

# **Ökotoxikologische Wirkungen atmosphärischer Trichloressigsäure in pflanzlichen Systemen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Fachbereich Biochemie/Biotechnologie)

von Evelyn Schmidt

geb. am 11. August 1975 in Schlema

Gutachter:

1. Prof. G.-J. Krauß
2. Prof. K. Jung
3. Prof. Förstel

Halle (Saale), den 15.12.2003



<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Einführung in die Problematik</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Zielstellung</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Übersicht der Arbeit</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Biologische Wirkungsuntersuchung in der Ökotoxikologie</b>	<b>5</b>
<b>1.5 Biologische Testsysteme</b>	<b>7</b>
<b>2 Kenntnisstand</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Trichloressigsäure in der Umwelt</b>	<b>9</b>
2.1.1 Physikochemische Eigenschaften	9
2.1.2 Anwendung von TCA	9
2.1.3 Vorkommen in der Umwelt	10
2.1.4 Industrielle Quellen, atmogene und biogene Bildung von TCA	11
2.1.5 Aufnahme und Akkumulation im pflanzlichen Gewebe	12
2.1.6 Phytotoxisches Wirkungsspektrum	13
2.1.7 Transformation und Abbau	14
<b>2.2 Endpunkte zur Wirkungsindikation</b>	<b>15</b>
2.2.1 Nitratassimilation und Stickstoffmetabolismus	15
2.2.2 Photosynthetische Energieumwandlung und Chlorophyllfluoreszenz	18
2.2.3 Die Rolle der Glutathion-S-Transferase im pflanzlichen Detoxifikationsmetabolismus	19
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Standardisierte Labortests</b>	<b>23</b>
3.1.1 <sup>15</sup> N-Stoffwechselfest (ESIMA)	23
3.1.1.1 Anzucht und Versuchsdurchführung mit <i>Pisum sativum</i>	23
3.1.1.2 Anzucht und Versuchsdurchführung mit <i>Lepidium sativum</i>	23
3.1.1.3 Auswertung	24
3.1.2 Pollenschlauchwachstumstest (PTG-Test)	24
3.1.2.1 Durchführung	24
3.1.2.2 Auswertung	25
3.1.3 Berechnung des IC <sub>50</sub> -Wertes	25

<b>3.2</b>	<b>Kontrollierte Exposition in der Expositions-kammer</b>	<b>26</b>
3.2.1	Anlage zur kontrollierten Applikation atmosphärisch getragener TCA	26
3.2.2	Atmosphärische TCA-Belastung unterschiedlicher Photosynthesetypen	27
3.2.2.1	Pflanzenanzucht	28
3.2.2.2	Exposition	29
3.2.3	Atmosphärische TCA-Belastungen von <i>Pinus sylvestris</i>	29
3.2.3.1	Pflanzenanzucht	30
3.2.3.2	Exposition	30
3.2.4	Atmosphärische TCA-Belastung von <i>Cirsium arvense</i>	31
3.2.4.1	Pflanzenanzucht	31
3.2.4.2	Exposition	31
<b>3.3</b>	<b>Untersuchungen unter freilandähnlichen Bedingungen</b>	<b>32</b>
3.3.1	Durchführung und Probenahme	32
<b>3.4</b>	<b>Freilanduntersuchungen</b>	<b>33</b>
3.4.1	Durchführung und Probenahme	33
<b>3.5</b>	<b>Untersuchungsparameter</b>	<b>34</b>
3.5.1	Untersuchung der <sup>15</sup> N-Häufigkeiten im Gesamtstickstoff, der Protein- und Nichtprotein-Fraktion	34
3.5.1.1	Probenaufarbeitung	34
3.5.1.2	Bestimmung des N-Gehaltes nach Kjeldahl	34
3.5.1.3	<sup>15</sup> N-Isotopenanalytik	35
3.5.2	Bestimmung der <sup>15</sup> N-Häufigkeiten einzelner Aminosäuren der löslichen Proteinfraktion	37
3.5.2.1	Gewinnung der löslichen Proteinfraktion für AS-Analytik	37
3.5.2.2	Proteinhydrolyse	37
3.5.2.3	Derivatisierung der Aminosäuren durch Trifluoracetylierung	38
3.5.2.4	GC-C-IRMS-Analyse	38
3.5.3	Biochemische Auftrennung der löslichen Proteine über SDS-PAGE	39
3.5.3.1	Gewinnung der löslichen Proteinfraktion für SDS-PAGE	39
3.5.3.2	Proteinbestimmung nach Lowry	39
3.5.3.3	SDS-Gelelektrophorese	40
3.5.3.4	Proteinfärbung	40
3.5.3.5	Geldokumentation	40

3.5.4	Bestimmung der Enzymaktivitäten wichtiger Schlüsselenzyme der Nitrataassimilation	41
3.5.4.1	Gewinnung des Rohenzymextraktes für NR/NIR-Aktivitätsbestimmung	41
3.5.4.2	Bestimmung der NADH-Nitratreduktase-Aktivität	41
3.5.4.3	Bestimmung der Nitritreduktase-Aktivität	42
3.5.5	Untersuchung der Glutathion-S-Transferase- Aktivitäten	42
3.5.5.1	Gewinnung des Rohenzymextraktes für GST-Aktivitätsbestimmung	42
3.5.5.2	GST-Aktivitätsbestimmung	42
3.5.6	Bestimmung der effektiven Quantenausbeute des PS II mit Hilfe der Chlorophyllfluoreszenz	43
3.5.7	Bestimmung der Pigmentgehalte	44
3.5.8	Bestimmung der TCA-Gehalte von Nadelproben	44
<b>3.6</b>	<b>Statistik und Fehlerberechnung</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Versuchsebene 1: Standardisierte Labortests</b>	<b>46</b>
4.1.1	Ergebnisse des Pollenschlauchwachstumstests (PTG-Test)	46
4.1.2	Ergebnisse des <sup>15</sup> N-Stoffwechselltests (ESIMA)	49
4.1.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	51
4.1.4	Diskussion	51
<b>4.2</b>	<b>Versuchsebene 2: Kontrollierte Exposition</b>	<b>57</b>
4.2.1	Atmosphärische TCA- Belastung unterschiedlicher Photosynthesetypen	57
4.2.1.1	Pflanzenwachstum und Vitalität	57
4.2.1.2	Stickstoffmetabolismus	60
4.2.1.3	Proteinmuster bei <i>Tropaeolum majus</i>	72
4.2.1.4	GST-Aktivität	73
4.2.1.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	76
4.2.2	Atmosphärische TCA-Belastungen von <i>Pinus sylvestris</i>	78
4.2.2.1	Photosynthese	78
4.2.2.2	Stickstoffmetabolismus	83
4.2.2.3	GST-Aktivität	88
4.2.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	90
4.2.3	Atmosphärische TCA-Belastungen genetischer Differenzierungen von <i>Cirsium arvense</i>	92
4.2.3.1	Photosynthese	92
4.2.3.2	Stickstoffmetabolismus	94
4.2.3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	98

---

<b>4.3 Versuchsebene 3: Freilandähnlicher Versuch in open-top Kammern</b>	<b>99</b>
4.3.1 Stickstoffmetabolismus und TCA- Gehalt	99
4.3.2 Wassergehalt	104
4.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	104
<b>4.4 Versuchsebene 4: Freilanduntersuchungen</b>	<b>105</b>
4.4.1 Stickstoffmetabolismus und TCA- Gehalt	105
4.4.2 Wassergehalt	112
4.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	112
<b>5 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>113</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>118</b>
<b>Tabellenanhang</b>	<b>133</b>
<b>Danksagung</b>	<b>156</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
CDNB	Chlordinitrobenzol
Chl	Chlorophyll
DCA	Dichloressigsäure
EC	Effect Concentration
ESIMA	Ecotoxicological Stable Isotope Metabolic Assay
FAD	Flavinadenindinucleotid
GC-C-IRMS	Gaschromatograph-Combustion-Isotope-Ratio-Mass-Spectrometer
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HATS	High Affinity Transport System
IC	Inhibition Concentration
kDa	Kilodalton
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration
MCA	Monochloressigsäure
NADH	reduziertes Nicotinamadenindinucleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamadenindinucleotidphosphat
Na-TCA	Natrium-Trichloressigsäure
NIR	Nitritreduktase
NOEC	No Observed Effect Concentration
NR	Nitratreduktase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PS	Photosystem
PTG	Pollen Tube Growth
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TCE	1,1,1- Trichlorethan
TECE	Tetrachlorethylen
TRI	Trichlorethen
VCH	Volatile Chlorinated Hydrocarbon

Dreibuchstaben-Code der Aminosäuren

Ala	Alanin	Gly	Glycin	Pro	Prolin
Arg	Arginin	His	Histidin	Ser	Serin
Asn	Asparagin	Ile	Isoleucin	Thr	Threonin
Asp	Asparaginsäure	Leu	Leucin	Trp	Tryptophan
Cys	Cystein	Lys	Lysin	Tyr	Tyrosin
Gln	Glutamin	Met	Methionin	Val	Valin
Glu	Glutaminsäure	Phe	Phenylalanin		

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung in die Problematik

Anfang der 80er Jahre erreichte die Baum- und Waldschädigung in Deutschland und Europa ein so hohes Ausmaß, dass diese unter dem Begriff „Waldsterben“ ein breites mediales und öffentliches Interesse fand. Heute ist dieses Thema fast vollständig aus den Medien verschwunden, dennoch besteht die Schädigung des Waldes fort. Der Wald hat sich in den letzten Jahren auf einem allgemein schlechten Vitalitätsniveau mehr oder weniger stabilisiert. So sind laut dem letzten vorliegenden deutschen Waldzustandsbericht von 2002 durchschnittlich 21 % Nadel-/ Blattverlust aller Baumarten zu verzeichnen (BMVEL, 2002). In zunehmendem Maße sind auch Laubbäume betroffen, die im allgemeinen als sehr robust gelten. Diese Schädigungen werden als neuartige Waldschäden bezeichnet. Als Ursachen dafür sind neben natürlichen Einflüssen wie Sturm, Insekten und Pilzbefall auch Luftschadstoffe mit anthropogenem Ursprung zu nennen (Schmidt, 2000). Stichprobenuntersuchungen in Gebieten, in denen die neuartigen Waldschäden besonders hoch sind, haben unter anderem hohe Werte von Trichloressigsäure in Fichtennadeln und in der Humusaufgabe ergeben.

Die Trichloressigsäure ist eine phytotoxische Substanz und wird als bedeutsamer Kofaktor bei der Verursachung neuartiger Waldschäden angesehen (Frank, 1988). Ihre phytotoxische Wirkung ist schon seit Jahrzehnten durch den Einsatz als Herbizid bekannt. In den letzten Jahren erlangte TCA als photochemisches Umwandlungsprodukt leicht flüchtiger chlorierter Kohlenwasserstoffe Aufmerksamkeit und wird auch als sekundärer Luftschadstoff bezeichnet (Frank, 1988, 1991; Frank et al. 1989, 1990, 1994). Der atmosphärische Abbau von C<sub>2</sub>-Chlorkohlenwasserstoffen liefert beachtliche Mengen an luftgetragenen Chloressigsäuren, die durch Transmission in der Atmosphäre verteilt werden und infolge von Deposition auf die Vegetation einwirken. Nicht zuletzt gelangen sie durch Auswaschungsprozesse in den Boden und auch in das Grundwasser. Seit den letzten 10 Jahren steht die Bedeutung von Trichloressigsäure hauptsächlich unter einem forstwirtschaftlichen Aspekt. Die Wirkung von TCA-Einträgen auf andere Nutz- bzw. Wildpflanzen spielt bisher eine untergeordnete Rolle. Neuere Biomonitoring-Studien von TCA im Bereich des Kaspischen Meeres lassen die Spekulation zu, dass auch hier dieser Luftschadstoff ein wichtiger Faktor beim Prozess der Versteppung dieser Region ist (Weissflog et al., 1999; Elansky et al., 2001).

## 1.2 Zielstellung

Zielstellung der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zur Abschätzung des ökotoxikologischen Potentials luftgetragener Trichloressigsäure auf die Vegetation zu leisten. Dabei wird ergänzend zu den in der Literatur vorhandenen Akkumulations- und Biomonitoringstudien die phytotoxische Wirkung dieser Substanz auf verschiedenen Versuchsebenen untersucht. Als Untersuchungsparameter steht der Stickstoffmetabolismus im Vordergrund. Weiterhin werden die Photosyntheseleistung und der Detoxifikationsmetabolismus zur Bewertung der ökotoxikologischen Relevanz herangezogen.

Diese Arbeit untergliedert sich dabei in vier Untersuchungsebenen:

Versuchsebene 1: Standardisierte Labortests

Versuchsebene 2: Kontrollierte Exposition

Versuchsebene 3: Untersuchungen unter freilandähnlichen Bedingungen

Versuchsebene 4: Freilanduntersuchungen

Im folgenden werden die einzelnen Versuchsebenen kurz erläutert:

Von den in der **Versuchsebene 1** durchgeführten Biotests (Pollen Tube Growth Test, Ecotoxicological Stable Isotope Metabolic Assay) werden Basisinformationen über die metabolische Wirkung und Zytotoxizität von TCA erwartet, die jedoch allein für die Abschätzung des Gefährdungspotentials atmosphärischer TCA im Ökosystem nicht ausreichen. Deshalb werden in der **Versuchsebene 2** Begasungsexperimente unter standardisierten Bedingungen in Expositions-kammern durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Themenkomplexe bearbeitet.

#### Themenkomplex 1

Es existieren zum Teil große Unterschiede zwischen verschiedenen Pflanzenspezies in der Schadstofftoleranz gegenüber Luftschadstoffen (Barnes et al., 1999). Aus diesem Grunde ist es notwendig, dass für eine Wirkungsdiagnostik der TCA verschiedene Wirkungsparameter und Pflanzenarten untersucht werden. So wird in dieser Studie auf der Versuchsebene 2 auf unterschiedliche Photosynthesetypen eingegangen, da vermutet wird, dass morphologische, physiologische und biochemische Merkmale das Toleranzverhalten der Pflanzen gegenüber Luftschadstoffen beeinflussen. Es werden C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Pflanzen herangezogen, die in ihrer Morphologie und Biochemie stark differieren.

#### Themenkomplex 2

Der zweite Aspekt, der in dieser Versuchsebene berücksichtigt wird, ist der Einfluss luftgetragener TCA auf Koniferenpflanzen, der im engen Zusammenhang mit den unter Kap 1.1 schon erwähnten neuartigen Waldschäden steht.

#### Themenkomplex 3

Darüber hinaus wird auf Versuchsebene 2 die Frage behandelt, ob und in welchem Maße unterschiedliche Herkünfte einer Art einen Einfluss auf die phytotoxische Wirkung ausüben.

Da bei Simulationen in der Expositions-kammer Bedingungen herrschen, die so in der freien Natur nicht vorkommen, ist es immer notwendig, Laborexperimente mit Freilandversuchen zu kombinieren. Aus diesem Grunde werden neben der kontrollierten Exposition auch freiland-ähnliche Versuche (**Versuchsebene 3**) mit der atmosphärischen Belastung von TCA-Vorläufer-substanzen in open-top Kammern durchgeführt. Die Relevanz der Vorläufersubstanzen liegt darin begründet, dass in der freien Natur aus ihnen die TCA gebildet wird und diese in unterschiedlichen Konzentrationen, je nach Bildungsrate, auf die Pflanzen einwirkt. In diesen Versuchen haben sowohl die Bildung, als auch die Bioakkumulation der Substanz unter naturnahen Bedingungen einen Effekt auf die phytotoxische Wirkung.

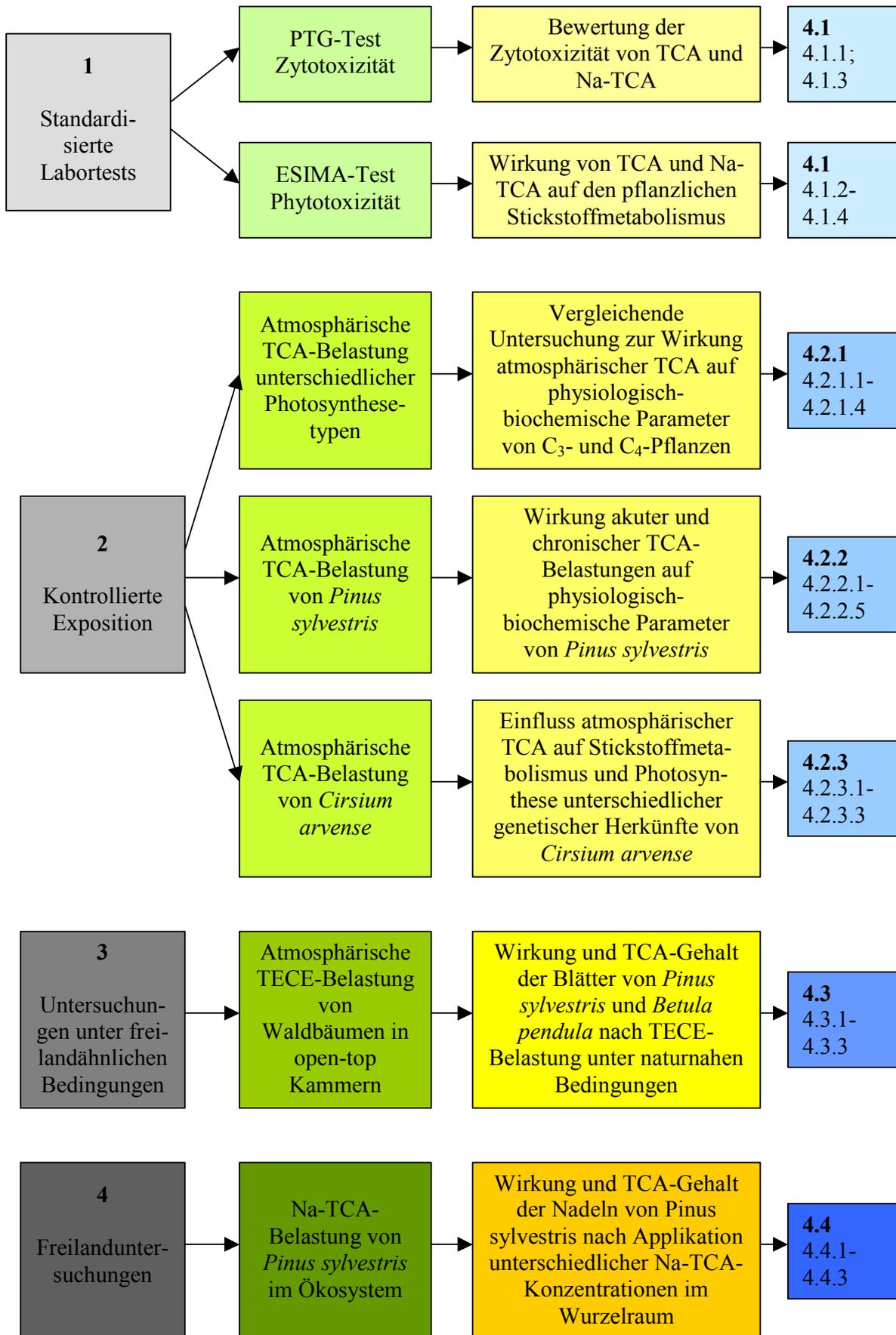
Die letzte Stufe (**Versuchsebene 4**) beinhaltet die Freilandversuche, in denen der Einfluss von TCA auf natürlich gewachsene Pflanzen über Wurzelapplikation in einem Ökosystem untersucht wird. Hier sind nicht nur natürliche klimatische Verhältnisse, sondern unter anderem die

Bodentextur, der mikrobielle Abbau und der Einfluss von Pflanzengemeinschaften für die ökotoxikologische Relevanz von Bedeutung.

Durch die Untersuchungen des Einflusses von TCA auf den Stickstoffmetabolismus, unter verschiedenen Aspekten betrachtet und auf vier Versuchsebenen analysiert, werden neue Informationen erwartet, die eine differenzierte Beurteilung der phytotoxischen Wirkung atmosphärisch vorkommender TCA erlauben und generelle Aussagen über das ökotoxikologische Gefährdungspotential ermöglichen.

### **1.3 Übersicht der Arbeit**

Zur besseren Übersicht der Arbeit sind im folgenden Schema die 4 Untersuchungsebenen (grau), die bearbeiteten Themenkomplexe (grün) mit den zugehörigen Zielstellungen (gelb) und den Ergebniskapiteln (blau) dargestellt. Die zunehmende ökologische Relevanz der Untersuchungsebenen wird mit steigender Farbintensität verdeutlicht.



## 1.4 Biologische Wirkungsuntersuchungen in der Ökotoxikologie

Durch die Zunahme der Erdbevölkerung und den höheren Bedarf an Bioressourcen steigen auch die damit verbundenen ökologischen Probleme, zu deren Klärung sich 1964 insgesamt 46 Staaten zusammengefunden und ein internationales biologisches Programm (IBP) beschlossen haben (Gellert et al., 1979). Durch eine Programmerweiterung unter dem Namen „Mensch und Biosphäre“ (MAB), die von der UNESCO verabschiedet wurde, sollen Ansätze erarbeitet werden, wie der Mensch die Biosphäre nutzen kann, ohne langfristig störende Nebenwirkungen im größeren Ausmaß hervorzurufen. Dazu gehört die Erfassung von Struktur und Funktion der Biosphäre und ihrer biologischen Teilgebiete, die Untersuchung der durch menschlichen Einfluss verursachten Veränderungen und die Rückwirkung dieser biosphärischen Veränderungen auf den Menschen (Gellert et al., 1979). Die Ökotoxikologie stellt dabei ein Gebiet dar, das sich mit der Lehre von der Schädlichkeit chemischer Stoffe (anthropogener und natürlicher Substanzen) und physikalischer Einwirkungen auf lebende Organismen, Populationen und ganze Lebensgemeinschaften beschäftigt, wobei Stoffkreisläufe und ihre Wechselwirkungen mit der Umwelt auch eine Rolle spielen (Güttinger & Stumm, 1990).

Der Begriff Ökotoxikologie wurde erstmals 1969 von dem Toxikologen René Truhaut eingeführt (Greim & Deml, 1996). Die Aufgabe der Ökotoxikologie ist es, u. a. Prognosen über schädliche Wirkungen als Abweichung von Referenzwerten lebender Systeme zu erstellen und das möglichst bis zur Ebene der Population. Die Ökotoxikologie ist ein interdisziplinäres Arbeitsgebiet, das Methoden der Toxikologie, Erkenntnisse aus der Pharmakokinetik und -dynamik mit ökologischem Wissen kombiniert und dabei auch juristischen Anforderungen gerecht wird (Rudolph & Boje, 1986). Das Problem dieser Disziplin besteht darin, dass das Ökosystem, worauf letztendlich die Wirkungsforschung ausgerichtet ist, ein hoch komplexes und flexibles Gebilde ist, das sich in seiner Struktur und Funktion mit der Zeit ändert. Des weiteren stellt sich die Frage, was der Grundzustand des Ökosystems ist und in welchen Grenzen er schwankt. Da der Mensch schon längst Einfluss auf die Natur ausübt, kann von einem rein natürlichen Zustand nicht mehr ausgegangen werden, vielmehr muss durch die bereits vorhandenen anthropogenen Einflüsse ein „naturnahes Ökosystem“ vorausgesetzt werden. Die allgemeine ökotoxikologische Bewertungsstrategie geht von einer Belastungsanalyse (vor Ort oder im Labor) aus und bestimmt anschließend den physikalisch-chemischen Charakter, die Exposition (Bioverfügbarkeit) und die ökotoxikologische Wirkung der Stoffe. Durch Modellierung und Risikoabschätzung kann abschließend eine Langzeitprognose und Bewertung erfolgen (Ketrupp et al., 1990).

Die Untersuchungsebenen der Ökotoxikologie erstrecken sich auf Biomoleküle, an denen Wirkungsmechanismen untersucht werden können, auf die Zelle, an der Aufnahme-, Anreicherungs-, Transformations- und Wirkungsstudien durchgeführt werden, auf einzelne Organe und Gewebearten, auf das Individuum und auf die gesamte Population. Die Population stellt die höchst entwickelte Ebene, in der Methoden und Kenntnisse zur Beurteilung von Schadwirkungen vorliegen, dar, auch wenn bis jetzt nur ein Bruchteil untersucht ist und die Erkenntnisse lückenhaft sind. Die entscheidende Forschungsebene der Ökotoxikologie ist jedoch das Individuum, da es hinreichend gut definiert ist und gesicherte Methoden zur Beurteilung der Schadwirkung vorliegen (Rudolph & Boje, 1986). Die Erkenntnisse, die an einem Individuum gewonnen wurden, lassen sich jedoch nur bedingt auf andere übertragen. Als Untersuchungsparameter werden die

Grundfunktionen des Lebens und des Stoffwechsels, Wachstum, Bewegung, Vermehrung, Vererbung und die Stoff- und Energieflüsse untersucht. Für die toxikologische Bewertung von Stoffen gibt es bereits eine Reihe gesetzlich vorgeschriebener Einzelspezies-tests, die jedoch den Anforderungen der Ökotoxikologie nicht im vollen Maß gerecht werden können, da sie hoch standardisiert sind und mit Monospezies durchgeführt werden. Bisher gibt es noch keine gesetzlich determinierten Freilandtests, die Veränderungen von ökosystemaren Struktur- und Funktionsparametern anzeigen (Ketrupp et al., 1991).

Freiland-Paralleluntersuchungen gehören zu den Perspektiven der Ökotoxikologie, um eine Abschätzung des ökotoxikologischen Risikos vornehmen zu können. Eine Verbindung zwischen Freiland- und Einzelspezies-test sind Modellökosysteme, die die Möglichkeit bieten, Lebensgemeinschaften mit realistischen Chemikalienkonzentrationen zu untersuchen. So können unter definierten Expositionsbedingungen Wirkungen auf Populationen erforscht werden und bei längerfristigen Studien Spätfolgen und Erholungspotential sowie Wirkungsschwellen und Langzeitverhalten von Stoffen ermittelt werden (Greim & Demel, 1996).

Eine weitere wichtige Aufgabe der ökotoxikologischen Forschung ist es, geeignete Biomarker zu finden, die im Sinne des Effektmonitorings sowohl die Akkumulation, als auch die Wirkung der Schadstoffe berücksichtigen und mit denen eine Bewertung subletaler und längerfristiger Toxizität, wie sie in der Umwelt vorkommt, möglich ist. Biomarker sind physiologisch-biochemische Veränderungen, die als Reaktion auf eine Kontamination im Gesamtorganismus untersucht werden (Greim & Demel, 1996). Neben biochemischen Parametern, wie Stressproteinen, metallbindenden Peptiden und Enzymaktivitäten können auch anatomische und zytologische Veränderungen herangezogen werden. Der derzeitige Einsatz von Biomarkern ist jedoch begrenzt. Gründe dafür sind zum einen fehlende Referenzwerte und fehlende Kenntnisse aus der Grundlagen- und angewandten Forschung und zum anderen die hohe Erwartung, dass durch Biomarker unmittelbar Schadstoffquellen nachweisbar sind (Sordyl, 2001).

Stabile Isotope können dabei einen integrierten Belastungsindikator in der biologischen Wirkungsforschung darstellen. Im Gegensatz zu radioaktiven Isotopen zerfallen diese nicht unter Strahlenfreisetzung und sind somit aus dieser Sicht für die Gesundheit unbedenklich. Aus diesem Grunde finden sie in medizinischen und biochemischen Untersuchungen eine breite Anwendung. Die meist verwendeten schweren Isotope sind neben dem Deuterium  $^2\text{H}$  das Stickstoffisotop  $^{15}\text{N}$  und das Kohlenstoffisotop  $^{13}\text{C}$ . Für biologische Wirkstudien ist das Stickstoffisotop von besonderem Interesse, da mit ihm speziell der Stickstoffmetabolismus als sensitiver biochemischer Parameter untersucht werden kann. Damit können zum einen  $^{15}\text{N}$ -Tracerstudien durchgeführt werden, die sich auf der Ebene der Aufnahme und des Einbaus von Pflanzennährstoffen in Aminosäuren und Proteine (Ter Steege et al., 1999) oder des Einflusses von Schadstoffen auf den N-Metabolismus (Rundel et al., 1989; Jung et al., 1994; Möcker et al., 1996; Jung et al., 1999; Hafner et al., 2000) befinden. Zum anderen können natürliche Isotopenverhältnisse für Biosynthesestudien genutzt werden, bei denen Isotopieffekte zu Grunde liegen (Jung et al., 1997; Hofmann et al., 1997; Schmidt & Kexel, 1998; Schulz et al., 2000; Jung et al., 2002). Der Proteinturnover und der Aminosäurestoffwechsel sind allgemeine Bioindikationsmerkmale, die besonders frühzeitig die Erkennung einer Schädigung ermöglichen (Schubert, 1991). Das  $^{15}\text{N}$ -Isotop stellt dabei einen sensitiven Marker zur Untersuchung des Stickstoffmetabolismus dar.

Die biochemisch-physiologischen Untersuchungen, die neben dem Protein- und Aminosäurestoffwechsel auch Biomembranen, Photosynthese, Pigmente, Energiestatus, Enzymaktivitäten, Phytohormone, Mineralstoffwechsel und andere Zellbestandteile und -vorgänge betrachten, beschreiben eine Stufe der Bioindikation, die empfindlich auf Störungen reagiert und zu den „unsichtbaren Schäden“ gehört (Schubert, 1991). Weitere Bioindikationsstufen sind morphologische, biorhythmische und verhaltensbiologische Abweichungen von Organismen, populationsdynamische Änderungen und Störungen von Lebensgemeinschaften.

## 1.5 Biologische Testsysteme

Mit fortschreitender Entwicklung der chemischen Analytik zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Stoffen bzw. Xenobiotika wird ein immer tieferer Einblick in das komplexe Gefüge der Exposition und Bioakkumulation dieser Substanzen auf biologische Systeme ermöglicht. Eine Aussage über die biologische Wirkung kann sie jedoch nur indirekt treffen. Für die Untersuchung des Wirkungsgeschehens einzelner Stoffe und Stoffgemische werden biologische Testverfahren herangezogen. Bereits in den 70er Jahren wurde begonnen, Testverfahren zur Beurteilung der Wirkungen chemischer Produkte auf Mensch und Tier zu entwickeln, die besonders wichtig für die Zulassung von Chemikalien, Pflanzenschutzmitteln, der Kontrolle von Abwassereinleitungen, Überwachung von Emittenten und von Immissionen sind (Rudolph, 1992). Dabei wurden eine Reihe von Tests etabliert, die sich von der Zelle bis zum Organismus erstrecken und Testspezies unterschiedlicher Trophieebenen, verschiedene Wirkungsparameter oder Endpunkte beinhalten. Die Weiterentwicklung solcher Testsysteme hat das Ziel, umfassende Aussagen über Schadwirkungen anthropogener Stoffe auf die belebte Umwelt treffen zu können. Es stehen nunmehr ca. 80 - 100 gesetzlich vorgeschriebene bzw. zugelassene Testverfahren zur Verfügung. Darüber hinaus wurden eine Vielzahl anderer sensitiver standardisierter Biotests entwickelt, um ein möglichst umfassendes Bild über die biologische Wirksamkeit von Stoffen zu erfassen (Fent, 1998).

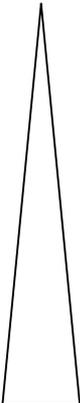
An die Etablierung von Biotestverfahren werden eine Reihe von Anforderungen gestellt, die sich auf die Reproduzierbarkeit, Standardisierung, biologische Interpretierbarkeit, Versuchsdauer, Automatisierbarkeit und Kosten beziehen (Rudolph, 1992). Diese Anforderungen sind je nach Verwendungszweck verschieden und müssen nicht alle in einem Test vereint sein.

Für die Dokumentation der Ergebnisse gibt es eine Reihe von Kenngrößen, bei denen untere Wirkungsschwellenwerte, wie NOEC (No Observed Effect Concentration), LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) und der  $EC_0$  (Effect Concentration) angegeben werden. Der NOEC-Wert ist die höchst geprüfte Konzentration, bei der kein Effekt auftrat. Eine häufig angegebene toxikologische Kenngröße ist der  $EC_{50}$ -Wert, der die Konzentration darstellt, bei der 50 % des Effektes eintritt (Nusch, 1989). Ist dieser Effekt eine Inhibierung bestimmter Parameter, kann auch von einem  $IC_{50}$ -Wert (Inhibition Concentration) gesprochen werden.

Die am weitesten entwickelten Toxizitätstests beziehen sich auf aquatische Ökosysteme, bei denen Organismen wie Bakterien, Grünalgen, Wasserpflanzen, Krebse, Würmer, Insekten und Fische als Testorganismen herangezogen werden. Testsysteme mit Zelllinien, wie z. B. Fischzelllinien,

ermöglichen ein schnelles Screeningtestverfahren zur Bestimmung akuter Toxizitäten. Die Etablierung solcher *in vitro* Testsysteme ist auch im Sinne des Tierschutzes wichtig (Fendt, 1998).

Bezüglich der Toxizitätstests für terrestrische Ökosysteme gibt es, verglichen mit aquatischen Systemen, bislang nur wenige Methoden, weil der Boden als Medium hoch komplex und die Bioverfügbarkeit der Stoffe inhomogen ist. Häufig verwendete terrestrische Testverfahren sind mikrobielle Tests, Untersuchungen mit höheren Pflanzen, die sich fast ausschließlich auf Samenkeimung und Wurzelwachstum beschränken, sowie Untersuchungen an Regenwürmern und Vögeln. Bei den tierischen Organismen wird hauptsächlich die Mortalität bestimmt (Fent, 1998). In Abb. 1 sind die Wirkebenen der Substanzen hinsichtlich ihrer biologischen Wirksamkeit, Empfindlichkeit und der ökologischen Relevanz abgebildet. Labortests liefern wichtige Ergebnisse für die ökotoxikologische Bewertung, sollten jedoch auf ihre ökologische Relevanz in langangelegten Feldversuchen geprüft werden.

Wirkebene	Wirkung/Aussage	Empfindlichkeit	Ökologische Relevanz
<b>Molekül</b>	Erbgutveränderungen, Enzymhemmung, Antikörperreaktion	hoch	niedrig
<b>Zelle</b>	Biologischer Abbau, Mutagenität, Vermehrungshemmung / Tod		
<b>Organismus</b>	Metabolisierung, Mutagenität, Vermehrungshemmung, Wachstumshemmung, Tod		
<b>Biotop</b>	Bioverfügbarkeit: biologische, chemische, physikalische Elimination Hemmung der Biomasseproduktion, Veränderungen des Artenspektrums, Verlust der biologischen Funktion		

**Abb. 1** Spektrum biologischer Testverfahren (Kanne, 1991)

Ein Aspekt, der bei Biotestverfahren eine Rolle spielt, ist die Beurteilung von Umweltproben, z. B. Wasser-, Boden- und Sedimentproben. Dies kommt vor allem bei Kontaminationsproblemen zum Tragen.

Die an Biotests gestellten Anforderungen bringen jedoch den Nachteil mit sich, dass diese Testsysteme weit entfernt von natürlichen Bedingungen sind. So werden klimatische Bedingungen, Nährstoffvorkommen und andere Lebensbedingungen im Labor optimiert und so standardisiert, wie sie in der Natur nur selten vorkommen. Außerdem werden meist nur Monospezies untersucht, die die Lebensgemeinschaften nicht repräsentieren können (Dorgerloh, 1997). Toxizitätstests können somit nur begrenzte Aussagen hinsichtlich einer möglichen Gefährdung für die Vegetation, Mensch und Tier treffen.

## 2 Kenntnisstand

### 2.1 Trichloressigsäure in der Umwelt

#### 2.1.1 Physikochemische Eigenschaften

Die Substitution der drei Wasserstoffatome an der Methyl-Gruppe der Essigsäure macht TCA zu einer starken Säure mit einem pKa-Wert von 0,67. In der natürlichen Umgebung liegt sie als Anion vor, was eine sehr gute Wasserlöslichkeit zur Folge hat. Klein (1997) berechnete, dass TCA in den Wolken zu 99 % in der Wasserphase vorliegt. Bei geringen Wassergehalten hängt das Verteilungsverhältnis im atmosphärischen Aerosol stark von der Temperatur und dem pH-Wert der Partikel ab. Wegen der hohen Wasserlöslichkeit ist die Bodenadsorption von TCA gering. Aus diesem Grunde kann sie in tiefere Bodenschichten und ins Grundwasser gelangen. In der Tab. 1 sind die wichtigsten Stoffeigenschaften aufgelistet.

**Tab. 1** Physikalisch-chemische Eigenschaften von TCA

Parameter	Wert	Literatur
Molekulargewicht	163,39 mol/l	Hoechst AG (1994)
Schmelzpunkt	56 °C	Hoechst AG (1994)
Siedepunkt	197 °C	Hoechst AG (1994)
Wasserlöslichkeit (20 °C)	1300 g/l	Hoechst AG (1994)
Henry-Konstante (20 °C)	$\ln(K'_H) 11,21 \pm 0,5$	Bowden et al. (1998)
pKa-Wert (20 °C)	0,67	Hoechst AG (1994)
log K <sub>OW</sub>	-0,27 – 1,65	BUA (1996)

#### 2.1.2 Anwendung von TCA

Trichloressigsäure wird in der Medizin in 50 %iger Lösung als Ätzmittel und zu Schälkuren verwendet sowie als Adstringens und Antiseptikum eingesetzt. Sie besitzt eine stark eiweißfällende Wirkung, die für die Herstellung eiweißfreier Lösungen aus biologischem Material genutzt wird (BUA, 1996). Auch in der Industrie findet sie Anwendung als Ätz- und Beizmittel.

Das Hauptanwendungsgebiet liegt jedoch in der Verwendung als Herbizid in der Landwirtschaft. 1944 wurde TCA in Form des Ammoniumsalzes und 1947 in Form des Natriumsalzes zur Bekämpfung verschiedener Grasarten eingeführt (Foy, 1975). Dieses Herbizid wirkt vorwiegend gegen monokotyle Gräser, bleibt jedoch wirkungslos gegen dikotyle Unkräuter. TCA wurde verstärkt in den letzten Jahrzehnten eingesetzt, wobei sie hauptsächlich auf ein- und mehrjährige

Gräser, speziell gegen Quecken angewendet wurde (Wegeler, 1970). So wurden weltweit 21 000 - 23 000 Tonnen Na-TCA pro Jahr als Herbizid ausgebracht. In Deutschland ist die TCA als Herbizid seit 1992 nicht mehr zugelassen, wird aber für den Export weiterhin produziert (BUA, 1996).

### 2.1.3 Vorkommen in der Umwelt

Trichloressigsäure kommt ubiquitär, aber in unterschiedlichen Konzentrationen, in allen Umweltkompartimenten vor. Die TCA-Gehalte variieren abhängig vom Standort und unterliegen jahreszeitlichen Schwankungen. In der Luft wurden Konzentrationen von 0,32 bis 2,6 ng/m<sup>3</sup> in einem Waldgebiet (Frank et al., 1994) und 0,03 bis 0,16 ng/m<sup>3</sup> in Tübingen (Frank et al., 1995) gemessen. Im Boden wurden zwischen 0,3 und 400 µg TCA/kg ermittelt (Frank, 1988; Plümacher, 1994). Es gibt einige Hinweise darauf, dass der Boden unter Koniferenbäumen stärker belastet ist (McCulloch, 2002). Viele Konzentrationsstudien erfolgten mit wässrigen Umweltproben. Im Niederschlag wurden in Deutschland Konzentrationen zwischen 10 ng/l und 2,1 µg/l gemessen. In Oberflächengewässern, also in Flüssen, Teichen und im Sumpfwasser, lagen die Konzentrationen im Bereich von 0,3 bis 5,5 µg/l (Plümacher & Renner, 1993; Frank et al., 1995; Müller et al., 1996; Klein, 1997; Römpf et al., 2001; Mc Culloch, 2002). Plümacher & Renner (1993) sowie Riemann et al. (1996) beobachteten, dass in Städten besonders im Sommer höhere Konzentrationen als in ländlichen Gebieten auftreten. Niedriger chlorierte Essigsäuren liegen im Vergleich zu TCA in ihrer Konzentration etwas höher. Bei einem Vergleich der Jahresdurchschnittswerte von MCA, DCA und TCA von 1993, 1994 und 1995 konnte ein leichter Rückgang, besonders bei MCA, festgestellt werden (Riemann et al., 1996).

In den letzten 10 Jahren wurden intensive Untersuchungen des TCA-Gehaltes in Pflanzen, besonders in Nadeln von Kiefern und Fichten, durchgeführt. In allen Proben konnten Konzentrationen zwischen 10 und 180 µg/kg Frischgewicht (FG) nachgewiesen werden (Frank, 1988; Frank et al., 1990, 1998; Juuti et al., 1995; Weissflog et al., 1999, 2001). Dabei gibt es große Unterschiede zwischen Nadelalter, Pflanzenart, Standort der Bäume und meteorologischen Bedingungen. Auch der Jahreszeitpunkt der Untersuchungen spielt eine entscheidende Rolle. In Akkumulationsstudien mit Freilandproben wurde ermittelt, dass mit steigendem Nadelalter die TCA-Konzentration zunimmt (Plümacher & Renner, 1993; Juuti et al., 1993, Frank et al. 1998).

Juuti et al. (1993) untersuchten die TCA-Konzentrationen des ersten und dritten Nadeljahrganges bei Fichten in einem Gebiet um eine Papierfabrik im östlichen Teil von Finnland. In ihren Studien fanden sie, dass in dem Gebiet nahe der Papierfabrik geringere Konzentrationen als in größerer Entfernung auftraten, wohingegen zwischen städtischen und ländlichen Gebieten keine Unterschiede beobachtet wurden. Sie vermuteten, dass die von der industriellen Quelle emittierten Substanzen die atmosphärische Bildung von TCA verhindern. In einer späteren Studie wurden gegenteilige Ergebnisse erzielt. Je näher der Messpunkt an der Papierfabrik lag, desto höhere TCA-Konzentrationen wurden gemessen. Diese Messwerte wurden mit der höheren Emission von flüchtigen Chlorkohlenwasserstoffen, den Ausgangssubstanzen zur Bildung von TCA in der Luft, begründet (Juuti et al., 1995). Es konnte letztendlich keine nachvollziehbare Abhängigkeit der TCA-Konzentrationen in Nadeln mit der Lage zur industriellen Quelle herausgefunden werden.

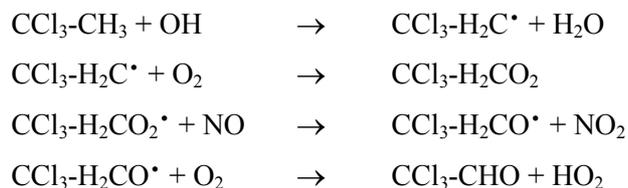
Auch im tierischen Gewebe konnte TCA nachgewiesen werden. In einem Feldversuch wurden im Juni und Oktober 1989 im Schwarzwald Regenwürmer (*Lumbricus terrestris*) zur Ermittlung des Gehaltes an flüchtigen Chlorkohlenwasserstoffen untersucht. Der Gehalt von TCA lag bei beiden Sammelzeitpunkten in vergleichbarer Höhe von 200 - 300 ng/g FG. Im Gegensatz dazu lagen die Messwerte bei Trichlorethen im Frühsommer deutlich höher als im Herbst (Back & Süsser, 1992).

### 2.1.4 Industrielle Quellen, atmogene und biogene Bildung von TCA

Eine wichtige industrielle Quelle von TCA ist die Zellstoffbehandlung mit Chlor und Chlordioxid, wobei bei der Oxidation von Lignin größere Mengen TCA entstehen können (Lindström & Österberg, 1986). So konnten in Abwässern von Papierfabriken TCA-Konzentrationen bis zu 300 µg/l gemessen werden (Riemann et al., 1996). Auch das Abwasser von Galvanisierungsbetrieben und Textilwäschereien ist vergleichbar hoch belastet (Müller et al., 1996). Des weiteren entsteht TCA bei der Chlorierung von Wasser und bei der Müllverbrennung. Die Abluft einer Müllverbrennungsanlage wies Konzentrationen von 400 bis 7800 ng/m<sup>3</sup> auf, eine nachgeschaltete Rauchgaswäsche verhindert jedoch größere Emissionen in die Umwelt (Klein, 1997).

Die bisher genannten Quellen können jedoch nur einen geringen Teil der in der Umwelt vorkommenden TCA-Konzentrationen erklären. Als zusätzliche Quelle wurde von Frank (1988, 1991) und Frank et al. (1990, 1994) die atmosphärische Photooxidation von Trichlorethen (TRI), Tetrachlorethylen (TECE) und 1,1,1-Trichlorethan (TCE) in Betracht gezogen. Diese Vorläufer-substanzen sind seit Jahrzehnten wichtige Lösungsmittel und werden z. B. zum Entfetten von Metallteilen oder in der chemischen Reinigung eingesetzt. Da diese Substanzen leicht flüchtig sind, entweicht ein Großteil der Verbindungen nach dem Einsatz in die Atmosphäre. Aufgrund der längeren Lebensdauer (TRI τ = 5 Jahre; TECE τ = 5 Monate; TCE τ = 5 - 7 Tage) und des atmosphärischen Ferntransportes kommen sie ubiquitär in der Luft vor. Aus ihnen kann sich dann durch einen photochemischen Reaktionsprozess die Trichloressigsäure bilden. Die Konzentration solcher Chlorkohlenwasserstoffe in der Luft in Zentraleuropa liegt in Größenordnungen zwischen 0,1 und 20 µg/m<sup>3</sup> (Frank, 1991). Dieser atmosphärische Bildungsprozess von Trichloressigsäure könnte auch die gemessenen TCA-Konzentrationen im Eis der Antarktis, die bei 1 - 13 ng/l liegen, erklären (Hoekstra et al., 1999).

Der atmosphärische Abbau von 1,1,1-Trichlorethan zu Trichloracetaldehyd wurde experimentell nachgewiesen. Die Bildung ist in folgender Gleichung dargestellt (Platz et al., 1995).



Das gebildete Trichloracetaldehyd unterliegt in der Atmosphäre Abbaureaktionen, die unter anderem auch zu Trichloressigsäure führen können. Über eine Mengenausgleich werden bisher in der Literatur noch keine gesicherten Aussagen getroffen (Klein, 1997). Die Bildung von Trichloressigsäurechlorid aus TECE mit Chlorradikalen ist bereits seit 1941 bekannt, wobei die Bildung in der Atmosphäre stark von der Konzentration der Cl-Radikale und der Anwesenheit radikalangender

Verbindungen abhängt. Ebenso spielen die Temperatur und die Ausgangskonzentrationen der beteiligten Reaktionssubstanzen eine entscheidende Rolle (Folbert und Putz, 1999).

Auch im tierischen und menschlichen Organismus kann TCA aus den leicht flüchtigen chlorierten Kohlenwasserstoffen (VCH), wie zum Beispiel Trichlorethen und Tetrachlorethen, gebildet werden (Völkel et al., 1998; Bernauer et al., 1996). Die gebildete Trichloressigsäure wird über die Niere ausgeschieden (Handbuch der Umweltgifte, 1997). Die prinzipielle Bildung von TCA aus Trichlorethen bei Invertebraten wird auch von Back & Süsser (1992) vermutet. Ihre Studien mit *Lumbricus terrestris* erbrachten eine signifikante Zunahme von TCA und gleichzeitige Abnahme von Trichlorethen. Sie schlussfolgerten daraus, dass Trichlorethen im Regenwurm zur Trichloressigsäure metabolisiert wurde und dass die Persistenz von TCA im Organismus wesentlich größer ist als die anderer VCH.

Auch ein enzymatischer Bildungsweg von TCA wird in der Literatur diskutiert. Hoekstra et al. (1995) zeigten die Bildung von DCA und TCA in NaCl-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösungen, die Huminstoffe und das aus *Caldariomyces fumago* isolierte Chloroperoxidaseenzym enthielten. Haiber et al. (1996) gab zu der NaCl- / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung auch das Chloroperoxidaseenzym und verschiedene kurzkettige Carbonsäuren und konnte ebenfalls einen Anstieg der TCA-Konzentration beobachten, die besonders stark bei Essigsäure war. Jedoch ist die Bildungsrate sehr gering und läuft auch ohne das Enzym in geringem Maße ab. Die gemessenen TCA-Konzentrationen in den Umweltproben lassen sich aus dieser Reaktion nicht erklären.

In der jüngsten Vergangenheit wurden Versuche unternommen, eine Massenbilanz zwischen Entstehung von TCA und Eintrag in die verschiedenen Bereiche der Geo- und Biosphäre zu errechnen (Hoekstra et al., 1999). Diese Berechnungen führen aber nicht zur Übereinstimmung mit den tatsächlich gemessenen Konzentrationen. Die gemessenen Werte stellen immer das Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Abbau, beziehungsweise Abgabe und Ausscheidung des Stoffes dar. Die Abbaurate von TCA im Boden liegt zwischen 20-70 % und ist von vielen Parametern abhängig, z. B. von der Bodenart und der Anzahl der TCA-metabolisierenden Bakterien (Lignell et al., 1984). Da Bildung, Verteilung, Aufnahme und Metabolismus von TCA in der Umwelt von vielen verschiedenen Faktoren abhängig ist, kann eine Massenbilanz nur unvollständig sein. Trotz Einbeziehung möglicher Fehlerquellen sind Hoekstra et al. (1999) zu dem Resultat gekommen, dass die Bildung von TCA in der Luft nicht ausreicht, um die gemessenen Konzentrationen zu erklären. Demzufolge wird angenommen, dass auch eine biogene Bildung im Boden und in Pflanzen beteiligt ist. Wie auch immer das Verhältnis der TCA-Entstehung in der Atmosphäre, dem Boden und in Pflanzen und Tieren ist, so steht fest, dass TCA sekundär aus Vorläufersubstanzen gebildet wird. Dieser Prozess hält solange an, wie diese Substanzen in der Umwelt präsent sind. Somit schwanken zwar die TCA-Konzentrationen jahreszeitlich und geographisch, dennoch ist die Belastung permanent.

### **2.1.5 Aufnahme und Akkumulation im pflanzlichen Gewebe**

Wie im Kap. 2.1.1 beschrieben, reichert sich die TCA in der Atmosphäre in der Tröpfchenphase an und verflüchtigt sich, bedingt durch den niedrigen Dampfdruck, aus Wasser kaum (Renner et al.; 1990). Dadurch kann die in der Atmosphäre gebildete TCA mit dem Niederschlag in den Boden

gelangen. In der Literatur werden zwei Aufnahmewege von TCA in die Pflanze beschrieben (Plümacher & Schröder 1994; Schroll et al., 1994; Sutinen et al., 1995, Matucha et al., 2001; Hafner et al., 2002a). Der Hauptaufnahmeweg ist die Aufnahme über die Wurzel. Dieser Aufnahmeweg wurde in Fichten (Matucha et al.; 2000, 2001), in Kiefern (Sutinen et al., 1995; Hafner et al., 2002a) und in Gerste und Hafer (Schroll et al., 1995) nachgewiesen. In Untersuchungen wurde eine höhere Anreicherung in der Hauptwachstumsphase, eine erhöhte TCA-Akkumulation im Korkkambium und in den Nadelspitzen sowie eine höhere Konzentration in den Leitbündeln festgestellt (Ulhirova et al., 1996). Dies weist auf eine enge Verbindung der TCA-Aufnahme mit dem Transpirationsstrom hin. Der andere Weg ist die direkte Aufnahme aus der Luft in die Blätter (Frank 1991; Sutinen et al., 1995; Schroll et al., 1995). Bei diesem Weg gibt es zwei Möglichkeiten, zum einen mit dem Gasaustausch über die Stomata und zum anderen über die Kutikula. Wegen der lipophilen Eigenschaften der Blattoberfläche kann die TCA nur schwer über die Kutikula aufgenommen werden. Sutinen et al. (1995) vermuten, dass sich auf der Nadeloberfläche ein dünner Wasserfilm mit der TCA bildet und dass dann ein Ionentransport entlang des Konzentrationsgradienten die TCA über die Flüssigphase in die substomatale Höhle stattfindet. Frank (1991) vermutet, dass es wahrscheinlicher ist, dass die Vorläufersubstanzen von TCA wie Tri- und Tetrachlorethen über die Blätter aufgenommen werden. Nachfolgend könnte TCA durch Oxidationsreaktionen im Blattgewebe gebildet werden. Die Akkumulationsrate in verschiedenen Nadeljahrgängen ist unterschiedlich. Sutinen et al. (1995) ermittelten nach einer 9-wöchigen TCA-Belastung in einjährigen Kiefernadeln höhere Anreicherungen als im aktuellen Nadeljahrgang. Dieses wurde sowohl bei Wurzelapplikation, als auch bei atmosphärischer Belastung festgestellt. In späteren Studien (Sutinen et al., 1997) und in Freilanduntersuchungen (Frank et al., 1994) konnte dies bestätigt werden. Matucha et al. (2000) konnten diese Relation in Langzeitstudien mit Fichtenbäumen ebenfalls erkennen, jedoch beobachteten sie bei einer 14-tägigen Belastung höhere TCA-Konzentrationen im aktuellen Nadeljahrgang. Im Gegensatz dazu fanden Hafner et al. (2002a) in Kiefernpflanzen nach 15 Tagen TCA-Applikation über die Wurzel höhere TCA-Akkumulationen im einjährigen Nadeljahrgang gegenüber dem aktuellen Nadeljahrgang. Bei der TCA-Akkumulation in unterschiedlichen Nadeljahrgängen spielen sowohl die Pflanzenart, als auch der Belastungszeitraum eine wichtige Rolle.

### 2.1.6 Phytotoxisches Wirkungsspektrum

Die phytotoxische Wirkung von TCA ist durch deren Einsatz als Herbizid bekannt. In älteren Untersuchungen wurden bei hohen Konzentrationen Schadsymptome, wie Wachstumsinhibierung an Sproß und Wurzel (Zöttel, 1953; Mayer, 1957; Ashton & Crafts, 1987), Chlorosen und Nekrosen, morphologische Veränderungen (Kolbe & Schütte, 1982) und Kontaktschäden (Ashton & Crafts, 1987) beobachtet. Unter physiologischen Bedingungen kann eine protein- und enzymdenaturierende Wirkung infolge der Reaktivität gegenüber Sulfhydryl- und Aminogruppen angenommen werden. Die daraus resultierenden biochemischen und physiologischen Veränderungen ergeben zusammengefasst die Wirkung von TCA im Organismus. Eine spezifische Wirkung auf bestimmte Pflanzenarten konnte nicht festgestellt werden. TCA wird der Gruppe der Lipidbiosynthese-Hemmstoff-Herbizide zugeordnet, deren wichtigste Eigenschaft die Inhibierung der Lipidbiosynthese auf unterschiedlichen Ebenen ist (Hock, 1995). Bei dieser Herbizidgruppe, zu

denen auch die Thiocarbamate zählen, wird vor allem die Synthese der längerkettigen Fettsäuren gehemmt, und es kommt bei empfindlichen Gräsern zu einer Verminderung der Wachsausscheidung. Der Verlust der Schutzschicht, eine erhöhte Transpiration und ein starker Wasserbedarf ist die Folge (Youngman & Elstner, 1988). Durch ältere Untersuchungen mit phytotoxischen TCA-Konzentrationen kann eine Inhibierung der Coenzym-A-Synthese vermutet werden (Hilton, 1959). Da das Coenzym A eine Schlüsselsubstanz im Fettstoffwechsel ist, führt ein Mangel zur verminderten Synthese von Lipiden. Nicht nur im Lipidstoffwechsel, sondern auch im Kohlenhydrat- und Stickstoffmetabolismus wurden Veränderungen durch die TCA-Belastung festgestellt. So wurde eine Erhöhung reduzierter Zucker (Rebstock et al., 1953), Proteinzerstörung und Ammoniumakkumulation, sowie eine Erhöhung der Konzentration der Aminosäuren Glutamin und Asparagin beobachtet. Auf enzymatischer Ebene kommt es zur Verringerung der Proteinaseaktivität (Ashton & Crafts, 1987).

Infolge des Verdachtes einer maßgeblichen Beteiligung der Trichloressigsäure an „neuartigen Waldschäden“ wurden weitere Untersuchungen hinsichtlich der phytotoxischen Wirkung durchgeführt. Dabei wurden besonders Veränderungen der Blätter beobachtet. Kristen et al. (1992) stellten nach TCA-Belastung bei Fichten gelbe Nadelspitzen, Nadelkrümmung und eine Reduktion des Thylakoidsystems bei einer gleichzeitigen starken Anhäufung von Plastoglobuli fest. Eine Reduktion der Chloroplastengröße und Auftreten von Plasmolysen wurde von Sutinen et al. (1995) ermittelt. Ebenso wurde bei TCA-belasteten Pflanzen ein erhöhter Nadel- bzw. Blattverlust (Norokorpi & Frank, 1993; Frank, 1994), sowie strukturelle Veränderungen der Epikutikularwachse und der Stomatazellen beobachtet (Kristen et al., 1992; McCulloch, 2002). Diese physiologischen Reaktionen hängen wiederum stark vom Allgemeinzustand der Pflanzen, sowie der Pflanzenart ab.

Neben den morphologischen und physiologischen Beobachtungen stand auch der Detoxifikations- und Stressmetabolismus der Pflanze im Vordergrund. In Freilandstudien konnte bei höheren TCA-Gehalten in den Nadeln von *Pinus sylvestris* auch eine erhöhte GST-Aktivität ermittelt werden (Plümacher & Schröder, 1994; Schröder et al. 2000). Eine erhöhte Aktivität der Katalase, Peroxidase, Glutathionreduktase und Superoxiddismutase durch TCA-Belastung wurde auch bei anderen terrestrischen Pflanzen gemessen (Radetski et al., 2000). Anhand dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass die Trichloressigsäure den Metabolismus der Detoxifikation über Glutathion und den oxidativen Metabolismus anregt.

### 2.1.7 Transformation und Abbau

Trichloressigsäure wird aerob im Boden von Bakterien (*Pseudomonas sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Pseudomonas dehalogens*), Pilzen (*Trichoderma viride*, *Chlorostachys sp.*, *Acrostalagum sp.*) und Actinomyceten (*Nocardia sp.*) abgebaut (BUA, 1996; Yu & Welander, 1995; Forczek et al., 2001). Auch unter anaeroben Bedingungen kann TCA metabolisiert werden. Das dabei isolierte Bakterium *Trichlorobacter thiogenes*, so wird vermutet, koppelt die TCA-Umwandlung mit einem Schwefel/Sulfid Redoxzyklus (De Wever et al., 2000). Die Abbaurate ist unterschiedlich und hängt von der TCA-Konzentration, Bodenart, Feuchtegehalt, Temperatur und organischer Substanz ab (BUA, 1996; McCulloch, 2002; Matucha et al., 2003). Im Laborversuch konnte nach 14 Tagen, je nach TCA-Konzentration, eine Mineralisierungsrate durch *Arthrobacter sp.* von 20 bis 65 % ermittelt werden (Gemmell & Jensen, 1964). Ein vollständiger Abbau kann jedoch mehrere Monate

dauern. Als Abbaumechanismus wird ein hydrolytischer Dechlorierungsprozess durch das Enzym Dehalogenase angenommen. Die aus der vollständigen Dechlorierung resultierende Oxalsäure dient dabei als Energiequelle (BUA, 1996). Ein weiterer in der Literatur diskutierter Prozess ist die Decarboxylierung hauptsächlich zu Chloroform (Frank et al., 1990; Plümacher et al., 1993; Hasselmann et al., 2000). Auch im wässrigen Milieu wird TCA von Mikroorganismen enzymatisch umgesetzt; angenommen wird bei diesem Prozess wiederum eine enzymatische Dehalogenierung und Bildung von Glycolsäure, Glyoxylsäure und Oxalsäure (Ellis et al., 2001). Frank et al. (1991) konnten in ihren Untersuchungen über TCA-Gehalte in Fichtennadeln auch eine Eliminierung im pflanzlichen Gewebe mit einer Geschwindigkeitskonstante von 0,07/d beobachten. Eine TCA-Eliminierung in Kiefernnadeln wurde ebenfalls von Sutinen et al. (1997) beobachtet. Photochemisch und über Ultraschall kann TCA auch abgebaut werden, wobei die Kombination von UV-Strahlen und Ultraschall effektiver ist, als jede Komponente allein (Spangenberg et al., 1996; Wu et al., 2001). Dieser Prozeß ist abhängig vom pH-Wert, der Temperatur und geeigneten Oxidationsmitteln.

## **2.2 Endpunkte zur Wirkungsindikation**

### **2.2.1 Nitratassimilation und Stickstoffmetabolismus**

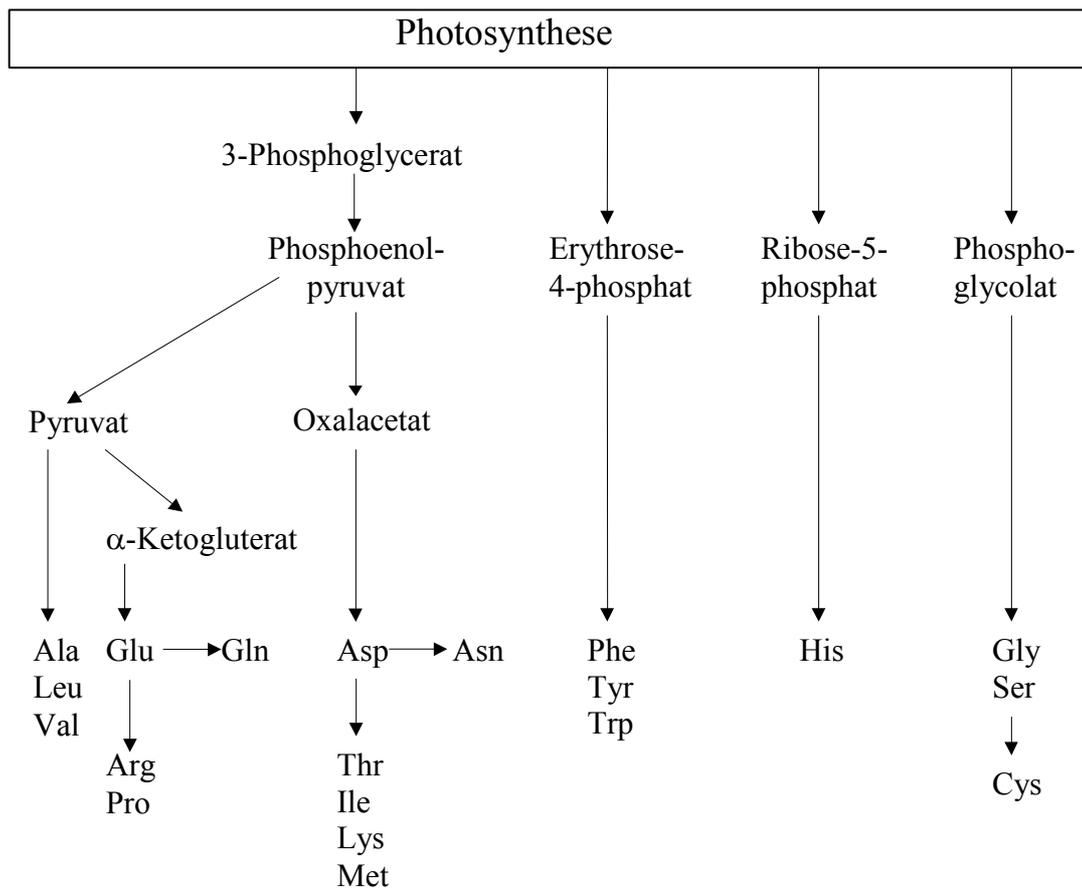
Stickstoff ist ein essentieller Bestandteil lebender Materie und kommt in Proteinen, Nukleinsäuren und vielen anderen Biomolekülen vor. Bei Pflanzen, die autotroph leben, wird der Stickstoffbedarf durch anorganischen Stickstoff gedeckt. Die meisten Pflanzen bevorzugen Nitrat als Stickstoffquelle, nur in ungenügend durchlüfteten oder versauerten Böden wird Ammonium aufgenommen. Der Stickstoff wird stets in reduzierter Form in organische Verbindungen eingebaut, daher muss das Nitrat vorher reduziert werden (Sitte et al., 1991).

Die Nitratassimilation ist sowohl in den Wurzeln, als auch in den Blättern der Pflanzen lokalisiert. Bei krautigen Pflanzen findet sie vorwiegend in den Blättern statt, bei Holzpflanzen ist sie hingegen hauptsächlich in der Wurzel konzentriert. In den Wurzeln befindet sich ein hochaffines, energieabhängiges Aufnahmesystem für Nitrat (Heldt, 1996). Der Transport von Nitrat durch die Plasmalemma erfolgt über einen Symport mit zwei Protonen und ist von der Aktivität der  $H^+$ -ATPase abhängig (Heldt, 1996; Forde, 2000). In den Wurzeln der Pflanzen existieren drei verschiedene  $NO_3^-$  Aufnahmesysteme. Zwei davon besitzen eine hohe Affinität zu Nitrat. Das induzierbare HATS (high-affinity transport system; iHATS) weist eine größere Kapazität gegenüber dem konstitutiven HATS (cHATS) auf. Das cHATS hat hingegen eine größere Affinität zu Nitrat. Das dritte Aufnahmesystem (LATS) besitzt eine geringe Affinität zu Nitrat, wird konstitutiv exprimiert und ist bedeutend bei externen Nitratkonzentrationen  $> 1mM$  (Sivasankar et al., 1997; Forde, 2000).

Die Regulation dieses Systems ist sehr komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Bisher wurden zwei Genfamilien der  $NO_3^-$  Transportergene in höheren Pflanzen identifiziert (Forde, 2000). Das in der Wurzelzelle im Cytosol vorliegende Nitrat wird entweder zu Ammonium reduziert und anschließend als Amid im Xylem in die Blätter transportiert oder gelangt unverändert

als Nitrat über den Transpirationsstrom in die Mesophyllzellen. Überschüssiges Nitrat kann in Vakuolen gespeichert und bei Bedarf wieder zur Verfügung gestellt werden. Die Reduktion von Nitrat zu Ammonium erfolgt in zwei Teilschritten. Zunächst wird das Nitrat mit Hilfe der Nitratreduktase (NR) zu Nitrit reduziert. Die Nitratreduktase besteht aus zwei identischen Untereinheiten, die je eine Elektronentransportkette besitzen. Diese Elektronentransportkette besteht aus FAD, Cytochrom- $b_{557}$  und einem Molybdän-Cofaktor, die jeweils kovalent am Apoenzym gebunden sind. Nitrit ist das Produkt der Nitratreduktase und zelltoxisch, da es Diazoverbindungen mit Nukleinsäuren eingehen und somit Mutationen hervorrufen kann. Deswegen ist es wichtig, dass die Aktivität der NR streng reguliert und der Nitritreduktase (NIR) Aktivität angepasst ist (Heldt, 1996; Hock et al., 1995). Die NR ist ein sehr kurzlebiges Enzym und wird auf der Ebene der Genexpression reguliert. Das Substrat  $\text{NO}_3$ , Licht und einige Kohlenhydrate induzieren die Synthese, während Glutamin und andere Aminosäuren hemmend wirken (Sivasankar et al., 1997; Heldt, 1996). Eine Inaktivierung innerhalb weniger Minuten erfolgt über eine Proteinphosphorylierung an regulatorischen Serinresten der Nitratreduktase in Anwesenheit eines speziellen Inhibitorproteins. Das Chlorat, welches ein funktionelles und kompetitives Analog zu Nitrat darstellt und als Herbizid eingesetzt wird, wird von der NR zu Chlorit umgesetzt, welches ein starkes Oxidationsmittel ist und die Nitratreduktase und andere Umgebungsenzyme hemmt (Hock, 1995; Heldt, 1996).

Nach der Umwandlung von Nitrat zu Nitrit wird das Nitrit in den Plastiden durch die Nitritreduktase zu Ammonium reduziert. Dazu ist die Aufnahme von sechs Elektronen nötig, die vom reduzierten Ferredoxin des PS I bereitgestellt werden. Im Dunkeln, wenn die Photosynthese nicht stattfindet, kann das Ferredoxin in geringem Umfang auch durch NADPH, welches durch den oxidativen Pentosephosphatweg geliefert wird, reduziert werden. Die Elektronen werden vom Ferredoxin über eine Elektronentransportkette, welche aus einem 4Fe-4S-Zentrum, einem FAD und einem Sirohäm besteht, auf das Nitrit übertragen. Das dabei entstehende Ammonium wird unter ATP-Verbrauch mit Hilfe der Glutamin-Synthetase auf Glutamat übertragen. Dabei entsteht Glutamin. Eine Hemmung dieses Teilschrittes der Nitratassimilation, z. B. durch das Totalherbizid Glufosinat, ist ein fundamentaler Eingriff in den Chloroplastenstoffwechsel und führt zu einer Ammoniumanreicherung, zur Verschiebung des Spektrums der löslichen Aminosäuren, zur Hemmung der Photosynthese und des Anionentransportes und zur Bildung von Chlorosen und Nekrosen (Hock, 1995; Heldt, 1996). Das gebildete Glutamin wird mit  $\alpha$ -Ketoglutarat zu zwei Molekülen Glutamat umgesetzt. Diese zwei Aminosäuren bilden die Primärprodukte der Nitratassimilation und werden aus den Chloroplasten über Transporter (Glutamat/Malat- bzw. Glutamin/Glutamat-Antiporter) in das Cytosol transportiert. Die  $\alpha$ -Aminogruppe des Glutamins kann durch Transaminierungsreaktionen zur Synthese von Aminosäuren, Aminoszuckern, Nucleotiden, NAD und anderen Moleküle übertragen werden (Stryer, 1996; Michal, 1999). Die Kohlenstoffgerüste der Aminosäuren stammen aus der  $\text{CO}_2$ -Assimilation (Heldt, 1996). Abb. 2 stellt einen Überblick über die Herkunft der Kohlenstoffgerüste dar.



**Abb. 2** Herkunft der Kohlenstoffgerüste für die einzelnen Aminosäuren (Heldt, 1996)

Die Aminosäuren sind Ausgangsprodukte für die Synthese von Peptiden und Proteinen, die wiederum zur Aufrechterhaltung wichtiger Prozesse in der Zelle benötigt werden. Eine Störung der Nitratassimilation und der Synthese von Aminosäuren kann weitreichende Folgen für die Zelle und den Organismus haben.

## 2.2.2 Photosynthetische Energieumwandlung und Chlorophyllfluoreszenz

Der Photosyntheseprozess ist von grundlegender Bedeutung für den pflanzlichen Stoffwechsel und wird im allgemeinen in vier Phasen unterteilt (Lodisch et al., 1996):

1. Lichtabsorption und Energieübertragung auf der Ebene der Antennenpigmente und anschließender Elektronenfluss auf den primären Akzeptor,
2. Elektronentransport über membrangebundene Elektronentransportmoleküle innerhalb der Thylakoidmembran auf einen letzten Elektronenakzeptor. Dieser ist in der Regel NADP<sup>+</sup> und wird dabei zu NADPH reduziert.
3. gekoppelter transmembraner Protonentransport und ATP-Synthese,
4. CO<sub>2</sub>-Assimilation und enzymatische Kohlenhydratsynthese aus CO<sub>2</sub>.

Die Prozesse der Teilschritte eins bis drei sind lichtabhängige Reaktionen und laufen in den Thylakoiden der Chloroplasten ab. Die vierte Ebene ist der lichtunabhängige Sekundärprozess und findet in dem Stroma der Chloroplasten statt.

Die Absorption des Lichtes erfolgt im Photosystem II; es ist in der Thylakoidmembran lokalisiert und liegt in direkter Nachbarschaft mit dem Lichtsammelkomplex. An zwei integralen Membranproteinen D1 und D2 ist das Chlorophyll-a-Molekül P<sub>680</sub> im Reaktionszentrum gebunden. Desweiteren enthalten D1 und D2 zwei weitere Chlorophyllmoleküle, zwei Pheophytine, ein Fe-Atom und zwei Chinone Q<sub>A</sub> und Q<sub>B</sub>. Auf der Lumen-Seite befinden sich drei periphere Proteine, die einen Mangankomplex, sowie Ca<sup>2+</sup> und Cl<sup>-</sup> Ionen, die zur Spaltung von H<sub>2</sub>O benötigt werden, enthalten. Durch die Absorption eines Photons wird dem Chlorophyllmolekül ein Elektron unter Bildung von P<sub>680</sub><sup>+</sup> entzogen und über das Pheophytin, Q<sub>A</sub> und das Fe-Atom auf einen primären Elektronenakzeptor, das Chinon Q<sub>B</sub>, übertragen. Sobald Q<sub>A</sub> reduziert ist, ist das Reaktionszentrum geschlossen, d. h. einfallende Energie wird nicht weitergeleitet, sondern als Wärme oder Fluoreszenz abgegeben. Hat Q<sub>A</sub> das Elektron an Q<sub>B</sub> abgegeben, dann steht es wieder zur Elektronenaufnahme zur Verfügung. Die bei dem Elektronentransport entstehende Elektronenlücke am P<sub>680</sub> wird durch Elektronen aus der Wasserspaltung am Mangankomplex wieder aufgefüllt. Als Nebenprodukt entstehen hier O<sub>2</sub> und Protonen, die zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials im Thylakoidlumen verbleiben. Mit dem Transport der Elektronen ist ein Protonentransport vom Stroma zum Lumen verbunden, der zur Aufrechterhaltung des pH-Gradienten beiträgt. Die Protonen können dann an einer anderen Stelle über den CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>-Komplex gerichtet wieder in das Stroma transportiert werden, wobei ATP aus ADP und Pi entsteht. Das im PS II entstandene reduzierte Chinon QH<sub>2</sub> löst sich von der Bindungsstelle im Reaktionszentrum von PS II, diffundiert zum Cytochrom b/f-Komplex und gibt zwei Elektronen ab. Von dem Cytochrom b/f-Komplex gelangen die Elektronen auf den Elektronencarrier Plastocyanin, der durch das Lumen der Thylakoide diffundiert und die Elektronen zum PS I auf P<sub>700</sub><sup>+</sup>, das nach der Absorption eines Photons im Lichtsammelkomplex aus P<sub>700</sub> entsteht, transportiert. Im PS I werden die Elektronen über FeS, Ferredoxin und FAD auf NADP<sup>+</sup> übertragen, und es entsteht NADPH.

Für Herbizide gibt es im Elektronentransportsystem drei verschiedene Wechselwirkungsmöglichkeiten (Draber et al., 1991).

*Plastochinon-Reduktion:* Durch Bindung des Herbizides in der Q<sub>B</sub>-Bindenische im D1-Protein ist der Elektronenfluss des Photosystems II unterbrochen (Jansen et al., 1993; Govindjee et al., 1997). Solche Herbizide müssen lipophil sein, um in die Membran eindringen zu können und gleichzeitig hydrophil sein, um im Xylem transportiert werden zu können (z.B. Metribuzin, Atrazin, Diuron).

*Plastohydrochinon-Oxidation:* Die Unterbrechung des Elektronenflusses erfolgt an der Stelle der Rückoxidation des reduzierten Plastohydrochinons am Cytochrom b/f-Komplex (z.B. Trifluoralin).

*Photosystem I-Elektronenübertragung:* Diese Herbizide werden durch das Photosystem I monovalent zur radikalischen Stufe reduziert, welche das Elektron wiederum auf Sauerstoff unter Bildung des Superoxid-Anions übertragen und somit einen oxidativen Stress in der Pflanze hervorrufen können (z. B. Diquat, Paraquat).

Die Chlorophyllfluoreszenz stellt ein nichtinvasives Diagnosesystem zur Untersuchung der Photosynthese dar (Lichtenthaler & Mische, 1997; Maxwell & Johnson, 2000). Die Indikatorfunktion der Chlorophyllfluoreszenz ergibt sich dadurch, dass die Fluoreszenzstrahlung alternativ zur photosynthetischen Energieumwandlung und Wärmestrahlung besteht und mit diesen in folgender Beziehung steht:

$$\text{Fluoreszenz} + \text{Photochemie} + \text{Wärme} = 1$$

Generell gilt: Die Fluoreszenz ist umso höher, je geringer die Photochemie und die Wärmestrahlung sind. Jede Änderung der Fluoreszenzstrahlung reflektiert eine Veränderung der photochemischen Effizienz. Die Änderungen der Chlorophyllfluoreszenz unter *in vivo* Bedingungen stammen ausschließlich vom Chlorophyll a, das im PSII lokalisiert ist. Deswegen können mit Hilfe der Chlorophyllfluoreszenz nur direkte Aussagen über die Energienutzung und Energiedissipation des PS II getroffen werden (Maxwell & Johnson, 2000).

Membranveränderungen oder Eingriffe in die Elektronentransportkette (z. B. durch Entkoppler) führen zur Veränderung der Fluoreszenzemission. Somit ist die Fluoreszenz ein Indikator für die Störung des Photosystems und kann zur Untersuchung toxischer Effekte auf das PS II eingesetzt werden (Schreiber, 1997; Brack & Frank, 1998; ).

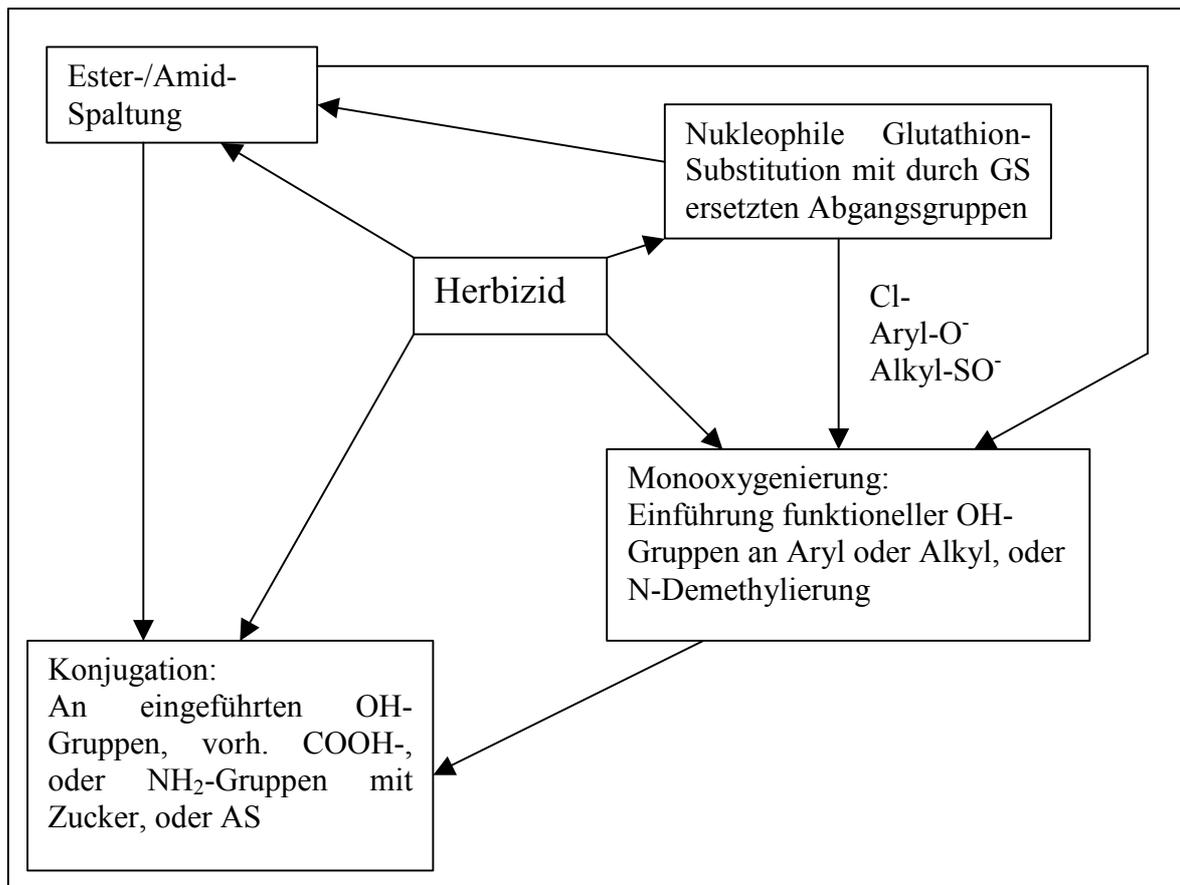
### **2.2.3 Die Rolle der Glutathion-S-Transferase im pflanzlichen Detoxifikationsmetabolismus**

Durch den ständigen Einfluss toxischer Substanzen haben alle Lebewesen Strategien entwickelt, um sich vor schädlichen Stoffen zu schützen. Für pflanzliche Organismen ist das besonders wichtig, da sie ortsgebunden und der potenziellen Schadstoffemission im vollen Umfang ausgesetzt sind. Es existieren eine Vielzahl schädlicher Verbindungen, die entweder auf natürliche Weise vorhanden (infolge von Waldbränden bzw. Vulkanismus, tierischen Gifte, Allelochemikalien) oder anthropogenen Ursprungs sind. Im Zuge der Industrialisierung werden eine Fülle von Chemikalien organischer Natur produziert und in die Umwelt emittiert. Zu diesen Substanzen gehören unter anderem Lösungsmittel, Kühlmittel, Treibstoffe, aber auch Pestizide und Herbizide, die von Pflanzen aufgenommen werden und auf den Stoffwechsel einwirken können. Der Detoxifikationsmechanismus von Xenobiotika im pflanzlichen Gewebe ist in der jüngeren Vergangenheit zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, da auf der einen Seite die Einwirkung toxischer

Substanzen zugenommen hat, auf der anderen Seite vermehrt Herbizidresistenzen beobachtet wurden.

Der Detoxifikationsstoffwechsel für Xenobiotika in Pflanzen wird zusammenfassend in einem Dreiphasenmodell erklärt (Coupland, 1991; Sandermann, 1994). Zuerst müssen viele Substanzen aktiviert werden, da sie keine reaktiven Gruppen besitzen. Dies geschieht in Phase I, der Aktivierungsphase, in der mittels Reduktion, Hydrolyse oder Oxidation solche reaktiven Gruppen in die Xenobiotika eingeführt werden. Wichtige Enzyme dieser Detoxifikationsphase gehören zum Cytochrom P<sub>450</sub>-Monooxygenasen-Typ. Es existieren in Pflanzen verschiedene Monooxygenasen. Sie weisen ein unterschiedliches Substratspektrum auf und können in den einzelnen Gewebearten in verschiedenen Enzymspektren auftreten. Besonders bei Weizen spielt die Einführung von Hydroxylgruppen bei der Toleranz von Herbiziden eine wichtige Rolle (Fendt, 1999). Diese Aktivierungsphase macht es möglich, dass in der zweiten Phase die Konjugation mit hydrophilen, organismuseigenen Verbindungen erfolgen kann. Solche Verbindungen können Zucker, wie Glucose und Malonat, aber auch Aminosäuren und Glutathion sein. Enzyme, die bei dieser Konjugationsreaktion eine wichtige Rolle spielen, sind die Glycosyltransferasen und die Glutathion-S-Transferasen. In der dritten Phase werden die konjugierten Metabolite entweder einem Abbau unterworfen oder durch Kompartimentierungsvorgänge aus dem Stoffwechselgeschehen entfernt. Die Deposition der Metabolite kann in der Vakuole, im Apoplaste oder in der Zellwand (Lamoureaux & Rusness, 1989) geschehen.

Existieren bereits reaktive Gruppen am Schadstoffmolekül, ist die erste Phase der Detoxifikation nicht notwendig. Dennoch können Hydroxylierungsreaktionen stattfinden, jedoch in abgeschwächter Form. Die Detoxifikation von Herbiziden muss nicht zwangsläufig nach dem dargestellten Modell ablaufen; vielmehr können die verschiedenen metabolischen Reaktionen auch nebeneinander ablaufen. Die Abbildung 3 stellt wichtige und verbreitete Metabolisierungsreaktionen von Herbiziden dar.



**Abb. 3** Schema für die Metabolisierung von Herbiziden (Fendt, 1999)

Die Glutathion-S-Transferasen (GST, E.C. 2.5.18) repräsentieren eine große Gruppe der Phase II-Entgiftungsenzyme. Sie metabolisieren endobiotische und xenobiotische Verbindungen durch die kovalente Konjugation von reduziertem Glutathion (GSH) mit einem breiten Spektrum hydrophober, elektrophiler Substrate (Harbig et al., 1974). Dies geschieht durch einen nukleophilen Angriff, bei der eine elektrophile Gruppe des Schadstoffes mit der Thiolgruppe des Cysteins im Glutathion reagiert. Das Glutathion besteht aus den drei Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin, ist ubiquitär verbreitet und das häufigste nichtproteinogene Thiol in der Zelle. Es ist direkt oder indirekt an vielen Prozessen in der Zelle beteiligt, wie Synthese von Proteinen und DNA, Transport, Enzymaktivität, Metabolismus und Zellschutz (Meister & Anderson, 1983). Die Glutathion-S-Transferase aus tierischem Gewebe ist hinsichtlich ihrer physikochemischen und katalytischen Eigenschaften weitestgehend untersucht worden. Sie ist ein dimeres Enzym, bei dem die Untereinheiten zwischen 25 und 30 kDa groß sind. Es treten sowohl Homo- als auch Heterodimere auf. Diese werden in fünf unterschiedliche Klassen aufgeteilt: alpha, mu, pi, sigma und theta, wobei die theta-Klasse auch in Pflanzen vorkommt (Karam, 1998). Pflanzeigene Substrate konnten bis jetzt der GST noch nicht zugeordnet werden. Für Aktivitätsstudien werden deswegen Modellssubstrate verwendet. Das meist angewandte Modellssubstrat ist das von Harbig et al. (1974) eingeführte 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (CDNB).

Der Katalysemechanismus dieser Zweisubstratreaktion ist ein geordneter Bi-Bi-Mechanismus (Pickett & Lu, 1989; Lebrou et al., 2001). Das Enzym unterstützt die Protonendissoziation von GSH-Thiol. Das dadurch entstandene Thiolanion besitzt eine hohe Nukleophilie. Die GST besitzt

je Untereinheit eine GSH-bindende Domäne (G-site) und eine angrenzende Bindedomäne für elektrophile Substanzen (Marrs, 1996).

Die Untersuchung der pflanzlichen GST erstreckt sich vorrangig auf das Gebiet der landwirtschaftlichen Nutzpflanzen und Unkräuter im Hinblick auf die Resistenz gegenüber Herbiziden (Lamoureux & Rusness, 1989). So konnten in verschiedenen Pflanzenspezies GST-Aktivitäten gemessen werden, darunter in verschiedenen Getreidearten, Kartoffeln, Zuckerrohr und Tabak. Durch die Zunahme der Forschung auf dem Gebiet der „neuartigen Waldschäden“ wurden auch Untersuchungen hinsichtlich der GST in Koniferen durchgeführt. Aktivitäten von Glutathion-S-Transferasen konnten somit in unterschiedlichen Nadelbäumen, wie *Picea abis* (Schröder et al. 1990), *Pinus mungu* (Schröder & Rennenberg, 1992) und *Pinus sylvestris* (Härtling, 1995) gefunden werden. In diesem Zusammenhang wird die GST auch als möglicher Biomarker für organische Schadstoffe in Koniferen diskutiert (Schröder et al., 1992; Schröder & Weiß, 2000). Das Substratspektrum pflanzlicher GST ist breit, so werden z. B. verschiedene Herbizide, wie Alachlor und Fluorodifen, Pestizide und Chlorbenzole umgesetzt.

Die pflanzliche GST ist in Analogie zum tierischen Gewebe in der Regel ebenfalls ein Dimer mit Untereinheiten zwischen 23-29 kDa und kann auch als Homo- und Heterodimer auftreten. Dean et al. (1995) konnten aber aus Mais auch ein 30 kDa großes Homodimer isolieren. Häufig existieren unterschiedliche Isoenzyme, die verschiedene Substratspezifitäten aufweisen. Im allgemeinen wird zwischen drei GST-Typen unterschieden (GST I-III), die jedoch zwischen den einzelnen Pflanzen geringfügig differieren können (Marrs, 1996). Die Induktion von GST-Aktivitäten durch verschiedene biotische und abiotische Faktoren wurde in der Literatur schon mehrfach beschrieben (Marrs, 1996; Schröder, 1993) und lässt auf eine Induktion der de novo Proteinsynthese und einer vermehrten Expressierung verschiedener Isoenzyme schließen (Gronwald, 1989; Debus & Schröder, 1990; Pflugmacher & Schröder, 1995). In mehreren Projekten zur Untersuchung neuartiger Waldschäden konnte bereits ein Einfluss leicht flüchtiger organischer Luftschadstoffe auf die GST-Aktivität und die Isoenzymmuster beschrieben werden (Schröder & Debus, 1991; Schröder & Wolf, 1996; Plümacher et al., 1993). Die GST-Aktivität lässt sich auch durch Safener (Verbindungen, die den Herbizidabbau in Nutzpflanzen beschleunigen) induzieren und leistet damit im hohen Maße einen Beitrag zur Herbizidresistenz (Timmermann, 1989; Fendt, 1998).

Nach der Konjugation von Schadstoffen mit GSH werden sie entweder kompartimentiert und eingelagert oder metabolisiert. Die Metabolisierung solcher Konjugate erfolgt zunächst über die Abspaltung von Glycin durch eine Carboxypeptidase und die nachfolgende Spaltung der  $\gamma$ -Glutamin-Cystein-Bindung durch eine Transpeptidase (Pickett & Lu, 1989; Lamoureux & Rusness, 1989). Das dadurch entstandene S-Cystein-Konjugat stellt eine Schlüsselrolle in der Metabolisierung der GSH-Konjugate dar. So können nachfolgend z. B. N-Malonylcystein-Konjugate, Sulfonylkonjugate und Thioessigsäurederivate entstehen oder eine Glycosylierung stattfinden (Lamoureux & Rusness, 1993). Durch Abspaltung des Cysteinrestes mittels einem  $\beta$ -Lyaseenzym entsteht ein reaktives Thiol des Xenobiotikums, das danach ebenfalls glycosyliert bzw. methyliert werden kann (Pickett & Lu, 1989; Lamoureux et al., 1992).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Standardisierte Labortests

#### 3.1.1 $^{15}\text{N}$ -Stoffwechselltest (ESIMA)

Der ESIMA (Ecotoxicological Stable Isotope Metabolic Assay) wurde mit zwei verschiedenen Pflanzenarten durchgeführt. Zum einen wurden Epikotylsegmente der Grünfüttererbse *Pisum sativum*, Sorte Pinoccio (IG Saatzucht GmbH & Co KG, Biendorf), zum anderen die Gartenkresse *Lepidium sativum*, Stamm 74 (Florensis Deutschland GmbH, Stuttgart) herangezogen. Letzteres stellt eine Weiterentwicklung des Tests dar, indem intakte Pflanzen unter standardisierten Bedingungen eingesetzt werden.

##### 3.1.1.1 Anzucht und Versuchsdurchführung mit *Pisum sativum*

Vor der Auskeimung quoll der Samen über 24 h unter fließendem Leitungswasser. Danach wurde er bei 25 °C im Dunkeln über fünf Tage auf feuchtem Fließpapier in Fotoschalen zum Keimen ausgelegt. Als die etiolierten Keimlinge eine Länge von 4 - 6 cm erreicht hatten, wurden sie in ca. 1 cm lange Segmente geschnitten und bis zur Inkubation auf Eis aufbewahrt. 10 Epikotylsegmente wurden in 20 ml Inkubationslösung, die sich aus 10 ml Medium (2 % Saccharose, 0,1 % Tween 20 und 0,1 % Ammoniumchlorid 95 at.-%  $^{15}\text{N}$ ; pH 5,5) und 10 ml Wirkstofflösung (bzw. aqua bidest beim Kontrollansatz) zusammensetzt, bei 25 °C zwei Stunden leicht geschüttelt (50 rpm). Anschließend wurden die Segmente gründlich mit aqua bidest gewaschen. Die Bestimmung der  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit erfolgte emissionspektrometrisch wie im Kap. 3.5.1.3 beschrieben.



Epikotyle von *Pisum sativum*

##### 3.1.1.2 Anzucht und Versuchsdurchführung mit *Lepidium sativum*

Pro Ansatz wurden mindestens 25 Samenkörner für ca. 30 min zum Quellen in aqua bidest ausgelegt. Anschließend wurden sie auf flache Metallsiebe (d = 3 cm) vereinzelt. Diese Siebe wurden in 25 ml Bechergläser, in denen sich Glasröhrchen mit einer Höhe von 3 cm befanden, gesetzt und mit Hoagland Nährlösung und Spurenelementlösung nach Arnon (siehe Kap. 3.2.2.1)

soweit aufgefüllt, dass der Samen nicht austrocknete. Das Keimen und die Anzucht der Pflanzen erfolgte in einem Pflanzenwuchsschrank unter standardisierten Bedingungen. Im Anhang (Abb. 1) ist der Tagesgang bezüglich des Lichtes, der Temperatur und der relativen Luftfeuchte aufgezeigt. Die Wurzeln der Pflanzen wuchsen durch das Sieb in die Nährlösung hinein. Der Flüssigkeitsverlust wurde mit aqua bidest ausgeglichen.

Nach 5 - 6 Tagen hatten die Pflanzen eine Größe von 3 cm erreicht.



Versuchsgefäße mit 6 Tage alten *Lepidium sativum* Pflanzen

Für die Schadstoffexposition der Pflanzen wurde die Anzuchtnährlösung gegen das Belastungsmedium, das sich aus 50 % doppelt konzentrierter Hoaglandnährlösung mit 0,0025 %  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  (95 at.-%  $^{15}\text{N}$ ) und 50 % Schadstofflösung zusammensetzt, ausgetauscht. Als Kontrollansatz wurde statt der Schadstofflösungen entsprechende Menge aqua bidest verwendet. Die Exposition erfolgte wiederum im Pflanzenwuchsschrank über fünf Stunden. Der Spross wurde danach mit einer Keramikscherer kurz über dem Sieb abgeschnitten und gründlich gewaschen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit wie im Kap. 3.5.1.3 beschrieben.

### 3.1.1.3 Auswertung

Die gemessenen  $^{15}\text{N}$ -Exzeshäufigkeiten der Schadstoffansätze wurden prozentual zum Kontrollansatz berechnet. Der Fehler wurde mit Hilfe der Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsanalyse (siehe Kap. 3.6) berechnet. Die Berechnung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes erfolgte wie im Kap. 3.1.3 beschrieben.

## 3.1.2 Pollenschlauchwachstumstest (PTG-Test)

Der PTG-Test (Pollen Tube Growth Test) wurde nach der Methode von Kristen & Kappler (1995) durchgeführt. Dafür wurde Tabakpollen der Spezies *Nicotiana sylvestris* (Speg. & Comes) verwendet, der in entsprechenden Pollenchargen von der Universität Hamburg, Fachbereich Biologie, zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Pollen kann bei  $-18\text{ °C}$  über drei Jahre ohne Verlust der Keimfähigkeit aufbewahrt werden.

### 3.1.2.1 Durchführung

Zunächst wurde eine Pollensuspension aus 5 mg Pollen pro ml doppelt konzentriertem Kulturmedium (10 % Sucrose [w/v], 0,02 % Borsäure [w/v], 0,142 %  $\text{Ca}[\text{NO}_3]_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,4 % Morpholinethansulfonsäure [MES] in aqua bidest) hergestellt. Der pH-Wert wurde mittels KOH

auf 5,6 eingestellt. Anschließend wurden pro Ansatz 0,1 ml Pollensuspension und 0,1 ml Schadstofflösung in unterschiedlichen Konzentrationen in 50 ml Glasschraubflaschen (Schott) pipettiert. Als Kontrollansatz wurde anstelle der Schadstofflösung aqua bidest verwendet. Für den Nullansatz (entsprechend Nullwachstum) wurde statt der Schadstofflösung 70 %iges Ethanol eingesetzt, das die Keimung der Pollen verhindert. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C über 18 Stunden. Das Abstoppen des Wachstums erfolgte mit einer Lösung, die aus einem Teil Alcian blue-Stammlösung (0,5 g Alcian blue in 100 ml Ethanol) und neun Teilen Acetatpuffer (0,1 % Triton-X 100 und 0,15 % Acetat in aqua bidest, pH 5,6 mit NaOH eingestellt) bestand. Das darin befindliche Ethanol stoppt das Wachstum der Pollenschläuche, der Farbstoff wird in die Pollenschlauchwand aufgenommen und an die Polysaccharide gebunden. Das Auswaschen des nicht gebundenen Farbstoffes erfolgte mit 6 ml aqua bidest, anschließender Zentrifugation bei 5 000 U/min über 10 min und Absaugen des Waschwassers mittels Wasserstrahlpumpe. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Durch Zugabe von 3 ml Zitronensäure wurde der Farbstoff von den Pollenschläuchen wieder gelöst. Nach nochmaliger Zentrifugation bei 5 000 U/min über 10 min wurde die Extinktion des Überstandes bei 618 nm (CADAS 100, Dr. Lange) für die quantitative Bestimmung der Inkorporation des Farbstoffes gemessen. Der Nullabgleich erfolgte mit Zitronensäure.

### 3.1.2.2 Auswertung

Von den Extinktionswerten der Schadstoff- und Kontrollansätze wurde zunächst der Mittelwert der Nullproben abgezogen, um den tatsächlichen Größenzuwachs der Pollenschläuche zu ermitteln. Somit bleiben die Menge des eingesetzten Pollens und mögliche Verunreinigungen unberücksichtigt. Anschließend wurden die Schadstoffansätze prozentual zum Kontrollansatz berechnet. Der Fehler wurde mit dem Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz (siehe Kap. 3.6) kalkuliert. Die Berechnung des  $IC_{50}$ -Wertes erfolgte wie im Kap. 3.1.3 beschrieben.

### 3.1.3 Berechnung des $IC_{50}$ - Wertes

Der  $IC_{50}$ -Wert stellt die Effektkonzentration dar, mit der das Pollenschlauchwachstum (PTG-Test) bzw. die  $^{15}N$ -Inkorporation (ESIMA) um 50 % gehemmt wird. Er wird als Maß für die Toxizität angegeben und durch lineare Interpolation zwischen den beiden Konzentrationsstufen ermittelt, deren Hemmungen gerade über und unter 50 % liegen.

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$IC_{50} = e^x$$

$$x = \frac{(\ln C_2 - \ln C_1) (50 - I_1)}{I_2 - I_1} + \ln C_1$$

$C_1$  = Konzentration, deren Hemmung gerade unter 50 % liegt

$C_2$  = Konzentration, deren Hemmung gerade über 50 % liegt

$I_1$  = Hemmung des Pollenschlauchwachstums [%] von Konzentration  $C_1$

$I_2$  = Hemmung des Pollenschlauchwachstums [%] von Konzentration  $C_2$

Diese Formel beruht auf der Annahme, dass ein linearer Zusammenhang zwischen dem natürlichen Logarithmus der Konzentration und der Hemmung besteht.

## **3.2 Kontrollierte Exposition in der Expositions-kammer**

### **3.2.1 Anlage zur kontrollierten Applikation atmosphärisch getragener TCA**

Für die Simulation atmosphärischer Belastungen von TCA unter standardisierten Bedingungen wurde eine Begasungsanlage aufgebaut, die aus einem Pflanzenwuchsschrank, einer Verneblerstation und einem Computer zur Datenerfassung besteht. Die Anlage ist in Abbildung 4 dargestellt. Der Pflanzenwuchsschrank (3) (HPS 1500/60/S, Heraeus Vötsch) diente zur Einstellung klimatischer Verhältnisse und wurde mit einem Tagesgang von 13/11 Stunden wie folgt programmiert: Lichtphase von 6 - 19 Uhr, 21 °C, 60 % relative Luftfeuchte; Dunkelphase von 19 - 6 Uhr, 15 °C, 75 % relative Luftfeuchte. Die Lichtintensität betrug je nach Lichtpunkthöhe 500 - 1 000  $\mu\text{mol/s/m}^2$  und wurde von 12 Metallhalogenid-Strahlern (Typ Osram HQI-R250 W/NDL) mit tageslichtähnlichem Spektrum erzeugt. In diesem Pflanzenwuchsschrank befinden sich zwei Glasexpositionsküvetten (ca. 80 l Volumen), jeweils für Belastung (1) und Kontrolle (2). Die Verneblerstation (7) besteht aus zwei Ultraschallverneblern (Medi-Sonic 400, Medizin-Technik-Apparatebau GmbH), die die zu applizierende Flüssigkeit (TCA-Lösung bei Belastung und deionisiertes Wasser bei Kontrolle) vernebeln, welche über eine Schmetterlingsnadel von oben aus einem Vorratsbehälter kontinuierlich zuläuft. Das Gerät hat eine Verneblerleistung von 3,9 ml/min, und die Teilchengröße liegt zwischen 0,5 und 5 Mikron (85 % unter 3 Mikron). Die Luftleistung beträgt maximal 20 l/min. Da diese wegen des Gegendruckes in der Kammer nicht ausreichte, wurde zusätzlich über Pumpen ein Luftstrom in die Becher gepumpt. Durch den Überdruck konnten die Aerosole in den Hauptluftstrom gelangen. Aerosolkondensat, welches sich im Zuleitungsschlauch zum Hauptluftstrom bildete, wurde in einen Auffangbecher geleitet. Die klimatisch konditionierte Luft wurde über ein Glasrohr (8) im Klimaraum des Pflanzenwuchsschranks angesaugt. Danach teilt sich die Leitung auf in eine Leitung für die Kontrollküvette (9) und in eine für die Belastungsküvette (10), in die jeweils das vernebelte Aerosol eingeleitet wurde. Anschließend wurde die mit der Applikationsflüssigkeit angereicherte Luft in die Expositions-küvetten eingeleitet. Die dort befindlichen 12-Volt-Ventilatoren sorgten für die Verwirbelung der Luft. In den Küvetten befanden sich ausserdem Temperatur- und Feuchtefühler (4 und 5), die die erfassten Daten über DA-Wandler auf den Computer (6) zur Überwachung übertrugen. Über den Anstieg der Luftfeuchtigkeit in den Küvetten wurde die Funktionsfähigkeit der Vernebler überprüft. Die Luft wurde aus den Expositions-küvetten abgesaugt und ging über Rotamesser (11), bei denen ein kontinuierlicher Fluss von 5 000 l/h eingestellt wurde, über einen Aktivkohlefilter (13) und ein Absauggebläse ins Freie.

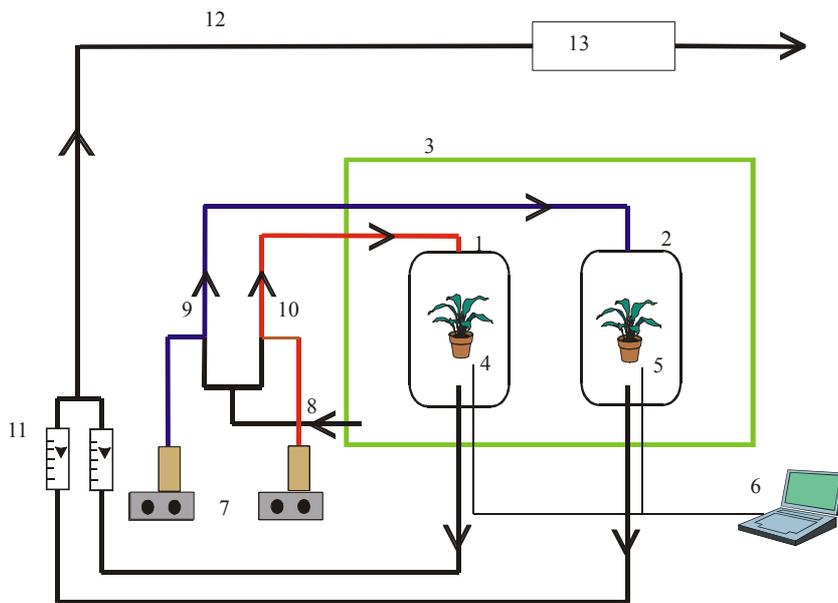


Abb. 4 Schema der Begasungsanlage

- Legende:
- 1 = Glasexpositionsküvette Belastung
  - 2 = Glasexpositionsküvette Kontrolle
  - 3 = Pflanzenwuchsschrank
  - 4 = Temperatur- und Feuchtefühler Belastung
  - 5 = Temperatur- und Feuchtefühler Kontrolle
  - 6 = Computer für Datenauswertung
  - 7 = Verneblerstation
  - 8 = Glasrohr zum Ansaugen konditionierter Luft aus Klimaraum
  - 9 = Glasrohr zum Einleiten des vernebelten Aerosols in Kontrollküvette
  - 10 = Glasrohr zum Einleiten des vernebelten Aerosols in Belastungsküvette
  - 11 = Rotamesser
  - 12 = Abluftrohr
  - 13 = Aktivkohlefilter

### 3.2.2 Atmosphärische TCA-Belastung unterschiedlicher Photosynthesetypen

Als  $C_3$ -Pflanze wurde die Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus*) und als  $C_4$ -Pflanze der Mais (*Zea mays*) ausgewählt.

*Zea mays* L. (Mais) gehört zu der Familie der Süßgräser (Poaceae) und stammt ursprünglich aus Mittelamerika. Obwohl Mais eine Pflanze der Tropen und Subtropen ist, vermag sie mit einigen Sorten auch in gemäßigten Breiten zu gedeihen (Franke, 1992). In Adaption an wärmere klimatische Verhältnisse gehört diese Pflanze zum  $C_4$ -Kohlenstoffassimilationstyp.

*Tropaeolum majus* L. (Kapuzinerkresse) gehört zu der Familie der Kapuzinerkressegewächse (Tropaeolaceae) und ist eine ein- bis mehrjährige, glucosinohaltige Pflanze. Sie ist ein Vertreter der C<sub>3</sub>-Kohlenstoffassimilation.

Beide Pflanzen sind im Labor sehr gut kultivierbar. Der Mais ist darüber hinaus eine weit verbreitete Versuchspflanze im Agrar- und ökologischen Bereich. Die Kapuzinerkresse wurde schon erfolgreich in Biomonitoringstudien zur Untersuchung atmosphärischer Belastungen eingesetzt (Hafner et al., 2002).



*Tropaeolum majus*



*Zea mays*

### 3.2.2.1 Pflanzenanzucht

Als Saatgut wurde für Mais die Züchtung *Zea mays* A + B der Zuchtstation Biendorf von Saatzucht GmbH & Co. KG und für Kapuzinerkresse die Sorte Whirlybird „Scharlach“ der Firma Walz Samen GmbH verwendet. Zunächst erfolgte die Keimung der Samen in Kunstbodensubstrat Vermiculite (Deutsche Vermiculite Dämmstoff GmbH) der Körnung 2 - 3 mit einer modifizierten Hoagland Nährlösung und Spurenelementlösung nach Arnon (Hoagland & Arnon, 1950) die sich aus 2,75 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O; 46,2 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 4,30 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 14,3 µM MnCl<sub>2</sub>; 1 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O; 0,3 µM CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O; 18 µM FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O; 0,5 µM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; 16,1 µM Na<sub>2</sub>-EDTA und 0,7 µM ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O zusammensetzte.

Das Verhältnis Vermiculite/Nährlösung betrug 0,3 : 1 (w/w). Der durch Verdunstung entstandene Gewichtsverlust wurde mit aqua bidest ausgeglichen. Nachdem die Keimlinge eine Größe von 4 cm erreicht hatten, wurden die Pflanzen in Hydrokultur mit modifizierter Hoagland-Nährlösung umgesetzt. Als Halterung der Keimlinge dienten durchbohrte PVC-Scheiben. Die Keimlinge wurden am unteren Teil der Hypokotyle mit Schaumstoff umwickelt, anschließend in die Löcher der PVC-Scheibe geklemmt und auf ein Becherglas mit Nährlösung gesetzt. *Zea mays* wurde einzeln in 100 ml Bechergläser, *Tropaeolum majus* mit jeweils 5 Pflanzen in ein 150 ml Becherglas gesetzt. Die Anzucht fand in einem Pflanzenwuchsschrank (Bio Line, VB 1514 Vötsch Industrietechnik GmbH; Bahlingen) mit einem Tag/Nachtrhythmus wie in Kap. 3.1.1.2 beschrieben statt. Die Anzucht dauerte bei *Zea mays* 8 Tage und bei *Tropaeolum majus* 10 Tage. Danach erreichte der Mais eine Größe von 20 - 25 cm und die Kapuzinerkresse eine Größe von 8 - 10 cm.

### 3.2.2.2 Exposition

Die Belastung der Pflanzen mit atmosphärisch getragener Trichloressigsäure fand in der in Kap. 3.2.1 beschriebenen Begasungsanlage gleich nach der Anzucht statt. Vor der Begasung wurde die Nährlösung der Pflanzen ausgewechselt. In jeder Küvette befanden sich 23 Mais- bzw. 25 Kressepflanzen. Die Dauer der Exposition betrug 92 Stunden. Dabei erfolgte durch die Vernebelung von TCA-haltiger Lösung eine kontinuierliche Belastung mit atmosphärischer TCA. Pro Exposition konnte nur eine Konzentration appliziert werden. In der Kontrollküvette wurde anstelle einer TCA-Lösung deionisiertes Wasser vernebelt. Die Berechnung der TCA-Konzentration in der Luft ergab sich aus dem Verbrauch der Applikationsflüssigkeit mit definierter TCA-Konzentration pro Stunde und dem Luftdurchsatz von 5 000 l/h.

Im Anschluss an die Begasung erfolgte die Umsetzung der Pflanzen in Tracerlösung mit 100 mg/l  $K^{15}NO_3$  (95 at.-%  $^{15}N$  bzw. 10 at.-%  $^{15}N$  bei den Pflanzen für die Aminosäureanalyse) in Hoagland-Nährlösung. Die Tracerapplikation erfolgte bei beiden Pflanzenarten über sieben Stunden im Pflanzenwuchsschrank. Danach erfolgte die Ernte des Pflanzenmaterials. Dabei wurden die Blätter mit einer Keramikscherer vom Stiel getrennt, in Aluminiumfolie verpackt und bei  $-80\text{ °C}$  bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Zur Untersuchung der phytotoxischen Wirkung von atmosphärischer TCA von *Tropaeolum majus* und *Zea mays* wurden folgende Untersuchungsparameter bestimmt:

- Zuwachs der Pflanzenhöhe,
- Gehalt an löslichen Proteinen,
- Gesamtstickstoffgehalt,
- $^{15}N$ -Inkorporation in NPN- und Proteinfraction,
- $^{15}N$ -Isotopenmuster einzelner Aminosäuren,
- Enzymaktivitäten der Nitrat- und Nitritreduktase,
- Enzymaktivität der Glutathion-S-Transferase.

### 3.2.3 Atmosphärische TCA-Belastungen von *Pinus sylvestris*

Die Gemeine Kiefer *Pinus sylvestris* L. gehört zu der Familie der Kieferngewächse (Pinaceae) und ist in Europa und Vorderasien weit verbreitet. Aufgrund ihres hohen Lichtbedarfs und der damit verbundenen Konkurrenz Nachteile wird die Kiefer von anderen Baumarten auf Standorte verdrängt, auf denen diese nicht gut gedeihen. Die Kiefer besitzt geringe Standortansprüche und eine weite ökologische Amplitude und kann in seltenen Fällen auch zur Alleinherrschaft gelangen. Sie wird in Deutschland auf über 20 % der Waldfläche angebaut und erlangte in der Holzindustrie Bedeutung (Roloff, 2001).

### 3.2.3.1 Pflanzenanzucht

Für die Begasungsversuche mit *Pinus sylvestris* wurden zweijährige Kiefernssämlinge von der Bundesanstalt für Forst und Holzwirtschaft (BFH), Außenstelle Waldsieversdorf, verwendet. Dort wurden sie im Gewächshaus in Pflanztöpfen angezogen. Um sie an die definierten Klimabedingungen, die während der Begasung herrschen, zu adaptieren, wurden die Pflanzen vor dem Versuchsbeginn zwei Wochen im Pflanzenwuchsschrank aufbewahrt und nach Bedarf gegossen. Die Pflanzen wiesen einen voll ausgebildeten diesjährigen Nadeljahrgang (C) und einen vorjährigen Nadeljahrgang (C+1) auf und hatten eine Größe von 30 - 40 cm.

### 3.2.3.2 Exposition

Es wurden zwei Begasungsversuche durchgeführt. Im ersten (KV1) wurde die akute Toxizität mit einer hohen TCA-Konzentration von  $262 \mu\text{g}/\text{m}^3$  und einer Applikationsdauer von 4 Tagen untersucht. Im zweiten Versuch (KV2) wurde die chronische Belastung mit einer TCA-Konzentration von  $0,2 \text{ ng}/\text{m}^3$  und einer Dauer von 50 Tagen getestet. Vor Beginn der Begasung wurde jede Pflanze mit 300 ml Leitungswasser gegossen und die effektive Quantenausbeute des PS II beider Nadeljahrgänge (siehe Kap. 3.5.6) bestimmt. Im Versuch KV1 wurden die Pflanzen während der Begasung nicht gegossen. Bei der chronischen Belastung (KV2) wurden die Pflanzen im vier-Tages-Rhythmus mit je 300 ml Leitungswasser gegossen und die effektive Quantenausbeute des PS II beider Nadeljahrgänge bestimmt. Im Anschluss an die Begasung erfolgte wiederum die Bestimmung der effektiven Quantenausbeute des PS II und die Tracerapplikation. Bei KV1 wurden jeder Pflanze  $68 \text{ mg K}^{15}\text{NO}_3$  (95 at.-%  $^{15}\text{N}$ ) über 24 Stunden appliziert. Da die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeiten sehr gering ausfielen, wurde bei KV2 jeder Pflanze  $136 \text{ mg K}^{15}\text{NO}_3$  (95 at.-%  $^{15}\text{N}$ ) über 3 Tage appliziert. Die Pflanzen wurden zunächst mit 300 ml Leitungswasser gegossen, dann wurde die Tracerlösung mit einer Spritze gleichmäßig über die Topfoberfläche verteilt und mit 30 ml Leitungswasser nachgespült. Nach Ablauf der Tracerinkorporationszeit wurden die Nadeln beider Nadeljahrgänge in Aluminiumfolie bis zur Aufarbeitung bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Zur Untersuchung phytotoxischer Wirkungen atmosphärischer Trichloressigsäure auf *Pinus sylvestris* wurden folgende Untersuchungsparameter bestimmt:

- $^{15}\text{N}$ -Inkorporation und N-Gehalt der Gesamtstickstofffraktion,
- $^{15}\text{N}$ -Inkorporation der NPN- und Proteinfraction,
- effektive Quantenausbeute des PS II,
- Gehalt an löslichen Proteinen,
- Pigmentgehalte,
- Enzymaktivität der Nitritreduktase,
- Enzymaktivität der Glutathion-S-Transferase.

### 3.2.4 Atmosphärische TCA- Belastung von *Cirsium arvense*

Die Acker-Kratzdistel (*Cirsium arvense* [L.] Scop.) ist aufgrund ihres tiefreichenden Wurzelsystems und der hohen Regenerationsfähigkeit der unterirdischen Organe als schwer bekämpfbares, perennierendes, weltweit verbreitetes Unkraut bekannt (Donald, 1990). Sie gehört zu der Familie der Asterngewächse (Asteraceae). Die Vermehrung erfolgt sowohl vegetativ als auch generativ. Die vegetative Vermehrung über laterale Wurzeln ist sehr effizient und ermöglicht der Pflanze die Persistenz und die Überwinterung. Die seltener auftretende geschlechtliche Vermehrung ist wichtig für die genetische Variabilität von *Cirsium arvense* (Heimann et al., 1996).

#### 3.2.4.1 Pflanzenanzucht

Die Isolierung und Aufzucht unterschiedlicher Herkünfte von *Cirsium arvense* wurde von der Sektion Biozönoseforschung im Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH durchgeführt. Dazu wurden im Herbst 2000 von verschiedenen Standorten Wurzelstücke von männlichen und weiblichen Pflanzen entnommen und über Winter im Gewächshaus zu Pflanzen herangezogen. Aus diesen Pflanzen wurden wiederum zum Zeitpunkt der Blüte Wurzelfragmente (klonale Fragmente) entnommen und einzeln in Töpfe gesetzt. Nach einer 5-monatigen Anzucht dieser Pflanzen im Gewächshaus erfolgte die Begasung mit Trichloressigsäure.



*Cirsium arvense*

#### 3.2.4.2 Exposition

Folgende Herkünfte wurden für diese Versuchsreihe ausgewählt:

**Tab. 2** Bezeichnung, Geschlecht und Herkunft der verwendeten Klone von *Cirsium arvense*

Bezeichnung	Geschlecht	Herkunft
P1	männlich	Botanischer Garten Bayreuth
P2	weiblich	Bad Lauchstädt, Versuchsfläche 2
P3	weiblich	Bad Lauchstädt, Versuchsfläche 1
P4	weiblich	Bad Lauchstädt, Feldrand
P5	weiblich	Bad Lauchstädt, Siedlung 3

Die Pflanzen wiesen eine Größe zwischen 30 und 50 cm auf und hatten bis zu 16 voll entwickelte Blätter. Da die Küvetten nur vier Pflanzen aufnehmen konnten und vier Herkünfte verglichen werden sollten, wurde im ersten Versuch die Variabilität innerhalb einer Herkunft (P1, männl.) untersucht. In den darauffolgenden 3 Expositionen wurden die Herkünfte P2, P3, P4 und P5, jeweils weiblichen Geschlechtes, mit TCA belastet und untereinander verglichen. Vor jeder Begasung wurden die Pflanzen mit 300 ml Leitungswasser gegossen. Die applizierte TCA-Konzentration aller vier Versuche lag bei  $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$  und die Begasungsdauer betrug 100 Stunden. Im Anschluss an die Exposition wurde die maximale Quantenausbeute der Photosynthese nach Dunkeladaption (siehe Kap. 3.5.6) an 5 unterschiedlich alten Blattaltersgruppen bestimmt. Beginnend mit dem ersten voll entwickelten Blatt wurden jeweils zwei aufeinanderfolgende Blätter zu einer Blattaltersgruppe zusammengefasst. Danach erfolgte die Tracerapplikation mit  $120 \text{ mg K}^{15}\text{NO}_3$  (25 at.-%  $^{15}\text{N}$ ). Zunächst wurde die Erde mit 300 ml Leitungswasser/Topf befeuchtet. In Anschluss wurde die Tracerlösung mit einer Spritze gleichmäßig über die gesamte Topfoberfläche verteilt und mit 30 ml Leitungswasser nachgespült. Nach 24 Stunden wurden die Blätter mit einer Keramikscheere abgeschnitten, in Blattaltersgruppen (A-E) eingeteilt und bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur Aufarbeitung aufbewahrt.

Zur Untersuchung phytotoxischer Wirkungen atmosphärischer TCA unterschiedlicher Herkünfte von *Cirsium arvense* wurden folgende Untersuchungsparameter bestimmt:

- $^{15}\text{N}$ -Inkorporation und N-Gehalt der Gesamtstickstofffraktion unterschiedlicher Blattaltersgruppen,
- $^{15}\text{N}$ -Inkorporation in die NPN- und Proteinfraction unterschiedlicher Blattaltersgruppen,
- Effektive Quantenausbeute des PS II unterschiedlicher Blattaltersgruppen.

### 3.3 Untersuchungen unter freilandähnlichen Bedingungen

Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit der Sektion Analytik im Umweltforschungszentrum (Arbeitsgruppe Dr. Weißflog) durchgeführt. Er fand in einem Waldgebiet in der Dahleiner Heide in der Nähe von Taura statt. Dort wurden ca. 8 Jahre alte, aus einer Naturverjüngung *in situ* gewachsene Kiefern, die in zwei Gruppen dicht zusammen standen, ausgewählt. Um diese zwei Pflanzengruppen herum wurde je eine open-top-Kammer, die aus durchsichtiger PVC-Folie bestand, gebaut. Diese wiesen eine Größe von je  $50 \text{ m}^3$  auf. Eine Kammer wurde für die Applikation von Tetrachlorethylen (TECE) verwendet, während die andere Kammer als Kontrollkammer diente, in der keine Applikation stattfand. Beide Kammern standen ca. 30 Meter voneinander entfernt. In der Applikationskammer befanden sich fünf und in der Kontrollkammer zwei Kiefern. Zusätzlich wurden pro Kammer noch 5 getopfte, 8 Jahre alte Birken (*Betula pendula*) hinzugefügt, die von der Forstbaumschule Fa. Brussenius aus Schildau bezogen wurden. Der Topfinhalt betrug 16,5 Liter.

#### 3.3.1 Durchführung und Probenahme

Die Applikation mit TECE (99 %) erfolgte durch Verdampfung, indem 10 ml dieser flüchtigen Substanz auf eine Petrischale gegeben und in ca. ein Meter Höhe über dem Boden in die Kammer

gestellt wurde. Die Verteilung der Substanz erfolgte durch natürliche Luftbewegung. Der Versuch begann am 30.05.2001 und dauerte bis zum 20.12.2001. Es wurden wöchentlich 20 ml TECE appliziert.

Die Tracerapplikation erfolgte am 15.08.2001, indem 3,37 g  $K^{15}NO_3$  (95 at.- %  $^{15}N$ ) in fünf Liter Leitungswasser in den Wurzelraum der Kiefern gegossen und mit zwei Litern nachgespült wurde. Pro Kammer wurde der Tracer jeweils zwei Kiefern und drei Birken appliziert. Bei den Birken wurde eine Konzentration von 1 g  $K^{15}NO_3$  (95 at.-%  $^{15}N$ ) in einem Liter Leitungswasser appliziert und mit 500 ml nachgespült.

Für die Probenahme bei *Pinus sylvestris* wurden Nadeln des aktuellen Nadeljahrgangs (C), d. h. des Nadeljahrgangs, der im Frühjahr 2001 ausgetrieben ist, verwendet. An folgenden Terminen wurden Proben entnommen: 15.08.2001 (vor der Tracergabe), 22.08.2001, 11.09.2001, 23.10.2001 und 03.12.2001. Es wurden pro Baum drei Mischproben, bestehend aus 10 bis 15 Nadeln, geerntet und bis zur Aufarbeitung bei  $-20\text{ }^{\circ}C$  aufbewahrt.

Die Probenahme bei *Betula pendula* fand an den gleichen Terminen wie bei *Pinus sylvestris* statt, der 03.12.2001 entfiel jedoch. Es wurden ebenfalls pro Baum drei Mischproben, bestehend aus 10 Blättern, entnommen und bei  $-20\text{ }^{\circ}C$  aufbewahrt.

Für die Untersuchung der Wirkung von TECE und der sich daraus bildenden TCA auf *Pinus sylvestris* und *Betula pendula* wurden folgende Untersuchungsparameter bestimmt:

- $^{15}N$ -Inkorporation in die Gesamtstickstofffraktion,
- Gesamtstickstoffgehalt des Pflanzenmaterials,
- Wassergehalt des Pflanzenmaterials.

## 3.4 Freilanduntersuchungen

Wie beim open-top-Kammerversuch wurde diese Untersuchung in Zusammenarbeit mit der Sektion Analytik im Umweltforschungszentrum (Arbeitsgruppe Dr. Weißflog) durchgeführt. Dieser Versuch fand ebenfalls in der Dahleiner Heide in der Nähe von Taura (Sachsen) in einer Dickung statt. Ausgewählt wurden dazu ca. 10 Jahre alte, in einer Reihe stehende, in situ gewachsene Kiefern (*Pinus sylvestris*) aus einer Kunstverjüngung. Die Bäume standen in einem Abstand von ca. sieben Meter voneinander entfernt. Die Bodenbedeckung im Umkreis von 50 cm um den Baumstamm wurde zur optimalen TCA-Applikation in den Wurzelraum entfernt.

### 3.3.1 Durchführung und Probenahme

Um den natürlichen pH-Wert des Bodens nicht zu beeinflussen, wurde die TCA als Na-Salz appliziert, indem sie in 10 l Leitungswasser gelöst und anschließend in den Wurzelraum gegossen wurde. Folgende Konzentrationen wurden verwendet: 0,1 g; 0,2 g; 0,4 g; und 0,8 g. Danach wurde mit 5 l Leitungswasser nachgespült. Jede Konzentration wurde an zwei Bäumen appliziert. Zusätzlich wurden zwei Bäume nur mit Leitungswasser als Kontrolle gegossen. Die TCA-Applikation fand einmalig am 11.04.2001 statt.

Die Tracerapplikation wurde am 02.05.2001 durchgeführt, indem 3,37 g  $K^{15}NO_3$  (95 at.-%) in 5 l Leitungswasser in den Wurzelraum der Kiefern gegossen und mit 2 l nachgespült wurde.

Die Probenahme fand am 02.05.2001 vor der Tracerapplikation, am 22.05.2001 und am 16.06.2001 statt. Dazu wurde der vorjährige Nadeljahrgang (C+1), d. h. der Nadeljahrgang, der im Frühjahr 2000 ausgetrieben ist, des vierten Wirtels ausgewählt. Pro Baum wurden zwei Mischproben, bestehend aus 10 bis 15 Nadeln, geerntet und bis zur Aufarbeitung bei  $-20\text{ °C}$  aufbewahrt.

Für die Untersuchung der Wirkung verschiedener TCA-Konzentrationen im Boden auf *Pinus sylvestris* wurden folgende Parameter bestimmt:

- $^{15}N$ -Inkorporation in die Gesamtstickstofffraktion,
- Stickstoffgehalt des Pflanzenmaterials,
- Wassergehalt des Pflanzenmaterials.

## 3.5 Untersuchungsparameter

### 3.5.1 Untersuchung der $^{15}N$ -Häufigkeiten im Gesamtstickstoff, der Protein- und Nichtprotein-Fraktion

#### 3.5.1.1 Probenaufarbeitung

Für die Auftrennung des Probenmaterials, zur Bestimmung der  $^{15}N$ -Häufigkeiten, in die Gesamtstickstofffraktionen, die Nichtprotein- und Proteinfraction, wurde eine irreversible Säurefällung der Proteine mit Trichloressigsäure durchgeführt. Zunächst wurde 1 g Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben, 100 mg davon für die Untersuchung des Gesamtstickstoffs abgewogen und der Rest mit 15 ml einer 20 %igen Trichloressigsäure versetzt und mittels Messerhomogenisator (Ultraturrax) homogenisiert. Die Präzipitation erfolgte über Nacht im Kühlschrank bei  $4\text{ °C}$  und dauerte mind. 16 Stunden. Nach der Fällung wurden die Proben 15 min lang bei  $2\text{ °C}$  mit 10 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (Nichtproteinfraktion) wurde über Watte in einen Kjeldahlkolben mit aqua bidest überführt. Das Pellet (Proteinfraction) wurde mit 5 ml einer 0,5 %igen TCA gewaschen, nochmals zentrifugiert und anschließend ebenfalls in einen Kjeldahlkolben mit aqua bidest überführt.

#### 3.5.1.2 Bestimmung des N-Gehaltes nach Kjeldahl

Die Stickstoffbestimmung wurde nach Kjeldahl (1883), modifiziert nach Faust (1981), durchgeführt. Dazu wurden nur N-freie Chemikalien verwendet und die N-Gehalte der Proben außerdem mit einem „blank“-Wert korrigiert. Die unter 3.5.1.1. gewonnenen N-Fractionen wurden in einem 100 ml-Kjeldahlkolben mit 2 ml konzentrierter Schwefelsäure und einer Spatelspitze Wienerer Reaktionsgemisch (500 Teile  $Na_2SO_4$ , 8 Teile  $CuSO_4$ , 8 Teile Se) als Katalysator versehen und anschließend auf einer Kjeldahl-Aufschlussapparatur (KI 16, Gerhardt) vollständig

verascht. Die abgekühlten Proben wurden anschließend mit ca. 10 ml aqua bidest verdünnt und an einer Kjeldahl-Destillationsapparatur nach Faust (1981) befestigt. Durch Zugabe von 10 ml 32 %iger NaOH stieg der pH-Wert der Probe in den alkalischen Bereich, der Stickstoff wurde in Form von Ammoniak freigesetzt und mittels Wasserdampf in eine Vorlage überführt, die aqua bidest und 2 Tropfen Taschiero-Indikator (125 mg Methylrot, 80 mg Methylenblau mit absolutem Ethanol, ad 100 ml) enthält. Die Bestimmung des Stickstoffgehaltes erfolgte durch Titration mit 0,02 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 1 ml 0,02 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> neutralisiert die Menge an NH<sub>4</sub>OH, die 0,28 mg N enthält. Daraus ergibt sich folgende Berechnung:

$$\text{mg N} = \text{ml } 0,02 \text{ n H}_2\text{SO}_4 \times 0,28.$$

Die wässrige Ammoniumsulfatlösung wurde in Abdampfschalen auf einem Wasserbad bei 80 °C für weitere Untersuchungen eingedampft und im Exsikator aufbewahrt.

### 3.5.1.3 <sup>15</sup>N-Isotopenanalytik

Die Isotopenmarkierung von Stickstoffverbindungen bietet gute Möglichkeiten zum Studium von Aufnahme- und Metabolisierungsvorgängen und wird in der letzten Zeit verstärkt angewendet (Lajtha & Michner, 1994; Faust et al., 1993). Radioaktive Isotope bringen den Nachteil mit sich, dass sie zerfallen, radioaktive Strahlen aussenden und somit ein gesundheitliches Gefährdungspotential darstellen. Da beim Stickstoff auch keine geeigneten radioaktiven Isotope existieren, bieten die stabilen Isotope, welche nicht zerfallen und für die Gesundheit unbedenklich sind, eine Alternative. Sie geben keine radioaktiven Strahlen ab. Das stabile Isotop <sup>15</sup>N (Molmasse 15,010) kommt mit einer natürlichen Häufigkeit von 0,3663 Atom-% in der Luft vor, d. h. 99,6337 % des natürlich vorkommenden Stickstoffs ist <sup>14</sup>N (Molmasse 14,003). Aufgrund des geringen Massenunterschiedes und dem damit verbundenen chemischen Isotopieeffekt kommt es bei biologischem Material zu minimalen Abweichungen in der Häufigkeit, die jedoch bei Traceruntersuchungen vernachlässigt werden können. Isotope eines Elementes unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Anzahl von Neutronen im Kern. Dadurch werden Atommasse, Volumen, Symmetrie und die magnetischen Eigenschaften des Atomkerns beeinflusst, die wiederum unterschiedliche physikalische und physikochemische Eigenschaften hervorrufen. Die daraus resultierenden Isotopieeffekte werden sowohl bei der Herstellung, als auch bei der Messung stabiler Isotope genutzt. Zur Analytik der <sup>15</sup>N-Isotope stehen zwei spektrometrische Messverfahren, die Isotopenmassenspektrometrie und die Emissionsspektrometrie zur Verfügung.

#### Emissionsspektrometrische <sup>15</sup>N-Bestimmung

Das Messprinzip der emissionsspektrometrischen Analytik beruht auf Bestimmung des <sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N-Verhältnisses der Elektronenschwingbanden des Stickstoffmoleküls. Die Bandenköpfe werden dabei bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen: 297,7 nm für <sup>14</sup>N<sub>2</sub>, 298,3 nm für <sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N, und 298,9 nm für <sup>15</sup>N<sub>2</sub>. Die Grundlage des Messprinzips sind die Isotopieeffekte der Stickstoffisotope (Faust et al. 1981). Für die emissionsspektrometrische <sup>15</sup>N-Bestimmung wurde das <sup>14/15</sup>N-Emissionsspektrometer NOI 7 (Fa. FAN, Leipzig) eingesetzt. Es ermöglicht Analysen im Bereich zwischen 0,34 und 80 at.-% und benötigt 10 µg pro N<sub>2</sub>/Messung. Bevor die Messung erfolgen

kann, muss der Stickstoff des Ammoniums in der wässrigen Probe in molekularen Stickstoff überführt werden. Die hierbei angewendete Probenchemie ist die Hypobromit-Methode nach Rittberg. Dabei wird der Stickstoff nach folgender Reaktionsgleichung durch die Oxidation von Ammonium mit Hilfe von Hypobromit in alkalischer Lösung freigesetzt:



Anhand der berechneten Stickstoffmenge wurde zu der Probe soviel aqua bidest zugegeben, dass in 1 ml 400 µg N gelöst waren. 25 µl dieser Lösung wurden in ein Probenglas pipettiert und am Probenhalter des Gerätes befestigt. Das <sup>15</sup>N-Analysensystem verfügt über eine integrierte Probenchemie und eine Datenauswertung.

Das Emissionsspektrometer NOI 7 kann auch mit einem Elementanalysator gekoppelt werden (vario EL III, elementar Analysensysteme GmbH), der in der Lage ist, Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel quantitativ zu bestimmen. Dieser arbeitet nach dem Prinzip der katalytischen Rohrverbrennung unter Sauerstoffzufuhr und hohen Temperaturen. Die dabei entstehenden Verbrennungsgase werden anschließend gereinigt, mittels spezifischen Adsorptionssäulen getrennt und mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) quantitativ bestimmt. Für die Untersuchung wurde ein Betriebsmodus gewählt, der die Elemente Stickstoff und Kohlenstoff bestimmt. Nach der Detektion wird 300 µg des elementaren Stickstoffs zum Entladungsrohr des NOI 7 geleitet und die <sup>15</sup>N-Exzeshäufigkeit ermittelt. Der Vorteil dieser Kombination ist, dass der Kjeldahlaufschluss und die Wasserdampfdestillation entfallen und das N-Gas durch eine saubere Verbrennung erzeugt wird. Zusätzlich wird der Kohlenstoffgehalt mit angegeben. Nachteilig sind der hohe Bedarf an Stickstoff und aufwendige Wartungsarbeiten des Gerätes.

Die erhaltenen Ergebnisse der zwei Varianten sind vergleichbar. In dieser Arbeit wurden beide Varianten verwendet.

### Massenspektrometrische <sup>15</sup>N-Bestimmung

Die Messung von <sup>15</sup>N im Massenspektrometer beruht auf der massenabhängigen Ablenkung positiver Ionen (<sup>14</sup>N<sup>14</sup>N)<sup>+</sup>, (<sup>14</sup>N<sup>15</sup>N)<sup>+</sup> und (<sup>15</sup>N<sup>15</sup>N)<sup>+</sup> im Magnetfeld. Diese Ionen werden in einer Ionenquelle durch Elektronenstoßionisation erzeugt. Die daraus resultierenden Massen 28, 29 und 30 werden zeitgleich in einem Dreifachauffänger (Faraday-Kollektoren) aufgefangen und quantifiziert. Die massenspektrometrische Analyse ist in den letzten Jahren rasch vorangeschritten und gewinnt immer mehr an Bedeutung (Mulvaney, 1993).

In dieser Arbeit wurden Proben, die einen Exzess < 0,1 at.-% exc. aufwiesen, massenspektrometrisch untersucht. Der dabei verwendete Isotopenverhältnismassenspektrometer (IRMS) (Delta-C, Finnigan-Mat) benötigt 50 µg N und weist eine Reproduzierbarkeit auf, die in 90 % aller Fälle unter 0,3 ‰ liegt (Gehre et al., 1994). Für die Bestimmung des Isotopenverhältnisses werden feste und flüssige Proben zunächst mit Hilfe eines Elementanalysators (EA 1108 CHN, Finnigan) in ein Messgas überführt. Vorerst wurden 0,35 mg des unter Kap. 3.5.1.2 gewonnenen Ammoniumsulfates oder entsprechende Mengen getrocknetes und pulverisiertes Pflanzenmaterial in Zinntiegel (HEKAtech GmbH Analysetechnik; Wegberg) eingewogen. Die Proben wurden dann mittels Sauerstoffpuls im Elementanalysator verbrannt, die Verbrennungsgase gereinigt, anschließend in

einer GC-Säule (Porapack PQS) aufgetrennt und in das IRMS geleitet. Gemessen und ausgewertet wurde das  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Verhältnis (Ratio  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ). Angegeben werden die Ergebnisse in  $\delta$ -Notationen. Dabei werden die Abweichungen der Isotopenverhältnisse der Proben zu Luftstickstoff in  $\delta$  ‰ dargestellt. Als Standard diente ein kalibriertes  $\text{N}_2$ -Gas. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\delta^{15}\text{N} = \frac{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{sample}} - (^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{standard}}}{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{standard}}} \times 1000 \text{ [‰]}.$$

### 3.5.2 Bestimmung der $^{15}\text{N}$ -Häufigkeiten einzelner Aminosäuren der löslichen Proteinfraktion

Zur Untersuchung einzelner Aminosäuren wurde eine modifizierte Methode nach Brand et al. (1994) angewendet. Sie erlaubt die Isotopencharakterisierung von Aminosäuren durch eine GC-C-IRMS Analyse und ist in der Literatur etabliert (Macko et al., 1997; Hofmann et al., 1995).

#### 3.4.2.1 Gewinnung der löslichen Proteinfraktion für AS-Analytik

Es wurden 6 g Pflanzenmaterial (Mischprobe aus 3-4 Pflanzen) mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben, mit 30 ml Phosphatpuffer nach SOERENSEN pH 6,5 versehen und unter Kühlung 3 min mit dem Ultraturrax homogenisiert. Die Extraktion des Strukturproteins erfolgte über Nacht bei 4 °C. Danach wurden die Proben zur groben Trennung 15 min bei 2 °C mit 10 000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand über Schwarzbandfilter (Schleicher & Schuell GmbH) mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Zur Fällung des löslichen Proteins wurde das Filtrat 1 : 1 mit 20 %iger TCA-Lösung versetzt. Sie erfolgte über Nacht bei 4 °C. Das Protein wurde danach abzentrifugiert (15 min, 2 °C, 10000 rpm), mit 0,5 %iger TCA gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das dadurch gewonnene Protein wurde bei -20 °C in einem Rundkolben eingefroren. Anschließend erfolgte eine Gefriertrocknung (LOVAC GT, FINN-AQUA Santasalo-Sohlberg) der Proben.

#### 3.5.2.2 Proteinhydrolyse

Für die Hydrolyse wurden 30 mg des gefriergetrockneten Proteins in 40 ml Vials (Supelco) eingewogen und mit 20 ml einer 6 N HCL-Lösung versetzt. Die Proben wurden anschließend nach Kaiser et al. (1975) im Ultraschallbad durch abwechselnde Heliumspülung und Evakuierung entgast. Die Hydrolyse fand unter Rühren in einem Heizblock (PIERCE, Reacti-Therm III, Rockford) bei 145 °C über 4 Stunden statt. Nach Abkühlung wurden die Proben im Rotationsverdampfer bis zur vollständigen Trockenheit eingengt und, um eventuell vorhandene Wasser Spuren zu entfernen, drei mal mit wasserfreiem Dichlormethan getrocknet.

### 3.5.2.3 Derivatisierung der Aminosäuren durch Trifluoracetylierung

Als erster Derivatisierungsschritt wurde die Carboxylgruppe der Aminosäuren mit Propanol verestert. Dazu wurden zu dem getrockneten Hydrolysat 10 ml einer frisch hergestellten Mischung aus Acetylchlorid und n-Propanol im Verhältnis 1 : 4 (v/v) gegeben. Die Veresterung erfolgte unter Rühren in einem Heizblock bei 110 °C über 1 h. Anschließend wurden die Proben bei 40 °C am Rotationsverdampfer eingengt, in 1,8 ml Vials (Supelco) überführt und im Heizblock bei 45 °C, unter einem Argonstrom und mit Unterstützung von Dichlormethan, getrocknet. Bei dem zweiten Derivatisierungsschritt wurden die Aminogruppen der Aminosäuren mit Trifluoracetanhydrid (TFAA) acetyliert. Dafür wurden 500 µl TFAA und 500 µl Dichlormethan zu den Proben gegeben und 20 min bei 100 °C unter Rühren derivatisiert. Danach wurden sie unter Eiskühlung und unter einem Argonstrom bis zur vollständigen Trockenheit eingengt. Die Proben wurden in wenig Dichlormethan wieder aufgenommen, in 0,6 ml Samplevials überführt und nochmals eingengt. Anschließend wurden die AS in 60 µg n-Propanol gelöst.

### 3.5.2.4 GC-C-IRMS Analyse

Die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeiten der derivatisierten Aminosäuren (vergl. Kap. 3.5.2.3) wurden mit Hilfe eines **Gaschromatograph-Combustion-Isotope-Ratio-Mass-Spectrometer**, der zusätzlich noch mit einem **Time-of-Flight Massenspektrometer (TOF-MS)** gekoppelt ist, bestimmt. Obwohl die GC-C-IRMS Methode eine relativ junge analytische Methode ist, wird sie in vielen Bereichen, z. B. Archäologie, Geochemie, Umweltchemie und Biochemie, erfolgreich eingesetzt (Meier-Augenstein, 1999). Das Messsystem besteht aus einem Gaschromatographen (6890 PLUS, Hewlett Packard), gekoppelt mit einem TOF-MS (GCT, Micromass) und kombiniert mit einem Isotopenverhältnismassenspektrometer (MAT 252, Finnigan). 3 µl AS-Probe wurden über einen Autosampler auf die GC-Kapillare (BPX 5 50 m, i.D. 0,32 mm, Schichtdicke 0,5 µm; Vorsäule) aufgegeben. Zur optimalen Auftrennung wurde folgendes Temperaturprogramm gewählt: 50 °C (10 min) → 2 °C/min → 175 °C (10 min) → 4 °C/min → 260 °C (10 min). Nach der gaschromatographischen Auftrennung erfolgte eine Teilung des Gasstroms. 5 - 10 % wurden in den TOF-MS zur qualitativen und quantitativen Analyse der Aminosäuren geleitet. Der andere Teil wurde in einem Verbrennungsofen (CuO/NiO/Pt) bei 980 °C vollständig oxidiert und im nachfolgenden Reduktionsofen bei 650 °C reduziert. Das bei der Verbrennung entstandene Wasser wurde mittels Wasserfalle entfernt und das CO<sub>2</sub> mit Hilfe von flüssigem Stickstoff ausgefroren. Das Probegas wurde anschließend über einen opensplit in das IRMS geleitet, wo es ionisiert und die daraus entstandenen Kationen entsprechend ihres Masse/Ladungsverhältnisses im Magnetfeld aufgetrennt und in Faraday-Kollektoren aufgefangen und quantifiziert wurden. Es wurden nur die Massen 28 ( $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) und 29 ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) gemessen. Das eingesetzte Massenspektrometer benötigte zur Peakdetektion eine Stickstoffmenge von mindestens 0,84 nmol. Die Reproduzierbarkeit sowie die Berechnung und die Angaben der Ergebnisse der  $^{15}\text{N}$ -Isotopenhäufigkeit sind mit dem unter Kap. 3.5.1.3 beschriebenen Massenspektrometer identisch.

### 3.5.3 Biochemische Auftrennung der löslichen Proteine über SDS-PAGE

Für die grobe Charakterisierung des löslichen Proteins wurde eine denaturierende gelelektrophoretische Auftrennung mittels Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) eingesetzt.

#### 3.5.3.1 Gewinnung der löslichen Proteinfraktion für SDS-PAGE

3 g Pflanzenmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben, mit 40 ml Phosphatpuffer nach SÖRENSEN pH (6,8) versetzt und 3 min mit Ultraturrax unter Eiskühlung homogenisiert. Das Strukturprotein wurde bei 4 °C über Nacht extrahiert und anschließend 30 min bei 2 °C und 10 000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde über einen Schwarzbandfilter (Schleicher & Schuell GmbH) mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt, nochmals zentrifugiert und wiederum abgesaugt. Die Konzentrierung der löslichen Proteine erfolgte durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung unter Eiskühlung. Dazu wurde zu dem Überstand soviel fein pulverisiertes Ammoniumsulfat unter Rühren zugegeben, bis eine Sättigung von 40 % erreicht wurde. Nach 30-minütiger Fällung wurden die präzipitierten Proteine durch eine Zentrifugation für 30 min bei 2 °C und 10 000 rpm aus der Lösung entfernt. Danach wurde wieder soviel Ammoniumsulfat zugegeben, bis sich eine Gesamtkonzentration von 80 % ergab. Nach einer halben Stunde erfolgte nochmals eine Zentrifugation mit 10 000 rpm bei 2 °C über 30 min. Die Pellets der zwei Fraktionen wurden in 2,5 ml Tris/HCL (25 mM, pH 7,6) aufgenommen. Anschließend wurden die Proben über eine mit 25 ml Tris/HCL-Lösung (25 mM, pH 7,6) equilibrierten PD 10 Säule (Amersham Pharmacia Biotech AB) entsalzt und mit dem gleichen Puffer eluiert. Diese Proteinlösung wurde zur quantitativen Proteinbestimmung und SDS-PAGE eingesetzt.

#### 3.5.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Um die Konzentration der Proteinlösung (vergl. 3.5.3.2 und 3.5.5.1) zu bestimmen, wurde die Methode nach Lowry et al. (1951) angewendet. Die Proteinextrakte wurden zunächst 1 : 1 mit 20 %iger Trichloressigsäure versetzt und die Proteine über Nacht im Kühlschrank gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 14 000 rpm wurde das Pellet nochmals mit 0,5 %iger TCA gewaschen, wiederum bei 14 000 rpm 10 min abzentrifugiert und in 1 ml 1 N NaOH resuspendiert. Je nach Konzentration wurden 50 - 200 µl dieser alkalischen Lösung für die Proteinbestimmung eingesetzt. Zunächst wurde ein Gemisch, bestehend aus einer 1 %igen CuSO<sub>4</sub>-Lösung und einer 2 %igen Na-K-Tartratlösung im Verhältnis 1 : 1 (v/v) hergestellt. Ein Volumenanteil wurde anschließend mit 49 Volumenanteilen einer 2 %igen Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung versetzt. Durch Zugabe von 1 ml dieser Lösung und sofortigem Durchmischen wurde die Reaktion des Proteins im alkalischen eingeleitet. Nach 10 min Inkubation wurden 100 µl des Folin-Reagenz, welches 1 : 1 mit aqua bidest verdünnt wurde, zugegeben und kräftig geschüttelt. Die Messung der Extinktion erfolgte nach 30 min am Spektralphotometer (UVIKON 923, BIO-TEK Kontron Instruments) gegen einen Blindwert, der anstatt der Proteinlösung entsprechend 1 N NaOH enthielt. Als Bezug diente eine Kalibrierreihe mit Rinderserumalbumin in 1 N NaOH im Bereich zwischen 0 und 100 µg Protein.

### 3.5.3.3 SDS-Gelelektrophorese

Es wurden Plattengele einer Größe von 10 x 8 x 0,1 cm genutzt. Zur Trennung wurden 10 %ige Trenngele und 5 %ige Sammelgele benutzt, deren Zusammensetzung in Tab. 3 dargestellt ist. Der Trenngelpuffer setzte sich aus 1,1 M Tris und 10 mM SDS und der Sammelgelpuffer aus 0,25 M Tris und 20 mM SDS zusammen. Der Elektrodenpuffer enthielt 50 mM Tris, 0,38 M Glycin und 0,1 % SDS. Dabei stellt sich ein pH-Wert von 8,8 ein. Die Proteinproben wurden auf eine einheitliche Proteinkonzentration von 2 µg/µl mit 25 mM Tris/HCl pH 7,6 verdünnt und anschließend mit SDS-Probenpuffer (1,25 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 1,00 ml Glycerin; 2,00 ml 10 % SDS; 0,50 ml Merkaptoethanol; 0,25 ml 1 % Bromphenolblau-Lösung) 1 : 1 gemischt.

Nach 5-minütigem Erhitzen der Proben in kochendem Wasser und anschließendem Abkühlen wurden 5 bzw. 10 µl der Proteinlösung auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker diente der Prestained SDS-PAGE Standard low Range von BIO-RAD, der einen Molekulargewichtsbereich von 20,7 kD (Lysozym), 28,8 kD (Trypsininhibitor, Soja), 34,3 kD (Carbonic anhydrase), 50 kD (Ovalbumin), 77 kD (Rinderserumalbumin) und 103 kD (Phosphorylase B) markiert.

**Tab.3** Zusammensetzung der verwendeten Gele für die SDS-PAGE

	<b>Fußkleber</b>	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
30 % Acrylamid/Bis (37,5 : 1)	1,5 ml	2,33 ml	0,675 ml
Trenngelpuffer pH (8,8)	1,1 ml	2,33 ml	
Sammelgelpuffer pH (6,8)			2,5 ml
aqua bidest	1,054 ml	2,31 ml	1,8 ml
TEMED	36 µl	5,8 µl	5 µl
APS	60 µl	23 µl	25 µl

### 3.5.3.4 Proteinfärbung

Für die Anfärbung der Proteine im Gel wurde der Farbstoff Coomassie-Brillant Blue 200 R (SERVA) verwendet, der auch bei der Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) eingesetzt wird. 0,1 g des Farbstoffes wurden in 50 ml Methanol gelöst und mit 8 ml Eisessig und 42 ml aqua bidest aufgefüllt. Das Gel wurde in dieser Lösung für 1 Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend unter mehrfachem Austausch der Lösung in 0,8 % Essig und 50 % Methanol entfärbt. Zur Aufbewahrung wurden die Gele in Folie eingeschweißt und im Kühlschrank gelagert. Nachteilig ist bei dieser Methode, dass es beträchtliche Extinktionsdifferenzen zwischen unterschiedlichen Proteinen gibt.

### 3.5.3.5 Geldokumentation

Die fertigen Gele wurden mit einer Digitalkamera fotografiert und anschließend qualitativ und quantitativ ausgewertet.

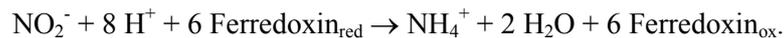
### 3.5.4 Bestimmung der Enzymaktivitäten wichtiger Schlüsselenzyme der Nitratassimilation

Es wurden die *in vitro* Aktivitäten von Schlüsselenzymen der pflanzlichen Nitratassimilation bestimmt, die folgende Reaktionen katalysieren:

NADH-Nitratreduktase (NR) (EC 1.6.6.1)



Nitritreduktase (NIR) (EC 1.7.7.1)



#### 3.5.4.1 Gewinnung des Rohenzymextraktes für NR/NIR-Aktivitätsbestimmung

Die Aktivitätsstudien wurden mit dem Rohenzymextrakt durchgeführt. Für die Gewinnung des Extraktes wurde das Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen und in den Aufschlusspuffer (0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,5; 1 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ; 0,5 % Rinderserumalbumin [w/v]; 1 % PVPP [w/v]; 0,1 % Triton X-100 [w/v]; 10 mM Cystein-HCl [täglich frisch dazu]; 5 mM Dithioerythriol [täglich frisch dazu]; 20  $\mu\text{M}$  FAD [täglich frisch dazu]) aufgenommen.

Dabei wurde das Verhältnis Pflanzenmaterial zu Aufschlusspuffer für die Nadeln von *Pinus sylvestris* mit 5 : 1 und für *Tropaeolum majus* und *Zea mays* mit 8 : 1 gewählt. Anschließend erfolgte eine Homogenisierung mit dem Ultraturrax für 60 s unter Eiskühlung. Nach einer 45 minütigen Zentrifugation des Homogenisates bei 2 °C mit 10 000 rpm wurde der Überstand über Schwarzbandfilter mittels Wasserstrahlpumpe abfiltriert und als Rohenzymextrakt eingesetzt.

#### 3.5.4.2 Bestimmung der NADH-Nitratreduktase-Aktivität

Die Aktivität der Nitratreduktase wurde durch Messung der Konzentration des Nitrits als Produkt der enzymatischen Umsetzung von Nitrat zu Nitrit bestimmt. Der Testansatz enthielt in 1 ml 34 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,5; 25 mM  $\text{KNO}_3$ ; 20  $\mu\text{M}$  FAD; 250  $\mu\text{M}$  NADH und maximal 300  $\mu\text{l}$  Rohenzymextrakt. Gestartet wurde die Reaktion nach 3 minütiger Vorinkubation bei 30 °C durch Zugabe des NADH. Nach 20 min Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion mit 100  $\mu\text{l}$  1 M Zinkacetat-Lösung abgestoppt. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der kein NADH enthielt. Die Linearität der Reaktion zwischen 0 und 30 min wurde in Vorversuchen sichergestellt. Die Proben wurden nach der Zinkacetatfällung 10 min bei 15 000 rpm zentrifugiert.

Der Nitritgehalt der Proben wurde mit der Geris-Ilovay-Methode (modifiziert nach Snell & Snell, 1949) bestimmt. Zunächst wurde das überschüssige NADH, welches die Farbreaktion stören würde, mit 50  $\mu\text{l}$  0,18 mM Phenanzinmethosulfat in 550  $\mu\text{l}$  Probe über 30 min im Dunkeln bei RT oxidiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,25 ml 1 % Sulfanilamid (w/v) in 1,5 N HCl und 0,25 ml 0,02 % N(1-Naphtyl)ethylendiamindihydrochlorid (w/v). Nach 10 min wurde die Extinktion des entstandenen Azofarbstoffes bei 540 nm mit einem Spektralphotometer (CADAS 100, Dr. Lange) gemessen. Anhand einer Kalibrierkurve wurde die Nitritkonzentration berechnet. Die Bezugsgröße der Enzymaktivitäten ist das Frischgewicht, da die Anwesenheit von BSA im Extraktionspuffer die Werte einer Proteinbestimmung verfälscht.

### 3.5.4.3 Bestimmung der Nitritreduktase-Aktivität

Die Nitritreduktaseaktivität wurde über den Verbrauch von Nitrit, verglichen mit der Nullzeit, bestimmt. Der Testansatz enthielt in 1 ml 64 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,5; 0,6 mM  $\text{KNO}_2$ ; 2,9 mM Methylviologen (täglich frisch angesetzt); 50  $\mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_4$  (50 mg/ml in 0,29 N  $\text{NaHCO}_3$ , ganz frisch) und max. 200  $\mu\text{l}$  Rohenzymextrakt. Nach Vorinkubation bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe des Natriumdithionits gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C über 15 min. Danach wurde die Reaktion abgestoppt, indem 50  $\mu\text{l}$  der Testlösung in 950  $\mu\text{l}$  aqua bidest pipettiert und kräftig geschüttelt wurde. Die Nitritbestimmung erfolgte wie unter 3.5.4.2 beschrieben. Die Linearität der Enzymreaktion wurde wiederum in Vorversuchen sichergestellt.

### 3.5.5 Bestimmung der Glutathion-S-Transferase-Aktivität

#### 3.5.5.1 Gewinnung des Rohenzymextraktes für GST-Aktivitätsbestimmung

Die Untersuchung der GST-Aktivitäten wurde mit Rohenzymextrakt durchgeführt. Das bei -80 °C tiefgefrorene Pflanzenmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen und anschließend in kalten Aufschlusspuffer (0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ ; pH 7,8; 5 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ; 1 % PVPP; 0,5 % Triton X-100) aufgenommen.

Das Verhältnis zwischen Pflanzenmaterial und Aufschlußpuffer war bei *Zea mays* und *Pinus sylvestris* 1 : 8 (w/v) und bei *Tropaeolum majus* 1 : 40 (w/v). Dieser Ansatz wurde 60 s im Ultraturrax unter Eiskühlung homogenisiert und danach in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 10 000 U/min und 2 °C 45 min abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde über einen Schwarzbandfilter (589, Schleicher & Schuell) mittels Wasserstrahlpumpe filtriert, um noch vorhandene Schwebeteilchen zu entfernen.

#### 3.5.5.2 GST-Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der GST-Aktivität wurde nach der Methode von Harbig et al. (1974) durchgeführt. Die Bildung des bei der Reaktion entstehenden Konjugates wurde bei 340 nm mit Hilfe eines temperierbaren Zweistrahlphotometers (UVIKON 923; BIO-TEK Kontron Instruments) verfolgt. Der Testansatz enthielt 100 mM Phosphatpuffer nach SOERENSEN pH (6,4); 1 mM CDNB in Ethanol und 1 mM Glutathion. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Rohenzymextrakt gestartet. Je nach Testansatz wurden 10 - 150  $\mu\text{l}$  Enzymextrakt eingesetzt. Als Referenz diente ein Testansatz, der statt des Enzymextraktes entsprechende Volumenanteile aqua bidest enthielt. Die Extinktionszunahme wurde nach 30 s über 5 min bei 25 °C verfolgt.

Die Berechnung der GST-Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{GST-Akt. [nkat/ml]} = \frac{\Delta E/\text{min} \times V [\text{ml}]}{\epsilon \times d \times v [\text{ml}] \times 60}$$

$\Delta E/\text{min}$  = Änderung der Extinktion pro Minute

$V$  = Endvolumen des Testansatzes

$\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient des Konjugates ( $9,6 \times \text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ )

$d$  = Schichtdicke der Küvette

$v$  = eingesetztes Extraktionsvolumen

### 3.5.6 Bestimmung der effektiven Quantenausbeute des PS II über die Chlorophyllfluoreszenz

Die Chlorophyllfluoreszenz ist eine häufig angewendete Untersuchungsmethode zur Ermittlung der Schadwirkung von Stressoren auf die Photosynthese (Maxwell & Johnson, 2000). Diese Methode wurde schon erfolgreich zur Untersuchung subletaler Schäden von Schadstoffen am photosynthetischen Apparat (Brack and Frank, 1998), zur allgemeinen Bestimmung der Vitalität und des Pflanzenstresses (Sutter, 2000; Rau, 2001) und auch bereits erfolgreich bei Untersuchungen des Einflusses luftgetragener Schadstoffe (Schweitzer et al., 2000; Saitanis et al., 2001; Bortier et al., 2001) eingesetzt.

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz erfolgte mit einem Puls-Amplituden-Modulations-fluorometer (PAM-2000; Walz, Effeltrich). Es besteht aus drei Hauptkomponenten: der Grundeinheit mit verschiedenen Lichtquellen, Detektoren und der Elektronikhardware, der Spezialfieberoptik 2010-F zur Verbindung der Pflanzenprobe mit der Grundeinheit und der Auswertesoftware DA-2000, die sich zur online-Berechnung der Daten auf einem externen PC befindet.

Der am häufigsten verwendete Parameter ist die Messung der Effizienz des PS II, also der effektiven Quantenausbeute, der auch als Genty-Parameter oder Yield bekannt ist und sich aus folgender Berechnung ergibt (Maxwell & Johnson, 2000):

$$\text{Yield} = (F_m - F_t)/F_m = \Delta F/F_m$$

$F_m$  = maximale Fluoreszenz dunkel adaptierter Reaktionszentren nach einem Sättigungsblitz

$F_t$  = Fluoreszenz dunkeladaptierter Reaktionszentren.

Für die Ermittlung des Yield werden folgende Schritte automatisch vom PAM-2000 nacheinander durchgeführt.

- Anschalten Messlicht.
- Messung von  $F_t$ .
- Applizierung des Sättigungslichtblitzes.
- Messung von  $F_m$ .
- Berechnung Yield.
- Speicherung der Daten.

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz wurde bei den Begasungsversuchen mit *Pinus sylvestris* durchgeführt. Mit Hilfe von Blattklammern (Leafclips) wurden die Nadeln 10 min dunkeladaptiert. Die Leafclips wurden stets an der Nadelspitze befestigt, um eine Variation der Chlorophyllfluoreszenz durch Vermessung unterschiedlicher Nadelsegmente zu verhindern. Pro Pflanze und Trieb wurden je 5 Nadeln gemessen. Der Mittelwert berechnet sich aus allen gemessenen Werten der 4 Parallelpflanzen des jeweiligen Triebes, so dass sich ein Mittelwert aus insgesamt 20 Messwerten ergibt.

### 3.5.7 Bestimmung der Pigmentgehalte

0,5 g tiefgefrorenes Pflanzenmaterial ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) wurde mit einer Keramikscherre grob zerkleinert, mit 6 ml 100 %igem Aceton versetzt und mittels Ultraturrax unter Eiskühlung für 2 min homogenisiert. Die Extraktion der Pigmente fand über 1,5 h bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurden die Proben über Schwarzbandfilter und Wasserstrahlpumpe abfiltriert und so lange mit Aceton gewaschen, bis das Filtrat farblos war. Das resultierende Filtrat wurde mit Aceton bis auf eine Gesamtmenge von 50 ml aufgefüllt und über Nacht im Dunkeln aufbewahrt. Die Absorption wurde bei 470 nm, 662 nm und 645 nm am Spektralphotometer (CADAS, Dr. Lange) gemessen. Die Berechnung der Pigmentgehalte erfolgte nach folgender Formel:

$$\begin{aligned} \text{Chl a } [\mu\text{g/ml Extrakt}] &= 12,21 \times E_{663} - 2,81 \times E_{646} \\ \text{Chl b } [\mu\text{g/ml Extrakt}] &= 20,13 \times E_{646} - 5,03 \times E_{663} \\ \text{Carotinoide } [\mu\text{g/ml Extrakt}] &= \frac{1000 \times E_{470} - 3,27 \times \text{Chl a} - 104 \times \text{Chl b}}{229} \end{aligned}$$

### 3.5.8 Bestimmung der TCA-Gehalte von Nadelproben

Die Bestimmung der TCA-Gehalte in den Nadeln von *Pinus sylvestris* erfolgte im Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle in der Sektion Analytik unter der Leitung von Dr. Weissflog und wurde nach der Methode von Weissflog et al. (1999) bestimmt. Dabei wurde die TCA bei  $65^{\circ}\text{C}$  thermisch zu Trichlormethan decarboxyliert und anschließend gaschromatographisch analysiert. Die Analysen erfolgten an einem Headspace sampler HP-7694 (Hewlett-Packard) und einem Gaschromatographen mit einem Elektroneneinfangdetektor (ECD) HP-589111 (Hewlett-Packard) unter folgenden Bedingungen:

Probe	2,5 g FG
Kapillare	l = 25 m; d = 0,32 mm; CP-SIL5CB; Schichtdicke = 5 $\mu\text{m}$
Injector	split, $250^{\circ}\text{C}$
Detector	ECD, $300^{\circ}\text{C}$
Trärgas	Stickstoff
Temperaturprogramm	$35^{\circ}\text{C}$ (3 min) $\rightarrow$ $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $\rightarrow$ $200^{\circ}\text{C}$ (1 min) $\rightarrow$ $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $\rightarrow$ $260^{\circ}\text{C}$ (3,5 min)

### 3.6 Statistik und Fehlerberechnung

Die Bestimmung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Analysendaten erfolgten mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes MS Excel 97.

Korrelationen wurden durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten  $r$  mittels MS Excel 97 bestimmt. Damit kann bestimmt werden, in welchem Maß Änderungen zweier Variablen miteinander verknüpft sind. Je näher  $r$  an  $\pm 1$  liegt, desto enger ist der Zusammenhang zwischen den zwei Variablen.  $r$  kann Werte zwischen  $-1$  und  $+1$  annehmen, wobei das Vorzeichen die Steigung der Geraden beschreibt. Liegt ein gleichsinniger Zusammenhang vor, so ist  $r$  positiv, bei einer gegensinnigen Korrelation ist  $r$  negativ (Bärlocher, 1999).

Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen zwei Proben wurde der t-Test mit MS Excel 97 durchgeführt. Der dabei angegebene p-Wert wird als  $\alpha$ -Wert, Signifikanzniveau oder Irrtumswahrscheinlichkeit bezeichnet. In der Biologie hat sich ein p-Wert von 0,05 durchgesetzt, d. h. liefert der t-Test einen p-Wert  $< 0,05$ , so unterscheiden sich die Messwerte signifikant voneinander (Bärlocher, 1999). Bei einem p-Wert  $< 0,01$  liegt eine starke Signifikanz vor. Dieser Wert wird herangezogen, wenn die Fehlerentscheidung schwerwiegende Folgen hätte. Bernoulli legte einen Wert von 0,001 fest, liegt der erhaltene p-Wert unter dieser Grenze, so besteht eine hohe Signifikanz.

Für einen Vergleich zwischen mehr als zwei Kennwerten wurde die Varianzanalyse (ANOVA) mit KyPlot (Version 2) durchgeführt. Dabei wurde der F-Wert bestimmt, der sich aus dem Quotienten der Versuchsfehler und dem Restfehler ergibt. Je höher dieser Wert ist, desto größer ist der Einfluss der Behandlung auf die Messdaten (Bärlocher, 1999). Aus einer Tabelle mit kritischen F-Werten und einem p-Wert = 0,05 wurde die Signifikanz abgeschätzt.

Bei dem Vergleich zwischen Belastung und Kontrolle wurde zunächst aus allen Messwerten einer Messreihe der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Aus diesen Mittelwerten wurde die Belastung prozentual zur Kontrolle berechnet. Ein Prozentsatz über 100 % bedeutet eine Förderung und unter 100 % eine Hemmung des jeweiligen Untersuchungsparameters. Zur Berechnung der Abweichung des Wertes, bedingt durch die Standardabweichungen der zwei Messreihen, wurde das Fehlerfortpflanzungsgesetz nach Gauß angewendet (Bartsch, 1984). Die Fehlerfortpflanzung gibt den Fehler an, der entsteht, wenn eine Größe (rel. Hemmung) aus mehreren fehlerbehafteten Messwerten berechnet wird.

Das Fehlerfortpflanzungsgesetz für zufällige Fehler nach Gauß lautet:

$$s_y = \sqrt{\sum_{v=1}^r \left( \frac{\partial f}{\partial x_v} \right)^2} s_x^2$$

$s_y$  = Fehler der resultierenden Größe (in diesem Fall angegeben in %)

$\frac{\partial f}{\partial x_v}$  = partielle Ableitung der Funktion  $f(x_1, \dots, x_n)$  nach  $x_i$

$s_x^2$  = Varianz der fehlerbehafteten Messgröße

## 4 Ergebnisse und Diskussion

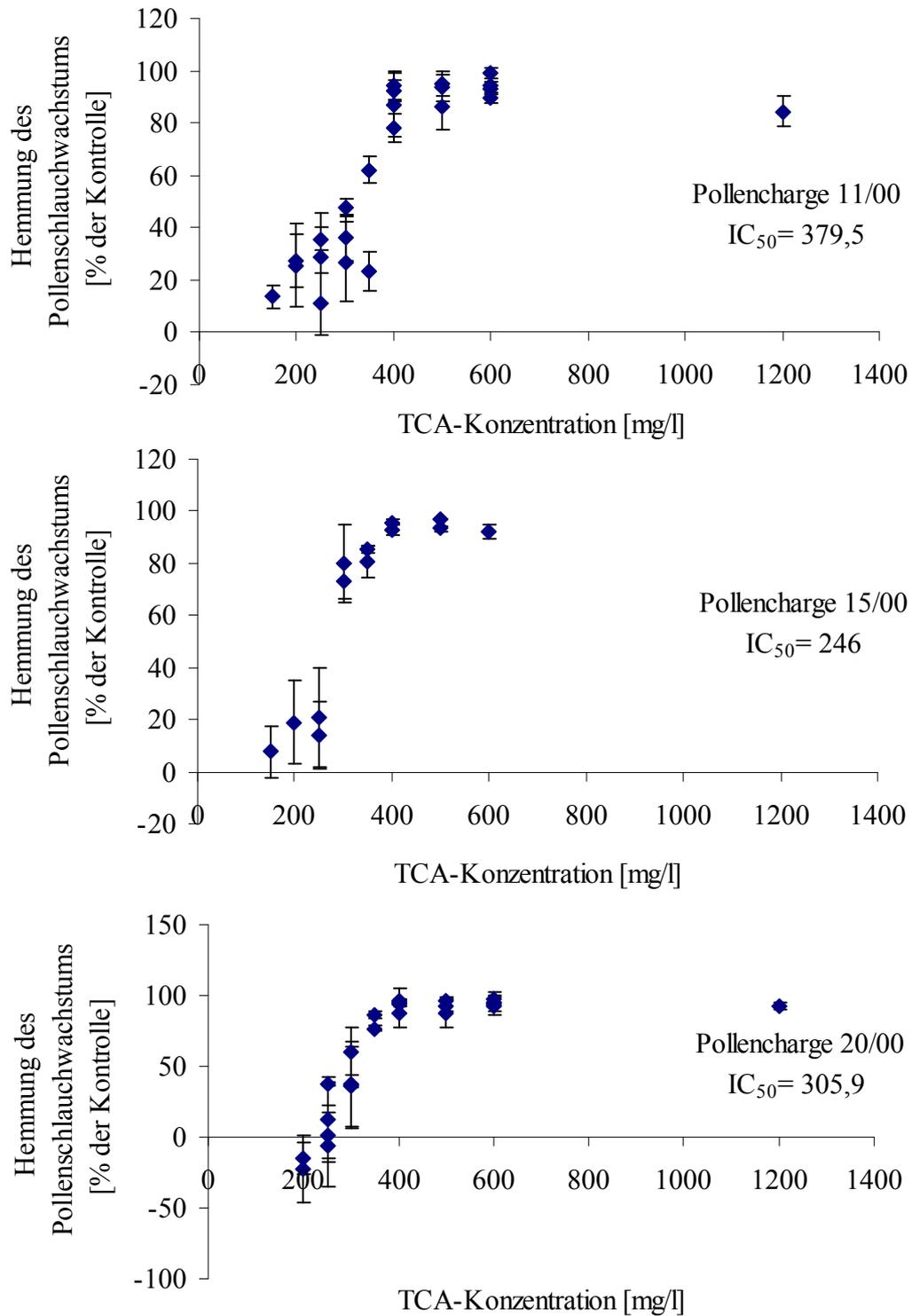
### 4.1 Versuchsebene 1: Standardisierte Labortests

Um schnell und effizient eine Risikobewertung für ökotoxikologisch relevante Stoffe durchführen zu können und mögliche phytotoxische Effekte von bioaktiven Substanzen, Chemikalien und Umweltproben zu ermitteln, bedarf es einfacher, reproduzierbarer und sensitiver Labortestsysteme. Um die Umweltrelevanz von Xenobiotika abschätzen zu können, wird vielfach der Einsatz von Testbatterien gefordert (Rojicková-Patroťová et al. 1998; Maxam et al. 2000). Es sollte darauf geachtet werden, dass Testsysteme verschiedener trophischer Ebenen und Organisationsstufen zum Einsatz kommen.

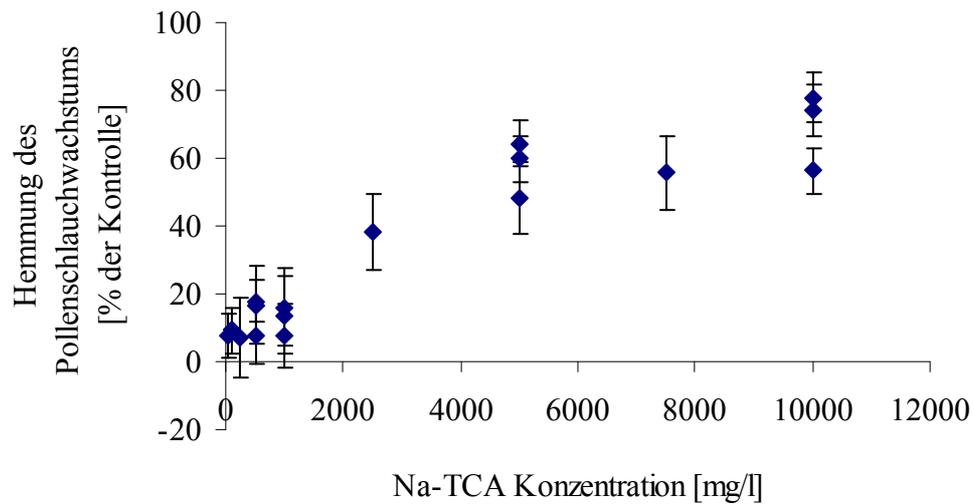
Für die Einschätzung des Wirkungspotentials von TCA und Na-TCA wurden 2 Biotests, der PTG-Test und der ESIMA herangezogen, wobei der ESIMA mit 2 verschiedenen Testorganismen, der Grünfüttererbse *Pisum arvense* und der Gartenkresse *Lepidium sativum*, durchgeführt wurde.

#### 4.1.1 Ergebnisse des Pollenschlauchwachstumstests (PTG-Test)

Dieser Test wurde mit 3 verschiedenen Pollenchargen von *Nicotiana sylvestris* durchgeführt, die jeweils mindestens zwei mal wiederholt wurden. In der Abbildung 5 ist die Hemmung des Pollenschlauchwachstums in Abhängigkeit verschiedener TCA-Konzentrationen bei den drei Pollenchargen dargestellt, wobei jeder Punkt die errechnete Hemmung gegenüber der Kontrolle pro Test darstellt. Bei jedem Test wurden immer mindestens 3 Parallelansätze für jede Konzentration angesetzt. Alle drei Pollenchargen zeigen eine ähnliche Konzentrations-Wirkungskurve. Während bei Pollen 11/00 schon bei einer TCA-Konzentration von 200 mg/l über 20 % Hemmung ermittelt werden konnte, ist dies bei den anderen zwei Pollen erst ab 300 mg/l möglich; Pollen 20/00 zeigt bei geringen Konzentrationen sogar eine leichte Stimulierung des Pollenschlauchwachstums. Eine 90 %ige Hemmung wurde bei allen Pollen bei einer Konzentration von ca. 400 mg TCA/l erreicht. Die Streuung zwischen den einzelnen Testdurchläufen ist bei einzelnen Konzentrationen zum Teil groß, besonders bei den niedrigen Konzentrationen. Der ermittelte Fehler schwankt zwischen 1 und 18 % und liegt nur bei Pollen 20/00 bei den niedrigen Konzentrationen zum Teil über 20 %. Die berechneten  $IC_{50}$ -Werte für TCA pro Test und Pollencharge sind in Tabelle 4 aufgelistet. Bei Pollen 15/00 ist der errechnete  $IC_{50}$ -Wert nur eine Abschätzung, da für die lineare Interpolation zwischen 20 %- und 80 %-Hemmungen infolge des steilen Anstiegs der Kurve keine Werte vorliegen. Im Mittel ergibt sich ein  $IC_{50}$ -Wert von  $318,1 \pm 71,3$  mg TCA/l, das entspricht einer Molarität von 1,94 mmol TCA.



**Abb. 5** Hemmung des Pollenschlauchwachstums nach 18-stündiger TCA-Belastung in Abhängigkeit von der TCA-Konzentration und von der Pollencharge mit 3 Testwiederholungen (n = 3 pro Test).



**Abb. 6** Hemmung des Pollenschlauchwachstums nach 18-stündiger Na-TCA-Belastung in Abhängigkeit von der TCA-Konzentration und von der Pollencharge mit 3 Testwiederholungen (n = 3 pro Test).

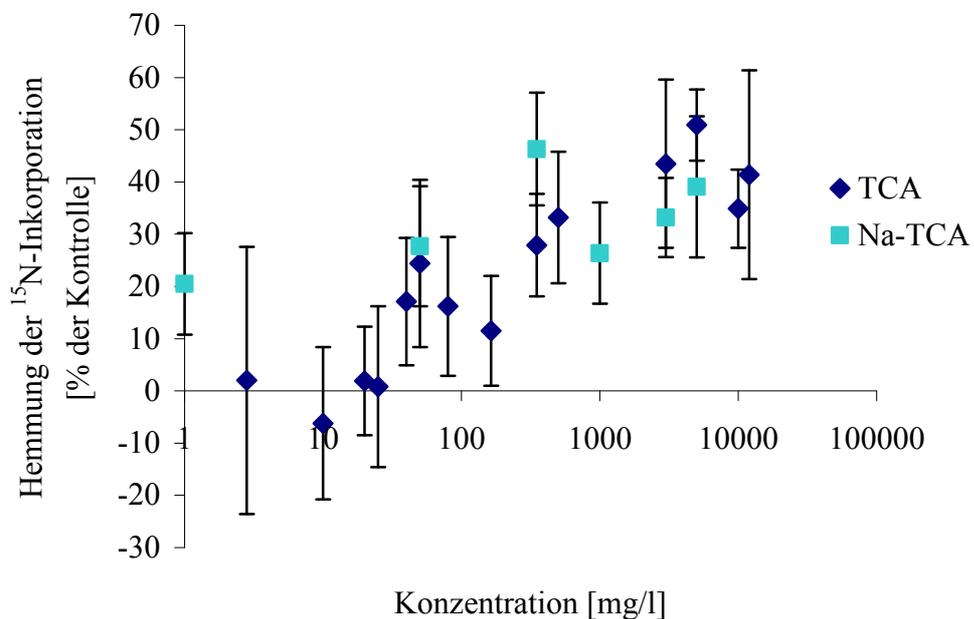
**Tab. 4** berechnete  $IC_{50}$ -Werte [mg/l] für Trichloressigsäure und Natriumtrichloressigsäure beim Pollenschlauchwachstumstest in Abhängigkeit von den Pollenchargen.

	TCA			Na-TCA
	11/00	15/00	20/00	20/01
<b>Pollencharge</b>	11/00	15/00	20/00	20/01
<b><math>IC_{50}</math>-Werte</b>	465,2	276,8	289,9	3538,08
	331,4	215,3	315,7	3415,28
	341,8		309,0	
<b>Mittelwert</b>	379,5	246	305,9	3476,7
<b>Standardabweichung</b>	74,5	43,5	13,4	86

Für das Natriumsalz der Trichloressigsäure wurde der PTG-Test nur mit einer Pollencharge (20/01) getestet. Im Vergleich zur Säure zeigt die Na-TCA erst ab 2,5 g/l eine signifikante Hemmung ( $p < 0,05$ ) des Pollenschlauchwachstums. Der errechnete  $IC_{50}$ -Wert liegt bei  $3\,476 \pm 86$  mg/l.

#### 4.1.2 Ergebnisse des $^{15}\text{N}$ -Stoffwechselfests (ESIMA)

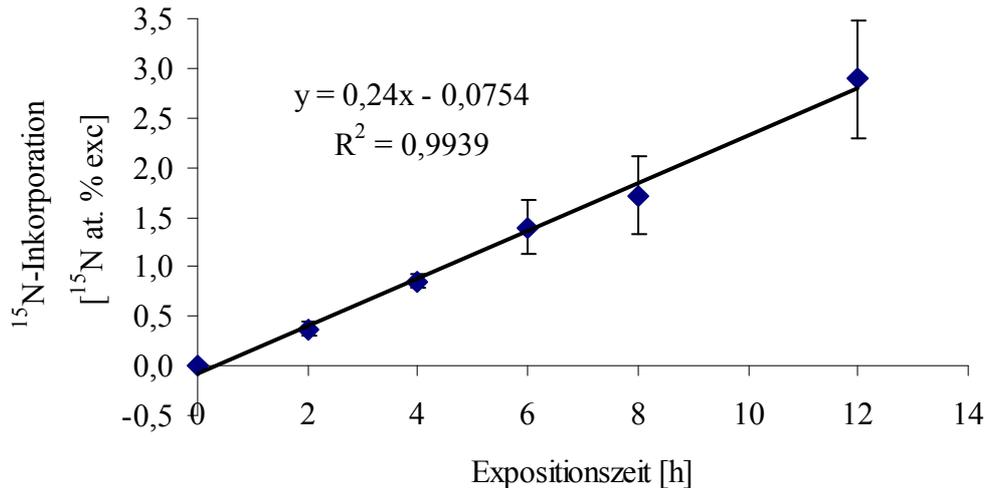
Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung für TCA und Na-TCA des ESIMA mit *Pisum arvense* sind in der Abb. 7 graphisch dargestellt. Sie zeigt bei beiden Substanzen eine logarithmische Zunahme der Hemmung. Eine Hemmung über 50 % konnte sowohl bei TCA, als auch bei Na-TCA nicht ermittelt werden, wodurch eine exakte Berechnung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes nicht möglich ist. Anhand einer Extrapolation sind  $\text{IC}_{50}$ -Werte für TCA von ca. 21 g/l und für Na-TCA von ca. 4 460 g/l zu erwarten. Der Wert für Na-TCA ist nicht praxisrelevant, da die Löslichkeitsgrenze für Na-TCA im wässrigen System bei 1 200 g/l liegt.



**Abb.7** Hemmung der  $^{15}\text{NH}_4^+$ -Inkorporation in Epikotylsegmente von *Pisum sativum* nach zwei stündiger Exposition mit TCA und Na-TCA in Abhängigkeit von der Konzentration.

Bei dem ESIMA mit *Lepidium sativum* wurden sowohl die Konzentrations-Wirkungsbeziehung, als auch der Einfluss der Expositionsszeit auf die Wirkung von TCA und Na-TCA untersucht.

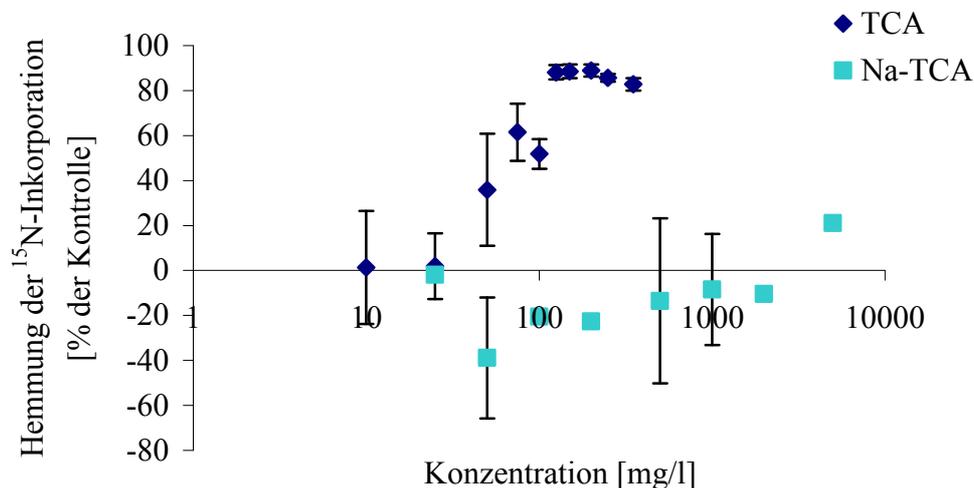
Zunächst wurde die  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation ohne Belastung mit Schadstoffen über einen Zeitraum von 12 Stunden ermittelt. Dadurch wurde der Bereich der linearen Tracerinkorporation über diesem Zeitraum geprüft und eine geeignete Expositionsszeit festgesetzt. Wie in Abb. 8 dargestellt wird deutlich, dass über 12 Stunden die  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation in die Gesamtstickstofffraktion der Kressepflanzen linear mit einem Anstieg von 0,24 at.-% exc. pro Stunde ansteigt ( $r = 0,99$ ). Anhand dieser Ergebnisse wurde für weitere Tests eine optimale Expositionsszeit von 5 Stunden festgelegt.



**Abb. 8**  $^{15}\text{NH}_4^+$ -Inkorporation in den Spross von *Lepidium sativum* in Abhängigkeit von der Expositionszeit (n = 5).

Für die Erstellung der Konzentrations-Wirkungskurve mit TCA (vgl. Abb. 9) wurden 9 verschiedene Konzentrationen zwischen 10 und 350 mg TCA/l getestet, wobei Konzentrationen bis 25 mg/l keine signifikanten Wirkungen zeigten. Bei höheren Konzentrationen steigt die Hemmung sprunghaft an und erreicht bei 150 mg TCA/l eine Hemmung der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation von über 88 %.

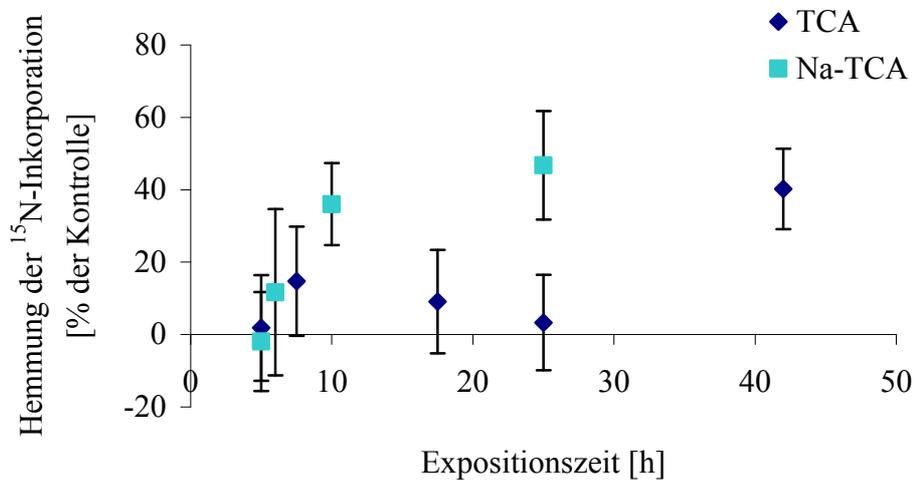
In Vergleich zu TCA zeigt Na-TCA im Konzentrationsbereich zwischen 25 und 2 000 mg/l eine Förderung der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation gegenüber der Kontrolle. Erst bei 5 g/l ist eine geringe Hemmung von 21 % ersichtlich.



**Abb. 9** Hemmung der  $^{15}\text{NH}_4^+$ -Inkorporation in den Spross von *Lepidium sativum* nach 5-stündiger Exposition mit TCA und Na-TCA in Abhängigkeit von der Schadstoffkonzentration (n = 5).

Eine Berechnung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes ist nur bei TCA möglich und wurde mit 63,38 mg/l ermittelt. Bei Na-TCA wurde eine Hemmung über 50 % nicht erreicht. Die Extrapolation ergibt einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 17 271 g/l, der wegen der Löslichkeitsgrenze (1 200 g/l) nicht praxisrelevant ist.

Die zeitabhängige Wirkung von TCA und Na-TCA wurde mit einer TCA- bzw. Na-TCA-Konzentration von 25 mg/l, die nach 5 Stunden noch keine Wirkung zeigte, durchgeführt. Die Ergebnisse dazu sind in Abb. 10 dargestellt. Anhand dieser Graphik lässt sich erkennen, dass bei Na-TCA eine längere Inkubationszeit über 25 Stunden die Empfindlichkeit des Testsystems erhöht. Für TCA kann erst nach 40 Stunden eine Erhöhung der Wirkung beobachtet werden.



**Abb.10** Hemmung der  $^{15}\text{NH}_4^+$ -Inkorporation in den Spross von *Lepidium sativum* nach einer Exposition von 25 mg/l TCA bzw. Na-TCA in Abhängigkeit von der Expositionszeit (n = 5).

### 4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

- Mit dem Pollen Tube Growth Test konnte ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert bei TCA von 318 mg/l und bei Na-TCA von 3 476 mg/l ermittelt werden.
- Bei dem ESIMA mit *Pisum arvense* wurde sowohl bei TCA, als auch bei Na-TCA keine 50 %ige Hemmung der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation erreicht. Die extrapolierten  $\text{IC}_{50}$ -Werte liegen für TCA bei 21 g/l und für Na-TCA bei 4 460 g/l, der jedoch nicht praxisrelevant ist.
- Mit dem ESIMA mit *Lepidium sativum* wurde bei TCA ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 63 mg/l ermittelt. Damit ist dieser verglichen mit den anderen beiden Testsystemen der sensitivste. Bei Na-TCA konnte mit diesem Test keine Hemmung festgestellt werden. Die Extrapolation ergab einen nicht praxisrelevanten  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 17 271 g/l.
- Die Expositionszeit hat einen entscheidenden Einfluss auf die Wirkung von TCA und Na-TCA bei dem ESIMA mit *Lepidium sativum*.

### 4.1.4 Diskussion

Die Biotests liefern Basisinformationen, die zur Abschätzung des Gefährdungspotentials von Stoffen dienen (Steinhäuser & Hansen, 1992). Häufig werden toxikologische Kenngrößen, wie der  $\text{IC}_{50}$ -Wert, angegeben. Sie können jedoch nicht zur unmittelbaren Voraussage bestimmter Effekte in der Umwelt herangezogen werden (Nusch 1993).

## Einführung PTG- Test und ESIMA

Die zwei verwendeten Biotests unterscheiden sich grundlegend voneinander. Der PTG-Test ist ein *in vitro* Screening-Verfahren zur Bestimmung der Zytotoxizität von Chemikalien und Umweltproben (Kristen & Kappler 1995; Schüürmann et al. 1996; Kristen et al. 1999). Als Messparameter werden die Pollenkeimung und das Schlauchwachstum herangezogen. Pollenschläuche unterschiedlicher Samenpflanzen wurden schon seit längerem zur Toxizitätsabschätzung herangezogen. Durch die von Kappler & Kristen (1995) etablierte Methode zur photometrischen Quantifizierung des Pollenschlauchwachstums über das Anfärben der Zellwände mit Alcian blue ist dieser Test bei geringem Aufwand schnell und effizient (Kristen et al., 2001).

Der ESIMA ist ein Phytotoxizitätstest, der über die Hemmung des Einbaus von stabilisiertem Stickstoff eine Aussage zur Wirkung von Umweltproben oder Chemikalien auf den Stickstoffstoffwechsel der Pflanze trifft. Getestet wird der Einfluss der Substanz auf die metabolische Aktivität der Pflanze. Er wurde mit dem Testorganismus *Pisum arvense* etabliert (Jung et al., 1999). Mit der Gartenkresse *Lepidium sativum* wurde der Test im Hinblick auf den Einsatz bei intakten Pflanzen weiterentwickelt. Dies hat den Vorteil, dass Aufnahmesysteme über die Wurzel, Transport des Schadstoffes in den Pflanzen und Einfluss auf die Photosynthese in die Wirkung einbezogen werden. Dies ist für ein Testsystem, das zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien und Umweltproben eingesetzt wird, wichtig. Der Einsatz dieser zwei Testsysteme unterschied sich grundlegend voneinander. Zum einen werden verschiedene Pflanzenarten herangezogen, die individuell verschieden auf Schadstoffe reagieren. Zum anderen werden bei *Pisum arvense* einheitliche Epikotylsegmente eingesetzt, während bei *Lepidium sativum* die ganze Pflanze in diesen Test integriert ist. Aus diesem Grunde ist eine differenzierte Wirkung zwischen den zwei Testsystemen zu erwarten.

Sowohl die Pollenschläuche von *Nicotiana sylvestris* als auch die Epikotylsegmente von *Pisum arvense* besitzen keine Chloroplasten und ähneln in dieser Hinsicht dem tierischen Gewebe. Diese nicht-grünen pflanzlichen Zellsysteme eröffnen die Möglichkeit, die Anwendungsgebiete nicht nur in die Ökotoxikologie, sondern auch auf die Risikoabschätzung im humantoxikologischen Bereich auszudehnen. In der europäischen COLIPA-Studie, die von der kosmetischen Industrie initiiert wurde, wurden mehrere *in vitro* Testverfahren zur Risikoabschätzung im Hinblick auf Alternativmethoden zu tierischen Testsystemen evaluiert. Die Ergebnisse zeigten, dass der PTG-Test vergleichbare Ergebnisse gegenüber dem Kaninchenaugen-Irritationstest liefert, der in dieser Studie zur Auswertung herangezogen wurde (Kristen et al., 1999). Anhand des Resultates kann der PTG-Test als mögliche Alternative zu tierischen Testsystemen diskutiert werden (Kristen et al., 2001). Der ESIMA wurde auf dieser Ebene noch nicht evaluiert, besitzt jedoch ein vergleichbares Potential.

Ausgehend von der grundlegenden Verschiedenheit dieser zwei Testsysteme sind die gewonnenen Ergebnisse differenziert zu betrachten.

### IC<sub>50</sub>-Werte im Vergleich zu Literaturangaben

Mit dem PTG-Test wurden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt und ein statistisch abgesicherter IC<sub>50</sub>-Wert für TCA und Na-TCA ermittelt, wohingegen die Berechnung eines IC<sub>50</sub>-Wertes beim ESIMA mit *Pisum arvense* nicht möglich war, weil eine 50 %ige Hemmung nicht erreicht wurde. Beim ESIMA mit *Lepidium sativum* konnte nur bei TCA der IC<sub>50</sub>-Wert berechnet werden. In der Tab. 5 sind die Ergebnisse von TCA mit in der Literatur bekannten Angaben vergleichend aufgelistet. Anhand dieser Tabelle wird deutlich, dass die ermittelten toxikologischen Kenngrößen stark vom Testorganismus und der Applikationsdauer abhängig sind. Auch ist darauf hinzuweisen, dass ein LC<sub>50</sub>-Wert nicht unmittelbar mit einem IC<sub>50</sub>- oder EC<sub>50</sub>-Wert zu vergleichen ist, da bei dem LC<sub>50</sub>-Wert (lethal concentration) die Letalität als Wirkkriterium angesehen wird, während bei den anderen beiden Werten Veränderungen anderer, nicht letaler, Wirkungskriterien (z. B. Schwimmfähigkeit) bzw. die Inhibition eines Parameters untersucht wird. Die in dieser Arbeit mit dem ESIMA mit *Lepidium sativum* ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte liegen hinsichtlich der Größenordnung im Bereich des LC<sub>50</sub>-Wertes der Bohnenzellkultur. Diese Werte können jedoch nicht direkt verglichen werden, da beim Zellkulturtest der Schadstoff über 14 Tage einwirkt, während es beim ESIMA nur 5 Stunden sind. Außerdem werden beim <sup>15</sup>N-Stoffwechselltest non-letale Effekte herangezogen. Aus diesem Grunde ist der ESIMA mit *Lepidium sativum* gegenüber dem Bohnenzellkulturtest empfindlicher und schneller. Die EC<sub>50</sub>-Werte anderer terrestrischer Pflanzen, die in der Tabelle 5 aufgelistet sind, liegen zwischen 0,12 mg/kg Boden und 23 mg/kg Boden und sind, verglichen mit dem ESIMA mit *Lepidium sativum*, niedriger. Diese Testsysteme zeigen zwar eine deutlich höhere Empfindlichkeit, die Testdauer erstreckt sich jedoch über mehrere Tage. Ein direkter Vergleich der EC<sub>50</sub>-Werte von *Lepidium sativum* und den anderen terrestrischen Pflanzen ist nicht möglich, da Applikationsdauer, Testmedium und Testorganismus verschieden sind. Der mit dem PTG-Test ermittelte IC<sub>50</sub>-Wert liegt im Bereich der Bakterientoxizität. In früheren Untersuchungen zum Einfluss von TCA auf die Stickstoffaufnahme bei *Lemna minor* konnten keine Effekte beobachtet werden. Die getesteten Konzentrationen lagen jedoch im Bereich zwischen 0,05 und 0,8 mg/l und waren wesentlich geringer, als die in dieser Arbeit getesteten Konzentrationen (Hafner et al., 2000).

Der Einfluss der Expositionsdauer auf die Toxizität von TCA und Na-TCA wurde beim ESIMA mit *Lepidium sativum* getestet. Dabei konnte eine Zunahme der Hemmung der <sup>15</sup>N-Inkorporation in die Pflanzen mit zunehmender Expositionszeit ermittelt werden, die besonders bei Na-TCA deutlich wurde.

**Tab. 5** Wirkung von TCA in unterschiedlichen Testsystemen

<b>Organismus</b>	<b>Parameter</b>	<b>Wert</b>	<b>Literatur</b>
Hafer ( <i>Avena sativa</i> )	EC <sub>50</sub> (Wachstum, 14 Tage)	< 1-23 mg/kg	Regelmann et al. (1999)
Weizen ( <i>Tritium aestivum</i> )	EC <sub>50</sub> (Wachstum, 15 Tage)	1,46 mg/kg	Regelmann et al. (1999)
Kiefer	EC <sub>50</sub> (Wachstum, 60 Tage)	0,12 mg/kg	Regelmann et al. (1999)
Wasserfloh ( <i>Daphnia magna</i> )	EC <sub>50</sub> (Schwimmunfähigkeit, 48 h)	2000 mg/l	SIDS (1997)
Bakterientoxizität	EC <sub>50</sub>	200 mg/l	EG-Sicherheitsdatenblatt (1999)
Goldorfe (Fischtoxizität)	LC <sub>50</sub> (48 h)	1000 mg/l	EG-Sicherheitsdatenblatt (1999)
Bohnenzellkultur	LC <sub>50</sub> (Wachstum, 14 d)	100 mg/l	Frank et al. (1994)
Tabakpollen ( <i>Nicotiana glauca</i> )	IC <sub>50</sub> (Keimung, Wachstum, 18 h)	318 mg/l	
Gartenkresse ( <i>Lepidium sativum</i> )	IC <sub>50</sub> (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -Aufnahme, 5h)	63,4 mg/l	
Erbsenkeimlinge ( <i>Pisum arvense</i> )	IC <sub>50</sub> (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -Aufnahme, 2h)	>1200 mg/l	

### Unterschiede zwischen TCA und Na-TCA

Die Ergebnisse der Biotests zeigen einen deutlichen Unterschied in der Wirkung zwischen TCA und Na-TCA. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Unterschiede in der Aufnahme und der Bioverfügbarkeit in der Zelle können zu differenzierten Wirkungen führen (Escher et al., 1997). Bei hohen Konzentrationen weist die TCA-Lösung einen stark sauren pH-Wert auf. Inwieweit die Testmedien in der Lage sind, den pH-Wert abzupuffern, ist im Anhang aus Tabelle 6 zu entnehmen. Aus dieser Tabelle ist erkennbar, dass das PTG-Medium die stärkste Pufferkapazität aufweist. Bei hohen Konzentrationen kann der pH-Wert-Abfall die Ursache für die beobachtete Wirkung sein. Bei geringen Konzentrationen kann eine leichte Absenkung des pH-Wertes die Wirkung von TCA noch verstärken und die großen Differenzen zwischen TCA und Na-TCA

hervorrufen. In der Literatur wird ebenfalls ein Unterschied in der Wirkung der zwei Substanzen beschrieben. Bringmann & Kühn (1982) ermittelten einen  $EC_{50}$ -Wert mit *Daphnia magna* (Schwimmfähigkeit) bei 24 h Inkubationszeit für TCA von 110 mg/l und für Na-TCA von 8 370 mg/l.

Eine Voraussetzung für die biologische Wirksamkeit eines Schadstoffes ist die Bioverfügbarkeit am Wirkungsort (Escher et al. 1997). Bei *Lepidium sativum* werden die Schadstoffe über die Wurzel appliziert, sie müssen also im Wasser gelöst sein, von der Wurzel aufgenommen und in den Symplasten transportiert werden. TCA und Na-TCA sind sehr gut wasserlöslich. Eine Aufnahme von TCA über die Wurzel wurde in der Literatur schon mehrfach bestätigt (Plümacher und Schröter 1994; Schroll et al. 1994; Sutinen et al. 1995, Matucha et al., 2001; Hafner et al. 2002a). Inwieweit sich die beiden Schadstoffe hinsichtlich ihrer Wurzelaufnahme unterscheiden, ist nicht bekannt. Die ermittelten Ergebnisse des ESIMA zeigten große Unterschiede zwischen den Epikotylsegmenten von *Pisum arvense* und der Wurzelapplikation mit *Lepidium sativum*. Während bei dem Test mit *Pisum arvense* bei beiden Schadstoffen keine 50 %ige Hemmung erreicht werden konnte, wurde bei dem Test mit *Lepidium sativum* bei TCA ein  $IC_{50}$ -Wert von 63 mg/l errechnet und bei Na-TCA keine signifikante Hemmung erreicht. Der Aufnahmepfad des Testsystems spielt in der Wirkung von TCA eine wesentliche Rolle.

### Vergleich der Testsysteme

Werden die Ergebnisse der drei in dieser Arbeit durchgeführten Testsysteme verglichen, so fällt auf, dass der neu entwickelte ESIMA mit *Lepidium sativum* bei TCA am sensitivsten ist. Er zeigt schon bei geringeren Konzentrationen eine Hemmung. Der ESIMA mit *Pisum arvense* hingegen ist unempfindlich gegenüber TCA und Na-TCA. Der PTG-Test reagiert bei TCA auch sensitiv, bei Na-TCA jedoch spricht er erst bei hohen Konzentrationen an.

In Tab. 6 sind die drei Testsysteme bezüglich einiger Parameter nochmals vergleichend aufgelistet. Alle drei Tests sind in ihrer Handhabung einfach und schnell erlernbar. In ihrer Sensitivität gegenüber TCA und Na-TCA differieren sie. Beim Pollenschlauchwachstumstest ist keine Pflanzenanzucht unmittelbar vor Versuchsbeginn notwendig, da der benötigte Pollen längere Zeit bei  $-18\text{ °C}$  lagerbar ist. Bei den anderen Tests hingegen ist eine Pflanzenanzucht über mehrere Tage notwendig.

**Tab. 6** Gegenüberstellung der verwendeten Testsysteme für TCA und Na-TCA

	<b>PTG-Test</b>	<b>ESIMA mit <i>Pisum arvense</i></b>	<b>ESIMA mit <i>Lepidium sativum</i></b>
<b>Testobjekt</b>	Pollen <i>Nicotiana sylvestris</i>	Epikotylsegmente <i>Pisum arvense</i>	Pflanzen <i>Lepidium sativum</i>
<b>Anzucht</b>	unmittelbar vor Versuchs- beginn nicht notwendig	6 Tage	5 Tage
<b>Vorbereitungszeit</b>	ca. 1 h	ca. 2 h	ca. 1 h
<b>Inkubationszeit</b>	18 h	2 h	5 h
<b>Testparameter</b>	Wachstum	<sup>15</sup> N-Inkorporation	<sup>15</sup> N-Inkorporation
<b>Handhabung</b>	einfach	einfach	einfach
<b>Testmaterial [ml]</b>	0,1	mindestens 10	mindestens 10
<b>Sensitivität bei TCA</b>	hoch	gering	hoch
<b>Sensitivität bei Na-TCA</b>	gering	gering	gering
<b>Etablierung</b>	ja	ja	neu entwickelt
<b>Reproduzierbarkeit</b>	gut	etwas schlechter	etwas schlechter

Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte liegen über dem 10 000- bis 100 000-fachen Wert, der in Oberflächengewässern gemessenen TCA-Konzentrationen (Plümacher & Renner, 1993; Frank et al., 1995; Müller et al., 1996; Klein, 1997; Römpf et al., 2001; Mc Culloch, 2002). Selbst wenn davon ausgegangen werden kann, dass eine Aufkonzentrierung von Schadstoffen in Pflanzen stattfindet, so ist es doch unwahrscheinlich, dass solche im Biotest wirksamen hohen Konzentrationen in der Natur relevant sind (Natangelo et. al., 1999).

## 4.2 Versuchsebene 2: Kontrollierte Exposition

### 4.2.1 Atmosphärische TCA-Belastung unterschiedlicher Photosynthesetypen

Bei diesen Begasungsversuchen sollte geklärt werden, ob es generelle Unterschiede zwischen C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Pflanzen hinsichtlich der Wirkung atmosphärischer TCA gibt. Dazu wurde als C<sub>3</sub>-Modellpflanze die Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) und als C<sub>4</sub>-Pflanze der Mais (*Zea mays* L.) herangezogen. Die Begasung erfolgte über 4 Tage und wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen mehrmals wiederholt, um eine konzentrationsabhängige Wirkung zu erfassen. Die Konzentrationen lagen in einem Bereich zwischen 194 µg/m<sup>3</sup> und 0,16 ng/m<sup>3</sup>. Parallel wurden Expositionsexperimente ohne Schadstoff in der Kontrollkammer durchgeführt. Um Kammereffekte auszuschließen, erfolgten ebenfalls Begasungsversuche ohne Schadstoff in der Applikationskammer. Unmittelbar an jede Exposition schloss sich die Tracergabe über 6 Stunden an. Als Wirkungsparameter wurden die Zunahme der Pflanzenhöhe, der Gesamtstickstoffgehalt, die <sup>15</sup>N-Inkorporation in Protein- und Nichtproteinfraktion, das <sup>15</sup>N-Isotopenmuster einzelner Aminosäuren der löslichen Proteinfraktion, der Gehalt an löslichen Proteinen, die Enzymaktivitäten der Nitrit- und Nitratreduktase und die Aktivität der Glutathion-S-Transferase ausgewertet.

#### 4.2.1.1 Pflanzenwachstum und Vitalität

##### Ergebnisse

Da in der älteren Literatur mehrfach erwähnt wurde, dass TCA einen Einfluss auf das Pflanzenwachstum ausübt, wurde die Pflanzenhöhe vor und nach der Begasung ermittelt und die Differenz als Zuwachs während der 4-tägigen Begasung angegeben. Der Zuwachs innerhalb dieser 4 Tage ist bei *Zea mays* mit 13 - 21 cm sehr hoch und auf die optimalen Wachstumsbedingungen in der Expositionskammer zurückzuführen (Tab. 7). Ein Unterschied zwischen Kontrolle und Belastung ist nicht ersichtlich, lediglich bei der höchsten Konzentration tritt eine minimale, nicht signifikante Wachstumsförderung auf, die einen Dosis-Wirkungszusammenhang vermuten lässt.

**Tab. 7** Zunahme der Pflanzenhöhe von *Zea mays* während einer 4-tägigen atmosphärischen Belastung mit TCA unterschiedlicher Konzentrationen (n = 21).

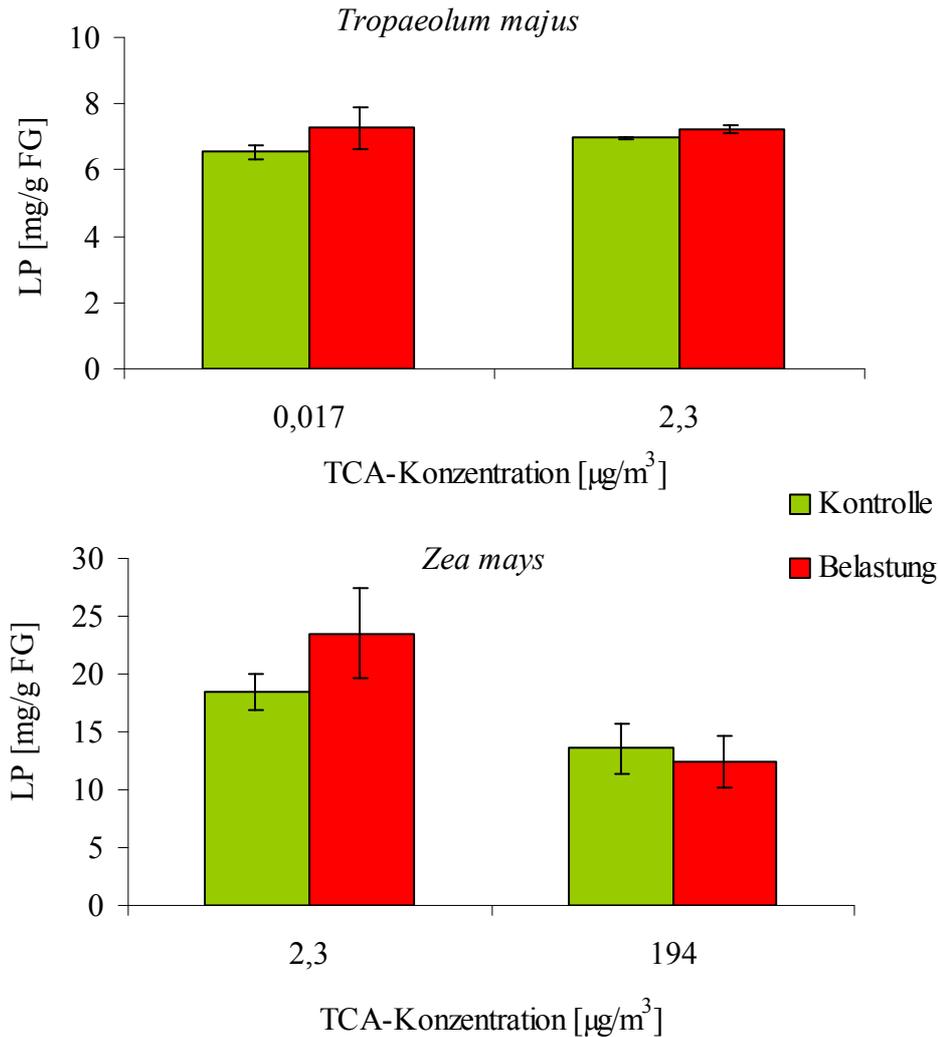
TCA-Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]	Kontrolle [cm]	Belastung [cm]	rel. Änderung [%]
194	17,8 ± 2,7	18,6 ± 2,8	+4,5
16	13,6 ± 2,0	13,5 ± 1,1	-0,7
2,3	20,8 ± 4,2	21,0 ± 3,5	+0,9
0,196	13,6 ± 2,0	13,5 ± 1,1	-0,7
0,021	13,6 ± 2,1	13,5 ± 1,2	-0,7

Bei *Tropaeolum majus* ist der Zuwachs wesentlich geringer (Tab. 8). Bei 1,5 und 0,16  $\text{ng}/\text{m}^3$  ist tendenziell ein stärkeres Pflanzenwachstum ersichtlich, aber ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Belastung tritt nicht auf, wie auch kein linearer Dosis-Wirkungszusammenhang erkennbar ist.

**Tab. 8** Zunahme der Pflanzenhöhe von *Tropaeolum majus* während einer 4-tägigen atmosphärischen Belastung mit TCA unterschiedlicher Konzentrationen (n = 25).

TCA-Konzentration [ $\text{ng}/\text{m}^3$ ]	Kontrolle [cm]	Belastung [cm]	rel. Änderung [%]
2300	2,2 ± 0,9	2,6 ± 1,1	+18,2
130	1,6 ± 1,1	1,3 ± 1,2	-18,8
17	3,3 ± 1,3	2,7 ± 1,1	-18,2
1,5	1,5 ± 0,7	1,8 ± 0,9	+20,0
0,16	1,3 ± 0,8	1,5 ± 1,2	+15,4

Zur Einschätzung des allgemeinen Vitalitätszustandes der Pflanzen wurde der Gehalt der löslichen Proteine bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt. Verglichen mit *Tropaeolum majus* weist *Zea mays* wesentlich höhere Gehalte an löslichen Proteinen auf. Tendenziell ist bei *Tropaeolum majus* bei den beiden untersuchten Konzentrationen eine leichte Erhöhung des Proteingehaltes durch die TCA-Belastung um 11,3 % (0,017  $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$ ) und 4,0 % (2,3  $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$ ) sichtbar. Eine solche Erhöhung ist bei *Zea mays* um 28 % bei 2  $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$  ebenfalls vorhanden, bei 200  $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$  tritt dagegen eine leichte Hemmung (8,8 %) auf. Die ermittelten Unterschiede weisen keine Signifikanz auf.



**Abb. 11** Gehalt an löslichen Proteinen in den Blättern von *Zea mays* und *Tropaeolum majus* in Abhängigkeit von der TCA-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (n = 4).

### Diskussion

Ein signifikant verändertes Wachstumsverhalten konnte durch atmosphärische TCA-Belastungen bei *Zea mays* und *Tropaeolum majus* nicht beobachtet werden. Die Angaben in der Literatur sind hinsichtlich dieses Parameters unterschiedlich. In der älteren Literatur wird bei höheren TCA-Konzentrationen im Wurzelraum eine Hemmung des Wachstums, hauptsächlich bei Wurzel und Spross von Keimlingen beobachtet (Zöttel, 1953; Mayer, 1957). Mayer konnte bei geringen Konzentration (16 mg/l) eine Wachstumsstimulierung beim Spross um 20 % und bei der Wurzel um 50 % beobachten. Die TCA wurde wegen der wachstumsstimulierenden Wirkung auch als auxinähnlicher Phytoeffektor angesehen (Hudson & Roberts, 1989). In anderen Studien konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden (BUA, 1996). Zahlreiche Untersuchungen hinsichtlich Wachstumsrate und Pflanzengewicht zeigten auch bei Konzentrationen im mg-Bereich bereits deutliche Hemmungen. Ergebnisse hinsichtlich des Pflanzenwachstums bei der Belastung mit atmosphärischer TCA sind bislang nicht bekannt. Die in dieser Arbeit applizierten TCA-

Konzentrationen sind sehr gering, so dass sie vermutlich akut keinen Einfluss auf das Längenwachstum ausüben können.

Durch den Einsatz als Herbizid und den zahlreich beobachteten Schadsymptomen nach TCA-Applikation (Ashton & Crafts, 1982; Kolbe & Schütte, 1982) kann davon ausgegangen werden, dass TCA in höheren Konzentrationen in den Pflanzen eine verminderte Vitalität hervorruft, die sich an einem geringeren Gehalt löslicher Proteine zeigt. Ein signifikanter Einfluss umweltrelevanter bzw. subakuter atmosphärischer TCA-Konzentrationen auf die Vitalität von *Zea mays* und *Tropaeolum majus* wurde nicht festgestellt. Eine geringe Erniedrigung des Proteingehaltes ist nur bei 200 µg TCA/m<sup>3</sup> bei *Zea mays* sichtbar. Die Erhöhung des Gehaltes an löslichen Proteinen bei der geringeren TCA-Konzentration kann möglicherweise auf eine erhöhte Expression verschiedener Stress- und Schutzproteine zurückgeführt werden.

#### 4.2.1.2. Stickstoffmetabolismus

Um diesen Parameter zu untersuchen, wurden sowohl die <sup>15</sup>N-Tracertechnik, als auch enzymatische Untersuchungen der Nitrat- und Nitritreduktase als wichtige Schlüsselenzyme der Nitratassimilation, herangezogen. Der <sup>15</sup>N-Einbau wurde sowohl in die Gesamtstickstofffraktion, in die Nichtprotein- und die Proteinfraction, als auch in einzelne Aminosäuren der löslichen Proteinfraction analysiert. Der Stickstoffstoffwechsel spielt im pflanzlichen Metabolismus eine zentrale Rolle. Eine Störung auf dieser Ebene hat weitreichende Veränderungen in der gesamten Pflanze zur Folge und jede Schädigung (z. B. verändertes Wachstum und Stress) spiegelt sich im Stickstoffmetabolismus als Grundstoffwechsel der Pflanze wider. Mit Hilfe dieser Untersuchungen sollen kausale Zusammenhänge zwischen dem Photosynthesetyp bzw. der Pflanzenart und der Empfindlichkeit gegenüber luftgetragener TCA aufgeklärt werden.

### Ergebnisse

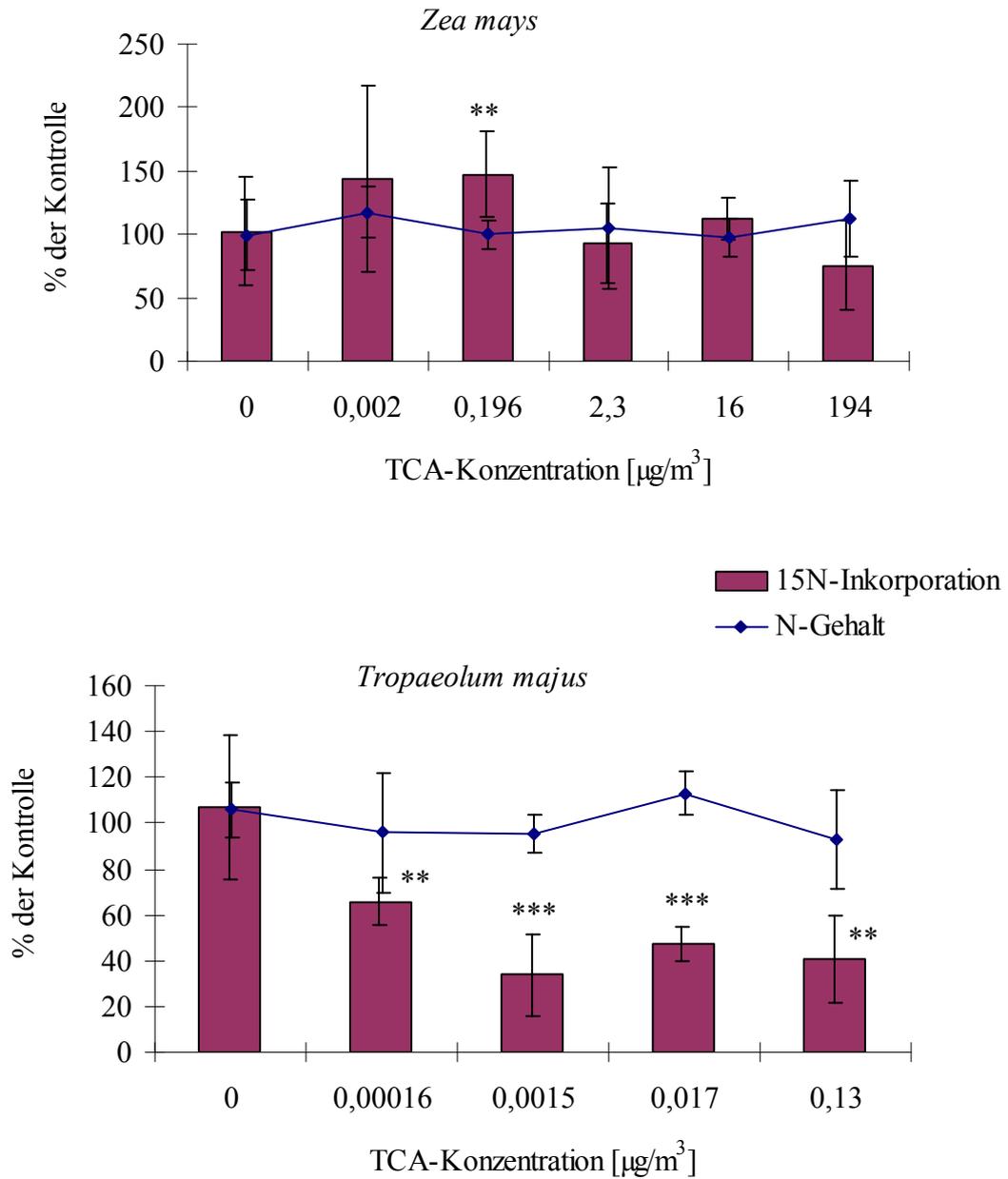
#### Gesamtstickstoff

Der Gesamtstickstoffgehalt der *Zea mays* Pflanzen betrug, bezogen auf das Frischgewicht unabhängig von der Begasungskonzentration unter den gegebenen Pflanzenanzuchtsbedingungen, durchschnittlich 0,41 %, während bei *Tropaeolum majus* der Stickstoffgehalt mit 0,71 % höher lag. Der relative N-Gehalt der mit TCA belasteten Pflanzen, bezogen auf die Kontrolle, variiert bei *Zea mays* zwischen 96 % und 118 % und liegt im Schnitt bei 104 %. Auch bei *Tropaeolum majus* konnten ähnliche Werte berechnet werden, die zwischen 93 % und 112 % liegen. In der Abbildung 12 sind die Ergebnisse des relativen N-Gehaltes und der relativen <sup>15</sup>N-Inkorporation dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass sich der Gesamtstickstoffgehalt durch die Applikation unterschiedlicher TCA-Konzentrationen nicht signifikant ändert, die <sup>15</sup>N-Inkorporationsraten hingegen sind von der TCA-Konzentration abhängig. Ein Unterschied zwischen den zwei Pflanzenarten ist ebenfalls ersichtlich. Bei *Zea mays* kommt es bei den geringeren Konzentrationen (0,002 - 0,196 µg/m<sup>3</sup>) zu einer Förderung (bis 50 %) und bei den höheren (194 µg/m<sup>3</sup>) zu einer Hemmung (bis 20 %) der <sup>15</sup>N-Inkorporation, während bei *Tropaeolum majus* die behandelten Pflanzen bei jeder untersuchten

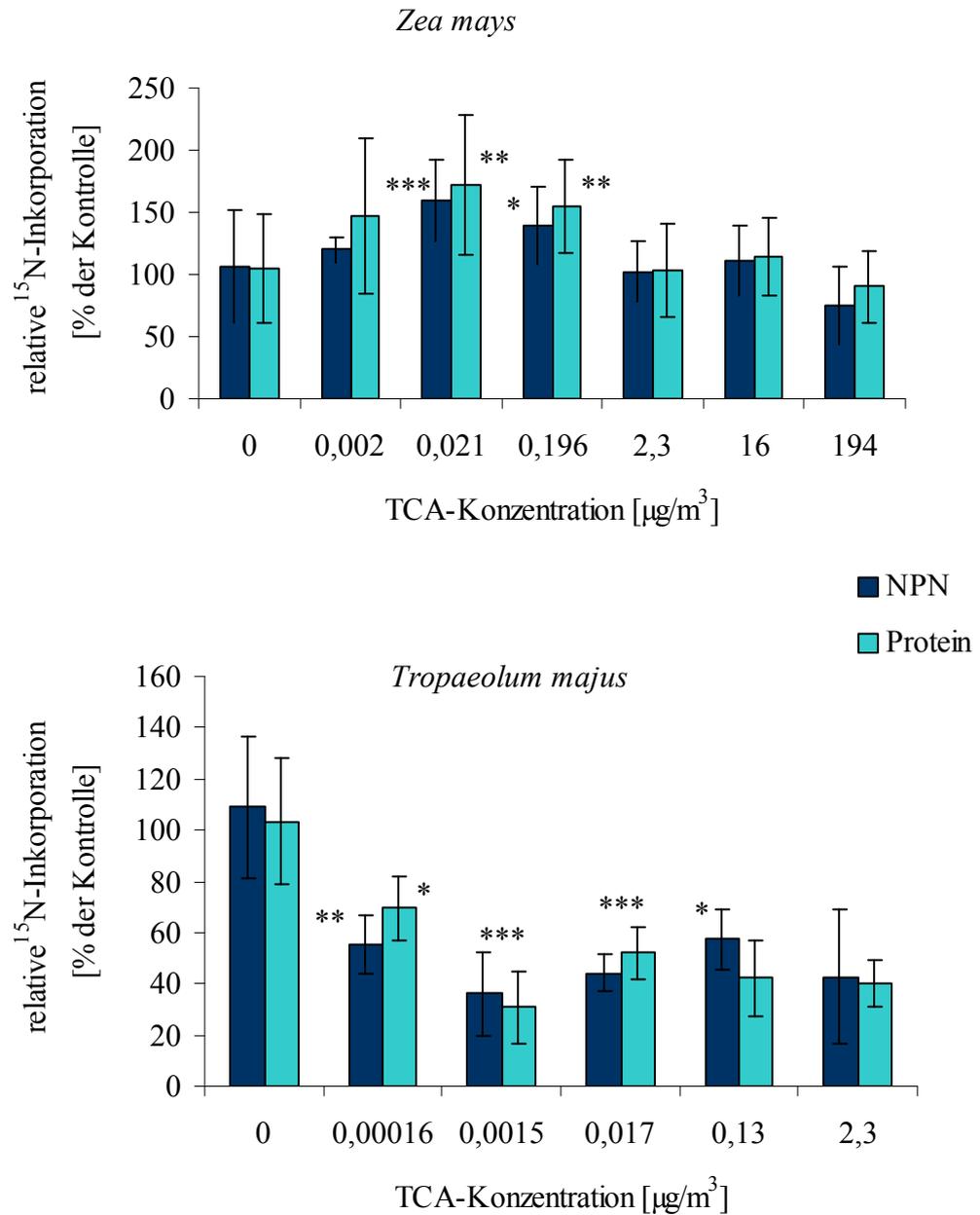
TCA-Konzentration signifikant geringere <sup>15</sup>N-Inkorporationen aufweisen. Die Hemmungen liegen zwischen 30 % und 79 %, wobei ein linearer Zusammenhang zwischen TCA-Konzentration und Hemmung der <sup>15</sup>N-Inkorporation nicht vorliegt. Lediglich bei der geringsten Konzentration ist auch die geringste Hemmung erkennbar.

#### Nichtprotein- und Proteinfraction

Eine Trennung in die Nichtprotein- und Proteinfraction ermöglicht die Untersuchung der Proteinbiosynthese. Die Ergebnisse spiegeln die Tendenz, die in der Gesamtstickstofffraction ersichtlich wurde, bei beiden Pflanzen im wesentlichen wider. Im Vergleich zwischen Protein- und NPN-Fraction wird deutlich, daß bei den *Zea mays* Pflanzen die Proteinfraction bei jeder TCA-Konzentration höhere relative Inkorporationsraten gegenüber der Kontrolle aufweist als die NPN-Fraction. Diese höheren Inkorporationsraten sind nur als Trend ersichtlich, signifikante Unterschiede zwischen Protein- und Nichtproteinfraktionen bestehen nicht. Im Gegensatz dazu ist diese Tendenz bei *Tropaeolum majus* nicht vorhanden.



**Abb. 12** Relativer Stickstoffgehalt und relative  $^{15}\text{NO}_3^-$ -Inkorporation [% der Kontrolle] in die Blätter von *Zea mays* und *Tropaeolum majus* in Abhängigkeit von der applizierten atmosphärischen TCA-Konzentration (n = 5; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

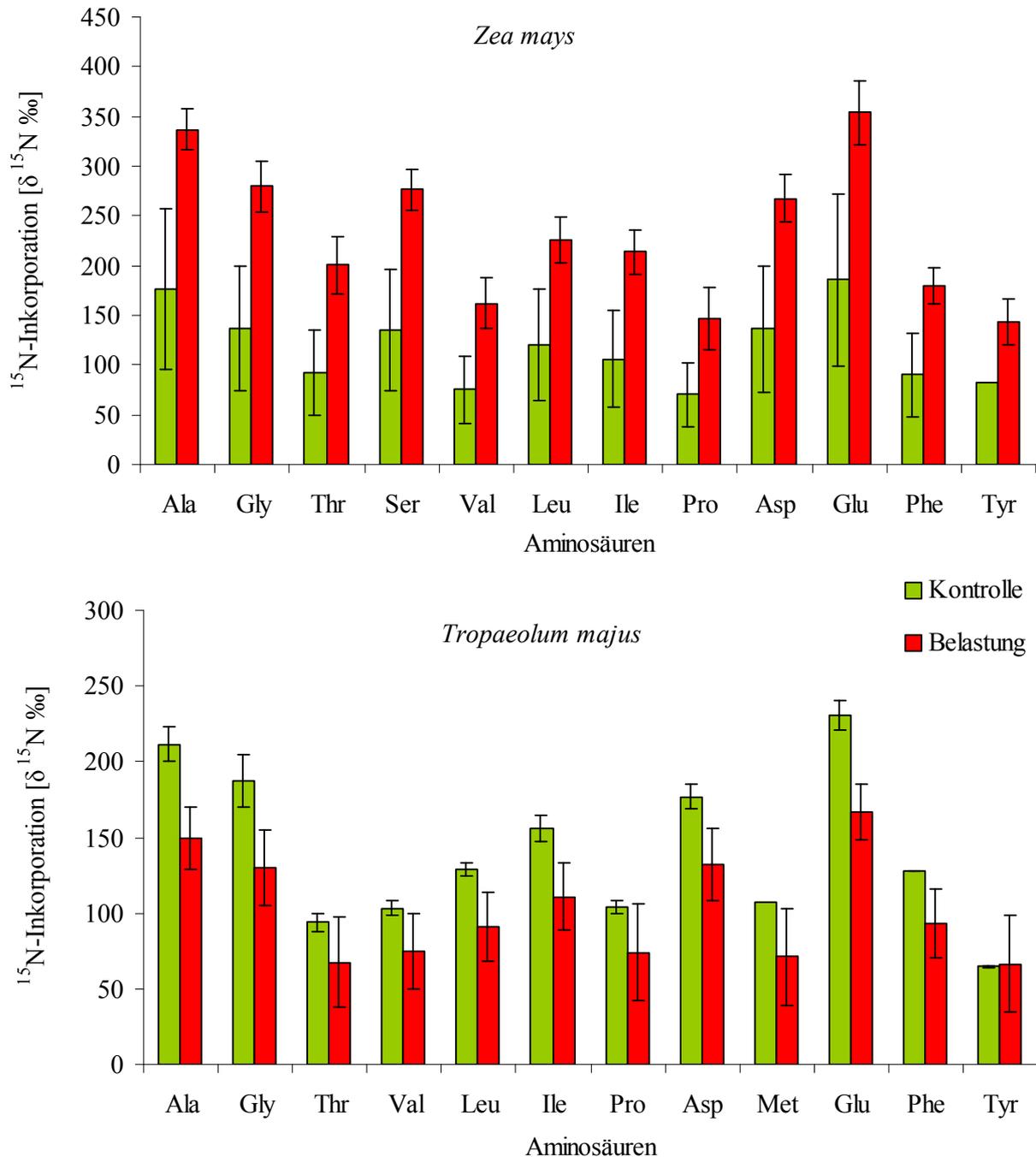


**Abb. 13** Relative  $^{15}\text{NO}_3^-$ -Inkorporation [% der Kontrolle] in die Protein- und Nichtproteinfraktion der Blätter von *Zea mays* und *Tropaeolum majus* in Abhängigkeit von der applizierten atmosphärischen TCA-Konzentration ( $n = 5$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  ).

## Aminosäuren

Die  $^{15}\text{N}$ -Isotopenhäufigkeiten einzelner Aminosäuren der löslichen Proteinfraction wurden bei beiden Pflanzenarten bei der jeweils geringsten TCA-Konzentration (*Zea mays*: 2 ng/m<sup>3</sup>; *Tropaeolum majus*: 0,16 ng/m<sup>3</sup>) analysiert. Freie AS konnten auf diese Weise nicht untersucht werden, da die Menge des Pflanzenmaterials, das dazu benötigt würde, nicht zur Verfügung stand. Es kann jedoch angenommen werden, dass sich das  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Verhältnis der freien AS in den löslichen Proteinen widerspiegelt.

Für die Analyse wurden jeweils 3 Pflanzen zu einer Mischprobe vereinigt. Die Standardabweichungen ergeben sich aus der Analyse von mindestens 2 unabhängigen Mischproben. Es konnten insgesamt folgende 11 proteinogenen Aminosäuren in jeder Pflanzenart und in jeder Probe analysiert werden: Alanin, Glycin, Threonin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Aspartat/Asparagin, Glutamat/Glutamin, Phenylalanin, Tyrosin. Bei *Zea mays* konnte zusätzlich Serin und bei *Tropaeolum majus* Methionin bestimmt werden. Abb. 14 stellt die Ergebnisse graphisch dar. Im Gegensatz zu *Tropaeolum majus* lag bei *Zea mays* Methionin unterhalb der Detektionsgrenze, während bei der *Tropaeolum majus* Serin nicht detektierbar war. Durch die Hydrolyse und der Derivatisierung kann zwischen den Amid- und den Säuren von Glutamin bzw. Asparagin nicht mehr unterschieden werden. Sie eluieren gleichzeitig und können nicht separat detektiert werden. Tryptophan, Methionin und Histidin bilden bei der Derivatisierungsmethode Nebenprodukte und können unterhalb der Detektionsgrenze liegen. Arginin wird nicht vollständig derivatisiert und kann nicht bestimmt werden (Hofmann et al. eingereicht). Die Aminosäuren Cystein und Lysin lagen bei diesen Proben ebenfalls unterhalb der Detektionsgrenze.



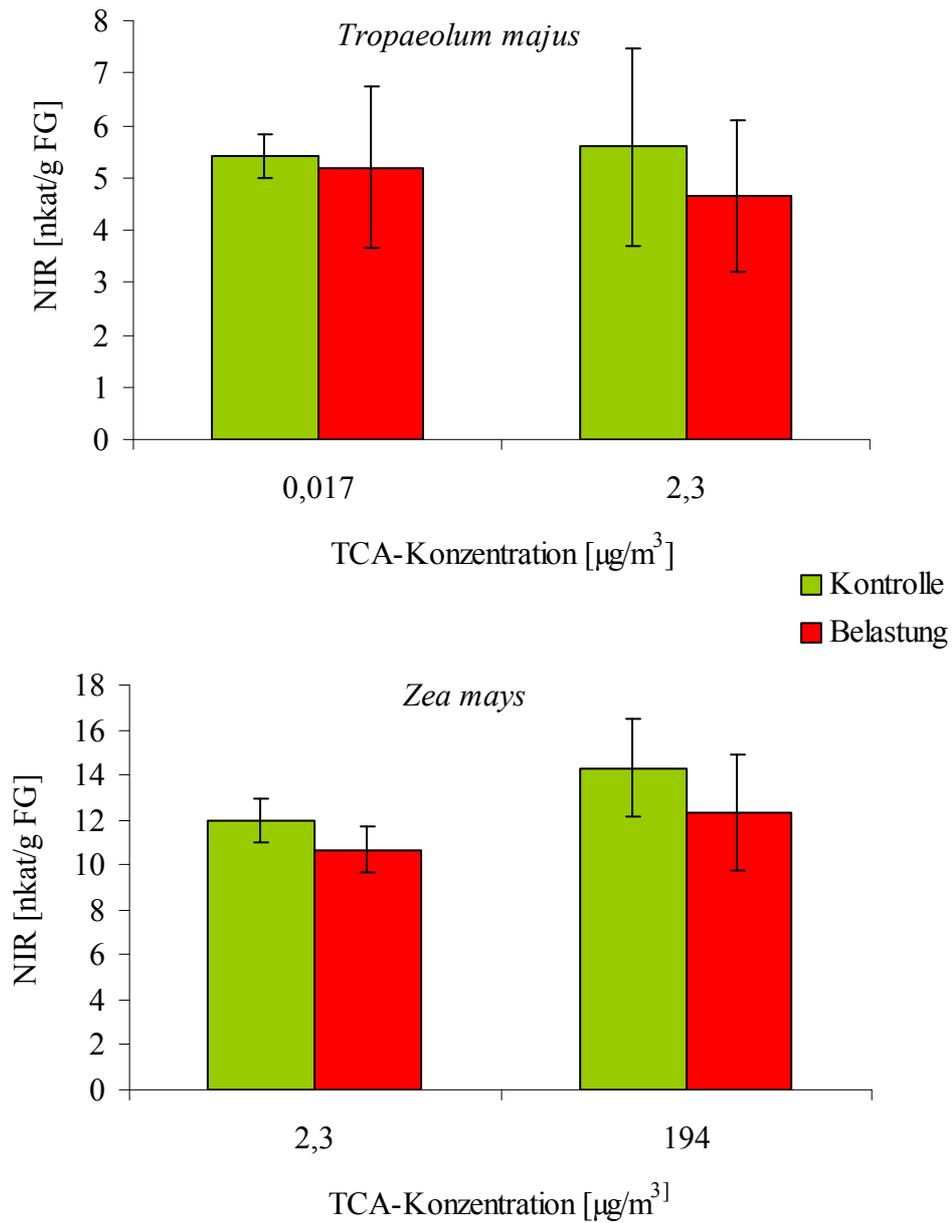
**Abb. 14**  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation in einzelne Aminosäuren der löslichen Proteine der Blätter von *Zea mays* und *Tropaeolum majus* nach einer 4-tägigen atmosphärischen TCA-Belastung mit  $2 \text{ ng/m}^3$  (*Zea mays*) bzw.  $0,16 \text{ ng/m}^3$  (*Tropaeolum majus*) und einer anschließenden Tracerinkorporationszeit von 7 Stunden im Vergleich zur Kontrolle ( $n = 2$ ).

Die Ergebnisse der  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeiten spiegeln in den AS das Verhältnis zwischen Kontrolle und Belastung, welches in der Gesamtproteinfraktion gefunden wurde, im wesentlichen wider. Bei *Zea mays* wurden bei allen analysierten Aminosäuren bis zu 100 % höhere  $^{15}\text{N}$ -Einbauraten durch die TCA-Belastung festgestellt. Diese Steigung der Inkorporationsraten ist im Gegensatz zur Gesamtproteinfraktion, die nur 47 % aufweist, wesentlich größer. Die Aminosäure Valin erfährt im Vergleich zu der Kontrolle mit 140 % die stärkste Förderung. Alle anderen Aminosäuren liegen im

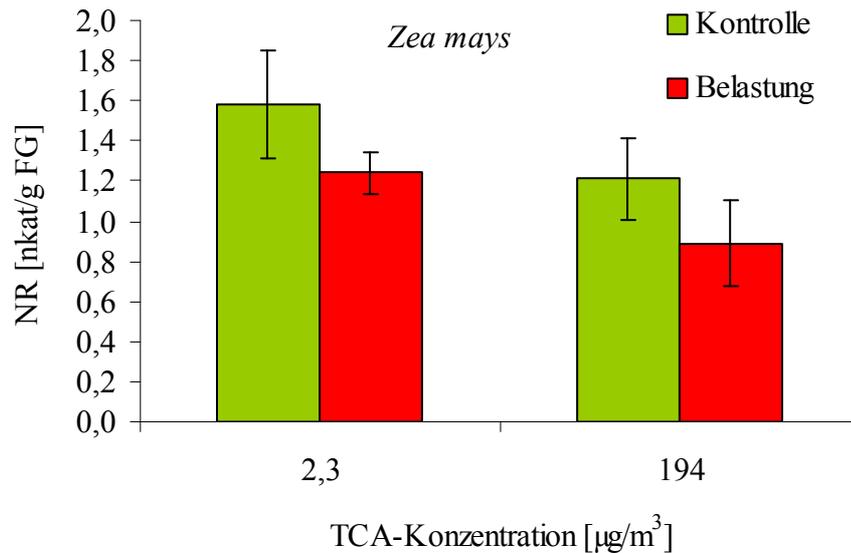
Bereich zwischen 90 % und 115 %. Folgende Reihenfolge wurde, beginnend mit der geringsten Förderung, ermittelt: Ile (89 %), Leu (91 %), Asp (91 %), Glu (94 %), Ala (96 %), Phe (100 %), Gly (103 %), Ser (105 %), Tyr (107 %), Pro (112 %), Thr (116 %), Val (140 %). Generell können bei beiden Pflanzenarten keine signifikanten Unterschiede im relativen  $^{15}\text{N}$ -Einbau (% der Kontrolle) zwischen den einzelnen AS gefunden werden. Die höchsten absoluten  $^{15}\text{N}$ -Inkorporationen weisen die AS Glutamin/Glutamat und Alanin und die geringsten die AS Prolin, Tyrosin und Valin auf. Eine Korrelation zwischen Höhe der absoluten  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation und relativem Verhältnis zwischen Kontrolle und TCA-Applikation besteht nicht. Im Vergleich zu *Zea mays* kommt es bei *Tropaeolum majus* bis auf Tyrosin bei allen AS zu einer Hemmung der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation. Bei dieser Pflanzenart wurde folgende Reihenfolge, beginnend mit der geringsten Hemmung, ermittelt: Tyr (103 %), Asp (75 %), Phe (73 %), Val (72,2 %), Glu (72,1 %), Thr (72,0 %), Pro (71,4 %), Ile (71,2 %), Ala (71 %), Leu (70 %), Gly (69 %), Met (67 %). Ebenso wie bei *Zea mays* sind die höchsten  $^{15}\text{N}$ -Inkorporationen bei den AS Glutamin/Glutamat und Alanin zu sehen. Die geringsten Anreicherungen bei dieser Pflanze sind bei Lysin, Tyrosin und Threonin sichtbar.

#### Nitrat- und Nitritreduktase

Die Bestimmung der Nitritreduktase-Aktivität war bei beiden Pflanzenarten möglich, während die Nitratreduktase nur bei *Zea mays* mit der verwendeten Methode charakterisierbar war. Bei jeder Pflanzenart wurden die Enzymaktivitäten bei einer geringen (*Zea mays* 2,3  $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$ , *Tropaeolum majus* 0,017  $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$ ) und einer hohen TCA-Belastung (*Zea mays* 194  $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$ , *Tropaeolum majus* 2,3  $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$ ) gemessen. Die Ergebnisse der Nitritreduktase-Aktivität von *Zea mays* und *Tropaeolum majus* sind in Abb. 15 graphisch dargestellt. Es ist daraus ersichtlich, dass die Aktivitäten bei *Zea mays* wesentlich größer sind, als bei *Tropaeolum majus*. Durch die TCA-Belastung kommt es bei beiden Pflanzenarten weder bei der geringen, noch bei der hohen Konzentration zu einer signifikanten Veränderung. Tendenziell ist zu erkennen, dass die Enzymaktivitäten unter TCA-Einfluss leicht gehemmt werden. Die Hemmung ist bei der hohen TCA-Konzentration größer, als bei der geringen. Die Enzymaktivität der Nitratreduktase bei *Zea mays* liegt im Bereich zwischen 0,89 und 1,6 nkat/g FG. Bei diesem Enzym ist der hemmende Einfluss der TCA etwas deutlicher, jedoch nicht signifikant. Die Hemmung beträgt bei 2  $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$  78 % und bei 200  $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$  73 %.



**Abb. 15** Aktivitäten der Nitritreduktase in Blättern von *Zea mays* und *Tropaeolum majus* nach einer 4-tägigen atmosphärischen TCA-Belastung in Abhängigkeit von der TCA-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (n = 4).



**Abb. 16** Aktivitäten der Nitratreduktase in Blättern von *Zea mays* nach einer 4-tägigen atmosphärischen TCA-Belastung in Abhängigkeit von der TCA-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (n = 4).

### Diskussion

Pflanzen sind in der Lage, atmosphärisch getragene TCA über die Blätter (Frank et al., 1991; Sutinen et al., 1995; Schroll et al., 1995) und nach Auswaschung und Eintrag in den Boden über die Wurzeln (Plümacher & Schröter, 1994; Schroll et al., 1995; Sutinen et al., 1995) aufzunehmen (siehe Kap. 2.1.5). Die Wurzelaufnahme wurde in dieser Arbeit durch Abdeckung der Gefäße, in denen sich die Pflanzen befanden, verhindert, so dass nur die Aufnahme über die Blätter erfolgen konnte. Die Aufnahme von TCA über die Blätter ist jedoch hauptsächlich von der stomatären Leitfähigkeit abhängig, eine Aufnahme über die Kutikula spielt eine untergeordnete Rolle (Sutinen et al., 1995). Durch die atmosphärische Schadstoffaufnahme kommt es zu einer Belastung und zu einem Eingriff in den Stickstoffstoffwechsel der Pflanzen. Erhebliche Schäden (z. B. Wachstumsstörungen) können die Folge sein. Das Ausmaß der Schädigung hängt jedoch auch von der Schadstofftoleranz ab, die zwischen den einzelnen Pflanzenspezies unterschiedlich sein kann (Barnes et al., 1999). Es wird vermutet, dass die Schadstofftoleranz durch morphologische, physiologische und biochemische Merkmale bestimmt wird. Für eine umfassende Einschätzung des Gefährdungspotentials ist es daher notwendig, Pflanzen unterschiedlichen Stoffwechselltyps in die Studien einzubeziehen.

$\text{C}_3$ - und  $\text{C}_4$ -Pflanzen unterscheiden sich hinsichtlich der  $\text{CO}_2$ -Fixierung und weisen Unterschiede hinsichtlich der Anatomie und Physiologie auf. Zum  $\text{C}_3$ -Photosynthesetyp gehört der größte Teil der Landpflanzen. Das erste Produkt der  $\text{CO}_2$ -Fixierung ist 3-Phosphoglycerat, eine  $\text{C}_3$ -Carbon-säure. Die Reaktion von Ribulose-1,5-bisphosphat mit  $\text{CO}_2$  zu zwei Molekülen 3-Phosphoglycerat wird von dem Enzym Ribulosebiphosphatcarboxylase/oxygenase (Rubisco) katalysiert, das jedoch eine geringe Affinität zu  $\text{CO}_2$  besitzt und ebenso eine Oxygenierungsfunktion bei hoher Sauerstoffrate ausübt (Lodisch et al., 1996; Schlee, 1992). Bei diesem Prozess, der auch als

Photorespiration bezeichnet wird, wird die Photosyntheserate gehemmt. Dies ist besonders bei hohen Temperaturen der Fall. Der Verlust des primär assimilierten Kohlenstoffes kann z.T. zwischen 30 % und 50 % liegen (Schlee, 1992). Die C<sub>4</sub>-Pflanzen weisen hingegen eine räumlich getrennte zweistufige Carboxylierung auf. In den Mesophyllzellen findet die CO<sub>2</sub>-Fixierung durch das Enzym Phosphoenolpyruvatcarboxylase, das unempfindlich gegenüber O<sub>2</sub> ist, statt. Das erste Fixierungsprodukt ist Oxalacetat, eine C<sub>4</sub>-Dicarbonsäure. Nach Umwandlung in Malat bzw. Aspartat wird dieses in die Chloroplasten der Gefäßbündelscheidenzellen transportiert. Dort befindet sich die Rubisco und andere Enzyme des Calvin-Cyclus (Lodisch et al., 1996). Der C<sub>4</sub>-Photosynthesetyp zeichnet sich unter anderem durch folgende Merkmale aus: hohe Nettphotosyntheserate mit gleichzeitig geringer Photorespiration, niedriger CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt, hohes Temperaturoptimum (35 °C), hohe Effektivität der Phosphoenolpyruvatcarboxylase und eine hohe Wassereffektivität. Außerdem ist eine hohe Strahlungsintensität für eine hohe Lichtsättigung erforderlich, da mehr ATP für die CO<sub>2</sub>-Assimilation benötigt wird (Schlee, 1992). Dieser Photosynthesetyp stellt eine Anpassung an trockene und/oder heiße Standorte dar.

Der Gaswechsel der Pflanzen findet hauptsächlich über die Stomata statt. Die Rate des Gasaustausches ist daher von dem stomatären Diffusionswiderstand, d. h. von der Öffnungsweite der Stomata, abhängig (Ziegler, 1995). C<sub>4</sub>-Pflanzen kommen mit einer geringeren Öffnung der Stomata aus, da sie einen geringeren CO<sub>2</sub>-Partialdruck benötigen. Die Folge ist eine geringere Transpiration und eine daraus resultierende geringere Aufnahme von Luftschadstoffen im Verhältnis zu C<sub>3</sub>-Pflanzen. Durch die Kompartimentierung, die hohe Wassernutzungseffizienz und die geringere Schadstoffaufnahme kann vermutet werden, dass die C<sub>4</sub>-Pflanzen eine höhere Schadgasresistenz aufweisen.

### Gesamtstickstoff

Eine Wirkung von Trichloressigsäure auf den Stickstoffmetabolismus ist in der älteren Literatur schon beschrieben. Durch TCA-Applikation von *Zea mays* Pflanzen über die Wurzel kommt es zu einem verringerten Stickstoffeinbau, und die Syntheseleistung wird zunehmend gehemmt (Zöttel, 1953). Die Folge ist eine verminderte Wachstumsrate. Zöttel (1953) kultivierte die Pflanzen in einer Nährlösung, die als Stickstoffquelle Nitrat enthielt. In der vorliegenden Arbeit, bei der durch Begasung TCA atmosphärisch auf die Pflanzen einwirkte, konnte über die sensitive <sup>15</sup>N-Tracermethode ebenfalls ein Einfluss des Herbizides auf den Stickstoffeinbau festgestellt werden. Während der Gehalt des Gesamtstickstoffes sich nicht wesentlich ändert, konnten anhand der <sup>15</sup>N-Häufigkeiten Veränderungen der Stickstoffaufnahme, die in ihrem Ausmaß vom Pflanzentyp abhängig sind, festgestellt werden. Bei *Tropaeolum majus*, der C<sub>3</sub>-Pflanze, ist auch bei sehr geringen Konzentrationen (0,16 ng/m<sup>3</sup>) eine starke Hemmung ersichtlich, während beim *Zea mays*, der C<sub>4</sub>-Pflanze, bei geringen TCA-Konzentrationen (0,002 - 0,196 µg/m<sup>3</sup>) eine Förderung und bei hohen Konzentrationen (194 µg/m<sup>3</sup>) eine relativ geringe Hemmung zu verzeichnen ist. Die C<sub>4</sub>-Pflanze reagiert hinsichtlich des Einflusses atmosphärischer TCA auf die Stickstoffaufnahme wesentlich toleranter als die C<sub>3</sub>-Pflanze. Dies deckt sich mit der Vermutung, dass die C<sub>4</sub>-Pflanzen durch die spezielle Kohlenstoffassimilation eine größere Schadstoffresistenz aufweisen. Wahrscheinlich nimmt sie durch die geringere Öffnung der Stomata weniger TCA aus der Luft auf.

Die Förderung der Stickstoffaufnahme bei den geringen TCA-Konzentrationen bei *Zea mays* kann dahingehend erklärt werden, dass geringe Schadstoffdosen infolge des erhöhten Stresses den Stoffwechsel zunächst aktivieren. Im allgemeinen Phasenmodell einer Stress-Situation kommt es zu Beginn zu einer Alarmphase, in der eine Destabilisierung von strukturellen und funktionellen Vorgängen in der Pflanze erfolgt (nach Seyle, 1936, Stocker, 1947, und Larcher; aus Schlee, 1992). Um dem Stress entgegen zu wirken, erfolgt eine Umstellung und Aktivierung des Stoffwechsels mit Reparaturvorgängen und *de novo* Synthese von Schutzstoffen. Dies hat unter anderem einen erhöhten Bedarf an Stickstoff zur Folge (Ballach, 1998). Bei andauerndem Stress erfolgt in der Widerstandsphase eine Abhärtung bis zum Resistenzmaximum. Nach erfolgter Anpassung kommt es zu einer Stabilisierung der Pflanzenfunktionen bis in den Normbereich. Es kann jedoch auch eine irreversible Schädigung auftreten, wenn die Belastung zu schnell und zu stark ist (akute Schädigung), oder wenn sie lang andauert (chronische Schädigung). In der Pflanze zeigt sich dies u. a. durch einen verminderten Stoffwechsel in Verbindung mit einer geringeren Stickstoffaufnahme. Dies kann bei hohen TCA-Konzentrationen, wie sie bei *Zea mays* appliziert wurden, ein Grund für die verminderte <sup>15</sup>N-Inkorporation sein. Bei *Tropaeolum majus* konnte selbst bei geringsten Schadstoffdosen eine deutlich geringere Stickstoffaufnahme ermittelt werden. Vermutlich spielt hier sowohl die oben schon erwähnte höhere Schadstoffaufnahme, aber auch die individuelle Physiologie und Anatomie eine Rolle.

#### Nichtprotein- und Proteinfraction

Ashton & Crafts (1987) beschrieben einen erhöhten Proteinabbau durch die TCA-Belastung. Für die Untersuchung der Proteinsynthese wurden die <sup>15</sup>N-Häufigkeiten sowohl in der Nichtproteinfraction, als auch in der Proteinfraction untersucht. Generell konnte kein signifikanter Einfluss der TCA auf die Proteinneusynthese beobachtet werden. Bei *Zea mays* wurde jedoch bei allen Konzentrationen eine leicht erhöhte <sup>15</sup>N-Inkorporationsrate in der Proteinfraction gegenüber der Nichtproteinfraction festgestellt. Dieses würde sich mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen decken. Bei *Tropaeolum majus* konnte kein konzentrationsabhängiger Einfluss der TCA auf die Proteinsynthese festgestellt werden.

#### Nitrit- und Nitratreduktase

Um die Frage zu klären, ob TCA bereits auf der Ebene der Nitratassimilation wirkt, wurden die Aktivitäten der Nitrat- bzw. Nitritreduktase untersucht. Aus früheren Studien und der Tatsache, dass TCA theoretisch in der Lage ist, Proteine zu modifizieren (Ashton & Crafts, 1987) konnte vermutet werden, dass die veränderten Stickstoffinkorporationsraten eine Folge veränderter Enzymaktivitäten sind. Einen Einfluss der TCA auf die Aktivitäten verschiedener Stress- und Detoxifikationsenzyme wurde bereits nachgewiesen (Ashton & Crafts, 1987; Plümacher & Schröter, 1994; Radetski et al., 2000).

Sowohl die Aktivitäten der Nitratreduktase bei *Zea mays*, als auch der Nitritreduktase bei beiden Spezies wurde durch TCA etwas gehemmt, was besonders bei den höheren Konzentrationen deutlich wird. Signifikante Unterschiede zwischen den zwei Pflanzenarten wurden nicht festgestellt. Anhand der starken Hemmung der <sup>15</sup>N-Inkorporation bei *Tropaeolum majus* sollte auch die

Nitritaktivität bei dieser Pflanze stärker gehemmt werden als bei *Zea mays*. Dies ist jedoch nicht der Fall. Zur Nitrataktivität kann diesbezüglich keine Aussage getroffen werden, da dieses Enzym bei *Tropaeolum majus* mit der verwendeten Methode nicht charakterisiert werden konnte. Die veränderte Stickstoffinkorporation kann nicht allein aus den veränderten Enzymaktivitäten resultieren. Ashton & Crafts (1987) vermuten, dass TCA eine Anhäufung von Ammonium in der Zelle bewirkt und dass es zu einer Abnahme von Amiden kommt. Die Anhäufung von Ammonium, so nehmen sie an, resultiert daraus, dass Enzyme inhibiert werden, die die Umwandlung von Ammonium zu Amiden katalysieren, wie z. B. die Glutamin-Synthetase und die Glutamat-Synthase. Um diese Hypothese zu prüfen, sollten in nachfolgenden Studien diese Enzyme untersucht werden.

### Aminosäuren

Die Aminosäuren stellen die ersten stabilen organischen Produkte der Stickstoffassimilation dar. Sie sind die Bausteine der Proteine und fungieren auch als N-Speicher in der Zelle (Nordin & Nösholm, 1997). Ein signifikanter Einfluss von atmosphärischer TCA auf die Biosynthese bestimmter Aminosäuren in *Tropaeolum majus* und *Zea mays* konnte nicht bestätigt werden. Bei *Zea mays* zeigte Valin die größte Förderung der <sup>15</sup>N-Inkorporation. Bei *Tropaeolum majus* wurde Methionin am stärksten gehemmt. Anderson et al. (1962) fanden in ihren Studien eine signifikante Erhöhung der freien Aminosäuren Glutamin und Asparagin. Diese zwei Aminosäuren wurden in dieser Studie gegenüber anderen nur geringfügig beeinflusst. In den Untersuchungen von Nordin & Nösholm (1997) wurde festgestellt, dass sowohl Asparagin, als auch Glutamin als N-Speicher dienen kann. Sie stellen auch eine wichtige Funktion im N-Transportsystem dar. Vermutlich resultiert die Erhöhung dieser beiden Aminosäuren in früheren Studien aus der verminderten Proteinbiosynthese, die dazu führt, dass ein Überangebot an Stickstoff vorliegt. Eine signifikant verringerte Proteinbiosyntheserate durch die TCA-Belastung wurde sowohl bei *Tropaeolum majus*, als auch bei *Zea mays* nicht festgestellt, so dass aus diesem Grunde kein gesteigerter Bedarf an Stickstoffspeichern vorliegen sollte. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass Asparagin/Aspartat und Glutamin/Glutamat sowohl bei der Kontrolle, als auch bei der Belastung die höchste <sup>15</sup>N-Anreicherung aufweisen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese beiden AS in *Zea mays* und *Tropaeolum majus* verstärkt synthetisiert werden und vermutlich auch als N-Speicher und N-Transporter in den Pflanzen dienen.

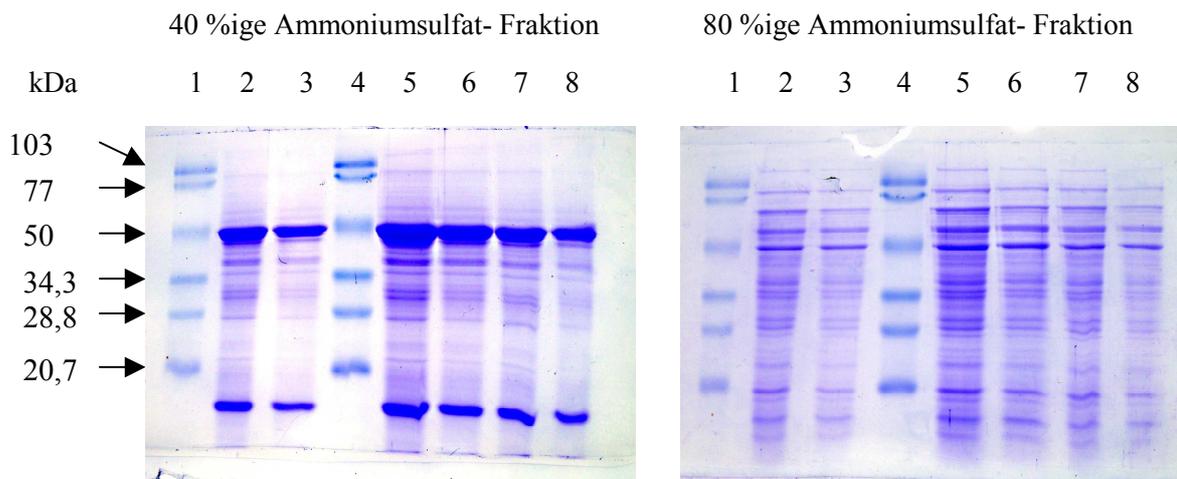
Eine andere Tatsache ist die inhibierende Wirkung der TCA auf die Bildung von Pantothenensäure (Hilton et al., 1959), die ein Bestandteil von Coenzym-A ist. Dieses zur B-Gruppe gehörende Vitamin ist ein wichtiger Acylgruppenüberträger und in der Zelle an über 100 Reaktionen beteiligt ist (Michal, 1999). In der Pflanzenzelle ist es u. a. an der Fettsäuresynthese und dem -abbau, der Pyruvatoxidation, der Sulfatassimilation und der Bildung von Isoprenoiden beteiligt (Heldt, 1996). Diesen Isoprenoiden werden vielfältige Funktionen in der Pflanze zugesprochen, z.B. als Wachstumsregulatoren, Abwehrstoffe, Pflanzenhormone, Membranbausteine, Photosynthesepigmente und Elektronentransportüberträger. Eine Verarmung an Coenzym-A könnte sich auf den gesamten Stoffwechsel und indirekt auch auf den Stickstoffstoffwechsel auswirken.

### 4.2.1.3 Proteinmuster bei *Tropaeolum majus*

Ein Mechanismus für die Adaptation der Pflanze an eine Stresssituation ist die Veränderung des Enzymmusters. Dies geschieht über einen selektiven Abbau und die Neubildung von Proteinen. Dadurch kann sich der Organismus den veränderten Bedingungen anpassen (Schlee, 1992).

#### Ergebnisse

Um Veränderungen auf Proteinebene darzustellen, wurden die löslichen Proteine von *Tropaeolum majus* Pflanzen, die mit  $2,3 \mu\text{g TCA/m}^3$  4 Tage lang belastet wurden, gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zur Verringerung der Bandenzahl bzw. zur Vermeidung einer Überladung des Gels wurden die Proteine anhand ihrer Löslichkeit in unterschiedlich konzentrierten Salzlösungen (40 %iges und 80 %iges Ammoniumsulfat) in zwei Fraktionen aufgetrennt, die sich in ihrem Bandenspektrum unterschieden. In Abb. 17 sind die Proteinmuster der durch 40 %iges Ammoniumsulfat und 80 %iges Ammoniumsulfat ausgesalzten Fraktion des löslichen Blattproteins dargestellt. Der Vergleich der Bandenmuster zwischen Kontrolle und Applikation zeigt keine Veränderungen. Es sind jedoch Unterschiede in der Bandenstärke zu erkennen, die darauf hindeuten, dass der Proteingehalt insgesamt verändert ist.



**Abb. 17** Eindimensionale Trennung mit Ammoniumsulfat gefällter löslicher Proteine von *Tropaeolum majus* durch SDS-PAGE. Folgende Bedingungen wurden gewählt: 10 %iges Tris/HCl-Gel, 5 bzw. 10  $\mu\text{g}$  Protein pro Spur, Coomassiefärbung. Spur 1 und 4 Molekulargewichtsmarker (Low Range Standard, Bio-Rad); Spur 2 und 7 Kontrolle, 5  $\mu\text{g}$  Protein; Spur 3 und 8 Belastung, 5  $\mu\text{g}$  Protein; Spur 5 Kontrolle, 10  $\mu\text{g}$  Protein; Spur 6 Belastung, 10  $\mu\text{g}$  Protein

#### Diskussion

Mit Hilfe der eindimensionalen SDS-PAGE konnte durch TCA-Belastung kein verändertes Proteinmuster bestimmt werden. Das dabei verwendete Trenngel (10 % SDS) trennt Proteine einer Molmasse zwischen 18 und 75 kDa gut auf. Kleinere und größere Proteine können mit dieser

Methode nicht analysiert werden. Um Proteine außerhalb dieses Bereiches zu untersuchen, sollten Gele anderer Konzentrationen (z. B. 7,5 oder 15 %) bzw. andere Untersuchungsmethoden (z. B. HPLC) verwendet werden.

Trotz der Tatsache, dass nach der Proteinbestimmung die Proben auf eine einheitliche Proteinkonzentration verdünnt wurden, weist in beiden Fraktionen die Kontrolle mehr Protein auf als die Applikation. Da die TCA in der Lage ist, sich an Proteine zu binden (Ashton & Crafts, 1987), könnte dies zu einer Störung der Proteinbestimmung und der Coomassiefärbung zur Darstellung der Proteinbanden im Gel führen.

Versuche zur Bestimmung der  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit der im Gel aufgetrennten Proteine wurden ebenfalls durchgeführt. Dabei traten große Schwierigkeiten in der Standardisierung der Methode auf; diese Versuche wurden nicht weiter verfolgt.

#### 4.2.1.4 GST-Aktivität

Durch die Bestimmung der spezifischen GST-Aktivität sollte untersucht werden, ob und in welchem Maße die TCA einen Einfluss auf den Detoxifikationsmetabolismus über die Glutathion-S-Transferase ausübt.

#### Ergebnisse

Da sich anhand der spezifischen Aktivitäten allein keine Aussagen zur Belastungsdifferenzierung treffen lassen, sind in Tab. 9 und 10 noch zusätzlich die Volumen-GST-Aktivitäten (nkat/g FG) und der Gehalt an löslichem Protein (mg/g FG) aufgeführt. Die ermittelte spezifische GST-Aktivität (nkat/mg) bei *Zea mays* liegt zwischen 0,25 nkat/mg und 0,5 nkat/mg und bei *Tropaeolum majus* zwischen 12,6 nkat/mg und 21,9 nkat/mg.

Bei hohen TCA-Konzentrationen sind bei beiden Pflanzenarten die Volumen-GST-Aktivitäten und die spezifischen GST-Aktivitäten durch die TCA-Belastung deutlich gehemmt. Bei den niedrigen TCA-Konzentrationen muss zwischen den Pflanzenarten unterschieden werden. Bei *Zea mays* ist die Volumen-GST-Aktivität bei der Belastung höher als bei der Kontrolle, was sich durch den ebenfalls erhöhten Anteil an löslichem Protein bei der spezifischen GST-Aktivität wieder ausgleicht. Bei *Tropaeolum majus* ist die Volumen-GST-Aktivität durch die TCA-Belastung leicht gehemmt. Der dabei höhere Anteil an löslichem Protein führt zu einer signifikant ( $p < 0,05$ ) verringerten spezifischen GST-Aktivität.

**Tab. 9** Volumen-GST-Aktivität [nkat/g FG], Gehalt an löslichem Protein [mg/g FG] und spezifische GST-Aktivität [nkat/mg] der Blätter von *Zea mays* nach einer 4-tägigen atmosphärischen TCA-Belastung in Abhängigkeit von der TCA-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (n = 4).

	2,3 µg TCA/m <sup>3</sup>		194 µg TCA/m <sup>3</sup>	
	Kontrolle	Belastung	Kontrolle	Belastung
<b>Volumen-GST-Aktivität</b>	5,93 ± 0,68	7,24 ± 0,15	7,20 ± 0,13	4,42 ± 0,15
<b>lösliches Protein</b>	18,45 ± 1,59	23,52 ± 3,92	13,56 ± 2,15	12,36 ± 2,2
<b>spezifische GST-Aktivität</b>	0,324 ± 0,065	0,312 ± 0,046	0,494 ± 0,07	0,312 ± 0,036

**Tab. 10** Volumen-GST-Aktivität [nkat/g FG], Gehalt an löslichem Protein [mg/g FG] und spezifische GST-Aktivität [nkat/mg] der Blätter von *Tropaeolum majus* nach einer 4-tägigen atmosphärischen TCA-Belastung in Abhängigkeit von der TCA-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (n = 4).

	0,017 µg TCA/m <sup>3</sup>		2,3 µg TCA/m <sup>3</sup>	
	Kontrolle	Belastung	Kontrolle	Belastung
<b>Volumen-GST-Aktivität</b>	107,3 ± 8,9	91,5 ± 9,0	152,1 ± 6,4	109,4 ± 10,1
<b>lösliches Protein</b>	6,54 ± 0,18	7,28 ± 0,64	6,96 ± 0,05	7,24 ± 0,13
<b>spezifische GST-Aktivität</b>	16,4 ± 0,89	12,55 ± 0,12	21,87 ± 1,07	15,11 ± 1,12

## Diskussion

Die wahrscheinlich am besten untersuchte pflanzliche Glutathion-S-Transferase ist die der *Zea mays*-GST-Familie. Erstmals wurde sie 1970, in Zusammenhang mit ihrer Befähigung, das Herbizid Atrazin zu konjugieren, von Frear et al. entdeckt (Timmerman 1989). Es wurde schnell bekannt, dass in *Zea mays* unterschiedliche GST-Isoenzyme exprimiert werden. Bis jetzt sind vier verschiedene Typen bekannt: GST I, ein Homodimer von 29kDa Untereinheiten; GST II, ein Heterodimer von 27kDa und 29kDa Untereinheiten; GST III, ein Homodimer von 26kDa Untereinheiten und GST IV, ein Homodimer von 27kDa Untereinheiten. Sie kommen sowohl in den Wurzeln, als auch im Spross vor. Jedoch besitzen sie differenzierte Substratspezifitäten und katalytische Aktivitäten (Karam, 1998; Irzyk & Fuerst 1993; Marrs, 1996). GST I und II umfassen ca. 1-2 % der gesamten löslichen Proteine in der Pflanze. Die Glutathion-S-Transferase von *Zea mays* katalysiert die Konjugation von GSH mit einem breiten Spektrum elektrophiler Verbindungen, darunter verschiedene endogene Stressmetabolite, sekundäre Substanzen und Herbizide. Durch die Belastung mit Atrazin, Metachlor und Alachlor kam es zu einer Erhöhung der spezifischen GST-Aktivität sowohl in den Blättern, als auch in den Wurzeln der *Zea mays* Pflanzen, wobei der Effekt in den Wurzeln größer war. Das Herbizid Alachlor induzierte dabei die

GST-Aktivität am stärksten. Es wird vermutet, dass die Herbizidresistenz der Pflanzen mit der Induktion der GST-Aktivität zusammenhängt (Mamdouh & Alla 1995).

In der Literatur sind noch keine Studien bezüglich des Einflusses von TCA auf die GST-Aktivität bei *Zea mays* bekannt. Beschrieben wird jedoch, dass geringe TCA-Konzentrationen die Aktivitäten verschiedener Enzyme des oxidativen Stresses bei terrestrischen Nutzpflanzen erhöhen (Radetski, 2000). Anhand dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass durch die Belastung mit TCA das Schutzsystem der Pflanzen gegen oxidativen Stress durch Erhöhung der Enzymaktivitäten gesteigert wird. Eine Steigerung der GST-Aktivitäten durch TCA-Belastung zur Detoxifikation des Schadstoffes wird in der Literatur ebenfalls angenommen und konnte in Begasungsexperimenten mit Kierfernsämlingen auch bestätigt werden (Schröder et al. 1996). In Freilanduntersuchungen werden Zusammenhänge zwischen Schadstoffgehalt, darunter auch chlorierte aliphatische Kohlenwasserstoffe, und der GST-Aktivität vermutet (Schröder et al. 2000). Eine direkte Korrelation wurde bisher noch nicht bestätigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die GST-Aktivität im Rohenzymextrakt mit dem Modellsubstrat CDNB nach der Belastung mit atmosphärischer TCA in unterschiedlichen Konzentrationen bei *Zea mays* und *Tropaeolum majus* untersucht. In beiden Pflanzen konnte eine GST-Aktivität im Rohenzymextrakt ermittelt werden, wobei *Tropaeolum majus* im Vergleich zu *Zea mays* bei der Volumen-GST-Aktivität eine über 10 bis 20-fach höhere Aktivität aufweist. Durch die geringeren Anteile an löslichem Protein bei *Tropaeolum majus* ist die spezifische GST-Aktivität bis zu 50-fach höher, als bei *Zea mays*. Die ermittelten spezifischen GST-Aktivitäten von *Zea mays* lagen etwas unter dem Bereich der in der Literatur angegebenen Werte. Über die GST-Aktivität von *Tropaeolum majus* ist in der Literatur nichts bekannt. Es wird jedoch angegeben, dass die Kulturpflanzen *Zea mays* und Soja die höchsten Aktivitäten der konjugierenden Enzyme besitzen (Hock et al., 1995). Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Enzymaktivitätsstudien konnte für *Tropaeolum majus* eine höhere GST-Aktivität als bei *Zea mays* ermittelt werden.

Die in der Literatur vermutete Erhöhung der GST-Aktivitäten durch TCA-Belastung konnte in diesen Studien nicht bestätigt werden. Bei der Begasung mit 200 µg TCA/m<sup>3</sup> bei *Zea mays* bzw. 2,3 und 0,017 µg TCA/m<sup>3</sup> bei *Tropaeolum majus* kam es zu einer Verringerung der Aktivitäten. Die Untersuchungen mit *Zea mays* und den niedrigen TCA-Konzentrationen erbrachten keine Veränderungen der spezifischen GST-Aktivität, jedoch konnte bei der Volumenaktivität bei *Zea mays* eine 22 %ige Erhöhung gegenüber der Kontrolle ermittelt werden. Durch den ebenfalls leicht erhöhten Proteingehalt in den belasteten Pflanzen hebt sich diese leichte Steigerung der Aktivität wieder auf. Auf eine Bildung der GST durch *de novo* Proteinsynthese bei TCA-Belastung kann allerdings daraus nicht geschlossen werden (Gronwald et al. 1989). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es in den belasteten Pflanzen zu einer Induktion spezifischer Isoenzyme kommt, die eine größere Substratspezifität gegenüber TCA oder eine höhere Konjugationsaktivität für diesen Schadstoff besitzen. Solche Isoenzyme werden mit CDNB nicht erfasst. Es ist bekannt, dass in *Zea mays* Isoenzyme exprimiert werden können, die die Konjugation mit CDNB nicht katalysieren (Irzyk & Fuerst 1993). Für eine tiefgründigere Untersuchung des Einflusses von TCA auf die GST-Aktivitäten müssten weiterführende Studien auf dem Gebiet verschiedener Isoenzyme durchgeführt werden.

Ein weiterer Aspekt, der generell bei allen Enzymaktivitäten eine Rolle spielt, ist die Möglichkeit, dass die TCA Proteine durch Alkylierung verändert. Daraus könnte sich eine veränderte Aktivität

des modifizierten Enzyms ergeben (siehe auch Kap. 4.2.1.2). Es ist bekannt, dass halogenierte Acetate und Propionate theoretisch in der Lage sind, Sulfhydryl- und Aminogruppen zu alkylieren (Ashton & Crafts 1987). Eine solche Modifizierung der Proteine wiederum bedingt auch Veränderungen in der nativen Konformation. Finden diese Modifikationen auch bei der Glutathion-S-Transferase statt, könnten sich daraus veränderte Aktivitäten auch gegenüber dem Substrat CDNB ergeben. Veränderte Aktivitäten könnten sowohl eine Zunahme, wahrscheinlicher ist jedoch, auch eine Abnahme der GST-Aktivitäten bedeuten. Dieser Effekt ist zumindest teilweise von der Konzentration anhängig, d. h. je mehr TCA-Moleküle für die Alkylierung zur Verfügung stehen, desto verstärkter ist der inhibierende Effekt. Dies würde mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmen, in der bei hohen TCA-Dosen eine starke Verminderung der GST-Aktivität gefunden wurde. Bei geringen Konzentrationen hingegen ist die Inhibierung weniger ausgeprägt.

#### 4.2.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei den vergleichenden Untersuchungen zum Einfluss atmosphärischer TCA auf physiologisch-biochemische Parameter von C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>- Pflanzen konnten folgende Wirkungen festgestellt werden:

##### Pflanzenwachstum und Vitalität

- Leicht erhöhter Gehalt an löslichem Protein bei niedrigen TCA-Konzentrationen (*Zea mays* 2,3 µg/m<sup>3</sup>; *Tropaeolum majus* 0,017 µg/m<sup>3</sup>)
- Bei *Zea mays* durch hohe TCA-Konzentration (194 µg/m<sup>3</sup>) geringe Erniedrigung des löslichen Proteins

Anhand der erhaltenen Ergebnisse zur Pflanzenhöhe und dem Gehalt an löslichen Proteinen konnten hinsichtlich des Wachstumsverhaltens und der Vitalität bei beiden Pflanzenarten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

##### Stickstoffmetabolismus

- Keine signifikanten Veränderungen im Gesamtstickstoffgehalt bei beiden Pflanzenarten
- *Tropaeolum majus*: <sup>15</sup>N-Inkorporation in Gesamtstickstoff, NPN- und Proteinfraction bei allen applizierten TCA-Konzentrationen (0,00016 - 2,3 µg/m<sup>3</sup>) signifikant erniedrigt
- *Zea mays*: <sup>15</sup>N-Inkorporation in Gesamtstickstoff, NPN- und Proteinfraction bei geringen Konzentrationen (0,002 - 0,196 µg/m<sup>3</sup>) z. T. signifikant erhöht und bei der hohen Konzentration (194 µg/m<sup>3</sup>) erniedrigt
- <sup>15</sup>N-Häufigkeiten einzelner Aminosäuren des löslichen Proteins beider Pflanzenarten spiegeln das Verhältnis zwischen Kontrolle und Belastung wider, welches in der Gesamtproteinfraktion gefunden wurde

- Geringe Erniedrigung der NIR- und NR- Aktivität bei *Zea mays* und der NIR-Aktivität bei *Tropaeolum majus* sowohl bei der hohen, als auch bei der geringen TCA-Belastung

Die Ergebnisse der <sup>15</sup>N-Tracerstudien zeigen große Unterschiede in der Stickstoffaufnahme zwischen der C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>- Pflanze. Die veränderten <sup>15</sup>N-Inkorporationsraten sind sowohl bei *Tropaeolum majus*, als auch bei *Zea mays* durch veränderte NIR- und NR- Aktivitäten allein nicht zu klären. Es konnte kein Einfluss von TCA auf die Biosynthese bestimmter Aminosäuren von *Zea mays* und *Tropaeolum majus* gefunden werden.

#### Proteinmuster bei *Tropaeolum majus*

Anhand der eindimensionalen Auftrennung des löslichen Proteins mittels SDS-PAGE konnte kein verändertes Proteinmuster durch TCA-Belastung (2,3 µg/m<sup>3</sup>) gefunden werden.

#### GST-Aktivität

- Relativ geringe TCA-Konzentration führen bei C<sub>3</sub>-Pflanzen zur leichten Erniedrigung der Volumen-GST-Aktivität und signifikante Erniedrigung der spezifischen GST-Aktivität und bei C<sub>4</sub>-Pflanzen zur leichten Erhöhung der Volumen-GST-Aktivität und zu keinen Veränderungen in der spezifischen GST-Aktivität.
- Dagegen zeigten hohe TCA-Konzentrationen bei beiden Spezies eine Erniedrigung der Volumen-GST-Aktivität und der spezifischen GST-Aktivität.

Durch hohe TCA-Belastung (*Zea mays*: 194 µg/m<sup>3</sup>; *Tropaeolum majus*: 2,3 µg/m<sup>3</sup>) kommt es zur Hemmung der GST-Aktivität bei beiden Pflanzenarten, die bei der geringen TCA-Konzentration bei *Tropaeolum majus* (0,017 µg/m<sup>3</sup>) ebenfalls vorhanden ist.

## 4.2.2 Atmosphärische TCA-Belastungen von *Pinus sylvestris*

Die Trichloressigsäure ist in den letzten Jahren in den Verdacht geraten, maßgeblich an den Waldschäden beteiligt zu sein. Um die Wirkung atmosphärisch getragener TCA auf Kiefern-pflanzen (*Pinus sylvestris* L.) einzuschätzen, wurden Versuche zur kontrollierten Belastung durchgeführt. Im Versuch V1 wurde zur Ermittlung akuter Effekte eine hohe TCA-Konzentration ( $262 \mu\text{g TCA/m}^3$ ) und eine kurze Applikationszeit (4 Tage) gewählt. Im Versuch V2 wurde eine TCA-Konzentration im umweltrelevanten Bereich mit  $0,16 \text{ ng TCA/m}^3$  und eine längere Applika-tionszeit von 50 Tagen gewählt, um chronische TCA-Wirkungen zu erforschen. Die Untersuchungen sollten die Frage klären helfen, ob TCA, die über die Atmosphäre auf *Pinus sylvestris* einwirkt, biochemisch physiologische Veränderungen in der Pflanze hervorruft. Als Wirkungsendpunkte wurde der Stickstoffmetabolismus, die Wirkung auf den Photosynthese-apparat, sowie bei V2 die Aktivität der Glutathion-S-Transferase jeweils im aktuellen (C) und vorjährigen (C+1) Nadeljahrgang untersucht.

In V1 wurde in Anlehnung an vorhergehende Versuche eine Tracerkonzentration von 68 mg  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  / Pflanze (95 at.-%  $^{15}\text{N}$ ) mit einer Applikationszeit von 24 Stunden im Anschluss an die Belastung gewählt. Die Bestimmung der effektiven Quantenausbeute des PS II erfolgte vor und nach der Belastung. Die Pflanzen wurden nach der TCA-Applikation auf visuell erfassbare Schäden untersucht. Dabei konnten bei drei von vier Pflanzen leichte Braunfärbungen an den Nadelspitzen beobachtet werden. Bei den Kontrollpflanzen konnten keine sichtbaren Veränderungen festgestellt werden.

Da bei V1 die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeiten sehr gering waren, erfolgte bei V2 die Tracerapplikation mit einer Konzentration von 136 mg  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  / Pflanze (95 at.-%  $^{15}\text{N}$ ) über 3 Tage. Bei diesem Versuch wurde die effektive Quantenausbeute des PS II nicht nur vor und nach der Begasung, sondern auch an 5 Tagen während des Versuches gemessen. Visuell erfassbare Schäden, wie sichtbare Chlorosen und Nekrosen infolge der TCA-Belastung, konnten bei V2 nicht festgestellt werden.

### 4.2.2.1 Photosynthese

Die Photosynthese ist der fundamentale Stoffwechselprozess, der zum einen für den Zellstoff-wechsel verwertbare Energie in Form von ATP liefert und zum anderen zur Versorgung der Zellen mit Reduktionsäquivalenten dient. Sie wird von vielen verschiedenen Umweltfaktoren, wie Temperatur, Lichtverhältnisse und Xenobiotika, beeinflusst. Jede Veränderung der Photosynthese-leistung kann eine Veränderung der gesamten Stoffwechselleistung der Zelle zur Folge haben und trägt damit zur Veränderung der Vitalität der Pflanze bei. Durch Bestimmung der effektiven Quantenausbeute des PS II über die Chlorophyllfluoreszenz können nichtinvasive Änderungen in der Effizienz der Photochemie ermittelt werden, die als sensitiver Indikator der Photosynthese dient (Maxwell & Johnson, 2000). Zusätzliche Untersuchungen hinsichtlich des Gehaltes an Chlorophyll a und b, sowie der Xanthophylle und Carotinoide geben Informationen darüber, ob die TCA den Pigmentgehalt der Pflanze beeinflusst.

Ergebnisse

In der Tabelle 11 sind die Ergebnisse der Chlorophyllfluoreszenzmessung von V1 zur akuten atmosphärischen TCA-Belastung zusammenfassend dargestellt.

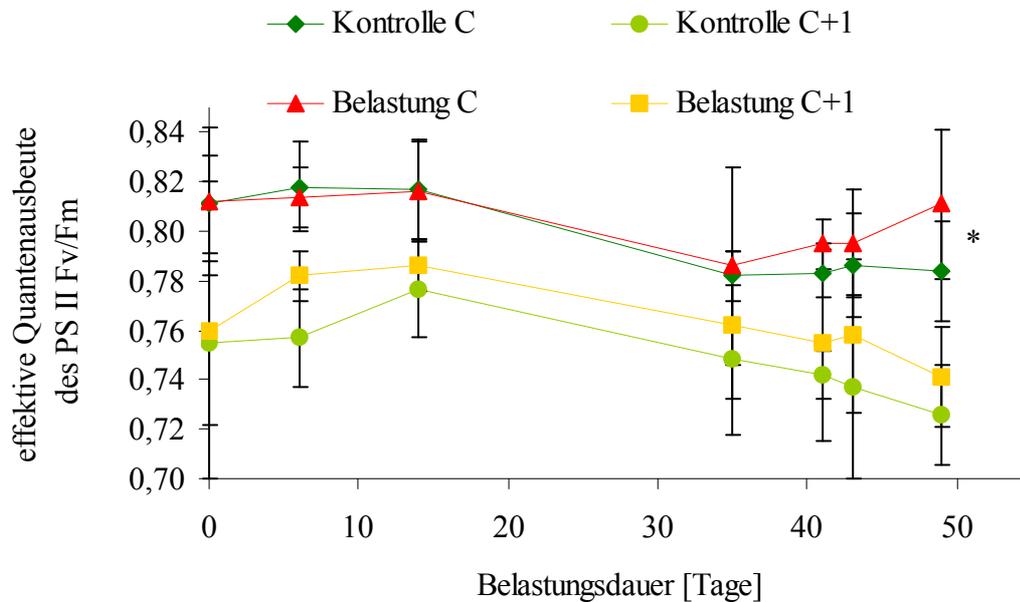
**Tab. 11** Mittelwerte und Standardabweichungen der effektiven Quantenausbeute des PS II von *Pinus sylvestris* vor und nach der Belastung mit 262 µg TCA/m<sup>3</sup> über 114 Stunden (n = 20; \* p < 0,001).

	Kontrolle		TCA- Variante	
	vor Versuchs- durchführung	nach Versuchs- durchführung	vor Versuchs- durchführung	nach Versuchs- durchführung
<b>diesjähriger Nadeljahrgang (C)</b>	0,819 ± 0,0078	0,823 ± 0,02	0,809 ± 0,0162	0,485 ± 0,115 *
<b>vorjähriger Nadeljahrgang (C+1)</b>	0,771 ± 0,0144	0,769 ± 0,018	0,773 ± 0,0141	0,504 ± 0,06 *

Vor der Belastung liegen die Werte der effektive Quantenausbeute des PS II bei allen Pflanzen beim diesjährigen Nadeljahrgang um 0,81 und beim vorjährigen Nadeljahrgang um 0,77. Nach der 114-stündigen TCA-Applikation ist ein deutlicher Unterschied zwischen belasteten und unbelasteten Pflanzen sichtbar. Während bei der Kontrolle der Yield weiterhin bei 0,8 bzw. 0,75 lag, wurden bei den Applikationspflanzen in beiden Nadeljahrgängen signifikant niedrigere Werte gemessen. Beim diesjährigen Nadeljahrgang wurde eine um 41 % und beim vorjährigen Nadeljahrgang eine um 35 % niedrigere effektive Quantenausbeute ermittelt. Der durchgeführte Signifikanztest ergab einen Wert p < 0,001. Die Standardabweichungen sind sowohl innerhalb der 5 Messungen an einem Baum, als auch zwischen den einzelnen Bäumen bei der Kontrolle mit 2 - 3 % sehr niedrig und bei der Applikation nach der TCA-Belastung mit 14 - 30 % im Vergleich zur Kontrolle relativ hoch.

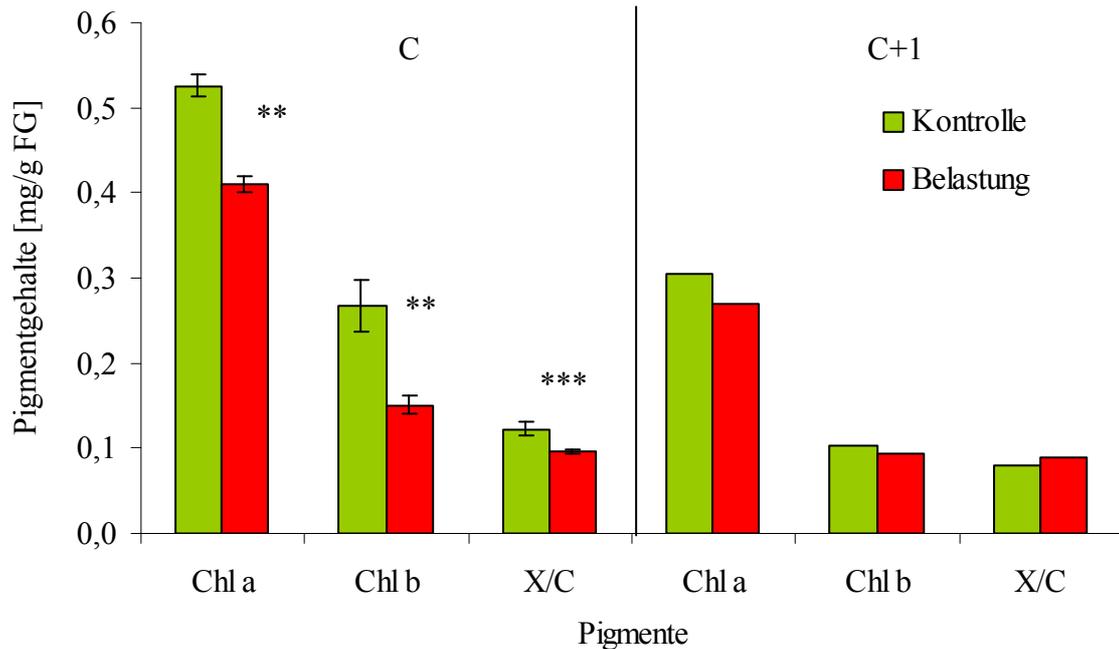
Die zu Beginn der chronischen TCA-Belastung (V2) ermittelten Werte der effektiven Quantenausbeute des PS II liegen bei dem diesjährigen Nadeljahrgang sowohl bei den Kontroll-, als auch bei den Versuchspflanzen bei 0,81. Bei dem vorjährigen Trieb wurden Werte um 0,75 bei allen Pflanzen gemessen, was eine leichte Beeinträchtigung der Photosyntheserate schon vor der TCA-Begasung bedeutet. In Abbildung 18 ist ersichtlich, dass es im Laufe der Versuchsdurchführung zu geringen Veränderungen in der effektiven Quantenausbeute des PS II kommt. In den ersten 2 Wochen schwanken die Werte des diesjährigen Triebes bei allen Pflanzen um den Ausgangswert. Bei dem vorjährigen Trieb konnte hingegen ein Anstieg gegenüber dem Ausgangswert ermittelt werden. Dieser Anstieg ist bei den TCA-Pflanzen mit 2,7 % höher, als bei den Kontrollpflanzen mit 2,0 %. Mit fortschreitender Versuchsdauer kommt es zu einer Verringerung des Yields, der beim vorjährigen Trieb bis zum Ende des Experimentes andauert. Bei dem diesjährigen Trieb kommt es nach dem 35. Tag zu einer Erhöhung der effektiven Quantenausbeute bei den Pflanzen mit TCA-Belastung.

Im Vergleich von Kontrolle und Versuchspflanzen wurde bei TCA-Applikation ein höherer Yield ermittelt, wobei der Unterschied beim vorjährigen Nadeljahrgang während der gesamten Belastungszeit andauert. Bei dem diesjährigen Nadeljahrgang zeichnet sich dieser Effekt erst ab dem 40. Applikationstag ab und erreicht am Ende eine um 3,4 % signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöhte effektive Quantenausbeute.



**Abb. 18** Effektive Quantenausbeute des PS II des diesjährigen (C) und vorjährigen (C+1) Nadeljahrgangs von *Pinus sylvestris* während einer 49-tägigen atmosphärischen TCA-Belastung mit  $0,16 \text{ ng TCA/m}^3$  in Abhängigkeit von der Belastungsdauer im Vergleich zur Kontrolle ( $n = 20$ ; \*  $p < 0,05$ ).

Pigmentgehalte wurden nur bei der chronischen TCA-Belastung (V2) bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abb. 19 dargestellt. In den Kiefernadeln des diesjährigen Triebes kommt es durch die chronische TCA-Belastung zu einer signifikanten Abnahme der Pigmentgehalte, wobei besonders das Chlorophyll b mit einer Reduktion von 44 % am stärksten betroffen ist. Beim vorjährigen Nadeljahrgang konnte nur bei Chlorophyll a und b eine Abnahme um ca. 11 % ermittelt werden. Die Xanthophylle hingegen weisen einen leicht erhöhten Wert gegenüber der Kontrolle auf. Im Vergleich zwischen den Nadeljahrgängen konnten im diesjährigen Nadeljahrgang durchweg höhere Pigmentgehalte gemessen werden.



**Abb. 19** Chlorophyll a (Chl a), Chlorophyll b (Chl b), und Xanthophyll/Carotenoid (X/C) Gehalte des diesjährigen (C) und vorjährigen (C+1) Nadeljahrgangs von *Pinus sylvestris* nach einer 49-tägigen atmosphärischen TCA-Belastung mit  $0,16 \text{ ng TCA/m}^3$  im Vergleich zur Kontrolle ( $n = 2$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Das Verhältnis Chlorophyll a/b ist beim diesjährigen Nadeljahrgang durch die TCA-Belastung erhöht, bei den älteren Nadeln wurde keine Veränderung festgestellt.

**Tab. 11** Verhältnis von Chlorophyll a/b im diesjährigen und vorjährigen Nadeljahrgang von *Pinus sylvestris* nach einer 49-tägigen TCA-Belastung mit einer Konzentration von  $0,16 \text{ ng/m}^3$  im Vergleich zur Kontrolle.

	Kontrolle	Belastung
<b>diesjähriger Nadeljahrgang (C)</b>	1,97	2,71
<b>vorjähriger Nadeljahrgang (C+1)</b>	2,92	2,90

## Diskussion

Durch die Belastung der Pflanzen mit Trichloressigsäure kommt es zur Veränderung der Chloroplasten. Visuell erfassbare Schäden, wie Chlorosen und Nekrosen (Ashton & Crafts, 1987), aber auch zelluläre Veränderungen, wie Reduktion des Thylakoidsystems, Zunahme von Plastoglobuli und Veränderung der Chloroplastengröße (Kristen et al., 1995; Sutinen et al., 1995, 1997) wurden beobachtet. Eine Schädigung des photosynthetischen Apparates hat auch eine Veränderung der photosynthetischen Leistung zur Folge.

Durch die **akute Belastung** der Kiefernpflanzen mit hohen TCA-Konzentrationen konnte eine signifikante Verminderung der effektiven Quantenausbeute des PS II ermittelt werden, die bei den jungen Nadeln stärker ausgeprägt war als bei den älteren. Dieses Ergebnis beweist einen Einfluss von TCA auf den photosynthetischen Apparat und eine Verminderung der Photosyntheseleistung. Untersuchungen von Govindjee et al. (1997) an isolierten Spinatthylakoiden lassen einen direkten Einfluss von TCA auf den photosynthetischen Elektronentransport vermuten. Sie untersuchten den Einfluss verschiedener Chloracetate (MCA, DCA und TCA) auf das PS II und dabei speziell den Elektronentransfer vom Semichinon  $Q_A^-$  zum oxidierten Chinon  $Q_B$ . Sie fanden, dass diese Verbindungen spezifisch an der  $Q_A Q_B$ -Region reagieren und somit die Photosynthese beeinflussen können. Mit Hilfe der Chlorophyllfluoreszenz untersuchten sie den Elektronenfluss von  $Q_A^-$  zu  $Q_B$ . Mit verschiedenen D1-D2 Mutanten von Cyanobakterien (*Synechostis sp.*) ermittelten sie den Einfluss der Bindeproteine auf die Wirkung verschiedener Substanzen. Anhand ihrer Untersuchungen stellten sie folgendes fest:

- Chloroacetate und Acetate erhöhen die Zeitkonstante des Elektronenflusses von  $Q_A^-$  zu  $Q_B$  und verschieben das Gleichgewicht zu Gunsten von  $[Q_A^-]$ . Der Grad des Effektes korreliert mit der Geometrie, d. h. der Anzahl der Chloratome und nimmt mit der Hydrophobizität zu. Demnach konnte TCA die stärkste Wirkung zeigen.
- Das Ausmaß der Wirkung ist pH-abhängig. TCA zeigt die stärkste Wirkung bei pH 7,5.
- Die unterschiedlichen Mutanten zeigten eine differenzierte Sensitivität gegenüber TCA, so dass die Umgebung der D1/D2-Bindetasche einen Einfluss auf den Wirkmechanismus ausübt.

Es ist vorstellbar, dass TCA ähnlich wie klassische PS II-Hemmer (z.B. Atrazin) den Elektronenfluss durch Bindung in der  $Q_A Q_B$ -Region des D1/D2-Komplexes beeinflusst. Dies setzt allerdings einen hydrophoben Charakter der Substanz voraus, der bei den von Govindjee et al. getesteten Chemikalien bei TCA am stärksten vorhanden ist. Damit trägt nicht die Säurewirkung, sondern der anionische Charakter zur Blockierung des Elektronentransfers bei. Da der Einfluss von TCA auf Membranen (Mayer, 1957) und speziell auf das Thylakoidsystem (Kristen, 1995) bekannt ist, kann neben der spezifischen Wirkung in der  $Q_A/Q_B$ -Binderegion auch eine allgemeine Beeinträchtigung der Photosynthese durch Membranerzörung und daraus resultierende Permeabilitätsänderungen in den Thylakoiden abgeleitet werden. Ebenso ist bekannt, dass es durch die Blockierung des Elektronentransportes im PS II zu einem oxidativen Stress unmittelbar im photosynthetischen Apparat kommt, der auch wiederum zur Membranschädigung führen kann (Rutherford and Krieger-Liszky, 2001; Schlee, 1992). Dies kommt ganz besonders dann zum tragen, wenn die zellulären Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress (z. B. durch Karotinoide oder enzymatische Entgiftung) durch zu hohe Schadwirkung überlastet sind. Dies alles können Gründe für die Verringerung der effektiven Quantenausbeute des PS II nach akuter atmosphärischer TCA-Belastung sein.

Bei der **chronischen TCA-Belastung** mit geringen Konzentrationen konnte jedoch eine sehr geringe Zunahme der effektiven Quantenausbeute und gleichzeitig eine signifikante Abnahme der Chlorophyllkonzentration ermittelt werden. Die dazu in der Literatur publizierte Ergebnisse sind zum Teil kontrovers. In Studien mit dem Luftschadstoff Ozon wurden positive Korrelationen zwischen effektiver Quantenausbeute und Chlorophyllkonzentration ermittelt (Saitanis et al. 2001;

Bortier et al. 2001), aber auch das Verhältnis von höherer Chlorophyllfluoreszenz zu geringerer Chlorophyllkonzentration in Regionen hoher Luftverschmutzung ( $O_3$ ,  $SO_2$ ) wurde beobachtet (Calatayud et al., 1996; Tuba et al. 1997). Es ist denkbar, dass die Trichloressigsäure schon in geringen Konzentrationen die Zerstörung von Chlorophyllmolekülen hervorruft und dass dieser Mangel an intakten Reaktionszentren des Photosystems durch eine höhere Effizienz des PS II kompensiert wird. Dies ist aber nur bei geringen Konzentrationen möglich, da eine hohe Schadstoffkonzentration eine massive Schädigung auf den photosynthetischen Apparat ausübt und eine Kompensation nicht mehr ermöglicht. Bezüglich des Schadstoffes TCA im Hinblick auf die Chlorophyllkonzentration ist in der Literatur wenig beschrieben. Sutinen et al. (1997) beobachtete eine leichte Zunahme der Chlorophyllkonzentration infolge der TCA-Belastung. In einem Übersichtsartikel wird dies ebenfalls erwähnt (McCulloch; 2002). Bei Untersuchungen von Hanson et al. (2001), die die Toxizität von TCA an aquatischen Macrophyten studierten, wurde eine Verminderung der Chlorophyllkonzentration durch diesen Schadstoff festgestellt. Solche kontroversen Ergebnisse können auf unterschiedliches Untersuchungsmaterial, verschiedene TCA-Konzentrationen und Applikationstechniken zurückzuführen sein.

Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die TCA bei akuten Belastungen mit sehr hohen Konzentrationen die Effizienz des Photosystems II stark beeinträchtigt, was auf eine Inhibierung des Elektronentransportes von  $Q_A^-$  zu  $Q_B$  und der Membranzerstörung in den Chloroplasten zurückzuführen ist. Bei einer chronischen Belastung mit geringen Konzentrationen wurde eine leichte Stimulierung der effektiven Quantenausbeute mit gleichzeitiger Abnahme der Chlorophyllkonzentration beobachtet, die mit einer Chlorophyllzerstörung durch reaktive Sauerstoffmoleküle und einer Kompensation durch höhere Effizienz erklärbar wäre.

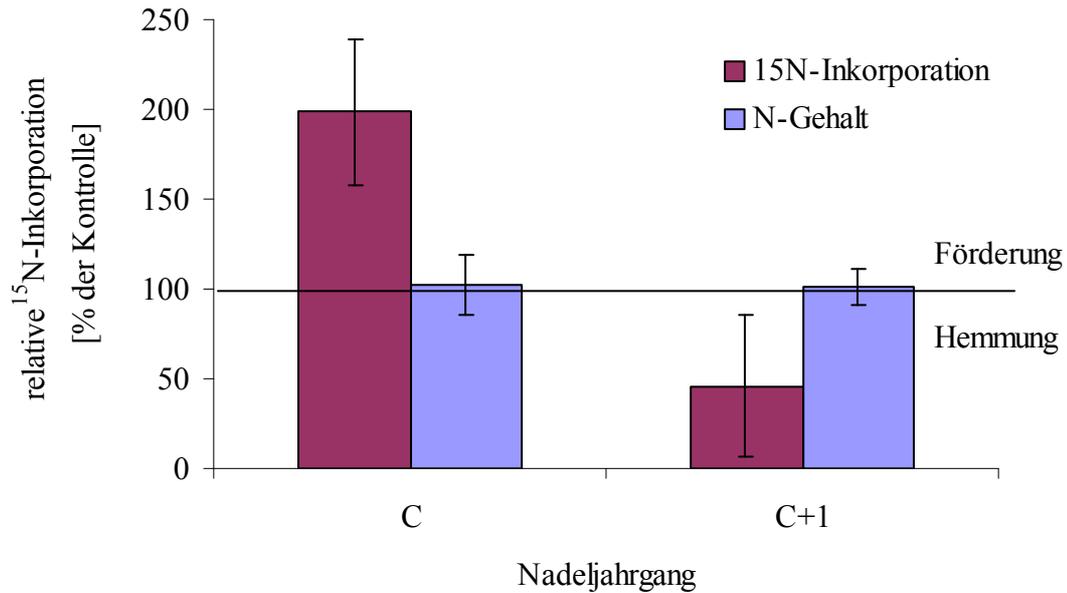
#### 4.2.2.2 Stickstoffmetabolismus

Für die Untersuchung des Einflusses atmosphärischer TCA-Konzentrationen auf die Syntheseleistung und den Stickstoffstoffwechsel von *Pinus sylvestris* wurde bei V1 der Gesamtstickstoffgehalt sowie die  $^{15}N$ -Inkorporation in die Protein- und Nichtproteinfraktion und bei V2 neben den  $^{15}N$ -Inkorporationsraten in den Stickstofffraktionen, die Nitritreduktase(NIR)-Aktivität und der Gehalt an löslichen Proteinen untersucht. Anhand dieser Studien sollte ermittelt werden, ob atmosphärische TCA den N-Metabolismus von Kiefernpflanzen beeinflusst und ob es Unterschiede zwischen akuter und chronischer Belastung gibt.

### Ergebnisse

#### Gesamtstickstoff

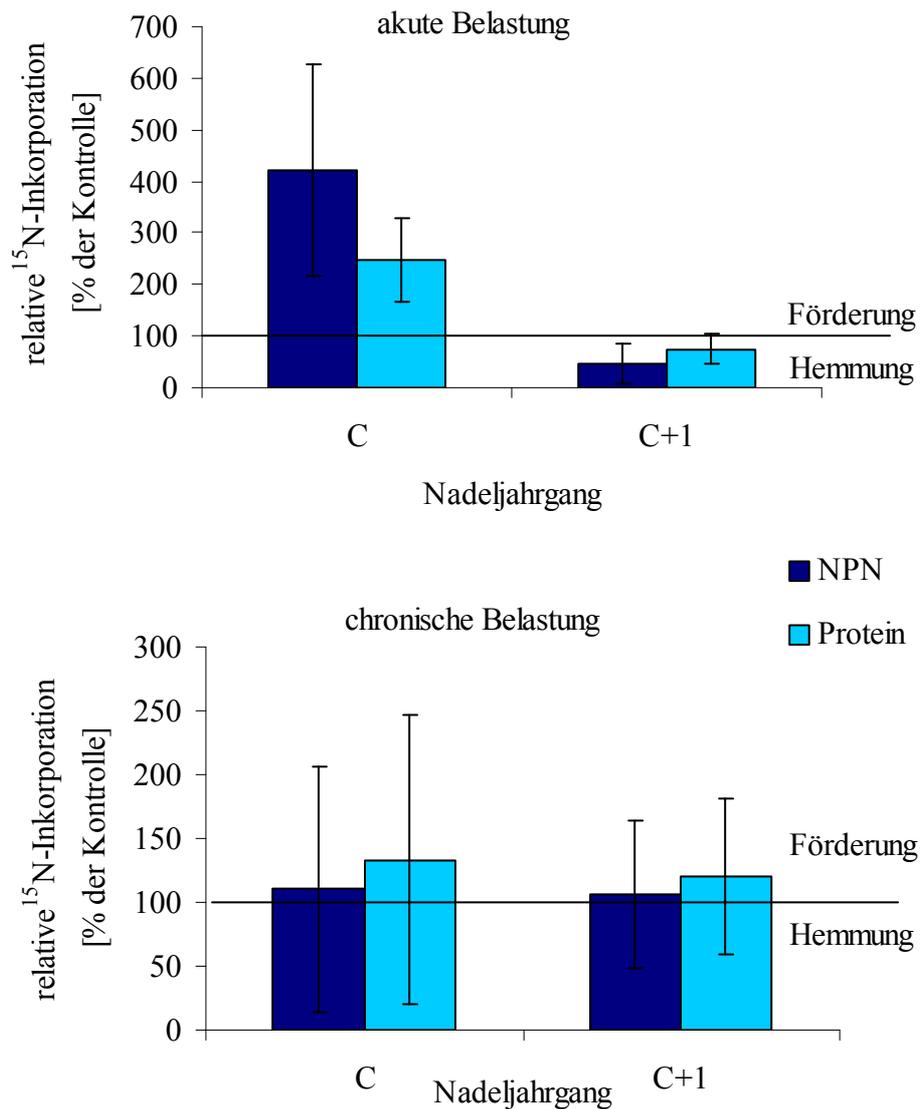
Wie in Abb. 20 ersichtlich, ändert sich der Gesamtstickstoffgehalt bei akuter TCA-Belastung kaum. Er ist mit 2,4 % bzw. 1,3 % gegenüber der Kontrolle nur unwesentlich höher. Die  $^{15}N$ -Häufigkeit im Gesamtstickstoff der Pflanze ist dagegen im diesjährigen Nadeljahrgang gegenüber der Kontrolle um 100 % erhöht und im vorjährigen Nadeljahrgang um 50 % reduziert.



**Abb. 20** Relative  $^{15}\text{NO}_3^-$ -Inkorporation und relativer Stickstoffgehalt in % zur Kontrolle des aktuellen (C) und vorjährigen Nadeljahrgangs (C+1) von *Pinus sylvestris* nach einer akuten atmosphärischen TCA-Belastung mit  $262 \mu\text{g TCA}/\text{m}^3$  ( $n = 4$ )

#### NPN- und Proteinfraction

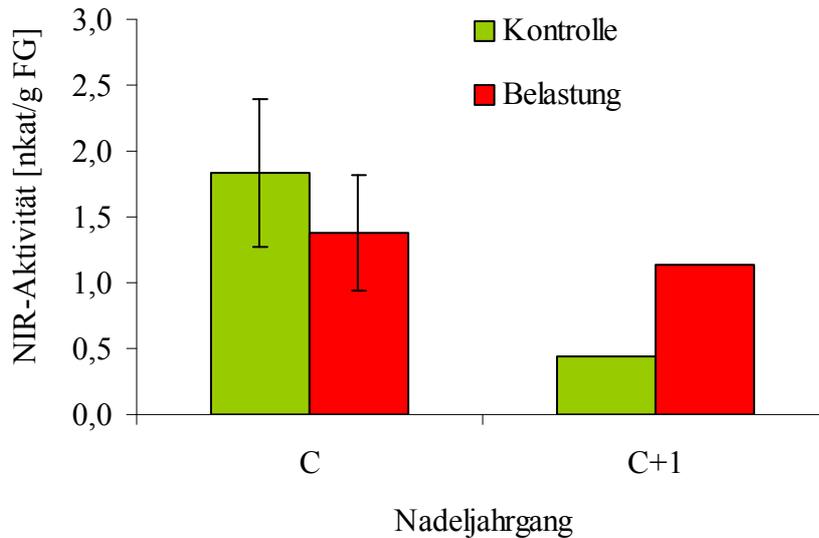
Um eine Aussage zur Proteinsynthese treffen zu können, wurde das Pflanzenmaterial in die Protein- und Nichtproteinfraktion getrennt. Die Ergebnisse der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation in die Protein- und Nichtproteinfraktion der TCA-belasteten Pflanzen im Verhältnis zu den Kontrollpflanzen sind in Abb. 21 dargestellt. Bei V1 (akute Belastung) sind deutliche Unterschiede zwischen Kontrolle und Belastung zu erkennen. Beim diesjährigen Nadeljahrgang ist in den Stickstofffraktionen eine höhere  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation als im vorjährigen Nadeljahrgang zu verzeichnen. Am stärksten beeinflusst wird die Nichtproteinfraktion. Bei ihr wurde in den jungen Nadeln eine über 400 % höhere  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation gegenüber der Kontrolle gemessen. In der Proteinfraction ist die Förderung der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation mit 250 % deutlich geringer als in der NPN-Fraktion. Die älteren Nadeln weisen jedoch eine Hemmung in der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation auf, die in der NPN-Fraktion stärker ist als in der Proteinfraction. Bei der chronischen TCA-Belastung (V2) konnten nur geringe Unterschiede in der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation ermittelt werden. Es ist eine leichte Erhöhung der  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeiten in den belasteten Pflanzen, besonders in der Proteinfraction, ersichtlich. Durch die großen Abweichungen der einzelnen Pflanzen und den daraus resultierenden hohen Fehlern sind die Unterschiede in den Studien zur  $^{15}\text{N}$ -Inkorporationen nicht signifikant.



**Abb. 21** Relative  $^{15}\text{NO}_3^-$ -Inkorporation in die NPN- und Proteinfraction des aktuellen (C) und vorjährigen (C+1) Nadeljahrgangs von *Pinus sylvestris* nach einer akuten ( $262 \mu\text{g TCA}/\text{m}^3$ ) und chronischen ( $0,16 \text{ ng TCA}/\text{m}^3$ ) atmosphärischen TCA-Belastung ( $n = 4$ )

### Nitritreduktase

Zur Untersuchung der Stickstoffassimilation auf enzymatischer Ebene wurde die Nitritreduktase-Aktivität bestimmt. Die Enzymaktivität der Nitritreduktase bei den Kiefernadeln schwankt zwischen 0,5 und 2,5 nkat/g FG. Im diesjährigen Nadeljahrgang (C) ist die Aktivität deutlich höher als im vorjährigen Nadeljahrgang (C+1). Im Vergleich zwischen Kontrolle und Versuchsvariante ist bei den jüngeren Nadeln eine um 19 % geringere Aktivität bei den belasteten Pflanzen zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu kommt es bei den älteren Nadeln zu einer massiven Förderung. Die Applikationspflanzen weisen gegenüber den Kontrollpflanzen eine um 280 % höhere Nitritreduktase-Aktivität auf.



**Abb. 22** Nitritreduktase-Aktivität des aktuellen (C) und vorjährigen (C+1) Nadeljahrgangs von *Pinus sylvestris* nach einer chronischen ( $0,16 \text{ ng TCA/m}^3$ ) atmosphärischen TCA-Belastung im Vergleich zur Kontrolle ( $n = 4$ ).

## Diskussion

### Gesamtstickstoff, NPN- und Proteinfraktion

Anhand der Ergebnisse konnte eine Wirkung von TCA auf den Stickstoffmetabolismus, besonders bei der akuten Belastung, festgestellt werden. Durch die erhöhten  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeiten in den belasteten Pflanzen gegenüber der Kontrolle kann auf eine höhere Stickstoffaufnahme und Inkorporation geschlossen werden. Einen Einfluss von TCA auf den Stickstoffmetabolismus von *Pinus sylvestris* wurde von Sutinen et al. (1997) durch Wurzelapplikation und atmosphärische Belastung und von Hafner et al. (2002a) durch Wurzelapplikation beobachtet. Beide Arbeitsgruppen konnten eine höhere Stickstoffaufnahme bzw. Stickstoffkonzentration in den Nadeln infolge der TCA-Belastung feststellen, was mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt. Diese zwei Arbeitsgruppen konnten ebenfalls Unterschiede zwischen den Nadeljahrgängen beobachten, die jedoch kontrovers sind. Während bei den Arbeiten von Sutinen et al. (1997) vor allem die jungen Nadeln beeinflusst wurden, konnten Hafner et al. (2002a) eine höhere Stickstoffinkorporation in die älteren Nadeln feststellen. Bei der chronischen TCA-Belastung (V2) weist sowohl die Protein- als auch die NPN-Fraktion des diesjährigen Nadeljahrgangs eine leicht höhere relative Stickstoffinkorporation gegenüber dem vorjährigen Nadeljahrgang auf. Diese Ergebnisse entsprechen den Resultaten von Sutinen et al. (1997). Bei der akuten TCA-Belastung konnten ebenfalls im diesjährigen Nadeljahrgang höhere Stickstoffinkorporationsraten gemessen werden, im vorjährigen Nadeljahrgang hingegen wurde eine Hemmung des Stickstoffeinbaus ermittelt. Die Wirkung atmosphärischer TCA ist sowohl von der Konzentration und Applikationsdauer, als auch vom Nadelmaterial abhängig. Bei anderen Untersuchungen mit atmosphärischen Schadstoff-

belastungen konnten auch Einflüsse auf den Stickstoffmetabolismus ermittelt werden. So zeigten geringe Ozon- und Bromoxynilbelastungen ebenfalls eine höhere Stickstoffinkorporation in terrestrische Pflanzen, während hohe Konzentrationen eine Hemmung der Stickstoffaufnahme zur Folge haben (Jung et al., 1994; Möcker et al., 1996; Schweizer et al., 2000).

Die  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation stellt einen Indikator für die metabolische Aktivität der Versuchspflanzen dar. Ein erhöhter Metabolismus ist eine direkte Reaktion der Pflanze auf Stress (Brunold et al., 2000). Durch den Stress kommt es zur verstärkten Synthese von Schutzproteinen und zu einer Erhöhung der Aktivität von Detoxifikationsenzymen. Aus diesem Grunde kommt es zu einem erhöhten Stickstoffbedarf und damit zu einer gesteigerten Stickstoffinkorporation. Ist die Schadstoffkonzentration jedoch zu groß, oder kann das Pflanzenmaterial sich nicht mehr auf den Stress einstellen, so kommt es zu einer Erschöpfung des Metabolismus, der sich in einer verringerten Stickstoffinkorporation zeigt (Ballach, 1998).

### Reproduzierbarkeit der $^{15}\text{N}$ -Inkorporationen

Die Standardabweichungen der Mittelwerte beim N-Gehalt, der Proteinkonzentration und den Enzymaktivitäten sind im allgemeinen nicht höher als 30 %, dagegen sind die Standardabweichungen bei der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation z. T. sehr hoch und auch sehr unterschiedlich. Das liegt zum einen daran, dass sich die Bäume schon von vorn herein im Metabolismus stark unterscheiden und somit auch unterschiedlich empfindlich auf die TCA-Belastung reagieren.

Ein weiterer Grund kann im Wurzelraum der Pflanze liegen. Hat eine Pflanze ein größeres Wurzelgeflecht, kann sie auch im gleichen Zeitraum eine größere Menge Nährsalze aufnehmen, als eine vergleichbare Pflanze mit weniger Wurzeln. Dies wäre dann in unterschiedlichen  $^{15}\text{N}$ -Inkorporationsraten direkt messbar. Des Weiteren sind die Pflanzen in Bodensubstrat eingepflanzt, was eine homogene Verteilung der Tracersubstanz im Topf nicht gewährleistet. Darüber hinaus kann auch eine unterschiedliche Bodentextur unterschiedliche Adsorptionseigenschaften aufweisen. Somit sind auch die für die Pflanze frei verfügbaren Nährsalze verschieden. All dies sind mögliche Ursachen dafür, dass der berechnete Fehler bei den  $^{15}\text{N}$ -Inkorporationsraten so groß ausfällt. Die  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation ist ein empfindlicher Parameter, der durch viele Faktoren beeinflusst wird und der eine hohe Variabilität aufweist.

### Nitritreduktase

Ob die gesteigerte Stickstoffinkorporation auch mit einer höheren Aktivität der Stickstoffassimilationsenzyme übereinstimmt, wurde bei V2 (chronische Belastung) anhand der Nitritreduktase überprüft. Theoretisch ist TCA in der Lage, Proteine zu modifizieren (Ashton & Crafts, 1987). Daraus können unter anderem auch veränderte Enzymaktivitäten resultieren. Die Ergebnisse zeigten bei der TCA-Belastung im diesjährigen Nadeljahrgang geringere und im vorjährigen höhere Aktivitäten gegenüber der Kontrolle. Daher kann nicht bestätigt werden, dass die höhere Stickstoffinkorporation mit der NIR-Aktivität zusammenhängt oder eine Folge dieser ist. Da jedoch die spezifische NIR-Aktivität nicht berechnet werden konnte (siehe Kap. 3.5.4.2), ist es möglich, dass die veränderten Aktivitäten eine Folge veränderter Gehalte an löslichem Protein sind. Die im

GST-Rohenzymextrakt bestimmten Proteingehalte (siehe Kap. 4.2.2.3) sind bei C ebenfalls geringfügig erniedrigt und bei C+1 erhöht.

Die Enzymaktivitäten stellen die aktuelle Situation des Stoffwechsels dar und werden durch eine Vielzahl anderer Faktoren beeinflusst. Die  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation kennzeichnet hingegen den Metabolismus integrativ über einen längeren Zeitraum und ist deswegen umfassender und aussagekräftiger.

#### 4.2.2.3 GST-Aktivität

Wie im Kapitel 2.2.3 schon beschrieben, repräsentieren die Glutathion-S-Transferasen eine große Gruppe von Detoxifikationsenzymen der Phase II-Reaktion, die die Konjugation von Xenobiotika mit dem Tripeptid Glutathion katalysieren. In diesem Versuch wurde die Aktivität von GST im Rohenzymextrakt mit dem Modellsubstrat CDNB untersucht, um eine Aussage zu treffen, inwieweit die kontrollierte Begasung mit umweltrelevanten TCA-Konzentrationen die GST-Aktivität in Kiefernadeln verändert.

#### Ergebnisse

Im diesjährigen Nadeljahrgang ist bei den Applikationspflanzen die Volumen-GST-Aktivität gegenüber den Kontrollpflanzen um 10 % erhöht. Durch den gleichzeitig geringeren Anteil an löslichem Protein ist die spezifische GST-Aktivität um 40 % erhöht. Im vorjährigen Nadeljahrgang ist bei den belasteten Pflanzen eine um 71 % höhere Volumen-GST-Aktivität ersichtlich, durch den ebenfalls höheren Anteil an löslichem Protein ist die spezifische GST-Aktivität nur noch um 40 % erhöht. Signifikante Unterschiede im diesjährigen Nadeljahrgang konnten jedoch nicht festgestellt werden. Beim vorjährigen Nadeljahrgang wurde von einer Mischprobe die Enzymaktivität bestimmt, wodurch keine Statistik mehr möglich ist.

**Tab. 12** Volumen-GST-Aktivität [nkat/g FG], Gehalt an löslichem Protein [mg/g FG] und spezifische GST-Aktivität [nkat/mg] der Nadeln des aktuellen (C) und vorjährigen (C+1) Nadeljahrgangs von *Pinus sylvestris* nach einer chronischen ( $0,16 \text{ ng TCA/m}^3$ ) atmosphärischen TCA-Belastung im Vergleich zur Kontrolle (n = 4).

	diesjähriger Nadeljahrgang		vorjähriger Nadeljahrgang	
	Kontrolle	Belastung	Kontrolle	Belastung
<b>Volumen-GST-Aktivität</b>	2,78 ± 0,71	3,08 ± 1,10	1,18	2,02
<b>lösliches Protein</b>	1,35 ± 0,44	1,23 ± 0,54	0,93	1,15
<b>spezifische GST-Aktivität</b>	2,29 ± 1,07	3,21 ± 1,83	1,27	1,79

## Diskussion

GST-Aktivitäten in Koniferennadeln wurden schon von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Sie sind im Vergleich zu anderen Nutzpflanzen relativ gering (Schröder & Berkau, 1993; Schröder et al., 2000). Das Substratspektrum dieser Glutathion-S-Transferasen ist breit, auch wenn Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies existieren. Als Substrat können Herbizide wie Alachlor, Fluorodifen und PCNB und einige Chlorbenzole dienen (Schröder et al., 2000), aber auch aliphatische Chlorkohlenwasserstoffe, wie Methylenchlorid, Trichlorethan und Tetrachlorethen (Schröder et al. 1997) sowie jodierte Substrate können umgesetzt werden. Es konnte nicht bestätigt werden, dass Atrazin von Fichtennadeln umgesetzt wird (Schröder et al. 1990b).

Da in jüngerer Vergangenheit bekannt geworden ist, dass leicht flüchtige chlorierte Kohlenwasserstoffe in größeren Konzentrationen in der Luft vorkommen und von Koniferennadeln akkumuliert werden, wurde in verschiedenen Freilandstudien im Hinblick auf das Detoxifikationsvermögen von Kiefern und Fichten an unterschiedlichen Standorten die GST-Aktivität untersucht. In diesem Zusammenhang wird die GST-Aktivität auch als Biomarker für Monitoringstudien von Waldökosystemen diskutiert. Eine bestätigende Korrelation zwischen Schadstoffgehalt bzw. geschädigten Bäumen und Enzymaktivität konnte dabei nicht abgesichert werden. Dennoch werden Zusammenhänge zwischen Schadstoffgehalt bzw. geschädigten Bäumen und der GST-Aktivität vermutet. Zum Teil konnten negative Korrelationen zwischen GST-Aktivität und leicht flüchtigen chlorierten Kohlenwasserstoffen ermittelt werden, die jedoch nicht statistisch abgesichert werden konnten (Plümacher & Schröder 1994).

Die Untersuchungen der GST-Aktivität von sichtbar geschädigten Bäumen zeigten in Tallagen eine um 53 % reduzierte Aktivität gegenüber gesunden Bäumen (Schröder et al. 1995). In Höhenlagen wurde dieser Effekt nicht beobachtet. In einer neueren Freilandstudie wurde eine mögliche Korrelation zwischen den Gehalten von Nitrophenolen und Trichloressigsäure und der GST-Aktivität untersucht (Schröder et al. 2000). Diese Korrelation konnte jedoch nicht statistisch abgesichert werden. Es zeichnete sich aber ein schwacher Zusammenhang zwischen Schadstoffgehalt und GST-Aktivität ab. Nur in älteren Nadeln konnte bei einer hohen TCA-Belastung auch eine höhere GST-Aktivität gemessen werden. In jungen Nadeln konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Bezüglich anderer Parameter (z. B. Temperatur, Niederschlag, Seehöhe und Nährstoffgehalt) konnte keine Korrelation festgestellt werden. Die Autoren nehmen an, dass eine Reihe anderer, nicht erhobener Parameter die GST-Aktivität in den Nadeln maßgeblich beeinflussen. Bei der TCA-Bestimmung sollte auch berücksichtigt werden, dass der Gesamtschadstoffgehalt der Nadel, also auch der kutikulär gebundene, gemessen wird. Dieser an der Oberfläche der Nadeln gebundene Schadstoff ist nicht bioverfügbar und beeinflusst die GST in den Zellen nicht. Ein anderer wichtiger Punkt ist das Vorhandensein verschiedener Isoenzyme, die unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen und nicht mit CDNB erfaßt werden können. Darin kann auch eine potentielle Ursache für die nur sehr schwache Korrelation liegen. Anhand dieser Ergebnisse sollte die GST-Aktivität als möglicher Biomarker kritisch betrachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten in allen Nadelproben GST-Aktivitäten gegenüber dem Modellsubstrat CDNB gemessen werden. Die spezifischen Aktivitäten lagen im Bereich zwischen 1,2 und 3,2 nkat/mg. Sie sind verglichen mit den in der Literatur angegebenen Werte von

Freilandproben (0,3 - 0,8 nkat/mg) etwas höher (Schröder & Berkau, 1993; Lange et al., 1998; Schröder & Wolf, 1996). Ein Unterschied zwischen den Nadeljahrgängen wurde festgestellt, wobei der diesjährige Nadeljahrgang eine höhere Aktivität aufwies als der vorjährige. Ein solches Verhältnis wurde auch in Freilanduntersuchungen ermittelt (Schröder et al., 2000). Durch die Belastung der Kiefern sämlinge mit umweltrelevanten TCA-Konzentrationen konnte gegenüber den Kontrollpflanzen eine deutlich höhere GST-Aktivität in den Nadeln ermittelt werden, die im vorjährigen Nadeljahrgang ausgeprägter war als im diesjährigen. Eine solche Induktion der GST-Aktivität durch kontrollierte TCA-Belastung konnte in einer anderen Begasungsstudie ebenfalls gefunden werden (Schröder et al. 1997). Es wurden jedoch keine vergleichenden Aussagen bezüglich der induzierten GST-Aktivität und des Nadelalters getroffen. Neben der Bestimmung der GST-Aktivität wurden auch die GST-Isoenzymmuster von TCA-belasteten Pflanzen und Kontrollpflanzen untersucht. Dabei wurde ein verändertes Isoenzymmuster mit deutlich veränderten Maximalgeschwindigkeiten bezüglich dem Substrat CDNB festgestellt. Außerdem fanden sie bei den belasteten Pflanzen eine Substratspezifität gegenüber dem Substrat Ethacrylic acid (ETA), während die Kontrollpflanzen bezüglich dieses Substrates GST-Aktivitäten zeigten (Schröder et al. 1997). Sie nahmen an, dass die TCA-belasteten Kiefernpflanzen als Adaptionsmechanismus mit der Induktion verschiedener Isoenzyme des Detoxifikationsmetabolismus reagieren. Ein solch verändertes GST-Isoenzymmuster könnte auch eine mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit gefundene höhere GST-Aktivität sein. Die stärkere Beeinflussung des vorjährigen Nadeljahrgangs könnte durch eine höhere TCA-Konzentration in der Nadel hervorgerufen werden. Die Tatsache, dass TCA in den älteren Nadeln in höheren Konzentrationen vorkommt, wurde schon in verschiedenen Untersuchungen festgestellt (siehe Kap. 2.1.5).

#### 4.2.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch die Belastung von *Pinus sylvestris* mit atmosphärischer TCA konnten folgende Wirkungen festgestellt werden:

##### Photosynthese und Pigmentgehalt:

akute TCA-Belastung (4 Tage; 262µg TCA/m<sup>3</sup>):

- signifikante Erniedrigung der effektiven Quantenausbeute des PS II mit stärkerer Beeinflussung der jüngeren Nadeln

chronische TCA-Belastung (50 Tage; 0,16 ng TCA/m<sup>3</sup>):

- leichte Erhöhung der effektiven Quantenausbeute des PS II in beiden Nadeljahrgängen
- signifikante Verringerung des Pigmentgehaltes im diesjährigen Nadeljahrgang bei einer gleichzeitigen Erhöhung des Verhältnisses von Chl a / Chl b
- leichte Erniedrigung des Chlorophyllgehaltes im vorjährigen Nadeljahrgang bei gleichbleibendem Verhältnis von Chl a / Chl b.

Anhand der Bestimmung der effektiven Quantenausbeute des PS II und des Pigmentgehaltes konnte ein Einfluss atmosphärischer TCA auf die Photosynthese der Nadeln von *Pinus sylvestris* sowohl bei der akuten, als auch bei der chronischen TCA-Belastung festgestellt werden.

Stickstoffmetabolismus:

akute TCA-Belastung (4 Tage; 262 µg TCA/m<sup>3</sup>):

- keine Veränderungen im Gesamtstickstoffgehalt
- Erhöhung der <sup>15</sup>N-Inkorporation in die NPN- und Proteinfraction im diesjährigen Nadeljahrgang und Erniedrigung im vorjährigen Nadeljahrgang

chronische TCA-Belastung (50 Tage; 0,16 ng TCA/m<sup>3</sup>):

- leichte Erhöhung der <sup>15</sup>N-Inkorporation in der NPN- und Proteinfraction des diesjährigen und vorjährigen Nadeljahrgangs mit stärkerer Beeinflussung der Proteinfraction
- leichte Erniedrigung der NIR-Aktivität im diesjährigen Nadeljahrgang und leichte Erhöhung im vorjährigen Nadeljahrgang.

<sup>15</sup>N-Tracerstudien zeigen einen Einfluss akuter TCA-Konzentrationen auf die Stickstoffaufnahme der Nadeln von *Pinus sylvestris*, wobei es große Unterschiede zwischen dem vorjährigen und dem diesjährigen Nadeljahrgang gibt.

GST-Aktivität:

chronische TCA-Belastung (50 Tage; 0,16 ng TCA/m<sup>3</sup>):

- erhöhte spezifische GST-Aktivität mit stärkerer Ausprägung im vorjährigen Nadeljahrgang.

### 4.2.3 Atmosphärische TCA-Belastungen genetischer Differenzierungen von *Cirsium arvense*

Zu den wichtigsten Komponenten des globalen Wandels, der sich in den letzten Jahrzehnten auf der Erde vollzogen hat, zählten unter anderem auch Beeinflussung, Veränderung und Verlust der biologischen Vielfalt. Die Kenntnisse über die Wirkung anthropogener Luftschadstoffe auf die genetische Vielfalt einer Art sind noch sehr lückenhaft. Aufgabe dieser Studie war es, unterschiedliche genetische Herkünfte von *Cirsium arvense* nach atmosphärischer TCA-Belastung biochemisch und ökotoxikologisch zu charakterisieren. Dazu wurden 5 Monate alte Pflanzen von *Cirsium arvense* (Ackerkratzdistel), die von verschiedenen Standorten isoliert wurden, angezogen (siehe Kap. 3.2.4.1). Es wurde davon ausgegangen, dass sich diese Pflanzen hinsichtlich ihres Genotyps unterscheiden. Nach der Belastung wurde das Blattmaterial in unterschiedliche Blattaltersgruppen aufgeteilt.

Im ersten Versuch wurden je vier männliche Pflanzen der Herkunft P1 exponiert, um die Abweichungen innerhalb eines Genotyps zu untersuchen. In den darauf folgenden drei Wiederholungsversuchen wurde je eine weibliche Pflanze der Herkünfte P2, P3, P4 und P5 herangezogen. Appliziert wurden jeweils 200 µg TCA/m<sup>3</sup> über vier Tage (siehe Kap. 3.2.4.2). Als Wirkungsparameter wurde der Stickstoffmetabolismus mit Hilfe der <sup>15</sup>N-Tracertechnik und die Photosynthese durch Bestimmung der effektiven Quantenausbeute des PS II in unterschiedlichen Blattaltersgruppen untersucht.

#### 4.2.3.1 Photosynthese

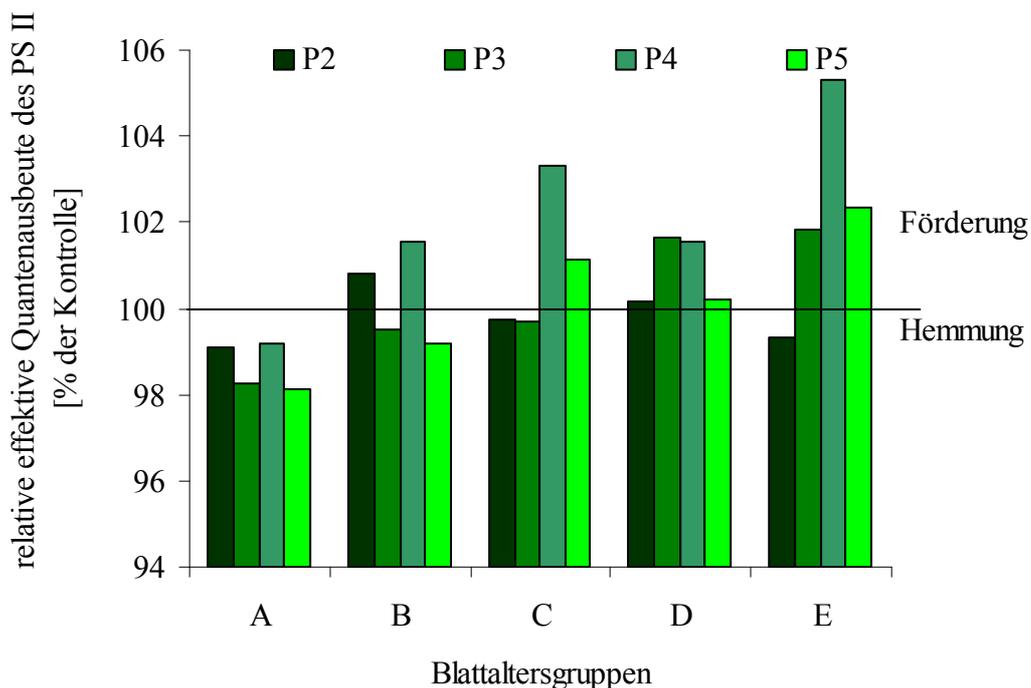
Wie im Kap. 2.2.2 bereits erwähnt, ist die Photosynthese ein essentieller Stoffwechselprozess, der Energie und Reduktionsäquivalente liefert und durch viele Faktoren beeinflusst werden kann. Innerhalb der Population einer Art bilden sich jedoch genetische Differenzen hinsichtlich der photosynthetischen Eigenschaften heraus, die für die Anpassung an veränderte Umweltbedingungen wichtig sein können (Zhang et al., 1993; Dudley, 1996). Mit Hilfe der Bestimmung der effektiven Quantenausbeute des PS II können Unterschiede im Einfluss atmosphärischer TCA zwischen den verschiedenen genetischen Herkünften ermittelt werden.

#### Ergebnisse

Im Anhang Tab. 31 sind die ermittelten Werte der effektiven Quantenausbeute des PS II der Kontrollpflanzen aufgelistet. Daraus ist ersichtlich, dass die effektive Quantenausbeute in den jüngeren Blättern (Blattaltersgruppe A-C) im allgemeinen größer ist, als in den älteren. Signifikante Unterschiede zwischen den Herkünften sind nicht vorhanden. Es lässt sich jedoch feststellen, dass P2 generell höhere Werte aufweist. Im Mittel kann folgende Reihenfolge, beginnend mit der höchsten effektiven Quantenausbeute, aufgestellt werden: P2 > P4 > P5 > P3.

Die effektive Quantenausbeute des PS II lag nach dem Begasungsversuch sowohl bei der Kontrolle, als auch bei der Belastung im Bereich zwischen 0,75 und 0,83 (Abb. 23). Es konnten

keine signifikanten Veränderungen infolge der TCA-Belastung festgestellt werden. Es ist jedoch erkennbar, dass die jüngsten Blätter, also Blattaltersgruppe A, eine Hemmung gegenüber der Kontrolle bei allen Genotypen zeigten, wobei P5 die stärkste Hemmung aufweist. Bei den anderen Blattaltersgruppen konnten zum Teil Förderungen, aber auch Hemmungen je nach Genotyp festgestellt werden; sie weisen aber keine Einheitlichkeit auf. Signifikante Unterschiede zwischen den Herkünften konnten nicht ermittelt werden. Als Trend lässt sich erkennen, dass P2 auch in den älteren Blattaltersgruppen vorwiegend mit einer Hemmung reagiert. P4 hingegen zeigte die größte Förderung gegenüber den anderen Genotypen. Folgende Reihenfolge mit zunehmender Hemmung der effektiven Quantenausbeute kann festgestellt werden: P4 > P5 > P3 > P2.



**Abb. 23** Relative effektive Quantenausbeute des PS II unterschiedlicher Herkünfte von *Cirsium arvense* nach einer atmosphärischen TCA-Belastung mit  $200 \mu\text{g TCA}/\text{m}^3$  in Abhängigkeit von der Blattaltersgruppe A - E ( $n = 2$ ).

### Diskussion

In Kap. 4.2.2.1 wurde bereits der Einfluss atmosphärischer TCA auf die Photosynthese des PS II bei *Pinus sylvestris* diskutiert. Dort konnte bei einer 4-tägigen Belastung mit  $262 \mu\text{g TCA}/\text{m}^3$  eine signifikante Verringerung der effektiven Quantenausbeute des PS II ermittelt werden, was einen Einfluss der TCA auf den photosynthetischen Apparat vermuten lässt. In Studien mit isolierten Thylakoiden wurde der direkte Einfluss von TCA auf den photosynthetischen Elektronentransport untersucht (Govindjee et al., 1997). Es kann vermutet werden, dass die Substanz ähnlich wie klassische PS II-Hemmer den Elektronenfluss durch Bindung in der  $\text{Q}_\text{A}\text{Q}_\text{B}$ -Region des D1/D2-Komplexes verhindert (siehe Diskussion Kap. 4.2.2.1). Veränderungen dieses D1/D2-Komplexes durch genetische Differenzierung könnten Unterschiede in der Wirkung von TCA hervorrufen. So

konnten Abweichungen in der effektiven Quantenausbeute zwischen Wildtypen und Atrazin resistenten Pflanzen von *Amaranthus hybridus* gefunden werden (Arntz et al., 2000). Arntz et al. vermuten, dass Mutationen im D1-Protein, die die Atrazinresistenz bewirken, die Kinetik des Elektronentransfers im PS II verändern.

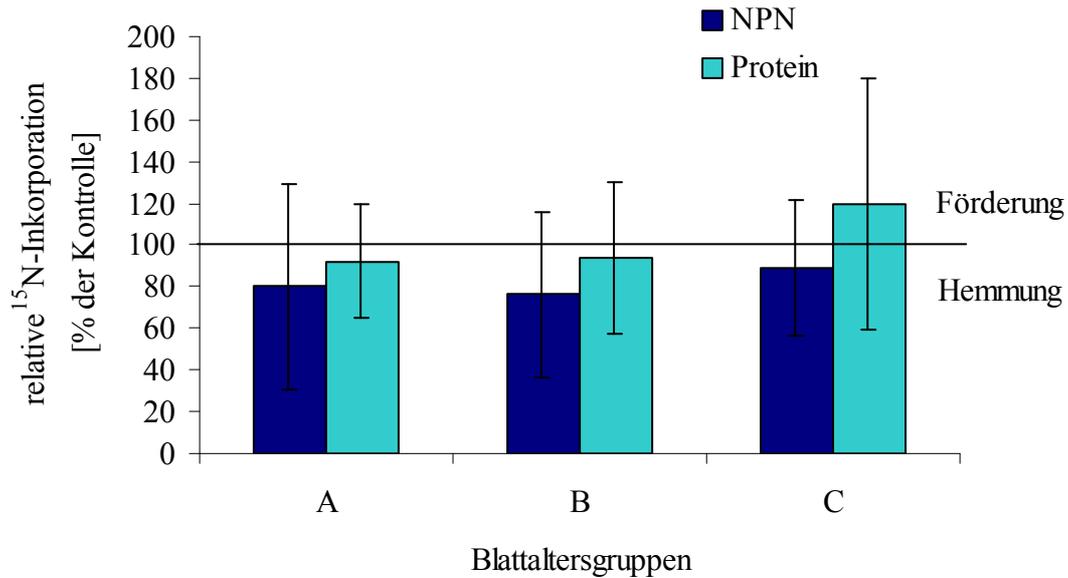
Signifikante Abweichungen in der Chlorophyllfluoreszenz zwischen den einzelnen Herkünften konnten sowohl in den Kontrollpflanzen, als auch in der Wirkung von atmosphärischer TCA bei den belasteten Pflanzen nicht ermittelt werden. Es lässt sich erkennen, dass P2 die genetische Herkunft ist, die ohne die TCA-Belastung die höchste effektive Quantenausbeute aufweist, aber auch empfindlicher auf die TCA-Belastung reagiert.

Im Gegensatz zu *Pinus sylvestris* (Kap. 4.2.2.1) konnte keine signifikante Wirkung der TCA auf die effektive Quantenausbeute des PS II bei *Cirsium arvense* gefunden werden. Generell reagierten die jüngeren Blätter (Blattaltersgruppe A) mit einer Abnahme der Quantenausbeute, die jedoch nicht größer als 2 % war. Die älteren Blätter (Blattaltersgruppe B - E) zeigten Förderungen bis zu 6 %. Daraus ist erkennbar, dass die jungen Blätter sensitiver gegenüber der atmosphärischen TCA sind. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei *Pinus sylvestris*, wo die jüngeren Nadeln auch die höhere Sensitivität aufwiesen. Unterschiedliche TCA-Aufnahmeraten, aber auch höhere Stoffwechselleistungen könnten Gründe für die größere Empfindlichkeit der jungen Blätter sein.

#### **4.2.3.2 Stickstoffmetabolismus**

##### Ergebnisse

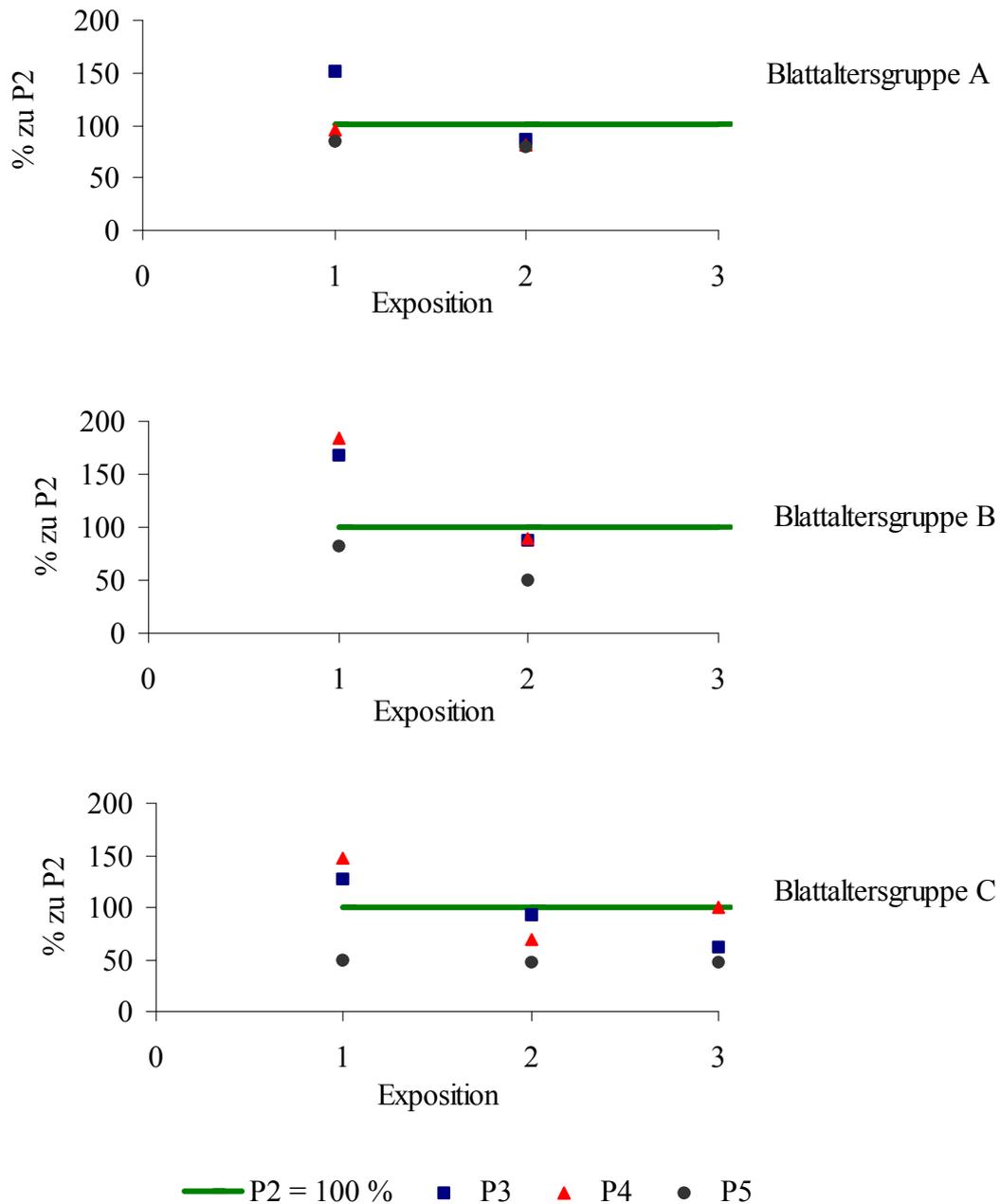
Im ersten Versuch wurden 4 männliche *Cirsium arvense* Pflanzen des Genotypes P4 mit atmosphärisch getragener TCA belastet, um eine Abweichung der Pflanzen untereinander zu ermitteln. In allen Blättern der drei untersuchten Altersgruppen kommt es durch die TCA-Belastung zu einer Hemmung der <sup>15</sup>N-Inkorporation in die NPN-Fraktion. Die Proteinfraction zeigt bei den jüngeren Blättern geringe Hemmungen und bei den älteren Blättern sogar eine leichte Förderung. Es lässt sich erkennen, dass die jungen Blätter eine stärkere Hemmung aufweisen. Infolge der hohen Variabilität der einzelnen Pflanzen (Standardabweichungen zwischen 35 % und 60 %), sind die Unterschiede nicht statistisch abzusichern.



**Abb. 24** Relative  $^{15}\text{NO}_3^-$ -Inkorporation in die NPN- und Proteinfraction der Blätter von *Cirsium arvense* der Herkunft P4 nach einer atmosphärischen TCA-Belastung von  $200 \mu\text{g TCA}/\text{m}^3$  in Abhängigkeit von der Altersgruppe A - C.

In den drei weiteren Begasungsversuchen wurden 4 verschiedene genetische Herkünfte mit TCA belastet. Die Ergebnisse der relativen  $^{15}\text{N}$ -Inkorporationen [% der Kontrolle] in die Gesamtstickstofffraktion sind zwischen den 3 Expositionen zum Teil sehr unterschiedlich und im Anhang in Tab. 27 aufgelistet. Bei einer mehrfraktionellen ANOVA-Analyse in der Altersgruppe C, bei der die drei Expositionen als Wiederholung angesehen wurden, ist nur in der Proteinfraction ein signifikanter Unterschied in der TCA-Wirkung zwischen den vier Herkünften ersichtlich. In der NPN-Fraction und in den anderen Altersgruppen konnten keine statistisch abgesicherten Differenzen in der Wirkung von TCA zwischen den verschiedenen Herkünften ermittelt werden. Da die Pflanzen bei den verschiedenen Expositionen auch ein unterschiedliches Alter aufwiesen, kann nicht von Parallelwerten ausgegangen werden.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde nur die  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation in die Gesamtstickstofffraktion herangezogen, die zunächst prozentual zur Kontrolle berechnet wurde. Für den Vergleich der einzelnen Herkünfte untereinander wurden anschließend diese Ergebnisse bei einer genetischen Herkunft 100 % gesetzt und das prozentuale Verhältnis der anderen genetischen Herkünfte dazu berechnet. In der Abbildung 25 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass P5 die Herkunft ist, die im Verhältnis zu den anderen Herkünften die geringste relative  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation aufweist.



**Abb. 25** Relative  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation in die Gesamtstickstofffraktion von *Cirsium arvense* in Abhängigkeit von Blattaltersgruppe und Expositionsversuch. Dargestellt sind die Ergebnisse von P3, P4 und P5 im Verhältnis zu P2.

Der Genotyp P2 reagierte bei Exposition 2 und 3 in allen Altersgruppen mit der höchsten relativen  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation. Der Genotyp P4 weist bei der ersten und dritten Exposition in der Blattaltersgruppe B und C die höchsten  $^{15}\text{N}$ -Inkorporationen auf. Bei dem Genotyp P3 hingegen ist generell kein Trend ersichtlich. Er weist nur bei der ersten Exposition bei den jüngsten Blättern die höchste  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation auf. In der Blattaltersgruppe C lässt sich folgende Reihenfolge mit zunehmender Hemmung der relativen  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation ermitteln:  $\text{P2} > \text{P4} > \text{P3} > \text{P5}$ . Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen konnten in der Gesamtproteinfraktion jedoch nicht ermittelt werden.

## Diskussion

Seit der Konvention über die biologische Vielfalt von 1992 in Rio de Janeiro rückt dieser Begriff verstärkt in das öffentliche Interesse. Die biologische Vielfalt bedeutet die Variabilität der lebenden Organismen jeglicher Herkunft. Sie erstreckt sich sowohl auf das Gebiet der Ökosysteme, als auch auf das der Arten und der genetischen Vielfalt innerhalb einer Art (Weigel, 1997).

### Bedeutung der Biodiversität im Ökosystem

Jedes Lebewesen wird durch verschiedene Faktoren seiner Umwelt beeinflusst. Dabei zeigt jeder Organismus innerhalb einer Population ein individuelles Reaktionsvermögen auf einen bestimmten Umweltfaktor, der auch als Selektionsfaktor angesehen werden kann. Dieses flexible Reaktionsvermögen der Einzelglieder einer Population auf verschiedene Umwelteinflüsse gewährleistet die Existenz der Population durch Ausgleich von Schwankungen. Dabei ist das Maß der genetischen Variationsbreite entscheidend für die Anpassungsfähigkeit an Umwelteinflüsse (Otto, 1994). Es sind die Organismen mit denjenigen Allelen überlegen, die möglichst wenig von den wachstums- und entwicklungshemmenden Faktoren beeinflusst werden, aber schnell auf fördernde Einflüsse reagieren können (Günther, 1991). Die Allelfrequenz einer Population ist nicht stabil. Sie ist zeitlich und räumlich variabel und wird durch Mutation, Selektion, Migration und Zufallswirkungen beeinflusst.

Infolge der beschleunigten Zerstörung natürlicher Habitate und der rasch zunehmenden Umweltverschmutzung ist die Aussterberate erhöht und wird auf das 10- bis 100-fache gegenüber dem geschichtlichen Hintergrund geschätzt (Pimm et al., 1995), wobei das Problem des Diversitätsverlustes nicht nur auf Wildarten begrenzt ist, sondern auch auf landwirtschaftliche Züchtungen zutrifft.

Auf der anderen Seite können Populationen in fremde Lebensräume eindringen, die sie vorher nicht bewohnt haben (Invasion). In vielen Fällen verschwinden die Invasoren wieder; sie können sich jedoch auch stark vermehren und etablieren und somit einen neuen Lebensraum erfolgreich besiedeln (Kuttler, 1993). Einheimische Arten können dabei verdrängt werden. Nun stellt sich die Frage, warum es manche Arten schaffen, sich erfolgreich anzusiedeln, und welche Faktoren dabei eine Rolle spielen.

### Biodiversität und Schadstoffe, speziell TCA

Chemische Kontaminationen können die biologische Vielfalt ändern, was sich z. B. in der Population durch veränderte Allelfrequenz zeigt. Dabei gibt es die Möglichkeit, dass die genetische Variation in der Population durch Mutationen ansteigt oder infolge von Engpässen sinkt. Studien zeigen jedoch, dass der Rückgang der genetischen Variation der häufigste Effekt ist (Bickham et al. 2000; Longauer et al. 2001). Die Folge der Umweltverschmutzung ist primär nicht der Rückgang der Populationsgröße, sondern ein Verlust ihrer genetischen Diversität.

Trichloressigsäure als sekundärer Luftschadstoff ist ubiquitär präsent, die Konzentrationen sind jedoch lokal sehr verschieden (Frank et al., 1994; 1995; Mc Culloch, 2002). Sie kann als Selektionsfaktor auf eine Population einwirken. Manche Arten sind in der Lage, dem Stress durch

phänotypische Veränderungen entgegen zu wirken. Es können sich jedoch auch durch genetische Anpassung neue Ökotypen herausbilden, oder besser angepasste Genotypen einer Art können in die Population eindringen und die bereits vorhandenen verdrängen. Diese vorhandenen Arten haben die Möglichkeit, sich in suboptimalen Räumen zu etablieren, durch Migration in andere Gebiete auszuwandern, oder sie sterben aus (Otto, 1994).

In den Untersuchungen dieser Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Einflusses atmosphärischer Trichloressigsäure auf die  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation in unterschiedlichen Stickstofffraktionen zwischen den einzelnen Herkünften von *Cirsium arvense* ermittelt werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass der Genotyp P5 mit der stärksten Hemmung der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation in die Gesamtstickstofffraktion der älteren Blätter reagiert.

Die Wirkung von TCA auf Pflanzen ist vielseitig (siehe Kap. 2.1.6). Schadsymptome, wie Wachstumsinhibierung, aber auch morphologische und zahlreiche biochemische Veränderungen in der Zelle konnten beobachtet werden. Mit der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation kann der Einfluss auf die metabolische Aktivität der Pflanze untersucht werden. Im männlichen Genotyp P5 konnte eine deutliche Hemmung des  $^{15}\text{N}$ -Einbaus in die Nichtproteinfraktion ermittelt werden, wobei die jüngeren Blätter die stärkste Hemmung aufweisen. Die Proteinfraktion wurde weniger stark beeinflusst. Mit diesem Ergebnis ist eine Verminderung der metabolischen Aktivität durch TCA hauptsächlich bei den jüngeren Blättern von *Cirsium arvense* nachweisbar.

Die anderen Genotypen zeigten bei den drei Wiederholungsversuchen zum Teil sehr unterschiedliche relative  $^{15}\text{N}$ -Inkorporationen. Ein Trend ist dabei nicht ersichtlich. Es konnten sowohl Hemmungen, als auch Förderungen ermittelt werden.

Anhand dieser Studie kann davon ausgegangen werden, dass die Trichloressigsäure den Stickstoffmetabolismus von *Cirsium arvense* beeinflusst. Damit kann sie grundsätzlich als Selektionsfaktor angesehen werden. Die in dieser Arbeit untersuchten genetischen Herkünfte von *Cirsium arvense* zeigten jedoch in der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation keine einheitlich differenzierte Reaktion darauf.

#### 4.2.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

- Eine 4-tägige Belastung von  $200 \mu\text{g TCA}/\text{m}^3$  hat keinen signifikanten Einfluss auf die effektive Quantenausbeute des PS II bei *Cirsium arvense*. Es ist eine leichte Hemmung, besonders bei den jüngsten Blättern, erkennbar.
- Die Trichloressigsäure beeinflusst den Stickstoffmetabolismus dieser Pflanze, wobei das Ausmaß vom Blattalter abhängig ist.
- Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Herkünften, dennoch sind leichte Differenzen ersichtlich.
- Die Kontrollpflanzen der genetischen Herkunft P2 wiesen bei der Chlorophyllfluoreszenz die höchste effektive Quantenausbeute des PS II auf. Diese genetische Herkunft reagierte ebenfalls bei der effektiven Quantenausbeute mit der größten Empfindlichkeit auf die TCA-Belastung. Hinsichtlich der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation reagierten diese Pflanzen mit der geringsten Hemmung.

### 4.3 Versuchsebene 3: Freilandähnlicher Versuch in open-top Kammern

In Ergänzung zu den Expositionsuntersuchungen wurde im Rahmen eines Biomonitoringprojektes die Wirkung von atmosphärischem Tetrachlorethylen, als Vorstufe der TCA, bei *Pinus sylvestris* und *Betula pendula* auf ihren Stickstoffstoffwechsel und den Wassergehalt untersucht.

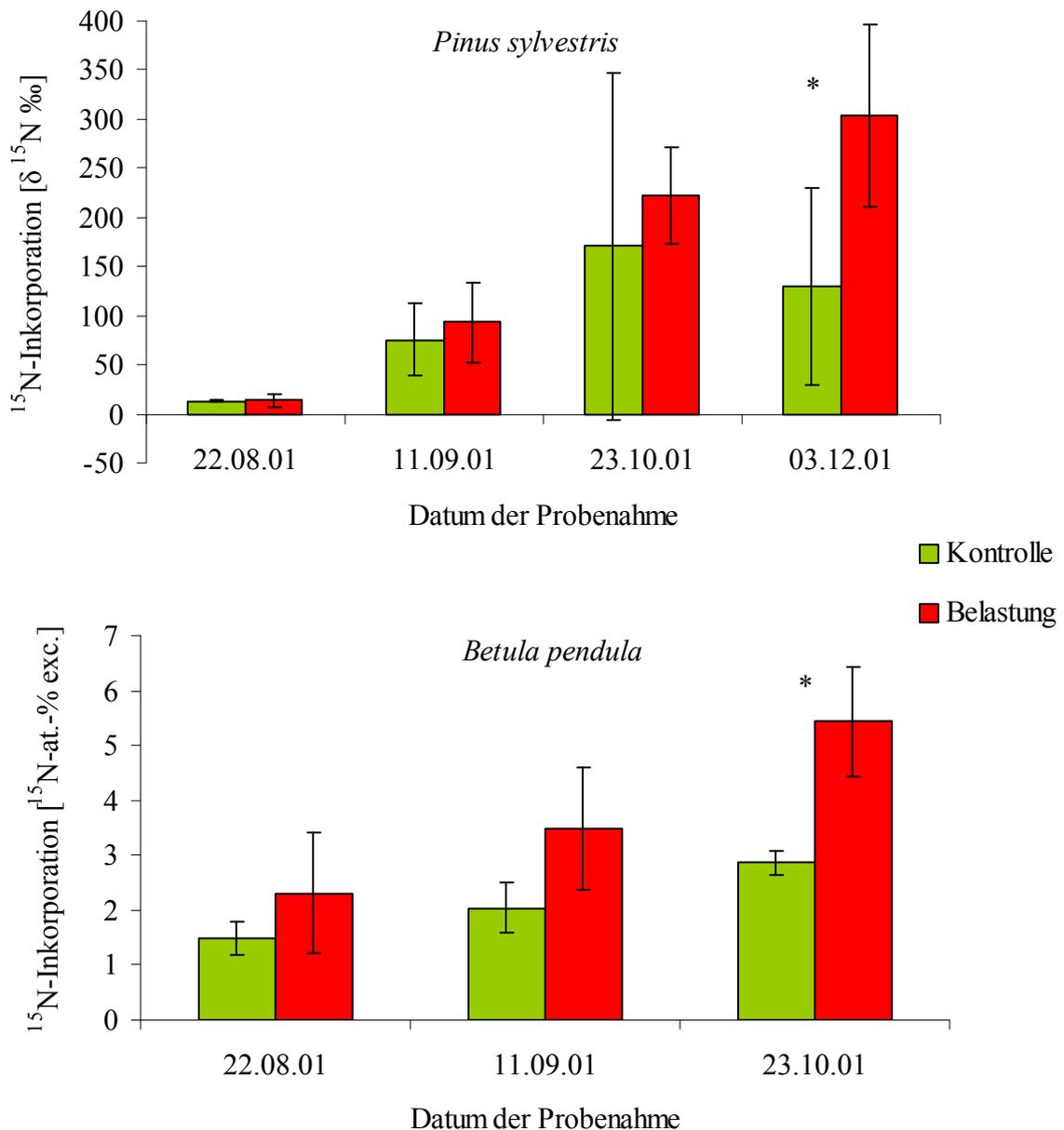
Die Versuche fanden in einem Kiefernforst bei Taura (Sachsen) statt. In open-top-Kammern befanden sich ca. 8 Jahre alte *in situ* gewachsene Kiefern aus einer Naturverjüngung und 5 Jahre alte getopfte Birkenpflanzen. In der Applikationskammer wurden die Pflanzen mit atmosphärischem Tetrachlorethylen (TECE) belastet. Die Pflanzen in der Kontrollkammer mit Umgebungsluft dienten als Referenz. Die Belastung mit TECE (20 ml/Woche) erfolgte im Zeitraum 30.05.2001 bis 20.12.2001. Die Tracerapplikation fand 12 Wochen nach Beginn des Versuches am 15.08.2001 statt. Als Wirkungsendpunkte wurden der Stickstoffmetabolismus durch die Ermittlung der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation und der Wassergehalt der Nadeln herangezogen.

#### 4.3.1 Stickstoffmetabolismus und TCA-Gehalt

Die Bildung von TCA aus Tetrachlorethylen der Atmosphäre durch Photooxidation mit OH- bzw. Cl- Radikalen wurde von Frank (1988, 1991) und Frank et al. (1990, 1994) postuliert und gilt derzeit als gesichert. Die Jahresemission von TECE lag in Europa von 1988 bis 1992 zwischen  $104$  und  $128 \times 10^3$  t und die durchschnittliche Konzentration in der Luft lag in Deutschland und in der Schweiz im Bereich zwischen 10 und 250 pptv. Die atmosphärische Aufenthaltsdauer dieser Substanz wird mit  $\tau = 4$  Monaten angegeben (McCulloch & Midgley, 1996).

#### Ergebnisse

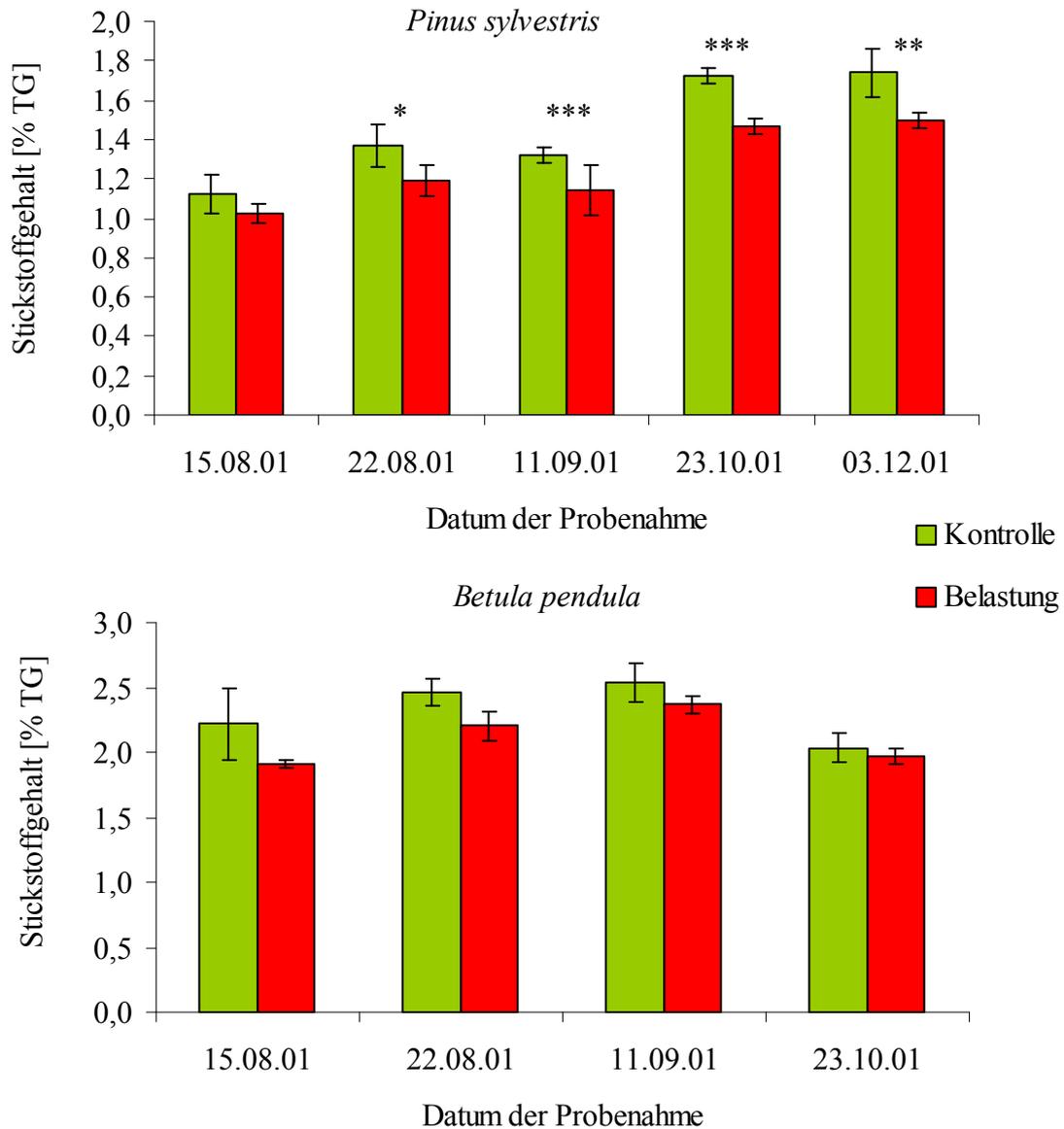
In Abb. 26 ist die  $^{15}\text{N}$ -Inkorporationen in die Nadeln von *Pinus sylvestris* und in die Blätter von *Betula pendula* über vier bzw. drei Monate graphisch dargestellt. In beiden Pflanzenarten ist eine Erhöhung der  $^{15}\text{N}$ -Konzentration innerhalb des Zeitraumes sichtbar. Die natürlichen Häufigkeiten von  $^{15}\text{N}$  in *Pinus sylvestris* vor der Tracerapplikation liegen im Bereich zwischen  $-5,97$  und  $9,97 \delta \text{‰}$  (siehe Anhang Tab. 32). Die  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse sind bei den belasteten Pflanzen, verglichen mit der Kontrolle, in beiden Pflanzenarten höher. Bei der letzten Probenahme sind die Unterschiede zwischen Belastung und Kontrolle signifikant ( $p < 0,05$ ). Die gemessenen  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeiten sind in den Kiefernadeln wesentlich geringer (angegeben in  $^{15}\text{N} \delta \text{‰}$ ) als in den Birkenblättern (angegeben in  $^{15}\text{N}$  at.-% exc.).



**Abb. 26**  $^{15}\text{NO}_3^-$ -Inkorporation in die Nadeln von *Pinus sylvestris* und in die Blätter von *Betula pendula* während einer atmosphärischen TECE-Belastung (20 ml Kammervolumen/Woche) in Abhängigkeit vom Probenahmezeitpunkt im Vergleich zur Kontrolle (n = 3; \* p < 0,05).

Der Stickstoffgehalt der Proben aller Probenahmezeitpunkte ist in Abb. 27 graphisch dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass bei den Nadeln von *Pinus sylvestris* der Stickstoffgehalt zwischen 1 und 1,8 % TG liegt und mit der Zeit zunimmt. Die Blätter von *Betula pendula* weisen hingegen einen höheren Stickstoffgehalt auf (zwischen 1,9 und 2,4 %). Eine leichte Zunahme ist nur bis zum 11.9. sichtbar, danach ist der Stickstoffgehalt deutlich reduziert. Im Vergleich zur Kontrolle weisen die belasteten Pflanzen deutlich geringere Stickstoffgehalte auf, bei den Kiefernpflanzen ist der Unterschied signifikant (p < 0,05).

Bei diesem Versuch wurden die ermittelten TCA-Gehalte, die in Tabelle 13 zusammengefasst sind, für die Auswertung mit herangezogen.



**Abb. 27** Stickstoffgehalt der Nadeln von *Pinus sylvestris* und der Blätter von *Betula pendula* bei atmosphärischer TECE-Belastung (20 ml/Woche) und Kontrolle in Abhängigkeit vom Probenahmezeitpunkt (n = 3; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

**Tab. 13** TCA-Gehalte der Nadeln von *Pinus sylvestris* und der Blätter von *Betula pendula* in µg/kg FG zum angegebenen Zeitpunkt während einer TECE-Belastung (20 ml/ Woche) ab dem 30.05.2001 (n = 4).

Datum	<i>Pinus sylvestris</i>		<i>Betula pendula</i>	
	TECE-Belastung	Kontrolle	TECE-Belastung	Kontrolle
22.08.2001	62 ± 13	5 ± 2	203 ± 18	3 ± 0,8
11.09.2001	29 ± 13	5 ± 1	638 ± 178	2,6 ± 1
23.10.2001	328 ± 244	8 ± 0	571 ± 256	1 ± 0,6
03.12.2001	157 ± 15	7 ± 1	561 ± 104	1 ± 0,6

Anhand der Tabelle 13 ist ersichtlich, dass es durch eine TECE-Belastung in der Atmosphäre zu einer höheren TCA-Konzentration in den Nadeln von *Pinus sylvestris* und den Blättern von *Betula pendula* gegenüber unbelasteten Pflanzen kommt. Eine Korrelationsanalyse zwischen dem TCA-Gehalt und der <sup>15</sup>N-Inkorporation ergab bei *Pinus sylvestris* einen Korrelationskoeffizienten von 0,57 und bei *Betula pendula* von 0,49. Die Korrelation ist im Anhang in Abb. 2 graphisch dargestellt.

### Diskussion

In diesem Versuch wurde die atmosphärische Belastung mit der TCA-Vorläufersubstanz Tetrachlorethylen auf zwei verschiedene Waldbaumarten, die Kiefer *Pinus sylvestris* und die Birke *Betula pendula*, unter naturnahen Bedingungen simuliert. Temperatur, Luftfeuchtigkeit sowie die Lichtintensität in der Kammer war während der Versuchsdauer unterschiedlich und abhängig von den natürlichen Gegebenheiten. Durch die PVC-Folie der Kammer entsprach das Klima in der Kammer (Wind, Temperatur, Luftfeuchte) nicht exakt den äußeren Bedingungen.

Die zwei Baumarten gleichen sich in ihrem ökologischen Verhalten dahingehend, dass sie beide, besonders in der Jugend, einen hohen Lichtbedarf aufweisen und ansonsten geringe Standortansprüche besitzen (Roloff, 2001). Die Birke zählt zu den Pionierbaumarten und ist sehr anspruchslos gegenüber den Nährstoffverhältnissen, kann jedoch auch in begrenzten Gebieten Reinbestände ausbilden (z. B. in größeren Gebieten Russlands). Die Kiefer wird in über 20 % der Waldfläche Deutschlands angebaut. Sie gedeiht auf feuchten, sehr trockenen, sowie sehr sauren und schwach alkalischen Böden und weist eine weite ökologische Amplitude auf (Roloff, 2001).

Die TECE-Konzentration in der Atmosphäre der Kammer konnte in diesem Versuch nicht angegeben werden. Es ist anzunehmen, dass sie zu Beginn jeder Applikation sehr hoch ist, jedoch infolge des atmosphärischen Transportes und des Abbaus schnell wieder absinkt. Die Bildung von TCA ist stark von der Temperatur sowie den Ausgangskonzentrationen abhängig (Folbert & Putz, 1999) und ist auch in der Kammer zeitlich sehr unterschiedlich. Neben der Bildung von TCA in der Atmosphäre der Kammer und der nachfolgenden Aufnahme in die Pflanze ist es auch möglich, dass die Vorläufersubstanz von den Pflanzen aufgenommen und anschließend im Pflanzenmaterial zu TCA umgewandelt wird (Hoekstra et al., 1999).

In diesem Versuch konnte eine erhöhte TCA-Konzentration in den Nadeln von *Pinus sylvestris* und in den Blättern von *Betula pendula* durch die atmosphärische TECE-Belastung ermittelt werden, wobei in den Birkenblättern höhere Werte gegenüber den Kiefernadeln vorliegen. Dies könnte an unterschiedlichen Aufnahme- bzw. Bildungsraten von TCA im Pflanzenmaterial liegen. Welche Prozesse daran beteiligt sind und in welchem Verhältnis sie liegen, kann in dieser Arbeit nicht beurteilt werden. Es konnte jedoch bestätigt werden, dass die TCA aus Tetrachlorethylen gebildet wird.

Die TECE-Belastung bewirkt in beiden Pflanzen eine Veränderung in der Stickstoffaufnahme und im Stickstoffgehalt. Während der Stickstoffgehalt in den belasteten Pflanzen generell geringer war, konnte bei der <sup>15</sup>N-Inkorporation eine Erhöhung festgestellt werden. Eine erhöhte <sup>15</sup>N-Inkorporation infolge atmosphärischer Schadstoffbelastung wurde bereits in verschiedenen Studien unter standardisierten Bedingungen ermittelt (Jung et al., 1994; Möcker et al., 1996; Schweizer et

al., 2000). Auch in dieser Arbeit konnte bereits bei den kontrollierten Begasungen mit atmosphärischer TCA eine höhere  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation in die Nadeln von *Pinus sylvestris* ermittelt werden (siehe Kap. 4.2.2.2).

Die  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation ist ein Indikator für die metabolische Aktivität, die durch die Einwirkung verschiedener Stressoren erhöht sein kann (Brunold et al., 2000). Es werden vermehrt Schutzproteine oder Detoxifikationsenzyme gebildet, was einen erhöhten Stickstoffbedarf zur Folge hat, der sich in einer höheren  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation zeigt. Durch eine mögliche Inaktivierung der Proteine durch die TCA (siehe Kap. 2.1.6) und der dadurch bedingten Neusynthese kann ebenfalls ein erhöhter Stickstoffbedarf vorliegen. Die sensitive Methode zur Bestimmung der metabolischen Aktivität über die  $^{15}\text{N}$ -Inkorporationsraten wurde auch in Freilandversuchen schon zur Immissionsüberwachung mittels aktivem Biomonitoring erfolgreich eingesetzt (Hafner et al. 2002). Dabei konnte ebenfalls in Gebieten mit größerer atmosphärischer Verschmutzung eine höhere  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation in die Testpflanzen (*Tropaeolum majus* und *Solanum lycopersicum*) gegenüber einem Kontrollstandort ermittelt werden.

Um abschätzen zu können, ob die Veränderungen der metabolischen Aktivität im direkten Zusammenhang mit dem TCA-Gehalt in den Blättern stehen, wurde eine Korrelationsanalyse zwischen dem gemessenen TCA-Gehalt und der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation durchgeführt. Sie ergab bei *Betula pendula* einen Korrelationskoeffizienten von 0,49 und bei *Pinus sylvestris* von 0,57. Damit ist eine leichte positive Korrelation vorhanden. Die  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation ist nicht nur allein vom TCA-Gehalt, sondern auch von vielen anderen Faktoren, wie z. B. anderen anthropogenen Einflüssen, die im Freiland vorhanden sind, der individuellen Physiologie der Pflanzen und der Verfügbarkeit des  $^{15}\text{NO}_3^-$  im Boden abhängig.

Bei dem Stickstoffgehalt wurde eine Erniedrigung in den belasteten Pflanzen festgestellt, die jedoch auch schon vor der Tracergabe vorhanden war. Der Stickstoffgehalt ist ein Parameter für die längerfristige Reaktion der Pflanze auf Stress und muss von der metabolischen Aktivität abgegrenzt werden. Hier spielt möglicherweise eine Stickstoffspeicherung, die bei den Kontrollpflanzen höher ist, eine wesentliche Rolle.

Beide Pflanzenarten reagierten gleichgerichtet auf die Schadstoffbelastung, wobei bei *Betula pendula* in der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation die Abweichungen zwischen den Parallelbäumen geringer war. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass sich ihr Wurzelraum in einem geschlossenen Gefäß mit einheitlicher Erde befand. Die Stickstoffdynamik im Boden (siehe Kap. 4.4) ist von vielen Faktoren, wie Feuchtigkeit, pH-Wert, Durchlüftung und Bodentextur abhängig und kann in einem offenen System lokal sehr verschieden sein (Josef, 1999). In geschlossenen Gefäßen unter gleichen Bedingungen ist davon auszugehen, dass sie grundsätzlich ähnlich ist. Außerdem wiesen die Pflanzen von *Betula pendula* aus der Züchtung eine einheitliche Größe auf, was bei den natürlich gewachsenen *Pinus sylvestris* nicht gegeben war.

### 4.3.2 Wassergehalt

#### Ergebnisse

Der Wassergehalt von *Pinus sylvestris* schwankt zwischen 50 und 65 % und ist am 15.08. 2001 am niedrigsten (siehe Anhang Tab 34 und 37). Zwischen Belastung und Kontrolle ist kein Unterschied erkennbar. Die Blätter von *Betula pendula* weisen einen niedrigeren Wassergehalt, der zwischen 34 und 45 % liegt, auf. Am niedrigsten ist er am 23.10.2001. Zu diesem Zeitpunkt weist die Belastung gegenüber der Kontrolle signifikant geringere Werte auf.

#### Diskussion

Der Wassergehalt in den Pflanzen wurde durch die Belastung nicht beeinflusst. Trichloressigsäure ist in der Lage, die Lipidsynthese zu hemmen und wird deswegen auch den Lipidsynthesehemmstoffherbiziden zugeordnet (Hilton, 1959; Hock, 1995). Besonders betroffen sind dabei die längerkettigen Fettsäuren, die am Aufbau der epikutikulären Wachsschicht beteiligt sind. Eine Verringerung dieser Schutzschicht hat eine erhöhte Transpiration zur Folge (Youngman & Elstner, 1987). Kann der Wasserbedarf nicht gedeckt werden, trocknet die Pflanze aus. Das konnte in diesem Versuch nicht festgestellt werden. Vermutlich konnte der erhöhte Wasserbedarf vollständig gedeckt werden. Die Birken wiesen nur am 23.10.2001 (4. Probenahme) einen geringeren Wassergehalt bei der Belastung auf. Dies lässt sich vermutlich durch die jahreszeitliche Seneszenz, die zusätzlich zu der Schadstoffbelastung auftritt, erklären. Gestresste Pflanzen könnten mit einer verfrühten Seneszenz reagieren (Schlee, 1992), die sich durch stärkeres Austrocknen der Pflanzen zeigt.

### 4.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

- Durch die atmosphärische Belastung mit Tetrachlorethylen kommt es zu höheren TCA-Gehalten in den Nadeln von *Pinus sylvestris* und den Blättern von *Betula pendula*.
- Diese Schadstoffbelastung führt zu einer erhöhten metabolischen Aktivität, die sich in einer erhöhten <sup>15</sup>N-Inkorporation zeigt.
- Der Stickstoffgehalt als ein allgemeiner Stressparameter ist in den belasteten Pflanzen geringer.
- Die atmosphärische TECE-Belastung führt zu keiner Veränderung im Wassergehalt der Blätter beider Pflanzen.

Eine Erhöhung des TCA-Gehaltes der Nadeln von *Pinus sylvestris* und der Blätter von *Betula pendula* nach atmosphärischer TECE-Belastung konnte festgestellt werden. Diese Schadstoffbelastung führte zu einer Steigerung der metabolischen Aktivität, der Wassergehalt änderte sich nicht.

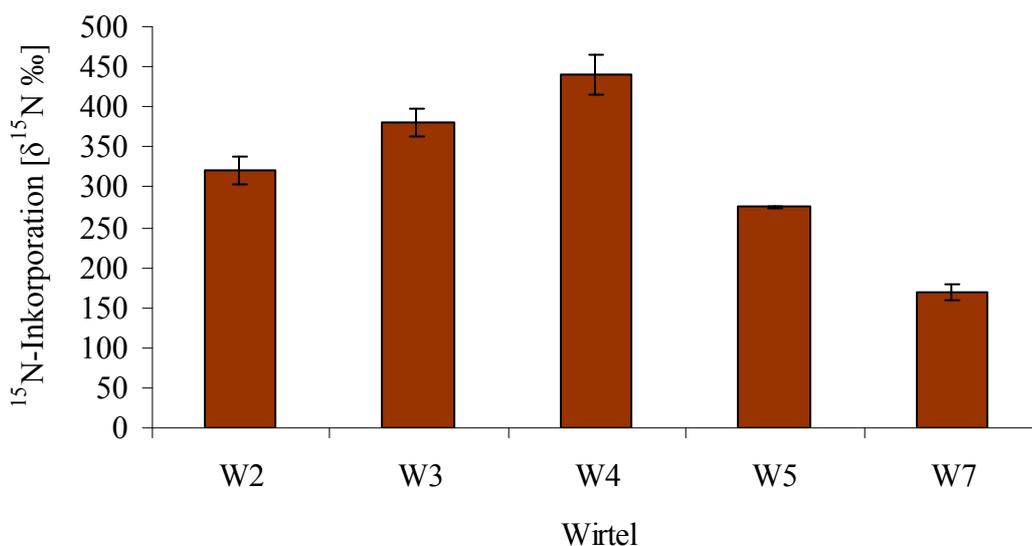
## 4.4 Versuchsebene 4: Freilanduntersuchungen

Bei diesem Versuch wurde im Rahmen eines Biomonitoringprojektes der Einfluss unterschiedlicher TCA-Konzentrationen im Boden auf die metabolische Aktivität der Kiefernadeln im Kiefernforst untersucht. Neben der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation und dem Stickstoffgehalt wurde auch der Wassergehalt analysiert.

Dieser Gießversuch wurde in einem Waldgebiet in der Nähe von Taura (Sachsen) mit ca. 10 Jahre alten Kiefernbaumen aus einer Kunstverjüngung durchgeführt. An zwei Bäumen wurden verschiedene TCA-Konzentrationen appliziert. Bei der Probenahme wurden pro Baum zwei Nadelmischproben entnommen. In Anlehnung an die Methodik zur Waldzustandserhebung wurde stets der vorjährige Trieb des vierten Wirtels beprobt (Knabe, 1984). Die TCA-Applikation fand am 11.04.2001 und die erste Probenahme am 02.05.2001 statt. Anschließend erfolgte die Tracerapplikation. Die zwei weiteren Probenahmen erfolgten am 22.05.2001 und am 16.06.2001. Die Pflanzen wurden während des gesamten Versuches nur zur TCA-Applikation (15 Liter/Baum) und zur  $^{15}\text{N}$ -Applikation mit einer Tracerlösung von 0,48 g  $\text{K}^{15}\text{NO}_3/\text{l}$ , 95 at.-% (7 Liter/Baum) gegossen.

### 4.4.1 Stickstoffmetabolismus und TCA- Gehalt

Für die Analyse der  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeiten und der TCA-Gehalte der Nadeln unterschiedlicher Wirtel wurden am 16.08.2001 Proben von fünf verschiedenen Wirteln (W 2-5; 7) eines Baumes (TCA-Belastung: 0,4 mg) entnommen. In Abb. 28 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Die entsprechenden TCA-Gehalte dazu sind in Tab. 14 aufgelistet.



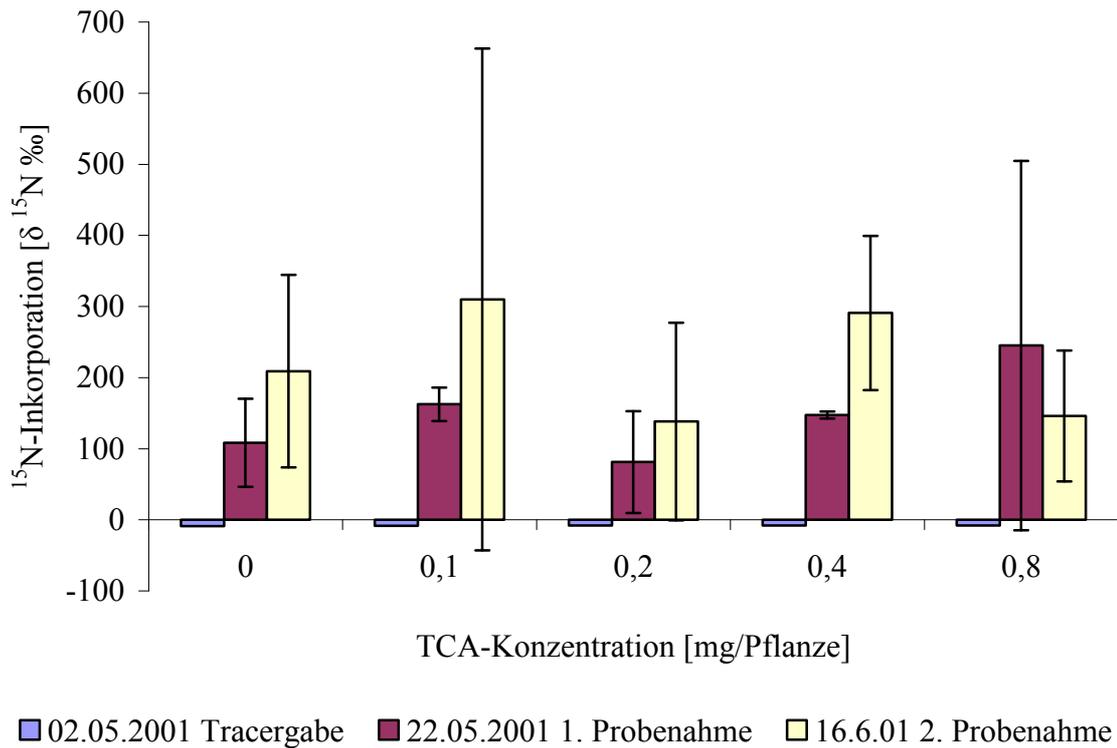
**Abb. 28**  $^{15}\text{NO}_3^-$ -Inkorporation am 16.08.2001 nach einer einmaligen Belastung von 0,4 mg TCA am 11.04.2001 und einmaligen Tracerapplikation am 02.05.2001 in den vorjährigen Nadeljahrgang von *Pinus sylvestris* in Abhängigkeit vom Wirtel (n = 3).

**Tab. 14** Gemessene TCA-Gehalte am 16.08.2001 nach einer einmaligen Belastung von 0,4 mg TCA am 11.04.2001 und einmaligen Tracerapplikation am 02.05.2001 des vorjährigen Nadeljahrgangs von *Pinus sylvestris* in Abhängigkeit vom Wirtel (n = 1).

Wirtel	TCA-Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{kg FG}$ ]
2	1.513
3	1.855
4	2.203
5	813
7	228

Es ist leicht erkennbar, dass der vierte Wirtel, der bei den Untersuchungen herangezogen wurde, sowohl die höchste  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit, als auch die höchste TCA-Konzentration aufweist. Bei den jüngeren Wirteln ist die  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation höher als bei den älteren. Die Standardabweichungen sind gering und liegen zwischen 0,6 und 6,6 %. Ein gleiches Muster ist bei der TCA-Konzentration erkennbar. Der errechnete Korrelationsfaktor zwischen dem  $^{15}\text{N}$ -Gehalt und der TCA-Konzentration ist 0,99. Es existiert somit ein enger positiver Zusammenhang. Die Korrelation ist im Anhang in Abb. 3 graphisch dargestellt.

Die Abb. 29 stellt die natürlichen  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeiten vor der Tracergabe (2.5.01) sowie 20 (22.5.01) und 45 (16.05.01) Tage nach der Tracerapplikation der einzelnen Pflanzen dar. Die natürlichen  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeiten dieser Kiefernpflanzen liegen im Bereich zwischen -7,5 und -9,3  $\delta$  ‰. Dabei zeichnet sich kein Trend zwischen den belasteten und unbelasteten Pflanzen ab (siehe Anhang Tab. 39). Nach 20 Tagen liegen die  $^{15}\text{N}$ -Inkorporationen im Bereich zwischen 30 und 428  $\delta$  ‰ und nach 45 Tagen im Bereich zwischen 40 und 460  $\delta$  ‰. Abgesehen von den Bäumen mit der hohen TCA-Konzentration (0,8 mg/Pflanze), ist ein Trend zur höheren  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit mit Zunahme der Zeit ersichtlich. Ein deutlicher Einfluss unterschiedlicher TCA-Konzentrationen auf die Nitrataufnahme und -assimilation in die Nadeln von *Pinus sylvestris* ist jedoch nicht erkennbar. Es lässt sich eine höhere  $^{15}\text{N}$ -Inkorporationsrate bei den TCA-belasteten Pflanzen 20 Tage nach der Tracerapplikation erkennen. Dies ist nach 45 Tagen nicht mehr ersichtlich. Die extrem großen Standardabweichungen resultieren aus sehr großen Messwertschwankungen zwischen den zwei Parallelbäumen (siehe Anhang Tab. 38).



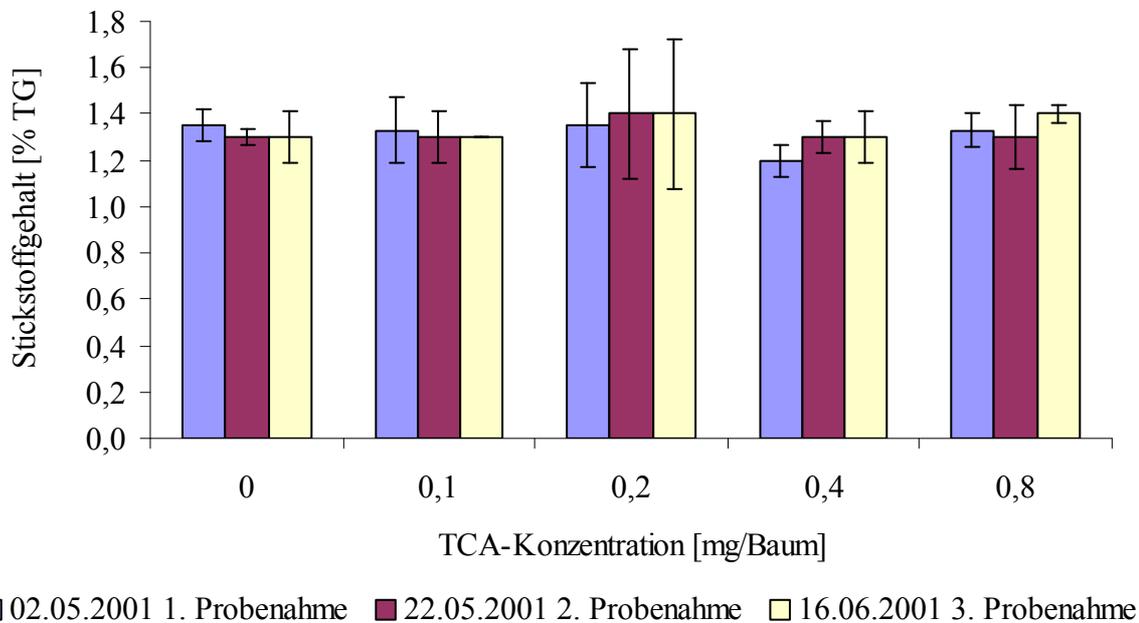
**Abb. 29**  $^{15}\text{NO}_3^-$ -Inkorporation in die Nadeln von *Pinus sylvestris* während einer TCA-Belastung im Wurzelraum in Abhängigkeit von der am 11.04.2001 applizierten TCA-Konzentration und dem Probenahmezeitpunkt ( $n = 4$ ).

Der Stickstoffgehalt bezogen auf das Trockengewicht liegt im Bereich zwischen 1,14 und 1,65 % (Abb. 30). Eine Korrelation zwischen applizierter TCA-Konzentration und Stickstoffgehalt bzw. Probenahmezeitpunkt und Stickstoffgehalt ist bei diesem Parameter nicht erkennbar.

In Tab. 15 sind die ermittelten TCA-Gehalte aufgelistet. Daraus ist ersichtlich, dass mit steigender TCA-Konzentration im Boden und mit fortschreitender Applikationszeit der TCA-Gehalt in den Nadeln ansteigt. Eine Ausnahme bilden dabei die mit 0,8 mg TCA applizierten Pflanzen, welche am 22.05.2001 die höchste Konzentration und zum späteren Zeitpunkt (16.06.2001) wieder geringere aufweisen. Dies korreliert auch mit der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation dieser Pflanzen.

**Tab. 15** TCA-Gehalte [ $\mu\text{g}/\text{kg}$  FG] der Nadeln von *Pinus sylvestris* in Abhängigkeit von der am 11.04.2001 in den Wurzelraum applizierten TCA-Konzentration zum angegebenen Zeitpunkt ( $n = 4$ ).

TCA-Konzentration [mg/Pflanze]	02.05.2001	22.05.2001	16.06.2001
0	11 $\pm$ 1,6	30 $\pm$ 2,7	29 $\pm$ 2,3
0,1	74	121 $\pm$ 31,5	185 $\pm$ 146,3
0,2	58	234 $\pm$ 234,8	173 $\pm$ 128,5
0,4	164	714 $\pm$ 112,4	1.070 $\pm$ 227,7
0,8	801	3.146 $\pm$ 1.408,5	2.313 $\pm$ 892,5



**Abb. 30** Stickstoffgehalt der Nadeln von *Pinus sylvestris* in Abhängigkeit von der am 11.04.2001 in den Wurzelraum applizierten TCA-Konzentration zum angegebenen Zeitpunkt ( $n = 4$ ).

## Diskussion

Die Freilandversuche zeichnen sich dadurch aus, dass durch multifaktorielle, unkontrollierbare Einflüsse eine Standardisierung unmöglich ist. Sämtliche Einflüsse, die auf ein Ökosystem einwirken, können die Schadstoffwirkung und den Untersuchungsparameter direkt beeinflussen. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Individuen einer Population grundsätzlich gleichgerichtet

auf anthropogene Störungen reagieren, wobei der Grad der Reaktion individuell verschieden sein kann (Schubert 1991). Eine Wiederholung des gleichen Stresstyps kann durch selektive Vorgänge in der Population zu qualitativen Veränderungen führen.

In diesem Versuch spielen sowohl die Bioverfügbarkeit der applizierten TCA (Mobilisierung im Boden und Aufnahmeprozesse), als auch das Vorkommen und die Aufnahme des  $^{15}\text{NO}_3^-$  eine wesentliche Rolle. Eine gleichmäßige Aufnahme des Tracerstickstoffes ist eine Grundvoraussetzung für den Erfolg dieser Untersuchung.

### $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit und TCA- Gehalt unterschiedlicher Wirtel

Ilonen et al. (1979) kommt mit seinen biometrischen und ertragskundlichen Untersuchungen an *Pinus sylvestris* zu der Erkenntnis, dass die Knospenanzahl sowie das Trieb- und Nadelwachstum stark von Wirtelposition, Wirtelalter und Lichtbedingungen am Baum abhängt. Ein erhöhter Nährstoffbedarf bedingt einen höheren Stofftransport, mit dem auch passiv die TCA transportiert wird. Es ist anzunehmen, dass TCA die metabolische Aktivität in den Nadeln erhöht, was sich in erhöhten  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeiten widerspiegelt. Es ist aber auch möglich, dass die Nadeln des vierten Wirtels eine höhere Stoffwechselaktivität besitzen und dass sie auch ohne TCA die höchste  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit aufweisen würden. Um diese Vermutung zu bestätigen, müssen jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Aus den hier vorliegenden Ergebnissen ist erkennbar, dass innerhalb eines Baumes der Stofftransport sehr unterschiedlich ist und dass der vierte Wirtel dabei die größte metabolische Aktivität und Schadstoffkonzentration aufweist.

### Stickstoffdynamik im Boden

Neben dem  $^{15}\text{NO}_3^-$ , das jeder Versuchspflanze in gleicher Konzentration verabreicht wurde, spielt der natürlich vorkommende Stickstoff wegen Verdünnungseffekten eine wichtige Rolle. Der Stickstoffanteil im Boden ist unterschiedlich. Er hängt vom Humusgehalt und seiner Zusammensetzung ab und ist zu über 90 % organisch und damit für Pflanzen nicht verfügbar (Galler, 1999). Die mikrobielle Mineralisierung des organischen Bodenstickstoffes beträgt jährlich ca. 1 - 2 % und hängt von vielen Faktoren, wie Temperatur, Luftführung, Feuchtigkeit und pH-Wert ab (Galler, 1999). Sie erfolgt in mehreren biochemischen Teilprozessen, wobei der organische Stickstoff zunächst über Ammonifikation zu  $\text{NH}_4^+$  metabolisiert und nachfolgend über die Nitrifizierung zu Nitrat umgewandelt wird (Schäffler, 2001). Neben diesen Prozessen tragen noch zusätzlich atmosphärische Stickstoffeinträge in Form von Ammonium oder Nitrat zur N-Verfügbarkeit für die Pflanzen bei (Möcker, 2000). Diese zum Teil hohen Einträge können unterschiedliche Auswirkungen auf das Ökosystem zeigen, die von Standort, Bestandsgeschichte und der forstwirtschaftlichen Bewirtschaftung abhängen. Die biologische  $\text{N}_2$ -Fixierung einiger frei (z. B. Acetobacter) oder in Symbiose mit höheren Pflanzen lebenden Mikroorganismen (z. B. Rhizobium) tragen ebenfalls zur Erhöhung des Stickstoffs im Boden bei. Neben der Erhöhung der Stickstoffeinträge können Denitrifikation und Auswaschungsprozesse den für die Pflanzen verfügbaren Stickstoff im Boden verringern. Die Denitrifikation ist die Reduktion von Nitrat und Nitrit zu Stickoxiden und molekularem Stickstoff, der in die Atmosphäre entweichen kann. Sie läuft bevorzugt bei hoher Wassersättigung und geringer Bodendurchlüftung ab. Bei Temperaturen

unter 10 °C kommt die Denitrifikation zum Erliegen (Jungk, 1988). Bei der Auswaschung wird vorwiegend Nitrat, das am Ende der Mineralisierungskette steht, dem Boden entzogen, da dieses Anion im Boden sehr mobil ist. Dieser Prozess läuft vorwiegend bei hohen Niederschlagsmengen kombiniert mit dem geringen Wasserbedarf der Pflanzen ab und ist stark von der Bodentextur abhängig (Galler, 1999).

Anhand der Stickstoffdynamik im Boden kann nicht von einer einheitlichen  $\text{NO}_3^-$ -Verfügbarkeit für jeden Baum ausgegangen werden, so dass das lokale  $^{14}\text{NO}_3^-/^{15}\text{NO}_3^-$ -Verhältnis unterschiedlich vorliegen kann.

### Stickstoffaufnahme der Pflanzen

Die Stickstoffaufnahme und somit auch die Aufnahme des Tracerstickstoffs ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Der Stickstoffbedarf, der von Pflanze zu Pflanze verschieden sein kann, und das Stickstoffangebot spielen dabei eine wesentliche Rolle. Im Unterschied zu kontrollierten Laborversuchen, bei denen der Stickstoff direkt pflanzenverfügbar ist (Hydrokultur) oder durch kurze Gießintervalle konstant gehalten wird, hängt die N-Aufnahme im Freiland stark von der Nährstoffverfügbarkeit am jeweiligen Standort ab.

Pflanzen sind in der Lage, sowohl  $\text{NH}_4^+$ , als auch  $\text{NO}_3^-$  als Stickstoffquelle zu nutzen. Der Vorteil der energieaufwendigen Nitrataufnahme liegt in der besseren Kationenbilanz, bedingt durch die Aufnahme von Gegenionen zum Nitrat. Ammonium behindert im Gegensatz dazu die Kationenaufnahme (Marschner et al., 1986; Boxman & Roelofs, 1988). In verschiedenen Untersuchungen wurde jedoch belegt, dass Koniferenpflanzen vorwiegend  $\text{NH}_4^+$  aufnehmen (Marschner et al., 1991; Kronzucker et al., 1997; Setzer et al., 1998; Malagoli et al., 2000). Die geringere Nitrataufnahme könnte durch eine geringere Kapazität des Nitrattransportsystems bedingt sein (Stadtler & Gebauer, 1992). Liegt viel  $\text{NH}_4^+$  im Boden vor, so ist die  $\text{NO}_3^-$  Aufnahme stark reduziert. Dadurch ist die Aufnahme des Tracerstickstoffes, welcher in Form von Nitrat appliziert wurde, stark von den natürlichen Ammoniumvorkommen abhängig und kann lokal sehr verschieden sein. Auch der Einfluss von Mykorrhizapilzen auf die Stickstoffaufnahme in die Pflanze muss berücksichtigt werden. Es wird vermutet, dass arbuskuläre Mykorrhiza die N-Aufnahme in Form von Ammonium verbessert (Gollner, 1997). Ebenso sind viele Mykorrhiza-Pilze in der Lage, Proteine, Peptide und Aminosäuren abzubauen (Abuzindah & Read, 1986). Somit wird nicht nur anorganischer, sondern auch über die symbiotisch lebenden Mykorrhiza-Pilze organischer Stickstoff von der Pflanze aufgenommen und metabolisiert.

Der Stickstoffgehalt der Nadeln der einzelnen Bäume ist ohne Unterschied. Auch die belasteten Bäume weisen gleiche N-Gehalte wie die Kontrollbäume auf. Es kann also festgestellt werden, dass durch die TCA der Gesamtstickstoffgehalt nicht verändert wird. Ein unterschiedlicher Stickstoffbedarf kann somit nur durch die  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation als sensitiver Parameter untersucht werden.

In der Bilanzierung des Tracerstickstoffs in Freilandversuchen muss auch die  $^{15}\text{N}$ -Aufnahme der Begleitvegetation mit berücksichtigt werden. Durch diesen Prozess wird den Kiefernpflanzen der verfügbare  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff entzogen. Licht-, Nährstoff- und Wasservorkommen, sowie potentielle

Nitratnutzung und Mykorrhizierung beeinflussen wiederum die N-Aufnahme dieser Pflanzen und können lokal sehr verschieden sein.

Wie die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit des aufgenommenen Tracerstickstoffs am Standort tatsächlich ist und ob dieser bei allen untersuchten Kiefern gleich ist, kann nicht abgeschätzt werden. Alle genannten Prozesse beeinflussen den pflanzenverfügbaren Stickstoff und können lokale Unterschiede in der Verfügbarkeit des Tracers bewirken.

Trotz dieser Unsicherheiten und der hohen Standardabweichung deuten die Ergebnisse der ersten Probenahme darauf hin, dass durch die TCA in den Kiefern eine höhere Stickstoffaufnahme bewirkt wird.

Die gemessenen  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeiten in den Nadeln von *Pinus sylvestris* schwanken zwischen den Bäumen z. T. erheblich. Dabei scheint die applizierte TCA-Konzentration keine Rolle zu spielen. Auch in den Kontrollbäumen wurden Abweichungen bis zu 60 % ermittelt. Anhand dieser Tatsache kann der Schluss gezogen werden, dass die unterschiedliche  $^{15}\text{N}$ -Aufnahme zwischen den Bäumen sich nicht ausschließlich auf die Schadstoffwirkung zurückführen lässt. Gründe für die auffällige, sehr unterschiedliche Standardabweichung zwischen den Parallelproben eines Baumes könnten in der differenzierten metabolischen Aktivität und damit auch des Stickstoffbedarfs der einzelnen Nadeln liegen.

### TCA- Aufnahme

Trichloressigsäure ist in der Lage, Proteine zu modifizieren und damit auch zu inaktivieren (Ashton & Crafts, 1987). Dies setzt die Bioverfügbarkeit der TCA am Wirkungsort voraus. Eine dadurch bedingte Neusynthese der Proteine erhöht den Stickstoffbedarf, der in einer höheren  $^{15}\text{N}$ -Aufnahme sichtbar wird. Die Aufnahme von TCA in Pflanzen über die Wurzel wurde bereits mehrfach nachgewiesen (Ulhirova et al., 1996; Schroll 1994; Frank et al., 1990; Frank, 1994; Matucha et al., 2001). Eine Quantifizierung ist jedoch schwierig, da es im Boden zu einem Abbau von TCA kommen kann, der wiederum von der Bodenqualität (Gehalt an organischer Substanz, Bodenart, Temperatur und Feuchte) und den vorhandenen Mikroorganismen abhängt (BUA, 1996; Yu & Welander, 1995; Forczek et al., 2001; McCulloch, 2002; Matucha et al. 2003). Außerdem führen Bodenadsorptionsprozesse, die jedoch als gering eingeschätzt werden, und Auswaschung ebenfalls zu einer Verringerung der für die Pflanzen verfügbaren TCA (BUA 1996; Kolbe & Schulte, 1982; Lignell et al., 1984). Willis und McDowell (1982) stuften die Na-TCA als eine mäßig persistente Substanz im Boden ein, mit einer Halbwertszeit zwischen 20 und 100 Tagen.

Infolge der Degradation von TCA im Boden kann vermutet werden, dass die Aufnahme dieser Substanz zu Beginn des Versuches groß ist, mit fortschreitender Versuchsdauer jedoch abnimmt. In dieser Studie konnte eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der TCA in den Nadeln von *Pinus sylvestris* nach TCA-Applikation in den Wurzelraum ermittelt werden. Bei der höchsten Konzentration kam es mit fortschreitender Applikationsdauer zu einer Erniedrigung des TCA-Gehaltes, die vermutlich auf einen Abbau in den Nadeln zurückzuführen ist. Für die Bioverfügbarkeit der TCA in den einzelnen Nadeln spielen auch die Verteilung innerhalb eines Baumes sowie Abbauvorgänge in der Nadel eine Rolle. Verschiedene Bioakkumulationsstudien belegen diese Tatsache (siehe Kap. 2.1.5).

Die Metabolisierung und Mobilisierung von TCA in den Nadeln wurde von Frank et al. (1991) mit einer Halbwertszeit von etwa 10 Tagen angegeben. Die Ergebnisse zahlreicher Rückstandsanalysen weisen darauf hin, dass die TCA im pflanzlichen Gewebe eine gewisse Persistenz aufweist, die örtlich und zeitlich begrenzt ist (BUA, 1996). Unterschiedliche Verteilung sowie Metabolisierung und Mobilisierung können zu differenzierten Schadwirkungen der TCA führen, die darauf hinauslaufen, dass selbst Nadeln des selben Triebes eine sehr unterschiedliche Schadstoffwirkung zeigen. Eine Korrelationsanalyse zwischen der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation und dem TCA-Gehalt ergab einen Korrelationskoeffizient von 0,29, d. h. es existiert nur eine sehr geringe positive Korrelation. Die oben diskutierten Einflüsse könnten ein Grund für die geringe Korrelation sein.

#### 4.4.2 Wassergehalt

Der Wassergehalt des Nadelmaterials beträgt 44,3 - 50,4 % (siehe Anhang Tab. 43). Bei den meisten Bäumen ist der Wassergehalt zum ersten Probenahmezeitpunkt am geringsten und am letzten Probenahmezeitpunkt am höchsten. Eine Abhängigkeit von den applizierten TCA-Konzentrationen ist nicht sichtbar.

Analog, wie bereits im Kap. 4.3 erläutert, konnte auch hier kein Einfluss von TCA auf den Wassergehalt der Nadeln von *Pinus sylvestris* festgestellt werden. Die unterschiedlichen Wassergehalte zu den einzelnen Probenahmezeitpunkten resultieren wahrscheinlich aus dem sich ändernden allgemeinen Wasserangebot zu dieser Jahreszeit.

#### 4.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch eine TCA-Applikation in den Wurzelraum kommt es zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Zunahme der TCA-Konzentration in den Nadeln von *Pinus sylvestris*.

- In den vorjährigen Nadeln des vierten Wirtels konnte die höchste TCA-Konzentration sowie die höchste  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation ermittelt werden.
- Bei der höchsten applizierten Konzentration von 0,8 mg TCA/Baum konnte bei längerer Applikationsdauer eine Schadstoffabnahme und eine  $^{15}\text{N}$ -Abnahme ermittelt werden.
- Eine höhere metabolische Aktivität in den Nadeln von *Pinus sylvestris* infolge der TCA-Belastungen ist wahrscheinlich.
- Veränderungen im Wassergehalt der Nadeln durch die Schadstoffbelastung konnte nicht festgestellt werden.

Die Ergebnisse des Versuches lassen keinen einheitlichen Schluss auf die Schadwirkung im Boden vorkommender TCA auf *Pinus sylvestris* in einem Kiefernforst zu. Dennoch kann zumindest anhand der zweiten Probenahme vermutet werden, dass die TCA eine höhere  $^{15}\text{N}$ -Aufnahme in die Kiefernadeln bewirkt, die aus einem höheren Proteinturnover und einer höheren metabolischen Aktivität resultieren könnte. Die Untersuchung des Stickstoffmetabolismus mit Hilfe der  $^{15}\text{N}$ -Tracertechnik im Freiland ist dahingehend schwierig, dass die Isotopenverdünnung durch natürlich vorkommenden Stickstoff und die Stickstoffdynamik im Boden schwer abschätzbar ist. Dies ist jedoch die Voraussetzung für qualitativ und quantitativ verifizierbare Untersuchungsergebnisse.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Umfangreiche Untersuchungen ergaben, dass die Trichloressigsäure ubiquitär in der Umwelt vorkommt. Als Quellen dafür können zum einen die Industrie, vor allem die Papier- und Textilindustrie, aber auch eine atmogene und eine biogene Bildung aus Vorläufersubstanzen in Betracht gezogen werden. Die phytotoxische Wirkung dieser Substanz ist schon seit Jahrzehnten durch den Einsatz als Herbizid bekannt. Sie erlangte jedoch in den letzten Jahren erneut als möglicher Verursacher „neuartiger Waldschäden“ an Bedeutung. In Gebieten mit einer hohen Waldschädigung konnten oftmals hohe TCA-Konzentrationen in Koniferennadeln ermittelt werden. So wird vermutet, dass die TCA in der Luft aus Vorläufersubstanzen, wie Tetrachlorethylen und Trichlorethan, die industriell emittiert werden, gebildet wird und somit über die Atmosphäre auf die Vegetation einwirkt. Durch Auswaschungsprozesse gelangt die Substanz in den Boden und in Oberflächengewässer.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Einfluss atmosphärisch getragener Trichloressigsäure auf Pflanzen in umweltrelevanten bzw. subakuten Konzentrationen in kontrollierten Expositionen im Labor und freilandähnlichen Begasungsexperimenten durchgeführt. Studien mit standardisierten Biotests und Untersuchungen im Ökosystem mit Wurzelapplikation erfolgten ergänzend dazu. Ziel der Untersuchungen war es, Aussagen über die phytotoxische Wirkung luftgetragener TCA zu erhalten und einen Beitrag zur Abschätzung des ökotoxikologischen Potentials dieser Substanz zu leisten.

### Versuchsebene 1: Standardisierte Laboruntersuchungen

Mit dem Pollenschlauchwachstumstest (PTG-Test) und dem  $^{15}\text{N}$ -Stoffwechselltest (ESIMA), die Basisinformationen zur Zytotoxizität und metabolischen Aktivität von Substanzen liefern, wurden mit TCA und Na-TCA Konzentrations-Wirkungsstudien durchgeführt. Es ergaben sich folgende Zusammenhänge:

- Das Natriumsalz der Trichloressigsäure reagierte in Abhängigkeit vom eingesetzten Biotest weniger toxisch als die TCA-Säure. So konnte beim PTG-Test ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert für TCA von 318 mg/l und für Na-TCA von 3 476 mg/l ermittelt werden.
- Der bereits etablierte ESIMA mit Epikotylsegmenten von *Pisum arvense* wurde mit *Lepidium-sativum*-Pflanzen weiterentwickelt. Während bei *Pisum arvense* sowohl bei TCA, als auch bei Na-TCA keine 50 %ige Hemmung erreicht wurde, konnte bei *Lepidium sativum* bei TCA ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 63 mg/l berechnet werden. Bei Na-TCA konnte keine signifikante Hemmung gefunden werden.
- Anhand einer Zeit-Wirkungsstudie bei *Lepidium sativum* wurde festgestellt, dass mit der Erhöhung der Expositionszeit die Toxizität beider Substanzen zunimmt.

Die berechneten  $\text{IC}_{50}$ -Werte liegen über dem 10 000- bis 100 000-fachen Wert der in Oberflächengewässern gemessenen TCA-Konzentration und sind für die Natur nur bedingt relevant.

## Versuchsebene 2: Kontrollierte Exposition

Es wurden verschiedene Begasungsexperimente unter standardisierten Bedingungen durchgeführt, um die Wirkung atmosphärisch getragener Trichloressigsäure auf unterschiedliche Pflanzenarten zu untersuchen.

### Themenkomplex 1: Atmosphärische TCA-Belastung unterschiedlicher Photosynthesetypen

Durch Begasungsexperimente mit *Tropaeolum majus* (C<sub>3</sub>-Pflanze) und *Zea mays* (C<sub>4</sub>-Pflanze) wurden vergleichende Untersuchungen zur Wirkung atmosphärischer TCA auf physiologische und biochemische Parameter durchgeführt. Es sollten Unterschiede in der Schadstofftoleranz zwischen zwei Photosynthesetypen ermittelt werden. Diese Untersuchungen erbrachten folgende Ergebnisse:

- Das Pflanzenwachstum wurde durch atmosphärische Applikation von TCA nicht beeinflusst.
- Die C<sub>3</sub>-Pflanze reagierte auf die applizierte TCA, die in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,16 ng/m<sup>3</sup> und 2,3 µg/m<sup>3</sup> lag, mit einer signifikanten Inhibierung der <sup>15</sup>N-Inkorporationen, während bei der C<sub>4</sub>-Pflanze im Konzentrationsbereich zwischen 2 und 196 ng/m<sup>3</sup> eine Förderung und bei 194 µg/m<sup>3</sup> eine Hemmung der Stickstoffinkorporation in die NPN- und Proteinfraction auftrat.
- Ein signifikanter Einfluss atmosphärischer Trichloressigsäure auf die Biosynthese von Aminosäuren und der Proteinsynthese von *Zea mays* und *Tropaeolum majus* besteht nicht.
- Sowohl die Nitratreduktase bei *Zea mays*, als auch die Nitritreduktase bei beiden Pflanzenspezies wurde infolge der TCA-Belastung, besonders bei hohen Konzentrationen, leicht gehemmt. Die veränderten Inkorporationsraten des Tracerstickstoffs können jedoch nicht allein durch modifizierte NR- und NIR-Enzymaktivitäten erfasst werden.
- Die spezifischen GST-Aktivitäten wurden bei den hohen TCA-Konzentrationen bei beiden Pflanzenarten (*Zea mays*, *Tropaeolum majus*) gehemmt, geringere Konzentrationen erbrachten bei *Zea mays* (2,3 µg/m<sup>3</sup>) keine Veränderungen. Dagegen erfuhr *Tropaeolum majus* bei geringen TCA-Belastungen (0,017 µg/m<sup>3</sup>) eine Hemmung der spezifischen GST-Aktivität.

Anhand dieser Versuche wurde eine geringere Empfindlichkeit von *Zea mays* im Vergleich zu *Tropaeolum majus* gegenüber luftgetragener TCA auf der Ebene der Nitratinkorporation und der spezifischen GST-Aktivität festgestellt. Dies bestätigt die Befunde, dass C<sub>4</sub>-Pflanzen gegenüber atmosphärischen Schadstoffen weniger empfindlich reagieren als C<sub>3</sub>-Pflanzen. Dies gilt nicht für die gemessenen NIR- und NR-Aktivitäten. Um die Frage zu klären, ob die Differenzen durch unterschiedliche TCA-Konzentrationen am Wirkort in den Blättern bedingt durch anatomische bzw. physiologische Eigenheiten der beiden Stoffwechselltypen zustande kommen, müssen weiterführende Untersuchungen zur Bioakkumulation und Bioverfügbarkeit der Substanz erfolgen.

## Themenkomplex 2: Atmosphärische TCA-Belastung von *Pinus sylvestris*

Durch Begasungsstudien mit akuten und chronischen TCA-Belastungen wurde die Wirkung des Schadstoffes auf *Pinus sylvestris* untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse belegen einen Einfluss von TCA auf den Stickstoffmetabolismus, die Photosynthese und den Detoxifikationsmetabolismus von *Pinus sylvestris*:

- Die effektive Quantenausbeute des PS II wurde durch die akute Belastung im diesjährigen und vorjährigen Nadeljahrgang signifikant erniedrigt, während es bei der chronischen Belastung zu einer leichten Erhöhung mit gleichzeitiger Abnahme des Pigmentgehaltes kam.
- Die <sup>15</sup>N-Inkorporation in die NPN- und Proteinfraction der Nadeln wurde bei akuter Belastung, bei der sich im aktuellen Nadeljahrgang eine starke Erhöhung und im vorjährigen Nadeljahrgang eine Erniedrigung zeigte, stärker beeinflusst, als bei der chronischen Belastung, bei der in beiden Nadeljahrgängen eine leichte Förderung festgestellt wurde. Die Nitritreduktaseaktivitäten wurden durch die chronische Belastung im diesjährigen Nadeljahrgang gehemmt und im vorjährigen Nadeljahrgang gefördert.
- Enzymaktivitätsstudien zeigten, dass atmosphärische TCA die spezifische GST- Aktivität, besonders im vorjährigen Nadeljahrgang, erhöht.

Diese Ergebnisse lassen erkennen, dass *Pinus sylvestris* empfindlich auf atmosphärisch getragene TCA reagiert. Die Wirkung ist sowohl von der Konzentration, als auch vom Nadelalter abhängig. Eine starke TCA-Belastung beeinflusst die Pflanzen massiv, während umweltrelevante Konzentrationen nur leichte Veränderungen hervorrufen, die aber bei Dauerbelastung relevant werden. Anhand dieser Begasungsexperimente kann angenommen werden, dass TCA mit an der Waldschädigung beteiligt ist. Wie aus der Literatur bekannt ist, werden Waldschäden nicht allein durch einen Schadstoff verursacht. In Kombination mit anderen relevanten Luftschadstoffen (z. B. Ozon, NO<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub>, VOC's) können synergistische Effekte auftreten, die dann typische Schädigungen an Waldbäumen (Verringerung der Vitalität, Blattschäden, Zuwachsverluste etc.) hervorrufen. Anknüpfend an die TCA-Wirkungsstudie mit *Pinus sylvestris* sollten Kombinationswirkungen mit anderen Luftschadstoffen studiert werden.

## Themenkomplex 3: Atmosphärische TCA-Belastungen genetischer Differenzierungen von *Cirsium arvense*

In dieser Begasungsstudie wurden unterschiedliche genetische Herkünfte von *Cirsium arvense* im Sinne einer biochemischen und ökotoxikologischen Charakterisierung auf ihre Empfindlichkeit gegenüber luftgetragener TCA getestet. Dies geschah auf der Ebene der Photosynthese und des Stickstoffmetabolismus. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Durch die Bestimmung der effektiven Quantenausbeute des PS II konnte kein signifikanter Einfluss atmosphärischer TCA-Blastung auf die Photosynthese ermittelt werden.
- Der Stickstoffmetabolismus wurde durch TCA beeinflusst, wobei das Ausmaß vom Blattalter abhängig war. Statistisch abgesicherte Unterschiede zwischen den einzelnen Herkünften

bestanden nicht, jedoch konnten geringe Differenzen zwischen den Herkünften ermittelt werden.

- Die genetische Herkunft P2 zeichnete sich durch die höchste effektive Quantenausbeute des PS II bei den Kontrollpflanzen aus. Auf die TCA-Belastung reagierte sie, verglichen mit den anderen genetischen Herkünften, mit der größten Empfindlichkeit hinsichtlich der effektiven Quantenausbeute des PS II und mit der geringsten Hemmung bei der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation.

Jeder Schadstoff, der einen Einfluss auf die Vegetation ausübt, kann als Selektionsfaktor, der die biologische Vielfalt innerhalb einer Population beeinflusst, angesehen werden. Erste Untersuchungen mit *Cirsium arvense* zeigten, dass atmosphärisch getragene TCA den Stickstoffmetabolismus dieser Pflanze beeinflusst. Die bisher ermittelten Differenzen zwischen den Herkünften erlauben jedoch keine klare Aussage hinsichtlich der Wirkung des Schadstoffes auf unterschiedliche genetische Differenzierungen.

### Versuchsebene 3: Freilandähnlicher Versuch in open-top Kammern

Für eine umfangreiche Abschätzung des ökotoxikologischen Potentials ist es notwendig, ergänzend zu den kontrollierten Expositionen, Freilandversuche durchzuführen. Dies wurde in dieser Arbeit dahingehend realisiert, dass in der dritten Versuchsebene in open-top Kammern eine atmosphärische Belastung mit Tetrachlorethylen, einer TCA-Vorläufersubstanz, unter naturnahen Bedingungen simuliert und der Einfluss auf die TCA-Konzentration der Nadeln, den Stickstoffmetabolismus und den Wassergehalt untersucht wurde. Als Versuchspflanzen wurden einheimische Waldbäume, *Pinus sylvestris* und *Betula pendula*, ausgewählt. Im Ergebnis der Untersuchungen konnte festgestellt werden:

- Infolge der atmosphärischen Tetrachlorethylenbelastung kam es zu einer Erhöhung der TCA-Konzentration im untersuchten Blattmaterial, die bei *Betula pendula* größer war als bei *Pinus sylvestris*.
- In beiden Pflanzenspezies konnten höhere  $^{15}\text{N}$ -Inkorporationsraten gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Eine starke Korrelation mit dem TCA-Gehalt besteht jedoch nicht.
- Der Stickstoffgehalt der Blätter wurde durch die Belastung erniedrigt. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass die Pflanzen durch die Dauerbelastung gestresst sind.
- Eine Reduktion des Wassergehaltes der Blätter konnte nicht beobachtet werden. Es ist davon auszugehen, dass, wenn die TCA eine Reduktion der Epikutikularwachse hervorruft, der erhöhte Wasserbedarf vollständig gedeckt werden kann.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass atmosphärisch getragenes Tetrachlorethylen den TCA-Gehalt in den Blättern erhöht und die metabolische Aktivität in den Pflanzen steigert. Daraus kann jedoch nicht abgeleitet werden, ob der Umwandlungsprozess von TECE in TCA in der Atmosphäre oder im Blattinneren stattfindet. Beide Möglichkeiten werden in der Literatur diskutiert. Ebenso ist unklar, ob nur eine der Substanzen den Stickstoffmetabolismus beeinflusst oder ob beide synergistisch wirken. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass diese TCA-Konzentrationen keine Erniedrigung des Wassergehaltes der Blätter unter naturnahen Bedingungen bewirken. In weiterführenden Studien (z. B. Elektronenmikroskopie und Bestimmung der

Wachsschicht) sollte eine Beeinflussung der Epikutikularwachse durch die Schadstoffe untersucht werden.

#### Versuchsebene 4: Freilandversuch

In der vierten Versuchsebene wurde der Einfluss verschiedener TCA-Konzentrationen im Wurzelraum von *Pinus sylvestris* auf den Stickstoffmetabolismus und den Wassergehalt im Ökosystem mit folgendem Ergebnis untersucht:

- Es besteht eine positive Korrelation ( $r = 0,99$ ) zwischen TCA-Konzentration und  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit der Nadeln in Abhängigkeit von der Wirtelposition.
- Im Boden befindliche TCA wird von den Pflanzen aufgenommen. Der Aufnahmeprozess ist sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig. Es existieren jedoch zum Teil große Schwankungen zwischen den Parallelpflanzen.
- Der Einsatz von Tracerstudien mit dem stabilen Isotop  $^{15}\text{N}$  im Ökosystem ist schwierig, da Prozesse wie der Stickstoffmetabolismus im Boden und die Stickstoffaufnahme der Begleitvegetation, aber auch der natürlich vorkommende Stickstoff und die Bodentextur die  $^{15}\text{N}$ -Aufnahme in die Versuchspflanzen beeinflussen und lokal sehr verschieden sein können. Eine Standardisierbarkeit ist dadurch nicht möglich, dennoch kann anhand der  $^{15}\text{N}$ -Konzentrationen in den Nadeln eine höhere metabolische Aktivität durch die TCA-Belastung postuliert werden.
- Eine Reduktion des Wassergehaltes der Nadeln durch die TCA-Belastung konnte nicht festgestellt werden.

Diese Studie belegt die Aufnahme von TCA aus dem Boden und die Anreicherung des Schadstoffes in der Nadel im Ökosystem. Ebenfalls kann eine Aktivierung des Stickstoffmetabolismus in der Pflanze durch TCA auch unter natürlichen Bedingungen angenommen werden.

#### Zusammenfassung

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass atmosphärische Trichloressigsäure den Stickstoffmetabolismus von Pflanzen beeinflusst. Auf allen vier Versuchsebenen konnte diese Wirkung festgestellt werden. Das Ausmaß der TCA-Wirkung ist sowohl von der Pflanzenspezies, als auch von der TCA-Konzentration und dem Blattalter abhängig. Neben dem Einfluss auf den Stickstoffstoffwechsel wirkt die TCA auch auf die Photosynthese, die von grundlegender Bedeutung für den pflanzlichen Stoffwechsel ist. Es konnte in Begasungsstudien eine Erhöhung der spezifischen GST-Aktivität bei *Pinus sylvestris* durch luftgetragene TCA nachgewiesen werden. Bei anderen Pflanzenspezies, wie *Tropaeolum majus* und *Zea mays*, konnte dies nicht bestätigt werden.

Anhand der nachgewiesenen Wirkungen von atmosphärischer TCA kann angenommen werden, dass von diesem Luftschadstoff in Konzentrationen, wie sie im Freiland analysiert wurden, ein Gefährdungspotential für die Vegetation ausgeht. Schadstoffkonzentrationen sowie Belastungsdauer, zusätzliche Stressoren und Standortparameter, die im Ökosystem unterschiedlich sind, bestimmen dabei das Ausmaß der ökotoxikologischen Wirkung.

## Literaturverzeichnis

- Abuzinadah, R. A., Read, D. J.** (1986): The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. *New Phytol.* 103, Part I. Utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi. 481-493, Part II. Utilization of protein by mycorrhizal plants of *Pinus contorta*. 495-506
- Alla, M. M. N., Hassan, N. M.** (1998): Efficacy of exogenous GA<sub>3</sub> and herbicide safeners in protection of *Zea mays* from metolachlor toxicity. *Plant. Physiol. Biochem.* 36 (11), 809-815
- Anderson, R. N., Behrens, R., Linck, A. J.** (1962): Effects of dalapon on some chemical constituents in sugar beets and yellow foxtail. *Weeds* 10, 4-9
- Arntz, M. A., DeLucia, E. H., Jordan, N.** (2000): From fluorescence to fitness: variation in photosynthetic rate affects fecundity and survivorship. *Ecology* 81 (9), 2567-2576
- Ashton, F. M., Crafts, A. S.** (1987): *Mode of Action of Herbicide*. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 2. Auflage
- Back, H., Süsser, P.** (1992): Concentrations of volatile chlorinated hydrocarbons and trichloroacetic acid in earthworms. *Soil Biol. Biochem.* 24 (12), 1745-1748
- Ballach, H.-J.** (1998): Theoretical aspects of pollutant stress. *ESPR-Environ. Sci. & Pollut. Res.* 5 (1), 37-43
- Bärlocher, F.** (1999): *Biostatistik: Praktische Einführung in Konzepte und Methoden*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Barnes, J. D., Bender, J., Lyons, T., Borland, A.** (1999): Natural and man-made selection for air pollution resistance. *J. Exp. Bot.* 50, 1423-1435
- Bartsch, H.-J.** (1984): *Mathematische Formeln*. VEB Fachbuchhandlung Leipzig, 20. Auflage
- Bernauer, U., Birner, G., Dekant, W., Henschler, D.** (1996): Biotransformation of trichloroethene: dose-dependent excretion of 1,1,1-trichloro-metabolites and mercapturic acid in rats and humans after inhalation. *Arch. Toxicol.* 70, 338-346
- Bickham, J. W., Sandhu, S., Hebert, P. D. N., Chikhi, L., Athwal, R.** (2000): Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research* 463, 33-51
- BMVEL** (Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft) (Hrsg.) (2002): Bericht über den Zustand des Waldes 2002.
- BMU** (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit) (Hrsg.) (2002): Hintergrundpapier zur 6. Vertragsstaatenkonferenz des VN-Übereinkommens über die biologische Vielfalt vom 7. bis 19. April 2002 in Den Haag. 11 S.
- Bortier, K., Vandermeiren, K., De Temmerman, L., Ceulemand, R.** (2001): Growth, photosynthesis and ozone uptake of young beech (*Fagus sylvatica* L.) in response to different ozone exposures. *Trees-Structure and Function* 15 (2), 75-82

- Boxmann, A. W., Roelofs, J. G.** (1988): Some effects of nitrate versus ammonium nutrition on the nutrient fluxes in *Pinus sylvestris* seedlings. Effects of mycorrhizal infection. *Can. J. Bot.* 66, 1091-1097
- Brack, W., Frank, H.** (1998): Chlorophyll a fluorescence: a tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus. *Ecotoxicology and Environmental Safty* 40 (1-2), 34-41
- Bradford, M. M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing in the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Brand, W. A., Tegtmeier, A. R., Hilkert, A.** (1994): Compound-specific isotope analysis: extending toward  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  and 180/160. *Org. Geochem.* 21, 585-594
- Bringmann, G., Kühn, R.** (1982): Ergebnisse der Schadwirkung wassergefährdender Stoffe gegen *Daphnia magna* in einem weiterentwickelten standardisierten Testverfahren. *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.* 15, 1-6
- Brunold, Ch., Rueggsegger, A., Braendle, R.** (1996): Stress bei Pflanzen. Haupt, Bern
- Bowden, D. J., Clegg, S. L., Brimblecombe, P.** (1998): The Henry's law constant of haloacetic acid. *Journal of Atmospheric Chemistry* 29 (1), 85-107
- BUA** (Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe), (Hrsg.), (1996): Trichloressigsäure/Natriumtrichloracetat, BUA-Stoffbericht 167. S. Hirzel, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart
- Calatayud, A., Sanz, M. J., Calvo, E., Barreno, E., del Valle-Tascon, S.** (1996): Chlorophyll a fluorescence and chlorophyll content in *Parcella quercina* thalli from a polluted region of northern castellón (Spain). *Lichenologist* 28 (1), 49-65
- Coupland, D.** (1991): Detoxification of herbicides in plants. In: Cousins et. al., Herbicide resistance in corps. Wiley, New York
- Dauderer, M.** (1997): Handbuch der Umweltgifte: klinische Umwelttoxikologie für die Praxis. Ecomed, Landsberg/Lech
- De Weaver, H., Cole, J. R., Fetting, M. R., Hogan, D. A., Tiedje, J. M.** (2000): Reductive dehalogenation of trichloroacetic acid by *Trichlorobacter thiogenes* gen. nov., sp. nov.
- Dean, J. V. Devarenne, T. P. Lee, I., Orlofsky, L. E.** (1995): Properties of maize glutathione S-transferase that conjugates coumaric acid and other phenylpropanoides. *Plant Physiol.* 108, 985-994
- Debus, R., Schröder, P.** (1990): Responses of *Petunia hybrida* and *Phasaeolus vulgaris* to fumigation with difluoro-chloro-bromo-methan (Halon 1211). *Chemosphere* 21 (12), 1499-1505
- Donald, W. W.** (1990): Management and control of Canada thistle (*Cirsium arvense*). *Rev. Weed Sci.* 5, 193-250
- Dorgerloh, M.** (1997): Labor-Algentests: Bedeutung der toxikologischen Endpunkte. *UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox* 9 (4), 222-224
- Draber, W., Kluth, J. F., Tietjen, K., Trebst, A.** (1991): Herbizide in der Photosyntheseforschung. *Angew. Chem.* 103, 1650-1663

- Dudley, S. A.** (1996): Differing selection on plant physiological traits response to environmental water availability: a test of adaptive hypotheses. *Evolution* 50, 92-102
- EG-Sicherheitsdatenblatt** (1999) gemäß 91/155/EWG, Stand: 24.08.99, Aug. Hedinger GmbH & Co. (Hrsg.), Stuttgart
- Elansky, N., Arabov, A., Weissflog, L., Lisitsyna, L.V., Ol'shanskii, D. I., Putz, E., Pfennigsdorff, A., Folbert, G.** (2001): Oxidizing ability of the atmosphere and trichloroacetic acid formation in surface air over European Russia. *Izvestiya Atmospheric and Oceanic Physics*, 37, 58-70
- Ellis, D. A., Hanson, M. L., Sibey, P. K., Shahid, T., Fineberg, N. A., Solomon, K. R., Muir, D. C. G., Mabury, S. A.** (2001): The fate and persistence of trifluoroacetic and chloroacetic acids in pond waters. *Chemosphere* 42, 309-318
- Erdmenger, E.** (1999): Bestimmung der phytotoxischen Wirkung von Chlororganika mit Hilfe der  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Tracer-Technik. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Escher, B. I., Behra, R., Eggen, R. I. L., Fendt, K.** (1997): Molecular mechanism in ecotoxicology: an interplay between environmental chemistry and biology. *Chimia* 51, 915-921
- Faust, H.** (1981): FAO/IAEA interregional training course on the use of  $^{15}\text{N}$  in soil science and plant nutrition. ZF-I-Mitteilungen, Berichte des Zentralinstituts für Isotopen und Strahlenforschung, Leipzig 38, 176
- Faust, H.** (1993): Advances in nitrogen-15 use for environmental studies in soil-plant systems. *Isotopenpraxis Environ. Health Stud.* 29, 289-326
- Fendt, K.** (1998): Ökotoxikologie: Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Folbert, G., Putz, E.** (1999): Modelling airborne TCA production through photochemical methyl chloroform decomposition in the lower troposphere. *Atmospheric reactive substances*, Bayreuth
- Forczek, S. T., Matucha, M., Ulhírová, H., Albrechtová, J., Fuksova, K., Schröder, H. P.** (2001): Biodegradation of trichloroacetic acid in Norway spruce/soil system. *Biologia Plantarum* 44 (2), 317-320
- Forde, B. G.** (2000): Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465, 219-235
- Foy, C. L.** (1975): The chlorinated aliphatic acids. In: *Herbicides*. Kearney, P. C., Kaufman, D. D. (Hrsg.)
- Frank, H.** (1988): Trichloressigsäure im Boden: eine Ursache neuartiger Waldschäden. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 36, 889
- Frank, H.** (1989): Neuartige Waldschäden durch luftgetragene Chlorcholenwasserstoffe. *Z. Umweltchem. Ökotox.* 4, 12-14
- Frank, H.** (1991): Airborne chlorocarbons, photooxidants, and forest decline. *Ambio* 20/1, 13-18

- Frank, H., Peichl, L., Binniker, H., Baumeister, W., Vierle, O.** (1998): Monitoring von Haloacetaten als phytotoxische F(CKW)-Abbauprodukte in Nebelproben aus dem LfU-Standortfichtenmessnetz. BayLfU 151, 172-180
- Frank, H., Renschen, D., Klein, A., Scholl, H.** (1995): Trace analysis of airborne haloacetates. J. High Resol. Chromat. 18, 83-88
- Frank, H., Scholl, H., Renschen, D., Rether, B., Laouedj, A., Norokorpi, Y.** (1994): Haloacetic Acids, Phytotoxic Secondary Air Pollutants, ESPR- Environ. Sc. & Pollut. Res. 1 (1) 4-14
- Frank, H., Vicon, A., Reiss, J.** (1990): Montane Baumschäden durch das Herbizid Trichloressigsäure. Z. Umweltchem. Ökotox. 2, 208-214
- Franke, W.** (1992): Nutzpflanzenkunde: nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen. Thieme, Stuttgart, New York, 5. Auflage
- Galler, Josef** (1999) Lehrbuch Umweltschutz, Fakten - Kreisläufe - Maßnahmen, ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co. KG, Landsberg
- Gehre, M., Hofmann, D., Weigel, P.** (1994): Methodische Untersuchungen zum <sup>15</sup>N Con-Flow-IRMS-System. Isotopentaxis Environ. Health Studies 30, 235-245
- Gellert, W., Gärtner, R., Küstner, H., Wolf, G.** (1979): Kleine Enzyklopädie, Natur. VEB Bibliographisches Institut Leipzig (Hrsg.)
- Gemmell, C. G., Jensen, H. L.** (1964): Some studies on trichloroacetate-decomposing soil bacteria. Archiv für Mikrobiologie 48, 286-392
- Greim, H., Deml, E.** (1996): Toxikologie: eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo
- Gronwald, J. W.** (1989): Influence of Herbicide Safeners on Herbicide Metabolism. In: Hatziotis, K. K., Hoagland, R. E. (Hrsg.), Corp Safeners for Herbicides: Development, uses and mechanisms of action. Academic Press, San Diego, CA, 103-128
- Günther, E.** (1991): Lehrbuch der Genetik. Gustav Fischer Verlag, Jena, 6. Auflage
- Güttinger, H., Stumm, W.** (1990): Ökotoxikologie am Beispiel der Rheinverschmutzung durch den Chemie-Unfall bei Sandoz in Basel. Naturwissenschaften 77, 253-261
- Gollner, M.** (1997): Die Bedeutung der vesicular-arbuskulären Mykorrhiza (VAM) in nachhaltigen Landnutzungssystemen, Diplomarbeit, Inst. für Freiraumgestaltung und Landschaftspflege, Universität für Bodenkultur, Wien
- Govindjee, Xu. C., Schansker, G., van Rensen, J. J. S.** (1997): Chloroacetates as inhibitors of Photosystem II: Effects on electron acceptor side. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 37, 107-117
- Hafner, Ch., Erdmenger, E., Jung, K., Gehre, M., Schüürmann, G.** (2000): Stable Isotope Technique as a Tool to increase the Sensitivity of Plant Growth Bioassays- investigations with Pentachlorophenol and Trichloroacetic acid. Fresenius Envir. Bull. 9, 225-231

- Hafner, Ch., Jung, K., Kostka-Rick, R., Hahn, H.-U.** (2002b): Nitrogen metabolism as effect parameter for air pollution in plant bioindicators- a  $^{15}\text{N}$ -tracer study. in: Bioindication and Air Quality in European Cities, Hrsg. Klumpp, A., Fomin, A., Klumpp, G., Ansel, W., Verlag Günter Heimbach
- Hafner, Ch., Jung, K., Schüürmann, G.** (2002a): Effects of trichloroacetic acid on the nitrogen metabolism of *Pinus sylvestris* – a  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  tracer study. Chemosphere 46, 259-266
- Haiber, G., Jacob, G., Niedan, V., Nkusi, G., Schöler, H. F.** (1996): The occurrence of trichloroacetic acid (TCAA)-indications of a natural production? Chemosphere 33 (5), 839-849
- Hanson, M. L., Sibley, P. K., Ellis, D. A., Fineberg, N. A., Mabury, S. A., Solomon, K. R., Muir, D. C.** (2002): Trichloroacetic acid fate and toxicity to the macrophytes *Myriophyllum spicatum* and *Myriophyllum sibiricum* under field conditions. Aquatic Toxicology 56, 241-255
- Harbig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B.** (1974): Glutathione-S-Transferases. The Journal of Biological Chemistry 249 (22), 7130-7139
- Härtling, S., Sagan, D., Schulz, H.** (1995): Glutathione-S-transferase in needles of Scots pine from field. Fresenius Envir. Bull. 4 (12), 737-742
- Hasselmann, K. F., Ketola, R. A., Laturus, F., Lauritsen, F. R., Grøn, C.** (2000): Occurrence and formation of chloroform at Danish forest sites. Atmospheric Environment 34, 187-193
- Heldt, H. W.** (1996): Pflanzenbiochemie. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford
- Heimann, B., Cussans, G. W.** (1996): The importance of seeds and sexual reproduction in the population biology of *Cirsium arvense* – a literature review. Weed Research 36, 493 – 502
- Hilton, J. L., Ard, J. S., Jansen, L. L., Gentner, W. A.** (1959): The pantothenate synthesizing enzyme, a metabolic site in the herbicidal action of chlorinated aliphatic acids. Weeds 9, 264-272
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I.** (1950): The water-culture method for growing plants without soil. Calif. Agr. Exp. Circ. 347, 1-39
- Hock, B., Fedtke, C., Schmidt, R. R.** (1995): Herbizide Entwicklung, Anwendung, Wirkung, Nebenwirkung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Hoechst AG** (1994): DIN-Sicherheitsdatenblatt Trichloressigsäure vom 21.02.1994
- Hoekstra, E. J., de Leer, E. W. B., Brinkman, U. A. T.** (1999): Findings supporting the natural formation of trichloroacetic acid in soil. Chemosphere 38 (12), 2875-2883
- Hoekstra, E. J., Lassen, P., van Leeuwen, J. G. E., de Leer, E. W. B., Carlsen, L.** (1995): Formation of organic chlorine compounds of low molecular weight in the chloroperoxidase-mediated reaction between chloride and humic material. In: Naturally-Produced Organohalogenes. Grimvall, A., de Leer, E. W. B. (Hrsg.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Hofmann, D., Jung, K., Segschneider, H.-J., Gehre, M., Schüürmann, G.** (1995):  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  analysis of amino acids with GC-C-IRMS-methodical investigations and ecotoxicological applications. Isotopes Environ. Health Stud. 31, 367-375

- Hofmann, D., Jung, K., Bender, J., Gehre, M., Schüürmann, G.** (1997): Using natural isotope variations of nitrogen in plants as an early indicator of air pollution stress. *Journal of Mass Spectrometry* 32, 855-863
- Hofmann, D., Gehre, M., Jung, K.** (eingereicht): Sample preparation techniques for the determination of natural  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  variations in amino acids by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS). In *Isotopes in Environmental and Health Studies*
- Hudson, D. H., Roberts, T. R.** (1987): *Herbicides*. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore
- Ilonen, P., Kellomäki, S., Hari, P., Kanninen, M.** (1979): On distribution of growth in crown system of some young Scots pine stands. *Silva Fennica* 13, 316-326
- Irzyk, G. P., Fuerst, E. P.** (1993): Purification and characterization of a Glutathione S-Transferase from benoxacor-treated maize (*Zea mays*). *Plant Physiol.* 102, 803-810
- Jansen, M. A. K., Mattoo, A. K., Malkin, S., Edelman, M.** (1993): Direct demonstration of binding site competition between photosystem II inhibitors at the  $Q_B$  niche of the D1 protein. *Pestic. Biochem. Physiol.* 46, 78-83
- Jung, K., Gebauer, G., Gehre, M., Hoffmann, D., Weissflog, L., Schüürmann, G.** (1997): Anthropogenic impacts on natural isotope variations in *Pinus sylvestris* stands in an industrially pollutand area. *Environ. Poll.* 97, 175-181
- Jung, K., Kaletta, K., Segner, H., Schüürmann, G.** (1999): N-15 metabolic test for the determination of phytotoxic effects of chemicals and contaminated environmental samples. *ESPR-Environ. Sc. & Pollut. Res.* 6 (2), 72-76
- Jung, K., Morawetz, W., Gebauer, G., Hafner, Ch., Gehre, M.** (2002): Nitrogen and carbon isotope abundances in a neotropical Rainforest and a savanna area of Venezuela. *Ecotropica*, submitted
- Jung, K., Rolle, W., Schlee, D., Tintemann, H., Gnauk, T., Schüürmann, G.** (1994): Ozone effects on nitrogen incorporation and superoxide dismutase activity in spruce seedlings (*Picea abis* L.). *New Phytol.* 128, 505-508
- Jungk, A.** (1988): *Toxikologie der Pflanzenernährung (Düngerschäden)*. In: *Schadwirkungen auf Pflanzen*. Hock, B., Elstner, E. F. (Hrsg), Bi Wissenschaftsverlag Mannheim, Wien, Zürich, 2. Auflage
- Juuti, S., Hirvonen, A., Turhanen, J., Holopainen, J. K., Ruuskanen, J.** (1993): Trichloroacetic acid in pine needles in the vicinity of a pulp mill. *Chemosphere* 26 (10), 1859-1868
- Juuti, S., Norokorpi, Y., Ruuskanen, J.** (1995): Trichloroacetic acid (TCA) in pine needles caused by atmospheric emissions of kraft pulp mills. *Chemosphere* 30 (3), 439-448
- Kanne, R.** (1991): Aquatische Ökotoxikologie, UWSF-Z. *Umweltchem. Ökotox.* 3 (1) 16-18
- Karam, D.**, (1998): *Glutathione S-Transferase: an enzyme for chemical defense in plants*. Student Review Articles *Chemical Ecology*, EN 570, Colorado State University
- Kaiser, F. E., Gehrke, C. W., Zumwalt, R. W., Kuo, K. C.** (1974): Hydrolysis, ion exchange cleanup, derivatization and quantitation by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 94, 113-133

- Ketrupp, A., Steinberg, C., Freitag, D.** (1991): Ökotoxikologie: Wirkungserfassung und Bewertung von Schadstoffen in der Umwelt. UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. 3 (6) 370-377
- Kjeldahl, J.** (1883): Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. Z. Anal. Chem. 22, 366-382
- Klein, A.** (1997): Halogenierte Essigsäuren in der Umwelt. Shaker Verlag, Aachen
- Kolbe, A., Schütte, H. R.** (1982): Über das Verhalten von Trichloressigsäure in Pflanzen und Böden. Nachrichtenbl. Pflanzenschutz DDR 36, 117-119
- Kristen, U., Kappler, R.** (1995): The Pollen Tube Growth Test. von: Methods in Molecular Biology. In: In Vitro Toxicity Testing Protocols, 43, Hrsg. O'Hare, S. und Atterwill, C. K., Humana Press Inc., Totowa
- Kristen, U., Joos, U., van Aken, J.P., Kappler, R.** (1991): Bestimmung von Detergentien, Pestiziden und anderen Chemikalien mit dem Pollentest (Pollen tube growth test), VDI Bericht, 901, 1191-1210
- Kristen, U., Jung, K., Pape, W., Pfannenbecker, U., Rensch, A., Schell, R.** (1999) Performance of the Pollen Tube Growth Test in the COLIPA Validation Study on Alternatives to the Rabbit Eye Irritation Test, Toxicology in Vitro 13, 335-342
- Kristen, U., Bishoff, N., Lisboa, S., Quader, H., Witt, S.** (2001): Der Pollenschlauch-Wachstumstest als Verfahren für die Risikoabschätzung von Wirkstoffen. Schriftenreihe des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Universität zu Lübeck, Heft 4
- Kristen, U., Lockhausen, J., Petersen, W., Schult, B., Strube, K.** (1992): Veränderungen an Fichtennadeln nach Begasung mit 2,4- Dinitrophenol, Benzaldehyd, Furfural, Trichlorethan und Trichloressigsäure. In Michaelis, W. und Bauch, J. (Hrsg.): Luftverunreinigungen und Waldschäden am Standort "Postturm", Forstamt Farchau/ Ratzeburg, GKSS- Forschungszentrum Geesthacht GmbH Geesthacht, GKSS 92/E/100, 341-352
- Kronzucker, H. J., Siddiqui, M. Y., Glass, A. D. M.** (1997): Conifer roots discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. Nature 385, 59-61
- Kuttler, W.** (1993): Handbuch zur Ökologie. Analytika, Berlin
- Labrou, N. E., Mello, L. V., Clonis, Y. D.** (2001): Functional and structure roles of the glutathione-binding residues in maize (*Zea mays*) glutathione S-transferase I. Biochemical Journal, 358, 101-110
- Laemmli, U. K.** (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685
- Lamoureux, G. L., Rusness, D. G., Schröder, P.** (1993): Metabolism of a Diphenylether Herbicide to a volatile thioanisole and a polar sulfonic acid metabolite in spruce (*Picea*). Pesticide Biochemistry and Physiology 47, 8-20
- Lamoureux, G. L., Rusness, D. G.** (1989): The role of glutathione and glutathione S-transferase in pesticide metabolism, selectivity and mode of action in plant and insects. In: Dolphin, D., Poulson,

- R., Avramovik, O. (Hrsg.), Glutathione: chemical, biochemical, and medical aspects, Part B, 153-196
- Lamourex, G. L., Rusness, D. G.** (1993): Glutathione in the metabolism and detoxification of xenobiotics in plants. In: De Kok, L. J., Stuelen, I., Rennenberg, H., Brunold, D., Rauser, W. E. (Hrsg.), Sulfur nutrition and assimilation in higher plants. SPB Acad. Publ., The Hague, The Netherlands, 221-237
- Lange, A., Schulz, H., Tintemann, H., Wenzel, K. D., Krauss, G. J.** (1998): Purification and characterization of glutathione-S-transferase from needles of polluted Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees. *Angew. Bot* 72 (5-6), 207-211
- Lejtha, K., Michner, R. H.** (1994): Stable isotopes in ecology and environmental science. Blackwell Scientific publications (Hrsg.) London, Edinburgh, Boston, Melbourne, Paris, Berlin, Vienna
- Lichtentaler, H. K., Miede, J. A.** (1997): Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Science* 2, 316-320
- Lignell, R., Heinonen-Tanski, H., Uusi-Rauva, A.** (1984): Degradation of trichloroacetic acid (TCA) in soil. *Acta Agric. Scand.* 34, 3-8
- Lindström, K., Österberg, F.** (1986): Chlorinated carboxylic acids in softwood kraft pulp spent bleach liquors. *Environ. Sci. Technol.* 20, 133-138
- Lodisch, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Darnell, J.** (1996): *Molekulare Zellbiologie.* Walter de Gruyter & Co, Berlin, 2. Auflage
- Longauer, R., Gömöry, D., Paule, L., Karnosky, D. F., Mankovska, B., Müller-Starck, G., Percy, K., Szaro, R.** (2001): Selection effects of air pollution on gene pools of Norway spruce, European silver fir and European beech. *Environmental Pollution* 115, 405-411
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.** (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 165-275
- Macko, S. A., Uhle, M. E.** (1997): Stable nitrogen isotope analysis of amino acid enantiomers by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 69 (5), 926-929
- Malagoli, M., Canal, A. D., Quaggiotti, S., Pegoraro, P., Bottacin, A.** (2000): Differences in nitrate and ammonium uptake between Scots pine and European larch. *Plant and Soil* 221, 1-3
- Marrs, K. A.** (1996): The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 127-158
- Marschner, H., Häussling, M., Leisen, E.** (1986): Rhizosphere pH of Norway spruce trees grown under both controlled and field conditions. In: Proc CEC Workshop, Kernforschungsanlage, Jülich, FRG, on „Indirect effects of air pollution on forest trees“, 113-118
- Marscher, H., Häusslings, M., George, E.** (1991): Ammonium and nitrate uptake rates in rhizosphere pH in non-mycorrhizal roots of Norway spruce (*Picea abis* (L.) Kast). *Trees* 5, 14-21
- Matucha, M., Ulhírová, H., Bubner, M.** (2000): Application of <sup>14</sup>C-labelling in Investigation of Forrest Decline: Pathway, Uptake and Fate of Trichloroacetic Acid in Norway Spruce (*Picea*

*abis/L./Kast.*) in: Pleiss, U., Voges, R., Proceedings of the Seventh International Symposium on the Synthesis on Applications of Isotopes and Isotopically labelled Compounds, J. Wiley Verlag, Chichester

**Matucha, M., Ulhírová, H., Bubner, M.** (2001): Investigation of uptake, translocation and fate of trichloroacetic acid in Norway spruce (*Picea abis/L./Kast.*) using C-14-labelling, *Chemosphere* 44 (2), 217-222

**Matucha, M., Forczek, S. T., Gryndler, M., Ulhírová, H., Fuksová, K., Schröder, P.** (2003): Trichloroacetic acid in Norway spruce/soil-system I. Biodegradation in soil. *Chemosphere* 50, 303-309

**Maxam, G., Rila, J.-P., Dott, W., Eisenträger, A.** (2000): Use of bioassays for assessment of water-extractable ecotoxic potential of soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45, 240-246

**Maxwell, K., Johnson, G. N.** (2000): Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51 (345), 659-668

**Mayer, F.** (1957): Zur Wirkungsweise von Trichloracetat auf die höhere Pflanze. *Z. Naturforsch.* 12b, 336-346

**McCulloch, A.** (2002): Trichloroacetic acid in the environment. *Chemosphere* 47 (7), 667-686

**McCulloch, A., Midgley, P. M.** (1996): The production and global distribution of emissions of trichlorethene, tetrachlorethene and dichlormethane over the period 1988-1992. *Atmospheric Environment* 30 (4), 601-608

**Meier-Augenstein, W.** (1999): Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 842, 351-371

**Meister, A., Anderson, M. E.** (1983): Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 711-760

**Michal, G.** (1999): *Biochemical pathways.* Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin

**Möcker, D., Hofmann, D., Jung, K.,** (1996): The impact of ozone on the N-15 incorporation and nitrogen assimilation of wheat and maize. *Isot. Environ. Health.* 32 (2-3), 181-190

**Müller, S. R., Zweifel, H. R., Kinnison, D. J., Jacobsen, J. A., Meier, M. A., Ulrich, M. M., Schwarzenbach, R. P.** (1996): Occurrence, sources and fate of trichloroacetic acid in Swiss waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1470-1478

**Mulvaney, R. I.** (1993): Mass spectrometry. In: Nitrogen isotope techniques. Knowles, R., Blackburn, T. H. (Hrsg.), Academic Press, Inc, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto

**Nantangelo, M., Manigiapan, S., Bagnati, R., Benfenati, E., Fanelli, E.** (1999): Increased concentrations of nitrophenols in leaves from a damaged forest site. *Chemosphere* 38, 1495-1503

**Norokorpi, Y., Frank, H.** (1995): Trichloroacetic acid as a phytotoxic air pollutant and the dose-response relationship for defoliation of Scots pine. *The Science of the Total Environment* 160/161, 459-463

**Nordin, A., Näsholm, T.** (1997): Nitrogen storage forms in nine boreal understorey plant species. *Ökologia* 110, 487-492

- Nusch, E. A.** (1989): Grundsätzliche Vorbemerkungen zur Planung, Durchführung und Auswertung biologischer und ökotoxikologischer Testverfahren In: Biologische Testverfahren, Hrsg. Steinhäuser, K. G. und Hansen P.-D., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1992
- Nusch, E. A.** (1991): Ökotoxikologische Testverfahren- Anforderungsprofile in Abhängigkeit vom Verwendungszweck, UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. 3 (1), 12-15
- Nusch, E. A.** (1993): Biologische Testverfahren- Aussagekraft und Grenzen der Übertragbarkeit. UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. 5, 155-161
- Pflugmacher, S., Schröder, P.** (1995): Glutathione-S-transferases in trees: Inducibility by various organic xenobiotics. Z. Pflanzenernähr. Bodenk. 158, 71-73
- Pickett, C. B., Lu, A. Y. H.** (1989): Glutathione-S-transferases: Gene structure, regulation, and biological funktion. Annu. Rev. Biochem. 58, 743-764
- Pimm, S. L., Russell, G. J., Gittleman, J. L., Brooks, T. M.** (1995): The future of biodiversity. Science 269, 347-350
- Platz, J., Nielsen, O. J., Sehested, J., Willington, T. J.** (1995): Atmospheric chemistry of 1,1,1 Trichloroethane: UV absorption spectra and self-reaction kinetics of  $\text{CCl}_3\text{CH}_2$  and  $\text{CCl}_3\text{CH}_2\text{O}_2$  radikals, kinetics of the reactions of the  $\text{CCl}_3\text{CH}_2$  radical with  $\text{NO}$  and  $\text{NO}_2$ , and the fate of the alkoxy radikal  $\text{CCl}_3\text{CH}_2\text{O}$ . J. Phys. Chem. 99, 6570-6579
- Plümacher, J., Renner, I.** (1993): Determination of volatile chlorinated hydrocarbons and trichloroacetic acid in conifer needles by headspace gas- chromatography. Fresenius J. Anal. Chem. 347, 129-135
- Plümacher, J., Renner, I., Schröder, P.** (1993): Volatile chlorinated hydrocarbons and trichloroacetic acid in conifer needles. In: Schröder, P., Frank, H., Rether, B. (Hrsg.): Volatile organic pollutants: Levels, fate and ecotoxicological impacts: Proceedings of the 2<sup>nd</sup> IMTOX-Workshop (1992) at the Fraunhofer Institute for Atmospheric Environmental Research (IFU) Garmisch-Partenkirchen, Wiss. Verlag Maraun, Frankfurt, 37-51
- Plümacher, J., Schröder, P.** (1994): Accumulation and fate of C1/C2-chlorocarbons and trichloroacetic acid in spruce needles from an Austrian mountain site. Chemosphere 29, 2467-2476
- Radetski, C. M., Cotelle, S., Féraud, J-F.** (2000): Classical and biochemical endpoints in the evaluation of phytotoxic effects caused by the herbicide trichloroacetate. Environ. Exp. Bot. 44, 221-229
- Rau, S.** (2002): Physiologisch-biochemische Charakterisierung schwermetallinduzierter Reaktionen in *Fontanalis antipyretica* Hedw. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Dissertation
- Regelmann, J., Riedhammer, C., Ahlers, J.** (1999): Environmental risk assessment of airborne trichloroacetic acid. Atmospheric Reactive Substans, Bayreuth
- Renner, I., Schleyer, R., Mühlhausen, D.** (1990): Gefährdung der Grundwasserqualität durch anthropogene organische Luftverunreinigung. VDI Berichte 837, 705-727
- Riemann, S., Grob, K., Frank, H.** (1996): Chloroacetic acids in rainwater. Environ. Sci. Technol. 30, 2340-2344

- Rojicková-Padrťová, R., Marsalek, B., Holoubek, B.** (1998): Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: selection of an optimal test battery. *Chemosphere* 37, 495-507
- Roloff, A.** (2001): Baumkronen: Verständnis und praktische Bedeutung eines komplexen Naturphänomens. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart
- Römpp, A., Klemm, O., Fricke, W., Frank, H.** (2001): Haloacetates in fog and rain. *Environ. Sci. Technol.* 35 (7), 1294-1298
- Rudolph, P.** (1989): Erkenntnisgrenzen biologischer Testverfahren zu Abbildung ökologischer Wirklichkeiten. In: *Biologische Testverfahren*, Hrsg. Steinhäuser, K. G. und Hansen P.-D., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1992
- Rudolph, P., Boje, R.** (1986): Ökotoxikologie: Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Umweltchemikaliengesetz. Aus: *Handbuch des Umweltschutzes*, Ecomed, Landsberg, München
- Rundel, P. W., Ehleringer, J., Nagy, K. A.** (1989): Stable isotopes in ecological research. Springer Verlag, New York
- Rutherford, A. W., Krieger-Liszkay, A.** (2001): Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends in Biochemical Sciences* 26 (11), 648-653
- Saitanis, C. J., Riga-Karandinos, A. N., Karandinos, M. G.** (2001): Effects of ozone on chlorophyll and quantum yield of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) varieties. *Chemosphere* 42 (8) 945-953
- Sandermann, H.** (1994): Higher plant metabolism of xenobiotics: the "green liver" concept. *Pharmacogenetics* 4, 225-241
- Schäffler, F.** (2002): Lehrbuch der Bodenkunde, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 15. Auflage
- Schlee, D.** (1992): Ökologische Biochemie. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, New York, 2. Auflage
- Schmidt, S.** (2000): Waldschädigende Luftverunreinigungen. Forstliche Bundesversuchsanstalt Wien.
- Schreiber, U.** (1997): Chlorophyllfluoreszenz und photosynthetische Energieumwandlung: Einfache einführende Experimente mit dem TEACHING-PAM Chlorophyll Fluorometer. Heinz Walz GmbH, Effeltrich
- Schröder, P.** (1993): Detoxification and metabolism of organic xenobiotics in *Picea* and *Pinus*. In Schröder, P., Frank, H., Rether, B. (Hrsg.): Volatile organic pollutants: Levels, fate and ecotoxicological impacts: Proceedings of the 2<sup>nd</sup> IMTOX-Workshop (1992) at the Fraunhofer Institute for Atmospheric Environmental Research (IFU) Garmisch-Partenkirchen, Wiss. Verlag Maraun, Frankfurt, 104-117
- Schröder, P., Berkau, C.** (1993): Characterization of cytosolic glutathione S-transferase in spruce needles. *Bot. Acta* 106, 301-306

- Schröder, P., Debus, R.** (1991): Responses of spruce trees. In: PicGotsuch, J. W., Lower, W. R., Lewis, M. A., Wang, W. (Hrsg.) Plant for toxicity assessment. ASTM, Philadelphia, 259-266
- Schröder, P., Juuti, S., Roy, S., Sandermann, H., Sutinen, S.** (1997): Exposure to chlorinated acetic acids: Responses of peroxidase and Glutathion S-Transferase activity in pine needles. *ESPR-Environ. Sci. & Pollut. Res* 4 (3), 163-171
- Schröder, P., Lamoureux, G. L., Rusness, D. G., Rennenberg, H.** (1990a): Glutathione S-transferase activity in spruce needles. *Pest. Biochem. Physiol.* 37, 211-218
- Schröder, P., Meßner, B., Weiss, P.** (2000): Glutathion-S-Transferase- und Glycosyltransferase-Aktivität in Fichtennadeln. In: Bundesumweltamt GmbH (Hrsg), Pflanzentoxische organische Schadstoffe und enzymatische Reaktionen in Fichten emitterferner Waldstandorte Österreichs. Bundesumweltamt GmbH, Wien
- Schröder, P., Pflugmacher, S., Rennenberg, H.** (1992): Biomarker für organische Schadstoffe in Fichten (*Picea abis* L.): Dynamik des Entgiftungsenzyms Glutathion S-Transferase. *Angew. Bot.* 66, 174-179
- Schröder, P., Rennenberg, H.** (1992): Characterization of glutathione S-transferase from dwarf pine needles (*Pinus mugo* Turra). *Tree Physiology* 11, 151-160
- Schröder, P., Rusness, D. G., Lamoureux, G. L.** (1990b): Detoxification of xenobiotics in spruce trees is mediated by glutathione S-transferases. In: De Kok, L. J., Stuelen, I., Rennenberg, H., Brunold, D., Rauser, W. E. (Hrsg.), Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants. SPB Acad. Publ., The Hague, The Netherlands, 221-237
- Schröder, P., Wolf, A.** (1996): Characterization of glutathione S-transferases in needles of Norway spruce trees from forest decline stand. *Tree Physiology* 16, 503-508
- Schroll, R., Bierling, B., Cao, G., Dörfler, U., Lahaniati, M., Langenbach, T., Scheunen, I., Winkler, R.** (1994): Uptake pathways of organic chemicals from soil by agricultural plants. *Chemosphere* 28 (2), 297-303
- Schubert, R.** (1991): Bioindikation in terrestrischen Ökosystemen, Gustav Fischer Verlag Jena, 2. Auflage
- Schulz, H., Gehre, M., Hofmann, D., Jung, K.** (2001): Nitrogen isotope ratios in pine bark as an indicator of N emissions from anthropogenic sources.
- Schüürmann, G., Somashekar, R. K., Kristen, U.** (1996): Structure- Activity Relationships for Chloro- and Nitrophenol Toxicity in the Pollen Tube Growth Test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15 (10) 1702-1708
- Schweizer, A., Hafner, Ch., Jung, K., Hurle, K., Schüürmann, G.** (2000): <sup>15</sup>N-Tracerstudien zur Untersuchung des Einflusses von atmosphärischen Herbizid-Konzentrationen auf den pflanzlichen N-Metabolismus. *Z. Pflkrankh. Pflschutz, Sonderheft XVII*, 799-809
- Setzer, B., Gebauer, G., Morh, H.** (1998): Influence of potassium supply on uptake and assimilation of (N-15)-nitrate and (N-15)-ammonium in Scots pine (*Pinus sylvestris*) seedlings. *Allgemeine Forst und Jagdzeitung* 169 (4), 76-80
- Seyle, H.** (1936): A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138, 32

- Shang, T. Q., Doty, S. L., Wilson, A. M., Howald, W. N., Gordon, M. P.** (2001): Trichloroethylene oxidative metabolism in plants: the trichloroethanol pathway. *Phytochemistry* 58, 1055-1065
- SIDS (Screening Information Data Sheet)** (1997): Initial Assessment profile OECD Existing Chemical Programme
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A.** (1991): Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. begründet von Straßburger, E., Noll, F., Schimper, A. F. W., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 33. Auflage
- Sivasankar, S., Rothstein, S., Oaks, A.** (1997): Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings. *Plant Physiol.* 583-589
- Snell, F. D., Snell, C. T.** (1949): Colorimetric methods of analysis. Nostrand, New York, 3. Auflage
- Sordyl, H.** (2001): Grenzen und Möglichkeiten des Einsatzes von Biomarkern an praktischen Beispielen. 7. Gewässersymposium, 8. November in Güstrow, „Perspektiven und Grenzen eines biologischen Effektmontoring als Instrument der Gewässerüberwachung“, Landesamt für Umwelt, Naturschutz und Geologie Mecklenburg-Vorpommern und Institut für Angewandte Ökologie GmbH, Boldersdorf (Hrsg.)
- Spangenberg, D., Möller, U., Kleinermanns, K.** (1996): Photooxidation of exhaust pollutants. *Chemosphere* 33 (1), 43-49
- Stadler, J., Gebauer, G.** (1992): Nitrate reduction and nitrate content in ash trees (*Fraxinus excesior* L.): distribution between compartments, site comparison and seasonal variation. *Trees* 6, 236-240
- Stocker, O.** (1947): Probleme der pflanzlichen Dürresistenz. *Naturwissenschaften* 34, 362-371
- Stryer, L.** (1996): Biochemie. Spektrum Acad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford, 4. Auflage
- Steinhäuser, K. G., Hansen, P.-D.** (1992): Biologische Testverfahren. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- Sutinen, S., Juuti, S., Koivisto, L., Turunen, M., Ruuskanen, J.** (1995): The uptake of and structural changes induced by trichloroacetic acid in the needles of Scots pine seedlings. *Journal of Experimental Botany* 46 (290), 1223-1231
- Sutinen, S., Juuti, S., Ryyppö, A.** (1997): Long-term exposure of Scots pine seedlings to monochloroacetic and trichloroacetic acid: Effects on the needles and growth. *Ann. Bot. Fennici* 34, 265-273
- Sutter, K.** (2000): Untersuchungen zur Akkumulation und physiologisch-biochemischen Wirkung von Schwermetallen im Wassermoos *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Dissertation
- Ter Steege, M. W., Stulen, I., Wiersema, P. K., Posthumus, F., 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

- Timmermann, K. P.** (1989): Molecular characterisation of corn Glutathione S-transferase isoenzymes involved in herbicide detoxification. *Physiol. Plant.* 77, 465-571
- Tuba, Z., Csintalan, Z., Badacsonyi, A., Proctor, M. C. F.** (1997): Chlorophyll fluorescence as a exploratory tool for ecophysiological studies on mosses and other small poikilohydric plants. *Journal of Bryology* 19 (3), 401-407
- Ulhirová, H., Matucha, M., Kretschmar, M., Bubner, M.** (1996): Aufnahme und Verteilung von Trichloressigsäure in Trieben Norwegischer Fichte. *UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox.* 8 (3), 138-142
- Völkel, W., Friedewald, M., Lederer, E., Pähler, A., Parker, J., Dakant, W.** (1998): Biotransformation of perchlorethene: dose-depended excretion of trichloroacetic acid, dichloroacetic acid and N-acetyl-S-(trichlorovinyl)-L-cysteine in rats and humans after inhalation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 153, 20-27
- Wegeler, R.** (1970): *Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel.* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Weigel, H. J.** (1997): Globale Umweltveränderungen und biologische Vielfalt. In: *Biologische Vielfalt in Ökosystemen. Schriftenreihe des BML „Angewandte Wissenschaft“*, Heft 465, 185-202
- Weissflog, L., Manz, M., Popp, P., Elansky, N., Arabov, A., Putz, E., Schüürmann, G.** (1999): Airborne trichloroacetic acid and its deposition in the catchment area of the Caspian Sea. *Environmental Pollution* 104, 359-364
- Weissflog, L., Pfennigsdorf, A., Martinez-Pastur, G., Puliafito, E., Figueroa, D., Elansky, N., Nikonov, V., Putz, E., Krüger, G., Kellner, K.** (2001): Trichloroacetic acid in the vegetation of polluted and remote areas of both hemispheres-Part I. Its formation, uptake and geographical distribution. *Atmospheric Environment* 35, 4511-4521
- Willis, G. H., McDowell, L. L.** (1982): Pesticides in agricultural runoff and their effects on downstream water quality. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 267-279
- Wolf-Schwenninger, K., Schwenninger, R.** (1994): *Altlastenerkundung mit biologischen Methoden* (13). Landesanstalt für Umweltschutz Baden Württemberg (Hrsg.), Stuttgart
- Youngman, R. J., Elstner, E. F.** (1988): Herbizide. In: *Schadwirkungen auf Pflanzen, Lehrbuch der Pflanzentoxikologie.* Hock, B., Elstner, E. F. (Hrsg.), BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, 2. Auflage
- Wu, C., Wei, D., Fan, J., Wang, L.** (2001): Photosonochemical degradation of trichloroacetic acid in aqueous solution. *Chemosphere* 44, 1293-1297
- Yu, P., Welander, T.** (1995): Growth of an aerobic bacterium with trichloroacetic acid as the sole source of energy and carbon. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42 (5), 769-774
- Zhang, J., Marshall, J. D., Jaquish, B. C.** (1993): Genetic differentiation in carbon isotope discrimination and gas exchange in *Pseudotsuga menziesii*. *Oecologia* 93, 80-87
- Ziegler, H.** (1995): Weg der Schadstoffe in der Pflanze. In: *Schadwirkungen auf Pflanzen.* Hock, B., Elstner, E. F. (Hrsg.), Bi Wissenschaftsverlag Mannheim, Wien, Zürich, 2. Auflage

**Zöttl, H.** (1953): Untersuchungen über die Wirkung von Trichloracetaten und anderen Haloacetaten auf pflanzliches Gewebe. Z. Naturforschg. 8b, 317-323

## Tabellenanhang

**Tab. 1** Ergebnisse des PTG-Tests mit TCA.

mg TCA/l	Pollen 11/00		Pollen 15/00		Pollen 20/00	
	Hemmung [%]	$\Delta s$	Hemmung [%]	$\Delta s$	Hemmung [%]	$\Delta s$
150	13,56	4,65	7,69	9,86		
200	27,11	10,22			-22,69	24,15
	25,59	15,78	19,02	15,83	-14,95	11,63
250	35,63	4,25	13,99	12,79	12,46	29,96
	10,8	11,99	20,63	18,86	1,55	16,18
	28,38	17,09			37,22	1,25
300	47,81	3,2	73,22	6,8	37,01	30,46
	36,02	8,39	79,97	15,22	36,48	1,2
	26,81	15,18			60,33	17,05
					35,74	28,0
350	23,3	7,63	80,62	6,1	86,35	2,59
	61,91	5,04	85,41	1,5	76,51	2,03
400	87,05	12,23	93,06	1,99	94,45	1,64
	77,95	5,49	95,76	1,06	93,22	0,67
	94,46	5,44			87,37	9,96
	92,23	3,94			96,12	8,5
500	85,98	8,66	93,29	1,02	96,36	0,52
	94,86	4,84	96,80	0,21	87,84	10,59
	93,37	5,08			93,12	4,74
600	89,40	1,61	92,14	2,87	93,72	1,12
	94,27	1,33			95,40	7,18
	98,86	2,01			92,79	6,51
	93,05	1,41			97,34	2,43
1200	84,47	5,64			92,27	2,25

**Tab. 2** Ergebnisse des PTG-Tests mit Na-TCA.

	Pollen 20/01			Pollen 20/01	
mg Na-TCA	Hemmung [%]	$\Delta s$	mg Na-TCA/l	Hemmung [%]	$\Delta s$
31	7,6	6,31	2500	38,24	11,1
100	9,23	6,78	5000	48,21	10,58
250	7,12	11,95		64,37	6,63
500	17,93	6,31		59,9	6,73
	16,69	11,37	7500	55,59	10,75
	7,84	8,56	10000	56,39	6,82
1000	16,17	11,39		77,9	7,48
	13,82	11,74		74,07	7,53
	7,4	9,43	20000	64,49	7,68

**Tab. 3** Ergebnisse des ESIMA-Tests mit *Pisum arvense*.

Konzentration mg/l	TCA		Na-TCA	
	Hemmung [%]	$\Delta s$	Hemmung [%]	$\Delta s$
1			16,3	5
2,81	2,0	25,60		
10	-6,2	14,6	20,5	9,7
20	1,9	10,4		
25	0,8	15,4		
40	17,1	12,2		
50	24,4	16,0		
80	16,2	13,3		
100			27,7	11,5
163,4	11,5	10,5		
350	27,9	9,8		
500	33,2	12,6		
1000			46,3	10,8
3000	43,5	16,1		
5000	50,9	6,8	26,4	9,7
10000	34,9	7,5	33,2	7,6
			39,1	13,5
12000	41,4	20,0		

**Tab. 4** Ergebnisse des ESIMA-Tests mit *Lepidium sativum*; Konzentrationsreihe.

Konzentration [mg/l]	TCA		Na-TCA	
	Hemmung [%]	$\Delta s$	Hemmung [%]	$\Delta s$
10	1,3	25,1		
25	1,9	14,6	-1,9	13,7
50	35,9	24,9	-38,9	34,9
75	61,5	12,7		
100			-20,5	26,9
125	88,1	3,2		
150	88,6	3,0		
200	88,9	2,7		
250	85,7	1,7		
350	82,8	2,8		
500			-13,5	34,8
1000			-8,5	29,4
2000			-10,5	36,7
5000			21,1	24,7

**Tab. 5** Ergebnisse des ESIMA-Test mit *Lepidium sativum*; Zeitreihe.

Expositionszeit [h]	TCA		Na-TCA	
	Hemmung [%]	$\Delta s$	Hemmung [%]	$\Delta s$
5	1,9	14,6	-1,9	13,7
6			11,7	23
7,5	14,8	15,1		
10			36,0	11,3
17,5	9,1	14,3		
25	3,3	13,2	46,8	15,0
42	40,2	11,1		

**Tab.6** pH-Werte in Abhängigkeit von Schadstoffkonzentration und Testmedium

Konzentration [mg/l]	PTG-Medium		Medium für ESIMA mit <i>Lepidium sativum</i>		Medium für ESIMA mit <i>Pisum arvense</i>	
	TCA pH	Na-TCA pH	TCA pH	Na-TCA pH	TCA pH	Na-TCA pH
10		5,5		5,5	5	5
50	5,5	5,5	5	5,5		5
75	5,5	5,5	4,5	5,5		5
100		5,5		5,5		5
125	5,0	5,5	4	5,5		5
150		5,5		5,5	3,5	5
250		5,5		5,5		5
350	4,5	5,5	2	5,5	2	5
1000	2,5	5,5	2	5,5		5
5000					1	
10000		6,0		6,0		5

**Tab. 7** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Zea mays*; Stickstoffgehalt der Gesamtstickstofffraktion.

Konzentration [ $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$ ]	% der Kontrolle	$\Delta\text{s}$
0	99,3	27,6
0,002	117,4	19,9
0,196	100	10,9
2,3	104,6	47,7
16	96,8	14,9
194	112,4	30,1

**Tab. 8** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Zea mays*;  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit [ $^{15}\text{N}$  at.% exc.] der Gesamtstickstoff-, NPN- und Proteinfraktion.

Konzentration [ $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$ ]	Gesamtstickstoff		NPN-Fraktion		Proteinfraktion	
	% der Kontrolle	$\Delta\text{s}$	% der Kontrolle	$\Delta\text{s}$	% der Kontrolle	$\Delta\text{s}$
0	102,1	42,8	105,7	45,7	104,5	43,4
0,002	144,2	73,1	119,7	9,6	146,6	62,2
0,021			159,1	32,5	171,5	55,9
0,196	147,0	33,5	138,5	31,1	154,6	38,2
2,3	93,2	31,2	102,1	24,0	103,6	37,6
16	112,7	16,5	110,6	28,3	113,6	31,4
194	75,5	35,5	74,5	31,4	89,9	28,3

**Tab. 9** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Zea mays*; Proteingehalt [ $\text{mg}/\text{g}$  FG] der löslichen Proteinfraktion.

Konzentration [ $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$ ]	Kontrolle		Belastung		% der Kontrolle
	MW	$\Delta\text{s}$	MW	$\Delta\text{s}$	
2,3	18,5	1,6	23,5	3,9	127,5
194	13,6	2,2	12,4	2,2	91,2

**Tab. 10** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Zea mays*; Nitratreduktase-Aktivität [nkat/g FG].

Konzentration [ $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$ ]	Kontrolle		Belastung		% der Kontrolle
	MW	$\Delta\text{s}$	MW	$\Delta\text{s}$	
2,3	1,58	0,27	1,24	0,1	78,4
194	1,21	0,21	0,89	0,21	73,5

**Tab. 11** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Zea mays*; Nitritreduktase-Aktivität [nkat/g FG].

Konzentration [ $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$ ]	Kontrolle		Belastung		% der Kontrolle
	MW	$\Delta\text{s}$	MW	$\Delta\text{s}$	
2,3	11,98	0,95	10,7	1,03	88,9
194	14,31	2,12	12,3	2,57	86,0

**Tab. 12** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Zea mays*;  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit [ $\delta^{15}\text{N}$  ‰] einzelner Aminosäuren der löslichen Proteinfraction.

Aminosäure	Kontrolle		Belastung	
	MW	$\Delta\text{s}$	MW	$\Delta\text{s}$
Ala	176,3	80,8	337,0	20,6
Gly	136,5	63,1	279,7	25,1
Thr	92,8	42,8	200,3	29,4
Ser	134,8	61,5	276,1	20,3
Val	75,2	34,0	162,3	25,0
Leu	120,3	55,6	226,1	22,8
Ile	106,3	49,2	213,8	22,2
Pro	70,5	32,0	146,5	31,9
Asp	136,0	63,4	267,4	24,1
Glu	185,7	86,8	354,1	31,9
Phe	89,9	41,7	180,1	18,5
Tyr	82,3		143,8	23,2

**Tab. 13** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Tropaeolum majus*; N-Gehalt [mg/g FG] der Gesamtstickstofffraktion.

Konzentration [ $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$ ]	% der Kontrolle	$\Delta\text{s}$
0	105,8	12,1
0,00016	95,8	26,0
0,0015	95,0	8,3
0,017	112,86	9,5
0,13	93,1	21,6

**Tab. 14** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Tropaeolum majus*;  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit [ $^{15}\text{N}$  at.% exc.] der Stickstofffraktionen.

Konzentration [ $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$ ]	Gesamtstickstoff		NPN-Fraktion		Proteinfraktion	
	% der Kontrolle	$\Delta\text{s}$	% der Kontrolle	$\Delta\text{s}$	% der Kontrolle	$\Delta\text{s}$
0	107,2	31,4	108,8	27,6	103,4	24,5
0,00016	65,5	10,3	55,5	11,2	69,4	12,8
0,0015	33,8	17,9	36,1	16,3	30,8	13,7
0,017	47,0	7,4	44,2	7,1	52,0	10,1
0,13	40,7	19,3	57,4	11,8	42,2	14,9
2,3			42,7	26,0	40,3	14,9

**Tab. 15** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Tropaeolum majus*; Poteingehalt [mg/g FG] der löslichen Proteinfraktion.

Konzentration [ $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$ ]	Kontrolle		Belastung		% der Kontrolle
	MW	$\Delta\text{s}$	MW	$\Delta\text{s}$	
0,017	6,54	0,19	7,28	0,64	111,3
2,3	6,96	0,05	7,24	0,13	104,0

**Tab. 16** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Tropaeolum majus*; Nitritareduktase-Aktivität [nkat/g FG].

Konzentration [ $\mu\text{g TCA}/\text{m}^3$ ]	Kontrolle		Belastung		% der Kontrolle
	MW	$\Delta\text{s}$	MW	$\Delta\text{s}$	
0,017	5,42	0,42	5,19	1,55	95,8
2,3	5,59	1,9	4,65	17,8	83,2

**Tab. 17** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Tropaeolum majus*;  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit [ $\delta^{15}\text{N}$  ‰] einzelner Aminosäuren der löslichen Proteinfraction.

Aminosäure	Kontrolle		Belastung	
	MW	$\Delta\text{s}$	MW	$\Delta\text{s}$
Ala	211,7	11,1	149,3	20,6
Gly	187,3	17,6	130,3	25,1
Thr	93,8	5,7	67,5	29,4
Val	103,1	4,8	74,5	25,0
Leu	129,2	4,2	90,7	22,8
Ile	156,0	8,5	111,0	22,2
Pro	103,8	4,1	74,1	31,9
Asp	176,7	8,1	131,9	24,1
Met	107		71,3	31,9
Glu	230,8	9,6	166,4	18,5
Phe	127,5	0,1	93,1	23,2
Tyr	64,7	0,4	66,6	31,7

**Tab. 18** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Pinus sylvestris*; effektive Quantenausbeute des PS II der chronischen Belastung (V2) des diesjährigen (C) und vorjährigen (C+1) Nadeljahrgangs.

Belastungsdauer [d]	C				C+1			
	Kontrolle		Belastung		Kontrolle		Belastung	
	MW	$\Delta s$						
0	0,811	0,02	0,812	0,03	0,755	0,03	0,76	0,06
6	0,818	0,018	0,814	0,012	0,757	0,02	0,782	0,01
14	0,817	0,02	0,816	0,02	0,777	0,02	0,786	0,01
35	0,782	0,01	0,786	0,04	0,748	0,03	0,762	0,03
41	0,783	0,01	0,795	0,01	0,742	0,01	0,755	0,04
43	0,786	0,021	0,795	0,022	0,737	0,037	0,758	0,031
49	0,784	0,02	0,811	0,03	0,726	0,02	0,741	0,02

**Tab. 19** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Pinus sylvestris*; Pigmentgehalt [mg/g FG] der chronischen Belastung (V2) des diesjährigen (C) und vorjährigen (C+1) Nadeljahrgangs.

	C				C+1	
	Kontrolle		Belastung		Kontrolle	Belastung
	MW	$\Delta s$	MW	$\Delta s$		
Chlorophyll a	0,526	0,012	0,410	0,009	0,304	0,270
Chlorophyll b	0,268	0,031	0,151	0,010	0,104	0,093
Xanthophylle/ Carotinoide	0,123	0,008	0,097	0,003	0,079	0,088

**Tab. 20** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Pinus sylvestris*; N-Gehalt der Gesamtstikstofffraktion der akuten Belastung (V1) des diesjährigen (C) und vorjährigen (C+1) Nadeljahrgangs.

	% der Kontrolle	$\Delta s$
C	102,4	17,04
C+1	101,3	10,02

**Tab. 21** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Pinus sylvestris*; <sup>15</sup>N-Häufigkeit [<sup>15</sup>N at.% exc.] der NPN- und Proteinfraction der akuten Belastung (V1) des diesjährigen (C) und vorjährigen (C+1) Nadeljahrgangs.

	NPN-Fraktion		Proteinfraction	
	% der Kontrolle	Δs	% der Kontrolle	Δs
C	123,6	53,67	246,2	80,72
C+1	46,2	37,17	74,7	29,32

**Tab. 22** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Pinus sylvestris*; Nitritreduktase-aktivität der chronischen Belastung (V2) des diesjährigen (C) und vorjährigen (C+1) Nadeljahrgangs.

	Kontrolle		Belastung		% der Kontrolle
	MW	Δs	MW	Δs	
C	1,83	0,56	1,38	0,44	75,3
C+1	0,43		1,14		263,5

**Tab. 23** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Pinus sylvestris*; Proteingehalt des löslichen Proteins der chronischen Belastung (V2) des diesjährigen (C) und vorjährigen (C+1) Nadeljahrgangs.

	Kontrolle		Belastung		% der Kontrolle
	MW	Δs	MW	Δs	
C	1,30	0,41	1,21	0,49	93,1
C+1	0,93		1,15		123,7

**Tab. 24** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Cirsium arvense*; effektive Quantenausbeute des PS II in verschiedenen Blattaltersgruppen (A-E) in Abhängigkeit von der genetischen Herkunft.

	P2		P3		P4		P5	
	% der Kontrolle	Δs						
A	99,08	0,62	98,26	1,05	99,21	1,29	98,13	0,01
B	100,91	0,97	99,49	1,42	101,54	0,08	99,19	1,15
C	99,76	0,18	99,69	1,70	103,30	0,77	101,12	3,34
D	100,19	0,45	101,63	4,86	101,53	1,09	100,21	1,90
E	99,31	1,33	101,83	0,81	105,39	1,55	102,34	

**Tab. 25** Ergebnisse der atmosphärischen TCA-Belastung mit *Cirsium arvense* (1. Exposition der Herkunft P1 männlich) relative <sup>15</sup>N-Inkorporation in der NPN- und Proteinfraction der Blattaltersgruppen A-C.

	NPN-Fraktion		Proteinfraction	
	% der Kontrolle	Δs	% der Kontrolle	Δs
A	80,0	49,2	92,3	27,6
B	76,5	39,7	93,8	36,4
C	88,7	32,5	119,2	60,3

**Tab. 26** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Cirsium arvense* (2.Versuch) relative <sup>15</sup>N-Inkorporation [% der Kontrolle] der genetischen Herkünfte.

	P2 (weibl.)			P3 (weibl.)			P4 (weibl.)			P5 (weibl.)		
	1. Beg	2. Beg	3. Beg	1. Beg	2. Beg	3. Beg	1. Beg	2. Beg	3. Beg	1. Beg	2. Beg	3. Beg
A	53,1	112,1		80,6	97,7		50,5	90,6		45,2	88,8	
B	42,3	121,5		70,8	105,8	70,2	77,5	108,8	116,0	34,9	61,6	89,0
C	50,9	120,7	127,9	64,7	112,0	80,0	75,1	82,8	127,6	25,2	56,8	59,6

**Tab. 27** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Cirsium arvense* (2.Versuch); relative <sup>15</sup>N-Inkorporation der genetischen Herkünfte P3, P4 und P5 im Verhältnis zu P2 in der Gesamtstickstofffraktion der Blattaltersgruppen A-C.

	P3			P4			P5		
	1. Beg	2. Beg	3. Beg	1. Beg	2. Beg	3. Beg	1. Beg	2. Beg	3. Beg
A	151,7	87,2		95,1	80,8		85,1	79,2	
B	167,4	87,1		183,2	89,6		82,4	50,7	
C	127,1	92,8	62,6	147,6	68,6	99,7	49,5	47,1	46,6

**Tab. 28** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Cirsium arvense* (2.Versuch); relative <sup>15</sup>N-Inkorporation der genetischen Herkünfte P2, P3 und P4 im Verhältnis zu P5 in der Gesamtstickstofffraktion der Blattaltersgruppen A-C.

	P2			P3			P4		
	1. Beg	2. Beg	3. Beg	1. Beg	2. Beg	3. Beg	1. Beg	2. Beg	3. Beg
A	117,5	126,2		178,2	110,0		111,7	103,0	
B	121,3	197,3		203,0	171,9	78,8	222,2	176,7	130,3
C	202,0	212,4	214,7	256,7	197,0	134,3	298,2	145,7	214,2

**Tab. 29** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Cirsium arvense* (2.Versuch); relative <sup>15</sup>N-Inkorporation der genetischen Herkünfte P2, P4 und P5 im Verhältnis zu P3 in der Gesamtstickstofffraktion der Blattaltersgruppen A-C.

	P2			P4			P5		
	1. Beg	2. Beg	3. Beg	1. Beg	2. Beg	3. Beg	1. Beg	2. Beg	3. Beg
A	65,9	114,7		62,7	92,7		56,1	90,9	
B	59,8	114,8		109,5	102,8	165,2	49,3	58,2	126,8
C	78,7	107,8	159,8	116,2	73,9	159,4	39,0	50,8	74,4

**Tab. 30** Ergebnisse der atmosphärischen TCA- Belastung mit *Cirsium arvense* (2.Versuch); relative <sup>15</sup>N-Inkorporation der genetischen Herkünfte P2, P3 und P5 im Verhältnis zu P4 in der Gesamtstickstofffraktion der Blattaltersgruppen A-C.

	P2			P3			P5		
	1. Beg	2. Beg	3. Beg	1. Beg	2. Beg	3. Beg	1. Beg	2. Beg	3. Beg
A	105,2	123,7		159,5			89,5	98,0	
B	54,6	111,6		91,3	97,3	60,5	45,0	56,6	76,8
C	67,7	145,8	100,3	86,1	135,3	62,7	33,5	68,7	46,7

**Tab. 31** Effektive Quantenausbeute des PS II der Kontrollpflanzen von *Cirsium arvense* nach dem 4-tägigen Begasungsversuch in Abhängigkeit von den Blattaltersgruppen

Blattaltersgruppe	P2	P3	P4	P5
A	0,813	0,804	0,815	0,802
B	0,806	0,794	0,811	0,804
C	0,813	0,788	0,791	0,789
D	0,795	0,773	0,785	0,780
E	0,796	0,769	0,758	0,768

**Tab. 32** Ergebnisse der TECE-Belastung unter naturnahen Bedingungen; relative  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation [ $\delta^{15}\text{N}$  ‰] in die Nadeln von *Pinus sylvestris* in Abhängigkeit vom Probenahmezeitpunkt.

Probenahme- datum	Kontrolle			Belastung			% der Kontrolle
	Pflanze 1	Pflanze 2	Mittelwert	Pflanze 1	Pflanze 2	Mittelwert	
15.08.01	-7,7 ± 0,2	-8,3 ± 0,4	-6,0 ± 1,5	-4,9 ± 0,2	-7,1 ± 0,4	-8,0 ± 0,4	74,9
22.08.01	13,1 ± 0,8	12,8 ± 2,0	12,9 ± 1,2	19,7 ± 0,8	7,1 ± 3,6	13,4 ± 7,4	103,2
11.09.01	45,3 ± 15,4	90,3 ± 37,2	75,3 ± 37,2	97,0 ± 49,0	85,9 ± 21,5	93,3 ± 40,6	123,9
23.10.01	13,4 ± 6,1	327,4 ± 63,7	170,4 ± 176,6	194,0 ± 37,7	268,0 ± 57,4	222,5 ± 49,8	130,6
03.12.01	38,9 ± 15,6	220,7 ± 20,0	129,8 ± 100,8	220,1 ± 6,2	386,6 ± 21,9	303,4 ± 92,3	233,7

**Tab. 33** Ergebnisse der TECE-Belastung unter naturnahen Bedingungen; Gesamtstickstoffgehalt in den Nadeln von *Pinus sylvestris* in Abhängigkeit vom Probenahmezeitpunkt.

Probenahme- datum	Kontrolle			Belastung			% der Kontrolle
	Pflanze 1	Pflanze 2	Mittelwert	Pflanze 1	Pflanze 2	Mittelwert	
15.08.01	1,20 ± 0,01	1,05 ± 0,07	1,13 ± 0,1	1,00 ± 0,01	1,05 ± 0,7	1,03 ± 0,05	91,1
22.08.01	1,29 ± 0,02	1,49 ± 0,03	1,37 ± 0,11	1,12 ± 0,03	1,26 ± 0,01	1,19 ± 0,08	86,9
11.09.01	1,36 ± 0,03	1,30 ± 0,03	1,33 ± 0,04	1,08 ± 0,1	1,28 ± 0,02	1,14 ± 0,13	86,4
23.10.01	1,73 ± 0,01	1,70 ± 0,06	1,72 ± 0,04	1,47 ± 0,01	1,47 ± 0,05	1,47 ± 0,04	85,5
03.12.01	1,83 ± 0,08	1,64 ± 0,04	1,74 ± 0,12	1,52 ± 0,05	1,49 ± 0,05	1,50 ± 0,04	86,2

**Tab. 34** Ergebnisse der TECE-Belastung unter naturnahen Bedingungen; Wassergehalt der Nadeln von *Pinus sylvestris* in Abhängigkeit vom Probenahmezeitpunkt.

Probenahme- datum	Kontrolle			Belastung			% der Kontrolle
	Pflanze 1	Pflanze 2	Mittelwert	Pflanze 1	Pflanze 2	Mittelwert	
15.08.01	53,3 ± 1,7	50,5 ± 0,8	51,9 ± 1,7	51,45 ± 1,5	52,2 ± 0,4	51,8 ± 1,0	99,8
22.08.01	61,9 ± 0,2	63,7 ± 0,1	62,6 ± 1,0	63,4 ± 0,2	61,9 ± 0,3	62,7 ± 0,9	100
11.09.01	56,4 ± 4,8	61,0 ± 0,3	57,9 ± 4,4	57,6 ± 3,5	59,8 ± 0,2	58,3 ± 3,0	100,7
23.10.01	58,6 ± 0,6	62,3 ± 0,8	60,4 ± 2,1	64,8 ± 2,0	59,6 ± 3,0	61,3 ± 3,6	1001,5
03.12.01	58,4 ± 0,2	57,7 ± 0,2	58,3 ± 0,5	57,9 ± 0,1	56,7 ± 0,4	57,3 ± 0,7	98,7

**Tab. 35** Ergebnisse der TECE-Belastung unter naturnahen Bedingungen; <sup>15</sup>N-Inkorporation [<sup>15</sup>N at.-% exc] der Blätter von *Betula pendula* in Abhängigkeit vom Probenahmezeitpunkt.

Probe- nahme- zeitpunkt	Kontrolle				Belastung				% der Kontrolle
	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Mittel- wert	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Mittel- wert	
15.08.01	3,6 10 <sup>-4</sup> ± 5,9 10 <sup>-5</sup>	5,9 10 <sup>-4</sup> ± 2,1 10 <sup>-5</sup>	8,4 10 <sup>-4</sup> ± 4,2 10 <sup>-5</sup>	5,9 10 <sup>-4</sup> ± 2,4 10 <sup>-4</sup>	6,3 10 <sup>-4</sup> ± 3,8 10 <sup>-5</sup>	9,2 10 <sup>-4</sup> ± 2,1 10 <sup>-5</sup>	3,8 10 <sup>-4</sup> ± 2,8 10 <sup>-5</sup>	6,4 10 <sup>-4</sup> ± 2,6 10 <sup>-4</sup>	108,5
22.08.01	1,7 ± 0,7	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,2	1,9 ± 0,3	3,6 ± 0,5	2,3 ± 1,1	154,0
11.09.01	1,5 ± 0,3	2,4 ± 0,6	2,2 ± 0,3	2,0 ± 0,5	3,2 ± 0,4	2,5 ± 0,3	4,7 ± 1,0	3,5 ± 1,1	170,6
23.10.01	2,6 ± 0,7	2,8 ± 0,2	3,1 ± 0,5	2,9 ± 0,3	6,5 ± 1,4	4,6 ± 0,3	5,2 ± 1,1	5,4 ± 1,0	189,9

**Tab. 36** Ergebnisse der TECE-Belastung unter naturnahen Bedingungen; Gesamtstickstoffgehalt der Blätter von *Betula pendula* in Abhängigkeit vom Probenahmezeitpunkt.

Probenahmezeitpunkt	Kontrolle				Belastung				% der Kontrolle
	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Mittelwert	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Mittelwert	
15.08.01	2,2 ± 0,01	2,5 ± 0,02	2,0 ± 0,1	2,2 ± 0,3	1,9 ± 0,01	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,01	1,9 ± 0,03	86,5
22.08.01	2,5 ± 0,3	2,7 ± 0,3	2,2 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,1 ± 0,01	2,0 ± 0,2	2,4 ± 0,4	2,2 ± 0,1	89,4
11.09.01	2,3 ± 0,2	2,8 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,2 ± 0,1	2,5 ± 0,03	2,4 ± 0,1	93,1
23.10.01	2,0 ± 0,1	2,3 ± 0,1	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,01	1,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1	96,6

**Tab. 37** Ergebnisse der TECE-Belastung unter naturnahen Bedingungen; Wassergehalt der Blätter von *Betula pendula* in Abhängigkeit vom Probenahmezeitpunkt.

Probenahmezeitpunkt	Kontrolle				Belastung				% der Kontrolle
	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Mittelwert	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Mittelwert	
15.08.01	53,7 ± 4,3	45,3 ± 0,2	43,9 ± 0,4	45,5 ± 4,9	40,9 ± 0,3	43,5 ± 0,1	43,0 ± 0,5	42,7 ± 1,6	94,0
22.08.01	39,0 ± 2,6	45,8 ± 2,6	41,64 ± 0,7	42,2 ± 1,7	42,50 ± 0,4	40,1 ± 2,6	40,2 ± 2,7	40,9 ± 0,7	97,1
11.09.01	41,9 ± 1,6	41,4 ± 0,8	41,3 ± 1,8	41,5 ± 0,2	37,4 ± 2,1	42,1 ± 0,2	42,2 ± 1,7	40,6 ± 1,4	97,7
23.10.01	35,6 ± 1,2	34,96 ± 0,9	34,9 ± 0,1	35,1 ± 0,2	29,6 ± 0,5	29,3 ± 0,6	31,8 ± 2,0	30,2 ± 0,7	86,0

**Tab. 38** Ergebnisse der TCA-Belastung im Wurzelraum von *Pinus sylvestris* im Ökosystem;  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation [ $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ ] in die Nadeln einzelner Pflanzen.

TCA-Konzentration [mg/Pflanze]	02.05.2001		22.05.2001		16.06.2001	
	MW	$\Delta\text{s}$	MW	$\Delta\text{s}$	MW	$\Delta\text{s}$
0	-8,08	0,13	152,28	1,35	304,68	
0	-9,27	0,28	64,37	4,38	113,33	17,68
0,1	-7,55	0,37	179,10	1,61	559,26	13,86
0,1	-9,27	0,18	145,82	119,66	60,39	
0,2	-7,64	0,52	131,85	13,54	236,61	7,19
0,2	-8,65	0,03	30,47	0,37	40,01	
0,4	-8,40	0,11	143,78	0,59	367,62	60,34
0,4	-7,73	0,16	150,89	122,20	214,30	
0,8	-7,97	0,17	428,80	29,92	210,94	
0,8	-7,78	0,09	61,57	6,70	80,83	0,92

**Tab. 39** Ergebnisse der TCA-Belastung im Wurzelraum von *Pinus sylvestris* im Ökosystem; Mittelwerte der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation [ $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ ] in den Nadeln.

TCA-Konzentration [mg/Pflanze]	02.05.2001		22.05.2001		16.06.2001	
	MW	$\Delta\text{s}$	MW	$\Delta\text{s}$	MW	$\Delta\text{s}$
0	-8,68	0,84	108,32	62,16	209,01	135,30
0,1	-8,41	1,22	162,46	23,53	14,48	309,83
0,2	-8,15	0,71	81,16	71,69	138,31	139,02
0,4	-8,07	0,47	147,34	5,03	290,96	108,41
0,8	-7,88	0,13	245,18	259,67	145,89	92,00

**Tab. 40** Ergebnisse der TCA-Belastung im Wurzelraum von *Pinus sylvestris* im Ökosystem; Gesamtstickstoffgehalt der Nadeln einzelner Pflanzen

TCA-Konzentration [mg/Pflanze]	02.05.2001		22.05.2001		16.06.2001	
	MW	$\Delta s$	MW	$\Delta s$	MW	$\Delta s$
0	1,3	0,07	1,3	0,00	1,2	
0	1,4	0,07	1,25	0,07	1,3	
0,1	1,43	0,25	1,4	0,00	1,3	0,0
0,1	1,23	0,04	1,2	0,00	1,2	
0,2	1,48	0,18	1,6	0,00	1,65	0,07
0,2	1,23	0,04	1,35	0,07	1,35	0,07
0,4	1,25	0,00	1,25	0,07	1,35	0,07
0,4	1,15	0,07	1,4	0,00	1,35	0,07
0,8	1,28	0,04	1,2	0,14	1,4	
0,8	1,38	0,04	1,3	0,14	1,35	0,07

**Tab. 41** Ergebnisse der TCA-Belastung im Wurzelraum von *Pinus sylvestris* im Ökosystem; Gesamtstickstoffgehalt der Nadeln.

TCA-Konzentration [mg/Pflanze]	02.05.2001		22.05.2001		16.06.2001	
	MW	$\Delta s$	MW	$\Delta s$	MW	$\Delta s$
0	1,35	0,07	1,3	0,0	1,3	0,11
0,1	1,33	0,14	1,3	0,1	1,3	0,0
0,2	1,35	0,18	1,4	0,28	1,4	0,32
0,4	1,2	0,07	1,3	0,07	1,3	0,11
0,8	1,33	0,07	1,3	0,14	1,4	0,04

**Tab. 42** Ergebnisse der TCA-Belastung im Wurzelraum von *Pinus sylvestris* im Ökosystem; Wassergehalt der Nadeln einzelner Pflanzen.

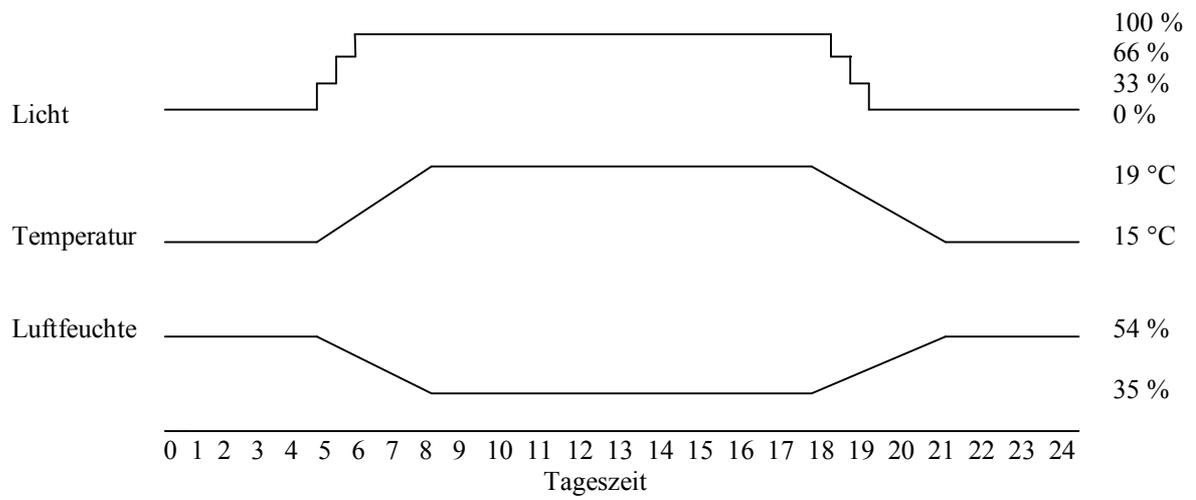
TCA-Konzentration [mg/Pflanze]	02.05.2001		22.05.2001		16.06.2001	
	MW	$\Delta s$	MW	$\Delta s$	MW	$\Delta s$
0	44,48	0,19	45,69	0,37	48,60	
0	44,71	0,18	48,99	3,93	47,43	0,52
0,1	48,07	3,92	46,22	0,17	49,27	0,26
0,1	45,9	0,55	45,16	3,28		
0,2	45,13	12,53	50,44	0,21	49,56	0,30
0,2	44,78	1,10	45,84	0,10	47,7	
0,4	44,29	0,29	47,95	0,07	48,91	0,88
0,4	45,9	0,86	46,27	0,88	49,7	
0,8	45,29	3,61	46,65	0,36	50,3	
0,8	44,67	2,14	43,81	0,19	47,22	0,32

**Tab. 43** Ergebnisse der TCA-Belastung im Wurzelraum von *Pinus sylvestris* im Ökosystem; Mittelwerte des Wassergehaltes in den Nadeln

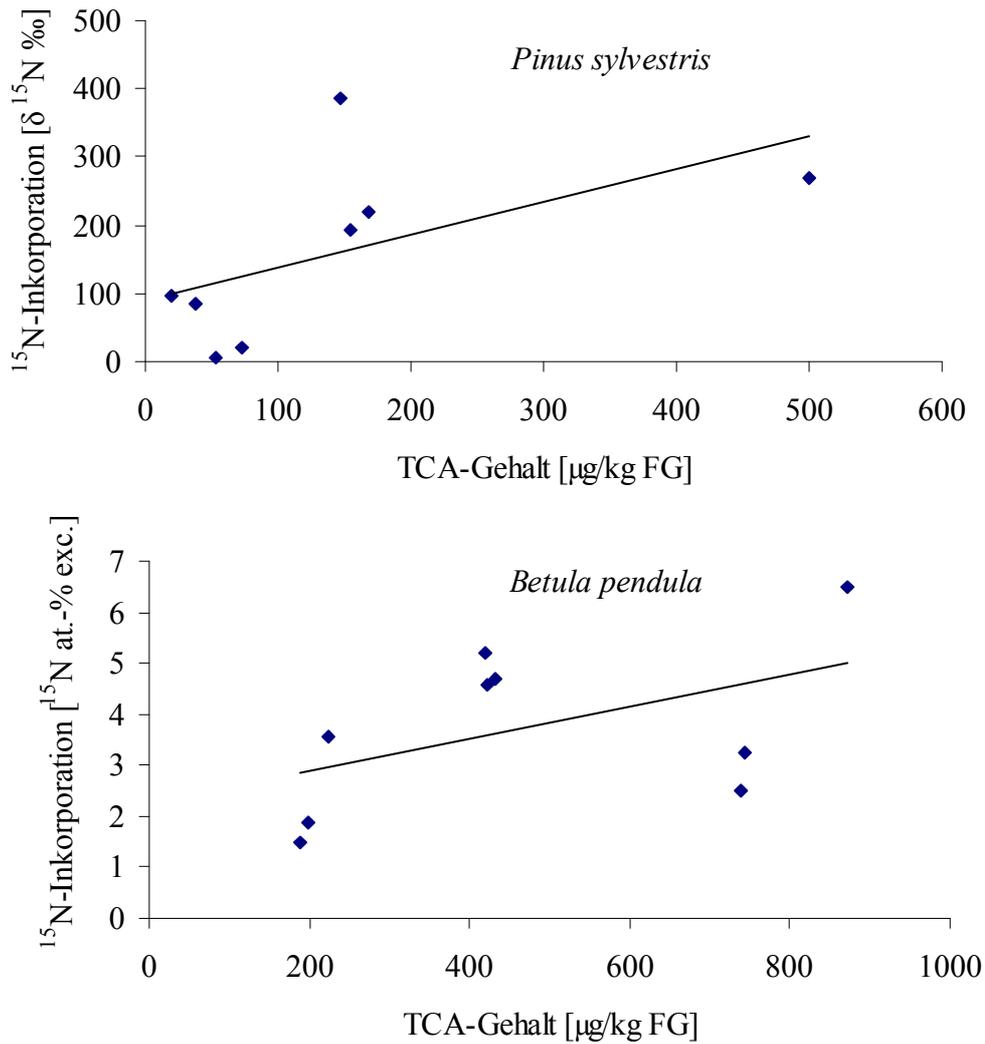
TCA-Konzentration [mg/Pflanze]	02.05.2001		22.05.2001		16.06.2001	
	MW	$\Delta s$	MW	$\Delta s$	MW	$\Delta s$
0	44,60	0,16	47,34	2,33	48,02	0,83
0,1	46,99	1,53	45,69	0,75	49,27	
0,2	44,96	0,25	48,14	3,25	48,63	1,32
0,4	45,10	1,14	47,11	1,19	49,31	0,56
0,8	44,98	0,44	45,23	2,01	48,76	2,18

**Tab. 44** Ergebnisse der TCA-Belastung im Wurzelraum von *Pinus sylvestris* im Ökosystem;  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation [ $\delta^{15}\text{N}\%$ ] in die Nadeln in Abhängigkeit vom Wirtel

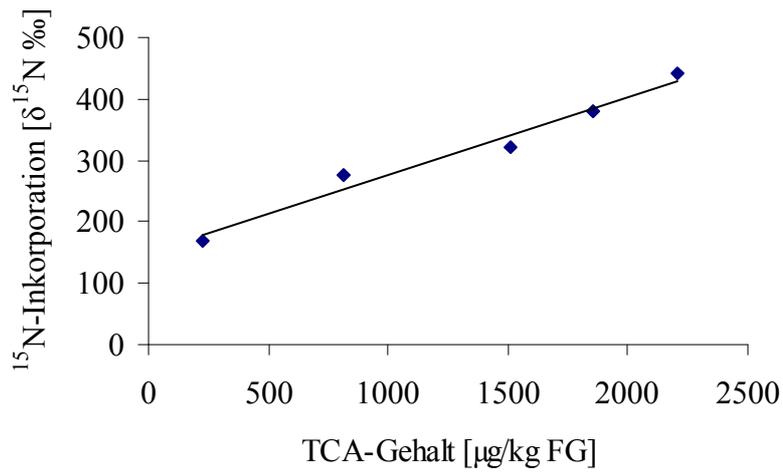
	Wirtel 1	Wirtel 2	Wirtel 3	Wirtel 4	Wirtel 5
Mittelwert	321,0	380,4	440,8	275,2	169,7
$\Delta s$	17,4	16,8	25,3	1,8	10,6



**Abb. 1** Schematische Darstellung der Einstellungsparameter des Pflanzenwuchsschrankes für den ESIMA-Test mit *Lepidium sativum*



**Abb. 2** Korrelation zwischen TCA-Gehalte und der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation der Nadeln von *Pinus sylvestris* und der Blätter von *Betula pendula* bei einer atmosphärischen TECE-Belastung (20 ml/Woche; 28 Wochen).



**Abb. 3** Korrelation zwischen TCA-Gehalte und <sup>15</sup>N-Inkorporation der Nadeln verschiedener Wirtel eines Baumen von *Pinus sylvestris* am 16.08.2001 nach einer einmaligen Belastung von 0,4 mg TCA am 11.04.2001 und einmaligen Tracerapplikation am 02.05.2001.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Klaus Jung für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung, die allzeitige Diskussionsbereitschaft und die Begutachtung der Arbeit.

Herrn Dr. Christoph Hafner für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente, seinen fachlichen Rat, die anregenden Diskussionen und für die Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn Dr. Herbert Tintemann und Frau Bianca Braha für die fachlichen Ratschläge bei den Enzymaktivitätsstudien, sowie der SDS-PAGE.

Herrn Dr. Harald Auge für die Diskussionsbereitschaft, die Bereitstellung des Pflanzenmaterials und die freundliche Hilfe bei den Biodiversitätsstudien mit *Cirsium arvense*.

Frau Helga Schröter und Frau Elke Kirschner für die sehr freundliche Aufnahme im Labor und ihre stetige Hilfsbereitschaft bei den Laborversuchen.

Herrn Matthias Gehre, Frau Ursula Günther und Frau Ingrid Flügel für die massenspektrometrische Analytik.

Herren Karsten Kotte und Christian Lange für die freundliche Kooperation bei den Freilandversuchen, der TCA-Analytik und den vielen hilfreichen Diskussionen.

Herrn Prof. Heltai, Frau Dr. Balint und Herrn Gabor Halasz für die freundliche Unterstützung während meines Aufenthaltes an der Universität in Gödöllő.

Frau Katrin Kurz, Herren André Reißaus, Uwe Langner und Charles Junghans für die kleinen und großen Hilfen im Labor.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Sektion Chemische Ökotoxikologie, die mir mit fachlichen Ratschlägen und vielen hilfreichen Diskussionen zur Seite standen.

Meinem lieben Mann, sowie meiner Familie und meinen Freunden für ihre stetige Aufmunterung und allzeitige Unterstützung.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Arbeit an keiner weiteren Universität eingereicht habe.

Leipzig, den 8.9.2003

Evelyn Schmidt