

Induktion thiolhaltiger Peptide im Wassermoos
Fontinalis antipyretica L. ex Hedw. unter Schwermetalleinfluß
und deren Nutzung als Biomarker für Schwermetallbelastungen
aquatischer Systeme



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
(Dr. rer. nat.)
Fachbereich Biochemie/Biotechnologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Ina Bruns

Oktober 1997

Gutachter:

Prof. Dr. G.-J. Krauß, Halle

Prof. Dr. B. Markert, Zittau

Prof. Dr. H. Rennenberg, Freiburg

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis

Bezugsquellen für Chemikalien

1 Einführung	1
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Biologie von <i>Fontinalis antipyretica</i>	2
1.3 Schwermetalle in der Umwelt.....	3
1.4 Phytotoxizität von Schwermetallen und pflanzliche Adaptation.....	4
1.5 Begriffsdefinition in der Bioindikation.....	5
1.6 Moose als Bioindikatoren.....	6
1.7 Metallothioneine.....	7
1.8 Phytochelatine.....	8
1.9 Glutathion.....	9
2 Material und Methoden	11
2.1 Pflanzenmaterial und Kultivierungsbedingungen.....	11
2.1.1 Probenahme für Biomonitoring- und Laborversuche.....	11
2.1.2 Probenahme zum Vergleich von Pflanzen unterschiedlicher Standorte.....	11
2.1.3 Kultivierungsbedingungen für <i>F. antipyretica</i>	11
2.1.4 Kultivierungsbedingungen für <i>Elodea canadensis</i>	12
2.1.5 Anzucht von Tomatenzellkulturen zur Gewinnung von Phytochelatinstandards.....	12
2.1.6 Vorbereitung des Pflanzenmaterials für Expositions- und Laborversuche.....	12
2.2 Freilanduntersuchungen.....	12
2.2.1 Expositionsversuche in der Elbe (aktives Biomonitoring).....	12
2.2.2 Expositionsversuche in extrem belasteten Gewässern (aktives Biomonitoring).....	13
2.3 Laborversuche.....	14
2.3.1 Aufbewahrung der Proben.....	14
2.3.2 Bestimmung des Trockengewichtes von <i>F. antipyretica</i>	14
2.3.3 Bestimmung der Chlorophyllgehalte von <i>F. antipyretica</i>	14

2.3.4	Bestimmung des intra- und extrazellulär gebundenen Cadmiums in <i>F. antipyretica</i>	14
2.3.5	Wachstumsmessungen an <i>F. antipyretica</i>	15
2.3.6	Induktion thiolhaltiger Verbindungen in Tomatenzellkulturen	15
2.3.7	Induktion thiolhaltiger Verbindungen in <i>F. antipyretica</i>	15
2.3.8	Inkubation unter konstanten Cadmium- und Nährstoffkonzentrationen	15
2.3.9	Kurzzeitige Cadmiumbelastung	16
2.4	Analytische Methoden	16
2.4.1	Aufschluß des Pflanzenmaterials für die Schwermetallanalytik.....	16
2.4.2	Vorbereitung der Wasserproben	16
2.4.3	Schwermetallanalytik der Moos- und Wasserproben	16
2.4.4	Schwermetallanalytik des oberflächengebundenen Cadmiums	17
2.5	Extraktion und Analytik thiolhaltiger Verbindungen	17
2.5.1	Extraktion thiolhaltiger Peptide.....	17
2.5.2	Analytik der Phytochelatine	18
2.5.3	Bestimmung der Glutathionvorstufen Cystein und γ -Glutamyl-Cystein	19
2.5.4	Enzymatische Bestimmung des Glutathiongehaltes.....	20
2.5.5	Bestimmung des Verhältnisses von oxidiertem zu reduziertem Glutathion.....	21
2.5.6	Bestimmung des Gesamtthiolgehaltes	22
2.5.7	Massenspektrometrie	22
2.5.8	Aminosäureanalysen	22
2.5.9	Kapillarelektrophoretische Untersuchungen	23
2.6	Auswertung und Darstellung der Daten.....	23
2.6.1	Darstellung der Ergebnisse	23
2.6.2	Gewässerdaten (Literaturwerte)	23
2.6.3	Berechnung der Akkumulationsfaktoren.....	23
2.6.4	Statistische Auswertung.....	24
2.7	Phytochelatinstandards aus Tomatenzellkulturen	24
2.7.1	Anreicherung der Phytochelatine aus Tomatenzellen	24
2.7.2	Identifizierung der Phytochelatine aus Tomatenzellen	24

3 Ergebnisse	26
3.1 Beobachtungen zum Wachstum von <i>F. antipyretica</i> am natürlichen Standort	26
3.2 Schwermetallakkumulation im aktiven Biomonitoring in der Elbe	26
3.2.1 Korrelation der Schwermetallgehalte der Moos- und Wasserproben	27
3.2.2 Biologische Varianz der exponierten Proben	28
3.3 Vitalität von <i>F. antipyretica</i> unter Cadmiumbelastung	29
3.4 Intra- und extrazelluläre Aufnahme von Cadmium.....	30
3.5 Phytochelatinsynthese in <i>F. antipyretica</i> unter Schwermetallbelastung	32
3.5.1 Induktion von Phytochelatinen in <i>F. antipyretica</i>	32
3.5.2 Identifizierung der Phytochelatine aus <i>F. antipyretica</i>	33
3.5.3 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Phytochelatinsynthese	33
3.5.4 Gehalte an Cystein und Glutathion + γ -Glutamyl-Cystein im Langzeitversuch	35
3.5.5 Nachweis einer unbekannt thiolhaltigen Verbindung unter Cadmиеinfluß.....	36
3.5.6 Untersuchungen zur Identifizierung der unbekannt thiolhaltigen Verbindung.....	36
3.5.7 Induktion von Phytochelatinen im Kurzzeitversuch	37
3.5.8 Glutathion + γ -Glutamyl-Cystein und PC ₄ unter Einfluß geringer Cadmiumkonzentrationen.....	38
3.5.9 Induktion von Phytochelatinen durch unterschiedliche Schwermetalle	38
3.6 Gesamtthiolgehalt und Phytochelatinvorstufen unter Schwermetallbelastung.....	39
3.6.1 Einfluß von Cadmium auf den Gesamtthiolgehalt	40
3.6.2 Einfluß von Cadmium auf den Glutathiongehalt	40
3.6.3 Verhältnis von Gesamtthiol- zu Glutathiongehalt unter Cadmiumbelastung	41
3.6.4 Einfluß unterschiedlicher Cadmiumkonzentrationen auf den Gesamtthiolgehalt	41
3.6.5 Einfluß unterschiedlicher Cadmiumkonzentrationen auf den Glutathiongehalt	42
3.6.6 Verhältnis von Gesamtthiol- zu Glutathiongehalt unter verschiedenen Cadmiumkonzentrationen	43
3.6.7 Glutathiongehalte unter konstanter Cadmium- und Nährstoffkonzentration.....	43

3.6.8	Einfluß unterschiedlicher Schwermetalle auf den Glutathiongehalt	44
3.6.9	Einfluß kurzzeitiger Cadmiumbelastung auf den Glutathionspiegel.....	45
3.6.10	Glutathiongehalte in älteren und jungen Pflanzenteilen.....	45
3.6.11	Oxidationsstatus des Glutathions unter Cadmiumbelastung.....	46
3.6.12	Einfluß von Cadmium auf den Gehalt an Glutathion, Cystein und γ -Glutamyl-Cystein.....	47
3.7	Vergleich von Pflanzen unterschiedlicher Standorte	48
3.7.1	Schwermetallgehalte und biologische Variabilität	48
3.7.2	Phytochelatingehalte	48
3.7.3	Induktion thiolhaltiger Verbindungen im Laborversuch.....	50
3.7.4	Gehalt der unbekannteren thiolhaltigen Verbindung.....	50
3.7.5	Glutathiongehalte.....	51
3.7.6	Glutathioninduktion in Sproßspitzen aus Laborkultur	52
3.7.7	Zuwachs und Ausbildung von Neutrieben unter Cadmiumeinfluß.....	52
3.8	Physiologische Reaktion des in der Elbe exponierten Pflanzenmaterials	54
3.8.1	Vitalität des Pflanzenmaterials.....	54
3.8.2	Phytochelatingehalte	55
3.8.3	Glutathiongehalte.....	56
3.9	Expositiosversuche an extrem belasteten Standorten des Mansfelder Landes	57
3.9.1	Schwermetallgehalte des Pflanzenmaterials.....	57
3.9.2	Vitalität des Pflanzenmaterials.....	57
3.9.3	Thiolhaltige Peptide.....	58
4	Diskussion	61
4.1	Schwermetallakkumulation im aktiven Biomonitoring in der Elbe	61
4.2	Vitalität des Pflanzenmaterials unter Cadmiumbelastung	64
4.3	Intra- und extrazelluläre Cadmiumaufnahme von <i>F. antipyretica</i>	65
4.4	Induktion von Phytochelatinen im Laborversuch.....	66
4.5	Vorkommen einer unbekannteren thiolhaltigen Verbindung	72
4.6	Glutathionpool unter Schwermetalleinfluß.....	73
4.7	Cystein- und γ -Glutamyl-Cystein-Gehalte unter Cadmiumeinfluß	81

4.8 Vergleich der Reaktion von Pflanzen unterschiedlicher Standorte auf Schwermetalle	81
4.9 Physiologische Parameter des aktiven Biomonitorings in der Elbe	85
4.10 Aktives Biomonitoring an extrem belasteten Standorten	87
5 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen	89
6 Literatur	95
Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ACN	Acetonitril
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
BaA	Benzo(a)anthracen
BaP	Benzo(a)pyren
BSO	Buthioninsulfoximin
CHES	2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure
des-PC	(γ -Glu-Cys) _n
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	1,4-Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EW	Einwaage
EXAFS	Extended X-ray Absorption Fine Structure
FG	Frischgewicht
GSH	Glutathion (reduziert)
GSH-Äqui.	Glutathionäquivalente
GSSG	Glutathion (oxidiert)
GSTH	Gesamtthiol
h-GSH	Homo-Glutathion (γ -Glu-Cys- β -Ala)
hm-GSH	Hydroxymethyl-Glutathion (γ -Glu-Cys-Ser)
h-PC	Homo-Phytochelatin ((γ -Glu-Cys) _n - β -Ala)
hm-PC	Hydroxymethyl-Phytochelatin ((γ -Glu-Cys) _n -Ser)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
MS	Massenspektrometrie
MS-Medium	Kulturmedium nach Murashige und Skoog
MW	Molekulargewicht
m/z	Masse/Ladung
NADPH+H ⁺	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NEM	N-Ethylmaleinimid
n.g.	nicht gemessen
OD	optische Dichte
p = 0,05 (0,01; 0,001)	Irrtumswahrscheinlichkeit = 5 % (1 %; 0,1 %)
PC/PCs	Phytochelatin/Phytochelatine
PITC	Phenylisothiocyanat
PVP	Polyvinylpyrrolidon
SD	Standardabweichung

SSA	5'-Sulfosalicylsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Trockengewicht
TNB	5-Thio-2-nitrobenzoesäure
U/min	Umdrehungen pro Minute

Bezugsquellen für Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Quelle</u>
ACN (gradient grade)	Merck
Aceton	Riedel de Häen
BCR 61 (Community Bureau of Reference)	Promochem
CdCl ₂	Feinchemie Apolda
CHES	Sigma
CuCl ₂	Merck
Cys	Sigma
Cys-Gly	Sigma
DTNB	Sigma
DTT	Merck
Essigsäure	Laborchemie Apolda
EDTA	Merck
γ-Glu-Cys	Reatec
GSH	Sigma
GSSG	Fluka
GSSG-Reduktase (Bäckerhefe)	Fluka
H ₂ O ₂ (30%ig, suprapur, Perhydrol [®])	Merck
HNO ₃ (65%ig, suprapur)	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
Methanol (gradient grade)	Merck
Monobrombiman	CalBiochem
NADPH+H ⁺	Fluka
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaH ₂ PO ₄	Merck
NEM	Sigma
PbCl ₂	Merck
PVP	Sigma
SSA	Merck
TFA (reinst)	Serva
Tris	Merck
ZnCl ₂	Merck

1 Einführung

1.1 Einleitung

Lebensräume werden durch eine Vielzahl biotischer und abiotischer Umwelteinflüsse geprägt. Im Zuge der Industrialisierung gewann die Emission toxischer Verbindungen und Elemente als Belastungskomponente zunehmend an Bedeutung. Eine erste Abschätzung der Immissionen giftiger Substanzen wie Schwermetalle in ein Ökosystem ist über die Untersuchung schadstoffakkumulierender Pflanzen (Bioindikation) möglich (MARKERT, 1993a).

Insbesondere die Analyse von Moosen erlaubt aufgrund der hohen Schwermetallakkumulation dieser Pflanzen Rückschlüsse auf die Belastung terrestrischer und aquatischer Lebensräume (RÜHLING und TYLER, 1968, 1973; SAY et al., 1981; SAY und WHITTON, 1983; STEINNES, 1984; MOUVET, 1984, 1985; MELZER, 1985; FROST, 1990; HERRMANN, 1990; CHOVANEC und VOGEL, 1992; MARKERT und WECKERT, 1993; BRÜNING und KREEB, 1993; CHOVANEC et al., 1994; HERPIN et al., 1994, 1996; GUNKEL, 1994; GONCALVES et al., 1994; MARKERT et al., 1996; SIEBERT et al., 1996; BRUNS et al., 1995, 1997). Die Erfassung der einzelnen Elemente ist bei diesem Verfahren jedoch rein summarisch, wodurch physiologisch/biochemische Auswirkungen auf die dort lebenden Arten weitgehend unberücksichtigt bleiben.

Pflanzen reagieren auf die Einwirkung eines Schadstoffes mit Streßreaktionen. Diese umfassen morphologische, physiologische und biochemische Anpassungen, wodurch mögliche Schädigungen minimiert oder sogar verhindert werden können (BRUNOLD, 1996). Ein Überangebot an toxischen Substanzen wie Schwermetallen kann jedoch zu Störungen des Stoffwechsels bis hin zum Absterben der Pflanzen führen (ERNST, 1996). Für die Abschätzung des ökotoxikologischen Potentials von Schwermetalleinträgen ist es daher notwendig, spezifische Reaktionen der Pflanzen in die Bewertung einzubeziehen, um somit auftretende Schadwirkungen zu qualifizieren und quantifizieren. Voraussetzung hierfür ist ein fundiertes Wissen über die biochemisch/physiologische Streßantwort einer Art auf eine spezifische Noxe.

Für die Nutzung einer streßinduzierten Reaktion von Organismen zum Biomonitoring (als quantitativer Biomarker) muß eine hohe Spezifität der Streßantwort gewährleistet sein (ERNST und PETERSON, 1994; SCHLEE et al., 1996; VAN GESTEL und VAN BRUMMELEN, 1996).

Die im gesamten Pflanzenreich verbreitete Synthese thiolhaltiger Peptide (Phytochelatine) ist eine sensitive Reaktion von Pflanzen auf intrazelluläre Schwermetallaufnahme (GRILL et al., 1987; GEKELER et al., 1989; RAUSER, 1990, 1993, 1995; ZENK, 1996) und erfüllt die Anforderung an eine hohe Schadstoffspezifität. Der Einsatz dieser Thiolpeptide als Biomarker für Schwermetallbelastungen natürlicher Standorte wird bereits diskutiert (ERNST und PETERSON, 1994).

Über die Phytochelatinsynthese in Moosen ist bisher nur wenig bekannt (GEKELER et al., 1989; JACKSON et al., 1991). Aufgrund der hohen Anreicherung von Schwermetallen in diesen Pflanzen ist die mögliche Verwendung von Phytochelatinen aus Moosen als Biomarker für Schwermetallbelastungen von Ökosystemen von besonderem Interesse.

Ziel dieser Arbeit war es, die Synthese thiolhaltiger Peptide unter Schwermetallstreß in Moosen näher zu charakterisieren. Hierdurch sollten Aussagen zu Mechanismen der intrazellulären Schwermetalldetoxifikation erhalten werden. Die Ergebnisse der Labor- und Freilanduntersuchungen waren im Hinblick auf die Nutzung thiolhaltiger Peptide als quantitativer Biomarker für Schwermetallbelastungen aquatischer Standorte auszuwerten.

Vor diesem Hintergrund wurden Untersuchungen am Wassermoos *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. durchgeführt. Als Grundlage für nachfolgende Freiland- und Laboruntersuchungen wurde die Akkumulation von Cd, Pb, Zn und Cu in *F. antipyretica* in Expositionsversuchen in der Elbe ermittelt. Untersuchungen zur physiologisch/biochemischen Reaktion des Wassermooses auf Schwermetallbelastung erfolgten in Laborexperimenten. Es wurden Daten zur intra- und extrazellulären Cd-Aufnahme ermittelt und die Vitalität des Pflanzenmaterials unter Cd-Belastung überprüft. Die Induktion thiolhaltiger Verbindungen wie Phytochelatine unter Einfluß von Cd, Pb, Zn und Cu wurde untersucht. Hieraus ergaben sich Aspekte für weiterführende Versuche zum Einfluß von Schwermetallen auf den Glutathiongehalt und dessen Vorstufen.

Begleitend zu den Laborversuchen wurden natürliche Standorte von *F. antipyretica* beprobt und der Einfluß unterschiedlicher Standorte auf die Induktion thiolhaltiger Peptide untersucht. Die Phytochelatin- und Glutathiongehalte der Moosproben aus Expositionsversuchen in der Elbe sowie an hoch belasteten Standorten eines ehemaligen Kupferschiefer-Bergbaugebietes wurden den Schwermetallgehalten der Pflanzen gegenübergestellt.

1.2 Biologie von *Fontinalis antipyretica*

Die vorgestellten Untersuchungen wurden am Wassermoos *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. durchgeführt (Abteilung: *Bryophyta*, Klasse: *Musci*, Ordnung: *Neckerales (Isobryales)*, Familie: *Fontinaliaceae*, (FRAHM und FREY, 1987)). Der Arname "*antipyretica*" (deutsch: gegen Feuer) geht auf die frühere Verwendung als Brandschutz beim Hausbau zurück (RICHARDSON, 1981).



Fontinalis antipyretica L. ex Hedw.

Die über 40 cm langen Stämmchen von *F. antipyretica* sind mit Rhizoiden an Substraten wie Steinen oder Baumstümpfen verankert und bilden flutende Rasen. Scharf gekielte Blätter ohne Mittelrippe umschließen den Stengel in drei Orthostichen, wobei die Farbe der Blätter von schwärzlich bis grün variiert. Die basalen Teile der Pflanze sind oft unbeblättert und dunkelbraun bis

schwarz (FRAHM und FREY, 1987; KREMER und MUHLE, 1991). Insbesondere im Winter kommt es zu kräftigem Biomassezuwachs und zum Austreiben neuer Sprosse. Vereinzelt kann die Bildung von Sporenkapseln beobachtet werden, die durch ein doppeltes, dunkelrotes Peristom gekennzeichnet sind. Die Vermehrung von *F. antipyretica* erfolgt jedoch vorwiegend vegetativ durch abgerissene Sproßstücke (BENEDIX et al., 1974).

Infolge des Formenreichtums verfügt das pleurokarpe, zweihäusige Wassermoos über eine weite ökologische Amplitude gegenüber Standortfaktoren. Aus diesem Grund finden sich zum Teil widersprüchliche Aussagen über die Biotopansprüche und ökologische Toleranz. *F. antipyretica* ist auf der nördlichen Halbkugel vorwiegend in kühleren und gemäßigten Zonen verbreitet. Als bevorzugte Standorte gelten fließende Gewässer, wobei es vereinzelt auch in Seen bis zu einer Tiefe von mehreren Metern zu finden ist. Es werden sowohl kalkreiche als auch leicht saure Gewässer mit schattigen bis sonnigen Standorten bei einer Wassertemperatur unter 18 °C besiedelt. Die Gewässergüte der Standorte reicht von oligotroph bis mesotroph (SOMMER und WINKLER, 1982; FRAHM und FREY, 1987; KREMER und MUHLE, 1991).

1.3 Schwermetalle in der Umwelt

Schwermetalle zeichnen sich durch ein spezifisches Gewicht $> 5 \text{ g/cm}^3$ aus (BAHADIR et al., 1995). Aufgrund der zum Teil hohen Toxizität ist die Überwachung ihres Eintrages in die Umwelt aus anthropogenen und geogenen Quellen ein wesentlicher Bestandteil der Umweltüberwachung. Zu den bedeutendsten Schwermetallen gehören hierbei die Elemente Cd, Pb, Zn und Cu. Durch ihre Persistenz kommt es zur Anreicherung dieser Elemente in der Umwelt, wobei sich durch die Akkumulation über die Nahrungskette das toxische Potential für Mensch, Tier und Pflanze erhöht. Auch die Aufnahme der essentiellen Schwermetalle Zn und Cu führt nach Überschreiten einer von der Art und dem Entwicklungszustand abhängigen Toxizitätsgrenze zu Schädigungen des Organismus (BLIEFERT, 1994).

Der Eintrag von Schwermetallen in Ökosysteme erfolgt im wesentlichen über die Luft in Form von Aerosolen, wodurch auch emittentenferne Standorte erreicht werden (FIEDLER und RÖSLER, 1993). Neben anthropogenen Quellen sind auch umweltrelevante Konzentrationen dieser Elemente in terrestrischen und aquatischen Ökosystemen aufgrund geogener Vorkommen zu finden (FOY et al., 1978; PETERSON und ALLOWAY, 1979; BIRKE und RAUCH, 1993). Als Senken für die Akkumulation von Schwermetallen sind insbesondere Böden und Gewässersedimente von Bedeutung. Die toxische Wirkung der Metalle hängt in diesen Systemen wesentlich davon ab, in welcher chemischen Form (Speziation) die Elemente vorliegen (HEINTZ und REINHARDT, 1996). Durch Adsorption an organische Partikel oder die Bildung anorganischer Komplexe wie Hydroxide, Sulfide, Carbonate und Fe-Mn-Oxid-Hydrate werden gelöste Schwermetalle immobilisiert (FIEDLER und RÖSLER, 1993). Eine Absenkung des pH-Wertes führt zur Remobilisierung organisch oder anorganisch gebundener Schwermetalle und somit zur Erhöhung der Pflanzenverfügbarkeit und der davon abhängigen Phytotoxizität (FÖRSTNER und SALOMONS, 1991; WALLNÖFER und ENGELHARDT, 1995).

In aquatischen Systemen liegt der größte Anteil der Schwermetalle in schwebstoffgebundener Form vor (HUBER und HUBER, 1995). Nach Angaben von FIEDLER und RÖSLER (1993) variiert der Gehalt an partikulär gebundenem Cd, Pb, Zn und Cu an der Gesamtmenge in drei anthropogen belasteten Flüssen (Rhein, Mulde und Elbe) zwischen 22 - 45 % (Cd), 73 - 87 % (Pb), 26 - 49 % (Zn) und 55 - 67 % (Cu). Die Freisetzung dieser Metalle ist im wesentlichen vom pH-Wert, der Salinität, dem Vorhandensein organischer Komplexbildner (wie EDTA aus Waschmitteln), den Redoxbedingungen sowie dem mikrobiellen Umsatz organischer Verbindungen abhängig (FÖRSTNER und SALOMONS, 1991; HEINTZ und REINHARDT, 1996; HUBER und HUBER, 1995).

1.4 Phytotoxizität von Schwermetallen und pflanzliche Adaptation

Die Toxizität von Cd, Pb, Zn und Cu beruht auf biochemischer Ebene im wesentlichen auf folgenden Reaktionen (MASON und JENKINS, 1995):

- Blockierung von funktionellen Gruppen (SH-Gruppen) in Biomolekülen
- Verdrängung essentieller Metalle aus Enzymen
- Veränderung der Molekülkonformation

Hierdurch kommt es zu verschiedenen Störungen des Stoffwechsels, die bis zum Absterben der Pflanzen führen können (ERNST, 1996). Als Folge von Cd-Streß wurden bei verschiedenen Pflanzen eine Verringerung der Chlorophyll a- und Chlorophyll b-Synthese, eine Abnahme des Chlorophyll a/b Verhältnisses, Veränderungen der Chloroplasten durch Destrukturierung der Thylakoide und eine Reduktion des Gaswechsels und der Transpiration beobachtet (RASCIO et al., 1993; GUPTA und DEVI, 1994; COSTA et al., 1994).

In Mitochondrien von Maispflanzen kam es nach Pb-Applikation zur Oxidation von NADPH (WALLNÖFER und ENGELHARDT, 1995).

Neben einer Beeinträchtigung der CO₂-Fixierung und des photosynthetischen Elektronentransportes (WALLNÖFER und ENGELHARDT, 1995) wurden unter Zn-Streß Veränderungen des apoplasmatischen Proteingehaltes festgestellt (BRUNE et al., 1994).

Die Phytotoxizität von Cu ist insbesondere auf die Bildung freier Radikale (ERNST, 1996) und die Oxidation ungesättigter Fettsäuren zurückzuführen, wodurch es zur Schädigung von Zellmembranen kommt (DE VOS et al., 1991).

Neben diesen hemmenden Effekten kann die Aktivität einzelner Enzyme durch Schwermetalle erhöht werden. Insbesondere die Aktivierung der an der Schwermetallentgiftung beteiligten Phytochelatinsynthese ist in diesem Zusammenhang zu nennen (GRILL et al., 1989). In *Phaseolus vulgaris* führten Zn- und Cd-Belastungen zu einem Anstieg der spezifischen Aktivität verschiedener Enzyme wie Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Glutamat-Dehydrogenase, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (VAN ASSCHE et al., 1988). Sowohl Cd, Pb, Zn also auch Cu aktivieren die Peroxidase pflanzlicher Zellen (ERNST, 1996).

Phänotypisch sind als Folgen von Schwermetallstreß Chlorosen, Nekrosen, ein verringertes

Längenwachstum und eine Abnahme der Biomasseproduktion zu beobachten (BAKER und WALKER, 1989; VERKLEIJ, 1993; WALLNÖFER und ENGELHARDT, 1995). In Farnpflanzen kommt es unter Cd-Belastung zur Deformation der Reproduktionsorgane und abnormaler Entwicklung der Prothalli sowie zur Hemmung der Sporenkeimung (GUPTA und DEVI, 1994).

Für Moose sind unter Belastungen mit Cd, Pb, Zn und Cu im wesentlichen die Inhibition der Photosynthese und die Hemmung des Wachstums bekannt (BROWN und WELLS, 1990; TYLER, 1990; BROWN und SIDHU, 1992; WELLS und BROWN, 1995). Bei *Rhytidiadelphus squarrosus* führt Cu-Streß zu einer Erhöhung der Respiration (WELLS und BROWN, 1995).

Auch für *F. antipyretica* ist unter Cd-Streß die Hemmung der Photosynthese und Dunkelatmung bekannt. Cu führt auch bei diesem Moos zur Erhöhung der Dunkelatmung bei gleichzeitiger Hemmung der Photosynthese (SOMMER und WINKLER, 1982).

Durch Adaptation auf morphologischer sowie physiologisch/biochemischer Ebene haben Pflanzen Strategien entwickelt, die eine Besiedelung von schwermetallreichen Habitaten erlauben. Diese sind insbesondere: eine verringerte Aufnahme von Schwermetallen, die Bindung an die Zellwand, die Ausscheidung über die Blattoberfläche, die Umwandlung in nicht toxische Verbindungen, die Translokalisierung innerhalb der Pflanze, die Kompartimentierung innerhalb der Pflanze oder Zelle, das Abwerfen von Blättern oder ganzen Pflanzenteilen mit hohem Schwermetallgehalt, die Chelatisierung durch organische Säuren sowie die Chelatisierung durch Phytochelatine (GRILL und ZENK, 1989; BAKER und WALKER, 1989; ERNST et al., 1992; HARBOURNE, 1992; STREIT und STUMM, 1993).

Ubiquitär im Pflanzenreich ist von diesen Anpassungsmechanismen die Synthese von Phytochelatinen bei intrazellulärer Aufnahme von Schwermetallen (GEKELER et al., 1989; RAUSER, 1990, 1993, 1995; KNEER et al., 1992; ZENK, 1996).

1.5 Begriffsdefinition in der Bioindikation

Zur Erfassung von Standortbelastungen werden seit mehreren Jahrzehnten Organismen eingesetzt, die Veränderungen ihrer Umwelt anzeigen. Eine Vielzahl von Publikationen befaßt sich seither mit unterschiedlichen Verfahrensweisen (MELZER, 1985; THÖNI et al., 1991; PAULUS et al., 1994; MARKERT, 1994; PEICHL et al., 1994; ZIMMERMANN und BAUMANN, 1994; WOLTERBEEK et al., 1995; MARKERT et al., 1997). Hieraus hat sich die Verwendung unterschiedlicher Termini ergeben, deren Bedeutung jedoch bis heute nicht einheitlich ist (ERNST und PETERSON, 1994; PEAKALL, 1994; VAN GESTEL und VAN BRUMMELEN, 1996; MARKERT et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit werden folgende Begriffe entsprechend den Vorschlägen von MARKERT und OEHLMANN (1996) verwendet:

Bioindikator: Organismen oder Organismengemeinschaften, bei denen Änderungen der Gehalte bestimmter Elemente oder Verbindungen und/oder ihrer morphologischen oder zellulären Struktur, ihrer physiologisch/biochemischen Abläufe, ihres Verhaltens oder der Populationsdichte bzw. -struktur Informationen über die *Qualität der Umwelt* ergeben.

Biomonitor: Organismen oder Organismengemeinschaften, bei denen Änderungen der Gehalte bestimmter Elemente oder Verbindungen und/oder ihrer morphologischen oder zellulären Struktur, ihrer physiologisch/biochemischen Abläufe, ihres Verhaltens oder der Populationsdichte bzw. -struktur Informationen über die *Quantität der Qualität der Umwelt* ergeben.

Im Gegensatz zum "passiven Biomonitoring", bei dem Pflanzen natürlicher Standorte gesammelt werden, werden im "aktiven Biomonitoring" die Pflanzen an den zu untersuchenden Standorten exponiert. Hierdurch lassen sich zeitintegrierende Rückschlüsse über die Belastung ziehen und die Flexibilität der Standortwahl wird erhöht (GUNKEL, 1994). Das Biomonitoring kann jedoch lediglich Daten über die Schwermetallbelastung als summarischen Parameter liefern. Aussagen über die Spezies der Schwermetallbindung (Speziation) sowie das ökotoxikologische Potential der Belastung sind nicht möglich.

Auch biochemisch/physiologische Reaktionen eines Organismus wie Veränderungen von Enzymaktivitäten oder der Nachweis streßspezifischer Stoffwechselprodukte können geeignet sein Veränderungen der Umwelt anzuzeigen und zu quantifizieren. Derartige, mit biochemischen Methoden erfaßbare Effekte von Umwelteinflüssen werden nach VAN GESTEL und VAN BRUMMELEN (1996) als "Biomarker" bezeichnet.

1.6 Moose als Bioindikatoren

Aufgrund morphologischer und physiologischer Eigenschaften haben sich terrestrische und aquatische Moose als Biomonitor von Schwermetallbelastungen in Ökosystemen als besonders geeignet erwiesen. Hierzu zählen insbesondere (nach MOUVET, 1985; EMPAIN, 1988; TYLER, 1990):

- das Fehlen einer voll entwickelten Cuticula
→ Schwermetalle werden über die Oberfläche aufgenommen
- die hohen Schwermetallakkumulationsraten aufgrund negativer Zellwandladungen
→ Schwermetalle werden in hohem Maße akkumuliert
- die Akkumulation der ionischen Form von Schwermetallen
→ der Schwermetallgehalt spiegelt die pflanzenverfügbare Menge wider
- das Fehlen eines voll entwickelten Leitsystems
→ Schwermetalle verbleiben innerhalb der Pflanze am Ort der Aufnahme, keine Akkumulation aus dem Substrat
- die Ausbildung homogener Populationen (aquatische Moose)
→ geringe biologische Varianz der Schwermetallgehalte (< 10 %)
- die hohe Schadstofftoleranz (aquatische Moose)
→ Vorkommen auch an belasteten Standorten
- die weite Verbreitung
→ großflächige Untersuchungen möglich

RÜHLING und TYLER (1968) führten erste Untersuchungen zur Bioindikation von Schwermetallbelastungen an Moosen durch. Seither wurden die Methoden optimiert und Untersuchungen zu unterschiedlichen Einflußfaktoren wie saisonalen Schwankungen, Probenahme, Probevorbereitung sowie Artenvergleiche durchgeführt (STEINNES, 1984; EMPAIN, 1988; KELLY und WHITTON, 1989; HERRMANN, 1990; MARKERT und WECKERT, 1993; BRÜNING und KREEB, 1993; HERPIN et al., 1994; BROWN und BRUMELIS, 1996; MARKERT, 1996).

Insbesondere in aquatischen Systemen, die aufgrund hoher Abflußraten eine kontinuierliche Beprobung zur Erfassung der Schadstoffbelastungen erfordern, ist die Anreicherung von Schwermetallen in Wassermoosen geeignet, Aussagen zur Belastungssituation zu treffen (BENSON-EVANS und WILLIAMS, 1976; SAY et al., 1981; SAY und WHITTON, 1983; MELZER, 1985; MOUVET, 1984, 1985; HERRMANN, 1990; FROST, 1990; CHOVANEC und VOGEL, 1992; CHOVANEC et al., 1994; GUNKEL, 1994; GONCALVES et al., 1994; SIEBERT et al., 1996; BRUNS et al., 1995, 1997).

1.7 Metallothioneine

Ende der 50er Jahre wurden schwermetallbindende Proteine aus Pferdenieren isoliert, woraufhin Proteine mit ähnlichen Eigenschaften in verschiedenen eukaryotischen Organismen nachgewiesen wurden (HAMER, 1986). Aufgrund ihres hohen Gehaltes an Cys und Schwermetallen wurden diese Verbindungen aus dem Tier- und Pflanzenreich unter dem Namen Metallothioneine zusammengefaßt. Weitere Charakteristika sind das niedere Molekulargewicht (< 10 kD) sowie das Fehlen von aromatischen Aminosäuren und His (RAUSER, 1990). Nach ihrer Struktur und ihrem Vorkommen werden drei Klassen von Metallothioneinen unterschieden (nach KOJIMA, 1991):

- Klasse I: Polypeptide mit Cys-Lokalisation entsprechend den aus Pferdenieren isolierten Metallothioneinen, translational synthetisiert (Tiere)
- Klasse II: Polypeptide mit Cys-Lokalisation abweichend von den aus Pferdenieren isolierten Metallothioneinen, translational synthetisiert (Tiere, Pilze)
- Klasse III: Nicht translational synthetisierte Peptide aus Pflanzen mit einer vom Glutathion oder Glutathion-Homologen abgeleiteten Struktur (Pflanzen, einige Pilze), (Phytochelatine)

Bis Mitte der 80er Jahre wurde davon ausgegangen, daß es sich auch bei den in Pflanzen nachgewiesenen schwermetallbindenden Komplexen um die bereits aus tierischen Systemen bekannten Metallothioneine handelt (WAGNER und TROTTER, 1982; ROBINSON und THURMAN, 1986). Erst die Strukturaufklärung pflanzlicher metallbindender Peptide durch GRILL et al. (1985) führte zur Entdeckung einer neuen Peptidklasse, die unter dem Namen "Phytochelatine" (PCs) (Synonyme: Metallothioneine III, Cadystine) zusammengefaßt wurde (GRILL et al., 1985).

1.8 Phytochelatine

LOLKEMA et al. stellten 1984 fest, daß in den Cu enthaltenden Fraktionen eines Extraktes von *Silene cucubalus* neben Cys, Asp und Ser vergleichsweise hohe Gehalte an Glu und Gly zu finden waren. 1985 wurde von GRILL et al. die Struktur schwermetallbindender Peptide aus Zellkulturen von *Rauwolfia serpentina* veröffentlicht (Abb. 1).

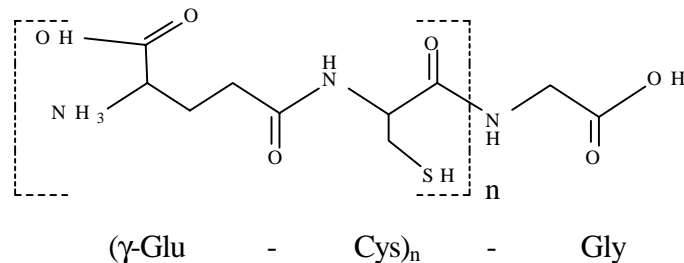


Abb. 1: Struktur der Phytochelatine, n = 2 - 11 (nach STEFFENS, 1990, verändert).

In der folgenden Zeit konnten schwermetallbindende Peptide der gleichen Struktur aus einer Vielzahl von Pflanzen isoliert werden (RAUSER et al., 1986; LUE KIM und RAUSER, 1986; ROBINSON und JACKSON, 1986; STEFFENS et al., 1986). Bis heute wurden Phytochelatine in allen höheren und niederen Pflanzen sowie einigen Pilzen nachgewiesen (GEKELER et al., 1988, 1989; STEFFENS, 1990; RAUSER, 1990, 1993; KNEER et al., 1992).

Aufgrund der SH-Gruppe des Cys verfügen Phytochelatine über schwermetallbindende Eigenschaften, die in der Zelle zu einer Entgiftung dieser Metalle führen (GRILL et al., 1985; GRILL und ZENK, 1989; KNEER und ZENK, 1992; ZENK, 1996). Des weiteren wird von einer Beteiligung der Phytochelatine an der intrazellulären Homöostase essentieller Schwermetalle ausgegangen (GRILL et al., 1988a; THUMANN et al., 1991; RAUSER, 1995).

Für die Bindung von Cd an Phytochelatine wurden von STRASDEIT et al. (1993) anhand von EXAFS-Messungen an isolierten Phytochelatin-Cd-Komplexen verschiedene Modelle vorgeschlagen, deren Struktur in Abhängigkeit von der Kettenlänge der Peptide variiert (Abb. 2).

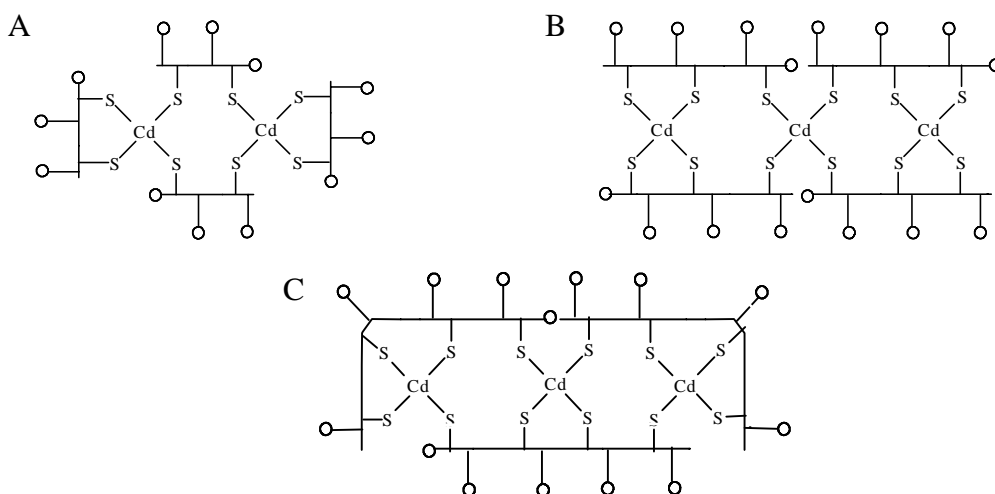
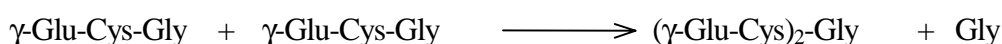


Abb. 2: Strukturmodelle für native Cd-Phytochelatin-Komplexe, A: $[Cd_2(PC_2)_4]$, B: $[Cd_3(PC_3)_4]$ und C: $[Cd_3(PC_4)_3]$ (nach STRASDEIT, 1992).

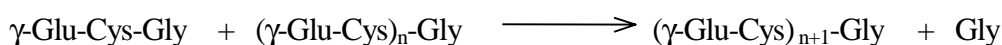
Von verschiedenen Autoren wird auch eine Beteiligung von S^{2-} an Schwermetall-Phytochelatin-Komplexen beschrieben (REESE und WINGE, 1988; SPEISER et al., 1992; REESE et al., 1992; KNEER und ZENK, 1997).

Die Biosynthese der Phytochelatine erfolgt durch das konstitutive Enzym γ -Glu-Cys-Dipeptidyl-Transpeptidase (Phytochelatin-Synthase) (GRILL et al., 1989). Die Aktivierung dieses Enzyms erfolgt durch freie Schwermetalle in der Zelle, wobei Cd im Vergleich zu anderen Schwermetallen der effektivste Aktivator der Phytochelatin-Synthase ist (GRILL et al., 1987, 1989; MAITANI et al., 1996b).

Die Synthese der Phytochelatine geht vom Glutathion aus, wobei es zur Bildung von Phytochelatinen mit zwei (γ -Glu-Cys)-Einheiten kommt oder durch Kettenverlängerung höhermolekulare Phytochelatine entstehen (GRILL et al., 1989):



oder



Durch die Chelatisierung freier Schwermetalle aufgrund der aktivierten Phytochelatinsynthese kommt es zur "Selbstregulation" der Enzymaktivität (LÖFFLER et al., 1989).

Als weiterer Syntheseweg der Phytochelatine wird nach Untersuchungen an *Schizosaccharomyces pombe* die Polymerisation von γ -Glu-Cys-Einheiten mit anschließender Addition von Gly postuliert (HAYASHI et al., 1991).

Neben diesen am häufigsten in Pflanzen und Pilzen vorkommenden Phytochelatinen sind vier weitere Familien dieser Peptide mit einer abweichenden terminalen Aminosäure bekannt. Von GRILL et al. (1986) wurden in Leguminosen die Homo-Phytochelatine (h-PCs) mit der Struktur $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$ nachgewiesen. 1994 konnten KLAPHECK et al. aus der Familie der *Poaceae* Hydroxymethyl-Phytochelatine (hm-PCs) mit der Aminosäuresequenz $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$ isolieren. Phytochelatine der Struktur $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$ sowie sogenannte des-Phytochelatine $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$ sind aus Maissämlingen bekannt (RAUSER und MEUWLY, 1995; MEUWLY et al., 1995). Als Vorstufen dieser Peptide wurden die entsprechenden Glutathion-Homologen nachgewiesen (GRILL et al., 1989; KLAPHECK et al., 1992; MEUWLY et al., 1993).

1.9 Glutathion

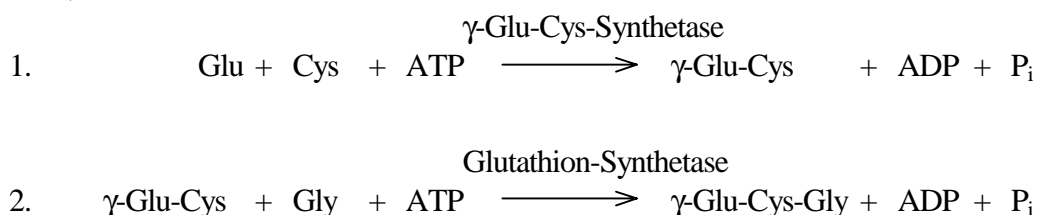
Mit der Struktur $\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$ (Molmasse 307,3) ist Glutathion das wichtigste nicht proteinogene Thiol pflanzlicher, tierischer und prokaryotischer Zellen (KOSOWER und KOSOWER, 1978). Als Metabolit der Phytochelatinsynthese steht dieses Tripeptid in direktem Zusammenhang mit der Schwermetalldetoxifikation in Pflanzen (GRILL et al., 1989; RAUSER, 1990, 1993, 1995).

Eine wesentliche Funktion kommt Glutathion als physiologischer Schwefelspeicher (RENNENBERG, 1982; BERGMANN und RENNENBERG, 1993) und Regulator der

Sulfataufnahme (HERSCHBACH und RENNENBERG, 1994) in Pflanzen zu. Weiterhin ist Glutathion wesentlich an Reaktionen beteiligt, die der Toleranz gegenüber Umweltstress dienen (SMITH et al., 1990; GRILL, 1992; RENNENBERG und BRUNOLD, 1994; BRUNOLD, 1996). Dieses betrifft insbesondere die Reduktion toxischer O₂-Spezies durch reduziertes Glutathion unter Bildung der oxidierten Form zur Vermeidung von oxidativem Stress, wie er unter extremen Umweltbedingungen in Pflanzen auftritt. (ALSCHER, 1989; SIES, 1989; HAUSLADEN und ALSCHER, 1993; DALTON, 1995; KRANNER und GRILL, 1996). Die Entgiftung verschiedener Xenobiotika durch nukleophile Substitution oder Addition stellt eine weitere wichtige Funktion des Glutathions im pflanzlichen Stoffwechsel dar. Hierdurch werden Pestizide und andere organische Schadstoffe konjugiert, wobei nicht toxische Verbindungen entstehen (LAMOUREUX und RUSNESS, 1993).

Auch Schwermetalle wie Cd können aufgrund chemischer Spezifitäten durch Glutathion chelatisiert werden (DIAZ-CRUZ et al., 1997). Für tierische Systeme liegen hierzu detailliertere physikochemische Modelle der Komplexbildung vor (RABENSTEIN, 1989). Der Nachweis einer derartigen Chelatbildung in Pflanzen konnte bisher nicht geführt werden.

Die Glutathionsynthese erfolgt in pflanzlichen Zellen sowohl in den Chloroplasten als auch im Cytosol (KLAPHECK et al., 1987; HELL und BERGMANN, 1988; HAUSLADEN und ALSCHER, 1993). Diese verläuft in zwei Schritten (nach RENNENBERG und LAMOUREUX, 1990):



Beide an den Reaktionen beteiligten Enzyme sind Mg²⁺-abhängig (BERGMANN und RENNENBERG, 1993). Die Regulation der Glutathionsynthese erfolgt durch Feedback-Hemmung der γ -Glu-Cys-Synthetase durch Glutathion (MEISTER und ANDERSON, 1983; HELL und BERGMANN, 1990; SCHNEIDER und BERGMANN, 1995).

Neben Glutathion wurden in einigen Pflanzen Homologe dieses Tripeptides gefunden. Homo-Glutathion (h-GSH, γ -Glu-Cys- β -Ala) wurde von KLAPHECK (1988) in der Familie der Fabales nachgewiesen. In einigen dieser Arten wird Glutathion ganz oder teilweise durch h-Glutathion ersetzt (KLAPHECK, 1988). MEUWLY et al. (1993) fanden in *Zea mays* ein Tripeptid der Struktur γ -Glu-Cys-Glu. Aus *Poaceae* ist Hydroxymethyl-Glutathion (hm-GSH) mit der Struktur γ -Glu-Cys-Ser bekannt (KLAPHECK et al., 1992). Die physiologische Rolle dieser Glutathion-Homologen ist nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch von vergleichbaren Funktionen wie denen des Glutathion ausgegangen (KLAPHECK et al., 1992). Für alle Glutathion-Homologen konnten unter Schwermetalleinfluss aus Pflanzen auch die entsprechenden Phytochelatine isoliert werden (Kap. 1.8).

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial und Kultivierungsbedingungen

2.1.1 Probenahme für Biomonitoring- und Laborversuche

Vorbereitend für die Untersuchungen am Wassermoos *Fontinalis antipyretica* wurden Standorte im Gebiet des Ostharzes kartiert (Tab. 1). Um eine Bestandsgefährdung zu vermeiden, erfolgten umfangreichere Probenahmen nur an Standorten mit vermehrtem Vorkommen (Wipper und Selke). Die Standorte Wipper und Selke lassen sich durch eine relativ hohe Fließgeschwindigkeit bei einer Wassertiefe von ca. 30 - 50 cm und direkter Sonneneinstrahlung charakterisieren. Die Breite des Flußbettes betrug an diesen Stellen ca. 4 - 6 m. Der Transport des Pflanzenmaterials erfolgte in Kunststoffwannen mit Eis.

Tab. 1: Probenahmestandorte von *F. antipyretica* im Gebiet des Harzes.

Standort	Lage
Wipper	Brücke Richtung Talsperre , Bad Wippra
Selke	Brücke vor Ortseinfahrt Alexisbad
Dammbach	vor Mündung in die Rappbode in Trautenstein
Rappbode	Ortsmitte, Trautenstein

2.1.2 Probenahme zum Vergleich von Pflanzen unterschiedlicher Standorte

Pflanzenproben zur Untersuchung unterschiedlich schwermetallsensitiver Populationen von *F. antipyretica* wurden an den Standorten des Harzes (Tab. 1) am selben Tag entnommen. Die Proben wurden in Polyethylenflaschen (250 mL) auf Eis ins Labor transportiert und mehrmals in einfachdestilliertem H₂O gewaschen. Eine längere Kultivierung unter Laborbedingungen wurde vermieden, weshalb die Laborversuche spätestens 2 Tage nach Probenahme begonnen wurden.

2.1.3 Kultivierungsbedingungen für *F. antipyretica*

In Anlehnung an SOMMER und WINKLER (1982) und MC QUEEN (1991) wurden die Pflanzen im Labor in einer Knop-Nährlösung in einer 1:10 Verdünnung (Tab. 2) in Aquarien kultiviert. Durch Reduktion des Phosphat- und Nitratanteils auf 33 % konnte Algenwachstum verhindert werden. Die Erneuerung des Mediums erfolgte in Abständen von 4 - 5 Wochen. Die Wasserströmung wurde mittels Aquarienpumpen simuliert und die Temperatur (10 °C) durch Kühlaggregate konstant gehalten. Die Beleuchtung von 12 Stunden pro Tag und ca. 40 kLux erfolgte über zeitgeschaltete Lampen. Unter diesen Bedingungen blieb das Pflanzenmaterial grün und vital und zeigte insbesondere im späten Herbst/Winter deutlichen Biomassezuwachs.

Tab. 2: Kulturmedium für *F. antipyretica* nach Knop (SCHOPFER, 1986), 1 : 10 verdünnt.

CaNO ₃ x 4H ₂ O	0,033 g/L
KCl	0,012 g/L
KH ₂ PO ₄	0,0083 g/L
KNO ₃	0,0083 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,025 g/L
FeCl ₃	gesättigte Lösung ca. 25 µL

Der pH-Wert betrug während der Kultivierung 6,5 - 7,0.

2.1.4 Kultivierungsbedingungen für *Elodea canadensis*

Als Vergleich zum Wassermoos *F. antipyretica* wurde die höhere Wasserpflanze *Elodea canadensis* unter den in Kap. 2.1.3 beschriebenen Bedingungen kultiviert.

2.1.5 Anzucht von Tomatenzellkulturen zur Gewinnung von Phytochelatinstandards

Eine in der Arbeitsgruppe etablierte heterothrophe Zellsuspensionskultur von *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Lukullus wurde für die Gewinnung von PC-Standards verwendet. Die Zellen wurden nach 4- oder 5tägiger Kultur auf eine OD von 0,3 in Kolben mit 100 mL MS-Medium (modifiziert nach TEWES et al., 1983) überimpft und nach 24 - 72 Stunden geerntet. Die Kultivierung erfolgte im Dunkeln bei 28 °C auf einem Schüttler bei 140 U/min.

2.1.6 Vorbereitung des Pflanzenmaterials für Expositions- und Laborversuche

Das für die Labor- und Expositionsversuche verwendete Pflanzenmaterial wurde mehrmals mit einfach-destilliertem H₂O gewaschen und in 2 - 3 cm lange Abschnitte unterteilt. Aufgrund der in Kap. 3.6.10, Abb. 32 dargestellten Ergebnisse wurden nur junge, voll beblätterte Pflanzenteile verwendet. Um die biologische Variabilität der Proben gering zu halten, wurde das Pflanzenmaterial zu einer Mischprobe vereinigt und für die Versuchsansätze entsprechende Teilmengen entnommen.

2.2 Freilanduntersuchungen

2.2.1 Expositionsversuche in der Elbe (aktives Biomonitoring)

Für die Exposition in der Elbe wurde Pflanzenmaterial aus der Wipper (Kap. 2.1.1) verwendet. Etwa 10 g FG wurde in Kunststoffnetze eingnäht und im Oktober/November 1994 und November/Dezember 1995 an den Standorten (Abb. 3) exponiert. Die Auswahl der Standorte orientierte sich an den Probenahmestellen des Landesmeßnetzes der Gewässerüberwachung Sachsen-Anhalt. Die Proben wurden an einem Schwimmer aus Styropor und einem Stein im freien Wasserkörper fixiert. Eine einheitliche Expositionsdauer war aufgrund des wechselnden

Wasserstandes nicht einzuhalten (Standorte und Expositionsdauer s. Anhang A, Tab. 1). Nach der Exposition wurden die Proben in Polyethylenflaschen (250 mL) auf Eis ins Labor transportiert und 3mal mit einfach-distilliertem H₂O gewaschen.

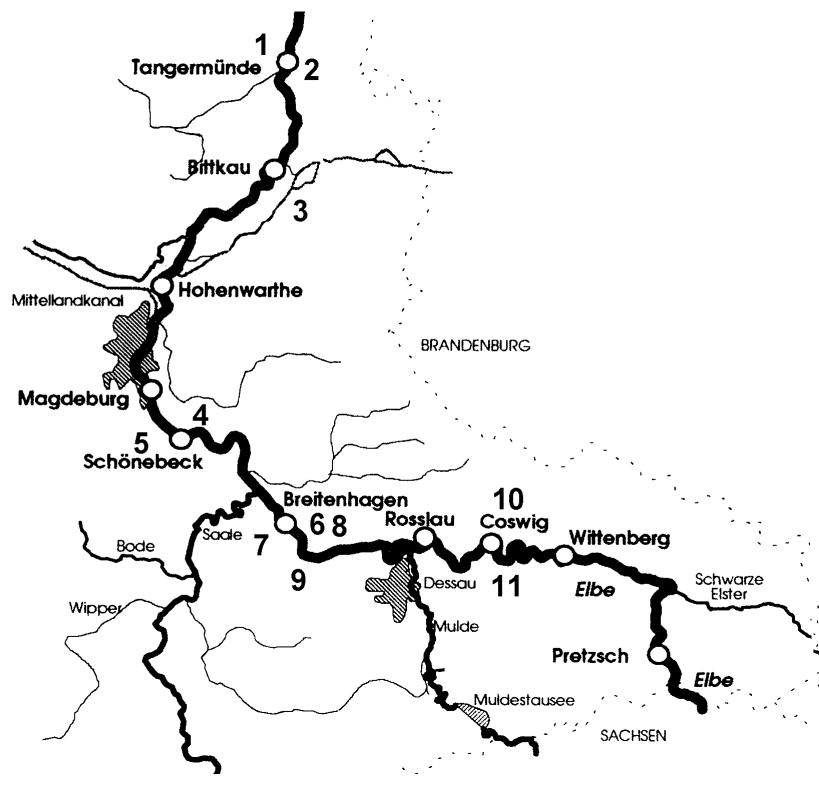


Abb. 3: Expositionsstandorte an der Elbe (Zeichnung nach GEWÄSSERGÜTEBERICHT SACHSEN-ANHALT, 1994; verändert).

2.2.2 Expositionsversuche in extrem belasteten Gewässern (aktives Biomonitoring)

An extrem belasteten Standorten in einem ehemaligen Kupferschiefer-Bergbauggebiet des Mansfelder Landes (Sachsen-Anhalt) wurden Proben von *F. antipyretica* für 21 Tage exponiert (Tab. 3). Diese Standorte werden durch die Sektion Hydrogeologie des UFZ Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle, Bad Lauchstädt hydrologisch und geochemisch (Dr. Schreck) sowie mikrobiologisch (Dr. G. Krauß) bearbeitet. Die Vorbereitung des Pflanzenmaterials erfolgte wie für die Elbeexposition beschrieben (Kap. 2.1.6 und 2.2.1).

Tab. 3: Expositionsstandorte im Mansfelder Land.

Probe	Standortbeschreibung
H3	Hütte Helbra, Sammelteich am Sanderschacht (stehendes Gewässer)
H4	Stadtborn Hergisdorf (fließendes Gewässer)
H5	Spülbecken Wormsleben (stehendes Gewässer)
H6	Böse Sieben, Brücke Wormsleben (fließendes Gewässer)
H7	Böse Sieben, Eisenbahnbrücke, Eisleben (fließendes Gewässer)
H8	Glume, Eisleben (fließendes Gewässer)

2.3 Laborversuche

2.3.1 Aufbewahrung der Proben

Die Proben für die Schwermetallanalytik und Chlorophyllbestimmung wurden 3mal mit einfachdestilliertem H₂O gewaschen und bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Bis zur Homogenisierung durch Mörsern (Porzellanmörser mit HNO₃ (ca. 20%ig, suprapur) gewaschen) erfolgte die Aufbewahrung im Dunkeln bei Raumtemperatur. Für die Analytik thiolhaltiger Verbindungen wurden die Proben bei -80 °C bis zur Extraktion aufbewahrt. Das Einfrieren bereits gemörserter Proben war für eine quantitative Analytik für wenige Stunden möglich. Die sauren Extrakte konnten nicht eingefroren werden.

2.3.2 Bestimmung des Trockengewichtes von *F. antipyretica*

Nach Entfernen des Oberflächenwassers mit Zellstoff wurde das Pflanzenmaterial bis zur Gewichtskonstanz bei 80 °C getrocknet und der Wasserverlust aus der Differenz des Frisch- und Trockengewichts bestimmt. Dieser betrug 85,2 % ± 1,1 (n = 3) für grüne Pflanzenteile und 90,6 % ± 1,7 (n = 7) für junge Spitzen. Da in den Versuchen hauptsächlich grünes voll entwickeltes Pflanzenmaterial verwendet wurde, wird im folgenden für die Umrechnung von Frisch- in Trockengewicht von einem mittleren Wasserverlust von 85 % ausgegangen.

2.3.3 Bestimmung der Chlorophyllgehalte von *F. antipyretica*

Getrocknetes Pflanzenmaterial (Kap. 2.3.2) wurde mit Seesand (Merck) und Aceton (90%ig) gemörsert, filtriert (Gelbband, Fa. Schleicher und Schuell) und anschließend der Gehalt an Chlorophyll a und b über die Extinktion bei 645 und 664 nm berechnet (JEFFREY und HUMPHREY, 1975). Zur Korrektur unspezifischer Absorption wurde zuvor die Extinktion bei 750 nm von diesen Werten subtrahiert. Zusätzlich wurde in einigen Versuchen die Extinktion bei 665 nm (E_{665}) vor und 1 min nach Zugabe (E_{665a}) von 10 µL 1N HCl/mL Extrakt bestimmt. Dieser Quotient (E_{665}/E_{665a}) kann über das Verhältnis von Chlorophyll zu Phaeophytin als Maß für Umweltstress bei Bryophyten herangezogen werden (LOPEZ und CARBALLEIRA, 1989; LOPEZ et al., 1994).

2.3.4 Bestimmung des intra- und extrazellulär gebundenen Cadmiums in *F. antipyretica*

Untersuchungen zur Oberflächen- bzw. Zellwandadsorption von Cd erfolgten über Austausch des Cd²⁺ durch Ni²⁺ (BROWN und WELLS, 1988). Etwa 1000 - 1500 mg Pflanzenmaterial wurden nach Inkubation in 100 mL Medium mit 100 µM Cd 2mal mit einfachdestilliertem H₂O (je 100 mL) gewaschen. Im folgenden wurden Waschungen mit 20 mM NiCl₂ durchgeführt (je 50 mL, 30 min auf einem Schüttler, ca. 100 U/min). Der Anteil des oberflächen- bzw. zellwandgebundenen Cd wurde aus den Cd-Gehalten der zum Waschen verwendeten NiCl₂-Lösungen berechnet. Im

Anschluß wurde das Moos bei 80 °C getrocknet, gemörsert (Porzellanmörser, mit HNO₃ (ca. 20%ig, suprapur) gespült) und für die Schwermetallanalytik aufgeschlossen (Kap. 2.4.1). Die Menge an intrazellulär aufgenommenem Cd wurde aus dem Rest-Cd-Gehalt der Pflanzen bestimmt.

2.3.5 Wachstumsmessungen an *F. antipyretica*

Für Untersuchungen zum Wachstum von *F. antipyretica* unter Cd-Belastung wurden je 10 Sproßspitzen (ca. 2 - 3 cm) von Pflanzen unterschiedlicher Standorte in Petrischalen auf Agar (6 g/L) mit Knop-Medium (Kap 2.1.3, Tab. 2) und 0, 1 und 5 µM Cd unter den in Kap 2.1.3 beschriebenen Bedingungen für 5 Wochen kultiviert (ohne Schüttler).

2.3.6 Induktion thiolhaltiger Verbindungen in Tomatenzellkulturen

Die Zellen einer Kultur von *Lycopersicon esculentum* wurden wie unter 2.1.5 beschrieben kultiviert. Die Zugabe von 100 - 200 µM CdCl₂ erfolgte nach 24 Stunden mit Eintritt in die logarithmische Wachstumsphase. Für die Gewinnung von PC-Standards wurden die Zellen 24 - 30 Stunden nach Cd-Zugabe geerntet. Durch Zusatz von 500 µM GSH zur Kultur wurde die Synthese der PCs gesteigert (MENDUM et al., 1990) (Kap. 2.7.2, Abb. 6). Die Zellen wurden durch Vakuumfiltration aus dem Medium entfernt und auf gleiche Weise 3mal mit einfach-destilliertem H₂O gewaschen und bis zur Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.7 Induktion thiolhaltiger Verbindungen in *F. antipyretica*

Zur Induktion der Synthese thiolhaltiger Verbindungen in *F. antipyretica* im Laborversuch wurde 1 g FG des Pflanzenmaterials pro 100 mL Knop-Medium eingesetzt. Die Zugabe der Schwermetalle zum Medium erfolgte als zweiwertige Chloridsalze. Aus dem Freiland entnommenes Pflanzenmaterial wurde 2 Tage in Medium ohne Schwermetallzusatz vorkultiviert. Während der Versuchsdurchführung wurden die Proben in Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler bei 125 U/min inkubiert. Die Probenahme erfolgte jeweils zur gleichen Tageszeit.

2.3.8 Inkubation unter konstanten Cadmium- und Nährstoffkonzentrationen

In dem in Kap 3.6.7 beschriebenen Versuch wurde zur Konstanthaltung der Nährstoff- und Cd-Konzentration im Medium das Pflanzenmaterial auf einem Schüttler (125 U/min) in einem Erlenmeyerkolben (400 mL) mit Zu- und Abfluß inkubiert. Während der Versuchsdauer wurde mit einer Peristaltikpumpe bei einem Fluß von 1 mL/min das Medium im Kolben kontinuierlich erneuert (Austausch von 3,6 Volumen pro Tag).

2.3.9 Kurzzeitige Cadmiumbelastung

Für die Untersuchung des GSH-Pools von *F. antipyretica* nach Entfernen des Cd aus dem Kulturmedium (Kap. 3.6.9, Abb. 31) wurde das Pflanzenmaterial wie unter 2.3.7 beschrieben für 3 Tage in Cd-haltigem Medium inkubiert. Im Anschluß wurde das Medium entfernt, das Pflanzenmaterial 3mal mit einfach-destilliertem H₂O (200 mL) gewaschen und für die nächsten 7 Tage in Cd-freiem Medium kultiviert.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Aufschluß des Pflanzenmaterials für die Schwermetallanalytik

Für den mikrowellengestützten Aufschluß (Fa. CEM, MDS 2100) wurden 40 - 50 mg getrocknetes und gemörseretes Pflanzenmaterial (Porzellanmörser mit HNO₃ (ca. 20%ig, suprapur) gewaschen) in die Aufschlußgefäße (Teflon: Lined Digestion Vessels, Fa. CEM) eingewogen und mit je 2 mL H₂O₂ (30%ig, suprapur) und 4 mL HNO₃ (65%ig, suprapur) versetzt. Die physikalischen Parameter des Aufschlusses sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Physikalische Parameter des Aufschlusses mittels Mikrowelle (Fa. CEM, MDS 2100).

Stufe	1	2	3
Druck [psi]	19	100	120
Zeit [min]	5.00	20.00	20.00
Dauer [min]	3.00	15.00	15.00

Der Aufschluß wurde durch eine Referenzprobe (BCR 61, *Platihynidium riparioides*, Wassermoos) während jedes Durchganges kontrolliert. Im Anschluß wurden die Proben mit einfach-destilliertem H₂O auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Aufgrund des hohen Silikatgehaltes des Pflanzenmaterials, wurden die Proben vor der Schwermetallmessung filtriert (Celluloseacetat, 45 µm, Fa. Sartorius).

2.4.2 Vorbereitung der Wasserproben

Die während der Freilanduntersuchungen entnommenen Wasserproben wurden filtriert (Celluloseacetat, 45 µm, Fa. Sartorius) und mit 3 % HNO₃ (65%ig, suprapur) angesäuert.

2.4.3 Schwermetallanalytik der Moos- und Wasserproben

Die Messungen der Gehalte an Cd, Pb, Zn, und Cu der Proben aus den Freilandversuchen (Kap. 3.2, Abb. 7 und 8; Kap. 3.7.1, Tab. 17 und Kap. 3.9.1, Tab. 19) erfolgten am UFZ Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle, Sektion Gewässerforschung, Magdeburg (Dr. K. Friese),

Sektion Analytik (Dr. Wennrich). Die Analytik wurde am ICP-MS (ELAN 5000, Fa. Perkin Elmer, Sciex) durchgeführt. Wiederfindung und Richtigkeit der Daten wurden anhand des Referenzmaterials SRM 1643c (Wasser) und BCR 61 (*Platihynidium riparioides*, Wassermoo) abgesichert. Die Kalibrierungen erfolgten mittels Multielement-Standardlösungen (Fa. Merck) im Bereich von 1 - 100 µg/L. Zur Korrektur von Matrixeffekten, auftretenden Interferenzen und 'drift correction' wurde ¹⁰³Rh als interner Standard eingesetzt. Durch Mitführen eines Blindwertes pro Aufschlußdurchgang konnten auftretende Kontaminationen erfaßt und berücksichtigt werden. Die Nachweisgrenzen lagen bei 0,2 µg/L (Cd), 2,0 µg/L (Pb), 10 µg/L (Zn) und 2,0 µg/L (Cu).

2.4.4 Schwermetallanalytik des oberflächengebundenen Cadmiums

Die Schwermetallgehalte der Waschlösungen, NiCl₂-Lösungen sowie des Mediums der Untersuchungen zur intra- und extrazellulären Cd-Aufnahme in *F. antipyretica* (Kap. 2.3.4) wurden ohne weitere Probenvorbereitung mittels AAS (Fa. Solar, ATI UNICAM 929) gemessen. Das aufgeschlossene Pflanzenmaterial (Kap. 2.4.1) wurde auf ein Volumen von 30 mL mit einfachdestilliertem H₂O aufgefüllt und ohne Filtration direkt eingesetzt. Die Kalibrierung erfolgte durch Standards im Bereich von 0,1 bis 5 mg/L. Die Nachweisgrenze lag bei 0,05 mg/L.

2.5 Extraktion und Analytik thiolhaltiger Verbindungen

2.5.1 Extraktion thiolhaltiger Peptide

Die Extraktion thiolhaltiger Peptide erfolgte nach GRILL et al. (1991). Es wurden pro Messung, in Abhängigkeit von der Homogenität des Pflanzenmaterials, mindestens 100 bis 200 mg FG eingesetzt. Geringere Mengen führten aufgrund der biologischen Variabilität zu einer höheren Streuung der Meßergebnisse. Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem N₂ gemörsert und mit 1 N NaOH mit 1 mg/mL NaBH₄, (Tab. 5) versetzt. Nach 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben 10 min bei 20 000 g zentrifugiert. Das Verhältnis von Pflanzenmaterial (FG) zur Extraktionslösung wurde entsprechend Tab. 5 variiert.

Tab. 5: Extraktionsbedingungen für unterschiedliche thiolhaltige Verbindungen.

Methoden	Einwaage [mg FG]: NaOH (mit NaBH ₄) [µL]	Verbindung
Extraktion 1	1 : 1	Phytochelatine (HPLC)
Extraktion 2	1 : 2	γ-Glu-Cys, Cys (HPLC)
Extraktion 3	1 : 4	Glutathion (enzymatisch)

Durch Erhöhung des Extraktionsvolumens wurden die Extrakte verdünnt und gleichzeitig die Wiederfindung erhöht. Wurden mehrere Substanzen aus einem Extrakt bestimmt, sind die Bedingungen in den jeweiligen Versuchen angegeben.

Durch Zugabe von 3,6 N HCl zum Überstand (120 μ L HCl/500 μ L Extrakt) wurden Proteine ausgefällt und der pH-Wert unter 2,0 gesenkt, wodurch S-gebundene Schwermetalle dissoziieren. Nach 15minütiger Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation (4 $^{\circ}$ C, 20 000 g) wurde ein klarer Überstand erhalten, der für die weiteren Analysen verwendet wurde. Unter diesen Bedingungen konnte Glutathion nur als Gesamt-GSH in der reduzierten Form bestimmt werden. Die Standardaddition von 5 - 25 μ g GSH zum gemörserten Pflanzenmaterial ergab für Extraktion 3 (Tab. 5) eine Wiederfindung von $48,8 \pm 3,9$ % (n = 6). Diese war auch durch Erhöhung des Extraktionsvolumens nicht signifikant zu verbessern. Für Cys und γ -Glu-Cys betrug die Wiederfindung 20 - 35 %. Die im Ergebnisteil dargestellten Werte beziehen sich auf die Menge an extrahierbarer Substanz, eine Umrechnung erfolgte nicht. Für die PCs konnte keine Wiederfindung ermittelt werden, da zur Zeit der Untersuchungen keine gereinigten Standards zur Verfügung standen.

Ein Vergleich der ausgewählten Extraktionsbedingungen mit anderen Methoden wie die Verwendung von SSA (GUPTA und GOLDSBROUGH, 1991) oder HCl (TUKENDORF und RAUSER, 1990) ergab jeweils für dasselbe Pflanzenmaterial leichte Abweichungen der extrahierbaren GSH-Mengen (Tab. 6):

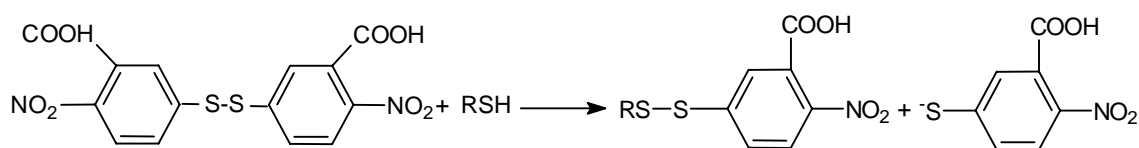
Tab. 6: Mengen an extrahierbarem GSH bei Verwendung unterschiedlicher Extraktionsmittel, Verhältnis von Extraktionslösung zu Einwaage je 4 : 1, [μ g/g FG], n = 3.

	Extraktion 3	SSA (5 % w/v)	HCl (0,1 N)
Wiederfindung	$98,5 \pm 5,6$	$80,7 \pm 7,1$	$87,6 \pm 4,2$

2.5.2 Analytik der Phytochelatine

Nach GRILL et al. (1991) erfolgte die Analytik der PCs (und GSH + γ -Glu-Cys als Summe) mittels Reversed-Phase HPLC (LKB System One) und Online-Nachsäulenderivatisierung (Pharmacia Pump P-3500) mit DTNB aus den in Kap. 2.5.1 beschriebenen Pflanzenextrakten. Extraktionen mit 5%iger SSA (GUPTA und GOLDSBROUGH, 1991) oder 0,1 M HCl (TUKENDORF und RAUSER, 1990) ergaben keine zufriedenstellenden Chromatogramme.

Der Nachweis der SH-Gruppen erfolgte durch Online-Nachsäulenderivatisierung mit DTNB (GRILL et al., 1991). Das bei der Reaktion von DTNB mit SH-Gruppen freigesetzte TNB (Abb. 4) kann als gelber Farbstoff bei 410 nm detektiert werden (ELLMAN, 1959).



5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoessäure) (DTNB)

5-Thio-2-nitrobenzoessäure (TNB)

Abb. 4: Reaktion von DTNB mit Thiolen unter Freisetzung von TNB (nach ANDERSON, 1989).

HPLC-Bedingungen:

Säule		C-18 (SuperpacPep S, Pharmacia), 5 μ m, 4,0 x 250 mm
Mobile Phase	A	H ₂ O, pH 3,0 mit TFA
	B	ACN
Gradient		2 - 20 % B in A in 20.0 min; 20.1 - 25.0 min 20 % B, 25.1 - 30.0 min 2 % B
Fluß		1 mL/min

Nachsäulenderivatisierung:

DTNB	300 μ M in 50 mM KH ₂ PO ₄ , pH 8,0
Fluß	0,4 mL/min
Reaktionsschleife	1 mL, entsprechend 44 s Reaktionszeit
Detektion	410 nm

Die DTNB-Konzentration, der Fluß sowie die Länge der Reaktionsschleife wurden zugunsten eines hohen Peakfläche/Peakbreite Verhältnisses optimiert.

Die Konzentrationen der Peptide wurden über Eichkurven mit GSH im linearen Bereich von 0,5 - 200 μ g/mL berechnet. Für unterschiedliche Injektionsvolumina wurden entsprechende Eichkurven aufgenommen. Die Berechnung der Thiolpeptidgehalte erfolgte anhand der bei der Extraktion erhaltenen Überstände. Die Ergebnisse sind als GSH-Äquivalente dargestellt. Unter diesen Bedingungen eluierten GSH und γ -Glu-Cys gemeinsam.

2.5.3 Bestimmung der Glutathionvorstufen Cystein und γ -Glutamyl-Cystein

Die Gehalte an Cys und γ -Glu-Cys aus den in Kap. 2.5.1 beschriebenen Extrakten wurden mittels Reversed-Phase HPLC bei einem pH-Wert von 1,8 und anschließender Online-Derivatisierung mit DTNB (Kap. 2.5.2) bestimmt. Mit dieser Methode war die Trennung von Cys, Cys-Gly, γ -Glu-Cys und sowie des GSH möglich (Abb. 5). Die Identifizierung der einzelnen Verbindungen aus den Pflanzenextrakten erfolgte über Standardaddition der Reinsubstanzen.

HPLC-Bedingungen:

Säule	C-18 (Si 100, Serva) 5 μ m, 4,6 x 240 mm
Mobile Phase	H ₂ O pH 1,8 mit TFA
Gradient	isokratisch
Fluß	1 mL/min

Nachsäulenderivatisierung:

DTNB	600 μ M in 200 mM KH ₂ PO ₄ , pH 8,0
Fluß	0,4 mL/min
Reaktionsschleife	500 μ L, entsprechend 22 s Reaktionszeit
Detektion	410 nm

Die Gehalte der Substanzen wurden anhand von Eichkurven im Bereich von 5 - 50 $\mu\text{g/mL}$ (50 μL Injektionsvolumen) berechnet. Durch Standardaddition zum sauren Extrakt wurde die Stabilität der Substanzen über 3 Stunden überprüft (Tab. 7).

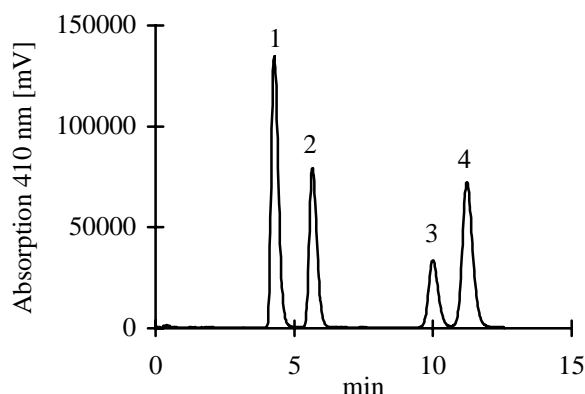


Abb. 5: HPLC-Chromatogramm der Standardsubstanzen (je 0,5 μg): 1= Cys; 2 = Cys-Gly; 3 = GSH; 4 = γ -Glu-Cys.

Tab. 7: Stabilität thiolhaltiger Verbindungen in sauren Extrakten von *F. antipyretica* über einen Zeitraum von 3 Stunden.

Zeit	Wiederfindung [%]		
	1h	2h	3h
Cys	96,8	96,8	92,7
γ -Glu-Cys	100,2	99,8	95,5
GSH	99,2	98,2	95,7

2.5.4 Enzymatische Bestimmung des Glutathiongehaltes

Die Extraktion des GSH erfolgte wie unter Kap. 2.5.1 beschrieben. Der Gesamt-GSH-Gehalt der Proben wurde über einen gekoppelten enzymatisch-optischen Test mit DTNB und GSSG-Reduktase (ANDERSON, 1985) bestimmt.

Puffer:

A		143 mM NaH_2PO_4
B		143 mM Na_2HPO_4
C	A : B	1 : 5,25 + 6,3 mM EDTA

Testansatz:

NADPH+ H^+	450 μM in C	700 μL
DTNB	6 mM in C	100 μL
H_2O		665 μL
Probe		25 μL
GSSG-Reduktase	20 U/mL	10 μL

Die Reaktion wurde durch Zugabe der GSSG-Reduktase nach 8minütiger Inkubation bei 30 °C gestartet (Wasserbad). Der GSH-Gehalt wurde anhand der photometrisch ermittelten Reaktionsgeschwindigkeit ($\Delta E_{410}/\text{min}$) bestimmt.

Dieser Test beruht auf einer Umwandlung von GSH in GSSG in Gegenwart von DTNB mit anschließender enzymatischer Reduktion des GSSG. Aufgrund der Regenerierung von GSH ist diese Reaktion lediglich durch die Konzentrationen an $\text{NADPH}+\text{H}^+$ und DTNB limitiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde über die Änderung der Extinktion bei 410 nm durch die Freisetzung von TNB während der Reaktion von DTNB mit GSH (Kap. 2.5.2, Abb. 4) bestimmt. Anhand von Eichkurven mit GSH im Bereich von 0,5 bis 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurden die GSH-Konzentrationen der Pflanzenextrakte ermittelt. GSSG und GSH ergeben hierbei die gleichen Eichkurven. Die Berechnung der GSH-Gehalte erfolgte anhand der Überstände (Kap. 2.5.1). Die analytische Schwankung betrug 7,7 % ($n = 6$). Im Vergleich zur GSH-Bestimmung mittels HPLC (Kap. 2.5.2) ergab sich eine leicht erhöhte Wiederfindung ($107,4\% \pm 2,9, n = 5$).

2.5.5 Bestimmung des Verhältnisses von oxidiertem zu reduziertem Glutathion

Die Bestimmung des GSSG-Gehaltes erfolgte über HPLC-Analysen der Monobrombimanderivate in zwei parallelen Reaktionsschritten aus einem Pflanzenextrakt (STROHM et al., 1995). Für die Extraktion wurden ca. 50 mg des in flüssigem N_2 gemörserten Pflanzenmaterials in 1,5 mL 0,1 N HCl mit 80 mg PVP (SCHUPP, 1991) eingewogen und anschließend 15 min bei 4 °C und 20 000 g zentrifugiert. Die Bestimmung des GSH und GSSG erfolgte aus den Überständen.

Durch die Umsetzung der Sulfhydrylgruppe des GSH mit NEM wird der Anteil an GSH der weiteren Derivatisierung entzogen. Hierdurch wird bei der anschließenden Reduktion des GSSG durch DTT und folgender Bimanderivatisierung nur der Anteil an GSSG erfaßt.

Die Bestimmung des GSSG und des Gesamt-GSH erfolgte in zwei Ansätzen:

1. Gesamtglutathion:

Extrakt		120 μL
CHES-Puffer	0,2 M, pH 9,3	180 μL
DTT	6,0 mM in H_2O	30 μL
1 Stunde bei Raumtemperatur		

2. oxidiertes Glutathion:

Extrakt		120 μL
CHES-Puffer	0,2 M, pH 9,3	180 μL
NEM	5,0 mM in H_2O	50 μL
10 min bei Raumtemperatur		
DTT	6,0 mM in H_2O	30 μL
1 Stunde bei Raumtemperatur		

Derivatisierung mit Monobrombiman (beide Ansätze):

Monobrombiman	30 mM in Methanol	10 μ L
15 min Raumtemperatur, dunkel		
Essigsäure	5% ig	250 μ L
Zentrifugation, 15 min, 4 °C, 20 000 g		

HPLC-Bedingungen:

Säule	C-18, (Ultrasphere ODS, Beckmann), 5 μ m, 4,6 x 250 mm	
Mobile Phase	A	10 % Methanol in H ₂ O (v/v), pH 4,3 mit Essigsäure (konz.)
	B	90 % Methanol in H ₂ O (v/v), pH 3,9 mit Essigsäure (konz.)
Gradient	4 - 18 % B in A in 20.0 min; 20.0 - 20.5 min auf 100 % B, 20.5 - 28.5 min 100 % B, 28.5 - 29.0 min auf 0 % B, 29.0 - 35.0 min 0 % B	
Fluß	1 mL/min	
Fluoreszenzdetektion	Anregung 420 nm/ Detektion 520 nm	

Die Quantifizierung erfolgte anhand von Eichkurven im Bereich von 2,0 - 8,0 μ g/mL GSH und 0,2 - 0,8 μ g/mL GSSG. Der GSH-Gehalt wurde über Subtraktion des oxidierten Anteils (2.) vom Gesamt-GSH (1.) ermittelt.

2.5.6 Bestimmung des Gesamtthiolgehaltes

Die Bestimmung des GSTH-Gehaltes erfolgte aus den in Kap. 2.5.1 beschriebenen Extrakten über die Farbreaktion mit DTNB (Kap. 2.5.2). Die Messung erfolgte nach 5 min bei 410 nm photometrisch gegen einen Blindwert ohne Probe mit 100 μ L H₂O. Anhand einer Eichkurve im Bereich von 5 - 200 μ g/mL wurden die GSTH-Gehalte der Proben ermittelt.

Testansatz:

Probe		100 μ L
DTNB	300 μ M in KH ₂ PO ₄ (50 mM, pH 8,0)	3,9 mL

2.5.7 Massenspektrometrie

Die Aufnahme der Massenspektren der thiolhaltigen Peptide wurde mit einem VG BIO Q Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer mit Elektrospray Interface durchgeführt. In einen konstanten Fluß von 4 μ L/min (Pumpe HP 1050) Acetonitril und H₂O (mit 0,5 % Ameisensäure) im Verhältnis 1 : 2 wurden 10 μ L Probe über ein Schleifendosierventil (Rheodyne 5717) direkt in die Quelle injiziert.

2.5.8 Aminosäureanalysen

Aminosäureanalysen der thiolhaltigen Verbindung erfolgten durch einen Aminosäureanalysator (Applied Biosystems) mit automatischer Hydrolyse und direkter Oxidation von Cys zu Cys-Säure.

2.5.9 Kapillarelektrophoretische Untersuchungen

Die kapillarelektrophoretischen Untersuchungen erfolgten an einem HP^{3D} System (Fa. Hewlett Packard) mit einer SUPELCO FS50 CE-Kapillare in 0,1 M Tris-HCl (pH 8,3) (SUTTER, 1996).

2.6 Auswertung und Darstellung der Daten

2.6.1 Darstellung der Ergebnisse

Die dargestellten Gehalte thiolhaltiger Peptide wurden vorwiegend in täglichen bzw. mehrtägigen Abständen gemessen. Aufgrund möglicher diurnaler Schwankungen, wie sie bei *Picea abies* für GSH festgestellt wurden (SCHUPP und RENNENBERG, 1988), erfolgte die graphische Darstellung als Balkendiagramme (mit Ausnahme der Kurzzeitversuche). Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich die Standardabweichungen auf drei parallele Versuchsansätze. Sind keine Standardabweichungen dargestellt, wurden die Ergebnisse in mindestens einer Versuchswiederholung bestätigt.

2.6.2 Gewässerdaten (Literaturwerte)

Die in Kap. 3.2, Abb. 7 und 8 dargestellten Schwermetallkonzentrationen des Elbwassers wurden den entsprechenden Gewässergüteberichten (GEWÄSSERGÜTEBERICHT SACHSEN-ANHALT, 1994, 1995) entnommen. Eine Filtration der Proben erfolgte nicht (pers. Mitteilung des bearbeitenden Labors), so daß es sich um Gesamtschwermetallgehalte (gelöste und ungelöste Fraktion) handelt. Es wurden die Werte von drei Messungen im Abstand von 14 Tagen vor, während und nach der Exposition gemittelt. In die Berechnung gingen die Werte < Nachweisgrenze als 0,5 x Nachweisgrenze ein.

2.6.3 Berechnung der Akkumulationsfaktoren

Die Berechnung der Akkumulationsfaktoren der Elbeexpositionen wurden nach folgender Formel durchgeführt (SM_{Probe} = Schwermetallgehalt der Probe [$\mu\text{g}/\text{kg TG}$], SM_{Wasser} = Schwermetallgehalt des Wassers [$\mu\text{g}/\text{L}$], $SM_{\text{Kontrolle}}$ = Schwermetallgehalt der Kontrollprobe [$\mu\text{g}/\text{kg TG}$], n = Anzahl der Proben):

$$\sum \frac{SM_{\text{Probe}} - SM_{\text{Kontrolle}}}{SM_{\text{Wasser}}} : n$$

Es wurden nur Werte berücksichtigt, deren Abweichung von der Kontrolle >10 % betrug. Die Grenzen für biologische Varianzen und analytische Fehler wurden bei $\pm 10\%$ der Kontrolle gesetzt.

2.6.4 Statistische Auswertung

Die Berechnung von Korrelationskoeffizienten erfolgte mittels linearer Regression durch computergestützte Tabellenkalkulation (MS Excel 5.0). Die Grenzwerte für die Signifikanzen wurden einem statistischen Standardwerk entnommen (SACHS, 1988).

2.7 Phytochelatinstandards aus Tomatenzellkulturen

2.7.1 Anreicherung der Phytochelatine aus Tomatenzellen

Tomatenzellen wurden wie unter 2.5.1 beschrieben extrahiert (Extraktion 1) und mittels HPLC und Nachsäulenderivatisierung mit DTNB analysiert (Kap. 2.5.2). Das Sammeln der PCs erfolgte bei einem Injektionsvolumen von 200 - 1000 μL ohne Nachsäulenderivatisierung mittels Fraktionssammler (2 mL, entsprechend 2 min). Aufgrund des hohen Probenvolumens wurde der pH-Wert der Extrakte zuvor auf pH 2 - 2,5 mit 1 N NaOH eingestellt, um eine Schädigung der Kieselgelsäule zu vermeiden. Durch Zugabe von 50 μL DTNB (in 300 μM KH_2PO_4 , 50 mM, pH 8,0) zu 50 - 100 μL der Fraktionen wurden die thiolhaltigen Fraktionen ermittelt und in einer Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von ca. 100 - 150 μL eingengt. 10 μL der Fraktionen wurden mit je 50 μL H_2O verdünnt und erneut mit Nachsäulenderivatisierung chromatographiert. Die PC-Gehalte wurden anhand von Eichkurven mit GSH (0,5 - 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) berechnet und Fraktionen mit PCs identischer Retentionszeit vereinigt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C .

2.7.2 Identifizierung der Phytochelatine aus Tomatenzellen

HPLC-Chromatogramme der Extrakte aus Tomatenzellkulturen, die in MS-Medium mit 150 μM Cd, 300 μM Cd sowie 150 μM Cd + 500 μM GSH angezogen wurden sind in Abb. 6 dargestellt. Während der Messungen, insbesondere bei Proben mit hohen PC-Gehalten, kam es zu leichten Verschiebungen der Retentionszeiten. Die Identifizierung der unterschiedlichen PCs erfolgte mittels Massenspektrometrie. Fraktionen mit einem PC-Gehalt von mindestens 50 nmol/mL GSH-Äquivalente wurden direkt gemessen. Es ergaben sich die in Tab. 8 dargestellten Molmassen (s. a. Anhang B, Abb. 2 - 5).

Tab. 8: Molmassen (m/z) und HPLC-Retentionszeiten [min] von PCs aus Tomatenzellkulturen, Extraktion und HPLC-Analytik siehe Kap. 2.5.1 und 2.5.2.

PC	m/z	Retentionszeit [min]
PC ₂	540	10 - 12
PC ₃	772	16 - 19
PC ₄	1004	19 - 23
PC ₅	1235	20 - 25

Die ermittelten PC-Molmassen aus Tomatenzellkulturen stimmten mit den in der Literatur dargestellten Massen von 540 für PC₂ (ISOBE et al., 1992, aus *Schizosaccharomyces pombe*), 772 für PC₃ und 1004 für PC₄ (KUBOTA et al., 1995, aus Wurzeln von *Rubia tinctorum*) überein. Für PC₅ sind keine Literaturdaten bekannt.

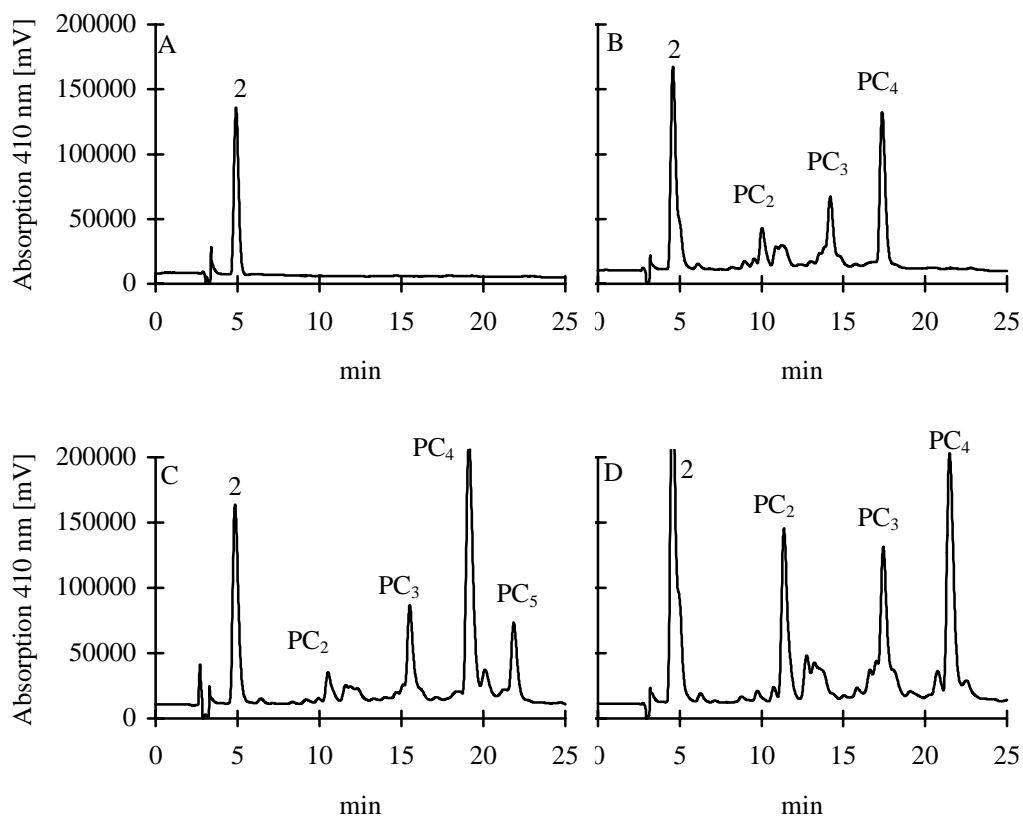


Abb. 6: HPLC-Chromatogramme thiolhaltiger Peptide aus Tomatenzellkulturen nach 24stündiger Inkubation in Cd-haltigem Medium (2 = GSH + γ -Glu-Cys). Kontrolle (A), 150 μ M Cd (B), 300 μ M Cd (C), 150 μ M Cd + 500 μ M GSH (D).

Die mit 150 μ M Cd + 500 μ M GSH angezogenen Zellen wiesen gegenüber dem Versuchsansatz mit Cd, aber ohne GSH, einen erhöhten PC-Gehalt auf. 300 μ M Cd führten im Vergleich zu 150 μ M zur Synthese längererkettiger PCs (Tab. 9).

Tab. 9: PC-Gehalte Cd-inkubierter Tomatenzellkulturen (entsprechend Abb. 6) (Extraktion 1, Kap. 2.5.1), [μ g/g FG], alle Angaben als GSH-Äquivalente.

	GSH + γ -Glu-Cys	PC ₂	PC ₃	PC ₄	PC ₅
A Kontrolle	18,0	0	0	0	0
B 150 μ M Cd	24,9	8,6	12,7	4,0	0
C 300 μ M Cd	25,4	5,0	17,0	42,8	13,6
D 150 μ M Cd + 500 μ M GSH	48,3	24,8	27,3	38,1	0

3 Ergebnisse

3.1 Beobachtungen zum Wachstum von *F. antipyretica* am natürlichen Standort

Die Pflanzen des Hauptprobenahmestandortes Wipper zeigten im Herbst/Winter starken Biomassezuwachs und zahlreiche junge Sproßtriebe. In den Sommermonaten war nur wenig grünes Pflanzenmaterial vorhanden, und die Pflanzen waren stark zurückgezogen. Im Juni - August war an den basalen Abschnitten von *F. antipyretica* eine Vielzahl von Sporenkapseln zu finden. An den Standorten Selke und Rappbode war im Sommer keine Veränderung der Population zu beobachten. Diese Pflanzen waren während des gesamten Jahres grün beblättert, wobei ebenfalls im Winter starker Neuzuwachs zu beobachten war. Sporenkapseln waren an Pflanzen dieser Standorte nicht zu finden.

3.2 Schwermetallakkumulation im aktiven Biomonitoring in der Elbe

Untersuchungen zur Schwermetallakkumulation von *F. antipyretica* wurden im aktiven Biomonitoring in der Elbe durchgeführt (Abb. 7 und 8). Das Moos wurde im Herbst 1994 sowie Herbst 1995 an verschiedenen Standorten der Elbe exponiert (Kap. 2.2.1) und die Akkumulation von Cd, Pb, Zn und Cu aus dem Wasser bestimmt (Anhang A: Tab. 2 - 4).

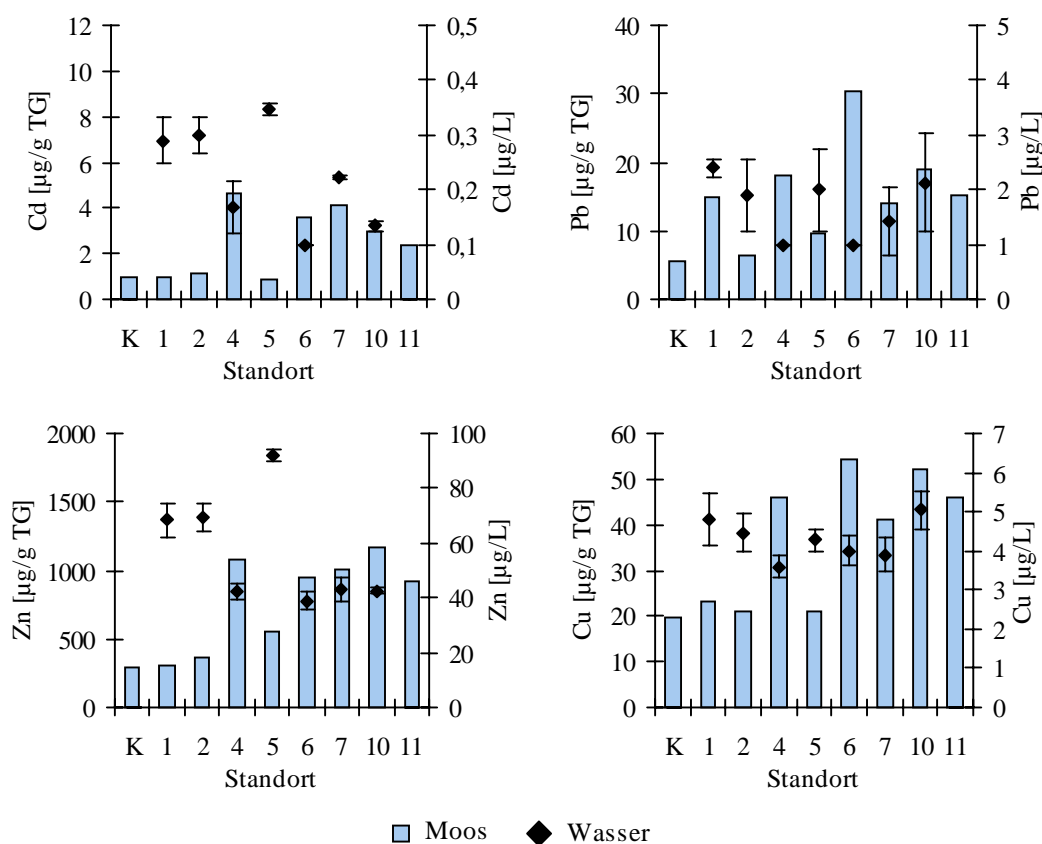


Abb. 7: Cd, Pb, Zn und Cu Gehalte der Moosproben nach Exposition an verschiedenen Standorten der Elbe 1994 sowie der Kontrolle (K) (linke Y-Achse) und der entsprechenden Wasserproben (rechte Y-Achse). Standorte: Kap. 2.2.1 und Anhang A: Tab. 1, Standort: 11 Wasser = n.g..

1994 war, außer an den Expositionsstellen 1, 2 und 5, eine deutliche Akkumulation von Cd (bis 3,7 $\mu\text{g/g}$ TG, Standort 4) zu messen. Ebenso wurden Pb und Zn in hohem Maße im Wassermoos angereichert (Pb bis 25,0 $\mu\text{g/g}$ TG Standort 6; Zn bis 880 $\mu\text{g/g}$ TG, Standort 10). Mit Ausnahme der Standorte 2 und 5 nahmen auch die Cu-Gehalte in allen Proben gegenüber der Kontrolle zu (bis 35,0 $\mu\text{g/g}$ TG, Standort 6).

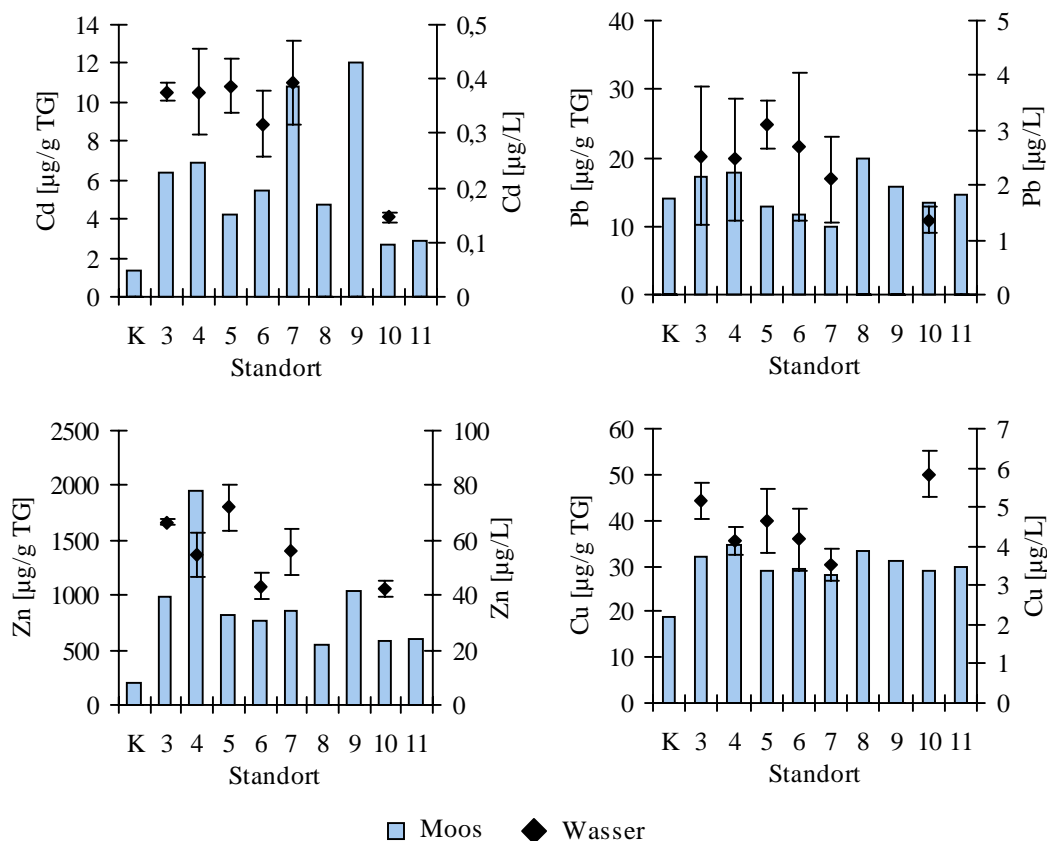


Abb. 8: Schwermetallgehalte der Moosproben nach Exposition an verschiedenen Standorten der Elbe 1995 sowie der Kontrolle (K) (linke Y-Achse) und der entsprechenden Wasserproben (rechte Y-Achse). Standorte: Kap. 2.2.1 und Anhang A: Tab. 1, Standort: 8, 9 und 11 Wasser = n.g..

1995 wurde gegenüber 1994 eine höhere Akkumulation von Cd (bis 9,5 $\mu\text{g/g}$ TG, Standort 9) ermittelt, wobei auch die Cd-Gehalte des Wassers vergleichsweise höher lagen. Ebenso wurden Zn und Cu an allen Standorten deutlich angereichert (Zn bis 1700 $\mu\text{g/g}$ TG, Standort 4; Cu bis 15,6 $\mu\text{g/g}$ TG, Standort 4). Dagegen waren für Pb nur Anreicherungen von maximal 6,1 $\mu\text{g/g}$ TG (Standort 8) zu messen. Wie im Jahre 1994 wurde auch 1995 am Standort 4 im Vergleich zu Standort 5 eine höhere Akkumulation aller Metalle festgestellt, obwohl aufgrund der Gewässerdaten (GEWÄSSERGÜTEBERICHT, 1994 u. 1995) von einer höheren Belastung des Standortes 5 ausgegangen werden muß.

3.2.1 Korrelation der Schwermetallgehalte der Moos- und Wasserproben

Für die Schwermetallgehalte der Moos- und Wasserproben ergaben sich die in Tab. 10 dargestellten Korrelationskoeffizienten. Lediglich die Gehalte an Cd und Zn korrelierten 1994; 1995 war keine

signifikante Korrelation nachweisbar.

Tab. 10: Korrelationskoeffizienten der Elementgehalte der Moosproben zu denen des Wassers, 1994: n = 7; 1995: n = 6, * p = 0,05.

Jahr	Cd	Pb	Zn	Cu
1994	0,7906*	0,5570	0,7958*	0,2604
1995	0,6622	0,0975	0,1486	0,0223

Tab. 11 gibt die Korrelationskoeffizienten der Schwermetallgehalte in den Moosproben und im Wasser der Exposition Herbst 1994 und Herbst 1995 an.

Tab. 11: Korrelationskoeffizienten der Schwermetallgehalte im Moos und Wasser, Exposition 1994 Wasser: n = 7; Moos: n = 8 und 1995 Wasser: n = 6; Moos n = 9, * p = 0,05; ** p = 0,01; *** p = 0,001.

Proben	Cd/Pb	Cd/Zn	Cd/Cu	Pb/Zn	Pb/Cu	Cu/Zn
<u>1994</u>						
Wasser	0,5925	0,9168**	0,1857	0,6145	0,8810**	0,2893
Moos	0,5924	0,8706**	0,8214*	0,5660	0,8027*	0,9119**
<u>1995</u>						
Wasser	0,7648	0,7043	0,7175	0,6426	0,4182	0,0849
Moos	0,1296	0,3778	0,0529	0,2567	0,9132***	0,5776

1994 war im Wasser eine signifikante Korrelation für die Elemente Cd/Zn und Pb/Cu und im Moos für die Elemente Cd/Zn, Cd/Cu, Pb/Cu und Cu/Zn nachweisbar. 1995 korrelierten lediglich die Gehalte an Pb und Cu im Moos.

3.2.2 Biologische Varianz der exponierten Proben

Zur Bestimmung der biologischen Varianz der Schwermetallakkumulation des exponierten Pflanzenmaterials wurden am Standort 4 drei Proben ausgebracht (Tab. 12). Die Varianz lag für alle Elemente < 10 %.

Tab. 12: Schwermetallgehalte von drei parallel am Standort 4 exponierten Proben, [$\mu\text{g/g}$ TG].

Probe	Cd	Pb	Zn	Cu
4a	5,0	18,4	1163	47,5
4b	4,2	18,8	947	46,9
4c	4,5	17,2	1135	42,9
Mittel	4,6	18,1	1082	45,8
SD	0,3	0,7	96	2,0
SD %	7,5	3,8	8,8	4,4

3.3 Vitalität von *F. antipyretica* unter Cadmiumbelastung

Als Parameter für die Vitalität des Pflanzenmaterials wurde während 10tägiger Inkubation in 100 μM Cd eine Bestimmung des Chlorophyll a/b-Verhältnisses, der Chlorophyllgehalte sowie des Chlorophyllabbaus durchgeführt (Abb. 9 -11, Anhang A: Tab. 7 und 8) (Kap. 2.3.3).

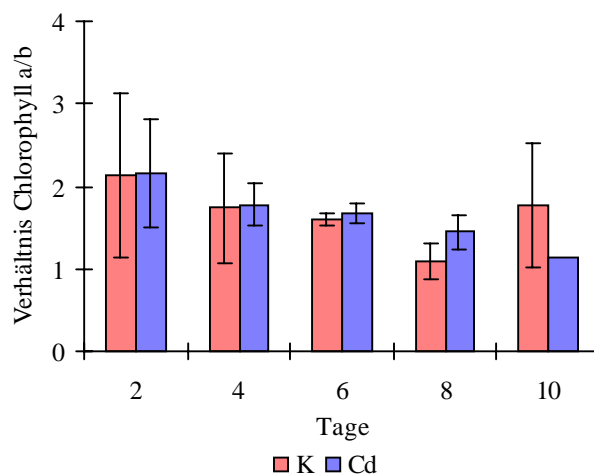


Abb. 9: Chlorophyll a/b-Verhältnis in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit 100 μM Cd, n = 3, 10 Tage Cd: n = 2.

Sowohl in der Kontrolle als auch in den Cd-belasteten Proben kam es innerhalb von 10 Tagen zu einer Abnahme des Chlorophyll a/b-Verhältnisses (Abb. 9). Ein signifikanter Einfluß des Cd war nicht feststellbar. Lediglich am 10. Tag lag dieser Wert in den Cd-belasteten Proben 36,5 % unter dem der Kontrolle. Die höchsten Werte wurden nach 2 Tagen in den Kontrollen mit $2,14 \pm 1,00$ und den Cd inkubierten Proben mit $2,16 \pm 0,65$ gemessen. Am 8. Tag betrug das Chlorophyll a/b-Verhältnis nur noch $1,10 \pm 0,21$ in der Kontrolle und am 10. Tag $1,13$ (n = 2) in den Cd-belasteten Proben. Die mittleren Gehalte an Chlorophyll a und b (Abb. 10) der Cd-belasteten Proben lagen mit $2,66 \pm 1,01$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ TG Chlorophyll a und $1,75 \pm 0,71$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ TG Chlorophyll b um 34,2 % unter denen der Kontrollen mit $3,04 \pm 0,55$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ TG Chlorophyll a und $2,13 \pm 0,36$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ TG Chlorophyll b. Aufgrund der hohen Standardabweichung war dieser Unterschied nicht signifikant.

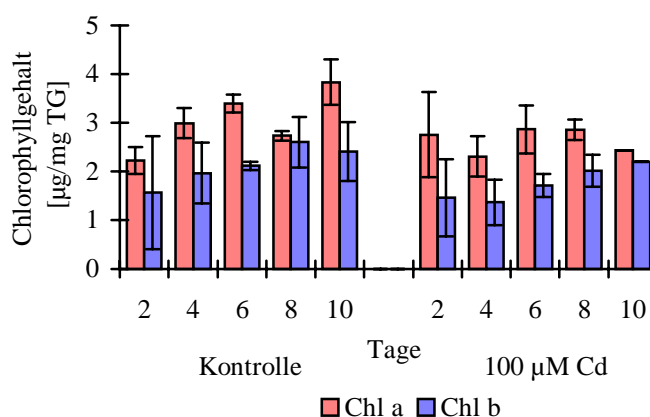


Abb. 10: Gehalte an Chlorophyll a und Chlorophyll b in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit 100 μM Cd und in den Kontrolle, n = 3, 10 Tage Cd: n = 2.

Das Verhältnis von E_{665} zu E_{665a} nach Ansäuerung der Proben als Maß für den Chlorophyll-Abbau ist in Abb. 11 dargestellt. Auch dieser Parameter zeigte mit $1,05 \pm 0,02$ in den Kontrollen und $1,07 \pm 0,04$ in den Cd-belasteten Proben über 10 Tage keine signifikante Veränderung unter Cd-Belastung.

Anhand der untersuchten Parameter war innerhalb von 10 Tagen kein signifikanter Einfluß von $100 \mu\text{M}$ Cd auf die Vitalität von *F. antipyretica* feststellbar.

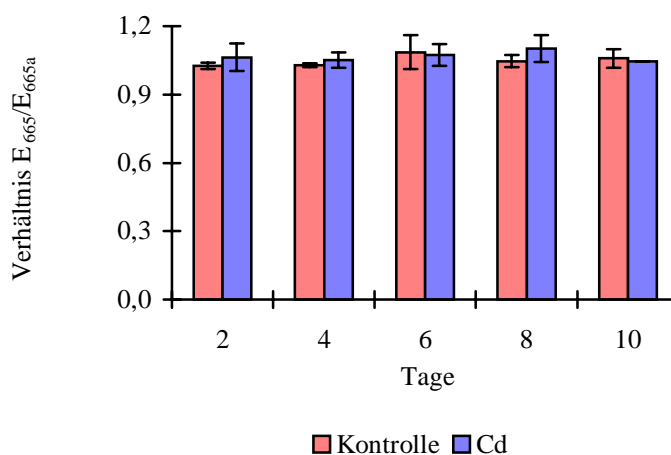


Abb. 11: Verhältnis von E_{665} zu E_{665a} in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit $100 \mu\text{M}$ Cd, $n = 3$, 10 Tage Cd: $n = 2$.

3.4 Intra- und extrazelluläre Aufnahme von Cadmium

In einem 10tägigen Versuch unter $100 \mu\text{M}$ Cd (entsprechend $1,12 \text{ mg}/100 \text{ mL}$) wurde in *F. antipyretica* der Anteil des extra- und intrazellulär gebundenen Cd durch Waschen des Pflanzenmaterials mit NiCl_2 (Kap. 2.3.4 und Anhang A: Tab. 9) bestimmt. Im folgenden wird als "extrazellulär" die Summe der durch Ni austauschbaren Cd-Menge und als "intrazellulär" der im Pflanzenmaterial verbleibende Rest-Cd-Gehalt benannt. Die Wiederfindung des Gesamt-Cd wurde aus der Summe des Cd der Waschlösungen, des Pflanzenmaterials und des Mediums ermittelt. Dieser Wert schwankte zwischen 100,1 und 120,8 %. In der für 10 Tage in Cd-freiem Medium kultivierten Kontrolle war weder "extra"- noch "intrazelluläres" Cd nachweisbar.

Der Anteil des "extrazellulär" gebundenen Cd am Gesamt-Cd des Mediums nahm in 10 Tagen von 71,2 auf 48,8 % ab (Abb. 12). Vom 3. - 7. Tag lag dieser Wert bei ca. 58 %. Der Anteil an "intrazellulärem" Cd nahm von 23,2 auf 49,3 % des Gesamt-Cd bis zum 9. Tag zu (Abb. 13). Gleichzeitig sank der Cd-Gehalt des Mediums von 17,9 auf 6,8 % des Gesamt-Cd. Die Berechnung der Menge an "extrazellulär" gebundenem Cd pro mg TG ergab über den gesamten Zeitraum einen Mittelwert von $3,75 \pm 0,65 \mu\text{g}/\text{mg}$ TG. Im Vorversuch betrug nach 5tägiger Inkubation in $100 \mu\text{M}$ Cd die Menge an "extrazellulärem" Cd $4,1 \pm 0,49 \mu\text{g}/\text{mg}$ TG.

Die pro mg TG "intrazellulär" aufgenommene Cd-Menge lag im Mittel bei $2,38 \pm 0,72 \mu\text{g}/\text{mg}$ TG. Die Gesamtmenge an aufgenommenem Cd ("intra"- + "extrazellulär") betrug im Mittel $6,13 \pm 1,1 \mu\text{g}/\text{mg}$ TG. Diese Werte korrelierten mit der Einwaage an Pflanzenmaterial (Abb. 14).

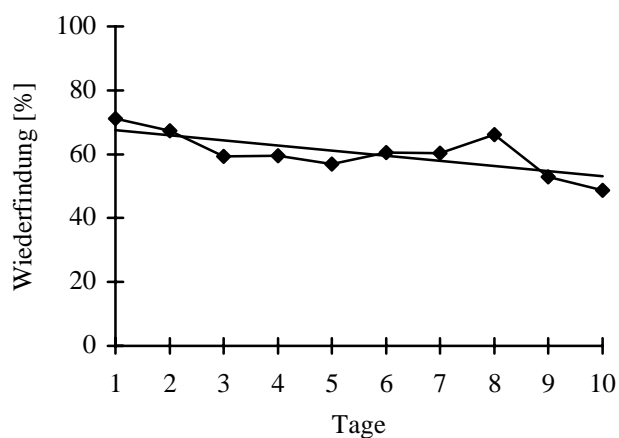


Abb. 12: Wiederfindung an "extrazellulärem" Cd in *F. antipyretica* als % der im Medium enthaltenen Cd-Menge über einen Zeitraum von 10 Tagen, n = 1.

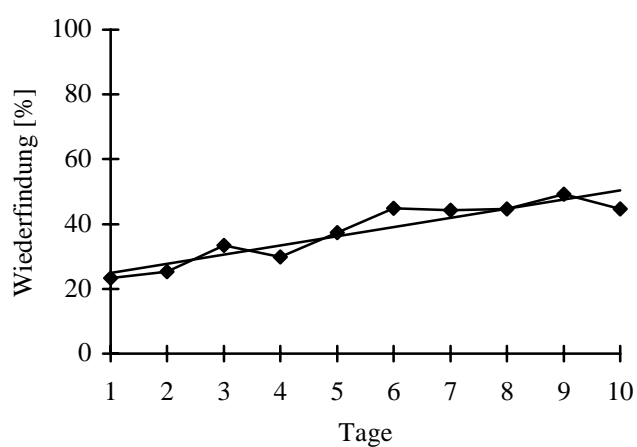


Abb. 13: Wiederfindung an "intrazellulärem" Cd in *F. antipyretica* als % der im Medium enthaltenen Cd-Menge über einen Zeitraum von 10 Tagen, n = 1.

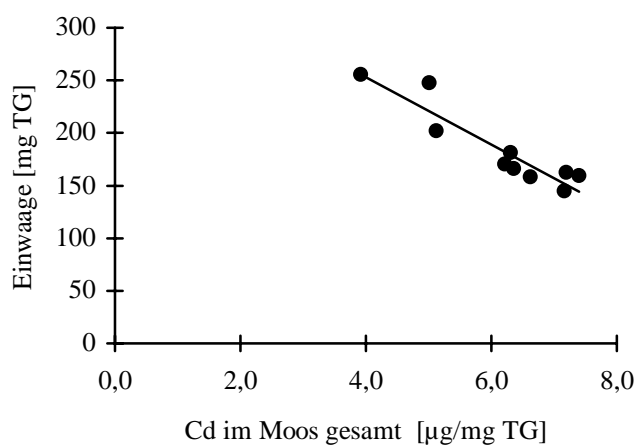


Abb. 14: Korrelationsdiagramm der pro mg Pflanzenmaterial aufgenommenen Cd-Menge ("intra"- + "extrazellulär") und der Einwaage an Pflanzenmaterial, n = 1, r = 0,9195, *** p = 0,001.

3.5 Phytochelatinsynthese in *F. antipyretica* unter Schwermetallbelastung

F. antipyretica akkumulierte im aktiven Biomonitoring in der Elbe signifikante Mengen an Cd, Pb, Zn und Cu (Kap. 3.2, Abb. 7 und 8). Auch an natürlichen Standorten des Harzes konnte durch unsere Arbeitsgruppe eine hohe Anreicherung dieser Elemente im Moose nachgewiesen werden (SIEBERT et al., 1996). Im Laborversuch (Kap. 3.4) betrug die mittlere Cd-Aufnahme in Gegenwart von 100 μM Cd (1,12 mg gesamt) 6,13 $\mu\text{g}/\text{mg}$ TG ("intra"- + "extrazellulär").

Untersuchungen zur physiologischen Reaktion von *F. antipyretica* auf Schwermetallstress erfolgten in Laborexperimenten. Die hierfür eingesetzten Schwermetallkonzentrationen der Kulturmedien lagen um den Faktor 1000 - 200 000 (100 μM = 11 200 $\mu\text{g}/\text{L}$) über denen natürlicher aquatischer Systeme wie der Elbe (max. 0,4 $\mu\text{g}/\text{L}$) und Fließgewässern des Harzes. Diese hohen Konzentrationen waren notwendig, um unter Laborbedingungen eine signifikante Reaktion von *F. antipyretica* auf Schwermetallstress zu erhalten.

3.5.1 Induktion von Phytochelatinen in *F. antipyretica*

Nach mehrtägiger Inkubation in Medium mit 50 - 200 μM Cd konnte in *F. antipyretica* die Synthese von PCs nachgewiesen werden. Typische HPLC-Elutionsprofile unbelasteter und mit Cd inkubierter Proben von *F. antipyretica* sind in Abb. 15 dargestellt. Grundlegende qualitative Veränderungen der HPLC-Profile waren in den folgenden Versuchen nicht feststellbar. Lediglich die Quantität einzelner Peaks änderte sich. PC₂ und PC_{5(?)} (Identifizierung der PCs siehe Kap. 3.5.2, Abb. 16) waren nicht in allen Proben nachweisbar. Zur Retentionszeit des PC_{5(?)} trat nach längerer Cd-Belastung ein Doppelpeak auf (Abb. 15, Peak 8), so daß möglicherweise zwei verschiedene thiolhaltige Verbindungen detektiert wurden. In die Quantifizierung von PC_{5(?)} wurde im folgenden die Gesamtpeakfläche einbezogen.

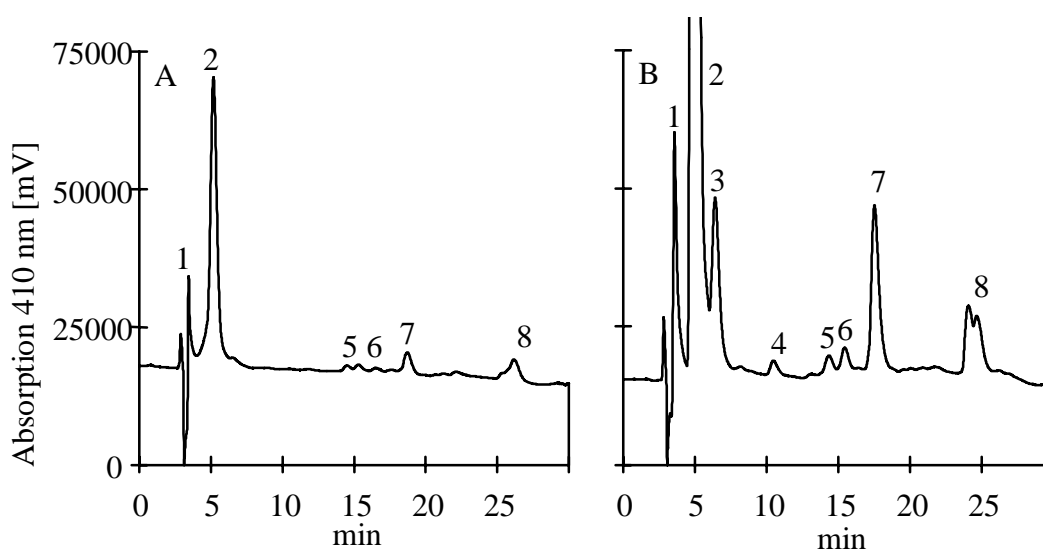


Abb. 15: HPLC-Chromatogramme thiolhaltiger Verbindungen in *F. antipyretica*; A: Kontrolle; B: nach 28-tägiger Inkubation in Medium mit 100 μM Cd. 1: Cys, 2: GSH + γ -Glu-Cys, 3: nicht identifiziert (Kap. 3.5.5), 4: PC₂, 5: PC₃, 6: nicht identifiziert, 7: PC₄, 8: PC_{5(?)} (Kap. 3.5.2).

3.5.2 Identifizierung der Phytochelatine aus *F. antipyretica*

Aufgrund der geringen PC-Mengen in *F. antipyretica* erfolgte die Identifizierung einzelner PCs durch Standardaddition von PCs aus Tomatenzellkulturen (Kap. 2.7) (Abb. 16).

Die für die einzelnen PCs aus Tomatenzellkulturen ermittelten Retentionszeiten (Kap. 2.7.2) entsprachen denen thiolhaltiger Verbindungen aus *F. antipyretica*. Durch technische Veränderungen der HPLC-Pumpe bedingt, zeigen die in Abb. 16 dargestellten Chromatogramme abweichende Retentionszeiten gegenüber Abb. 15 (Kap. 3.5.1) und Abb. 6 (Kap. 2.7.2).

Da nur geringe Mengen an PC₂ und PC₃ in *F. antipyretica* nachweisbar waren, wurde ihre Position erst durch Standardaddition von PCs aus Tomatenzellen deutlich markiert (Abb. 16). Aus der Vielzahl der durchgeführten Messungen war jedoch ersichtlich, daß die Retentionszeiten der PCs aus *F. antipyretica* denen der PCs aus Tomatenzellkulturen entsprachen.

Ein weiteres thiolhaltiges Peptid in *F. antipyretica* mit einer Retentionszeit von 19 - 24 min konnte nicht über Standardaddition von PCs aus Tomatenzellkulturen identifiziert werden. Aufgrund der Übereinstimmung der Retentionszeit mit PC₅ aus Tomatenzellkulturen (Kap. 2.7.2) wird davon ausgegangen, daß es sich hierbei um PC₅ handelt. Da dieses bisher nicht eindeutig bestätigt werden konnte, wird diese Substanz im folgenden als PC_{5(?)} bezeichnet.

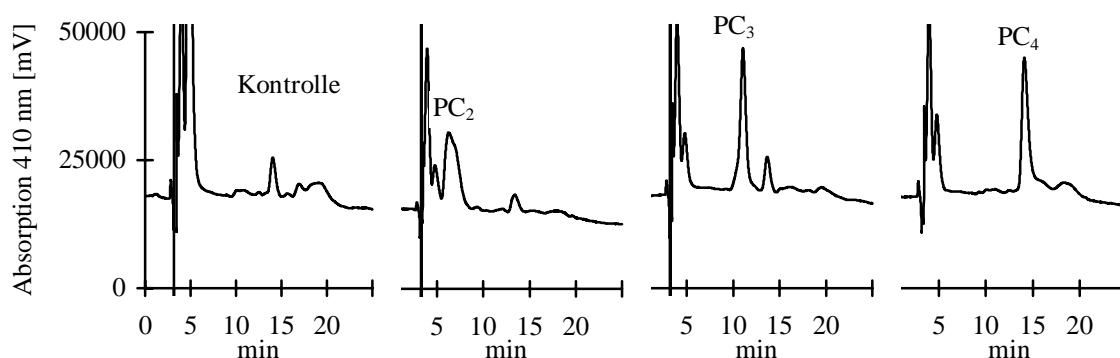


Abb. 16: HPLC-Chromatogramme der Standardaddition von PCs aus Tomatenzellkulturen zu einem Extrakt von *F. antipyretica*.

3.5.3 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Phytochelatinsynthese

Die Induktion von Phytochelatinen in *F. antipyretica* wurde unter Cd-Konzentration von 0, 50, 100 und 200 μM über einen Zeitraum von 35 Tagen untersucht (Abb. 17; Anhang A: Tab. 10). In Abhängigkeit von der Cd-Konzentration und der Inkubationsdauer war ein Anstieg aller PC-Gehalte (außer PC₂) feststellbar. PC₂ konnte aufgrund der geringen Mengen nicht quantifiziert werden.

PC₃ war, mit Ausnahme der Kontrolle am 14., 21. und 28. Tag, in allen Proben enthalten. Bereits nach 7 Tagen nahm unter 100 μM Cd der Gehalt um 0,80 $\mu\text{g/g}$ FG und unter 200 μM Cd um 1,49 $\mu\text{g/g}$ FG gegenüber der Kontrolle zu. 50 μM Cd führten nach 14 Tagen zu einem Anstieg von 0,95 $\mu\text{g/g}$ FG. Unter 200 μM Cd nahm der Gehalt dieses PCs bis zum 21. Tag um 1,13 $\mu\text{g/g}$ FG

gegenüber dem 7. Tag ab, gefolgt von einer Zunahme um 0,37 - 0,52 µg/g FG. Unter 100 µM Cd war bis zum 28. Tag keine signifikante Erhöhung des PC₃-Gehaltes feststellbar. Nach 35 Tagen nahm in den Cd-belasteten Proben der PC₃-Gehalt um 0,46 µg/g FG (50 µM Cd), 0,23 µg/g FG (100 µM Cd) und 0,15 µg/g FG (200 µM Cd) gegenüber dem 28. Tag ab. Gegenüber PC₄ und PC_{5(?)} mit Konzentrationen von 0,61 - 10,34 µg/g FG bzw. 0,91 - 9,36 µg/g FG waren die PC₃-Gehalte mit 0 - 1,96 µg/g FG in allen Proben vergleichsweise gering.

PC₄ war in allen Kontrollen und Cd-belasteten Proben nachweisbar. Bis zum 28. Tag nahm der Gehalt dieses Peptides unter 50 µM Cd um 6,28 µg/g FG gegenüber der Kontrolle zu. Mit 9,73 µg/g FG wurde die größte Zunahme unter 100 µM Cd am 28. Tag gemessen. 200 µM Cd führten am selben Tag zu einem Anstieg um 6,13 µg/g FG. Nach 35 Tagen nahm unter 50 und 100 µM Cd der PC₄-Gehalt gegenüber dem 28. Tag um 0,76 bzw. 3,10 µg/g FG ab.

Auch PC_{5(?)} war in diesem Versuch in allen Cd-belasteten Proben und Kontrollen enthalten. Unter 50 µM Cd kam es bis zum 28. Tag zu einem Anstieg um 8,45 µg/g FG gegenüber der Kontrolle. Dagegen nahm unter 100 und 200 µM Cd der PC_{5(?)}-Gehalt nur bis zum 21. Tag zu (4,15 bzw. 0,44 µg/g FG gegenüber der Kontrolle).

Die höchsten Gehalte an PC₄ und PC_{5(?)} wurden unter 100 µM Cd nach 21 bzw. 28 Tagen gemessen sowie unter 50 µM Cd nach 28 Tagen. Eine Cd-Konzentration von 200 µM oder eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 35 Tage führte mit Ausnahme von PC₄, das unter 200 µM noch um 0,80 µg/g TG anstieg, zu keiner weiteren Zunahme der PC-Gehalte.

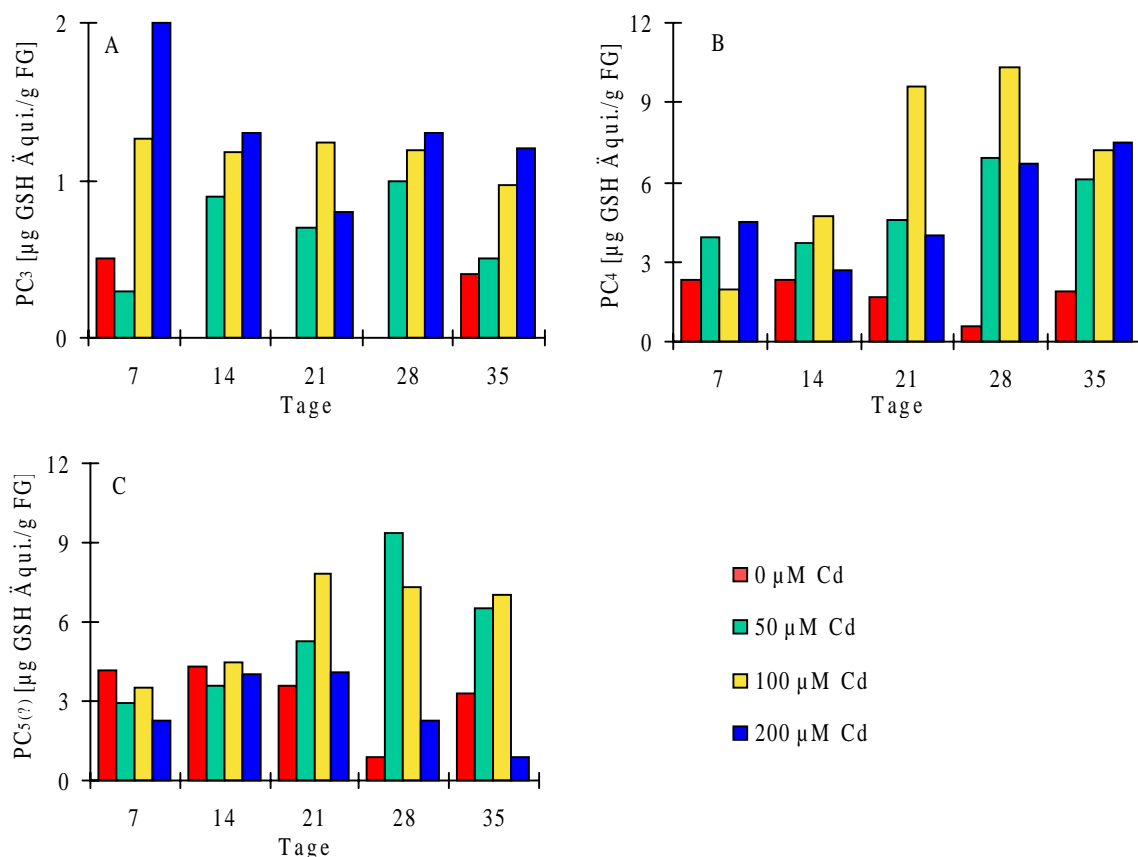


Abb. 17: PC-Gehalte in *F. antipyretica* in Abhängigkeit von der Cd-Konzentration und der Inkubationsdauer. A: PC₃; B: PC₄; C: PC_{5(?)}, Extraktion 1 (Kap. 2.5.1, Tab. 5), n = 1, die Ergebnisse waren in einem weiteren Versuch reproduzierbar.

Die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der PC-Synthese in *F. antipyretica* wurde in einem weiteren Versuch unter gleichen Bedingungen im wesentlichen bestätigt (nicht dargestellt). Während der dargestellte Versuch im Herbst 1994 mit Pflanzen aus der Wipper durchgeführt wurde, erfolgte die Durchführung dieses Versuches im Frühjahr 1994 mit Moosen aus der Selke. Auch hierbei wurde erst nach 21 Tagen eine signifikante positive Korrelation der PC₄-Gehalte zur Cd-Konzentration (50, 100 und 200 µM) des Mediums festgestellt. Die Korrelationskoeffizienten ergaben folgende Werte: 7 Tage: 0,252; 14 Tage: 0,356; 21 Tage: 0,997; 35 Tage: 0,978 (28 Tage, nicht gemessen). Da n = 3 werden keine Aussagen zur Signifikanz gemacht.

Für die dargestellten Untersuchungen wurden keine Korrelationskoeffizienten berechnet, da unter 200 µM bereits eine Abnahme der PC-Gehalte eintrat. Die Werte deuten jedoch ebenfalls nach 21 Tagen auf eine Korrelation der PC₄- und PC_{5(?)}-Gehalte zur Cd-Konzentration des Mediums hin.

3.5.4 Gehalte an Cystein und Glutathion + γ-Glutamyl-Cystein im Langzeitversuch

Unter den in Kap. 2.5.2 dargestellten Bedingungen eluierten die Peptide GSH + γ-Glu-Cys gemeinsamen (Kap. 3.5.1, Abb. 15, Peak 2). Diese wurden als Summe quantifiziert (Abb. 18, Anhang A: Tab. 11). Die Bestimmung der Cys-Gehalte war unter diesen Bedingungen semiquantitativ, da Cys mit dem Ausschlußvolumen eluiert (Kap. 3.5.1, Abb. 15, Peak 1). Mit einem pH-Wert < 2,0 (Kap. 2.5.1) eluiert auch die Extraktionslösung der Proben mit dem Ausschlußvolumen, wodurch es zur Beeinträchtigung der Nachsäulenderivatisierung kommt, die bei pH 8,0 durchgeführt wurde (Kap. 2.5.2).

Eine Zunahme der Cys-Gehalte mit steigender Cd-Konzentration war nach 7 - 21 Tagen in allen mit Cd inkubierten Proben zu beobachten (Abb. 16, Anhang A: Tab. 11). Nach 28 Tagen nahm der Cys-Gehalt mit zunehmender Cd-Konzentration dagegen ab. Mit Ausnahme der Kontrolle enthielten nach 35 Tagen alle Proben vergleichbare Mengen an Cys.

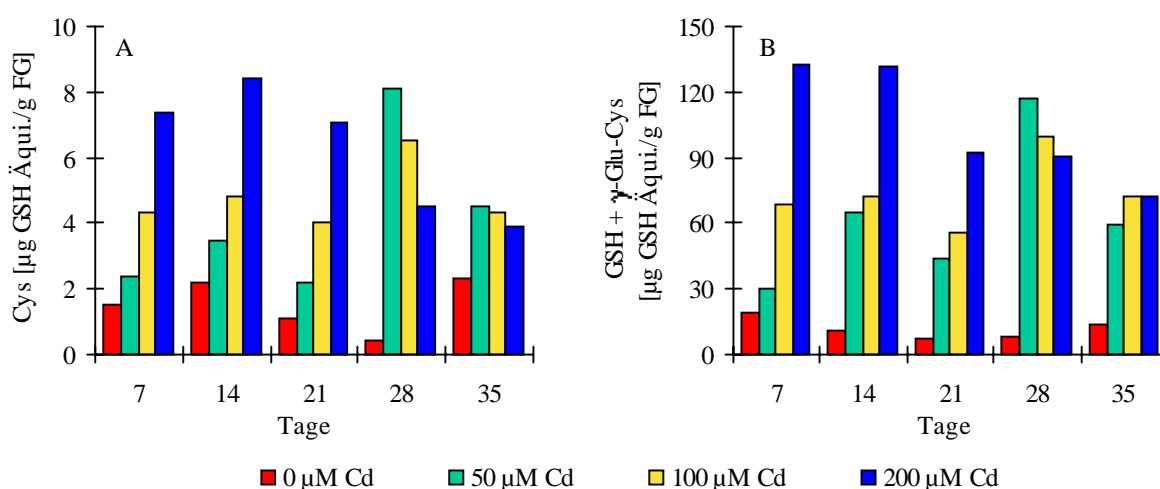


Abb. 18: Cys-Gehalte (A) und Summe der Gehalte an GSH + γ-Glu-Cys (B) in *F. antipyretica* in Abhängigkeit von der Cd-Konzentration und der Inkubationsdauer, Extraktion 1 (Kap. 2.5.1, Tab. 5), n = 1, die Ergebnisse waren in einem weiteren Versuch reproduzierbar.

Die Zunahme der PC-Vorstufen GSH + γ -Glu-Cys (als Summe, Kap. 2.5.2) zeigte während des gesamten Versuches einen ähnlichen Verlauf wie die Cys-Gehalte, wobei jedoch die Konzentrationen um den Faktor 10 - 20 höher lagen (Abb. 18). Bis zum 21. Tag war eine Zunahme in Abhängigkeit von der Cd-Konzentration feststellbar. Die Höchstwerte wurden unter 50 und 100 μ M Cd am 28. Tag mit 116,9 bzw. 100,0 μ g/g FG erreicht. 200 μ M Cd führten bereits am 7. Tag zu einem maximalen Gehalt von 133,0 μ g/g FG.

3.5.5 Nachweis einer unbekanntes thiolhaltigen Verbindung unter Cadmumeinfluß

In den in Abb. 17 (Kap. 3.5.3) beschriebenen Proben wurde eine weitere thiolhaltige Verbindung (Kap. 3.5.1, Abb. 15, Peak 3) detektiert. Diese Substanz war erst nach 14tägiger Inkubation in Gegenwart von Cd nachweisbar (Abb. 19, Anhang A: Tab. 12).

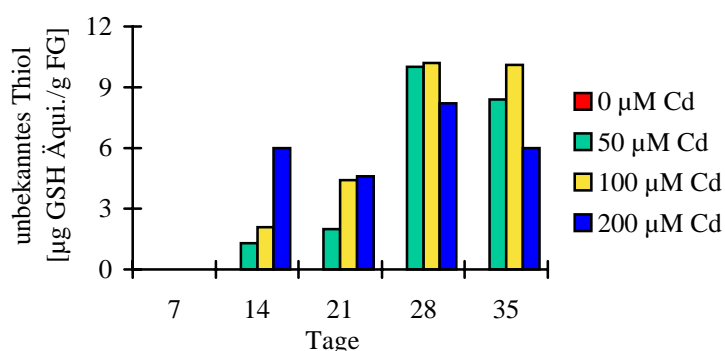


Abb. 19: Gehalte einer nicht identifizierten thiolhaltigen Verbindung in *F. antipyretica* in Abhängigkeit von der Cd-Konzentration und der Inkubationsdauer, Extraktion 1 (Kap. 2.5.1, Tab. 5), $n = 1$, die Ergebnisse waren in einem weiteren Versuch reproduzierbar.

Nach 28 Tagen wurden unter 50 und 100 μ M Cd 10,03 bzw. 10,15 μ g/g FG dieser Substanz gemessen. Gegenüber dem 21. Tag kam es am 28. Tag zu einer Zunahme um 8,03 μ g/g FG (50 μ M Cd), 5,76 μ g/g FG (100 μ M Cd) und 3,55 μ g/g FG (200 μ M Cd). Der Gehalt dieser Verbindung war ebenso wie die PC-Gehalte (Kap. 3.5.3) von der Cd-Konzentration und der Inkubationszeit abhängig. Nach 35 Tagen nahm der Gehalt dieser Substanz unter 200 und 50 μ M Cd ab.

3.5.6 Untersuchungen zur Identifizierung der unbekanntes thiolhaltigen Verbindung

Für die in Kap. 3.5.5 beschriebene Cd-induzierbare thiolhaltige Verbindung wurden erste Untersuchungen zur Identifizierung durchgeführt. Die Massenspektren der entsprechenden HPLC-Fractionen zeigten ein Signal von $M + H^+$ 407 (Anhang B, Abb. 6). Aufgrund ungenügender Reinheit der Proben (insbesondere leichte Verunreinigungen mit GSH) konnte diese Molmasse nicht eindeutig dieser Verbindung zugeordnet werden. Die Migrationszeit dieser Substanz in der Kapillarelektrophorese wich von der des GSH und γ -Glu-Cys ab (Tab. 13).

Tab. 13: Migrationszeit thiolhaltiger Verbindungen in der Kapillarelektrophorese [min].

GSH	γ -Glu-Cys	unbek. Verbindung
3,18	3,33	3,52

Aminosäureanalysen ergaben die für PCs der GSH-Familie typischen Aminosäuren Glu, Cys und Gly. Die Quantifizierung ergab jedoch ein Verhältnis von Glu : Cys : Gly von 4,5 : 1 : 0,6. Entsprechende Mengen weiterer Aminosäuren, die auf das Vorhandensein von hm-GSH (Ser) oder h-GSH (β -Ala) hinweisen waren nicht nachweisbar.

3.5.7 Induktion von Phytochelatinen im Kurzzeitversuch

Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurden Moosproben unter Konzentrationen von 0, 50 und 100 μ M Cd inkubiert und daraus PC₄ quantifiziert (Abb. 20, Anhang A: Tab. 13).

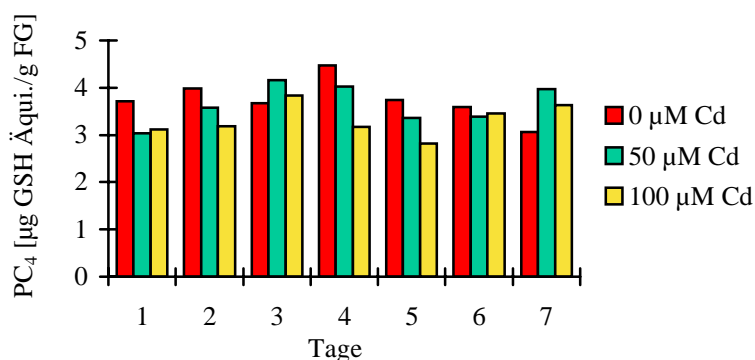


Abb. 20: Gehalte an PC₄ in *F. antipyretica* während 7tägiger Inkubation in Medium mit 50 und 100 μ M Cd, Extraktion 1 (Kap. 2.5.1, Tab. 5), n = 1, die Ergebnisse waren in einem weiteren Versuch reproduzierbar.

Der PC₄-Gehalt nahm in Gegenwart von 50 und 100 μ M Cd gegenüber der Kontrolle ab (bis -1,3 μ g/g FG, 100 μ M Cd, 4. Tag) und lag erst am 7. Tag um 0,92 μ g/g FG (50 μ M Cd) bzw. 0,57 μ g/g FG (100 μ M Cd) über der Kontrolle. Während des 7tägigen Versuches schwankte der PC₄-Gehalt unter allen Cd-Konzentrationen sowie in der Kontrolle. Die HPLC-Chromatogramme (Abb. 21) belegen die Abnahme thiolhaltiger Verbindungen in *F. antipyretica* am 1. Tag nach Cd-Zugabe.

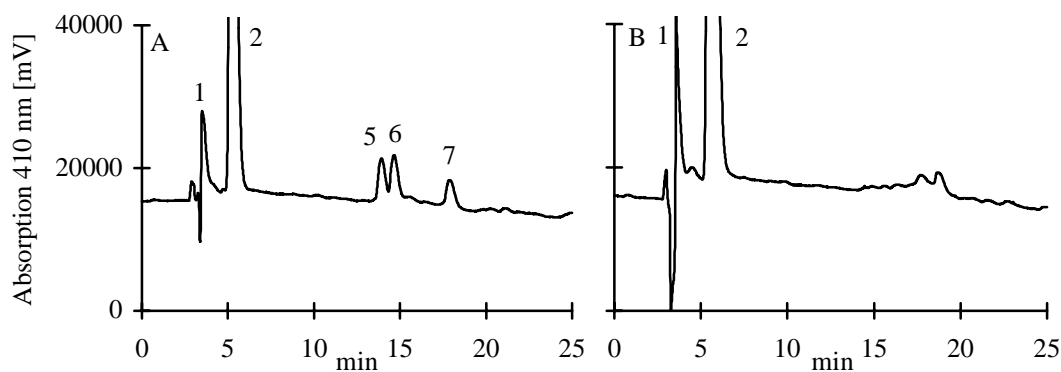


Abb. 21: HPLC-Chromatogramme thiolhaltiger Verbindungen in *F. antipyretica*. A: Kontrolle, B: 1. Tag nach Zugabe von 100 μ M Cd.

3.5.8 Glutathion + γ -Glutamyl-Cystein und PC₄ unter Einfluß geringer Cadmiumkonzentrationen

Während einer Inkubationszeit von 12 Tagen wurde der Einfluß von 5, 10, 20 und 50 μM Cd auf den Gehalt der PC-Vorstufen GSH + γ -Glu-Cys (als Summe, Kap. 2.5.2) und PC₄ untersucht (Abb. 22, Anhang A: Tab. 14).

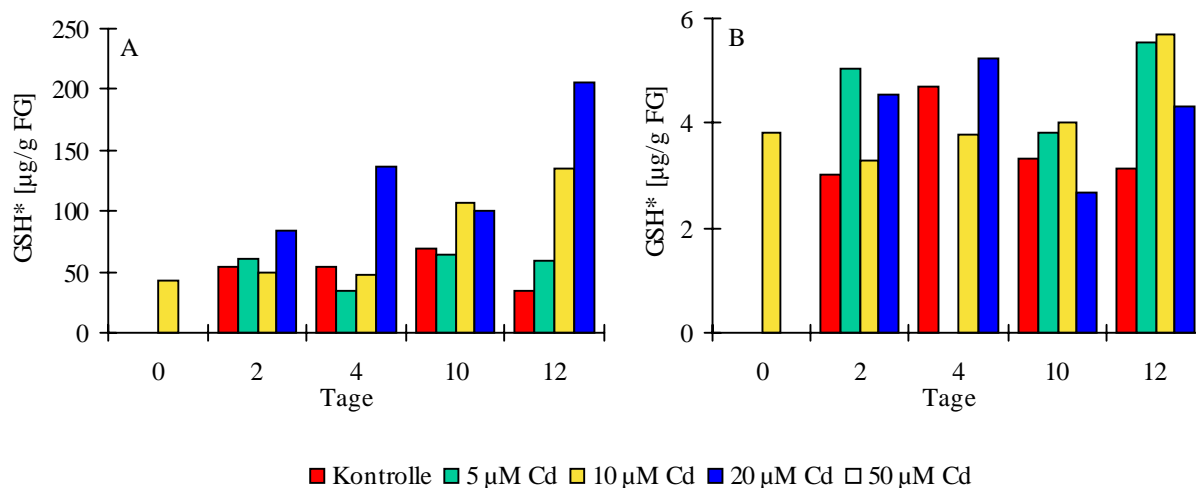


Abb. 22: Gehalte GSH + γ -Glu-Cys (A) und PC₄ (B) in *F. antipyretica* in Abhängigkeit von der Cd-Konzentration und der Inkubationsdauer, 4. Tag 10 μM Cd: n.g., Extraktion 1 (Kap. 2.5.1, Tab. 5), n = 1.

Nach 2 Tagen nahm unter 50 μM Cd der Gehalt der PC-Vorstufen um 41,0 $\mu\text{g/g}$ FG zu. Das Maximum wurde mit 164,0 $\mu\text{g/g}$ FG am 12. Tag erreicht. Unter 20 μM war nach 2 Tagen ein Anstieg um 7,1 und nach 12 Tagen um 93,3 $\mu\text{g/g}$ FG feststellbar. 10 μM Cd führten dagegen nur zu einem Anstieg um 18,8 $\mu\text{g/g}$ FG am 2. Tag und 22,4 $\mu\text{g/g}$ FG am 10. Tag. In Gegenwart von 5 μM Cd nahm der Gehalt dieser Substanzen gegenüber der Kontrolle bis zum 10. Tag um 26,3 $\mu\text{g/g}$ FG zu.

PC₄ zeigte keine Abhängigkeit von der Cd-Konzentration. Die maximalen Zunahmen gegenüber der Kontrolle betragen: 8,6 $\mu\text{g/g}$ FG (5 μM Cd, 4. Tag), 1,7 $\mu\text{g/g}$ FG (10 μM Cd, 12. Tag) 1,9 $\mu\text{g/g}$ FG (20 μM Cd, 12. Tag) und 1,4 $\mu\text{g/g}$ FG (50 μM Cd, 4. Tag).

3.5.9 Induktion von Phytochelatinen durch unterschiedliche Schwermetalle

Neben Cd wurde auch die Induktion von PCs in *F. antipyretica* durch Pb, Zn und Cu untersucht. Die HPLC-Chromatogramme der Proben nach 14tägiger Inkubation in Medien mit je 200 μM dieser Metalle sind in Abb. 23 dargestellt.

Lediglich Cd führte in *F. antipyretica* zu einer meßbaren Induktion von PCs. Unter Einfluß von Pb war keine signifikante Veränderung des HPLC-Profiles gegenüber der Kontrolle zu erkennen. Zn und Cu führten im Vergleich zur Kontrolle zu einer Abnahme von PC₃, PC₄ und Peak 6.

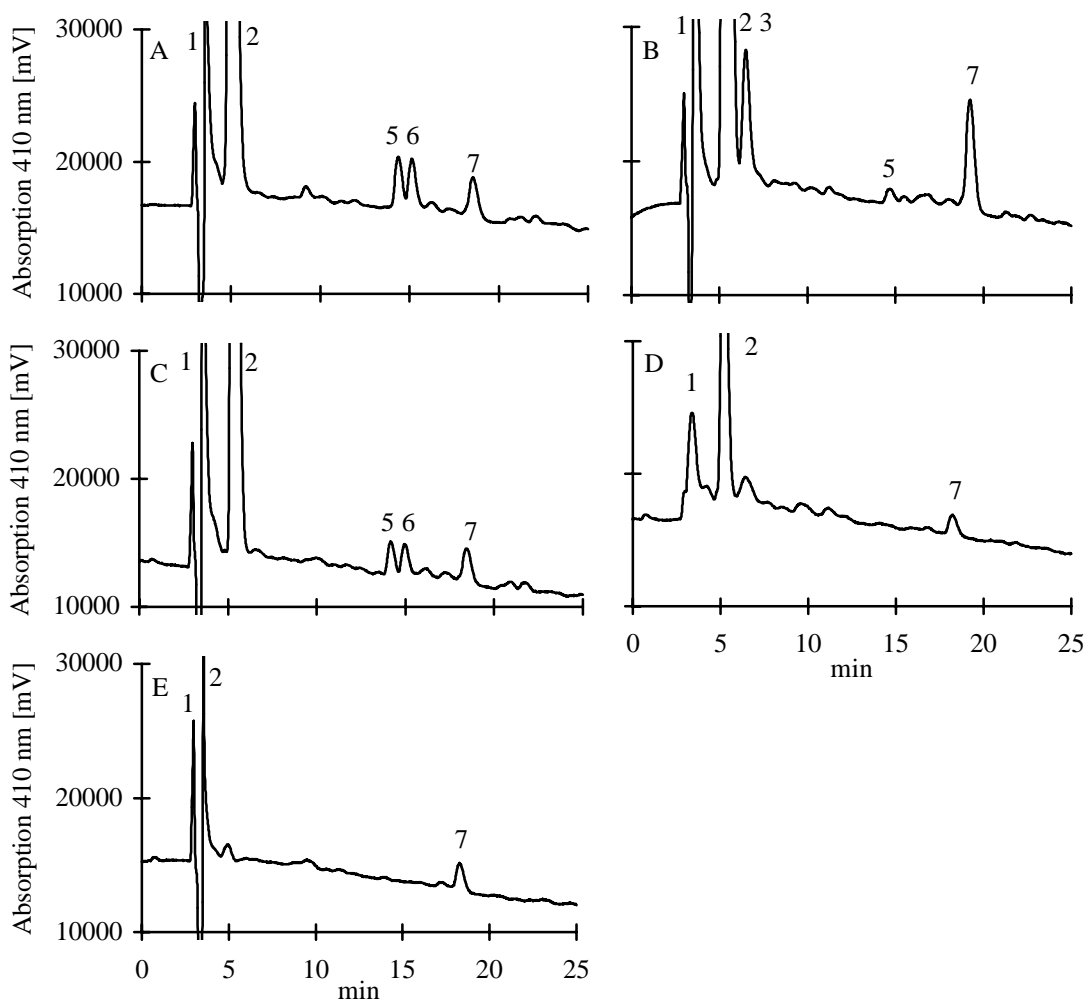


Abb. 23: HPLC-Chromatogramme thiolhaltiger Verbindungen in *F. antipyretica* nach 14tägiger Inkubation in Medium mit je 200 μM Cd (B), Pb (C), Zn (D), Cu (E) sowie der Kontrolle (A). 1: Cys, 2: GSH + γ -Glu-Cys, 3: nicht identifiziert (Kap. 3.5.5), 5: PC₃, 6: nicht identifiziert, 7: PC₄ (nach BECH-OTSCHIR, 1995).

3.6 Gesamtthiolgehalt und Phytochelatinvorstufen unter Schwermetallbelastung

In *F. antipyretica* wurden Veränderungen des GSTH-Pools (Gesamtthiolpool) sowie des GSH-Pools (Glutathionpool) unter Einfluß von Schwermetallen untersucht. Die Quantifizierung des GSH-Gehaltes erfolgte über einen enzymatischen Test nach ANDERSON (1985) (Kap. 2.5.4). Da das in diesem Test verwendete Enzym GSSG-Reduktase auch GSH-Homologe wie hm-GSH als Substrat erkennt (KLAPHECK et al., 1992), wurden weitere Methoden zur Identifizierung eingesetzt. Mittels Massenspektrometrie wurde eine Masse von 308 entsprechend der Molmasse (+ H⁺) von GSH aus den HPLC-Fractionen ermittelt (Anhang B, Abb. 1). Kapillarelektrophoretische Messungen (nicht dargestellt) bestätigten die Migrationszeit von GSH.

Die dargestellten GSH-Gehalte beziehen sich auf das extrahierbare Glutathion (als GSH angegeben). Soweit nicht anders angegeben wurde Extraktion 3 (Kap. 2.5.1, Tab. 5) durchgeführt. Die Unterschiede der GSH-Gehalte zwischen Kap. 3.6.2, 3.6.5, 3.6.7, 3.6.8, und 3.6.9 sind auf die Variabilität des Pflanzenmaterials zurückzuführen. In Kap. 3.6.4, 3.6.5 und 3.6.8 betrug das

Verhältnis von Pflanzenmaterial zu Extraktionsmittel 1 : 5 (BECH-OTSCHIR, 1995).

Der verwendete enzymatische Test sowie die reduzierenden Bedingungen während der Extraktion erlaubten keine Differenzierung der reduzierten und oxidierten Form des Glutathions. Im folgenden wurde daher eine weitere Methode eingeführt (Kap. 2.5.5), um erste Messungen zum Oxidationsstatus von Glutathion in *F. antipyretica* unter Cd-Einfluß durchzuführen (Kap. 3.6.12).

3.6.1 Einfluß von Cadmium auf den Gesamtthiolgehalt

Unter 100 μM Cd stieg der GSTH-Gehalt in *F. antipyretica* deutlich an, wobei während der Versuchsdauer von 10 Tagen ein bimodaler Verlauf beobachtet wurde (Abb. 24, Anhang A: Tab. 15). Der mittlere GSTH-Gehalt der Kontrollen lag während des Untersuchungszeitraumes bei $134,9 \pm 10,4 \mu\text{g/g}$ FG. Bereits am 1. Tag war in den mit Cd inkubierten Proben der GSTH-Pools um $22,9 \mu\text{g/g}$ FG erhöht. Dieser stieg bis zum 5. Tag gegenüber der Kontrolle um $186,9 \mu\text{g/g}$ FG an. Die maximale Zunahme betrug $261,3 \mu\text{g/g}$ FG gegenüber der Kontrolle (10. Tag).

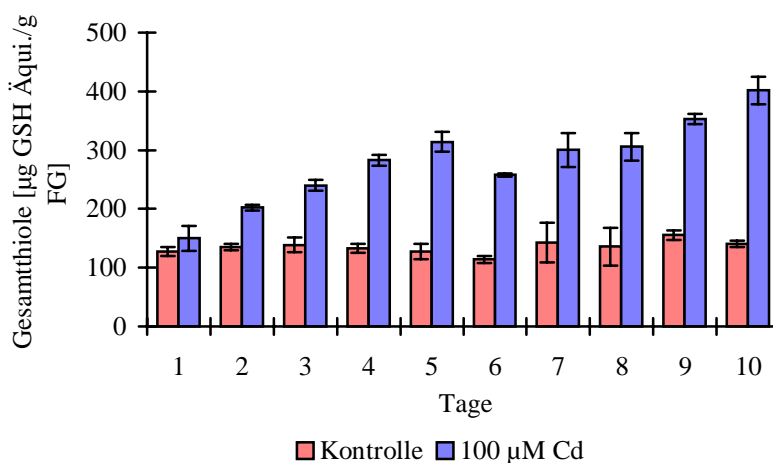


Abb. 24: GSTH-Gehalte in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit 100 μM Cd, n = 3.

3.6.2 Einfluß von Cadmium auf den Glutathiongehalt

In *F. antipyretica* kam es in Gegenwart von Cd zu einer deutlichen Erhöhung des GSH-Pools (Abb. 25, Anhang A: Tab. 15). Der GSH-Anstieg der Cd-belasteten Proben nahm während des Versuchszeitraumes einen bimodalen Verlauf. Bis zum 5. Tag kam es zu einem Anstieg um $153,3 \mu\text{g/g}$ FG gegenüber der Kontrolle. Der maximale GSH-Gehalt lag am 9. Tag $185,3 \mu\text{g/g}$ FG über der Kontrolle. Der mittlere GSH-Gehalt der Kontrollproben betrug während des Untersuchungszeitraumes $37,5 \mu\text{g/g}$ FG $\pm 10,8$, wobei der bimodale Verlauf dem der Cd-inkubierten Proben entsprach.

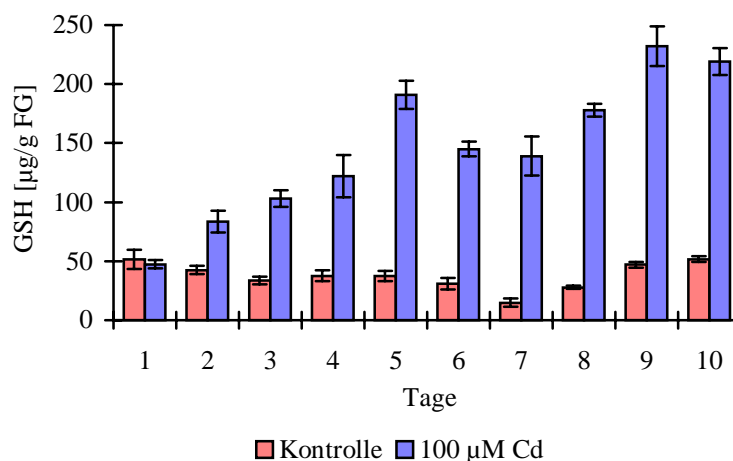


Abb. 25: GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit 100 µM Cd, n = 3.

3.6.3 Verhältnis von Gesamtthiol- zu Glutathiongehalt unter Cadmiumbelastung

Da nicht ausgeschlossen werden kann, daß in *F. antipyretica* neben GSH und PCs weitere thiolhaltige Verbindungen unter Einfluß von Schwermetallen synthetisiert werden, wurde der GSTH-Gehalt dem GSH-Gehalt gegenübergestellt.

Der Anteil des GSH am GSTH entsprach in den Kontrollen im Mittel $27,9 \pm 7,9$ % und $50,1 \pm 10,1$ % in den Cd belasteten Proben. Die Restthiolgehalte betragen während des Untersuchungszeitraumes 75,7 (1. Tag) - 127,6 µg/g FG (7. Tag) in den Kontrollen und 102,5 (1. Tag) - 183,2 µg/g FG (10. Tag) in den Cd-belasteten Proben. Bereits am 1. Tag war unter Cd-Einfluß der Restthiolgehalt deutlich erhöht. Innerhalb von 10 Tagen verdoppelte sich dieser Wert gegenüber der Kontrolle. In den Cd-belasteten Proben nahm das Verhältnis von GSTH zu GSH gegenüber der Kontrolle ab (Tab. 14).

Tab. 14: Verhältnis von GSTH zu GSH in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit 100 µM Cd, berechnet anhand der Mittelwerte aus Kap. 3.6.1 und Kap. 3.6.2.

Tag	GSTH/GSH									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kontrolle	2,5	3,2	4,1	3,5	3,4	3,7	9,6	4,9	3,3	2,7
100 µM Cd	3,2	2,4	2,3	2,3	1,6	1,8	2,2	1,7	1,5	1,8

3.6.4 Einfluß unterschiedlicher Cadmiumkonzentrationen auf den Gesamtthiolgehalt

Der GSTH-Gehalt war von der Cd-Konzentration abhängig (Abb. 26, Anhang A: Tab. 16). Der in Kap. 3.6.1 beschriebene bimodale Verlauf des GSTH-Anstiegs war ebenfalls unter unterschiedlichen Cd-Konzentrationen zu beobachten. Über 10 Tage betrug der mittlere GSTH-Gehalt der

Kontrollen $141,7 \pm 34,6 \mu\text{g/g}$ FG. Unter $50 \mu\text{M}$ Cd wurde die maximale Zunahme mit $150,6 \mu\text{g/g}$ FG gegenüber der Kontrolle am 6. Tag erreicht. Unter $100 \mu\text{M}$ Cd betrug diese am 10. Tag $281,7 \mu\text{g/g}$ FG. $25 \mu\text{M}$ Cd führten, außer am 3. Tag, zu keiner signifikanten Erhöhung des GSTH-Pools.

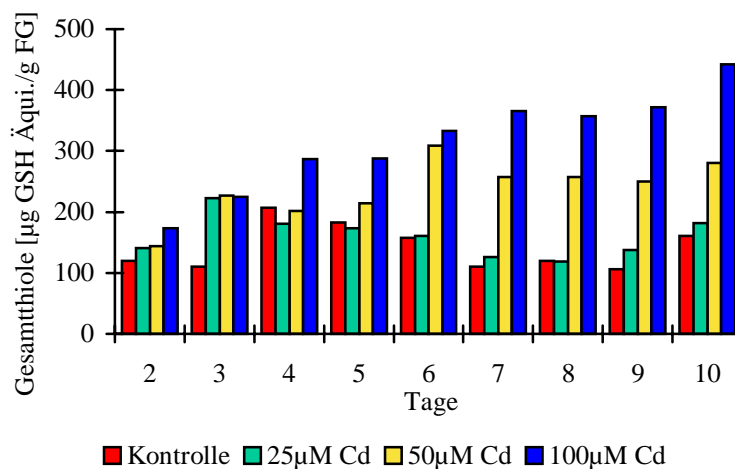


Abb. 26: GSTH-Gehalte in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit unterschiedlichen Cd-Konzentrationen (nach BECH-OTSCHIR, 1995), $n = 1$, die Ergebnisse waren in einem weiteren Versuch reproduzierbar.

3.6.5 Einfluß unterschiedlicher Cadmiumkonzentrationen auf den Glutathiongehalt

Die Abhängigkeit des GSH-Pools von der Cd-Konzentration des Mediums ist in Abb. 27 dargestellt.

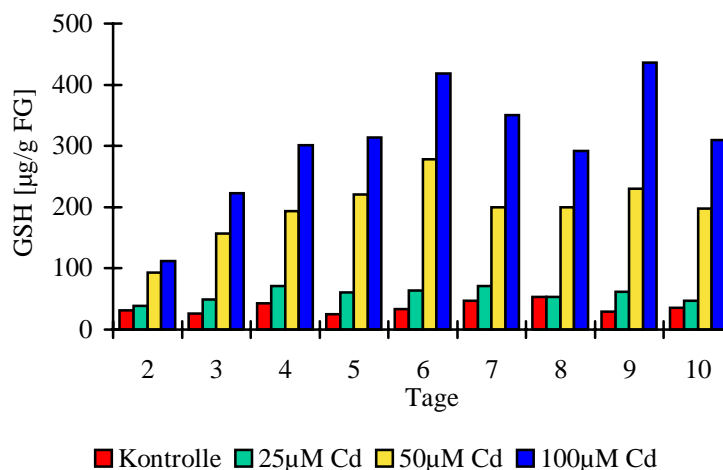


Abb. 27: GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit unterschiedlichen Cd-Konzentrationen (nach BECH-OTSCHIR, 1995), $n = 1$, die Ergebnisse waren in einem weiteren Versuch reproduzierbar.

Eine Verdopplung der Cd-Konzentration des Mediums führte nicht zu einer Verdopplung des GSH-Gehaltes des Pflanzenmaterials. Der mittlere GSH-Gehalt der Kontrolle betrug über 10 Tage $35,9 \pm 9,0 \mu\text{g/g}$ FG. Unter allen Cd-Konzentrationen sowie in den Kontrollen war ebenfalls der im

Kap. 3.6.2 beschriebene bimodale Verlauf der GSH-Zunahme zu erkennen. Bereits nach 2 Tagen nahm der GSH-Gehalt unter 50 und 100 μM Cd deutlich zu. Während der ersten Woche wurde der höchste GSH-Anstieg gegenüber der Kontrolle nach 5 Tagen (25 μM Cd: + 34,9 $\mu\text{g/g}$ FG) und 6 Tagen (50 μM Cd: + 245,1 $\mu\text{g/g}$ FG; 100 μM Cd: + 385,1 $\mu\text{g/g}$ FG) gemessen. Der höchste GSH-Gehalt wurde am 9. Tag unter 100 μM Cd mit 407,5 $\mu\text{g/g}$ FG erreicht.

3.6.6 Verhältnis Gesamthiol- zu Glutathiongehalt unter verschiedenen Cadmiumkonzentrationen

Unter steigenden Cd-Konzentrationen nahm der GSH-Anteil am GSTH-Pool zu. Für das Verhältnis von GSTH zu GSH ergaben sich während der Versuchsdauer von 10 Tagen (Kap. 3.6.5) die in Tab. 15 dargestellten Werte.

Tab. 15: Verhältnis von GSTH zu GSH in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit unterschiedlichen Cd-Konzentrationen, Mittelwerte und SD, n = 9.

Kontrolle	25 μM	50 μM	100 μM
4,2 \pm 1,4	2,9 \pm 0,9	1,2 \pm 0,2	1,1 \pm 0,2

3.6.7 Glutathiongehalte unter konstanter Cadmium- und Nährstoffkonzentration

Inwieweit der bimodale Verlauf des GSH-Anstiegs auf eine Cd-Verarmung des Mediums zurückzuführen ist, wurde in einer weiteren Versuchsreihe unter konstanter Nährstoff- und Cd-Konzentration untersucht (Abb. 28; Anhang A: Tab. 17, Reihe B). Unter diesen Bedingungen war ebenfalls ein bimodaler Verlauf zu erkennen. Bis zum 5. Tag stieg der GSH-Gehalt auf 340,2 $\mu\text{g/g}$ FG, entsprechend einer Zunahme gegenüber der Kontrolle von 294,5 $\mu\text{g/g}$ FG. Im folgenden nahm der GSH-Gehalt auf 243,4 $\mu\text{g/g}$ FG (8. Tag) ab und stieg am 9. Tag wieder auf 336,5 $\mu\text{g/g}$ FG (+ 290,8 $\mu\text{g/g}$ FG gegenüber der Kontrolle).

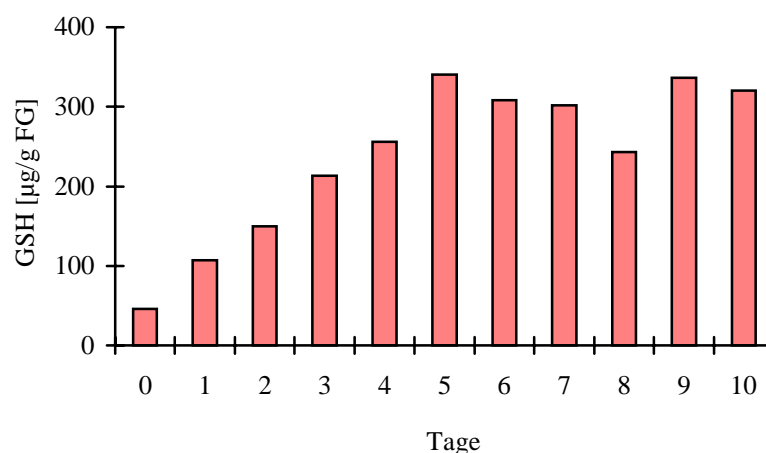


Abb. 28: GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit konstanter Nährstoff- und Cd-Konzentration (100 μM Cd), n = 1, die Ergebnisse waren in einer weiteren Meßreihe reproduzierbar.

3.6.8 Einfluß unterschiedlicher Schwermetalle auf den Glutathiongehalt

Im Vergleich zu 100 μM Cd führten äquimolare Konzentrationen an Pb, Zn und Cu zu keiner signifikanten Zunahme des GSH-Pools (Abb. 29, Anhang A: Tab. 16 und 18 - 20). Unter 100 μM Cu waren die GSH-Gehalte geringer als in der Kontrolle und die Pflanzen zeigten deutliche Schädigungen (Chlorosen).

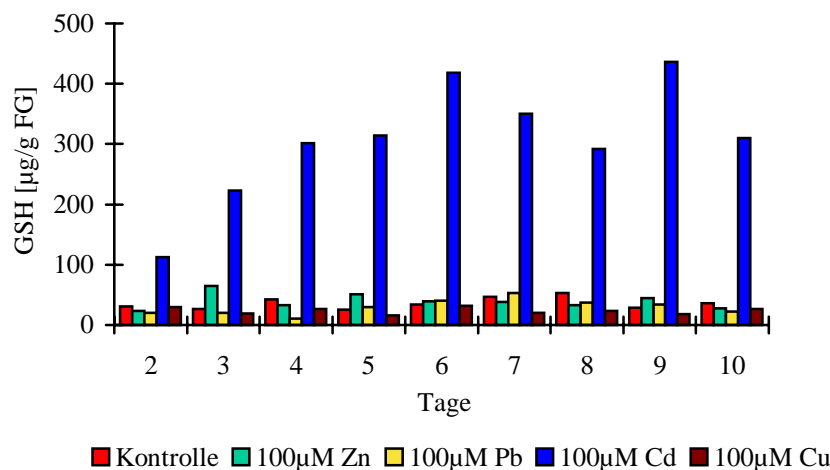


Abb. 29: GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit 100 μM Zn, Pb, Cd und Cu (nach BECH-OTSCHIR, 1995). $n = 1$, die Ergebnisse waren in einem weiteren Versuch reproduzierbar.

Weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen Konzentrationen dieser Metalle ergaben für Pb und Zn erst bei einer Konzentration von 500 μM eine signifikante Erhöhung des GSH-Pools (Abb. 30, Anhang A: Tab. 16 und 18 - 20).

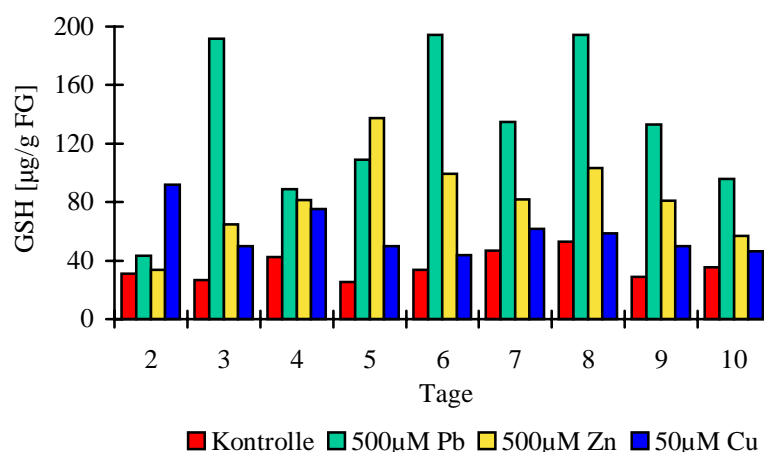


Abb. 30: GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit 500 μM Pb und Zn und 50 μM Cu (nach BECH-OTSCHIR, 1995). $n = 1$, die Ergebnisse waren in einem weiteren Versuch reproduzierbar.

Unter 500 μM Pb stieg der GSH-Gehalt am 3. Tag auf 191,9 $\mu\text{g/g}$ FG sowie am 6. und 8. Tag auf 194,1 $\mu\text{g/g}$ FG, entsprechend einer Zunahme von 165,4 (3. Tag) und 161,6 bzw. 141,2 $\mu\text{g/g}$ FG

(6. und 8. Tag) gegenüber der Kontrolle. Unter 500 μM Zn wurde das Maximum mit 137,2 $\mu\text{g/g}$ FG am 5. Tag erreicht, was einer Zunahme von 111,9 $\mu\text{g/g}$ FG gegenüber der Kontrolle entsprach. 50 μM Cu führten am 2. Tag zu einer Erhöhung von 60,8 $\mu\text{g/g}$ FG gegenüber der Kontrolle. Über den Untersuchungszeitraum lagen die GSH-Gehalte unter 50 μM Cu im Mittel jedoch nur $22,9 \pm 9,9$ $\mu\text{g/g}$ FG über denen der Kontrolle. Von den untersuchten Schwermetallen induzierte Cd den stärksten Anstieg des GSH-Pools von *F. antipyretica*.

3.6.9 Einfluß kurzzeitiger Cadmiumbelastung auf den Glutathionspiegel

Durch Entfernen des Cd aus dem Medium sollte das Verhalten des GSH-Spiegels nach kurzzeitigem (3 Tage) Schwermetallstreß untersucht werden (Abb. 31, Anhang A: Tab. 21). Im Anschluß an die Cd-Belastung stieg der GSH-Gehalt weiter an.

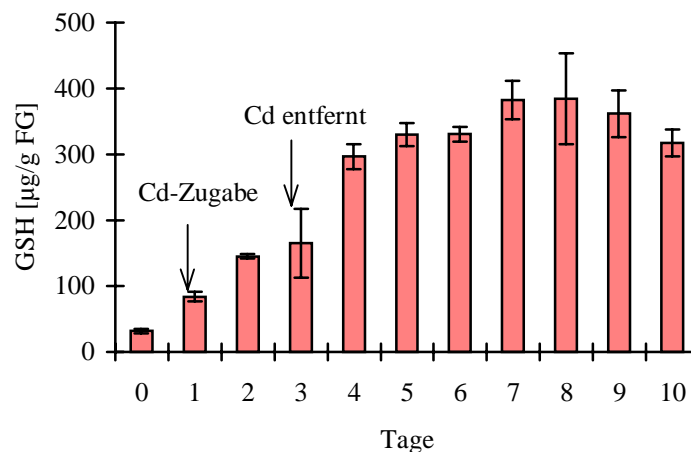


Abb. 31: GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während 3tägiger Inkubation in Medium mit 100 μM Cd und nach Entfernen des Cd aus dem Medium, $n = 3$.

Der GSH-Anstieg nahm unter diesen Bedingungen nicht den in Kap. 3.6.2 beschriebenen bimodalen Verlauf. Bis zum 3. Tag nach Cd-Zugabe nahm der GSH-Gehalt auf 164,7 $\mu\text{g/g}$ FG zu. Nach Entfernen des Cd aus dem Medium kam es am 4. Tag zu einem weiteren Anstieg auf 296,7 $\mu\text{g/g}$ FG, was einer Zunahme von 132,0 $\mu\text{g/g}$ FG gegenüber dem Vortag entsprach. Die höchsten Werte von 382,2 bzw. 384,4 $\mu\text{g/g}$ FG wurden am 7. und 8. Tag erreicht, woraufhin am 9. und 10. Tag eine leichte Abnahme zu beobachten war.

3.6.10 Glutathiongehalte in älteren und jungen Pflanzenteilen

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben, daß ältere Pflanzenteile von *F. antipyretica*, im Vergleich zu jungen Sproßspitzen, höhere Gehalte an Schwermetallen aufweisen (BRUNS et al., 1995; SIEBERT et al., 1996). Es wurde überprüft, inwieweit auch Unterschiede in der Reaktion des GSH-Pools auf Cd in diesen unterschiedlichen Sproßsegmenten auftreten (Abb. 32, Anhang A: Tab. 22). Der GSH-Gehalt der Kontrollproben älterer Pflanzenabschnitte lag mit 45,6 $\mu\text{g/g}$ FG

gegenüber 71,8 µg/g FG zu Beginn des Versuches deutlich unter dem junger Sproßspitzen.

Bis zum 4. Tag nach Cd-Zugabe war in den älteren Abschnitten keine signifikante Reaktion des GSH-Gehaltes auf Cd feststellbar. Erst nach 6 Tagen kam es zu einer Zunahme von 32,3 µg/g FG. Die Sproßspitzen dagegen reagierten bereits nach 2 Tagen mit einer Erhöhung des GSH-Pools gegenüber der Kontrolle um 123,2 µg/g FG. Am 6. Tag betrug dieser Wert 285,5 µg/g FG.

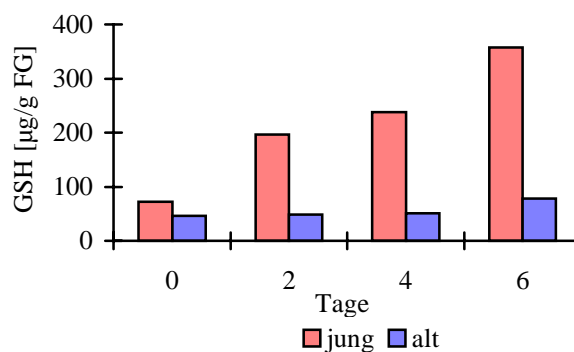


Abb. 32: GSH-Gehalte in jungen und älteren Pflanzenteilen von *F. antipyretica* während 6tägiger Inkubation in Medium mit 100 µM Cd. n = 1, die Ergebnisse waren in einer weiteren Meßreihe reproduzierbar.

3.6.11 Oxidationsstatus des Glutathions unter Cadmiumbelastung

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde lediglich der Gesamt-GSH-Gehalt von *F. antipyretica* ermittelt. Da es in Moosen unter Umweltstreß zur Oxidation von GSH kommen kann (DHINDSA, 1987; KRANNER und GRILL, 1996), wurde zusätzlich der Gehalt an GSSG nach 7tägiger Cd-Belastung (100 µM) bestimmt (Tab. 16).

Tab. 16: Gehalte an Gesamtglutathion, GSH- und GSSG [µg/g FG] sowie der GSSG-Anteil am Gesamt-GSH [%] in *F. antipyretica* nach 7tägiger Inkubation in Medium mit 100 µM Cd sowie in den Kontrollen, Mittelwerte und SD, n = 4.

	Gesamt-GSH	GSH	GSSG	GSSG-Anteil
Kontrolle	59,7 ± 4,5	35,8 ± 12,7	23,9 ± 9,3	41,0 ± 17,8
Cd	176,4 ± 20,9	148,4 ± 21,6	28,0 ± 2,0	16,2 ± 2,8

Wie in den vorangegangenen Untersuchungen stieg auch hier der GSH-Pool unter Cd-Einfluß deutlich an. Der Gehalt an GSSG nahm unter diesen Bedingungen nicht zu, so daß es zu einer Erhöhung des GSH/GSSG-Verhältnisses von 1,5 auf 5,3 kam.

3.6.12 Einfluß von Cadmium auf den Gehalt an Glutathion, Cystein und γ -Glutamyl-Cystein

Der starke Anstieg des GSH-Gehaltes in *F. antipyretica* unter Schwermetalleinfluß führte zu der Frage, inwieweit auch der Pool der GSH-Metaboliten Cys und γ -Glu-Cys durch Schwermetalle beeinflusst wird. Es wurden hierzu Methoden optimiert, die eine Trennung und Quantifizierung dieser Substanzen erlaubten (Kap. 2.5.3).

Abb. 33 stellt die Cys- und GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während der ersten 26 Stunden nach Cd-Zugabe (200 μ M) dar (Anhang A: Tab. 23). Innerhalb von 2 Stunden fiel der Cys-Gehalt von 3,2 auf 1,6 μ g/g FG und der GSH-Gehalt von 16,0 auf 7,3 μ g/g FG ab. Im folgenden stiegen beide Substanzen kontinuierlich an. Der GSH-Gehalt lag während der Untersuchungen um den Faktor 3 - 5 über dem des Cys. γ -Glu-Cys war in diesem Zeitraum in den Proben nicht nachweisbar. Über 26 Stunden ergab sich für Cys und GSH eine Korrelationen von 0,9764*** ($p = 0,001$)

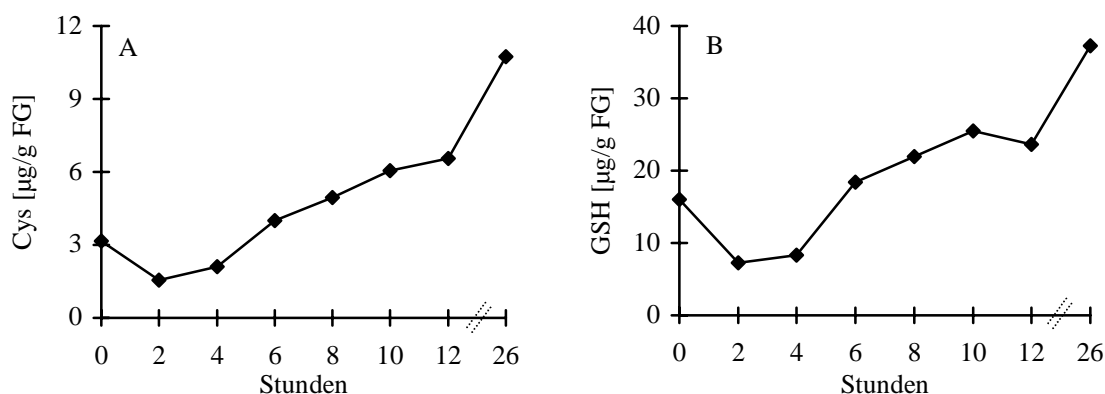


Abb. 33: Gehalte an Cys (A) und GSH (B) in *F. antipyretica* während 26stündiger Inkubation in Medium mit 200 μ M Cd, n = 2.

Während 10 Tagen unter 100 μ M Cd stiegen die Gehalte an Cys und GSH ebenfalls an (Abb. 34, GSH nicht dargestellt, Anhang A: Tab. 24). Der Cys-Gehalt nahm bis zum 3. Tag von 1,4 μ g/g FG auf 14,1 μ g/g FG zu. Im folgenden schwankte dieser um einen Mittelwert von $13,5 \pm 1,0$ μ g/g FG.

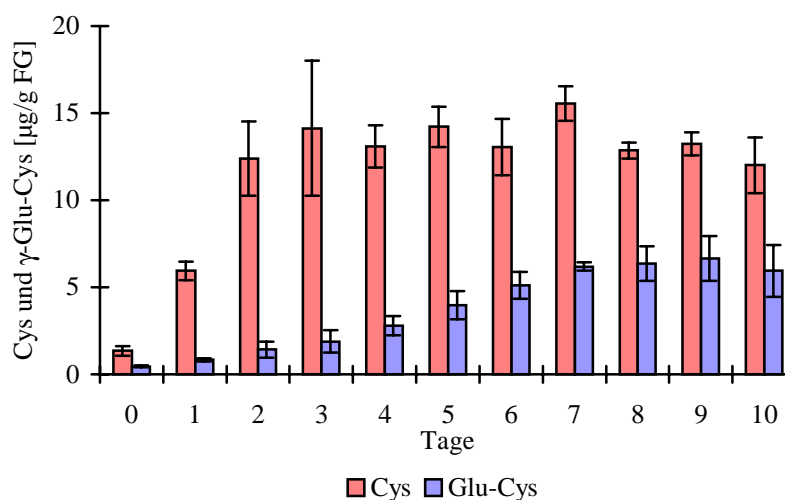


Abb. 34: Gehalte an Cys und γ -Glu-Cys in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit 100 μ M Cd, n = 3.

Auch γ -Glu-Cys war während dieses Versuches in allen Proben nachweisbar. Der Gehalt dieses Peptides stieg kontinuierlich bis zum 9. Tag von 0,45 $\mu\text{g/g}$ FG auf 6,7 $\mu\text{g/g}$ FG und fiel dann am 10. Tag leicht ab.

Die Korrelationskoeffizienten der Cys- und γ -Glu-Cys-Gehalte zu den GSH-Gehalten dieser Proben (nicht dargestellt) lagen bei 0,8856**, 0,9007** (** $p=0,01$).

3.7 Vergleich von Pflanzen unterschiedlicher Standorte

3.7.1 Schwermetallgehalte und biologische Variabilität

Für Untersuchungen zum Einfluß unterschiedlicher Probenahmestandorte auf die Induktion thiolhaltiger Verbindungen in *F. antipyretica* wurden vier Standorte des Harzes (Kap. 2.1.1, Tab. 1) im Mai 1996 (und Juli 1995, nicht dargestellt) gleichzeitig beprobt. Die Schwermetallgehalte der Pflanzen dieser Standorte sind in Tab. 17 dargestellt.

Tab. 17: Schwermetallgehalte der Moosproben, [$\mu\text{g/g}$ TG], Standorte: Kap. 2.1.1, Tab.1.

Standort	Cd	Pb	Zn	Cu
Wipper	0,25	10,9	59	12,9
Selke	1,75	95,1	267	34,0
Dammbach	1,70	16,0	163	23,0
Rappbode	0,57	10,7	110	15,6

Die biologische Variabilität der Schwermetallgehalte der Pflanzen wurde anhand einer 5fach-Beprobung des Standortes Wipper überprüft (Tab. 18). Für die untersuchten Elemente lag die biologische Streuung unter 20 %.

Tab. 18: Biologische Variabilität der Schwermetallgehalte von *F. antipyretica* innerhalb eines Beprobungsabschnittes von ca. 30 x 4 m des Standortes Wipper, $n = 5$, [$\mu\text{g/g}$ TG].

	Cd	Pb	Zn	Cu
Mittel	0,56	10,9	118,0	12,3
SD	0,01	1,1	17,2	2,3
SD %	1,9	10,0	14,5	18,6

3.7.2 Phytochelatingehalte

Die Pflanzen aller vier Standorte enthielten nachweisbare PC-Mengen, die unterschiedliche HPLC-Profile ergaben (Abb. 35). Der Gehalt des in allen Proben nachweisbaren PC₄ (Anhang A: Tab. 25) wurde den Cd-Gehalten gegenübergestellt (Abb. 36).

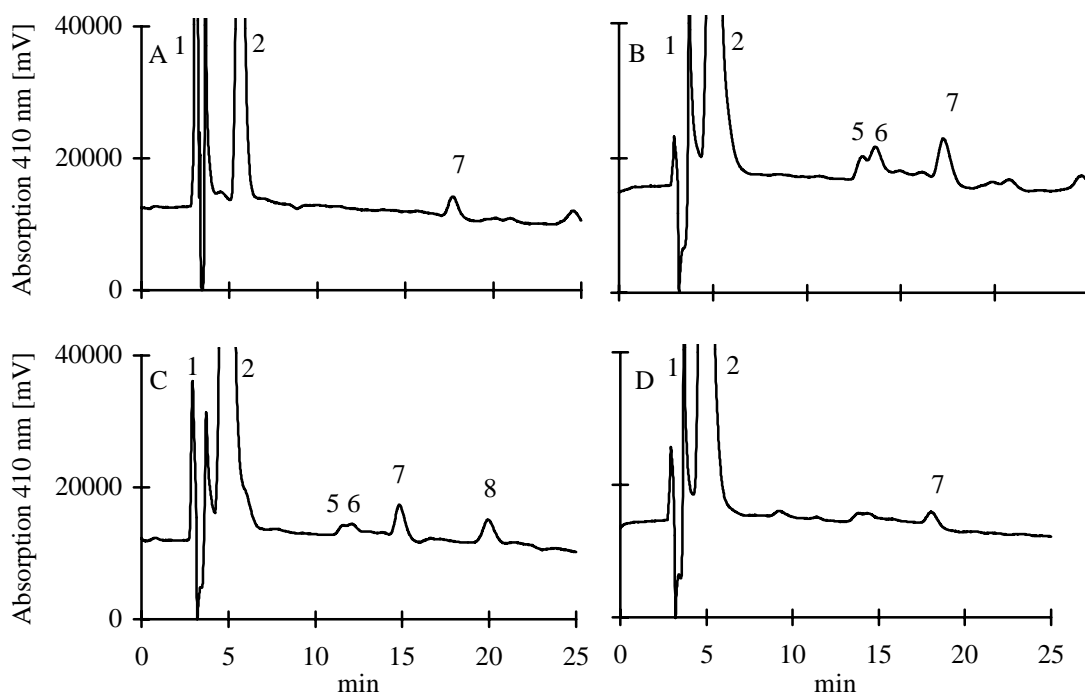


Abb. 35: HPLC-Profile thiolhaltiger Verbindungen in *F. antipyretica* von unterschiedlichen Standorten des Harzes. A: Wipper, B: Selke, C: Dammbach, D: Rappbode. 1: Cys, 2: GSH + γ -Glu-Cys, 5: PC₃, 6: nicht identifiziert, 7: PC₄, 8: PC_{5(?)} (Kap. 3.5.2), Standorte: Kap. 2.1.1, Tab. 1.

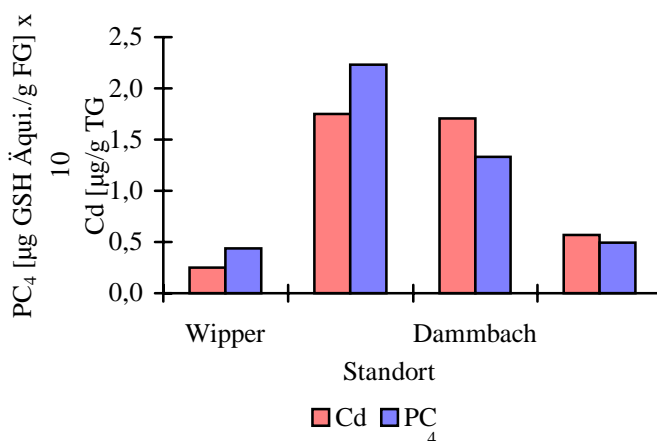


Abb. 36: Gehalte an PC₄ und Cd in Proben von *F. antipyretica* unterschiedlicher Standorte des Harzes, n = 1, Standorte: Kap. 2.1.1, Tab. 1.

Die Proben der Standorte Selke und Dammbach enthielten im Vergleich zu denen der Wipper und Rappbode erhöhte Cd- und PC₄-Gehalte. Die deutlichsten Unterschiede zeigten sich zwischen den Proben aus der Wipper und der Selke. Auch im Vorjahr (nicht dargestellt, Extraktion 1) war der Gehalt an PC₄ in der Selkeprobe mit 12,3 $\mu\text{g/g FG}$ gegenüber der Wipperprobe mit 4,3 $\mu\text{g/g FG}$ deutlich erhöht. Die Standorte Dammbach und Rappbode enthielten im Vorjahr 4,7 und 6,1 $\mu\text{g/g FG}$ PC₄.

3.7.3 Induktion thiolhaltiger Verbindungen im Laborversuch

In den vorangegangenen Labor- und Freilanduntersuchungen war die absolute Reproduktion der Ergebnisse zur PC- und GSH-Induktion aufgrund der Variabilität des Pflanzenmaterials in Versuchswiederholungen oft nicht möglich. Als Ursache hierfür wird neben saisonalen Faktoren auch ein Einfluß der Schwermetallbelastung der natürlichen Standorte vermutet. Im folgenden sollten Aussagen zur Induktion von PCs in Pflanzen unterschiedlicher Standorte erhalten werden.

Die Reaktion auf 100 μM Cd innerhalb von 14 Tagen unter Laborbedingungen wurde über den Gehalt an PC₄ quantifiziert (Abb. 37, Anhang A: Tab. 25). In den Proben der Rappbode und des Dammbaches nahm unter diesen Bedingungen der PC₄ Gehalt um 14,9 $\mu\text{g/g}$ FG und 34,6 $\mu\text{g/g}$ FG zu, wohingegen dieser Wert in der Selkeprobe um 11,0 $\mu\text{g/g}$ FG abnahm. Das Pflanzenmaterial der Wipper zeigte keine signifikante Reaktion auf Cd.

Im Vorjahr (Juli 1995) reagierte das Material aus der Wipper mit einer Zunahme um 0,2 $\mu\text{g/g}$ FG ebenfalls nur gering, wogegen in Pflanzen der anderen Standorte der PC₄-Gehalt innerhalb von 14 Tagen unter Cd-Belastung deutlich zunahm: Rappbode 4,9 $\mu\text{g/g}$ FG, Dammbach 2,2 $\mu\text{g/g}$ FG und Selke 3,2 $\mu\text{g/g}$ FG.

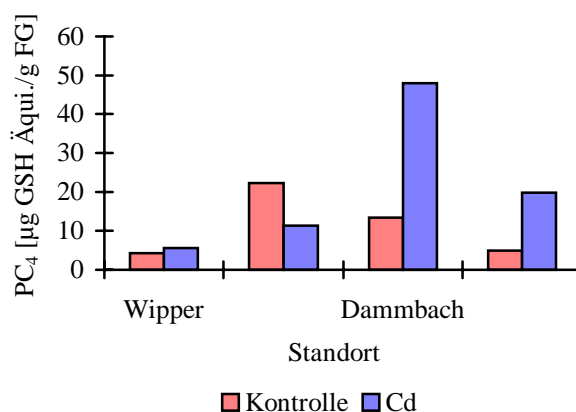


Abb. 37: Gehalte an PC₄ in Proben von *F. antipyretica* verschiedener Standorte des Harzes nach 14tägiger Inkubation in Medium mit 100 μM Cd, n = 1, Standorte: Kap. 2.1.1, Tab. 1.

3.7.4 Gehalt der unbekannt thiolhaltigen Verbindung

Der Gehalt eines nicht identifizierten Thiols (Kap. 3.5.5) wurde ebenfalls aus den Proben der verschiedenen Standorte nach 14tägiger Inkubation in Cd-haltigem Medium (100 μM) quantifiziert (Abb. 38, Anhang A: Tab. 25). In den Pflanzen der Rappbode und der Selke wurde mit 276,1 $\mu\text{g/g}$ FG und 252,4 $\mu\text{g/g}$ FG gegenüber den Proben der Wipper mit 80,5 $\mu\text{g/g}$ FG und des Dammbaches mit 89,7 $\mu\text{g/g}$ FG ein höherer Gehalt dieser Verbindung gemessen. Diese Substanz war in keiner der Kontrollen nachweisbar.

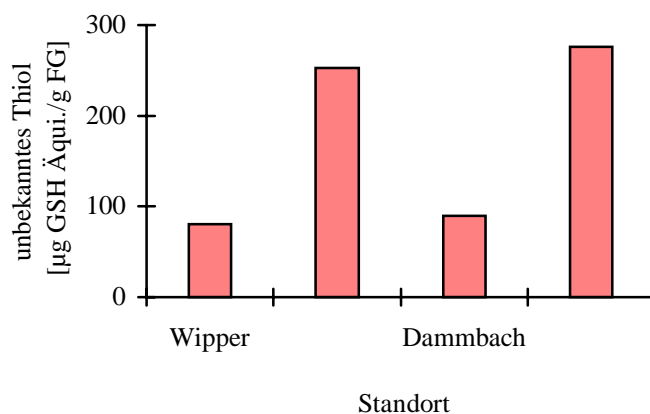


Abb. 38: Gehalte einer nicht identifizierten thiolhaltigen Substanz in Proben von *F. antipyretica* verschiedener Standorte des Harzes nach 14tägiger Inkubation in Medium mit 100 µM Cd, n = 1, Standorte: Kap. 2.1.1, Tab. 1.

3.7.5 Glutathiongehalte

Da der GSH-Pool von der Schwermetall-, insbesondere Cd-Konzentration, des Mediums abhängig ist, wurden auch die GSH-Gehalte der Pflanzen unterschiedlicher Standorte gemessen. Eine Korrelation zu Schwermetallgehalten der Proben war nicht festzustellen (Abb. 39 Kontrollen).

Ebenso wurde die GSH-Induktion nach Cd-Applikation im Labor gemessen (Abb. 39, Anhang A: Tab. 26). 2 Tage nach Cd-Zugabe stieg der GSH-Pool aller Proben, mit Ausnahme der Wipper, an. Die höchste Zunahme betrug an diesem Tag 105,8 µg/g FG (Rappbode) und 55,0 µg/g FG (Selke). Am 6. Tag lagen die GSH-Gehalte der vergleichsweise hoch mit Cd belasteten Standorte Selke und Dammbach deutlich unter denen der geringer belasteten Standorte Wipper und Rappbode. In der Selkeprobe nahm der GSH-Pool zu diesem Zeitpunkt bereits um 55,2 µg/g FG gegenüber dem 4. Tag ab.

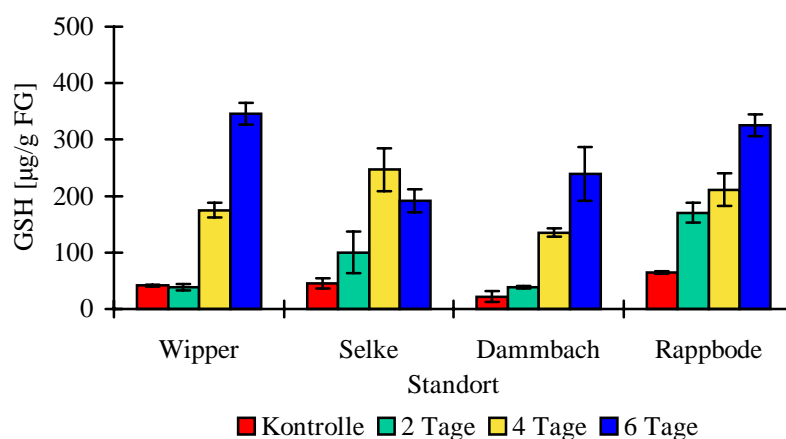


Abb. 39: GSH-Gehalte in *F. antipyretica* von verschiedenen Standorten des Harzes nach Inkubation in Medium mit 100 µM Cd, n = 3, Standorte: Kap. 2.1.1, Tab. 1.

Im Vorjahr (nicht dargestellt, Extraktion 1, Kap. 2.5.1, Tab. 5) wurde nach 7tägiger Inkubation in 100 µM Cd im Pflanzenmaterial der Rappbode ein GSH-Anstieg um 74,7 µg/g FG gemessen. In

der Probe der Wipper betrug dieser nur 13,6 $\mu\text{g/g}$ FG. In den Proben der Selke und des Dammbach war keine signifikante Zunahme des GSH-Pools zu messen.

3.7.6 Glutathioninduktion in Sproßspitzen aus Laborkultur

Das Pflanzenmaterial der verschiedenen Standorte reagierte unterschiedlich auf die Inkubation in Cd-haltigem Medium (Kap. 3.7.5, Abb. 39). Inwieweit dieses auf Umweltfaktoren des natürlichen Standorts zurückzuführen ist, wurde anhand von jungen im Labor ausgetriebenen Sproßspitzen unter Einfluß von 100 μM Cd untersucht (Abb. 40, Anhang A: Tab. 27). Das Ausgangsmaterial entsprach dem aus Kap. 3.7.1. In diesem Versuch reagierte der GSH-Pool der Selkepflanzen anders als bei den übrigen Pflanzen, wobei erst am 4. Tag eine signifikante Zunahme des GSH-Gehaltes meßbar war (68,6 $\mu\text{g/g}$ FG). Unter diesen Bedingungen stieg der GSH-Pool der Wipperprobe mit 129,3 $\mu\text{g/g}$ FG (4. Tag) am stärksten an. Auch die vergleichsweise langsame Reaktion des GSH-Pools der Freilandpflanzen aus dem Dammbach (Kap. 3.7.5, Abb. 39) war in den im Labor ausgetriebenen Spitzen nicht reproduzierbar.

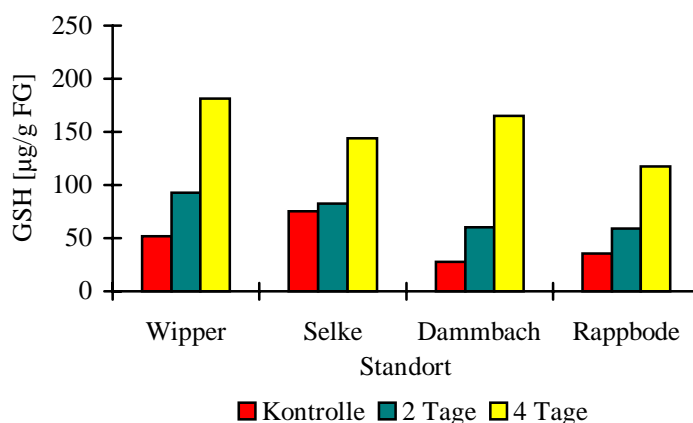


Abb. 40: GSH-Gehalte junger im Labor gewachsener Sproßspitzen (ca. 2 cm) von *F. antipyretica* von Standorten des Harzes nach Inkubation in Medium mit 100 μM Cd, n = 1, Standorte: Kap. 2.1.1, Tab. 1.

3.7.7 Zuwachs und Ausbildung von Neutrieben unter Cadmiumeinfluß

Vorversuche ergaben bereits bei einer Konzentration von 10 μM Cd eine 100%ige Hemmung des Längenwachstums und der Bildung von Seitentrieben an Sproßspitzen von *F. antipyretica* (nicht dargestellt). Konzentrationen von 1 bis 5 μM Cd führten dagegen lediglich zu einem verringerten Wachstum und einer reduzierten Anzahl von Neutrieben. Zur Untersuchung einer unterschiedlichen Cd-Toleranz wurden junge Sproßspitzen von Pflanzen unterschiedlicher Standorte des Harzes auf Agarplatten ohne und mit 5 und 1 μM Cd für 5 Wochen kultiviert (Kap. 2.3.5). Als Maß für die Cd-Toleranz wurden die Anzahl der Neutriebe und der Längenzuwachs bestimmt (Abb. 41 und 42, Anhang A: Tab. 28 und 29).

Die Anzahl der Neutriebe war bei Pflanzen der wenig belasteten Standorte Wipper und Rappbode

unter 1 μM Cd um 41,7 % bzw. 42,8 % erhöht, wogegen bei den Proben der Selke die Anzahl der Neutriebe um 21,4 %; und den Proben des Dammbaches um 52,6 % gegenüber der Kontrolle abnahm. Unter 5 μM Cd war die Ausbildung von Neutrieben in allen Proben reduziert (Wipper - 66,7 %; Selke - 71,4 %; Rappbode - 92,9 %; Dammbach - 100 %).

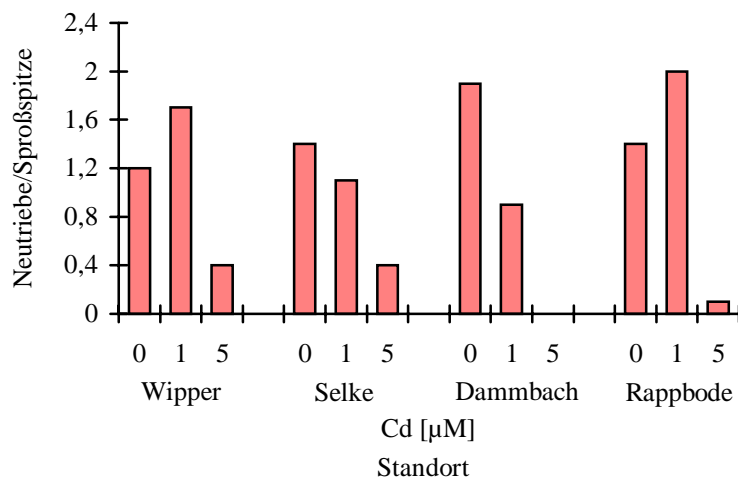


Abb. 41: Anzahl der Neutriebe pro Sproßspitze (2 - 3 cm) von *F. antipyretica* von Standorten des Harzes nach 5 Wochen auf Agarplatten mit 0, 1 und 5 μM Cd, n = 10, Standorte: Kap. 2.1.1, Tab. 1.

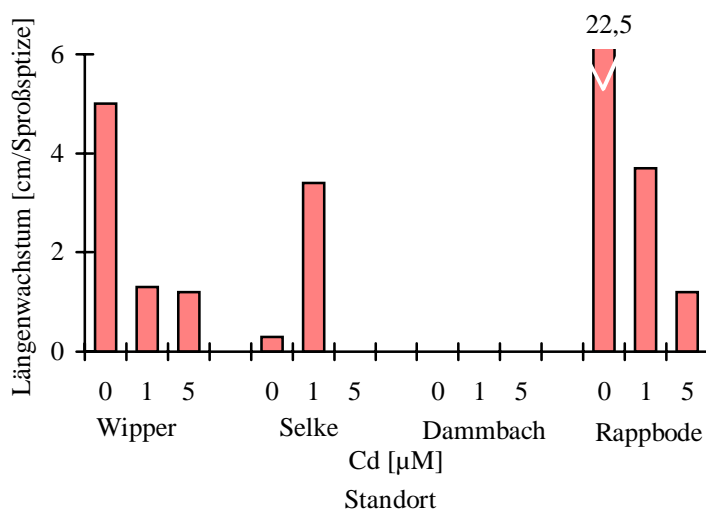


Abb. 42: Längenzuwachs pro Sproßspitze von *F. antipyretica* von Standorten des Harzes nach 5 Wochen auf Agarplatten mit 0, 1 und 5 μM Cd, Mittelwerte, n = 10, Standorte: Kap. 2.1.1, Tab. 1.

Das Längenwachstum der Proben der Rappbode und Wipper war unter 1 μM Cd um 74,0 bzw. 83,6 % gehemmt. Dagegen nahm bei der Selkeprobe das Längenwachstum um das 10fache zu, wogegen unter 5 μM Cd kein Wachstum auftrat. In den Proben der Wipper und Rappbode war das Längenwachstum unter 5 μM Cd um 76,0 % bzw. 94,8 % reduziert. Bei den Pflanzen des Dammbaches war unter keiner der Bedingungen Längenwachstum zu beobachten.

3.8 Physiologische Reaktion des in der Elbe exponierten Pflanzenmaterials

3.8.1 Vitalität des Pflanzenmaterials

Neben der Schwermetallakkumulation (Kap. 3.2, Abb. 7 und 8) wurde auch die physiologische Reaktion des 1994 in der Elbe exponierten Pflanzenmaterials untersucht (Standorte: Kap. 2.2.1, Anhang A: Tab. 1) Einflüsse der Gewässerqualität auf die Vitalität der Proben wurden anhand des Chlorophyllgehaltes (Abb. 43, Anhang A: Tab. 5) sowie des Chlorophyll a/b-Verhältnisses (Abb. 44, Anhang A: Tab. 5) überprüft.

Mit Ausnahme der Standorte 4 und 5 war in allen Proben der Gehalt an Chlorophyll a und b verringert. Die stärkste Abnahme gegenüber der Kontrolle wurde mit 63,6 % (Chlorophyll a) und 55,6 % (Chlorophyll b) am Standort 7 sowie mit 59,3 % (Chlorophyll b) am Standort 10 gemessen.

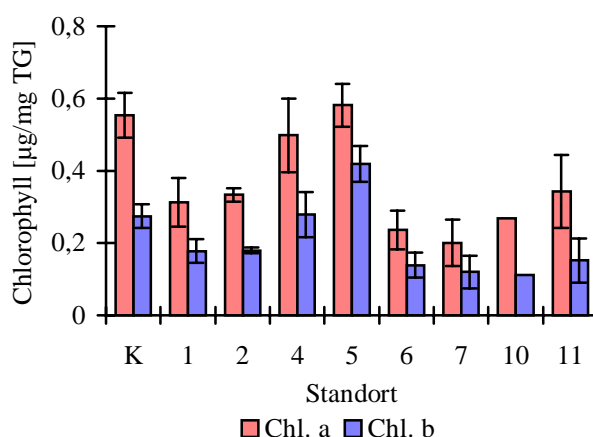


Abb. 43: Gehalte an Chlorophyll a und b in Proben von *F. antipyretica* nach Exposition in der Elbe 1994, n = 3 Analysen, Standort 10: n = 2, Standorte: Kap. 2.2.1, Abb. 3.

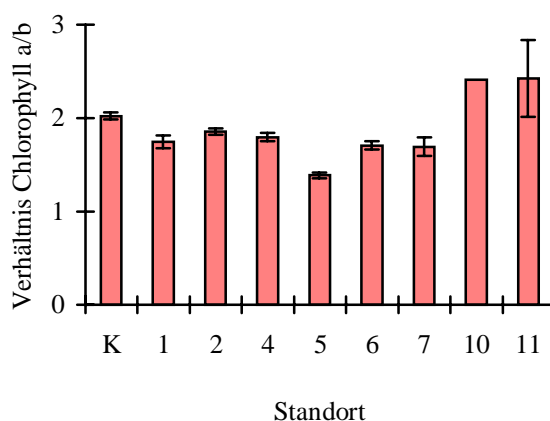


Abb. 44: Chlorophyll a/b-Verhältnis in Proben von *F. antipyretica* nach Exposition in der Elbe 1994 und in der Kontrolle (K), n = 3 Analysen, Standort 10: n = 2, Standorte: Kap. 2.2.1, Abb. 3.

Das Chlorophyll a/b-Verhältnis nahm, mit Ausnahme am Standort 5 (- 30 %), gegenüber der Kontrolle nur um 10 - 15 % ab. An den Standorten 10 und 11 nahm dieser Parameter um 20 % zu. Eine Korrelation des Chlorophyllgehaltes oder des Chlorophyll a/b-Verhältnisses zu den Schwermetallgehalten der Moosproben bzw. zu den Gewässerdaten war nicht nachweisbar.

3.8.2 Phytochelatingehalte

In den exponierten Proben veränderten sich die HPLC-Elutionsprofile, wobei der Thiolpeptidgehalt in fast allen Proben gegenüber der Kontrolle abnahm. Die HPLC-Chromatogramme der Kontrolle sowie der Proben der Standorte 5 und 4a sind in Abb. 45 dargestellt. Der Gehalt thiolhaltiger Peptide der 1994 in der Elbe exponierten Proben wurde über den PC₄-Gehalt quantifiziert (Abb. 46, Anhang A: Tab. 6). Der stärkste Abbau thiolhaltiger Verbindungen wurde an den Standorten 1 und 5 mit 1,28 bzw. - 1,13 µg/g FG gemessen. Lediglich am Standort 4 nahm der PC₄-Gehalt um 0,38 µg/g FG zu.

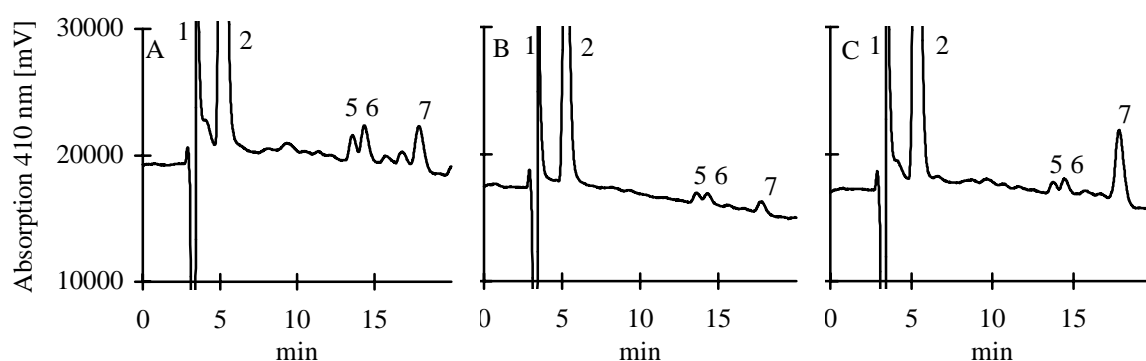


Abb. 45: HPLC-Chromatogramme der Kontrolle (A) und der Proben der Standorte 5 (B) und 4a (C) nach Exposition in der Elbe (1994), Extraktion 1 (Kap. 2.5.1, Tab. 5), Standorte: Kap. 2.2.1, Abb. 3.

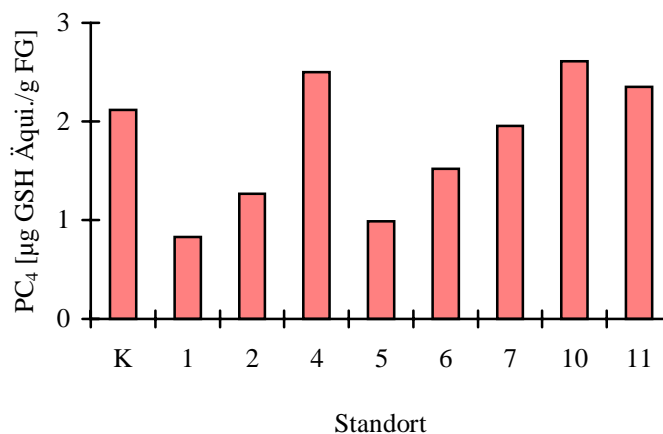


Abb. 46: PC₄-Gehalte der Moosproben nach Exposition in der Elbe 1994 und in der Kontrolle (K), Extraktion 1 (Kap. 2.5.1, Tab. 5), n = 1, Standorte: Kap. 2.2.1, Abb. 3.

Die Gegenüberstellung der PC₄- und Cd-Gehalte des exponierten Pflanzenmaterials ergab eine signifikante Korrelation ($p = 0,01$) dieser beiden Parameter (Abb. 47). Die Pb, Zn und Cu-Gehalte korrelierten nicht mit den PC₄-Gehalten. Da von einem Einfluß des Elbwassers auf die Thiolpeptidsynthese ausgegangen wird, blieb die nicht exponierte Kontrolle bei der Berechnung der Korrelationskoeffizienten der PC- und Schwermetallgehalte unberücksichtigt.

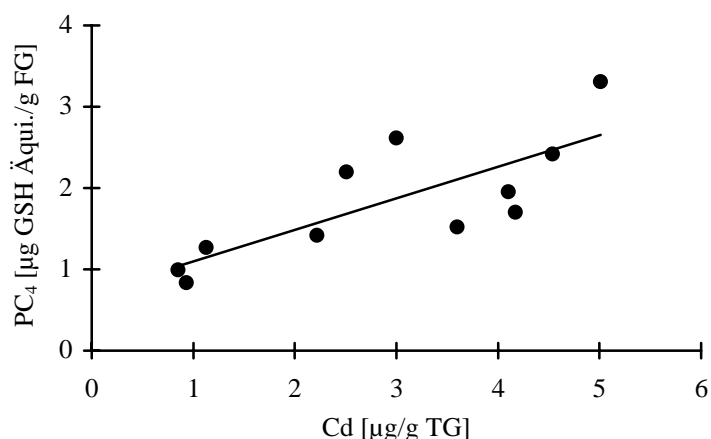


Abb. 47: Korrelationsdiagramm der Gehalte an PC₄ und Cd in Moosproben nach Exposition in der Elbe 1994, ohne Kontrolle, $r = 0,779^{**}$, $p = 0,01$.

3.8.3 Glutathiongehalte

Begleitend zu den PCs und Cd, Pb, Zn und Cu wurden die GSH-Gehalte des exponierten Pflanzenmaterials gemessen (Abb. 48, Anhang A: Tab. 6). Es sollte überprüft werden, ob Veränderungen des GSH-Pools Rückschlüsse auf die Belastung einzelner Standorte erlauben.

Die GSH-Gehalte der exponierten Proben zeigten keine Korrelation zu den Schwermetallgehalten der Moosproben. An den Standorten 1, 2, 7 und 11 nahm der GSH-Pool signifikant ab (Standort 1: -22,4; 2: -20,4; 7: -13,0; 11: -13,0 µg/g FG). Nur am Standort 5 nahm dieser um 10,0 µg/g FG zu.

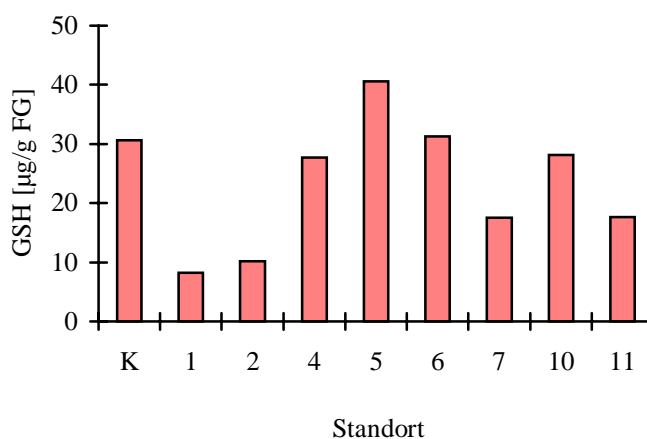


Abb. 48: GSH-Gehalte in *F. antipyretica* nach Exposition in der Elbe 1994 und in der Kontrolle (K), Extraktion 1 (Kap. 2.5.1, Tab. 5), Standorte: Kap. 2.2.1, Abb. 1.

3.9 Expositionsversuche an extrem belasteten Standorten des Mansfelder Landes

3.9.1 Schwermetallgehalte des Pflanzenmaterials

Neben dem aktiven Biomonitoring in der Elbe (Kap. 3.2, Abb. 7 und 8) wurde ein weiterer Expositionsversuch an einem belasteten Standorten des Mansfelder Landes (Kap. 2.2.2, Tab. 2, ehemaliges Kupferschiefer-Bergbaugebiet) durchgeführt. Die exponierten Proben enthielten im Vergleich zur Kontrolle extrem hohe Gehalte an Cd, Pb, Zn und Cu (Tab. 19). Die maximalen Anreicherungsfaktoren gegenüber der Kontrolle lagen bei 11 für Cd (H8), 65 für Pb (H3), 34 für Zn (H4) und 226 für Cu (H4).

Tab. 19: Schwermetallgehalte von *F. antipyretica* nach Exposition an hoch belasteten Standorten sowie der Kontrolle, [$\mu\text{g/g TG}$].

Standort	Cd	Pb	Zn	Cu
Kontrolle	3,3	224	958	84
H3	25,0	14500	17654	1170
H4	36,6	9108	32331	19010
H5	9,8	196	1889	77
H6	12,2	476	6833	348
H7	7,0	379	2937	186
H8	36,7	966	7861	440

3.9.2 Vitalität des Pflanzenmaterials

Die Vitalität des exponierten Pflanzenmaterials wurde anhand von Chlorophyllbestimmungen überprüft (Anhang A: Tab. 30).

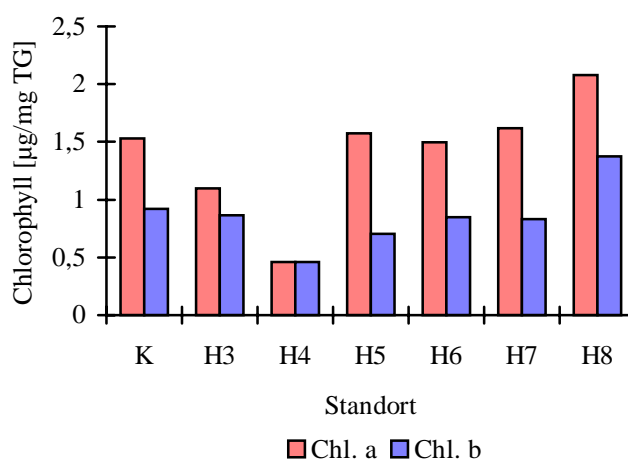


Abb. 49: Chlorophyllgehalte in *F. antipyretica* nach Exposition an hoch belasteten Standorten und in der Kontrolle (K), n = 1 Standorte: Kap. 2.2.2, Tab. 3.

Die Gehalte an Chlorophyll a waren in den Proben der Standorte H3 und H4 gegenüber der Kontrolle um 28,6 % bzw. 70,1 % verringert (Abb. 49). Lediglich am Standort H8 war eine Zunahme um 35,1 % zu beobachten. An den Standorten H4 und H5 nahm der Chlorophyll b-Gehalt um 50,0 % und 23,9 % ab, wohingegen dieser in der Probe des Standortes H8 um 48,9 % gegenüber der Kontrolle erhöht war. An den Standorten H3 und H4 nahm das Chlorophyll a/b-Verhältnis um 26,0 % bzw. 39,6 % ab (Abb. 50), wogegen dieser Wert am Standort H5 um 34,7 % gegenüber der Kontrolle zunahm.

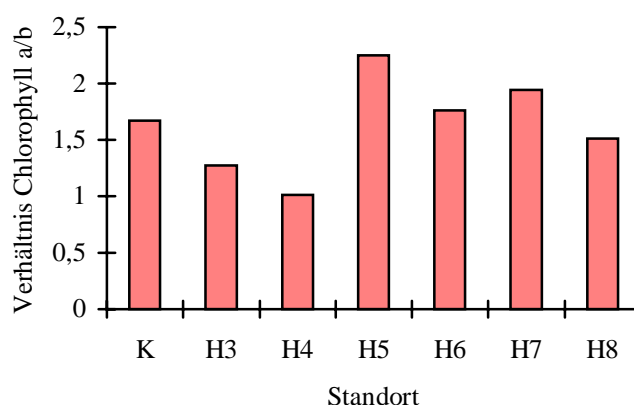


Abb. 50: Chlorophyll a/b-Verhältnis in *F. antipyretica* nach Exposition an hoch belasteten Standorten und in der Kontrolle (K), n = 1, Standorte: Kap. 2.2.2, Tab. 3.

Das Verhältnis von E_{665} zu E_{665a} als Indikator des Chlorophyllabbaus nahm an allen Standorten gegenüber der Kontrolle leicht ab, wobei am Standort H4 mit 5,8 % die Abnahme am größten war (Abb. 51).

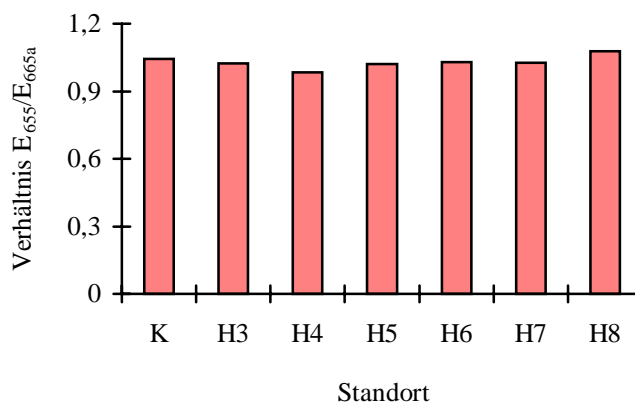


Abb. 51: Verhältnis von E_{665} zu E_{665a} in Chlorophyllextrakten von *F. antipyretica* nach Exposition an hoch belasteten Standorten und in der Kontrolle (K), n = 1, Standorte: Kap. 2.2.2, Tab. 3.

3.9.3 Thiolhaltige Peptide

Der PC-Gehalt der Proben wurde über PC_4 quantifiziert. Dieser war in allen Proben gegenüber der Kontrolle erhöht (Abb. 52 und 53, Anhang A: Tab. 31). Die schlechte Abtrennung des Peak 2 in der Probe H8 ist auf einen Fehler bei der Probeninjektion zurückzuführen. Eine Korrelation der PC_4 -

Gehalte (Abb. 53) zu den Cd-, Pb-, Zn- und Cu-Gehalten des Pflanzenmaterials war nicht festzustellen.

Auch die GSH-Gehalte (Abb. 54, Anhang A: Tab. 31) korrelierten nicht mit den Schwermetallgehalten der Proben. In der Probe des Standortes H4 war kein GSH nachweisbar.

Neben PC₄ wurden in allen Proben, mit Ausnahme der Standorte H3 und H4, weitere thiolhaltige Verbindungen nachgewiesen, die jedoch nicht quantifiziert wurden.

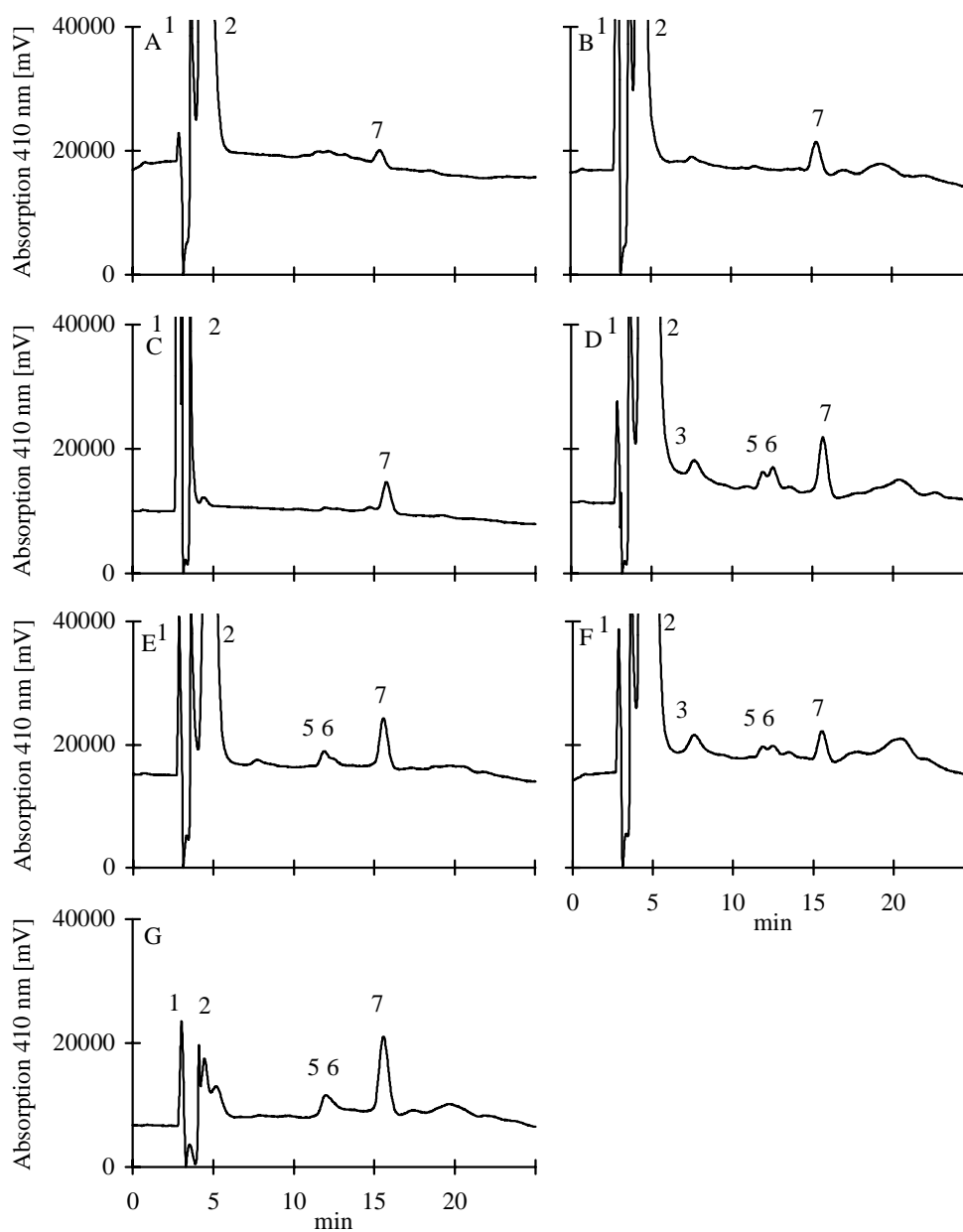


Abb. 52: HPLC-Chromatogramme thiolhaltiger Verbindungen in *F. antipyretica* nach Exposition an extrem belasteten Standorten. A = Kontrolle, B = H3, C = H4, D = H5, E = H6, F = H7, G = H8. 1: Cys, 2: GSH + γ -Glu-Cys, 3: nicht identifiziert (Kap. 3.5.5), 5: PC₃, 6: nicht identifiziert, 7: PC₄, 8: PC₅(?) (Kap. 3.5.2), Extraktion 3 (Kap. 2.5.1, Tab. 5), Standorte: Kap. 2.2.2, Tab. 3.

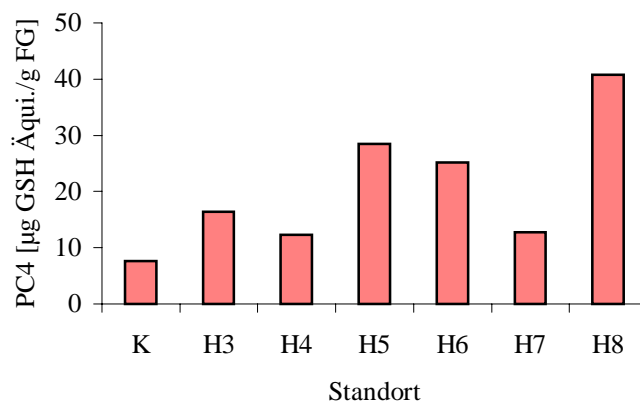


Abb. 53: PC₄-Gehalte in *F. antipyretica* nach Exposition an hoch belasteten Standorten und in der Kontrolle (K), Extraktion 3 (Kap. 2.5.1, Tab. 5), n = 1, Standorte: Kap. 2.2.2, Tab. 3.

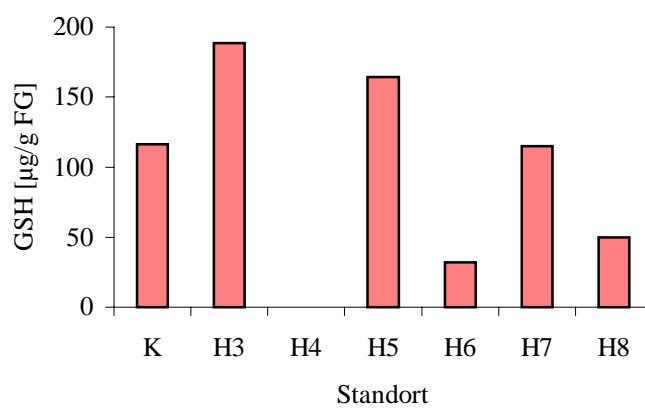


Abb. 54: GSH-Gehalte in *F. antipyretica* nach Exposition an hoch belasteten Standorten und in der Kontrolle (K), Extraktion 3 (Kap. 2.5.1, Tab. 5), n = 1, Standorte: Kap. 2.2.2, Tab. 3.

4 Diskussion

4.1 Schwermetallakkumulation im aktiven Biomonitoring in der Elbe

Während der Exposition in der Elbe im Oktober/November 1994 und November/Dezember 1995 akkumulierte *F. antipyretica* signifikante Mengen an Schwermetallen (Kap. 3.2, Abb. 7 und 8). Durch die Fixierung der Proben im freien Wasserkörper verbesserten sich die Akkumulations-eigenschaften des Pflanzenmaterials gegenüber vorangegangenen Untersuchungen im November/Dezember 1993 und Mai/Juni 1994 (nicht dargestellt) (SIEBERT, 1994; BRUNS et al., 1997). In diesen Versuchen wurden die Proben ohne Schwimmer ausgebracht, was ein Absinken auf das Sediment ermöglichte und die Akkumulation aus dem Wasser beeinträchtigte.

Möglicherweise hat auch der ursprüngliche Schwermetallgehalt des Pflanzenmaterials einen Einfluß auf die Akkumulationsleistung des Mooses. Die Schwermetallgehalte des im Oktober/November 1994 und November/Dezember 1995 verwendeten Materials lagen in der Größenordnung der aus der Literatur bekannten Hintergrundbelastungen für *F. antipyretica* bzw. *F. squamosa* unbelasteter Standorte (Tab. 20). Dagegen lagen diese im Ausgangsmaterial der vorangegangenen Expositionen deutlich höher (Tab. 20).

Tab. 20: Hintergrundbelastungen von *F. antipyretica* (und *F. squamosa*, GONCALVES et al., 1994), [$\mu\text{g/g}$ TG].

Exposition	Cd	Pb	Zn	Cu
Nov./Dez. 1993 (SIEBERT, 1994)	4,2	53	809	45
Mai/Juni 1994 (SIEBERT, 1994)	12,1	199	2303	154
Okt./Nov. 1994	0,9	6	289	20
Nov./Dez. 1995	1,3	14	203	19
GONCALVES et al., 1994	1,0	13	217	36
LOPEZ et al., 1994	1,3	7	84	20

Die Expositionen wurden im Herbst durchgeführt (Kap. 3.2, Abb. 7 und 8). Ein Einfluß der Jahreszeit auf die Akkumulation von Pb ist für *F. antipyretica* bekannt und wird hauptsächlich auf saisonale Änderungen der Gewässerchemie zurückgeführt (WEHR und WHITTON, 1983a).

Das in den Expositionsversuchen eingesetzte Pflanzenmaterial zeigte im Herbst/Winter am natürlichen Standort in der Wipper starken Biomassezuwachs und sichtbar die größte Vitalität. In den Sommermonaten konnten kaum grüne Sproßspitzen gesammelt werden, da die Pflanzen stark zurückgezogen waren (Kap. 3.1). Ältere Pflanzenteile von *F. antipyretica* enthalten höhere Schwermetallgehalte als junge Sproßspitzen (BRUNS et al., 1995; SIEBERT et al., 1996), daher ist die hohe Hintergrundbelastung des Ausgangsmaterials vom Mai/Juni 1994 im Gegensatz zu den im Herbst exponierten Pflanzen (Tab. 20) vermutlich auf den geringen Anteil an jungem Pflanzensegmenten zurückzuführen. Saisonale Schwankungen der Schwermetallakkumulation sind auch für das terrestrische Moos *Polytrichum formosum* bekannt. Diese werden jedoch auf

Verdünnungseffekte durch Biomassezuwachs zurückgeführt (MARKERT und WECKERT, 1989).

Im aktiven Biomonitoring wurden Unterschiede in der Belastung einzelner Standorte deutlich. Auffällig war die geringe Akkumulation an den Standorten 1, 2 und 5 im Jahre 1994, obwohl aufgrund der Wasserdaten (Kap. 3.2, Abb. 7, unfiltriert, lt. GEWÄSSERGÜTEBERICHT SACHSEN-ANHALT, 1994; Anhang A: Tab. 3) von einer hohen Belastung dieser Standorte besonders mit Cd und Zn auszugehen war.

An den Standorten 1 und 2 wurden die Proben in Gewässerabschnitten mit geringer Fließgeschwindigkeit (Hafenanlage und durch dichten Pflanzenbewuchs gekennzeichnete Uferregion) exponiert. Anhand der Wasserwerte filtrierter Proben (eigene Untersuchungen, nicht dargestellt) lag eine geringe Belastung dieser beiden Standorte mit gelösten Schwermetallen vor; Cd, Pb und Cu waren nicht nachweisbar und auch Zn nur in vergleichsweise geringen Mengen (9 µg/L). Probe 5 wurde ebenso an einem Standort mit geringer Fließgeschwindigkeit ausgebracht und akkumulierte nur geringe Mengen an Pb, Zn und Cu.

Da Wassermoose lediglich die im Wasser gelöste Schwermetallfraktion anreichern (EMPAIN, 1988), sind auch die in *F. antipyretica* gemessenen Schwermetallgehalte auf den im Wasser gelösten Anteil dieser Metalle zurückzuführen (partikuläre Verunreinigungen wurden durch Waschen der Proben mit destilliertem Wasser entfernt, Kap. 2.2.1).

Am Standort 6 nahmen alle Elemente im Moos deutlich zu (Kap. 3.2, Abb. 7), obwohl weder Cd noch Pb im Wasser nachweisbar waren (Anhang A: Tab. 3). Es ist anzunehmen, daß diese Metalle, auch wenn sie nur in sehr geringen Mengen vorkamen, zu einem hohen Anteil in der gelösten Form vorlagen.

1995 lagen die Cd-, Pb-, Zn- und Cu-Konzentrationen im Wasser über der Nachweisgrenze (Kap. 3.2, Abb. 8). Daß dennoch an den Standorten 5, 6, 7 und 10 keine Akkumulation von Pb feststellbar war, wird nicht auf Besonderheiten der Standorte zurückgeführt, da im Vorjahr hier Pb deutlich angereichert wurde. Unterschiede im Schwebstoffgehalt des Wassers und damit des Anteils an gelösten Schwermetallen sind möglicherweise die Ursache hierfür. Auch in diesem Zusammenhang könnte der Pb-Gehalt im Ausgangsmaterial eine Rolle spielen, da dieser 1995 ca. 2,5fach über dem des 1994 exponierten Pflanzenmaterials lag. Auffällig waren 1995 die geringen Unterschiede der Cu-Gehalte im Moos, die auf eine gleichmäßigen Cu-Belastung aller Standorte mit gelöstem Cu hindeuten.

Im aktiven Biomonitoring in der Elbe war lediglich 1994 für Cd und Zn eine signifikante Korrelation zwischen den Gehalten des Wassers und des Moores feststellbar (Kap. 3.2.1, Tab. 10). Vermutlich haben auch Umweltfaktoren wie die chemische Zusammensetzung des Wassers und die Konzentrationen an kompetitierenden Ionen wie Ca^{2+} (WELLS und BROWN, 1990) einen Einfluß auf die Akkumulationsleistung des Moores gegenüber Schwermetallen. Verschiedene Autoren beschreiben jedoch für *Fontinalis* eine hohe Korrelation der Schwermetallakkumulation im Moos zu den Wasserbelastungen verschiedener Standorte. KELLY und WHITTON (1989) fanden eine positive Korrelation der Zn- und Pb-Gehalte von *F. antipyretica* zu den Konzentrationen des Wassers. Entsprechende Ergebnisse wurden bei *F. squamosa* für Zn erhalten (SAY et al., 1981).

Die Gegenüberstellung einzelner gewässeranalytischer Daten und Akkumulationsergebnissen aus dem aktiven Biomonitoring ist problematisch. Die hohe Akkumulation von Schwermetallen an einigen Standorten (1994: Pb an Standort 6; 1995: Cd an Standort 7 und 9 sowie Zn an Standort 4) deutet auf kurzfristige Belastungen mit diesen Schwermetallen hin, die jedoch durch die Gewässeranalysen nicht erfaßt wurden. Aufgrund der geringen Streuung der 3fach-Beprobung des Standortes 4 (Kap. 3.2.2, Tab. 12), handelt es sich bei diesen Werten wohl nicht um einen methodischen Fehler. Da die Akkumulation von Schwermetallen in Moosen auf die Fraktion gelöster pflanzenverfügbarer Metalle beschränkt ist (EMPAIN, 1988), sind Daten der Gesamtschwermetallbelastung des Wassers nicht absolut mit den Monitoringergebnissen vergleichbar. Inwieweit die Beurteilung von Standorten auf Grundlage einer Gewässeranalytik oder durch Biomonitoringverfahren den realen Belastungen am nächsten kommt, kann nicht entschieden werden. Im Hinblick auf die Monitoringergebnisse ist jedoch die Aussagekraft punktueller Wasseranalysen zur Erfassung von Gesamtbelastungen innerhalb eines Zeitraumes ungenügend.

Die signifikanten Korrelationen von Cd/Zn, Cd/Cu, Cu/Zn und Pb/Cu im Moos 1994 (Kap. 3.2.1, Tab. 11) spiegeln vermutlich multiple Belastungen der Standorte wider. Dieses ist für Cd/Zn aus den Gewässerdaten (Gesamtschwermetallgehalte lt. GEWÄSSERGÜTEBERICHT SACHSEN-ANHALT, 1994) ersichtlich. Auch von GONCALVES et al. (1994) wurden in *F. antipyretica* bzw. *F. squamosa* Korrelationen der Elemente Cd/Cu und Cd/Zn im passiven Biomonitoring festgestellt. Eine Korrelation von Pb/Cu wie sie 1995 und 1994 in den Moosproben auftrat, wurde auch bei *F. antipyretica* von natürlichen Standorten gefunden (SIEBERT et al., 1996). Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine elementspezifische Korrelation der Schwermetallakkumulation.

Die mittleren Anreicherungsfaktoren gegenüber den Gesamtschwermetallgehalten des Wassers lagen für Cd und Zn im Vergleich zu Pb und Cu deutlich höher (Tab. 21). Im Gegensatz hierzu wurden von anderen Autoren Akkumulationsfaktoren von Cd > Pb > Cu > Zn für *F. antipyretica* (LOPEZ et al., 1994) und Pb > Zn > Cd > Cu für *Rhynchosstegium riparioides* (WEHR und WHITTON, 1983b) ermittelt.

Tab. 21: Mittlere Anreicherungsfaktoren von Cd, Pb, Zn und Cu (\pm Standardabweichungen) in *F. antipyretica* gegenüber dem Wasser im passiven Biomonitoring im Harz sowie im aktiven Biomonitoring in der Elbe. Harz: n = 3 (Cd: n = 4); Elbe 1994: Cd: n = 5; Pb: n = 7; Zn: n = 6; Cu: n = 5; 1995: Cd: n = 6; Zn: n = 6; Cu: n = 6, * Berechnung aufgrund geringer Akkumulation nicht möglich (s. Kap. 3.2, Abb. 8), [$\mu\text{g/g}$ TG].

Mittel + SD	Cd	Pb	Zn	Cu
1994 (Harz) (SIEBERT, 1994)	17500 \pm 9400	8800 \pm 6200	11200 \pm 1500	4550 \pm 1500
1994 (Elbe)	15600 \pm 8700	8100 \pm 7800	12900 \pm 7800	5700 \pm 2700
1995 (Elbe)	13800 \pm 5300	-*	14390 \pm 8000	2500 \pm 630

Die mittleren Anreicherungsfaktoren von *F. antipyretica* gegenüber dem Wasser im aktiven Biomonitoring in der Elbe stimmten in der Größenordnung mit den im passiven Biomonitoring im

Harz ermittelten Werten (Tab. 21, SIEBERT, 1994) überein. Dieses kann nicht befriedigend interpretiert werden. Denkbar wäre die Einstellung eines elementspezifischen Gleichgewichtes gegenüber den Schwermetallgehalten des Wassers.

Die großen Streuungen der Akkumulationsfaktoren sind vermutlich auf standortspezifische Einflüsse wie die Fließgeschwindigkeit, den Schwebstoffgehalt und die chemische Zusammensetzung des Wassers, die den Anteil an gelösten Schwermetallen im Wasser beeinflussen zurückzuführen (HUBER und HUBER, 1995).

Die Befunde belegen, daß *F. antipyretica* im aktiven Biomonitoring geeignet ist über die Akkumulation von Schwermetallen Unterschiede in der Belastung von Standorten anzuzeigen.

4.2 Vitalität des Pflanzenmaterials unter Cadmiumbelastung

In einem 10tägigen Versuch wurde die Vitalität von *F. antipyretica* unter 100 µM Cd und in Kontrollpflanzen ohne Cd-Belastung bestimmt (Kap. 3.3, Abb. 9 - 11). Sowohl in den Kontrollen als auch in den Cd-belasteten Proben nahm das Chlorophyll a/b-Verhältnis um 48,4 % (8. Tag, Kontrolle) und 47,4 % (10. Tag, Cd) ab. Die Gehalte an Chlorophyll a und Chlorophyll b waren am 10. Tag 36,8 bzw. 8,3 % geringer als in der Kontrolle. Das Verhältnis von E₆₆₅/E_{665a} als Maß für die Phaeophytinbildung betrug im Mittel über 10 Tage 1,05 ± 0,02 in den Kontrollen und 1,07 ± 0,04 in den Cd-belasteten Proben. Ein signifikanter Einfluß des Cd auf die Vitalität des Pflanzenmaterials war anhand der untersuchten Parameter nicht feststellbar.

Arbeiten von LOPEZ und CARBALLEIRA (1989) und LOPEZ et al. (1994) an *F. antipyretica* ergaben in Abhängigkeit von der Wasserqualität Chlorophyll a/b-Verhältnisse von 3,4 - 2,2 und E₆₆₅/E_{665a}-Verhältnisse von 1,68 - 1,53. Diese weichen deutlich von den im Laborversuch (Kap. 3.3, Abb. 9 und 11) ermittelten Werten ab.

Da auch in den Kontrollen das Chlorophyll a/b-Verhältnis sowie die Gehalte an Chlorophyll a und b abnehmen wird vermutet, daß die veränderten Licht- und Nährstoffbedingungen im Labor einen größeren Einfluß auf diese Parameter haben als die Inkubation in Cd-haltigem Medium.

Obwohl kein signifikanter Einfluß von 100 µM Cd innerhalb von 10 Tagen auf die Pigmentzusammensetzung von *F. antipyretica* feststellbar war, muß doch von einer Hemmung der Photosyntheseleistung ausgegangen werden. Diese trat bei *Rhytidadelphus squarrosus* bereits nach 30minütiger Cd-Belastung (10 - 1000 µM) auf (WELLS und BROWN, 1995) und führte innerhalb von 72 Stunden nach Cd-Belastung (100 µM Cd) zu einer Abnahme auf ca. 30 % der Kontrolle. Auch für *F. antipyretica* ist die Photosynthesehemmung durch Cd bekannt (SOMMER und WINKLER, 1982). Nach 30 Minuten unter Konzentrationen von 10 - 1000 µM Cd fiel die Photosyntheseleistung in diesem Moos exponentiell zur steigenden Cd-Konzentration ab. Unter 100 µM Cd wurde eine Abnahme auf 68,3 % der Kontrolle beobachtet. Aufgrund der in Kap. 3.7.1, Tab. 17 beschriebenen Cd-Belastung der Pflanzen am natürlichen Standort, könnte jedoch das in den hier vorgestellten Untersuchungen verwendete Pflanzenmaterial weniger sensitiv auf Cd reagieren als das von SOMMER und WINKLER (1982) verwendete.

4.3 Intra- und extrazelluläre Cadmiumaufnahme von *F. antipyretica*

Die Bestimmung der intra- und extrazellulären Cd-Aufnahme von *F. antipyretica* erfolgten nach BROWN und WELLS (1988) durch Waschen des Pflanzenmaterials mit NiCl₂ (Kap. 2.3.4). Ebenfalls WELLS und BROWN (1987) geben für dieses Verfahren eine möglicherweise unvollständige Entfernung des oberflächengebundenen Cd an (von 50 ng/mg TG bei *Rhizidiadelphus squarrosus*), wodurch ein zu hoher Gehalt an intrazellulärem Cd ermittelt wird. Für *F. antipyretica* liegen hierzu bisher keine Daten vor, weshalb im folgenden als "extrazellulär" die durch Ni austauschbare Cd-Menge und als "intrazellulär" der Rest-Cd-Gehalt der Pflanze benannt wird.

Die Untersuchungen wurden über 10 Tage unter 100 µM Cd durchgeführt (Kap. 3.4, Abb. 12 und 13). Bereits nach einem Tag wurden mehr als 90 % (6,22 µg/mg TG) des Cd aus dem Medium vom Pflanzenmaterial aufgenommen.

Der Anteil an "extrazellulärem" Cd nahm vom 1. - 10. Tag von 71,2 auf 48,8 % des Gesamt-Cd ab, wogegen der Anteil an "intrazellulärem" Cd bis zum 9. Tag von 23,2 auf 49,3 % anstieg. Mit einer Streuung von 17,3 % blieb die absolute Menge an "extrazellulär" gebundenem Cd pro mg TG (Mittel über 10 Tage 3,75 µg/mg TG) über 10 Tage relativ konstant, zeigte jedoch eine Tendenz zur Abnahme.

Auch wenn der "intrazelluläre" Cd-Gehalt aufgrund eines unvollständigen Oberflächenaustausches zu hoch ermittelt worden wäre, betrüge die "intrazelluläre" Aufnahme innerhalb von 10 Tagen noch mindestens 1,5 µg/mg TG (vorausgesetzt innerhalb der ersten 24 Stunden würde kein Cd aufgenommen).

Offensichtlich werden in *F. antipyretica* Cd²⁺-Ionen zunächst an die Zellwand gebunden und von dort aus kontinuierlich in die Zellen aufgenommen. Innerhalb der ersten 24 Stunden erfolgt hierbei die Einstellung eines Gleichgewichtes zur Cd-Konzentration des Mediums; gleichzeitig werden weitere Cd²⁺-Ionen aus dem Medium extrazellulär adsorbiert. Auch Untersuchungen an *Rhizidiadelphus squarrosus* zeigten, daß sich bereits 30 min nach Cd-Applikation ein Gleichgewicht zwischen der Cd-Konzentration des Mediums und der Pflanzenoberfläche einstellt (WELLS und BROWN, 1987). Innerhalb von 24 Stunden nach Cd-Belastung waren ca. 15 % des Gesamt-Cd des Pflanzenmaterials in die Zellen gewandert, wobei die Menge an "extrazellulärem" Cd entsprechend abnahm. Auch diese Befunde belegen eine Aufnahme des "extrazellulären" Cd in die Zelle.

Die Cd-Aufnahme in *F. antipyretica* korrelierte mit der pro mg Pflanzenmaterial im Medium enthaltenen Cd-Menge (Kap. 3.4, Abb. 14). Dieses ergaben ebenfalls Arbeiten von LOPEZ et al. (1994) an *F. antipyretica* und von WELLS und BROWN (1987) an *Rhizidiadelphus squarrosus* erhalten. Für weiterführende Untersuchungen ist daher die Einhaltung eines konstanten Verhältnisses zwischen Pflanzenmaterial (FG) und Cd-Gehalt des Mediums zu beachten.

4.4 Induktion von Phytochelatinen im Laborversuch

Die physiologisch/biochemische Reaktion von *F. antipyretica* auf Schwermetalle wurde unter Laborbedingungen untersucht (Kap. 3.5). Durch mehrtägige Inkubation in Cd-haltigem Medium konnte die Synthese von PCs induziert werden (Kap. 3.5.1, Abb. 15). Aufgrund der biologischen Variabilität des Pflanzenmaterials und saisonaler Schwankungen waren die Gehalte dieser Peptide in ihren absoluten Werten jedoch nicht immer reproduzierbar.

Die Identifizierung der PCs aus *F. antipyretica* erfolgte bisher nur über eine Standardaddition von PCs aus Tomatenzellkulturen (Kap. 3.5.2, Abb. 16). Aufgrund der Übereinstimmung der Retentionszeiten wird davon ausgegangen, daß es sich im Moos um PCs der Struktur $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ handelt. Da $\text{PC}_{5(7)}$ nach längerer Cd-Belastung im HPLC-Chromatogramm oft als Doppelpeak erschien, wird die gemeinsame Elution zweier thiolhaltiger Substanzen vermutet. Es wäre daher möglich, daß auch PC-Homologe in *F. antipyretica* vorkommen wie sie von GRILL et al. (1986), KLAPHECK et al. (1994), MEUWLY et al. (1993, 1995) und KUBOTA et al. (1995) in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen wurden (Kap. 1.8).

Bisher wurden PCs in allen untersuchten Pflanzen nachgewiesen (GEKELER et al., 1988, 1989). Tab. 22 stellt die PC-Gehalte unterschiedlicher Pflanzenarten im Vergleich zu eigenen Messungen an *F. antipyretica* und der höheren Wasserpflanze *Elodea canadensis* dar.

Tab. 22: Vergleich der PC-Gehalte unterschiedlicher Pflanzen. Extraktion und HPLC-Analytik nach GRILL et al. (1991). Berechnung entsprechend der $\gamma\text{-Glu-Cys}$ -Einheiten. 1. - 8.: PC-Gehalte verschiedener Pflanzen nach 2 - 4 Tagen unter Einfluß von $100\ \mu\text{M Cd}$ (• + 1 mM Al, + 1 mM Zn), (nach GEKELER et al., 1989, verändert). 9. - 11.: PC-Gehalte von *F. antipyretica* und *Elodea canadensis* nach Inkubation in Cd-haltigem Medium. 9.: 28 Tage $100\ \mu\text{M Cd}$; 10. und 11.: 10 Tage $100\ \mu\text{M Cd}$; * Extraktion 1, ** Extraktion 3 (Kap. 2.5.1, Tab. 5), [nmol/g TG].

Art	Ordnung	PC ₂	PC ₃	PC ₄	PC ₅	PC ₆	gesamt PC
<u>niedere Pflanzen</u>							
1. <i>Marchantia polymorpha</i>	Marchantiales	500	200	0	0	0	1700
2. <i>Selaginella viticulosa</i> •	Selaginellales	200	100	100	0	0	900
3. <i>Lycopodium clavatum</i> •	Lycopodiales	200	0	0	0	0	500
4. <i>Equisetum giganteum</i> •	Equisetales	0	500	200	0	0	2500
5. <i>Azolla filiculoides</i>	Hydropteridales	200	100	0	0	0	700
<u>höherer Pflanzen</u>							
6. <i>Pinus pinea</i>	Pinales	6800	1200	200	0	0	18000
7. <i>Linum usitatissimum</i>	Geraniales	0	1780	460	1030	380	14680
8. <i>Lemna gibba</i>	Arales	540	670	200	0	0	38900
<u>eigene Untersuchungen</u>							
9. <i>F. antipyretica</i> •*	Bryales	0	9	56	32	0	400
10. <i>F. antipyretica</i> **	Bryales	0	0	0	0	0	0
11. <i>Elodea canadensis</i> **	Hydrocharitales	135	670	120	0	0	2520

Die PC-Gehalte von *F. antipyretica* und *E. canadensis* wurden unter den gleichen Bedingungen der Extraktion und Analytik wie die in Tab. 22 aufgeführten Werte (GEKELER et al., 1989) ermittelt, so daß diese miteinander vergleichbar sind. In *F. antipyretica* waren die PC-Gehalte geringer (Tab. 22: 9.) als in anderen niederen Pflanzen (Tab. 22: 1. - 5.) und wurden erst nach einer Inkubationszeit von 28 Tagen in 100 μM Cd erreicht.

Die Kontrollen der unter 1. - 5. beschriebenen Arten enthielten keine PCs (GEKELER et al., 1989), wogegen in allen unbelasteten Proben von *F. antipyretica* insbesondere PC₄ nachweisbar war. Die PC-Gehalte des Moooses sind daher nicht allein auf die Inkubation in Cd-haltigem Medium im Labor zurückzuführen.

Im Vergleich zu höheren Pflanzen enthalten niedere Pflanzen weniger PCs, wobei insbesondere höhermolekulare Peptide wie PC₄, PC₅ und PC₆ nur in geringen Mengen oder gar nicht vorkommen (Tab. 22, GEKELER et al., 1989).

Tab. 22 zeigt unter 10. und 11. einen Vergleich der PC-Gehalte von *F. antipyretica* und der höheren Wasserpflanze *Elodea canadensis* (beide Extraktion 3, Kap. 2.5.1, Tab. 5). Im Vergleich zu 9. (Tab. 22, Extraktion 1) konnten unter 10. keine PCs nachgewiesen werden. Dieses ist auf die Erhöhung des Extraktionsvolumens von Extraktion 1 auf Extraktion 3 (Kap. 2.5.1, Tab. 5) zurückzuführen und nicht auf die kürzere Inkubationszeit.

Daten anderer Autoren lassen sich aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen (Untersuchungsobjekt, Inkubationsbedingungen, Extraktionsmethode, Schwermetall, Inkubationszeit und Bezugsgröße) nur bedingt mit den Ergebnissen an *F. antipyretica* vergleichen.

Die einzigen aus der Literatur bekannten Untersuchungen zur Induktion von PCs in Wassermoosen wurden an *Rhynchostegium riparioides* durchgeführt (JACKSON et al., 1991). Diese zeigen jedoch keine Daten zur Quantität der einzelnen PCs.

In *F. antipyretica* war die PC-Synthese deutlich von der Cd-Konzentration des Mediums abhängig (Kap. 3.5.3, Abb. 17). Nach 21 Tagen unter 0, 50, 100 und 200 μM Cd betragen die PC₄-Gehalte 1,7; 4,6; 9,6 und 4,0 $\mu\text{g/g}$ FG.

Die Abhängigkeit der PC-Synthese von der Schwermetallkonzentration ist auch für andere Pflanzen bekannt (GRILL et al., 1988a; DE KNECHT et al., 1994; AHNER et al., 1994, 1995; AHNER und MOREL, 1995).

Neben der Konzentration an Schwermetallen ist für die PC-Synthese in *F. antipyretica* auch die Dauer der Cd-Belastung ausschlaggebend. Versuche über einen Zeitraum von 35 Tagen wurden durchgeführt. Eine positive Korrelationen der PC-Gehalte zu der Cd-Konzentration des Mediums zeigte sich jedoch erst nach 21 Tagen (Kap. 3.5.3, Abb. 17).

Auch im Vergleich zu eigenen Messungen an *Elodea canadensis* und einer Zellkultur von *Lycopersicon esculentum* verläuft die PC-Induktion in *F. antipyretica* mit einer ersten meßbaren PC-Synthese nach 7 - 14 Tagen unter 100 - 200 μM Cd deutlich langsamer. *L. esculentum* wies bereits 24 Stunden nach Cd-Zugabe deutliche PC-Mengen auf (Kap. 2.7.2, Abb. 6); in *E. canadensis* konnte nach 2 Tagen eine PC-Synthese beobachtet werden (nicht dargestellt).

Viele der in der Literatur dargestellten Untersuchungen wurden an Zellkulturen durchgeführt. In diesen verläuft die Induktion von PCs meist schneller als in ausdifferenzierten Pflanzen. In

Zellkulturen von *Rauwolfia serpentina* (GRILL et al., 1987) und *Datura innoxia* (ROBINSON et al., 1988) wurde bereits unmittelbar nach Cd-Zugabe die Synthese von PCs gemessen. Auch in Tomatenzellkulturen stieg in Abhängigkeit von der Cd-Konzentration bereits nach 4 - 8 Stunden der nicht proteinogene Thiolgehalt deutlich an (SCHELLER et al., 1987).

Das Maximum an PC_{5(?)} wurde in *F. antipyretica* unter 100 µM Cd nach 21 Tagen erreicht, wogegen unter 50 µM Cd der Gehalt dieses Peptides bis zum 28. Tag zunahm. Auch in Cd-toleranten Tomatenzellen wurden unter 6, 4, 2 und 1 mM Cd die maximalen PC-Gehalte nach 4, 8, 10 bzw. 5 Tagen erreicht (GUPTA und GOLDBROUGH, 1991). Offensichtlich ist die Dauer der PC-Akkumulation von der applizierten Schwermetallkonzentration abhängig, wobei unter hohen Schwermetallkonzentrationen der maximale PC-Gehalt früher erreicht wird.

Untersuchungen zur PC-Synthese über einen Zeitraum von 35 Tagen, wie die an *F. antipyretica* durchgeführten, sind aus der Literatur nicht bekannt. Die Abnahme der PC-Akkumulation bzw. der PC-Gehalte nach 28 - 35 Tagen (Kap. 3.5.3, Abb. 17) könnte auf eine Cd-Verarmung des Mediums oder die Einstellung eines Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärem Schwermetallgehalt hinweisen. Bereits 24 Stunden nach Cd-Applikation wurden von *F. antipyretica* mehr als 90 % des Cd aus dem Medium aufgenommen (Kap. 3.4, Abb. 12 und 13). Hiervon waren ca. 70 % an der Pflanzenoberfläche adsorbiert, von wo aus offensichtlich die Aufnahme in die Zelle erfolgt (Kap. 4.3). Über eine Dauer von 35 Tagen liegen bisher keine Befunde hierzu vor. Es muß jedoch in diesem Zeitraum von einer starken Cd-Verarmung des Mediums ausgegangen werden. Auch Versuche an PC-Synthese aus *Silene cucubalus* belegen *in vitro* die Abnahme der PC-Synthese nach Entfernen bzw. Chelatisierung der freien Schwermetalle aus dem Versuchsansatz (LÖFFLER et al., 1989).

Es kann jedoch als Ursache der PC-Abnahme in *F. antipyretica* während 35tägiger Inkubation sowie unter hohen Cd-Konzentrationen auch eine Vitalitätsbeeinträchtigung des Pflanzenmaterials nicht ausgeschlossen werden.

Bei *Silene vulgaris* wurde während des PC-Abbaus die Akkumulation nicht identifizierter Thiole beobachtet, wobei die Cd-Konzentration der Zellen jedoch konstant blieb (DE KNECHT et al., 1995). Möglicherweise sind neben PCs weitere Mechanismen an der Detoxifikation von Cd beteiligt (DE KNECHT et al., 1995). Auch *F. antipyretica* enthielt geringe Mengen nicht identifizierter Thiole (Kap. 3.5.1, Abb. 15, Peak 6), deren Gehalte jedoch nicht mit der Cd-Belastung oder Inkubationsdauer korrelierten. Ob es sich hierbei um Abbauprodukte von PCs handelt, wie sie von DE KNECHT et al. (1995) beschrieben werden, bleibt zu untersuchen.

Im Zusammenhang mit dem geringen PC-Gehalt in *F. antipyretica* spielt möglicherweise auch die Ablagerung von Cd-PC-Komplexen in die Vakuole eine Rolle. In Blättern von *Nicotinianum rustica* Sämlingen wurde die Gesamtmenge an Cd und Cd-bindenden Peptiden in den Vakuolen nachgewiesen, wogegen GSH als Vorstufe der PC-Synthese, in diesen Zellkompartimenten nicht nachgewiesen wurde (VÖGELI-LANGE und WAGNER, 1990). Es wird daher der Transport Cd-bindender Peptide vom Ort der Synthese in die Vakuole vermutet, wo es durch den niederen pH-Wert zur Abspaltung des Schwermetalls kommt (VÖGELI-LANGE und WAGNER, 1990).

Die subzelluläre Verteilung von Schwermetallen in *F. antipyretica* ist bisher lediglich durch mikroskopische Untersuchungen von MOUVET (1985) beschrieben. Diese weisen auf die Ablagerung von Metallen in die Zellwände und Vakuolen hin.

Aufgrund der langsam verlaufenden PC-Synthese in *F. antipyretica* bei gleichzeitiger Cd-Aufnahme ist auch die Beteiligung weiterer Chelatoren, wie organischen Säuren, an der Entgiftung von Schwermetallen denkbar. In Zellkulturen von *Nicotiana tabacum* und *Datura innoxia* wurde zwar eine PC-Synthese beobachtet, diese hatte jedoch keinen Einfluß auf die intrazelluläre Cd-Konzentration, da vermutlich organische Säuren an der Komplexbildung dieser Metalle beteiligt sind (KROTZ et al., 1989). Für *F. antipyretica* liegen bisher keine Daten zum Gehalt an organischen Säuren unter Schwermetallbelastung vor.

Möglicherweise spielt auch S^{2-} eine Rolle bei der Detoxifikation von Cd in *F. antipyretica*, wie es bei verschiedenen Pflanzen beobachtet wurde (REESE et al., 1992; REESE und WINGE, 1988; KNEER und ZENK, 1997). In Cd-PC-Komplexen von *Silene cucubalus* stieg mit der Molmassen auch der Anteil an längerkettigen PCs und S^{2-} an. Nach 7tägiger Cd-Belastung nahm der PC-Gehalt deutlich ab, während sich der Anteil an S^{2-} erhöhte. Es wird vermutet, daß mit der Inkubationszeit die Beteiligung von S^{2-} an der Schwermetallchelatisierung in PC-Komplexen zunimmt, wodurch die in den PCs enthaltenen Aminosäuren dem Grundstoffwechsel zurückgeführt werden können (KNEER und ZENK, 1997).

Es bleibt unklar, ob die vergleichbar geringe Synthese von PCs in *F. antipyretica* durch andere Varianten der Schwermetallstößreaktion wie die Ablagerungen in der Vakuole, die Erhöhung des S^{2-} -Anteils in schwermetallbindenden Komplexen oder die Chelatisierung durch andere organische Verbindungen ergänzt wird. Auf eine Funktion der PC-Metaboliten an der Schwermetallentgiftung in *F. antipyretica* wird in Kap. 4.6 eingegangen.

Nach 10 Tagen unter 100 μM Cd betrug in *F. antipyretica* der "intrazelluläre" Cd-Gehalt 4,2 $\mu\text{mol/g}$ FG (Kap. 3.4). Dieser Wert liegt über den Konzentrationen an PCs von etwa 0,10 $\mu\text{mol/g}$ FG (als $\gamma\text{-Glu-Cys-Einheiten}$). Die geringe PC-Synthese in *F. antipyretica* ist daher vermutlich nicht auf eine zu niedrige intrazelluläre Cd-Konzentration zurückzuführen. Da auch in Freilandpflanzen des Wassermooses *Rhynchosstegium riparioides* nur 0,06 - 0,52 % des Gesamt-Cd in PC-Komplexen nachgewiesen wurden (JACKSON et al., 1991) (Inwieweit es sich hierbei um PCs handelt wird in Kap. 4.6 diskutiert), erfolgt in Moosen die Detoxifikation der Schwermetalle wahrscheinlich nicht allein durch PCs.

Auch die geringe PC-Synthese unter Cd-Einfluß in *F. antipyretica* deutet jedoch zumindest auf eine Beteiligung dieser Peptide an der Entgiftung des Cd hin.

In höheren Pflanzen liegen zwischen 60 und 95 % der Schwermetalle in Form von PC-Komplexen vor (BERNHARD und KÄGI, 1987; VERKLEIJ et al., 1990; GUPTA und GOLDSBROUGH, 1991; MAITANI et al., 1996a).

Die detoxifizierende Wirkung von PCs gegenüber Cd wurde *in vitro* anhand von Aktivitätsbestimmungen an schwermetallsensitiven Enzymen nachgewiesen (KNEER und ZENK, 1992). Das molare Verhältnis von S : Cd in Cd-PC-Komplexen wird von GRILL et al. (1985) und

LÖFFLER et al. (1989) mit 2 : 1 angegeben. *In vitro* Studien von STRASDEIT et al. (1993) belegten jedoch oberhalb von pH 4 die Bildung von Cd(S-Cys)₄ Strukturen (s. a. Kap. 1.8). Der Gehalt an thiolhaltigen Peptiden in diesen Komplexen wurde wie folgt bestimmt: GSH 3,9; PC₂ 1,7; PC₃ 71,0; PC₄ 22,9; PC₅ 3,9; PC₆ 1,1; S²⁻ 1,0; Cd 89,4 µmol. Carboxylgruppen waren nicht an der Cd-Koordination beteiligt (STRASDEIT et al., 1993).

Unter Cd-Einfluß wurden in *F. antipyretica* insbesondere höhermolekulare PCs wie PC₄ und PC_{5(?)} synthetisiert. In den meisten Proben war PC₂ nicht nachweisbar und PC₃ nur mit ca. 10 - 20 % des Gehaltes an PC₄ (bezogen auf GSH-Äquivalente) (Kap. 3.5.3, Abb. 17) Dieses ist ein bemerkenswerter Effekt, da für die Biosynthese höhermolekularer PCs die Addition von γ-Glu-Cys-Einheiten an niedermolekulare PCs erfolgt und diese zuerst synthetisiert werden (GRILL et al., 1987; ROBINSON et al., 1988; TUKENDORF und RAUSER, 1990; MEUWLY und RAUSER, 1992). Auch *in vitro* verläuft die PC-Biosynthese durch die partiell gereinigte PC-Synthase aus *Silene cucubalus* über die Synthese von PC₂, wobei erst im weiteren Verlauf PC₃ und PC₄ im Medium nachzuweisen sind (ZENK, pers. Mitteilung).

Die vermehrte Synthese höhermolekularer PCs, wie bei *F. antipyretica*, wird für andere Pflanzen unter steigenden Schwermetallkonzentrationen beschrieben, wobei die bevorzugte Synthese einzelner PCs neben der Schwermetallkonzentration und Inkubationsdauer auch von der Pflanzenart abhängig ist. So nahm in Cd-toleranten Tomatenzellen unter steigenden Cd-Konzentrationen der Anteil an PC₅ und PC₆ zu (GUPTA und GOLDSBROUGH, 1991). In Wurzeln von Maissämlingen stieg insbesondere der PC₃- und PC₄-Gehalt mit der applizierten Cd-Menge (TUKENDORF und RAUSER, 1990). In *Silene vulgaris* wurde vorwiegend PC₃ synthetisiert (DE KNECHT et al., 1994). Vermutlich sind diese Unterschiede auf Spezifitäten der PC-Synthase in den einzelnen Arten zurückzuführen sowie auf eine artspezifische Dynamik des PC-Pools. Mit zunehmender Kettenlänge der PCs erhöht sich hierbei die Stabilität der Schwermetallbindung, wodurch die Effektivität der Schwermetalldetoxifikation zunimmt (THUMANN et al., 1991; MEHRA et al., 1995).

Die geringe Akkumulation von PC₂ und PC₃ in *F. antipyretica* läßt vermuten, daß PCs mit niederem Molekulargewicht nicht direkt oder nur unmittelbar nach Cd-Applikation an der Detoxifikation dieser Metalle beteiligt sind. Möglicherweise dienen diese unter Schwermetallstreß als Vorstufen der Synthese höhermolekularer PCs und unterliegen einem schnellen regulierten Umsatz, der eine Akkumulation dieser Peptide in den Zellen verhindert.

Da in den ersten Tagen nach Cd-Applikation auch der PC₄-Gehalt des Mooses deutlich abnahm (Kap. 3.5.7, Abb. 20 und 21) wird angenommen, daß dieses PC ebenfalls unmittelbar nach Schwermetallapplikation als Vorstufe längerkettiger PCs (PC_{5(?)}) dient oder zugunsten der Synthese niedermolekularer thiolhaltiger Schwermetallchelatoren wie GSH abgebaut wird.

Möglicherweise übernehmen niedermolekulare PCs in der Zelle auch eine Transportfunktion für Schwermetalle auf höhermolekulare PCs. Dieses konnte für Pb *in vitro* von MEHRA et al. (1995) demonstriert werden. Inwieweit dieses *in vivo* für die Detoxifikation von Schwermetallen von Bedeutung ist, bleibt bisher jedoch offen.

Die Gehalte der einzelnen PCs in *F. antipyretica* schwankten sowohl im Kurz- als auch im Langzeitversuch und korrelierten erst nach 3 Wochen mit der Cd-Konzentration des Mediums (Kap. 3.5.3, Abb. 17). Es wird daher vermutet, daß diese Peptide in *F. antipyretica* in der ersten Zeit nach Schwermetallapplikation einem ständigen Turnover unterliegen.

Über 12 Tage unter 5, 10, 20 und 50 μM Cd standen die PC-Gehalte in keiner Korrelation zu der Cd-Konzentration des Mediums (Kap. 3.5.8, Abb. 22). Der leichte Anstieg des Gehaltes an PC-Vorstufen (GSH + $\gamma\text{-Glu-Cys}$) unter 50 μM Cd, deutet jedoch bei dieser Konzentration auf eine Reaktion des Thiolstoffwechsels hin. Aufgrund der Ergebnisse zur intrazellulären Cd-Aufnahme in *F. antipyretica* (Kap. 3.4, Abb. 13) wird davon ausgegangen, daß ausreichend Cd^{2+} -Ionen in die Zelle gelangten, um auch unter diesen geringeren Cd-Konzentrationen eine PC-Synthese zu induzieren. Am terrestrischen Moos *Rhytidiadelphus squarrosus* konnte gezeigt werden, daß der intrazelluläre Cd-Gehalt unabhängig von der applizierten Konzentration bereits nach 24 Stunden ca. 15 % des Gesamt-Cd der Pflanze beträgt (WELLS und BROWN, 1987).

Auch in allen unbelasteten Kontrollproben von *F. antipyretica* wurden PCs nachgewiesen (Kap. 3.5.3, Abb. 17). Möglicherweise ist dieses auf eine Rolle an der Homöostase essentieller Metalle wie Cu und Zn zurückzuführen. Es wird eine Funktion der PCs an der Homöostase essentieller Metalle im Stoffwechsel vermutet, da bereits die Zn- und Cu-Konzentrationen gebräuchlicher Kulturmedien wie Linsmaier-Skoog, Murashige und Skoog u. a. in Zellkulturen PCs induzieren können (GRILL et al., 1988a). Auch kann *in vitro* durch Zugabe von Cu- bzw. Zn-PC-Komplexe eine Aktivierung metallabhängiger Enzyme erreicht werden (THUMANN et al., 1991).

PCs konnten in *F. antipyretica* bisher nur durch Cd induziert werden. Nach Inkubation mit äquimolaren Konzentrationen an Pb, Zn und Cu (200 μM) war innerhalb von 14 Tagen keine PC-Synthese feststellbar (Kap. 3.5.9, Abb. 23). Cu erwies sich hierbei als toxisch und führte zu einem sichtbaren Vitalitätsverlust der Pflanzen (Chlorosen). Durch Zn- und Cu-Belastung kam es zur Abnahme einzelner PC-Peaks in den HPLC-Chromatogrammen, wohingegen Pb zu keiner Änderung des HPLC-Elutionsprofils führte. Letzteres steht mit Befunden an *Rhynchostegium riparioides* in Einklang, da auch bei diesem Wassermoos keine Bindung von Pb an Thiolpeptid-Komplexen nachweisbar war (JACKSON et al., 1991).

Auch nach Arbeiten von GRILL et al. (1989) ist Cd im Vergleich zu anderen Schwermetallen der effektivste Aktivator der PC-Synthase. In einer Zellkultur von *Rauvolfia serpentina* führten 1000 μM Pb und Zn nur zu 56 bzw. 41 % der unter 100 μM Cd synthetisierten PC-Mengen (GRILL et al., 1987). Vergleichbare Ergebnisse wurden an einer Wurzelkultur von *Rubia tinctorum* erhalten (MAITANI et al., 1996b). Möglicherweise spielen jedoch bei Moosen auch elementspezifische Unterschiede der Ionenaufnahme in diesem Zusammenhang eine Rolle. Cd und Zn werden in Moosen vergleichsweise schnell von extrazellulären Bindungsstellen ins Zellinnere aufgenommen (WELLS und BROWN, 1987, 1990; BROWN und SIDHU, 1992), wogegen Pb eine höhere Zellwandaffinität besitzt und nur langsam in die Zelle gelangt (TYLER, 1990).

Es konnte gezeigt werden, daß die Induktion der PC-Synthese in *F. antipyretica* von den Beobachtungen an anderen Pflanzen abweicht. Die Detoxifikation von Schwermetallen in Moosen

erfolgt vermutlich nicht allein durch PCs, sondern weitere Mechanismen wie die Chelatisierung durch GSH (Kap. 4.6) sind hierbei von Bedeutung.

4.5 Vorkommen einer unbekanntem thiolhaltigen Verbindung

Neben den in Kap. 3.5.3, Abb. 17 beschriebenen PCs war in *F. antipyretica* nach mehrtägiger Cd-Belastung eine weitere thiolhaltige Verbindung nachweisbar (Kap. 3.5.5, Abb. 19) (s. a. Kap. 3.5.1, Abb. 15, Peak 3). Die eindeutige Identifizierung war bisher nicht möglich.

Da diese thiolhaltige Substanz nur unter Cd-Einfluß auftrat und die Gehalte über einen Zeitraum von 35 Tagen vergleichbar zu den PC-Gehalten anstiegen (Kap. 3.5.5, Abb. 19), gehört diese Verbindung vermutlich zur Familie (γ -Glu-Cys)-Peptide. Aufgrund der Retentionszeiten in der HPLC (Kap. 3.5.1, Abb. 15, Peak 3), massenspektrometrischer (Anhang B: Abb. 6) und kapillarelektrophoretischer (Kap. 3.5.6, Tab. 13) Untersuchungen der entsprechenden HPLC-Fractionen handelt es sich hierbei weder um GSH, γ -Glu-Cys, Cys-Gly oder ein aus *F. antipyretica* bekanntes PC.

Aminosäureanalysen dieser Substanz aus *F. antipyretica* ergaben ein Verhältnis von Glu : Cys : Gly von 4,5 : 1 : 0,6. Da eine Molmasse ($M+H^+$) von 407 vermutet wird, kann die Struktur γ -Glu-Cys-Glu jedoch weitgehend ausgeschlossen werden.

In Pflanzen sind bisher drei weitere GSH- und PC-Homologe mit einer abweichenden terminalen Aminosäure bekannt: (γ -Glu-Cys)_n- β -Ala (Homo-PCs, Leguminosen, GRILL et al., 1986; KLAPHECK, 1988), (γ -Glu-Cys)_n-Glu (RAUSER und MEUWLY, 1995; MEUWLY et al., 1995; MEUWLY et al., 1993, *Zea mays*) und (γ -Glu-Cys)_n-Ser (Hydroxymethyl-PCs, *Poaceae*, KLAPHECK et al., 1992, 1994).

Entsprechende Mengen an β -Ala oder Ser, die auf eines dieser bereits bekannten PCs oder GSH-Homologe hindeuten, wurden nicht nachgewiesen. Auch die Massenspektrometrie (Anhang B: Abb. 6) ergab keine Hinweise hierauf.

Da auch verschiedene Glu-Derivate während der Aminosäureanalyse als Glu (Glx) nachgewiesen werden, könnte auch ein Glu-Derivat in diesen Proben enthalten und somit Bestandteil dieser Verbindung sein. Die bisherigen Befunde weisen auf ein γ -Glu-Cys-Peptid mit einer nicht proteinogenen terminalen Aminosäure hin, wie z. B. α -Aminopimelinsäure: HOOC-(CH₂)₄-CH(NH₂)-COOH, MW 175 (KARRER, 1958). Diese wurde in *Asplenium septentrionale* nachgewiesen (KARRER, 1958).

Da die thiolhaltige Substanz im Vergleich zu PC₄ und PC₅ in entsprechenden Mengen vorkam (bis 10,2 μ g/g FG), sollte es sich hierbei nicht um Abbauprodukte der PCs handeln, wie sie von DE KNECHT et al. (1995) beschrieben wurden. Diese akkumulierten während der PC-Abnahme, was für die hier beschriebene Substanz nicht der Fall war (Kap. 3.5.3, Abb. 17 und Kap. 3.5.5, Abb. 19).

4.6 Glutathionpool unter Schwermetalleinfluß

Unter Cd-Einfluß stieg in *F. antipyretica* der extrahierbare GSH-Gehalt von ca. 50 auf 250 - 500 µg/g FG an (Kap. 3.6.2, Abb. 25). Gleichzeitig wurde eine nur geringe und vergleichsweise langsam verlaufende PC-Synthese (Kap. 3.5.3, Abb. 17) gemessen. Eine massive Zunahme des GSH-Gehaltes bei gleichzeitig geringer PC-Synthese unter Schwermetallbelastung wurde bisher an höheren und niederen Pflanzen nicht beobachtet. Im allgemeinen kommt es in Pflanzen unter Schwermetalleinfluß zu einer signifikanten Abnahme des intrazellulären GSH-Gehaltes, die auf die Synthese von PCs zurückzuführen ist (GRILL und ZENK, 1989; RAUSER et al., 1991; TUKENDORF und RAUSER, 1990; MEUWLY und RAUSER, 1992; GUPTA et al., 1995).

Lediglich für einzelne höhere Pflanzen und Pilze ist eine Zunahme an GSH unter Schwermetalleinfluß belegt. In *Zea mays* stieg unter Cu-Einfluß der GSH-Gehalt um 45 % (TUKENDORF und RAUSER, 1990) und ca. 270 % (GALLI et al., 1995) an. In Cd-toleranten Tomatenzellen war der GSH-Pool unter Cd-Belastung um ca. 350 % (CHEN und GOLDSBROUGH, 1994) und bis zu 500 % (GUPTA und GOLDSBROUGH, 1991) erhöht. Im Wildtyp von *Candida glabrata* nahm der GSH-Gehalt nach Cd-Zugabe um 200 % zu (MEHRA et al., 1994). Der hm-GSH-Gehalt in den Sprossen und Wurzeln von *Oryza sativa* stieg unter Cd-Einfluß um 125 % bzw. 40 % an, wobei der GSH-Pool jedoch in den ersten 24 Stunden nach Cd-Applikation abnahm (KLAPHECK et al., 1994). In *Pisum sativum* war der Gehalt an h-GSH nach Cd-Applikation um ca. 200 % erhöht, wohingegen auch hier der GSH-Pool auf ca. 25 % der Ausgangskonzentration abfiel (KLAPHECK et al., 1995). Die Befunde der Autoren werden im Zusammenhang mit der PC-Synthese diskutiert und geben keinen Hinweis auf eine unmittelbare Beteiligung des GSH an der Schwermetalldetoxifikation.

Für Moose liegen bisher keine Daten zum Verhalten des GSH-Pools unter Schwermetallstress vor. Lediglich in einer Arbeit von JACKSON et al. (1991) am Wassermoos *Rhynchosstegium riparioides* zeigt das Reversed-Phase Chromatogramm des Pflanzenextraktes nach Cd-Applikation einen auffällig großen Peak thiolhaltiger Substanz zur Retentionszeit von GSH. Diese Verbindung wurde von den Autoren jedoch nicht identifiziert. Aufgrund der Ergebnisse an *F. antipyretica* und weiteren aquatischen und terrestrischen Moosen (einschließlich *Rhynchosstegium riparioides*, nicht dargestellt) ist vermutlich ein wesentlicher Anteil der von JACKSON et al. (1991) mit diesem Peak nachgewiesenen thiolhaltigen Verbindungen auf GSH zurückzuführen.

Im Vergleich zu anderen Pflanzen unter verschiedenen Umweltbedingungen lagen die extrahierbaren GSH-Gehalte in *F. antipyretica* um das 3 - 25fache höher (Tab. 23).

Die Erhöhung des GSH-Pools in *F. antipyretica* bis zum 10fachen der Kontrolle bei gleichzeitig geringer PC-Synthese läßt die Hypothese zu, daß in diesem Moos GSH als direkter Schwermetallchelator fungiert und diese in der Zelle entgiftet.

Tab. 23: Gehalte an extrahierbarem GSH in Pflanzen unter verschiedenen Einflußfaktoren.

Art	Autor	GSH [$\mu\text{mol/g FG}$]	Einfluß
<i>Zea mays</i>	TUKENDORF und RAUSER (1990)	0,64 - 0,66	-
<i>Zea mays</i>	GALLI et al. (1995)	0,3 - 0,35	Cu
<i>Arabidopsis thaliana</i>	HOWDEN et al. (1995)	0,18 - 0,25	-
<i>Lycopersicon esculentum</i>	CHEN und GOLDSBROUGH (1991)	0,45	Cd
<i>Lycopersicon esculentum</i>	GUPTA und GOLDSBROUGH (1991)	0,41	Cd
<i>F. antipyretica</i>	ROY et al. (1994)	0,07 - 0,085	BaA, BaP
<i>F. antipyretica</i>	eigene Untersuchungen	0,065 - 0,13	-
<i>F. antipyretica</i>	eigene Untersuchungen	1,63	Cd

Die GSH-Gehalte in *F. antipyretica* betragen bis zu 0,5 mg/g FG, entsprechend einer Konzentration von 1,63 $\mu\text{mol/g FG}$. Im Vergleich zur "intrazellulären" Cd-Konzentration nach Applikation von 100 $\mu\text{M Cd}$ (Kap. 3.4, Abb. 13) von bis zu 3,17 mg/g TG (entsprechend 4,3 $\mu\text{mol/g FG}$) liegt in der Zelle ein Verhältnis von Cd : GSH von 1 : 0,4 vor. Selbst wenn der tatsächliche intrazelluläre Cd-Gehalt aufgrund eines Restgehaltes an "extrazellulärem" Cd unter dem ermittelten Wert liegt, kann noch von einer tatsächlichen "intrazellulären" Aufnahme von 2,1 $\mu\text{mol/g FG}$ innerhalb von 10 Tagen ausgegangen werden (Kap. 4.3). Bei einer Wiederfindung von nur ca. 50 % des GSH (Kap. 2.5.1) könnte der tatsächliche GSH-Gehalt in der Zelle bei 3,3 $\mu\text{mol/g FG}$ liegen. In diesem Fall betrüge das intrazelluläre Verhältnis von Cd : GSH 1 : 1,6. Vermutlich liegt *in vivo* das Verhältnis von Cd zu GSH zwischen diesen extremen Beispielen.

In biologischen Systemen wird von einer Cd-GSH Bindung im Verhältnis 1 : 2 ausgegangen (RABENSTEIN, 1989). Chemisch erfolgt die Chelatisierung eines Cd^{2+} -Ions als Thiolatbindung über die SH-Gruppen zweier GSH-Moleküle. Der pk-Wert der SH-Gruppe des GSH liegt im Bereich von 9,1 bis 9,9, wobei die dissoziierte Form bei einem pH-Wert über 7,0 auftritt (RABENSTEIN, 1989). *In vitro* Untersuchungen ergaben, daß bei einem Überschuß an GSH und einem physiologischen pH-Wert von 7,0 zu 55 % ein Cd-GSH-Komplex im Verhältnis von 1 : 2 vorliegt (DIAZ-CRUZ et al., 1997). Bei einem Überschuß an Cd kann es jedoch auch zur Komplexbildung mit GSH im Verhältnis 1 : 1 kommen, wobei 2 Cd^{2+} -Ionen durch 2 GSH-Moleküle gebunden werden. Hierbei ist eine Aminogruppe an der Cd-Koordination beteiligt (DIAZ-CRUZ et al., 1997). Ob dieses zweite Modell der Komplexbildung *in vivo* eine Rolle spielt, ist unklar. Es liegen jedoch Cd und GSH in *F. antipyretica* in einem stöchiometrischen Verhältnis vor, welches eine Komplexbildung von GSH und Cd in der Zelle möglich erscheinen läßt. Diese Vermutung würde allerdings eine unterschiedliche Kompartimentierung von Cd und GSH in der Zelle unberücksichtigt lassen.

Für tierische Zellen und Hefen ist die Bildung von Schwermetall-GSH-Komplexen bekannt. Aus der Hefe *Candida glabrata* wurden Cd-S-Komplexe isoliert, die von GSH und $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$ -Peptiden bedeckt waren (DAMERON et al., 1989). Hiermit wurde zum ersten Mal die Bildung von Cd-GSH

Komplexen in biologischen Systemen nachgewiesen.

Da nach eigenen Untersuchungen (nicht dargestellt) die Bildung von Cd-GSH-Komplexen in einem Gemisch von Cd und GSH als Reinsubstanzen auch spontan erfolgen kann, könnte der Nachweis solcher Komplexe aus biologischen Rohextrakten jedoch eventuell auch auf eine Chelatbildung während der Probenvorbereitung zurückzuführen sein.

FREEDMANN et al. (1989) belegten die Chelatisierung von Cu durch GSH in tierischen Systemen. Hiernach lagen in Leberzellkulturen mehr als 60 % des im Cytoplasma enthaltenen Cu als Cu-GSH-Komplex vor. Da die Hemmung der GSH-Synthese zu einem verringerten Cu-Einbau in Metallothioneine führte, wird auf einen Transport von Cu-GSH-Komplex zu den Metallothioneinen geschlossen. Auch in *Homarus americanus* (Hummer) konnte die Bildung von Cu-GSH-Komplexen nachweisen werden (BROUWER und BROUWER-HOEXUM, 1991).

Für Pflanzen liegen bisher keine Beweise für eine Schwermetallchelatisierung durch GSH *in vivo* vor. Aus der Literatur ergeben sich jedoch einige Hinweise, daß GSH in diesem Zusammenhang in pflanzlichen Zellen von Bedeutung ist. So enthielten Wurzelhaarkulturen von *Rubia tinctorum* bereits vom ersten Tag nach Cd-Applikation eine konstante Cd-Konzentration, wogegen der Gehalt an Cd-bindenden Peptid-Komplexen noch über einige Tage zunahm (MAITANI et al., 1996a). Es wäre daher möglich, daß in der ersten Zeit nach Cd-Aufnahme entweder eine unterschiedliche Kompartimentierung des Cd in den Zellen vorliegt (MAITANI et al., 1996a) oder andere Substanzen die Funktion der PCs übernehmen.

Die Arbeit von JACKSON et al. (1991) gibt nach den Untersuchungen an *F. antipyretica* einen Hinweis auf eine schwermetallbindende Funktion des GSH in Moosen. Nach Inkubation in Cd-haltigem Medium (100 µM) waren 87 % des im Extrakt von *Rhynchostegium riparioides* enthaltenen Cd an niedermolekulare thiolhaltige Peptide gebunden. Sollte es sich, wie bereits beschrieben, bei den dargestellten thiolhaltigen Verbindungen zum Großteil um GSH handeln, wäre auch dies ein Indiz für die Bildung von Cd-GSH Komplexen in Moosen.

Das Vorkommen von GSH in Schwermetall-PC-Komplexen ist bereits bekannt. PLOCKE und KÄGI (1992) identifizierten aus *Schizosaccharomyces pombe* unter Schwermetalleinfluß Komplexe aus verschiedenen thiolreichen Peptiden, die auch GSH enthielten. Auch PC-Cd-Komplexe aus *Rauvolfia serpentina* enthielten neben unterschiedlichen PCs 3,7 % GSH (STRASDEIT et al., 1993).

Die von FREEDMANN et al. (1989) für tierische Systeme diskutierte Transportfunktion von GSH-Schwermetallkomplexen wäre auch bei Moosen eine mögliche Erklärung für den starken Anstieg des GSH-Pools unter Schwermetallbelastung. Da mikroskopische Untersuchungen an Blättern von *F. antipyretica* eines belasteten Standortes eine Anhäufung von Partikeln mit hoher Elektronendichte in den Zellwänden und Vakuolen zeigen (MOUVET, 1984), kann auf die Ablagerung von Metallen in diesen Zellkompartimenten geschlossen werden. GSH als Transportmolekül für Schwermetalle in die Vakuole wäre in diesem Zusammenhang vorstellbar.

In vitro können Cu (I)-Ionen von GSH auf PCs übertragen werden (MEHRA und MULCHANDANI, 1995). Entsprechende Ergebnisse liegen auch für Pb vor (MEHRA et al., 1995), weshalb GSH auch *in vivo* als primärer Schwermetallchelator in Organismen ohne

Metallothionein I- oder Metallothionein II-Synthese, wie Pflanzen und einigen Pilzen, diskutiert wird (MEHRA et al., 1995).

Nach Untersuchungen von HOWDEN et al. (1995) an einer PC-Synthase negativen Mutante von *Arabidopsis thaliana* war die Sensitivität gegenüber Cd nach Hemmung der GSH-Synthese durch BSO (Hemmstoff der γ -Glu-Cys-Synthetase) gegenüber dem Wildtyp nicht signifikant erhöht. Die Autoren gehen daher nicht von einer maßgeblichen Funktion des GSH an der Schwermetallentgiftung aus (HOWDEN et al., 1995). Die in dieser Arbeit dargestellten Werte zeigen jedoch unter 0,15 - 1,5 μ M Cd eine Abnahme der Biomasseproduktion um ca. 10 - 30 % bei der mit Cd + BSO behandelten Mutante gegenüber der nur mit Cd (ohne BSO) inkubierten Mutante (HOWDEN et al., 1995). Im Gegensatz zu den Aussagen der Autoren, deutet dieses auf eine Funktion des GSH an der Schwermetallentgiftung in *Arabidopsis* hin.

Die Chelatisierung von Schwermetallen durch GSH zur Detoxifizierung oder als Transportform dieser Metalle könnte die schnelle und hohe GSH-Synthese bei gleichzeitig geringer und langsamer PC-Induktion in Moosen erklären. Der Vorteil gegenüber der Chelatisierung durch PCs wie bei höheren Pflanzen und Algen (GEKELER et al., 1988, 1989) bleibt jedoch fraglich, insbesondere da die Effektivität der Detoxifikation von Schwermetallen durch GSH im Vergleich zu PCs 1000fach geringer ist (KNEER und ZENK, 1992).

Nach 5tägiger Inkubation in Medium mit 100 μ M Cd war die extrahierbare GSH-Synthetase-Aktivität im Rohextrakt von *F. antipyrretica* bis zu 100 % gegenüber der Kontrolle erhöht. Ein signifikanter Einfluß von Cd auf die spezifische Aktivität des partiell gereinigten Enzyms war jedoch nicht feststellbar (AUGUSTIN, 1996). Dieses steht nicht im Widerspruch zu den Befunden anderer Autoren an Pflanzen, deren Schwermetallchelatisierung vorwiegend durch PCs erfolgt. In *Petroselinum crispum* und *Nicotiana tabacum* war unter Cd-Einfluß *in vivo* die GSH-Syntheserate um das 7 - 10fache erhöht, wobei jedoch der intrazelluläre GSH-Gehalt um über 60 % abnahm (SCHNEIDER und BERGMANN, 1995). Eine signifikante Zunahme der extrahierbaren GSH-Synthetase-Aktivität wurde lediglich für Tabak nachgewiesen (SCHNEIDER und BERGMANN, 1995). Auch in *Pisum sativum* stieg die extrahierbare GSH-Synthetase-Aktivität unter Cd um mehr als 300 % (RÜEGSEGGER et al., 1990) bzw. bis auf 510 % der Kontrolle an (KLAPHECK et al., 1995).

Inwieweit die Erhöhung des GSH-Pools in Moosen auf eine Steigerung der Aktivitäten der GSH-Synthetase und γ -Glu-Cys-Synthetase durch Schwermetalle *in vivo* oder auf die Induktion der Enzym-Neusynthese zurückzuführen ist, bleibt zu klären. Ebenso könnte als Ursache für die starke GSH-Akkumulation eine verringerte Aktivität bzw. ein geringerer Gehalt an PC-Synthase in Moosen in Betracht kommen, wobei die Akkumulation von GSH auf einen minimalen GSH-Verbrauch zur PC-Synthese zurückzuführen wäre. Entsprechende Ergebnisse ergaben Untersuchungen an PC-Synthase negativen Mutanten von *Arabidopsis thaliana* (HOWDEN et al., 1995). In diesen Mutanten stieg unter 30 μ M Cd der GSH-Pool auf 200 - 300 % der Kontrolle an.

Orte der GSH-Synthese pflanzlicher Zellen sind die Chloroplasten und das Cytoplasma (KLAPHECK et al., 1987; HELL und BERGMANN, 1988), wobei die intrazelluläre Verteilung

auf Chloroplasten und Cytoplasma zwischen einem Verhältnis von 50 : 50 und 70 : 30 variiert (ALSCHER, 1989). Die Regulation des GSH-Spiegels pflanzlicher Zellen erfolgt über Feedback-Hemmung der γ -Glu-Cys-Synthetase durch GSH (MEISTER und ANDERSON, 1983; HELL und BERGMANN, 1990; SCHNEIDER und BERGMANN, 1995). Möglicherweise ist die Feedback-Regulation jedoch nicht der einzige Mechanismus, der die intrazelluläre GSH-Synthese kontrolliert, da Pflanzen nach Herbizidbehandlung ebenfalls einen erhöhten GSH-Gehalt aufweisen können (BERGMANN und RENNENBERG, 1993).

Sollte in Moosen eine Feedback-Regulation der γ -Glu-Cys-Synthetase durch GSH erfolgen, muß eine unterschiedliche intrazelluläre Kompartimentierung der γ -Glu-Cys-Synthese und GSH-Akkumulation diskutiert werden. Die zur Quantifizierung des GSH-Gehaltes in *F. antipyretica* eingesetzten Methoden (Kap. 2.5.1 und Kap. 2.5.4) erlaubten bisher nur eine Bestimmung des intrazellulären Gesamt-GSH-Pools. Die Lokalisation von GSH in den Zellen von *F. antipyretica* bleibt zu untersuchen.

Die Ablagerung von oxidiertem GSH in der Vakuole, wie sie an isolierten Vakuolen von Gerste gezeigt wurde (DIETZ et al., 1992), wäre eine Möglichkeit der intrazellulären Kompartimentierung. Hierdurch könnte eine starke Akkumulation von GSH in den Chloroplasten oder im Cytoplasma vermieden und die Feedback Hemmung der γ -Glu-Cys-Synthetase umgangen werden. Die bisherigen Befunde sprechen jedoch dagegen (Kap. 3.6.11, Tab. 16), daß es in *F. antipyretica* unter Cd-Einfluß zur Oxidation von GSH kommt. Inwieweit auch die Aufnahme von Cd-GSH-Komplexen in die Vakuole stattfinden kann, ist nicht bekannt.

Unter Schwermetalleinfluß nahm der GSH-Anstieg in *F. antipyretica* einen bimodalen Verlauf, wobei es bis etwa zum 5. Tag zu einer starken Erhöhung kam und bis zum 10. Tag der GSH-Gehalt um ein erhöhtes Niveau schwankte (Kap. 3.6.2, Abb. 25). Dieser Effekt war mehrfach reproduzierbar. Ob die bimodale Änderung des GSH-Pools auch unter Freilandbedingungen auftritt oder auf die Laborkultur zurückzuführen ist, kann nicht gesagt werden. Möglich wäre eine Änderung des Thiolhaushaltes unter Schwermetalleinfluß, durch die nach etwa 5 Tagen der GSH-Gehalt der Zellen auf einem erhöhten Level neu reguliert wird. Bisher ist dieses jedoch hypothetisch. Da GSH auch als Schwefelspeicher fungiert (RENNENBERG, 1982), unterliegt möglicherweise auch der unter Schwermetallstreß induzierte erhöhte GSH-Spiegel einem ständigen Turnover. Ebenso werden vermutlich auch die für die PC-Synthese benötigten, wenn auch nur geringen, Mengen an GSH diesem Pool entnommen.

Unter konstanten Nährstoff- und Cd-Konzentrationen war dieser bimodale Verlauf ebenfalls zu erkennen (Kap. 3.6.7, Abb. 28), es ist daher nicht anzunehmen, daß eine Nährstoff- oder Cd-Verarmung des Mediums Ursache hierfür ist. Da sich vermutlich bereits in den ersten 24 Stunden nach Cd-Applikation ein Gleichgewicht zwischen Pflanzenoberfläche und Medium einstellt bzw. eine Sättigung der extrazellulären Bindungsstellen stattfindet (Kap. 4.3), kann auch durch eine kontinuierliche Cd-Zugabe die absolute Menge des extrazellulär gebundenen Cd nicht wesentlich erhöht werden.

Ein weiterer Anstieg des GSH-Gehaltes war auch zu beobachten, wenn nach 3tägiger Inkubation das Cd aus dem Medium entfernt wurde (Kap. 3.6.9, Abb. 31). Dies kann auf die Depotwirkung

der Zellwand Cd (Kap. 4.3) zurückgeführt werden, wodurch trotz eines Cd-freien Mediums noch ausreichend Cd von extrazellulären Bindungsstellen in die Zelle gelangt, um einen weiteren GSH-Anstieg zu induzieren. BROWN und SIDHU (1992) und WELLS und BROWN (1990) beobachteten ebenfalls, daß Metallionen in Moosen zunächst an die Zellwand gebunden werden und im folgenden ins Zellinnere gelangen. Bei *Rhytidiadelphus squarrosus* betrug die intrazelluläre Cd-Aufnahme innerhalb von 24 Stunden ca. 15 % des Gesamt-Cd (WELLS und BROWN, 1987).

Junge Sproßspitzen von *F. antipyretica* enthielten gegenüber älteren Pflanzenteilen eine höhere GSH-Menge (+ 30 - 55 %) (Kap. 3.6.10, Abb. 32). Unter Cd-Belastung nahm in den älteren Abschnitten der GSH-Gehalt innerhalb von 6 Tagen nur um ca. 200 % zu, wogegen der GSH-Pool junger Sproßspitzen bis auf 500 % der Kontrolle anstieg. Unterschiede im GSH-Gehalt traten auch in jungen und älteren Wurzelsegmenten von Maispflanzen auf (TUKENDORF und RAUSER, 1990), wobei die 1-cm-Wurzelspitzen und die 1 - 10-cm-Segmente der Kontrollpflanzen 196 bzw. 129 µg/g FG GSH enthielten. In den mit 3 µM Cd inkubierten Wurzelspitzen betrug der GSH-Gehalt nach einem Tag 159 µg/g FG (1 cm) bzw. 48 µg/g FG GSH (1- 10 cm). Entsprechende Ergebnisse wurden auch von RÜEGSEGGER und BRUNOLD (1993) an den Wurzeln 3 Tage alter Maissämlinge gegenüber 7 und 11 Tage alten Pflanzen erhalten. Der Vergleich zu Moosen ist jedoch nur bedingt möglich, da es sich hierbei um Organe höherer Pflanzen handelt.

Für die Versuche mit *F. antipyretica* wurden nur grüne voll beblätterte Pflanzenteile verwendet. Ablagerungen auf den Blattoberflächen waren nicht sichtbar. Da keine mikroskopischen Untersuchungen erfolgten, können jedoch geringe Mengen an Fe-Mn Niederschlägen auf älteren Pflanzensegmenten nicht ausgeschlossen werden. Diese Ablagerungen treten auf älteren Pflanzenteilen von Wassermoosen auf und können Metallionen adsorbieren (WEHR und WHITTON, 1983b). Hierdurch könnte die Cd-Aufnahme in den älteren Pflanzenteilen verlangsamt werden. Möglicherweise spielt auch die unterschiedliche Ausbildung der Zellwände und Bindungsstellen für Schwermetalle eine Rolle, da sich der Gehalt an Polyuronsäuren mit dem Alter der Pflanze verändert. Dieses geht auf Arbeiten von BROWN und SIDHU (1992) zurück, wonach der höhere Schwermetallgehalt älterer Moossegmente auf eine erhöhte Kationenaustauschkapazität der Zellwände gegenüber jungen Pflanzenteilen zurückzuführen ist.

Neben Cd führten auch Pb, Zn und Cu zum Anstieg des GSH-Pools von *F. antipyretica* (Kap. 3.6.8, Abb. 30). Cd erwies sich jedoch im Vergleich zu diesen Elementen als effektivstes Metall (Kap. 3.6.8, Abb. 29). Es wäre denkbar, daß diese elementspezifischen Unterschiede der GSH-Induktion in einer differentiellen Aktivierung der an der GSH-Synthese beteiligten Enzyme begründet sind. Dieses ist für die PC-Synthase bekannt (GRILL et al., 1989) (s. a. Kap. 4.4). Unterschiedliche Zellwandaffinitäten und Aufnahmemechanismen für Cd, Pb, Zn und Cu könnten ebenso Ursache für diese elementspezifischen Unterschiede sein. Nach LOPEZ et al. (1994) erfolgt die Akkumulation von Schwermetallen in *F. antipyretica* in der Reihenfolge Cd > Pb > Cu > Zn. Es ist jedoch unklar, inwieweit diese Reihung auch auf die intrazelluläre Ionenaufnahme zutrifft. Als Ursache der unterschiedlichen GSH-Induktion durch Cd, Pb, Zn und Cu wirken vermutlich mehrere der Mechanismen zusammen.

Innerhalb der ersten 2 Stunden nach Cd-Zugabe nahm in *F. antipyretica* der GSH-Pool um ca. 50 % ab (Kap. 3.6.12, Abb. 33). Da die PC-Synthese erst nach mehreren Tagen einsetzte (Kap. 3.5.3, Abb. 17) und sich der PC-Gehalt in den ersten Tagen nach Cd-Zugabe zunächst verringerte (Kap. 3.5.7, Abb. 20 und 21), kann diese Abnahme nicht mit einem Verbrauch des GSH zur Synthese höhermolekularer γ -Glu-Cys-Peptide erklärt werden. Ebenso nahm auch der Gehalt an Cys innerhalb der ersten 2 Stunden nach Cd-Applikation ab. Der GSH-Abbau erfolgt daher vermutlich auch nicht zugunsten einer Erhöhung des Gehaltes dieser Substanzen.

Die intrazelluläre Cd-Aufnahme im terrestrischen Moos *Rhytidiadelphus squarrosus* beginnt wenige Minuten nach Cd-Applikation (WELLS und BROWN, 1987). Vorausgesetzt die Cd-Aufnahme in *F. antipyretica* verläuft ebenso schnell, könnte die Abnahme des Thiolpeptidpools zeitlich mit einer ersten intrazellulären Cd-Aufnahme einhergehen. Möglicherweise wird ein erhöhter Schwefelbedarf aufgrund der intrazellulären Cd-Aufnahme in den ersten Stunden über den Abbau thiolhaltiger Peptide gedeckt.

Da anzunehmen ist, daß sowohl der GSH-Pool als auch dessen Vorstufen in *F. antipyretica* einem ständigen Turnover unterliegen, könnte es durch die intrazelluläre Cd-Aufnahme zu einem Eingriff in den Schwefelhaushalt kommen, der zur Neuregulation des Schwefelstoffwechsels führt. Da auch der Gesamtthiolpool unter Schwermetalleinfluß ansteigt (Kap. 3.6.1, Abb. 24 und Kap. 3.6.4, Abb. 26), wäre unter diesen Bedingungen eine Erhöhung der Sulfatreduktion denkbar, wie sie bei *Zea mays* unter Cd-Einfluß beobachtet wurde (NUSSBAUM et al., 1988).

Die Befunde zur Reaktion des GSH-Pools von *F. antipyretica* auf Schwermetalle, insbesondere Cd, lassen eine direkte Chelatisierung und Detoxifikation dieser Metalle durch GSH vermuten. Allerdings ist GSH in Pflanzen auch an einer Vielzahl weiterer Prozesse beteiligt, die dem Schutz gegenüber Schädigungen durch extreme Umweltbedingungen dienen (LAMOUREUX und RUSNESS, 1993; DALTON, 1995; KRANNER und GRILL, 1996). Die Erhöhung des GSH-Pools in Moosen könnte daher auch lediglich eine unspezifische Reaktion auf Streß sein.

Der GSSG-Gehalt pflanzlicher Zellen beträgt normalerweise weniger als 5 % des Gesamt-GSH-Gehaltes (RENNENBERG und BRUNOLD, 1994). Unter Streßbedingungen kann es zu einer Erhöhung des GSSG-Anteils kommen, der von einer Zunahme des Gesamt-GSH-Gehaltes begleitet sein kann. Dieses wurde nach Hg-Applikation bei der Grünalge *Cosmarium conspersum* beobachtet (AGRAWAL und CHAUDHARY, 1993). In dem Moos *Tortula ruralis* stieg unter Trockenstreß Anteils an GSSG am Gesamt-GSH-Gehalt von ca. 5 auf 45 % an (DHINDSA, 1987).

Erste Messungen zum Oxidationsstatus von GSH in *F. antipyretica* ergaben jedoch keine Hinweise auf die Entstehung von oxidativem Streß unter Cd-Einfluß (Kap. 3.6.11, Tab. 16). Mit 23,9 $\mu\text{g/g}$ FG in der Kontrolle und 28,0 $\mu\text{g/g}$ FG in den 7 Tage mit 100 μM Cd belasteten Proben war der GSSG-Gehalt unter Cd-Belastung nicht signifikant verändert. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit Arbeiten von DE VOS et al. (1992) an *Silene cucubalus*. Im Gegensatz zu Cu wurde durch Cd der GSSG-Gehalt nicht erhöht und es wurden keine Lipidperoxydationsprodukte wie sie unter Cu-Belastung entstehen gemessen.

Aktivitätsbestimmungen der GSSG-Reduktase aus Rohextrakten von *F. antipyretica* (nicht dargestellt) ergaben in ersten Untersuchungen einen 100%igen Aktivitätsverlust des Enzyms nach

24 Stunden unter 100 μM Cd. Diese Hemmung war jedoch durch den Zusatz von EDTA zum Testansatz (50 mM) teilweise reversibel. Inwieweit die Cd-Sensitivität dieses Enzyms *in vivo* für den Oxidationsstatus des GSH in *F. antipyretica* eine Rolle spielt, bleibt zu klären.

Neben dem GSH-Gehalt nahm auch der GSTH-Pool während 10 Tagen unter 100 μM Cd von 149,9 auf 401,8 $\mu\text{g/g}$ FG zu (Kap. 3.6.1, Abb. 24). Der GSTH-Gehalt lag hierbei um den Faktor 0,5 - 2,2 über dem Gehalt an GSH (auf Grundlage der GSH-Äquivalente). Diese Mengen an Restthiolen können weder auf den Gehalt an Cys, γ -Glu-Cys noch auf die Synthese von PCs zurückgeführt werden, da die Summe dieser Verbindungen unter Cd-Einfluß lediglich 20 - 25 $\mu\text{g/g}$ FG (GSH-Äquivalente) beträgt.

Möglicherweise kommt auch S^{2-} unter Schwermetallbelastung in Moosen vor. Die Biosynthese von Cd-S-Komplexen wurde erstmals in dem Pilz *Schizosaccharomyces pombe* nachgewiesen (REESE und WINGE, 1988) und auch in *Candida glabrata* wurden Cd-S-Komplexe gefunden (MEHRA et al., 1994). Da Cd-S-Komplexe auch in Wurzeln und Blättern von Tomatenpflanzen vorkommen, ist ihre Bildung unter Assoziation von PCs vermutlich auch in Pflanzen eine generelle Reaktion auf hohe Cd-Konzentrationen (REESE et al., 1992). Es wird angenommen, daß S^{2-} eine stabilisierende Wirkung auf Cd-PC-Komplexe hat (REESE und WINGE, 1988). Detaillierte Untersuchungen zur Bildung dieser Komplexe liegen an *Silene vulgaris* und *Rauvolfia serpentina* vor (KNEER und ZENK, 1997).

Ein Anstieg des GSH-Pools unter Schwermetallstreß bei gleichzeitig geringer PC-Synthese, wie bei *F. antipyretica* beobachtet, ist bisher für andere höhere und niedere Pflanzen nicht bekannt. Möglicherweise kommt es in Moosen zu einer direkten Komplexbildung und somit Detoxifikation von Schwermetallen mit GSH. Modelle der Reaktionen von GSH und PCs mit Cd sind in Abb. 55 dargestellt.

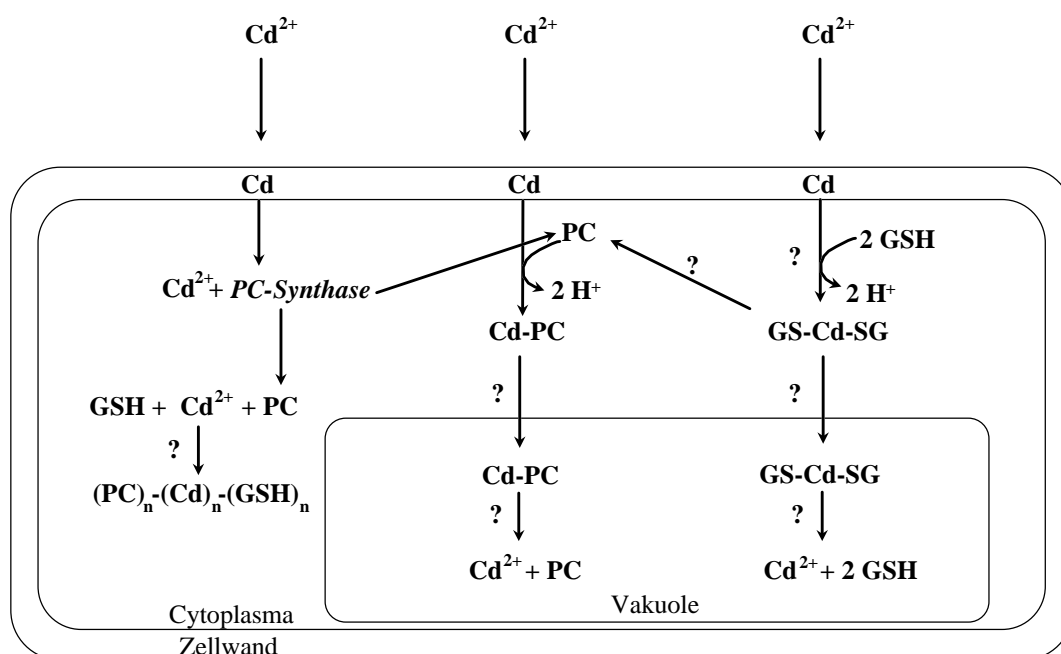


Abb. 55: Mögliche Mechanismen der Detoxifikation von Cd durch GSH und PCs in *F. antipyretica*.

4.7 Cystein- und γ -Glutamyl-Cystein-Gehalte unter Cadmiumeinfluß

Bei Untersuchungen zum Einfluß von Cd auf die Gehalte an GSH-Metaboliten in *F. antipyrretica* wurden Cys und γ -Glu-Cys nachgewiesen. γ -Glu-Cys war in den ersten 26 Stunden nach Cd-Applikation in *F. antipyrretica* nicht nachweisbar (Kap. 3.6.12). Während einer 10tägigen Inkubation in Cd erreichte der γ -Glu-Cys-Gehalt ca. 50 % des Cys-Gehaltes (Kap. 3.6.12, Abb. 34).

Für höhere Pflanzen ist während der Synthese von PCs unter Schwermetalleinfluß ein Anstieg des γ -Glu-Cys-Gehaltes bekannt. Das Verhalten des Cys-Spiegels unter Schwermetalleinfluß wird dagegen unterschiedlich beschrieben. In Sprossen und Wurzeln von Maissämlingen nahm unter Cd-Einfluß der γ -Glu-Cys um das 20 - 30fache und der Gesamtthiolgehaltes (ohne Cys, γ -Glu-Cys und GSH) um das 4 - 12fache zu, wobei gleichzeitig der Cys- und GSH-Spiegel abnahm (MEUWLY und RAUSER, 1992). Zellkulturen von *Petroselinum crispum* zeigten in den ersten 24 Stunden nach Cd-Zugabe einen Anstieg des γ -Glu-Cys-Gehaltes von 4,9 auf 48,2 nmol/g FG sowie eine Verdopplung des Cys-Gehaltes innerhalb von 9 Stunden (SCHNEIDER und BERGMANN, 1995). In Tabakzellen stieg der γ -Glu-Cys-Gehalt von nahezu 0 auf 48,4 ng/g FG, wobei auch der Cys-Gehalt nach einer anfänglichen Abnahme von 20,0 auf 61,0 nmol/g FG anstieg (SCHNEIDER und BERGMANN, 1995).

Das Fehlen bzw. die sehr geringen Mengen an γ -Glu-Cys in *F. antipyrretica* könnten auf einen starken Turnover dieses Peptides im Zusammenhang mit der GSH-Synthese zurückzuführen sein. Allein anhand der geringen Mengen dieses Peptides kann nicht auf eine verminderte Synthese in *F. antipyrretica* geschlossen werden. Aufgrund des starken GSH-Anstiegs unter Cd-Belastung ist auch von einer Erhöhung der γ -Glu-Cys-Synthese unter diesen Bedingungen auszugehen. In den unbelasteten Kontrollen war entweder kein γ -Glu-Cys nachweisbar oder die Mengen waren mit 0,45 μ g/g FG nur gering. Zu Beginn der Cd-Belastung kann daher die GSH-Synthese nicht aus diesem Pool erfolgen, sondern die γ -Glu-Cys-Synthese muß gesteigert werden. Möglicherweise übersteigt während der 10tägigen Cd-Inkubation die γ -Glu-Cys-Synthese den Verbrauch zur GSH-Synthese, wodurch sich der intrazelluläre γ -Glu-Cys-Pool erhöht.

Die Cys-Gehalte in *F. antipyrretica* korrelierten sowohl im Kurzzeitversuch über 26 Stunden als auch über 10 und 35 Tage mit den GSH-Gehalten (Kap. 3.6.12, Abb. 33 und Kap. 3.5.4, Abb. 18). Vermutlich wird der intrazelluläre Cys-Gehalt dem Bedarf für die GSH-Synthese angepaßt. Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß im Versuch über 35 Tage (Kap. 3.5.4, Abb. 18) γ -Glu-Cys und GSH als Summe quantifiziert wurden und die Cys-Bestimmung nur semiquantitativ erfolgte.

4.8 Vergleich der Reaktion von Pflanzen unterschiedlicher Standorte auf Schwermetalle

Unterschiede in der physiologisch/biochemischen Reaktion auf Schwermetalle in Pflanzen verschiedener Standorte wurden an Proben aus der Selke, der Wipper, dem Dammbach und der Rappbode untersucht (Kap. 3.7). Die biologische Varianz der Schwermetallakkumulation des Pflanzenmaterials eines Standortes (Wipper) betrug weniger als 20 % (n = 5) (Kap. 3.7.1, Tab. 18).

Dieser Wert liegt zwar über der von MOUVET (1985) für Wassermoose beschriebenen Varianz von weniger als 10 %, belegt jedoch trotzdem die Homogenität von Wassermoosepopulationen in Bezug auf die Schwermetallakkumulation. Die unterschiedlichen Cd-, Zn-, Pb- und Cu-Gehalte der Proben werden daher auf eine Schwermetallakkumulation am natürlichen Standort zurückgeführt.

Die Schwermetallgehalte der Moosproben (Kap. 3.7.1, Tab. 17) deuten auf eine höhere Belastung der Standorte Selke und Dammbach gegenüber der Wipper und Rappbode hin.

Auch die parallel zu den Pflanzen entnommenen Wasserproben (nicht dargestellt) ergaben eine höhere Belastung der Selke gegenüber der Wipper. Im Vergleich zu den anderen Standorten wies das Wasser der Selke mit 3,5 µg/L Cu und 19 µg/L Zn die höchsten Gehalte auf (Rappbode 8 µg/L Zn, alle anderen Elemente lagen unter der Nachweisgrenze). Daten zu den Gesamtschwermetallen des Wassers dieser Standorte liegen nicht vor.

Der Standort Selke liegt ca. 3 - 7 km flußabwärts einer Region mit ehemaligen Metallhütten und Pochwerken sowie chemischer Industrie. Wasserführende Stollen des ehemaligen Silberbergbaus münden an verschiedenen Stellen innerhalb dieses Abschnittes in die Selke. Eine Beprobung der Flußauensedimente nahe der Probenahmestelle von *F. antipyretica* ergab Schwermetallgehalte von mehr als 23 000 µg/g Pb, 32,6 µg/g Cd und 414 µg/g Cu. Flußaufwärts oberhalb dieser ehemaligen Bergbauregion wurden dagegen nur 68 µg/g Pb, 1,2 µg/g Cd und 40 µg/g Cu gemessen (DOBLER und FRÜHAUF, 1997). Der Standort Wipper dagegen liegt ca. 3,5 km unterhalb der Wipper-Talsperre in einem naturnahen Gebiet. Für die Wipper, den Dammbach sowie die Rappbode liegen keine Daten der Sediment- bzw. Auenbelastung vor. Es ist zwar bekannt, daß im Gebiet des Harzes zum Teil hohe geogene Schwermetallgehalte vorkommen (BIRKE und RAUCH, 1993), die jedoch im Vergleich zu den Einträgen durch ehemalige Bergbautätigkeit wie an der Selke zu vernachlässigen sind (DOBLER, pers. Mitteilung).

In den Moosproben aller Standorte des Harzes waren PCs enthalten, die standortcharakteristische HPLC-Elutionsprofile ergaben (Kap. 3.7.2, Abb. 35). In *Fontinalis*-Proben aus der Isar wurden dagegen keine PCs gefunden (ZENK, 1997, pers. Mitteilung). In Moosen von natürlichen Standorten sind PCs bisher lediglich von JACKSON et al. (1991) im Wassermoose *Rynchosstegium riparioides* beschrieben.

Die Quantifizierung des in allen Proben von *F. antipyretica* enthaltenen PC₄ ergab eine Übereinstimmung mit den Cd-Belastungen des Pflanzenmaterials, das heißt, höher belastete Proben enthielten im Vergleich zu geringer belasteten mehr PC₄ (Kap. 3.7.2, Abb. 36). Dieses war aufgrund der geringen Probenanzahl jedoch statistisch nicht absicherbar.

Da PCs in *F. antipyretica* im Labor bisher nur durch Cd induziert werden konnten (Kap. 3.5.9, Abb. 23), werden auch die PC-Gehalte der Freilandpflanzen im wesentlichen auf Cd-Belastungen zurückgeführt.

Die Proben der Selke und des Dammbachs enthielten gegenüber denen aus der Wipper und Rappbode erhöhte PC₄-Mengen. Der PC₄-Gehalt der Pflanzen des Dammbachs war jedoch um 40 % geringer als der der Selkeprobe, obwohl beide Proben identische Cd-Mengen (ca. 1,7 µg/g TG) enthielten. Die Unterschiede im PC₄-Gehalt werden im wesentlichen auf die biologische

Variabilität des Pflanzenmaterials und Standortfaktoren zurückgeführt. Der PC₄-Gehalt der Moosproben läßt daher im passiven Biomonitoring nur bedingt Rückschlüsse auf die Schwermetallbelastung der Standorte zu. Vermutlich spielen Umwelteinflüsse wie das Nährstoff- und Lichtangebot und der pH-Wert sowie die Entwicklung der Pflanzen eine Rolle bei der Synthese von Thiolpeptiden und der intrazellulären Schwermetallaufnahme.

Aufgrund hoher Abflußraten und wechselnder Schwebstofffrachten ist in Fließgewässern von hohen Fluktuationen der Schwermetallgehalte und ihrem gelösten Anteil auszugehen (FIEDLER und RÖSLER, 1993). Die mangelnde Korrelation zwischen den Schwermetallgehalten des Wassers und den PC-Gehalten der Pflanzen ist nicht ungewöhnlich, da die Induktion von PCs nur auf den Anteil an gelösten Schwermetallen im Wasser zurückzuführen ist (AHNER et al., 1994).

PC-Gehalte von Moosen natürlicher Standorte ermöglichen, vor allem an Standorten an denen die Schwermetallgehalte des Wassers unter der Nachweisgrenze liegen, die Abschätzung insbesondere von Cd-Belastungen. Bisher liegen nur wenige Arbeiten zu PC-Gehalten von Pflanzen natürlicher Standorte vor. So kann nach XIANG et al. (1994) der Gesamtthiolgehalt der Wasserhyazinthe *Eichhornia crassipes* als Maß für die Schwermetallaufnahme zur Indikation der Schwermetallbelastung von Gewässern genutzt werden. In der Massachusetts Bay wurde eine positive Übereinstimmung der PC-Gehalte von Phytoplankton mit der Belastungssituation verschiedener Standorte der Bucht festgestellt (AHNER et al., 1994). Auch teilweise geschädigte Bestände von *Picea rubens* und *Abies balsamiae* zeigten einen erhöhten PC-Gehalt in stärker geschädigten Bäumen (GAWEL et al., 1996). Ebenso waren in *Acer pseudoplatanus* und *Silene cucubalus* eines belasteten Standortes PCs nachweisbar, wogegen die Pflanzen eines unbelasteten Nachbarstandortes keine PCs enthielten.

Die Proben der Selke wiesen bei mehreren Beprobungen der Jahre 1994 bis 1996 (nicht dargestellt) immer einen erhöhten Schwermetallgehalt gegenüber Proben aus der Wipper auf, welcher sich auch in den PC-Gehalten der Pflanzen widerspiegelte (nicht dargestellt). Ob der PC-Gehalt jedoch auf eine unterschiedliche Schwermetalltoleranz der Pflanzen schließen läßt, kann anhand der Ergebnisse nicht abschließend gesagt werden. Nach PC-Gehaltsbestimmungen an toleranten und sensitiven *Silene*-Pflanzen ist eine erhöhte Schwermetalltoleranz nicht mit einer vermehrten PC-Synthese gekoppelt. Nach DE KNECHT et al. (1992) wiesen Cd-sensitive Pflanzen von *Silene vulgaris* einen 2 - 3fach höheren PC-Gehalt auf als tolerante. Auch Arbeiten von HARMENS et al. (1993) an Wurzeln von *Silene vulgaris* belegen einen erhöhten PC-Gehalt in Cd-sensitiven Pflanzen gegenüber toleranten. GRILL et al. (1988b) wiesen PCs in den Wurzeln von *Acer pseudoplatanus* und *Silene cucubalus* von ehemaligen Schwermetallabbaugebieten nach. In den Wurzeln der schwermetalltoleranteren *Silene* war im Vergleich zu *Acer pseudoplatanus* die PC-Menge in Bezug auf den Zn-Gehalt geringer. Da Untersuchungen zur Bedeutung der PCs für die Schwermetalltoleranz im wesentlichen an höheren Pflanzen durchgeführt wurden, sollten diese Ergebnisse jedoch nicht ohne Einschränkungen auf niedere Pflanzen wie Moose übertragen werden.

Im Laborversuch über 14 Tage unter 100 µM Cd nahm in den Proben der Selke der PC₄-Gehalt ab (Kap. 3.7.3, Abb. 37). Dieser Effekt wurde bereits in vorangegangenen Versuchen beobachtet

(Kap. 3.5.7, Abb. 20) und im Zusammenhang mit dem Abbau von PCs für die Bereitstellung niedermolekularer thiolhaltiger Verbindungen diskutiert (Kap. 4.4).

Die in Kap. 3.5.5, Abb. 19 beschriebene unbekannte thiolhaltige Verbindung war nach 14tägiger Inkubation in Cd-haltigem Medium auch in allen Proben der unterschiedlichen Standorte nachweisbar (Kap. 3.7.4, Abb. 38). Die Gehalte dieser Substanz korrelierten jedoch nicht mit den Schwermetallbelastungen der Pflanzen.

Auch die GSH-Gehalte der Freilandproben zeigten keine Abhängigkeit von den Schwermetallgehalten der Proben (Kap. 3.7.5, Abb. 39).

Nach 6 Tagen unter 100 μM Cd enthielten die Proben der weniger belasteten Standorte Wipper und Rappbode höhere GSH-Gehalte als die Proben der Selke- und des Dammbachs (Kap. 3.7.5, Abb. 39). In den Pflanzen aus der Selke nahm zu diesem Zeitpunkt der GSH-Gehalt bereits ab, wogegen dieser in den anderen Proben gegenüber dem 4. Tag weiter anstieg. Es wäre denkbar, daß der Stoffwechsel der Pflanzen aus der Selke bereits an erhöhte Cd-Konzentrationen adaptiert ist und mit einer schnellen, dafür aber kürzeren, Phase der GSH-Synthese auf zusätzliche Schwermetalle reagiert. Der GSH-Pool der Proben aus der Wipper hingegen nahm unter diesen Bedingungen nur langsam zu.

Möglicherweise spielen auch Unterschiede in der intrazellulären Cd-Aufnahme hierbei eine Rolle. Eine Cd-sensitive Population von *Rhytidiadelphus squarrosus* enthielt gegenüber einer Cd-toleranten höhere Mengen an Cd (WELLS und BROWN, 1987). Als Ursachen hierfür werden Unterschiede in der Zellwandzusammensetzung und des Zellwand/Cytoplasma Verhältnisses sowie ein Einfluß von Fe-Mn-Ablagerungen auf den Pflanzen vermutet (WELLS und BROWN, 1987).

Junge, im Labor gewachsene Sproßspitzen von Pflanzen der Wipper, der Selke, des Dammbachs und der Rappbode wurden ebenfalls auf die Reaktion des GSH-Pools unter Cd-Einfluß untersucht (Kap. 3.7.6, Abb. 40). Der GSH-Gehalt der Selkeproben stieg erst 4 Tage nach Cd-Applikation an, wogegen die anderen Proben bereits nach 2 Tagen erhöhte GSH-Mengen aufwiesen. Vermutlich wird die Aufnahme von Cd bzw. die Reaktion des GSH-Haushaltes durch äußere Einflüsse wie Standortfaktoren beeinflusst und ist daher an im Labor kultivierten Pflanzen nicht reproduzierbar. Diese Befunde an *F. antipyretica* entsprechen denen an zwei Populationen von *Rhytidiadelphus squarrosus* (WELLS und BROWN, 1987), wonach sich die Moose aus dem Freiland in Bezug auf die Cd-Aufnahme unterschieden. Dieses war an jungem unter Laborbedingungen gewachsenem Pflanzenmaterial nicht reproduzierbar. Die Aufnahmekapazität für Cd der im Labor gewachsenen Pflanzen war auf 30 % verringert und die Dissoziationskonstante für extrazellulär gebundenes Cd betrug lediglich 10 % der Freilandmoose. Auch waren Unterschiede im Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Gehalt der Moose festzustellen. Es wird daher eine verringerte Anzahl von Bindungsstellen und eine Veränderung der Zellwandzusammensetzung, wie die Erhöhung des Anteils an uronsäurereichen Polymeren vermutet (WELLS und BROWN, 1987).

Wachstumsmessungen sind geeignet Aussagen über die Toxizität von Schwermetallen auf Pflanzen zu erhalten (BAKER und WALKER, 1990) (Kap. 3.7.7, Abb. 41 und 42). Konzentrationen von 1 und 5 μM Cd reduzierten bei *F. antipyretica* aller Standorte, mit Ausnahme der Selke, das Längenwachstum. In der Selkeprobe war unter 1 μM Cd das Längenwachstum erhöht.

Möglicherweise wird hier eine Adaptation der Selkepflanzen an belastete Standorte deutlich.

Die Proben der geringer belasteten Standorte Wipper und Rappbode bildeten unter 1 μM Cd eine erhöhte Anzahl von Neutrieben, die teilweise aus dem Cd-haltigen Medium herauswuchsen. Vielleicht ist die Ausbildung von Neutrieben unter diesen Bedingungen für nicht adaptierte Pflanzen eine Möglichkeit der vegetativen Vermehrung nicht kontaminierter Pflanzenteile.

Die Untersuchungen an *F. antipyrethica* ergaben Unterschiede in der Schwermetallbelastung des Pflanzenmaterials. Insbesondere die Cd-Belastungen spiegelten sich in den PC₄-Gehalten der Pflanzen wider. Gegenüber dem in Kap. 3.8 beschriebenen aktiven Biomonitoring beeinflussen jedoch bei der Beprobung natürlicher Standorte (passives Biomonitoring) die biologische Variabilität und Altersunterschiede des Pflanzenmaterials die Bewertung der Ergebnisse.

Vermutlich bilden sich an natürlichen Standorten unterschiedlich schwermetallsensitive Formen von *F. antipyrethica* aus. Insbesondere zwischen den Pflanzen der gering und hoch belasteten Standorte Wipper und Selke wurden Unterschiede in der physiologisch/biochemischen Reaktion auf Cd deutlich. Da sich die Reproduktion der Ergebnisse aufgrund saisonaler Einflüsse und Umweltfaktoren als schwierig erwies, ist eine abschließende Interpretation der Befunde in Bezug auf die Schwermetalltoleranz von *F. antipyrethica* nicht möglich.

4.9 Physiologische Parameter des aktiven Biomonitorings in der Elbe

Aus den in Kap. 3.2, Abb. 7 und 8; Kap. 3.7.1, Tab. 17 und Kap. 3.9.1, Tab. 19 dargestellten Ergebnissen wird ein gutes Akkumulationsvermögen von *F. antipyrethica* gegenüber Schwermetallen im aktiven und passiven Biomonitoring deutlich. An natürlichen Standorten zeigten sich Unterschiede in der PC- und GSH-Induktion die jedoch nicht allein auf die Schwermetallakkumulation, sondern auch auf die biologische Variabilität des Pflanzenmaterials aufgrund von Standortfaktoren zurückgeführt werden (Kap. 4.8). Durch die Exposition homogener Pflanzenproben im aktiven Biomonitoring wurde diese biologische Variabilität minimiert.

Anhand des in der Elbe exponierten Pflanzenmaterials wurde der Nutzen der schwermetallspezifischen Induktion von PCs für die Beurteilung von Standortbelastungen untersucht. Chlorophyllbestimmungen sollten hierbei die Vitalität des Pflanzenmaterials überprüfen.

Die Abnahme des Chlorophyllgehaltes (Kap. 3.8.1, Abb. 43 und 44) der Proben deutet auf eine Beeinflussung der photosynthetischen Aktivität an allen Standorten, mit Ausnahme der Expositionsstellen 4 und 5, hin. Vermutlich wurde dies durch das veränderte Medium (Elbwasser) und standortspezifische Faktoren verursacht. Das Chlorophyll a/b-Verhältnis der exponierten Proben war in den meisten Proben um 10 - 15 % verringert (Kap. 3.8.1, Abb. 44), was auf eine geringe bis mäßige Belastung der Standorte hindeutet (LOPEZ und CARBALLEIRA, 1989).

Die Änderungen der Chlorophyllparameter werden nicht auf die Akkumulation von Cd zurückgeführt, da im Laborversuch unter 100 μM Cd kein signifikanter Einfluß des Metalls auf die Pigmentzusammensetzung feststellbar war (Kap. 3.3, Abb. 9 - 11). Dieses wird an den Proben des Standortes 4 deutlich, die trotz hoher Schwermetallgehalte nur eine geringe Beeinträchtigung des

Chlorophyllgehaltes sowie des Chlorophyll a/b-Verhältnisses aufwiesen. Ob die Chlorophyllgehalte einen indirekten Einfluß auf die Akkumulationsleistung des Mooses haben, ist nicht bekannt.

Von einer intrazellulären Aufnahme der akkumulierten Schwermetalle insbesondere Cd wird aufgrund der Änderungen der PC₄-Gehalte ausgegangen. Die Abnahme dieser Verbindungen gegenüber der Kontrolle an den Standorten 1, 2, 5 und 6 ist vermutlich auf die veränderten Umweltbedingungen durch Umsetzen der Proben aus dem Labor in die Elbe bedingt. Als Maß für die PC-Gehalte wurde im aktiven Biomonitoring in der Elbe (Kap. 3.8.2, Abb. 46) wie auch im passiven Biomonitoring im Harz (Kap. 3.7.2, Abb. 36) PC₄ quantifiziert und den Cd, Pb, Zn und Cu-Gehalten der Proben gegenübergestellt. Es ergab sich eine signifikante Korrelation der PC₄-Gehalte zu den Cd-Konzentrationen des exponierten Pflanzenmaterials (Kap. 3.8.2, Abb. 47). Für die Elemente Pb, Zn und Cu war dieses nicht nachweisbar.

Da Cd, wie auch im Laborversuch beobachtet (Kap. 3.5.9, Abb. 23), der effektivste Aktivator der PC-Synthese ist (GRILL et al., 1989), ist es nicht ungewöhnlich, daß die PC₄-Gehalte der Proben ausschließlich mit den Cd-Gehalten des Pflanzenmaterials korrelierten.

Ein Zusammenhang zwischen der Cd-Akkumulation und dem GSH-Gehalt der Moosproben war im Expositionsversuch nicht feststellbar. Möglicherweise dient GSH auch unter diesen Bedingungen als Konjugatbildner für verschiedene unbekannte organische Xenobiotika, die im Elbwasser vorkommen und der GSH-Pool reagiert daher in aquatischen Ökosystemen nur unspezifisch auf Belastungen. Kontaminationen mit Benzo(a)pyren zum Beispiel, führen in *F. antipyretica* zu einer Erhöhung des Gesamt-GSH-Gehaltes (ROY et al., 1994).

Aufgrund der Ergebnisse wäre PC₄ in *F. antipyretica* im aktiven Biomonitoring ein potentieller Biomarker für die quantitative Erfassung von Cd-Belastungen aquatischer Systeme. Insbesondere Rückschlüsse auf Verunreinigungen mit gelöstem und somit pflanzenverfügbarem Cd wären hierüber möglich, da die Quantität der PC-Synthese mit der Konzentration an freien Cd²⁺-Ionen und nicht mit dem Gesamt-Cd-Gehalt des Mediums korreliert (AHNER et al., 1994). Dieses konnte in marinem Phytoplankton bis zu Konzentrationen an freien Cd²⁺-Ionen von weniger als 1 nM (0,112 µg/L) nachgewiesen werden (AHNER et al., 1994.), was umweltrelevanten Mengen entspricht (z. B. Elbe ca. 0,1 - 0,4 nM Gesamt-Cd), die jedoch bei einer Nachweisgrenze von 0,2 µg/L (ICP-MS, Kap. 2.4.3) oft analytisch nicht mehr erfaßbar sind.

Die Aufnahme von Schwermetallen durch Pflanzen kann jedoch nach MARKERT (1993b) einen unterschiedlichen Verlauf nehmen, wobei es unter geringen Konzentrationen zu einer verminderten Aufnahme kommen kann (Rejektor) bzw. niedere Konzentrationen stärker als hohe angereichert werden (Akkumulator). Im Idealfall besteht eine direkt proportionale Beziehung zwischen Angebot und Aufnahme (Indikator) (MARKERT, 1993b). Für den Einsatz von PCs aus *F. antipyretica* als quantitativer Biomarker sollte daher über einen weiten Konzentrationsbereich eine Linearität der Schwermetallaufnahme und der PC-Induktion gegeben sein.

Bisher liegen wenige Untersuchungen hierzu vor (XIANG et al., 1994; AHNER et al., 1994; GAWEL et al., 1996). Die mit *F. antipyretica* in der Elbe (Kap. 3.8) und im Mansfelder Land (Kap. 3.9) erhaltenen Ergebnisse sind jedoch die ersten aus einem aktiven Biomonitoring.

4.10 Aktives Biomonitoring an extrem belasteten Standorten

An extrem belasteten Standorten des Mansfelder Landes (ehemaliges Kupferschiefer-Bergbaugebiet in Sachsen-Anhalt) (Kap. 2.2.2, Tab. 3) wurden Pflanzenproben für 21 Tage exponiert und deren Schwermetallgehalte und physiologisch/biochemische Reaktion untersucht (Kap. 3.9.1, Tab. 19, Abb. 49 - 54). Die Gehalte an Cd, Pb, Zn und Cu dieser Proben waren gegenüber den Proben aus dem Harz und der Elbeexposition sowie Literaturangaben vergleichsweise hoch (Tab. 24).

Die Schwermetallgehalte der Kontrolle lagen 3 - 4fach (Cd, Zn und Cu) und ca. 20fach (Pb) über der Hintergrundbelastung des im Herbst 1994 und 1995 in der Elbe exponierten Pflanzenmaterials (Kap. 4.1, Tab. 20). Das im Mansfelder Land exponierte Pflanzenmaterial wurde vom Standort Selke (Kap. 2.1.1, Tab. 1) entnommen; die in der Elbe exponierten Moose stammten dagegen aus der Wipper. Da die Selke im Vergleich zur Wipper als höher belastet einzustufen ist (Kap. 4.8), lassen sich die Differenzen des Schwermetallgehaltes im Ausgangsmaterial hierdurch erklären. In Bezug auf die hohe Akkumulation sind diese Unterschiede des Ausgangsmaterials jedoch zu vernachlässigen.

Tab. 24: Maximale Gehalte an Cd, Pb, Zn und Cu in Wassermoosen (aktives und passives Biomonitoring) im Vergleich zu den im Mansfelder Land (Kap. 3.9.1, Tab. 19) und der Elbe exponierten Proben (Kap. 3.2, Abb. 7 und 8) sowie einer Beprobung des Harzes. * Sproßspitzen, ** ganze Pflanzen, •diese Probenahmestelle in der Selke liegt ca. 2 km flußabwärts des in Kap. 2.1.1, Tab. 1 beschriebenen Selkestandortes. [$\mu\text{g/g}$ TG].

Art	Autor	Cd	Pb	Zn	Cu
<i>F. antipyretica</i>	LOPEZ et al. (1994)	5,4	16	810	740
<i>F. antipyretica</i>	SAY und WHITTON (1983)	15,6	10100	11300	-
<i>F. antipyretica</i>	LEDL et al. (1981)	5,9	-1620	33	
<i>F. antipyretica</i> / <i>F. squamosa</i>	GONCALVES et al. (1994)	2,9	440	300	12930
<i>Fissidens fontanus</i>	FROST (1990)	11,0	130	-	-
<i>Leptodictyum riparium</i>	FROST (1990)	4,5	262	-	-
<i>Platihypnidium riparioides</i>	MOUVET (1985)	- 2900	277000	15000	
<i>Rhynchostegium riparioides</i> *	WEHR und WHITTON (1983b)	64,7	8690	8840	116
<i>Rhynchostegium riparioides</i> **	WEHR und WHITTON (1983b)	89,5	17800	22300	157
<i>F. antipyretica</i>	eigene Untersuchungen Standort (Mansfeld)	36,7 H8	14500 H3	32300 H4	19000 H4
<i>F. antipyretica</i>	eigene Untersuchungen Standort (Elbe, Jahr)	10,8 7 (1995)	31 6 (1994)	1950 4 (1995)	55 6 (1994)
<i>F. antipyretica</i>	eigene Untersuchungen Standort (Harz [•] , 1995)	16,8 Selke	186 Selke	3580 Selke	103 Selke

Gegenüber den in der Elbe exponierten Proben (Kap. 3.8.1, Abb. 43 und 44) ist der Vitalitätsverlust des Pflanzenmaterials (anhand der Chlorophyllbestimmungen) insgesamt als geringer einzuschätzen, obwohl extrem hohe Schwermetallmengen akkumuliert wurden. Eine Beeinträchtigung der Vitalität des Pflanzenmaterials wurde anhand des Chlorophyll a/b-Verhältnisses sowie der Chlorophyll-

gehalte (Kap. 3.9.2, Abb. 49 und 50) nur an den Standorten H3 und H4 festgestellt. Ebenso nahm auch das Verhältnis E_{665}/E_{665a} nur am Standort H4 gegenüber der Kontrolle signifikant ab (Kap. 3.9.2, Abb. 51).

Neben PC₄ enthielten die exponierten Moose weitere thiolhaltige Verbindungen, bei denen es sich aufgrund der Retentionszeit vermutlich um unterschiedliche PCs handelt. Diese wurden nicht quantifiziert, da die Auftrennung der einzelnen Peptide in den HPLC-Chromatogrammen nur ungenügend war (Kap. 3.9.3, Abb. 52).

Vermutlich gehen auch die Thiolpeptidgehalte der Proben des Mansfelder Landes im wesentlichen auf die Cd-Belastungen der Standorte zurück wie es bereits für die Harz- und Elbeproben diskutiert wurde (4.8 und 4.9).

Die Quantifizierung der PC-Gehalte erfolgte ebenfalls wie auch für die in der Elbe exponierten Proben über die Gehalte an PC₄. In allen Proben war eine Zunahme dieses Peptides feststellbar (Kap. 3.9.3, Abb. 53). Die Proben der Standorte H5, H6 und H8 enthielten die höchsten PC₄-Gehalte; die Pflanzen der Standorte H5 und H6 waren im Vergleich zu denen anderer Standorte jedoch geringer mit Schwermetallen belastet. Die höchste Cd-Akkumulation wurde in Proben der Standorte H3, H4 und H8 gemessen. Gegenüber Standort H5 und H6 war der PC₄-Gehalt in diesen Proben jedoch geringer. Möglicherweise beeinträchtigt der hohe Gehalt an Pb, Zn und Cu in diesen Proben die Induktion thiolhaltiger Peptide. Auch eine kompetitive Hemmung der intrazellulären Cd-Aufnahme durch weitere Ionen wie Ca²⁺ wäre in diesem Zusammenhang möglich (BROWN und WELLS, 1990). Die Ca²⁺-Gehalte des Wassers lagen an diesen Standorten mit 320 mg/L (H3), 407 mg/L (H4) und 435 mg/L (H8) über denen der Standorte H5 (170 mg/L), H7 (173 mg/L) und H6 (241) mg/L (KRAUSS, pers. Mitteilung).

Die HPLC-Chromatogramme (Kap. 3.9.2, Abb. 52) zeigen, daß in der Probe H7 der PC₄-Gehalt nicht wesentlich erhöht war, gleichzeitig jedoch weitere Thiole synthetisiert wurden. Die Quantifizierung von PC₄ allein reicht daher unter hohen Schwermetallkonzentrationen nicht aus, um Rückschlüsse auf Standortbelastungen zu ziehen. Vermutlich wird PC₄, wie in Kap. 4.4 diskutiert, auch im Freiland unter extremen Schwermetallbelastungen als Substrat für die Synthese anderer thiolhaltiger Peptide abgebaut.

An den Standorten H3 und H5 kam es zur deutlichen Erhöhung des GSH-Pools der Proben (Kap. 3.9.3, Abb. 54), wogegen in der Probe des Standortes H4 der GSH-Gehalt unter die Nachweisgrenze abnahm.

Die Pflanzen des Standortes H4 enthielten mit 19010 µg/g TG vergleichsweise hohe Cu-Mengen (Kap. 3.9.1, Tab. 19). Auch Sediment- und Wasseranalysen ergaben mit 50200 mg/kg bzw. 13,3 mg/L (entsprechend 208 µM Cu) an diesem Standort die höchste Cu-Belastung (H7 und H8 Sediment nicht gemessen) (KRAUSS et al., 1997). In Laborversuchen wurde nach mehrtägiger Inkubation bereits eine Konzentration von 100 µM Cu anhand sichtbarer Schädigungen wie Chlorosen als toxisch für *F. antipyretica* eingestuft, wobei die GSH-Synthese gehemmt war (Kap. 3.6.8, Abb. 29). Es wird daher vermutet, daß die auch die hohe Cu-Belastung des Standortes H4 zur Vitalitätsbeeinträchtigung und dadurch bedingten GSH-Abbau führte.

5 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Im Rahmen der Arbeit sollten Aussagen zur Akkumulation von Schwermetallen sowie deren Einfluß auf den Thiolpool im Wassermoos *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. erarbeitet werden. Dies geschah im Hinblick auf die Nutzung der schwermetallinduzierten Synthese der Thiolpeptide Phytochelatine und Glutathion als quantitativer Biomarker für Schwermetallbelastungen aquatischer Systeme.

Im aktiven Biomonitoring in der Elbe zeigte *F. antipyretica* ein gutes Akkumulationsvermögen gegenüber Cd, Pb, Zn und Cu. Hierdurch wurden Unterschiede in der Belastung einzelner Standorte deutlich. Die Messungen der Schwermetalle erfolgten nach Mikrowellenaufschluß des Pflanzenmaterials mittels ICP-MS. Zu den Gesamtschwermetallgehalten des Elbwassers ergab sich lediglich für Cd und Zn im Expositionsdurchgang 1994 eine Korrelation. Standorttypische Faktoren wie die Fließgeschwindigkeit, der Schwebstoffgehalt und Parameter der Gewässerchemie sind mögliche Ursachen für die geringe Korrelation. Für weitere Untersuchungen mit *F. antipyretica* im aktiven Biomonitoring ist daher die optimale Exposition des Pflanzenmaterials im freien Wasserkörper sowie die Vergleichbarkeit von Standortfaktoren wie der Fließgeschwindigkeit zu beachten.

Neben der Schwermetallakkumulation im Freiland wurde über 10 Tage die intra- und extrazelluläre Aufnahme von Cd durch *F. antipyretica* im Labor untersucht. Die Bestimmung des extrazellulär gebundenen Cd erfolgte durch Austausch gegen Ni. Innerhalb von 24 Stunden wurden mehr als 90 % des Cd aus dem Medium vom Pflanzenmaterial aufgenommen (intra- + extrazellulär, im Mittel über 10 Tage 6,13 mg/g TG). Vermutlich stellt sich bereits in diesem Zeitraum ein Gleichgewicht zwischen der Cd-Konzentration der Pflanzenoberfläche und der des Mediums ein. Der extrazelluläre Cd-Gehalt nahm über 10 Tage von 71,2 auf 48,8 % ab, während die intrazelluläre Cd-Menge von 23,2 auf 49,3 % anstieg. Die Zellwand wirkt offensichtlich als Speicher für die Cd-Aufnahme in die Zelle. Möglicherweise wird bei dieser Methode das extrazelluläre Cd nur unvollständig entfernt und somit ein zu hoher intrazellulärer Cd-Gehalt bestimmt. Es ist daher notwendig, den verbleibenden Rest-Cd-Gehalt der Oberfläche zu bestimmen, um detailliertere Daten zur intrazellulären Cd-Aufnahme zu erhalten. Kurzzeitkinetiken der intra- und extrazellulären Schwermetallaufnahme sollten aufgenommen werden. Da kompetitive Effekte der Schwermetallakkumulation zu erwarten sind, ist auch die Aufnahme weiterer Schwermetalle wie Pb, Zn und Cu (und Cd), einzeln und in Kombination, zu untersuchen. Für die Annäherung an natürliche aquatische Systeme ist hierbei die Verwendung umweltrelevanter Konzentrationen der Metalle erforderlich.

Eine Vitalitätsbeeinträchtigung von *F. antipyretica* während 10tägiger Belastung mit 100 µM Cd war anhand von Chlorophyllmessungen nicht festzustellen. Da die Pigmentzusammensetzung jedoch auch von Umweltbedingungen wie dem Lichtangebot abhängt, ist dieser Parameter allein kein befriedigender Indikator für die Vitalität des Pflanzenmaterials unter Schwermetallbelastung. Die Ergänzung dieser Methode durch Bestimmung der photosynthetischen Aktivität anhand von Gaswechselformen wäre sinnvoll.

Die Thiolpeptidsynthese in *F. antipyretica* unter Schwermetallbelastung konnte in dieser Arbeit lediglich deskriptiv dargestellt werden. Eine Erklärung kausaler Zusammenhänge ist bisher nicht abschließend möglich. Oft konnten die Ergebnisse, aufgrund der biologischen Variabilität des Pflanzenmaterials, in ihren absoluten Werten nicht reproduziert werden. Für weitere physiologisch/biochemische Untersuchungen wäre die Anlage einer homogenen Laborkultur von *F. antipyretica* von Vorteil, wodurch die Streuung der Ergebnisse verringert und ihre Reproduzierbarkeit erhöht würde.

Nach mehrtägiger Cd-Belastung wurde in *F. antipyretica* mittels Reversed-Phase HPLC mit Online-Nachsäulenderivatisierung durch 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) die Synthese von Phytochelatinen nachgewiesen. Pb, Zn und Cu hingegen induzierten keine Phytochelatine in diesem Moos. Die Identifizierung von PC₂, PC₃ und PC₄ erfolgte durch Standardaddition von Phytochelatinen aus einer Kultur von *Lycopersicon esculentum*. Die Isolierung einzelner Phytochelatine aus dem Wassermoos gelang aufgrund der geringen Mengen bisher nicht.

Eine abschließende Strukturbestimmung der Phytochelatine aus *F. antipyretica* ist notwendig, da möglicherweise auch Phytochelatin-Homologe in diesem Moos vorkommen. Hierzu kann eine HPLC-MS-Kopplung geeignet sein, die eine Online-Identifizierung einzelner Thiolpeptide erlaubt. Die Charakterisierung von Cd-Phytochelatin-Komplexen könnte über das Cd-S-Verhältnis in diesen Komplexen Aufschluß über das Entgiftungspotential von Phytochelatinen in *F. antipyretica* geben.

Unter Einfluß von 50 und 100 µM Cd nahmen über einen Zeitraum von 21 - 28 Tagen insbesondere die Gehalte an PC₄ und PC_{5(?)} zu, was auf eine Funktion dieser Peptide bei der Cd-Entgiftung im Moos schließen läßt. Im Vergleich zu anderen Pflanzen ist die Phytochelatinsynthese in *F. antipyretica* jedoch nur gering und verläuft langsam.

Um die Ursachen der geringen Phytochelatinsynthese im weiteren zu klären, sollte die Reinigung und Charakterisierung der Phytochelatin-Synthase aus *F. antipyretica* erfolgen. Am gereinigten Enzym könnte möglicherweise auch die unterschiedliche Wirkung von Cd, Pb, Zn und Cu auf die Phytochelatinsynthese geklärt werden.

Auch unbelastete Kontrollproben von *F. antipyretica* enthielten geringe Mengen an Phytochelatinen, insbesondere PC₄, die jedoch in den ersten Tagen nach Cd-Applikation abnahmen. Möglicherweise dient dieser Abbau der Bereitstellung kurzkettiger Phytochelatine zur Synthese höhermolekularer Peptide oder des Glutathions. Ob die Phytochelatingehalte der Kontrollpflanzen für die Homöostase essentieller Metalle wie Cu und Zn von Bedeutung sind oder lediglich auf Schwermetallbelastungen der Probenahmestandorte zurückführbar sind, bleibt zu untersuchen.

Aufgrund der geringen Phytochelatinsynthese in *F. antipyretica* bei gleichzeitiger Cd-Aufnahme wird angenommen, daß weitere Mechanismen wie die Chelatbildung durch Glutathion an der Entgiftung von Schwermetallen beteiligt sind.

Der Glutathiongehalt in *F. antipyretica* stieg bereits 1 - 2 Tage nach Cd-Applikation deutlich an und erreichte am 5. bzw. 6. Tag bis zum 10fachen der Kontrolle. Diese Erhöhung des Glutathionpools nahm einen bimodalen Verlauf, der offensichtlich nicht durch eine Cd-Verarmung des Mediums verursacht wurde. Der Grund hierfür ist vermutlich ein bisher nicht bekannter Regulationsmechanismus des Schwefelhaushaltes oder der intrazellulären Cd-Aufnahme.

Pb und Zn führten in Konzentrationen von 500 μM ebenfalls zu einer Erhöhung des Glutathiongehaltes, wogegen Cu nur bis zu einer Konzentration von 50 μM einen Anstieg des Glutathionpools bewirkte.

Die Erhöhung des Glutathionspiegels unter Schwermetallbelastung bei gleichzeitig geringer Phytochelatinsynthese ist für andere Pflanzen bisher nicht beschrieben. Es wird eine direkte Detoxifikation der Schwermetalle, insbesondere von Cd, durch Chelatbildung mit Glutathion in Moosen vermutet. Bisher ist diese Komplexbildung jedoch hypothetisch. Die Extraktion und Isolierung von Cd-Glutathionkomplexen würde zum erstenmal den Nachweis von Schwermetall-Glutathionkomplexen im Pflanzenreich erbringen. Hierzu sind anaerobe Methoden notwendig, die eine Oxidation oder Komplexbildung *in vitro* während der Extraktion und Analytik verhindern. Ebenso wäre die gemeinsame Kompartimentierung von Cd und Glutathion in der Zelle ein Hinweis auf die Cd-Entgiftung durch Glutathion *in vivo*. Diese könnte über Zellfraktionierungen sowie mittels mikroskopischer Verfahren zur intrazellulären Lokalisation von Cd überprüft werden. Zur Untersuchung der Regulation des Glutathionanstieges unter Schwermetallbelastung ist die Reinigung und Charakterisierung der Glutathion-Synthetase sowie der γ -Glu-Cys-Synthetase notwendig.

Während der Inkubation in Cd-haltigem Medium stieg der Glutathiongehalt junger Sproßspitzen im Vergleich zu älteren Pflanzenteilen auf das ca. 4,5fache an. Unterschiede in der Ionenaufnahmekapazität, der Ausbildung extrazellulärer Bindungsstellen, Fe-Mn-Ablagerungen auf älteren Pflanzensegmenten sowie eine erhöhte Stoffwechsellistung der Sproßspitzen sind mögliche Ursachen hierfür. Mikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation von Cd in den Zellen und Zellwänden sowie Messungen der intra- und extrazellulären Ionenaufnahme in älteren und jungen Pflanzensegmenten könnten Aussagen hierüber liefern. Die Mechanismen der intrazellulären Aufnahme verschiedener Schwermetalle in *F. antipyretica* sind bisher nicht geklärt, da keine Daten zu Transportsystemen für diese Metalle vorliegen. Kenntnisse über Aufnahme- und Transportsysteme für Schwermetalle wären auch im Zusammenhang mit der differentiellen Induktion der Glutathion- und Phytochelatinsynthese von hohem Wert.

Nach Reduktion mit DTT wurden die Monobrombimanderivate des oxidierten Glutathionanteils gemessen. Cd führte zu keiner Erhöhung des GSSG-Gehaltes. Der Anstieg des Glutathionpools im Moos unter Cd-Einfluß ist daher vermutlich nicht auf eine Bildung von GSSG als unspezifische Streßreaktion zurückzuführen. Es sollten sich jedoch weitere Kinetiken anschließen, durch die auch kurzfristige Änderungen des Oxidationsstatus von Glutathion erfaßt werden können. Die Aktivität der GSSG-Reduktase aus *F. antipyretica* unter Schwermetallbelastung *in vivo* bleibt in diesem Zusammenhang zu klären.

Auch die Gehalte an Cystein und γ -Glu-Cys stiegen über 10 Tage unter 100 μM Cd deutlich an (Cystein bis ca. zum 10fachen und γ -Glu-Cys bis zum ca. 5fachen der Kontrolle). Der Cysteingehalt korrelierte hierbei mit dem Glutathiongehalt der Proben, was auf eine Anpassung des Cysteinpools an den Bedarf der Glutathionsynthese hinweist. Versuche unter Schwefelmangel bzw. Schwefel-

oder Cysteinzugabe zum Medium könnten Hinweise auf die Regulation des Cysteinhaushaltes in Bezug auf die Glutathionsynthese geben.

Wenn die Pflanzen nach 3tägiger Cd-Inkubation in Cd-freies Medium überführt wurden, war ein weiterer Anstieg des Glutathiongehaltes zu beobachten. Vermutlich ist dieser auf die Speicherfunktion der Zellwand für Cd zurückzuführen, wodurch eine kontinuierliche intrazelluläre Aufnahme extrazellulär gebundener Cd²⁺-Ionen erfolgt. Kurzzeitkinetiken zur intrazellulären Cd-Aufnahme sowie zum Verhalten des Glutathionpools könnten Aussagen hierzu liefern. Ebenso wäre hierdurch zu klären, ob eine Glutathion- und Cysteinabnahme in den ersten 2 Stunden nach Cd-Zugabe zeitlich mit der ersten intrazellulären Cd-Aufnahme einhergeht. Die Glutathionvorstufe γ -Glutamyl-Cystein war in den ersten 26 Stunden nicht nachweisbar. Es wird von einem starken Turnover dieses Peptides ausgegangen.

Über die Reaktion mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) war ebenfalls ein Anstieg des Gesamtthiolpools unter Schwermetalleinfluß festzustellen. Nach Subtraktion des Glutathiongehaltes verblieb eine Restmenge an Thiolen von maximal 127,6 $\mu\text{g/g}$ FG in den Kontrollen und 183,2 $\mu\text{g/g}$ FG in den Cd-belasteten Proben. Offensichtlich handelte es sich hierbei nicht um Phytochelatine, da diese insgesamt nur max. 20-25 % des Restthiolgehaltes ausmachen. Möglicherweise ist auch S²⁻ an der Detoxifikation von Schwermetallen in Moosen beteiligt. Daher muß die Quantifizierung des S²⁻-Gehaltes in Rohextrakten sowie in gereinigten Cd-Phytochelatin- bzw. Cd-Glutathionkomplexen erfolgen.

Neben den beschriebenen Verbindungen wurde in *F. antipyretica* eine weitere thiolhaltige Substanz nachgewiesen, die jedoch nur in Cd-belasteten Proben auftrat. Deren Identifizierung war bisher nicht möglich. Vermutlich enthält diese Verbindung einen hohen Anteil an Glu oder eines Glu-Derivates und hat eine Molmasse (M+H⁺) von 407. Zur abschließenden Strukturaufklärung ist die Anreicherung und Reinigung über Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration notwendig, die eine Charakterisierung mittels Tandem-MS ermöglicht.

Die Synthese der Thiolpeptide in *F. antipyretica* wurde ebenfalls an Pflanzen von unterschiedlichen Standorten untersucht. Die Quantifizierung der Phytochelatingehalte erfolgte hierbei anhand des in allen Proben enthaltenen PC₄. Ein Vergleich von Moosproben unterschiedlicher Standorte ergab, daß Pflanzen der stärker mit Schwermetallen belasteten Standorte Selke und Dammbach auch höhere Gehalte an PC₄ aufwiesen. Eine Korrelation des PC₄- oder Glutathiongehalte zu den Schwermetallgehalten der Pflanzen war jedoch nicht festzustellen. Nach 6tägiger Cd-Belastung im Labor lagen die Glutathiongehalte der Proben der höher Cd-belasteten Standorte Selke und Dammbach unter denen der geringer belasteten Probenahmestellen Wipper und Rappbode. Der Glutathionpool reagierte anders in Sproßspitzen des selben Ausgangsmaterials, die im Labor gewachsen waren.

Die Anzahl der gebildeten Neutriebe an Sproßspitzen von *F. antipyretica* nahm in Gegenwart von 1 μM Cd in Proben der Wipper und Rappbode zu. Das Längenwachstum war jedoch unter diesen Bedingungen in allen Proben, mit Ausnahme der Selke, deutlich reduziert. Inwieweit Differenzen in der Wachstumshemmung durch Cd auf eine unterschiedliche Toleranz dieses Pflanzenmaterials

zurückzuführen ist, bleibt offen. Abschließend kann diese Frage nur durch umfangreichere Untersuchungen zur Schwermetallaufnahme in Verbindung mit Vitalitätsbestimmungen an Pflanzen von unterschiedlich belasteten Standorten beantwortet werden.

In dem in der Elbe exponierten Pflanzenmaterial wurde eine signifikante Korrelation ($p = 0,01$) zwischen den PC₄- und Cd-Gehalten nachgewiesen. Diese war für Pb, Zn und Cu nicht festzustellen. PC₄ erwies sich daher im aktiven Biomonitoring als potentieller quantitativer Biomarker für Cd-Belastungen.

Nach Exposition an hoch belasteten Standorten eines ehemaligen Kupferschiefer-Bergbaugesbietes wurden im Pflanzenmaterial Gehalte von 36,7 µg/g TG Cd, 14500 µg/g TG Pb, 32300 µg/g TG Zn und 19000 µg/g TG Cu gemessen. Die Vitalität des Moose war jedoch nur geringfügig beeinträchtigt. Neben PC₄ wurden unter diesen Bedingungen weitere thiolhaltige Verbindungen synthetisiert.

Im passiven und aktiven Biomonitoring mit *F. antipyretica* wurde eine gute Akkumulation von Cd, Pb, Zn und Cu festgestellt. Gegenüber dem passiven Biomonitoring bietet die Exposition von Pflanzenmaterial den Vorteil einer minimalen biologischen Variabilität der Proben. Diese kann bei der passiven Bioindikation durch morphologische und physiologische Parameter, wie Pflanzenalter und Entwicklungszustand, die Akkumulationsleistung der Pflanzen beeinflussen.

Bislang wurde nicht ausreichend untersucht, inwieweit weitere organische und anorganische Substanzen im Wasser die Schwermetallakkumulation beeinflussen. Dieses sollte im Labor mit definierten Parametern der Wasserzusammensetzung geschehen.

In Hinblick auf die Nutzung von Phytochelatinen als Biomarker für Schwermetallbelastungen aquatischer Standorte erwies sich die Quantifizierung des in allen Proben von *F. antipyretica* enthaltenen PC₄ als sinnvoll. Da die Phytochelatinsynthese im Laborversuch jedoch nur durch Cd induziert werden konnte, ist PC₄ in *F. antipyretica* für dieses Metall ein potentieller quantitativer Biomarker. Die durchgeführten Untersuchungen sind bisher noch exemplarisch. Erst durch weitere umfangreiche Messungen zur Induktion von Phytochelatinen an natürlichen Standorten und im Expositionsversuch können abiotische Einflußfaktoren wie Lichtangebot, Temperatur, pH-Wert sowie die Zusammensetzung der Gewässerchemie bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Eine hohe Reproduzierbarkeit der Phytochelatin-Schwermetall-Korrelation im Biomonitoring ist abzusichern.

Auch bei der Nutzung von Phytochelatinen als Biomarker ist die Durchführung von Expositionsversuchen mit homogenen Pflanzenproben erfolgversprechender als im passiven Biomonitoring, bei dem die Thiolpeptidsynthese durch die biologische Variabilität des Pflanzenmaterials beeinflußt wird.

Extreme Schwermetallkonzentrationen können auch im Freiland dazu führen, daß im Moos verschiedene Phytochelatine gleichzeitig induziert werden, wodurch PC₄ allein nicht mehr als Referenz-Thiolpeptid ausgewertet werden kann. Inwieweit die Quantifizierung des gesamten Phytochelatinspektrums hier sinnvoll ist, bleibt zu untersuchen. Grundlage für die Verwendung der Phytochelatingehalte als quantitativer Biomarker ist, daß eine Beeinträchtigung der Vitalität des

Pflanzenmaterials ausgeschlossen werden kann. Insbesondere Cu-Belastungen können die Thiolpeptidsynthese hemmen.

Die Untersuchungen zur Reaktion des Thiolhaushaltes auf Cd, Pb, Zn und Cu ergaben Hinweise auf eine Schwermetalldetoxifikation durch Glutathion in Moosen. Ein derartiger Mechanismus ist bisher im Pflanzenreich nicht beschrieben und würde die allgemeine Annahme widerlegen, daß in Pflanzen die Schwermetallentgiftung im wesentlichen über Phytochelatine erfolgt.

Die Freilanduntersuchungen lieferten eine erfolgversprechende Grundlage für weitere Studien zum Einsatz von Phytochelatinen aus *F. antipyretica* als Biomarker für Schwermetallbelastungen aquatischer Systeme.

6 Literatur

- Agrawal, S. B.; Chaudhary, B. R. (1993) Mercury-induced changes in glutathione content of a green alga, *Cosmarium conspersum*. *Microbios* 76: 223 - 229
- Ahner, B. A.; Price, N. M.; Morel, F. M. M. (1994) Phytochelatin production by marine phytoplankton at low free metal ion concentrations: Laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8433 - 8436
- Ahner, B. A.; Kong, S.; Morel, F. M. M. (1995) Phytochelatin production in marine algae. 1. An interspecies comparison. *Limnol. Oceanogr.* 40: 649 - 657
- Ahner, B. A.; Morel, F. M. M. (1995) Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. *Limnol. Oceanogr.* 40: 658 - 665
- Alscher, R. G. (1989) Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol. Plant.* 77: 457 - 646
- Anderson, M. E. (1985) Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Biological Samples. *Methods Enzymol.* 113: 548 - 555
- Anderson, M. E. (1989) Enzymatic and Chemical Methods for the Determination of Glutathione. In: Dolphin, D.; Poutson, R.; Avramovic, O. (eds.) *Glutathione. Part A*, Wiley Int. Sci. New York. 147 - 186
- Augustin, T. (1996) Reinigung und Charakterisierung der Glutathion-Synthetase aus *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw.. Diplomarbeit, Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Bahadir, M.; Parlar, H.; Spitteller, M. (1995) Springer Umweltlexikon. Springer Verlag Berlin, Heidelberg. 928
- Baker, A. J. M.; Walker, P. L. (1989) Physiological response of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. *Chem. Speciation Bioavailab.* 1: 7 - 17
- Baker, A. J. M.; Walker, P. L. (1990) Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Shaw, A. J. (ed.) *Heavy metal tolerance in plants*. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. 155 - 177
- Bech-Otschir, D. (1995) Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Schwermetalle auf den Glutathion- und Gesamtthiol-Gehalt von *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw.. Diplomarbeit, Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Bendix, E. H.; Casper, S. J.; Danert, S.; Hübsch, P.; Lindner, K. E.; Schmelzer, K.; Schmiedeknecht, M.; Schubert, R.; Senge, W.; Siegel, M. (1974) *Urania Pflanzenreich, Niedere Pflanzen*. Urania Verlag Leipzig, Jena, Berlin. 453
- Benson-Evans, K.; Williams, P. F. (1976) Transplanting aquatic bryophytes to assess river pollution. *J. Bryol.* 9: 81 - 91
- Bergmann, L.; Rennenberg, H. (1993) Glutathione metabolism in plants. In: De Kok, L. J.; Stulen, I.; Rennenberg, H.; Brunold, C.; Rauser, W. E. (eds.) *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants*, SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands. 109 - 123
- Bernhard, W. R.; Kägi, J. H. R. (1987) Purification and characterization of atypical cadmium-binding polypeptides from *Zea mays*. *Exp. Suppl.* 52: 309 - 315
- Birke, M.; Rauch, U. (1993) Environmental aspects of the regional geochemical survey in the southern part of East Germany. *J. Geochem. Explor.* 49: 35 - 61

- Bliefert, C. (1994) Umweltchemie. VCH Weinheim, New York, Cambridge. 336 - 355
- Brouwer, M.; Brouwer-Hoexum, T. (1991) Interaction of Copper-Metallothioneine from the American Lobster, *Homarus americanus*, with Glutathione. Arch. Biochem. Biophys. 290: 207 - 213
- Brown, D. H.; Wells, J. M. (1988) Sequential elution technique for determining the cellular location of cations. In: Glime, J. M. (ed.) Methods in Bryology. Proc. Bryol. Meth. Workshop, Mainz. Hattori Bot. Lab.. Nichinan. 227 - 233
- Brown, D.; Wells, J. M. (1990) Physiological Effects of Heavy Metals on the Moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. Ann. Bot. 66: 641 - 647
- Brown, D. H.; Sidhu, M. (1992) Heavy Metal Uptake, Cellular Location, and Inhibition of Moss Growth. Crypt. Bot. 3: 82 - 85
- Brown, D. H.; Brumelis, G. (1996) A biomonitoring method using cellular distribution of metals in moss. Sci. Total. Environ. 187: 153 - 161
- Brune, A.; Urbach, W.; Dietz, K.-J. (1994) Zinc stress induces changes in apoplasmic protein content and polypeptide composition of *barley* primary leaves. J. Exp. Bot. 45: 1189 - 1196
- Brüning, F.; Kreeb, K. H. (1993) Mosses as Biomonitors of Heavy Metal Contamination within Urban Areas. In: Markert, B. (ed.) Plants as biomonitors - Indicators for heavy metals in the terrestrial environment. VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge. 395 - 401
- Brunold, C. (1996) Einführung. In: Brunold, C.; Rügsegger, A.; Brändle, R. (eds.) Stress bei Pflanzen. UTB Verlag Bern, Stuttgart, Wien. 15 - 34
- Bruns, I.; Siebert, A.; Baumbach, R.; Miersch, J.; Günther, D.; Markert, B.; Krauss, G.-J. (1995) Analysis of heavy metals and sulphur-rich compounds in the water moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw.. Fresenius J. Anal. Chem. 353: 101 - 104
- Bruns, I.; Friese, K.; Markert, B.; Krauss, G.-J. (1997) The use of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals. 2. Heavy metal accumulation and physiological reaction of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. in active biomonitoring in the river Elbe. Sci. Total Environ. 204: 161 - 176
- Chen, J.; Goldsbrough, P. B. (1994) Increased Activity of γ -Glutamylcysteine Synthetase in Tomato Cells Selected for Cadmium Tolerance. Plant Physiol. 106: 233 - 239
- Chovanec, A.; Vogel, W. R. (1992) Schadstoffe in aquatischen Moosen und Sedimenten im Einflußbereich eines industriellen und urbanen Ballungsraumes. Deutsche Gesellschaft für Limnologie. 579 - 583
- Chovanec, A.; Vogel, W. R.; Lorbeer, G.; Hanus-Illyar, A.; Seif, P. (1994) Chlorinated organic compounds, PAHs, and heavy metals in sediment and aquatic mosses of two upper Austrian rivers. Chemosphere 29: 2117 - 2133
- Costa, G.; Michaut, J.-C.; Morel, J.-L. (1994) Influence of cadmium on water relations and gas exchanges, in phosphorus deficient *Lupinus alba*. Plant Physiol. Biochem. 32: 105 - 114
- Dalton, D. A. (1995) Antioxidant Defense of Plants and Fungi. In: Ahmad, S. (ed.) Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology. Chapman & Hall New York u. a... 298 - 342
- Dameron, C. T.; Smith, B. R.; Winge, D. R. (1989) Glutathione-coated Cadmium-Sulfide Crystallites in *Candida glabrata*. J. Biol. Chem. 264: 17355 - 17360

- De Knecht, J. A.; Koevoets, P. L. M.; Verkleij, J. A. C.; Ernst, W. H. O. (1992) Evidence against a role for phytochelatins in naturally selected increased cadmium tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *New Phytol.* 122: 681 - 688
- De Knecht, J. A.; Van Dillen, M.; Koevoets, P. L. M.; Schat, H.; Verkleij, J. A. C.; Ernst, W. H. O. (1994) Phytochelatins in Cadmium-Sensitive and Cadmium-Tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiol.* 104: 255 - 261
- De Knecht, J. A.; Van Baren, N.; Ten Bookum, W. M.; Wong Fong Sang, H. W.; Koevoets, P. L. M.; Schat, H.; Verkleij, J. A. C. (1995) Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Science* 106: 9 - 18
- De Vos, C. H. R.; Schat, H.; De Waal, M. A. M.; Vooijs, R.; Ernst, W. H. O. (1991) Increased resistance to copper-induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Physiol. Plant.* 82: 523 - 528
- De Vos, C. H. R.; Vonk, M. J.; Vooijs, R.; Schat, H. (1992) Glutathione Depletion Due to Copper Induced Phytochelatin Synthesis Causes Oxidative Stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol.* 98: 853 - 858
- Dhindsa, R. S. (1987) Glutathione Status and Protein Synthesis during Drought and Subsequent Rehydration in *Tortula ruralis*. *Plant Physiol.* 83: 816 - 819
- Dietz, K.-J.; Brune, A.; Pfanz, H. (1992) Trans-Tonoplast Transport of the Sulfur Containing Compounds Sulfate, Methionine, Cysteine and Glutathione. *Phyton* 32: 37 - 40
- Diaz-Cruz, M. S.; Mendieta, J.; Tauler, R.; Esteban, M. (1997) Cadmium-Binding Properties of Glutathione: A Chemometrical Analysis of Voltammetric Data. *J. Inorg. Biochem.* 66: 29 - 36
- Dobler, L.; Frühauf, M. (1997) Die Schwermetallführung von Auenböden und Hochmooren als Indikator für den Einfluß des historischen Bergbaus im Unterharz auf die Landschaftsentwicklung und -belastung. Abschlußbericht zum Forschungsprojekt, Institut für Geographie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70 - 77
- Empain, A. M. (1988) A Posteriori Detection of Heavy-Metal Pollution of Aquatic Habitats. In: Glime, J. M. (ed.) *Methods in Bryology. Proc. Bryol. Meth. Workshop, Mainz. Hattori Bot. Lab.. Nichinan.* 227 - 233
- Ernst, W. H. O.; Verkleij, J. A. C.; Schat, H. (1992) Metal tolerance in plants. *Acta Bot. Neerl.* 41: 213 - 220
- Ernst, W. H. O.; Peterson, P. J. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (4). *Terrestrial plants. Ecotoxicology* 3: 180 - 192
- Ernst, W. H. O. (1996) Schwermetalle. In: Brunold, C.; Rügsegger, A.; Brändle, R. (eds.) *Stress bei Pflanzen.* UTB Verlag Bern, Stuttgart, Wien. 191 - 220
- Fiedler, H. J.; Rösler, H. J. (1993) *Spurenelemente in der Umwelt.* Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart.
- Förstner, U.; Salomons, W. (1991) Mobilization of Metals from Sediments. In: Merian, E. (ed.) *Metals and Their Compounds in the Environment.* VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge. 379 - 398
- Foy, C. D.; Chaney, R. L.; White, M. C. (1978) The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29: 511 - 566

- Frahm, J. P.; Frey, W. (1987) Moosflora. UTB Ulmer Stuttgart. 398
- Freedmann, J. H.; Ciriolo, M. R.; Peisach, J. (1989) The Role of Glutathione in Copper Metabolism and Toxicity. *J. Biol. Chem.* 264: 5598 - 5605
- Frost, U. (1990) Transplantationsversuche mit Wassermoosen zur Indikation der Gewässergüte am Niederrhein. *Cryptog. Bryol. Lichenol.* 11: 339 - 352
- Galli, U.; Schüepp, H.; Brunold, C. (1995) Thiols of Cu-treated maize plants inoculated with the arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Physiol. Plant.* 94: 247 - 253
- Gawel, J. E.; Ahner, B. A.; Friedland, A. J.; Morel, F. M. M. (1996) Role of heavy metals in forest decline indicated by phytochelatin measurements. *Nature* 381: 64 - 65
- Gekeler, W.; Grill, E.; Winnacker, E. L.; Zenk, M. H. (1988) Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.* 150: 197 - 202
- Gekeler, W.; Grill, E.; Winnacker, E. L.; Zenk, M. H. (1989) Survey of the Plant Kingdom for the Ability to Bind Heavy Metals through Phytochelatins. *Z. Naturforsch.* 44: 361 - 369
- Gewässergütebericht Sachsen-Anhalt (1994) Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt.
- Gewässergütebericht Sachsen-Anhalt (1995) Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt.
- Goncalves, E. P. R.; Soares, H. M. V. M.; Boaventura, R. A. R.; Machado, A. A. S. C.; Esteves da Silva, J. C. G. (1994) Seasonal variations of heavy metals in sediment and aquatic mosses from the Cavado river basin (Portugal). *Sci. Total Environ.* 142: 143 - 156
- Grill, D. (1992) The role of thiols in stress physiology. In: Guttenberger, H. Bermadinger, E. & Grill, D. (eds.) *Pflanze, Umwelt, Stoffwechsel*. Institut für Pflanzenphysiologie, GRAZ. 73 - 86
- Grill, E.; Winnacker, E.-L.; Zenk, M. H. (1985) Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. *Science* 230: 674 - 676
- Grill, E.; Gekeler, W.; Winnacker, E.-L.; Zenk, M. H. (1986) Homo-phytochelatins are heavy metal-binding peptides of homo-glutathione containing Fabales. *FEBS Letters* 205: 47 - 50
- Grill, E.; Winnacker, E.-L.; Zenk, M. H. (1987) Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 439 - 443
- Grill, E.; Thumann, J.; Winnacker, E.-L.; Zenk, M. H. (1988a) Induction of heavy-metal binding phytochelatins by inoculation of cell cultures in standard media. *Plant Cell Rep.* 7: 375 - 378
- Grill, E.; Winnacker, E.-L.; Zenk, M. H. (1988b) Occurrence of heavy metal binding phytochelatins in plants growing in a mining refuse area. *Experientia* 44: 539 - 540
- Grill, E.; Loeffler, S.; Winnacker, E.-L.; Zenk, M. H. (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6838 - 6842
- Grill, E.; Zenk, M. H. (1989) Wie schützen sich Pflanzen vor toxischen Schwermetallen? *Chemie in unserer Zeit* 6: 193 - 199
- Grill, E.; Winnacker, E.-L.; Zenk, M. H. (1991) Phytochelatins. *Methods Enzymol.* 205: 333 - 341
- Gunkel, G. (1994) Bioindikation in aquatischen Ökosystemen. Fischer Verlag Jena, Stuttgart

- Gupta, S. C.; Goldsbrough, P. B. (1991) Phytochelatin Accumulation and Cadmium Tolerance in Selected Tomato Cell Lines. *Plant Physiol.* 97: 306 - 312
- Gupta, M.; Devi, S. (1994) Chronic toxicity of cadmium in *Pteris vittata*, a roadside fern. *Ecotoxicology* 3: 235 - 247
- Gupta, S. C.; Rai, U. N.; Tripathi, R. D.; Chandra, P. (1995) Lead induced changes in glutathione and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle. *Chemosphere* 30: 2011 - 2020
- Harbourne, J. B. (1992) Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press London, San Diego, New York, Boston, Sidney, Tokyo, Toronto. 19 - 22
- Harmens, H.; Den Hartog, P. R.; Ten Bookum, W. M.; Verkleij, J. A. C. (1993) Increased Zinc Tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke Is Not Due to Increased Production of Phytochelatins. *Plant Physiol.* 103: 1305 - 1309
- Hamer, D. H. (1986) Metallothioneins. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 913 - 951
- Hausladen, A.; Alscher, R. G. (1993) Glutathione. In: Alscher, R. G.; Hess, J. L. (eds.) Antioxidants in Higher Plants. CRC Press Inc. Boca Raton, Ann Arbor, London Tokyo. 1 - 29
- Hayashi, Y.; Nakagawa, C. W.; Mutho, N.; Isobe, M.; Goto, T. (1991) Two pathways in the biosynthesis of cadystins (γ EC)_nG in the cell free system of the fission yeast. *Biochem. Cell Biol.* 69: 115 - 121
- Heintz, A.; Reinhardt, G. A. (1996) Chemie in der Umwelt. Vieweg Verlag Braunschweig, Wiesbaden. 233 - 257
- Hell, R.; Bergmann, L. (1988) Glutathione synthetase in tobacco suspension cultures: catalytic properties and localization. *Physiol. Plant.* 72: 70 - 76
- Hell, R.; Bergmann, L. (1990) γ -Glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization. *Planta* 180: 603 - 612
- Herpin, U.; Markert, B.; Siewers, U.; Lieth, H. (1994) Monitoring der Schwermetallbelastung in der Bundesrepublik Deutschland mit Hilfe von Moosanalysen. *Forschungsbericht* 108 02 087 UBA-FB. 94 - 125
- Herpin, U.; Berlekamp, J.; Markert, B.; Wolterbeek, B.; Grodzinska, K.; Siewers, U.; Lieth, H.; Weckert, V. (1996) The distribution of heavy metals in a transect of the three states The Netherlands, Germany and Poland, determined with the aid of moss monitoring. *Sci. Total Environ.* 187: 185 - 198
- Herrmann, R. (1990) Biomonitoring of organic and inorganic trace pollutants by means of mosses. In: Zinsmeister, H. D.; Mues, R. (eds.). *Bryophytes: Their Chemistry and Chemical Taxonomy*. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe 29, Clarendon Press, Oxford. 319 - 325
- Herschbach, C.; Rennenberg, H. (1994) Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulphate and sulphate transport in tobacco plants. *J. Exp. Bot.* 45: 1069 - 1076
- Howden, R.; Goldsbrough, P. B.; Andersen, C. R.; Cobett, S. (1995) Cadmium-Sensitive, *cad1* Mutants of *Arabidopsis thaliana* Are Phytochelatin Deficient. *Plant Physiol.* 107: 1059 - 1066
- Huber, W.; Huber, A. (1995) Schadstoffbelastungen für Wasserpflanzen. In: Hock, B.; Elstner, E. F. (eds.) *Schadwirkungen auf Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford. 141 - 154

- Isobe, M.; Hayashi, Y.; Imai, K.; Nakagawa, C.-W.; Uyakul, D.; Mutoh, N.; Goto, T. (1992) Biosynthesis of Cadystin. Structure and biosynthesis of cadystin [γ -EC]Peptides (γ -EC)_n-G] of Fission Yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. In: Stillman, M. J.; Shaw, C. F.; Suzuki, K. T. (eds.) Metallothioneins. VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge 226 - 256
- Jackson, P. P.; Robinson, N. J.; Whitton, B. A. (1991) Low molecular weight metal complexes in the freshwater moss *Rhynchostegium riparioides* exposed to elevated concentrations of Zn, Cu, Cd and Pb in the laboratory and field. *Environ. Exp. Bot.* 31: 359 - 366
- Jeffrey, S. W.; Humphrey, G. F. (1975) New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167: 191 - 194
- Karrer, W. (1958) Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe. Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart. 96 - 971
- Kelly, M. G.; Whitton, B. A. (1989) Interspecific differences in Zn, Cd and Pb accumulation by freshwater algae and bryophytes. *Hydrobiologia* 175: 1 - 11
- Klapheck, S.; Latus, C.; Bergmann, L. (1987) Localization of glutathione synthetase and distribution of glutathione in leaf cells of *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* 131: 123 - 131
- Klapheck, S. (1988) Homoglutathione: Isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiol. Plant.* 74: 727 - 732
- Klapheck, S.; Chrost, B.; Starke, J.; Zimmermann, H. (1992) γ -Glutamylcysteinylserine - A New Homologue of Glutathione in Plants of the Family *Poaceae*. *Bot. Acta* 105: 174 - 179
- Klapheck, S.; Fliegner, W.; Zimmer, I. (1994) Hydroxymethyl-Phytochelatin [(γ -Glutamylcysteine)_n - Serine] Are Metal-Induced Peptides of the *Poaceae*. *Plant Physiol.* 104: 1325 - 1332
- Klapheck S.; Schlunz S.; Bergmann L. (1995) Synthesis of Phytochelatin and Homophytochelatin in *Pisum sativum* L.. *Plant Physiol.* 107: 515 - 521
- Kneer, R.; Kutchan, T. M.; Hochberger, A.; Zenk, M. H. (1992) *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Arch. Microbiol.* 157: 305 - 310
- Kneer, R.; Zenk, M. H. (1992) Phytochelatin protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry* 8: 2663 - 2667
- Kneer, R.; Zenk, M. H. (1997) The formation of Cd-phytochelatin complexes in plant cell cultures. *Phytochemistry* 44: 69 - 74
- Kojima, Y. (1991) Definitions and Nomenclature of Metallothioneins. *Methods Enzymol.* 205: 8 - 9
- Kosower, N. S.; Kosower, E. M. (1978) The Glutathione Status of Cells. *Int. Rev. Cytol.* 54: 109 - 160
- Kranner, I.; Grill, D. (1996) Significance of Thiol-Disulfide Exchange in Resting Stages of Plant Development. *Bot. Acta* 109: 8 - 14
- Krauss, G.; Bärlocher, F.; Schreck, P.; Dermietzel, J.; Wennrich, R.; Glässer, W.; Krauss, G.-J. (1997) Aquatic hyphomycetes occur in hyperpolluted waters in Central Germany. *Science* (submitted)

- Kremer, B. P.; Muhle, H. (1991) Flechten, Moose, Farne. Steinbach, G. (ed.) Steinbachs Naturführer. Mosaik Verlag München. 190
- Krotz, R. M.; Evangelou, B. P.; Wagner, G. J. (1989) Relationships between Cadmium, Zinc, Cd-Peptide, and Organic Acid in Tobacco Suspension Cells. *Plant Physiol.* 91: 780 - 787
- Kubota, H.; Sato, K.; Yamada, T.; Maitani, T. (1995) Phytochelatins (Class III metallothioneins) and their desglycyl peptides induced by cadmium in normal root cultures of *Rubia tinctorum* L.. *Plant Science* 106: 157 - 166
- Lamoureux, G. L.; Rusness, D. G. (1993) Glutathione in the metabolism and detoxification of xenobiotics in plants. In: De Kok, L. J.; Stulen, I.; Rennenberg, H.; Brunold, C.; Rauser, W. E. (eds.) *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants*. SPB Academic Publishing The Hague, The Netherlands. 221 - 237
- Ledl, G.; Janauer, G. A.; Horak, O. (1981) Die Anreicherung von Schwermetallen in Wasserpflanzen aus einigen österreichischen Fließgewässern. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 9: 651 - 663
- Löffler, S.; Hochberger, A.; Grill, E.; Winnacker, E.-L.; Zenk, M. H. (1989) Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. *FEBS Letters* 258: 42 - 46
- Lolkema, P. C.; Donker, M. H.; Schouten, A. J.; Ernst, W. H. O. (1984) The possible role of metallothioneins in copper tolerance of *Silene cucubalus*. *Planta* 162: 174 - 179
- Lopez, J.; Carballeira, A. (1989) A comparative study of pigment contents and response to stress in five species of aquatic bryophytes. *Lindbergia* 15: 188 - 194
- Lopez, J.; Vazquez, D. M.; Carballeira, A. (1994) Stress responses and metal exchange kinetics following transplant of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*. *Freshwater Biol.* 32: 185 - 198
- Lue-Kim, H.; Rauser, W. E. (1986) Partial Characterization of Cadmium-Binding Protein from Roots of Tomato. *Plant Physiol.* 81: 896 - 900
- Maitani, T.; Kubota, H.; Sato, K.; Takeda, M.; Yoshihira, K. (1996a) Induction of Phytochelatin (Class III Metallothionein) and Incorporation of Copper in Transformed Hairy Roots of *Rubia tinctorum* Exposed to Cadmium. *J. Plant Physiol.* 147: 743 - 748
- Maitani, T.; Kubota, H.; Sato, K.; Yamada, T. (1996b) The Composition of Metals Bound to Class III Metallothionein (Phytochelatin and Its Desglycyl Peptide) Induced by Various Metals in Root Cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol.* 110: 1145 - 1150
- Markert, B.; Weckert, V. (1989) Fluctuation of the element concentrations during the growing season of *Polytrichum formosum* (Hedw.). *Water, Air, and Soil Pollution* 43: 177 - 189
- Markert, B. (ed.) (1993a) *Plants as biomonitors - Indicators for heavy metals in the terrestrial environment*. VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- Markert, B. (1993b) *Instrumentelle Multielementanalyse von Pflanzenproben*. VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge. 16 - 19
- Markert, B.; Weckert, V. (1993) Time- and site integrated long-term biomonitoring of chemicals by means of mosses. *Toxicol. Environ. Chem.* 40: 43 - 56
- Markert, B. (1994) Biomonitoring - Quo Vadis? *Z. Umweltchem. Ökotox.* 6: 145 - 149
- Markert, B.; Herpin, U.; Siewers, U.; Berlekamp, J.; Lieth, H. (1996) The German heavy metal survey by means of mosses. *Sci. Total Environ.* 182: 159 - 168

- Markert, B.; Oehlmann, J. (1996) Thesenpapier zur Standort- und Begriffsdefinition in der Bioindikation. In: Arndt, U.; Fomin, A.; Lorenz, S. (eds.) Bioindikation: Neue Entwicklungen, Nomenklatur, Synökologische Aspekte. 1. Hohenheimer Workshop zur Bioindikation am Kraftwerk Altbach-Deizisau. Verlag Günter Heimbach Ostfildern. 281 - 286
- Markert, B. (1996) Instrumental Element and Multi-element Analysis of Plant Samples. Methods and Applications. John Wiley & Sons Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Markert, B.; Oehlmann, J.; Roth, M. (1997) Biomonitoring von Schwermetallen eine kritische Bestandsaufnahme. Z. Ökologie und Naturschutz. 6: 1 - 8
- Mason, A. Z.; Jenkins, K. D. (1995) Metal detoxification in aquatic organisms. In: Tessier, A.; Turner, D. R. (eds.) Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. UPAC 3. John Wiley & Sons Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore. 479 - 607
- Mc Queen, C. B. (1991) Laboratory and Greenhouse Cultures and the Experimental Taxonomy of Bryophytes. Adv. Bryol. 4: 103 - 120
- Mehra, R. K.; Mulchandani, P.; Hunter, T. C. (1994) Role of CdS quantum crystallites in cadmium resistance in *Candida glabrata*. Biochem. Biophys. Res. Com. 200: 1193 - 1200
- Mehra, R. K.; Mulchandani, P. (1995) Glutathione-mediated transfer of Cu (I) into phytochelatins. Biochem. J. 307: 697 - 705
- Mehra, R. K.; Kodati, R.; Abdullah, R. (1995) Chain length-dependent Pb(II)-coordination in phytochelatins. Biochem. Biophys. Res. Comm. 215: 730 - 736
- Meister, A.; Anderson, M. E. (1983) Glutathione. Ann. Rev. Biochem. 52: 711 - 760
- Melzer, A. (1985) Makrophytische Wasserpflanzen als Bioindikatoren. Naturwissenschaften. 72: 456 - 460
- Mendum, M. L.; Gupta, S. C.; Goldsbrough, P. B. (1990) Effect of Glutathione on Phytochelatin Synthesis in Tomato Cells. Plant Physiol. 93: 484 - 488
- Meuwly, P.; Rauser, W. E. (1992) Alteration of Thiol Pools in Roots and Shoots of Maize Seedlings Exposed to Cadmium. Plant Physiol. 99: 8 - 15
- Meuwly, P.; Thibault, P.; Rauser, W. E. (1993) γ -Glutamylcysteinylglutamic acid - a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. FEBS Letters 336: 472 - 476
- Meuwly, P.; Thibault, P.; Schwan, A. L.; Rauser, W. E. (1995) Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. Plant J. 7: 391 - 400
- Mouvet, C. (1984) Accumulation of chromium and copper by the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. transplanted in a metal contaminated river. Environ. Technol. Lett. 5: 541 - 548
- Mouvet, C. (1985) The use of aquatic bryophytes to monitor heavy metal pollution of freshwaters as illustrated by case studies. Verh. Internat. Verein. Limnol. 22: 2420 - 2425
- Nussbaum, S.; Schmutz, D.; Brunold, C. (1988) Regulation of Assimilatory Sulfate Reduction by Cadmium in *Zea mays* L.. Plant Physiol. 88: 1407 - 1410
- Paulus, M.; Alteyer, M.; Klein, R.; Hildebrandt, A.; Ostapczuk, P.; Oxynos, K. (1994) Biomonitoring und Umweltprobenbank. Beitragsserie: Biomonitoring und Umweltprobenbank. Z. Umweltchem. Ökotox. 6: 375 - 383

- Peakall, D. B. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology* 3: 157 - 160
- Peichl, L.; Wäber, M.; Reifenhäuser, W. (1994) Schwermetallmonitoring mit der Standardisierten Graskultur im Untersuchungsgebiet München. *Z. Umweltchem. Ökotox.* 6: 63 - 69
- Peterson, P. J.; Alloway, B. J. (1979) Cadmium in soils and vegetation. In: Webb, M. (ed.) *The chemistry, biochemistry and biology of cadmium*. Elsevier/North Holland Biomedical Press. 93 - 132
- Plocke, D. J.; Kägi, H. R. (1992) Spectral characteristics of cadmium-containing phytochelatin complexes isolated from *Schizosaccharomyces pombe*. *Int. J. Biochem.* 207: 201 - 205
- Rabenstein, D. L. (1989) Metal Complexes of Glutathione and their Biological Significance. In: Dolphin, D.; Poutson, R.; Avramovic, O. (eds.): *Glutathione. Part A*, Wiley Int. Sci. New York. 147 - 186
- Rascio, N.; Vecchia, F. D.; Ferretti, M.; Merlo, L.; Ghisi, R. (1993) Some effects of cadmium on maize plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25: 244 - 249
- Rauser, W. E.; Hunziker, P. E.; Kägi, J. H. R. (1986) Reversed-phase high-performance liquid chromatography of Cd-binding proteins from the grass *Agrostis gigantea*. *Plant Science* 45: 105 - 109
- Rauser, W. E. (1990) Phytochelatins. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 61 - 86
- Rauser, W. E.; Schupp, R.; Rennenberg, H. (1991) Cysteine, γ -Glutamylcysteine, and Glutathione Levels in Maize Seedlings. *Plant Physiol.* 97: 128 - 138
- Rauser, W. E. (1993) Metal-Binding Peptides in Plants. In: De Kok, L. J.; Stulen, I.; Rennenberg, H.; Brunold, C.; Rauser, W. E. (eds.) *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants*. SPB Academic Publishing The Hague, The Netherlands. 239 - 251
- Rauser, W. E. (1995) Phytochelatins and Related Peptides. *Plant Physiol.* 109: 1141 - 1149
- Rauser, W. E.; Meuwly, P. (1995) Retention of Cadmium in Roots of Maize Seedlings. *Plant Physiol.* 109: 195 - 202
- Reese, R. N.; Winge, D. R. (1988) Sulfide Stabilization of the Cadmium- γ -Glutamyl Peptide Complex of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 263: 12832 - 12835
- Reese, R. N.; White, C. A.; Winge, D. R. (1992) Cadmium-Sulfide Crystallites in Cd-(γ EC)_n-G Peptide Complexes from Tomato. *Plant Physiol.* 98: 225 - 229
- Rennenberg, H. (1982) Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* 21: 2771 - 2781
- Rennenberg, H.; Brunold, C. (1994) Significance of Glutathione Metabolism in Plants Under Stress. *Progress in Botany* 55: 142 - 155
- Rennenberg, H.; Lamoureux, G. L. (1990) Physiological Process that Modulate the Concentration of Glutathione in Plant Cells. In: Brunold, C.; Rennenberg, H. (eds.) *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants*, SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands. 53 - 65
- Richardson, D. H. S. (1981) *The Biology of Mosses*. Blackwell Scientific Publications Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne. 184 - 185

- Robinson, N. J.; Jackson, P. J. (1986) 'Metallothioneine-like' metal-complexes in angiosperms; their structure and function. *Physiol. Plant.* 67: 499 - 506
- Robinson, N. J.; Ratlief, R. L.; Anderson, P. J.; Delhaize, E.; Berger, J.; Jackson, P. J. (1988) Biosynthesis of Poly(γ -glutamylcysteinyl)glycines in cadmium-tolerant *Datura innoxia* (Mill.) Cells. *Plant Science* 56: 197 - 204
- Robinson, N. J.; Thurman, D. A. (1986) Isolation of copper complex and its rate of appearance in roots of *Mimulus guttatus*. *Planta* 169: 192 - 197
- Roy, S.; Pellinen, J.; Sen, C. K.; Hänninen, O. (1994) Benzo(a)anthracene and Benzo(a)pyrene exposure in the aquatic plant *Fontinalis antipyretica*: Uptake, elimination and the responses of biotransformation and antioxidant enzymes. *Chemosphere* 29: 1301 - 1311
- Rüegsegger, A.; Schmutz, D.; Brunold C. (1990) Regulation of Glutathione Synthesis by Cadmium in *Pisum sativum* L.. *Plant Physiol.* 93: 1579 - 1584
- Rüegsegger, A.; Brunold, C. (1993) Localization of γ -Glutamylcysteine Synthetase and Glutathione Synthetase in Maize Seedlings. *Plant Physiol.* 101: 561 - 566
- Rühling, A.; Tyler, G. (1968) An ecological approach to the lead problem. *Bot. Notiser.* 121: 321 - 342
- Rühling, A.; Tyler, G. (1973) Heavy metal deposition in Scandinavia. *Water, Air and Soil Pollution* 2: 445 - 455
- Sachs, L. (1988) *Statistische Methoden.* Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Tokio. 255 - 256
- Say, P. J.; Harding, J. P. C.; Whitton, B. A. (1981) Aquatic mosses as monitors of the heavy metal contamination of the River Etherow, Great Britain. *Environ. Pollut.* 2: 295 - 307
- Say, P. J.; Whitton, B. A. (1983) Accumulation of heavy metals by aquatic mosses. 1: *Fontinalis antipyretica* Hedw.. *Hydrobiologia* 100: 245 - 260
- Scheller, H. V.; Huang, B.; Hatch, E.; Goldsbrough, P. B. (1987) Phytochelatin Synthesis and Glutathione Levels in Response to Heavy Metals in Tomato Cells. *Plant Physiol.* 85: 1031 - 1035
- Schlee, D.; Schulz, H.; Jung, K. (1996) Biomonitoring - Eine Methode der Umweltanalytik. *Z. Umweltchem. Ökotox.* 8: 172 - 178
- Schneider, St.; Bergmann, L. (1995) Regulation of Glutathione Synthesis in Suspension Cultures of Parsley and Tobacco. *Bot. Acta* 108: 34 - 40
- Schopfer, P. (1986) *Experimentelle Pflanzenphysiologie.* Band 1, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokio. 47
- Schupp, R.; Rennenberg, H. (1988) Diurnal changes in the glutathione content of spruce needles (*Picea abies* L.). *Plant Science* 57: 113 - 117
- Schupp, R. (1991) Untersuchungen zur Schwefelernährung der Fichte (*Picea abies* L.): Die Bedeutung der Sulfatassimilation und des Transports von Thiolen. Dissertation, Institut für Botanik und Mikrobiologie, TU München.
- Siebert, A. (1994) Untersuchungen zur Schwermetallakkumulation von *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. an natürlichen Standorten und zum Einsatz als Monitoring-Organismus. Diplomarbeit, Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Siebert, A.; Bruns, I.; Krauss, G.-J.; Miersch, J.; Markert, B. (1996) The use of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals. 1. Fundamental investigations into heavy metal accumulation in *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw.. Sci. Total Environ. 177: 137 - 144
- Sies, H. (1989) Zur Biochemie der Thiolgruppe: Bedeutung des Glutathion. Naturwissenschaften 76: 57 - 64
- Smith, I. K.; Polle, A.; Rennenberg, H. (1990) Glutathione. In: Alscher, R. G.; Cumming, J. R. (eds.) Stress Responses in Plants: Adaption and Acclimation Mechanisms. John Wiley & Sons New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. 201 - 215
- Sommer, C.; Winkler, S. (1982) Reaktionen im Gaswechsel von *Fontinalis antipyretica* HEDW. nach experimentellen Belastungen mit Schwermetallverbindungen. Arch. Hydrobiol. 93: 503 - 524
- Speiser, D. M.; Abrahamson, S. L.; Banuelos, G.; Ow, D. W. (1992) *Brassica juncea* Produces a Phytochelatin-Cadmium-Sulfide Complex. Plant Physiol. 99: 817 - 821
- Steffens, J. C.; Hunt, D. F.; Williams, B. G. (1986) Accumulation of Non-protein Metal-binding Polypeptides (γ -Glutamyl-Cysteinyl)_n-Glycine in Selected Cadmium-resistant Tomato Cells. The J. Biol. Chem. 261: 13879 - 13882
- Steffens, J. C. (1990) The heavy metal-binding peptides of plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 41: 553 - 575
- Steinnes, E. (1993) Some aspects of biomonitoring of air pollutants using mosses, as illustrated by the 1976 Norwegian survey. In: Markert, B. (ed.): Plants as biomonitors - Indicators for heavy metals in the terrestrial environment. VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge. 381 - 394
- Strasdeit, H. (1992) Beiträge zur Komplexchemie und bioanorganischen Chemie des Cadmiums. Habilitationsschrift, Fachbereich Anorganische Chemie, Universität Oldenburg
- Strasdeit, H.; Duhme, A.-K.; Johanning, J. (1993) Cadmiumkomplexe mit pflanzlichen Chelatbildnern. GIT Fachz. Labor 8: 678 - 681
- Streit, B.; Stumm, W. (1993) Chemical Properties of Metals and the Process of Bioaccumulation in Terrestrial Plants. In: Markert, B. (ed.) Plants as biomonitors. VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge. 31 - 62
- Strohm, M.; Jouanin, L.; Kunert, K. J.; Pruvost, C.; Polle, A.; Foyer, C. H.; Rennenberg, H. (1995) Regulation of glutathione synthesis in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase. Plant J. 7: 141 - 145
- Sutter, K. (1996) Entwicklung selektiver Trenn- und Analysenverfahren für thiolhaltige Peptide aus pflanzlichen Extrakten. Diplomarbeit, Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Tewes, A.; Glund, K.; Walther, R.; Reinbothe, H. (1983) High Yield Isolation and Rapid Recovery of Protoplasts From Suspension Cultures of Tomato (*Lycopersicon esculentum*). Z. Pflanzenphysiol. 113: 141 - 150
- Thöni, L.; Schmid-Grob, I.; Hertz, J. (1991) Analytische Vergleichsmessungen an Moosen und an Bergerhoffproben - zum Aussagewert von Schwermetallmessungen mit Hilfe von Moosen als Biomonitoren. VDI Berichte 901: 705 - 728
- Thumann, J.; Grill, E.; Winnacker, E.-L.; Zenk, M. H. (1991) Reactivation of metal requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. FEBS Letters 284: 66 - 69

- Tukendorf, A.; Rauser, W. (1990) Changes in glutathione and phytochelatins in roots of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Science* 70: 155 - 166
- Tyler, G. (1990) Bryophytes and heavy metals: A literature review. *Bot. J. Linn. Soc.* 104: 231 - 253
- Van Assche, F.; Cardinales, C.; Clijsters, H. (1988) Induction of Enzyme Capacity in Plants as a Result of Heavy Metal Toxicity: Dose-Response Relations in *Phaseoles vulgaris* L., Treated with Zinc and Cadmium. *Environ. Pollut.* 52: 103 - 115
- Van Gestel, C. A. M.; Van Brummelen, T. C. (1996) Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5: 217 - 225
- Vögeli-Lange, R.; Wagner, G. J. (1990) Subcellular Localization of Cadmium and Cadmium-Binding Peptides in Tobacco Leaves. *Plant Physiol.* 92: 1086 - 1093
- Verkleij, J. A. C.; Koevoets, P.; Van 't Riet, J.; Bank, R.; Nijdam, Y.; Ernst, W. H. O. (1990) Poly(γ -glutamylcysteinyl)glycines or phytochelatins and their role in cadmium tolerance of *Silene vulgaris*. *Plant Cell Environ.* 13: 913 - 921
- Verkleij, J. A. C. (1993) The Effects of Heavy Metal Stress on Higher Plants and their Use as Biomonitors. In: Markert, B. (ed.) *Plants as biomonitors - Indicators for heavy metals in the terrestrial environment*. VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge. 415 - 424
- Wagner, G. J.; Trotter, M. M. (1982) Inducible Cadmium Binding Complexes of Cabbage and Tobacco. *Plant Physiol.* 69: 804 - 809
- Wallnöfer, P. R.; Engelhardt, G. (1995) Schadstoffe aus dem Boden. In: Hock, B.; Elstner, E. F. (eds.) *Schadwirkungen auf Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford. 118 - 140
- Wehr, J. D.; Whitton, B. A. (1983a) Accumulation of heavy metals by aquatic mosses. 3: Seasonal changes. *Hydrobiologia* 100: 285 - 291
- Wehr, J. D.; Whitton, B. A. (1983b) Accumulation of heavy metals by aquatic mosses. 2: *Rhynchostegium riparioides*. *Hydrobiologia* 100: 261 - 284
- Wells, J. M.; Brown, D. H. (1987) Factors affecting the kinetic of intra- and extracellular cadmium uptake by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. *New Phytol.* 105: 123 - 137
- Wells, J. M.; Brown, D. H. (1990) Ionic control of intracellular and extracellular Cd uptake by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst.. *New Phytol.* 116: 541 - 553
- Wells, J. M.; Brown, D. H. (1995) Cadmium Tolerance in a Metal-Contaminated Population of the Grassland Moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. *Ann. Bot.* 75: 21 - 29
- Wolterbeek, H. Th.; Kuik, P.; Verburg, T. G.; Herpin, U.; Markert, B.; Thöni, L. (1995) Moss interspecies comparisons in trace element concentrations. *Environ. Monit. Assess.* 35: 263 - 286
- Xiang, D.; Jian, J.; Yingyan, W.; Wenqing, W.; Bingeng, R. (1994) Bioconcentration of cadmium in water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in relation to thiol group content. *Environ. Pollut.* 84: 93 - 96
- Zenk, M. H. (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* 179: 21 - 30
- Zimmermann, R.-D.; Baumann, R. (1994) Bioindikationsmethoden. Beitragsserie zur Erstellung von Wirkungskatstern. *Z. Umweltchem. Ökotox.* 6: 111 - 115

Anhang

Tab. 1: Standorte und Beprobungsschema der Expositionsversuche in der Elbe 1994 und 1995, Ergebnisteil Kap. 3.2, Material und Methoden Kap. 2.2.1, Abb. 3.

Standort	Nr.	Expositionsdauer [Tage]	
		1994	1995
Tangermünde rechts	1	16	n.g.
Tangermünde links	2	16	n.g.
Bittkau links	3	n.g.	14
Schönebeck rechts	4	16	14
Schönebeck links	5	16	14
Breitenhagen rechts	6	16	14
Breitenhagen links	7	16	14
Aken rechts	8	n.g.	15
Aken links	9	n.g.	15
Coswig rechts	10	16	15
Coswig links	11	16	15

Tab. 2: Schwermetallgehalte der Proben von *F. antipyretica* nach Exposition in der Elbe 1994 und 1995, [$\mu\text{g/g}$ TG], Ergebnisteil Kap. 3.2.

Standort	1994				1995			
	Cd	Pb	Zn	Cu	Cd	Pb	Zn	Cu
K	0,9	5,5	289	19,9	1,3	13,9	203	18,9
1	0,9	14,9	312	23,0	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
2	1,1	6,5	372	21,0	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
3	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	6,4	17,3	985	31,9
4	4,6	18,1	1082	46,0	6,9	17,8	1946	34,5
5	0,9	9,6	562	21,0	4,2	12,9	828	28,7
6	3,6	30,5	946	54,5	5,5	11,6	772	29,4
7	4,1	14,1	1011	41,3	10,8	10,0	861	27,9
8	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	4,7	20,0	540	33,3
9	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	12,0	15,7	1041	31,3
10	3,0	19,0	1170	52,0	2,7	13,5	591	29,0
11	2,4	15,2	917	46,0	2,9	14,6	608	29,9

Tab. 3: Gesamtschwermetallgehalte des Elbwassers 1994 (nach GEWÄSSERGÜTEBERICHT SACHSEN-ANHALT, 1994), n = 3, n.g. = nicht gemessen, [$\mu\text{g/L}$], Ergebnisteil Kap. 3.2.

1994 Standort	Cd		Pb		Zn		Cu	
	Mittel	SD	Mittel	SD	Mittel	SD	Mittel	SD
1	0,29	0,04	2,4	0,16	68,3	6,1	4,8	0,7
2	0,30	0,03	1,9	0,65	69,3	5,2	4,5	0,5
4	0,17	0,05	1,0*	0,00	42,0	2,9	3,6	0,3
5	0,35	0,01	2,0	0,75	92,0	2,4	4,3	0,3
6	0,10*	0,00	1,0*	0,00	39,0	3,6	4,0	0,4
7	0,22	0,00	1,4	0,61	43,0	4,3	3,9	0,4
10	0,13	0,01	2,1	0,90	42,7	1,2	5,0	0,5
11	n.g.	-	n.g.	-	n.g.	-	n.g.	-

Tab. 4: Gesamtschwermetallgehalte des Elbwassers 1995 (nach GEWÄSSERGÜTEBERICHT SACHSEN-ANHALT, 1995), n = 3, n.g. = nicht gemessen. [$\mu\text{g/L}$], Ergebnisteil Kap. 3.2.1.

1995 Standort	Cd		Pb		Zn		Cu	
	Mittel	SD	Mittel	SD	Mittel	SD	Mittel	SD
3	0,38	0,02	2,53	1,3	66,7	1,2	5,2	0,4
4	0,38	0,08	2,47	1,1	54,7	8,3	4,1	0,4
5	0,39	0,05	3,10	0,4	72,0	8,2	4,6	0,8
6	0,32	0,06	2,70	1,3	43,3	4,8	4,2	0,8
7	0,39	0,08	2,10	0,8	56,0	8,3	3,5	0,4
8	n.g.	-	n.g.	-	n.g.	-	n.g.	-
9	n.g.	-	n.g.	-	n.g.	-	n.g.	-
10	0,15	0,01	1,37	0,2	42,3	3,1	5,8	0,6
11	n.g.	-	n.g.	-	n.g.	-	n.g.	-

Tab. 5: Chlorophyllgehalte [$\mu\text{g}/\text{mg}$ TG] und Verhältnis Chlorophyll a/b der Proben von *F. antipyretica* nach Exposition in der Elbe (1994), $n = 3$, * $n = 2$, Ergebnisteil Kap. 3.8.1.

Standort	Chl. a	SD	Chl. b	SD	a/b	SD	Chl. a + b
K	0,55	0,06	0,27	0,03	2,02	0,04	0,83
1	0,31	0,07	0,18	0,03	1,75	0,07	0,49
2	0,33	0,02	0,18	0,01	1,86	0,03	0,51
4	0,50	0,10	0,28	0,06	1,80	0,04	0,78
5	0,58	0,06	0,42	0,05	1,39	0,03	1,00
6	0,24	0,05	0,14	0,04	1,71	0,05	0,38
7	0,20	0,06	0,12	0,05	1,69	0,10	0,32
10	0,27	*	0,11	*	2,41	*	0,38
11	0,34	0,10	0,15	0,06	2,42	0,41	0,50

Tab. 6: Gehalte an PC_4 (GSH-Äquivalente) und GSH in Proben von *F. antipyretica* nach Exposition in der Elbe (1994). [$\mu\text{g}/\text{g}$ FG], PC_4 als GSH-Äquivalente, Ergebnisteil Kap. 3.8.2.

Standort	PC_4	GSH
K	2,12	30,6
1	0,83	8,2
2	1,27	10,2
4	2,50	27,7
5	0,99	40,6
6	1,52	31,3
7	1,95	17,6
10	2,61	28,1
11	2,35	17,6

Tab. 7: Chlorophyllgehalte in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Cd-haltigem Medium ($100 \mu\text{M}$), $n = 3$, * $n = 2$. [$\mu\text{g}/\text{mg}$ TG], Ergebnisteil Kap. 3.3.

Tag	Chl. a		Chl. b		Chl. a		Chl. b	
	K	SD	K	SD	Cd	SD	Cd	SD
2	2,23	0,28	1,57	1,16	2,76	0,87	1,45	0,79
4	2,99	0,31	1,96	0,63	2,31	0,41	1,36	0,47
6	3,40	0,18	2,11	0,09	2,86	0,50	1,71	0,24
8	2,74	0,10	2,60	0,52	2,85	0,21	2,02	0,33
10	3,83	0,47	2,41	0,60	2,44	*	2,20	*

Tab. 8: Chlorophyll a/b- und E₆₆₅/E_{665a}-Verhältnisse in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Cd-haltigem Medium (100 µM), n = 3, * n = 2, Ergebnisteil Kap. 3.3.

Tag	Chl. a/b		E ₆₆₅ /E _{665a}		Chl. a/b		E ₆₆₅ /E _{665a}	
	K	SD	K	SD	Cd	SD	Cd	SD
2	2,14	1,00	1,03	0,01	2,16	0,65	1,06	0,06
4	1,74	0,67	1,03	0,01	1,78	0,25	1,05	0,03
6	1,61	0,07	1,09	0,07	1,67	0,11	1,07	0,05
8	1,10	0,21	1,05	0,03	1,45	0,20	1,10	0,06
10	1,78	0,75	1,06	0,00	1,13	*	1,05	*

Tab. 9: Gehalte an 'intra'- und 'extrazellulär' gebundenem Cd in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Cd-haltigem Medium (100 µM), Ergebnisteil Kap. 3.4.

Tag	Einwaage [mg TG]	gesamt Cd [mg]			Summe	Wiederf. [%]	[µg/mg TG]		Summe [µg/g TG]
		intraz.	extraz.	Medium			intraz.	extraz.	
1	170,2	0,260	0,798	0,200	1,258	112,3	1,53	4,69	6,22
2	202,3	0,283	0,754	0,154	1,191	106,3	1,40	3,73	5,12
3	145,0	0,374	0,664	0,167	1,205	107,6	2,58	4,58	7,16
4	255,5	0,335	0,666	0,121	1,122	100,1	1,31	2,61	3,92
5	166,0	0,418	0,636	0,131	1,186	105,9	2,52	3,83	6,35
6	159,4	0,502	0,677	0,102	1,281	114,4	3,15	4,25	7,40
7	162,7	0,495	0,675	0,108	1,278	114,1	3,04	4,15	7,19
8	247,7	0,500	0,740	0,112	1,353	120,8	2,02	2,99	5,01
9	181,3	0,552	0,591	0,076	1,220	108,9	3,04	3,26	6,31
10	158,0	0,500	0,546	0,092	1,138	101,6	3,17	3,46	6,62
	mittel	0,422	0,675	0,126	1,223	109,2	2,38	3,75	6,13
	SD	0,098	0,071	0,119	0,067	5,97	0,72	0,65	1,06

Tab. 10: Gehalte an PC₃, PC₄ und PC_{5(?)} (GSH-Äquivalente) in *F. antipyretica* während 35tägiger Inkubation in Medium mit unterschiedlichen Cd-Konzentrationen, [µg/g FG], Ergebnisteil Kap. 3.5.3.

Cd [µM]	PC ₃				PC ₄				PC _{5(?)}			
	0	50	100	200	0	50	100	200	0	50	100	200
Tage												
7	0,47	0,31	1,27	1,96	2,25	3,94	1,96	4,45	4,21	2,86	3,46	2,25
14	0,00	0,95	1,18	1,27	2,30	3,66	4,68	2,71	4,27	3,62	4,54	3,97
21	0,00	0,66	1,24	0,83	1,65	4,56	9,59	4,00	3,63	5,30	7,78	4,07
28	0,00	1,00	1,20	1,35	0,61	6,89	10,34	6,74	0,91	9,36	7,34	2,31
35	0,38	0,54	0,97	1,20	1,89	6,13	7,24	7,54	3,32	6,46	7,03	0,87

Tab. 11: Gehalte an Cys und GSH + γ -Glu-Cys (GSH-Äquivalente) in *F. antipyretica* während 35tägiger Inkubation in Medium mit unterschiedlichen Cd-Konzentrationen, [$\mu\text{g/g}$ FG], Ergebnisteil Kap. 3.5.4.

Cd [μM]	Cys				GSH+ γ -Glu-Cys			
	0	50	100	200	0	50	100	200
Tage								
7	1,5	2,4	4,3	7,4	19,0	30,4	68,8	133,0
14	2,2	3,5	4,8	8,4	11,2	65,1	72,7	132,1
21	1,1	2,2	4,0	7,1	7,7	43,5	55,7	92,0
28	0,4	8,1	6,5	4,5	7,8	116,9	100,0	90,8
35	2,3	4,5	4,3	3,9	13,5	59,0	72,5	72,0

Tab. 12: Gehalte einer unbekanntes thiolhaltigen Verbindung (GSH-Äquivalente) in *F. antipyretica* während 35tägiger Inkubation in Medium mit unterschiedlichen Cd-Konzentrationen, [$\mu\text{g/g}$ FG], Ergebnisteil Kap. 3.5.5.

Cd [μM]				
	0	50	100	200
Tage				
7	0,0	0,0	0,0	0,0
14	0,0	1,3	2,1	6,0
21	0,0	2,0	4,4	4,6
28	0,0	10,0	10,2	8,2
35	0,0	8,4	10,1	6,0

Tab. 13: Gehalte an PC₄ (GSH-Äquivalente) in *F. antipyretica* während 7tägiger Inkubation in Medium mit unterschiedlichen Cd-Konzentrationen, [$\mu\text{g/g}$ FG], Ergebnisteil Kap. 3.5.7.

PC ₄ Tage	Cd [μM]		
	0	50	100
1	3,71	3,03	3,11
2	3,98	3,58	3,18
3	3,67	4,17	3,83
4	4,47	4,03	3,17
5	3,74	3,36	2,82
6	3,59	3,39	3,45
7	3,06	3,98	3,63

Tab. 14: Gehalte an PC₄ und GSH + γ -Glu-Cys (GSH-Äquivalente) in *F. antipyretica* während 12tägiger Inkubation in Medium mit unterschiedlichen Cd-Konzentrationen, [$\mu\text{g/g}$ FG], Ergebnisteil Kap. 3.5.8.

Cd [μM]	PC ₄					GSH+ γ -Glu-Cys				
	0	5	10	20	50	0	5	10	20	50
Tage										
2	3,8	3,0	5,0	3,3	4,5	42,2	54,6	60,9	49,2	83,2
4	n.g.	4,7	n.g.	3,8	5,2	n.g.	54,2	35,0	47,4	136,5
10	n.g.	3,3	3,8	4,0	2,7	n.g.	68,4	64,5	107,0	100,2
12	n.g.	3,1	5,6	5,7	4,3	n.g.	33,8	59,1	135,5	206,2

Tab. 15: GSTH- (GSH-Äquivalente) und GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Cd-haltigem Medium (100 μM), n = 3, [$\mu\text{g/g}$ FG], Ergebnisteil Kap. 3.6.1 und 3.6.2.

Tag	GSTH				GSH			
	Kontrolle		100 μM Cd		Kontrolle		100 μM Cd	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
1	127,1	7,7	149,9	21,6	51,4	8,2	47,4	3,7
2	135,1	5,3	202,2	5,2	42,5	3,6	83,4	9,3
3	138,6	12,7	240,1	9,7	33,7	3,3	103,1	7,0
4	132,9	8,1	282,7	9,6	37,6	4,7	122,0	17,9
5	127,3	12,8	314,2	16,5	37,5	4,3	190,7	11,9
6	114,1	6,1	257,9	2,9	31,1	4,9	145,1	6,4
7	142,5	33,5	300,2	29,3	14,9	3,7	139,4	16,8
8	135,7	31,7	305,7	23,7	27,8	1,4	178,3	5,4
9	155,7	8,2	352,8	8,8	47,0	2,4	232,3	16,8
10	140,6	5,3	401,8	23,6	51,6	2,4	218,6	11,4

Tab. 16: GSTH- (GSH-Äquivalente) und GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit unterschiedlichen Cd-Konzentrationen, [$\mu\text{g/g}$ FG], Ergebnisteil Kap. 3.6.4 und 3.6.5.

Tag	GSTH				GSH			
	K	25 μM	50 μM	100 μM	K	25 μM	50 μM	100 μM
2	119,5	141,1	144,2	172,8	31,0	39,2	93,6	112,1
3	110,8	223,0	227,0	224,4	26,5	48,8	157,1	222,5
4	207,0	180,2	201,2	286,4	42,4	70,7	194,0	301,2
5	182,8	172,8	214,4	287,6	25,3	60,2	221,0	314,1
6	158,0	161,1	308,6	333,0	33,5	64,2	278,6	418,6
7	110,6	126,2	257,3	365,9	46,7	71,0	200,3	350,4
8	119,5	118,5	257,3	356,8	52,9	53,5	200,1	291,8
9	106,4	137,8	250,0	371,8	29,0	62,0	230,0	436,5
10	161,0	181,7	280,6	442,7	35,6	47,0	197,2	309,8

Tab. 17: GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während konstanter Cd-Belastung (100 μM), [$\mu\text{g/g}$ FG], Ergebnisteil Kap. 3.6.7.

Tag	GSH		
	A	B	Mittelwert
K	55,9	45,7	50,8
1	68,2	106,8	87,5
2	179,6	149,7	164,7
3	156,8	213,5	185,2
4	230,8	255,8	243,3
5	308,4	340,2	324,3
6	322,8	308,4	315,6
7	345,4	302,2	323,8
8	253,4	243,4	248,4
9	356,0	336,5	346,3
10	256,5	320,0	288,3

Tab. 18: GSTH- (GSH-Äquivalente) und GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit unterschiedlichen Pb-Konzentrationen, [$\mu\text{g/g}$ FG], Ergebnisteil Kap. 3.6.8.

Tag	GSTH				GSH			
	K	100 μM	250 μM	500 μM	K	100 μM	250 μM	500 μM
2	119,5	140,7	156,6	143,2	31,0	19,9	40,1	43,2
3	110,8	95,7	122,2	175,8	26,5	20,7	64,1	191,9
4	207,0	113,4	111,6	163,5	42,4	10,1	11,1	88,9
5	182,8	144,9	162,5	197,8	25,3	29,9	35,1	108,8
6	158,0	131,3	116,7	184,7	33,5	40,8	56,2	194,1
7	110,6	122,4	143,2	190,9	46,7	53,3	42,7	134,7
8	119,5	154,7	145,7	200,0	52,9	37,0	48,5	194,1
9	106,4	131,3	174,3	204,7	29,0	34,4	40,2	133,2
10	161,0	146,2	175,7	187,9	35,6	22,2	27,6	96,0

Tab. 19: GSTH- (GSH-Äquivalente) und GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit unterschiedlichen Zn-Konzentrationen, [$\mu\text{g/g}$ FG], Ergebnisteil Kap. 3.6.8.

Tag	GSTH				GSH			
	K	100 μM	250 μM	500 μM	K	100 μM	250 μM	500 μM
2	119,5	161,0	165,5	141,4	31,0	22,9	35,6	33,8
3	110,8	161,2	160,4	163,9	26,5	65,2	47,8	64,7
4	207,0	117,4	115,5	144,0	42,4	33,4	41,8	81,4
5	182,8	237,2	164,0	184,7	25,3	51,2	35,2	137,2
6	158,0	146,8	152,1	184,4	33,5	39,2	52,4	99,5
7	110,6	213,6	257,3	212,7	46,7	38,7	64,0	81,8
8	119,5	178,8	232,1	213,2	52,9	33,2	57,1	103,3
9	106,4	118,2	221,3	278,6	29,0	44,2	49,0	80,9
10	161,0	134,3	148,1	175,7	35,6	27,1	36,6	56,9

Tab. 20: GSTH- (GSH-Äquivalente) und GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit unterschiedlichen Cu-Konzentrationen, [$\mu\text{g/g}$ FG], Ergebnisteil Kap. 3.6.8.

Tag	GSTH				GSH			
	K	25 μM	50 μM	100 μM	K	25 μM	50 μM	100 μM
2	119,5	127,6	144,0	99,0	31,0	42,7	91,8	29,8
3	110,8	152,7	137,6	107,2	26,5	59,1	49,8	18,9
4	207,0	146,6	152,4	86,1	42,4	72,8	75,2	26,2
5	182,8	186,4	109,8	82,4	25,3	70,7	50,1	16,3
6	158,0	132,0	116,1	82,4	33,5	59,6	43,6	32,2
7	110,6	111,6	142,6	77,6	46,7	58,0	61,9	20,5
8	119,5	118,5	189,5	117,5	52,9	44,2	58,6	23,1
9	106,4	166,8	139,6	127,6	29,0	55,2	49,9	18,0
10	161,0	129,1	122,4	101,0	35,6	66,8	46,5	26,2

Tab. 21: GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während und nach 3tägiger Cd-Belastung (100 μM), [$\mu\text{g/g}$ FG], n = 3, Ergebnisteil Kap. 3.6.9.

Tag	GSH	
	Mittelwert	SD
K	31,7	3,5
1	83,6	7,2
2	145,0	3,3
3	164,7	53,5
4	296,8	19,1
5	330,2	17,7
6	330,8	11,3
7	382,2	29,0
8	384,4	68,7
9	361,7	35,8
10	317,4	20,0

Tab. 22: GSH-Gehalte in jungen und älteren Pflanzensegmenten von *F. antipyretica* während 6tägiger Inkubation in Medium mit 100 μM Cd, [$\mu\text{g/g}$ FG], Ergebnisteil Kap. 3.6.10.

Tage	alt	jung
0	45,6	71,8
2	48,5	196,4
4	50,8	237,7
6	77,8	357,3

Tab. 23: Gehalte an Cys und GSH in *F. antipyretica* während 26stündiger Inkubation in Cd-haltigem Medium (100 μ M), [μ g/g FG], Ergebnisteil Kap. 3.6.12.

Zeit [h]	Cys		GSH		Mittelwert	
	A	B	A	B	Cys	GSH
K	2,8	3,5	18,0	14,0	3,15	16,00
2	1,6	1,5	7,1	7,5	1,55	7,30
4	2,2	2,0	8,3	8,3	2,10	8,30
6	3,8	4,2	18,4	18,4	4,00	18,40
8	5,0	4,9	19,9	24,0	4,95	21,95
10	5,6	6,5	22,3	28,7	6,05	25,50
12	6,9	6,2	22,2	25,0	6,55	23,60
26	10,6	10,9	37,4	37,1	10,75	37,25

Tab. 24: Gehalte an Cys, γ -Glu-Cys und GSH in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Cd-haltigem Medium (100 μ M), n = 3, [μ g/g FG], Ergebnisteil Kap. 3.6.12.

Tag	Cys		γ -Glu-Cys		GSH	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
K	1,35	0,27	0,45	0,07	35,9	9,6
1	5,94	0,53	0,83	0,10	75,2	0,6
2	12,40	2,13	1,43	0,46	139,3	19,0
3	14,12	3,88	1,89	0,65	144,4	32,8
4	13,07	1,22	2,78	0,55	162,7	18,0
5	14,22	1,16	3,96	0,81	199,9	23,8
6	13,05	1,61	5,11	0,76	228,8	23,7
7	15,55	1,01	6,19	0,24	239,7	17,6
8	12,85	0,46	6,36	1,00	209,9	17,2
9	13,23	0,65	6,66	1,28	209,1	18,5
10	12,01	1,61	5,94	1,49	169,1	43,7

Tab. 25: Thiolhaltige Verbindungen (GSH-Äquivalente) in Proben verschiedener Standorte des Harzes nach 14tägiger Inkubation in Cd-haltigem Medium (100 μ M), [μ g/g FG], Ergebnisteil Kap. 3.7.2, 3.7.3 und 3.7.4.

1996	Wipper	Selke	Dammbach	Rappbode
PC ₄ K	4,4	22,3	13,3	5,0
PC ₄ Cd	5,6	11,3	47,9	19,8
unbek. Peak	80,5	252,4	89,7	276,0

Tab. 26: GSH-Gehalte junger Sproßspitzen verschiedener Standorte des Harzes nach Inkubation in Cd-haltigem Medium (100 µM), n = 3, [µg/g FG], Ergebnisteil Kap. 3.7.5.

1996 Tage	Wipper		Selke		Dammbach		Rappbode	
	Mittelw.	SD	Mittelw.	SD	Mittelw.	SD	Mittelw.	SD
0	41,5	1,7	35,3	8,8	22,1	10,0	65,7	2,8
2	38,2	5,6	100,3	36,6	38,9	2,4	170,5	17,9
4	175,1	13,0	146,6	37,8	135,5	7,3	211,3	28,8
6	345,8	19,8	191,4	20,2	239,1	47,4	325,1	19,2

Tab. 27: GSH-Gehalte junger im Labor gewachsener Sproßspitzen nach Inkubation in Cd-haltigem Medium (100 µM), [µg/g FG], Ergebnisteil Kap. 3.7.6.

Tage 1996	Wipper	Selke	Dammbach	Rappbode
0	51,9	75,4	27,6	35,5
2	92,8	82,3	60,3	58,8
4	181,3	144,0	165,0	117,1
1995				
0	n.g.	20,0	13,7	23,4
2	n.g.	71,7	47,5	74,7
4	n.g.	169,1	79,5	177,1

Tab. 28: Anzahl der gebildeten Neutriebe während 5wöchiger Kultivierung auf Cd-haltigem Agar, Mittelwerte, n = 10, Ergebnisteil Kap. 3.7.7.

µM Cd	Wipper	Selke	Dammbach	Rappbode
0	1,2	1,4	1,9	1,4
1	1,7	1,1	0,9	2,0
5	0,4	0,4	0	0,1

Tab. 29: Längenzuwachs während 5wöchiger Kultivierung auf Cd-haltigem Agar, [cm/Sproßspitze] Mittelwerte, n = 10, Ergebnisteil Kap. 3.7.7.

µM Cd	Wipper	Selke	Dammbach	Rappbode
0	5,0	0,3	0	22,5
1	1,3	3,4	0	3,7
5	1,2	0	0	1,2

Tab. 30: Chlorophyllgehalte [$\mu\text{g}/\text{mg}$ TG], Verhältnis Chlorophyll a/b und Verhältnis E_{665}/E_{665a} der Proben von *F. antipyretica* nach Exposition an hoch belasteten Standorten, Ergebnisteil Kap. 3.9.2.

Standort	Chl. a/b	Chl. a	Chl. b	E_{665}/E_{665a}
K	1,67	1,53	0,92	1,0430
H3	1,27	1,10	0,86	1,0248
H4	1,01	0,46	0,46	0,983
H5	2,25	1,58	0,70	1,0207
H6	1,76	1,49	0,85	1,0305
H7	1,94	1,62	0,83	1,0274
H8	1,51	2,08	1,37	1,0780

Tab. 31: Gehalte an GSH und PC_4 (GSH-Äquivalente) der Proben von *F. antipyretica* nach Exposition an hoch belasteten Standorten, [$\mu\text{g}/\text{g}$ FG], Ergebnisteil Kap. 3.9.3.

Standort	GSH	PC_4
K	116,3	7,6
H3	188,5	16,4
H4	0,00	12,3
H5	164,1	28,5
H6	31,98	25,2
H7	114,9	12,7
H8	49,8	40,8

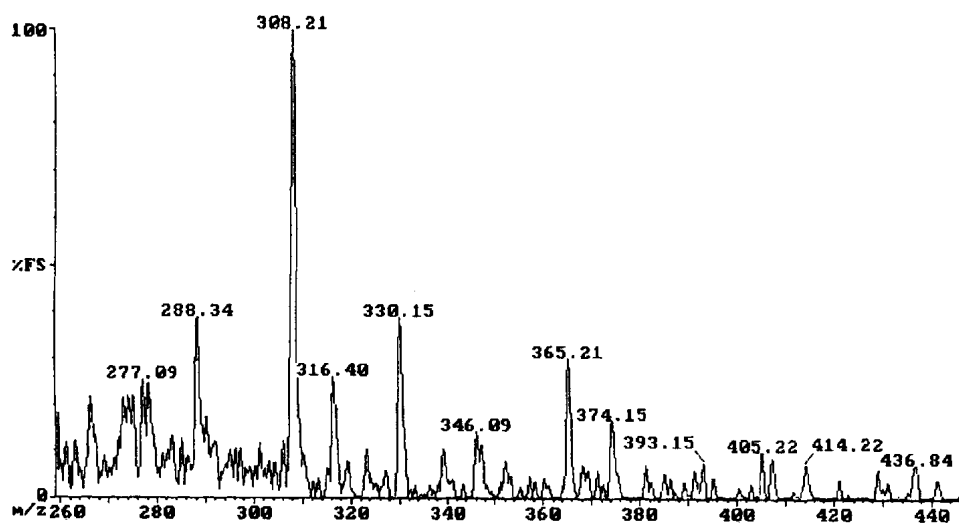


Abb. 1: Massenspektrum von GSH aus *Fontinalis antipyretica*, m/z 308,2; Ergebnisteil Kap. 3.6.

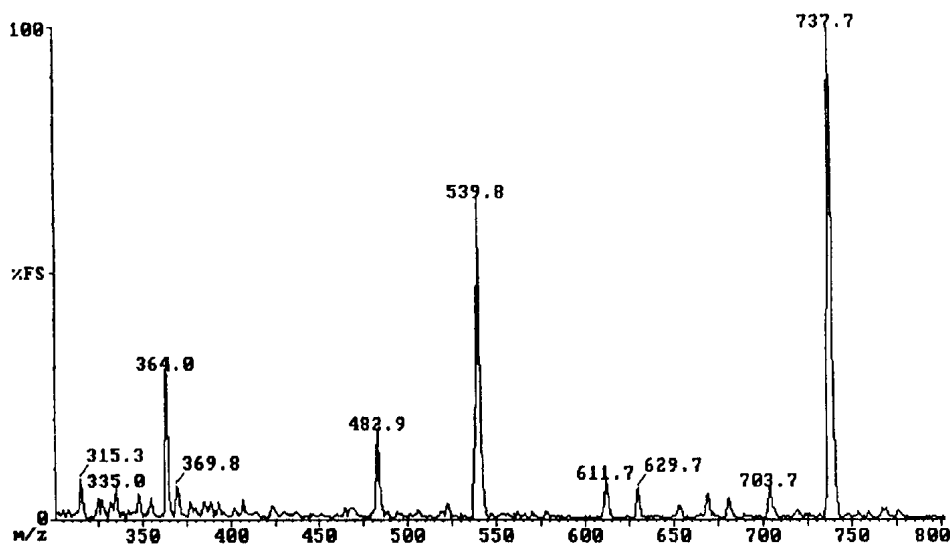


Abb. 2: Massenspektrum von PC₂ aus *Lycopersicon esculentum*, m/z 539,8; Material und Methoden Kap. 2.7.2.

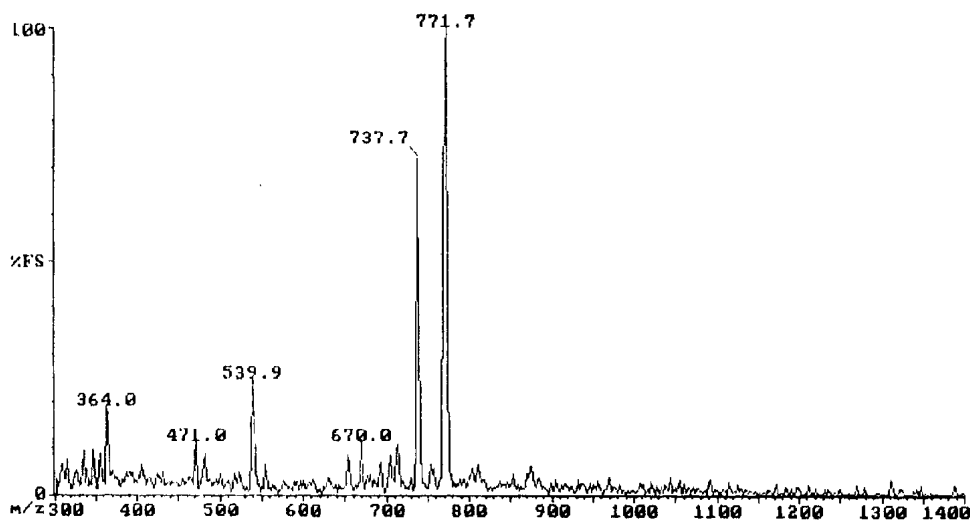


Abb. 3: Massenspektrum von PC₃ aus *Lycopersicon esculentum*, m/z 771,7; Material und Methoden Kap. 2.7.2.

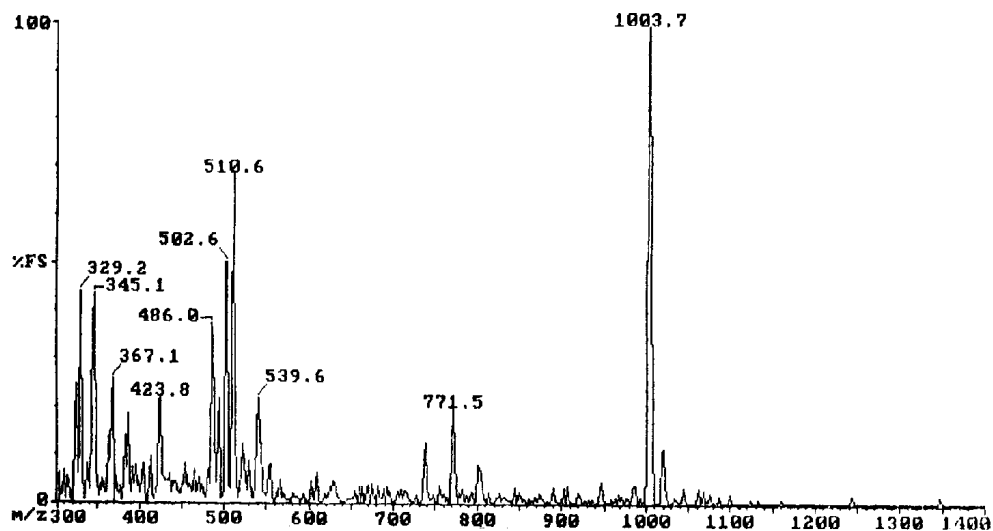


Abb. 4: Massenspektrum von PC₄ aus *Lycopersicon esculentum*, m/z 1003,7; Material und Methoden Kap. 2.7.2.

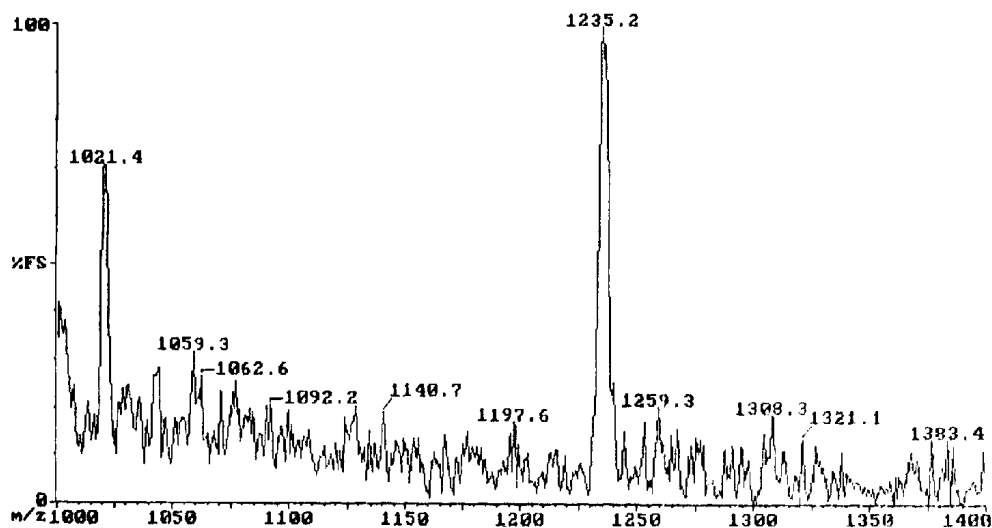


Abb. 5: Massenspektrum von PC₃ aus *Lycopersicon esculentum*, m/z 1235,2; Material und Methoden Kap. 2.7.2.

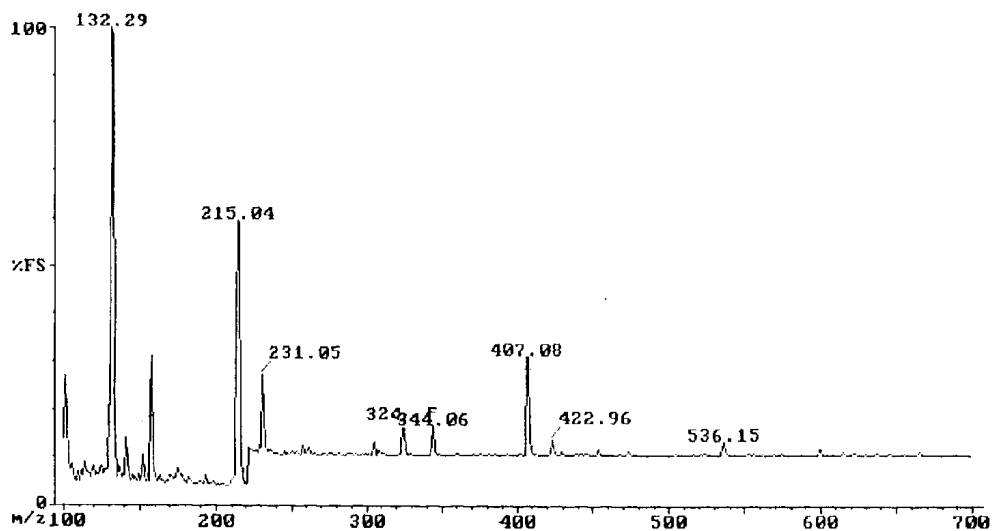


Abb. 6: Massenspektrum einer unbekannt thiolhaltigen Verbindung aus *Fontinalis antipyretica*, m/z 407,1; Ergebnisteil, Kap. 3.5.5.

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mir die Durchführung der vorgestellten Untersuchungen ermöglicht haben und mir bei der Anfertigung der Arbeit behilflich waren:

ganz besonders Herrn Prof. Dr. G.-J. Krauß für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit sowie für die Vielzahl der wertvollen und kreativen Diskussionen,

Herrn Prof. Dr. B. Markert für die Anregung des Themas, die Begutachtung der Arbeit, die materielle und technische Unterstützung sowie seine fachlichen Ratschläge,

Herrn Prof. Dr. H. Rennenberg für die Begutachtung der Arbeit, die freundliche Unterstützung und die hilfreichen Diskussionen,

Herrn Dr. K. Friese für die umfangreiche und zuverlässige Unterstützung bei der Schwermetallanalytik und seine fachlichen Anregungen.

Frau E. Püschel, die mir bei der Vielzahl von Messungen behilflich war, danke ich besonders für ihr Engagement und ihre Zuverlässigkeit,

Frau Dr. A. Schierhorn für die Durchführung der Massenspektrometrie und

Herrn Dr. P. Rüedi für die Durchführung spezieller Analysetechniken und die fachliche Beratung.

Andrea Kerk, Barbe Schulz, Torsten Augustin und Robert Augustin, deren Mitarbeit die umfangreichen Freilandarbeiten ermöglicht hat, danke ich ebenso wie allen Freunden und Bekannten, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit behilflich waren

sowie allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Allgemeine und Pflanzenbiochemie, die durch praktische Ratschläge und technische Unterstützung sowie durch eine angenehme Arbeitsatmosphäre zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

30. 10. 1962	geboren in Westerstede
1969 - 1974	Grundschule Bad Zwischenahn
1974 - 1982	Gymnasium Bad Zwischenahn/Edewecht
Mai 1982	Abitur am Gymnasium Bad Zwischenahn/Edewecht
SS 1983 - SS 1984	Studium an der Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg im Studiengang Diplom Chemie
WS 1984/85 - WS1989/90	Studium an der Universität Osnabrück im Studiengang Diplom Biologie
Dez. 1989	Diplom im Fachbereich Biologie, Arbeitsgruppe Ökologie der Universität Osnabrück (Prof. D. Overdieck)
Aug. 1990 - Jan. 1993	Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Ökosystemforschung der Universität Osnabrück (Prof. H. Lieth)
Sept. 1992 - März 1993	Hauptamtliche Tätigkeit beim Naturschutzverband Niedersachsen
April 1993 - Feb. 1998	Promotion im Fachbereich Biochemie / Biotechnologie Arbeitsgruppe Allgemeine und Pflanzenbiochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Prof. G.-J. Krauß)

Ina Bruns
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
FB Biochemie
Kurt-Mothes Str. 3
06120 Halle
email: bruns@biochemtech.uni-halle.de