

**Untersuchungen zur Akkumulation und physiologisch-  
biochemischen Wirkung von Schwermetallen im Wassermoos  
*Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw.**

**Dissertation**



Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Fachbereich Biochemie/Biotechnologie)

von Dipl. Biochemikerin Kristin Sutter  
geb. am: 15. 07. 1972, in: Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. G.-J. Krauß
2. Prof. Dr. H. Rennenberg
3. Dr. habil. D. Neumann

Halle/Saale, den 07. 12. 2000

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

## Chemikalienverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Die Wirkung von Schwermetallen auf Pflanzen und Mechanismen der Schwermetall-Detoxifikation .....	1
1.2 Xenobiotika .....	6
1.2.1 Wirkung und Detoxifikation von Xenobiotika in Pflanzenzellen .....	6
1.2.2 Glutathion-S-Konjugat-Transporter .....	9
1.3 Die Beeinflussung zellulärer Prozesse in Pflanzen durch Schwermetalle und Xenobiotika .....	10
1.3.1 Der Einfluss von Schwermetallen und Xenobiotika auf die Photosynthese .....	10
1.3.2 Die Sulfatassimilation in Pflanzen und die Biosynthese von Cystein und Glutathion .....	12
1.3.3 Die Nitratassimilation in Pflanzen als Voraussetzung der Aminosäure- und Protein-Biosynthese .....	16
1.4 Problemstellung und Ziel der Arbeit .....	18
<b>2 Material und Methoden</b> .....	20
2.1 Das aquatische Moos <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	20
2.2 Probenahme und Versuchsvorbereitung .....	20
2.3 Beschreibung der Methoden .....	22
2.3.1 Bestimmung der Schwermetall-Akkumulation von <i>Fontinalis antipyretica</i> und <i>Fontinalis dalecarlica</i> .....	22
2.3.2 Analytik thiolhaltiger Verbindungen .....	23
<i>Extraktion thiolhaltiger Verbindungen</i> .....	23
<i>Bestimmung des Glutathion-Gehaltes mittels GSH-Reduktase</i> .....	24
<i>Bestimmung von Thiolen mittels Derivatisierung mit Monobrombiman</i> ...	25
2.3.3 Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz .....	27
2.3.4 Kapillarelektrophoretische Analyse von Sulfat .....	28
2.3.5 Analytische Elektronenmikroskopie .....	29

2. 3. 6	Bestimmung der <sup>15</sup> N-Häufigkeit .....	30
2. 4	Beschreibung der Laborexperimente .....	31
2. 4. 1	Schwermetall-Akkumulation von <i>Fontinalis antipyretica</i> / <i>Fontinalis dalecarlica</i> .....	31
2. 4. 2	Vitalitätsuntersuchungen an <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	32
2. 4. 3	Einfluss von Cd(II) auf den Schwefelmetabolismus von <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	32
	<i>Einfluss der Versorgung mit Sulfat bei Cd(II)-Belastung von Fontinalis antipyretica</i> .....	32
	<i>Effekte der Cd(II)-Belastung nach Schwefelmangel</i> .....	33
2. 4. 4	Kompartimentierung von Cd(II) in <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	34
2. 4. 5	<sup>15</sup> N-Inkorporation in <i>Fontinalis antipyretica</i> nach Exposition mit Schwermetallen .....	34
2. 4. 6	Glutathiongehalt, Cd(II)-Akkumulation und Vitalität von <i>Fontinalis antipyretica</i> bei gleichzeitiger Belastung mit Organika .....	35
2. 5	Statistische Auswertung von Ergebnissen.....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
3. 1	Akkumulation von Schwermetallen durch <i>Fontinalis antipyretica</i> – Einfluss auf den zellulären GSH-Gehalt .....	37
3. 1. 1	Cd(II)-Akkumulation durch <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	37
3. 1. 2	Zn(II)-Akkumulation durch <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	43
3. 1. 3	Pb(II)-Akkumulation durch <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	45
3. 1. 4	Cd(II)-Akkumulation durch <i>Fontinalis dalecarlica</i> .....	49
3. 1. 5	Cd(II)-Akkumulation durch <i>Fontinalis antipyretica</i> nach Absetzen der Cd(II)-Belastung .....	51
3. 2	Vitalität von <i>Fontinalis antipyretica</i> bei Schwermetallstress .....	53
3. 3	Einfluss von Cd(II) auf den Schwefelmetabolismus von <i>Fontinalis antipyretica</i> ..	54
3. 3. 1	Einfluss der Versorgung mit Sulfat auf den Thiolgehalt und die Cd(II)-Akkumulation von <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	54
3. 3. 2	Effekte von Schwefelmangel und Cd(II)-Belastung auf den Schwefelmetabolismus und die Vitalität von <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	60
3. 4	Zelluläre Kompartimentierung von Cd(II) in <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	65
3. 4. 1	Intrazelluläre Lokalisation von Cd(II) in <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	65
3. 4. 2	Einfluss von Organika auf die Kompartimentierung von Cd(II) .....	69
3. 5	<sup>15</sup> N-Tracer-Studien mit <i>Fontinalis antipyretica</i> unter Schwermetallbelastung .....	70

3. 6 Einfluss von Organika auf Thiolgehalt, Cd(II)-Akkumulation und Vitalität von <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	73
<b>4 Diskussion</b> .....	79
4. 1 Schwermetallakkumulation durch <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	79
4. 1. 1 Akkumulation von Cd(II), Zn(II) und Pb(II) durch <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	79
4. 1. 2 Cd(II)-Akkumulation durch <i>Fontinalis antipyretica</i> nach Absetzen der Cd(II)-Belastung .....	87
4. 1. 3 Vergleich der Cd(II)-Akkumulation verschiedener Arten der Gattung <i>Fontinalis</i> .....	88
4. 2 Lokalisation von Cd(II) in <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	92
4. 3 Vitalität von <i>Fontinalis antipyretica</i> nach Schwermetallexposition .....	95
4. 4 Einfluss von Cd(II) auf den Schwefelmetabolismus von <i>Fontinalis antipyretica</i> ..	98
4. 4. 1 Einfluss der Sulfatversorgung von <i>Fontinalis antipyretica</i> auf die biochemisch-physiologische Reaktion auf Cd(II)-Stress .....	98
4. 4. 2 Effekte von Schwefelmangel und Cd(II)-Belastung auf den Schwefelmetabolismus von <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	103
4. 5 <sup>15</sup> N-Tracer-Studien mit <i>Fontinalis antipyretica</i> unter Schwermetallbelastung .....	107
4. 6 Effekte der Exposition mit organischen Substanzen (Xenobiotika) auf <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	109
4. 6. 1 Einfluss von Organika auf den Thiolgehalt und die Vitalität von <i>Fontinalis antipyretica</i> .....	109
4. 6. 2 Beeinflussung der Cd(II)-Akkumulation und –Kompartimentierung durch Xenobiotika .....	111
<b>5 Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	116
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	124

## Anhang A – Rohdaten

## Anhang B – Standardabweichungen

## Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
at.-% exc.	Atom-% Excess
c	Konzentration einer Substanz
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzen
CE / CZE	Capillary Electrophoresis / Capillary Zone Electrophoresis
CHES	2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure
CoA	Coenzym A
Cys	Cystein
DFT	Dichte-Funktions-Theorie
DTE	Dithioerythrit
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX-Analysen	Energy dispersive X-ray-Analysen
EELS	Electron Energy Loss Spectroscopy
FAD	Flavinadenindinucleotid (oxidiert)
Fd	Ferredoxin
FM	Frischmasse
$\gamma$ -EC	$\gamma$ -Glutamylcystein ( $\gamma$ -Glu-Cys)
GSH	Glutathion (reduziert) - $\gamma$ -Glu-Cys-Gly
GSSG	Glutathion (oxidiert)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
mBBr	Monobrombiman (3,7-Dimethyl-4-brommethyl-6-methyl-1,5-diazabicyclo-[3.3.0]-octa-3,6-dien-2,8-dion)
Me	Metall
Metola	Metolachlor
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduziert)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduziert)

n. b.	nicht bestimmt
NEM	N-Ethylmaleinimid
NPN	nicht proteinogene Stickstoff-Fraktion der Zellen
OAS	O-Acetylserin
PC	Phytochelatin (( $\gamma$ -Glu-Cys) <sub>n</sub> -Gly)
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PN	proteinogene Stickstoff-Fraktion der Zellen
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
PS I / PS II	Photosystem I / Photosystem II
RP	Reversed Phase
rpm	Rotations per minute
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SD	Standardabweichung
SAT	Serin-Acetyl-Transferase
SE	Relative Standardabweichung
TCA	Trichloressigsäure
TNB	5-Thio-2-nitrobenzoesäure
UV/Vis	Ultravioletter bis sichtbarer Lichtwellenbereich

## Chemikalienverzeichnis

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	VEB Jenapharm-Laborchemie, Apolda (D)
$\text{CdCl}_2$	Riedel de Häen AG, Seelze (D)
CDNB	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim (D)
CHES	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim (D)
Cys	Reatec GmbH, Weiterstadt (D)
DTE	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
DTNB	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim (D)
EDTA	HB Labor- und Feinchemikalien (D)
Eisessig	MERCK-Schuchardt, Hohenbrunnen (D)
$\text{FeCl}_3$	VEB Jenapharm-Laborchemie, Apolda (D)
$\gamma$ -EC	Reatec GmbH, Weiterstadt (D)
GSH	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim (D)
GSH-Reduktase	Fluka, Neu-Ulm (D)
GSSG	Fluka, Neu-Ulm (D)
HCl	VEB Jenapharm-Laborchemie, Apolda (D)
Hexamethoniumhydroxid	Fluka, Neu-Ulm (D)
$\text{HNO}_3$ (65 %, suprapur)	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
$\text{H}_2\text{O}_2$ (35 %)	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
$\text{H}_3\text{PO}_4$	VEB Jenapharm-Laborchemie, Apolda (D)
$\text{H}_2\text{SO}_4$	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
KCl	VEB Jenapharm-Laborchemie, Apolda (D)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
$\text{KHSO}_4$	VEB Jenapharm-Laborchemie, Apolda (D)
$\text{KNO}_3$	VEB Jenapharm-Laborchemie, Apolda (D)
$\text{K}^{15}\text{NO}_3$	Zur Verfügung gest.: UFZ Halle-Leipzig, Leipzig (D)
MBBr	Fluka, Neu-Ulm (D)
Methanol	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
Metolachlor	Institute of industrial organic chemistry, Warschau (Po)
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
$\text{NADPH} + \text{H}^+$	Fluka, Neu-Ulm (D)
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	MERCK KgaA, Darmstadt (D)

NaOH	Lachema, Brno (CSSR)
NaO <sub>3</sub> V	Fluka, Neu-Ulm (D)
Na <sub>2</sub> S	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim (D)
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
NEM	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim (D)
NiCl <sub>2</sub>	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim (D)
PbCl <sub>2</sub>	MERCK-Schuchardt, Hohenbrunnen (D)
Pyromellinsäure	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim (D)
Selen	Zur Verfügung gest.: UFZ Halle-Leipzig, Leipzig (D)
TCA	MERCK KgaA, Darmstadt (D)
Triethanolamin	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim (D)
ZnCl <sub>2</sub>	MERCK KgaA, Darmstadt (D)



# 1 Einleitung

## 1. 1 Die Wirkung von Schwermetallen auf Pflanzen und Mechanismen der Schwermetall-Detoxifikation

Pflanzen werden in der Umwelt von einer großen Anzahl von abiotischen und biotischen Faktoren beeinflusst, mit denen sie sich auseinandersetzen müssen. Werden hierbei für jede Pflanze individuelle Grenzen überschritten, d. h. kommt es zu einer Abweichung vom Lebensoptimum, entsteht eine Belastungs- bzw. Stress-Situation. Jeder Organismus besitzt in dieser Auseinandersetzung mit seiner Umwelt ein spezifisches Reaktionsvermögen, welches ihm eine Anpassung an die Stress-Faktoren ermöglicht (Schlee, 1992). Anthropogene Einflüsse, deren Ursachen vor allem in der Industrialisierung liegen, führten und führen auch heute zu einer starken Belastung der Ökosysteme mit Schadstoffen, z. B. mit toxischen Schwermetallen (Oehlmann und Markert, 1999).

Schwermetalle, Elemente deren spezifische Dichte größer als  $6 \text{ g/cm}^3$  ist, kommen normalerweise als natürliche Bestandteile in Ökosystemen vor (Maywald und Weigel, 1997). Pflanzen benötigen essentielle Schwermetalle, wie Zn(II), Mn(II), Fe(II), Mo(II) und Cu(II), die als Cofaktoren oder Aktivatoren von Enzymen wichtige biochemische Prozesse in den Zellen aufrechterhalten (Maywald und Weigel, 1997). In Abhängigkeit von ihrer Konzentration in der Pflanzenzelle können sie dennoch schädigende Wirkungen zeigen. Neben diesen Spurenelementen gibt es nichtessentielle Schwermetalle, die schon in geringen Dosen toxisch wirken. Zu ihnen gehören Cd(II), Pb(II) oder Hg(II).

Schwermetalle reichern sich vor allem durch Klärschlammdüngung oder Bergbau in der Umwelt an (Merian, 1991; Larcher, 1994; Krauss et al., 1998; Markert und Friese, 2000). Die Verunreinigung von Boden und Wasser mit diesen Elementen kann außerordentlich hoch sein. Jahrhunderte-langer Kupferschiefer-Bergbau ist zum Beispiel im Mansfelder Land die Ursache der starken Belastung von Gewässern mit Schadstoffen, insbesondere mit Schwermetallen (siehe Tab. 1).

Richtwerte der EG (EG-Qualitätsnorm 80/778) für Trinkwasser liegen bei  $3 \text{ } \mu\text{g Cd(II)/L}$ ,  $10 \text{ } \mu\text{g Pb(II)/L}$  und  $< 5 \text{ mg Zn(II)/L}$  (Alloway und Ayres, 1996). Diese Werte werden in den Oberflächenwässern der Standorte Helbra und Hergisdorf um ein Vielfaches überschritten, während der Ausfluss des Süßen Sees, der eine Akkumulationssenke für eingetragene Schadstoffe aus diesem Bergbauggebiet darstellt, relativ unbelastet ist (Tab. 1).

**Tab. 1.** Schwermetallgehalte [mg/L] von Wässern im Kupferschiefer-Bergbau-Gebiet des Mansfelder Landes. (Krauss et al., 1998)

Schwermetall	Schwermetallgehalte der Standorte [mg/L]		
	Sanderschacht Helbra (stehendes Gewässer)	Stadtborn Hergisdorf (Fließgewässer)	Ausfluss des Süßen Sees (Fließgewässer)
Cd(II)	0,13	2,80	< 0,02
Pb(II)	0,74	1,94	0
Zn(II)	56,10	2626	0,05

Die Aufnahme von Schwermetallen durch Pflanzen hängt von der Bioverfügbarkeit der Elemente in Boden, Wasser und Luft ab (Greger, 1999). In aquatischen Systemen wird diese Verfügbarkeit durch vielfältige Faktoren, wie pH-Wert, organische Chelatoren, Humin-Verbindungen, Partikel und komplexierende Agenzien, das Vorhandensein anderer Metalle oder Anionen, die Ionenstärke, Temperatur, Salinität oder Lichtintensität beeinflusst (Pickering und Puia, 1969; Förstner und Wittmann, 1979; Vray et al., 1992; Gagnon et al., 1998). Die Mobilität der Schwermetalle kann unterschiedlich sein. Cd(II) und Zn(II) werden als sehr mobile Ionen betrachtet. Dagegen sind Cu(II) und Pb(II) immobil und bilden stabile organische Komplexe mit Fulvinsäuren (Greger, 1999; Pinheiro et al., 1999). Organische Verbindungen, wie Fulvin- und Huminsäuren können in Boden und Sediment fest an die Partikel-Oberfläche adsorbiert sein, aber auch als gelöste organische Liganden im Wasser vorkommen (Petrovic et al., 1999; Pinheiro et al., 1999). Sie beeinflussen in großem Maße die Verfügbarkeit und Mobilität von Schwermetallen. Während Boden und Sediment als Senken für Schwermetalle dienen, stellt das Wasser ein Transportmedium für die Schwermetalle dar, wobei die Verfügbarkeit von den Verweilzeiten im Wasser abhängt, welche wiederum von den bereits genannten Faktoren beeinflusst werden.

Die Akkumulation von Schwermetallen im Wasser erfordert den Nachweis dieser Elemente, um die Auswirkungen auf die Organismen abschätzen zu können. Die chemische Analyse der Schwermetallgehalte im System Wasser reflektiert jedoch nur eine momentäre Belastungssituation (Mouvet, 1984). Aussagen über die längerfristige Beeinflussung von Pflanzen sind aus solchen Momentaufnahmen nicht möglich.

Über die unterschiedliche, z. T. zeitabhängige Belastung von Gewässern mit Schadstoffen gibt es vielfältige Untersuchungen zur Nutzung von Organismen als Biomonitore und Bioindikatoren. Aufgrund ihrer morphologischen und physiologischen Eigenschaften erwiesen sich terrestrische und aquatische Moose als optimale Untersuchungsobjekte

(Mouvet, 1984). Sie sind weitverbreitet, so dass großflächige Studien möglich sind. Sie können große Mengen an Schadstoffen akkumulieren und auch tolerieren, was sie vielfältig einsetzbar macht.

Die Akkumulation von Schwermetallen durch aquatische Bryophyten, wie *Fontinalis antipyretica* und *Rhynchostegium riparioides*, und ihre Nutzung als Bioindikatoren für Schwermetalle war Schwerpunkt vieler Arbeiten (Say und Whitton, 1983; Wehr und Whitton, 1983; Mouvet, 1984; Siebert et al., 1996; Mersch und Reichard, 1998). Andere Untersuchungen an dem Wassermoos *Fontinalis antipyretica* umfassten die Bestimmung der natürlichen Verteilung von Cd(II), Pb(II), Zn(II) und Cu(II) in Pflanzen verschiedener Standorte, Biomonitoring in der Elbe, sowie Studien zur Induktion thiolreicher Verbindungen nach Schwermetall-Stress (Bruns et al., 1995, 1997, 2000a; Bruns und Krauss, 1999). Das terrestrische Moos *Hylocomium splendens* wurde von Berg et al. (1995) als Biomonitor für die Belastung natürlicher Standorte in Norwegen mit atmosphärischen Spurenelementen verwendet. Auch andere terrestrische Moose (*Pleurozium schreberi*, *Polytrichum formosum*) dienten dem Monitoring Schwermetall-belasteter Standorte (Grodzinska et al., 1999; Wappelhorst et al., 2000).

Die Nutzung biologischer Indikatoren hat den Vorteil, dass zeitabhängige Verläufe der Akkumulation in Abhängigkeit von der Bioverfügbarkeit der Schwermetalle dargestellt werden können (Mouvet, 1984). Dadurch wird eine Erfassung der Schadwirkung auf die Organismen und eine Risikobewertung belasteter Standorte möglich.

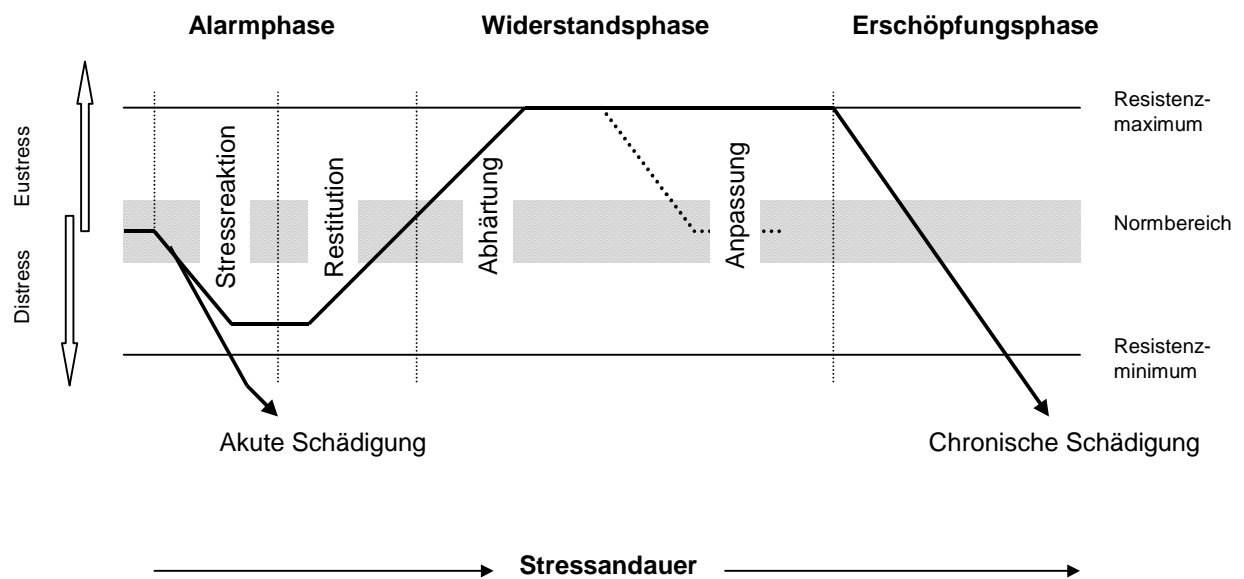
Eine wichtige Entwicklung in Richtung der Nutzung der Schwermetall-Akkumulation ist die Untersuchung höherer Pflanzen, v. a. von Hyperakkumulatoren, für die Phytoremediation belasteter Standorte (Krämer et al., 1997; Robinson et al., 1999). Die Nutzung aquatischer Ökosysteme zur Reinigung hoch belasteter Gewässer wurde in diesem Zusammenhang bisher nicht näher diskutiert. Grund hierfür könnten der zum Teil recht geringe Bewuchs der Gewässer mit geeigneten Arten und die im Gegensatz zum terrestrischen System diffizilere Handhabung der Anpflanzung dieser Arten sein.

Pflanzliche Organismen reichern Schwermetalle aus der Umwelt an. Neben einer extrazellulären Biosorption erfolgt eine Aufnahme in die Zellen (Wehr und Whitton, 1983; Berg et al., 1995; Kugonic und Grman, 1999; Vázquez et al., 1999). Freie Schwermetall-Ionen im Cytoplasma können vielfältige Schädigungen des pflanzlichen Stoffwechsels hervorrufen. Es kommt zur Inhibierung des Wachstums, der Beeinflussung von Photosynthese, Atmung und Transpiration (Clijsters und van Assche, 1985; Stoyanova und Tchakalova, 1997; Prasad und Strzalka, 1999), Veränderungen von Membranlipiden (Devi und Prasad, 1999), Austausch von essentiellen Cofaktoren (Zn(II), Mn(II)) oder Blockierung

von funktionellen SH-Gruppen in Enzymen (Alloway und Ayres, 1996). Llamas et al. (2000) fanden bei Wurzeln von Cd(II)-belastetem Reis (*Oryza sativa* L.) eine Depolarisierung der Zellmembranen und eine erhöhte Membranpermeabilität, einhergehend mit einem verstärkten Efflux an Kalium-Ionen. Bei höheren Cd(II)-Konzentrationen kam es zu einer Inhibierung der Respiration. Auch ein erheblicher Einfluss auf den Schwefel- und Stickstoffmetabolismus wurde beschrieben (Bharti und Singh, 1994; Popovic et al., 1996; McMahon und Anderson, 1998; Nussbaum et al., 1998; Boussama et al., 1999).

Die Toxizität von Schwermetallen auf Pflanzen ist abhängig von der Sensitivität der Organismen, der Dosis und der Dauer der Exposition und der Art des Schwermetalls (Baker und Walker, 1989). In Abhängigkeit von der Konzentration des Schwermetalls kann man 3 Bereiche unterscheiden, die die Stoffwechseleistungen der Pflanzen beeinflussen. Bereich 1 - Mangelzone, gekennzeichnet durch eine geringe Schwermetall-Konzentration, hat bei nichtessentiellen Elementen keinen Einfluss auf die Leistung der Pflanzen. Kommen essentielle Elemente in sehr geringen Dosen vor, können Mangelercheinungen auftreten. Im Bereich 2, der Toleranzzone, wird der pflanzliche Metabolismus nicht beeinträchtigt. Ab einer für jedes Schwermetall spezifischen Konzentration (Bereich 3 – toxische Zone) wird die toxische Schwelle überschritten und es machen sich Auswirkungen auf die Stoffwechseleistungen der Pflanzen bemerkbar. Bei sehr hohen Konzentrationen kommt es zum Absterben der Organismen (lethale Toxizität).

Während einer Stress-Situation, die z. B. durch die Wirkung von Schwermetallen hervorgerufen wird, erfährt jede Pflanze eine Abfolge von charakteristischen Zustandsphasen, die in Abb. 1 dargestellt sind (nach Seyle, 1936 und Stocker, 1947 aus Larcher, 1994). In der *Alarmphase*, die durch den Beginn einer Stress-Situation gekennzeichnet ist, kommt es zu einer Destabilisierung von strukturellen und funktionellen Voraussetzungen für eine normale Funktionsfähigkeit der Pflanzen. Diese Stressreaktion wird mit Gegenreaktionen, wie Reparaturvorgängen (Proteinbiosynthesen) und *de novo* Synthesen von Schutzstoffen, beantwortet (Restitution). Hält die Stressdauer an erfolgt in der *Widerstandsphase* eine Abhärtung des Organismus, die Widerstandskraft wird bis zum Resistenzmaximum gesteigert. Durch eine folgende Anpassung an den Stressfaktor kommt es zu einer Stabilisierung der Pflanzenfunktionen im Normbereich. Irreversible Schädigungen können entstehen, wenn die Belastung zu schnell zunimmt (akute Schädigung) oder zu lang andauert (chronische Schädigung). Letzteres endet für die Pflanzen in der *Erschöpfungsphase*, in der das Resistenzminimum unterschritten wird. Das Konzept des Stressgeschehens enthält demzufolge destabilisierende Vorgänge (Distress) und restabilisierende und resistenzfördernde Prozesse (Eustress).



**Abb. 1.** Phasenmodell des Stressgeschehens (nach Selye, 1936 und Stocker, 1947 aus Larcher, 1994).

Im Laufe der Evolution haben die Pflanzen verschiedene Mechanismen entwickelt, um sich vor Schwermetall-Stress zu schützen. Die Anpassung erfolgt auf der Grundlage einer Vielzahl von biochemischen und physiologischen Reaktionen, sowie morphologischen Modifizierungen (Schlee, 1992; Sanita di Toppi und Gabbrielli, 1999). Eine Möglichkeit besteht in der Hemmung der Aufnahme durch den Ausschluss von Metallionen. Die Verringerung der Ionenaufnahme erfolgt hierbei durch eine verminderte Aktivität von ATPasen und/oder eine geringere Kationenaustauschkapazität der Zellwände. Biochemische Veränderungen auf der Wurzeloberfläche bewirken eine Adaptation von Enzymen an hohe Metallkonzentrationen. Auch die Bindung der Schwermetalle an SH-Gruppen spezifischer Proteine der Zellwand ermöglicht eine Verringerung der cytoplasmatischen Metallkonzentration. In den Pflanzenzellen können Schwermetalle in den Vakuolen kompartimentiert werden. Ferner schützen sich Pflanzen vor der toxischen Wirkung bestimmter Schwermetalle durch eine Ausscheidung von schwermetallhaltigen Sekreten, Exkreten und Rekreten oder die kontinuierliche Produktion neuer Akkumulationsorgane, insbesondere von Blättern. Ein wichtiger Prozess in den Pflanzenzellen ist die Bindung an weitere Substanzen, z. B. die Chelatierung durch Metallothioneine und Phytochelatine über die SH-Gruppen des Cysteins, aber auch durch organische Säuren, wie Citrat und Malat;

Aminosäuren, wie Histidin, Aspartat, Glutamin und Tyrosin oder Phytinsäure über den Sauerstoff oder Stickstoff dieser Liganden (Rauser, 2000).

Durch die Aktivierung solcher Entgiftungsmechanismen sind Pflanzen in der Lage, die Toxizität der Schwermetalle zu senken, d. h. höhere Konzentrationen zu tolerieren und so das Überleben am Standort innerhalb bestimmter Stressbereiche zu sichern.

## 1. 2 Xenobiotika

### 1. 2. 1 Wirkung und Detoxifikation von Xenobiotika in Pflanzenzellen

Neben Schwermetallen sind Pflanzen kontinuierlich zahlreichen anderen, potentiell toxischen Substanzen in ihrer Umwelt ausgesetzt, die natürlichen oder anthropogenen Ursprungs sind. Solche „fremden“ Verbindungen – Xenobiotika - können von den Pflanzen nicht für die Ernährung oder als Energiequelle verwendet werden. Es erfolgt jedoch eine Aufnahme und Akkumulation durch die Organismen. Weitverbreitete Xenobiotika sind Pestizide und Herbizide, wie Metolachlor (Abb. 3), Chlorsulfon, Imazethaphyr oder Paraquat (Coleman et al., 1997; Heldt, 1999).

Aufgrund der großen Anzahl und Varietät solcher phytotoxischen Substanzen sind die Angriffspunkte in der Zelle vielfältig und reichen von der Reaktion mit dem Schwefel von Cys- und Met-Resten bis hin zur Anlagerung an die Aminogruppen von Proteinen oder an die Purine der DNA und RNA (Coleman et al., 1997). So können bestimmte Herbizide in die Biosynthese von Fettsäuren, Aminosäuren, aber auch Carotinoiden und Chlorophyll eingreifen. Andere wirken als Phytohormonanaloga oder Mitosehemmer (Heldt, 1999). Sie besitzen neben cytotoxischen oft auch genotoxische Wirkungen (Coleman et al., 1997).

Substanzen, die mit SH-Gruppen reagieren, können Cys-Reste in Proteinen oder Glutathion blockieren und dadurch Enzymreaktionen beeinflussen. Kim et al. (1995) zeigten z. B., dass die vakuoläre H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase (V-PPase) von *Arabidopsis thaliana*, welche eine wichtige Rolle bei der Regulation der cytoplasmatischen Pyrophosphat-Konzentration spielt, irreversibel durch N-Ethylmaleinimid (NEM) inhibiert wird. Verantwortlich hierfür ist die kovalente Bindung von NEM an das Cys<sup>634</sup> der V-PPase, wodurch es wahrscheinlich zu einer sterischen Behinderung oder Konformationsänderung der Substrat-Bindungsstelle kommt.

Das Herbizid Paraquat wirkt in Pflanzenzellen als Quelle von oxidativem Stress. So führte die Exposition von Blättern bzw. Samen von *Oryza sativa* mit Paraquat zu einer Lipidperoxidation (Chang und Kao, 1997; Yu et al., 2000). Das Blattgewebe wies weiterhin eine erhöhte Membranpermeabilität auf. Paraquat induzierte in Samen von *Hordeum vulgare* und *Oryza sativa* einen signifikanten Anstieg der antioxidierenden Enzyme Peroxidase,

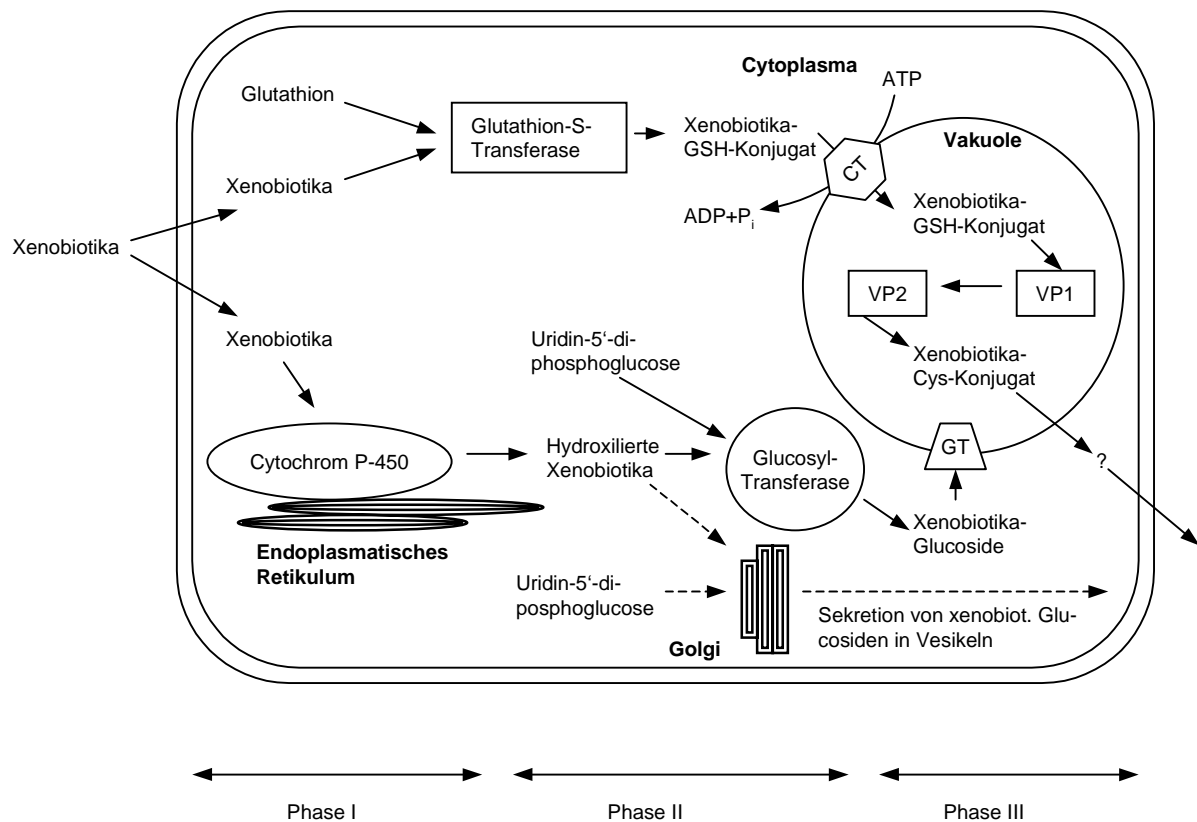
Katalase und Superoxid-Dismutase (Patra und Panda, 1998; Yu et al., 2000). Außerdem erfolgte eine Erhöhung von GSH, welches Pflanzenzellen vor oxidativem Stress schützt.

Die Detoxifikation von Xenobiotika erfolgt in einem Multiphasen-Prozess, dargestellt in Abb. 2 (Coleman et al., 1997; Rea et al., 1998, 1999). In der Phase I (Aktivierung) kommt es zur Aktivierung der Fremdstoffe durch Hydrolysen oder Oxidationen. Die Hydrolysen werden durch Esterasen und Amidasen katalysiert. Das Cytochrom P<sub>450</sub>-System, ein Häm-Protein des endoplasmatischen Retikulums, katalysiert als Mono-Oxygenase die Oxidation von Xenobiotika (Bolwell et al., 1994; Werck-Reichhart et al., 2000).

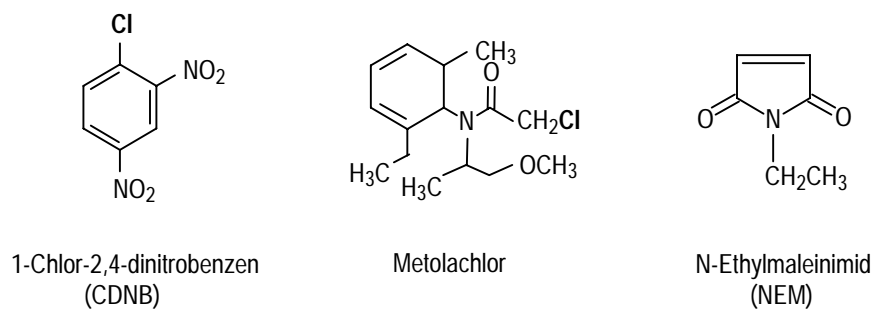
Durch die Aktivierung der Substanzen, d. h. das Einführen funktioneller Gruppen, wie –OH oder –COOH, ist die kovalente Bindung an hydrophile Moleküle in der Phase II (Konjugation) möglich. Solche Moleküle sind Glucose, Malonat oder Glutathion. Diese Reaktionen werden durch Transferasen katalysiert. Die Produkte, die aus diesem Prozess hervorgehen, sind entweder nicht mehr oder nur noch gering toxisch. Substanzen, die funktionelle Gruppen besitzen, die der Katalyse der Phase II - Enzyme zugänglich sind, werden in Phase I nicht verändert, sondern gleich in die Phase II geleitet.

Die inaktiven wasserlöslichen Konjugate werden nun in Phase III (Eliminierung) durch membrangebundene Transporter aus dem Cytoplasma in die Vakuole und den Apoplasten transportiert oder an unlösliche Zellbestandteile, wie Lignin, gebunden (Schulz und Friebe, 1999). In der Literatur findet man vielfältige Studien zur Untersuchung der GSH-S-Konjugat-Transporter bei Pflanzen (Martinoia et al., 1993; Li et al., 1995; Lu et al., 1997; Tommasini et al., 1998), wobei die Transportaktivität oft mit Modellsubstanzen, wie CDNB und NEM, aber auch mit Metolachlor bestimmt wurde (Abb. 3).

In Phase IV (Transformation) werden die Substanzen dann weiter substituiert oder abgebaut. Glutathion-Konjugate werden durch die Wirkung zweier Peptidasen zum Cys-Konjugat abgebaut. Nach Transport dieses Komplexes in das Cytoplasma erfolgt die weitere Metabolisierung durch Cys-S-β-Lyase und der Export der Abbauprodukte in den Apoplasten, wo eine Bindung an Lignin oder Cellulose möglich ist (Sandermann, 1992; Coleman, et al., 1997; Leustek et al., 2000).



**Abb. 2.** Detoxifikation von Xenobiotika in Pflanzen (nach Coleman et al., 1997). CT: GSH-Konjugat-Transporter; GT: Glucosid-Konjugat-Transporter; VP: vakuoläre Peptidase. (Gestrichelte Pfeile zeigen einen weiteren möglichen Weg der Glucosylierung von Xenobiotika im Golgi-Apparat und die Freisetzung über Endocytose.)



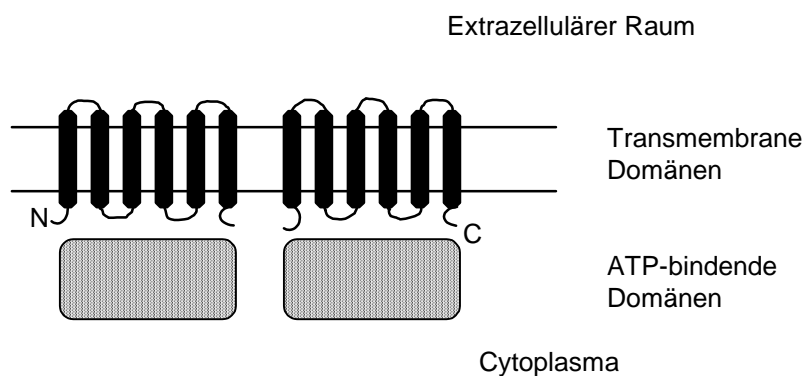
**Abb. 3.** Beispiele für Xenobiotika in Pflanzenzellen. CDNB und NEM sind Modellsubstanzen zur Untersuchung der Detoxifikation von Xenobiotika. (Reaktive Gruppen – fettgedruckt; bei NEM kann eine Anlagerung an die Doppelbindung des Ringes erfolgen).



### 1. 2. 2 Glutathion-S-Konjugat-Transporter

Der vakuoläre GSH-S-Konjugat-Transporter gehört zur Familie der **ABC**-Transporter („**A**T**P**-**B**inding **C**assette“), welche die größte Gruppe von Membrantransportsystemen in Pro- und Eukaryoten darstellen (Higgins, 1992; Schneider und Hunke, 1998; Rea, 1999). ABC-Transporter benötigen für ihre Funktion die Energie der ATP-Hydrolyse, sie sind  $Mg^{2+}$ ATP abhängig. Sie zeigen eine hohe Spezifität zu bestimmten Substratklassen, innerhalb dieser Klassen ist die Spezifität jedoch relativ gering. So gibt es spezifische Transporter für Aminosäuren, Zucker, anorganische Ionen, Polysaccharide oder Peptide (Higgins, 1992). Die Mitglieder dieser Familie regulieren aber nicht nur die Aufnahme von Nährstoffen, sie sind auch in einer Vielzahl anderer Prozesse integriert, z. B. Signal-Transduktion, Protein-Sekretion, Resistenz gegen Arzneimittel und Antibiotika, Antigen-Präsentation (Schneider und Hunke, 1998).

Abb. 4 zeigt den allgemeinen Aufbau eines ABC-Transporters (Higgins, 1992). Alle ABC-Transporter bestehen aus ein oder zwei Kopien von zwei Strukturelementen: einer hydrophoben Membran-Domäne mit jeweils 4-6 Membran-Helices und einer cytosolisch orientierten, ATP-bindenden Domäne (Rea, 1999). Die Membran-Domänen bilden den Kanal, durch den die Substrate aufgenommen werden. Sie können die Substratspezifität bestimmen. Die ATP-bindenden Domänen realisieren die ATP-Hydrolyse. Die Sequenz dieser Domänen ist hoch konserviert. Die einzelnen Domänen können in Prokaryoten als separate Polypeptide exprimiert werden. In Eukaryoten erfolgt oft eine Fusion zu größeren multifunktionalen Polypeptiden.



**Abb. 4.** Struktur eines ABC-Transporters (nach Higgins, 1992).

ABC-Transporter können durch Ortho-Vanadat, einen spezifischen Inhibitor von P-Typ ATPasen, gehemmt werden (Schneider und Hunke, 1998). Gleichzeitig wird eine Unabhängigkeit von der elektrochemischen Potentialdifferenz durch  $H^+$ -Ionen, die bei  $H^+$ -abhängigen Transportern erforderlich ist, beschrieben (Rea et al., 1998).

Martinoia et al. (1993) beschrieben zum ersten Mal einen GSH-S-Konjugat-Transport von Xenobiotika in isolierte Mesophyllvakuolen von Gerste. Der Transporter erwies sich als  $Mg^{2+}$ -ATP-abhängig und wurde durch Vanadat gehemmt. In den folgenden Jahren wurden weitere ABC-Transporter in Pflanzen entdeckt (Li et al., 1995; Lu et al., 1997; Tommasini et al., 1997). Li et al. (1997) fanden in *Saccharomyces cerevisiae* den "Yeast Cadmium Factor" YCF1, einen  $Mg^{2+}$ -ATP-abhängigen GSH-S-Konjugat-Transporter, der neben organischen Verbindungen auch  $Cd(II)$ -GSH-Komplexe in die Vakuolen transportieren kann. Somit konkurrieren in *Saccharomyces cerevisiae* beim letzten Schritt der Detoxifikation Xenobiotika und  $Cd(II)$  um den gleichen Prozess.

## **1. 3 Die Beeinflussung zellulärer Prozesse in Pflanzen durch Schwermetalle und Xenobiotika**

### **1. 3. 1 Der Einfluss von Schwermetallen und Xenobiotika auf die Photosynthese**

Die Photosynthese ist ein biochemisch fundamentaler Stoffwechselprozess von Pflanzen. Sie dient einerseits der Bereitstellung chemischer, im Zellstoffwechsel verwertbarer Energie (ATP) und der Versorgung der Zellen mit Reduktionsäquivalenten ( $NADPH + H^+$ ), andererseits der Verwendung dieser Substanzen zur Synthese von Hexosen/Kohlehydraten und anderen organischen Verbindungen. Vorgänge, die wie die Sulfat- bzw. Nitratassimilation in den Chloroplasten ablaufen, sind dort direkt von der in der Photosynthese erzeugten Energie, z. T. über die Bildung anderer Produkte, z. B. Ferredoxin abhängig (Schlee, 1992).

Die Photosynthese ist ein außerordentlich Stress-sensitiver Prozess; sie reagiert sehr empfindlich auf jede Veränderung abiotischer Umweltfaktoren. Eine Schädigung der Photosynthese kann zu entscheidenden Veränderungen im gesamten Stoffwechselgeschehen führen, da andere metabolische Prozesse vom optimalen Ablauf der Photosynthese abhängen.

Wie in Kap. 1. 1 und 1. 2. 1 beschrieben, zeigen Schwermetalle und organische Schadstoffe vielfältige schädliche Auswirkungen auf Pflanzen. Auch die Photosynthese kann durch diese Substanzen negativ beeinflusst werden, wobei die Angriffspunkte aufgrund der Komplexität dieses Systems mannigfaltig sein können. Clijsters und van Assche (1985) fassten die Effekte

von Schwermetallen auf die Photosynthesysteme von intakten höheren Pflanzen in einer Übersicht zusammen (Tab. 2).

**Tab. 2.** Beispiele für Auswirkungen von toxischen Schwermetall-Konzentrationen auf die Photosynthese höherer Pflanzen (aus Clijsters und van Assche, 1985).

Betroffener Prozess	Schwermetall	Organismus
Reduktion der Netto-Photosynthese	Ni, Cd, Co, Cr, Zn	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , Sonnenblume, Soyabohne
Erniedrigung des Chlorophyll-Gehaltes, des Chlorophyll a/b-Verhältnisses	Cd, Pb	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Zerstörung der Chloroplasten-Ultrastruktur	Cd, Pb	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Ceratophyllum demersum</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i>
Inhibierung des PS II	Zn, Cd	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Inhibierung der Rubisco	Zn	<i>Phaseolus vulgaris</i>

Schwermetalle können somit die Photosynthese auf verschiedenen Ebenen inhibieren: Stomata, Pigmente, Struktur und Funktion von Chloroplasten, Enzyme. Während es zu einer starken Inhibierung des PS II und der Rubisco-Aktivität kommt, ist das PS I weniger betroffen. Untersuchungen wurden hierbei vor allem an höheren Pflanzen durchgeführt. Carlson et al. (1975) beschrieben einen schädlichen Effekt von Ni(II) auf die Stomata-Funktion von *Zea mays*. Cd(II) bewirkte in den Chloroplasten der Wasserpflanze *M. spicatum* eine Zerstörung der Thylakoidmembranen, auf denen die Photosysteme und die ATP-Synthase lokalisiert sind (Stoyanova und Tchakalova, 1997). Des weiteren kann Mg(II), das Zentralatom der Chlorophylle in höheren Wasserpflanzen durch Cd(II), Zn(II) oder Cu(II) substituiert werden. Dadurch sinkt der Resonanz-Energie-Transfer von den Antennen-Pigmenten zum Reaktionszentrum der Photosysteme, was eine Inhibierung der Photosynthese zur Folge hat (Küpper et al., 1998). Auch eine Verringerung des Chlorophyll-Gehaltes wurde bei Belastung verschiedener Pflanzen mit Cd(II) oder Pb(II) beschrieben (Clijsters und van Assche, 1985; Larsson et al., 1998; Padmaja et al., 1990).

Xenobiotika schädigen ebenfalls die Prozesse der Photosynthese. Lichtenthaler und Miede (1997) untersuchten die Blockierung des photosynthetischen Elektronentransportes durch die Bindung des Herbizides Diuron (3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff) an das D1-Protein des PS II. Auch Atrazin und Bentazon binden an die Plastochinonbindungsstelle des D1-Proteines und blockieren so die Photosynthese (Heldt, 1999). Paraquat, ein nicht-

selektives Herbizid, ruft in Pflanzen oxidativen Stress hervor. Durch Aufnahme eines Elektrons aus dem angeregten PS I wird es zu einer radikalischen Substanz reduziert, welche das Elektron weiter auf Sauerstoff unter Bildung des Superoxidradikales überträgt (Heldt, 1999; Patra und Panda, 1998). Des weiteren beeinflusst es die Regeneration von Dehydroascorbat und hemmt somit die Reaktion der Ascorbat-Peroxidase, die in der Thylakoidmembran lokalisiert ist und der Vermeidung von oxidativem Stress dient (Heldt, 1999).

Das Photosystem II ist ein sensitiver Marker, um den Einfluss von Stress-Faktoren auf die Photosynthese zu untersuchen (Lichtenthaler und Mische, 1997). Durch Messung der effektiven Quantenausbeute der Energieumwandlung im PS II (Chlorophyll-Fluoreszenz) können Aussagen über die Vitalität von Pflanzen während Belastungssituationen gemacht werden. Durch Nutzung dieses Parameters ist eine Abschätzung von schädlichen Auswirkungen möglich, bevor Symptome, wie Chlorosen und Nekrosen, sichtbar werden.

### **1. 3. 2 Die Sulfatassimilation in Pflanzen und die Biosynthese von Cystein und Glutathion**

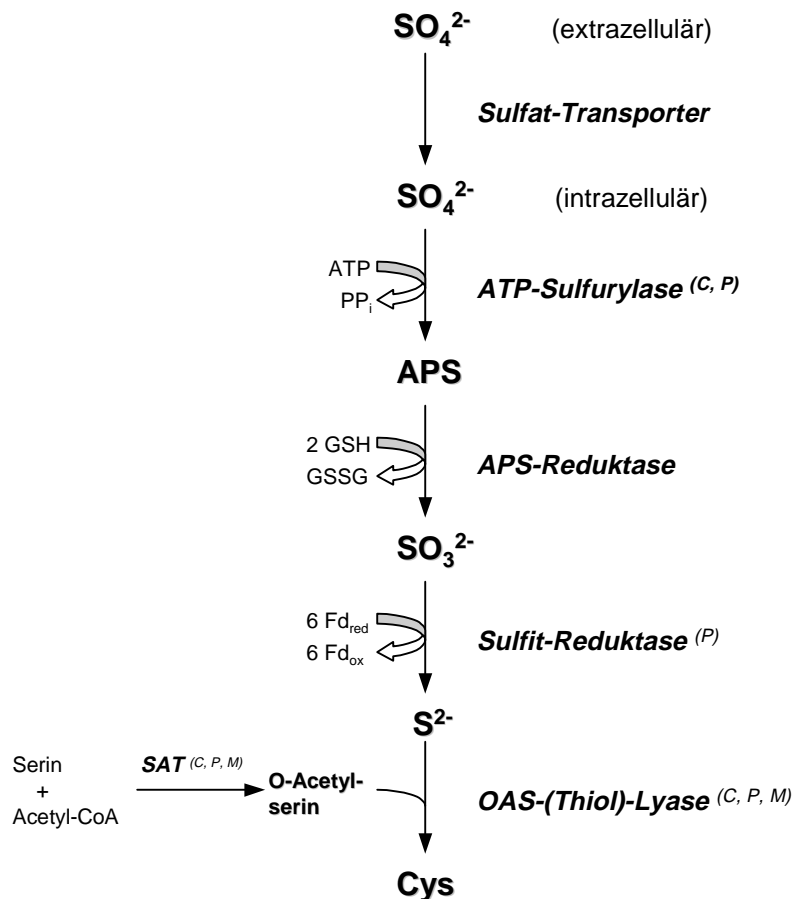
Auch die Sulfatassimilation der Pflanzen kann durch Schadstoffe, wie Schwermetalle und Xenobiotika negativ beeinflusst werden, z. B. durch die Inaktivierung von Enzymen oder die Inhibierung der Aufnahme von Sulfat. Außerordentlich wichtig ist dieser Prozess jedoch für die Bereitstellung von Verbindungen, mit denen die Entgiftung dieser toxischen Substanzen möglich ist (Kap. 1. 1 und 1. 2). So dienen Cystein-reiche Moleküle, wie Phytochelatine und Metallothioneine, der Chelatierung von Schwermetallen in höheren Pflanzen (Zenk, 1996; Rauser, 2000). Xenobiotika können an GSH gebunden und über GSH-S-Konjugat-Transporter in die Vakuolen transportiert werden (Coleman et al., 1997). Die Sulfatassimilation steht in der Pflanzenzelle in enger Verbindung zur Nitratassimilation, die den Stickstoff in eine für die Aminosäure- und Proteinbiosynthese verfügbare Form umwandelt, aber auch zur Photosynthese, die Energieäquivalente für die Sulfatreduktion in Form von ATP bereitstellt.

Schwefel wird normalerweise in Form von Sulfat aus dem Boden oder dem Wasser aufgenommen. In den Zellen erfolgt dann die Umwandlung in seine reduzierte Form, das Sulfid (Hell und Rennenberg, 1998). Die Aufnahme von Sulfat durch die Plasmamembran von Wurzeln erfolgt mittels Protonen/Sulfat-Cotransportern. Dabei handelt es sich um Polypeptide von 70-74 kDa. Diese Transporter zeigen keinerlei Homologie zu einer bekannten Transporter-Familie, so dass man eine eigene Gruppe vermutet (Hawkesford, 2000; Saito,

2000). In *Arabidopsis thaliana* wurden bisher 7 Typen von Sulfat-Transportern gefunden, die zum Teil relativ geringe Sequenzhomologien zeigen. Die Ursache hierfür könnte darin liegen, dass Sulfat innerhalb der Zelle über viele Membranen transportiert werden muss. So erfolgt die Aufnahme über die Plasmamembran in der Wurzel, die Beladung des Xylems der Wurzel, die Entladung des Xylems in den Blättern und der Transport in die Chloroplasten des Blattmesophylls. Weiterhin kann eine Phloembeladung in den Blättern zum Transport von Sulfat in jüngere Blätter oder Samen stattfinden. Deshalb wurde eine Klassifizierung in Wurzeltyp-, Blatttyp- und Wurzel/Sprosstyp-Transporter vorgenommen (Hawkesford, 2000). Die Aufnahme von Sulfat ist in starkem Masse von der Versorgung mit Schwefel abhängig (Bell et al., 1995b; Bolchi et al., 1999; Saito, 2000). Eine weitere Regulation kann über den intrazellulären Gehalt an Sulfat, aber auch Cystein oder Glutathion erfolgen (Herschbach und Rennenberg, 1991, 1994; Bell et al., 1995b). Nach der Sulfat-Aufnahme kommt es zur Reduktion des Sulfates oder, bei Sulfatüberschuss, zur Speicherung des Nährstoffes in der Vakuole (Leustek et al., 2000). Die Sulfatassimilation erfolgt vorwiegend in den Chloroplasten (Heldt, 1999; Saito, 2000). Der Ablauf dieses Syntheseweges ist in Abb. 5 dargestellt (Hell und Rennenberg, 1998; Leustek und Saito, 1999; Leustek und Bick, 2000; Leustek et al., 2000).

Der erste Schritt der sogenannten assimilatorischen Sulfatreduktion in Pflanzen ist die Reduktion des Sulfates, da Schwefel in den Zellen vor allem in seiner reduzierten Form benötigt wird. Hierzu muss das sehr stabile Sulfat aktiviert werden. Dies geschieht durch ATP unter Bildung von Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS), katalysiert durch die ATP-Sulfurylase. Dann erfolgt eine Reduktion des aktivierten Sulfates zum Sulfit mittels der APS-Reduktase. Die pflanzliche APS-Reduktase nutzt reduziertes Glutathion als Elektronendonator, vermittelt durch das C-terminale Ende des Enzymes, welches in Homologie zum Thioredoxin als Glutaredoxin fungiert (Leustek et al., 2000). Das aus dem APS freigesetzte Sulfit wird dann mittels der Sulfit-Reduktase zum Sulfid reduziert wird. Der Elektronentransfer vom Sulfit zum Sulfid erfolgt durch Sirohäm und 4Fe-4S-Cluster, wobei die Sulfit-Reduktase die Elektronen vom Ferredoxin erhält.

Im weiteren Verlauf wird Sulfid in Form von Cystein fixiert, welches die erste stabile organische Schwefelverbindung darstellt. Für die Synthese von Cystein muss zunächst Serin aktiviert werden. Dies geschieht durch Übertragung des Acetylrestes von Acetyl-CoA auf die  $\beta$ -Hydroxylgruppe der Aminosäure mittels der Serin-Acetyl-Transferase. Es entsteht O-Acetylserin. Letztlich erfolgt die Reaktion von Sulfid mit dem aktivierten Serin, katalysiert durch die O-Acetylserin-(Thiol)-Lyase. Damit bildet Cystein das Endprodukt der Sulfatassimilation (Hell und Rennenberg, 1998; Heldt, 1999; Leustek et al., 2000).



**Abb. 5.** Sulfatassimilation in Pflanzen (nach Hell und Rennenberg, 1998; Leustek et al., 2000). APS: Adenosin-5'-Phosphosulfat, SAT: Serin-Acetyl-Transferase. Subzelluläre Lokalisierung der Enzyme: (C) Cytosol, (P) Plastid, (M) Mitochondrien.

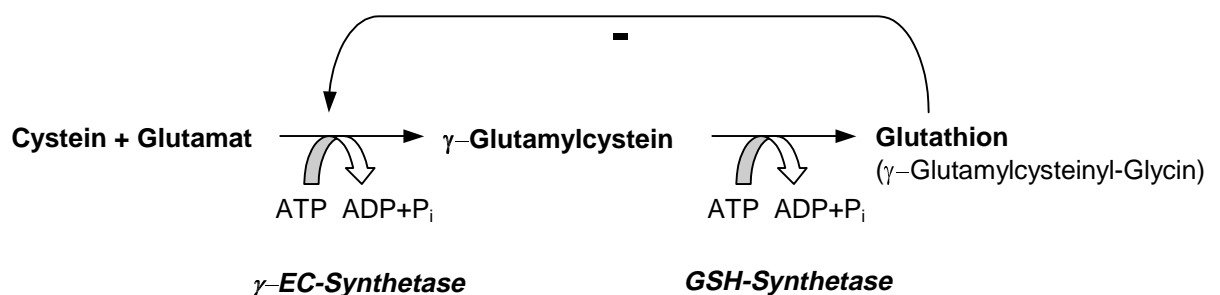
Cystein besitzt eine große Bedeutung im pflanzlichen Stoffwechsel, da diese Aminosäure als Bestandteil von vielen Enzymen deren Struktur und katalytische Funktion maßgeblich bestimmt. Ein relativ hoher Anteil des synthetisierten Cysteins wird für die Biosynthese von Glutathion verwendet (Heldt, 1999). Die größte Menge an Cystein fließt jedoch in die Proteinbiosynthese.

Neben seiner Funktion als Speicher- und Transportmolekül für reduzierten Schwefel ist Glutathion vor allem in Prozesse der Stressantwort und Detoxifikation involviert. Zu nennen sind: Xenobiotika-, Schwermetall-, Hitze-, Kälte-, und Trockenstress, Schwefelüberschuss, Pathogenabwehr und oxidativer Stress (Rennenberg und Brunold, 1994; Hell und Rennenberg, 1998; Noctor et al., 1998; Foyer und Rennenberg, 2000).

Aufgrund seiner redox-aktiven Thiolgruppe spielt Glutathion eine wichtige Rolle als Antioxidans. So schützt es funktionelle Thiolgruppen von Enzymen vor der Oxidation, indem es den reduzierten Status aufrechterhält. Weiterhin kann es zusammen mit Ascorbat

Sauerstoffradikale, die bei der Photosynthese als Nebenprodukte auftreten, entsorgen (Noctor et al., 1998; Heldt, 1999). Xenobiotika können durch Konjugation an GSH und Transport in die Vakuolen detoxifiziert werden (Kap. 1.2). Ein Entgiftungsmechanismus für Schwermetalle ist die Chelatierung über Phytochelatine, deren Vorstufe, bei der am weitesten verbreiteten Gruppe GSH darstellt (Robinson et al., 1993; Zenk, 1996; Rauser, 2000). Nussbaum et al. (1998) beschrieben einen verstärkten Einbau von Sulfat in höher molekulare Peptide, wahrscheinlich Phytochelatine, bei Belastung von *Zea mays* mit Cd(II). Dies war verbunden mit einer Aktivierung der Sulfatassimilation und der Cystein- und Glutathion-Biosynthese. Ähnliche Ergebnisse erhielten Heiss et al. (1999) bei der Exposition von *Brassica juncea* mit Cd(II). Cd(II) erhöhte die Expression der ATP-Sulfurylase und der APS-Reduktase, verbunden mit einer signifikanten Produktion von Phytochelatinen. Die koordinierte transkriptionale Regulation von Genen der Sulfatassimilation und der GSH-Biosynthese stellt somit einen wichtigen Teil der zellulären Antwort auf Cd(II)-Stress dar (Heiss et al., 1999).

Die Biosynthese von Glutathion erfolgt in zwei Schritten (Abb. 6) (Bergmann und Rennenberg, 1993). Zuerst kommt es zur Bildung von  $\gamma$ -EC aus Cystein und Glutamat mittels der  $\gamma$ -EC-Synthetase. Der zweite Schritt besteht in der C-terminalen Addition von Glycin an  $\gamma$ -EC durch die GSH-Synthetase. Beide Reaktionsschritte sind  $Mg^{2+}$ ATP-abhängige Prozesse. Die Regulation der GSH-Biosynthese erfolgt über (a) die  $\gamma$ -EC-Synthetase-Aktivität und (b) eine Feedback-Hemmung der  $\gamma$ -EC-Synthetase durch das Endprodukt GSH (Noctor et al., 1998).



**Abb. 6.** Biosynthese von Glutathion (nach Bergmann und Rennenberg, 1993).

### 1. 3. 3 Die Nitratassimilation in Pflanzen als Voraussetzung der Aminosäure- und Protein-Biosynthese

Ein zentraler Baustein von Aminosäuren, Proteinen und anderen Biomolekülen in pflanzlichen Zellen ist reduzierter Stickstoff. Ebenso wie die Photosynthese oder die Sulfatassimilation kann die Nitratassimilation durch eine Belastung der Pflanzen mit Schwermetallen und Xenobiotika gehemmt werden. Erwähnt werden muss wiederum das enge Wechselspiel zwischen diesen Stoffwechselwegen, das aus der Verwendung der Produkte für die Proteinbiosynthese resultiert und ohne das die Pflanzen ihre Lebensfähigkeit nicht aufrechterhalten können.

In Pflanzen ist die Aufnahme und Assimilation von Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) aus dem Boden oder dem Wasser die Voraussetzung zur Synthese dieser organischen Substanzen. Neben Nitrat können viele Pflanzen auch Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) als Stickstoffquelle nutzen (Heldt, 1999). Die Nitratassimilation findet in den Wurzeln und Blättern der Pflanzen statt. In den Wurzeln werden hochaffine, ATP-abhängige Aufnahmesysteme für Nitrat-Ionen exprimiert. Sie werden eingeteilt in 3 Gruppen: ein konstitutives LATS (low-affinity transport system) mit einer niedrigen Affinität zu Nitrat, ein induzierbares und ein konstitutives HATS (high-affinity transport system) mit einer hohen Affinität zu Nitrat (Sivasankar und Oaks, 1996; Wang et al., 1998; Forde und Clarkson, 1999; Liu et al., 1999). Überschüssiges Nitrat wird in den Vakuolen gespeichert (Sivasankar und Oaks, 1996).

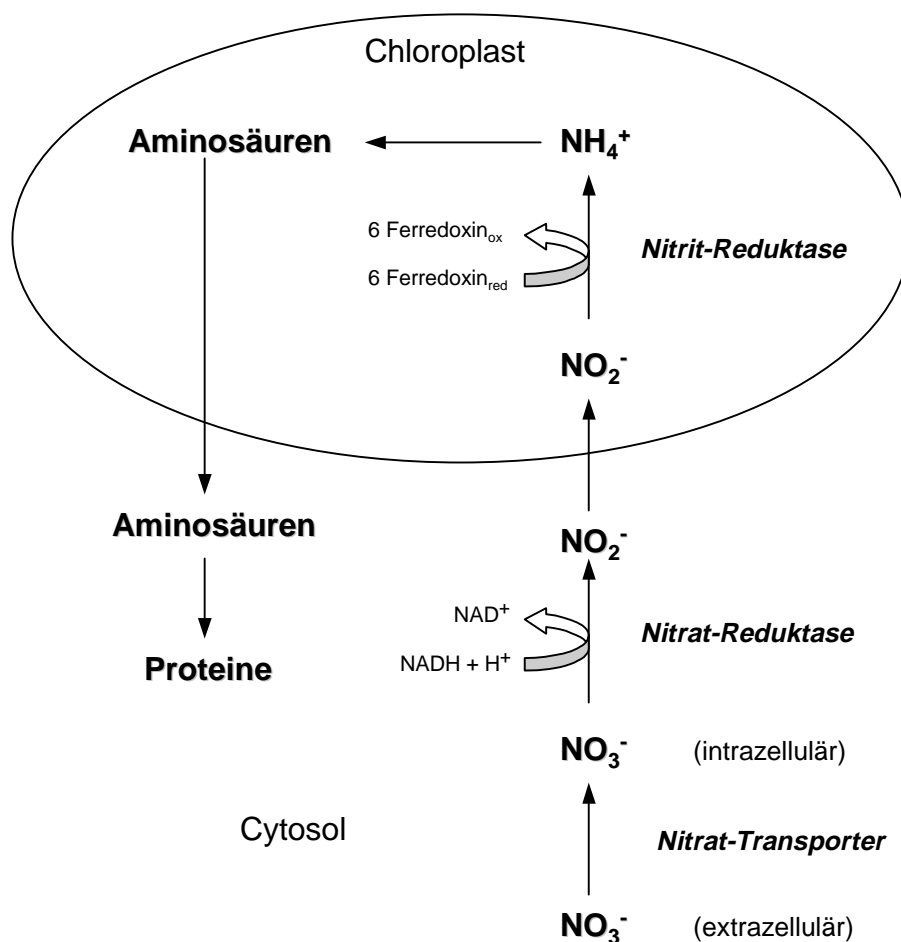
Wassermoose, wie *Fontinalis antipyretica*, besitzen keine echten Wurzeln, die Aufnahme-, Stoffwechsel- und Transportfunktionen aufweisen. Die Hauptaufgabe der Rhizoide besteht in einer Verankerung auf dem Untergrund (Kap. 2. 1). Die Aufnahme von Nährstoffen erfolgt über die Blattoberfläche. Es ist anzunehmen, dass sich in den Blättern des Moores Aufnahmesysteme entwickelt haben, die denen der Wurzeln höherer Pflanzen entsprechen. Da die Nitratassimilation auch in den Blättern stattfindet, wird im weiteren dieser Stoffwechselprozess nur in diesen Organen beschrieben.

In Abb. 7 ist die Nitratassimilation in den Blättern von Pflanzen dargestellt (Oaks, 1994a/b; Sivasankar und Oaks, 1996; Heldt, 1999). Nach Aufnahme des Nitrates erfolgt seine Reduktion zum Nitrit mittels der Nitrat-Reduktase. Diese Reaktion findet im Cytosol statt. Bei den meisten Pflanzen ist das Reduktionsmittel NADH. Manche Isoformen des Enzymes können zusätzlich NADPH verwenden. Jede der beiden Untereinheiten der Nitratreduktase (je 99-104 kDa) besitzt eine Elektronentransportkette aus FAD, Cyt-*b*<sub>557</sub> und einem Molybdän-Cofaktor, mit deren Hilfe die Elektronen vom NADH auf das Nitrat übertragen werden. Nach Aufnahme des Nitrits in die Chloroplasten kommt es zur Reduktion des Ions zum Ammonium durch die Nitrit-Reduktase. Während bei der Reaktion von Nitrat zu Nitrit nur 2 Elektronen



übertragen werden müssen, sind bei diesem Prozess 6 Elektronen erforderlich. Als Elektronendonator dient reduziertes Ferredoxin. Dieses entsteht durch den Elektronenfluss im Photosystem I. Die Übertragung der Elektronen in der Nitritreduktase wird durch ein 4Fe-4S-Zentrum, FAD und Sirohäm vermittelt. Die Affinität des Enzyms zum Nitrit ist sehr hoch. Da Nitrit für die Zellen hochtoxisch ist, wird es vollständig in Ammonium umgesetzt.

Der nächste Schritt in der Stickstoffassimilation ist die Fixierung von Ammonium in der Aminosäure Glutamin. Dieses wird dann in Glutamat umgesetzt, so dass Glutamat und Glutamin die Primärprodukte des Nitrataassimilation darstellen. Die  $\alpha$ -Aminogruppe des Glutamats stellt den Donor der  $\alpha$ -Aminogruppe der meisten anderen Aminosäuren dar, die durch Transaminierungen übertragen wird. Der Seitenkettenstickstoff des Glutamins steht für die Biosynthese vieler wichtiger Verbindungen zur Verfügung (Stryer, 1999). Das Kohlenstoffgerüst der Aminosäuren wird durch die  $\text{CO}_2$ -Assimilation (Calvin-Zyklus) der Photosynthese bereitgestellt (Oaks, 1994b; Sivasankar und Oaks, 1996). Aminosäuren wiederum bilden die Grundbausteine von Peptiden und Proteinen.



**Abb. 7.** Nitratassimilation in den Blättern von Pflanzen (nach Oaks, 1994a/b; Sivasankar und Oaks, 1996; Heldt, 1999).

Schwermetalle können alle Prozesse von der Aufnahme von Nitrat über die Nitratassimilation bis hin zur Aminosäure- und Proteinbiosynthese negativ beeinflussen. Aussagen über den Angriffspunkt einzelner Elemente in solch einem komplexen System sind jedoch schwierig und beschränken sich auf Untersuchungen einzelner Stoffwechselwege. Einige Autoren beschreiben die Hemmung von Enzymen der Nitratassimilation (Nitrat- und Nitritreduktase) durch Schwermetalle (Boussama et al., 1999; Bharti und Singh, 1994). Auch eine Inhibierung von Glutamat-Synthase und Glutamin-Synthetase wurde nachgewiesen (Boussama et al., 1999). Eine spezifische Veränderung des Gehaltes an Aminosäuren bei Belastung von *Lactuca sativa* mit Cd(II) fanden Costa und Morel (1994). Hier kam es neben einer Erniedrigung (Arg, Try, Phe, Ser, Ala) auch zu einer Erhöhung des Gehaltes an bestimmten Aminosäuren (Glu/Gln, Asn, Gly, Lys, Val, Ile), wobei Unterschiede zwischen Wurzel und Spross festgestellt wurden. Der Gesamt-Proteingehalt nahm dagegen deutlich ab. Die Autoren führen diese spezifischen Modifikationen in der Zusammensetzung des Aminosäure-Pools, v. a. die Akkumulation bestimmter Aminosäuren, auf verschiedene Ursachen zurück: Inhibierung der Proteinbiosynthese, Schädigung der Regulation von Enzymen der Glutamin- und Asparagin-Biosynthese. Weiterhin wird einigen Aminosäuren eine mögliche Schutzfunktion bei Cd(II)-Stress zugeschrieben.

#### **1. 4 Problemstellung und Ziel der Arbeit**

Aufbauend auf den Ergebnissen früherer Arbeiten (Bruns, 1997; Bruns et al., 2000b, c), in denen erste Fragen zur Reaktion des Wassermooses *Fontinalis antipyretica* auf eine Exposition mit Schwermetallen beantwortet werden konnten, war es Ziel dieser Studie, einen tieferen Einblick in die Mechanismen der Akkumulation, Detoxifikation und intrazellulären Wirkung von Schwermetallen (Cd(II), Pb(II), Zn(II)) bei dieser niederen Pflanze zu erhalten. Die Aktualität des Problems ergab sich aus der zum Teil extrem hohen Belastung von Gewässern mit diesen Schadstoffen aufgrund von anthropogenen Einflüssen, wie Klärschlammdüngung, Bergbau und vielen anderen Industriezweigen.

In diesem Zusammenhang wurde das extra- und intrazelluläre Akkumulationsvermögen des aquatischen Mooses für die Schwermetalle Cd(II), Pb(II) und Zn(II) bestimmt. Neben der Untersuchung einer Depotfunktion der Zellwand für Cd(II), wurde die Cd(II)-Akkumulations-Kapazität zweier Arten von *Fontinalis* verglichen. Diese Experimente sollten Aufschluss über allgemeine Mechanismen der Biosorption und Aufnahme von Schwermetallen durch das Wassermoos geben.

Photosynthese, Sulfat- und Nitratassimilation reagieren sehr sensitiv auf Stress-Situationen, die u. a. durch eine die Toleranzgrenze einer Pflanze überschreitende Konzentration an Schwermetallen entstehen kann. Eine Schädigung der Prozesse der Photosynthese, Sulfat- und Nitratassimilation zeigt vielfältige Wirkungen auf den gesamten Metabolismus der Pflanzen. Deshalb wurde der Einfluss der Schwermetalle auf die Photosynthese von *Fontinalis antipyretica* untersucht. Dies erfolgte mittels Bestimmung der Quantenausbeute der photochemischen Energieumwandlung im Photosystem II, gemessen über die Chlorophyll-Fluoreszenz. Diese Messungen ermöglichten Aussagen über die Vitalität des Mooses bei Schwermetall-Exposition.

Bei der Belastung mit Schwermetallen, v. a. mit Cd(II) erfolgt in den Zellen von *Fontinalis antipyretica* eine Erhöhung des GSH-Pools. Aus diesem Grunde wurden weiterhin Experimente zur Wirkung von Cd(II) auf die Sulfatassimilation durchgeführt, da die Erhöhung dieses Prozesses die Grundlage für eine verstärkte Biosynthese von GSH darstellt. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf einen denkbaren Zusammenhang zwischen der Versorgung mit Sulfat und der Belastung mit Cd(II) gerichtet.

Weil die Hemmung von Nitratassimilation und Aminosäure- und Proteinbiosynthese durch Schwermetalle bekannt ist, wurde letztlich der Einbau von <sup>15</sup>N-Stickstoff in Aminosäuren und Proteine nach Exposition mit Schwermetallen verfolgt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, unter Nutzung der analytischen Elektronenmikroskopie, die Kompartimentierung und Komplexierung von Cd(II) in den Mooszellen zu untersuchen. Dies sollte einen tieferen Einblick in den möglichen Entgiftungsmechanismus von Cd(II) in den Zellen von *Fontinalis antipyretica* geben.

Eine zusätzliche Möglichkeit, die Detoxifikation von Cd(II) im Moos näher zu beschreiben, bestand in der Untersuchung der gleichzeitigen Exposition mit Cd(II) und organischen Modellsubstanzen, wie CDNB oder NEM. Diese Substanzen können in den Zellen durch Konjugation mit GSH und anschließenden Transport über GSH-S-Konjugat-Transporter in die Vakuole detoxifiziert werden. Bei der Belastung mit Cd(II) wird, aufgrund der Erhöhung des GSH-Pools, dem GSH eine wichtige Rolle bei der Entgiftung des Schwermetalls zugeschrieben. Wegen einer möglichen Konkurrenz von Cd(II) und Xenobiotika um GSH-Moleküle im Zuge der Detoxifikation in den Zellen von *Fontinalis antipyretica* wurde letztlich der Einfluss von Organika auf den GSH-Gehalt der Zellen, aber auch auf die Lokalisation, Akkumulation und Detoxifikation von Cd(II) untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Das aquatische Moos *Fontinalis antipyretica*

Aquatische Moose wurden zu Biomonitoring-Untersuchungen schwermetallbelasteter Habitate schon vielfältig genutzt (Wehr und Whitton, 1983; Mouvet, 1984; Say und Whitton, 1983; Siebert et al., 1996). Dies ist vor allem auf ihre morphologischen und physiologischen Eigenschaften zurückzuführen (Mouvet, 1984). Sie können hohe Mengen an Schadstoffen tolerieren, sind leicht handhabbar und weitverbreitet. Ihre Kultivierung im Labor erfordert keine hohen Ansprüche. Die Aufnahme der Nähr-, aber auch Schadstoffe erfolgt über die Blattoberflächen. Durch das Fehlen eines voll entwickelten Leitsystems verbleiben die Schadstoffe am Ort der Aufnahme.

Als Untersuchungsobjekt wurde in der vorliegenden Arbeit das Wassermoos *Fontinalis antipyretica* gewählt. Nach Frahm und Frey (1987) kann es wie folgt klassifiziert werden:

Klasse: Laubmoose (Musci)  
Ordnung: Neckerales (Isobryales)  
Familie: Fontinalaceae  
Gattung: *Fontinalis*  
Art: *Fontinalis antipyretica*.

Die Gattung *Fontinalis* gehört zu den flutenden Wassermoose, von denen weltweit 35 Arten beschrieben wurden. Sie kommt fast ausschließlich in den gemäßigten und kälteren Teilen der nördlichen Hemisphäre vor. *Fontinalis antipyretica* besitzt Stämmchen, die bis zu 30 cm lang sein können. Die von uns gesammelten Proben wiesen Stämmchen mit einer maximalen Länge von 10-20 cm auf. Mit Rhizoiden kann sich das Moos auf dem Untergrund verankern. Es bildet dunkelgrüne Rasen in fließenden Gewässern. Der Biomassezuwachs erfolgt vor allem im Winter und Frühjahr bei Wassertemperaturen unter 15 °C.

### 2.2 Probenahme und Versuchsvorbereitung

Als Probenahmestandorte für die Untersuchungen an *Fontinalis antipyretica* wurden die Standorte Wipper (Nähe Wippa) und Helbe (Nähe Diätenborn) im Harz ausgewählt. Die Belastung der Wipper mit Schwermetallen, die sich in den letzten Jahren seit Stilllegung von Metallverarbeitungsanlagen stark verringerte, beschränkt sich vor allem auf den Unterlauf des Gewässers im Mansfelder-Hettstedter Raum. Da die Probenahme bei Wippa, also oberhalb

dieses Gebietes erfolgte, kann man von einer geringeren Belastung mit Schadstoffen ausgehen. Die biologische Beschaffenheit der Wipper bei Wippra wird der Güteklasse II (mäßig belastet) zugeordnet. Bemerkenswert ist das Auftreten von 3 Fischarten, die klare sauerstoffreiche Bäche als Lebensraum bevorzugen (Gewässergütebericht, Landesamt für Umweltschutz, Sachen-Anhalt, 1995). Die Sammelstelle des Moooses befand sich unterhalb einer Talsperre, wodurch der Nährstoffeintrag stark von der Ablassregulierung der Talsperre abhängt. Die Helbe kann als unbelastetes Fließgewässer betrachtet werden (Regionallabor, Thüringer Landesamt für Umwelt, 1997-1999). Moos beider Standorte wurde mittels Frahm und Frey (1987) als *Fontinalis antipyretica* Hedw. klassifiziert. Koch (1950, in www.musci.com) ordnete es weiterhin als *Fontinalis antipyretica* Hedw. var. *antipyretica* Koch ein.

Ein Großteil der Versuche wurde mit dem Pflanzenmaterial aus der Helbe durchgeführt. *Fontinalis antipyretica* aus der Wipper wurde nur zur Untersuchung der Akkumulation von Cd(II) zum Vergleich mit Moos aus der Helbe und zur Untersuchung des „Einflusses der Versorgung mit Sulfat bei Cd(II)-Belastung von *Fontinalis antipyretica*“ (Kap. 2. 4. 3) herangezogen.

Für die vergleichenden Messungen der Cd(II)-Akkumulation wurde eine weitere Art von *Fontinalis* – *Fontinalis dalecarlica* - aus dem Allen Creek bei Westpoint, in der Nähe von Sackville (New Brunswick, Kanada) gesammelt. Gewässergüteberichte gibt es für diesen Standort nicht. Der Fluss fließt durch einen gemischten Wald in einem Sphagnum-Moor, das aufgrund von geringem anthropogenen Einfluss als unbelastet angesehen werden kann. Die Proben wurden gekühlt transportiert. Das Moos wurde von Miersch (2000, Halle) nach Ireland (1982) als *Fontinalis dalecarlica* Schimper bestimmt. Die Einordnung beider Arten als *Fontinalis antipyretica* Hedw. bzw. *Fontinalis dalecarlica* Schimper wurden von L. Meinunger (Ludwigstadt) bestätigt.

Spätestens einen Tag nach der Probenahme und Lagerung bei 4 °C wurde das Pflanzenmaterial für die Versuche aufgearbeitet. Dazu wurden die grünen Spitzen des Moooses in 3-4 cm lange Sektionen geteilt, mehrfach mit bidestilliertem Wasser gewaschen und in entsprechender Menge eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte in Knop-Medium nach Schopfer und Brennicke (1999). Um das Algenwachstum zu minimieren, wurde das Medium 1:10 verdünnt und der Anteil an N und P auf 33 % reduziert (Bruns et al., 1995). Das Medium setzte sich wie folgt zusammen:

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,33 g/L
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,25 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,083 g/L

---

KNO <sub>3</sub>	0,083 g/L
KCL	0,12 g/L
FeCl <sub>3</sub>	1 Tropfen einer gesättigten Lösung.

Eine Temperatur von 10 °C und eine Belichtung von 12 h pro Tag mit ca. 40 kLux wurden automatisch eingestellt. Um die Sauerstoffversorgung der Proben zu erhöhen, wurden die Proben bei ca. 120 rpm geschüttelt (Bruns et al., 1995). Nach 2-4 Tagen der Akklimatisierung unter diesen Bedingungen wurden die Versuche durchgeführt.

## 2. 3 Beschreibung der Methoden

### 2. 3. 1 Bestimmung der Schwermetall-Akkumulation von *Fontinalis antipyretica* und *Fontinalis dalecarlica*

Zur Untersuchung der Kapazität von *Fontinalis antipyretica/Fontinalis dalecarlica*, Schwermetalle zu akkumulieren, wurden die Biosorption an die Blattoberfläche (extrazellulärer Gehalt) und die Aufnahme ins Zellinnere (intrazellulärer Gehalt) in Kurz- und Langzeitmessungen bestimmt. Das Akkumulationsvermögen einer Pflanze wird im allgemeinen durch die Summe von extrazellulärer Adsorption und intrazellulärer Aufnahme charakterisiert.

Zur Kalkulation der beiden Fraktionen wurde je Messpunkt 1 g Frischmaterial in 100 mL Knop-Lösung und der entsprechenden Konzentration an Schwermetall, das als Me(II)Cl<sub>2</sub>-Salz eingesetzt wurde, inkubiert. Für jede Analyse wurde das Pflanzenmaterial aus einem Kolben verwendet. Das Moos wurde zunächst zweimal mit bidestilliertem Wasser und nachfolgend 3mal 30 min mit 100 mL einer 20 mM NiCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen (Brown und Wells, 1988). Dabei werden die Schwermetall-Ionen durch Ni(II)-Ionen ausgetauscht. Bei Belastung mit 400 µM Cd(II) und 500 µM Zn(II) bzw. Pb(II) wurde jeweils 4mal mit NiCl<sub>2</sub> gewaschen. Der Schwermetall-Gehalt der Waschlösungen wurde mittels Atomabsorptionsspektroskopie AAS (ATI unicam) gemessen. Aus der Summe der Schwermetall-Gehalte dieser Lösungen wurde der extrazelluläre Anteil errechnet. Nach Trocknen des gewaschenen Moosmaterials bei 80 °C (24 h) wurde es in einer Mikrowelle (CEM, MDS 2100) nach einer modifizierten Methode nach Bruns et al. (1995) aufgeschlossen. Dazu wurde das Material mit flüssigem N<sub>2</sub> gemörsert. Zu 50 mg Moos wurden 4 mL HNO<sub>3</sub> und 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gegeben. Der Aufschluss erfolgte nach Tab. 3. Nach dem Aufschluss wurden die Proben in Abhängigkeit von der eingesetzten Schwermetall-Konzentration mit bidestilliertem Wasser auf 25 oder 50 mL aufgefüllt und der intrazelluläre Schwermetall-Gehalt mittels AAS bestimmt. Des weiteren

wurde der Schwermetall-Gehalt des Knop-Mediums bestimmt (AAS). Die Wiederfindung der Schwermetalle wurde durch Addition der Metall-Gehalte von Medium, extrazellulärer und intrazellulärer Fraktion berechnet und entspricht dem Gesamt-Gehalt an Schwermetall.

Die Gehalte an Schwermetallionen wurden mittels Eichkurven mit 0,1-2,5 µg/mL CdCl<sub>2</sub> (entspricht 0,0558-1,4 µg Cd(II)/mL), 0,1-2,5 µg/mL ZnCl<sub>2</sub> (0,048-1,2 µg Zn(II)/mL) und 0,5-10 µg/mL PbCl<sub>2</sub> (0,37-7,45 µg Pb(II)/mL) berechnet.

**Tab. 3.** Parameter für den Mikrowellen-Aufschluss von *Fontinalis antipyretica*/*Fontinalis dalecarlica*.

Stufe	(1)	(2)	(3)
Leistung [%]	25	70	90
Druck [bar]	1,30	6,95	8,33
Zeit gesamt [min]	10:00	20:00	20:00
Haltezeit [min]	1:00	1:00	10:00
Temperatur [°C]	0	180	180

### 2. 3. 2 Analytik thiolhaltiger Verbindungen

#### *Extraktion thiolhaltiger Verbindungen*

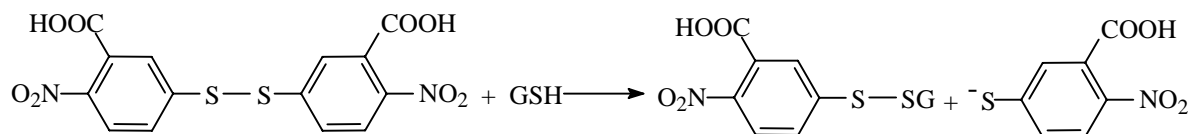
Für die Bestimmung von Veränderungen der intrazellulären Konzentration thiolhaltiger Verbindungen wurden eine modifizierte Extraktionsmethode nach Schupp (1991) verwendet. Dazu wurde 50 mg von in flüssigem N<sub>2</sub> gemörsertem Pflanzenmaterial in 1,5 bzw. 1,0 mL 0,1 N HCl eingewogen und 15 min bei 4 °C und 15000 rpm zentrifugiert. Aus den Überständen erfolgte die Bestimmung von reduziertem und oxidiertem Glutathion (GSH und GSSG) und der Vorstufen Cystein (Cys) und γ-Glutamylcystein (γ-EC), wie nachfolgend beschrieben wird. Aufgrund der schnellen Oxidation der Thiole wurden die Messungen am Tag der Extraktion durchgeführt und die Proben bis zur Messung auf Eis aufbewahrt.

**Bestimmung des Glutathion-Gehaltes mittels GSH-Reduktase**

Die Messung von Glutathion erfolgte nach Anderson (1985) mittels eines gekoppelten enzymatisch-optischen Testes, wobei die 2. Reaktion durch die GSH-Reduktase katalysiert wird:

1.  $2 \text{ GSH} + \text{DTNB} \rightarrow \text{GSSG} + \text{TNB} + 2 \text{ H}^+$
2.  $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{ GSH} + \text{NADP}^+$ .

GSH reagiert bei diesem Test mit DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)). Dabei entsteht TNB (5-Thio-2-nitrobenzoesäure-Anion), welches bei 410 nm detektiert werden kann (Abb. 8) (Ellman, 1959). Entstandenes GSSG wird durch die Reduktase und  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  wieder zu GSH reduziert. Es kann nur der Gesamt-GSH-Gehalt bestimmt werden.



**Abb. 8.** Reaktion von GSH mit DTNB.

Die Durchführung der enzymatischen Analyse des Gesamt-GSH-Gehaltes ist nachfolgend beschrieben.

Puffer:

A		143 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
B		143 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
C	A+B	1+5,25 (+ 6,3 mM EDTA), pH 7,5 (NaOH)

Testansatz:

$\text{H}_2\text{O}$ , bidest.		665 $\mu\text{L}$
+ $\text{NADPH} + \text{H}^+$	(450 $\mu\text{M}$ in C)	700 $\mu\text{L}$
+ DTNB	( 6 mM in C)	100 $\mu\text{L}$
+ Extrakt		25 $\mu\text{L}$



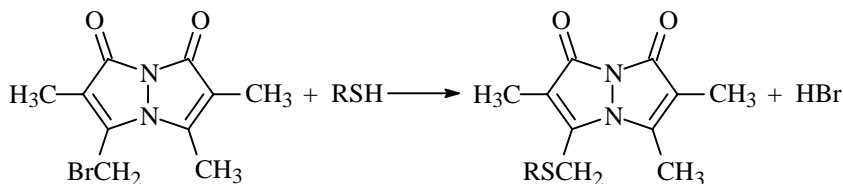
Start der Reaktion mit GSH-Reduktase:

( 20 U/mL)                      10 µL

Die GSH-Gehalte der Extrakte wurden mittels Eichkurven mit GSH im Bereich von 1-100 µg/mL berechnet und auf 1 g Frischmasse bezogen.

### ***Bestimmung von Thiolen mittels Derivatisierung mit Monobrombiman***

In Anlehnung an Fahey et al. (1981) wurden GSH, GSSG, Cys und  $\gamma$ -EC durch Reaktion der SH-Gruppe mit Monobrombiman (mBBr) in fluoreszierende Derivate (Abb. 9) umgewandelt und anschließend chromatographisch aufgetrennt.



**Abb. 9.** Reaktion von Thiolen mit mBBr (3,7-Dimethyl-4-brommethyl-6-methyl-1,5-diazabicyclo-[3.3.0]-octa-3,6-dien-2,8-dion).

Die Analyse der Thiole erfolgte in zwei Ansätzen (modifiziert, nach Strohm et al., 1995). Im ersten wurden alle Thiole des Pflanzenextraktes mittels Dithioerythrit (DTE) reduziert und derivatisiert. Aus diesem Ansatz wurden Gesamt-GSH, Cys und  $\gamma$ -EC bestimmt. Im zweiten Ansatz wurden vor der Reduktion die SH-Gruppen der reduzierten Thiole mit N-Ethylmaleinimid (NEM) maskiert und so der Reaktion mit mBBr entzogen. Nicht umgesetztes GSSG wurde dann reduziert und derivatisiert.

### Versuchsansatz:

#### 1. Gesamt-GSH, Cys und $\gamma$ -EC

Extrakt		120 µL
+ CHES	(0,2 M, pH 9,3)	180 µL
+ DTE	(6 mM)	30 µL
⇒ 1 Stunde auf Eis - Reduktion der Thiole		

+ mBBr (30 mM, Methanol) 10 µL

⇒ 15 min bei Raumtemperatur (dunkel) – Derivatisierung

+ Eisessig (5 %) 250 µL

⇒ Abstoppen der Reaktion

## 2. GSSG

Extrakt 120 µL

+ NEM (5 mM) 50 µL

⇒ 10 min bei Raumtemperatur – Reaktion mit reduzierten Thiolen

+ CHES (0,2 M, pH 9,3) 180 µL

+ DTE (6 mM) 30 µL

⇒ 1 Stunde auf Eis - Reduktion des GSSG

+ mBBr (30 mM, Methanol) 10 µL

⇒ 15 min bei Raumtemperatur (dunkel) – Derivatisierung

+ Eisessig (5 %) 250 µL

⇒ Abstoppen der Reaktion

Die Ansätze wurden im folgenden mittels einer Spectrasystem HPLC-Anlage (Spectra-Physics Analytical Inc., Fremont) analysiert. Die GSH, Cys- und  $\gamma$ -EC-Gehalte wurden anhand von Eichkurven im Bereich von 0,01-20 µg Standard/Extraktionsansatz, der GSSG-Gehalt mittels Eichkurve im Bereich von 0,025-5 µg GSSG/Extraktionsansatz ermittelt.

### HPLC-Bedingungen:

#### Stationäre Phase:

Lichrospher 60 RP Select B (5 µm, 250\*4 mm)

#### Mobile Phase:

A 10 % Methanol/0,25 % Eisessig (v/v), pH 4,3  
(10 N NaOH)

B 90 % Methanol/0,25 % Eisessig (v/v), pH 3,9  
(0,1 N NaOH)

#### Fluss:

0,9 mL/min

Injektionsvolumen: 100 µl

Detektion: Fluoreszenz 420/520 nm  
UV/Vis 254 nm

Gradient:

Zeit [min]	Gradient	
	A [%]	B [%]
0,0	100	0
8,0	100	0
8,1	99	1
18,0	85	15
18,1	0	100
28,0	0	100
29,0	100	0
40,0	100	0
40,1	100	0

### 2. 3. 3 Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz

Zur Untersuchung der Schadwirkung bei Exposition von *Fontinalis antipyretica* mit Schwermetallen, Organika oder bei Schwefelmangel wurde die Messung der effektiven Quantenausbeute der photochemischen Energieumwandlung im Photosystem II (Mini-PAM, Heinz Walz GmbH, Effeltrich) herangezogen. Die Bestimmung dieses Parameters erfolgte durch Applikation eines einzigen, sättigenden Lichtpulses, welcher kurzzeitig die photochemischen Reaktionen unterdrückt und eine maximale Chlorophyll-Fluoreszenz induziert. Die photochemische Ausbeute wird sofort kalkuliert:

$$\text{Yield} = Y/1000 = (M-F)/M = \Delta F/F_m \quad (\text{Genty-Parameter})$$

wobei:

M = F<sub>m</sub> maximale Fluoreszenz

F Fluoreszenz kurz vor Applikation des Lichtpulses.

Zur Messung werden an Dunkelheit adaptierte Proben verwendet, da hier die Fluoreszenz F kurz vor der Applikation des Lichtpulses minimal ist und so der Maximalwert der photochemischen Ausbeute ermittelt werden kann.

Das PS II ist ein sensitives System für frühe Schädigungen von Pflanzen durch Schadstoffe, wie Schwermetalle. Da eine Beeinflussung des PS II und damit auch der gesamten Photosynthese immer einen Einfluss auf die Vitalität der Pflanzen hat, kann man in erster Näherung den Genty-Parameter als Maß für die Vitalität einer Pflanze nehmen.

Der Wert des Genty-Parameters liegt zwischen 0 (minimale Vitalität) und 1 (maximale Vitalität). Für die Untersuchungen wurde je eine Moosspitze in einer Klammer im Dunklen bei 4 °C für 30 min inkubiert. Bei der Auswertung wurden die Messwerte entweder als Yield angegeben oder die Messwerte der Kontrolle wurden jeweils auf 100 % gesetzt und die der belasteten Proben prozentual zur Kontrolle berechnet. Pro Probe wurden jeweils 5 Spitzen vermessen.

### **2. 3. 4 Kapillarelektrophoretische Analyse von Sulfat**

Die Sulfatbestimmung erfolgte mit Hilfe einer kapillarelektrophoretischen Methode, die auf Nutzung der indirekten UV-Absorption beruht (Ross, 1995).

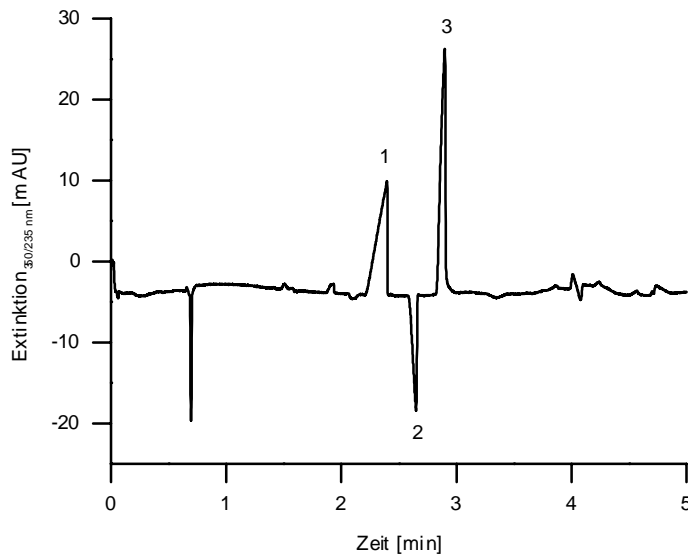
Ca. 50 mg Moosmaterial wurde 1:4 mit heißem, bidestilliertem Wasser extrahiert und 10 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Aus den Überständen erfolgte die Bestimmung des intrazellulären Sulfat-Gehaltes. Bei Messungen von Sulfat-Konzentrationen des Wassers der Wipper oder Helbe bzw. des Knop-Mediums wurden die Lösungen ohne weitere Vorbehandlung verwendet.

Die Trennung der anorganischen Anionen erfolgte mittels eines HEWLETT PACKARD HP<sup>3</sup> Systems mit Dioden-Array-Detektor, ausgestattet mit einer Chemstation Hard- und Software zur Analyse der Elektropherogramme. Es wurde eine unbeschichtete Kapillare (SUPELCO FS 50 CE) mit einem Innendurchmesser von 50 µm verwendet. Die Temperatur der Kapillare wurde mittels eines Luftkühlsystems auf 20 °C gehalten. Die Injektion der Proben erfolgte bei 200 mbar\*s. Die Proben wurden bei einer Signalwellenlänge von 350 nm und einer Referenzwellenlänge von 235 nm als positive Peaks detektiert. Vor jedem Lauf wurde die Kapillare je 2 min mit 0,1 N NaOH, 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und H<sub>2</sub>O (bidest.) und 5 min mit Puffer gespült.

Die Analysen von Sulfat wurden mit einem Puffer bestehend aus 2,25 mM Pyromellinsäure, 6,5 mM NaOH, 0,75 mM Hexamethoniumhydroxid, 1,6 mM Triethanolamin (pH 7,0), einer Kapillare mit einer effektiven Länge von 56 cm, einer Spannung von 30 kV und negativer Polarität durchgeführt. Da eine Trennung der Anionen SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> und S<sup>2-</sup> nicht realisiert

werden konnte, wurde der pH-Wert des Puffers auf 11,4 erhöht. Die Kapillare für diese Trennung hatte eine effektive Länge von 24,5 cm, die Analysen erfolgten bei 18 kV und negativer Polarität. Abb. 10 zeigt ein Elektropherogramm der Trennung von Anionen-Standards mittels der modifizierten Methode.

Die Konzentration an Sulfat in den Pflanzenextrakten wurde mit Eichkurven von  $\text{KHSO}_4$  im Bereich von 0,025-2 mM berechnet.



**Abb. 10.** Separation von S-Anionen (je 1mM) mittels CZE. **1** Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), **2** Sulfid ( $\text{S}^{2-}$ ), **3** Sulfit ( $\text{SO}_3^{2-}$ ).

### 2. 3. 5 Analytische Elektronenmikroskopie

Zur Messung der Lokalisation von Cd(II) in den Zellen von *Fontinalis antipyretica* wurden Blätter nach Neumann et al. (1995) gefriersubstituiert. Dazu wurde das Material in flüssigem Propan (JFD 030, Balzers) gekühlt, mit Aceton substituiert (CS auto, Leica) und in Epoxidharz eingebettet. Für die analytische Elektronenmikroskopie wurde ein Transmissions-Mikroskop (EM 912 OMEGA, Zeiss), ausgestattet mit einem Energiefilter für EEL-Spektroskopie und einem EDX-Analyser (Link, Oxford Instruments), verwendet.

Mittels EDX („energy dispersive X-ray“) kann die Zusammensetzung von Niederschlägen in Zellkompartimenten untersucht werden. Ultradünne Sektionen wurden auf Ti-Gitter aufgebracht und im Spot-Modus (100 nm Durchmesser) analysiert.

EELS („electron energy loss spectroscopy“) ermöglicht Aussagen über den Bindungszustand zwischen Elementen der Probe. Es wurden Spektren von 50 nm dicken Schnitten mit einer

SIT TV-Kamera aufgenommen. Die Spektren wurden nach Subtraktion des Hintergrundes (Evision-System, SYS) mit Standardspektren verglichen oder quantenchemisch über die Dichte-Funktions-Theorie berechnet.

### 2. 3. 6 Bestimmung der $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit

Zur Untersuchung der Hemmung von Aminosäure- und Proteinbiosynthese von *Fontinalis antipyretica* durch Schwermetalle wurden Tracerstudien mit stabilisotop-markiertem Stickstoff durchgeführt. Dabei erfolgte die Messung der Inkorporation von  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff in die NP- (nichtproteinogene/Aminosäure-) bzw. PN- (proteinogene/Protein-) Fraktion.

500 mg Frischmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff gemörsert. Nach Zugabe von 10 mL 10 %iger TCA (Trichloressigsäure) wurde 2 min mit dem Ultra Turrax T 25 (Jahnke @ Kunkel Labortechnik, Stauffen) homogenisiert. Über Nacht bei 4 °C erfolgte die Fällung der Proteine. Nach 20 min Zentrifugation bei 0 °C und 8000 rpm wurde der Überstand, der die lösliche Aminosäure-Fraktion (NPN-Fraktion) enthielt, in Kjeldahl-Kolben überführt. Das Pellet (Protein-Fraktion – PN-Fraktion) wurde zweimal mit 5 mL 0,5 %iger TCA gewaschen und 5 min zentrifugiert. Danach wurde es in 3 mL  $\text{H}_2\text{O}$  (bidest.) aufgenommen und in Kjeldahl-Kolben überführt. Die Proben wurden nach Zugabe von Siedesteinen, dem Katalysator Selen und 2 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  unter Wärmezufuhr aufgeschlossen bis die Lösungen klar wurden. Die Aufschlüsse wurden anschließend 1 Stunde gekocht und nach Abkühlen mit 5-10 mL  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt. Die entstandenen  $(^{15}\text{NH}_4)\text{SO}_4$ -Lösungen wurden mit einer modifizierten Mikro-Kjeldahl-Apparatur nach Faust (1981) destilliert. Der Stickstoff-Gehalt wurde durch Titration gegen 0,02 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Standard bestimmt und die Proben bis zur Trockne eingedampft.

Für die emissionspektrometrische Bestimmung des  $^{15}\text{N}$ -Isotopes in beiden Fraktionen wurde das  $^{15}\text{N}$ -Analysensystem NOI-7 (FAN - Fischer Analyseninstrumente, Leipzig) verwendet. Die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit ( $^{15}\text{N}$  at.-%) wurde gemessen und die  $^{15}\text{N}$ -Überschuß-Häufigkeit ( $^{15}\text{N}$  at.-% exc.) durch Subtraktion der natürlichen  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit von 0,37 at.-% kalkuliert.

## 2. 4 Beschreibung der Laborexperimente

### 2. 4. 1 Schwermetall-Akkumulation von *Fontinalis antipyretica*/*Fontinalis dalecarlica*

Zur Untersuchung der Schwermetall-Akkumulation durch *Fontinalis antipyretica* wurden Cd(II), Pb(II) und Zn(II) als Chlorid-Salze eingesetzt. Es wurden Kurz- und Langzeitmessungen zur Biosorption an die Blattoberfläche und Anreicherung im Zellinneren durchgeführt (Kap. 2. 3. 1). Tab. 4 zeigt die eingesetzten Konzentrationen der Metallionen und deren Mengen in 100 mL Knop-Medium.

**Tab. 4.** Schwermetall-Konzentrationen für die Schwermetallakkumulation von *Fontinalis antipyretica*.

Cd(II)		Pb(II)		Zn(II)	
c	c <sub>100 mL Knop</sub>	c	c <sub>100 mL Knop</sub>	c	c <sub>100 mL Knop</sub>
[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]
25	2,5	25	2,5	25	2,5
100	10	100	10	100	10
200	20	500	50	500	50
400	40				

Mit den verschiedenen Ansätzen sollten Abhängigkeiten der Schwermetall-Akkumulation von der Konzentration und Art des Schwermetalls untersucht werden.

Vergleichende Untersuchungen erfolgten weiterhin mit unterschiedlichen Arten der Gattung *Fontinalis*. Zum einen wurde *Fontinalis antipyretica* der Helbe bzw. Wipper herangezogen. Zum anderen wurde *Fontinalis dalecarlica* aus dem Fließgewässer Allen Creek (Westpoint, Sackville) ausgewählt. Beide Arten unterscheiden sich im Blatthabitus (Kap. 4. 1. 3), was sich in Unterschieden der Akkumulationskapazität von Schwermetallen zeigen könnte. Für diese Arbeiten wurde Cd(II) der Konzentrationen 25, 100 und 200  $\mu$ M herangezogen.

Zur Untersuchung einer möglichen Depotfunktion der Zellwand von *Fontinalis antipyretica* wurde die Cd(II)-Akkumulation nach Absetzen der Cd(II)-Belastung untersucht. Das Moos (Standort: Helbe) wurde zunächst 2 h mit 100  $\mu$ M Cd(II) exponiert. Nach Austausch des Cd(II)-haltigen gegen Cd(II)-freies Knop-Medium wurden intra- und extrazellulärer Cd(II)-Gehalt und der Cd(II)-Gehalt des Mediums bestimmt.

Bei diesen Versuchen wurde viel Pflanzenmaterial benötigt - pro Messpunkt 1 g Frischmasse.

Um die Art am Standort zu erhalten, wurde - zur Einsparung von Moosmaterial - die

Standardabweichung zu Lasten einer umfassenden Statistik von jeweils nur zwei Messpunkten einer Reihe mit  $n = 5$  bestimmt. Jede Messreihe wurde jedoch zur Festigung der Ergebnisse mindestens 2mal durchgeführt. Für Signifikanzanalysen musste deshalb für jeden Wert einer Messreihe dieselbe relative Standardabweichung angenommen werden. Die Standardabweichungen der Schwermetallbestimmungen mit AAS sind im Anhang B – Standardabweichungen dargestellt.

Bei allen Versuchen wurde zusätzlich der GSH-Gehalt mittels enzymatischer Bestimmung gemessen (Kap. 2. 3. 2).

#### **2. 4. 2 Vitalitätsuntersuchungen an *Fontinalis antipyretica***

Die Bestimmung der Vitalität, d. h. des Einflusses auf das PS II von *Fontinalis antipyretica* aus der Helbe erfolgte wie unter Kap. 2. 3. 3 beschrieben für jede Schwermetall-Konzentration (Kap. 2. 4. 1). Zusätzlich wurde die Belastung mit  $50 \mu\text{M}$  Cd(II), Pb(II) und Zn(II) untersucht. Weitere Messungen der Vitalität wurden bei den Versuchen der Wirkung von Organika (Kap. 2. 4. 6) und des Einflusses der Schwefelernährung bei Cd(II)-Belastung des Moores aus der Helbe (Kap. 2. 4. 3 ) durchgeführt.

Für die Versuche wurden ca. 3 g Moosspitzen in 300 mL Knop-Medium inkubiert und jeden Tag je 5 Spitzen vermessen.

#### **2. 4. 3 Einfluss von Cd(II) auf den Schwefelmetabolismus von *Fontinalis antipyretica***

##### ***Einfluss der Versorgung mit Sulfat bei Cd(II)-Belastung von *Fontinalis antipyretica****

Für diese Untersuchungen wurde 5 g Moosmaterial aus der Wipper erst 3 Tage bei  $10^\circ\text{C}$  in 500 mL Knop-Medium mit  $100 \mu\text{M}$  Sulfat/ohne Cd(II) und dann 1 Tag in Nährmedium ohne Sulfat akklimatisiert. Dann wurden folgende Reihen angesetzt:

- A  $0 \mu\text{M SO}_4 / 0 \mu\text{M Cd(II)}$
- B  $500 \mu\text{M SO}_4 / 0 \mu\text{M Cd(II)}$
- C  $0 \mu\text{M SO}_4 / 200 \mu\text{M Cd(II)}$
- D  $500 \mu\text{M SO}_4 / 200 \mu\text{M Cd(II)}$ , wobei Sulfat als  $\text{KHSO}_4$  eingesetzt wurde.

Fehlendes  $\text{Mg}^{2+}$  im Knop-Medium wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge an  $\text{MgCl}_2$  ersetzt.



Der natürliche Sulfat-Gehalt der Wipper lag zwischen 600 und 800  $\mu\text{M}$ , der der Helbe bei 500  $\mu\text{M}$ . Für alle Versuche in diesem Kapitel wurde eine Sulfat-Konzentration im Medium von 500  $\mu\text{M}$  ausgewählt.

Innerhalb von 14 Tagen wurden in regelmäßigen Abständen Proben von Medium und Moos genommen und der Sulfatgehalt von Medium und Moos (Kap. 2. 3. 4) und der Thiolgehalt des Mooses mittels Biman-Derivatisierung (Kap. 2. 3. 2) untersucht. Da die Standardabweichung jeder Messreihe von jeweils nur einem Punkt mit  $n = 5$  bestimmt wurde, musste bei Signifikanzanalysen für jeden Wert der Reihe dieselbe relative Standardabweichung angenommen werden.

Weiterhin wurde die Cd(II)-Akkumulation von Reihe C und D untersucht. Hierzu wurden pro Messpunkt 1 g Moos aus der Wipper 4 Tage in 100 mL Medium ohne Sulfat/Cd(II) akklimatisiert und dann Sulfat und Cd(II) der entsprechenden Menge gleichzeitig zugegeben. Wie in Kap. 2. 3. 1 beschrieben erfolgte die Messung der Cd(II)-Akkumulation über 14 Tage. Zu einem Messpunkt wurde eine Kontrolle ohne Cd(II) und Sulfat mitgeführt.

Letztlich wurde der Einfluss der Schwefelernährung auf die Vitalität des Mooses bei Cd(II)-Belastung untersucht (Kap. 2. 3. 3). Dazu wurde *Fontinalis antipyretica* 4 Tage mit 0, 50, 100, 250 und 500  $\mu\text{M}$  Sulfat (als  $\text{KHSO}_4$ ) bei 10 °C kultiviert. Dann wurden jeweils 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) zugegeben und die Vitalität über 10 Tage bestimmt.

### ***Effekte der Cd(II)-Belastung nach Schwefelmangel***

In einem ersten Versuch wurde Pflanzenmaterial aus der Helbe 38 Tage ohne Sulfat im Nährmedium inkubiert. Fehlendes  $\text{Mg}^{2+}$  im Knop-Medium wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge an  $\text{MgCl}_2$  ersetzt. Regelmäßig wurden Proben genommen und die GSH- und Sulfat-Konzentration dokumentiert (Kap. 2. 3. 2 und 2. 3. 4). Dann erfolgte eine Umsetzung des Moosmaterials auf folgende Bedingungen:

- A 0  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4$  / 0  $\mu\text{M}$  Cd(II)
- B 500  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4$  / 0  $\mu\text{M}$  Cd(II)
- C 0  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4$  / 100  $\mu\text{M}$  Cd(II)
- D 500  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4$  / 100  $\mu\text{M}$  Cd(II), wobei Sulfat als  $\text{KHSO}_4$  eingesetzt wurde.

Cd(II) und Sulfat wurden gleichzeitig zugegeben. Innerhalb von 22 Tagen wurden der Sulfat-Gehalt von Medium und Moos (Kap. 2. 3. 4) und der Thiol-Gehalt des Mooses mittels Biman-

Derivatisierung (Kap. 2. 3. 2) untersucht. Zusätzlich erfolgte die Messung der Vitalität des Mooses über 10 Tage (Kap. 2. 3. 3).

In einem zweiten Versuch wurde *Fontinalis antipyretica* aus der Helbe nach 45 Tagen Sulfatmangel auf die Reihen A-D umgesetzt, wobei jedoch erst Sulfat zugegeben und einen Tag später mit Cd(II) exponiert wurde. Dies sollte dem Moos eine Anpassung des S-Metabolismus vor einer Cd(II)-Belastung ermöglichen. Über 10 Tage wurden Sulfat- und GSH-Gehalt des Mooses (Kap. 2. 3. 4 und 2. 3. 2) und die Vitalität (Kap. 2. 3. 3) bestimmt.

#### **2. 4. 4 Kompartimentierung von Cd(II) in *Fontinalis antipyretica***

Zur Untersuchung der Lokalisation von Cd(II) in den Zellen von *Fontinalis antipyretica* wurde Pflanzenmaterial aus der Helbe 4 Tage mit 100 µM Cd(II) inkubiert, eine Kontrolle ohne Cd(II) wurde mitgeführt. Die Zellen der Blätter wurden entsprechend Kap. 2. 3. 5 analysiert.

Weiterhin wurde der Einfluss der Organika CDNB (Chlor-2,4-dinitrobenzol) und NEM (N-Ethylmaleinimid) auf die Aufnahme und den intrazellulären Transport von Cd(II) untersucht. Dazu wurde nach 3tägiger Inkubation mit je 100 µM der organischen Substanz für 3 Tage mit 100 µM Cd(II) belastet und die Proben elektronenmikroskopisch untersucht (Kap. 2. 3. 5). Eine Kontrolle wurde mitgeführt.

Schließlich wurden Effekte von Vanadat auf die Akkumulation von Cd(II) in *Fontinalis antipyretica* vermessen. Pflanzenmaterial wurde einen Tag mit 1 mM NaO<sub>3</sub>V kultiviert, dann wurde 2 Tage mit 100 µM Cd(II) exponiert und die Lokalisation von Cd(II) im Zellinneren bestimmt.

#### **2. 4. 5 <sup>15</sup>N-Inkorporation in *Fontinalis antipyretica* nach Exposition mit Schwermetallen**

Es wurde ca. 2 g Pflanzenmaterial aus der Helbe mit 200 mL Knop-Medium bei 10 °C für 2-4 Tage vorkultiviert. Nach Umsetzen auf Knop-Nährlösung, bei der KNO<sub>3</sub> durch K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> (95 at.-%) ersetzt wurde, erfolgte die Exposition mit den Schwermetallen Cd(II), Pb(II) und Zn(II). Das Moos wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet.

Zum einen wurden Versuche mit 25, 50 und 200 µM Cd(II) über 10 Tage durchgeführt, um die Kinetik der <sup>15</sup>N-Inkorporation in Aminosäuren (NPN-Fraktion) und Proteine (PN-Fraktion) bestimmen zu können. Die Konzentrationsabhängigkeit der <sup>15</sup>N-Häufigkeit im Moos wurde mit 25, 50, 100 und 400 µM Cd(II) nach 5tägiger Exposition gemessen. Vergleichende Untersuchungen wurden mit 100 und 500 µM Pb(II) und Zn(II) durchgeführt.

Bei allen Versuchen wurde eine Kontrolle ohne Schwermetall mitgeführt. Die  $^{15}\text{N}$ -Isotopenanalyse erfolgte wie unter Kap. 2. 3. 6 beschrieben.

#### **2. 4. 6 Glutathiongehalt, Cd(II)-Akkumulation und Vitalität von *Fontinalis antipyretica* bei gleichzeitiger Belastung mit Organika**

Frisches Pflanzenmaterial aus der Helbe wurde 3 Tage mit 100  $\mu\text{M}$  CDNB, NEM und Metolachlor inkubiert. Dann wurde das Medium entweder erneuert (CDNB 1, NEM 1, Metola 1) oder die Substanzen für den weiteren Verlauf im Medium belassen (CDNB 2, NEM 2, Metola 2). 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) wurden zugegeben und die Cd(II)-Akkumulation (Kap. 2. 3. 1) und der GSH-Gehalt mittels Glutathion-Reduktase (Kap. 2. 3. 2) bestimmt. Es wurden eine Kontrolle (ohne Cd(II)/Organika) und eine nur mit Cd(II) belastete Probe mitgeführt.

Vitalitätsuntersuchungen (Kap. 2. 3. 3) wurden zum einen mit je 50  $\mu\text{M}$  CDNB und NEM und Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) nach obiger Beschreibung ohne Austausch des Nährmediums durchgeführt. Aufgrund sehr starker Schädigungen des Moores bei diesen Konzentrationen wurde die Bestimmung der Vitalität mit eintägiger Exposition mit je 10  $\mu\text{M}$  CDNB bzw. NEM und folgender Belastung mit 50  $\mu\text{M}$  Cd(II) wiederholt. Weiterhin wurde die Wirkung von 25 und 50  $\mu\text{M}$  Metolachlor und Cd(II)-Exposition (50  $\mu\text{M}$ ) untersucht. Bei allen Versuchen wurden Kontrollen (ohne Cd(II)/Organika, nur Cd(II), nur organische Substanz) mitgeführt.

#### **2. 5 Statistische Auswertung von Ergebnissen**

Die Bestimmung der Standardabweichungen erfolgte mittels Nutzung einer computergestützten Tabellenkalkulation (MS Excel 6.0).

Die Korrelation zwischen zwei Zeitreihen wurde durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten  $r$  mittels MS Excel 6.0 bestimmt, wobei das Pflanzenmaterial jeweils einer Reihe Homogenität aufwies. Je näher  $r$  an  $\pm 1$  liegt, desto straffer ist der Zusammenhang zwischen zwei Zeitreihen (Doerffel, 1990).  $r = +1$  bedeutet einen straffen gleichsinnigen Zusammenhang,  $r = -1$  eine straffe, jedoch gegensinnige Korrelation. Die Korrelation zwischen zwei Reihen ist erst dann nachgewiesen, wenn sich der Korrelationskoeffizient  $r$  gesichert von Null unterscheidet. Daraus ergeben sich Grenzwerte  $r(p, f)$  zur Prüfung des errechneten Korrelationskoeffizienten auf lineare Abhängigkeit zweier

Größen (Doerffel, 1990). Die Wahrscheinlichkeit  $p$  wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Die Anzahl der Freiheitsgrade ergab sich aus  $f = m - 2$ , wobei  $m$  die Anzahl der Wertepaare darstellt.

Zur Ermittlung von signifikanten Unterschieden zwischen zwei Messwerten erfolgte ein Vergleich der Mittelwerte durch den t-Test (Doerffel, 1990). Vor der Durchführung dieses Prüfverfahrens mussten die Standardabweichungen  $s_1$  und  $s_2$  auf einen signifikanten Unterschied untersucht werden (F-Test).

F-Test: 
$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$
 wobei  $s_1 > s_2$

Bei  $F < F(p, f_1, f_2)$ , wobei die Wahrscheinlichkeit  $p$  auf  $p < 0,05$  und die Anzahl der Freiheitsgrade durch  $f = n - 1$  ( $n$  – Anzahl der Messungen) festgelegt wurde, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Standardabweichungen und der t-Test kann durchgeführt werden (Doerffel, 1990).

t-Test: 
$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2 f_1 + s_2^2 f_2}{f_1 + f_2}}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

Erhält man  $t > t(p, f_g)$ , wobei die Wahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  und die Anzahl der Freiheitsgrade  $f_g = n_1 + n_2 - 2$ , ist der Unterschied zwischen den zu vergleichenden Werten signifikant, bei  $t < t(p, f_g)$  ist die Differenz nicht signifikant. Die Grenzen für  $F(p, f_1, f_2)$  und  $t(p, f_g)$  wurden Doerffel (1990) entnommen.

## 3 Ergebnisse

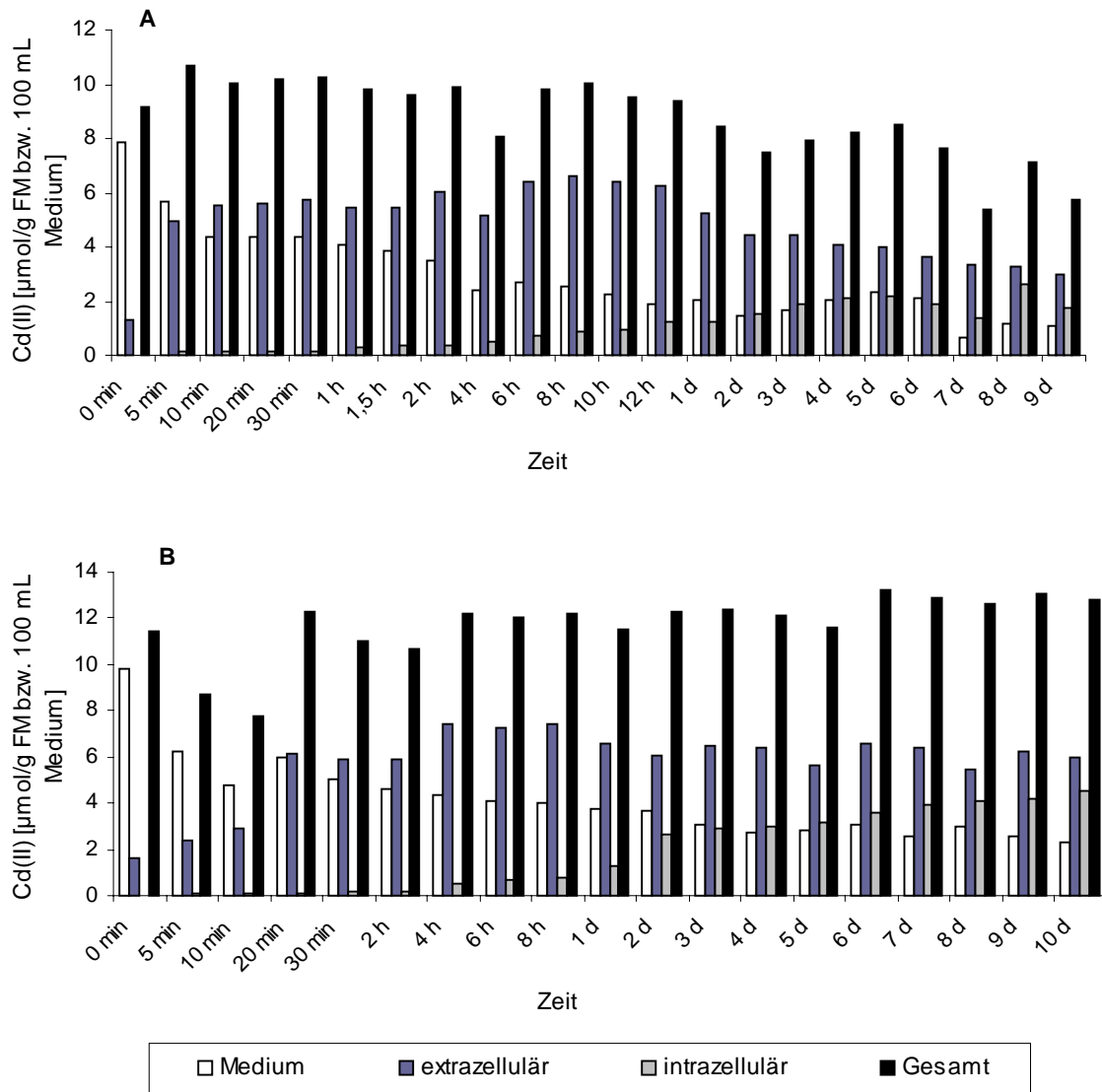
### 3. 1 Akkumulation von Schwermetallen durch *Fontinalis antipyretica* – Einfluss auf den zellulären GSH-Gehalt

#### 3. 1. 1 Cd(II)-Akkumulation durch *Fontinalis antipyretica*

Zur Untersuchung der Cd(II)-Akkumulation durch *Fontinalis antipyretica* wurden Kurz- und Langzeitmessungen von extra- und intrazellulärer Cd(II)-Fraktion durchgeführt (Kap. 2. 3. 1 / 2. 4. 1). Um Aussagen über die Abhängigkeit der Akkumulationskapazität des Mooses von der Schwermetallkonzentration zu erhalten, wurden 25, 100, 200 und 400  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  verwendet.

In Abb. 11 ist die Cd(II)-Akkumulation von *Fontinalis antipyretica* nach Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Cd (10  $\mu\text{mol}$  absolut) dargestellt. Bei den Pflanzen beider Standorte kam es in den ersten 20 Minuten zu einer schnellen Adsorption des Schwermetalls an die Blattoberfläche, der extrazelluläre Cd(II)-Gehalt betrug 5,6  $\mu\text{mol/g}$  FM (Wipper) bzw. 6,2  $\mu\text{mol/g}$  FM (Helbe). Bei Moos vom Standort A stieg diese Fraktion innerhalb der folgenden 2 Stunden signifikant bis auf 6,1  $\mu\text{mol/g}$  FM an. Das Material von Standort B zeigte eine signifikante Zunahme des biosorbierten Cd(II) auf 7,4  $\mu\text{mol/g}$  FM innerhalb von 4 Stunden. Im Versuchsverlauf von 9 (A) bzw. 10 (B) Tagen nahm der extrazelluläre Cd(II)-Gehalt wieder signifikant auf 3,0  $\mu\text{mol/g}$  FM (A) bzw. 6,0  $\mu\text{mol/g}$  FM (B) ab. Zwischen dem Verlauf der extrazellulären Adsorption von Reihe A und B konnte keine Korrelation festgestellt werden ( $r = 0,40$ ).

Die intrazelluläre Anreicherung von Cd(II) erfolgte bei beiden Moosen langsamer als die Biosorption, jedoch kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum hinweg. Zum Versuchsende waren 1,7  $\mu\text{mol}$  Cd(II)/g FM (A) bzw. 4,5  $\mu\text{mol}$  Cd(II)/g FM (B) akkumuliert. Beide Reihen korrelierten nicht in bezug auf den Verlauf der Aufnahme von Cd(II), der Korrelationskoeffizient  $r$  lag bei 0,47 .

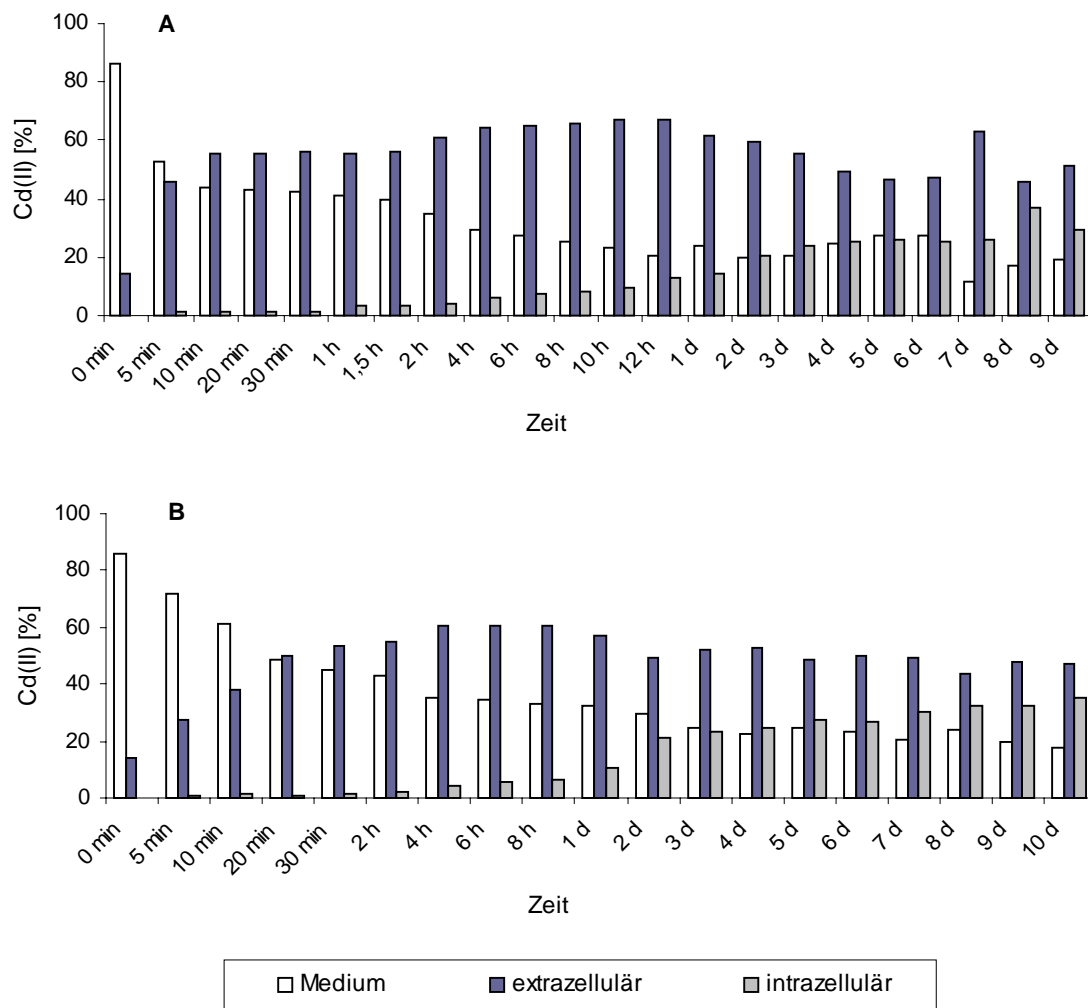


**Abb. 11.** Cd(II)-Akkumulation von *Fontinalis antipyretica* nach Belastung mit  $100 \mu\text{M}$  Cd(II) ( $10 \mu\text{mol}$  absolut). **A** Standort Wipper, **B** Standort Helbe. (Standardabweichungen in Anhang B, Tab. 1)

Die Wiederfindung von Cd(II) lag bei den Proben von Standort A (Wipper) im Mittel bei 87 % des zugegebenen Cd(II). Bei diesen Proben wurde vor dem Waschen mit  $\text{NiCl}_2$  eine Probe für die GSH-Bestimmung abgenommen (ca. 200 mg), was diese geringe Wiederfindung erklärt. Bei weiteren Versuchen erfolgte deshalb die Entnahme von Moosmaterial für die GSH-Messung erst nach dem Waschen mit  $\text{NiCl}_2$ . Die Wiederfindung von Cd(II) bei Untersuchung von Standort B (Helbe) lag im Durchschnitt bei 117 % des addierten Cd(II).

Aufgrund dieser zum Teil sehr differenten Wiederfindungen von Cd(II) erwies sich eine prozentuale Darstellung der Cd(II)-Akkumulation zum Vergleich verschiedener Standorte, aber auch verschiedener Cd(II)-Konzentrationen als besser geeignet als die Darstellung von

Absolutwerten (Abb. 11). Abb. 12 zeigt die der Abb. 11 entsprechenden Versuche in dieser Darstellungsweise, wobei Cd(II) in % des insgesamt wiedergefundenen Cd(II) dargestellt wird. Diese Einheit gilt für alle Abbildungen in denen Schwermetalle in [%] dargestellt werden.



**Abb. 12.** Cd(II)-Akkumulation von *Fontinalis antipyretica* nach Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) (10  $\mu\text{mol}$  absolut). **A** Standort Wipper, **B** Standort Helbe. (Standardabweichungen Anhang B, Tab. 2)

Auch in dieser Darstellungsweise kann man die schnelle Biosorption des Schwermetalls an die Blattoberfläche erkennen, die leichte Abnahme dieser Fraktion bis zum Versuchsende und die gleichmäßige Aufnahme in das Zellinnere. Die aufgrund der unterschiedlichen Wiederfindung gemessenen Unterschiede in den Absolutwerten an extra- und intrazellulärem Cd(II)-Gehalt zwischen Helbe und Wipper (Abb. 11) wurden durch Darstellung von [%] des wiedergefundenen Cd(II) deutlich geringer. Nach 20 min waren bei dem Moos aus der Wipper 55 % biosorbiert, beim Helbematerial 50 % des wiedergefundenen Cd(II). Innerhalb

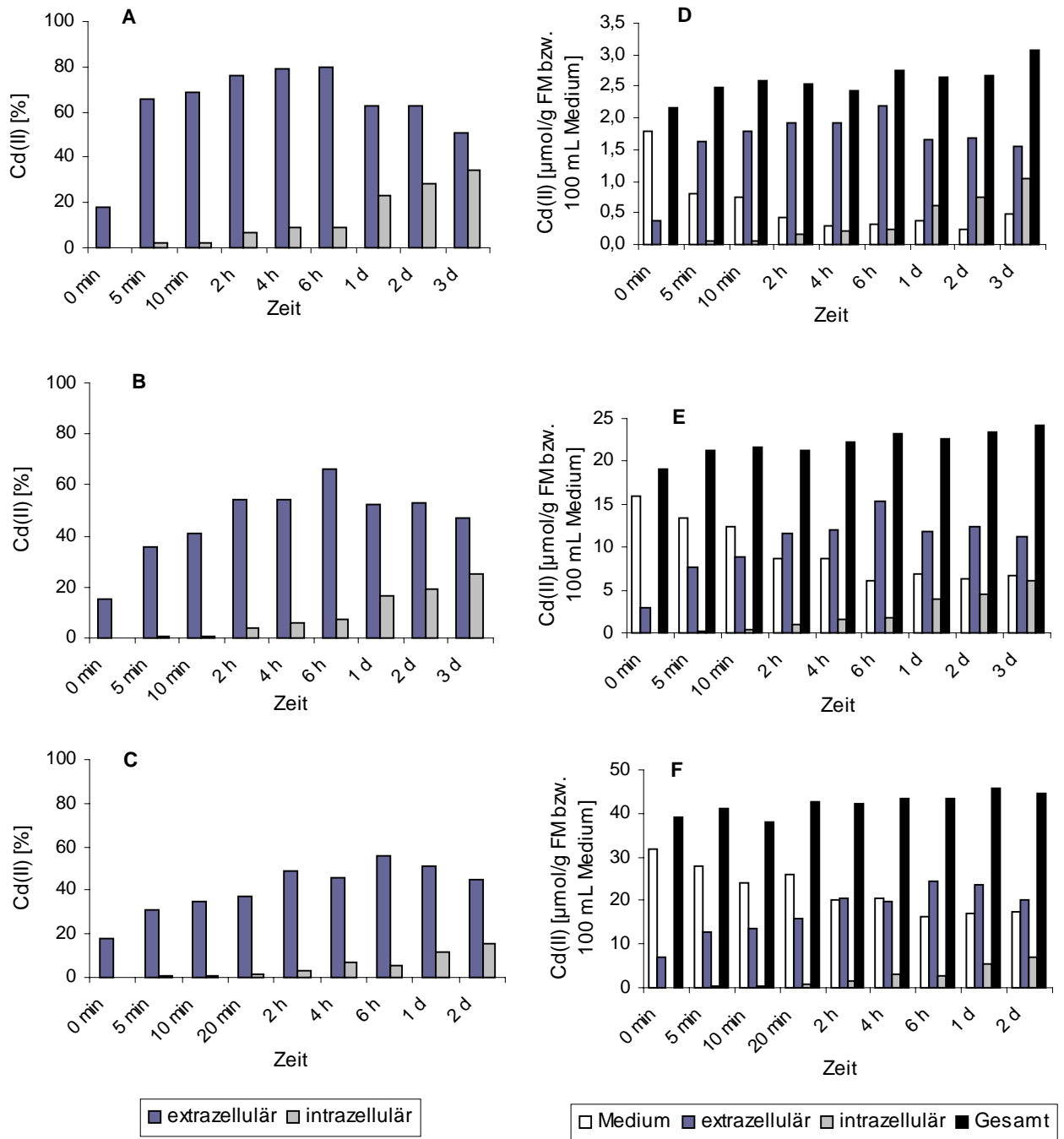
von 4 Stunden stiegen diese Werte signifikant auf 64 % (A) bzw. 61 % (B). Am Ende der Untersuchung betrug der Cd(II)-Gehalt der extrazellulären Fraktion 51 % (A) bzw. 47 % (B), der der intrazellulären 30 % (A) bzw. 35 % (B) des wiedergefundenen Cd(II). Hier wurde bei extra- und intrazellulärer Fraktion eine Korrelation zwischen den Reihen A und B festgestellt. Die Korrelationskoeffizienten betragen  $r_{\text{extra}} = 0,86$  und  $r_{\text{intra}} = 0,99$ .

Die Abhängigkeit der Cd(II)-Akkumulation von der Konzentration des Schwermetalls wurde durch Bestimmung von Biosorption und Aufnahme bei Belastung mit 25, 200 und 400  $\mu\text{M}$  Cd(II) untersucht. In Abb. 13 ist die Cd(II)-Akkumulation durch *Fontinalis antipyretica* aus der Helbe bei den verschiedenen Cd(II)-Konzentrationen über einen Versuchszeitraum von 3 Tagen dargestellt. Bei allen Konzentrationen kam es zu der bereits beschriebenen schnellen Biosorption von Cd(II) an die Moosoberfläche, nach 2 Stunden betrug der extrazelluläre Cd(II)-Gehalt 76 %, 54 % bzw. 49 % des wiedergefundenen Cd(II) bei Belastung mit 25  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  bzw. 400  $\mu\text{M}$  Cd(II). Bei 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) lag dieser Wert bei 55 %. Die entsprechenden Absolutwerte sind 1,9  $\mu\text{mol/g FM}$  (25  $\mu\text{M}$  Cd(II)), 5,9  $\mu\text{mol/g FM}$  (100  $\mu\text{M}$  Cd(II)), 11,5  $\mu\text{mol/g FM}$  (200  $\mu\text{M}$  Cd(II)) bzw. 20,6  $\mu\text{mol/g FM}$  (400  $\mu\text{M}$  Cd(II)).

Die Aufnahme ins Zellinnere des Moores verlief wie bei der Exposition mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) langsamer, jedoch kontinuierlich. Nach zweitägiger Belastung mit 25  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  bzw. 400  $\mu\text{M}$  Cd(II) waren 28 % (0,8  $\mu\text{mol Cd(II)/g FM}$ ), 21 % (2,6  $\mu\text{mol Cd(II)/g FM}$ ), 19 % (4,5  $\mu\text{mol Cd(II)/g FM}$ ) bzw. 15 % (7,0  $\mu\text{mol Cd(II)/g FM}$ ) intrazellulär zu finden. Der Gehalt von Cd(II) im Nährmedium nahm über den gesamten Versuchszeitraum ab.

*Fontinalis antipyretica* aus der Wipper reagierte bei Belastung mit verschiedenen Konzentrationen an Cd(II) in Verlauf der Cd(II)-Akkumulation und Größe der extra- und intrazellulären Fraktion ähnlich dem Material aus der Helbe (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 1). Es wurde bei Belastung mit 25  $\mu\text{M}$  Cd(II) bei Angabe der Ergebnisse in [% des insgesamt wiedergefundenen Cd(II)] eine Korrelation zwischen beiden Reihen (Wipper und Helbe) für die extra- und intrazelluläre Fraktion festgestellt ( $r_{\text{extra}} = 0,98$ ,  $r_{\text{intra}} = 0,99$ ). Gleiches gilt für die Exposition mit 200  $\mu\text{M}$  Cd(II) ( $r_{\text{extra}} = 0,97$ ,  $r_{\text{intra}} = 0,97$ ). Bei dem Vergleich der Absolutmengen von Cd(II) [ $\mu\text{mol/g FM}$ ] wurde für alle Reihen, bis auf die intrazelluläre Fraktion bei Belastung mit 25  $\mu\text{M}$  Cd(II), eine Korrelation zwischen A und B ermittelt.

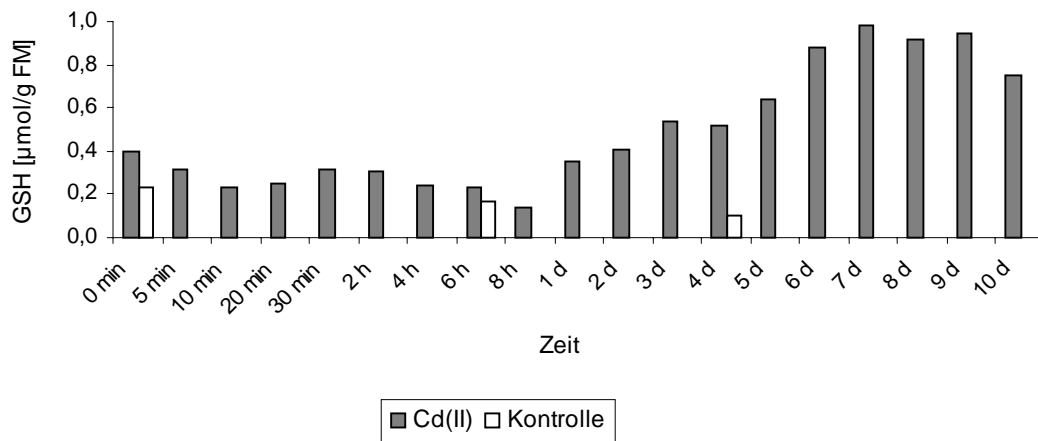




**Abb. 13.** Cd(II)-Akkumulation von *Fontinalis antipyretica* (Helbe) bei Exposition mit verschiedenen Cd(II)-Konzentrationen. **A, D** 25 µM Cd(II), **B, E** 200 µM Cd(II), **C, F** 400 µM Cd(II). (Standardabweichungen Anhang B, Tab. 3)

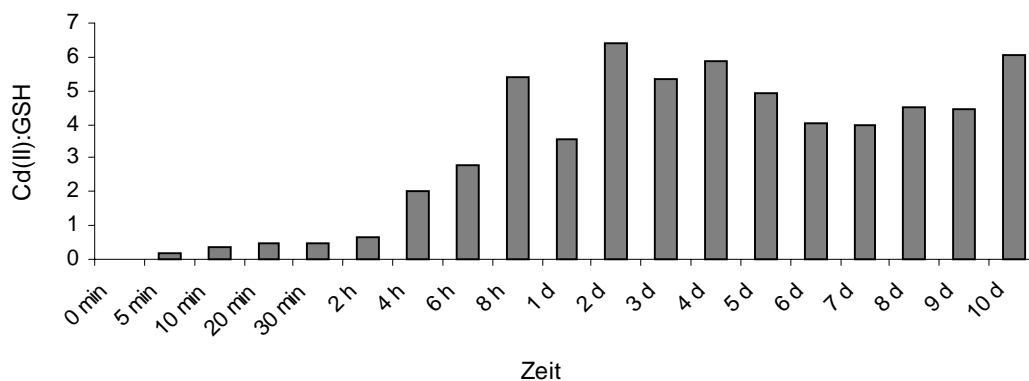
Frühere Untersuchungen von Bruns und Krauss (1999) zeigten einen von der Konzentration des Schwermetalls abhängigen Anstieg des GSH-Pooles bei Belastung mit Cd(II), der auch bei diesen Versuchen bei allen Cd(II)-Konzentrationen gemessen werden konnte.

Abb. 14 zeigt den GSH-Gehalt von *Fontinalis antipyretica* aus der Helbe nach Belastung mit 100 µM Cd(II).



**Abb. 14.** GSH-Gehalt in *Fontinalis antipyretica* (Helbe) nach Belastung mit 100 µM Cd(II). Standardabweichung: 2 d: 0,027 (8,2 %), 8 d: 0,127 (16,3 %)

Nach 3 Tagen stieg der GSH-Gehalt der Cd(II)-belasteten Probe signifikant an und erreichte am 7. Tag ein Maximum mit 0,98 µmol/g FM. Das entsprach dem 2,5fachen des Ausgangsgehaltes an GSH. Für einen Vergleich von intrazellulärer Cd(II)-Fraktion mit dem GSH-Pool wurden die Verhältnisse von Cd(II)-Konzentration zu GSH-Konzentration der Pflanzenzellen berechnet (Cd(II):GSH) (Abb. 15). Werte kleiner als 1 bedeuten einen höheren GSH-Gehalt verglichen mit Cd(II), Werte größer als 1 eine deutlich größere intrazelluläre Cd(II)- als GSH-Konzentration. Nach 4 Stunden der Belastung mit 100 µM Cd(II) betrug das Verhältnis 2, d. h. auf 0,24 µmol GSH/g FM kamen 0,48 µmol Cd(II)/g FM. Das Verhältnis stieg innerhalb von 8 Stunden auf 5,4 an und schwankte dann zwischen 3,6 am ersten Tag und 6,0 am 10. Tag. Die Werte zeigen, dass trotz des GSH-Anstieges bei intrazellulärer Anreicherung von Cd(II) die Cd(II)-Konzentration ab 4 Stunden stetig größer war als die Konzentration an GSH.



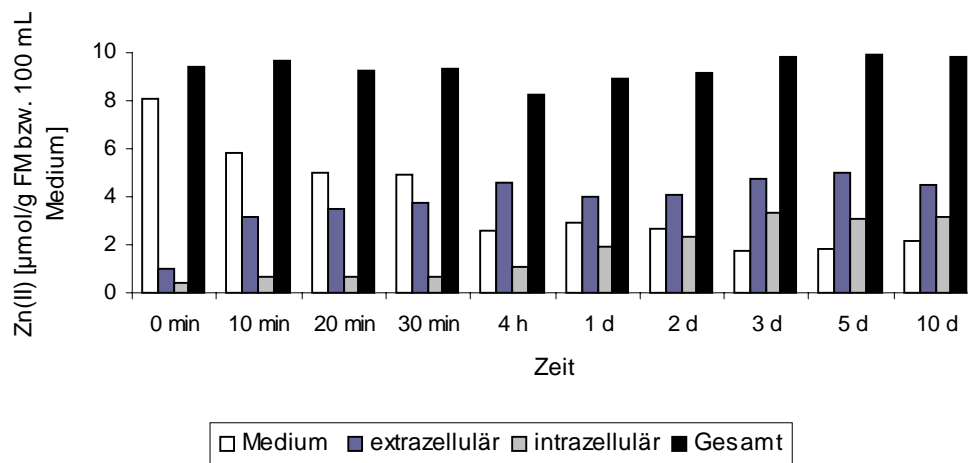
**Abb. 15.** Verhältnis von Cd(II):GSH in *Fontinalis antipyretica* (Helbe) nach Belastung mit 100 µM Cd(II).

### 3. 1. 2 Zn(II)-Akkumulation durch *Fontinalis antipyretica*

Zur Untersuchung der Zn(II)-Aufnahme bzw. –Biosorption wurde Frischmaterial von *Fontinalis antipyretica* aus der Helbe herangezogen und mit 25, 100 und 500  $\mu\text{M}$  Zn(II) exponiert. Es wurden Kurz- und Langzeitmessungen durchgeführt (Kap. 2. 3. 1 / 2. 4. 1).

Die Standardabweichungen für die Zn(II)-Bestimmung aller Akkumulationsversuche sind in Anhang B zu finden. Die Akkumulation bei Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Zn(II) ist in Abb. 16 dargestellt. Ähnlich Cd(II) erfolgte in den ersten Minuten eine schnelle Adsorption des Schwermetalls an die Blattoberfläche. Nach 10 Minuten waren 3,2  $\mu\text{mol}$  Zn(II)/g FM biosorbiert. Diese Fraktion stieg innerhalb der folgenden 4 Stunden signifikant, bis auf 4,6  $\mu\text{mol/g}$  FM an. Über einen Zeitraum von 10 Tagen war keine signifikante Abnahme des extrazellulären Zn(II)-Gehaltes zu verzeichnen. Er schwankte zwischen 4,0  $\mu\text{mol/g}$  FM (1. Tag) und 4,5  $\mu\text{mol/g}$  FM (10. Tag). Der natürliche intrazelluläre Zn(II)-Gehalt der Kontrolle lag bei 0,3  $\mu\text{mol/g}$  FM. Die Aufnahme von Zn(II) erfolgte langsamer als die Biosorption, jedoch gleichmäßig über 10 Tage hinweg. Nach 10 Tagen waren bei Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Zn(II) 3,2  $\mu\text{mol/g}$  FM akkumuliert.

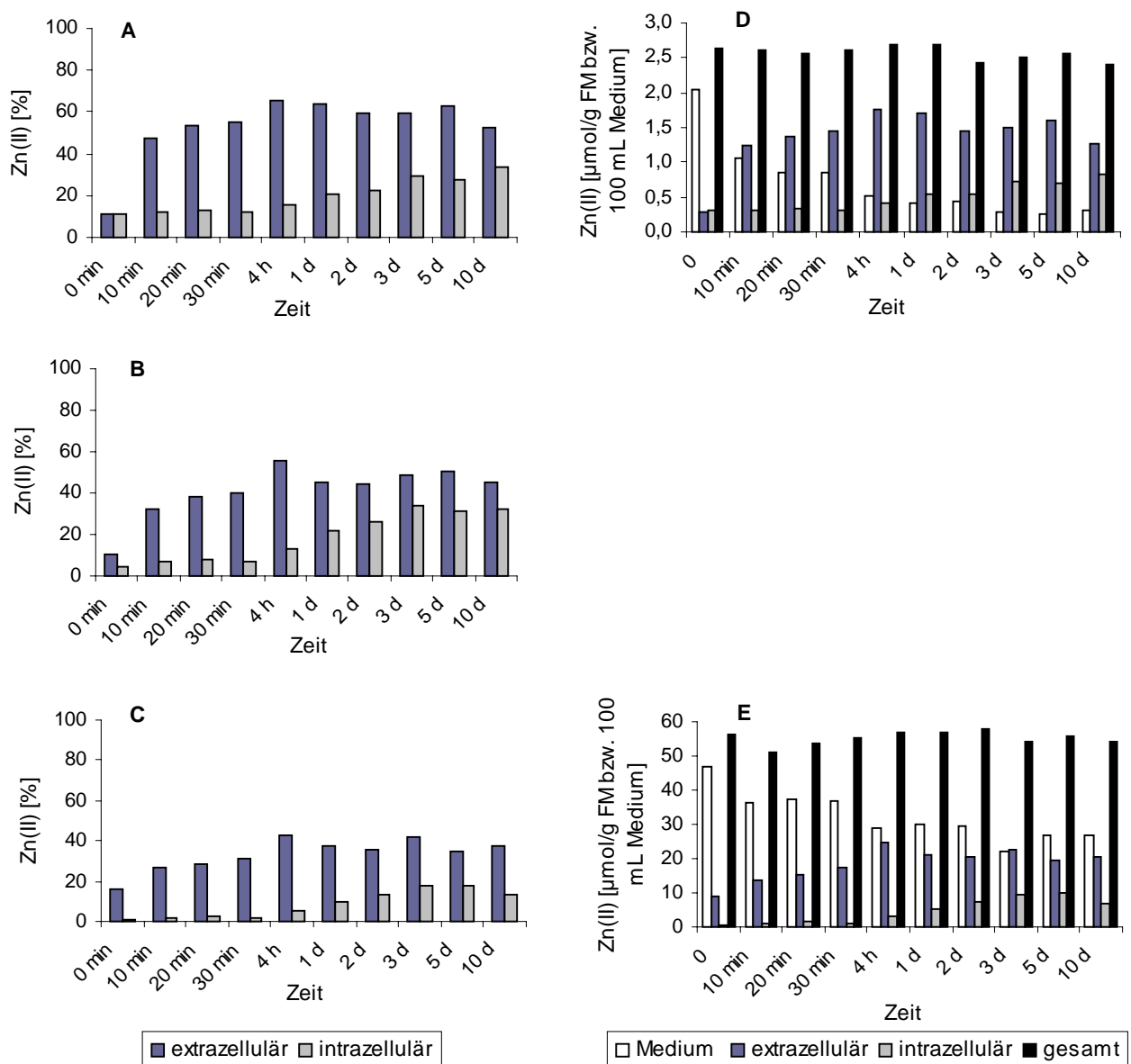
Bei Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Zn(II) lag die Wiederfindung des Elementes zwischen 83 % und 99 % des gesamt zugegebenen Zn(II).



**Abb. 16.** Zn(II)-Akkumulation von *Fontinalis antipyretica* (Helbe) nach Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Zn(II) (10  $\mu\text{mol}$  absolut). (Standardabweichungen siehe Anhang B, Tab. 4)

Die Akkumulation von Zn(II) bei Belastung mit verschiedenen Konzentrationen ist in Abb. 17 dargestellt. Die Wiederfindung des zugegebenen Zn(II) lag im Mittel bei 103 % (25  $\mu\text{M}$ ), 93 % (100  $\mu\text{M}$ ) und 111 % (500  $\mu\text{M}$ ). Bei allen Konzentrationen konnte die schnelle Adsorption des Schwermetalls an die Oberfläche des Mooses beobachtet werden. Nach 10 Minuten waren 47, 33 bzw. 27 % des wiedergefundenen Zn(II) bei Exposition mit 25, 100

bzw. 500  $\mu\text{M}$  Zn(II) biosorbiert. Die entsprechenden Absolutwerte betragen 1,2, 3,2 bzw. 13,8  $\mu\text{mol}$  Zn(II)/g FM. Dieser Anteil stieg innerhalb der folgenden 4 Stunden signifikant auf 68, 56 bzw. 44 % (1,8, 4,6 bzw. 24,5  $\mu\text{mol/g}$  FM). Bei 25 und 500  $\mu\text{M}$  Zn(II) nahm der extrazelluläre Zn(II)-Gehalt im Versuchsverlauf wieder signifikant ab und lag nach 10 Tagen bei 53 % (25  $\mu\text{M}$  Zn(II)) bzw. 37 % (500  $\mu\text{M}$  Zn(II)) des wiedergefundenen Zn(II). Das entsprach 1,3 bzw. 20,3  $\mu\text{mol}$  Zn(II)/g FM. Die intrazelluläre Zn(II)-Fraktion stieg über den gesamten Versuchszeitraum an und erreichte nach 10 Tagen 34 % (0,8  $\mu\text{mol/g}$  FM), 32 % (3,2  $\mu\text{mol/g}$  FM) bzw. 13 % (7,1  $\mu\text{mol/g}$  FM) des wiedergefundenen Zn(II).



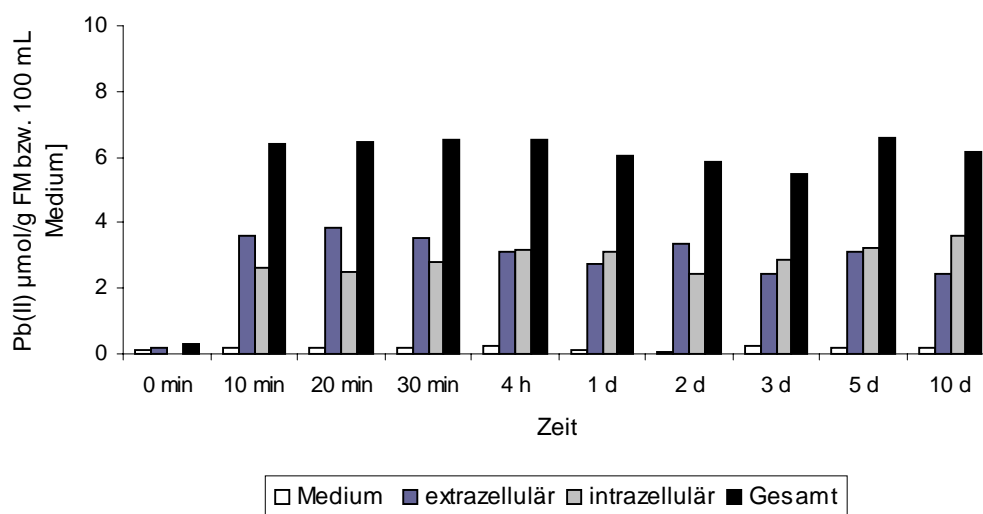
**Abb. 17.** Zn(II)-Akkumulation von *Fontinalis antipyretica* (Helbe) nach Belastung mit verschiedenen Zn(II)-Konzentrationen. **A, D** 25  $\mu\text{M}$  Zn(II), **B** 100  $\mu\text{M}$  Zn(II), **C, E** 500  $\mu\text{M}$  Zn(II). (Standardabweichungen siehe Anhang B, Tab. 4)

Eine Erhöhung des GSH-Gehaltes konnte nur bei Belastung mit 500  $\mu\text{M}$  Zn(II) gemessen werden (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 2). Der GSH-Gehalt stieg signifikant von 0,18  $\mu\text{mol/g}$  FM auf 0,31  $\mu\text{mol/g}$  FM am 2. Tag und erreichte mit 0,41  $\mu\text{mol/g}$  FM am 3. Tag ein Maximum. Bis zum 10. Tag sank er wieder signifikant auf 0,30  $\mu\text{mol/g}$  FM ab.

### 3. 1. 3 Pb(II)-Akkumulation durch *Fontinalis antipyretica*

Die Akkumulationsversuche mit Pb(II) wurden in Kurz- und Langzeitmessungen mit *Fontinalis antipyretica* aus der Helbe durchgeführt (Kap. 2. 3. 1/2. 4. 1). Als Konzentrationen wurden 25, 100 und 500  $\mu\text{M}$  Pb(II) ausgewählt. Die Standardabweichungen der Akkumulation von Pb(II) verschiedener Konzentrationen sind in Anhang B dargestellt.

In Abb. 18 ist die Pb(II)-Akkumulation des Moores nach Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Pb(II) dargestellt. In den ersten Minuten nach Pb(II)-Zugabe kam es zu einer schnellen extrazellulären Adsorption. Nach 10 Minuten lag der Wert dieser Fraktion bei 3,6  $\mu\text{mol/g}$  FM und stieg bis zu 20 Minuten nicht signifikant auf maximale 3,8  $\mu\text{mol/g}$  FM an. Dann kam es bis zum Versuchsende zu einer signifikanten Abnahme des extrazellulären Pb(II)-Gehaltes auf 2,4  $\mu\text{mol/g}$  FM. Die intrazelluläre Anreicherung erfolgte nur geringfügig langsamer. Nach 10 Minuten war schon eine relativ große Menge von 2,6  $\mu\text{mol/g}$  FM Pb(II) aufgenommen. Dieser Wert stieg in den folgenden 10 Tagen nur noch langsam, jedoch signifikant an. Er erreichte nach 4 Stunden 3,2  $\mu\text{mol/g}$  FM und schwankte dann bis zum 10. Tag zwischen minimalen 2,4 und maximalen 3,6  $\mu\text{mol/g}$  FM.



**Abb. 18.** Pb(II)-Akkumulation von *Fontinalis antipyretica* (Helbe) nach Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Pb(II) (10  $\mu\text{mol}$  absolut). (Standardabweichungen siehe Anhang B, Tab. 5)

Die Wiederfindung an Pb(II) zum Zeitpunkt 0 h war mit 3 % des zugegebenen Pb(II) sehr gering. Nach der Zugabe von Pb(II) konnte das Auftreten eines Niederschlages beobachtet werden. Durch die extra- und intrazelluläre Akkumulation von Pb(II) stieg die Wiederfindung im Versuchsverlauf auf 55 – 66 % des zugegebenen Pb(II), erreichte jedoch nicht 100 %. Der Niederschlag in den Kolben verschwand über den gesamten Zeitraum des Experimentes nicht. Einige Pb(II)-Salze, z. B. PbCl<sub>2</sub> oder PbSO<sub>4</sub>, besitzen eine sehr geringe Löslichkeit, so dass in Vorbereitung der Versuche die Konzentrationen der Ionen des Nährmediums berechnet und mit den Löslichkeitsprodukten der entsprechenden Salze verglichen wurden. Jedoch kann in komplexen Lösungen, wie Knop-Medium, die Löslichkeit von Salzen durch die Zugabe gleichioniger Zusätze stark absinken (Holleman und Wiberg, 1985; Otto, 1995). Aufgrund der Zusammensetzung des Mediums könnte z. B. PbCl<sub>2</sub> ausfallen (Kap. 2. 2). Da die ausgefallenen Salze nicht in die Messungen eingingen, dürfte hierin die Ursache für die geringe Wiederfindung liegen.

Um die Abhängigkeit der Pb(II)-Akkumulation von der Schwermetall-Konzentration zu untersuchen, wurden die Konzentrationen 25, 100 und 500 µM Pb(II) verwendet. Abb. 19 zeigt die extra- und intrazelluläre Pb(II)-Akkumulation.

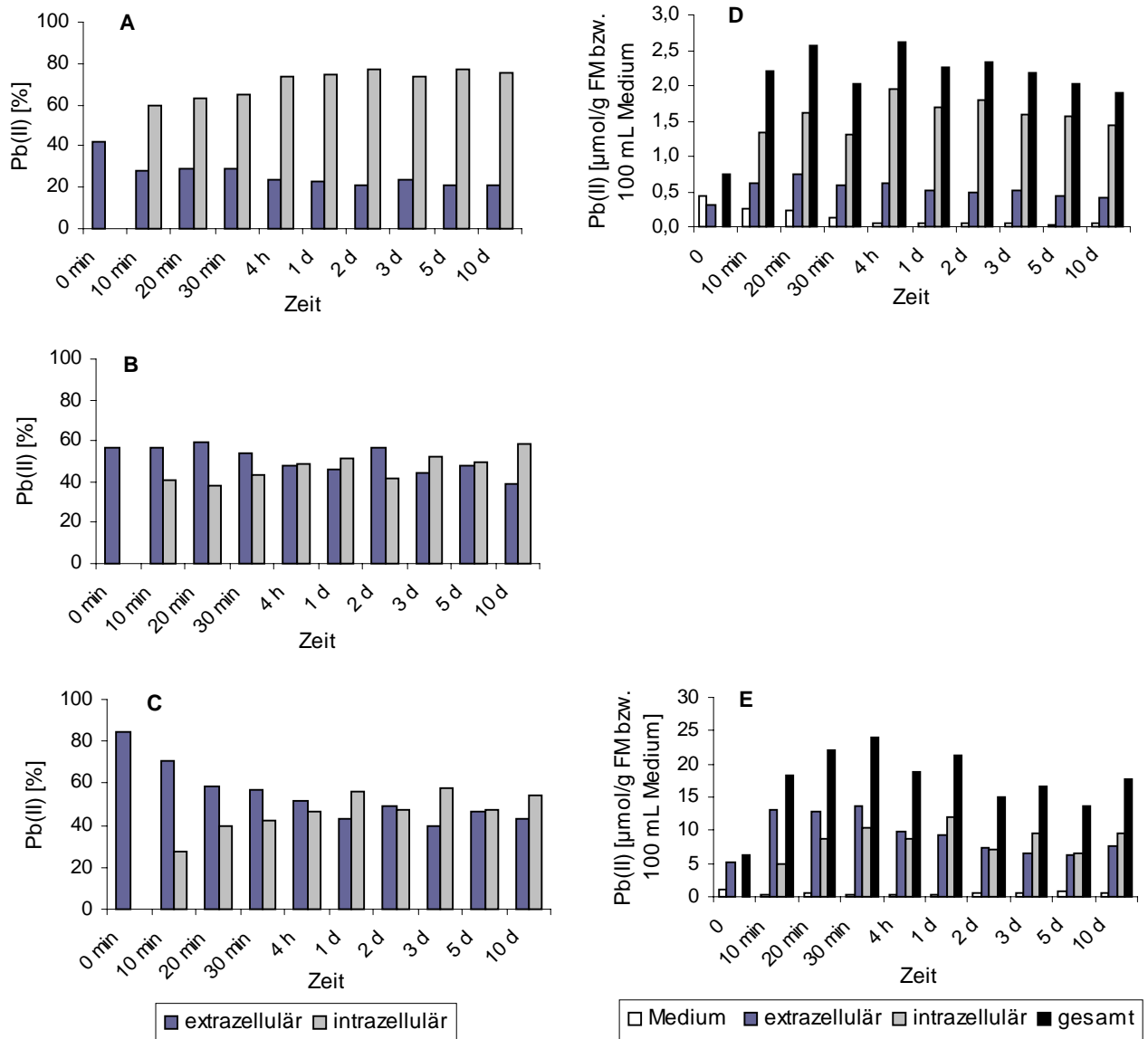
Die Wiederfindung zum Zeitpunkt 0 betrug 30, 3 bzw. 12 % des zugegebenen Pb(II) (25, 100 bzw. 500 µM Pb(II)). Bei allen Konzentrationen wurde das schon beschriebene Auftreten eines Niederschlages beobachtet. Er löste sich bei Belastung mit 25 µM Pb(II) nach wenigen Minuten wieder auf und die Wiederfindung stieg auf ca. 89 % (22 µM). Bei 100 und 500 µM Pb(II) war er über den gesamten Versuchszeitraum zu beobachten. So betrug die Wiederfindung bei Belastung mit 100 µM Pb(II) im Mittel 62 % (62 µM), mit 500 µM Pb(II) 37 % (185 µM).

Bei jeder der drei Konzentrationen konnte eine schnelle Biosorption des Schwermetalls gemessen werden. Der hohe prozentuale Wert der extrazellulären Fraktion zum Zeitpunkt 0 h ergab sich aus die geringen Wiederfindung von Pb(II) und täuscht die Adsorption eines großen Anteils nach 0 h nur vor. Der Absolutwert dieser Fraktion lag bei allen Konzentrationen unter dem des extrazellulären Gehaltes nach 10 min. Nach 10 Minuten betrug der extrazelluläre Pb(II)-Gehalt bereits bei 28, 57 bzw. 71 % (25, 100 bzw. 500 µM Pb(II)). Die entsprechenden Absolutwerte waren 0,6, 3,6 bzw. 13,1 µmol/g FM. Dieser Wert stieg innerhalb von 20 Minuten bei Belastung mit 25 µM nicht signifikant bis auf 29 % (0,7 µmol/g FM) und mit 100 µM nicht signifikant bis auf 59 % (3,8 µmol/g FM). Bei Belastung mit 500 µM Pb(II) lag der extrazelluläre Anteil nach 30 Minuten bei 56 % (13,6 µmol/g FM). Bis zum Versuchsende kam es zu einer signifikanten Abnahme des

extrazellulären Gehaltes bis auf 21 % (0,4 µmol/g FM, 25 µM), 39 % (2,4 µmol/g FM, 100 µM) und 43 % (7,6 µmol/g FM, 500 µM) des wiedergefundenen Pb(II).

Bei allen Konzentrationen konnte eine schnelle intrazelluläre Aufnahme von Pb(II) innerhalb der ersten 10 Minuten gemessen werden. Der intrazelluläre Gehalt lag bei 60 % (1,3 µmol/g FM, 25 µM), 40 % (2,6 µmol/g FM, 100 µM) und 27 % (5,0 µmol/g FM, 500 µM). Diese Fraktion stieg bei allen Konzentrationen bis zu 4 Stunden (25 und 100 µM) bzw. einem Tag (500 µM) signifikant an. Die intrazellulären Pb(II)-Gehalte lagen nach diesem Zeitraum bei 74 % (1,9 µmol/g FM, 25 µM), 49 % (3,2 µmol/g FM, 100 µM) und 56 % (12,1 µmol/g FM, 500 µM). Diese Werte blieben dann über den gesamten Versuchszeitraum relativ konstant. Auch der Pb(II)-Gehalt des Mediums sank nicht mehr ab. Im Falle der Exposition mit 500 µM Pb(II) stieg er ab dem 2. Tag wieder etwas an, einhergehend mit einer Verringerung der extrazellulären Fraktion.

Bei Exposition mit 25 µM Pb(II) stieg der GSH-Spiegel von 0,13 µmol/g FM (0 h) signifikant bis auf 0,23 µmol/g FM (2 d) an. Ein Maximum wurde nach 10 Tagen mit 0,28 µmol/g FM erreicht. Eine deutlichere Erhöhung des GSH-Gehaltes konnte bei Belastung des Mooses mit 100 und 500 µM Pb(II) gemessen werden (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 3). Bei 100 µM stieg der GSH-Gehalt ab dem 2. Tag signifikant von 0,095 auf 0,211 µmol/g FM und erreichte mit 0,51 µmol/g FM am 10. Tag ein Maximum. Wurde das Moos mit 500 µM Pb(II) inkubiert, erhöhte sich der GSH-Gehalt innerhalb eines Tages signifikant von 0,15 µmol/g FM auf 0,41 µmol/g FM und erreichte am 10. Tag ein Maximum mit 0,56 µmol/g FM.

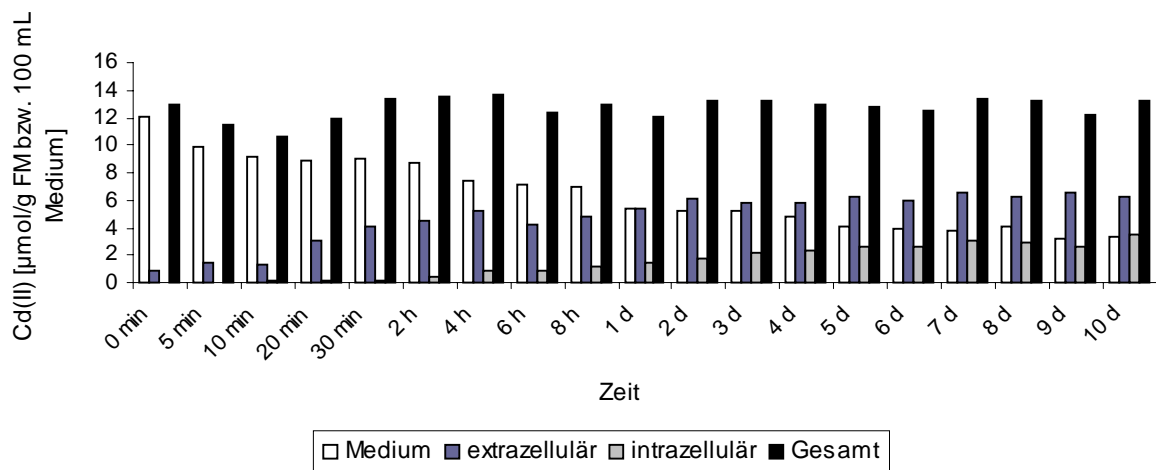


**Abb. 19.** Pb(II)-Akkumulation von *Fontinalis antipyretica* (Helbe) nach Belastung mit verschiedenen Pb(II)-Konzentrationen. **A, D** 25  $\mu\text{M}$  Pb(II), **B** 100  $\mu\text{M}$  Pb(II), **C, E** 500  $\mu\text{M}$  Pb(II). (Standardabweichungen siehe Anhang B, Tab. 5)



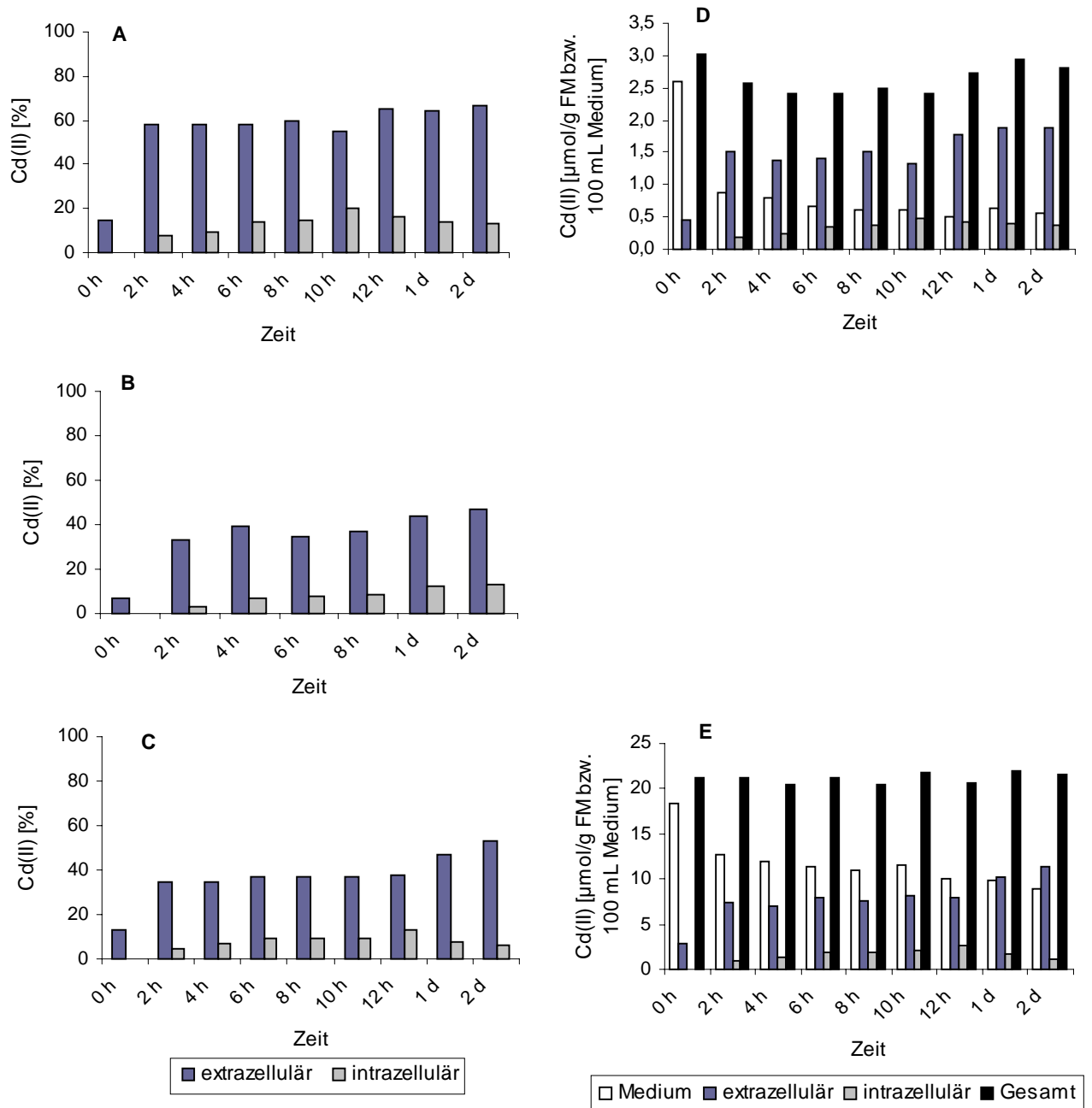
### 3. 1. 4 Cd(II)-Akkumulation durch *Fontinalis dalecarlica*

Die Cd(II)-Akkumulation von *Fontinalis dalecarlica* wurde, wie unter Kap. 2. 3. 1 beschrieben, bestimmt. In Abb. 20 sind Biosorption und Aufnahme von Cd(II) durch das Moos bei Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) dargestellt. Es erfolgte eine schnelle Adsorption des Schwermetalls an die Blattoberfläche. Innerhalb von 30 Minuten waren 4,1  $\mu\text{mol/g}$  FM biosorbiert. Dieser Wert stieg signifikant auf 5,2  $\mu\text{mol/g}$  FM nach 4 Stunden der Cd(II)-Exposition und blieb über den gesamten Versuchszeitraum mit Werten zwischen 5,2 und 6,6  $\mu\text{mol/g}$  FM relativ konstant. Eine Abnahme der extrazellulären Fraktion war nicht zu erkennen. Die intrazelluläre Aufnahme von Cd(II) erfolgte langsamer, jedoch gleichmäßig über den gesamten Versuchszeitraum hinweg. Nach einem Tag wurde in den Mooszellen 1,4  $\mu\text{mol Cd(II)/g}$  FM, nach 10 Tagen 3,5  $\mu\text{mol Cd(II)/g}$  FM gefunden. Die Wiederfindung von Cd(II) lag im Mittel bei 12,7  $\mu\text{mol/g}$  FM (127 %).



**Abb. 20.** Cd(II)-Akkumulation von *Fontinalis dalecarlica* bei Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II). (Standardabweichung siehe Anhang B, Tab. 6)

Zum Vergleich der Cd(II)-Akkumulation von Pflanzen der Gattung *Fontinalis* verschiedener Standorte und Wuchsformen wurden Biosorption und Aufnahme von Cd(II) bei verschiedenen Konzentrationen des Schwermetalls untersucht (Abb. 21). Es wurden 25, 100 und 200  $\mu\text{M}$  Cd(II) verwendet.



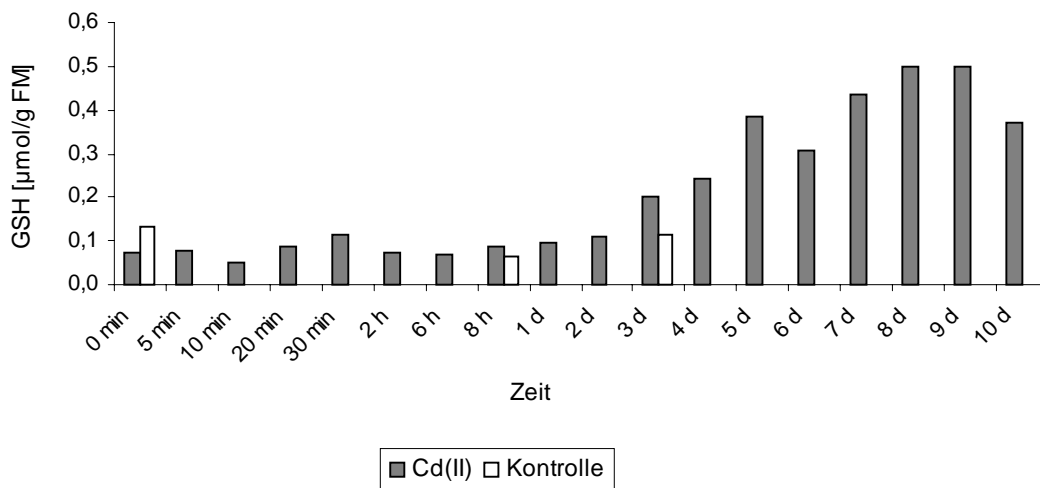
**Abb. 21.** Cd(II)-Akkumulation von *Fontinalis dalecarlica* bei Belastung mit verschiedenen Schwermetall-Konzentrationen. **A, D** 25 µM Cd(II), **B** 100 µM Cd(II), **C, E** 200 µM Cd(II). (Standardabweichungen siehe Anhang B, Tab. 6)

Bei allen Konzentrationen kam es zu der bereits beschriebenen schnellen Biosorption von Cd(II) an die Moosoberfläche, nach 2 Stunden betrug der extrazelluläre Cd(II)-Gehalt 58 %, 33 % bzw. 35 % des wiedergefundenen Cd(II) bei Belastung mit 25 µM, 100 µM bzw. 200 µM Cd(II). Die entsprechenden Absolutwerte sind 1,5 µmol/g FM (25 µM Cd(II)),

4,5  $\mu\text{mol/g}$  FM (100  $\mu\text{M}$  Cd(II)) bzw. 7,3  $\mu\text{mol/g}$  FM (200  $\mu\text{M}$  Cd(II)). Diese Werte blieben über den gesamten Versuchszeitraum relativ konstant.

Die Aufnahme ins Zellinnere des Moooses erfolgte langsamer, jedoch kontinuierlich. Bei 200  $\mu\text{M}$  Cd(II) sank der intrazelluläre Cd(II)-Gehalt nach 12 Stunden wieder etwas ab. Nach 2 Tagen der Belastung mit 25  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  bzw. 200  $\mu\text{M}$  waren 13 % (0,4  $\mu\text{mol}$  Cd(II)/g FM), 13 % (1,8  $\mu\text{mol}$  Cd(II)/g FM), bzw. 6 % (1,2  $\mu\text{mol}$  Cd(II)/g FM) intrazellulär zu finden. Der Gehalt von Cd(II) im Nährmedium nahm über den gesamten Versuchszeitraum ab.

In Abb. 22 ist der GSH-Gehalt bei Belastung des Moooses mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) dargestellt. Der GSH-Spiegel stieg ab dem ersten Tag signifikant an, von 0,073  $\mu\text{mol/g}$  FM auf 0,095  $\mu\text{mol/g}$  FM, und erreichte am 5. Tag ein Maximum mit 0,39  $\mu\text{mol/g}$  FM, am 8. Tag ein zweites Maximum mit 0,50  $\mu\text{mol/g}$  FM, dem ca. 7fachen des Ausgangsgehaltes an GSH.



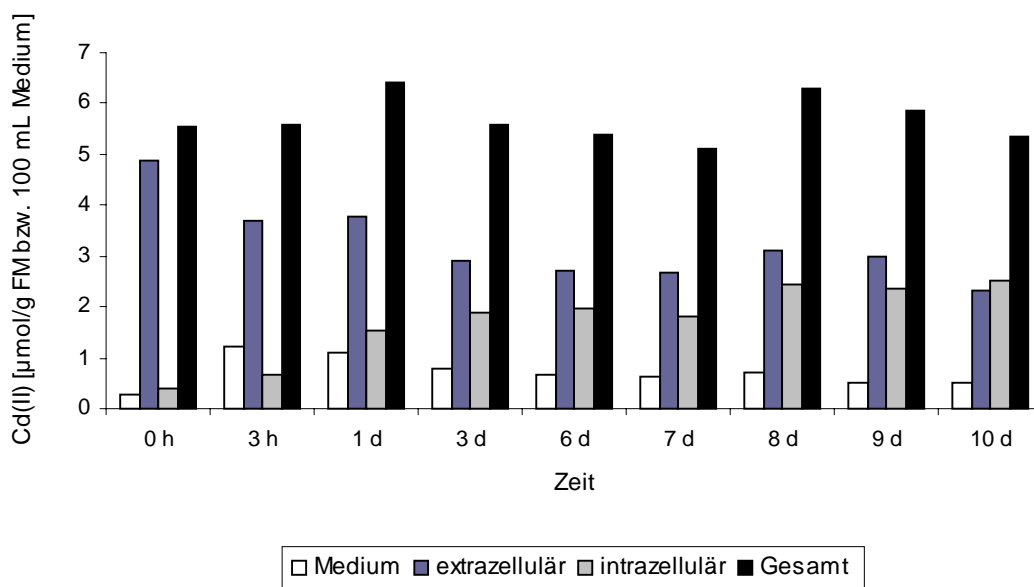
**Abb. 22.** GSH-Gehalt von *Fontinalis dalecarlica* nach Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II). Standardabweichungen : 1 d: 0,0081 (8,2 %), 7 d: 0,051 (14,1 %)

### 3. 1. 5 Cd(II)-Akkumulation durch *Fontinalis antipyretica* nach Absetzen der Cd(II)-Belastung

Um eine mögliche Depotfunktion der Mooszellwand für Cd(II) zu untersuchen, wurde *Fontinalis antipyretica* zunächst 2 h mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) inkubiert. Nach Austausch des Cd(II)-haltigen gegen Cd(II)-freies Medium wurden intra- und extrazellulärer Cd(II)-Gehalt bestimmt (Kap. 2. 3. 1) (Abb. 23).

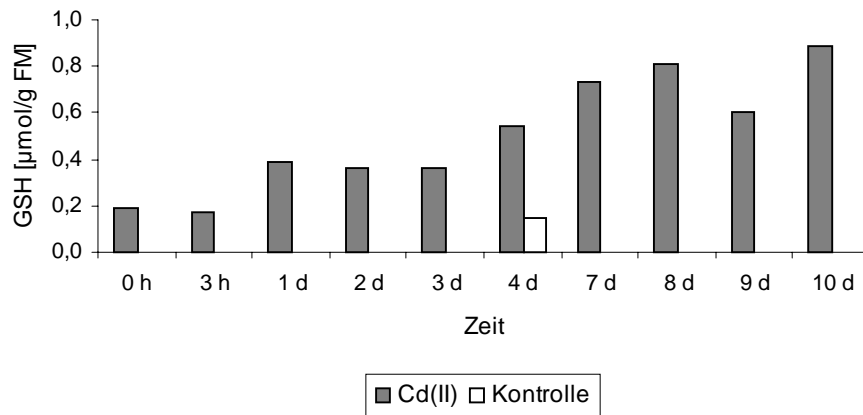
Der Gesamt-Cd(II)-Gehalt im Pflanzenmaterial nach Umsetzen lag zwischen 5,1 und 6,4  $\mu\text{mol/g}$  FM (51-64 % des zugegebenen Cd(II)). Davon befanden sich zum Zeitpunkt 0 h (Umsetzen auf Cd(II)-freies Medium) 0,3  $\mu\text{mol/g}$  FM im Medium, 4,9  $\mu\text{mol/g}$  FM an der

Oberfläche der Blätter und 0,4  $\mu\text{mol/g}$  FM im Inneren der Zellen. Innerhalb der folgenden 3 Stunden erfolgte eine Diffusion von Cd(II) von der Oberfläche ins Medium. Der Cd(II)-Gehalt des Mediums stieg signifikant auf 1,2  $\mu\text{mol/g}$  FM, der extrazelluläre Anteil sank signifikant auf 3,7  $\mu\text{mol/g}$  FM. Ab dem ersten Tag nahm der Cd(II)-Gehalt der Oberfläche ab, gleiches galt für das Medium. Nach 10 Tagen waren extrazellulär noch 2,3  $\mu\text{mol Cd(II)/g}$  FM, im Medium 0,5  $\mu\text{mol Cd(II)/g}$  FM zu finden. Unabhängig davon erfolgte eine kontinuierliche Aufnahme von Cd(II) ins Zellinnere bis auf 2,5  $\mu\text{mol/g}$  FM am 10. Tag.



**Abb. 23.** Cd(II)-Akkumulation durch *Fontinalis antipyretica* nach Absetzen der Cd(II)-Belastung nach 2 Stunden (100  $\mu\text{M}$ ). Standardabweichung 3 d: Medium: 0,019 (2,4 %), extrazelluläres Cd(II): 0,193 (6,5 %), intrazelluläres Cd(II): 0,073 (3,8 %)

Wie bei Bruns et al. (2000b) beschrieben, bewirkte intrazelluläres Cd(II) auch bei diesem Versuch einen Anstieg der GSH-Gehaltes der Zellen (Abb. 24). Nach einem Tag stieg der GSH-Pool signifikant von 0,19 auf 0,39  $\mu\text{mol/g}$  FM. Er erreichte am 10. Tag mit 0,89  $\mu\text{mol/g}$  FM, dem ca. 4,6fachen des Ausgangsgehaltes, ein Maximum.



**Abb. 24.** GSH-Gehalt von *Fontinalis antipyretica* nach Absetzen der Cd(II)-Belastung nach 2 Stunden (100 µM). Standardabweichung 9 d: 0,08 (13,5 %)

### 3. 2 Vitalität von *Fontinalis antipyretica* bei Schwermetallstress

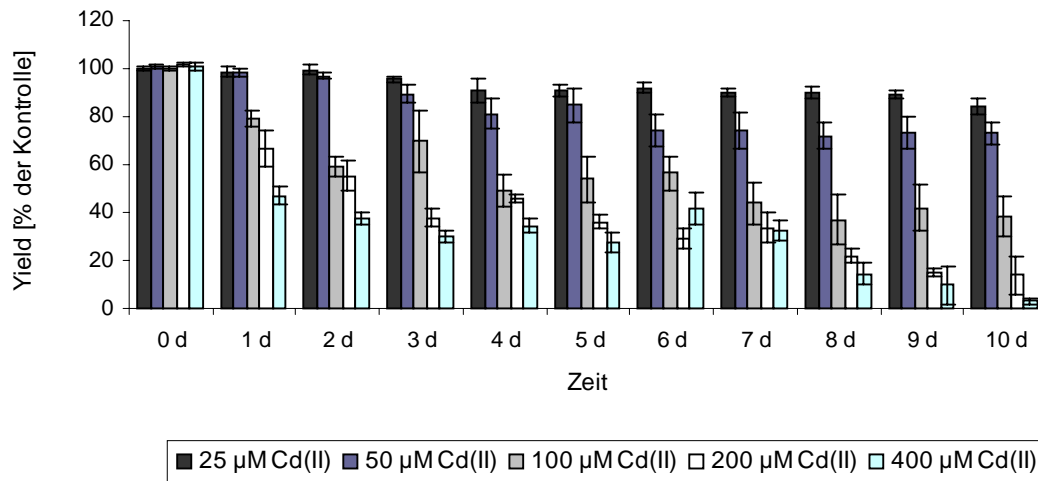
Abb. 25 zeigt die photochemische Ausbeute im Photosystem II von *Fontinalis antipyretica* als Vitalitäts-Parameter nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Schwermetalls Cd(II).

Bei Belastung mit Cd(II) kam es im Bereich zwischen 25 und 400 µM zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Vitalität des Moores. Intrazellulär lokalisiertes Cd(II) bewirkte eine Schädigung des Photosystems II, wobei der größte Effekt durch 400 µM hervorgerufen wurde. Der Einfluss von 25 µM Cd(II) war relativ gering, die Vitalität sank innerhalb von 10 Tagen signifikant bis auf 84 % der Kontrolle. Eine Verringerung der Chlorophyll-Fluoreszenz auf 50 % der Kontrolle war bei 100 µM Cd(II) nach ca. 4 Tagen, bei 200 µM Cd(II) nach 2 Tagen und bei 400 µM Cd(II) bereits nach einem Tag erreicht. Zum Versuchsende betrug die Vitalität 84, 73, 38, 14 und 3 % der Kontrolle bei Exposition mit 25, 50, 100, 200 und 400 µM Cd(II).

Korrelationsanalysen (Kap. 2. 5) von intrazellulärem Cd(II) und Vitalität (Yield) ergaben für eine Exposition mit 100, 200 und 400 µM Cd(II) eine gegensinnige Korrelation dieser beiden Parameter mit  $r_{100} = -0,80$ ,  $r_{200} = -0,99$  und  $r_{400} = -1,0$ . Die Werte von intrazellulärem Cd(II) und Vitalität bei Belastung mit 25 µM Cd(II) korrelierten nicht.

Die Schwermetalle Pb(II) und Zn(II) riefen bei Konzentrationen zwischen 25 und 100 µM keine nennenswerten Veränderungen der Chlorophyll-Fluoreszenz hervor (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 4). Bei Belastung mit 500 µM Zn(II) lag die Vitalität nach einem Tag bei 97 % der Kontrolle. Dieser Wert sank bis zum 5. Tag signifikant auf 83 % und schwankte dann bis zum Versuchsende zwischen 78 % und 98 % der Kontrolle (nicht

dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 4). Nach Exposition mit 500  $\mu\text{M}$  Pb(II) sank die Vitalität des Moooses innerhalb eines Tages signifikant auf 83 % und schwankte bis zum Versuchsende zwischen 93 % und 80 % (10 Tage) (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 4).



**Abb. 25.** Vitalität von *Fontinalis antipyretica* nach Exposition mit Cd(II) verschiedener Konzentration (n=5).

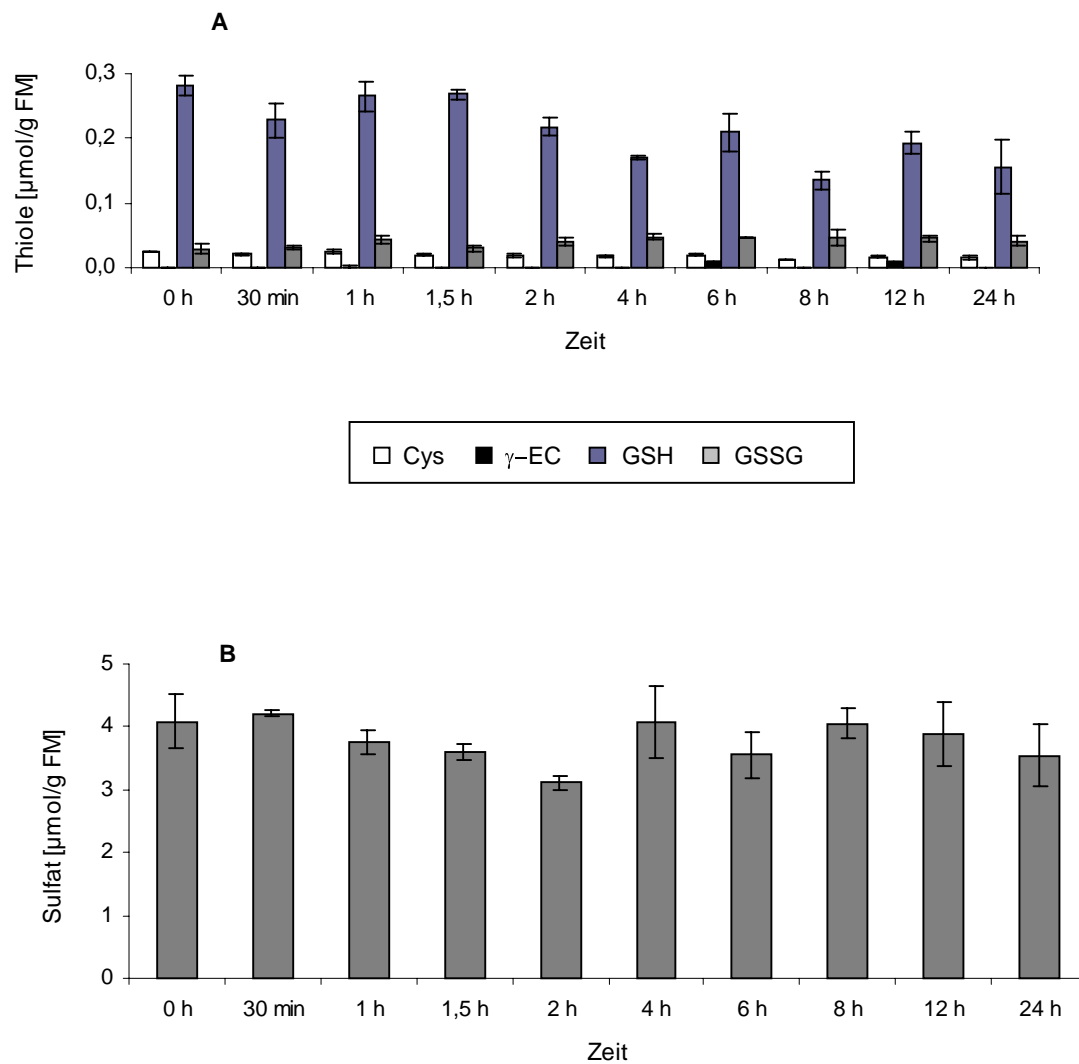
### 3. 3 Einfluss von Cd(II) auf den Schwefelmetabolismus von *Fontinalis antipyretica*

#### 3. 3. 1 Einfluss der Versorgung mit Sulfat auf den Thiolgehalt und die Cd(II)-Akkumulation von *Fontinalis antipyretica*

Die Laboruntersuchungen zur Induktion thiolhaltiger Verbindungen bei *Fontinalis antipyretica* wurden auch in Bezug auf die Schwefelernährung durchgeführt, da GSH in den Mooszellen aus Cys und  $\gamma$ -EC synthetisiert wird und Cys wiederum ein Produkt der Sulfatassimilation darstellt.

Versuche zur Aktivierung des S-Metabolismus bei Cd(II)-Stress wurden nach eintägiger Inkubation in Nährmedium ohne Sulfat durchgeführt (siehe Kap. 2. 4. 3). Abb. 26 zeigt die Thiol- und Sulfatgehalte im Moos während 24 Stunden ohne Sulfat im Knop-Medium. Der GSH-Gehalt nahm innerhalb von 24 Stunden signifikant von 0,28 auf 0,15  $\mu\text{mol/g}$  FM ab. Der Gehalt an Cys sank signifikant von 0,025 auf 0,015  $\mu\text{mol/g}$  FM. Auch GSSG war in nur geringen Mengen vorhanden, die Zunahme von 0,028 auf 0,041  $\mu\text{mol/g}$  FM war jedoch nach statistischen Berechnungen nicht signifikant. Zu Versuchsanfang betrug der GSSG-Gehalt im

Vergleich zum Gesamt-GSH 9 %. Er stieg bis auf 25 % (8 h) an und sank dann auf 21 % zum Ende des Versuches.  $\gamma$ -EC war in nur sehr geringen Mengen vorhanden, teilweise konnte kein  $\gamma$ -EC gemessen werden. Der Sulfatpool des Moores lag zum Zeitpunkt 0 h bei 4,1  $\mu\text{mol/g FM}$ . Er schwankte in 24 Stunden innerhalb sehr enger Grenzen (3,1 und 4,2  $\mu\text{mol/g FM}$ ), wobei keine signifikante Zu- oder Abnahme zu verzeichnen war.



**Abb. 26.** Thiol- (A) und Sulfatgehalt (B) in *Fontinalis antipyretica* während eintägiger Kultivierung ohne Sulfat im Nährmedium (n = 3).

Nach einem Tag der Inkubation ohne Sulfat im Nährmedium wurde das Moos entsprechend Kap. 2. 4. 3 auf folgende Reihen umgesetzt:

- A 0  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4$  / 0  $\mu\text{M}$  Cd(II)
- B 500  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4$  / 0  $\mu\text{M}$  Cd(II)
- C 0  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4$  / 200  $\mu\text{M}$  Cd(II)
- D 500  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4$  / 200  $\mu\text{M}$  Cd(II).

Abb. 27 und 28 zeigen den Thiol- und Sulfatgehalt von *Fontinalis antipyretica* unter diesen Bedingungen. Die Wiederfindung der Thiole betrug 98 % (Cys), 133 % ( $\gamma$ -EC), 108 % (GSH) und 110 % (GSSG), die von Sulfat 98 %. Die relativen Standardabweichungen wurden von je einem Messpunkt jeder Reihe mit  $n=5$  bestimmt (siehe Anhang B, Tab. 7).

Pflanzen ohne Cd(II) im Nährmedium (Abb. 27, A und B) zeigten innerhalb des Versuches keine deutlichen Veränderungen im Gehalt an Cys,  $\gamma$ -EC, GSH und Sulfat.  $\gamma$ -EC war bei beiden Reihen in nur sehr geringen Mengen vorhanden. Bei Reihe A ohne Sulfat im Knop-Medium schwankte der GSH-Gehalt zwischen 0,11 und 0,27  $\mu\text{mol/g}$  FM, wobei innerhalb von 14 Tagen keine signifikante Abnahme festzustellen war. Auch der Cys-Gehalt veränderte sich nicht signifikant und lag zwischen 0,014 auf 0,024  $\mu\text{mol/g}$  FM. Der GSH-Gehalt betrug zum Versuchsende 0,19  $\mu\text{mol/g}$  FM, der Cys-Gehalt 0,020  $\mu\text{mol/g}$  FM. Dagegen erhöhte sich der GSSG-Gehalt signifikant von 0,051 auf 0,096  $\mu\text{mol/g}$  FM nach 6 Stunden und schwankte dann bis zum Versuchsende zwischen 0,058 und 0,089  $\mu\text{mol/g}$  FM. Die prozentuale GSSG-Menge am Gesamt-GSH sank von 32 % bei 0 h auf 17 % nach 1,5 h und erreichte maximal 38 % des Gesamt-GSH-Gehaltes nach 10 Tagen. Bei Zugabe von 500  $\mu\text{M}$  Sulfat (B) nach eintägiger Inkubation ohne Sulfat stieg der GSSG-Gehalt innerhalb von 6 Tagen signifikant von 0,030 auf 0,069  $\mu\text{mol/g}$  FM an und erreichte maximal 20 % des Gesamt-GSH-Spiegels. Der GSH-Gehalt schwankte zwischen 0,15 und 0,36  $\mu\text{mol/g}$  FM, der Cys-Gehalt zwischen 0,015 und 0,030  $\mu\text{mol/g}$  FM. Im Vergleich mit den Proben ohne Sulfat (Reihe A) waren der Cys- und GSH-Gehalt bei Reihe B ab dem 1. Tag überwiegend signifikant höher, im Durchschnitt um das ca. 1,6fache. Der GSSG-Gehalt wies meist signifikant geringere Werte auf (0,7fach). Ein signifikant höherer Sulfatgehalt war ab dem 10. Tag zu beobachten (1,3fach).

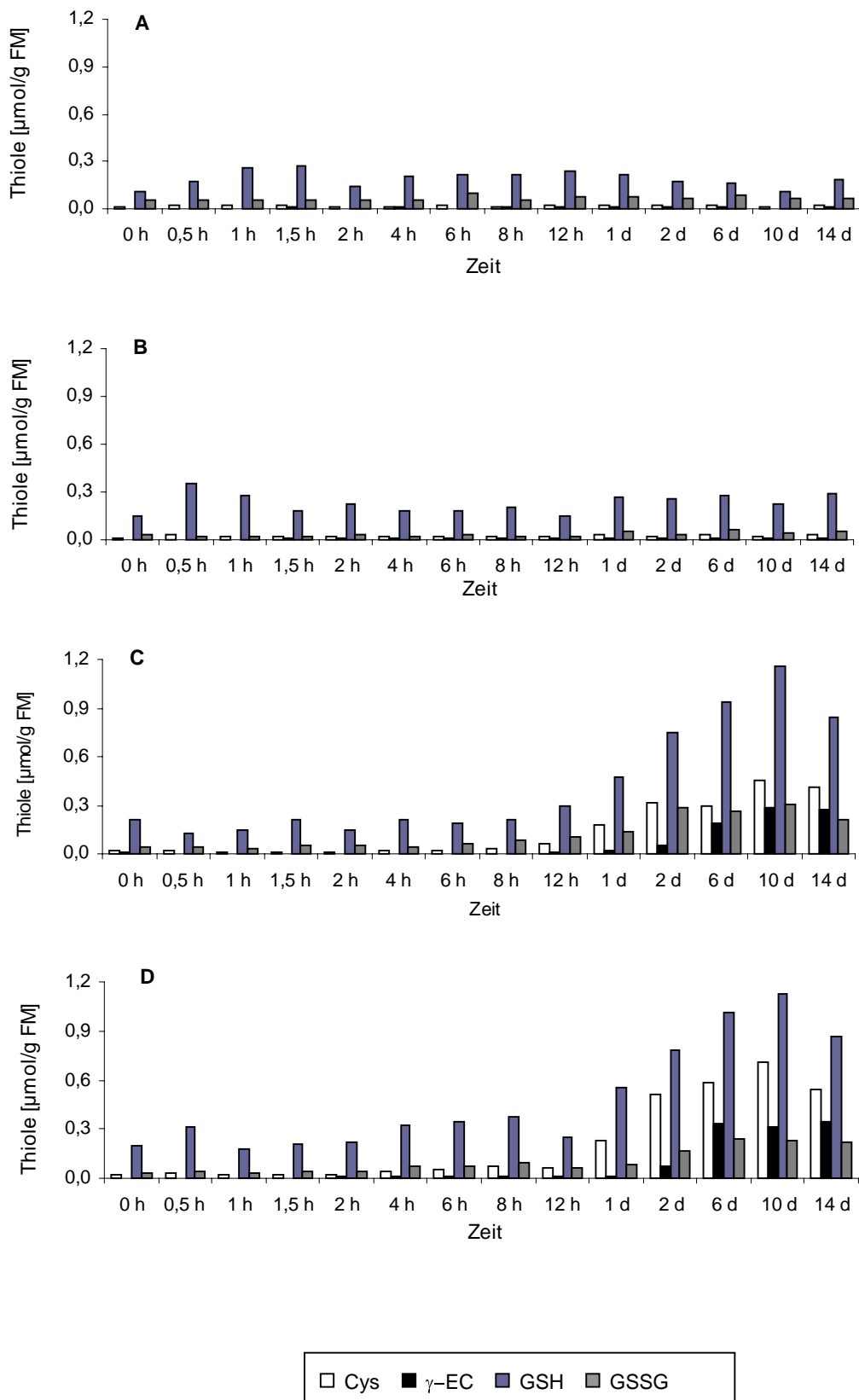
Bei Belastung mit 200  $\mu\text{M}$  Cd(II) erhöhte sich der Gehalt aller Thiole unabhängig von der Sulfatnahrung nach 1 Tag der Belastung mit Cd(II) (Abb. 27, C und D). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Mengen von GSH zwischen Reihe C und D festgestellt werden. Der GSH-Gehalt betrug nach einem Tag 0,47  $\mu\text{mol/g}$  FM (C) bzw. 0,55  $\mu\text{mol/g}$  FM



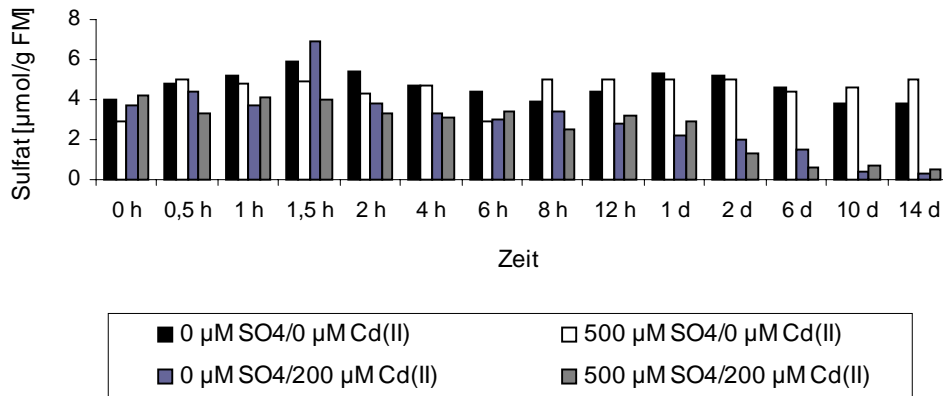
(D), ein Maximum wurde bei beiden Reihen mit 1,16  $\mu\text{mol/g}$  FM (C) bzw. 1,13  $\mu\text{mol/g}$  FM (D) am 10. Tag erreicht. Der GSSG-Spiegel der beiden Reihen unterschied sich signifikant und erreichte maximal 0,30  $\mu\text{mol/g}$  FM (C, 10. Tag) und 0,24  $\mu\text{mol/g}$  FM (D, 6. Tag). Der prozentuale Anteil von GSSG in Bezug auf Gesamt-GSH lag bei Reihe C bei 0 Stunden bei 17 %, stieg auf maximale 29 % nach 8 Stunden und betrug zum Versuchsende 20 %. Bei Reihe D stieg er von 12 % auf maximale 20 % (8 h, 14 d).

Signifikante Unterschiede waren auch beim Cys- und  $\gamma$ -EC-Gehalt zu erkennen. Cys- und  $\gamma$ -EC-Menge waren nach Zugabe von 500  $\mu\text{M}$  Sulfat (Reihe D) ab dem 2. Tag (Cys) bzw. am 2. und 6. Tag ( $\gamma$ -EC) höher als bei den Proben ohne Sulfat (Reihe C). Der Cys-Gehalt erhöhte sich auf maximal 0,45  $\mu\text{mol/g}$  FM (C, 10 d), während er bei Reihe D maximal 0,71  $\mu\text{mol/g}$  FM (10 d) erreichte.  $\gamma$ -EC stieg auf 0,28  $\mu\text{mol/g}$  FM (C) bzw. 0,35  $\mu\text{mol/g}$  FM (D) am 10. bzw. 14. Tag der Cd(II)-Exposition. Einhergehend mit der erhöhten Synthese der Thiole sank der Sulfatgehalt im Moos von 3,7 auf 0,34  $\mu\text{mol/g}$  FM (C) bzw. von 4,2 auf 0,47  $\mu\text{mol/g}$  FM (D) – Abb. 28 (0  $\mu\text{M}$  Sulfat bzw. 500  $\mu\text{M}$  Sulfat).

Bei den Reihen A und C befand sich über den gesamten Versuchszeitraum kein Sulfat im Medium, der Sulfatgehalt der Knop-Nährlösung schwankte bei den Reihen B und D zwischen 400 und 500  $\mu\text{M}$  (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 5).



**Abb. 27.** Thiolgehalt in *Fontinalis antipyretica* bei Exposition mit 200  $\mu\text{M Cd(II)}$  in Abhängigkeit von der Ernährung mit Sulfat. **A** 0  $\mu\text{M SO}_4$  / 0  $\mu\text{M Cd(II)$ , **B** 500  $\mu\text{M SO}_4$  / 0  $\mu\text{M Cd(II)$ , **C** 0  $\mu\text{M SO}_4$  / 200  $\mu\text{M Cd(II)$ , **D** 500  $\mu\text{M SO}_4$  / 200  $\mu\text{M Cd(II)$ . (Relative Standardabweichungen siehe Anhang B, Tab. 7)

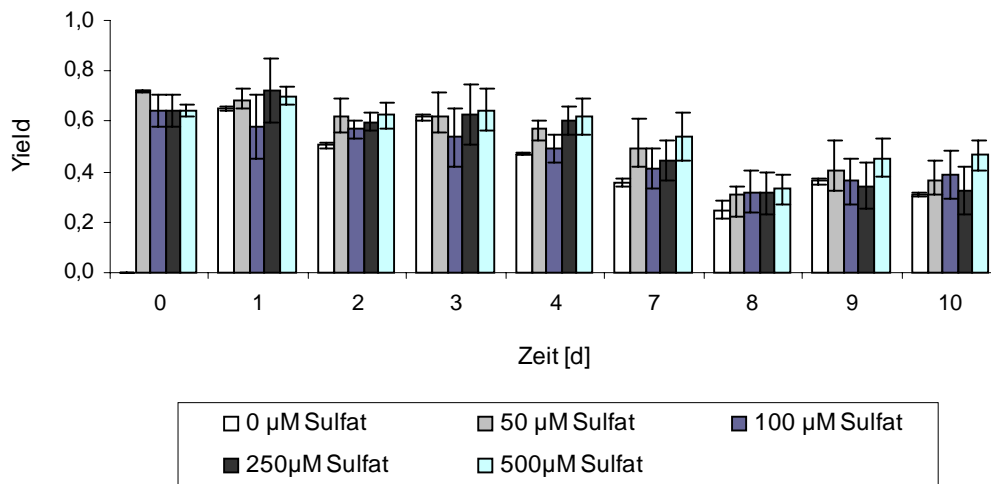


**Abb. 28.** Sulfatgehalt in *Fontinalis antipyretica* bei Exposition mit 200 µM Cd(II) in Abhängigkeit von der Ernährung mit Sulfat. (Relative Standardabweichungen siehe Anhang B, Tab. 7)

Die Reaktionen des Mooses bei Cd(II)-Belastung und unterschiedlicher Zugabe von Sulfat ins Nährmedium können nur verglichen werden, wenn ähnliche Mengen an Cd(II) akkumuliert wurden. Deshalb wurden von Reihe C und D extra- und intrazellulärer Cd(II)-Gehalt bestimmt (Kap. 2. 3. 1). Biosorption und Aufnahme korrelierten unabhängig von der Sulfatkonzentration im Medium über den gesamten Versuchszeitraum mit  $r_{\text{extra}} = 0,85$  und  $r_{\text{intra}} = 0,98$ . Die extra- und intrazellulären Gehalte waren bei Reihe C jedoch etwas größer als bei Reihe D. Extrazellulär waren bis zu 6,75 µmol/g FM mehr adsorbiert. Die größte Differenz der intrazellulären Fraktion betrug ca. 1 µmol/g FM. Bis zum Versuchsende kam es zu einem Angleich der beiden Fraktionen (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 6).

Weiterhin wurde die Vitalität von *Fontinalis antipyretica* bei Belastung mit 100 µM Cd(II) und Kultivierung in Knop-Medium mit 0, 50, 100, 250 und 500 µM Sulfat untersucht (Kap. 2. 4. 3) (Abb. 29). Durch die Belastung mit Cd(II) kam es zu einer Abnahme der photochemischen Ausbeute im Photosystem II. Eine Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration der Nährlösung war jedoch nicht zu erkennen. Nach 4 Tagen lag die Vitalität bei Kultivierung mit 0 µM Sulfat bei 0,47, mit 50 µM Sulfat bei 0,57, mit 100 µM Sulfat bei 0,49 und mit 500 µM Sulfat bei 0,62. Nach 10 Tagen lag die Chlorophyll-Fluoreszenz bei 0 und 250 µM Sulfat mit 0,31 und 0,32 bei ähnlichen Werten, während die Werte bei 50 µM Sulfat, 100 µM Sulfat und 500 µM Sulfat mit 0,37; 0,39 und 0,47 etwas höher waren. Ein signifikanter Unterschied bestand zu diesem Zeitpunkt lediglich zwischen den Vitalitätswerten bei 0 und 500 µM Sulfat. Eine Kontrolle ohne Cd(II) im Knop-Medium mit

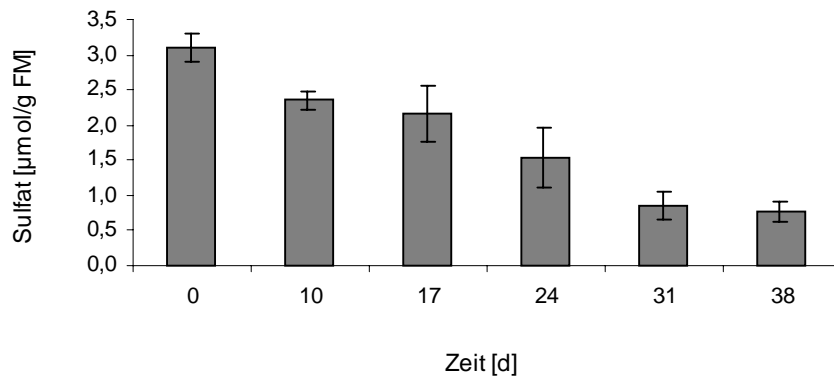
normalem Sulfat-Gehalt (192  $\mu\text{M}$ ) zeigte keine Abnahme der Vitalität über 10 Tage (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 7). Auch bei Kultivierung ohne Sulfat und ohne Cd(II) war innerhalb von 10 Tagen keine Verringerung der Chlorophyll-Fluoreszenz zu beobachten (siehe Abb. 32).



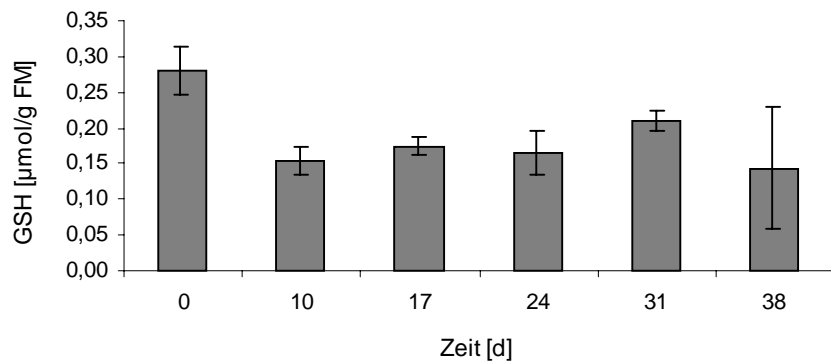
**Abb. 29.** Vitalität von *Fontinalis antipyretica* während Kultivierung in Knop-Medium mit unterschiedlicher Sulfat-Konzentration und Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) ( $n = 5$ ).

### 3. 3. 2 Effekte von Schwefelmangel und Cd(II)-Belastung auf den Schwefelmetabolismus und die Vitalität von *Fontinalis antipyretica*

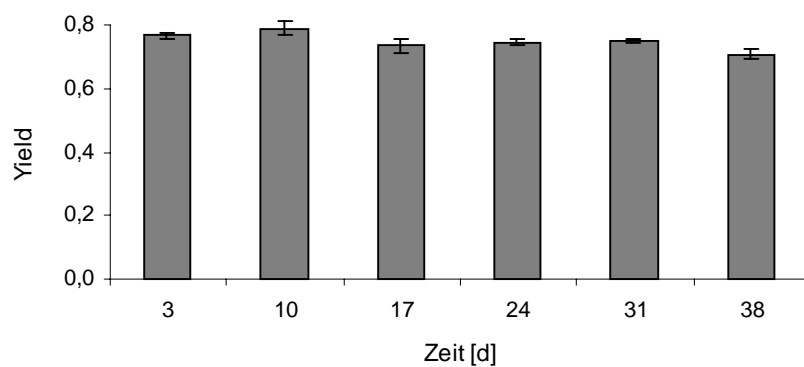
Der natürliche Sulfatgehalt des gesammelten Moores lag zwischen 3,0 und 4,5  $\mu\text{mol/g}$  FM, was ausreichte, um bei Belastung mit Cd(II) entsprechende Mengen an Thiolen zu synthetisieren. Um eine Aktivierung des Schwefelstoffwechsels und Auswirkungen auf die Vitalität deutlicher zu machen, wurde das Moos an Sulfat verarmt und dann mit Cd(II) exponiert (Kap. 2. 4. 3). In einem Zeitraum von 38 Tagen sank der Sulfatgehalt im Moos von 3,1 auf 0,77  $\mu\text{mol/g}$  FM, was einem Viertel der Ausgangskonzentration entsprach (Abb. 30). Auch die GSH-Menge in den Zellen nahm ab, von 0,28 auf 0,15  $\mu\text{mol/g}$  FM am 10. Tag (Abb. 31), jedoch war nach dem 10. Tag keine weitere signifikante Abnahme festzustellen. Die Chlorophyll-Fluoreszenz als Parameter der Vitalität wurde regelmäßig bestimmt (Abb. 32). Es war eine leichte, doch signifikante Abnahme des Vitalitätsparameters von 0,77 auf 0,71 zu erkennen, eine mitgeführte Kontrolle mit ca. 190  $\mu\text{M}$  Sulfat im Medium besaß nach diesem Zeitraum eine Vitalität von 0,74.



**Abb. 30.** Sulfat-Gehalt in *Fontinalis antipyretica* während Inkubation in Knop-Medium ohne Sulfat (n=3).



**Abb. 31.** GSH-Gehalt in *Fontinalis antipyretica* während Inkubation in Knop-Medium ohne Sulfat (n=3).



**Abb. 32.** Vitalität von *Fontinalis antipyretica* während Inkubation in Knop-Medium ohne Sulfat (n=5).

Um eine Reaktion des Schwefelstoffwechsels hervorzurufen, wurde nun Cd(II) und/oder Sulfat zugegeben, wobei die Zugabe gleichzeitig erfolgte (Kap. 2. 4. 3).

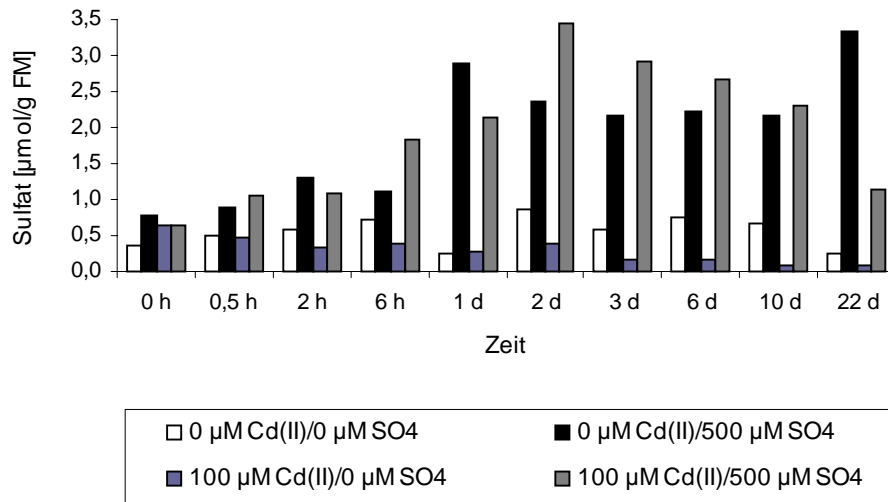
Bei Zugabe von Sulfat wurde der Sulfatpool in den Zellen wieder aufgefüllt (Abb. 33). Er stieg bei unbelastetem Moos innerhalb eines Tages auf 2,9  $\mu\text{mol/g FM}$  an und erreichte damit den Ausgangsgehalt an Sulfat. Auch der GSH-Spiegel erhöhte sich wieder, ein Maximum wurde nach einem Tag erreicht (0,43  $\mu\text{mol/g FM}$ ) (Abb. 34). Im weiteren Verlauf sank er auf 0,19  $\mu\text{mol/g FM}$  ab (22. Tag). Entsprechend dem GSH verhielt sich der Cys-Gehalt. Er stieg bis zum 1. Tag von 0,032 auf 0,060  $\mu\text{mol/g FM}$  an, gefolgt von einem Absinken auf 0,014  $\mu\text{mol/g FM}$ .  $\gamma$ -EC war in den Proben nicht nachweisbar (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 8). Auch der GSSG-Spiegel des Mooses stieg an und erreichte mit 0,038  $\mu\text{mol/g FM}$  am 6. Tag ein Maximum. Der prozentuale Anteil von GSSG am Gesamt-GSH schwankte zwischen 5 und 24 %. Der Sulfatgehalt des Mediums sank im Laufe des Versuches von 480  $\mu\text{M}$  auf 410  $\mu\text{M}$  ab (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 8).

Wurde das Moos zusätzlich mit 100  $\mu\text{M Cd(II)}$  belastet (Abb. 33), stieg der Sulfatgehalt bis zum 2. Tag auf 3,44  $\mu\text{mol/g FM}$ , sank dann jedoch auf 1,15  $\mu\text{mol/g FM}$  ab. Dies ging mit einer kontinuierlichen Neusynthese von GSH auf 0,76  $\mu\text{mol/g FM}$  am ersten Tag bzw. 1,90  $\mu\text{mol/g FM}$  am 22. Tag einher (Abb. 34). Auch die Gehalte der Thiole Cys,  $\gamma$ -EC und GSSG nahmen zu, Maxima wurden mit 0,43  $\mu\text{mol/g FM}$  am 2. Tag (Cys), 0,81  $\mu\text{mol/g FM}$  am 22. Tag ( $\gamma$ -EC) und 0,15  $\mu\text{mol/g FM}$  am 3. Tag (GSSG) erreicht. Der prozentuale Anteil von GSSG am Gesamt-GSH lag zwischen 2 und 20 % (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 8). Der Sulfatgehalt des Mediums sank von 460  $\mu\text{M}$  auf 420  $\mu\text{M}$  zum Versuchsende (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 8).

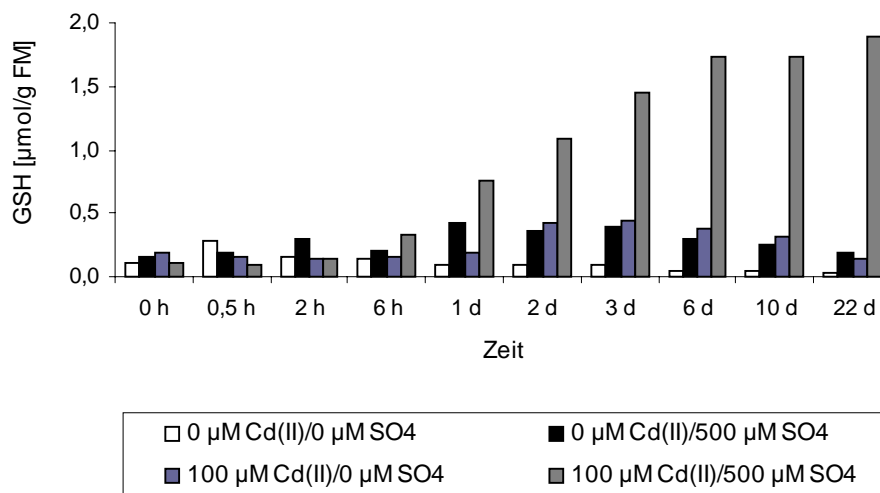
Wurde das Pflanzenmaterial weiter ohne Sulfat belassen, sank der Sulfatgehalt bei der unbelasteten Probe auf 0,25  $\mu\text{mol/g FM}$  ab (22 Tage, insgesamt 60 Tage Sulfatmangel) (Abb. 33). Auch der GSH-Spiegel nahm deutlich ab, er betrug am 22. Tag 0,027  $\mu\text{mol/g FM}$  (Abb. 34). Der Cys-Gehalt sank von 0,025 auf 0,017  $\mu\text{mol/g FM}$ ,  $\gamma$ -EC konnte nicht nachgewiesen werden. Der Gehalt von GSSG nahm auf 0,019  $\mu\text{mol/g FM}$  ab. Der prozentuale Anteil von GSSG am Gesamt-GSH stieg jedoch von 12 % bis auf 33 % am 6. Tag (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 8). Das Verhältnis blieb dann bis zum Ende des Versuches relativ konstant. Im Medium wurde über den gesamten Zeitraum kein Sulfat gefunden (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 8).

Bei belastetem Moos (Abb. 33) sank der Sulfatgehalt stärker ab; nach 22 Tagen lag er bei 0,07  $\mu\text{mol/g FM}$ . Der GSH-Gehalt stieg nur bis zum 3. Tag an (0,45  $\mu\text{mol/g FM}$ ), um dann auf 0,14  $\mu\text{mol/g FM}$  (22. Tag) abzusinken (Abb. 34). Die Gehalte an Cys,  $\gamma$ -EC und GSSG nahmen einen ähnlichen Verlauf - kurzzeitiger Anstieg und darauffolgende Abnahme. Der

prozentuale Anteil von GSSG am Gesamt-GSH schwankte zwischen 10 % und 21 %. Im Medium wurde über den gesamten Zeitraum kein Sulfat nachgewiesen (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 8).



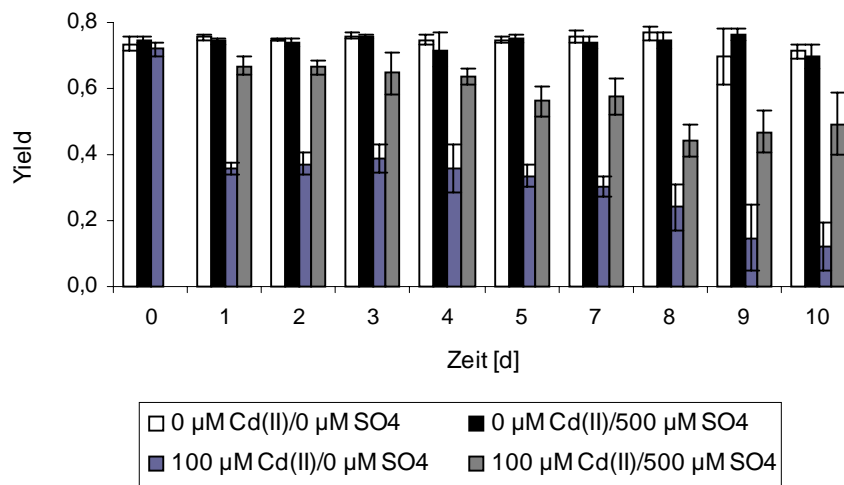
**Abb. 33.** Sulfat-Gehalt in *Fontinalis antipyretica* nach Zugabe von Cd(II) und/oder Sulfat.



**Abb. 34.** GSH-Gehalt in *Fontinalis antipyretica* nach Zugabe von Cd(II) und/oder Sulfat.

In Abb. 35 ist die Vitalität von *Fontinalis antipyretica* nach Zugabe von Cd(II) und/oder Sulfat dargestellt. Moos ohne Cd(II) und ohne Sulfat zeigte innerhalb von 10 Tagen keinen signifikanten Vitalitätsverlust (insgesamt 48 Tage Sulfatmangel). Die Chlorophyll-Fluoreszenz lag zwischen Werten von 0,70 und 0,77. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{M Cd(II)}$  nahm die Vitalität des Moores ab. Bei Pflanzen mit Sulfat im Knop-Medium betrug sie nach einem

Tag 0,67 und sank bis zum 10. Tag signifikant auf 0,49 ab. Befand sich kein Sulfat in der Nährlösung lag die Vitalität nach einem Tag nur noch bei 0,36, und erreichte in den folgenden 9 Tagen einen minimalen Wert von 0,12.



**Abb. 35.** Vitalität von *Fontinalis antipyretica* nach Zugabe von Cd(II) und/oder Sulfat (n =5).

In einem weiteren Versuch wurde das Moos 45 Tage an Sulfat verarmt. Dann wurde, wie in Kap. 2. 4. 3 beschrieben, 500  $\mu\text{M}$  Sulfat zugegeben. Damit *Fontinalis antipyretica* nach Aufnahme des Nährstoffes effektiver auf eine Cd(II)-Belastung (100  $\mu\text{M}$ ) reagieren konnte, wurde das Schwermetall erst einen Tag später zugegeben. Der natürliche Sulfat-Gehalt des Moores bei diesem Versuch betrug 2,1  $\mu\text{mol/g}$  FM. Innerhalb von 45 Tagen sanken Sulfat- bzw. GSH-Gehalt auf durchschnittlich 0,43  $\mu\text{mol/g}$  FM bzw. 0,050  $\mu\text{mol/g}$  FM ab. Veränderungen im GSH- und Sulfat-Gehalt, sowie der Vitalität waren nach Umsetzen auf die verschiedenen Bedingungen in Bezug auf den Verlauf ähnlich dem ersten Versuch zum Sulfatmangel, bei dem Cd(II) und Sulfat gleichzeitig zugegeben wurden (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 9).

So stieg der Sulfat-Gehalt nach Zugabe des Nährstoffes innerhalb eines Tages auf ca. 2,5  $\mu\text{mol/g}$  FM und erreichte den Ausgangsgehalt an Sulfat. Wurde das Moos nach Sulfatzugabe nicht mit Cd(II) belastet, blieb der Sulfatspiegel über den Versuchszeitraum von 10 Tagen relativ konstant und schwankte zwischen 2,3 und 3,3  $\mu\text{mol/g}$  FM. Der Gehalt an GSH nahm innerhalb eines Tages signifikant auf 0,13  $\mu\text{mol/g}$  FM zu, erreichte nach 3 Tagen ein Maximum von 0,17  $\mu\text{mol/g}$  FM und sank dann wieder signifikant auf 0,10  $\mu\text{mol/g}$  FM ab. Wurde das Moos nach 45tägigem Sulfatmangel und Zugabe von 500  $\mu\text{M}$  Sulfat mit Cd(II) belastet, stieg der GSH-Gehalt innerhalb eines Tages signifikant von 0,077 auf 0,13  $\mu\text{mol/g}$



FM an und erreichte nach 10 Tagen ein Maximum von 0,56  $\mu\text{mol/g}$  FM. Der Sulfatgehalt des Mooses sank nicht signifikant ab.

Wurde das Moos weiterhin ohne Sulfat kultiviert, kam es zu einer kontinuierlichen, signifikanten Abnahme des GSH-Gehaltes auf 0,017  $\mu\text{mol/g}$  FM. Der Sulfat-Gehalt sank nicht deutlich ab. Nach Zugabe von Cd(II) kam es trotz fortlaufendem Sulfatmangel zu einer Erhöhung des GSH-Gehaltes, der jedoch mit maximal 0,26  $\mu\text{mol/g}$  FM signifikant geringer war als der der Cd(II)-belasteten Probe mit Sulfat.

Das Moos besaß, wahrscheinlich aufgrund einer längeren Trockenperiode, einen GSH-Spiegel, der ca. nur  $\frac{1}{4}$  von dem des ersten Versuches zum Einfluss von Sulfatmangel auf die Reaktion von *F. antipyretica* auf Cd(II)-Stress betrug. Bei Belastung mit Cd(II) (mit/ohne Sulfat) kam es zu den bereits beobachteten Erhöhungen des GSH, jedoch nicht in dem Maße wie beim ersten Experiment beschrieben. Es wurde nur ca.  $\frac{1}{4}$  der Konzentrationen erreicht. Deshalb sank auch der Sulfat-Gehalt dieser beiden Reihen nicht so extrem ab.

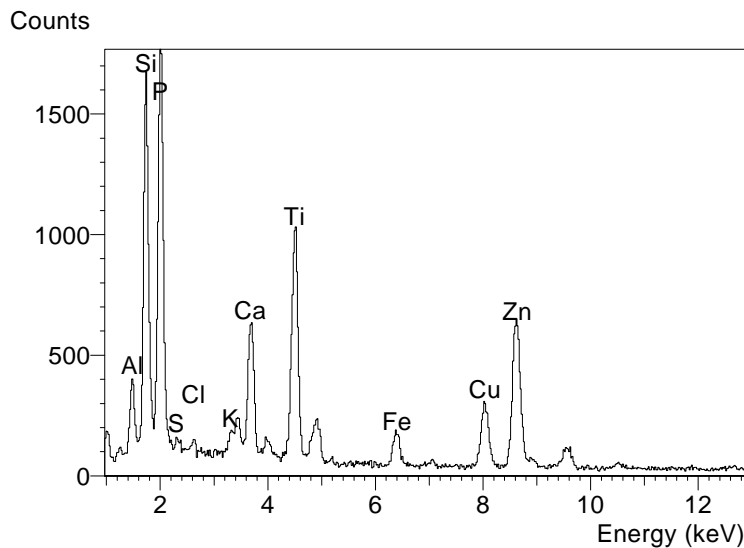
Auch die Vitalität veränderte sich entsprechend (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 9). Bei dieser Versuchsreihe bewirkte der Sulfatmangel jedoch Schädigungen des PS II des Mooses, die Vitalität sank innerhalb von 45 Tagen von 0,72 auf ca. 0,58. Dies könnte auf die veränderten Umweltbedingungen am Standort zurückgeführt werden. Auch bei Belastung mit Cd(II) kam es zu einer stärkeren Beeinträchtigung der Vitalität. Der Unterschied zwischen belastetem Moos mit und ohne Sulfat war trotzdem deutlich zu erkennen. So sank die Vitalität innerhalb von 8 Tagen auf 0,33 (Cd(II), mit Sulfat) bzw. 0,09 (Cd(II), ohne Sulfat). Weiterhin war bei Pflanzen ohne Cd(II) und ohne Sulfat im Medium ein Vitalitätsverlust zu erkennen, der jedoch nicht so hoch war wie bei den Cd(II)-exponierten Proben. Die Vitalität lag nach 8 Tagen noch bei 0,52. Nach Zugabe von Sulfat stieg die Vitalität im Versuchsverlauf wieder bis auf 0,71 an. Der Wert entsprach der Vitalität, die zum Versuchsanfang gemessen wurde.

### **3. 4 Zelluläre Kompartimentierung von Cd(II) in *Fontinalis antipyretica***

#### **3. 4. 1 Intrazelluläre Lokalisation von Cd(II) in *Fontinalis antipyretica***

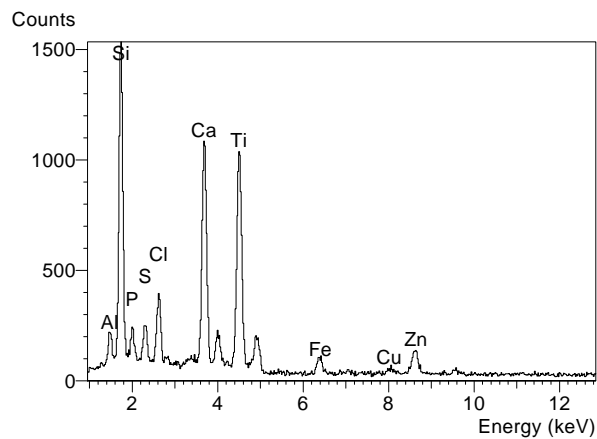
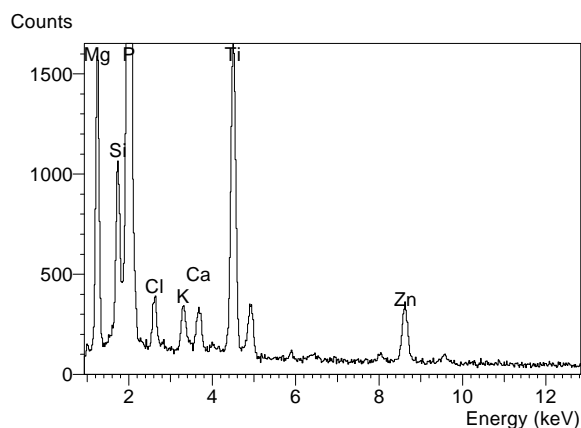
Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an *Fontinalis antipyretica* wurden entsprechend Kap. 2. 3. 5 und 2. 4. 4 durchgeführt. Es wurden EDX- und EEL-Spektren von Niederschlägen der Blattoberfläche, des Cytoplasmas und der Vakuolen aufgenommen. Die Blätter von *Fontinalis antipyretica* bestehen aus nur einer Zellschicht. Alle Ergebnisse wurden mittels Messung einer entsprechenden Anzahl von Niederschlägen in den Zellen statistisch abgesichert. In Abhängigkeit von der Jahreszeit wurden auf der Oberfläche

unterschiedliche Mengen an Elementen gefunden. Im Winter/Frühjahr, nach frischem Austreiben der Spitzen, befanden sich wenige, kleine Kristalle auf den Blättern. Sie enthielten u. a. Zn, Cu, Ca, Si, Al, P und sehr wenig Mn. Bis zum Herbst, mit steigender Belastung des Wassers über den Sommer, erhöhten sich die kristallinen Ablagerungen auf der Oberfläche. Abb. 36 zeigt ein EDX-Spektrum von Kristallen der Blattoberfläche eines älteren Blattes. Sie enthielten u. a. Al, Si, P, Ca, Cu, Fe und Zn in unterschiedlichen Konzentrationen. Der Peak für Ti kommt durch die Ti-Gitter zustande, auf die die Proben aufgebracht werden.



**Abb. 36.** EDX-Spektrum eines Kristalls der Blattoberfläche von *Fontinalis antipyretica*.

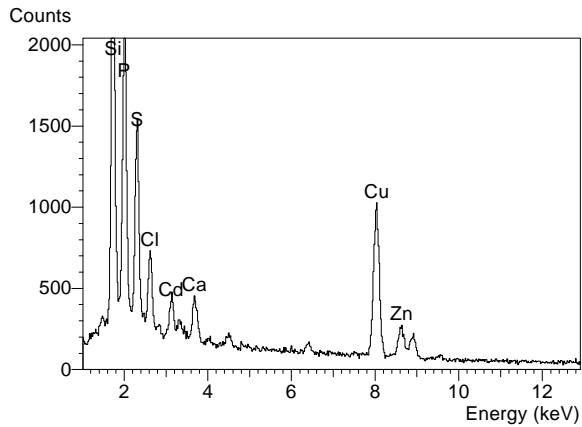
Im Cytoplasma unbelasteter Proben konnten u. a. Al, Si, P, S, Cl, Ca, Fe, Cu und Zn gemessen werden (Abb. 37 A), während Vakuolen u. a. Mg, Si, P, Cl, K, Ca und Zn enthielten (Abb. 37 B). In Abhängigkeit von den durch den 100 nm großen Spot analysierten Stellen des Niederschlages konnten in der Vakuole auch Cu und S gemessen werden.

**A****B**

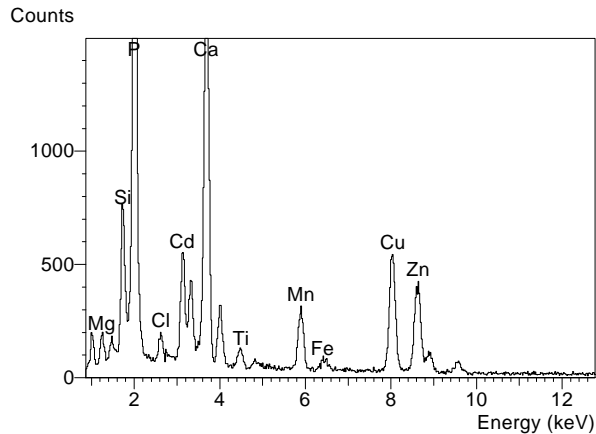
**Abb. 37.** EDX-Spektren von Niederschlägen in Zellen von *Fontinalis antipyretica*. **A** Cytoplasma, **B** Vakuole.

Die Zugabe von Cd(II) führte zu einer Aufnahme der Schwermetallionen ins Zellinnere; in den Kontrollen wurde das Schwermetall nicht gefunden (Abb. 37, 38). Pilze und Bakterien auf der Oberfläche der Blätter enthielten kein Cd(II). Cd(II) konnte im Cytoplasma und in vakuolären Niederschlägen nachgewiesen werden (Abb. 38, A und B). Während der Belastung mit Cd(II) stieg der S-Gehalt im Cytoplasma an. Abhängig von der vermessenen Stelle des Niederschlages konnte auch in der Vakuole S gefunden werden.

A



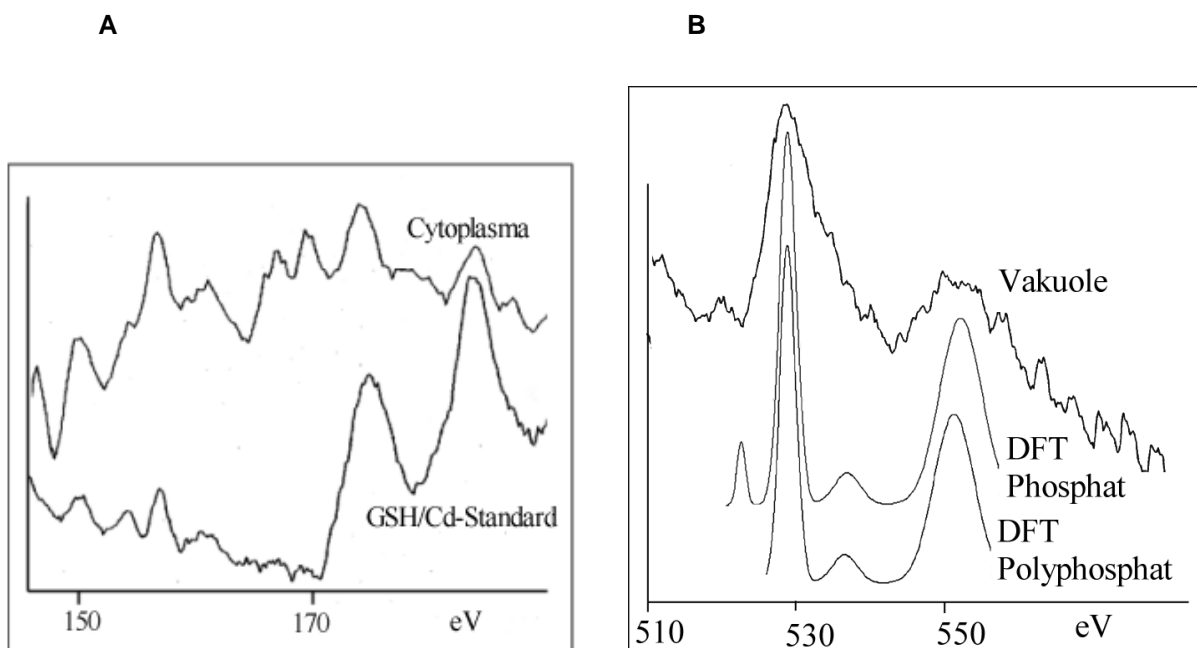
B



**Abb. 38.** EDX-Spektren von Niederschlägen in Zellen von *Fontinalis antipyretica* nach Exposition mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II). **A** Cytoplasma, **B** Vakuole.

EEL-Spektren von Niederschlägen im Cytoplasma zeigten eine Chelatierung des Cd(II) durch SH-Gruppen von Thiolpeptiden (Abb. 39 A). Standard-Spektren von GSH/Cd(II)-Komplexen stimmten mit den Spektren des Cytoplasmas Cd(II)-belasteter Blätter von *Fontinalis antipyretica* überein. Eine kovalente Bindung von S zeigte vollständig unterschiedliche Spektren der

S-L<sub>2,3</sub>-Kante (nicht dargestellt). In den Vakuolen konnten neben den Schwermetallen große Mengen an P gemessen werden. Zur Identifizierung des Bindungszustandes von P wurde die O-K-Kante gewählt, wobei Spektren eines Phosphates und der vakuolären Niederschläge eine hohe Übereinstimmung zeigten. Auch quantenchemische Kalkulationen (DFT = Dichte-Funktions-Theorie) bestätigten die experimentell ermittelten Spektren und unterstützten die Schlussfolgerung, dass Cd(II) in den Vakuolen als anorganisches Phosphat abgelagert wird (Abb. 39 B). Eine Speicherung als Polyphosphat konnte aufgrund unterschiedlicher EEL-Spektren ausgeschlossen werden.

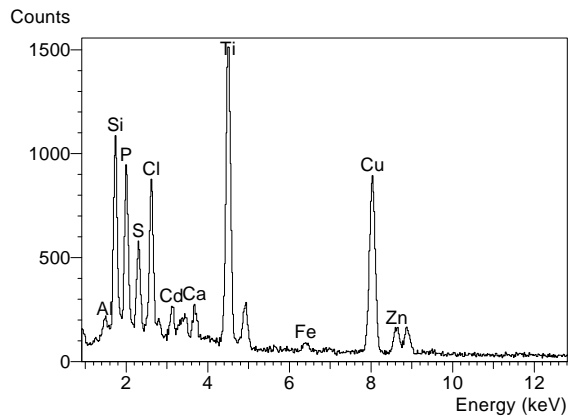


**Abb. 39.** EEL-Spektren von Niederschlägen in Zellen von *Fontinalis antipyretica* nach Exposition mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) im Vergleich mit Spektren von Standardkomplexen bzw. quantenchemischen Kalkulationen der Komplexe. **A** Cytoplasma, **B** Vakuole. (DFT – Dichte-Funktions-Theorie)

### 3. 4. 2 Einfluss von Organika auf die Kompartimentierung von Cd(II)

Um den Einfluss von Organika auf die Kompartimentierung von Cd(II) in den Zellen von *Fontinalis antipyretica* zu untersuchen, wurden elektronenmikroskopische Messungen entsprechend Kap. 2. 3. 5 und 2. 4. 4 durchgeführt. Abb. 40 zeigt ein EDX-Spektrum der Vakuole nach Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  CDNB und 100  $\mu\text{M}$  Cd(II). Es erfolgte ein Transport von Cd(II) in die Vakuole, was durch Messungen von verschiedenen Niederschlägen statistisch abgesichert wurde. Auch bei Exposition mit 100  $\mu\text{M}$  NEM und 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) wurde Cd(II) in der Vakuole abgelagert (nicht dargestellt). Eine quantitative Bestimmung des Cd(II) in der Vakuole zum Vergleich mit einer nur mit Cd(II)-belasteten Probe (Kap. 3. 4. 1)

war mittels der Elektronenmikroskopie bei diesen Versuchen nicht möglich, da zum einen die Schnittdicken der Proben nicht exakt übereinstimmten. Zum anderen wurden einige Geräteparameter, die für eine quantitative Auswertung wichtig sind, nicht bestimmt, so dass die Spektren nur qualitativ ausgewertet werden konnten.



**Abb. 40.** EDX-Spektrum eines Niederschlages der Vakuole von *Fontinalis antipyretica* nach Exposition mit 100  $\mu\text{M}$  CDNB und 100  $\mu\text{M}$  Cd(II).

### 3. 5 $^{15}\text{N}$ -Tracer-Studien mit *Fontinalis antipyretica* unter Schwermetallbelastung

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von Schwermetallen auf den Einbau von Stickstoff in Aminosäuren und Proteine von *Fontinalis antipyretica* wurden Tracer-Studien mit  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  (95 at.-%) durchgeführt (Kap. 2. 3. 6 und 2. 4. 5).

In Abb. 41 ist der Zeitverlauf des Einbaus der Tracer-Verbindung in die Aminosäure (NPN-) - und Protein (PN-) -Fraktion nach Belastung mit Cd(II) über 10 Tage dargestellt.

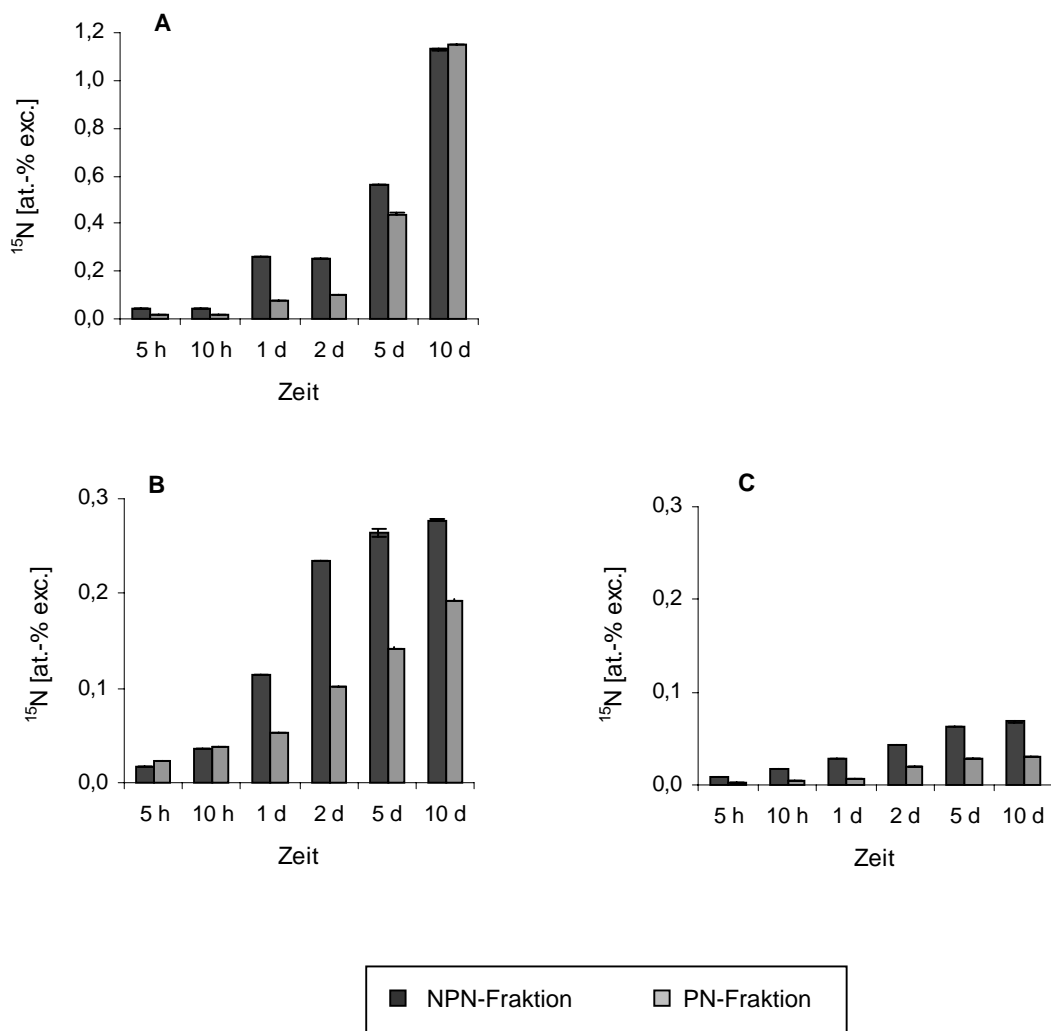
Die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit in frischem Moos lag bei 0,37 at.-% und entsprach den in der Natur vorkommenden Werten. Durch den Einsatz von  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  (95 at.-%) als Stickstoffquelle für die Pflanzen konnte der Verlauf von Stickstoffeinbau in Aminosäuren und Proteine verfolgt werden (Abb. 41 A). Nach der Aufnahme des Nährstoffes erfolgte seine Inkorporation in die Aminosäuren (NPN-Fraktion), die Häufigkeit an  $^{15}\text{N}$  betrug nach 10 Tagen 1,13 at.-% exc.. Die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit in der Protein-Fraktion stieg langsamer an, erreichte aber nach 5-10 Tagen den Wert der NPN-Fraktion.

Bei Belastung mit 25  $\mu\text{M}$  Cd(II) wurde signifikant weniger  $^{15}\text{N}$  in die NPN- und PN-Fraktion eingebaut (Abb. 41 B). Nach 10 Tagen lag die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit der Aminosäuren bei 0,28 at.-%

exc., die der Proteine bei 0,19 at.-% exc.. Das waren 35 % bzw. 29 % der entsprechenden Kontrolle (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 10). Die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit der Proteine lag zudem über den gesamten Versuchszeitraum signifikant unter dem der Aminosäuren. Mit steigender Cd(II)-Konzentration sank die Inkorporation des Tracers in diese beiden Fraktionen weiter ab, bei Belastung mit 50  $\mu\text{M}$  Cd(II) betrug die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit nach 10 Tagen 14 % der Kontrolle (NPN und PN) (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 10).

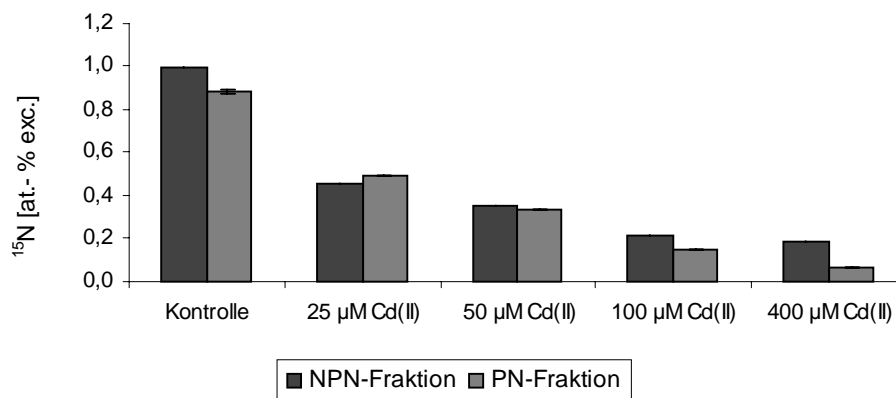
Bei Exposition mit 200  $\mu\text{M}$  Cd(II) (Abb. 41 C) wurde noch weniger  $^{15}\text{N}$  in Aminosäuren und Proteine eingebaut. Nach 10 Tagen wurden in der NPN-Fraktion der belasteten Proben nur noch ca. 6 %, in der PN-Fraktion ca. 3 % der  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit der Kontrolle gemessen.

Somit ist bei Belastung mit Cd(II) die  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation in die PN-Fraktion deutlich stärker gehemmt als der Einbau des Tracers in die NPN-Fraktion.



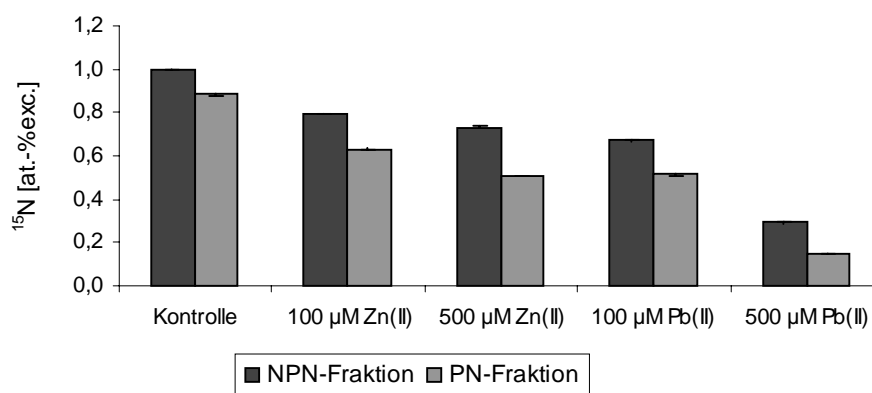
**Abb. 41.** Inkorporation von  $^{15}\text{N}$  in Aminosäuren und Proteine von *Fontinalis antipyretica* nach Belastung mit Cd(II) (n=3). **A** Kontrolle, **B** 25  $\mu\text{M}$  Cd(II), **C** 200  $\mu\text{M}$  Cd(II).

Abb. 42 zeigt den Einbau des Tracers in das Moos nach fünftägiger Exposition mit Cd(II) verschiedener Konzentration. Im Gegensatz zur Kontrolle war die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit der NPN- und PN-Fraktion bei allen belasteten Proben deutlich geringer, wobei eine konzentrationsabhängige Abnahme der Inkorporation des  $^{15}\text{N}$  in beide Fraktionen zu erkennen war. Ab einer Konzentration von  $50\ \mu\text{M}$  Cd(II) wurde weiterhin signifikant weniger  $^{15}\text{N}$  in die Proteine eingebaut, die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit der NPN-Fraktion war höher. Auch hier war ab einer Cd(II)-Konzentration von  $100\ \mu\text{M}$  eine stärkere Inhibierung der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation in die PN-Fraktion verglichen mit der NPN-Fraktion zu erkennen.



**Abb. 42.**  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit in Aminosäuren und Proteinen von *Fontinalis antipyretica* nach fünftägiger Belastung mit Cd(II) verschiedener Konzentration (n=5).

Abb. 43 zeigt die Häufigkeit von  $^{15}\text{N}$  in NPN- und PN-Fraktion bei Belastung mit Pb(II) und Zn(II).



**Abb. 43.** Einbau von  $^{15}\text{N}$  in NPN- und PN-Fraktion von *Fontinalis antipyretica* nach fünftägiger Belastung mit Zn(II) und Pb(II) (n=5).



Auch bei diesen Schwermetallen wurde deutlich weniger  $^{15}\text{N}$  in die beiden Fraktionen eingebaut, wobei eine Konzentrationsabhängigkeit erkennbar war. Analog zur Cd(II)-Exposition war bei beiden Schwermetallen die Inhibierung des  $^{15}\text{N}$ -Einbaus in die PN-Fraktion größer. Die Hemmung der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation war bei Zn(II) am geringsten, gefolgt von Pb(II) und Cd(II). Nach 5tägiger Belastung mit  $100\ \mu\text{M}$  des Schwermetalls lag die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit bei Cd(II) in der NPN-Fraktion bei 0,21 at.-% exc., in der PN-Fraktion bei 0,15 at.-% exc., bei Pb(II) bei 0,70 at.-% exc. (NPN) bzw. 0,51 at.-% exc. (PN), bei Zn(II) bei 0,79 at.-% exc. (NPN) bzw. 0,63 at.-% exc. (PN). In der Kontrolle waren zum selben Zeitpunkt in der NPN-Fraktion 1,0 at.-% exc. und in der PN-Fraktion 0,88 at.-% exc. zu finden.

### **3. 6 Einfluss von Organika auf Thiolgehalt, Cd(II)-Akkumulation und Vitalität von *Fontinalis antipyretica***

Um den Einfluss von Organika auf den Thiolgehalt, die Cd(II)-Akkumulation und die Vitalität von *Fontinalis antipyretica* zu untersuchen, wurden Versuche mit CDNB, NEM und Metolachlor entsprechend Kap. 2. 4. 6 durchgeführt.

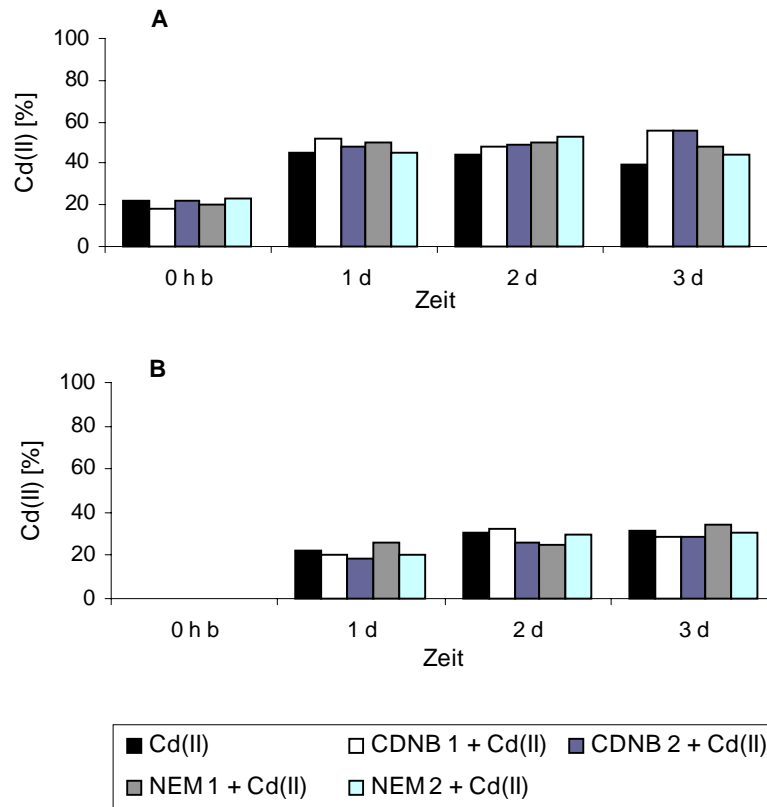
Die Experimente zur Bestimmung von GSH und Cd(II)-Akkumulation wurden als Vorversuche durchgeführt, um Unterschiede zwischen den einzelnen Reihen zu messen und die optimalen Versuchsbedingungen für die analytische Elektronenmikroskopie und die Vitalitätsanalysen zu finden. Deshalb wurden keine relativen Standardabweichungen bestimmt. Da die Vorgehensweise im Versuch der der Akkumulationsversuche und Thiolbestimmungen entspricht, kann man davon ausgehen, dass die relativen Standardabweichungen den Werten in Anhang B und in Kap. 3. 1. 1 ähnlich sind. Aufgrund deutlicher Tendenzen im Thiolgehalt bei unterschiedlicher Belastung mit Organika, werden die Ergebnisse im folgenden dargestellt.

Die Bestimmung von GSH erfolgte nach Zugabe der jeweiligen organischen Substanz (0 h a). Nach 3 Tagen wurde Cd(II) zugegeben und der GSH-Gehalt über weitere 3 Tage gemessen (0 h b, 1 d, 2 d, 3 d). Die Messung der Cd(II)-Akkumulation begann erst nach Zugabe des Cd(II) (0 h b, 1 d, 2 d, 3 d). Die Bezeichnung CDNB1 und 2 bzw. NEM 1 und 2 ist in Kap. 2. 4. 6 näher erläutert. Bei den Proben CDNB 1 und NEM 1 wurde das Medium nach dreitägiger Exposition mit den organischen Substanzen vor der Cd(II)-Zugabe erneuert, so dass im folgenden Verlauf nur noch Cd(II) im Medium vorhanden war. Wurde das Medium vor der Exposition mit Cd(II) nicht ausgetauscht, erfolgte die Bezeichnung CDNB 2 und

NEM 2. CDNB/NEM und Cd(II) befanden sich während des gesamten Versuches im Medium.

Abb. 44 zeigt die extrazelluläre Biosorption und die intrazelluläre Anreicherung von Cd(II) nach Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  CDNB bzw. NEM und Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Cd(II). Im Vergleich zu der nur mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) belasteten Probe lag die Adsorption von Cd(II) bei gleichzeitiger Exposition mit 100  $\mu\text{M}$  Organika bei ähnlichen Werten (Abb. 44 A). Sie war bei den Proben mit organischen Substanzen unabhängig davon, ob das Medium vor der Zugabe von Cd(II) erneuert wurde (CDNB 1 und NEM 1) oder nicht (CDNB 2 und NEM 2). Es kam zu einer schnellen Biosorption nach kurzem Schütteln der Kolben (Zeitpunkt 0 h b) von 18 % (CDNB 1) bis 23 % (NEM 2) des insgesamt wiedergefundenen Cd(II). Dieser Wert stieg bis auf 45 % (Cd(II)) – 52 % (CDNB 1) nach einem Tag. Diese Fraktion blieb bis zum Versuchsende nach 3 Tagen bei allen Reihen relativ konstant. Auch die intrazelluläre Anreicherung von Cd(II) war bei allen Reihen vergleichbar (Abb. 44 B) und nicht abhängig davon, ob die organische Substanz weiterhin im Nährmedium verblieb. Nach 3 Tagen waren zwischen 29 % (CDNB 2) und 34 % (NEM 1) des gesamt wiedergefundenen Cd(II) ins Zellinnere aufgenommen.

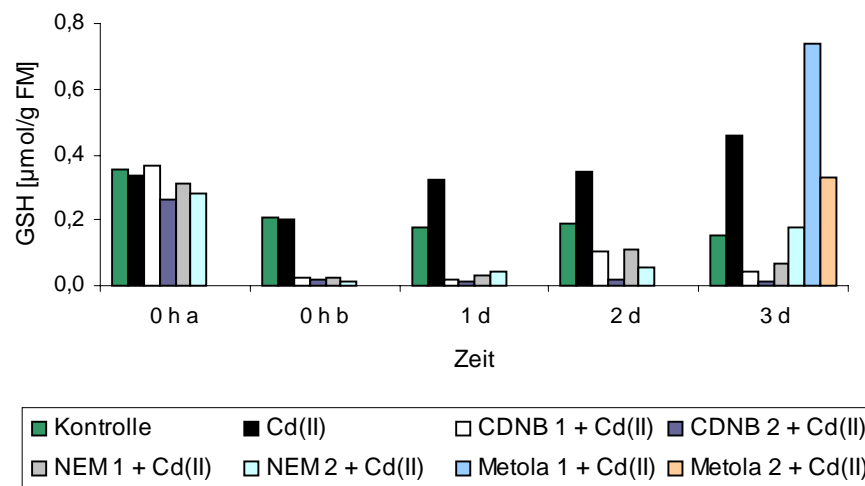
Die Akkumulation von Cd(II) bei gleichzeitiger Exposition mit Metolachlor wurde in einem anderen Versuch durchgeführt. Im Vergleich mit der nur mit Cd(II) belasteten Probe waren auch hier vergleichbare Werte von Biosorption und Aufnahme von Cd(II) zu messen (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 11).



**Abb. 44.** Cd(II)-Akkumulation von *Fontinalis antipyretica* nach Belastung mit Organika und Cd(II) (je 100  $\mu$ M). **A** extrazelluläres Cd(II), **B** intrazelluläres Cd(II).

In Abb. 45 ist der GSH-Gehalt der Versuchsreihen dargestellt. Der Zeitpunkt 0 h b zeigt den GSH-Spiegel in den Zellen nach 3tägiger Belastung mit den organischen Substanzen. Der Gehalt der Kontrolle sank leicht ab von 0,35 auf 0,21  $\mu$ mol/g FM. Die Organika bewirkten eine deutliche Verringerung des GSH-Gehaltes auf ca. 1/8 bis 1/16 der Kontrolle (0,013 – 0,026  $\mu$ mol/g FM). Der GSH-Gehalt der Kontrolle schwankte im weiteren Versuchsverlauf um Werte zwischen 0,18 und 0,16  $\mu$ mol/g FM. Nach Zugabe von Cd(II) (0 h b) stieg der GSH-Gehalt der Cd(II)-Probe im Vergleich zur Kontrolle innerhalb eines Tages auf das 1,8fache (0,32  $\mu$ mol/g FM) und erhöhte sich weiter bis zum Versuchsende auf das ca. 3fache (0,46  $\mu$ mol/g FM). Dies entsprach dem von Bruns et al. (2000) beschriebenen Verhalten des Moores nach Cd(II)-Belastung. Bei gleichzeitiger Exposition mit CDNB (2) sank der GSH-Spiegel bis zum 3. Tag auf 0,01  $\mu$ mol/g FM ab (1/46 der Cd(II)-Probe), während er nach Erneuern des Mediums (CDNB 1) wieder auf 0,041  $\mu$ mol/g FM anstieg – 1/11 der Cd(II)-Probe. Bei gleichzeitiger Belastung mit NEM (2) stieg der GSH-Gehalt nach einem Tag wieder an (0,044  $\mu$ mol/g FM) und erreichte am 3. Tag mit 0,18  $\mu$ mol/g FM ca. 1/3 der Cd(II)-Probe. Ähnlich verhielt sich der GSH-Spiegel nach Erneuern des Mediums vor der Cd(II)-

Zugabe (NEM 1). Der GSH-Gehalt stieg auf 0,11  $\mu\text{mol/g FM}$  (1/3 der Cd(II)-Probe) am 2. Tag, sank dann jedoch leicht ab - auf 0,067  $\mu\text{mol/g FM}$  (1/7 der Cd(II)-Probe). Der GSH-Gehalt bei Belastung mit Metolachlor wurde nur zum Versuchsende gemessen. Bei gleichzeitiger Exposition mit Metolachlor und Cd(II) (Metola 2) stieg der GSH-Gehalt auf 0,33  $\mu\text{mol/g FM}$ . Wurde das Medium vor der Cd(II)-Zugabe erneuert (Metola 1), erhöhte sich der GSH-Spiegel auf 0,74  $\mu\text{mol/g FM}$ . Das entsprach dem 1,6fachen der Cd(II)-Probe.

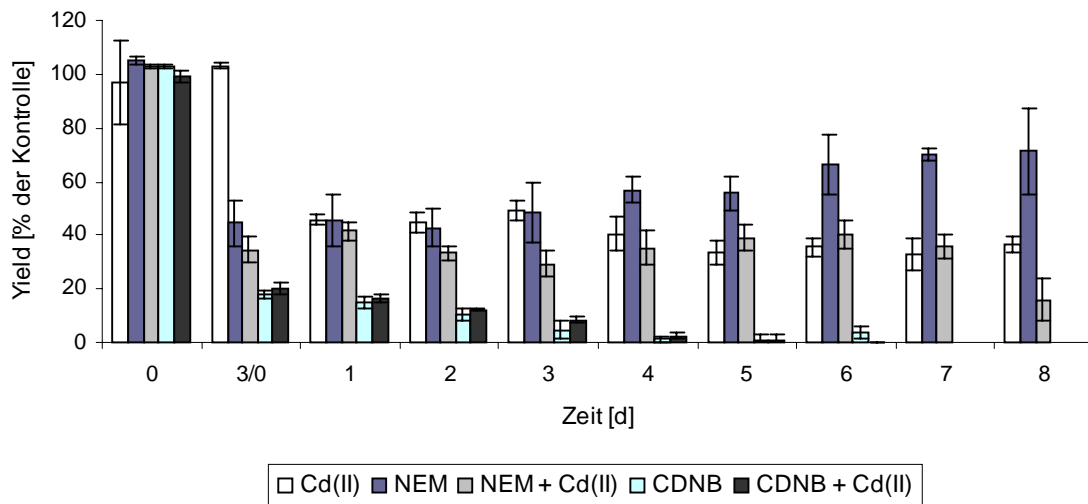


**Abb. 45.** GSH-Gehalt von *Fontinalis antipyretica* nach Belastung mit Organika und Cd(II) (je 100  $\mu\text{M}$ ).

Die Bestimmung der Vitalität erfolgte in einem ersten Versuch nach 3tägiger Belastung mit 50  $\mu\text{M}$  CDNB bzw. NEM und folgender Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) (Kap. 2. 3. 3 und 2. 4. 6). Die organischen Substanzen verblieben nach der Cd(II)-Zugabe im Nährmedium. Abb. 46 zeigt den Verlauf der Vitalität unter diesen Bedingungen. Messpunkt 3 d/0 d stellt die Vitalität nach 3tägiger Exposition mit CDNB/NEM vor Cd(II)-Zugabe dar.

100  $\mu\text{M}$  Cd(II) bewirkte eine Schädigung des Photosystemes II des Moooses, wie in Kap. 3. 2 beschrieben. Nach einem Tag lag die Vitalität bei 46 % der Kontrolle, zum Versuchsende (8 Tage) betrug sie 36 %. Bei Exposition mit 50  $\mu\text{M}$  NEM kam es innerhalb von 3 Tagen zu einem Vitalitätsverlust bis auf 45 % (3/0 d). Dieser Wert stieg vom 2. Tag (43 %) wieder bis auf 72 % der Kontrolle am 8. Tag an. Bei gleichzeitiger Belastung mit Cd(II) stieg die Vitalität bis zum ersten Tag signifikant an, von 35 % auf 42 % der Kontrolle, sank dann jedoch stark ab, bis auf 16 % der Kontrolle am 8. Tag. Bei Belastung mit 50  $\mu\text{M}$  CDNB kam es innerhalb von 3 Tagen zu einer Abnahme der Vitalität bis auf 18 % (3/0 d). Sie sank weiter bis auf minimale 1 % am 5. Tag. Am 7. und 8. Tag lag sie bei 0 % der Kontrolle. Bei gleichzeitiger Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) wurden ähnliche Werte gemessen, signifikante

Unterschied wurden nicht festgestellt. Nach 5 Tagen lag die Vitalität nur noch bei 1 %, danach konnte keine Vitalität mehr gemessen werden.

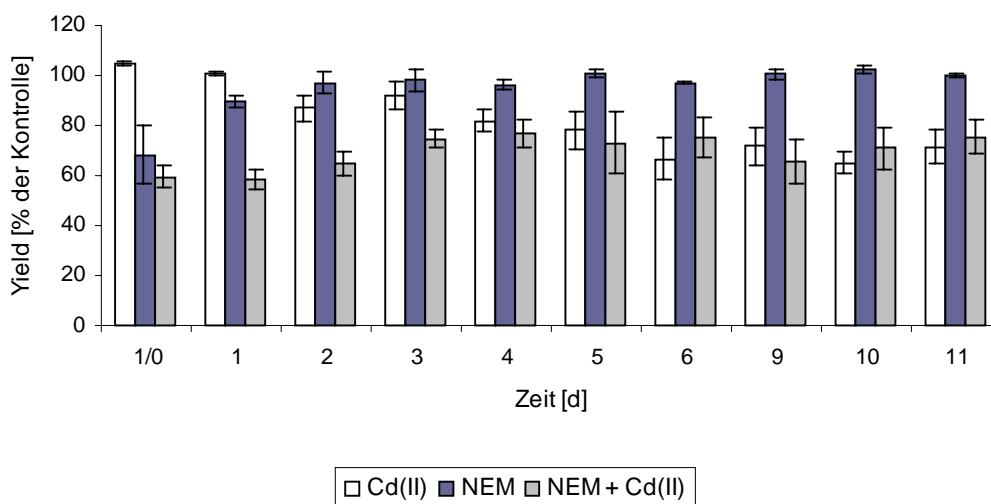


**Abb. 46.** Vitalität von *Fontinalis antipyretica* nach 3tägiger Belastung mit 50  $\mu\text{M}$  CDNB/NEM und folgender Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) (n = 5).

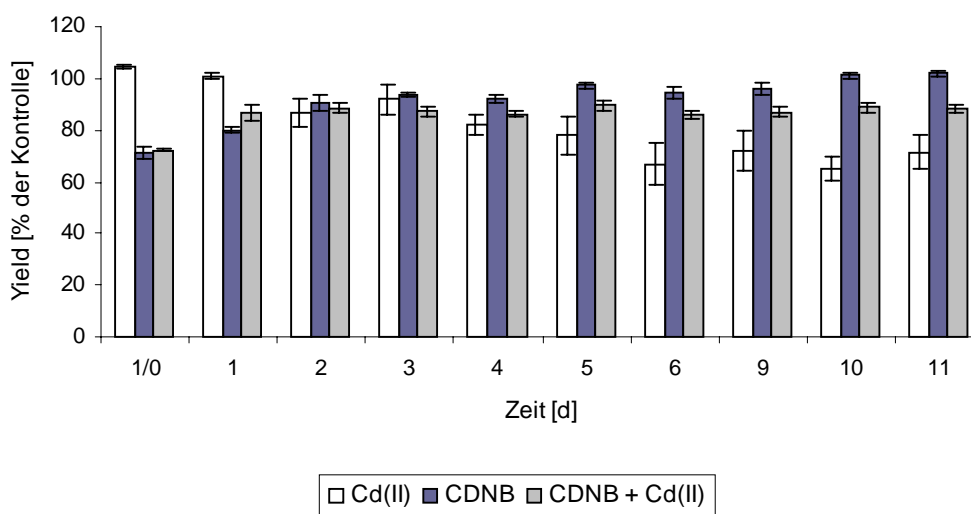
Aufgrund der starken Schädigungen des Moores durch Cd(II) und die Organika wurde Pflanzenmaterial in einem zweiten Versuch erst einen Tag mit 10  $\mu\text{M}$  CDNB bzw. NEM und 25 bzw. 50  $\mu\text{M}$  Metolachlor kultiviert. Dann erfolgte die Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Cd(II) (Kap. 2. 3. 3 und 2. 4. 6) – Messpunkt 1 d/0 d. Durch die Belastung mit Cd(II) sank die Vitalität signifikant auf 87 % der Kontrolle (2. Tag) bzw. 72 % zum Versuchsende (Abb. 47 und 48) ab.

Bei Belastung mit NEM (Abb. 47) kam es innerhalb eines Tages zu einer signifikanten Abnahme der Vitalität auf ca. 64 % der Kontrolle (1/0 d). Sie stieg ab dem 1. Tag wieder signifikant an und erreichte am 1. Tag 90 %, am 5. Tag 100 % der Kontrolle. Auch nach Cd(II)-Zugabe erfolgte ein signifikanter Wiederanstieg der Vitalität, jedoch erst ab dem 2. Tag (65 %) nach Cd(II)-Zugabe. 100 % wurden nicht erreicht, zum Versuchsende lag die Vitalität bei 75 % der Kontrolle.

Bei Exposition mit 10  $\mu\text{M}$  CDNB (Abb. 48) kam es innerhalb von einem Tag zu einem Vitalitätsverlust auf ca. 71 % der Kontrolle (1/0 d). Auch bei diesem Versuch stieg die Vitalität wieder an und erreichte am 2. Tag 90 % der Kontrolle. 100 % der Kontrolle wurden am 10. Tag gemessen. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Cd(II) war ein Anstieg der Vitalität zu erkennen. Er war jedoch nicht so groß wie bei den Proben, die nur mit CDNB belastet waren. Am 2. Tag waren 89 % der Kontrolle erreicht, dieser Wert blieb bis zum Versuchsende relativ konstant. 100 % Vitalität wurden nicht erreicht.



**Abb. 47.** Vitalität von *Fontinalis antipyretica* nach eintägiger Belastung mit 10 µM NEM und folgender Zugabe von 50 µM Cd(II) (n = 5).



**Abb. 48.** Vitalität von *Fontinalis antipyretica* nach eintägiger Belastung mit 10 µM CDNB und folgender Zugabe von 50 µM Cd(II) (n = 5).

25 bzw. 50 µM Metolachlor hatten keinen Einfluss auf die Vitalität des Mooses (nicht dargestellt, Rohdaten siehe Anhang A, Tab. 12). Bei gleichzeitiger Belastung mit Cd(II) kam es zu einer Abnahme dieses Parameters. Die Werte entsprachen ungefähr denen, die bei diesem Versuch bei der Cd(II)-Probe gemessen wurden. Am 2. Tag nach Zugabe von Cd(II) lag die Vitalität bei 86 % (25 µM Metolachlor + Cd(II)) bzw. bei 91 % (50 µM Metolachlor + Cd(II)). Bei der Cd(II)-Probe waren es 87 %. Zum Versuchsende wurden 64 % bzw. 70 % (25 µM bzw. 50 µM Metolachlor + Cd(II)) gemessen, bei der Cd(II)-Probe waren es 72 %.

## 4 Diskussion

### 4. 1 Schwermetallakkumulation durch *Fontinalis antipyretica*

#### 4. 1. 1 Akkumulation von Cd(II), Zn(II) und Pb(II) durch *Fontinalis antipyretica*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Akkumulation der Schwermetalle Cd(II), Zn(II) und Pb(II) untersucht, wobei das Wassermoos *Fontinalis antipyretica* mit unterschiedlichen Konzentrationen exponiert und die Adsorption an die Blattoberfläche und die Aufnahme in die Zellen bestimmt wurden (Kap. 3. 1).

Bei allen Schwermetallen kam es, unabhängig von der zugegeben Konzentration an Schwermetall, zu einer schnellen extrazellulären Biosorption an die Blattoberfläche in den ersten Minuten (Abb. 11-13, 16-19). Ähnliche Befunde erhielten Al-Asheh und Duvnjak (1997), die die Adsorption von Cu(II), Zn(II), Cd(II), Cr(III) bzw. Ni(II) an die Oberfläche eines Moosgemisches aus 7 Arten von terrestrischen Moosen eines sehr humiden Standortes (Kanada, Quebec) untersuchten. Wells und Brown (1987) stellten fest, dass bei der Adsorption von Cd(II) beim Moos *Rhytidiadelphus squarrosus* nach 30 Minuten ein Gleichgewicht zwischen dem Cd(II)-Gehalt der Lösung und der Moosoberfläche erreicht wurde.

Vergleicht man extra- und intrazellulären Anteil bei Belastung von *Fontinalis antipyretica* mit Cd(II) und Zn(II) (Kap. 3. 1. 1, Abb. 11, 12 und Kap. 3. 1. 2, Abb. 16, 17), stellt man fest, dass eine relativ große Menge des ins Medium gegebenen Metalls biosorbiert wird. Die Adsorption der positiv geladenen Schwermetallionen kann bei verschiedenen Moosarten an negativ geladene Gruppen von polymeren Molekülen der Zellwand erfolgen. Diese Polymere wirken wie schwache Kationenaustauscher (Greger, 1999). So wird für Wassermoose eine Wechselwirkung mit der Polygalacturonsäure diskutiert (Brown, 1982). Sie besitzt ein Polysaccharid-Rückgrat mit freien Carboxylgruppen, welche im deprotonierten Zustand Bindestellen für Schwermetalle darstellen (Buffle, 1988). Vázquez et al. (1999) folgerten aus ähnlichen Ergebnissen von Studien zur Schwermetall-Akkumulation der Moose *Fontinalis antipyretica*, *Fissidens polyphyllus* und *Scapania undulata*, dass Bryophyten eine große Anzahl von Kationen-Bindungsstellen auf der Oberfläche besitzen, was eine Anpassung an das wässrige Milieu darstellt, in dem die Konzentration an Schwermetallen extrem hoch sein kann (Förstner und Wittmann, 1979). Extrazellulär gebundene Schwermetalle dürften einen geringeren Einfluss auf den pflanzlichen Metabolismus haben als aufgenommene Ionen. Vazquez et al. (1999) führten die Versuche zur Schwermetall-Akkumulation jedoch nur über einen Zeitraum von 60 Minuten durch. Da die intrazelluläre Aufnahme viel langsamer

verläuft als die Biosorption, ist der Anteil von Schwermetallen in den Zellen nach dieser Zeit entsprechend gering.

Im Gegensatz zu diesen Aussagen wurde bei den Experimenten in der vorliegenden Arbeit im Versuchsverlauf von 10 Tagen bei Cd(II) und Zn(II) eine kontinuierliche Aufnahme des Schwermetalls gemessen. Weiterhin wurde bei beiden Schwermetallen in einem Konzentrationsbereich zwischen 25 und 500  $\mu\text{M}$  eine Abnahme der extrazellulären Schwermetall-Fraktion gefunden (Abb. 11-13, 16, 17). Sie war für Cd(II) deutlicher ausgeprägt als für Zn(II). Da die Konzentration des Schwermetalls im Medium trotz dieser Abnahme nicht wieder anstieg, teilweise sogar geringer wurde, ist auf eine Depotfunktion der Moosoberfläche für diese beiden Elemente zu schließen, von der aus die Aufnahme ins Zellinnere erfolgen könnte. Dies würde bedeuten, dass an die Oberfläche gebundene Metalle durchaus mobil sind und nach Aufnahme in die Mooszellen toxische Wirkungen zeigen können. Eine mögliche Depotfunktion der Moosoberfläche für Ionen könnte auch eine Rolle bei der Versorgung der Pflanzen mit essentiellen Elementen spielen. Eine weitere Bestätigung dieser Hypothese wurde durch das Absetzen der Cd(II)-Belastung erbracht, die unter Kap. 4. 1. 2 näher diskutiert wird.

Anders als Cd(II) und Zn(II) zeigte sich das Akkumulationsverhalten von Pb(II). Zwar kam es auch bei 100  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  Pb(II) innerhalb der ersten 10 Minuten zu einer schnellen Biosorption einer relativ großen Menge des wiedergefundenen Schwermetalls (60-70 %, Kap. 3. 1. 3, Abb. 18, 19 B, C/E), jedoch wurde gleichzeitig eine entsprechend hohe Menge aufgenommen (ca. 40 %). Bei Belastung mit 25  $\mu\text{M}$  wurde sogar weniger biosorbiert (ca. 30 %) als intrazellulär angereichert (60 %) (Abb. 19 A/D). Der intrazelluläre Anteil blieb dann bei allen Pb(II)-Konzentrationen über den gesamten Versuchszeitraum relativ konstant, der extrazelluläre Anteil nahm wieder etwas ab, einhergehend mit einer Erhöhung des Pb(II)-Gehaltes im Medium. Daraus kann man folgern, dass trotz der schnellen Aufnahme einer bestimmten Menge von Pb(II), die extrazelluläre Fraktion relativ immobil ist und nicht ins Innere transportiert wird. Wells und Brown (1987) zeigten, dass extrazelluläres Cd(II) bei *Rhytidiadelphus squarrosus* durch eine Pb(II)-Lösung abgelöst werden kann. Dieser Befund weist auf die höhere Affinität von Pb(II) zu den Kationen-Bindungsstellen der Zellwand hin.

Je größer die Konzentration des Schwermetalls im Nährmedium war, desto höher war auch der extrazelluläre Anteil (Abb. 13, 17, 19). Man kann somit bei der Biosorption von Schwermetallen durch *Fontinalis antipyretica* von einem konzentrationsabhängigen Prozess ausgehen. Ähnliche Befunde findet man bei anderen Studien zur Akkumulation von Schwermetallen durch aquatische und terrestrische Moose (Al-Asheh und Duvnjak, 1997; Vázquez et al., 1999), aber auch bei der Untersuchung der Schwermetalladsorption durch



andere Biosorbentien, wie Teeblätter (Singh et al. 1993) oder Buchenblätter (Salim et al., 1992).

Unterschiede zwischen den Metallen bestanden jedoch in der Höhe der adsorbierten Mengen. Vergleicht man den extrazellulären Gehalt bei Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Schwermetalls (Abb. 11 B, 16, 18), findet man in den ersten Stunden bei Cd(II) eine Adsorption relativ großer Mengen, wobei maximal 7,4  $\mu\text{mol/g}$  FM nach 4 Stunden gemessen wurden. Der Maximalwert der Adsorption bei Zn(II) war mit 4,6  $\mu\text{mol/g}$  FM nach 4 Stunden und bei Pb(II) mit 3,8  $\mu\text{mol/g}$  FM nach 20 Minuten deutlich geringer. Jedoch muss beachtet werden, dass die Wiederfindung von Pb(II) zu diesem Zeitpunkt bei nur 65 % lag, die Wiederfindung von Cd(II) und Zn(II) dagegen bei 122 % bzw. 83 %. Der biosorbierte Anteil ist aber abhängig von der Konzentration des Metalls im Medium. Rechnet man nun die extrazellulären Werte auf 100 % Wiederfindung, d. h. auf genau 100  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Schwermetalls um, erhält man nachstehende extrazelluläre Anteile: Cd(II) – 6,1  $\mu\text{mol/g}$  FM, Pb(II) - 5,9  $\mu\text{mol/g}$  FM, Zn(II) - 5,6  $\mu\text{mol/g}$  FM. Die Reihenfolge der Biosorptions-Kapazität bei Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Schwermetalls lässt sich damit wie folgt festlegen: Cd(II) > Pb(II) > Zn(II). Beachtet man die Standardabweichungen der Versuche, die beim extrazellulären Anteil bis zu 18 % betragen, darf man diese relativ geringen Unterschiede aber nicht überbewerten. So konnte lediglich für die Werte von Cd(II) und Zn(II) ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Vergleich von Cd(II)/Pb(II) bzw. Pb(II)/Zn(II) ergab keine signifikante Differenz. Stellt man weiterhin die Mengen jeweils eines Zeitpunktes gegenüber und rechnet man diese auf 100 % Wiederfindung hoch, so kann man erkennen, dass in den ersten 30 Minuten Pb(II) > Cd(II) > Zn(II) gilt, was für eine sehr schnelle Biosorption von Pb(II) spricht. Nach 4 Stunden findet man Cd(II) > Zn(II) > Pb(II). Diese Reihenfolge änderte sich aufgrund der unterschiedlichen Schwankungen des extrazellulären Anteiles über 10 Tage immer wieder. Bei Exposition mit 25  $\mu\text{M}$  des Schwermetalls findet man, bei Umrechnung auf 100 % Wiederfindung, die geringste Adsorptionskapazität für Pb(II) (Abb. 13 A/D, 17 A/D, 19 A/D). Aufgrund der schnellen und extrem hohen Aufnahme von Pb(II) ins Zellinnere wurde hier nur sehr wenig adsorbiert - 20-30 % des insgesamt wiedergefundenen Pb(II), i. e. nach Umrechnung auf 100 % Wiederfindung ca. 0,5 – 0,7  $\mu\text{mol/g}$  FM. Die extrazellulären Gehalte von Cd(II) bzw. Zn(II) waren mit 51 – 80 % bzw. 47 – 68 % deutlich höher. Die zugehörigen Absolutwerte lagen nach Umrechnung auf 100 % bei 1,3 – 2,0  $\mu\text{mol Cd(II)/g}$  FM bzw. 1,2 – 1,6  $\mu\text{mol Zn(II)/g}$  FM. Sie sind sich relativ ähnlich, so dass für geringere Konzentrationen gilt: Cd(II)  $\geq$  Zn(II) > Pb(II). Breuer und Melzer (1990) untersuchten die Kationenaustausch-Kapazität dreier Arten von *Sphagnaceae*. Nach Exposition mit jeweils 10  $\mu\text{M}$  Schwermetall-Lösung erhielten sie

eine höhere Akkumulationskapazität für Pb(II) als für Cd(II). Beachtet werden muss jedoch die völlig unterschiedliche Probenbehandlung durch die Autoren, auf die die Differenzen im Vergleich mit *Fontinalis antipyretica* zurückgeführt werden müssen. Während in der zitierten Arbeit die Versuche mit getrocknetem Moos durchgeführt wurden und nur eine Summenabschätzung der Kationenaustausch-Kapazität der drei Arten gemessen werden konnte, wurden in der vorliegenden Arbeit extra- und intrazellulärer Anteil in Frischmaterial separat untersucht. Hinzu kommt möglicherweise eine unterschiedliche Zusammensetzung der Zellwand in Bezug auf kationenbindende Gruppen auf der Moosoberfläche, die das unterschiedliche Adsorptionsvermögen hervorrufen könnte.

Bei Belastung mit 500  $\mu\text{M}$  fanden wir für Pb(II) die größte Kapazität zur Schwermetall-Adsorption: Pb(II) > Cd(II) > Zn(II), wobei der Unterschied von Pb(II) zu den anderen Schwermetallen bis zu 4 Stunden relativ groß war. So wurden bei Pb(II) maximal 71 % des wiedergefundenen Pb(II) adsorbiert, bei Cd(II) bzw. Zn(II) waren es maximal 56 % bzw. 44 % (Abb. 13 C/F, 17 C/E, 19 C/E).

Vázquez et al. (1999) führten Untersuchungen zur Biosorption und Aufnahme verschiedener Schwermetalle mit drei Moosarten (*Fontinalis antipyretica*, *Scapania undulata*, *Fissidens polyphyllus*) durch. Der ausgewählte Konzentrationsbereich beinhaltet auch die in dieser Arbeit untersuchten Konzentrationen, so dass Vergleiche der Biosorption durch *Fontinalis antipyretica* möglich sind. Nach 60minütiger Exposition mit 0-200 ppm des jeweiligen Schwermetalls fanden die Autoren für alle Spezies folgende Reihenfolge der Biosorption: Pb(II) > Cd(II) > Zn(II). In der vorliegenden Arbeit veränderte sich die Adsorptionskapazität von *Fontinalis antipyretica* in Abhängigkeit von der Konzentration der Schwermetalle. Unterschiede in der Adsorptionskapazität bei Pflanzen derselben Art, wie sie bei diesem Vergleich festgestellt wurden, können zum einen durch verschiedene Umweltparameter des Probenahmestandortes zustande kommen. Faktoren wie Lichtintensität, Wassertemperatur und pH-Wert können die Zellwandzusammensetzung und somit die Anzahl von Kationen-Bindungsstellen beeinflussen. So fanden Breuer und Melzer (1990) eine Abhängigkeit der Kationenaustausch-Kapazität von *Sphagnum*-Arten von der Humidität des Standortes. Andererseits können andere Kationen, die in Abhängigkeit von der Stoffzusammensetzung des Wassers am Standort in unterschiedlichen Konzentrationen auf der Moosoberfläche abgelagert sind, die Adsorption und die Aufnahme von Cd(II), Pb(II) oder Zn(II) beeinflussen (Wells und Brown, 1987; Gjengedal und Steinnes, 1990). Wells und Brown (1987) fanden weiterhin einen Zusammenhang zwischen der Größe der Zellwand, d. h. der Anzahl der Bindestellen und der Geschwindigkeit der Adsorption von Cd(II) durch das Moos *Rhytidiadelphus squarrosus*.

Trotz der Konzentrationsabhängigkeit der Biosorption von Schwermetallen durch *Fontinalis antipyretica* waren Unterschiede in der Höhe der extrazellulären Fraktionen bei unterschiedlichen Konzentrationen der Schwermetalle zu erkennen (Kap. 3. 1. 1-3). Das könnte eine Ursache für die Veränderung der Adsorptionskapazität bei höheren Schwermetall-Konzentrationen sein.

Bei geringeren Konzentrationen (25  $\mu\text{M}$ ) kam es in den ersten Stunden bei Belastung von *Fontinalis antipyretica* mit Cd(II) zur Biosorption eines relativ hohen Anteils des insgesamt wiedergefundenen Cd(II) von 76 % (Abb. 13 A). Dieser Anteil lag bei Cd(II)-Konzentrationen von 100, 200 bzw. 400  $\mu\text{M}$  etwas niedriger bei ähnlichen Anteilen von 55, 54, bzw. 49 % (Abb. 12 B, 13 B, C). Innerhalb von 2 Tagen glich sich der extrazelluläre Anteil bei allen Konzentrationen an und erreichte Werte zwischen 45 und 53 % des gesamt wiedergefundenen Cd(II). Vergleicht man die Absolutmengen, kann man feststellen, dass bei Verdopplung der Konzentration von Cd(II) im Medium eine doppelt so große Menge adsorbiert wurde (Abb. 11 B, 13 D, E, F). Eine Sättigung der Oberfläche mit Cd(II) wird im Konzentrationsbereich von 25 bis 400  $\mu\text{M}$  Cd(II) nicht erreicht. Die starke Abnahme des extrazellulären Anteiles bei 25  $\mu\text{M}$  Cd(II) im Gegensatz zu höheren Konzentrationen, lässt sich wieder mit einer möglichen Depotfunktion der Oberfläche für Cd(II) erklären. Durch die Adsorption von Cd(II) verringert sich die Konzentration von Cd(II) im Medium bei 25  $\mu\text{M}$  stärker als bei höheren Konzentrationen, so dass die Aufnahme des Schwermetalls von der Oberfläche ins Zellinnere deutlicher wird und sich in einer stärkeren Abnahme dieser Fraktion ausdrückt.

Bei Belastung von *Fontinalis antipyretica* mit 25  $\mu\text{M}$  Zn(II) kam es ähnlich Cd(II) in den ersten 4 Stunden zur Adsorption eines relativ hohen Anteils von 68 % des insgesamt wiedergefundenen Zn(II) (Abb. 17 A). Bei Exposition mit 100 bzw. 500  $\mu\text{M}$  Zn(II) wurden in den ersten 4 Stunden 56 % bzw. 44 % adsorbiert (Abb. 17 B, C), wiederum mit Cd(II) vergleichbare Werte. Im Gegensatz zur Belastung mit Cd(II) war die Abnahme der extrazellulären Fraktion im Versuchsverlauf bei Zn(II) jedoch nicht so groß. Nach 10 Tagen waren noch 53 % (25  $\mu\text{M}$ ), 46 % (100  $\mu\text{M}$ ) und 37 % (500  $\mu\text{M}$ ) biosorbiert. Zwar sind die Absolutmengen bei Exposition mit 500  $\mu\text{M}$  Zn(II) größer als bei 25 oder 100  $\mu\text{M}$ , jedoch ist hier eine gewisse Sättigung der Oberfläche zu erkennen, da bei 500  $\mu\text{M}$  nicht mehr das 20- bzw. 5fache der geringeren Konzentrationen biosorbiert wird (Abb. 16, 17 D, E). So lag nach Umrechnung auf 100 % Wiederfindung der extrazelluläre Zn(II)-Gehalt nach 10 Tagen bei 1,32  $\mu\text{mol/g}$  FM (25  $\mu\text{M}$ ), 4,56  $\mu\text{mol/g}$  FM (100  $\mu\text{M}$ ) und 18,7  $\mu\text{mol/g}$  FM (500  $\mu\text{M}$ ). Verglichen mit 25  $\mu\text{M}$  wird bei 100  $\mu\text{M}$  noch das 3,5fache, bei 500  $\mu\text{M}$  nur das 14fache adsorbiert.

Die Ursache für einen gewissen Sättigungseffekt bei diesem essentiellen Schwermetall könnte darin liegen, dass am natürlichen Standort Zn(II) aus dem Wasser an die Oberfläche adsorbiert wurde, so dass Zn(II)-Bindungsstellen besetzt sind. Bei Kontrollpflanzen, die ohne Zn(II) inkubiert wurden, konnte jedoch mittels Flammen-AAS kein extrazelluläres Zn(II) gemessen werden. Elektronenmikroskopische Messungen bestätigen aber das Vorhandensein von Zn(II) auf der Moosoberfläche (Kap. 3. 4. 1, Abb. 36). Daraus lässt sich folgern, dass die natürliche extrazelluläre Zn(II)-Konzentration sehr niedrig ist und unter der Nachweisgrenze der AAS-Methode von ca. 0,09  $\mu\text{mol/g}$  FM (nach DIN 32645) liegt. Es ist anzunehmen, dass diese geringen Mengen an Zn(II) die Adsorption des Schwermetalls nicht nachhaltig beeinflussen. Gstoettner und Fisher (1997) beschrieben bei der Verwendung von mikro- bzw. millimolaren Konzentrationen an Schwermetallen eine Hemmung der Biosorption durch Kationen, wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  beim Torfmoos *Sphagnum papillosum*. Pickering und Puia (1969) zeigten die kompetitive Hemmung der Akkumulation von  $\text{Ca}^{2+}$  und Zn(II) bei *Fontinalis antipyretica*. So könnten auch andere Elemente die Adsorption von Zn(II) beeinflussen. Auch  $\text{Ca}^{2+}$  wurde elektronenmikroskopisch auf der Blattoberfläche des Moores nachgewiesen (Kap. 3. 4. 1, Abb. 36). In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche zur Akkumulation unter Verwendung von Knop-Nährmedium durchgeführt, welches Ionen, wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{K}^+$  enthält. Auch diese könnten die Zn(II)-Adsorption beeinflussen. Da jedoch die Kultivierungsbedingungen für alle Versuche konstant gehalten wurden, müsste der Einfluss dieser Elemente auf die Adsorption aller untersuchten Schwermetalle gleich sein und dürfte für Differenzen im Akkumulationsvermögen nicht verantwortlich sein.

Auch bei der Exposition mit Pb(II) erfolgte die Biosorption konzentrationsabhängig (Abb. 19). Aufgrund der sinkenden Wiederfindung von Pb(II) mit steigender Konzentration im Medium (25  $\mu\text{M}$  – 89 %, 100  $\mu\text{M}$  - 62 %, 500  $\mu\text{M}$  – 37 %) lassen sich mit den Messwerten nur schwer Rückschlüsse auf eine mögliche Sättigung der Oberfläche mit Pb(II)-Ionen ziehen. Ohne eine Umrechnung der Werte auf 100 % erkennt man dennoch einen Unterschied zu Cd(II) und Zn(II). Im Bereich zwischen 25  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Pb(II) stieg der Anteil des extrazellulären Pb(II) mit steigender Konzentration des Schwermetalls im Medium stärker an als bei Cd(II) oder Zn(II)-Exposition. Während bei Belastung mit 25  $\mu\text{M}$  maximal 29 % des gesamt wiedergefundenen Pb(II) extrazellulär zu finden war, lag dieser Anteil bei 100  $\mu\text{M}$  Pb(II) bei 59 %. Vergleicht man die Absolutmengen wird bei 100  $\mu\text{M}$  Pb(II) im Gegensatz zu 25  $\mu\text{M}$  Pb(II) das ca. 5-7fache adsorbiert. Nach 10 Tagen und Umrechnung auf 100 % Wiederfindung betrug der extrazelluläre Pb(II)-Gehalt bei 25  $\mu\text{M}$  0,53  $\mu\text{mol/g}$  FM, bei 100  $\mu\text{M}$  3,9  $\mu\text{mol/g}$  FM und bei 500  $\mu\text{M}$  21,6  $\mu\text{mol/g}$  FM. So wurde, verglichen mit 25  $\mu\text{M}$ , das ca. 7- bzw. 41fache adsorbiert. Bei Cd(II) war es beim Vergleich von 25 und 100  $\mu\text{M}$  das

4fache. Bei Exposition mit 500  $\mu\text{M}$  Zn(II), bei der es zu einer gewissen Sättigung der Oberfläche kam, wurde, verglichen mit der Adsorption bei 25  $\mu\text{M}$  Zn(II) teilweise nur das 13fache biosorbiert. Vergleicht man jedoch die prozentualen Anteile und die Absolutmengen bei Exposition mit 100 und 500  $\mu\text{M}$  Pb(II), muss man feststellen, dass hier das ca. 5fache adsorbiert wird, ähnlich wie bei Cd(II). Die Ursache für diese Veränderung könnte in der schnellen intrazellulären Aufnahme von Pb(II) liegen. Dadurch steht der Moosoberfläche bei der geringen Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  entsprechend weniger Pb(II) zur Adsorption zur Verfügung als es bei höheren Konzentrationen der Fall ist. Durch diese Unterschiede in der Höhe der Schwermetall-Adsorption zwischen Cd(II), Zn(II) und Pb(II) lässt sich auch die bereits beschriebene Veränderung der Adsorptionskapazität bei höheren Schwermetall-Konzentrationen erklären.

Eine Sättigung der Moosoberfläche war für Cd(II) und Pb(II) nicht zu beobachten, was darauf hinweist, dass bereits am Standort biosorbiertes Zn(II) die Adsorption von Cd(II) und Pb(II) nicht beeinflusst. Ob ein Ion an die auf der Oberfläche vorhandenen Bindungsstellen angelagert wird, hängt von vielen Faktoren ab. Einerseits von der Affinität zur Akzeptor-Gruppe, verglichen mit der anderer Ionen, die in Lösung oder auf der Oberfläche vorkommen (Brown, 1982). Andererseits bewirkt eine pH-Erniedrigung eine Protonierung der Carboxyl-Gruppen der Polygalacturonsäuren, was wiederum eine Dissoziation von Ionen zur Folge hat. Gstoettner und Fisher (1997) stellten fest, dass die Adsorption bei geringen Schwermetall-Konzentrationen ( $10^{-7}$  bis  $10^{-10}$  M) im Gemisch mit mehreren Metallionen ähnlich der von Lösungen mit nur einem Metall war. Bei der Verwendung höherer Konzentrationen ( $\mu\text{M}$  oder mM) kann es zur Hemmung der Biosorption durch Kationen, wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  kommen. Rühling und Tyler (1970) fanden bei *Hylocomium splendens* eine höhere Sorptionsfähigkeit für Pb(II) verglichen mit Zn(II). Gagnon et al. (1998) beschrieben einen negativen Einfluss der Wasserhärte (Gehalt an  $\text{CaCO}_3$ ) auf die Akkumulation und Eliminierung von Cd(II) bei zwei aquatischen Moosen (*F. dalecarlica* und *P. riparioides*).

Da in der vorliegenden Arbeit mit Freilandmaterial gearbeitet wurde, waren in Abhängigkeit von der Jahreszeit unterschiedliche Mengen an Elementen auf der Blattoberfläche zu finden (Kap. 3. 4. 1). Das könnte die Adsorption der Schwermetalle zusätzlich unterschiedlich beeinflussen. Die Abschätzung und der Vergleich der Adsorptionskapazität des Moores für Cd(II), Zn(II) und Pb(II) ist somit sehr schwierig.

Die Aufnahme von Cd(II) und Zn(II) ins Zellinnere erfolgte bei allen Versuchen langsamer als die Biosorption, jedoch kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum (Abb. 11-13, 16, 17). Im Gegensatz dazu kam es bei der Exposition mit Pb(II) bei allen Konzentrationen zu einer schnellen Aufnahme des Schwermetalls innerhalb von 10 Minuten (Abb. 18, 19). Dieser

Wert stieg dann nur noch leicht an und blieb über 10 Tage relativ unverändert. Unabhängig von der Art des Schwermetalls stieg die intrazelluläre Aufnahme mit steigender Schwermetallkonzentration des Nährmediums. Ähnliche Aussagen findet man bei Vázquez et al. (1999) und Pickering und Puia (1969).

In der vorliegenden Arbeit waren nach 10 Tagen bei Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  des Schwermetalls 3,59  $\mu\text{mol Pb(II)/g FM}$ , 4,53  $\mu\text{mol Cd(II)/g FM}$  bzw. 3,15  $\mu\text{mol Zn(II)/g FM}$  intrazellulär zu finden (Abb. 11 B, 16, 18). Nach Umrechnung auf 100 % Wiederfindung lässt sich für die Aufnahmekapazität anhand der Ergebnisse folgende Reihenfolge festlegen:  $\text{Pb(II)} > \text{Cd(II)} \geq \text{Zn(II)}$ . Bei Belastung mit 25 und 500  $\mu\text{M}$  und Umrechnung der Absolutwerte von Pb(II) auf 100 % ergab sich:  $\text{Pb(II)} \gg \text{Cd(II)} \geq \text{Zn(II)}$ . So wurden innerhalb von 3 Tagen bei Belastung mit 25  $\mu\text{M}$  1,8  $\mu\text{mol Pb(II)/g FM}$ , 0,85  $\mu\text{mol Cd(II)/g FM}$  und 0,74  $\mu\text{mol Zn(II)/g FM}$  aufgenommen. Bei Exposition mit 500  $\mu\text{M}$  lagen diese Werte nach 2 Tagen bei 23,8  $\mu\text{mol Pb(II)/g FM}$ , 7,8  $\mu\text{mol Cd(II)/g FM}$  und 6,6  $\mu\text{mol Zn(II)/g FM}$ .

Die Ergebnisse der Biosorption und Aufnahme von Schwermetallen durch *Fontinalis antipyretica* lassen die Schlussfolgerung zu, dass das Akkumulationsverhalten von Cd(II) und Zn(II) auch in bezug auf deren Mobilität ähnlich ist, während vor allem die Aufnahme von Pb(II) deutliche Unterschiede aufweist. Extrazellulär gebundenes Pb(II) scheint immobil zu sein als die beiden anderen Schwermetalle, es wird nicht deutlich ins Zellinnere aufgenommen. Eine hohe Affinität von Pb(II) zu den Bindungsstellen der Oberfläche von Moosen wird von vielen Autoren beschrieben (Rühling und Tyler, 1970; Wells und Brown, 1987; Vázquez et al., 1999).

Bei der Belastung mit Cd(II) kommt es bereits bei geringen Konzentrationen von 25-50  $\mu\text{M}$  zu einer Erhöhung des Glutathion-Gehaltes (Bruns, 1997). So wurde in der vorliegenden Arbeit eine Erhöhung des GSH-Spiegels nach eintägiger Belastung mit 25  $\mu\text{M}$  Cd(II) auf das 3,5fache des Ausgangsgehaltes gemessen (nicht dargestellt). Die zugehörige intrazellulär wirksame Cd(II)-Konzentration betrug 0,61  $\mu\text{mol/g FM}$ . Bei der Exposition mit Zn(II) kam es erst bei 500  $\mu\text{M}$  Zn(II) zu einem Anstieg von GSH. Er begann nach 2 Tagen und erreichte am 3. Tag mit 0,41  $\mu\text{mol/g FM}$  das maximal 2,3fache des Ausgangsgehaltes. Der intrazelluläre Zn(II)-Gehalt lag zu diesem Zeitpunkt bei 9,5  $\mu\text{mol/g FM}$ . Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass das essentielle Element Zn(II) von den Pflanzen wahrscheinlich in größerem Maße toleriert werden kann, ohne dass die Biosynthese von GSH, dem eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von Schwermetallen in *Fontinalis antipyretica* zugeschrieben wird, erhöht wird.

Bei Belastung mit Pb(II) wurde bei allen Konzentrationen eine Erhöhung des GSH-Spiegels gemessen. Hier stieg die GSH-Konzentration auf das ca. 2fache (25  $\mu\text{M}$ ), 5fache (100  $\mu\text{M}$ )

bzw. 4fache (500  $\mu\text{M}$ ) des Ausgangsgehaltes. Die GSH-Erhöhung begann bei Belastung mit 25  $\mu\text{M}$  Pb(II) nach 2 Tagen. Beachtet werden muss, dass im Gegensatz zu Cd(II) eine bis zu 3fache Menge an Pb(II) aufgenommen wurde. So lag der intrazelluläre Pb(II)-Gehalt nach 2tägiger Belastung mit 25  $\mu\text{M}$  bei 1,8  $\mu\text{mol/g}$  FM, der von Cd(II) bei 0,75  $\mu\text{mol/g}$  FM. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Pflanzen im Vergleich mit Pb(II) schon bei geringeren intrazellulären Konzentrationen an Cd(II) mit einer Erhöhung des GSH-Pools reagieren.

#### **4. 1. 2 Cd(II)-Akkumulation durch *Fontinalis antipyretica* nach Absetzen der Cd(II)-Belastung**

Bei Belastung mit Cd(II) könnte die intrazelluläre Aufnahme des Schwermetalls nach Absättigen der Bindungsstellen auf der Oberfläche der Moospflanze zum einen direkt aus dem Medium, zum anderen von der Oberfläche aus erfolgen. Letzterer Mechanismus würde eine Depotfunktion der Moosoberfläche für Schwermetalle bedeuten. Erste Untersuchungen dazu wurden von Bruns et al. (2000b) durchgeführt. Hier stieg der GSH-Spiegel trotz Entfernen des Cd(II) aus dem Nährmedium weiter an. Diese Reaktion deutet auf eine fortlaufende Aufnahme von Cd(II) ins Zellinnere hin, die in diesem Fall nur von der Oberfläche aus geschehen kann.

Für unsere Untersuchungen wurde das Cd(II)-haltige Medium nach 2 h gegen Cd(II)-freies Medium ausgetauscht. Wie in Kap. 3. 1. 1 beschrieben, war innerhalb dieses Zeitraumes das Gleichgewicht zwischen den Cd(II)-Ionen des Mediums und der Blattoberfläche eingestellt. Vor Zugabe der Cd(II)-freien Lösung wurde das Moos mit 100 mL bidestilliertem Wasser gewaschen, um sicherzugehen, dass nur an die Oberfläche sorbierte Ionen zur Aufnahme beitragen. Innerhalb der ersten 3 h nach dem Austausch des Mediums kam es dennoch zu einer Abgabe von Cd(II)-Ionen ins Medium. Im Laufe des Versuches nahmen der Anteil von Cd(II) im Medium, aber auch der extrazelluläre Cd(II)-Gehalt der Oberfläche ab, während die intrazelluläre Cd(II)-Fraktion kontinuierlich anstieg (Abb. 23). Dies spricht für eine Depotfunktion der Oberfläche von *Fontinalis antipyretica* für Cd(II), von der aus der Transport des Schwermetalls ins Zellinnere erfolgen kann.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass den Kationen-Bindestellen der Moosoberfläche, z. B. den Polygalacturonsäuren, eine wichtige Funktion in der Versorgung der Zellen mit essentiellen Schwermetallen, wie Zn(II), Mn(II) und Fe(III) und anderen Ionen, wie Mg(II) und Ca(II) zukommt. Brown (1982) nahm an, dass an die Oberfläche von Bryophyten gebundene Ionen immobilisiert sind und nicht ins Innere aufgenommen werden. Seine Aussage, dass nur eine Aufnahme von Nährstoffen und Metallen erfolgen kann, wenn sich

diese im Medium und nicht an der Oberfläche der Moose befinden, konnte durch die Experimente der vorliegenden Arbeit widerlegt werden.

#### 4. 1. 3 Vergleich der Cd(II)-Akkumulation verschiedener Arten der Gattung *Fontinalis*

Das Wassermoose *Fontinalis* besitzt beblätterte Stämmchen und Rhizoide, mit denen eine Verankerung an Steinen oder Hölzern in Fließgewässern erfolgt. Frahm und Frey (1987) und Pascher (1931) beschreiben breite, eiförmige bis schmale, lanzettliche Blätter, die gekielt, konkav oder fast flach sein können. Nach diesen Autoren konnte das Moos aus der Wipper und der Helbe als *Fontinalis antipyretica* klassifiziert werden, da bei dieser Art eine deutliche Kielung der Blätter zu sehen war. Die Einordnung des kanadischen Moores (Standort: Allen Creek, New Brunswick) war jedoch schwieriger, da man aufgrund der sehr schmalen Blätter dieser Pflanze den Blattkiel oft nicht eindeutig erkennen konnte. Auch in der Literatur ist die Einordnung umstritten, da es keine Genomanalysen gibt (Ireland, 1982). Besitzen die Blätter einen Kiel könnte es als *Fontinalis antipyretica* der Varietät *gracilis* eingeordnet werden. Ist jedoch keine Kielung vorhanden, könnte es als eigene Art - *Fontinalis dalecarlica* - klassifiziert werden. Pascher (1931) beschreibt zwischen beiden Pflanzen eine gewisse Ähnlichkeit, da bei *Fontinalis antipyretica* der Varietät *gracilis* die Kielfalte oft undeutlich entwickelt ist. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Art konnte jedoch von Miersch (2000, Halle) nach Ireland (1982) als *Fontinalis dalecarlica* eingeordnet werden. In Abb. 49 sind beide Arten dargestellt.



**Abb. 49.** Habitusbild verschiedener Arten des Wassermoores *Fontinalis*. **A** *Fontinalis dalecarlica*, **B** *Fontinalis antipyretica*.



*Fontinalis dalecarlica* zeichnet sich durch eine sehr schlanke Form aus, mit schlanken Ästen und sehr schmalen, hohlen Blättern. *Fontinalis antipyretica* ist durch eine deutlich stärkere Wuchsform charakterisiert, die Äste sind dicker und die Blätter breiter. Dieser Unterschied in der Morphologie der Blätter, welche die Organe der Nährstoff-, aber auch Schadstoffaufnahme darstellen, könnte Differenzen in der Akkumulationskapazität für Schwermetalle, wie Cd(II) verursachen.

Untersuchungen zum Vergleich der Aufnahme von Co(II) durch drei Arten von Wassermoosen (*Fontinalis antipyretica*, *Cinclidotus aquaticus* und *Platyhypnidium riparioides*) findet man bei Beaugelin-Seiller et al. (1995). Neben dem Einfluss saisonaler Parameter wurden für die Co(II)-Aufnahme Unterschiede zwischen *Fontinalis*, und den anderen beiden Spezies gefunden, wobei letztere dieselben Standorte besiedeln und durch eine ähnlich Morphologie gekennzeichnet sind. Sie sind dichter beblättert und besitzen deshalb eine größere Anzahl von Oberflächen-Bindestellen für Co(II) als *Fontinalis antipyretica*, was sich in einer höheren Co(II)-Akkumulation ausdrückte. Wells und Brown (1995) untersuchten die Cd(II)-Toleranz des Mooses *Rhytidiadelphus squarrosus* Schwermetall-belasteter und -unbelasteter Habitate. Das Moos bevorzugt feuchte Standorte. Die Pflanzen des kontaminierten Standortes zeigten bei höherer Aufnahme von Cd(II) eine deutlich größere Toleranz gegenüber intrazellulärem Cd(II). Dies drückte sich in einer geringeren Beeinflussung der Photosyntheserate durch Cd(II) bei dem Moos des belasteten Standortes aus. Die Autoren führten diese Unterschiede jedoch eher auf eine spezifische genotypische Reaktion auf Cd(II) zurück als auf eine phänotypische Anpassung an den Standort.

In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichende Untersuchungen zur Cd(II)-Akkumulation von zwei verschiedenen Arten von *Fontinalis* durchgeführt, die sich vor allem in ihrer Wuchsform unterschieden. Die Moose wurden an relativ unbelasteten Standorten zur selben Jahreszeit gesammelt, um den Einfluss saisonaler Unterschiede zu minimieren. Dessen ungeachtet können Umweltbedingungen, wie Lichteinfall, Wassertemperatur, Nährstoffzusammensetzung des Wassers, aber auch Transportzeiten zu Differenzen in der Akkumulationskapazität führen.

Wie für die Cd(II)-Akkumulation von *Fontinalis antipyretica* beschrieben, erfolgte auch bei *Fontinalis dalecarlica* eine schnelle Adsorption des Schwermetalls an die Moosoberfläche, wobei eine Konzentrationsabhängigkeit festzustellen war (Kap. 3. 1. 4, Abb. 20, 21). Der Anteil des extrazellulären Cd(II) nahm jedoch im Versuchsverlauf nicht wieder ab, sondern blieb relativ konstant. Nach 4stündiger Belastung mit 100 µM Cd(II) waren 39 % des gesamt wiedergefundenen Cd(II) biosorbiert, bei dem Moos aus der Helbe (*Fontinalis antipyretica*)

waren es zu diesem Zeitpunkt 61 % (Abb. 12 B). Bis zum 4. Tag war der Anteil an extrazellulärem Cd(II) bei *Fontinalis antipyretica* größer. Durch das Absinken dieser Fraktion kam es jedoch nach 5 Tagen zu einem Ausgleich des extrazellulären Anteils bei beiden Formen. Nach 10 Tagen betrug der extrazelluläre Anteil 47 % (*Fontinalis antipyretica*) bzw. 48 % (*Fontinalis dalecarlica*) des gesamt wiedergefundenen Cd(II). Auch bei Belastung mit 25 bzw. 200  $\mu\text{M}$  Cd(II) war der extrazelluläre Cd(II)-Gehalt von *Fontinalis dalecarlica* geringer (Abb. 21 A/D, C/E), jedoch kam es durch die Abnahme dieser Fraktion bei *Fontinalis antipyretica* (Abb. 13 A/D, B/E) und der Konstanz bei *Fontinalis dalecarlica* zu einem Ausgleich des adsorbierten Anteiles. Im Gegensatz zu *Fontinalis antipyretica* kann man bei *Fontinalis dalecarlica* im Konzentrationsbereich zwischen 25 und 200  $\mu\text{M}$  Cd(II) eine gewisse Sättigung der Blattoberfläche mit Cd(II) erkennen. Während der prozentuale Anteil des extrazellulären Cd(II) bei *Fontinalis antipyretica* nach 2 Tagen bei allen Konzentrationen relativ ähnlich war, sank er bei *Fontinalis dalecarlica* mit steigender Cd(II)-Konzentration ab, von durchschnittlich ca. 60 % bei 25  $\mu\text{M}$  bis auf 40 % bei 200  $\mu\text{M}$  Cd(II). Diese Unterschiede in der Adsorptionskapazität der beiden Moose könnten zum einen in der unterschiedlichen Form der Blätter begründet sein (siehe Abb. 49). Die Blätter von *Fontinalis antipyretica* besitzen eine größere Blattoberfläche, die eine größere Menge an Cd(II)-Bindungsstellen aufweisen kann. Andererseits könnte eine artspezifische Differenz der Menge von Polygalacturonsäuren in der Mooszellwand für eine geringere Anzahl von Bindungsstellen für Cd(II) bei *Fontinalis dalecarlica* verantwortlich sein. Breuer und Melzer (1990) führten die unterschiedliche Kationenaustausch-Kapazität dreier Arten von *Sphagnum* auf die Menge von Pektinsäuren zurück. Spearing (1972) verglich den Gehalt an Galacturonsäuren mit der Kationenaustausch-Kapazität von *Sphagnaceae* und erhielt ähnliche Aussagen.

Mit einer geringeren Anzahl an Bindekapazitäten für Cd(II) auf den Blättern von *Fontinalis dalecarlica* lässt sich so der geringere extrazelluläre Cd(II)-Gehalt, aber auch die Sättigung der Oberfläche bei höheren Cd(II)-Konzentrationen, die bei *Fontinalis antipyretica* nicht zu beobachten war, erklären.

Eine weitere Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse mit *Fontinalis antipyretica* und *Fontinalis dalecarlica* könnte eine differente Nährstoffzusammensetzung des Wassers am Standort sein. Durch das natürliche Vorkommen verschiedener Kationen, wie  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Ca}^{2+}$  auf der Moosoberfläche können Adsorption und Aufnahme von Cd(II) gehemmt werden (Pickering und Puia, 1969; Wells und Brown, 1987; Gjengedal und Steinnes, 1990). Zieht man zum Vergleich *Fontinalis antipyretica* der Wipper heran (Kap. 3. 1. 1, Abb. 12 A), stellt man eine dem Moos aus der Helbe korrelierende Biosorption fest. Der Standort der

Wipper wird im Gegensatz zu dem der Helbe stärker vom Nährstoffeintrag durch eine Talsperre beeinflusst, so dass die Ionenzusammensetzung des Wassers in Abhängigkeit von der Ablassregulierung schwanken kann. Daten zum Gehalt an verschiedenen Ionen gibt es für diesen Standort nicht, jedoch kann man Unterschiede zur Helbe annehmen. Da dieses Moos von einem anderen Standort gesammelt wurde, jedoch ähnliche Eigenschaften wie das Material aus der Helbe aufweist, kann man schlussfolgern, dass die Unterschiede der Adsorption eher auf artspezifische Differenzen der Zellwandzusammensetzung bzw. den unterschiedlichen Blatthabitus zurückzuführen sind, als auf einen Einfluss der standortspezifischen Umweltparameter.

Bei beiden *Fontinalis*-Arten erfolgte die Aufnahme von Cd(II) ins Zellinnere bei Belastung mit 100 µM Cd(II) langsamer als die Adsorption, über den gesamten Versuchszeitraum hinweg (Abb. 11 B, 12 B, 20, 21 B). Bis zu 24 Stunden waren die intrazellulären Fraktionen relativ ähnlich und lagen nach einem Tag bei 11 % (1,3 µmol/g FM, *Fontinalis antipyretica*) bzw. 12 % (1,4 µmol/g FM, *Fontinalis dalecarlica*) des insgesamt wiedergefundenen Cd(II). Innerhalb von 2-10 Tagen war jedoch der intrazelluläre Anteil von *Fontinalis dalecarlica* stetig geringer als der von *Fontinalis antipyretica*. Während *Fontinalis antipyretica* (Helbe) nach 7 Tagen bereits 30 % des gesamt wiedergefundenen Cd(II) (3,9 µmol/g FM) aufgenommen hatte, lag der Anteil beim kanadischen Moos signifikant darunter, bei nur 23 % (3,1 µmol/g FM). Nach 10 Tagen waren es bei *Fontinalis antipyretica* 35 % (4,5 µmol/g FM), bei *Fontinalis dalecarlica* 27 % (3,5 µmol/g FM), was einen signifikanten Unterschied darstellt. Wenn man von einer Depotfunktion der Zellwand für Cd(II) bei beiden Moosen ausgeht, von der aus die Aufnahme erfolgt, lässt sich der geringere intrazelluläre Anteil mit dem entsprechend niedrigeren extrazellulären Gehalt an Cd(II) erklären. Weiterhin nahm im Gegensatz zu *Fontinalis antipyretica* der Cd(II)-Gehalt der Oberfläche im Versuchsverlauf bei *Fontinalis dalecarlica* nicht ab, was wiederum für eine geringere Mobilisierung des Cd(II) von der Blattoberfläche dieser Art spricht.

Vázquez et al. (1999) stellten für drei Arten von aquatischen Bryophyten trotz ähnlicher Biosorptionseigenschaften (maximaler extrazellulärer Gehalt an Schwermetallen) eine deutliche Differenzierung in der Aufnahme-Kapazität fest. Die Autoren führten dies auf charakteristische Unterschiede des Standortes und der Physiologie der Pflanzen zurück, z. B. auf einen aktiveren Membrantransport oder eine höhere Kapazität zur Detoxifizierung der Schwermetalle (Komplexierung, Kompartimentierung).

Die geringere Aufnahme und die scheinbare Abnahme der intrazellulären Fraktion bei Exposition mit 25 und 200 µM Cd(II) (*Fontinalis dalecarlica*) in der vorliegenden Arbeit lassen sich bislang nicht klären (Abb. 21 A/D, C/E).

Als physiologisch-biochemische Reaktion auf eine Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) kam es bei beiden *Fontinalis*-Arten zu einer Erhöhung des GSH-Gehaltes der Zellen (Abb. 14, 22). Unterschiede bestanden jedoch in der Höhe des GSH-Spiegels, zum einen des Ausgangsgehaltes, der bei 0,40  $\mu\text{mol/g}$  FM (*Fontinalis antipyretica*) bzw. 0,073  $\mu\text{mol/g}$  FM (*Fontinalis dalecarlica*) lag. Zum anderen stieg er bei *Fontinalis antipyretica* bis auf maximal 0,98  $\mu\text{mol/g}$  FM an (das 2,5fache des Ausgangsgehaltes), bei *Fontinalis dalecarlica* nur bis auf maximal 0,50  $\mu\text{mol/g}$  FM, was jedoch das 7fache des Ausgangsgehaltes bedeutet. Der Cd(II)-Gehalt lag zu diesen Zeitpunkt bei *Fontinalis antipyretica* bei 3,9  $\mu\text{mol/g}$  FM, bei *Fontinalis dalecarlica* bei nur 2,9  $\mu\text{mol/g}$  FM. Bruns (1997) beschrieb eine von der Cd(II)-Konzentration des Mediums abhängige Erhöhung des GSH-Gehaltes bei *Fontinalis antipyretica*. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Aufnahme von Cd(II) konzentrationsabhängig erfolgt, d. h. bei einer höheren Cd(II)-Konzentration im Nährmedium wird eine größere Menge aufgenommen. Somit wird der Anstieg des GSH-Spiegels letztlich durch die intrazelluläre Cd(II)-Konzentration beeinflusst. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte der geringere GSH-Gehalt in *Fontinalis dalecarlica* auf den geringeren intrazellulären Cd(II)-Gehalt zurückgeführt werden. Ob eine der beiden Arten eine effektivere Detoxifikation von Cd(II) aufweist, könnte mittels der Bestimmung der Quantenausbeute des PS II (Kap. 2. 3. 3) untersucht werden.

## 4. 2 Lokalisation von Cd(II) in *Fontinalis antipyretica*

Neben einer extrazellulären Biosorption von Cd(II) erfolgte eine intrazelluläre Aufnahme des Schwermetalls durch das Wassermoos *Fontinalis antipyretica* (siehe Kap. 3. 1. 1). Freie Cd(II)-Ionen im Cytoplasma können jedoch Schädigungen des Moores hervorrufen. Um sich davor zu schützen, sollten in *Fontinalis antipyretica* Mechanismen der Detoxifizierung und Kompartimentierung von Cd(II) existieren.

Eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von Cd(II) in *Fontinalis antipyretica* wird der Komplexierung durch die SH-Gruppe des GSH zugeschrieben (Bruns et al., 1999, 2000b, c). Vergleicht man jedoch das Verhältnis von Cd(II):GSH in den Mooszellen (Kap. 3. 1. 1, Abb. 15), stellt man fest, dass der GSH-Gehalt bei Cd(II)-Belastung, trotz Anstieges, ab 4 Stunden immer geringer ist als der intrazelluläre Cd(II)-Gehalt. Nach Rabenstein (1989) wird ein Cd(II)-Molekül mindestens durch ein GSH-Molekül, normalerweise durch 2 GSH-Moleküle komplexiert. D. h. das Verhältnis Cd(II):GSH müsste mindestens 1:1 bzw. 1:2 betragen. Ab 4 Stunden nach Exposition mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) liegt dieses Verhältnis bei *Fontinalis antipyretica* immer bei  $> 1:1$  und erreicht teilweise Werte von 6:1, d. h. durch ein

GSH-Molekül müssten 6 Moleküle Cd(II) chelatiert werden. Diese Betrachtungsweise ist freilich nur auf die Möglichkeit der Komplexierung von Cd(II) mit GSH reduziert. Das System der Chelatierung und Detoxifikation von Schwermetallen in Pflanzen ist jedoch sehr viel komplexer.

In der Hefe *Candida glabrata* fand man nach Belastung mit Cd(II) ein Cd(II):S-Verhältnis von 1,4. Untersuchungen von Dameron et al. (1989) zeigten jedoch die Bildung von Cd(II)-Sulfid-Kristallen in dieser Hefe, die in Abhängigkeit von der Art des Nährmediums mit GSH und  $\gamma$ -EC beschichtet waren. Diese Moleküle trugen zur Stabilisierung der Cd(II)-S-Komplexe bei. Durch die Bildung von höhermolekularen Cd(II)-S-Kristallen unter Beteiligung von GSH konnten somit größere Mengen an Cd(II) komplexiert werden.

Des Weiteren muss die Möglichkeit der Komplexierung von Cd(II) bzw. Schwermetallen durch andere Moleküle in der Zelle in Betracht gezogen werden. Rauser (2000) fasste dies in einer Übersicht zusammen. So können Schwermetalle durch organische Säuren, wie Citrat und Malat, Aminosäuren, wie Histidin, Aspartat, Glutamin und Tyrosin oder Phytinsäure chelatiert werden. Hierbei kommt es zur Wechselwirkung der Schwermetalle mit dem Sauerstoff oder Stickstoff der Liganden. Andere Cystein-reiche Proteine, wie Metallothioneine oder Phytochelatine komplexieren die Schwermetalle über die SH-Gruppe des Cysteins.

Unabhängig von der Art der Komplexierung von Cd(II), sollte eine Kompartimentierung von Cd(II) in den Mooszellen erfolgen, die sicherstellt, dass keine freien Cd(II)-Ionen im Cytoplasma vorkommen. Nur freie Schwermetallionen können wichtige Stoffwechselprozesse der Pflanzen inhibieren (Kap. 1. 1). Deshalb erfolgt in Pflanzen der Transport von Schadstoffen, wie Schwermetallen, in die Vakuole, wo sie nicht mehr toxisch wirken können. Der Transport von Phytochelatin-Schwermetall-Komplexen in dieses Zellorganell wurde bereits von Vögeli-Lange und Wagner (1990), Ortiz et al. (1995) und Salt und Rauser (1995) beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die intrazelluläre Kompartimentierung von Cd(II) in den Zellen von *Fontinalis antipyretica* mittels analytischer Elektronenmikroskopie untersucht (Kap. 3. 4. 1, Abb. 38). Es erfolgte eine Aufnahme von Cd(II) in das Cytoplasma und die Vakuole. EEL-Spektren des Cytoplasmas induzierten eine Bindung von Cd(II) an SH-Gruppen von Thiolpeptiden (Kap. 3. 4. 1, Abb. 39 A). Der Vergleich mit Standard-Spektren von Cd(II)/GSH-Komplexen zeigte eine große Übereinstimmung, wohingegen kovalente S-Bindungen völlig andere Spektren erzeugten.

Bruns et al. (2000b) fanden eine Erhöhung des GSH-Gehaltes nach Cd(II)-Belastung bei mehreren Arten von aquatischen und terrestrischen Bryophyten. Phytochelatine wurden, im

Gegensatz zur Reaktion von höheren Pflanzen auf eine Schwermetalexposition, nicht nachgewiesen. Somit kann eine Beteiligung dieser Peptide bei der Entgiftung von Cd(II) ausgeschlossen werden. GSH scheint somit nicht nur bei *Fontinalis antipyretica*, sondern auch bei anderen Moosen eine wichtige Rolle bei der Vermeidung von Schwermetall-Stress zu spielen. Auch in anderen Organismen wurde eine Beteiligung von GSH bei der Detoxifikation von Schwermetallen vermutet. Li et al. (1997) zeigten einen Transport von Cd(II)-GSH-Konjugaten in die Vakuole von *Saccharomyces cerevisiae*. Mehra und Mulchandani (1995) beschrieben den Transfer von Cu(I) aus Cu(I)-GSH Komplexen in Phytochelatine und die Möglichkeit einer stabilisierenden Wirkung von GSH auf PC-Cu(I)-Komplexe bei *C. glabrata* und *S. pombe*. Vögeli-Lange und Wagner (1996) schlossen bei Belastung von Tabak mit niedrigen Cd(II)-Konzentrationen (5  $\mu$ M) eine Komplexierung mit GSH und anschließenden Transport in die Vakuole nicht aus.

Nach der Komplexierung von Cd(II) im Cytoplasma erfolgte der Transport des Schwermetalls in die Vakuole von *Fontinalis antipyretica* (Kap. 3. 4. 1, Abb. 38 B). Die Konzentration eines möglichen Cd(II)/GSH-Komplexes an der Vakuolenmembran, dem Tonoplasten, war zu gering und konnte mittels analytischer Elektronenmikroskopie nicht nachgewiesen werden. Deshalb sind keine Aussagen über die Transportform von Cd(II) über diese Membran möglich. Ob der Transport des Schwermetalls als Cd(II)/GSH-Komplex oder nach Abspaltung des GSH als freies Cd(II)-Ion erfolgt, kann nicht gesagt werden. Zwar war in einigen vakuolären Niederschlägen S zu finden, jedoch würde ein Komplex von Cd(II) und GSH aufgrund des geringen pH-Wertes in diesem Zellorganell dissoziieren. Der Nachweis eines Cd(II)/GSH-Komplexes in der Vakuole, der weiteren Aufschluss über die Transportform des Cd(II) geben könnte, war mit analytischer Elektronenmikroskopie somit nicht möglich.

EEL-Spektren von Niederschlägen in der Vakuole von *Fontinalis antipyretica* zeigten eine Ablagerung von Cd(II) als anorganisches Phosphat (Kap. 3. 4. 1, Abb. 39 B), eine Bindung an Schwefelspezies erfolgte nicht. Dies unterstützt die Annahme, dass in *Fontinalis antipyretica* die Detoxifikation von Cd(II) nicht über eine Komplexierung mit Phytochelatinen und den anschließenden Transport in die Vakuole erfolgt. Im Gegensatz dazu konnten Vögeli-Lange und Wagner (1990) bei der Untersuchung der Lokalisation von Phytochelatinen in Cd(II)-exponierten Blättern von Tabakpflanzen Cd(II)-Phytochelatin-Komplexe in den Vakuolen nachweisen. Ortiz et al. (1995) beschrieben den Transport von Cd(II)-Phytochelatin-Komplexen in die Vakuolen von Hefe mittels eines ABC-Transporters (HMT1).

Neben Phytochelatinen können in höheren Pflanzen aber auch andere Chelatoren zur Detoxifikation von Schwermetallen in Frage kommen. Nach Rauser (2000) könnten in

Pflanzen organische Säuren, Aminosäuren, Phytat oder pflanzliche Metallothioneine Schwermetalle komplexieren.

Krämer et al. (2000) untersuchten die subzelluläre Lokalisierung von Nickel in *Thlaspi*-Arten. Röntgen-Absorptionsspektroskopie, welche der EEL-Spektroskopie ähnliche Spektren liefert, zeigte die Chelatierung von Ni(II) durch Citrat bzw. Histidin. Da bei dieser Methode gemörsertes Pflanzenmaterial genutzt wurde, d. h. die Zellstruktur zerstört war, waren nur Vermutungen über die Lokalisierung dieser Komplexe möglich und die Isolierung von Protoplasten und Vakuolen erforderlich. Die Autoren ordneten His die Transportfunktion für Ni(II) im Cytoplasma zu, während die Ablagerung in der Vakuole als Citrat-Komplex beschrieben wurde.

Auch in der vorliegenden Arbeit war die Deutung einer Funktion von GSH bei der Detoxifikation von Cd(II) in *Fontinalis antipyretica* schwierig. Der *in vivo* Nachweis von GSH-Cd(II)-Komplexen war mittels der analytischen Elektronenmikroskopie nicht möglich. Weiterhin ist GSH in viele physiologische Prozesse von Pflanzen integriert. So dient es u. a. der Vermeidung von oxidativem Stress (Noctor et al., 1998; May et al., 1998). Untersuchungen von Bruns et al. (2000b) zum GSH-Status in *Fontinalis antipyretica* bei Cd(II)-Belastung konnten allerdings oxidativen Stress als Ursache für die Erhöhung des GSH-Pools ausschließen.

Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit lassen die Schlussfolgerung zu, dass *Fontinalis antipyretica* möglicherweise einen anderen Mechanismus der Detoxifikation von Schwermetallen besitzt als höhere Pflanzen. Hierbei könnte GSH eine wichtige Rolle spielen, z. B. bei der Komplexierung der Me(II)-Ionen und ihrer Bindung an einen vakuolären Metall-Transporter.

#### **4. 3 Vitalität von *Fontinalis antipyretica* nach Schwermetallexposition**

Schwermetalle können u. a. den Photosyntheseapparat beeinträchtigen (Kap. 1. 3. 1). Die Schädigungen dieses Systems durch Schwermetalle, die zur Inaktivierung des PS II führen, müssten einen direkten Effekt auf die Vitalität von *Fontinalis antipyretica* haben, deren Bestimmung durch Messung der effektiven Quantenausbeute der photochemischen Energieumwandlung im Photosystem II als Chlorophyll-Fluoreszenz erfolgte (Kap. 2. 3. 3). Auch in anderen Untersuchungen wurde die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz als sensitiver Indikator für Pflanzenstress angewendet (Lichtenthaler und Miehe, 1997). Lanaras et al. (1994) nutzten die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz in Blättern von *Taraxacum* sp. zum Screening der urbanen Verschmutzung der Großstadt Thessaloniki, Griechenland.

Andere Techniken, wie die Bestimmung von Chlorophyll-Gehalt, Chlorophyll-Abbau und dem Verhältnis von Chlorophyll a/b wurden bei Exposition von *Fontinalis antipyretica* mit 100 µM Cd(II) bereits von Bruns (1997) eingesetzt. Anhand der untersuchten Parameter konnte kein signifikanter Einfluss des Schwermetalls auf die Vitalität des Moores festgestellt werden.

Da das PS II ein sensibler Indikator für eine frühe Schädigung der Pflanzen durch Schwermetalle ist, bietet die Methode der Messung der effektiven Quantenausbeute der photochemischen Energieumwandlung im Photosystem II die Möglichkeit, gewisse Aussagen über die Vitalität zu machen. Die Bezeichnung „Vitalität“ ist in diesem Zusammenhang nicht optimal, da das PS II sehr komplex ist und nicht nur ein spezifischer Parameter gehemmt wird. Der Begriff wird hier nur in Bezug auf eine Schädigung des PS II verwendet.

Bei Belastung mit Cd(II) (Kap. 3. 2, Abb. 25) kam es im Bereich zwischen 25 und 400 µM zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Vitalität des Moores. Während 25 und 50 µM Cd(II) die Vitalität innerhalb von 10 Tagen nicht so stark beeinflussten, sank diese bei Belastung mit 100 µM Cd(II) bis auf 38 % der Kontrolle ab. 400 µM Cd(II) führten im Versuchszeitraum zum Absterben der Pflanzen, die Vitalität lag nach 10 Tagen bei minimalen 3 %. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Cd(II) in *Fontinalis antipyretica* das PS II der Photosynthese schädigt und so den gemessenen Vitalitätsverlust hervorruft.

Aus der Literatur sind uns keine Befunde zur Beeinträchtigung dieses Parameters bei der Schwermetallbelastung von aquatischen Moosen bekannt, jedoch gibt es vielfältige Forschungen an höheren Pflanzen. Stoyanova und Tchakalova (1997) untersuchten Chloroplasten von Blatt- und Stammparenchym der Wasserpflanze *Myriophyllum spicatum* L.. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Parenchymzellen nach Belastung mit Cd(II) zeigten radikale ultrastrukturelle Veränderungen der Chloroplasten. Es kam zu einer Zerstörung des inneren Membransystems, der Thylakoide, in dem die Photosysteme lokalisiert sind. Ursache dafür könnte die Wechselwirkung von Cd(II) mit den Lipiden der Membranen sein, die zur Veränderung der Membranstruktur und -permeabilität führte. Sehr hohe Konzentrationen an Cd(II) (5 und 6 g Cd<sup>2+</sup>/m<sup>3</sup>) riefen eine Zerstörung der Chloroplasten und eine Gerinnung des Stromas hervor, was eine Aufrechterhaltung der Photosynthese unmöglich machte. Clijsters und van Assche (1985) folgerten aus verschiedenen Untersuchungen, dass Cd(II) und andere Schwermetalle vor allem das PS II und den Elektronentransport des PS II beeinflussen, während das PS I nicht beeinträchtigt wird. Padmaja et al. (1990) beschrieben die Inhibierung der Chlorophyllsynthese in *Phaseolus vulgaris* L. durch Cd(II). Samen von *Brassica napus* zeigten eine signifikante Abnahme des Chlorophyll-Gehaltes und der photochemischen Quantenausbeute der Photosynthese (Larsson



et al., 1998). Geiken et al. (1998) untersuchten den Einfluss von Cd(II) auf den Turnover des D1-Proteines, einer Untereinheit des Reaktionszentrums des PS II. Cd(II) senkte die quantenchemische Ausbeute im PS II, gemessen als Chlorophyll-Fluoreszenz, bei *Pisum sativum* und *Vicia faba*, wobei *V. faba* toleranter auf den Cd(II)-Stress reagierte. Dieser Unterschied war nicht auf eine differente Cd(II)-Aufnahme in das PS II oder eine unterschiedliche Bindung von Cd(II) an das D1-Protein zurückzuführen, sondern auf einen durch Cd(II) stimulierten artspezifischen Turnover dieses Proteins. Ähnliche Prozesse könnten das PS II von *Fontinalis antipyretica* beeinträchtigen und zur beschriebenen Verringerung der Chlorophyll-Fluoreszenz beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurden im Gegensatz zur Veränderung der Vitalität bei Cd(II)-Stress bei Belastung von *Fontinalis antipyretica* mit Zn(II) nur bei 500  $\mu\text{M}$  geringe Vitalitätseinbußen beobachtet (Kap. 3. 2). Trotz intrazellulärer Akkumulation, wobei der Zn(II)-Gehalt bei allen Konzentrationen dem des Cd(II) sehr ähnlich war (Kap. 3. 1. 2 und 4. 1. 1), kam es erst bei einer Zn(II)-Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  zu einer Erhöhung der GSH-Synthese. Das deutet darauf hin, dass Zn(II) als essentielles Element in bezug auf eine Schädigung des PS II eine relativ geringe Toxizität besitzt und die Erhöhung des GSH-Pooles als Mechanismus zur Detoxifikation des Schwermetalls erst bei hohen Zn(II)-Konzentrationen aktiviert wird. Brune et al. (1995) untersuchten die Toxizität von Schwermetallen bei der höheren Pflanze *Hordeum vulgare* cv. Gerbel. Die Exposition mit 400  $\mu\text{M}$  Zn(II) beeinflusste weder den Chlorophyll-Gehalt, noch die Quantenausbeute des PS II, trotz einer Akkumulation des Schwermetalls in den Blättern der Pflanzen. Messungen an aquatischen Moosen sind in diesem Zusammenhang nicht bekannt.

Bei Belastung von *Fontinalis antipyretica* mit dem Schwermetall Pb(II) beobachteten wir erst bei 500  $\mu\text{M}$  toxische Effekte, die sich in einer Abnahme der Vitalität zeigten (Kap. 3. 2). Verglichen mit den Cd(II)- und Zn(II)-Gehalten der Zellen, war teilweise bis zu dreimal soviel Pb(II) intrazellulär akkumuliert (Kap. 3. 1. 3 und 4. 1. 1). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Pb(II) als toxisches Schwermetall eine weniger schädigende Wirkung auf das PS II hat als Cd(II). Der GSH-Gehalt stieg jedoch bereits bei Exposition mit Pb(II)-Konzentrationen von weniger als 500  $\mu\text{M}$  an. Die Detoxifikationsmechanismen werden somit, falls GSH hierbei eine Rolle spielt, schon bei geringen intrazellulären Konzentrationen an Pb(II) aktiviert.

Im Unterschied zu diesen Ergebnissen senkte Pb(II) den Chlorophyll-Gehalt in höheren Pflanzen und bewirkte eine Zerstörung der Ultrastruktur der Chloroplasten (Clijsters und van Assche, 1985). Miles et al. (1972) beschrieben in isolierten Chloroplasten höherer Pflanzen

eine Inhibierung der Hill-Reaktion, der photochemischen Spaltung von Wasser zu Sauerstoff im PS II, durch Pb(II) im Konzentrationsbereich von 0,2 – 0,5 mM.

Küpper et al. (1998) zeigten die Substitution von Mg(II), dem Zentralatom der Chlorophylle, in höheren Wasserpflanzen (Makrophyten) durch Cd(II), Zn(II) und Cu(II). Zn(II) bildete hoch stabile Komplexe mit Chlorophyll. Die Substitution des Mg(II) durch andere Schwermetalle führte zur Inhibierung der Photosynthese, da der Resonanz-Energie-Transfer von den Antennen-Pigmenten zum Reaktionszentrum aufgrund der geringeren Fluoreszenz-Ausbeute verglichen mit Mg<sup>2+</sup>-Chlorophyll nicht mehr möglich war.

Gaur et al. (1994) untersuchten den Zusammenhang zwischen Schwermetall-Akkumulation und -Toxizität bei zwei Arten von aquatischen Makrophyten (*Spirodelia polyrrhyza* L. und *Azolla pinnata* r. Br.), wobei die Reihenfolge der Toxizität wie folgt festgelegt wurde: Cd(II) >> Pb(II) > Zn(II). Die EC<sub>50</sub>-Werte der relativen Wachstumsrate von *S. polyrrhyza* lagen bei 7 µmol Cd(II)/g TM, 33 µmol Pb(II)/g TM bzw. 54 µmol Zn(II)/g TM.

In der vorliegenden Arbeit lässt sich bezüglich der Daten der Vitalität von *Fontinalis antipyretica* nach Belastung mit Schwermetallen (Kap. 3. 2) und der Werte für die intrazellulären Schwermetall-Gehalte (Kap. 3. 1. 1-3) dieselbe Reihenfolge für die toxische Wirkung auf die Reaktionen im PS II festlegen: Cd(II) >> Pb(II) > Zn(II).

#### **4. 4 Einfluss von Cd(II) auf den Schwefelmetabolismus von *Fontinalis antipyretica***

##### **4. 4. 1 Einfluss der Sulfatversorgung von *Fontinalis antipyretica* auf die biochemisch-physiologische Reaktion auf Cd(II)-Stress**

Schwefel ist als essentieller Nährstoff in Pflanzen Baustein von Aminosäuren (Cystein und Methionin), Glutathion, Thioredoxin, Sulfolipiden (Lipide der Thylakoidmembran) und verschiedenen Coenzymen (Biotin, Coenzym A, Thiaminpyrophosphat) (Heldt, 1999; Zhao et al., 1997). Überschüssiges Sulfat wird in den Vakuolen gespeichert und kann wieder remobilisiert werden, wenn der Sulfatgehalt im Cytoplasma stark absinkt (Clarkson et al., 1993; Bell et al., 1995 a, b). In den Pflanzen erfolgt eine Umverteilung von Sulfat, wobei der Nährstoff u. a. in stoffwechselaktive Organe, wie junge Blätter, transportiert wird (Hartmann et al., 2000).

Da Cystein das Endprodukt der Sulfatassimilation darstellt, könnten Änderungen der Versorgung von Pflanzen mit Sulfat deren Reaktion auf Cd(II)-Stress nachhaltig beeinflussen. Nussbaum et al. (1998) untersuchten die Regulation der Sulfatassimilation durch Cd(II) bei

*Zea mays*. Bei einer Belastung mit 50  $\mu\text{M}$  Cd(II) wurde mehr  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  in höher molekulare Cys-haltige Verbindungen eingebaut als bei Kontrollen. Weiterhin kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Aktivitäten der ATP-Sulfurylase und der Adenosin-5'-Phosphosulfat-Sulfotransferase, welche Enzyme des S-Stoffwechsels darstellen. Die Autoren folgerten, dass in den Pflanzen bei Exposition mit Cd(II) die Sulfatassimilation aktiviert wird, um einen erhöhten Bedarf an S-haltigen Aminosäuren zur Synthese chelatbildender Thiolpeptide abzusichern.

Das Wassermoos *Fontinalis antipyretica* reagierte auf Cd(II)-Stress mit einer Erhöhung des GSH-Spiegels (Bruns, 1997). Die verstärkte Synthese von GSH sollte auch in diesem Fall mit einer Erhöhung der Sulfatassimilation verbunden sein. Untersuchungen zum Schwefelstoffwechsel bei Wassermoosen sind uns jedoch aus der Literatur nicht bekannt.

Um den Einfluss von Cd(II) auf die Sulfatassimilation, aber auch den Einfluss einer veränderten Versorgung mit Sulfat auf *Fontinalis antipyretica* nach Cd(II)-Belastung zu untersuchen, wurde das Moos in der vorliegenden Arbeit nach eintägiger Vorkultivierung in Medium ohne Sulfat auf unterschiedliche Bedingungen umgesetzt (Kap. 2. 4. 3). Der Sulfatgehalt der Pflanzen betrug 4,1  $\mu\text{mol/g}$  FM, während der Sulfatgehalt des Baches am Standort zwischen 500 und 800  $\mu\text{M}$  lag. Der Sulfatgehalt in Blättern von Reispflanzen lag bei ca. 20  $\mu\text{mol/g}$  FM (Kuzuhura et al., 2000). Er kann in Pflanzen, die auf S-reichen Böden wachsen, bis auf 80  $\mu\text{mol/g}$ , teilweise sogar auf 1700  $\mu\text{mol/g}$  ansteigen (Ernst, 1998).

Der Sulfatgehalt unseres Untersuchungsobjektes lag somit bei relativ niedrigen Werten. Elektronenmikroskopische Analysen in der vorliegenden Arbeit wiesen Schwefel auch in Niederschlägen der Vakuolen von *Fontinalis antipyretica* nach (Kap. 3. 4. 1), der z. T. Sulfat-Schwefel darstellen könnte. Die Speicherung dieser Schwefel-Spezies würde darauf hinweisen, dass nicht das gesamte Sulfat in den Zellen für die Aufrechterhaltung des Schwefel-Metabolismus benötigt wird. Innerhalb von 24 Stunden ohne Sulfat im Nährmedium konnte keine signifikante Abnahme des intrazellulären Sulfatgehaltes beobachtet werden (Kap. 3. 3. 1, Abb. 26 B). Jedoch waren Schwankungen zu erkennen, der Sulfatgehalt lag zwischen 3,1 und 4,2  $\mu\text{mol/g}$  FM. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der größte Teil des gemessenen Sulfates in der Vakuole gespeichert ist, da sich innerhalb von 24 Stunden keine extremen Veränderungen dieses Pools andeuteten, anders als bei GSH, Cys und  $\gamma$ -EC, die in den Zellen einem ständigen Turnover unterliegen. GSH bzw. Cys sanken in 24 Stunden signifikant von 0,28 auf 0,15  $\mu\text{mol/g}$  FM bzw. von 0,025 auf 0,015  $\mu\text{mol/g}$  FM. Der GSSG-Gehalt stieg nicht signifikant an von 0,028 auf 0,041  $\mu\text{mol/g}$  FM (Abb. 26 A). Sein Anteil am Gesamt-GSH lag zum Versuchsanfang bei 9 %, stieg innerhalb von 4 Stunden auf 22 % und schwankte dann zwischen 18 % und 25 %.

Der Gehalt an GSH korreliert in Pflanzen mit der Anpassung an Stressbedingungen (May et al., 1998). Die Effizienz mit der das oxidierte Dithiol GSSG wieder in reduziertes GSH umgewandelt wird, ist besonders wichtig für die Rolle von GSH bei der Bekämpfung von oxidativem Stress (May et al., 1998). So weisen Veränderungen des Verhältnisses von GSH:GSSG auf Stress in den Zellen hin. Nach Rennenberg und Brunold (1994) liegt der GSSG-Anteil von Pflanzenzellen größtenteils unter 5 % der Gesamt-GSH-Menge. Bruns (1997) bestimmte bei Kontrollpflanzen von *Fontinalis antipyretica*, die 7 Tage in Knop-Medium kultiviert wurden, jedoch einen weitaus größeren GSSG-Anteil von  $41 \% \pm 18 \%$  des Gesamt-GSH. Bei Cd(II)-Belastung (7 Tage) blieb der GSSG-Gehalt konstant, so dass sich der prozentuale Anteil am Gesamt-GSH durch die GSH-Erhöhung verringerte.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei eintägigem Sulfatmangel eine Erhöhung des prozentualen Anteils von GSSG festgestellt. Jedoch wurden größere Schwankungen dieses Anteils auch nach dem Umsetzen dieser Proben auf verschiedene Bedingungen gemessen (Kap. 3. 3. 1, Abb. 27 A/B), so dass diese Erhöhung nicht unbedingt auf eine außergewöhnliche Stress-Situation hinweist.

Nach eintägiger Vorkultivierung ohne Sulfat wurde das Untersuchungsobjekt *Fontinalis antipyretica* verschiedenen Sulfat- und Cd(II)-Konzentrationen ausgesetzt (Kap. 2. 4. 3). Bei Kontrollpflanzen ( $0 \mu\text{M}$  Cd(II)), die mit Sulfat versorgt wurden, veränderten sich die Gehalte an Cys,  $\gamma$ -EC, GSH und Sulfat innerhalb von 14 Tagen nicht signifikant (Kap. 3. 3. 1, Abb. 27 B, 28). Ohne Sulfat im Medium zeigten sich stärkere Veränderungen, die auf einen S-Mangel zurückgeführt werden könnten (Kap. 3. 3. 1, Abb. 27 A, 28). Cys-,  $\gamma$ -EC- und GSH- bzw. Sulfatgehalt im Moos waren im Vergleich mit den Sulfat-versorgten Proben ab dem 1. bzw. 10. Tag signifikant niedriger, der Gehalt an GSSG dagegen ab dem 1. Tag signifikant höher. Kuzuhara et al. (2000) fanden im Phloemsaft von Reispflanzen, die unter S-Mangel kultiviert wurden, gleichfalls eine Abnahme der Sulfatkonzentration, jedoch blieben GSH- und  $\gamma$ -EC-Gehalt relativ konstant. Im Gegensatz dazu beschrieben Lappartient und Touraine (1996) in *Brassica napus* eine Erniedrigung des GSH-Spiegels unter S-Mangel-Bedingungen. Physiologische Reaktionen auf eine veränderte Versorgung mit Sulfat können somit Spezies-spezifische Unterschiede zeigen.

In unseren Experimenten stieg der GSSG-Spiegel von *Fontinalis antipyretica* ohne Sulfat im Medium im Vergleich zum GSH-Gehalt etwas an. Der prozentuale Anteil am Gesamt-GSH lag zwischen 17 % und maximal 38 %. Da eine Erhöhung des GSSG-Anteiles in Pflanzen auf Stress hinweist (Noctor et al., 1998; May et al., 1998), deutet dieses Ergebnis auf eine beginnende Stress-Situation für das Moos aufgrund von S-Mangel hin. Jedoch sind die Veränderungen bei *Fontinalis antipyretica* nicht so extrem wie sie von Dhindsa (1987)

beobachtet wurden. Getrocknetes Moos der Art *Tortula ruralis* reagierte bei der Rehydrierung mit einer Steigerung des GSSG-Anteils von 5 auf 45 % des Gesamt-GSH. Als mögliche Ursachen wurden eine direkte Reaktion von GSH mit freien Radikalen bzw. die Oxidation von GSH durch die GSH-Peroxidase vermutet, beides Antworten auf oxidativen Stress in der Pflanzenzelle.

Die Resultate unserer Arbeit deuten darauf hin, dass die Versorgung von *Fontinalis antipyretica* mit Sulfat einen Einfluss auf den Schwefel-Metabolismus hat, d. h. auf den Gehalt an Thiolen und Sulfat. Die Sulfatassimilation, die in den Chloroplasten stattfindet, steht im engen Zusammenhang mit der Photosynthese. Einerseits sind ATP und reduziertes Ferredoxin, die bei der Photosynthese gebildet werden, wichtige Bestandteile der Assimilation von Sulfat (Kap. 1. 3. 2). Andererseits ist Cystein in der Photosynthese, z. B. als Teil von Fe-S-Clustern oder von Plastocyanin, integriert (Heldt, 1999). Aufgrund dieser Wechselwirkung könnte eine veränderte Versorgung mit Sulfat die Abläufe der Photosynthese negativ beeinflussen. Eine Abnahme der photochemischen Ausbeute des PS II als Parameter für die Vitalität von *Fontinalis antipyretica* bei Sulfatmangel über 14 Tagen wurde von uns jedoch nicht beobachtet (Kap. 3. 3. 2, Abb. 32). Das bedeutet, dass das Moos in Hinsicht auf die Assimilation von Sulfat und die Reaktionen im PS II unter diesen Bedingungen keiner Stresssituation ausgesetzt war, zumal der Sulfatgehalt der Pflanzen innerhalb dieses Zeitraumes nur wenig abnahm.

Wurde zu den Pflanzen 200  $\mu\text{M}$  Cd(II) zugegeben, kam es unabhängig von einer Versorgung mit Sulfat (500  $\mu\text{M}$  / 0  $\mu\text{M}$ ) zu einer Zunahme der Thiole Cys,  $\gamma$ -EC und GSH innerhalb von 14 Tagen, wobei intrazelluläres Sulfat verbraucht wurde (Kap. 3. 3. 1, Abb. 27 C, D, Abb. 28). Dies deutet auf eine Aktivierung der Sulfatassimilation bei Schwermetall-Belastung hin, wie sie auch von Nussbaum et al. (1998) und Heiss et al. (1999) beschrieben wurden. Die Autoren fanden bei Belastung von *Zea mays* bzw. *Brassica juncea* mit Cd(II) eine erhöhte Aktivierung von Enzymen der Sulfatassimilation. Weiterhin stellten wir bei *Fontinalis antipyretica* innerhalb von 14 Tagen keinen signifikanten Einfluss der Sulfat-Konzentration des Nährmediums auf den Gehalt an GSH fest. So wurden maximal 1,13  $\mu\text{mol}$  GSH/g FM (200  $\mu\text{M}$  Cd(II)/500  $\mu\text{M}$  Sulfat) bzw. 1,16  $\mu\text{mol}$  GSH/g FM (200  $\mu\text{M}$  Cd(II)/0  $\mu\text{M}$  Sulfat) synthetisiert. Auch der GSSG-Gehalt erhöhte sich analog (max. 0,30 bzw. 0,24  $\mu\text{mol}$ /g FM).

Vergleicht man den GSSG-Anteil des Gesamt-GSH der Cd(II)-belasteten Proben mit denen der unbelasteten Proben so kann keine deutliche Erhöhung, die auf oxidativen Stress hinweisen würde, beobachtet werden. Bei der Cd(II)-belasteten Probe ohne Sulfat stieg der Anteil des GSSG von 17 % auf maximale 29 % (8 h) und lag nach 14 Tagen bei 20 %. Der GSSG-Anteil der Cd(II)-belasteten Probe mit Sulfat lag bei 12 % (0 h), stieg auf maximal

20 % (8 h) und betrug zum Versuchsende 20 %. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die veränderte Versorgung mit Sulfat und eine gleichzeitige Belastung mit Cd(II) keinen oxidativen Stress bei *Fontinalis antipyretica* hervorrufen.

Unterschiede waren lediglich in der Höhe der Cys- und  $\gamma$ -EC-Gehalte zu bemerken, die ab dem 2. Tag (Cys) bzw. am 2. und 6. Tag ( $\gamma$ -EC) bei der Cd(II)-Probe mit Sulfat im Medium bei Cys bis zu 2fach, bei  $\gamma$ -EC bis zu 1,8fach höher waren. Das Moos ist wahrscheinlich in der Lage, bei Versorgung mit Sulfat auf eine Cd(II)-Exposition mit einer verstärkten Sulfatassimilation und Biosynthese von Cys und  $\gamma$ -EC zu reagieren. Der Gehalt an GSH war bei beiden Reihen relativ ähnlich. Ob die Aktivität der GSH-Synthetase unabhängig vom externen Sulfatgehalt ist, müsste in weiteren Experimenten untersucht werden. Ursache ihrer Aktivierung könnte ebenfalls intrazellulär angereichertes Cd(II) sein.

Vergleicht man die intrazellulären Gehalte der beiden Cd(II)-belasteten Reihen muss man jedoch feststellen, dass Moos, welches mit Sulfat kultiviert wurde, eine geringere Menge an Cd(II) aufnahm (bis zu 1  $\mu\text{mol/g}$  FM weniger), so dass die höheren Gehalte an Cys und  $\gamma$ -EC in diesen Proben unverständlich sind. Die Wiederfindung von Cd(II) bei beiden Reihen war mit 106 % (C) bzw. 107 % (D) fast gleich, so dass die geringere Aufnahme nicht auf ausgefallenes CdSO<sub>4</sub> zurückgeführt werden konnte.

Unter den Versuchsbedingungen dieses Experimentes (Kap. 2. 4. 3 – Einfluss der Versorgung mit Sulfat bei Cd(II)-Belastung von *Fontinalis antipyretica*) scheint die biochemisch-physiologische Reaktion von *Fontinalis antipyretica* auf Cd(II)-Stress – eine Erhöhung des GSH-Gehaltes - aufgrund des zellulären Sulfatpools von der Sulfaternährung nicht signifikant beeinflusst zu werden. Der Sulfatgehalt des Moooses von ca. 4  $\mu\text{mol/g}$  FM war ausreichend, um bei einer Cd(II)-Exposition ohne Sulfat im Medium innerhalb von 14 Tagen verstärkt GSH zu synthetisieren.

Um eine eventuelle Schädigung des Photosyntheseapparates bei Cd(II)-Belastung im Zusammenhang mit unterschiedlicher Schwefelernährung zu untersuchen, wurde die Chlorophyll-Fluoreszenz, als Parameter für eine Beeinträchtigung des PS II, nach Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) und 0-500  $\mu\text{M}$  Sulfat über 10 Tage gemessen (Kap. 3. 3. 1, Abb. 29). Unabhängig von der Sulfat-Konzentration im Medium kam es bei allen Proben zu einer Abnahme der Vitalität, wobei keine deutlichen Tendenzen zu erkennen waren. Trotz des engen Zusammenhanges zwischen Photosynthese und Sulfatassimilation konnte in diesem Versuch kein negativer Einfluss geringer Sulfat-Konzentrationen im Medium auf die Vitalität von *Fontinalis antipyretica* bei Cd(II)-Belastung beobachtet werden. Die Schädigung des PS II wurde somit nur durch Cd(II) verursacht.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Sulfatassimilation als Voraussetzung für eine erhöhte GSH-Biosynthese in *Fontinalis antipyretica* bei Cd(II)-Stress verstärkt wird. Diese Zunahme ist bei den von uns gewählten Versuchsbedingungen nicht abhängig von der Versorgung der Pflanzen mit Sulfat. Der intrazelluläre Sulfat-Pool ist ausreichend, um bei einer 14tägigen Exposition mit Cd(II) Thiole zur möglichen direkten Detoxifikation des Schwermetalls durch Chelatbildung zu synthetisieren. Diese Unabhängigkeit der biochemisch-physiologischen Reaktion des Moores von der externen Sulfat-Konzentration bei Cd(II)-Belastung wurde weiterhin durch Messungen der Vitalität bestätigt, die durch den unterschiedlichen Sulfat-Gehalt des Mediums nicht beeinflusst wurde.

#### **4. 4. 2 Effekte von Schwefelmangel und Cd(II)-Belastung auf den Schwefelmetabolismus von *Fontinalis antipyretica***

Schwefelmangel kann vielfältige und erhebliche Auswirkungen auf den Stoffwechsel von Pflanzen haben. Fitzgerald et al. (1999) und Zhao et al. (1997) beschreiben eine geringere Ausbeute und Qualität von Getreide und Raps unter limitierter Ernährung mit Sulfat. In Weizen wurden S-arme Proteine, wie  $\omega$ -Gliadin synthetisiert, was zu einer Änderung in der Protein-Komposition der Pflanzen, verbunden mit einer verminderten Qualität des aus dem Getreide produzierten Brotes führte (Wrigley et al., 1984; Fullington et al., 1987). Weiterhin wurden Effekte auf die CO<sub>2</sub>-Assimilationsrate, die Aktivität der Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) und den Chlorophyll-Gehalt junger Blätter nachgewiesen, was eine Inhibierung der *de novo* Synthese von Komponenten des photosynthetischen Apparates reflektiert (Burke et al., 1986; Gilbert et al., 1997).

Leustek (1996) beschrieb die Aktivierung von Sulfataufnahme und -assimilation bei höheren Pflanzen unter S-Mangel-Bedingungen. Honda et al. (1998) zeigten, dass die Sulfataufnahme in *Arabidopsis thaliana* von der externen Sulfat-Konzentration abhängt. Der Transfer von Samen von Medium mit 1500 mM Sulfat auf 10 mM Sulfat rief eine Erhöhung der Aufnahme von Sulfat um das Doppelte hervor. Ähnliche Befunde erzielten Deane-Drummond (1987) und Hawkesford et al. (1993) bei der Untersuchung von *Pisum* und *Brassica*. Durch diese erhöhte Akkumulation von Sulfat werden in den Pflanzenzellen die Aufrechterhaltung der Sulfatassimilation und als Folge andere wichtige zelluläre Prozesse gewährleistet. Als mögliche Regulatoren der Sulfat-Aufnahme werden intrazelluläres Sulfat, aber auch OAS, Cys oder GSH diskutiert (Herschbach und Rennenberg, 1991, 1994; Bell et al. 1995b; Saito, 2000).

Auch die Biosynthese von GSH, welches in den Pflanzenzellen aus Cys über  $\gamma$ -EC hergestellt wird (Bergmann und Rennenberg, 1993), kann durch eine verringerte Sulfatassimilation durch S-Mangel-Bedingungen beeinflusst werden. Kuzuhura et al. (2000) untersuchten den Gehalt an Sulfat, GSH und  $\gamma$ -EC in Reispflanzen (*Oryza sativa*) während Schwefelmangels. Während es innerhalb von 4-7 Tagen zu einer Abnahme des Sulfatgehaltes in Phloemsaft und Blättern kam, wurden GSH- und  $\gamma$ -EC-Gehalt relativ konstant gehalten. In anderen Untersuchungen wurde bei *Brassica napus* eine Erniedrigung des GSH-Gehaltes bei S-Mangel festgestellt (Lappartient und Touraine, 1996). Untersuchungen zum Einfluss von Schwefelmangel auf Pflanzen beschränken sich in der Literatur auf höhere Pflanzen. Ergebnisse zu Wassermoosen sind uns in diesem Zusammenhang nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sank der interne Sulfat-Gehalt während 38 Tagen S-Mangel in *Fontinalis antipyretica* von 3,1  $\mu\text{mol/g}$  FM auf 0,77  $\mu\text{mol/g}$  FM ab (Kap. 3. 3. 2, Abb. 30). Auch der GSH-Spiegel nahm ab, innerhalb von 10 Tagen von 0,28 auf 0,15  $\mu\text{mol/g}$  FM (Kap. 3. 3. 2, Abb. 31). Danach blieb er relativ konstant, was die Hypothese einer Aufrechterhaltung der Sulfatassimilation und des S-Metabolismus unter Mangelbedingungen bestätigt. Die Vitalität des Moores, gemessen mittels Bestimmung der Ausbeute im PS II, wurde durch die fehlende Versorgung mit Sulfat nur in geringem Maße beeinflusst, es konnte eine leichte, jedoch signifikante Abnahme von 0,77 auf 0,71 beobachtet werden (Kap. 3. 3. 2, Abb. 32).

Wurde nach diesen 38 Tagen 500  $\mu\text{M}$  Sulfat zugegeben, reagierte das Moos mit einer aktiven Aufnahme des Nährstoffes. Der Sulfat-Pool wurde innerhalb eines Tages wieder auf 2,9  $\mu\text{mol/g}$  FM aufgefüllt und erreichte damit den Ausgangsgehalt an Sulfat (Kap. 3. 3. 2, Abb. 33). Auch der GSH-, GSSG- und Cys-Pool nahmen wieder zu (Kap. 3. 3. 2, Abb. 34 und Anhang A, Tab. 8). Der Gehalt an GSH stieg innerhalb eines Tages auf 0,43  $\mu\text{mol/g}$  FM, was dem 1,2fachen des Ausgangsgehaltes entsprach. Die Resultate sprechen für eine schnelle Aktivierung von Sulfatassimilation und GSH-Biosynthese durch Sulfat-Gabe nach S-Mangelbedingungen. Eine Änderung der Vitalität des Moores war dabei nicht zu beobachten (Kap. 3. 3. 2, Abb. 35). Der prozentuale Anteil von GSSG am Gesamt-GSH nahm von 13 % auf maximal 24 % (6 d) zu und betrug nach 22 Tagen 13 %. Diese Werte deuten nicht auf eine Stress-Situation für das Moos hin.

Wurde *Fontinalis antipyretica* nach 38 Tagen Sulfatmangel mit Sulfat versorgt und zusätzlich mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) belastet, stieg der Sulfatgehalt nur bis zum 2. Tag an (3,4  $\mu\text{mol/g}$  FM). Gleichzeitig mit einer Erhöhung des GSH-, Cys- und  $\gamma$ -EC-Gehaltes aufgrund der Cd(II)-Exposition, die nach einem Tag begann, nahm die Sulfat-Konzentration in den Zellen wieder bis auf 1,15  $\mu\text{mol/g}$  FM ab (Kap. 3. 3. 2, Abb. 33, 34 und Anhang A, Tab. 8). Maximal



wurden in den Mooszellen 1,9  $\mu\text{mol GSH/g FM}$ , 0,43  $\mu\text{mol Cys/g FM}$  und 0,81  $\mu\text{mol } \gamma\text{-EC/g FM}$  synthetisiert. Interessant hierbei ist die schnelle Reaktion der Pflanze auf die Exposition mit Cd(II). Sulfat und Cd(II) wurden bei diesem Versuch gleichzeitig zugegeben. Das Moos war in der Lage, nach 38tägigem Schwefelmangel die Sulfataufnahme und -assimilation innerhalb eines Tages so stark zu erhöhen, dass die Reaktion auf intrazelluläres Cd(II) – eine Erhöhung des GSH-Spiegels - innerhalb von 24 Stunden erfolgte. Man kann daraus folgern, dass die Aktivierung dieser Prozesse in den Zellen überaus schnell reguliert wird, was eine schnelle Reaktion auf Cd(II)-Stress ermöglicht. Die Werte von GSSG stiegen von 9 % auf maximal 20 % am Gesamt-GSH. Eine Erhöhung des prozentualen Anteils von GSSG, die auf oxidativen Stress hinweisen würde, erfolgte somit nicht (Kap. 4. 4. 1).

Im Gegensatz zur Probe mit Sulfat/ohne Cd(II) kam es jedoch zu einer Schädigung des PS II. (Kap. 3. 3. 2, Abb. 35). Da sich die Vitalität bei Belastung mit Cd(II) unter normalen Kultivierungsbedingungen (Kap. 3. 2, Abb. 25) in dem selben Maße verringerte, kann man davon ausgehen, dass nur Cd(II) an der Beeinträchtigung der Reaktionen des PS II beteiligt ist. Deshalb wurde in einem zweiten Versuch nach 45 Tagen S-Mangel zuerst 500  $\mu\text{M}$  Sulfat zugegeben. Die Cd(II)-Zugabe erfolgte erst einen Tag später, nachdem der Sulfatpool durch *Fontinalis antipyretica* wieder aufgefüllt war. Hiermit sollte bei Beteiligung von GSH eine effektivere Detoxifikation von Cd(II) möglich sein. Vergleicht man jedoch die Daten von Sulfat- und GSH-Gehalt (Kap. 3. 3. 2 und Anhang A, Tab. 9), erkennt man unabhängig von der zeitlichen Abfolge der Zugabe der beiden Substanzen tendenziell dieselben Reaktionen. Auch die Vitalität sank bei beiden Reihen relativ ähnlich ab. Das Moos scheint somit bei einer Cd(II)-Belastung primär die Sulfatassimilation zur Erhöhung der GSH-Biosynthese zu aktivieren. Weiterhin ist das Moos nach langen Sulfatmangel-Bedingungen in der Lage, schnell auf eine Sulfatversorgung zu reagieren, auch, wenn Cd(II) und Sulfat gleichzeitig zugegeben werden.

Wurde das Moos nach 38 Tagen S-Mangel weiterhin in Medium ohne Sulfat kultiviert, kam es zu einer weiteren Abnahme des Sulfat-Pools der Zellen bis auf minimale 0,25  $\mu\text{mol/g FM}$  (Kap. 3. 3. 2, Abb. 33). Insgesamt 60 Tage Sulfatmangel führten zu einer Verringerung des GSH-Gehaltes ab dem 41. - 46. Tag bis auf 0,027  $\mu\text{mol/g FM}$  (Kap. 3. 3. 2, Abb. 34). Auch der Cys- und der GSSG-Spiegel sanken. Ist *Fontinalis antipyretica* längerem S-Mangel ausgesetzt, kommt es zu einer Inhibierung von Sulfatassimilation und GSH-Biosynthese. Auch wenn der Sulfat-Pool der Zellen nicht vollständig verbraucht ist, wird die Produktion von GSH, Cys und GSSG „herunter reguliert“. Der prozentuale Anteil von GSSG am Gesamt-GSH stieg ab dem insgesamt 44. Tag bis auf über 30 % an, was verglichen mit den sulfatversorgten Proben etwas höher ist. Das deutet auf eine Stress-Situation aufgrund von

limitierter S-Ernährung hin. Ein Einfluss auf das PS II war nicht signifikant, die Vitalität verringerte sich nicht und war mit der Sulfat-Probe vergleichbar (Kap. 3. 3. 2, Abb. 35). So kann man folgern, dass das langzeitige Fehlen einer Versorgung mit Schwefel in *Fontinalis antipyretica* (60 Tage) keinen Einfluss auf die Leistung des PS II hat.

Wurde Pflanzenmaterial unter Sulfatmangel zusätzlich mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) belastet, reagierte das Moos trotz eines im Vergleich zum Normalzustand sehr geringen Sulfat-Pools mit einer Erhöhung von GSH, Cys,  $\gamma$ -EC, aber auch GSSG (Kap. 3. 3. 2, Abb. 34, Anhang A, Tab. 8). Dementsprechend nahm der Sulfat-Gehalt auf minimale 0,07  $\mu\text{mol/g}$  FM ab (Kap. 3. 3. 2, Abb. 33). Diese Aktivierung von Sulfatassimilation und GSH-Biosynthese bei Cd(II)-Belastung trotz gleichzeitigem S-Mangel zeigt die wichtige Rolle der Erhöhung des GSH bei der möglichen direkten Detoxifikation des Schwermetalls Cd(II). Der prozentuale Anteil von GSSG am Gesamt-GSH lag im Normbereich zwischen 10 und 21 % und deutet nicht auf oxidativen Stress hin. Aufgrund des sehr niedrigen Sulfat-Grundgehaltes in den Zellen, konnte der GSH-Gehalt jedoch nicht in dem Masse erhöht werden, wie es bei der mit Sulfat versorgten Cd(II)-belasteten Probe der Fall war. Er betrug maximal ca. 1/3, was den GSH-Mengen der Probe mit Sulfat, jedoch ohne Cd(II) entsprach. Er erreichte am 3. Tag ein Maximum (0,45  $\mu\text{mol/g}$  FM), um dann auf 0,14  $\mu\text{mol/g}$  FM abzusinken.

Das Moos war aufgrund des sehr niedrigen Sulfat-Spiegels somit nicht in der Lage, GSH in einer der Cd(II)-Belastung entsprechenden Menge zu synthetisieren. Das wirkte sich auch auf die Reaktionen des PS II aus. Im Vergleich zur Cd(II)-belasteten Probe mit Sulfat kam es zu einem deutlich stärkeren Abfall der Vitalität (Kap. 3. 3. 2, Abb. 35). Die Abnahme der Vitalität weist darauf hin, dass die Detoxifikation von Cd(II) nicht mehr effektiv erfolgte. Falls GSH zur Komplexierung von Cd(II) im Cytoplasma der Zellen beiträgt, könnten freie Cd(II)-Ionen im Cytoplasma den höheren Vitalitätsverlust hervorrufen, da eine ungenügende Erhöhung des GSH-Pools eine geringere Chelatierung nach sich ziehen könnte.

Auch in der Literatur findet man Aussagen über den Einfluss der Sulfatversorgung auf die Sensitivität von Pflanzen gegenüber Cd(II). Popovic et al. (1996) beschrieben bei Zuckerrüben, die mit viel S versorgt wurden, eine Erniedrigung der toxischen Wirkung von Cd(II) auf die Aktivität der Nitratreduktase und Glutamat-Dehydrogenase. Weiterhin spielt Schwefel eine wichtige Rolle bei der Synthese von cysteinreichen Thiolpeptiden, wie Phytochelatinen, die in höheren Pflanzen an der Detoxifikation von Cd(II) beteiligt sein können. Bei Kupfer-intoleranten Klonen von *Deschampsia cespitosa* kam es unter Schwefelmangel zur Reduktion des Gehaltes an thiolreichen Kupfer-bindenden Peptiden und zur Inhibierung des Wurzelwachstums (Schultz und Hutchinson, 1988). Fontes und Cox

(1995) fanden bei der Untersuchung von Sojabohnen eine Abhängigkeit der Zn(II)-Toxizität von der S-Ernährung.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Wassermoose *Fontinalis antipyretica* in der Lage ist, lange S-Mangel-Perioden ohne Vitalitätsverlust zu überdauern. In diesem Zusammenhang werden jedoch Sulfatassimilation und Thiol-Biosynthese in den Zellen vermindert. Nach Zugabe von Sulfat erfolgt ein schnelles Auffüllen von Sulfat- und Thiol-Pool durch eine Aktivierung des S-Metabolismus, was eine sehr schnelle Reaktion der Pflanze auf gleichzeitigen Cd(II)-Stress ermöglicht. Auch während längerfristigem Sulfatmangel reagiert *Fontinalis antipyretica* bei Cd(II)-Belastung mit einer Aktivierung der Sulfatassimilation und einer Erhöhung des Thioloopoles, v. a. der Biosynthese von GSH. Mit diesen Untersuchungen konnte die wichtige Rolle von GSH bei der Vermeidung von Cd(II)-Stress in den Zellen des Moooses bestätigt werden.

#### **4.5 <sup>15</sup>N–Tracer-Studien mit *Fontinalis antipyretica* unter Schwermetallbelastung**

Die Nutzung von stabilen Isotopen, wie <sup>15</sup>N, ermöglicht Studien über die Aufnahme dieser für Pflanzen wichtigen Nährstoffe in die Zellen und deren Einbau in Aminosäuren und Proteine (Mae, 1997; Ter Steege et al., 1999). Vielfältig wurde dieser Tracer auch zur Untersuchung des Einflusses von Schadstoffen auf den pflanzlichen N-Metabolismus oder für Studien der Änderung natürlicher Stickstoffverhältnisse (<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N) durch anthropogene Stickstoffeinträge eingesetzt (Jung und Junghans, 1981; Jung et al., 1994, 1997, 1999; Hafner et al., 2000; Schweizer et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde die Messung des Einbaus von <sup>15</sup>N-Stickstoff in die Aminosäure (NPN)- und Protein (PN)-Fraktion verwendet, um die potentielle Toxizität von Schwermetallen für die Stoffwechselsituation von *Fontinalis antipyretica* abzuschätzen (Kap. 3. 5).

In Kontrollpflanzen kam es nach Aufnahme von <sup>15</sup>N, welches in Form von K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> dem Nährmedium als Stickstoffquelle zugesetzt wurde, zur Inkorporation des Tracers in die Aminosäuren. Die <sup>15</sup>N-Häufigkeit stieg innerhalb von 10 Tagen auf 1,13 at.-% exc. (Kap. 3. 5, Abb. 41 A). Die <sup>15</sup>N-Häufigkeit der Protein-Fraktion stieg langsamer an, erreichte jedoch nach 5-10 Tagen den Wert des <sup>15</sup>N der Aminosäuren. In den Pflanzen wird Stickstoff zuerst in Aminosäuren eingebaut, welche dann im Laufe der Proteinbiosynthese als Bausteine zum Aufbau von Peptiden und Proteinen dienen. Der Flux von <sup>15</sup>N von Nitrat ⇒ Aminosäure-N ⇒ Protein-N zeigt die wichtige Rolle von Stickstoff für die Aufrechterhaltung des pflanzlichen Metabolismus, aber auch die der Aminosäuren als Vorstufen der Proteinbiosynthese.

Trotz Belastung mit Cd(II) kam es weiterhin zum Einbau von Stickstoff in Aminosäuren und Proteine, jedoch sank die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit von Aminosäure- und Protein-Fraktion mit höherer Cd(II)-Konzentration immer mehr ab (Kap. 3. 5, Abb. 41 B, C). Es erfolgte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Nitratassimilation und der Aminosäure-Synthese in *Fontinalis antipyretica* bei Cd(II)-Stress.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei Experimenten mit höheren Pflanzen erhalten. Boussama et al. (1999) untersuchten die Wirkung von Cd(II) auf die Stickstoffassimilation bei *Zea mays*. Dabei zeigte Cd(II) im Bereich zwischen 10 und 50  $\mu\text{M}$  einen inhibitorischen Effekt auf die Enzyme der Nitratreduktion (Nitrat- und Nitritreduktase) und der Glutamat/Glutamin-Biosynthese (Glutamat-Synthase/Glutamin-Synthetase). Auch der Gesamt-Gehalt an Aminosäuren sank mit steigender Cd(II)-Konzentration. In Samen von *Sesamum indicum* wurde die *in vivo* Aktivität der Nitratreduktase durch Kombinationen von Cd(II), Cu(II) und Pb(II) (je 1 mM) gehemmt (Bharti und Singh, 1994). Costa und Morel (1994) beschrieben eine Erniedrigung des Aminosäure-Gehaltes und der  $^{14}\text{C}$ -Inkorporation in Aminosäuren bei Belastung von *Lactuca sativa* mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II), jedoch auch eine signifikante Erhöhung bestimmter Aminosäuren, wie Prolin, Asparagin oder Aspartat, die u. a. durch eine Hemmung der Proteinbiosynthese akkumuliert werden könnten. Befunde aus aquatischen Bryophyten sind uns hierzu nicht bekannt.

Eine weitere Ursache für die von uns beobachtete Verringerung des Einbaus von  $^{15}\text{N}$  in Aminosäuren und Proteine könnte eine Hemmung der Nitrat-Aufnahme durch Cd(II) sein. Schwermetalle schädigen die Lipidstruktur des Plasmalemmas und sind so in der Lage, eine Veränderung der Aufnahmekapazität von Nährstoffen zu bewirken. Sie beeinflussen zum Beispiel die Membranlipide qualitativ und quantitativ, indem sie ihre Biosynthese hemmen oder indirekt durch Bildung freier Radikale eine Peroxidation bewirken (Devi und Prasad, 1999; De Vos et al., 1991). Dadurch werden Struktur und Funktion der Membran modifiziert, was wiederum einen Einfluss auf die Konformation und Aktivität von Membranenzymen haben kann (Cooke und Burden, 1990; Ros et al., 1992; Lindberg und Griffith, 1993). Eine verringerte Aktivität von membrangebundenen ATPasen wurden bei Belastung mit Al(III), Cd(II), Ni(II) und Cu(II) beobachtet (Lindberg und Griffith, 1993; Ros et al., 1992; De Vos et al., 1991). Al(III) reduzierte die Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und Phosphat in *Fagus sylvatica* (Bengtsson et al., 1988). Die Autoren führten dies zum einen auf eine Konkurrenz der Ionen um Bindungsstellen an der Zellwand, zum anderen auf eine Modifikation der Membranpermeabilität durch Al(III) zurück. Die Inhibierung des Nitrat-Transporters in *Fontinalis antipyretica* durch Cd(II) könnte eine verringerte Nitrat-Aufnahme nach sich

ziehen und neben einer Hemmung von Nitratassimilation und Aminosäurebiosynthese die geringere Inkorporation von  $^{15}\text{N}$  erklären.

Die Hemmung der Aminosäure-Synthese oder der Nitrat-Aufnahme in die Mooszellen könnte auch den geringeren Einbau von Stickstoff in die Protein-Fraktion erklären. Bezeichnend ist jedoch die mit steigendem Cd(II)-Gehalt der Zellen immer größer werdende Differenz der  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit zwischen Aminosäuren und Proteinen (Kap. 3. 5, Abb. 41, 42). Während der Flux von  $^{15}\text{N}$  von Aminosäuren in Proteine bei geringeren Cd(II)-Konzentrationen nicht so stark gehemmt wird, sinkt er mit steigender Cd(II)-Konzentration immer mehr ab. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die geringere Inkorporation von Stickstoff in die Proteine auf eine konzentrationsabhängige Hemmung der Protein-Biosynthese durch Cd(II) zurückgeführt werden kann und nicht bloß eine Folge einer verringerten Aminosäure-Synthese oder Nitrat-Aufnahme bzw. -Assimilation darstellt.

Neben dem Einfluss von Cd(II) auf Aminosäure- und Protein-Biosynthese wurde der der Schwermetalle Zn(II) und Pb(II) untersucht (Kap. 3. 5, Abb. 43). Bei diesen beiden Schwermetallen kam es ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Verringerung der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation in Aminosäuren und Proteine. Die deutliche stärkere Erniedrigung des Einbaus von  $^{15}\text{N}$  in die Proteinfraktion weist auch bei Zn(II) und Pb(II) auf die Hemmung der Protein-Biosynthese hin. Folgende Reihenfolge der Inhibierung von Aminosäure- und Proteinbiosynthese lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten: Cd(II) >> Pb(II) > Zn(II).

Die Beeinflussung von Aminosäure- und Protein-Biosynthese durch alle drei Schwermetalle, die schon bei Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  sichtbar wird, weist auf die extreme Sensibilität dieser Prozesse gegenüber Umweltschadstoffen, v. a. Schwermetallen hin. Peptide und Proteine sind an der Aufrechterhaltung aller lebenswichtigen Prozesse von Pflanzenzellen beteiligt. Die Hemmung von Aminosäure- und Protein-Biosynthese erwies sich somit als ein sensitiver Indikator für Schwermetall-Stress bei *Fontinalis antipyretica*. Aussagen über den Mechanismus der Inhibierung sind aufgrund der vielfältigen Angriffspunkte in der Zelle jedoch nicht möglich.

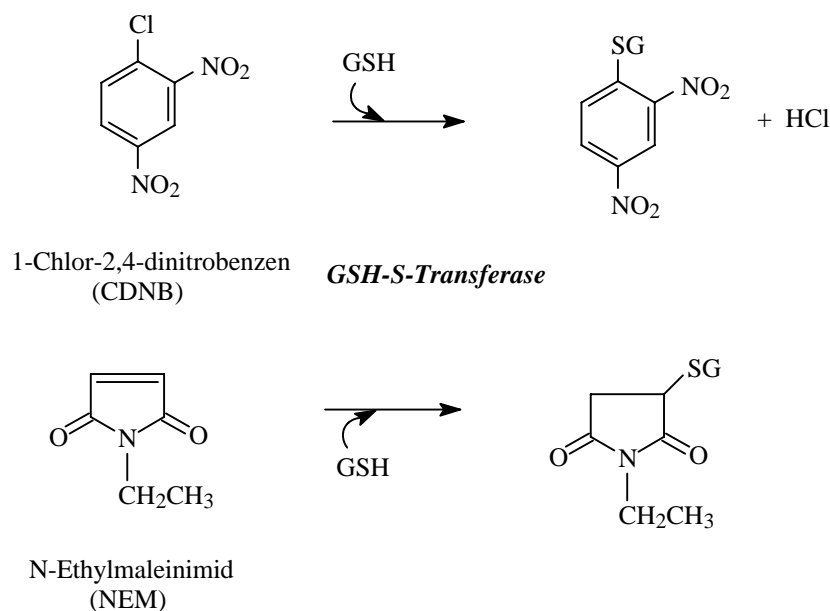
## **4. 6 Effekte der Exposition mit organischen Substanzen (Xenobiotika) auf *Fontinalis antipyretica***

### **4. 6. 1 Einfluss von Organika auf den Thiolgehalt und die Vitalität von *Fontinalis antipyretica***

Neben Schwermetallen können auch organische Schadstoffe, sogenannte Xenobiotika, die Aufrechterhaltung des pflanzlichen Stoffwechsels beeinträchtigen. Die Detoxifikation kann

durch Bindung an GSH und Transport dieses Komplexes in die Vakuole erfolgen (Kap. 1. 2). In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Konkurrenz bei der Detoxifikation von Cd(II) und den organischen Verbindungen CDNB, NEM und Metolachlor in *Fontinalis antipyretica* untersucht, die Aufschluss über den Mechanismus der Kompartimentierung von Cd(II) geben sollten (Kap. 3. 6 und 4. 6. 2). Die Ergebnisse der Experimente gaben ferner Einblick in die Wirkung dieser Substanzen auf den Thiolgehalt und die Vitalität von *Fontinalis antipyretica*.

Durch Exposition des Moores mit 100  $\mu\text{M}$  CDNB und NEM kam es innerhalb von 3 Tagen zu einer signifikanten Abnahme des GSH-Spiegels (Kap. 3. 6, Abb. 45 – 0 h b). Der GSH-Gehalt der Kontrolle lag ca. 10fach höher als der durchschnittliche GSH-Spiegel der mit 100  $\mu\text{M}$  CDNB oder NEM belasteten Proben. Die Abnahme des GSH-Pools bei Belastung von *Fontinalis antipyretica* mit Xenobiotika könnte mit einer Konjugation der beiden Substanzen an die SH-Gruppe des GSH und einem möglichen Transport des Konjugates in die Vakuole über GSH-S-Konjugat-Transporter erklärt werden. In Abb. 50 ist die denkbare Konjugat-Bildung von CDNB und NEM mit GSH dargestellt. Da sich der GSH-Gehalt im Versuchsverlauf nicht wieder erhöhte, könnte man zusätzlich eine Hemmung der GSH-synthetisierenden Enzyme vermuten.



**Abb. 50.** Mögliche Bindung von GSH an CDNB und NEM in Pflanzenzellen mittels der GSH-S-Transferase.

Der Einfluss auf die Vitalität wurde mittels Bestimmung der photochemischen Quantenausbeute des PS II (Kap. 2. 3. 3) bei Belastung von *Fontinalis antipyretica* mit

50 und 10  $\mu\text{M}$  CDNB bzw. NEM und 25 und 50  $\mu\text{M}$  Metolachlor untersucht (Abb. 46, 47, 48). Dabei zeigte sich für die untersuchten Xenobiotika folgende Toxizität auf *Fontinalis antipyretica*: CDNB > NEM > Metolachlor. Während Metolachlor die Vitalität nicht beeinflusste, hatte die Belastung mit 50  $\mu\text{M}$  CDNB das Absterben der Pflanzen zur Folge. Bei der Exposition mit 50  $\mu\text{M}$  NEM war das Moos trotz Absinkens des GSH-Gehaltes in der Lage, NEM soweit zu detoxifizieren, dass die Vitalität ab dem 6. Tag wieder bis auf maximal 72 % der Kontrolle anstieg. Auch bei Belastung mit 10  $\mu\text{M}$  CDNB bzw. NEM kam es zu einer Inhibierung der photochemischen Reaktionen des PS II. Da die intrazelluläre Konzentration der beiden Verbindungen im Gegensatz zur Belastung mit 50  $\mu\text{M}$  wahrscheinlich geringer war, erfolgte die Detoxifikation effektiver und schneller. Die Vitalität von *Fontinalis antipyretica* stieg bei Belastung mit beiden Substanzen im Versuchsverlauf wieder bis auf 100 % der Kontrolle an.

Zusammenfassend kann man sagen, dass *Fontinalis antipyretica* in der Lage ist, Xenobiotika, in diesem Fall Modellsubstanzen, wie CDNB und NEM, in den Zellen zu entgiften. Aus der Erniedrigung des GSH-Gehaltes nach Exposition mit diesen Verbindungen, kann man folgern, dass eine Konjugation an GSH und der Transport dieser Komplexe in die Vakuole wahrscheinlich ist. Schädigungen des PS II können durch diese Detoxifikation nur bei geringen Schadstoff-Konzentrationen vollständig regeneriert werden.

#### **4. 6. 2 Beeinflussung der Cd(II)-Akkumulation und –Kompartimentierung durch Xenobiotika**

Aufgrund der Erhöhung des zellulären GSH-Spiegels nach Belastung mit dem Schwermetall Cd(II) und der Möglichkeit einer Bindung von Cd(II) an die SH-Gruppe des Cys von GSH, käme Glutathion als Transportmolekül für Cd(II) in die Vakuole in Frage. Elektronenmikroskopische Analysen (EELS, Kap. 3. 4. 1, Abb. 39 A) zeigten eine Chelatierung von Cd(II) im Cytoplasma durch thiolhaltige Peptide, wobei Phytochelatine als Komplexbildner ausscheiden (Bruns et al., 2000b).

Li et al. (1997) fanden in *Saccharomyces cerevisiae* einen Glutathion-S-Konjugat-Transporter (YCF 1), der neben Xenobiotika-Konjugaten (DNP-GS) auch den Transport von Bis(Glutathionato)-Cadmium-Komplexen ( $\text{Cd} \cdot \text{GS}_2$ ) in die Vakuole katalysierte. In *Arabidopsis thaliana* entdeckten Tommasini et al. (1997) vier Gene (AtMRP) mit großer Homologie zu MRP1 und YCF1, welche GSH-S-Konjugat-Transporter in Human- bzw. Hefezellen darstellen. Durch Komplementation eines Cd(II)-sensitiven Hefestammes von *Saccharomyces cerevisiae* ohne YCF1-Transportaktivität mit AtMRP3 konnte die Cd(II)-

Toleranz dieses Stammes wiederhergestellt werden (Tommasini et al., 1998). Diese Ergebnisse deuten auf die Möglichkeit der Detoxifikation von Cd(II)-GSH-Komplexen über Glutathion-S-Konjugat-Transporter (ABC-Transporter) hin.

Würde man den GSH-Gehalt in den Zellen gegen Null senken, müsste man, falls dieses Tripeptid an der Entgiftung von Cd(II) beteiligt ist, eine erhöhte Toxizität bzw. eine Anreicherung von Cd(II) im Cytoplasma feststellen können. Eine Möglichkeit, den GSH-Pool zu erniedrigen, liegt in der Inhibierung der Biosynthese von GSH. Die Wirkung von Buthioninsulfoximin (BSO) wurde bereits von Bergmann und Rennenberg (1993) beschrieben. Diese Verbindung hemmt die  $\gamma$ -EC-Synthetase, welche die Bildung von  $\gamma$ -EC aus Cys und Glu katalysiert. Bei Exposition mit bis zu 1 mM BSO konnten wir bei *Fontinalis antipyretica* jedoch keine Hemmung der GSH-Produktion erreichen (nicht dargestellt). Ursache dafür könnte sein, dass BSO nicht in die Mooszellen aufgenommen wurde.

Wie in Kap. 3. 6 beschrieben, kam es bei Belastung mit CDNB oder NEM, welche nach der Literatur als GSH-Konjugate detoxifiziert werden, zu einer extremen Erniedrigung des zellulären GSH-Gehaltes in *Fontinalis antipyretica*. Nach dreitägiger Belastung mit 100  $\mu$ M CDNB bzw. NEM lag der GSH-Gehalt zwischen 0,013 und 0,026  $\mu$ mol/g FM, während der GSH-Gehaltes der Kontrolle 0,21  $\mu$ mol/g FM betrug (Abb. 45). Theoretisch kann dieses an die Xenobiotika gebundene GSH Cd(II) nicht mehr chelatieren, so dass der Transport eines möglichen Cd(II)-GSH-Komplexes in die Vakuole gehemmt sein würde. Um solch eine Konkurrenzsituation zwischen Xenobiotika und Cd(II) hervorzurufen, wurde das Pflanzenmaterial mit CDNB/NEM und Cd(II) exponiert (Kap. 2. 4. 6).

Biosorption und Akkumulation von Cd(II) wurden durch die Anwesenheit der organischen Verbindungen in der Nährlösung nicht beeinflusst, die extra- und intrazellulären Cd(II)-Gehalte waren mit den Werten der nur mit Cd(II)-belasteten Probe vergleichbar (Kap. 3. 6, Abb. 44). Eine übereinstimmende Cd(II)-Akkumulation der Proben war wichtig, um Veränderungen in GSH-Gehalt oder Vitalität vergleichen zu können.

Nach dreitägiger Belastung mit 100  $\mu$ M CDNB bzw. NEM kam es zu einer Erniedrigung des GSH-Spiegels auf ca. 1/8 bis 1/16 der Kontrolle. Nach Zugabe von Cd(II) erhöhte sich der GSH-Gehalt der nur mit Cd(II)-belasteten Probe auf das maximal dreifache der Kontrolle nach 3 Tagen. Bei gleichzeitiger Exposition mit CDNB sank der GSH-Spiegel weiter ab, während er bei NEM wieder bis auf 0,18  $\mu$ mol/g FM anstieg (Kap. 3. 6, Abb. 45). Dies verdeutlicht erneut den schon in Kap. 4. 6. 1 beschriebenen starken Einfluss von CDNB auf das Moos. Die Zellen können auf eine zusätzliche Belastung mit Cd(II) nicht mehr mit einer Erhöhung des GSH-Gehaltes reagieren, was sich auf den Transport von Cd(II) in die Vakuole auswirken könnte. Die Detoxifikation von NEM scheint effektiver zu erfolgen, da es in



*Fontinalis antipyretica* nach der Cd(II)-Zugabe bei gleichzeitiger Anwesenheit von NEM zu einer GSH-Erhöhung kommt. Jedoch beträgt der Wert des GSH ca. 1/3 der nur mit Cd(II)-belasteten Probe, was einen negativen Einfluss auf die Entgiftung von Cd(II) haben könnte.

Wurden CDNB und NEM vor der Cd(II)-Exposition entfernt, stieg der GSH-Spiegel in beiden Fällen wieder an, erreichte aber nur 1/11 bzw. 1/7 der nur mit Cd(II)-belasteten Probe. Auch diese Differenz sollte einen Einfluss auf die Effektivität der Cd(II)-Detoxifikation in den Zellen haben. Bei gleichzeitiger Belastung des Moores mit Metolachlor und Cd(II) stieg der GSH-Spiegel ähnlich wie bei der nur mit Cd(II)-exponierten Probe an. Die große Erhöhung des GSH-Spiegels nach Entfernen der Verbindung und folgender Cd(II)-Belastung kann bisher nicht erklärt werden.

Sollten bei der Detoxifikation von Cd(II) in *Fontinalis antipyretica* die Chelatierung mit GSH und der Transport dieses Komplexes über GSH-S-Konjugat-Transporter eine wichtige Rolle spielen, müsste die Erniedrigung des GSH-Gehaltes durch NEM und CDNB eine größere Anzahl freier Cd(II)-Ionen im Cytoplasma hervorrufen, da nicht mehr genügend GSH-Moleküle zur Komplexierung von Cd(II) zur Verfügung stehen. Dies könnte in den Mooszellen einen direkten Einfluss auf die Vitalität des Moores bzw. die Kompartimentierung von Cd(II) in den Vakuolen haben.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Vitalität des Moores nach 3tägiger Belastung mit 50 µM CDNB bzw. NEM und folgender Zugabe von 100 µM Cd(II) bestimmt (Kap. 3. 6, Abb. 46). Würde zwischen den Xenobiotika und Cd(II) eine Konkurrenz um GSH-Moleküle bestehen, müssten sich deutliche Vitalitätsunterschiede zwischen den Proben, die nur mit Cd(II), NEM oder CDNB belastet waren, und denen, die gleichzeitig mit Cd(II) und NEM/CDNB exponiert wurden, zeigen. Vitalitätsverluste der Einzelproben sollten sich bei Kombination der Schadstoffe addieren.

Eine Additionswirkung der Schädigungen durch NEM/CDNB und Cd(II) war allerdings aus diesen Messungen nicht zu erkennen. Aufgrund der starken Schädigungen bei diesen relativ hohen Konzentrationen, wurden weitere Vitalitätsuntersuchungen bei Belastung mit 10 µM NEM bzw. CDNB und 50 µM Cd(II) durchgeführt (Kap. 3. 6, Abb. 47 und 48). Die Belastung mit NEM senkte die Vitalität innerhalb eines Tages auf durchschnittlich 64 % der Kontrolle: Sie stieg ab dem ersten Tag wieder an und erreichte am 2. Tag 97 % der Kontrolle. Bei Belastung mit Cd(II) kam es innerhalb von 2 Tagen zu einer Vitalitätsabnahme auf 87 %, während die Vitalität der NEM + Cd(II)-Probe bei nur 65 % lag. Bei dieser Probe war ein Wiederanstieg der Vitalität ab dem 2. Tag zu erkennen. Sie erreichte ihr Maximum nach 4 Tagen (77 %). Da dieser Wert ungefähr dem der Cd(II)-Probe zu diesem Zeitpunkt entsprach, kann davon ausgegangen werden, dass die Vitalität der NEM + Cd(II)-Probe ab

dem 4. Tag nur noch durch das Schwermetall Cd(II) beeinflusst wurde. Auffällig ist der im Vergleich zur NEM-Probe langsamere Wiederanstieg der Vitalität bei gleichzeitiger Belastung mit NEM und Cd(II), was darauf hindeutet, dass die Detoxifikation von NEM in Gegenwart von Cd(II) in den Zellen beeinträchtigt wird. Ähnliche Tendenzen konnten bei Belastung mit CDNB, welches über den gleichen Mechanismus wie NEM entgiftet wird, nicht gefunden werden. Somit ist eine befriedigende Aussage über eine Konkurrenzsituation zwischen Xenobiotika und Cd(II) in den Mooszellen nicht möglich, obwohl die gegenseitige Beeinflussung der Vitalität durch NEM und Cd(II) ein erster Hinweis auf konkurrierende Detoxifikationsmechanismen sein könnte.

Vorraussetzung für einen Vergleich der Vitalität ist zudem eine gleiche Schadwirkung der verschiedenen Substanzen. Für die Beeinträchtigung des PS II kann es jedoch vielfältige Ursachen geben, wie Zerstörung des Thylakoid-Membransystemes (Stoyanova und Tchakalova, 1997), Beeinflussung der Antennenpigmente (Küpper et al., 1998), aber auch Inhibierung von Enzymen (Clijsters und van Assche, 1985), die eine Erniedrigung der photochemischen Ausbeute und somit der Vitalität verursachen. Mit der Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz kann man somit nicht sagen, ob NEM/CDNB und Cd(II) im PS II gleiche Angriffspunkte haben und inwiefern sich unterschiedliche Schadwirkungen bei den Messungen addieren.

Ergänzende Untersuchungen zu diesem Problem wurden mittels analytischer Elektronenmikroskopie durchgeführt. Dazu wurde *Fontinalis antipyretica* zunächst 3 Tage mit 100  $\mu$ M CDNB bzw. NEM belastet, dann erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ M Cd(II). Trotz der oben beschriebenen Abnahme des GSH-Gehaltes in den Zellen kam es zu einem Transport von Cd(II) in die Vakuolen der Mooszellen (Kap. 3. 4. 2, Abb. 40). Auch dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Transport von Cd(II) nicht dem der Xenobiotika ähnelt. Jedoch könnte auch eine geringe Menge an verfügbarem GSH zum Transport von Cd(II) an die Tonoplastenmembran ausreichen, wenn es an der Membran zur Auflösung des Komplexes käme und nur freie Cd(II)-Ionen in die Vakuole transportiert werden würden. Salt und Wagner (1993) beschrieben den Cd(II)-Transport durch den Tonoplast von Haferwurzeln mittels einer V-Typ ATPase über einen pH-Gradienten. Sie bewiesen einen Gramacidin-sensitiven Cd<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiport in Tonoplasten-angereicherten Vesikeln. Dieser Transporter gehört nicht zur Klasse der GSH-S-Konjugat-Transporter, die durch Vanadat, aber nicht durch H<sup>+</sup>-Ionophore (Gramicidin) gehemmt werden können.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Vanadat sollten in der vorliegenden Arbeit weitere Aufklärung über den Transportmechanismus von Cd(II) in die Vakuolen von *Fontinalis antipyretica* bringen. Vanadat gilt als Hemmstoff von ABC-Transportern und

somit auch von GSH-S-Konjugat-Transportern. Da schon der Transport von Cd(II) ins Cytoplasma gehemmt wurde, konnte ein Einfluss auf den Cd(II)-Transport in die Vakuole nicht überprüft werden. Molekularbiologische Experimente zur Isolierung eines GSH-S-Konjugat-Transporters in *Fontinalis antipyretica*, der eine Funktion als Transporter für Cd(II)-GSH-Komplexe aufweisen könnte, zeigten bislang keinen Erfolg.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Schwermetall-Stress stellt ein wesentliches Problem im pflanzlichen System dar. Frühere Studien mit terrestrischen und aquatischen Moosen beschränkten sich jedoch oft auf die Nutzung dieser Organismen als Biomonitore und Bioindikatoren, mit denen die Schwermetallbelastung natürlicher Standorte untersucht wurde. Die Charakterisierung der biochemisch-physiologischen Reaktion dieser Pflanzen auf die Belastungssituation war dabei von geringerem Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Biomonitor Moos *Fontinalis antipyretica* gearbeitet. Hier zeigten sich schon in früheren Arbeiten von Bruns et al. (1997, 2000b, c) deutliche Unterschiede in der Schwermetallantwort dieses Moooses im Vergleich zur höheren Pflanze.

Auf der Basis dieser Ergebnisse untersuchten wir die Akkumulation von Schwermetallen und deren Wirkung auf die Vitalität und den Stoffwechsel von *Fontinalis antipyretica*, wobei gleichzeitig weitere Kenntnisse über den Mechanismus der Detoxifikation von Schwermetallen erlangt werden sollten.

- Die Akkumulation der Schwermetalle Cd(II), Pb(II) und Zn(II) erwies sich als zeit- und konzentrationsabhängiger Prozess. Es kam bei allen Elementen zu einer schnellen Biosorption an die Blattoberfläche der Pflanzen. Das Gleichgewicht zwischen Medium und Oberfläche wurde nach maximal 4 Stunden erreicht.

Die Reihenfolge der Biosorptions-Kapazität von *Fontinalis antipyretica* ließ sich nach Umrechnung auf 100 % Wiederfindung des jeweiligen Schwermetalls wie folgt festlegen:

⇒ 25 µM: Cd(II) ≥ Zn(II) > Pb(II)

⇒ 100 µM: Cd(II) > Pb(II) > Zn(II)

⇒ 500 µM: Pb(II) > Cd(II) > Zn(II).

Ein Vergleich der Adsorptionskapazität des Moooses für die Schwermetalle war jedoch schwierig, zurückzuführen auf den unterschiedlichen Verlauf der Biosorption und die differente Wiederfindung der Schwermetalle. Ein weiteres Problem war die Verwendung von Freilandmaterial, auf welchem in Abhängigkeit vom Probenahmezeitpunkt unterschiedliche Mengen an Elementen zu finden waren, die die Adsorption kompetitiv beeinflussen konnten.

Bei Cd(II) und Zn(II) wurde im Verlauf von 10 Tagen eine Abnahme der extrazellulären Fraktion beobachtet. Weitere Versuche, bei denen die Cd(II)-Belastung nach 2 Stunden abgesetzt wurde, lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Aufnahme dieser Metallionen von der Oberfläche aus geschieht. Dies spricht für eine Depotfunktion der Moosoberfläche für Cd(II).

Pb(II) zeigte ein anderes Adsorptionsverhalten als Cd(II) und Zn(II). Hier scheinen die Ionen eine sehr große Affinität zur Oberfläche zu besitzen, eine Aufnahme dieser Fraktion ins Innere ist unwahrscheinlich. Dies spricht für die höhere Mobilität von Cd(II) und Zn(II) im Gegensatz zu Pb(II).

Eine Sättigung der Moosoberfläche mit Cd(II) oder Pb(II) war im untersuchten Konzentrationsbereich (25 – 400/500 µM) nicht zu beobachten. Bei Zn(II) deutete sich eine gewisse Sättigung der Kationen-Bindungsstellen mit steigender Schwermetall-Konzentration an.

- Neben der Biosorption kam es zu einer Aufnahme aller drei Schwermetalle ins Zellinnere. Diese erfolgte langsamer, bei Cd(II) und Zn(II) jedoch kontinuierlich über den Versuchszeitraum von 10 Tagen hinweg. Im Gegensatz dazu kam es bei Pb(II) zur Aufnahme einer relativ großen Menge innerhalb der ersten 10 Minuten. Diese Fraktion blieb dann über 10 Tage relativ konstant, vergleichbar mit dem Verhalten des extrazellulären Anteils. Nach Umrechnung auf 100 % Wiederfindung wurde für alle Schwermetall-Konzentrationen (25/100/500 µM) folgende Aufnahmekapazität von *Fontinalis antipyretica* festgelegt: Pb(II) > Cd(II) ≥ Zn(II).

- Vergleichende Untersuchungen der Cd(II)-Akkumulation zweier Arten von *Fontinalis* (*Fontinalis antipyretica* / *Fontinalis dalecarlica*) mit differenter Blattform sollten Aufschluss über den Einfluss der Blattmorphologie auf das Akkumulationsvermögen der Moose geben. Die Blätter stellen bei *Fontinalis* die Organe der Stoffaufnahme dar. Unterschiede in der Biosorption könnten einerseits auf eine differente Anzahl von Bindungsstellen für Cd(II) in der Mooszellwand zurückgeführt werden. Mögliche Ursachen dafür sind artspezifische Unterschiede in der Blattgröße, aber auch der Zellwand. Da Freilandmaterial verwendet wurde, kann andererseits das natürliche Vorkommen kompetitiver Elemente auf der Moosoberfläche einen Einfluss auf die Biosorption von Cd(II) zeigen. Die Aufnahme ins Zellinnere kann wiederum auf Unterschiede des Standortes, aber auch der Physiologie der Pflanzen zurückgeführt werden.

Bei beiden Arten erfolgte eine zeit- und konzentrationsabhängige Akkumulation von Cd(II), verbunden mit einer schnellen Biosorption und langsamen, kontinuierlichen Aufnahme. Deutliche Unterschiede waren jedoch in der Größe von extra- und intrazellulärer Fraktion zu erkennen. *Fontinalis dalecarlica*, die Art mit schmalen Blättern, besaß eine deutlich geringere Adsorptions- und Aufnahmekapazität. Bei Belastung mit 100 µM Cd(II) waren nach 4 Stunden 39 % des gesamt wiedergefundenen Cd(II) biosorbiert, bei *Fontinalis*

*antipyretica* waren es immerhin 61 %. Das deutet auf einen signifikanten Einfluss der Blattform und somit der Anzahl an Kationenbindungsstellen auf die Biosorption von Schwermetallen hin. Auch der Verlauf der Biosorption war verschieden. Während es bei *Fontinalis antipyretica* innerhalb von 10 Tagen zu einer Abnahme der extrazellulären Fraktion kam, blieb diese bei *Fontinalis dalecarlica* relativ konstant. Weiterhin war bei *Fontinalis dalecarlica* im Konzentrationsbereich von 25-200  $\mu\text{M}$  Cd(II) eine gewisse Sättigung der Oberfläche mit den Metallionen zu beobachten, was bei *Fontinalis antipyretica* nicht der Fall war. Dies könnte wiederum auf die geringere Menge von Bindungsstellen in der Zellwand bei *Fontinalis dalecarlica* zurückgeführt werden. Letztlich war der intrazelluläre Anteil bei Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) bei *Fontinalis dalecarlica* geringer als bei *Fontinalis antipyretica*. Jedoch waren die Unterschiede hier nicht so deutlich wie bei der extrazellulären Fraktion.

Ein Vergleich mit *Fontinalis antipyretica* eines anderen Standortes lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Unterschiede bei der Akkumulation von Cd(II) eher auf artspezifische Differenzen der Zellwandzusammensetzung aufgrund der verschiedenen Blattmorphologie zurückzuführen sind. Standortsspezifische Parameter scheinen keinen so großen Einfluss zu haben.

Beide Moosarten reagierten auf die Belastung mit Cd(II) mit einer Erhöhung des GSH-Gehaltes, wobei deutliche Unterschiede in der Höhe des Ausgangsgehaltes und des Anstieges zu beobachten waren. Dies sollte eher auf die Umweltbedingungen am Standort zurückgeführt werden, da auch Pflanzen eines Standortes, d. h. einer Art in Abhängigkeit von der Zeit der Probenahme einen unterschiedlichen Ausgangsgehalt und eine differente Reaktion in bezug auf die Höhe des GSH-Gehaltes bei Cd(II)-Belastung aufweisen können.

- Mittels analytischer Elektronenmikroskopie wurde die Kompartimentierung von intrazellulär angereichertem Cd(II) untersucht. Cd(II) konnte im Cytoplasma und in den Vakuolen nachgewiesen werden. Der Vergleich von EEL-Standard-Spektren von Cd(II)/GSH-Komplexen mit denen der Cd(II)-haltigen Niederschläge im Cytoplasma lassen die Schlussfolgerung zu, dass Cd(II) an thiolhaltige Peptide gebunden ist. Cd(II) wird offensichtlich in die Vakuole transportiert, wo es nicht mehr toxisch wirken kann. Ob der Transport des Schwermetalls als Cd(II)/GSH-Komplex oder nach Abspaltung des GSH als freies Cd(II)-Ion erfolgt, konnte mit dieser Methode nicht analysiert werden. In der Vakuole wird Cd(II) als anorganisches Phosphat abgelagert, eine Bindung an Thiolpeptide erfolgte nicht. Diese Ergebnisse verbunden mit der Erhöhung des GSH-Gehaltes bei Cd(II)-Belastung und dem Fehlen von Phytochelatinen lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Detoxifikation

von Cd(II) in *Fontinalis antipyretica* durch Komplexierung mit GSH und folgendem Transport in die Vakuole erfolgt.

Cd(II), Pb(II) und Zn(II) zeigten einen, wenn auch unterschiedlichen Einfluss auf wichtige metabolische Prozesse von *Fontinalis antipyretica*, wie Photosynthese, Nitrat- und Sulfatassimilation, Aminosäure- und Proteinbiosynthese.

- Cd(II) und Pb(II) schädigten Prozesse des PS II, gemessen mittels der Chlorophyll-Fluoreszenz als Parameter für die Quantenausbeute der photochemischen Energieumwandlung im PS II. Im Bereich von 25 – 400 µM Cd(II) kam es zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Chlorophyll-Fluoreszenz. 400 µM Cd(II) führten innerhalb von 10 Tagen zum vollständigen Vitalitätsverlust, d. h. die Prozesse im PS II kamen zum Erliegen. Toxische Effekte beim Schwermetall Pb(II) waren erst bei einer Konzentration von 500 µM zu beobachten. Die Chlorophyll-Fluoreszenz lag jedoch mit Werten von 80 – 93 % der Kontrolle im vitalen Bereich der Pflanze. Bei Belastung mit 25 – 500 µM Zn(II) war kein negativer Einfluss auf das PS II zu messen. Folgende Reihenfolge für die Schädigung des PS II durch Schwermetalle lässt sich festlegen: Cd(II) >> Pb(II) > Zn(II).

- Studien zur Inkorporation von <sup>15</sup>N-Stickstoff in Aminosäuren und Proteine von *Fontinalis antipyretica* zeigten den Einfluss der Schwermetalle auf den Stickstoffmetabolismus. In diesem Fall wurde der Einbau von <sup>15</sup>N in die Aminosäure- und Protein-Fraktion durch Cd(II), Pb(II) und Zn(II) gehemmt, wobei eine konzentrationsabhängige Abnahme festgestellt wurde. Auch hier konnte man eine deutliche Reihung der Schädigung erkennen: Cd(II) >> Pb(II) > Zn(II). Aufgrund der Beeinflussung dieser Prozesse durch alle drei Elemente kann man schlussfolgern, dass die Systeme der Nitratassimilation, Aminosäure- und Proteinbiosynthese von *Fontinalis antipyretica* sehr sensitiv auf Schwermetall-Stress reagieren.

- Bei Belastung von *Fontinalis antipyretica* mit Schwermetallen kommt es zum Anstieg des GSH-Spiegels. Voraussetzung für eine verstärkte GSH-Biosynthese ist eine erhöhte Sulfatassimilation. Deshalb wurde der Einfluss von Cd(II) auf den Schwefelmetabolismus in Abhängigkeit von der Versorgung der Pflanzen mit Sulfat untersucht. Messungen des Sulfatgehaltes des Moores bei Cd(II)-Belastung zeigten eine deutliche Aktivierung dieses Prozesses. Kurzzeitiger Sulfatmangel hatte hierbei keinen Einfluss auf die Höhe des synthetisierten GSH. Der intrazelluläre Sulfatpool von 3 – 4 µmol/g FM scheint bei einer Exposition mit Cd(II) über 14 Tage zur GSH-Erhöhung auszureichen. Auch die Chlorophyll-

Fluoreszenz (Einfluss auf das PS II) zeigte sich bei Cd(II)-Belastung über 10 Tage unabhängig von der Sulfat-Konzentration des Mediums.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Sulfat-Gehalt des Mooses durch Schwefelmangel über 38 Tage bis auf 0,77  $\mu\text{mol/g}$  FM abgesenkt. Das Moos kann solch lange S-Mangel-Perioden ohne Vitalitätsverlust (Chlorophyll-Fluoreszenz) überdauern, jedoch werden Sulfatassimilation und Thiol-Biosynthese „herunter reguliert“. Nach Zugabe des Nährstoffes reagierte das Moos mit einer schnellen Auffüllung von Sulfat- und Thiol-Pool innerhalb eines Tages. So scheinen Sulfataufnahme und -assimilation doch von der externen Sulfat-Konzentration abzuhängen. Diese schnelle Aktivierung dieser Prozesse ermöglichte dem Moos eine effektive Reaktion bei gleichzeitiger Belastung mit Cd(II) nach Schwefelmangel. Wurde das Moos während einer langfristigen Sulfatmangel-Periode mit Cd(II) exponiert, konnte es, wenn auch nicht in demselben Maße wie eine sulfatversorgte Pflanze, mit einer Erhöhung der Sulfatassimilation und folglich einem Anstieg des GSH-Spiegels reagieren. Das war jedoch mit einer deutlich stärkeren Schädigung des PS II verbunden, was auf eine ineffizientere Detoxifikation von freien Cd(II)-Ionen im Cytoplasma durch GSH hinweist. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass GSH eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von Cd(II) zukommt.

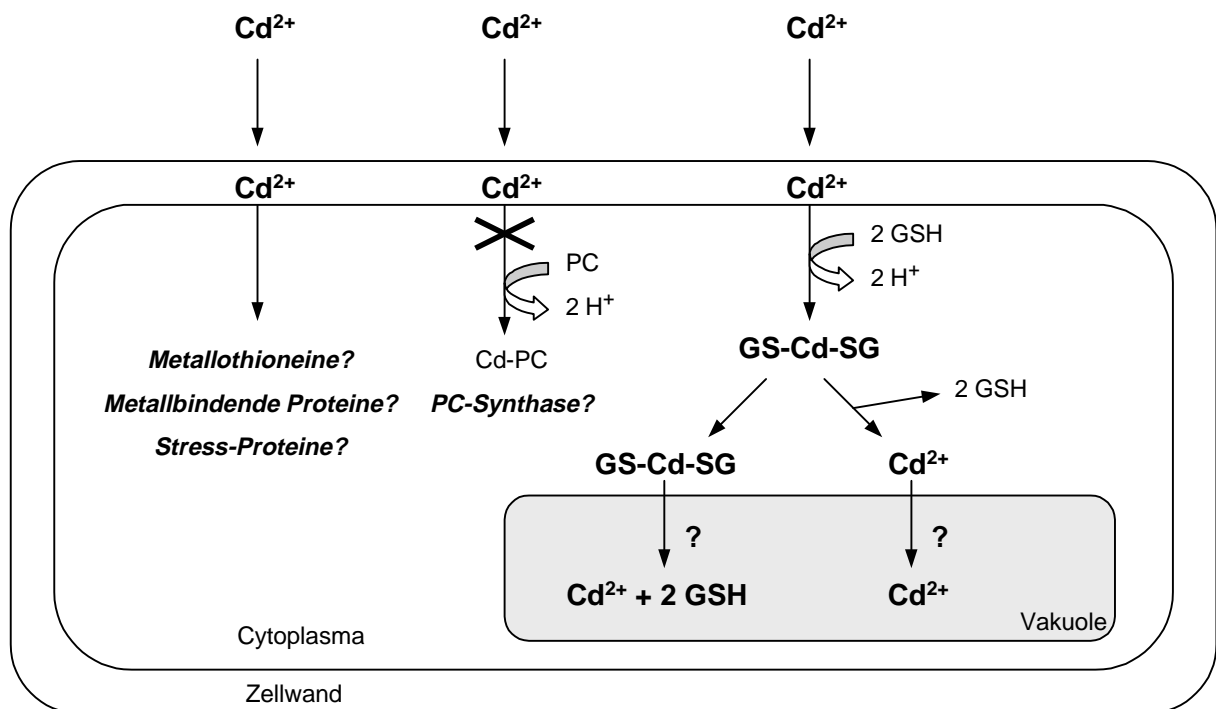
- Wegen einer möglichen Konkurrenz von Cd(II) und Xenobiotika um GSH-Moleküle im Zuge der Detoxifikation in den Zellen von *Fontinalis antipyretica* wurden Modellsubstanzen für Xenobiotika, wie CDNB und NEM genutzt, um den Mechanismus der Cd(II)-Detoxifikation näher zu beschreiben. Gleichzeitig erhielten wir Ergebnisse der Wirkung dieser organischen Substanzen auf die Vitalität (PS II) und den GSH-Gehalt des Mooses.

NEM und CDNB bewirkten eine konzentrationsabhängige Abnahme der Chlorophyll-Fluoreszenz, was ihren negativen Einfluss auf die Photosynthese deutlich macht. CDNB erwies sich hierbei als die toxischere Verbindung. Bei Belastung mit 50  $\mu\text{M}$  CDNB kamen die photosynthetischen Prozesse innerhalb von 7 Tagen zum Erliegen. Bei NEM und bei geringeren Konzentrationen an CDNB konnte jedoch ein Wiederanstieg der Chlorophyll-Fluoreszenz beobachtet werden. Das deutet auf eine effektive Detoxifikation dieser Substanzen durch *Fontinalis antipyretica* hin. Durch Belastung mit NEM und CDNB kam es weiterhin zu einer Abnahme des intrazellulären GSH-Gehaltes. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass diese Modellsubstanzen nach Konjugation an GSH als Komplex in die Vakuole transportiert werden, wo sie nicht mehr toxisch wirken. In Abhängigkeit von der Konzentration dieser Schadstoffe konnten Schädigungen im PS II wieder regeneriert werden.



Die Detoxifikation von CDNB/NEM und Cd(II) in *Fontinalis antipyretica* scheint von der Verfügbarkeit von GSH abhängig zu sein. Deshalb könnte es bei gleichzeitiger Exposition mit diesen Substanzen im Zuge der Entgiftung zu einer Konkurrenz um GSH-Moleküle in der Zelle kommen, die sich auf die Vitalität des Mooses, aber auch die Kompartimentierung von Cd(II) auswirken könnte. Die Akkumulation von Cd(II) wurde durch die organischen Verbindungen nicht beeinflusst. Trotz erster Hinweise auf einen möglichen gegenseitigen Einfluss von NEM und Cd(II), konnten keine signifikanten Unterschiede in bezug auf die Beeinträchtigung des PS II gefunden werden. Auch die Kompartimentierung von Cd(II) in der Vakuole wurde durch die Xenobiotika nicht beeinflusst.

- Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass *Fontinalis antipyretica* im Gegensatz zu höheren Pflanzen einen anderen Mechanismus für die Detoxifikation von Schwermetallen entwickelt hat. Hierbei könnte GSH eine wichtige Rolle als Chelator für diese Elemente zukommen. Abb. 51 zeigt die Möglichkeiten der Entgiftung von Cd(II) in *Fontinalis antipyretica*.



**Abb. 51.** Möglichkeiten der Detoxifikation von Cd(II)/Schwermetallen im aquatischen Moos *Fontinalis antipyretica*.

Cd(II) wird in den Zellen von *Fontinalis antipyretica* akkumuliert. Die physiologisch biochemische Reaktion des Mooses auf intrazellulär angereichertes Cd(II) besteht in einer Erhöhung des GSH-Gehaltes. Phytochelatine wurden nicht gefunden. Es könnte eine Komplexierung an GSH und ein Transport in die Vakuole erfolgen. Ob dieser Transport als Cd(II)/GSH-Komplex oder nach Freisetzung des Cd(II) an der Tonoplasten-Membran als freies Cd(II)-Ion erfolgt, konnte in diesem Zusammenhang nicht geklärt werden. Beide Wege würden jedoch entsprechend gegenwärtiger Literaturbefunde unterschiedliche Transportsysteme erfordern.

Zur Beantwortung der Fragen nach der Transportform von Cd(II) in den Zellen von *Fontinalis antipyretica* sollten sich zukünftige Untersuchungen auf die Isolierung und Charakterisierung von Cd(II)-Transportern der Vakuolenmembran konzentrieren. Der Einsatz molekularbiologischer Methoden bietet sich an, da in der Literatur viele Anhaltspunkte zu diesem Problem gegeben sind. So wäre die Erstellung einer cDNA-Bank eine wichtige Voraussetzung zum Gennachweis für vakuoläre Cd(II)-Transporter. Transportuntersuchungen mit Cd(II)/GSH-Komplexen an isolierten Vakuolen bzw. Membranvesikeln würden das Bild zum Cd(II)-Transport vervollständigen.

Interessant ist eine fortführende Erforschung der Rolle des GSH bei der Entgiftung von Cd(II) und anderen Schwermetallen. Durch die Anwendung der Einzelzellanalytik wäre der Nachweis von Cd(II)/GSH-Komplexen in einzelnen Zellkompartimenten möglich. Durch Nutzung der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie in Verbindung mit einer *in vivo* Derivatisierung des GSH mit z. B. fluoreszenzaktiven Substanzen könnte die Kompartimentierung und quantitative Bedeutung des GSH untersucht werden. Auch die Beeinflussung der Regulation der GSH-Biosynthese durch Schwermetalle würde einen weiteren Einblick in die Wechselwirkung von GSH und Schwermetallen unter Stressbedingungen bieten. Da die Regulierung von Stoffwechselprozessen oft über die Enzyme erfolgt, sollte die Isolierung und Charakterisierung dieser Moleküle auf molekularbiologischer und proteinbiochemischer Grundlage ein weiterer Schwerpunkt künftiger Arbeiten sein.

Phytochelatine wurden in *Fontinalis antipyretica* nach Belastung mit Schwermetallen nicht nachgewiesen. Dennoch wäre es möglich, dass das Gen für die PC-Synthase auf der chromosomalen DNA existiert. Wird dieses Gen jedoch nicht exprimiert, können keine Phytochelatine in den Zellen des Mooses synthetisiert werden. Die molekularbiologische Suche nach der Phytochelatin-Synthase würde einen Aufschluss über die Regulation der Cd(II)-Detoxifikation auf der Genebene, aber auch über eine evolutionäre Entwicklung dieses Prozesses im Pflanzenreich geben.

Die Aufrechterhaltung und Erhöhung der Sulfatassimilation ist eine elementare Grundlage für den Anstieg der GSH-Biosynthese bei Schwermetall-Stress. Erste Ergebnisse zum Einfluss der Versorgung von *Fontinalis antipyretica* mit Sulfat auf die Reaktion der Pflanzen auf Cd(II)-Belastung konnten in der vorliegenden Arbeit erlangt werden. Dennoch sollte dieser für die Entgiftung von Schwermetallen wahrscheinlich wichtige Prozess näher charakterisiert werden, v. a. in Bezug auf die Regulation der Enzyme bei Belastung mit Schwermetallen. Dabei könnten wiederum molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden zum Einsatz kommen.

Das Wassermoos *Fontinalis antipyretica* liegt für diese Arbeiten nur als Freilandmaterial vor, was viele Nachteile mit sich bringt, die v. a. in der Insterilität der Proben begründet sind. Empfehlenswert wäre es, ein anderes Moos, wie *Physcomitrella patens* zu nutzen, das in Sterilkultur vorliegt. Des weiteren ist dieses Moos molekularbiologisch bereits sehr gut charakterisiert, was eine leichtere gentechnische Bearbeitung der genannten Schwerpunkte für zukünftige Arbeiten möglich macht. Voraussetzung für die Nutzung einer anderen Moospezies ist natürlich die gleiche physiologische Reaktion bei der Exposition mit Schwermetallen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Al-Asheh, S. und Duvnjak, Z. (1997): Adsorption of metal ions by moss. *Adv. Environ. Res.* 1 (2): 194-212
- Alloway, B. J. und Ayres, D. C. (1996): *Schadstoffe in der Umwelt: Chemische Grundlagen zur Beurteilung von Luft-, Wasser- und Bodenverschmutzung.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Anderson, M. E. (1985): Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 113: 548-555
- Baker, A. J. M. und Walker, P. L. (1989): Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. *Bioavail.* 1 (1): 7-17
- Beaugelin-Seiller, K; Baudin, J.-P. und Casellas, C. (1995): Experimental study of the effects of various factors on the uptake of <sup>60</sup>Co by freshwater mosses. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28: 125-133
- Bell, C. I.; Clarkson, D. T. und Cram, W. J. (1995a): Partitioning and redistribution of S during S-stress *Macropodium atropurpureum* cv. Siratro. *J. Exp. Bot.* 46: 73-81
- Bell, C. I.; Clarkson, D. T. und Cram, W. J. (1995b): Sulphate supply and its regulation of transport in roots of a tropical legume *Macropodium atropurpureum* cv. Siratro. *J. Exp. Bot.* 46: 65-71
- Bengtsson, B.; Asp, H.; Jensen, P. und Berggren, D. (1988): Influence of aluminium on phosphate and calcium uptake in nutrient solution and soil solution. *Physiol. Plant.* 74: 294-305
- Berg, T.; Røyset, O. und Steinnes, E. (1995): Moss (*Hylocomium splendens*) used as biomonitor of atmospheric trace element deposition: Estimation of uptake efficiencies. *Atmosph. Environ.* 29 (3): 353-360
- Bergmann, L. und Rennenberg, H. (1993): Glutathione metabolism in plants. In: De Kok, L. J. (Ed.): *Sulfur nutrition and assimilation in higher plants.* SPB Academic Publishing, The Hague
- Bharti, N. und Singh, R. P. (1994): Antagonistic effect of sodium chloride to differential heavy metal toxicity regarding biomass accumulation and nitrate assimilation in *Sesamum indicum* seedlings. *Phytochem.* 35 (5): 1157-1161
- Bolchi, A.; Petrucco, S.; Tenca, P. L.; Foroni, C. und Ottonello, S. (1999): Coordinate modulation of maize sulfate permease and ATP sulfurylase mRNAs in response to variations in sulfur nutritional status: stereospecific down-regulation by L-cysteine. *Plant Mol. Biol.* 39: 527-537
- Bolwell, G. P.; Bozak, K. und Zimmerlin, A. (1994): Plant cytochrome P450. *Phytochem.* 37: 1491-1506

- Boussama, N.; Ouariti, O.; Suzuki, A. und Ghorbal, M. H. (1999): Cd-stress on nitrogen assimilation. *J. Plant Physiol.* 155: 310-317
- Breuer, K. und Melzer, A. (1990): Heavy metal accumulation (lead and cadmium) and ion exchange in three species of *Sphagnaceae*. *Oecologia* 82: 461-467
- Brown, D. H. (1982): Mineral nutrition. In: Smith, A. J. E. (Ed.): *Bryophyte ecology*. Chapman and Hall, London, 383-444
- Brown, D. H. und 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
- Brune, A.; Urbach, W. und Dietz, K.-J. (1995): Differential toxicity of heavy metals is partly related to a loss of preferential extraplasmatic compartmentation: A comparison of Cd-, Mo-, Ni- and Zn-stress. *Phytol.* 129: 403-409
- Bruns, I. (1997): Induktion thiolhaltiger Peptide im Wassermoos *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. unter Schwermetalleinfluss und deren Nutzung als Biomarker für Schwermetallbelastungen aquatischer Systeme. Dissertationsschrift, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Bruns, I.; Friese, K.; Krauss, G. und Krauss, G.-J. (2000a): Assessment of metal pollution of aquatic systems with the water moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. – from fundamental investigations to physiological effects. In: Markert, B. und Friese, K. (Eds.): *Trace elements – Their distribution and effects in the environment*. Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo, 323-340
- Bruns, I.; Friese, K.; Markert, B. und 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 Environm.* 204: 1161-176
- Bruns, I. und Krauss, G.-J. (1999): Das aquatische Monitormoos *Fontinalis antipyretica* – Schwermetallakkumulation und Synthese spezifischer Streßmetabolite. In: Oehlmann, J. und Markert, B. (Eds.): *Ökotoxikologie. Ökosystemare Ansätze und Methoden*. Ecomed, Landsberg: 301-315
- Bruns, I.; Siebert, A.; Baumbach, R.; Miersch, J.; Günther, D.; Markert, B. und Krauss, G.-J. (1995): Analysis of heavy metals and sulphur-rich compounds in the water moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw.. *Fres. J. Anal. Chem.* 353: 101-104
- Bruns, I.; Sutter, K.; Menge, S.; Neumann, D. und Krauss, G.-J. (2000b): Cadmium let increase the glutathione pool in bryophytes. *J. Plant Physiol.* (im Druck)
- Bruns, I.; Sutter, K.; Neumann, D. und Krauss, G.-J. (2000c): Glutathione accumulation – a specific response of mosses to heavy metal stress. In: Brunold, C.; Rennenberg, H.; De Kok, L. J.; Stulen, I. und Davidian, J.-C. (Eds.): *Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants*. Paul Haupt Publishers, Bern, Stuttgart, Vienna, 389-392
- Buffle, J. (1988): *Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach*. Ellis Horwood Ltd., Chichester

- Burke, J. J.; Holloway, P. und Dalling, M. J. (1986): The effect of sulfur deficiency on the organization and photosynthetic capability of wheat leaves. *J. Plant Physiol.* 125: 371-375
- Carlson, R. W.; Bazzaz, F. A. und Rolfe, G. L. (1975): The effect of heavy metals on plants. II. Net photosynthesis and transpiration of whole corn and sunflower plants treated with Pb, Cd, Ni and Tl. *Environ. Res.* 10: 113-120
- Chang, C. J. und Kao, C. H. (1997): Paraquat toxicity is reduced by metal chelators in rice leaves. *Physiol. Plant.* 101: 471-476
- Clarkson, D. T.; Hawkesford, M. J. und Davidian, J. (1993): Membrane and long-distance transport of sulphate. In: De Kok, L. J.; Stulen, I.; Rennenberg, H.; Brunold, C. H. und Rauser, W. E. (Eds.): Sulphur nutrition and assimilation in higher plants: Regulatory, agricultural and environmental aspects. The Hague: SPB Acad. Publ., 3-20
- Clijsters, H. und van Assche, F. (1985): Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynth. Res.* 7: 31-40
- Coleman, J. O. D.; Blake-Kalff, M. M. A. und Davies, T. G. E. (1997): Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* 2 (4):144-151
- Cooke, D. T. und Burden, R. (1990): Lipid modulation of plasma membrane bound ATPases. *Physiol. Plant.* 78: 153-159
- Costa, G. und Morel, J.-L. (1994): Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. *Plant Physiol.* 32 (4): 561-570
- Dameron, C. T.; Smith, B. R. und Winge, D. R. (1989): Glutathione-coated cadmium-sulfide crystallites in *Candida glabrata*. *J. Biol. Chem.* 264 (29): 17355-17360
- Deane-Drummond, C. E. (1987): The regulation of sulphate uptake following growth of *Pisum sativum* L. seedlings in S nutrient limiting conditions. Interaction between nitrate and sulphate transport. *Plant Sci.* 50: 27-35
- Devi, S. R. und Prasad, M. N. V. (1999): Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: Prasad, M. N. V. und Hagemeyer, J.(Eds.): Heavy metal stress in plants. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 99-116
- De Vos, C. H. R.; Schat, H.; Vooijs, R. und 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
- Dhindsa, R. S. (1987): Glutathione status and protein synthesis during drought and subsequent rehydration in *Tortula ruralis*. *Plant Physiol.* 83: 816-819
- Doerffel, K. (1990): Statistik in der analytischen Chemie. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie GmbH, Leipzig, 5. Auflage
- Ellman, G. L. (1959): Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77

- Ernst, W. H. O. (1998): Sulfur metabolism in higher plants: Potential for phytoremediation. *Biodegrad.* 9: 311-318
- Fahey, R. C.; Newton, G. L.; Dorian, R. und Kosower, E. M. (1981): Analysis of biological thiols: Quantitative determination of thiols at the picomole level based upon derivatization with monobromobimanes and separation by cation-exchange chromatography. *Anal. Biochem.* 111: 357-365
- Faust, H. (1981): FAO/IAEA Interregional training course on the use of  $^{15}\text{N}$  in soil science and plant nutrition. *ZfI-Mitteilungen, Berichte des Zentralinstitutes für Isotopen- und Strahlenforschung* 38, Leipzig
- Fitzgerald, M. A.; Ugalde, T. D. und Anderson, J. W. (1999): S nutrition affects the pool of S available to developing grains of wheat. *J. Exp. Bot.* 50 (339): 1587-1592
- Fontes, R. L. F. und Cox, F. R. (1995): Effects of sulphur supply on soybean plants exposed to zinc toxicity. *J. Plant. Nutr.* 18: 1893-1906
- Förstner, U. und Wittmann, G. T. W. (Eds.) (1979): Metall pollution in the aquatic environment. Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Forde, B. G. und Clarkson, D. T. (1999): Nitrate and ammonium nutrition of plants: Physiological and molecular perspectives. *Adv. Bot. Res.* 30: 1-90
- Foyer, C. und Rennenberg, H. (2000): Regulation of glutathione synthesis and its role in abiotic and biotic stress defence. In: Brunold, C. (Ed.): Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants. Paul Haupt, Bern, Schweiz:127-153
- Frahm, J. P. und Frey, W. (1987): Moosflora. UTB für Wissenschaft. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 2. Auflage
- Fullington, J. G.; Miskelly, D. M.; Wrigley, C. W. und Kasarda, D. D. (1987): Quality-related endosperm proteins in sulfur-deficient and normal wheat grain. *J. Cereal Sci.* 5: 233-245
- Gagnon, C.; Vaillancourt, G. und Pazdernik, L. (1998): Influence of water hardness on accumulation and elimination of cadmium in two aquatic mosses under laboratory conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 12-20
- Gaur, J. P.; Noraho, N. und Chauhan, Y. S. (1994): Relationship between heavy metal accumulation and toxicity in *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. and *Azolla pinnata* R. Br. *Aquat. Bot.* 49: 183-192
- Geiken, B.; Masojidek, J.; Rizzuto, M.; Pompili, M. L. und Giardi, M. T. (1998): Incorporation of [ $^{35}\text{S}$ ]methionine in higher plants reveals that stimulation of the D1 reaction centre II protein turnover accompanies tolerance to heavy metal stress. *Plant, Cell and Environ.* 21: 1265-1273
- Gilbert, S.; Clarkson, D. T.; Cambridge, M.; Lambers, H. und Hawkesford, M. J. (1997): Sulphate-deprivation has an early effect on the content of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and photosynthesis in young leaves of wheat. *Plant Physiol.* 115: 1231-1239

- Gjengedal, E. und Steinnes, E. (1990): Uptake of metal ions in moss from artificial precipitation. *Environ. Monit. Assess* 14: 77-87
- Greger, M. (1999): Metal availability and bioconcentration in plants. In: Prasad, M. N. V. und Hagemeyer, J. (Eds.): *Heavy metal stress in plants*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 1-27
- Grodzinska, K.; Szarek-Lukaszewska und Godzik, B. (1999): Survey of heavy metal deposition in Poland using mosses as indicators. *Sci. Tot. Environ.* 229: 41-51
- Gstoettner, E. M. und Fisher, N. S. (1997): Accumulation of cadmium, and zinc by the moss *Sphagnum papillosum* Lindle. *Water, air and soil poll.* 93: 321-330
- Hafner, C.; Erdmenger, E.; Jung, K.; Gehre, M. und Schüürmann (2000): Stable isotop tracer technique as a tool to increase the sensitivity of plant growth bioassays – investigations with pentachlorophenol and trichloroacetic acid. *Fres. Environ. Bull.* 9 (3-4): 225-231
- Hartmann, T.; Mult, S.; Suter, M.; Rennenberg, H. und Herschbach, C. (2000): Leaf age-dependent differences in sulphur assimilation and allocation in poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) leaves. *J. Exp. Bot.* 51 (347): 1077-1088
- Hawkesford, M. J. (2000): Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. *J. Exp. Bot.* 51 (342): 131-138
- Hawkesford, M. J.; Davidian, J. C. und Grignon, C. (1993): Sulphate/proton cotransport in plasma-membrane vesicles isolated from roots of *Brassica napus* L.: Increased transport in membranes isolated from sulphur-starved plants. *Planta* 190: 297-304
- Heiss, S.; Schäfer, H. J.; Haag-Kerwer, A. und Rausch, T. (1999): Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L.: Cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity sulfate transporter and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. *Plant Mol. Biol.* 39: 847-857
- Heldt, H. W. (1999): *Pflanzenbiochemie*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, 2. Auflage
- Hell, R. und Rennenberg, H. (1998): The plant sulphur cycle. In: E. Schnug (Ed.): *Sulphur in agroecosystems*. Kluwer Acad. Publ., Niederlande: 135-173
- Herschbach, C. und Rennenberg, H. (1991): Influence of glutathione (GSH) on sulphate influx, xylem loading and exudation in excised tobacco roots. *J. Exp. Bot.* 42 (241): 1021-1029
- Herschbach, C. und Rennenberg, H. (1994): Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulfate and sulfate transport in tobacco plants. *J. Exp. Bot.* 42: 1021-1029
- Higgins, C. F. (1992): ABC Transporters: From microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 67-113
- Holleman, A. F. und Wiberg, E. (1985): *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. Walter de Gruyter, Berlin, New York



- Honda, C.; Fujiwara, T. und Chino, M. (1998): Sulfat uptake in *Arabidopsis thaliana*. J. Plant Nutr. 21 (4): 601-614
- Ireland, R. R. (1982): Moss flora of the maritime provinces. Publ. Bot. 13: 414-425
- Jung, K.; Gebauer, G.; Gehre, M.; Hoffmann, D.; Weissflog, L. und Schüürmann, G. (1997): Anthropogenic impacts on natural isotope variations in *Pinus sylvestris* stands in an industrially polluted area. Environ. Poll. 97: 175-181
- Jung, K. und Junghans, P. (1981): Untersuchungen des pflanzlichen Proteinturnovers unter Wirkstoffeinfluß mit Hilfe von <sup>15</sup>N-Tracerexperimenten und ihre Interpretation auf Grundlage von Kompartimentmodellen. Biol. Zentralblatt 100: 217-226
- Jung, K.; Kaletta, K.; Segner, H. und Schüürmann, G. (1999): N-15 metabolic test for the determination of phytotoxic effects of chemicals and contaminated environmental samples. Environm. Sci. and Poll. Res. 6 (2): 72-76
- Jung, K.; Rolle, W.; Schlee, D.; Tintemann, H., Gnauk, T. und Schüürmann, G. (1994): Ozone effects on nitrogen incorporation and superoxide dismutase activity in spruce seedlings (*Picea abies* L.). New Phytol. 128: 505-508
- Kim, E. J.; Zhen, R.-G. und Rea, P. A. (1995): Site-directed mutagenesis of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. J. Biol. Chem. 270 (6): 2630-2635
- Krämer, U.; Pickering, I. J.; Ponce, R. C.; Raskin, I. und Salt, D. E. (2000): Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. Plant Physiol. 122: 1343-1354
- Krauss, G.; Baerlocher, F.; Schreck, P.; Kranich, W.; Miersch, J.; Dermietzel, F.; Wennrich, R. und Krauss, G.-J. (1998): Aquatic hyphomycetes at extremely polluted sites in the Mansfelder Land area . In: Becker, P. M. (Ed.): Microbiology of polluted aquatic ecosystems. UFZ-Bericht 10/1998, UFZ, Leipzig: 76-83
- Krämer, U.; Smith, R. D.; Wenzel, W. W.; Raskin, I. und Salt, D. E. (1997): The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Hálácsy. Plant Physiol. 115: 1641-1650
- Küpper, H., Küpper, F. und Spiller, M. (1998): In *situ* detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. Photosynth. Res. 58:123-133
- Kugonic, N. und Grčman, H. (1999): The accumulation of cadmium, lead and zinc by different vegetables from Zasavje (Slovenia). Phyton (Austria) 39: 161-165
- Kuzuhara, Y.; Isobe, A.; Awazuhara, M.; Fujiwara, T. und Hayashi, H. (2000): Glutathione levels in phloem sap of rice plants under sulfur deficient conditions. Soil Sci. Plant Nutr. 46 (1): 265-270
- Lanaras, T.; Sgardelis, S. P. und Pantis, J. D. (1994): Chlorophyll fluorescence in the dandelion (*Taraxacum* ssp.): A probe for screening urban pollution. Sci. Tot. Environ. 149: 61-68

- Lappartient, A. G. und Touraine, B. (1996): Demand-driven control of ATP sulfurylase activity and  $\text{SO}_4^{2-}$  uptake in intact canola. *Plant Physiol.* 111: 147-157
- Larcher, W. (1994): Ökophysiologie der Pflanzen: Leben, Leistung und Stressbewältigung der Pflanzen in ihrer Umwelt. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 5. Auflage
- Larsson, E. H.; Bornmann, J. F. und Asp, H. (1998): Influence of radiation and  $\text{Cd}^{2+}$  on chlorophyll fluorescence, growth and nutrient content in *Brassica napus*. *J. Exp. Bot.* 49: 1031-1039
- Leustek, T. (1996): Molecular genetics of sulfate assimilation in plants. *Physiol. Plant.* 97: 411-419
- Leustek, T. und Bick, J.-A. (2000): The evolution of sulfur assimilation in plants. In: Brunold, C.; Rennenberg, H.; De Kok, L. J.; Stulen, I. und Davidian, J.-C. (Eds.): Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants. Paul Haupt, Bern, Schweiz: 1-18
- Leustek, T.; Martin, M. N.; Bick, J.-A. und Davies, J. P. (2000): Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 141-165
- Leustek, T. und Saito, K. (1999): Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol.* 120: 637-643
- Li, Z.-S.; Lu, Y.-P.; Zhen, R.-G., Szczypka, M.; Thiele, D. J. und Rea, P. A. (1997): A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 42-47
- Li, Z.-S.; Zhao, Y. und Rea, P. A. (1995): Magnesium adenosine 5'-triphosphate-energized transport of glutathione-S-conjugates by plant vacuolar membrane vesicles. *Plant Physiol.* 107: 1257-1268
- Lichtenthaler, H. K. und Miehe, J. A. (1997): Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Sci.* 2: 316-320
- Lindberg, S. und Griffith, G. (1993): Aluminium effects on ATPase activity and lipid composition of plasma membranes in sugar beet roots. *J. Exp. Bot.* 44: 1543-1550
- Liu, K.-H.; Huang, C.-Y. und Tsay, Y.-F. (1999): CHL1 is a dual-affinity transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell* 11: 865-874
- Llamas, A.; Ullrich, C. I. und Sanz, A. (2000):  $\text{Cd}^{2+}$  effects on transmembrane electrical potential difference, respiration and membrane permeability of rice (*Oryza sativa* L) roots. *Plant and soil* 219: 21-28
- Lu, Y.-P.; Li, Z.-S. und Rea, P. A. (1997): AtMRP1 gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8243-8248
- Mae, T. (1997): Physiological nitrogen efficiency in rice: Nitrogen utilization, photosynthesis, and yield potential. *Plant and Soil* 196 (2): 201-210

- Markert, B. und Friese, K. (2000): Trace elements – their distribution and effects in the environment. Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo
- Martinoia, E.; Grill, E.; Tommasini, R.; Kreuz, K. und Amrhein, N. (1993): ATP-dependent glutathione S-conjugate „export“ pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364: 247-249
- May, M. J.; Vernoux, T.; Leaver, C.; van Montagu, M. und Inzé, D. (1998): Glutathione homeostasis in plants: Implications for environmental sensing and plant development. *J. Exp. Bot.* 49 (321): 649-667
- Maywald, F. und Weigel, H. J. (1997): Zur Biochemie und Molekularbiologie der Schwermetallaufnahme und –speicherung bei höheren Pflanzen. *Landbauforschung Völkenrode* 3: 103-126
- McMahon, P. J. und Anderson, J. W. (1998): Preferential allocation of sulphur into  $\gamma$ -glutamylcysteinyl peptides in wheat plants grown at low sulphur nutrition in the presence of cadmium. *Physiol. Plant.* 104: 440-448
- Mehra, R. K. und Mulchandani, P. (1995): Glutathione-mediated transfer of Cu(I) into phytochelatins. *Biochem. J.* 307: 697-705
- Merian, E. (1991): Metals and their compounds in the environment. VCH Verlag, Weinheim
- Mersch, J. und Reichard, M. (1998): *In situ* investigation of trace metal availability in industrial effluents using transplanted aquatic mosses. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 336-342
- Miles, C. D.; Brandle, J. R.; Daniel, D. J.; Chur-Der, O.; Schnore, P. D. und Uhlik, D. J. (1972): Inhibition of photosystem II in isolated chloroplasts by lead. *Plant Physiol.* 49: 820-825
- 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
- Neumann, D.; zur Nieden, U.; Lichtenberger, O. und Leopold, I. (1995): How does *Armeria maritima* tolerate high heavy metal concentrations? *J. Plant Physiol.* 146: 704-717
- Noctor, G.; Arisi, A. M.; Jouanin, L.; Kunert, K. J.; Rennenberg, H. und Foyer, C. H. (1998): Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot.* 49 (321): 623-647
- Nussbaum, S.; Schmutz, D. und Brunold, C. (1998): Regulation of assimilatory sulfate reduction by cadmium in *Zea mays* L.. *Plant Physiol.* 88: 1407-1410
- Oaks, A. (1994a): Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can. J. Bot.* 72: 739-750
- Oaks, A. (1994b): Efficiency of nitrogen utilization in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> cereals. *Plant Physiol.* 106: 407-414

- Oehlmann, J. und Markert, B. (Eds.) (1999): Ökotoxikologie. Ökosystemare Ansätze und Methoden. Ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co. KG, Landsberg
- Ortiz, D. F.; Ruscitti, T.; McCue, K. F. und Ow, D. W. (1995): Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J. Biol. Chem.* 270: 4721-4728
- Otto, M. (1995): Analytische Chemie. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo
- Padmaja, K.; Prasad, D. D. K. und Prasad, A. R. K. (1990): Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings by cadmium acetate. *Photosynth.* 24: 399-405
- Pascher, A. (Ed.) (1931): Die Süßwasser-Flora Mitteleuropas. Gustav-Fischer-Verlag, Jena
- Patra, J. und Panda, B. B. (1998): A comparison of biochemical responses to oxidative and metal stress in seedlings of barley, *Hordeum vulgare* L.. *Environ. Poll.* 101: 99-105
- Petrovic, M.; Kaštelan-Macan, M. und Horvat, A. J. M. (1998): Interactive sorption of metal ions and humic acid onto mineral particles. *Water, Air and Soil Poll.* 111: 41-56
- Pickering, D. C. und Puia, I. L. (1969): Mechanism for the uptake of zinc by *Fontinalis antipyretica*. *Physiol. Plant.* 22: 653-661
- Pinheiro, J. P.; Mota, A. M. und Benedetti, M. F. (1999): Lead and calcium binding to fulvic acids: salt effect and competition. *Environ. Sci. Technol.* 33: 3398-3404
- Popovic, M.; Kevresan, S.; Kandrak, J.; Nolic, J.; Petrovic, N. und Kastori, R. (1996): The role of sulphur in detoxification of cadmium in young sugar beet plants. *Biol. Plant.* 38: 281-287
- Prasad, M. N. V. und Strzalka, K. (1999): Impact of heavy metals on photosynthesis. In: Prasad, M. N. V. und Hagemeyer, J.(Eds.): Heavy metal stress in plants. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 117-138
- Rabenstein, D. L. (1989): Metal complexes of glutathione and their biological significance. In: Dolphin, D.; Poutson, R. und Avramovic, O. (Eds.): Glutathione. Part A, Wiley Int. Sci. New York. 147-186
- Rausser, W. E. (2000): The role of thiols in plants under metal stress. In: Brunold, C.; Rennenberg, H.; De Kok, L. J.; Stulen, I. und Davidian, J.-C. (Eds.): Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants. Paul Haupt, Bern, Schweiz: 169-183
- Rea, P. A. (1999): MRP subfamily ABC transporters from plants and yeast. *J. Exp. Bot.* 50: 895-913
- Rea, P. A.; Li, Z.-S.; Lu, Y.-P. und Drozdowicz, Y. M. (1998): From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 727-760
- Rennenberg, H. und Brunold, C. (1994): Significance of glutathione metabolism in plants under stress. *Progr. Bot.* 55: 142-155

- Robinson, B. H.; Brooks, R. R. und Clothier, B. E. (1999): Soil amendments affecting nickel and cobalt uptake by *Berkheya coddii*: Potential use for phytomining and phytoremediation. *Ann. Bot.* 84: 689-694
- Robinson, N. J.; Tommey, A. M.; Kuske, C. und Jackson, P. J. (1993): Plant metallothioneins. *Biochem. J.* 295: 1-10
- Ros, R.; Morales, A.; Segura, J. und Picazo, I. (1992): In vivo and in vitro effects of nickel and cadmium on the plasmalemma ATPase from rice (*Oryza sativa* L.) shoots and roots. *Plant Sci.* 83: 1-6
- Ross, G. (Ed.) (1995): Applications of the HP<sup>3D</sup> capillary electrophoresis system. HP Company, Frankreich
- Rühling, A. und Tyler, G. (1970): Sorption and retention of heavy metals in the woodland moss *Hylocomium splendens* (Hedw.) Br. et Sch.. *Oikos* 21: 92-97
- Saito, K. (2000): Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Cur. Opin. Plant Biol.* 3: 188-195
- Salim, R.; Al-Subu, M. M. und Sahrhage, E. (1992): Uptake of cadmium from water by beech leaves. *J. Environ. Sci. Health A* 27 (3): 603-627
- Salt, D. E. und Rauser, W. E. (1995): MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol.* 107: 1293-1301
- Salt, D. E. und Wagner, G. J. (1993): Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. *J. Biol. Chem.* 268 (17): 12297-12302
- Sandermann, H. (1992): Plant metabolism of xenobiotics. *TIBS* 17: 82-84
- Sanita di Toppi, L. und Gabbrielli, R. (1999): Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41: 105-130
- Say, P. J. und Whitton, B. A. (1983): Accumulation of heavy metals by aquatic mosses: 1. *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw.. *Hydrobiol.* 100: 245-260
- Schlee, D. (1992): *Ökologische Biochemie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, New York, 2. Auflage
- Schneider, E. und Hunke, S. (1998): ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 1-20
- Schopfer, P. und Brennicke, A. (1999): *Pflanzenphysiologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio, 5. Auflage
- Schultz, C. L. und Hutchinson, T. C. (1988): Evidence against a key role for metallothionein-like protein in the copper tolerance mechanism of *Deschampsia cespifosa* (L.) Beauv. X. *New Phytol.* 110: 163-171

- Schulz, M. und Friebe, A. (1999): Detoxification of allelochemicals in higher plants and enzymes involved. Principles and Practices in Plant Ecology: Allelochemical Interactions. CRC Press LLC: 383-400
- Schupp, R. (1991): Untersuchungen zur Schwefelernährung der Fichte (*Picea abies* L.): Die Bedeutung der Sulfatassimilation und des Transportes von Thiolen. Dissertation, Institut für Botanik und Mikrobiologie, München
- Schweizer, A.; Hafner, C.; Jung, K.; Hurle, K. und Schüürmann, G. (2000): N-15 tracer studies on the effect of airborne bromoxynil on the nitrogen metabolism of plants. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz S7: 799-806
- Seyle, H. (1936): A syndrome produced by diverse nocuous agents. Nature 138: 32
- Siebert, A.; Bruns, I.; Krauss, G.-J. und Markert, B. (1996): The use of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals. Sci. Tot. Environ. 177: 137-144
- Singh, D. K.; Tiwari, D. P. und Saksena, D. N. (1993): Removal of lead from aqueous solutions by chemically treated tea leaves. Ind. J. Environ. Health 35 (3): 169-177
- Sivasankar, S. und Oaks, A. (1996): Nitrate assimilation in higher plants: The effect of metabolites and light. Plant Physiol. Biochem. 34 (5): 609-620
- Spearing, A. M. (1972): Cation exchange capacity and galacturonic acid content of several species of *Sphagnum* in sandy rich bog, Central New York state. Bryol. 75: 154-158
- Stocker, O. (1947): Probleme der pflanzlichen Dürresistenz . Naturwissenschaften 34: 362-371
- Stoyanova, D. P. und Tchakalova, E. S. (1997): Cadmium-induced ultrastructural changes in chloroplasts of the leaves and stems parenchyma in *Myriophyllum spicatum* L.. Photosynth. 34 (2): 241-248
- Strohm, M.; Jouanin, L.; Kunert, K., J.; Pruvost, C.; Polle, A.; Foyer, C. und 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
- Stryer, L. (1999): Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg, Berlin, New York, 4. Auflage
- Ter Steege, M. W.; Stulen, I.; Wiersema, P. K.; Posthumus, F. und Vaalburg, W. (1999): Efficiency of nitrate uptake in spinach: impact of external nitrate concentration and relative growth rate on nitrate influx and efflux. Plant and Soil: 208: 125-134
- Tommasini, R.; Vogt, E.; Fromenteau, M.; Hörtensteiner, S.; Matile, P.; Amrhein, N. und Martinoia, E. (1998): An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. Plant J. 13 (6): 773-780
- Tommasini, R.; Vogt, E.; Schmid, J.; Fromenteau, M.; Amrhein, N. und Martinoia, E. (1997): Differential expression of genes coding for ABC-transporter after treatment of *Arabidopsis thaliana* with xenobiotics. FEBS Lett. 411: 206-210

- Vázquez, M. D.; López, J. und Carballeira, A. (1999): Uptake of heavy metals to the extracellular and intracellular compartments in three species of aquatic bryophyte. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 44: 12-24
- Vögeli-Lange, R. und Wagner, G. J. (1990): Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 92: 1086-1093
- Vögeli-Lange, R. und Wagner, G. J. (1996): Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. *Plant Sci.* 114: 11-18
- Vray, F.; Baudin, J. P. und Svadlenkova, M. (1992): Effects of some factors on uptake and release of Ru-106 by a freshwater moss, *Platyhypnidium riparioides*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23 (2): 190-197
- Wang, R.; Liu, D. L. und Crawford, N. M. (1998): The *Arabidopsis* CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15134-15139
- Wappelhorst, O.; Kühn, I.; Oehlmann, J. und Markert, B. (2000): Deposition and disease: A moss monitoring project as an approach to ascertaining potential connections. *Sci. of Tot. Environ.* 249: 243-256
- Wehr, J. D. und Whitton, B. A. (1983): Accumulation of heavy metals by aquatic mosses. 2: *Rhynchostegium riparioides*. *Hydrobiol.* 100: 261-284
- Wells, J. M. und Brown, D. H. (1987): Factors effecting the kinetic of intra- and extracellular cadmium uptake by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. *New Phytol.* 105: 123-137
- Wells, J. M. und Brown, D. H. (1995): Cadmium tolerance in a metal-contaminated population of the grassland moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. *Ann. Bot.* 75: 21-29
- Werck-Reichhart, D.; Hehn, A. und Didierjean, L. (2000): Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Plant Sci.* 5: 116-123
- Wrigley, C. W.; Du Cros, D. L.; Fullington, J. G. und Kasarda, D. D. (1984): Changes in polypeptide composition and grain quality due to sulfur deficiency. *J. Cereal. Sci.* 2: 15-24
- Yu, G.; Wang, G.; He, C. und Bai, J. (2000): Physiological response to oxidative and heavy metal stress in seedlings of rice paddy, *Oryza sativa* L.. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65: 514-521
- Zenk, M. H. (1996): Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene* 179: 21-30
- Zhao, F. F.; Withers, P. J. A.; Evans, E. J.; Monaghan, J.; Salmon, S. E.; Shewry, P. R. und McGrath, S. P. (1997): Sulphur nutrition: An important factor for the quality of wheat and rapeseed. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43: 1137-1142

## Anhang A – Rohdaten

**Tab. 1.** Cd(II)-Gehalte in *Fontinalis antipyretica* (Wipper) nach Belastung mit 25 und 200  $\mu\text{M}$  Cd(II) in [% des wiedergefundenen Cd(II)] bzw. [ $\mu\text{mol/g}$  FM]. (Kap. 3. 1. 1)

a) 25  $\mu\text{M}$  Cd(II)

Zeit	<u>Cd(II)-Gehalt</u>			
	<u>Extra</u>		<u>Intra</u>	
[h]	[%]	[ $\mu\text{mol/g}$ FM]	[%]	[ $\mu\text{mol/g}$ FM]
0	26	0,34	0	0
2	79	1,36	7,6	0,13
4	83	1,84	7,7	0,17
6	85	2,04	7,5	0,18
8	80	1,18	13,5	0,20
10	82	1,5	14,7	0,27
12	76	1,19	20,5	0,32
24	78	0,87	17,0	0,19

b) 200  $\mu\text{M}$  Cd(II)

Zeit	<u>Cd(II)-Gehalt</u>			
	<u>Extra</u>		<u>Intra</u>	
[h]	[%]	[ $\mu\text{mol/g}$ FM]	[%]	[ $\mu\text{mol/g}$ FM]
0	16	2,79	0	0
2	57	12,38	5,1	1,11
4	54	11,36	4,5	0,94
6	56	11,15	6,2	1,24
8	54	10,83	7,2	1,46
10	58	12,37	8,1	1,72
12	51	9,33	11,3	2,04
24	52	9,87	12,5	2,35



**Tab. 2.** GSH-Gehalte in *Fontinalis antipyretica* (Helbe) nach Belastung mit 25, 100 bzw. 500  $\mu\text{M}$  Zn(II) in [ $\mu\text{mol/g FM}$ ]. (Kap. 3. 1. 2). Standardabweichungen wurden für jeweils einen Messpunkt bestimmt,  $n = 5$ .

Zeit	GSH-Gehalt [ $\mu\text{mol/g FM}$ ]		
	25 $\mu\text{M}$ Zn(II)	100 $\mu\text{M}$ Zn(II)	500 $\mu\text{M}$ Zn(II)
0 h	0,195	0,180	0,180
10 min	0,167	0,194	0,140
20 min	0,192	0,173	0,154
30 min	0,219	0,182	0,166
4 h	0,195	0,157	0,243
1 d	0,171	0,184	0,244
2 d	0,170	0,160	0,314
3 d	0,158	0,203	0,410
5 d	0,164	0,178	0,251
10 d	0,142	0,134	0,295
SD	0,014	0,033	0,064
SE	7,8	15,9	20,0

**Tab. 3.** GSH-Gehalte in *Fontinalis antipyretica* (Helbe) nach Belastung mit 25, 100 bzw. 500  $\mu\text{M}$  Pb(II) in [ $\mu\text{mol/g FM}$ ] (Kap. 3. 1. 2). Standardabweichungen wurden für jeweils einen Messpunkt bestimmt,  $n = 5$ .

Zeit	<u>GSH-Gehalt</u> [ $\mu\text{mol/g FM}$ ]		
	25 $\mu\text{M}$ Pb(II)	100 $\mu\text{M}$ Pb(II)	500 $\mu\text{M}$ Pb(II)
0 h	0,133	0,095	0,147
10 min	0,106	0,136	0,125
20 min	0,180	0,091	0,201
30 min	0,065	0,094	0,148
4 h	0,082	0,143	0,158
1 d	0,138	0,133	0,410
2 d	0,230	0,211	0,418
3 d	0,206	0,264	0,445
5 d	0,158	0,307	0,417
10 d	0,282	0,513	0,562
SD	0,027	0,018	0,039
SE	14,2	8,5	9,7

**Tab. 4.** Vitalität von *Fontinalis antipyretica* bei Belastung mit Pb(II) bzw. Zn(II) verschiedener Konzentrationen. Yield in [% der Kontrolle], n = 5. n. b. – nicht bestimmt. (Kap. 3. 2)

a) Pb(II)

Konzentration	Yield [% der Kontrolle]									
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7	8 d	9 d	10 d
25 µM Pb(II)	96	100	101	98	98	101	99			
SD	5,2	0,6	2,6	1,7	2,1	0,4	1,5			
50 µM Pb(II)	102	99	100	99	99	102	98			
SD	1,2	0,8	1,7	1,2	2,1	1,6	0,6			
100 µM Pb(II)	103	100	99	97	100	100	98			
SD	0,5	0,6	2,1	2,6	0,9	0,8	2,0			
500 µM Pb(II)	83	93	90	90	85	85	87	92	n. b.	80
SD	4,3	2,6	1,6	2,2	1,4	1,6	1,4	1,4	n. b.	5,3

b) Zn(II)

Konzentration	Yield [% der Kontrolle]									
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7	8 d	9 d	10 d
25 µM Zn(II)	104	101	102	98	101	99	99			
SD	1,0	2,3	1,5	1,0	1,5	0,9	0,7			
50 µM Zn(II)	102	101	99	97	102	99	100			
SD	1,7	1,2	1,4	1,0	0,5	0,7	0,8			
100 µM Zn(II)	106	100	97	99	100	100	98			
SD	1,1	1,3	1,5	1,0	1,2	0,4	1,1			
500 µM Zn(II)	97	97	96	94	83	n. b.	97	78	96	98
SD	1,9	1,4	2,2	1,7	4,3	n. b.	2,5	0,04	1,4	1,8

**Tab. 5.** Sulfatgehalt des Mediums bei Belastung mit 200  $\mu\text{M}$  Cd(II) in Abhängigkeit von der Ernährung mit Sulfat in [ $\mu\text{M}$ ]. Standardabweichungen wurden für jeweils einen Messpunkt bestimmt ( $n = 5$ ). (Kap. 3. 3. 1)

Zeit	Sulfat [ $\mu\text{M}$ ]	
	Reihe B (500 $\mu\text{M}$ SO <sub>4</sub> /0 $\mu\text{M}$ Cd(II))	Reihe D (500 $\mu\text{M}$ SO <sub>4</sub> /200 $\mu\text{M}$ Cd(II))
0 h	420	581
0,5 h	470	468
1 h	467	486
1,5 h	464	473
2 h	443	484
4 h	444	456
6 h	446	467
8 h	436	332
12 h	443	447
1 d	425	464
2 d	437	449
6 d	459	447
10 d	438	454
14 d	429	421
SD	64,5	41,2
SE	14	8

**Tab. 6.** Cd(II)-Gehalt bei Belastung mit 200  $\mu\text{M}$  Cd(II) in Abhängigkeit von der Ernährung mit Sulfat in [ $\mu\text{mol/g FM}$ ]. (Kap. 3. 3. 1). Standardabweichungen wurden für jeweils einen Messpunkt bestimmt ( $n = 5$ ).

Zeit	Cd(II)-Gehalt [ $\mu\text{mol/g FM}$ ]			
	200 $\mu\text{M}$ Cd(II)/ 0 $\mu\text{M}$ SO <sub>4</sub>		200 $\mu\text{M}$ Cd(II)/ 500 $\mu\text{M}$ SO <sub>4</sub>	
	Extra	Intra	Extra	Intra
0 h	3,17	0,036	2,67	0,024
30 min	16,32	0,364	9,57	0,172
1 h	13,35	0,531	10,29	0,242
2 h	13,56	0,716	9,34	0,388
5 h	13,43	1,25	8,60	0,677
10 h	14,87	1,68	9,96	1,06
1 d	12,47	2,46	11,49	1,93
2 d	12,37	3,19	11,02	2,12
6 d	11,1	3,37	9,19	2,50
10 d	7,76	3,82	6,06	3,38
14 d	6,81	4,56	6,94	4,38
SD	0,491	0,026	0,504	0,017
SE	6,9	5,6	4,6	7,1

**Tab. 7.** Vitalität von *Fontinalis antipyretica* während Kultivierung in Knop-Medium mit 192  $\mu\text{M}$  Sulfat/ ohne Cd(II) (Kontrolle) in Yield ( $n = 5$ ). (Kap. 3. 3. 1)

Zeit	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	7 d	8 d	9 d	10 d
Yield	0,68	0,73	0,73	0,76	0,74	0,73	0,63	0,73	0,73
SD	0,000	0,006	0,012	0,012	0,007	0,015	0,033	0,015	0,008

**Tab. 8.** Gehalte an Cys,  $\gamma$ -EC, GSSG in *Fontinalis antipyretica* bzw. Sulfat im Medium nach Sulfatmangel (38 Tage) und Zugabe von Cd(II) und/oder Sulfat in [ $\mu\text{mol/g FM}$ ] bzw. [ $\mu\text{M}$ ]. (Kap. 3. 3. 2)

## a) Cys

Zeit	Cys-Gehalt [ $\mu\text{mol/g FM}$ ]			
	0 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 0 $\mu\text{M SO}_4$	100 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 0 $\mu\text{M SO}_4$	0 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 500 $\mu\text{M SO}_4$	100 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 500 $\mu\text{M SO}_4$
0 h	0,025	0,032	0,032	0,014
30 min	0,043	0	0,028	0,033
2 h	0,029	0	0,032	0,024
6 h	0,027	0,028	0,031	0,044
1 d	0,026	0,054	0,060	0,34
2 d	0,029	0,15	0,054	0,43
3 d	0,019	0,15	0,047	0,11
6 d	0,014	0,13	0,026	0,31
10 d	0,019	0,13	0,016	0,25
22 d	0,017	0,074	0,014	0,33

b)  $\gamma$ -EC

Zeit	$\gamma$ -EC-Gehalt [ $\mu\text{mol/g FM}$ ]			
	0 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 0 $\mu\text{M SO}_4$	100 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 0 $\mu\text{M SO}_4$	0 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 500 $\mu\text{M SO}_4$	100 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 500 $\mu\text{M SO}_4$
0 h	0	0	0	0
30 min	0	0	0	0
2 h	0	0	0	0
6 h	0	0	0	0
1 d	0	0,017	0	0,044
2 d	0	0,075	0	0,13
3 d	0	0,16	0	0,027
6 d	0	0,25	0	0,33
10 d	0	0,21	0	0,41
22 d	0	0,041	0	0,81

## c) GSSG

Zeit	<u>GSSG-Gehalt</u> [ $\mu\text{mol/g FM}$ ] bzw. [% von Gesamt-GSH]							
	0 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 0 $\mu\text{M SO}_4$		100 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 0 $\mu\text{M SO}_4$		0 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 500 $\mu\text{M SO}_4$		100 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 500 $\mu\text{M SO}_4$	
	[ $\mu\text{mol/g FM}$ ]	[%]	[ $\mu\text{mol/g FM}$ ]	[%]	[ $\mu\text{mol/g FM}$ ]	[%]	[ $\mu\text{mol/g FM}$ ]	[%]
0 h	0,013	12	0,025	21	0,012	13	0,005	7
30 min	0,042	15	0,017	10	0,010	12	0,013	9
2 h	0,043	30	0,024	14	0,014	10	0,019	20
6 h	0,036	29	0,016	15	0,019	17	0,026	16
1 d	0,023	22	0,023	19	0,015	6	0,064	18
2 d	0,027	25	0,041	12	0,025	10	0,054	9
3 d	0,020	22	0,056	16	0,022	9	0,15	9
6 d	0,019	33	0,038	14	0,038	24	0,13	14
10 d	0,030	34	0,033	14	0,008	5	n. b.	n. b.
22 d	0,019	33	0,016	17	0,014	13	0,021	2

## d) Sulfat

Zeit	<u>Sulfat-Gehalt</u> [ $\mu\text{M}$ ]			
	0 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 0 $\mu\text{M SO}_4$	100 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 0 $\mu\text{M SO}_4$	0 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 500 $\mu\text{M SO}_4$	100 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 500 $\mu\text{M SO}_4$
0 h	0	0	484	462
30 min			451	452
2 h	0	0	423	444
6 h			404	432
1 d			398	464
2 d	0	0	348	421
3 d			355	394
6 d			393	370
10 d			383	369
22 d	0	0	411	419

**Tab. 9.** GSH- und Sulfat-Gehalt bzw. Vitalität von *Fontinalis antipyretica* nach Sulfatmangel (45 Tage) und Zugabe von Cd(II) und/oder Sulfat in [ $\mu\text{mol/g FM}$ ],  $n = 3$  bzw. [Yield],  $n = 5$ . (Kap. 3. 3. 2). (0 d<sub>a</sub>: Zugabe von Sulfat; 0 d<sub>b</sub>: Zugabe von Cd(II) = 1 d Sulfat).

## a) Sulfat

Zeit	Sulfat-Gehalt [ $\mu\text{mol/g FM}$ ]							
	0 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 0 $\mu\text{M SO}_4$		100 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 0 $\mu\text{M SO}_4$		0 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 500 $\mu\text{M SO}_4$		100 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 500 $\mu\text{M SO}_4$	
	[ $\mu\text{mol/g FM}$ ]	SD	[ $\mu\text{mol/g FM}$ ]	SD	[ $\mu\text{mol/g FM}$ ]	SD	[ $\mu\text{mol/g FM}$ ]	SD
0 d <sub>a</sub>	0,30	0,08	0,24	0,00	0,58	0,06	0,60	0,14
0 d <sub>b</sub>	0,29	0,09	0,36	0,14	2,52	0,76	2,48	0,36
1 d	0,27	0,09	0,37	0,10	2,33	0,05	3,21	0,18
2 d	0,12	0,02	0,21	0,10	2,51	0,40	1,69	0,28
3 d	0,05	0,00	0,14	0,02	3,19	0,35	2,43	0,43
4 d	0,31	0,08	0,11	0,00	3,22	0,02	3,74	0,19
5 d	0,13	0,03	0,11	0,00	2,70	0,23	2,10	0,30
6 d	0,18	0,01	0,05	0,01	3,03	0,30	2,75	0,50
7 d	0,30	0,005	0,06	0,01	3,13	0,50	2,04	0,32
8 d	0,25	0,16	0,12	0,02	2,87	0,72	1,90	0,42
9 d	0,18	0,06	0,11	0,04	2,63	0,15	1,98	0,12
10 d	0,28	0,02	0,14	0,07	3,27	0,27	2,34	0,47



## b) GSH

Zeit	GSH-Gehalt [ $\mu\text{mol/g FM}$ ]							
	0 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 0 $\mu\text{M SO}_4$		100 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 0 $\mu\text{M SO}_4$		0 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 500 $\mu\text{M SO}_4$		100 $\mu\text{M Cd(II)}/$ 500 $\mu\text{M SO}_4$	
	[ $\mu\text{mol/g FM}$ ]	SD	[ $\mu\text{mol/g FM}$ ]	SD	[ $\mu\text{mol/g FM}$ ]	SD	[ $\mu\text{mol/g FM}$ ]	SD
0 d <sub>a</sub>	0,048	0,008	0,062	0,005	0,057	0,015	0,031	0,000
0 d <sub>b</sub>	0,046	0,006	0,071	0,011	0,132	0,025	0,077	0,010
1 d	0,028	0,003	0,104	0,026	0,118	0,003	0,130	0,015
2 d	0,030	0,009	0,107	0,033	0,155	0,027	0,244	0,070
3 d	0,015	0,006	0,075	0,016	0,174	0,020	0,398	0,025
4 d	0,040	0,003	0,166	0,017	0,138	0,040	0,406	0,019
5 d	0,040	0,009	0,132	0,013	0,165	0,016	0,342	0,030
6 d	0,025	0,006	0,078	0,012	0,135	0,004	0,493	0,091
7 d	0,028	0,004	0,162	0,021	0,095	0,011	0,472	0,052
8 d	0,024	0,002	0,176	0,002	0,095	0,005	0,522	0,043
9 d	0,026	0,001	0,208	0,017	0,065	0,011	0,538	0,030
10 d	0,017	0,005	0,256	0,017	0,097	0,013	0,564	0,067

## c) Vitalität

Zeit	Vitalität [Yield]							
	0 $\mu\text{M}$ Cd(II)/ 0 $\mu\text{M}$ SO <sub>4</sub>		100 $\mu\text{M}$ Cd(II)/ 0 $\mu\text{M}$ SO <sub>4</sub>		0 $\mu\text{M}$ Cd(II)/ 500 $\mu\text{M}$ SO <sub>4</sub>		100 $\mu\text{M}$ Cd(II)/ 500 $\mu\text{M}$ SO <sub>4</sub>	
	[Yield]	SD	[Yield]	SD	[Yield]	SD	[Yield]	SD
0 d <sub>a</sub>	0,58	0,027	0,55	0,12	0,60	0,072	0,60	0,080
0 d <sub>b</sub>	0,62	0,050	0,53	0,11	0,60	0,062	0,59	0,080
1 d	0,61	0,032	0,17	0,077	0,63	0,071	0,29	0,045
2 d	0,53	0,089	0,23	0,091	0,68	0,060	0,41	0,10
3 d	0,50	0,070	0,11	0,043	0,70	0,044	0,42	0,055
4 d	0,53	0,12	0,09	0,043	0,68	0,022	0,44	0,092
5 d	0,57	0,071	0,10	0,037	0,68	0,023	0,37	0,11
6 d	0,53	0,10	0,14	0,056	0,69	0,037	0,34	0,059
7 d	0,55	0,035	0,07	0,071	0,71	0,021	0,32	0,066
8 d	0,52	0,088	0,09	0,041	0,71	0,012	0,33	0,062

**Tab. 10.** <sup>15</sup>N-Häufigkeit in der NPN- und PN-Fraktion von *Fontinalis antipyretica* ohne Cd(II) bzw. nach Belastung mit 50  $\mu\text{M}$  Cd(II) in [at.-% exc.], n = 3. (Kap. 3. 5)

Zeit	<sup>15</sup> N-Häufigkeit [at.-% exc.]							
	Kontrolle				50 $\mu\text{M}$ Cd(II)			
	NPN	SD	PN	SD	NPN	SD	PN	SD
5 h	0,04	0,00007	0,044	0,00009	0,019	0,00017	0,034	0,00009
10 h	0,056	0,0001848	0,051	0,00009	0,018	0,00007	0,034	0,00008
1 d	0,144	0,0003168	0,106	0,00034	0,099	0,00052	0,057	0,00019
2 d	0,171	0,0005985	0,08	0,00028	0,114	0,00072	0,063	0,00026
5 d	0,367	0,0013579	0,223	0,00051	0,165	0,00045	0,113	0,00019
10 d	0,781	0,001562	0,667	0,00027	0,110	0,00043	0,091	0,00028

**Tab. 11.** Cd(II)-Gehalt von *Fontinalis antipyretica* nach Belastung mit Metolachlor und Cd(II) (3 Tage) (je 100  $\mu$ M) in [% des wiedergefundenen Cd(II)]. (Kap. 3. 6)

Probe	Cd(II)-Gehalt [%]	
	Extra	Intra
Cd(II)	57	23
Metola 1 + Cd(II)	69	19
Metola 2 + Cd(II)	54	25

**Tab. 12.** Vitalität von *Fontinalis antipyretica* nach Belastung mit 25 bzw. 50  $\mu$ M Metolachlor (1 Tag) und folgender Zugabe von 50  $\mu$ M Cd(II) in [% der Kontrolle], n = 5. (Kap. 3. 6)

Probe	Yield [% der Kontrolle]									
	1 d/0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	9 d	10 d	
Metola 25	103,3	100,3	100,6	100,3	98,9	104,2	97,9	96,5	101,7	
SD	1,6	1,4	1,2	2,2	2,3	0,7	1,6	2,4	0,8	
Metola 25 + Cd(II)	103,7	95,1	86,1	81,9	80,6	76,7	73,7	58,4	58,3	
SD	0,5	2,4	6,5	5,3	1,7	3,9	2,9	3,4	3,0	
Metola 50	101,4	99,7	100,9	100,8	94,4	101,7	99,2	96,5	99,4	
SD	1,2	2,3	1,5	0,8	1,9	1,7	1,0	2,2	1,7	
Metola 50 + Cd(II)	99,5	92,3	90,6	80,8	71,9	77,6	61,8	66,2	62,5	
SD	2,5	4,4	4,9	5,3	7,2	3,8	2,6	4,3	4,8	

## Anhang B – Standardabweichungen

**Tab. 1.** Standardabweichungen der Cd(II)-Akkumulation von Helbe- und Wippermateriale bei Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) (Cd(II) in  $\mu\text{mol/g}$  FM, n=5).

Standort	<u>Standardabweichung</u>					
	<u>Medium</u>		<u>Extrazellulär</u>		<u>Intrazellulär</u>	
	SD	SE	SD	SE	SD	SE
<u>Wipper</u>						
1 h	0,134	3,3	0,229	5,1	0,02	6,6
6 h	0,183	7,5	0,257	4,1	0,098	12,2
<u>Helbe</u>						
2 d	0,116	3,3	0,367	5,8	0,032	1,21
8 d	0,254	8,2	0,113	2,0	0,249	5,9

**Tab. 2.** Standardabweichungen der Cd(II)-Akkumulation von Helbe- und Wippermateriale bei Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  Cd(II) (Cd(II) in % des wiedergefundenen Cd(II), n=5).

Standort	<u>Standardabweichung</u>					
	<u>Medium</u>		<u>Extrazellulär</u>		<u>Intrazellulär</u>	
	SD	SE	SD	SE	SD	SE
<u>Wipper</u>						
1 h	1,5	3,9	1,7	3,0	0,2	8,4
6 h	1,8	7,1	1,0	1,5	0,9	11,1
<u>Helbe</u>						
2 d	1,4	4,9	1,8	3,6	0,5	2,5
8 d	1,9	7,9	0,8	1,8	1,8	5,4

**Tab. 3.** Standardabweichungen der Cd(II)-Akkumulation von Helbematerial bei Belastung mit 25, 200 und 400  $\mu\text{M}$  Cd(II) (n=5).

## a) Cd(II) in % des wiedergefundenen Cd(II)

Cd(II)- Konzentration	Standardabweichung					
	<u>Medium</u>		<u>Extrazellulär</u>		<u>Intrazellulär</u>	
	SD	SE	SD	SE	SD	SE
<u>25 <math>\mu\text{M}</math></u>						
4 h	1,5	7,9	2,4	3,6	1,2	7,7
<u>200 <math>\mu\text{M}</math></u>						
1 d	2,2	5,1	2,5	5,8	0,6	3,6
<u>400 <math>\mu\text{M}</math></u>						
2 d	0,6	1,6	1,0	2,0	0,9	7,4

b) Cd(II) in  $\mu\text{mol/g}$  FM

Cd(II)- Konzentration	Standardabweichung					
	<u>Medium</u>		<u>Extrazellulär</u>		<u>Intrazellulär</u>	
	SD	SE	SD	SE	SD	SE
<u>25 <math>\mu\text{M}</math></u>						
4 h	0,029	8,7	0,072	6,1	0,031	11,1
<u>200 <math>\mu\text{M}</math></u>						
1 d	0,465	6,2	0,410	5,5	0,160	5,8
<u>400 <math>\mu\text{M}</math></u>						
2 d	0,386	2,2	0,392	1,9	0,452	8,4

**Tab. 4.** Standardabweichungen bei Belastung von Helbmaterial mit 25, 100 und 500  $\mu\text{M}$  Zn(II) (n=5).a) Zn(II) in % des wiedergefundenen Zn(II)

Zn(II)- Konzentration	Standardabweichung					
	<u>Medium</u>		<u>Extrazellulär</u>		<u>Intrazellulär</u>	
	SD	SE	SD	SE	SD	SE
<u>25 <math>\mu\text{M}</math></u>						
1 d	0,9	5,7	2,4	2,5	1,7	6,9
<u>100 <math>\mu\text{M}</math></u>						
2 d	0,8	2,6	2,2	5,0	2,5	10,2
<u>500 <math>\mu\text{M}</math></u>						
5 d	2,8	5,4	3,0	6,8	0,3	8,4

b) Zn(II) in  $\mu\text{mol/g}$  FM

Zn(II)- Konzentration	Standardabweichung					
	<u>Medium</u>		<u>Extrazellulär</u>		<u>Intrazellulär</u>	
	SD	SE	SD	SE	SD	SE
<u>25 <math>\mu\text{M}</math></u>						
1 d	0,019	56,2	0,027	2,9	0,039	8,8
<u>100 <math>\mu\text{M}</math></u>						
2 d	0,127	4,4	0,170	4,0	0,310	13,6
<u>500 <math>\mu\text{M}</math></u>						
5 d	1,390	5,6	1,520	7,2	0,687	7,4

**Tab. 5.** Standardabweichungen bei Belastung von Helbmaterial mit 25, 100 und 500  $\mu\text{M}$  Pb(II) (n=5).a) Pb(II) in % des wiedergefundenen Pb(II)

Pb(II)- Konzentration	Standardabweichung					
	<u>Medium</u>		<u>Extrazellulär</u>		<u>Intrazellulär</u>	
	SD	SE	SD	SE	SD	SE
<u>25 <math>\mu\text{M}</math></u>						
1 d	0,2	12,6	1,5	14,5	1,6	1,8
<u>100 <math>\mu\text{M}</math></u>						
2 d	1,3	37,5	4,7	15,5	4,3	6,4
<u>500 <math>\mu\text{M}</math></u>						
3 d	0,7	29,8	4,2	16,2	3,5	4,9

b) Pb(II) in  $\mu\text{mol/g}$  FM

Pb(II)- Konzentration	Standardabweichung					
	<u>Medium</u>		<u>Extrazellulär</u>		<u>Intrazellulär</u>	
	SD	SE	SD	SE	SD	SE
<u>25 <math>\mu\text{M}</math></u>						
1 d	0,006	14,4	0,037	15,2	0,071	3,5
<u>100 <math>\mu\text{M}</math></u>						
2 d	0,062	30,4	0,326	17,5	0,428	10,3
<u>500 <math>\mu\text{M}</math></u>						
3 d	0,092	24,9	1,350	28,4	1,630	12,8

**Tab. 6.** Standardabweichungen der Cd(II)-Akkumulation von *Fontinalis dalecarlica* bei Belastung mit 25, 100 und 200  $\mu\text{M}$  Cd(II) (n=5).

## a) Cd(II) in % des wiedergefundenen Cd(II)

Cd(II)- Konzentration	Standardabweichung					
	<u>Medium</u>		<u>Extrazellulär</u>		<u>Intrazellulär</u>	
	SD	SE	SD	SE	SD	SE
<u>25 <math>\mu\text{M}</math></u>						
2 h	6,7	16,5	5,5	10,3	0,8	10,0
10 h	1,8	7,5	3,4	5,9	2,0	11,9
<u>100 <math>\mu\text{M}</math></u>						
1 d	1,6	3,6	1,2	2,8	1,4	12,7
7 d	1,4	4,4	1,6	3,5	0,5	2,0
<u>200 <math>\mu\text{M}</math></u>						
2 h	1,0	1,6	1,0	2,9	0,3	5,2
10 h	3,4	6,9	4,2	9,8	0,9	8,9

b) Cd(II) in  $\mu\text{mol/g}$  FM

Cd(II)- Konzentration	Standardabweichung					
	<u>Medium</u>		<u>Extrazellulär</u>		<u>Intrazellulär</u>	
	SD	SE	SD	SE	SD	SE
<u>25 <math>\mu\text{M}</math></u>						
2 h	0,170	16,0	0,178	12,8	0,028	13,3
10 h	0,058	10,0	0,140	10,0	0,058	14,4
<u>100 <math>\mu\text{M}</math></u>						
1 d	0,209	3,7	0,248	4,6	0,186	13,6
7 d	0,173	4,2	0,261	4,4	0,088	2,8
<u>200 <math>\mu\text{M}</math></u>						
2 h	0,269	2,1	0,244	3,3	0,066	6,0
10 h	0,702	6,9	0,732	8,3	0,186	9,0



**Tab. 7.** Relative Standardabweichungen von Thiolen und Sulfat (n=5).

Thiole	<u>Relative Standardabweichung SE</u>			
	0 $\mu\text{M}$ $\text{SO}_4$ / 0 $\mu\text{M}$ Cd(II)	500 $\mu\text{M}$ $\text{SO}_4$ / 0 $\mu\text{M}$ Cd(II)	0 $\mu\text{M}$ $\text{SO}_4$ / 200 $\mu\text{M}$ Cd(II)	500 $\mu\text{M}$ $\text{SO}_4$ / 200 $\mu\text{M}$ Cd(II)
Cys	21	26	16	18
$\gamma$ -EC	0	0	0	15
GSH	5	26	12	18
GSSG	18	26	12	25
Sulfat	11	6	8	4

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und die verwendeten Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Halle/Saale, den 26. 10. 2000