 20 µg L<sup>-1</sup> Diclofenac oder 60 µg L<sup>-1</sup> Lamotrigin), dabei trat die höchste Konzentration von Diclofenac in den Wurzeln (6.02 µg g<sup>-1</sup> DW) sechs Stunden nach der Exposition auf. Gleichzeitig konnte zu diesem Zeitpunkt 4'-Hydroxydiclofenac als erster pflanzlicher Metabolit im Gewebe detektiert werden. Die Metabolisierung von Diclofenac verlief so schnell, dass nach 24 Std. die Konzentration des Metaboliten höher als die der verbliebenen Ausgangsverbindung war. In den Blättern der Salatpflanzen konnte hingegen während der gesamten Versuchsdauer weder Diclofenac noch der 4'-OH-Metabolit detektiert werden. Im Gegensatz dazu stieg die Konzentration von Lamotrigin in den Wurzelproben in den ersten sechs Std. an, blieb dann aber auf einem konstanten Level (durchschnittlich 2.14 ± 0.22 µg g<sup>-1</sup>). Außerdem konnte Lamotrigin zusätzlich in den Blättern in geringen, aber ansteigenden Konzentrationen quantifiziert werden.

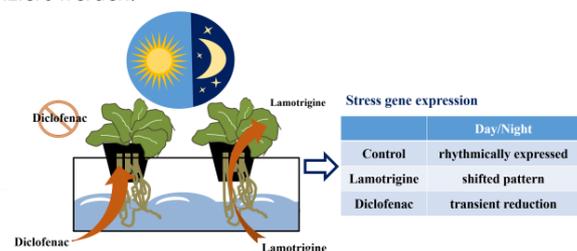


Abbildung 1: Schematische Darstellung der wichtigsten Ergebnisse des AWARE-Teilprojekts

Die Analyse des wichtigen stress-induzierten Signalmoleküls Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ergab, dass 12 Std. nach der Behandlung der Salatpflanzen mit Lamotrigin eine hoch-signifikant erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration in Wurzeln und Blättern zur gleichen Zeit vorlag. Zu anderen Zeitpunkten oder nach Behandlung mit Diclofenac konnte dies nicht festgestellt werden. Diese transiente Erhöhung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration lässt auf einen durch Lamotrigin direkt oder indirekt ausgelösten oxidativen Burst schließen, der als Stresssignal dient.

Um dieser Hypothese zu folgen, wurde die Genexpression von insgesamt zwölf Genen bestimmt, die an verschiedenen Stressreaktion beteiligt sind. Die Analyse konsekutiver Zeitpunkte belegte einen Tagesverlauf der Expression fast aller getesteter Gene in den Kontrollpflanzen, die nicht mit Pharmazeutika behandelt worden waren. In Wurzelproben konnte dabei die höchste Transkriptmenge kurz vor der Dämmerung festgestellt werden. Interessanterweise konnte im vorliegenden Experiment nach der Exposition mit Lamotrigin eine Phasenverschiebung der Expression zirkadian exprimierter Gene, deren Induktion durch eine erhöhte Konzentration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bereits in vorherigen Studien gezeigt worden waren (PER50, CAT1, GST-F6 und GST-F8), beobachtet werden (Abbildung 1). In den Wurzeln der Diclofenac-behandelten Pflanzen wurde eine signifikante, vorübergehende Verringerung der Expression aller Gene nach sechs Std. festgestellt. Mit abnehmenden Diclofenac-Konzentrationen wurde der Einfluss auf die Stressgen-Expression im Vergleich zu den Salatwurzeln der Kontrollpflanzen geringer.

Nicht nur die Expression der Gene, sondern auch die Aktivität der entsprechenden Stressenzyme Peroxidase (POX) und Glutathion S-Transferase wurde untersucht. So konnte eine signifikant reduzierte POX Aktivität in den Wurzeln der Lamotrigin-behandelten Salatpflanzen während des gesamten Experiments gemessen werden. Die Konzentration von Lamotrigin in den Blättern sowie die Konzentration von Diclofenac in der gesamten Pflanze waren vermutlich zu gering, um eine signifikante Veränderung der POX Aktivität zu induzieren.

### Einfluss auf die endophytische Gemeinschaft in Salatwurzeln

Gemeinsam mit den Projektpartnern des INRA in Dijon wurden Versuche durchgeführt, um den Einfluss von Pharmazeutika aus behandeltem Abwasser auf die endophytische und mykorrhizale Gemeinschaft zu untersuchen. Dafür wurden Salatpflanzen (*Lactuca sativa*) für 60 Tage in einem Gewächshaus kultiviert und entweder mit behandeltem Abwasser oder mit Frischwasser, ohne und mit zusätzlich zugegebenen Pharmazeutika gegossen. Nur durch Bewässerung mit behandeltem Abwasser, nicht aber mit kontaminierten Frischwasser konnte eine signifikant erhöhte Pflanzenbiomasse festgestellt werden. Die Ergebnisse der bakteriellen und der mykorrhizalen Gemeinschaft stehen aufgrund des durch die Covid-19 Pandemie verursachten Minimalbetriebs noch aus.

## FAZIT

Durch die im AWARE Teilprojekt erzielten Ergebnisse konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Expression von pflanzlichen Stressgenen, die für die Metabolisierung von Xenobiotika und in der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies relevant sind, durch die Exposition mit den beiden Pharmazeutika Diclofenac und Lamotrigin signifikant beeinflusst wurde. Darüber hinaus wirken die Arzneimittel möglicherweise als *Zeitgeber*, die die zirkadiane Expression der oben genannten Stressgene beeinflussen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Arzneimittel unterschiedliche Signaltransduktionen auslösten. Im Fall von Diclofenac waren die Veränderungen der Genexpression überwiegend in denjenigen Pflanzenteilen ausgeprägt, in denen die Verbindung lokalisiert war, während Lamotrigin nach seiner Translokation in die Blätter vermutlich eine systemische Reaktion hervorrief.

Mit Blick auf die Diskussion um die Wiederverwendung teilklärt Abwässer in der Landwirtschaft sind die Ergebnisse des Projekts einerseits beunruhigend, denn sie bestätigen, dass Nutzpflanzen wie der Salat, der ja üblicherweise roh verzehrt wird, beträchtliche Mengen an organischen Fremdstoffen aufnehmen und akkumulieren. Im Fall der untersuchten Pharmazeutika erfolgt die Speicherung aber wohl hauptsächlich in der nicht direkt dem Verzehr zugeführten Salat-Wurzel. Zum anderen zeigen die Ergebnisse aber auch, dass Pflanzen, die mit solchen Abwässern beaufschlagt werden, in der Lage sind, aufgenommene Fremdstoffe zu metabolisieren. Weitere Studien sind erforderlich, um abschätzen zu können, welchen Weg diese Abbauprodukte nehmen, wo und wie sie im Gewebe abgelagert werden, und ob sie ein toxikologisch relevantes Potenzial besitzen. Solche Fragen können, wie das vorliegende Projekt gezeigt hat, am besten in einem Konsortium von Forschern mit verschiedenen Arbeitsschwerpunkten und unterschiedlicher Expertise beantwortet werden. AWARE ist ein exzellentes Beispiel für eine solche erfolgreiche Verknüpfung auf EU-Level.

## PUBLIKATIONEN

Bigott Y., Chowdhury S.P., Pérez S., Montemurro N., Manasfi R., Schröder P., 2020. Effect of the pharmaceuticals diclofenac and lamotrigine on stress responses and stress gene expression in lettuce (*Lactuca sativa*) at environmentally relevant concentrations. Accepted for publication in *Journal of Hazardous Materials*.

Bigott Y., Kamel D., Schröder P.M., Schröder P., Cruzeiro C., 2020. Uptake and Translocation of Pharmaceuticals in Plants: Principles and Data Analysis. Accepted for publication in *Interaction and Fate of Pharmaceuticals in Soil-Crop Systems - The Impact of Reclaimed Wastewater. The Handbook of Environmental Chemistry (698)*, Springer.

### Projektbeteiligte:

Helmholtz Zentrum München GmbH (HMGU); Institute of Environmental Assessment and Water Research, Barcelona (IDAEA-CSIC); National Institute for Agricultural Research, Dijon (INRA); Norwegian Institute of Bioeconomy Research (NIBIO); Université de Montpellier (UM)

### Kontakt:

Sandra Pérez, Dr.; spsqam@cid.csic.es; IDAEA-CSIC, c/Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spanien;

<https://www.idaea.csic.es/project/aware/> (AWARE Projektleiterin)

Peter Schröder, Prof. Dr.; peter.schroeder@helmholtz-muenchen.de; Helmholtz Zentrum München GmbH, Ingolstädter Landstraße 1, 85764 Neuherberg, Deutschland (Projektleiter des deutschen AWARE Teilprojekts)