



# UFZ-Bericht

UFZ-UMWELTFORSCHUNGSZENTRUM LEIPZIG-HALLE GMBH

Nr. 35/2000

---

## **Moose als Indikatoren ökosystemarer Schadstoffbelastungen**

---

I. Bruns<sup>1</sup>, K. Sutter<sup>1</sup>, K. Friese<sup>2</sup>, G.-J. Krauß<sup>1</sup>,  
H. Schumann<sup>3</sup> und K. Jung<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Martin-Luther-Universität, FB Biochemie/Biotechnologie

<sup>2</sup>UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH,  
Sektion Gewässerforschung

<sup>3</sup>Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt,  
Abteilung Umweltplanung/Umweltanalytik

<sup>4</sup>UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH,  
Sektion Chemische Ökotoxikologie

# Moose als Indikatoren ökosystemarer Schadstoffbelastungen<sup>a</sup>

I. Bruns<sup>1</sup>, K. Sutter<sup>1</sup>, K. Friese<sup>2</sup>, G.-J. Krauß<sup>1</sup>, H. Schumann<sup>3</sup>, K. Jung<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Martin-Luther-Universität  
FB Biochemie/Biotechnologie  
Institut für Biochemie  
K.-Mothes-Str. 3, 06120 Halle

<sup>2</sup> UFZ-Umweltforschungszentrum  
Leipzig-Halle  
Sektion Gewässerforschung  
Brückstr. 3 a, 39114 Magdeburg

<sup>3</sup> Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt  
Abt. Umweltplanung/Umweltanalytik  
Domplatz 7, 06108 Halle

<sup>4</sup> UFZ-Umweltforschungszentrum  
Leipzig-Halle  
Sektion Chemische Ökotoxikologie  
Permoserstr. 15, 04318 Leipzig

*Archiv*

---

<sup>a</sup> Teilgefördert durch das Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Raumordnung des Landes Sachsen-Anhalt

<b>1. EINFÜHRUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. ÜBERSICHT DER FORSCHUNGSSCHWERPUNKTE</b>	<b>3</b>
2.1. Einfluß der Probenahme und Oberflächendeposition von Schadstoffen auf die Ergebnisse der Schwermetall- und Schadstoffuntersuchungen	3
2.2. Bewertung des Akkumulationsvermögens ausgewählter terrestrischer Moose für Schwermetalle und organische Verbindungen an natürlichen Standorten in Sachsen-Anhalt	3
2.3. Laboruntersuchungen zur Akkumulation von Schwermetallen und ausgewählten organischen Verbindungen	4
2.4. Erarbeitung hoch sensibler Methoden zum Nachweis thiolhaltiger Verbindungen aus Moosproben	4
2.5. Laboruntersuchungen zum Einfluß von Cd auf den S- und N-Stoffwechsel	5
2.6. Freilanduntersuchungen zur Induktion thiolhaltiger Verbindungen	5
2.7. Korrelation von Schwermetallgehalten als Summenparameter und physiologische Reaktion ('Thiolantwort')	5
2.8. Interspezifische Vergleiche der Effektivität von Toleranzmechanismen	5
2.9. Untersuchungen zur Nutzung der spezifischen biochemischen Reaktionen als Indikator für Belastung und ökotoxikologisches Gefährdungspotential auf Grundlage von Monitoringstudien	5
2.10. Studien zur saisonalen Varianz der Schwermetall- und PAK-Akkumulation und physiologischen Reaktion	5
2.11. Ergänzende Untersuchungen	6
2.12. Einfluß kurzfristiger Wetterereignisse auf den Thiolpeptidgehalt der Freilandpflanzen	6
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>7</b>
3.1. Standorte der Freilanduntersuchungen	7
3.1.1. Hohenthurm	7
3.1.2. Petersberg	8
3.1.3. Salzmünde	8
3.2. Pflanzenmaterial für die Laborversuche	9
3.3. Aufbewahrung der Proben	9
3.4. Vorbereitung der Pflanzen für Laborversuche	9
3.5. Bestimmung des intra- und extrazellulär gebundenen Cadmiums in <i>F. antipyretica</i>	9
3.6. Vorbereitung des Pflanzenmaterials für die Schwermetallanalytik	10
3.7. Analytik der Schwermetallgehalte	10
3.8. Bestimmung des Trockengewichtes	10
3.9. Induktion thiolhaltiger Verbindungen im Laborversuch	11
3.10. Extraktion thiolhaltiger Peptide	11
3.11. Analytik von Phytochelatinen	12
3.12. Trennung von $\gamma$ -EC, Cys und GSH durch HPLC und Nachsäulenderivatisierung mit DTNB	13
3.13. Bestimmung von GSH- Cys und $\gamma$ -EC durch Derivatisierung mit Monobrombiman	14
3.14. Bestimmung des Gesamtthiolgehaltes	15

<b>3.15. Analytik organischer Verbindungen</b>	<b>15</b>
<b>3.16. Bestimmung der natürlichen <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N-Isotopenverhältnisse und <sup>15</sup>N-Aufnahme unter Cd-Belastung</b>	<b>16</b>
<b>3.17. Untersuchungen zum Einfluß von Umweltparametern auf die Thiolpeptidsynthese in <i>Fontinalis antipyretica</i></b>	<b>16</b>
3.17.1.    Einfluß der Schwefelernährung	16
3.17.2.    Einfluß der Schwefelernährung nach S-Mangelbedingungen	16
3.17.3.    Bestimmung von Sulfat	17
<b>3.18. Identifikation unbekannter Verbindungen aus Polytrichales</b>	<b>17</b>
3.18.1.    Massenspektrometrie	17
3.18.2.    NMR	17
<b>4.    ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>18</b>
<b>4.1. Biologische Variabilität der Schwermetallgehalte am natürlichen Standort</b>	<b>18</b>
<b>4.2. Biosorption und intrazelluläre Aufnahme von Cd (Laborversuche)</b>	<b>19</b>
<b>4.3. Schwermetallgehalte der Freilandproben</b>	<b>22</b>
<b>4.4. Organische Verbindungen in Freilandmoosen</b>	<b>30</b>
<b>4.5. Erarbeitung hoch sensitiver Methoden zum Nachweis thiolhaltiger Verbindungen in Moosproben</b>	<b>31</b>
4.5.1.    Derivatisierung mit Monobrombiman	31
4.5.2.    Enzymatische Bestimmung des GSH-Gehaltes	31
4.5.3.    Bestimmung thiolhaltiger Verbindungen durch Kapillarelektrophorese	32
<b>4.6. Problematik der Analyse von Phytochelatinen durch Nachsäulenderivatisierung mit DTNB</b>	<b>33</b>
<b>4.7. Laboruntersuchungen zur Induktion thiolhaltiger Verbindungen</b>	<b>35</b>
4.7.1.    Glutathion	35
4.7.2.    Gesamthiol-Gehalt (GSTH)	37
4.7.3.    Cystein und $\gamma$ -EC	38
<b>4.8. Einfluß von Cd auf den Stickstoffmetabolismus von <i>F. antipyretica</i></b>	<b>39</b>
<b>4.9. Natürliche Variationen der stabilen Stickstoffisotope in terrestrischen Freilandmoosen</b>	<b>41</b>
<b>4.10. Einfluß von Umweltfaktoren (Schwefelernährung) auf die Synthese thiolhaltiger Verbindungen</b>	<b>42</b>
<b>4.11. Thiolgehalte in Freilandmoosen</b>	<b>48</b>
4.11.1.    GSH-Gehalt	48
4.11.2. $\gamma$ -EC-Gehalt	50
4.11.3.    Cystein-Gehalt	52
<b>4.12. Interspezifische Vergleiche der biochemischen Reaktion auf Cd</b>	<b>54</b>
<b>4.13. Korrelation von Schwermetallgehalten als Summenparameter und physiologische Reaktion ('Thiolantwort')</b>	<b>55</b>
<b>4.14. Auswirkungen von Cd-Belastungen auf unterschiedliche Moospezies</b>	<b>55</b>
<b>4.15. Nutzen der spezifischen biochemischen Reaktionen als Indikator für Belastung und ökotoxikologisches Gefährdungspotential</b>	<b>56</b>

<b>4.16. Saisonale Varianz der Schwermetall-Akkumulation</b>	<b>57</b>
<b>4.17. Einfluß kurzfristiger Wetterereignisse auf den Thiolpeptidgehalt der Freilandpflanzen</b>	<b>57</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>58</b>
<b>6. LITERATUR</b>	<b>61</b>
<b>7. ANHANG</b>	

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
BSO	Buthioninsulfoximin
CHES	2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure
Cys	Cystein
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	1,4-Dithiothreit
FG	Frischgewicht
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
GSH-Äqui.	Glutathionäquivalente
GSTH	Gesamtthiol-Gehalt
$\gamma$ -EC	$\gamma$ -Glutamyl-Cystein
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladung
NADPH+H <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduziert
NEM	N-Ethylmaleinimid
n.g.	nicht gemessen
PAH	polyaromatische Kohlenwasserstoffe
PC/PCs	Phytochelatin/Phytochelatine
PVP	Polyvinylpyrrolidon
SD	Standardabweichung
SSA	5'-Sulfosalicylsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Trockengewicht
TNB	5-Thio-2-nitrobenzoesäure
U/min	Umdrehungen pro Minute

## 1. Einführung

Schwermetalle spielen eine zunehmende Rolle bei der Gefährdung von Lebensräumen in der Natur. Verursacher dieser Belastungen sind neben natürlichen geogenen Quellen anthropogene Einflüsse aus Industrie, Kohlenfeuerung und Kfz-Verkehr (BLIEFERT, 1997). Die Immission dieser Metalle kann zu Anreicherungen in der Nahrungskette führen, wodurch es zu Schädigungen einzelner Individuen bis hin zur Beeinflussung gesamter Ökosysteme kommen kann. Die toxischen Wirkungen von Schwermetallen äußern sich u.a. in der Schädigung von Enzymen, Veränderungen der Membranpermeabilität von Zellen sowie Austauschprozesse gegen essentielle Elemente wie Calcium. Der Stoffwechsel kann erheblich beeinflusst werden. Mögliche Folgen für Mensch und Tier sind hierbei Knochen-, Nerven-, und Organschädigungen. In Pflanzen kann es u.a. zu oxidativen Schädigungen der Zellen sowie zur Zerstörung des Photosyntheseapparates und Wachstumsstörungen kommen (PRASAD u. HAGEMeyer, 1999).

Trotz immer empfindlicher werdender Nachweismethoden können Belastungen in den verschiedenen Matrices oft nicht exakt bestimmt werden. Dieses gilt insbesondere für Luft- und Gewässerbelastungen aufgrund der geringen Konzentration und der hohen Transportraten.

Bioindikation und Biomonitoring ermöglichen über die Akkumulation von Schadstoffen in Organismen eine Abschätzung der Belastungssituation (MARKERT, 1993; HERPIN et al., 1994; HERPIN et al., 1996; GUNKEL, 1994; CHOVANEC et al., 1994; PAULUS et al., 1994). Hierdurch können auch Belastungen erfaßt werden, die in Luft und Wasser aufgrund der starken Verdünnung nicht nachweisbar sind.

Besonders bewährt hat sich der Einsatz von Moosen zum Biomonitoring von Schwermetallbelastungen und wird daher seit den 60er Jahren erfolgreich eingesetzt (RÜHLING und TYLER, 1968, 1973; STEINNES 1984; CHOVANEC und VOGEL, 1992; MARKERT und WECKERT 1993; HERPIN et al., 1994; SIEVERS und HERPIN, 1998; SIEBERT et al., 1996; BRUNS et al., 1995, 1997, 1999; BRUNS und KRAUSS, 1999; BRUNS et al., 2000a). Diese Pflanzen sind aufgrund morphologischer und physiologischer Eigenschaften besonders geeignet, Schwermetalle anzureichern. Das Fehlen einer vollentwickelten Cuticula, eine einschichtige Zellstruktur der Blätter sowie ein gering entwickeltes Leitsystem sind hierbei von Vorteil. Die weite Verbreitung und das ganzjährige Vorkommen ermöglichen großräumige und langfristige Untersuchungen (FROST, 1990; MOUVET 1985; BRÜNING und KREEB, 1993).

Erstmals wurden von HERPIN et al. (1994) Moosarten zum Monitoring der Schwermetallbelastung in einem bundesweiten Projekt eingesetzt. In einem Raster von 25 km<sup>2</sup> wurden Proben entnommen und aus den Schwermetallanalysen Belastungskarten der Bundesrepublik Deutschland erstellt. Derartige Untersuchungen beziehen sich jedoch im wesentlichen auf die Schadstoffbelastung als Summenparameter. Es muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei einem Großteil der gemessenen Schadstoffmengen aus Moosproben um Oberflächendepositionen handelt.

Diese Untersuchungen erlauben jedoch keine Aussagen über die physiologisch/biochemische Reaktion in der Pflanze. Pflanzen sind in der Lage, Schadstoffe und Schwermetalle in gewissem Umfang innerhalb der Zelle zu entgiften (PRASAD und HAGEMEYER, 1999; RAUSER, 1999, 2000; ERNST et al., 1992). Dies geschieht bei höheren Pflanzen unter anderem durch sogenannte Phytochelatine (PCs). Hierbei handelt es sich um cysteinreiche Peptide, die über die SH-Gruppen des Cys Schwermetalle, insbesondere Cd, komplexieren und somit dem Stoffwechsel entziehen. Die Synthese dieser Peptide erfolgt in der Mehrzahl der Pflanzen vom Glutathion ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) ausgehend durch das schwermetallinduzierbare Enzym PC-Synthase (RAUSER, 1999, 2000; ZENK, 1996).

GSH ist neben der Bereitstellung als Substrat für die PC-Synthese auch für die Entgiftung toxischer Verbindungen sowie die Abwehr von abiotischem und biotischem Stress in der pflanzlichen Zelle von großer Bedeutung (LAMMOUREUX UND RUSNESS, 1993; NOCTOR and FOYER, 1998; NOCTOR et al. 1998; FOYER und RENNENBERG, 2000).

Aus eigenen Untersuchungen mit dem Wassermoos *F. antipyretica* ist bekannt, daß sich der GSH-Pool erhöht, wenn die Pflanze Schwermetallstress ausgesetzt wird (BRUNS et al., 1997).

Eine Bewertung und Nutzung physiologischer Daten für Schadstoffbelastungen von Moosen in Kombination mit der Erfassung der Xenobiotika als Summenparameter ist bisher nicht verwirklicht. Ebenso liegen keine vergleichenden Untersuchungen unterschiedlicher Spezies gleicher Standorte vor. Mit dem Projekt sollten Untersuchungen durchgeführt werden, deren Problematik international im Ansatz diskutiert wird (ERNST UND PETERSON, 1994), deren geforderte Umsetzung bisher jedoch nicht erfolgte.

Gegenstand der vorliegenden Studie war es, in terrestrischen Moosarten die Syntheseleistung zu Thiolpeptiden unter Freiland- und Laborbedingungen hinsichtlich Rückschlüssen auf die Schwermetallbelastung im Sinne eines Biomonitoring zu untersuchen

Darüber hinaus sollten durch Einsatz der  $^{15}\text{N}$ -Tracertechnik Aussagen zur Beeinflussung des Stickstoffmetabolismus der Moose durch Schwermetalle gewonnen werden.

Es handelt sich hierbei um grundlegende Untersuchungen, die zunächst Aufschluß über die Wirkung von Schwermetallen auf terrestrische Moose geben sollten. Es konnte aufgrund des geringen Probenmaterials an den Freilandstandorten nicht für alle Versuche die gleiche Spezies eingesetzt werden. Für die Laborversuche wurde vorwiegend das aquatische Moos *Fontinalis antipyretica* als Modellpflanze verwendet. Für Freilanduntersuchungen wurde das terrestrische Moos *Scleropodium purum* gesammelt.

## **2. Übersicht der Forschungsschwerpunkte**

Die im Projektantrag dargestellten Ziele konnten weitgehend erfüllt werden. In einigen Fällen war es jedoch notwendig, von den geplanten Untersuchungen abzuweichen. Die Laboruntersuchungen wurden am aquatischen Moos *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. durchgeführt. Diese Art ist aufgrund ihrer Anpassung an eine aquatische Umgebung besser für Laborversuche in wässrigen Medien, wie hier verwendet, geeignet. Grundlegende Unterschiede in der Reaktion von terrestrischen und aquatischen Moosen auf Schadstoffbelastungen konnten nicht beobachtet werden, so daß die Verwendung von *F. antipyretica* als Modellpflanze im Labor vertretbar war.

Bei den terrestrischen Moosen im Freiland kam es bedingt durch Witterungseinflüsse, wie starke Trockenheit in den Sommermonaten oder Schneebedeckung im Winter, teilweise zu Problemen bei der Probenahme.

Im Folgenden wird eine Kurzdarstellung zu den unter den einzelnen Schwerpunkten durchgeführten Studien gegeben. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4 übersichtlich dargestellt. Die jeweiligen Rohdaten können dem Anhang zu entnommen werden.

### **2.1. Einfluß der Probenahme und Oberflächendeposition von Schadstoffen auf die Ergebnisse der Schwermetall- und Schadstoffuntersuchungen**

Zur Bestimmung der biologischen Varianz der Schwermetallakkumulation am natürlichen Standort erfolgte am Standort Hohenthurm eine regelmäßige Probennahme von 3 Moosproben innerhalb eines Gebietes von 50 x 200 m. Zusätzlich wurde am 28.2.99 eine Dreifachbeprobung des Standortes Hohenthurm 3 auf einer Fläche von ca. 5 x 5 m durchgeführt (Kap. 4.1.).

Für die Untersuchungen zum Einfluß der Probenahme und Oberflächendeposition von Schadstoffen erfolgte zunächst die Bestimmung der Oberflächenadsorption von Schwermetallen an Moosen im Laborversuch. Hierzu wurde insbesondere die Art *F. antipyretica* (aquatisches Moos) eingesetzt.

Die Bestimmung der intra- und extrazellulären Verteilung der Schwermetalle in terrestrischen Moosen im Freiland erfolgte nicht, da die Gesamtschwermetallgehalte bereits im unteren Nachweisbereich lagen.

### **2.2. Bewertung des Akkumulationsvermögens ausgewählter terrestrischer Moose für Schwermetalle und organische Verbindungen an natürlichen Standorten in Sachsen-Anhalt**

Im Zeitraum Januar 1998 bis Juli 1999 wurden drei Standorte im Gebiet um Halle regelmäßig beprobt und die Schwermetallgehalte der Moosproben bestimmt (Kap. 4.3.). Zusätzlich wurden erste Untersuchungen zum Gehalt an organischen Verbindungen in Freilandmoosen durchgeführt (Kap. 4.4.)

### **2.3. Laboruntersuchungen zur Akkumulation von Schwermetallen und ausgewählten organischen Verbindungen**

Laboruntersuchungen zur Reaktion auf Schwermetallakkumulation wurden an unterschiedlichen terrestrischen und aquatischen Moosen vorgenommen. Es ergab sich hierbei im Vergleich zu höheren Pflanzen eine Besonderheit in der Stressantwort durch Thiolpeptide (Kap. 4.7.).

Organische Verbindungen wurden nur aus einigen Freilandproben bestimmt. Die Ergebnisse sind in Kap. 4.4. dargestellt.

### **2.4. Erarbeitung hoch sensitiver Methoden zum Nachweis thiolhaltiger Verbindungen aus Moosproben**

Methoden, die im Rahmen des Projektes neu erarbeitet bzw. optimiert wurden, werden im Ergebnisteil (Kap. 4) dargestellt. Alle anderen Methoden werden unter Material und Methoden (Kap. 3) beschrieben.

Für Untersuchungen zum Vorkommen von PCs in unterschiedlichen Moospezies wurde die Methode nach GRILL et al. (1991) mittels HPLC und online Nachsäulenderivatisierung mit DTNB eingesetzt. Diese erlaubt jedoch eine Trennung der PC-Vorstufen GSH und  $\gamma$ -EC nur mit einer extrem sauren mobilen Phase (pH 1,5). Da es unter diesen Bedingungen bei größerem Probenumfang zur Schädigung des HPLC-Säulenmaterials kommt, wurde diese Methode nur für die ersten Versuche eingesetzt (Kap. 3.12. und 4.7.3).

Der PC-Nachweis durch Nachsäulenderivatisierung mit DTNB erwies sich in Untersuchungen an *Polytrichum formosum* als nicht spezifisch für Thiolpeptide (Kap. 4.6.) Es wurden umfangreiche Versuche mit diesem Moos sowie mit *Atrichum undulatum* mittels MS und NMR durchgeführt. Wir konnten erstmalig zeigen, daß Coumarinderivate ebenfalls unter diesen Derivatisierungsbedingungen im HPLC-Chromatogramm nachweisbar sind.

Es wurden weitere Methoden erarbeitet, die es erlauben, thiolhaltige Verbindungen aus Moosen auch in geringsten Mengen nachzuweisen. Mittels Extraktion durch HCl und anschließender Derivatisierung der Proben mit Monobrombiman können durch HPLC die Verbindungen Cys, GSH, und  $\gamma$ -EC in einem Analysengang erfaßt und quantifiziert werden (Kap. 3.13. und 4.5.1.).

Für sehr umfangreiche Meßreihen bzw. für einige Laborversuche wurde eine enzymatische Bestimmung des Gesamt-GSH-Gehaltes nach ANDERSON (1989) für das jeweilige Pflanzenmaterial optimiert (Kap. 4.5.2.).

Weiterhin wurde eine Methode zur Bestimmung der Thiolverbindungen aus Moosen mittels Kapillarelektrophorese erarbeitet (Kap. 4.5.3.).

### **2.5. Laboruntersuchungen zum Einfluß von Cd auf den S- und N-Stoffwechsel**

Die Laboruntersuchungen zur Induktion thiolhaltiger Verbindungen wurden insbesondere in Bezug auf die Schwefelernährung (Kap. 3.1.7.) durchgeführt. Die Parameter sind für die hohe GSH-Syntheseleistung der Moose unter Schwermetallstress von besonderer Bedeutung. Der Einsatz von <sup>15</sup>N als Stickstoffquelle machte die Untersuchung von N-Aufnahme und -Einbau in Aminosäuren und Proteine unter Cd-Streß möglich (Kap. 4.8.). Studien zu anderen Umweltparametern wie pH und Temperatur wurden zunächst zurückgestellt.

### **2.6. Freilanduntersuchungen zur Induktion thiolhaltiger Verbindungen**

Aus den gesammelten Freilandproben wurden neben dem Schwermetallgehalt auch die thiolhaltigen Verbindungen Cys,  $\gamma$ -EC und GSH analysiert. (Kap. 4.11).

### **2.7. Korrelation von Schwermetallgehalten als Summenparameter und physiologische Reaktion ('Thiolantwort')**

Die unter 4.3 und 4.11 erhaltenen Daten wurden gegenübergestellt und einer Korrelationsanalyse unterzogen (Kap. 4. 13.).

### **2.8. Interspezifische Vergleiche der Effektivität von Toleranzmechanismen**

Verschiedene terrestrische und aquatische Moospezies wurden auf ihre Thiolantwort unter Schwermetallstress verglichen (Kap. 4.12.). Teilweise stammten die Pflanzen aus axenischen Laborkulturen, so daß standardisierte Ausgangsbedingungen gegeben waren.

### **2.9. Untersuchungen zur Nutzung der spezifischen biochemischen Reaktionen als Indikator für Belastung und ökotoxikologisches Gefährdungspotential auf Grundlage von Monitoringstudien**

Die unter 4.3 und 4.11 erhaltenen Daten wurden in Hinblick auf die Nutzung einer Thiolpeptidsynthese als Biomarker von Schwermetallbelastungen in Moosen ausgewertet.

### **2.10. Studien zur saisonalen Varianz der Schwermetall- und PAK-Akkumulation und physiologischen Reaktion**

Die Schwermetallgehalte der Freilandproben wurden in Hinblick auf eine saisonale Varianz der Akkumulation ausgewertet (Kap. 4. 16.).

Die Organika-Belastung der Freilandmoose wurde untersucht.

Umfangreiche Studien der Pflanzen als Akkumulator für organische Verbindungen erfolgte nicht. Daher können auch keine befriedigenden Aussagen zur saisonalen Varianz gegeben werden.

**2.11. Ergänzende Untersuchungen**

Zusätzlich zu den im Projekt beantragten Untersuchungen wurden die  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse in Freilandpflanzen gemessen (Kap. 4.9.)

**2.12. Einfluß kurzfristiger Wetterereignisse auf den Thiolpeptidgehalt der Freilandpflanzen.**

Zur Interpretation auffälliger Schwankungen im Thiolpeptidgehalt der Moospflanzen wurden die aktuellen Temperaturen, Niederschläge und Sonnenschein für den Tag vor und während der Probenahme ausgewertet (Kap. 4. 17.).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Standorte der Freilanduntersuchungen

Für Dauerbeprobungen wurden drei Standorte im Saalkreis (Sachsen-Anhalt) ausgewählt, von denen Standort 1 im Umkreis von ca. 200 m dreimal beprobt wurde.

Die Auswahl der Untersuchungsgebiete erfolgte anhand des vom Umweltbundesamt (UBA) Anfang und Mitte der 90er Jahre (HERPIN et al. 1994, SIEWERS et al., 1998) durchgeführten Projektes zur Bioindikation von atmosphärischen Schwermetalleinträgen mit terrestrischen Moosen. Die Probenahmestandorte sind in Abb.1-3 dargestellt. Die Beprobungen erfolgten vom Januar 1998 bis Juli 1999, und, soweit es die Witterung erlaubte, im Abstand von 4 Wochen. Durch die mit den Jahreszeiten wechselnde Vegetation, waren die Moosstandorte nicht während des gesamten Untersuchungszeitraumes "offen", d.h. teilweise waren die Moose von einer Krautschicht bedeckt.

##### 3.1.1. Hohenthurm

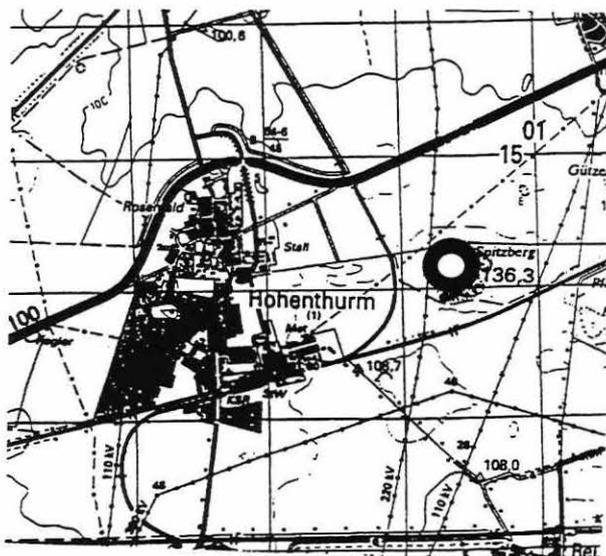
Lage: ca. 10 km westlich von Halle, ca. 1 km außerhalb der Ortschaft Hohenthurm auf einem Hügel mit Kiefernbestand. Große Bestände an *Scleropodium purum*.

*Hohenthurm 1*: unterhalb eines Kiefernbestandes direkt am Waldrand. Am Weg zur Kuppe des Hügels.

*Hohenthurm 2*: ca. 10 m von Hohenthurm 1 entfernt, offener Standort in der Nähe einzeln stehender Kiefern

*Hohenthurm 3*: ca. 100 m von Hohenthurm 1 und Hohenthurm 2 entfernt auf der Kuppe des Hügels, in der Nähe einzeln stehender Kiefern.

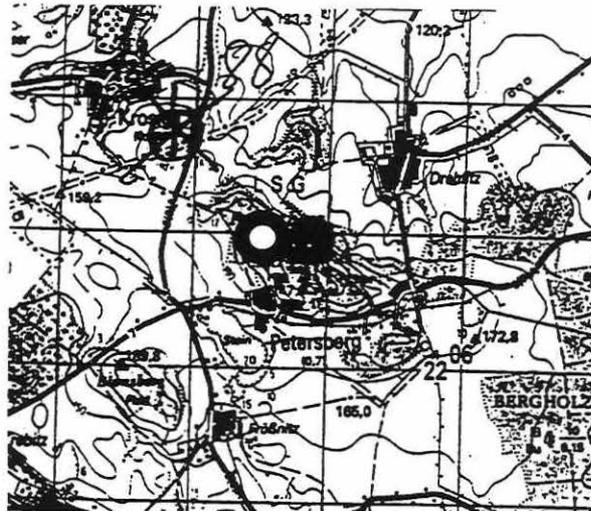
Abb. 1: Standort Hohenthurm



### 3.1.2. Petersberg

Der Standort Petersberg liegt ca. 500 m östlich vom Petersberg, auf einer Lichtung ohne Baumbestand, jedoch mit im Frühjahr/Sommer hoher Krautschicht.

Abb. 2: Standort Petersberg



### 3.1.3. Salzmünde

Der Standort Salzmünde liegt ca. 1 km außerhalb von der Ortschaft Salzmünde, auf einer Kuppe in einem landwirtschaftlich genutzten Gebiet ohne Baumbestand, jedoch mit z.T. hoher Krautschicht, die Proben wurden an der Wand eines Betonschachtes entnommen.

Abb. 3: Standort Salzmünde



Alle Proben wurden in Plastiktüten innerhalb kürzester Zeit ins Labor transportiert und umgehend bei -80 °C eingefroren.

### **3.2. Pflanzenmaterial für die Laborversuche**

Die Laborversuche wurden zum großen Teil mit dem aquatischen Moos *Fontinalis antipyretica* durchgeführt, da dieses Moos besser an die für die Versuche benötigte Laborkultur angepaßt ist.

Die Probenahme von *F. antipyretica* erfolgte hauptsächlich in der Wipper (östliches Harzgebiet), ca. 1km außerhalb von Wippra (Harz). Dieser Standort ist durch eine relativ hohe Fließgeschwindigkeit bei einer Wassertiefe von ca. 30 - 50 cm und direkter Sonneneinstrahlung charakterisiert. Die Breite des Flußbettes beträgt an diesen Stellen ca. 4 - 6m. Weiteres Pflanzenmaterial wurde aus der Helbe entnommen.

Die terrestrischen Moose wurden an verschiedenen Standorten Sachsen-Anhalts und Niedersachsen gesammelt (s. Anhang).

Einige Arten (s. Anhang) stammten aus Laborkultur. Die Anzucht erfolgte in sterilen lichtdurchlässigen Kunststoffbehältern auf Agar mit Knop-Lösung bei ca. 25 °C und 12stündiger Beleuchtung im Kulturschrank.

### **3.3. Aufbewahrung der Proben**

Die Proben für die Schwermetallanalytik wurden bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Bis zur Homogenisierung durch Mörsem erfolgte die Aufbewahrung im Dunkeln bei Raumtemperatur. Für die Analytik thiolhaltiger Verbindungen wurden die Proben bei -80 °C bis zur Extraktion aufbewahrt. Das Einfrieren bereits gemörserter Proben war für eine quantitative Analytik für wenige Stunden möglich. Die sauren Extrakte konnten nicht eingefroren werden.

### **3.4. Vorbereitung der Pflanzen für Laborversuche**

Das für die Laborversuche verwendete Pflanzenmaterial von *F. antipyretica* wurde mehrmals mit einfachdestilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen und in 2 - 3 cm lange Abschnitte unterteilt. Die terrestrischen Moose wurden ohne weitere Vorbehandlung für die Versuche eingesetzt. Es wurden nur junge, voll beblätterte Pflanzenteile verwendet. Um die biologische Variabilität der Proben gering zu halten, wurde das Pflanzenmaterial zu einer Mischprobe vereinigt und für die Versuchsansätze entsprechende Teilmengen entnommen.

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

Laboruntersuchungen zur Biosorption (Oberflächen- bzw. Zellwandadsorption) von Cd erfolgten über Austausch des Cd<sup>2+</sup> durch Ni<sup>2+</sup> (BROWN und WELLS, 1988). Etwa 1,0 – 1,5 g Pflanzenmaterial wurden nach Inkubation in 100 mL Medium (mit 100 µM Cd) 2mal mit einfachdestilliertem H<sub>2</sub>O (je 100 mL) gewaschen. Im folgenden wurden Waschungen mit 20 mM NiCl<sub>2</sub> durchgeführt (je 50 mL, 30 min auf einem Schüttler, ca. 100 U/min). Der Anteil des oberflächen- bzw. zellwandgebundenen Cd wurde aus den Cd-Gehalten der zum Waschen verwendeten NiCl<sub>2</sub>-Lösungen berechnet. Im Anschluß wurde das Moos bei 80 °C getrocknet, gemörsert (Porzellanmörser, mit HNO<sub>3</sub> (ca. 20 %ig, suprapur) gespült) und

für die Schwermetallanalytik aufgeschlossen. Die Menge an intrazellulär aufgenommenem Cd wurde aus dem Rest-Cd-Gehalt der Pflanzen bestimmt.

### 3.6. Vorbereitung des Pflanzenmaterials für die Schwermetallanalytik

Das Pflanzenmaterial wurde ohne Waschen direkt für die Analysen eingesetzt, über Nacht bei 80°C getrocknet und anschließend im Porzellanmörser homogenisiert.

Für den mikrowellengestützten Aufschluß (Fa. CEM, MDS 2100) wurden 40 - 50 mg getrocknetes und gemörsertes Pflanzenmaterial in die Aufschlußgefäße (Teflon: Lined Digestion Vessels, Fa. CEM) eingewogen und mit je 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %ig, suprapur) und 4 mL HNO<sub>3</sub> (65 %ig, suprapur) versetzt. Die physikalischen Parameter des Aufschlusses sind in Abb. 4 dargestellt.

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

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

Pro Aufschlußdurchgang wurde eine Referenzprobe (BCR 61, *Platihypnidium riparioides*, Wassermoos) und eine Blankprobe ohne Pflanzenmaterial mitgeführt. Im Anschluß wurden die Proben mit destilliertem H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 30 mL aufgefüllt.

### 3.7. Analytik der Schwermetallgehalte

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

### 3.8. Bestimmung des Trockengewichtes

Da durch Witterungseinflüsse die Moose unterschiedliche Wassergehalte aufwiesen, wurde für jede Probe aus dem Freiland das Trockengewicht bestimmt, um insbesondere für die physiologischen

Parameter einheitliche Bezugsgrößen zu haben. Hierzu wurde das Pflanzenmaterial bis zur Gewichtskonstanz bei 80 °C getrocknet und der Wasserverlust aus der Differenz des Frisch- und Trockengewichts bestimmt. Für die Laborversuche mit *F. antipyretica* erfolgte keine Umrechnung auf Frischgewicht, da der Wassergehalt dieser Pflanzen mit 85 % konstant war.

### 3.9. Induktion thiolhaltiger Verbindungen im Laborversuch

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

Tab. 1.: Kulturmedium nach Knop (SCHOPFER, 1986), 1 : 10 verdünnt.

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

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

### 3.10. Extraktion thiolhaltiger Peptide

Für das Screening unterschiedlicher Moospezies auf das Vorkommen von PCs wurde die Methode nach GRILL et al. (1991) eingesetzt. Aus den somit erhaltenen Extrakten konnte durch einen enzymatischen GSH-Reduktase Test (Kap. 4.5.2.) auch der GSH-Gehalt sowie  $\gamma$ -EC und Cys mittels HPLC bestimmt werden (Kap. 3.12.).

Es wurden pro Messung, in Abhängigkeit von der Homogenität des Pflanzenmaterials, mindestens 100 bis 200 mg FG eingesetzt. Geringere Mengen führten aufgrund der biologischen Variabilität zu einer höheren Streuung der Meßergebnisse. Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem N<sub>2</sub> gemörsert und mit 1 N NaOH mit 1 mg/mL NaBH<sub>4</sub>, (Tab. 3) versetzt. Nach 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben 10 min bei 20 000 g zentrifugiert. Das Verhältnis von Pflanzenmaterial (FG) zur Extraktionslösung wurde entsprechend Tab. 2 variiert.

**Tab. 2.:** Extraktionsbedingungen für unterschiedliche thiolhaltige Verbindungen.

Methode	Einwaage [mg FG]: NaOH (mit NaBH <sub>4</sub> ) [μL]	Verbindung
1.	1:1	PCs
2.	1:4	GSH
3.	1:3	Cys und γ-EC

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

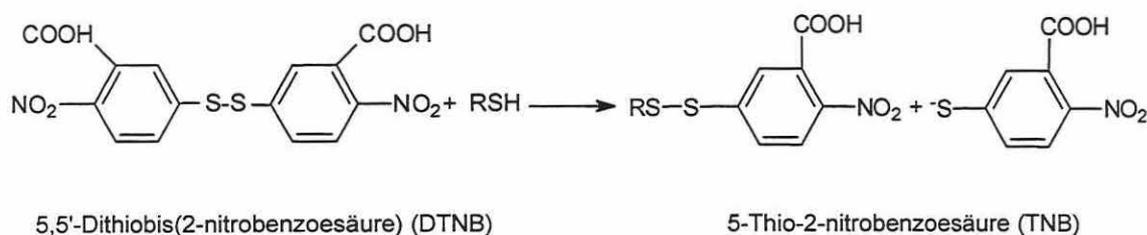
Durch Zugabe von 3,6 N HCl zum Überstand (120 μL HCl/500 μL Extrakt) wurden Proteine ausgefällt und der pH-Wert unter 2,0 gesenkt, wodurch S-gebundene Schwermetalle dissoziieren. Nach 15minütiger Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation (4 °C, 20 000 g) wurde ein klarer Überstand erhalten, der für die weiteren Analysen verwendet wurde. Unter diesen Bedingungen konnte GSH nur als Gesamt-GSH in der reduzierten Form bestimmt werden.

### 3.11. Analytik von Phytochelatinen

Nach GRILL et al. (1991) erfolgte die Analytik der PCs (und GSH + γ-EC als Summe) mittels Reversed-Phase HPLC (LKB System One) und Online-Nachsäulenderivatisierung (Pharmacia Pump P-3500) mit DTNB aus den in Kap. 3.10. beschriebenen Pflanzenextrakten. Extraktionen mit 5 %iger SSA (GUPTA und GOLDSBROUGH, 1991) oder 0,1 M HCl (TUKENDORF und RAUSER, 1990) ergaben keine reproduzierbaren Ergebnisse.

Der Nachweis der SH-Gruppen erfolgte durch Online-Nachsäulenderivatisierung mit DTNB (GRILL et al., 1991). Das bei der Reaktion von DTNB mit SH-Gruppen freigesetzte TNB (Abb. 5) kann als gelber Farbstoff bei 410 nm detektiert werden (ELLMAN, 1959).

Bei dieser Methode muß allerdings berücksichtigt werden, daß sie nicht nur für thiolhaltige Verbindungen spezifisch ist, wie wir erstmalig zeigen konnten (vergl. Kap. 4.6.)

**Abb. 5:** Reaktion von DTNB mit Thiolen unter Freisetzung von TNB (nach ANDERSON, 1989).

HPLC-Bedingungen:

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

*Nachsäulenderivatisierung:*

DTNB	300 $\mu$ M in 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8,0
Fluß	0,4 mL/min
Reaktionsschleife	1 mL, entsprechend 44 s Reaktionszeit
Detektion	410 nm

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

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

Die Verwendbarkeit der Methode wurde anhand von Pflanzenmaterial mit bekannter PC-Synthese, wie Tomatenzellkulturen überprüft.

### **3.12. Trennung von $\gamma$ -EC, Cys und GSH durch HPLC und Nachsäulenderivatisierung mit DTNB**

Die Gehalte an Cys und  $\gamma$ -EC aus den Laborversuchen mit *F. antipyretica* erfolgte mit einer ähnlichen Methode, wie unter 3.11. beschrieben, bei einem pH-Wert der mobilen Phase von 1,8. Mit dieser Methode war die Trennung von Cys, Cys-Gly,  $\gamma$ -EC und GSH möglich. Die Identifizierung der einzelnen Verbindungen aus den Pflanzenextrakten erfolgte über Standardaddition der Reinsubstanzen. Die Gehalte der Substanzen wurden anhand von Eichkurven berechnet.

Diese Methode ist einfach und vergleichsweise schnell, führt aber aufgrund des niedrigen pH-Wertes bei großem Probenumfang zu Schädigung der HPLC-Säule. Es wurde daher eine weitere Methode zur Bestimmung von GSH, Cys und  $\gamma$ -EC optimiert (Kap. 3.13.).

*HPLC-Bedingungen:*

Säule	C-18 (Si 100, Serva) 5 $\mu$ m, 4,6 x 240 mm
Mobile Phase	H <sub>2</sub> O pH 1,8 mit TFA

Gradient	isokratisch
Fluß	1 mL/min

*Nachsäulenderivatisierung:*

DTNB	600 µM in 200 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8,0
Fluß	0,4 mL/min
Reaktionsschleife	500 µL, entsprechend 22 s Reaktionszeit
Detektion	410 nm

### 3.13. Bestimmung von GSH, Cys und $\gamma$ -EC durch Derivatisierung mit Monobrombiman

Die Bestimmung des GSH-, Cys- und  $\gamma$ -EC-Gehaltes der Freilandproben erfolgte über HPLC-Analysen nach Derivatisierung mit Monobrombiman (STROHM et al., 1995). Für die Extraktion wurden ca. 50 mg des in flüssigem N<sub>2</sub> gemörserten Pflanzenmaterials in 1,5 mL 0,1 N HCl mit 80 mg PVP (SCHUPP, 1991) eingewogen und anschließend 15 min bei 4 °C und 20 000 g zentrifugiert. Die Bestimmung der Verbindungen erfolgte aus den Überständen.

*Gesamt-GSH, Cys und  $\gamma$ -EC*

Extrakt		120 µL
CHES-Puffer	0,2 M, pH 9,3	180 µL
DTT	6,0 mM in H <sub>2</sub> O	30 µL
1 Stunde gekühlt		

*Derivatisierung mit Monobrombiman:*

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

*HPLC-Bedingungen:*

Säule	C-18, (Lichrosphere 60 RP Select B)	
Mobile Phase	A	10 % Methanol /0,25% Eisessig in H <sub>2</sub> O (v/v) pH 4,3, mit 10 N NaOH eingestellt
	B	90 % Methanol /0,25% Eisessig in H <sub>2</sub> O (v/v) pH 3,9 mit 0,1 N NaOH eingestellt
Gradient	4 - 18 % B in A in 20.0 min; 20.0 - 20.5 min auf 100 % B, 20.5 - 28.5 min 100 % B, 28.5 - 29.0 min auf 0 % B, 29.0 - 35.0 min 0 % B	
Fluß	1 mL/min	
Fluoreszenzdetektion	Anregung 420 nm/ Detektion 520 nm	

Die Quantifizierung erfolgte anhand von Eichkurven im Bereich von 5,0 - 50,0 µg/mL GSH.

Bei dieser Methode wird GSH als Gesamt-GSH erfaßt. Die Bestimmung des oxidierten GSH kann in einem parallelen Derivatisierungsschritt erfolgen.

### 3.14. Bestimmung des Gesamtthiolgehaltes

Die Bestimmung des GSTH-Gehaltes erfolgte aus den in Kap. 3.10. beschriebenen Extrakten über die Farbreaktion mit DTNB (Kap. 3.11.). Die Messung erfolgte nach 5 min bei 410 nm photometrisch gegen einen Blindwert ohne Probe mit 100 µL H<sub>2</sub>O. Anhand einer Eichkurve im Bereich von 5 - 200 µg/mL wurden die GSTH-Gehalte der Proben ermittelt.

Testansatz:

Probe		100 µL
DTNB	300 µM in KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50 mM, pH 8,0)	3,9 mL

### 3.15. Analytik organischer Verbindungen

Persistente organische Schadstoffe (POPs) in der Atmosphäre akkumulieren in der Vegetation, wobei die Fremdstoffgehalte als integrale Maße für die mittleren Konzentrationswerte in der Luft betrachtet werden können. Neben Nadeln von Fichten und Kiefern sowie Blättern von Laubbäumen, Sträuchern oder Nutzpflanzen werden Moose als passive Bioakkumulatoren für POPs und Schwermetalle verwendet.

Die analytischen Untersuchungen der POPs setzen sich aus Extraktion der Schadstoffe, Cleanup der gewonnenen Extrakte und anschließender Analyse zusammen. Moose besitzen im Vergleich zur Kiefernnadel eine einfachere und homogenere Matrix und verfügen über eine deutlich weniger ausgeprägte Cuticula. Man verfährt bei der Extraktion analog zu der bei inneren Kiefernnadeln angewandten Methode, bei der zunächst die Wachsschicht extraktiv mit Dichlormethan abgetrennt wurde (WENZEL et al., 1997). Das ausgearbeitete Cleanup-Verfahren bezieht mehrere Reinigungsstufen über Florisilsäulen ein. Die nachfolgende GC/MS-Analyse erfolgte unter Verwendung eines Hewlett Packard (HP) 5971 Massenspektrometers im SIM Mode, der gekoppelt ist mit einem HP 5890 Gaschromatographen und HP 7673 Autosampler (WENZEL et al., 1998).

Für die Analytik der POPs sind wir Herrn Dr. K.-D. Wenzel, Sektion Chemische Ökotoxikologie des UFZ Leipzig-Halle, zu Dank verpflichtet.

### 3.16. Bestimmung der natürlichen $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse und $^{15}\text{N}$ -Aufnahme unter Cd-Belastung

Die Moospflanzen unterschiedlicher Standorte wurden getrocknet und gemahlen. Im homogenen Pflanzenpulver wurden die  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  Ratios ( $\delta^{15}\text{N}$ -Werte) mit einem Isotopenmassenspektrometer (Delta C, Finnigan MAT) in Kombination mit einem Elementaranalysator (EA-IRMS) direkt oder nach Umsetzung des Stickstoffs zu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Mikrokjeldahltechnik) bestimmt. Die Standardabweichungen der massenspektrometrischen Isotopenanalyse waren kleiner als 0,2  $\delta$ -Promille (Standard: Reinfluft).

$$\delta^{15}\text{N} = (\text{Ratio}_{\text{Probe}} / \text{Ratio}_{\text{Standard}} - 1) \times 1000 \text{ [‰]}$$

Zur Untersuchung des Einflusses von Cd auf den Stickstoffmetabolismus von *Fontinalis antipyretica* wurden ca. 2 g Pflanzenmaterial mit 200 ml Knop-Medium bei 10 °C für 2-4 Tage vorkultiviert. Nach Umsetzen auf Knop-Nährlösung mit  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  (50 bzw. 95at.-%) wurde mit Cd exponiert und das Moos zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Zur Bestimmung des  $^{15}\text{N}$ -Einbaues in Aminosäuren und Proteine wurden 500 mg Moos aufgearbeitet und der Stickstoff nach Umsetzung zu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Kjeldahltechnik) emissionsspektrometrisch (NOI-7PC) vermessen.

### 3.17. Untersuchungen zum Einfluß von Umweltparametern auf die Thiolpeptidsynthese in *Fontinalis antipyretica*

#### 3.17.1. Einfluß der Schwefelernährung

Erste Untersuchungen zum Einfluß der Schwefelernährung auf die Thiolpeptidsynthese wurden im Laborversuch über 14 Tage durchgeführt, wobei Moos verschiedenen Sulfat- und Cd-Konzentrationen ausgesetzt wurde. Vor Beginn der Versuchsreihe wurde das Pflanzenmaterial 3 Tage in einer Knop-Lösung mit 100  $\mu\text{M}$  Sulfat, ohne Cd und einen weiteren Tag in Medium ohne Sulfat/Cd inkubiert. Dann wurden folgende Reihen angesetzt: 0  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4$ /0  $\mu\text{M}$  Cd, 0  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4$ /200  $\mu\text{M}$  Cd, 500  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4$ /0  $\mu\text{M}$  Cd, 500  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4$ /200  $\mu\text{M}$  Cd im Nährmedium.

Es wurde der Sulfatgehalt im Moos und im Medium gemessen. Weiterhin erfolgte die Bestimmung des Thiolgehaltes mittels Bimanderivatisierung (Kap.3.13.).

#### 3.17.2. Einfluß der Schwefelernährung nach S-Mangelbedingungen

*Fontinalis antipyretica* wurde 38 Tage in Knop-Medium ohne Sulfat inkubiert, um den Sulfatgehalt im Moos zu senken. Dann wurden folgende Versuchsreihen angesetzt: 0  $\mu\text{M}$  Sulfat/0  $\mu\text{M}$  Cd, 0  $\mu\text{M}$  Sulfat/100  $\mu\text{M}$  Cd, 500  $\mu\text{M}$  Sulfat/0  $\mu\text{M}$  Cd, 500  $\mu\text{M}$  Sulfat/100  $\mu\text{M}$  Cd.

Es wurden die Sulfatgehalte in Moos und Medium gemessen. Weiterhin erfolgte die Bestimmung des Thiolgehaltes mittels Bimanderivatisierung (Kap. 3.13.).

### 3.17.3. Bestimmung von Sulfat

Die Sulfatbestimmung erfolgte mit Hilfe einer eigens entwickelten kapillarelektrophoretischen Methode, die auf Nutzung der indirekten UV-Absorption beruht. Hierzu wurde ca. 50 mg Moosmaterial 1:4 mit heißem, bidestilliertem Wasser extrahiert und 10 min bei 15000 U/min zentrifugiert. Die Trennung der anorganischen Anionen erfolgte mittels eines Hewlett Packard HP<sup>3</sup>-kapillarelektrophorese-Systems mit Dioden-Array-Detektor unter Verwendung eines Pyromellinsäure-Puffers. Die unbeschichtete Kapillare (SUPELCO FS 50 CE) hatte eine effektive Länge von 56 cm und einen Innendurchmesser von 50 µm. Die Analysen erfolgten bei 30 kV und negativer Polarität, die Injektion der Proben betrug 200 mbar\*sec<sup>-1</sup>. Die Anionen wurden bei einer Signal-Wellenlänge von 245 nm und einer Referenz-Wellenlänge von 350 nm detektiert.

### 3.18. Identifikation unbekannter Verbindungen aus *Polytrichales*

In den terrestrischen Moosen *Polytrichum formosum* und *Atrichum undulatum* wurden mittels HPLC und Nachsäulenderivatisierung durch DTNB Substanzen nachgewiesen, die unter den gegebenen Elutions- und Derivatisierungsbedingungen zunächst für PCs gehalten wurden (Kap. 4.6.) Nachfolgende identifizierende Analysentechniken (MS, NMR) konnten diese Vermutung nicht bestätigen und erforderten eine weitere Strukturaufklärung.

#### 3.18.1. Massenspektrometrie

Zur Klärung der chemischen Identität und der Molmassen der fraktionierten Verbindungen wurden LC-MS Untersuchungen durchgeführt (Finigan MAT GmbH, TSQ 7000). Es wurde mit einem isokratischen Gradienten von 10 % ACN eluiert. Die Probenschleife hatte ein Volumen von 50 µL. Mit einer Fraktion von *Atrichum undulatum*, die vergleichbare Retentionszeiten zu der gesammelten Fraktion von *Polytrichum formosum* aufwies, wurde ebenfalls eine LC-MS durchgeführt. Da in *Atrichum undulatum* eine höhere Konzentration vorlag, wurde zusätzlich eine Tandem-MS mit einem Fragment (m/z-Verhältnis 210,9) der Fraktion durchgeführt.

#### 3.18.2. NMR

Die HPLC-NMR-Analyse zur Identifizierung des Peaks 8 wurde mit einem BRUKER DRX 500 SPEKTROMETER bei 500,13 MHz durchgeführt. Mit einer MERCK HITACHI LICHROGRAPH L-6200A PUMPE wurde ein Gradient von 5 - 25 % ACN (0,1 % TFA) erzeugt. Das <sup>1</sup>H Spektrum wurde bei 12000 Hz mit einer Anregungsdauer von 1,36 sec und einer Relaxationsverzögerung von 1,80 sec aufgenommen. Zur Unterdrückung unerwünschter Signale von ACN und Restwasser im Gradienten wurde eine Standard BRUKER Pulssequenz durchgeführt. Danach wurde die Rauschunterdrückung von ACN auf 2,0 ppm eingestellt. Es wurden 120 µL eingespritzt.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Biologische Variabilität der Schwermetallgehalte am natürlichen Standort

Zur Überprüfung der biologischen Variabilität der Schwermetallgehalte in *Scleropodium purum* an einem größeren Standort wurden am Standort Hohenthurm an den meisten Terminen 3 Proben in einem Gebiet von ca. 50 x 200 m entnommen. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengestellt.

**Tab. 3:** Mittelwerte [ $\mu\text{g/g}$  TG] der Dreifachbeprobung des Standortes Hohenthurm, n=3.

	Cd	Pb	Zn	Cu	Datum
Mittelwert	0,35	7,40	69,64	9,07	2.3.98
SD	0,09	1,29	14,84	1,99	
SD %	25,56	17,37	21,31	21,96	
Mittelwert	0,32	6,09	76,61	10,83	7.4.98
SD	0,08	0,17	36,17	1,38	
SD %	25,55	2,83	47,22	12,74	
Mittelwert	0,29	8,02	69,38	12,18	2.6.98
SD	0,11	1,88	20,90	0,97	
SD %	38,61	23,39	30,12	7,94	
Mittelwert	0,31	8,94	47,71	8,79	13.7.98
SD	0,06	2,40	9,41	3,19	
SD %	20,09	26,87	19,72	36,31	
Mittelwert	0,26	5,43	300,01	6,75	12.8.98
SD	0,02	1,48	357,64	1,03	
SD %	6,70	27,19	119,21	15,30	
Mittelwert	0,45	8,37	66,05	12,13	7.9.98
SD	0,15	4,65	24,73	2,54	
SD %	32,64	55,55	37,44	20,93	
Mittelwert	0,32	6,58	132,40	10,39	16.12.98
SD	0,00	1,06	6,60	2,31	
SD %	1,55	16,17	4,99	22,23	
Mittelwert	0,31	5,58	417,47	9,76	14.1.99
SD	0,09	0,43	272,06	2,24	
SD %	28,04	7,62	65,17	22,98	
Mittelwert	0,31	5,74	59,15	9,98	28.2.99
SD	0,07	1,13	8,72	0,32	
SD %	24,26	19,75	14,75	3,25	
Mittelwert	0,23	4,88	51,98	9,70	30.3.99
SD	0,03	0,75	0,65	0,69	
SD %	12,86	15,30	1,25	7,08	
Mittelwert	0,19	6,03	53,47	9,26	26.4.99
SD	0,02	2,31	10,99	2,45	
SD %	9,32	38,35	20,56	26,43	

Für Cd schwankte die Streuung zwischen 38,6 und 1,6 % (n=3), für Pb lagen diese Werte zwischen 55,6 und 2,8 %. Die höchsten Streuungen wurden für Zn mit 19,2 % gemessen, der niedrigste Wert lag hier bei 1,25 %. Die Cu-Gehalte streuten zwischen 36,3 % und 7,1 %.

Gleichzeitig wurde eine Dreifachbeprobung des einzelnen Standortes Hohenthurm 1 vorgenommen (Tab. 4.). Auch hier lag die Streuung im Bereich der weiter auseinander liegenden Standorte. Die Streuung der Zn-Gehalte war ebenfalls höher als die der anderen Metalle.

**Tab. 4:** Mittelwerte [ $\mu\text{g/g}$  TG] der Dreifachbeprobung des Standortes Hohenthurm 1 am 28.2.98, n=3.

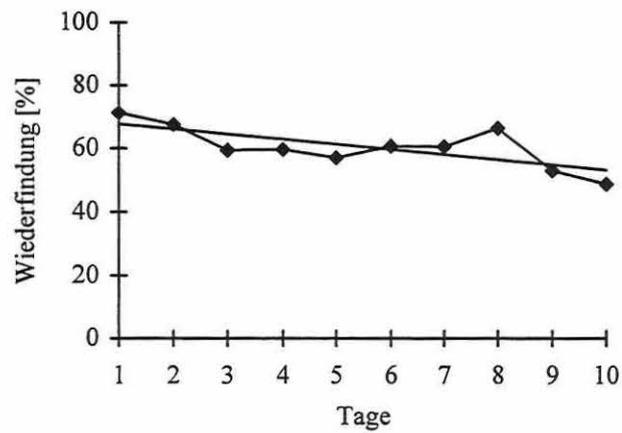
	Cd	Pb	Zn	Cu
	0,17	5,21	33,5	6,2
	0,28	6,56	57,0	10,3
	0,41	12,1	105,6	16,9
Mittelwert	<b>0,29</b>	<b>7,96</b>	<b>65,4</b>	<b>11,1</b>
SD	<b>0,10</b>	<b>2,98</b>	<b>30,0</b>	<b>4,4</b>
SD %	<b>33,3</b>	<b>37,5</b>	<b>45,9</b>	<b>39,6</b>

#### 4.2. Biosorption und intrazelluläre Aufnahme von Cd (Laborversuche)

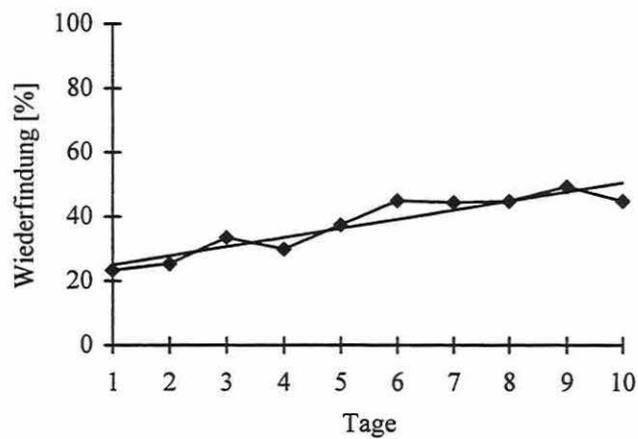
Die Biosorption (extrazelluläre Aufnahme) von Cd wurde zunächst am Wassermoos *F. antipyretica* untersucht. In einem 10tägigen Versuch unter 100  $\mu\text{M}$  Cd (entsprechend 1,12 mg/100 mL) wurde in *F. antipyretica* der Anteil des extra- und intrazellulär gebundenen Cd durch Waschen des Pflanzenmaterials mit  $\text{NiCl}_2$  bestimmt. Im folgenden wird als "extrazellulär" die Summe der durch Ni austauschbaren Cd-Menge und als "intrazellulär" der im Pflanzenmaterial verbleibende Rest-Cd-Gehalt benannt. Die Wiederfindung des Gesamt-Cd wurde aus der Summe des Cd der Waschlösungen, des Pflanzenmaterials und des Mediums ermittelt. Dieser Wert schwankte zwischen 100,1 und 120,8 %. In der für 10 Tage in Cd-freiem Medium kultivierten Kontrolle war weder "extra"- noch "intrazelluläres" Cd nachweisbar.

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

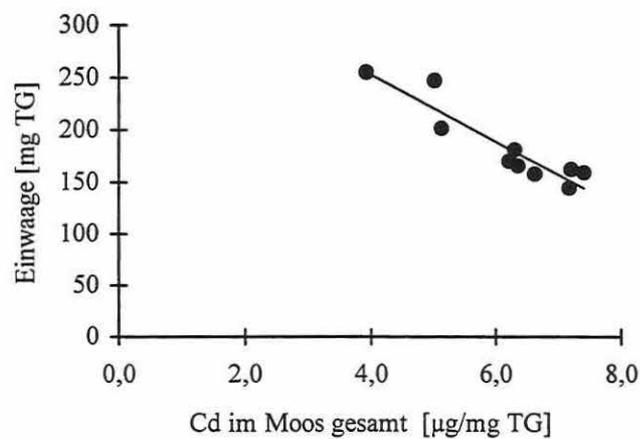
Die pro mg TG "intrazellulär" aufgenommene Cd-Menge lag im Mittel bei  $2,38 \pm 0,72 \mu\text{g/mg}$  TG. Die Gesamtmenge an aufgenommenem Cd ("intra"- + "extrazellulär") betrug im Mittel  $6,13 \pm 1,1 \mu\text{g/mg}$  TG. Diese Werte korrelierten mit der Einwaage an Pflanzenmaterial (Abb. 8).



**Abb. 6:** Wiederfindung an "extrazellulärem" Cd in *F. antipyretica* als % der im Medium enthaltenen Cd-Menge über einen Zeitraum von 10 Tagen, n = 1.



**Abb. 7:** Wiederfindung an "intrazellulärem" Cd in *F. antipyretica* als % der im Medium enthaltenen Cd-Menge über einen Zeitraum von 10 Tagen, n = 1.



**Abb. 8:** Korrelationsdiagramm der pro mg Pflanzenmaterial (*F. antipyretica*) aufgenommenen Cd-Menge ("intra"-+"extrazellulär") und der Einwaage an Pflanzenmaterial, n = 1,  $r = 0,9195$ ,  $*** p = 0,001$ .

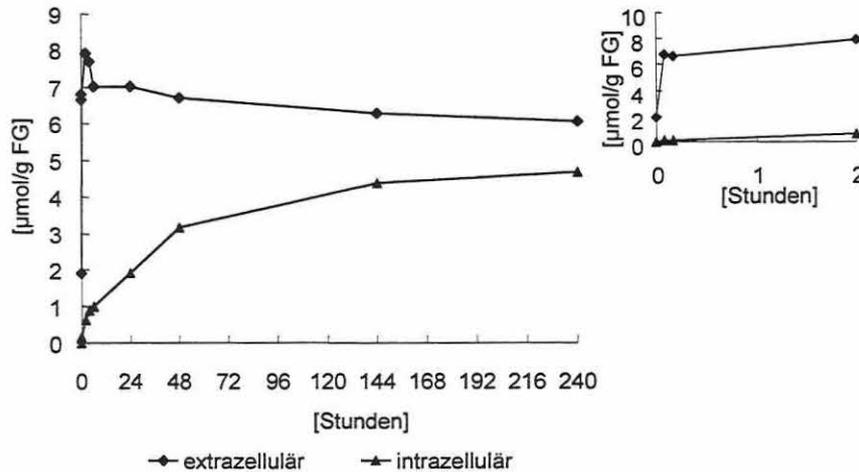


Abb. 9: Cd-Aufnahme über 10 Tage in *F. antipyretica* ( $1 \mu\text{mol} = 11,2 \mu\text{g}$ ).

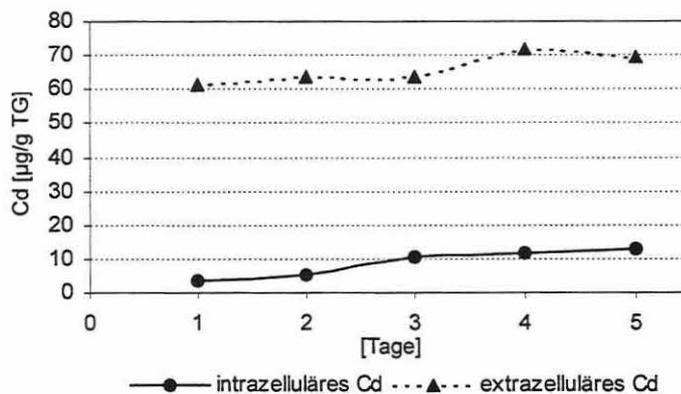


Abb. 10: Cd-Aufnahme über 5 Tage in *Polytrichum formosum* bei Exposition mit  $100 \mu\text{M}$  Cd

Bei *P. formosum* waren ebenfalls bereits am 1. Tag ca. 60 % des gesamten Cd des Mediums an die Oberfläche adsorbiert, wogegen der intrazelluläre Anteil ca. 5% betrug (Abb.10). Im Laufe der Inkubationszeit nahm sowohl der intrazelluläre als auch der extrazelluläre Cd-Gehalt des Mooses kontinuierlich zu.

Offensichtlich werden durch *F. antipyretica* und *P. formosum*  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen zunächst an die Zellwand gebunden und von dort aus kontinuierlich in die Zellen aufgenommen. Innerhalb der ersten 48 Stunden erfolgt hierbei die Einstellung eines Gleichgewichtes zur Cd-Konzentration des Mediums; gleichzeitig werden weitere  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen aus dem Medium extrazellulär adsorbiert. Auch Untersuchungen an *Rhytidiadelphus squarrosus* zeigten, daß sich bereits 30 min nach Cd-Applikation ein Gleichgewicht zwischen der Cd-Konzentration des Mediums und der Pflanzenoberfläche einstellt (WELLS und BROWN, 1987). Innerhalb von 24 Stunden nach Cd-Belastung waren ca. 15 % des Gesamt-Cd des Pflanzenmaterials in die Zellen gewandert, wobei die Menge an "extrazellulärem" Cd entsprechend abnahm. Auch diese Befunde belegen eine Aufnahme des "extrazellulären" Cd in die Zelle.

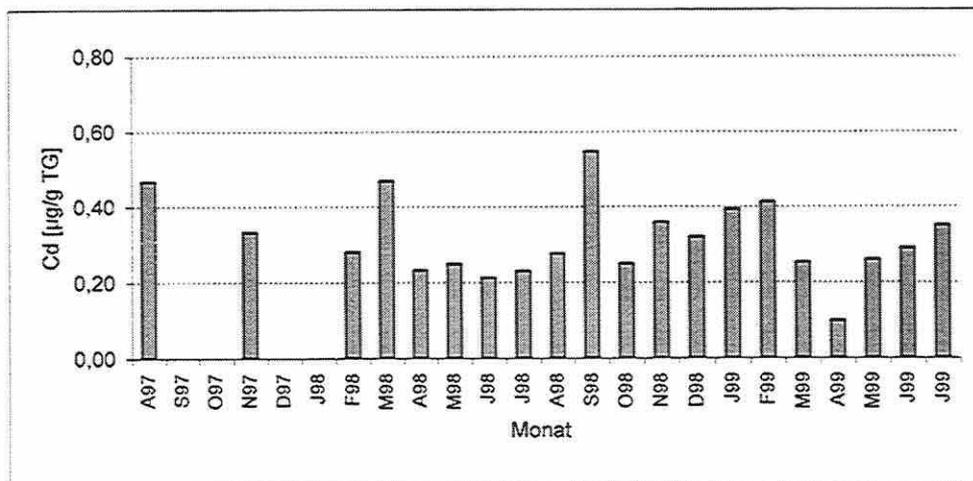
Untersuchungen zur Schwermetallaufnahme bei *F. antipyretica* liegen ebenfalls von VAZQUEZ et al. (1999) vor. Die Autoren beschreiben auch eine deutliche Akkumulation von Cd, jedoch wurden diese Versuche nur über einen Zeitraum von 60 min durchgeführt.

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

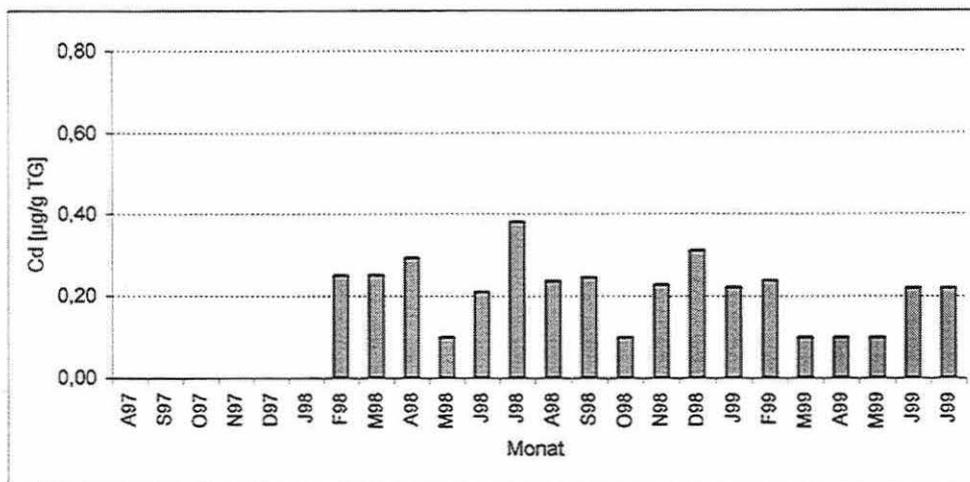
Die intrazelluläre Cd-Aufnahme im terrestrischen Moos *Rhytidiadelphus squarrosus* beginnt wenige Minuten nach Cd-Applikation (WELLS und BROWN, 1987).

#### 4.3. Schwermetallgehalte der Freilandproben

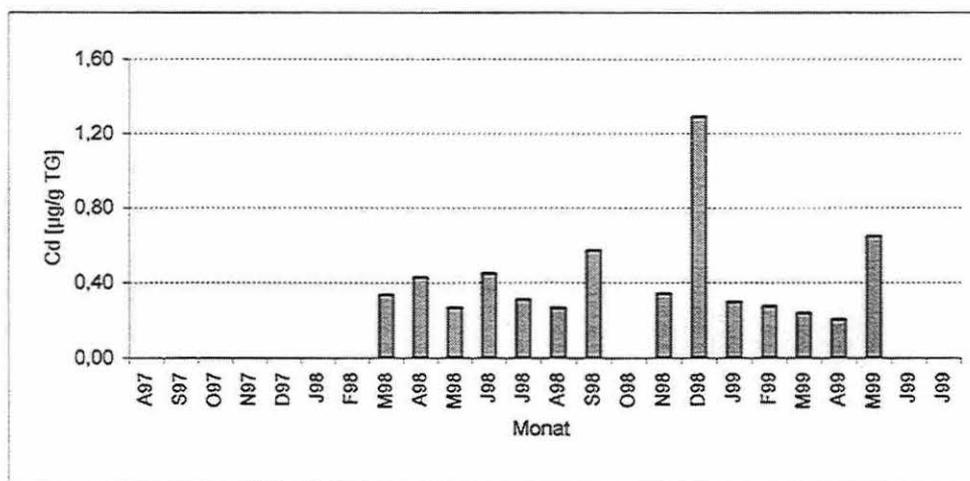
Im Folgenden sind die Schwermetallgehalte der Pflanzenproben aus dem Freiland dargestellt (Abb. 11-30). Neben den Daten von Januar 1998 bis Juli 1999 sind die Ergebnisse von August und November 1997 angegeben. Aufgrund der unterschiedlichen Belastungen der Standorte konnten bei der Darstellung keine einheitlichen y-Achsen gewählt werden.



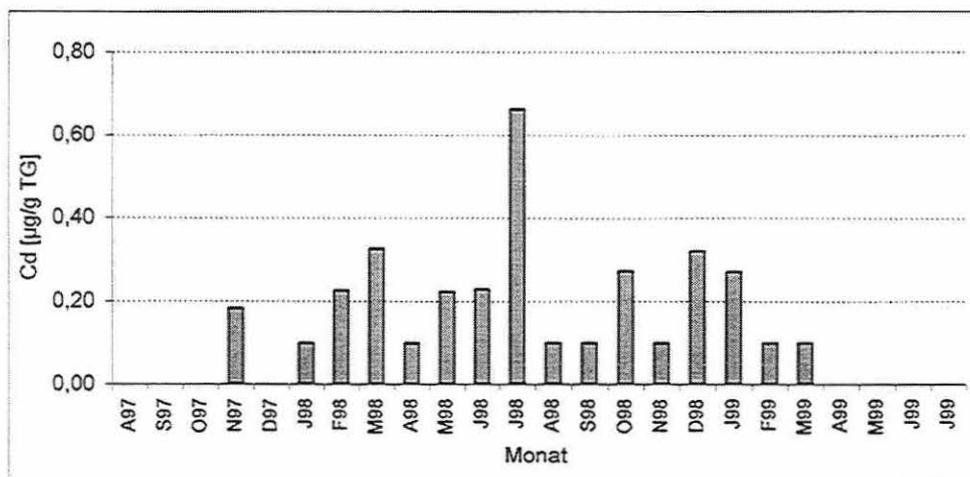
**Abb. 11:** Cd-Gehalte der Freilandproben (*S. purum*) am Standort Hohenthurm 1, A97=August 1997 usw.; S97, O97, D97, J98 nicht gemessen.



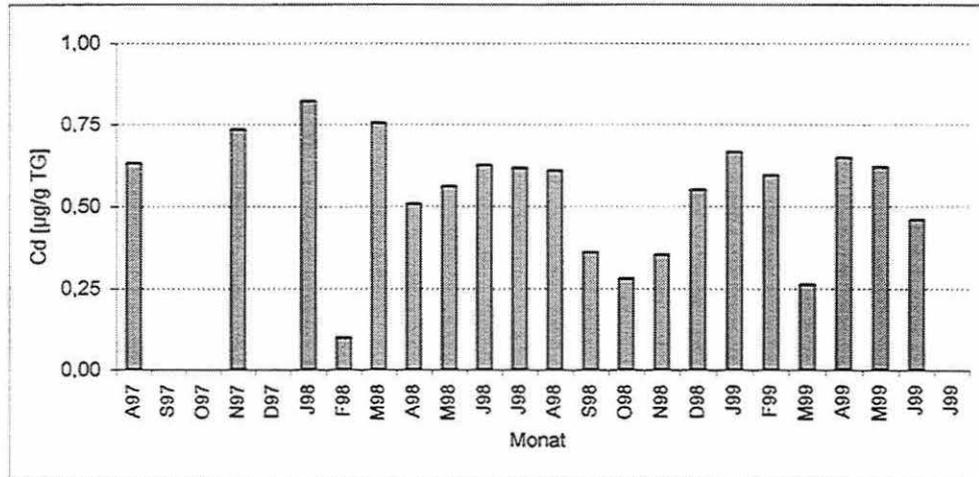
**Abb. 12:** Cd-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 2, A97=August 1997 usw.; A97 bis Feb. 98, O98, J99, J99 nicht gemessen.



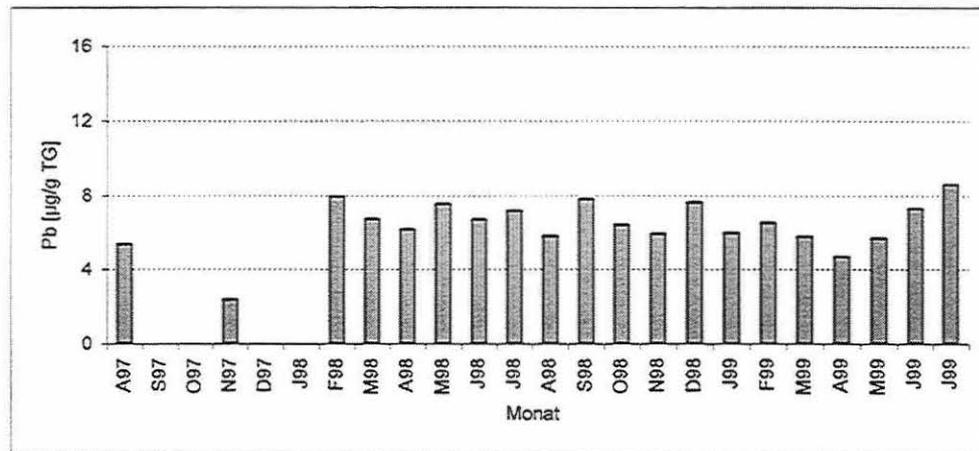
**Abb. 13:** Cd-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 3, A97=August 1997 usw.; A97 bis J98 nicht gemessen.



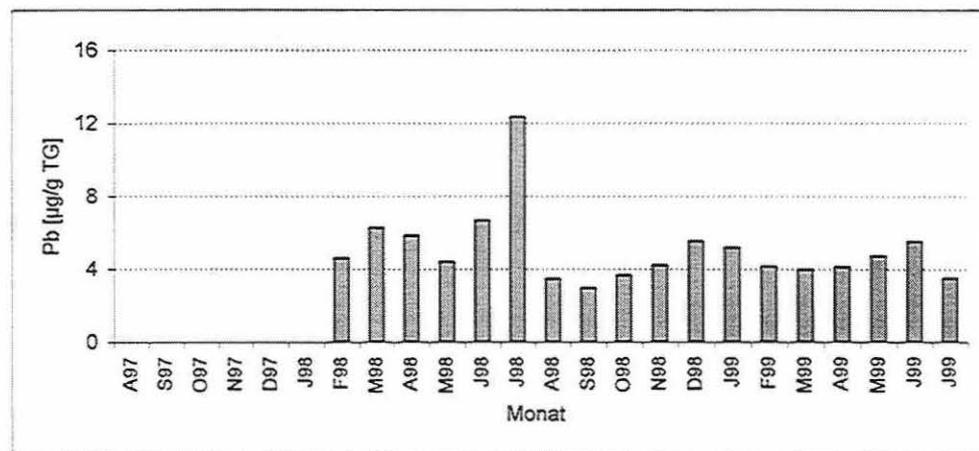
**Abb. 14:** Cd-Gehalte der Freilandproben am Standort Salzmünde, A97=August 1997 usw.; A98, S98;O98, D98, A99, M99, J99, J99 nicht gemessen.



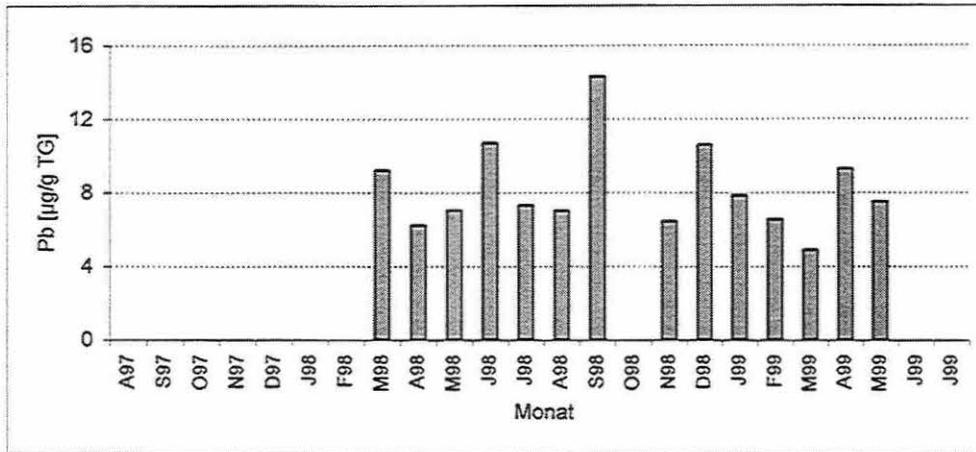
**Abb. 15:** Cd-Gehalte der Freilandproben am Standort Petersberg, A97=August 1997 usw.; S97, O97, D97, J99 nicht gemessen.



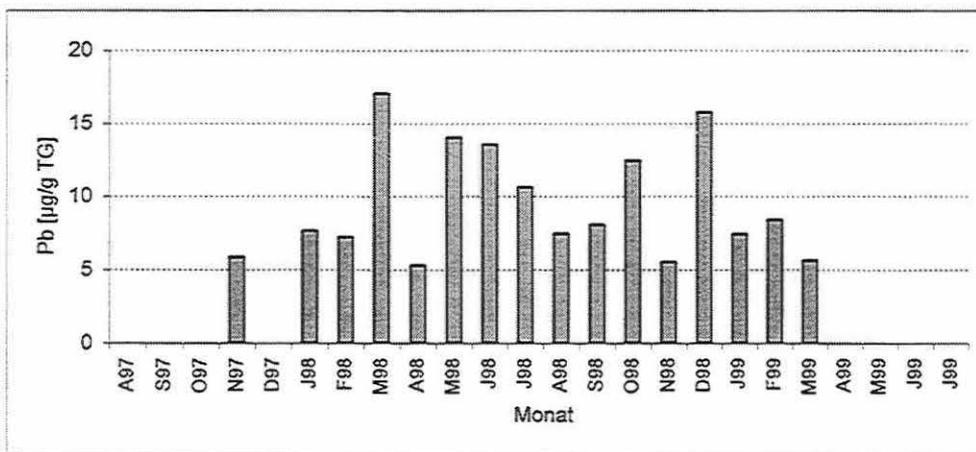
**Abb. 16:** Pb-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 1, A97=August 1997 usw.; S97, O97, D97, J99 nicht gemessen.



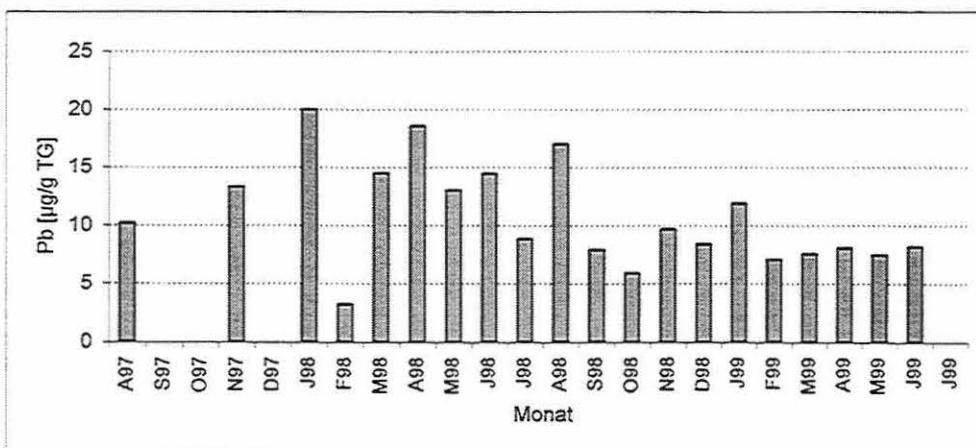
**Abb. 17:** Pb-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 2, A97=August 1997 usw.; S97, O97, D97, J99 nicht gemessen.



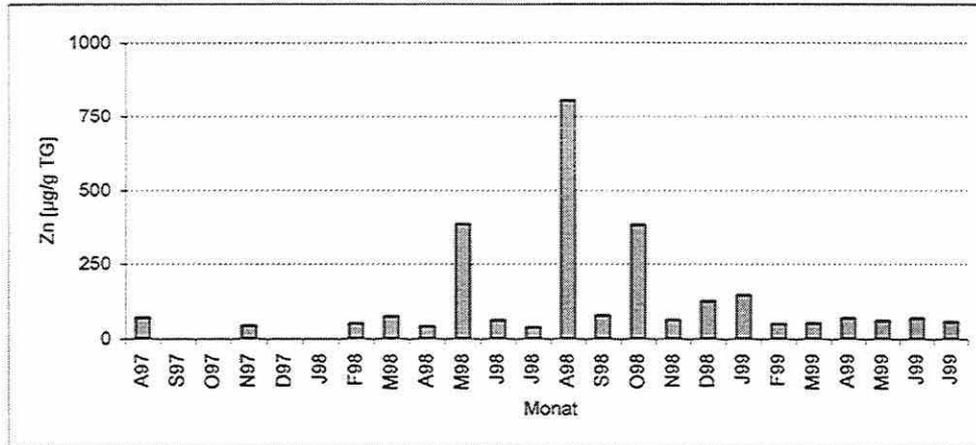
**Abb. 18:** Pb-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 3, A97=August 1997 usw.; S97, O97, D97, J99 nicht gemessen.



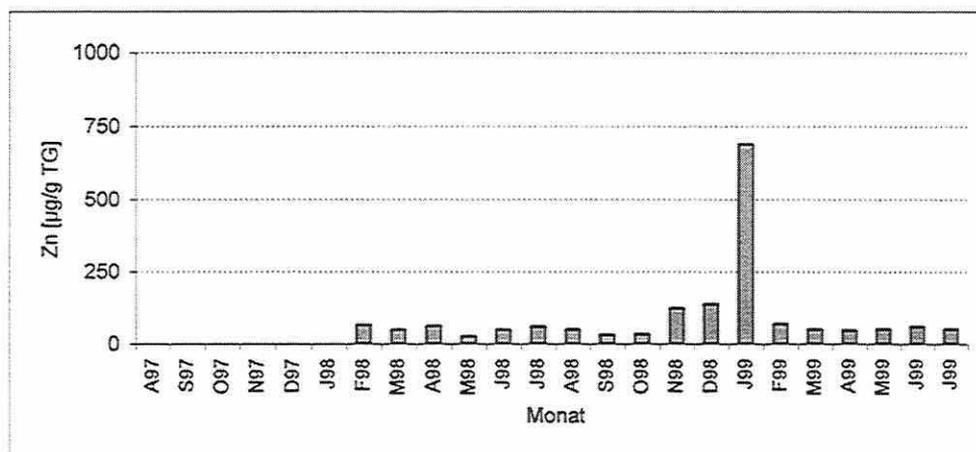
**Abb. 19:** Pb-Gehalte der Freilandproben am Standort Salzmünde, A97=August 1997 usw.; S97, O97, D97, J99 nicht gemessen.



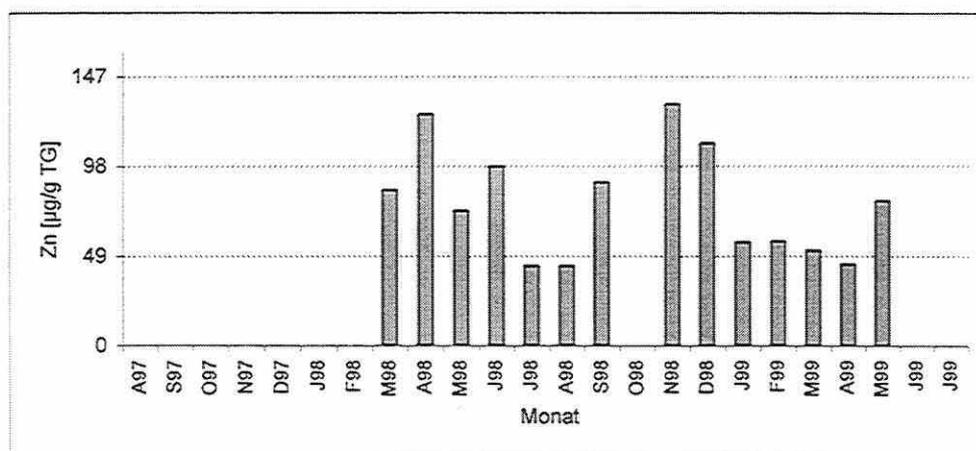
**Abb. 20:** Pb-Gehalte der Freilandproben am Standort Petersberg, A97=August 1997 usw.; S97, O97, D97, J99 nicht gemessen.



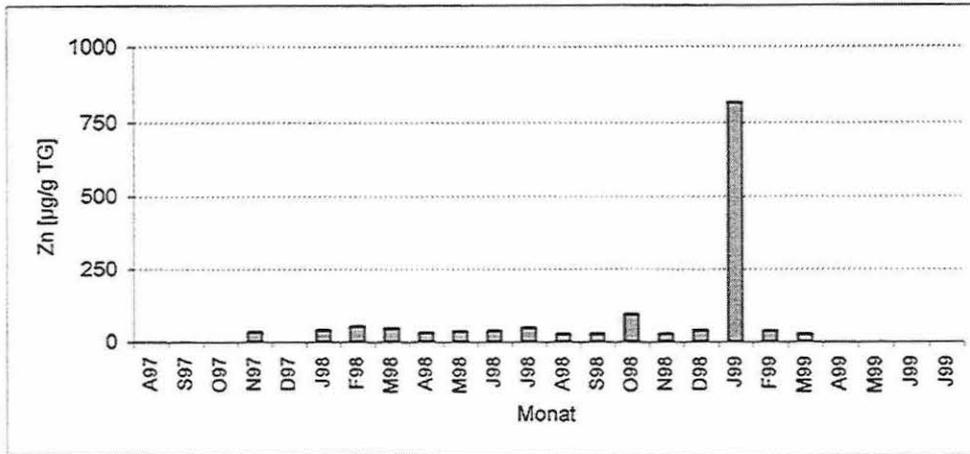
**Abb. 21:** Zn-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 1, A97=August 1997 usw.; S97, O97, D97, J99 nicht gemessen.



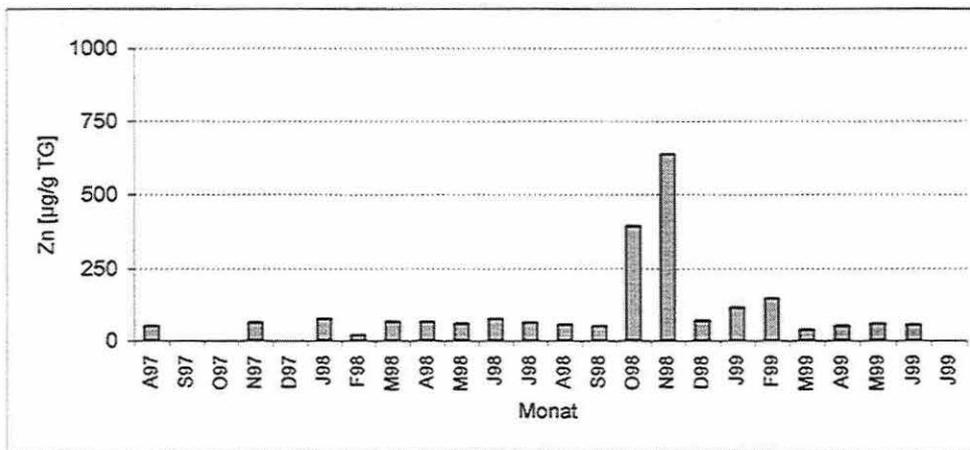
**Abb. 22:** Zn-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 2, A97=August 1997 usw.; S97, O97, D97, J99 nicht gemessen.



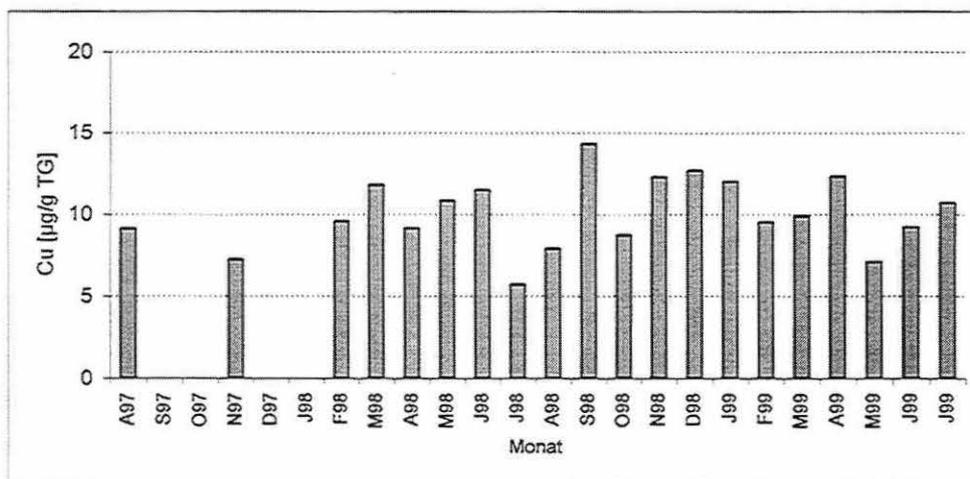
**Abb. 23:** Zn-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 3, A97=August 1997 usw.; S97, O97, D97, J99 nicht gemessen.



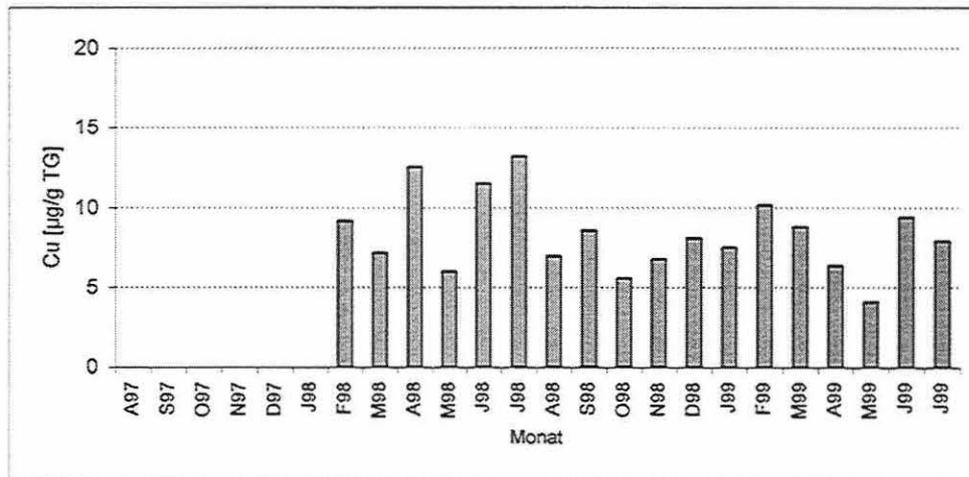
**Abb. 24:** Zn-Gehalte der Freilandproben am Standort Salzmuende, A97=August 1997 usw.; S97, O97, D97, J99 nicht gemessen.



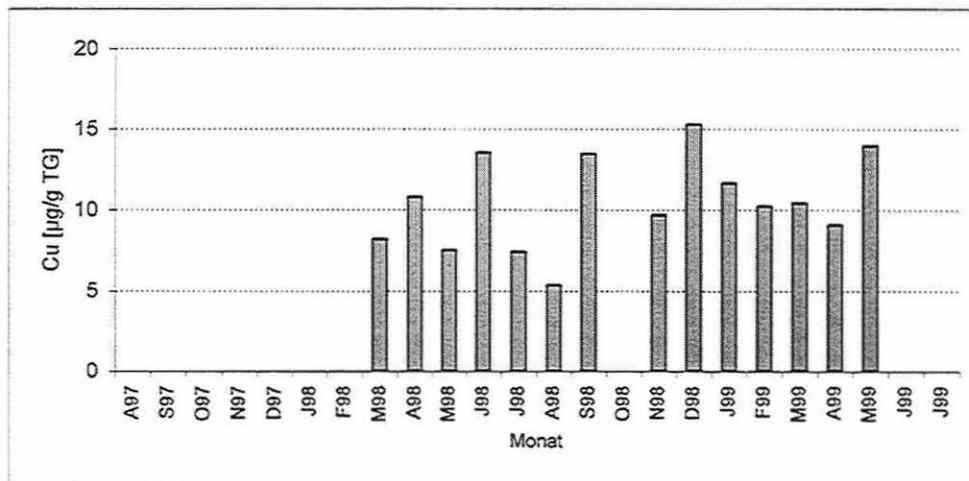
**Abb. 25:** Zn-Gehalte der Freilandproben am Standort Petersberg, A97=August 1997 usw.; S97, O97, D97, J99 nicht gemessen.



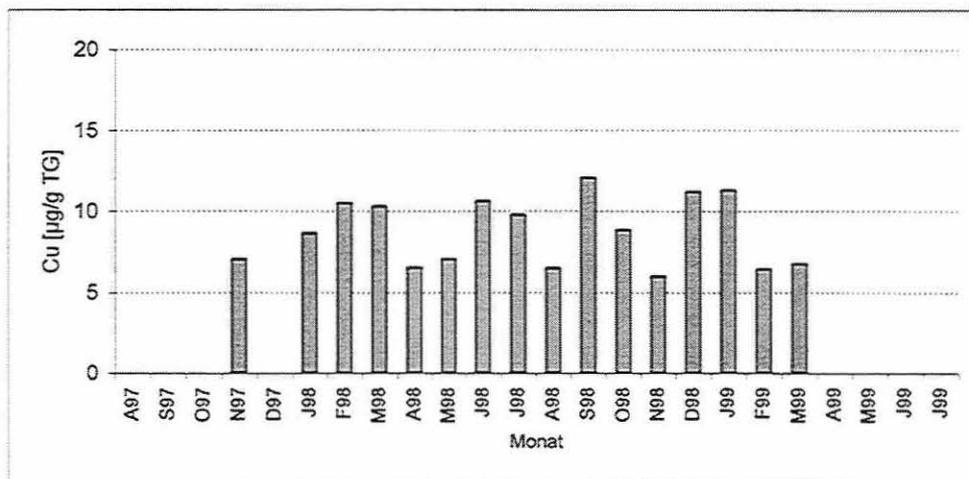
**Abb. 26:** Cu-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 1, A97=August 1997 usw.; S97, O97, D97, J99 nicht gemessen.



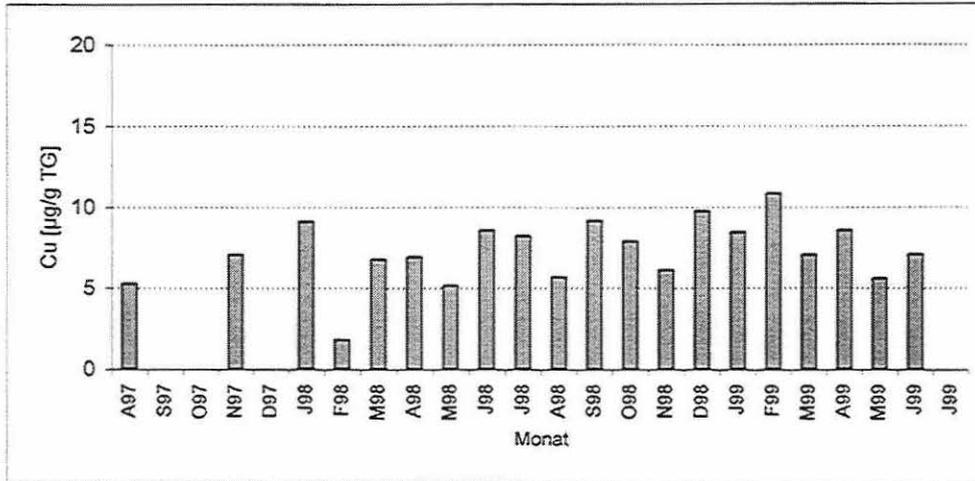
**Abb. 27:** Cu-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 2, A97=August 1997 usw.; S97, O97, D97, J99 nicht gemessen.



**Abb. 28:** Cu-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 3, A97=August 1997 usw.; S97, O97, D97, J99 nicht gemessen.

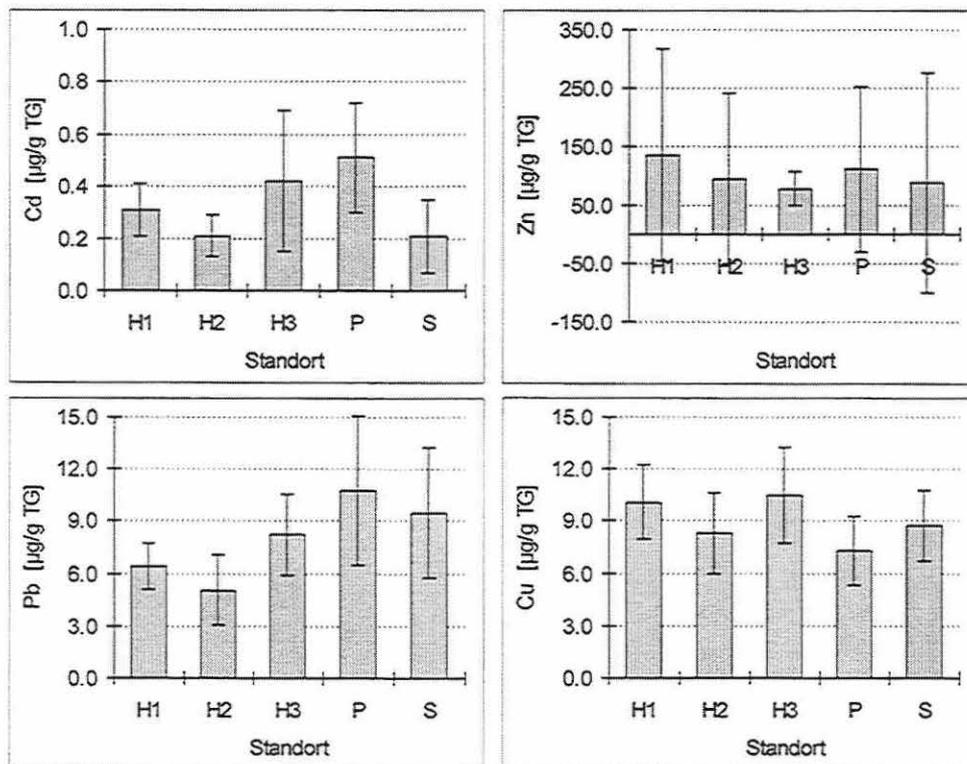


**Abb. 29:** Cu-Gehalte der Freilandproben am Standort Salzmünde, A97=August 1997 usw.; S97, O97, D97, J99 nicht gemessen.



**Abb. 30:** Cu-Gehalte der Freilandproben am Standort Petersberg, A97=August 1997 usw.; S97, O97, D97, J99 nicht gemessen.

Die Jahresmittel der Schwermetallgehalte der Moosproben der einzelnen Standorte sind in Abb.31 dargestellt. Signifikante Unterschiede der Standorte in der Belastung mit Cd, Pb, Zn oder Cu konnten nicht festgestellt werden, da die Werte hohe Standardabweichungen aufweisen. Insbesondere für Zn wurden Abweichungen im Laufe des Untersuchungszeitraums von > 100 % gemessen. Lediglich der Standort Petersberg war vergleichsweise hoch mit den Metallen Cd, Pb und Zn belastet.



**Abb. 31:** Mittelwerte der Gehalte an Cd, Pb, Zn und Cu in den Moosproben der verschiedenen Probenahmestellen. Es wurden alle verfügbaren Daten in die Auswertung einbezogen. Hohenthurm 1: n=20; Hohenthurm 2: n=18.; Hohenthurm 3: n=14; Petersberg: n=16; Salzmünde: n=20.

Eine Korrelation dieser Befunde zur Schwermetallbelastung von Freilandmoosen im Raum Halle, zu den von HERPIN et al. (1994) und SIEVERT und HERPIN (1998) ermittelten Belastungen kann nicht hergestellt werden. Diese Untersuchungen zielen mehr auf eine großräumige Beurteilung von Belastungssituationen, bei der saisonale Veränderungen nicht berücksichtigt wurden. Unsere Befunde hingegen belegen deutlich die saisonalen Änderungen der Schwermetallgehalte. Rückschlüsse auf unterschiedliche Belastungen sind bei diesen wenigen Probenahmestandorten nicht möglich.

#### 4.4. Organische Verbindungen in Freilandmoosen

Für die Belastung mit organischen Verbindungen konnten deutliche Unterschiede zwischen den Standorten Hohenthurm 1-3 festgestellt werden (Tab. 5). Insbesondere für den Standort Hohenthurm 3 wurden vergleichsweise hohe Belastungen mit PAHs gemessen. Diese ersten Untersuchungen erlauben keine eindeutige Erklärung. Möglich ist, daß die etwas höhere und exponierte Lage dieses Standortes hierbei eine Rolle spielt. Im Gegensatz zu Hohenthurm 1 und Hohenthurm 2 ist dieser Standort ca. 100 m entfernt auf der Kuppe eines Hügels gelegen. Aufgrund des geringeren Baumbestandes könnte es hier zu einem höheren Eintrag über die Luft kommen.

**Tab. 5:** Chlororganika und PAHs in Moosen der Standorte Hohenthurm (1, 2, 3) und Salzmünde [ng/g TG].

Substanz	Hohenthurm 1	Hohenthurm 2	Hohenthurm 3	Salzmünde
$\alpha$ -HCH	3,49	4,86	5,57	2,34
$\beta$ -HCH	3,91	1,20	5,56	4,18
$\gamma$ -HCH	6,15	19,6	6,85	7,95
$\delta$ -HCH	2,97	n.n.	n.n.	0,65
$\varepsilon$ -HCH	0,45	0,98	n.n.	n.n.
DDT	3,69	n.n.	1,53	0,45
DDE	0,93	n.n.	0,72	0,17
DDD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
TCB	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
HCB	0,06	n.n.	n.n.	n.n.
PCB 28	0,37	n.n.	0,40	n.n.
PCB 52	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
PCB 101	n.n.	n.n.	n.n.	0,11
PCB 138	1,77	2,09	2,85	1,54
PCB 153	2,09	0,84	2,19	1,22
PCB 180	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Phenanthren	66,1	86,0	111	72,3
Anthracen	4,29	3,58	9,70	5,22

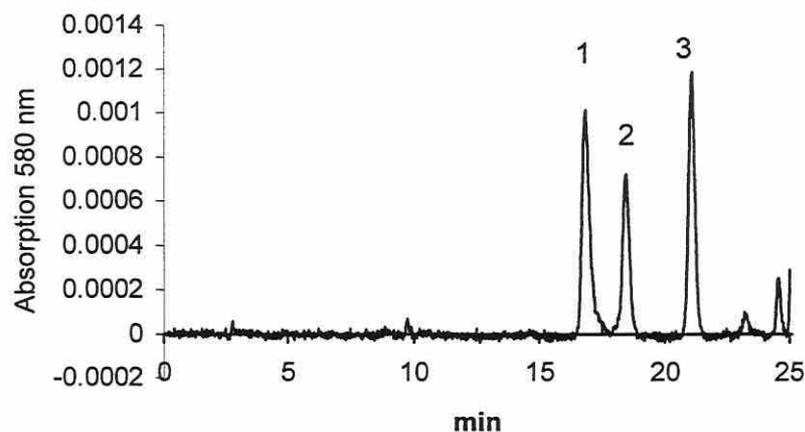
Fluoranthren	19,4	16,8	41,3	26,6
Pyren	29,4	36,5	73,4	43,9
Benz(o)pyren	n.n.	0,34	10,0	1,25

#### 4.5. Erarbeitung hoch sensitiver Methoden zum Nachweis thiolhaltiger Verbindungen in Moosproben

Da die für den Nachweis von PCs eingesetzte Methode mittels HPLC und Online-Nachsäulenderivatisierung mit DTNB (Kap. 3.12.) keine Trennung von GSH und  $\gamma$ -EC unter mäßig sauren Bedingungen (pH 3,0) erlaubt, war es notwendig, weitere Methoden zu optimieren.

##### 4.5.1. Derivatisierung mit Monobrombiman

Eine Möglichkeit zur Trennung von GSH und  $\gamma$ -EC ist die Extraktion der Proben mit 0,1 N HCl und anschließender Derivatisierung mit Monobrombiman (STROHM et al., 1991). Diese Methode wurde für die Moosproben optimiert und für die Analyse der PC-Vorstufen aus terrestrischen Moosen eingesetzt. Durch die Reduktion des Extraktionsvolumens von 1,5 auf 1,0 mL konnte die Konzentration der Verbindungen im Extrakt erhöht werden und somit  $\gamma$ -EC, das nur in geringen Mengen vorkommt, besser nachgewiesen werden.



**Abb. 32:** HPLC-Chromatogramm nach Derivatisierung der Standardsubstanzen 1= Cys; 2 =  $\gamma$ -EC, 3 = GSH mit Monobrombiman

##### 4.5.2. Enzymatische Bestimmung des GSH-Gehaltes

Für große Probemengen, bei denen lediglich Gesamt-GSH bestimmt werden sollte, wurde der enzymatische Test nach ANDERSON, 1989 eingesetzt. Diese Bestimmung ist schneller und weniger aufwendig als die GSH-Bestimmung mittels HPLC.

Um zu gewährleisten, daß die unterschiedlichen Nachweismethoden keinen Einfluß auf die Ergebnisse haben, war es notwendig, unterschiedliche Extraktionsbedingungen zu vergleichen.

Neben den Extraktionen mit NaOH (mit 1mg/mL NaBH<sub>4</sub>) und HCl wurde auch eine Extraktion mit Sulfosalicylsäure durchgeführt.

**Tab. 6:** Mengen an extrahierbarem GSH bei Verwendung unterschiedlicher Extraktionsmittel, Verhältnis von Extraktionslösung zu Einwaage je 4 : 1, [ $\mu\text{g/g}$  FG], n = 3.

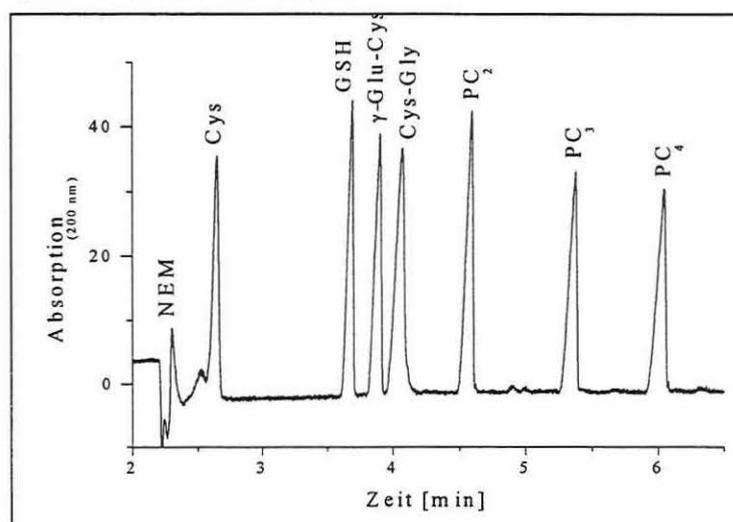
	1 N NaOH	SSA (5 % w/v)	HCl (0,1 N)
Wiederfindung	98,5 $\pm$ 5,6	80,7 $\pm$ 7,1	87,6 $\pm$ 4,2

#### 4.5.3. Bestimmung thiolhaltiger Verbindungen durch Kapillarelektrophorese

Neben den bisher beschriebenen Methoden mittels HPLC wurde ein weiteres Verfahren zur Bestimmung von thiolhaltigen Verbindungen aus Pflanzen durch Kapillarelektrophorese erarbeitet. Gegenüber den HPLC-Messungen ist bei der Kapillarelektrophorese die Analysenzeit verkürzt und es werden geringere Mengen an Proben benötigt. Es gelang ein Verfahren zu entwickeln, das die Trennung thiolhaltiger Peptide durch "on-column" Derivatisierung mit N-ethylmaleimid (NEM) ermöglicht (SUTTER et al., 1999).

Die Messungen wurden durchgeführt an einem Hewlett Packard HP<sup>3</sup> System mit Dioden-Array-Detektor. Die verwendete Kapillare (SUPELCO FS 50 CE) hatte eine Länge von 47,5 cm und einen Innendurchmesser von 50  $\mu\text{m}$ . Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 20° C und einer Spannung von 30 kV bei positiver Polarität. Die Injektionsdauer betrug 3-10 s bei einem Druck von 50 mbar. Die Peptide wurden bei 200 nm detektiert.

Für die "on-column"-Derivatisierung" wurde im Anschluß an die Probe eine definierte Menge NEM injiziert. Durch die schnellere Migration des NEM gegenüber den Peptiden kommt es zur Derivatisierung der Peptide innerhalb der Kapillare.



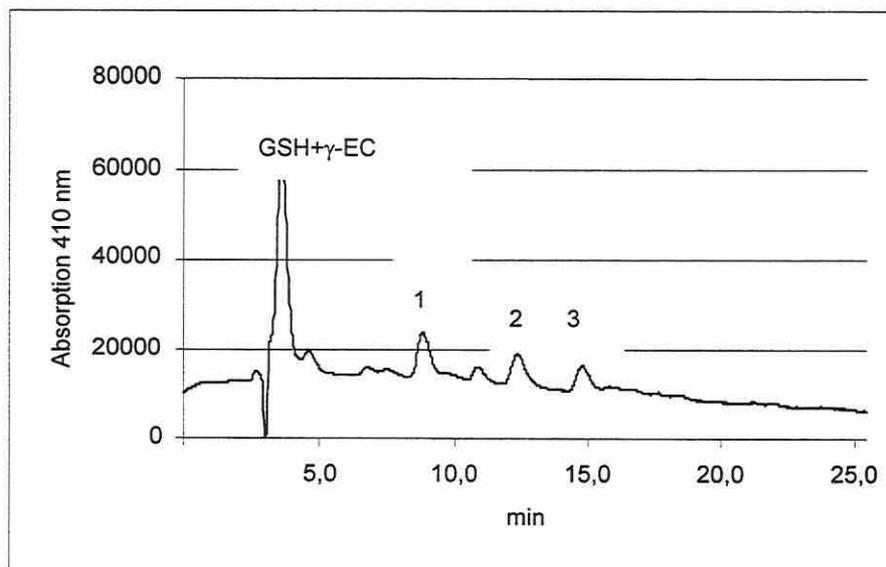
**Abb. 33:** Elektropherogramm thiolhaltiger Standardverbindungen nach Trennung durch Kapillarezonen-elektrophorese, je 250  $\mu\text{g/mL}$ .

Es war jedoch bisher nicht möglich, diese Verbindungen direkt aus den pflanzlichen Rohextrakten quantitativ zu bestimmen. Die nötige Probenvorbereitung führt zu einer Veränderung der quantitativen Zusammensetzung der Proben, die die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erschwert. Daher konnte diese Methode bisher nicht standardmäßig eingesetzt werden. Die Methode mittels Kapillarelektrophorese ist jedoch sehr gut geeignet für die qualitative Absicherung der durch HPLC gewonnenen Fraktionen.

#### 4.6. Problematik der Analyse von Phytochelatinen durch Nachsäulenderivatisierung mit DTNB

In den Versuchen wurden unterschiedliche Methoden zur Bestimmung von PCs, GSH und deren Vorstufen eingesetzt. Für den Nachweis eventuell vorkommender PCs wurde die Methode nach GRILL et al., 1991 (Kap. 3.12.) verwendet, da diese Methode als einzige den Nachweis von PCs und GSH ( $\gamma$ -EC), als auch die Bestimmung der Gesamtthiole (GSTH) aus einem Extrakt erlaubt. PCs waren in allen untersuchten terrestrischen und aquatischen Moos-Spezies nicht nachweisbar.

Messungen der terrestrischen Moose *Polytrichum formosum* und *Atrichum undulatum* ergaben Peaks in den HPLC Profilen, die bereits in nicht belasteten Proben aus dem Freiland detektiert werden konnten (Abb. 34).

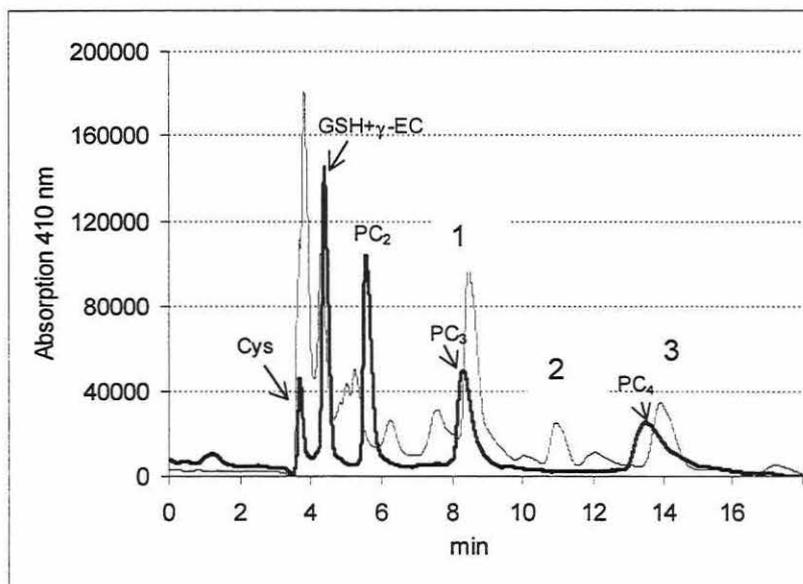


**Abb. 34:** HPLC-Chromatogramm mit Nachsäulenderivatisierung mit DTNB von *P. formosum*, unbelastete Probe

Auffallend war bei allen Untersuchungen unter Cd-Belastung (100  $\mu$ M), daß es am 3. Tag zu einer deutlichen Zunahme der Peaks 1, 2 und 3 kam (nicht dargestellt). Dieser Befund war in mehreren Versuchsreihen reproduzierbar.

Eine Standardaddition von Thiolstandards ergab entsprechende Retentionszeiten, die nur gering von denen der Substanzen aus *P. formosum* abwichen (Abb. 35). Geringfügige Änderungen der

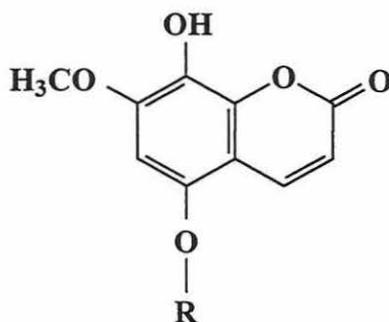
Retentionszeiten zwischen einzelnen HPLC-Messungen sind von der Analyse von Tomatenzellkulturen bekannt (nicht dargestellt).



**Abb. 35:** HPLC-Chromatogramm eines Cd-belasteten Extraktes von *Polytrichum formosum* (dünne Linie) im Vergleich zu Thiolstandards (starke Linie) unter gleichen analytischen Bedingungen wie Abb. 34 (Peak 1-3, vgl. Text)

Aufgrund der Zunahme des Gehaltes an DTNB-positiven Verbindungen unter Cd-Belastung wurde zunächst davon ausgegangen, daß es sich bei den detektierten Verbindungen um PCs handelt. Auffällig war jedoch das Vorhandensein dieser Substanzen in relativ großen Mengen auch in den unbelasteten Kontrollproben (Abb. 34). Daher wurden weitere Untersuchungen zu Identifizierung dieser Substanzen durchgeführt.

Die Reinigung und Charakterisierung des Peak 3 (Abb. 35) mittels HPLC-MS und NMR ergab, daß diese Verbindung kein PC ist (BERLICH et al., 2000, in Vorbereitung). Die Untersuchungen zur Strukturaufklärung deuten darauf hin, daß es sich hierbei um einen Vertreter der Coumarylglykoside handelt, deren Vorkommen in Moosen beschrieben wurde (JUNG et al., 1994)



**Abb. 36:** Strukturformel der isolierten Coumarinverbindung aus *Polytrichum formosum* und *Atrichum undulatum* (JUNG et al., 1994). R = Disaccharid

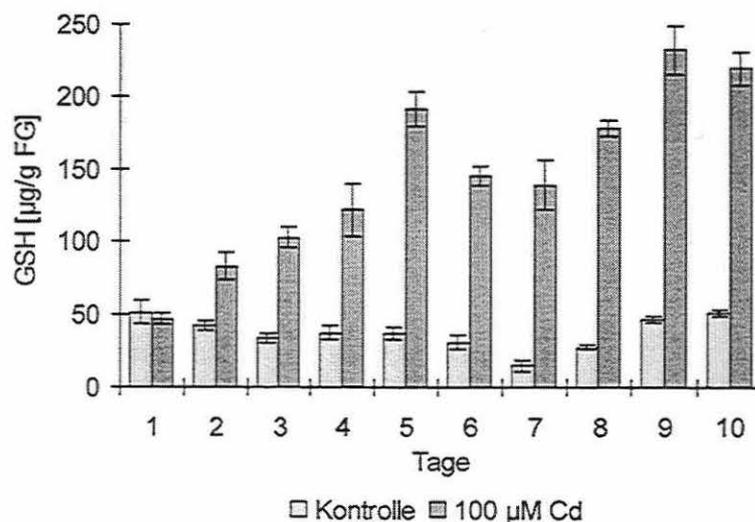
Der Nachweis von thiolhaltigen Verbindungen durch HPLC mit Nachsäulenderivatisierung mit DTNB kann daher nicht als spezifisch für diese Verbindungsklasse erachtet werden. Diese Ergebnisse sind bisher nicht aus der Literatur bekannt und belegen, daß die Identifizierung von PCs mit dieser Methode ohne weitere Charakterisierung der isolierten Einzelsubstanzen äußerst kritisch ist.

#### 4.7. Laboruntersuchungen zur Induktion thiolhaltiger Verbindungen

##### 4.7.1. Glutathion

Die Versuche zur Induktion thiolhaltiger Verbindungen im Labor wurden zunächst am Wassermoos *F. antipyretica* durchgeführt. Es konnten keine PCs nachgewiesen werden. Auffällig war jedoch gegenüber höheren Pflanzen ein deutlicher Anstieg des GSH-Gehaltes unter Cd-Einfluß.

In *F. antipyretica* kam es in Gegenwart von Cd zu einer deutlichen Erhöhung des GSH-Pools (Abb. 37) (andere Moosarten, vergl. Kap. 4.13.). Der GSH-Anstieg der Cd-belasteten Proben nahm während des Versuchszeitraumes einen bimodalen Verlauf. Bis zum 5. Tag kam es zu einem Anstieg um 153,3 µg/g FG gegenüber der Kontrolle. Der maximale GSH-Gehalt lag am 9. Tag 185,3 µg/g FG über der Kontrolle. Der mittlere GSH-Gehalt der Kontrollproben betrug während des Untersuchungszeitraumes 37,5 µg/g FG ± 10,8, wobei der bimodale Verlauf dem der Cd-inkubierten Proben entsprach.



**Abb. 37:** GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit 100 µM Cd, n=3.

Für Moose liegen bisher keine Daten zum Verhalten des GSH-Pools unter Schwermetallstress vor. Lediglich in einer Arbeit von JACKSON et al. (1991) am Wassermoos *Rhynchostegium riparioides* zeigt das Reversed-phase-HPLC-Chromatogramm des Pflanzenextraktes nach Cd-Applikation einen auffällig großen Peak thiolhaltiger Substanz zur Retentionszeit von GSH. Diese Verbindung wurde von den

Autoren jedoch nicht identifiziert. Aufgrund der Befunde an *F. antipyretica* und weiteren aquatischen und terrestrischen Moosen (einschließlich *Rhynchostegium riparioides*, Kap. 4.13.) ist vermutlich ein wesentlicher Anteil der von JACKSON et al. (1991) mit diesem Peak nachgewiesenen thiolhaltigen Verbindungen auf GSH zurückzuführen und nicht auf PCs.

Die Erhöhung des GSH-Pools in *F. antipyretica* bis zum 10fachen der Kontrolle bei fehlender PC-Synthese läßt die Hypothese zu, daß in Moosen GSH möglicherweise als direkter Chelator für Schwermetalle fungiert und diese in der Zelle entgiftet.

Für tierische Zellen und Hefen ist die Bildung von Schwermetall-GSH-Komplexen bekannt. Aus der Hefe *Candida glabrata* wurden Cd-S-Komplexe isoliert, die von GSH und  $(\gamma\text{-EC})_n$ -Peptiden bedeckt waren (DAMERON et al., 1989). Hiermit wurde zum ersten Mal die Bildung von Cd-GSH-Komplexen in biologischen Systemen nachgewiesen. Jüngste Studien belegen die Translokation von  $\text{Cd(II)}_1(\text{GSH})_2$ -Komplexen in die Vakuolen von *Saccharomyces cerevisiae* (LI et al., 1997, REA et al., 1998).

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

Für Pflanzen liegen bisher keine Beweise für eine Schwermetallchelatisierung durch GSH *in vivo* vor. Die Chelatisierung von Schwermetallen durch GSH zur Detoxifizierung oder als Transportform dieser Metalle in der Zelle könnte die schnelle und hohe GSH-Synthese in Moosen erklären. Orte der GSH-Synthese pflanzlicher Zellen sind die Chloroplasten und das Cytoplasma (KLAPHECK et al., 1987; HELL und BERGMANN, 1988, FOYER und RENNENBERG, 2000), wobei die intrazelluläre Verteilung auf Chloroplasten und Cytoplasma zwischen einem Verhältnis von 50 : 50 und 70 : 30 variiert (ALSCHER, 1989). Die Regulation des GSH-Spiegels pflanzlicher Zellen erfolgt über Feedback-Hemmung der  $\gamma\text{-EC}$ -Synthetase durch GSH (HELL und BERGMANN, 1990; SCHNEIDER und BERGMANN, 1995; NOCTOR et al. 1998, FOYER und RENNENBERG, 2000). Möglicherweise ist die Feedback-Regulation jedoch nicht der einzige Mechanismus, der die intrazelluläre GSH-Synthese kontrolliert, da Pflanzen nach Herbizidbehandlung ebenfalls einen erhöhten GSH-Gehalt aufweisen können (BERGMANN und RENNENBERG, 1993).

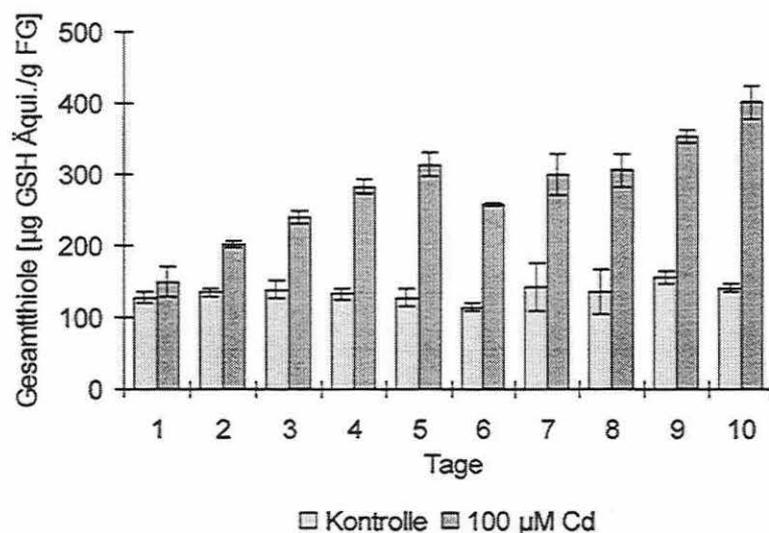
An *F. antipyretica* wurden erste Untersuchungen mittels analytischer Elektronenmikroskopie zur Lokalisation von Cd und Schwefel in den Zellen durchgeführt. Während Cd-Streß erhöht sich der cytoplasmatische S-Gehalt (BRUNS et al., 2000b,c). EEL-Spektren (electron energy loss spectra) weisen auf die Bindung von Cadmium an SH-Gruppen im Cytosol hin (Bruns et al., 2000c).

Ein weiterer Anstieg des GSH-Gehaltes war auch zu beobachten, wenn nach 3tägiger Inkubation das Cd aus dem Medium entfernt wurde (BRUNS et al., 2000b). Dies kann auf die Depotwirkung der Zellwand (Kap. 4.2.) zurückgeführt werden, wodurch trotz eines Cd-freien Mediums noch ausreichend Cd von

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

#### 4.7.2. Gesamtthiol-Gehalt (GSTH)

Der GSTH-Gehalt war ebenfalls von der Cd-Konzentration abhängig (Abb. 38). Der beschriebene bimodale Verlauf des GSTH-Anstiegs war unter unterschiedlichen Cd-Konzentrationen zu beobachten. Über 10 Tage betrug der mittlere GSTH-Gehalt der Kontrollen  $141,7 \pm 34,6 \mu\text{g/g FG}$ . Unter  $50 \mu\text{M Cd}$  wurde die maximale Zunahme mit  $150,6 \mu\text{g/g FG}$  gegenüber der Kontrolle am 6. Tag erreicht. Unter  $100 \mu\text{M Cd}$  betrug diese am 10. Tag  $281,7 \mu\text{g/g FG}$ .  $25 \mu\text{M Cd}$  führten, außer am 3. Tag, zu keiner signifikanten Erhöhung des GSTH-Pools.



**Abb. 38:** Gesamtthiolgehalte in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit  $100 \mu\text{M Cd}$ ,  $n=3$ , Angaben als GSH-Äquivalente.

Der GSTH-Gehalt lag um den Faktor 1,5 - 2,2 über dem Gehalt an GSH (auf Grundlage der GSH-Äquivalente). Diese Mengen an Restthiolen können weder auf den Gehalt an Cys,  $\gamma$ -EC noch auf die Synthese von PCs zurückgeführt werden, da die Summe dieser Verbindungen unter Cd-Einfluß lediglich 20 - 25  $\mu\text{g/g FG}$  (GSH-Äquivalente) beträgt.

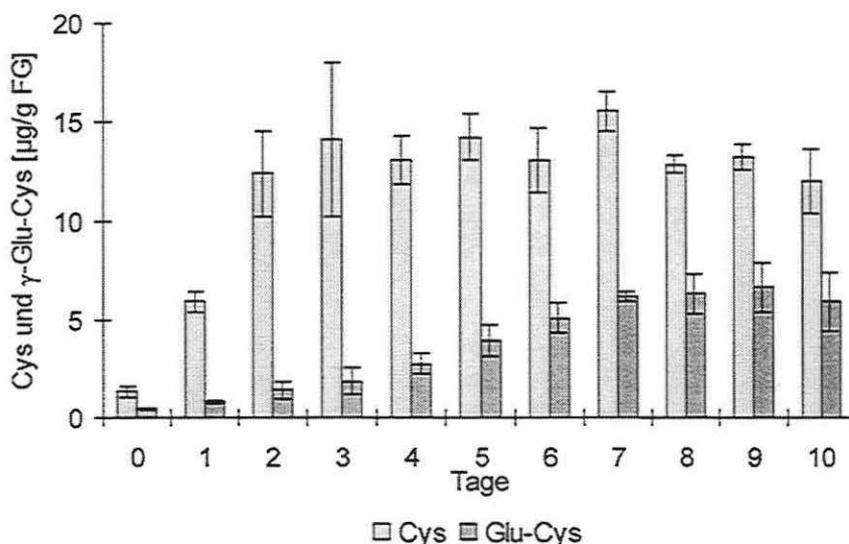
Möglicherweise kommt auch  $\text{S}^{2-}$  unter Schwermetallbelastung in Moosen vor. Die Biosynthese von Cd-S-Komplexen wurde erstmals in dem Pilz *Schizosaccharomyces pombe* nachgewiesen (REESE und WINGE, 1988) und auch in *Candida glabrata* wurden Cd-S-Komplexe gefunden (MEHRA et al., 1994). Da Cd-S-Komplexe auch in Wurzeln und Blättern von Tomatenpflanzen vorkommen, ist ihre Bildung unter Assoziation von PCs vermutlich auch in Pflanzen eine generelle Reaktion auf hohe Cd-Konzentrationen (REESE et al., 1992). Es wird angenommen, daß  $\text{S}^{2-}$  eine stabilisierende Wirkung auf

Cd-PC-Komplexe hat (REESE und WINGE, 1988). Detaillierte Untersuchungen zur Bildung dieser Komplexe liegen an *Silene vulgaris* und *Rauvolfia serpentina* vor (KNEER und ZENK, 1997).

Bei Messungen des GSTH-Gehaltes mit den hier verwendeten Methoden, muß allerdings berücksichtigt werden, daß auch pflanzliche Sekundärstoffe, wie z.B. Coumarinverbindungen mit DTNB reagieren können (vergl. Kap. 4.6.).

#### 4.7.3. Cystein und $\gamma$ -EC

Während 10 Tagen unter 100  $\mu$ M Cd stiegen die Gehalte an Cys und  $\gamma$ -EC ebenfalls an (Abb. 39, GSH nicht dargestellt). Der Cys-Gehalt nahm bis zum 3. Tag von 1,4  $\mu$ g/g FG auf 14,1  $\mu$ g/g FG zu. Im folgenden schwankte dieser um einen Mittelwert von  $13,5 \pm 1,0$   $\mu$ g/g FG. Auch  $\gamma$ -EC war während dieses Versuches in allen Proben nachweisbar. Der Gehalt dieses Peptides stieg kontinuierlich bis zum 9. Tag von 0,45  $\mu$ g/g FG auf 6,7  $\mu$ g/g FG und fiel dann am 10. Tag leicht ab.



**Abb. 39:** Cys und  $\gamma$ -EC-Gehalte in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Medium mit 100  $\mu$ M Cd, n=3, Angaben als GSH-Äquivalente.

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

Das Fehlen bzw. die sehr geringen Mengen an  $\gamma$ -EC in *F. antipyretica* könnten auf einen starken

Turnover dieses Peptides im Zusammenhang mit der GSH-Synthese zurückzuführen sein. Allein anhand der geringen Mengen dieses Peptides kann nicht auf eine verminderte Synthese in *F. antipyretica* geschlossen werden. Aufgrund des starken GSH-Anstiegs unter Cd-Belastung ist auch von einer Erhöhung der  $\gamma$ -EC-Synthese unter diesen Bedingungen auszugehen. In den unbelasteten Kontrollen war entweder kein  $\gamma$ -EC nachweisbar oder die Mengen waren mit 0,45  $\mu\text{g/g}$  FG nur gering.

#### **4.8. Einfluß von Cd auf den Stickstoffmetabolismus von *F. antipyretica***

Stabile Isotope wurden zur Untersuchung der Wirkung von Schadstoffen und Umweltprobematerialien auf den pflanzlichen N-Metabolismus schon vielfach eingesetzt (JUNG et al., 1981, 1994, 1999; MÖCKER et al., 1996, 1998; HAFNER et al., 1999, in press).

Zur Untersuchung des Einflusses von Cd auf den Stickstoffmetabolismus von Moosen wurden zunächst  $^{15}\text{N}$ -Tracerversuche ausgehend von  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  (50 At.-%  $^{15}\text{N}$ ) und einer Belastung von 100  $\mu\text{M}$  im Nährmedium durchgeführt.

Der Gesamtstickstoffgehalt des Moores liegt über den gesamten Versuchszeitraum hinweg bei Werten zwischen 3-3,9 % (Tab. 7). Er verändert sich nicht durch Cd-Streß. Zwei Stunden nach Versuchsbeginn ist die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit in der Nichtproteinfraktion (NPN) und der Proteinfraktion (PN) beider Versuchsansätze nahezu gleich. Nach zwei Tagen wird der Einfluß von Cd anhand der verringerten Tracerstickstoffkorporation in die N-Fractionen deutlich. Die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit beträgt unter Einfluß von 100  $\mu\text{M}$  Cd nur 50 % der Häufigkeit der Kontrolle.

**Tab. 7:**  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeiten (at.-% exc.) in *F. antipyrretica* während der Inkubation in Medium mit 100  $\mu\text{M}$  Cd sowie in den Kontrollen.

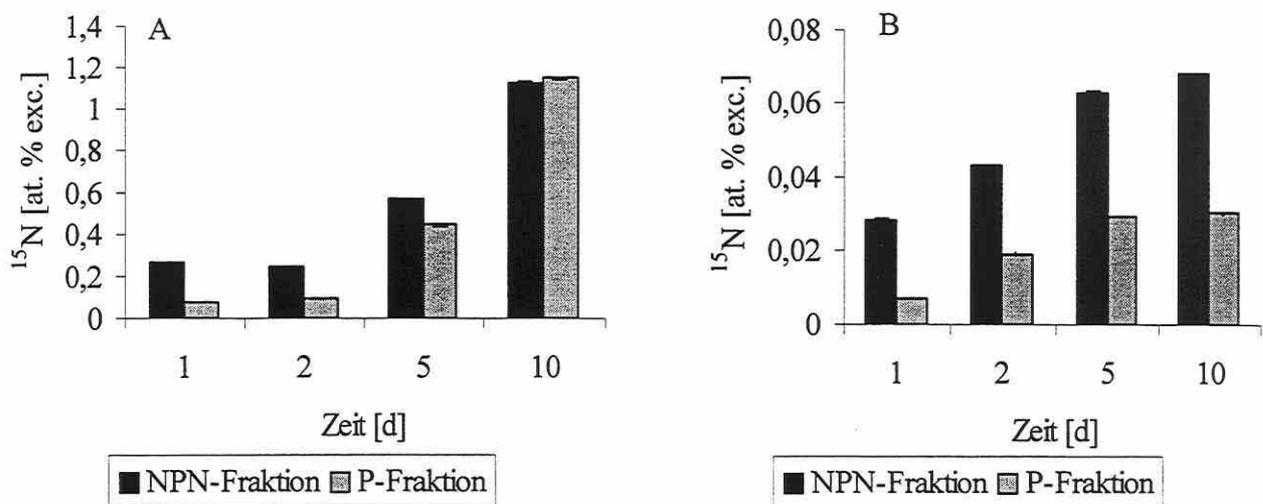
Probe	Gesamtstickstoff		NPN-Fraktion	P-Fraktion
	[% N]	[ $^{15}\text{N}$ at.-%exc.]	[ $^{15}\text{N}$ at.-%exc.]	[ $^{15}\text{N}$ at.-%exc.]
K 2 h	3,86	0,002	0,011	0,023
K 2 d	3,04	0,040	0,057	0,053
Cd 2 h	3,50	0,006	0,024	0,025
Cd 2 d	3,66	0,020	0,033	0,029

Aufgrund der relativ geringen  $^{15}\text{N}$ -Anreicherungen der Moospflanzen bei den Versuchen mit 50 At.-% wurden im folgenden die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeiten des  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  auf 95 At.-% und die Schwermetallkonzentration auf 200  $\mu\text{M}$  Cd erhöht.

In Abb. 40 ist der zeitliche Verlauf der  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation in die Nichtprotein-Stickstofffraktion (NPN-Fraktion), die im wesentlichen die Aminosäuren enthält und die Proteinfraktion der Moose bei Cd-Belastung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen darstellt.

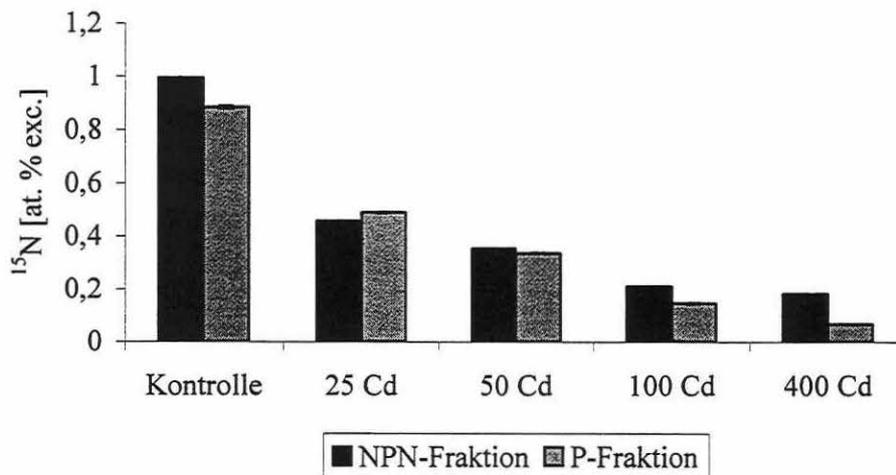
**Abb. 40:** Inkorporation von  $^{15}\text{N}$  in *F. antipyrretica* bei 10tägiger Belastung mit Cd

A...Kontrolle, B...200  $\mu\text{M}$  Cd



Dabei wird deutlich, dass unter Schwermetallstress eine signifikante Hemmung des  $^{15}\text{N}$ -Einbaus in die pflanzlichen N-Fractionen auftritt. Während nach fünf Tagen bei den Kontrollpflanzen die  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeiten in der NPN-(Precursor-)Fraktion und der Proteinfraction nahezu ausgeglichen sind, ist unter Cd-Einfluß auch nach 10 Tagen noch eine Inhibierung der Proteinsynthese nachweisbar. Insgesamt findet man nach dieser Zeit unter Cd-Stress eine  $^{15}\text{N}$ -Inkorporation von nur 6% in die NPN-Fraction und 3 % in die Proteinfraction im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollpflanzen.

Abb. 41 zeigt den Einbau des Tracerstickstoffs in *F. antipyretica* nach fünftägiger Belastung mit Cd verschiedener Konzentration. Es ist eine konzentrationsabhängige Verringerung der Inkorporation des markierten N in beide Fractionen zu erkennen. Auch die Hemmung der Protein-Biosynthese erweist sich von der Cd-Konzentration des Mediums abhängig. Während sich die Häufigkeit von  $^{15}\text{N}$  in NPN- und P-Fraction bis zu 50  $\mu\text{M}$  Cd nicht unterscheidet, ist der Tracereinbau in der Protein-Fraction bei höheren Konzentrationen deutlich geringer.



**Abb. 41:** Einbau von  $^{15}\text{N}$  in *F. antipyretica* nach fünftägiger Belastung mit Cd verschiedener Konzentration (0-400  $\mu\text{M}$  Cd)

#### 4.9. Natürliche Variationen der stabilen Stickstoffisotope in terrestrischen Freilandmoosen

An vier unterschiedlichen Standorten der Region Hohenturm-Salzmünde wurden an Laubmoosen (*Scleropodium*) im Vergleich zu einem Referenzstandort am Stechlinsee (nahe Menz) die natürlichen  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse bestimmt (Tab. 8).

Da Laubmoose Nährstoffe und Wasser überwiegend aus atmosphärischen Quellen nutzen, erscheinen sie geeignet, anthropogene Stickstoffeinträge über die Änderung ihrer natürlichen Stickstoffisotopenverhältnisse ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratios,  $\delta\text{-}^{15}\text{N}$ -Werte) anzuzeigen (JUNG, et. al., 1997; HOFMANN et al., 1997).

**Tab. 8:**  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratios ( $\delta\text{-}^{15}\text{N}$ -Werte) von *Scleropodium* unterschiedlicher Standorte

Standort	Salzmünde		Hohenturm I		Hohenturm II		Hohenturm III		Referenzstandort Menz Mittel von 5 Flächen (n=15)
	Pr 1	Pr 2	Pr 1	Pr 2	Pr 1	Pr 2	Pr 1	Pr 2	
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ [‰]	-2,85	-2,50	-3,66	-3,80	-5,34	-5,57	-5,09	-5,04	-8,35
$\pm s$	0,15	0,01	0,06	0,03	0,09	0,10	0,09	0,10	0,1

Pr = Probe

Im Ergebnis der Untersuchungen kann festgestellt werden:

- Die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der unterschiedlichen Standorte stimmen innerhalb der Probenahmen gut überein.
- Signifikante Unterschiede ergeben sich sowohl zwischen den regionalen Standorten als auch zwischen diesen und den relativ unbelasteten Referenzstandorten am Stechlinsee (Menz), welche auf unterschiedliche N-Belastungen (Einträge) zurückzuführen sind.

Mehr positive  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratios ( $\delta$ -Werte) sind im wesentlichen das Ergebnis von Belastungen mit oxidierten N-Verbindungen aus Verbrennungsprozessen (industrielle Quellen, Straßenverkehr).

Die Untersuchungen zeigen, daß *Scleropodium* im Hinblick auf die Analyse seiner Stickstoffisotopen-Verhältnisse ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratios,  $\delta\text{-}^{15}\text{N}$ -Werte) als Bioindikationssystem anthropogener N-Belastungen geeignet ist. Eine Identifikation atmosphärischer Stickstoffquellen ist möglich.

#### **4.10. Einfluß von Umweltfaktoren (Schwefelernährung) auf die Synthese thiolhaltiger Verbindungen**

Die Laboruntersuchungen zur Induktion thiolhaltiger Verbindungen wurden auch in Bezug auf die Schwefelernährung durchgeführt, da GSH in den Mooszellen aus Cys und  $\gamma\text{-EC}$  synthetisiert wird und Cys wiederum ein Produkt der Sulfatassimilation darstellt. Als besonders geeignet für diese Untersuchungen erwies sich das Wassermoos *F. antipyretica*, da es an ein wässriges Außenmedium angepaßt ist und auch unter natürlichen Bedingungen die Nährstoffaufnahme hieraus erfolgt.

Der Einfluß des Schwefelangebotes auf die Toxizität von Cd wurde bereits bei *Triticum aestivum* (P.J. MCMAHON et. al, 1998) und *Hordeum vulgare* (Y. CHEN et. al, 1997) untersucht. Deutliche Effekte in Bezug auf Vitalität und Wachstum der Pflanzen zeigten sich hier bereits bei Sulfat-

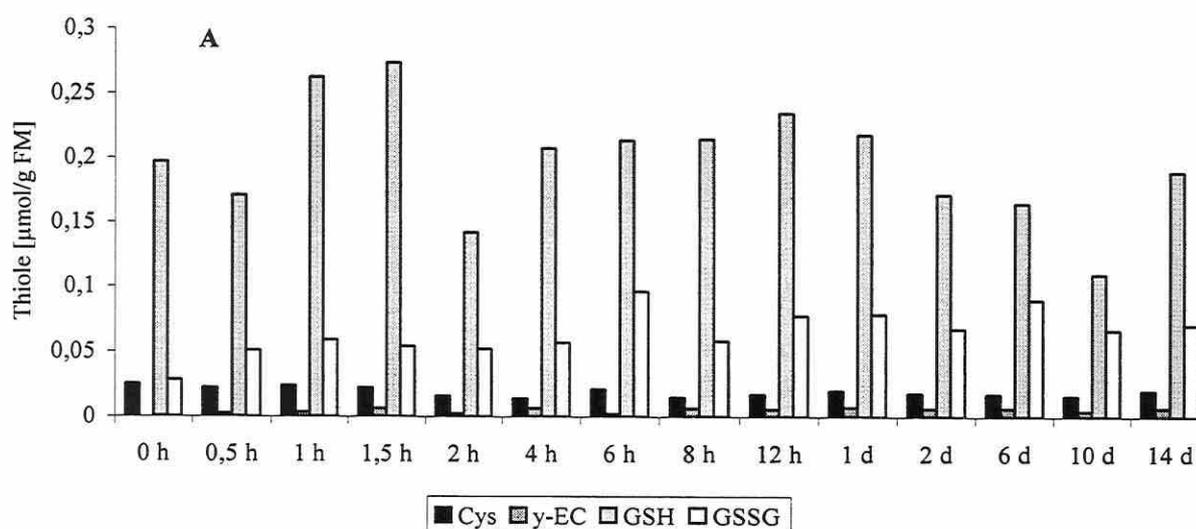
Konzentrationen von weniger als 100  $\mu\text{M}$  im Nährmedium und gleichzeitiger Cd-Belastung. Die Kultivierung des Wassermooses findet in Knop-Lösung mit einer Sulfat-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  statt. Vitalitätsuntersuchungen von Kontrollen zeigen keine Effekte durch möglichen S-Mangel.

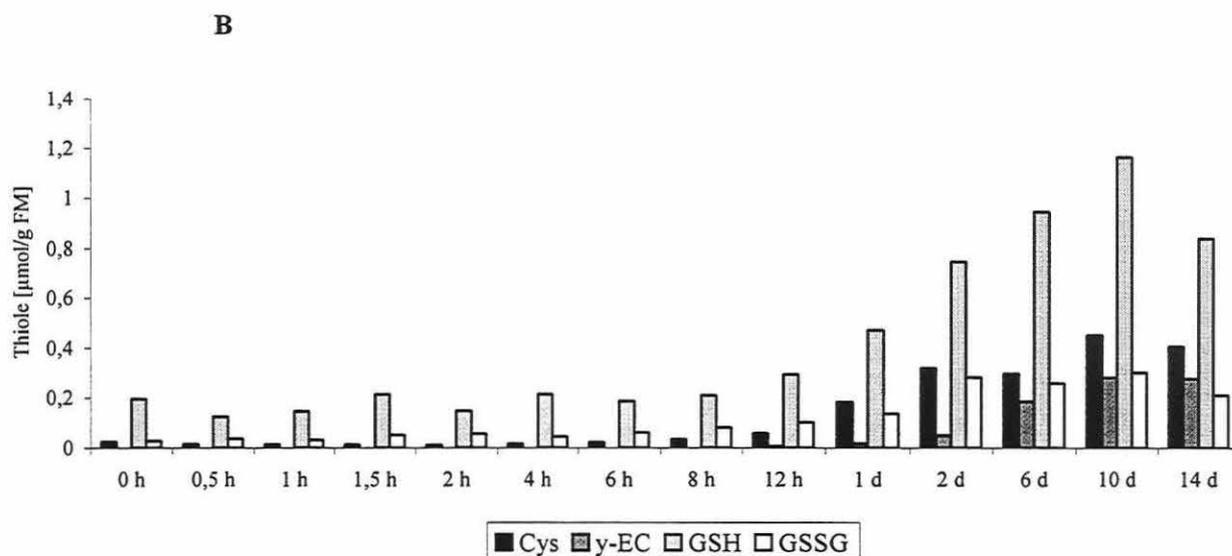
Deshalb wurden die folgenden Untersuchungen zur Aktivierung des S-Metabolismus bei Cd-Stress mit Nährmedium ohne Sulfat durchgeführt.

In Abb. 42 und 43 sind Thiol- und Sulfatgehalt in *Fontinalis antipyretica* dargestellt, wobei das Moos in Knop-Lösung ohne Sulfat und mit/ohne Cd inkubiert wurde. Im Medium wurde über den gesamten Zeitraum kein Sulfat nachgewiesen.

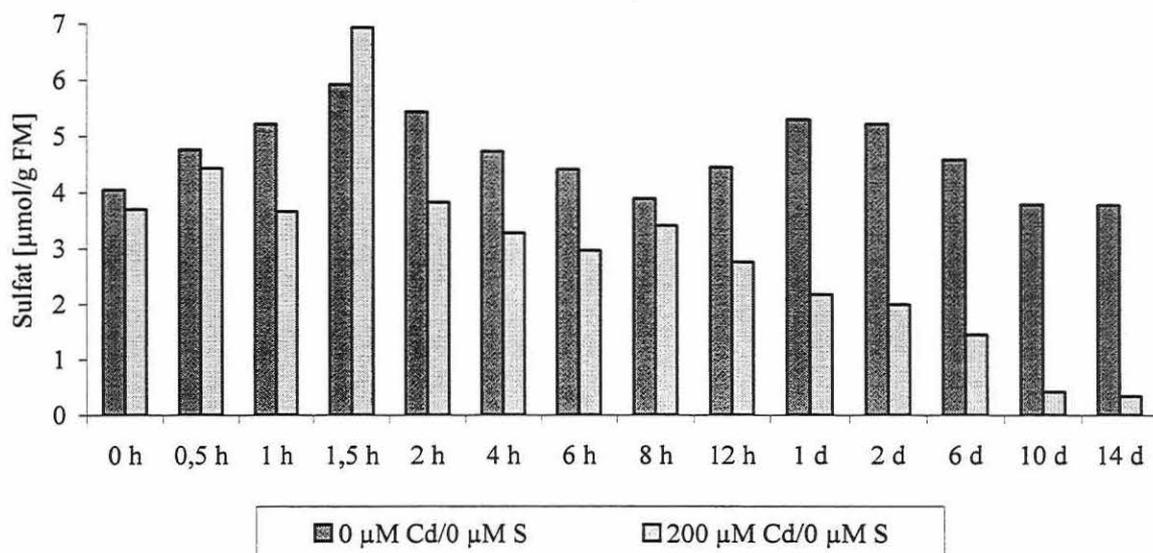
Der Thiol- und Sulfatgehalt im unbelasteten Moos (Abb. 42 A, 43) zeigt bei Kultivierung ohne Sulfat über den gesamten Versuchszeitraum keine starken Veränderungen, es kommt zu natürlichen Schwankungen innerhalb bestimmter Grenzen. Cystein,  $\gamma$ -Glutamylcystein und GSSG liegen in nur geringen Mengen vor.

Unter Cd-Belastung (Abb. 42 B) kommt es zur Erhöhung des Glutathion-, aber auch des Cystein-,  $\gamma$ -Glutamylcystein- und GSSG-Spiegels. Diese Neusynthese der Thiole ist mit einem Verbrauch von Sulfat im Moos gekoppelt (Abb. 43). Der Sulfatgehalt in am Standort gesammelten *Fontinalis antipyretica*-Pflanze liegt zwischen 3 und 4,5  $\mu\text{mol/g}$  FM. Diese Menge ist ausreichend, um bei einer Cd-Belastung Glutathion zu synthetisieren, ohne daß Sulfat aus dem Nährmedium aufgenommen werden muss. Nach 10tägiger Inkubation mit 200  $\mu\text{M}$  Cd liegt der Sulfatgehalt im Moos noch bei 0,4-1  $\mu\text{mol/g}$  FM (Abb. 43).





**Abb. 42:** Gehalt an Thiolen in *Fontinalis antipyretica* mit unterschiedlichem Sulfatangebot im Nährmedium  
 A...0 μM Cd/0 μM Sulfat      B...200 μM Cd/0 μM Sulfat



**Abb. 43:** Gehalt an Sulfat in *Fontinalis antipyretica* mit unterschiedlichem Sulfatangebot im Nährmedium

Um eine Aktivierung des Schwefelstoffwechsels deutlicher zu machen, wurde das Moos an Sulfat verarmt und dann mit Cd exponiert. In einem Zeitraum von 38 Tagen sinkt der Sulfatgehalt im Moos von 3,1 auf 0,77 μmol/g FM, ein Viertel der Ausgangskonzentration (Abb. 44). Auch die GSH-Menge in den Zellen nimmt ab, von 0,28 auf 0,15 μmol/g FM am 10. Tag (Abb. 45), jedoch war nach dem 10. Tag keine weitere signifikante Abnahme festzustellen. Um eine Reaktion des Schwefelstoffwechsels auszulösen, wurde nun Cd und/oder Sulfat zugegeben.

Erfolgt die Gabe von Sulfat, wird der Sulfatpool in den Zellen wieder aufgefüllt (Abb. 46). Er steigt bei unbelastetem Moos innerhalb von 1 Tag auf 2,9  $\mu\text{mol/g FM}$  ( $n=3$ ) an und erreicht damit den Ausgangsgehalt an Sulfat. Auch der GSH-Spiegel erhöht sich wieder, ein Maximum wird nach 1 Tag erreicht (0,433  $\mu\text{mol/g FM}$ ,  $n=3$ ) (Abb. 47). Im weiteren Verlauf sinkt er auf 0,19  $\mu\text{mol/g FM}$  ab (22 Tage).

Wird das Moos zusätzlich mit Cd belastet (Abb. 46), steigt der Sulfatgehalt bis zum 2. Tag auf 3,44  $\mu\text{mol/g FM}$  an, sinkt dann jedoch auf 1,15  $\mu\text{mol/g FM}$  ab. Das geht einher mit einer kontinuierlichen Neusynthese von GSH auf 0,337  $\mu\text{mol/g FM}$  am 1. Tag bzw. 1,9  $\mu\text{mol/g FM}$  am 22. Tag (Abb. 46). Dies zeigt einerseits eine verstärkte Aufnahme von Sulfat nach Mangelbedingungen zur Auffüllung des zelleigenen Pools - Sulfat wird auch bei der Aminosäure- und Proteinbiosynthese benötigt. Andererseits wird bei Cd-Streß die Sulfatassimilation zur GSH-Synthese in hohem Maße aktiviert. Nach einem Tag ist der GSH-Gehalt der belasteten Probe ca. doppelt so hoch wie bei der Kontrolle (ohne Cd/mit Sulfat), nach 22 Tagen sogar 10fach höher.

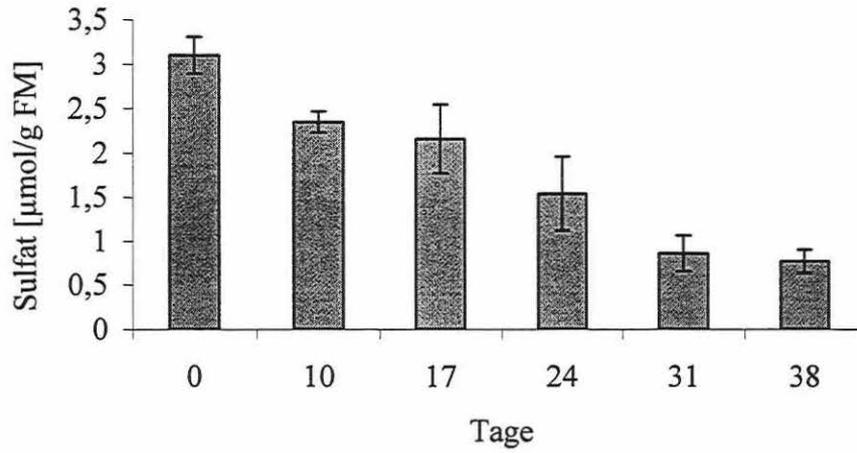
Wird das Pflanzenmaterial weiter ohne Sulfat belassen, sinkt der Sulfatgehalt bei der unbelasteten Probe auf 0,25  $\mu\text{mol/g FM}$  ab (22 Tage, insgesamt 60 Tage Sulfatmangel) (Abb. 46). Auch der GSH-Spiegel nimmt nun deutlich ab, er beträgt zum Versuchsende 0,027  $\mu\text{mol/g FM}$  (Abb. 47).

Bei belastetem Moos (Abb. 46) sinkt der Sulfatgehalt stärker ab, da die Pflanzen auf den Cd-Streß, trotz des niedrigen Sulfatspiegels, mit einer verstärkten Synthese von GSH reagieren (Abb. 47). Der Schwefelmetabolismus wird auch hier aktiviert. Da aber nicht so viel Sulfat zur Verfügung steht, steigt der GSH-Gehalt nur bis zum 3. Tag (0,45  $\mu\text{mol/g FM}$ , das 4,5fache der Kontrolle – ohne Cd/Sulfat), um dann auf 0,14  $\mu\text{mol/g FM}$  abzusinken (22. Tag) (Abb. 47). Dies entspricht den Werten in unbelastetem Moos (nach 1d bei 10 °C). Die Sulfatmenge vermindert sich in dieser Zeit auf einen minimalen Wert von 0,07  $\mu\text{mol/g FM}$  (Abb. 46). Da nicht mehr genügend Sulfat für die GSH-Synthese zur Verfügung steht, kann Cd nicht mehr in genügendem Umfang detoxifiziert werden

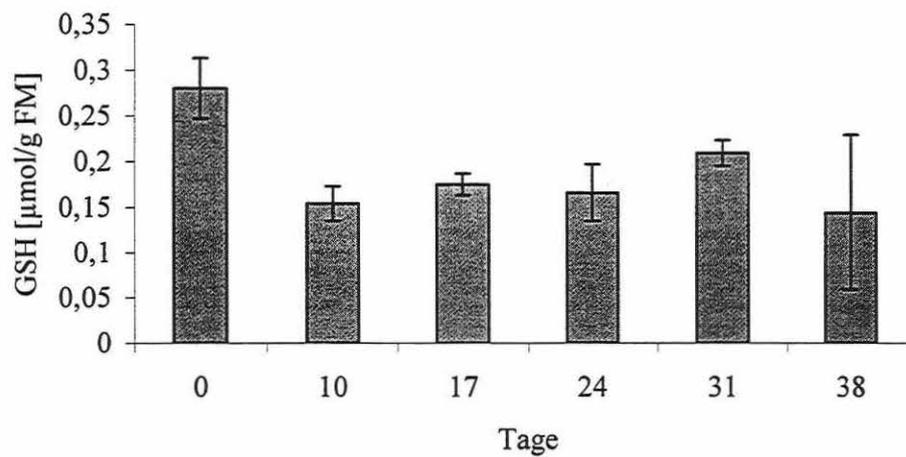
Nach Sulfatmangel-Bedingungen reagiert *Fontinalis antipyretica* bei Gabe von Sulfat mit einer aktiven Aufnahme dieses Nährstoffes. Das Moos reagiert auf Cd-Streß mit einer Aktivierung der Schwefelassimilation, nach Sulfatzugabe ist dies in einem stärkeren Grad möglich.

Erste Untersuchungen der Chlorophyll-Fluoreszenz als Parameter für die Vitalität des Mooses zeigen innerhalb von 8 Tagen nach 38 Tagen Sulfatmangel deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsreihen (Daten nicht gezeigt). Während bei Sulfatmangel die Vitalität auf ca. 80-70 % absinkt, kann sich nach Zugabe von Sulfat das Moos wieder erholen, die Fluoreszenz steigt auf 100 % an. Bei Belastung mit Cd ist Moos, welches zusätzlich mit Sulfat versorgt wird, eher in der Lage auf diese Stress-Situation zu reagieren. Die Vitalität sinkt zwar innerhalb von 8 Tagen auf Werte von 50 %, ist aber im Gegensatz zu 10 % bei belastetem Moos ohne Sulfat deutlich höher.

Dies unterstreicht die wichtige Rolle des Sulfats für eine verstärkte Assimilation als Voraussetzung für eine erhöhte GSH-Biosynthese bei Cd-Exposition.



**Abb. 44:** Sulfat-Spiegel in *Fontinalis antipyretica* während Inkubation in Knop-Medium ohne Sulfat



**Abb. 45:** GSH-Spiegel in *Fontinalis antipyretica* während Inkubation in Knop-Medium ohne Sulfat

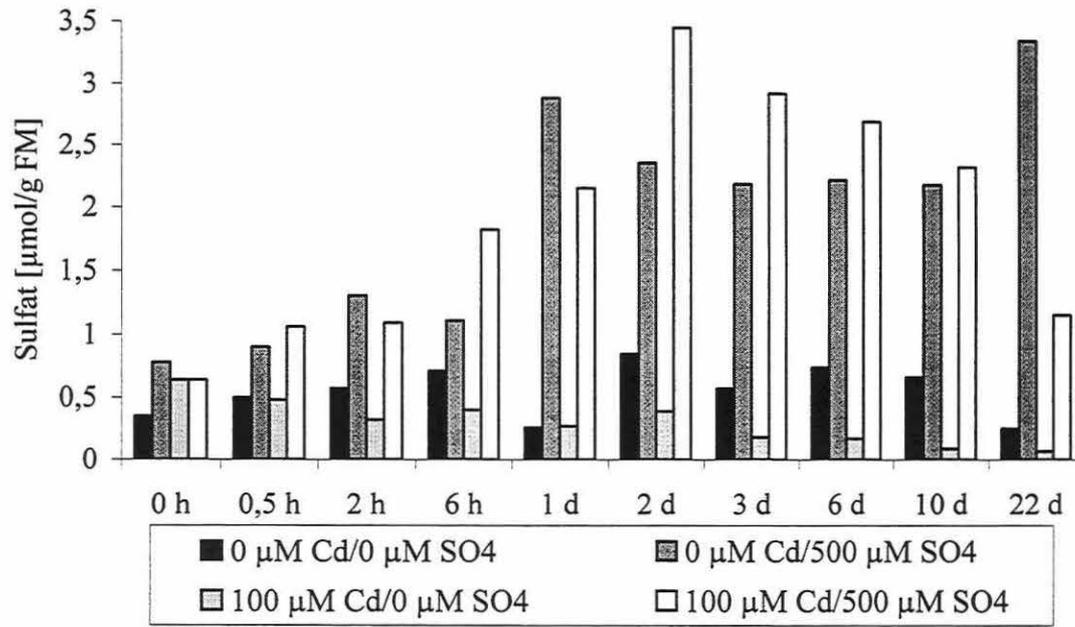


Abb. 46: Sulfat-Gehalt in *Fontinalis antipyretica* nach Zugabe von Cd und/oder Sulfat

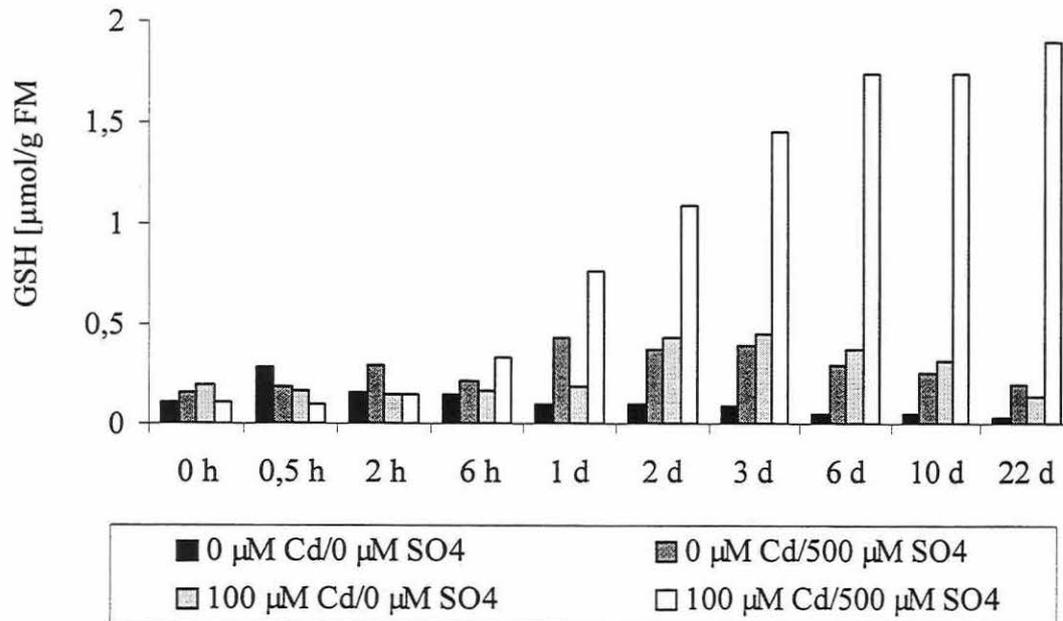


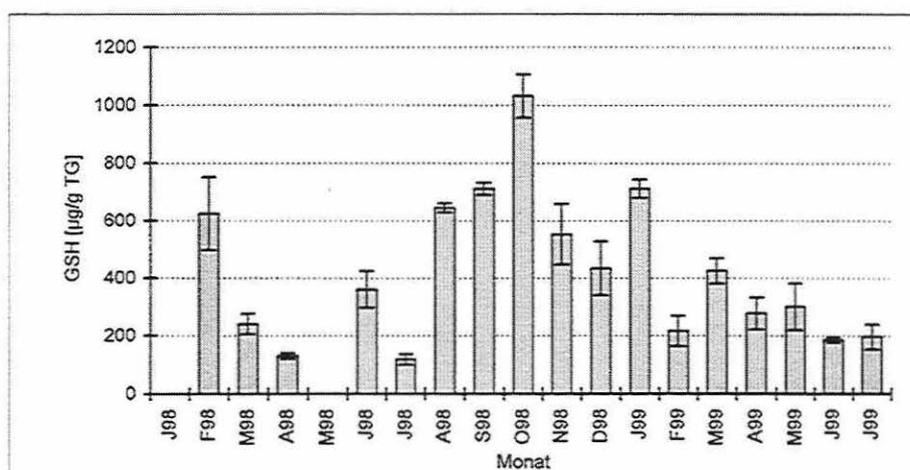
Abb. 47: GSH-Gehalt in *Fontinalis antipyretica* nach Zugabe von Cd und/oder Sulfat

#### 4.11. Thiolgehalte in Freilandmoosen

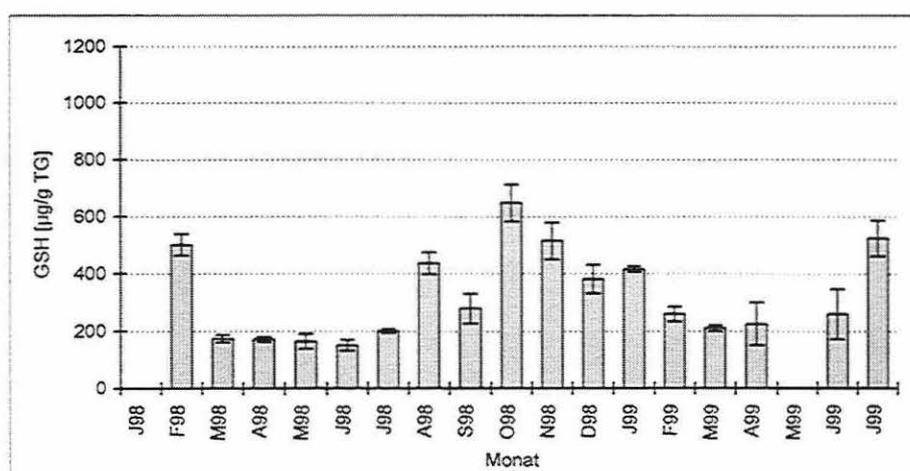
Die während der Langzeitbeobachtung entnommenen Moose der Standorte Hohenthurm 1, Hohenthurm 2, Hohenthurm 3, Petersberg und Salzmünde wurden auf ihren Gehalt an GSH,  $\gamma$ -EC und Cys untersucht. Die Analysen wurden nach der in Kap. 3.13. beschriebenen Methode durchgeführt.

Es wurden pro Probe 3 Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind auf das Trockengewicht der Moose umgerechnet. Die Proben aus dem Jahr 1997 sind nicht aufgeführt. Aufgrund von saisonalen Einflüssen (Schnee, extreme Trockenheit, oder eine starke Krautschicht am Standort) war es an einigen Terminen nicht möglich, alle Standorte zu beproben.

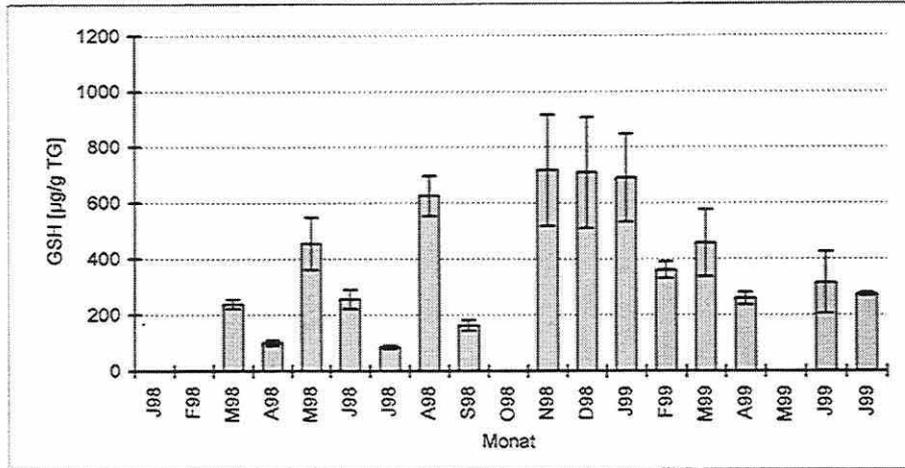
##### 4.11.1. GSH-Gehalt



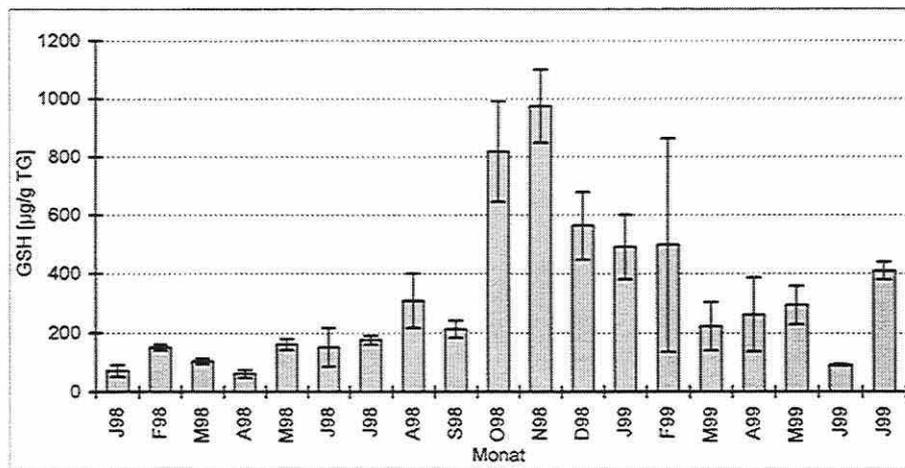
**Abb. 48:** GSH-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 1, F98=Februar 1998 usw.; J98 und M98 nicht gemessen; n=3.



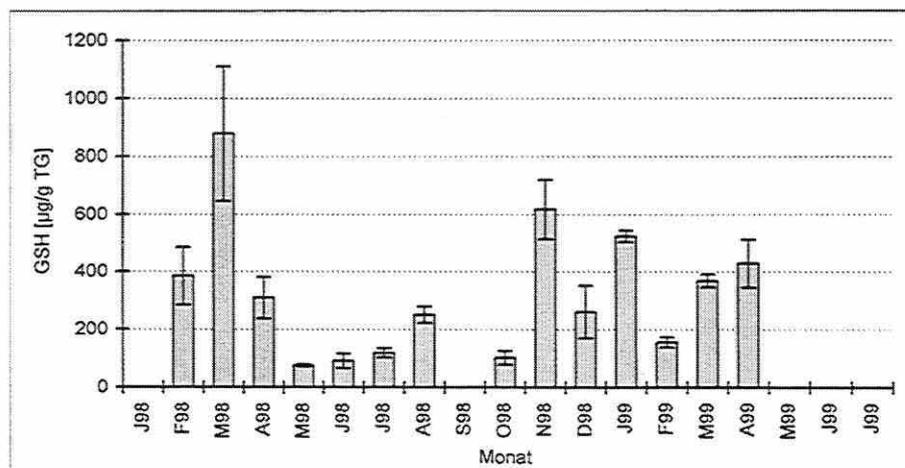
**Abb. 49:** GSH-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 2, F98=Februar 1998 usw.; J98 und M99 nicht gemessen; n=3.



**Abb. 50:** GSH-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 3, F98=Februar 1998 usw.; J98, F98, O98 und M99 nicht gemessen; n=3.



**Abb. 51:** GSH-Gehalte der Freilandproben am Standort Petersberg, F98=Februar 1998 usw.; n=3.

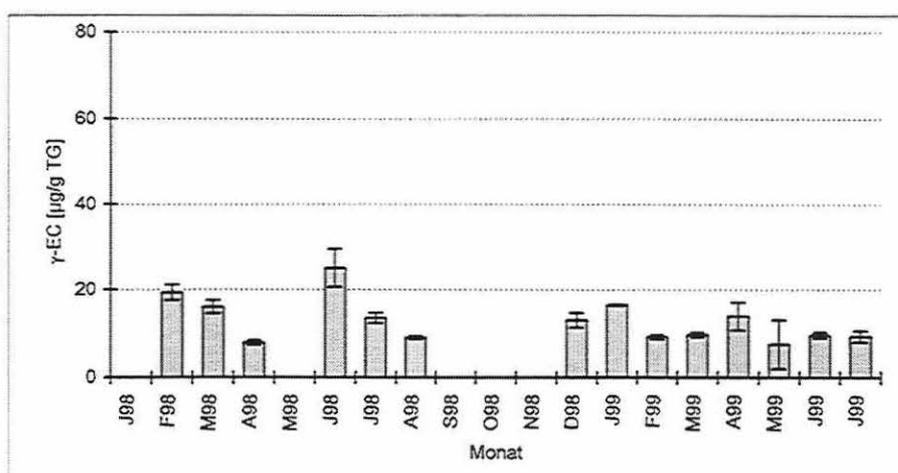


**Abb. 52:** GSH-Gehalte der Freilandproben am Standort Salzmünde, F98=Februar 1998 usw.; J98, S98, M99, J99 und J99 nicht gemessen; n=3.

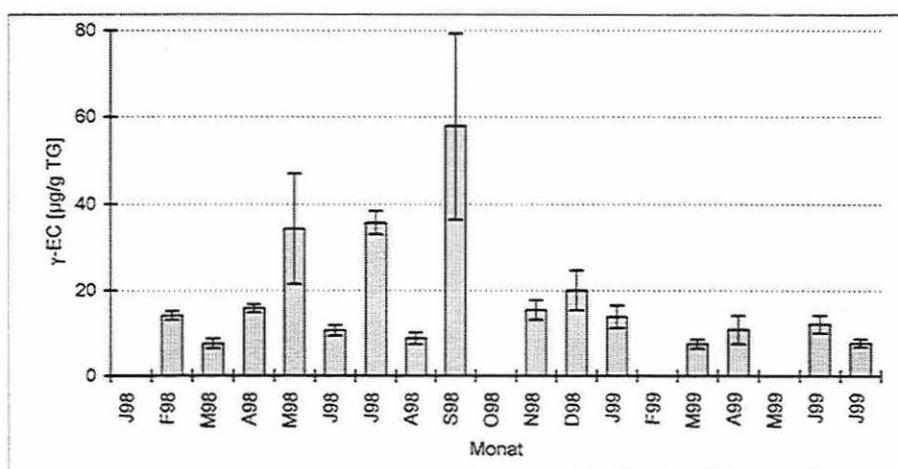
In allen untersuchten Proben konnten signifikante Mengen an GSH nachgewiesen werden. In den Herbst/Wintermonaten war ein deutlicher Anstieg der GSH-Gehalte an allen Standorten mit Ausnahme von Salzmünde zu erkennen. In den folgenden Monaten nahm dieser wieder auf das Niveau der vorangegangenen Sommermonate ab. Der Anstieg des GSH-Gehaltes in den kühleren Monaten kann möglicherweise auf die Funktion von GSH bei der Kältetoleranz zurückgeführt werden, wie sie von GRILL, 1992 und KRANNER und GRILL, 1996 beschrieben werden. Auf den Einfluß einzelner klimatischer Ereignisse wird in Kap. 4.17. eingegangen.

Insgesamt lagen die durchschnittlichen GSH-Gehalte der Standorte ähnlich: von  $317,1 \mu\text{g/g TG} \pm 246,8 (P)$  bis  $421,8 \mu\text{g/g TG} \pm 409,9$  (Hohenthurm 1), wobei die Streuungen bis zu 100% betragen (s. Anhang).

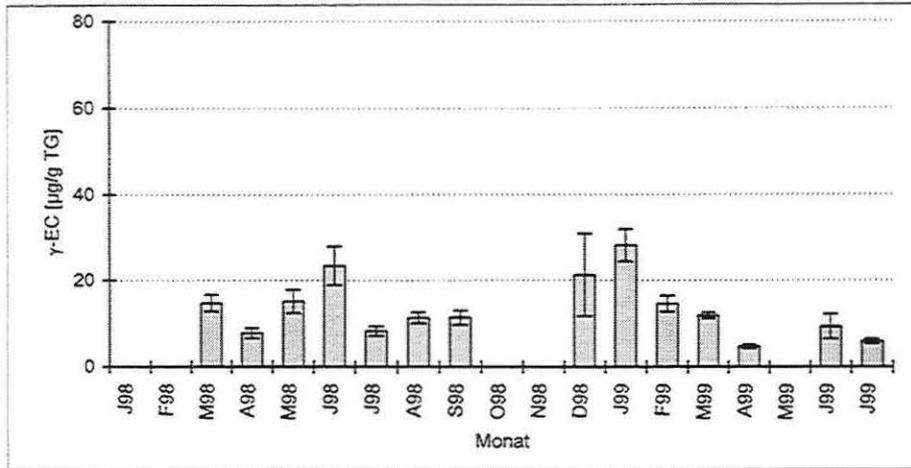
#### 4.11.2. $\gamma$ -EC-Gehalt



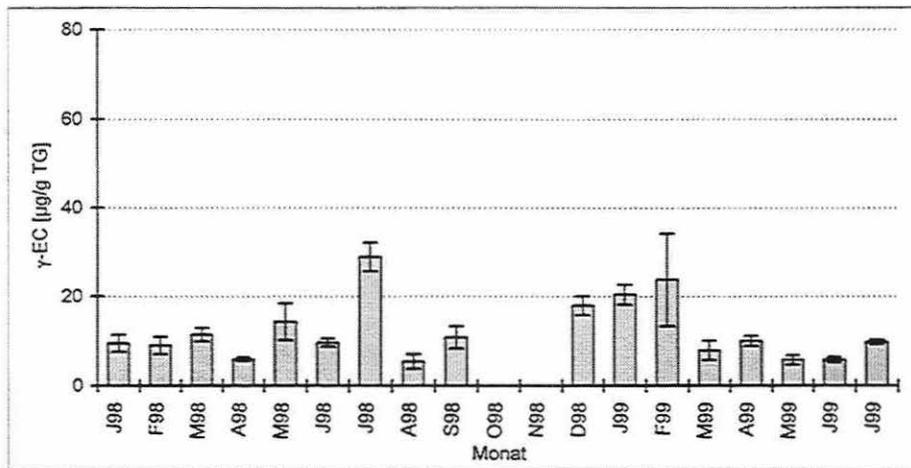
**Abb. 53:**  $\gamma$ -EC-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 1, F98=Februar 1998 usw.; J98 und M98 nicht gemessen; S98, O98 und N98 nicht nachgewiesen; n=3.



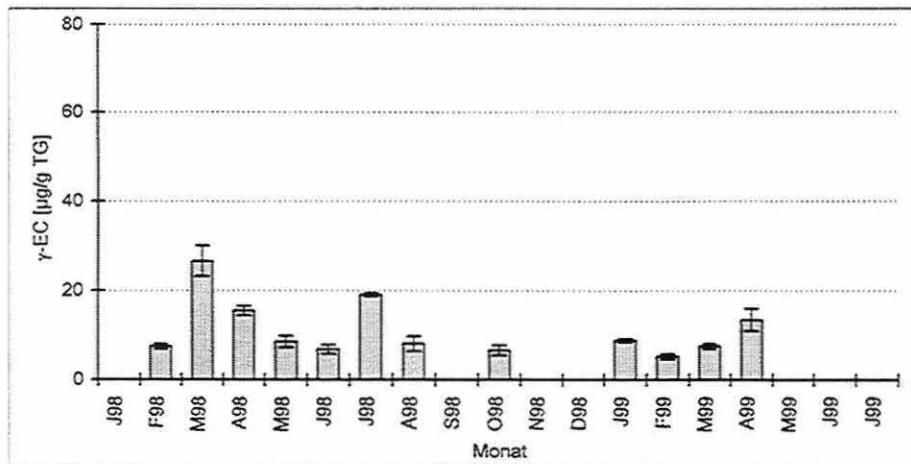
**Abb. 54:**  $\gamma$ -EC-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 2, F98=Februar 1998 usw.; J98 und M99 nicht gemessen; O98 und F99 nicht nachgewiesen; n=3.



**Abb. 55:**  $\gamma$ -EC-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 3, F98=Februar 1998 usw.; J98, F98, O98 und M99 nicht gemessen; N98 nicht nachgewiesen; n=3.



**Abb. 56:**  $\gamma$ -EC-Gehalte der Freilandproben am Standort Petersberg, F98=Februar 1998 usw.; O98 und N98 nicht nachgewiesen; n=3.

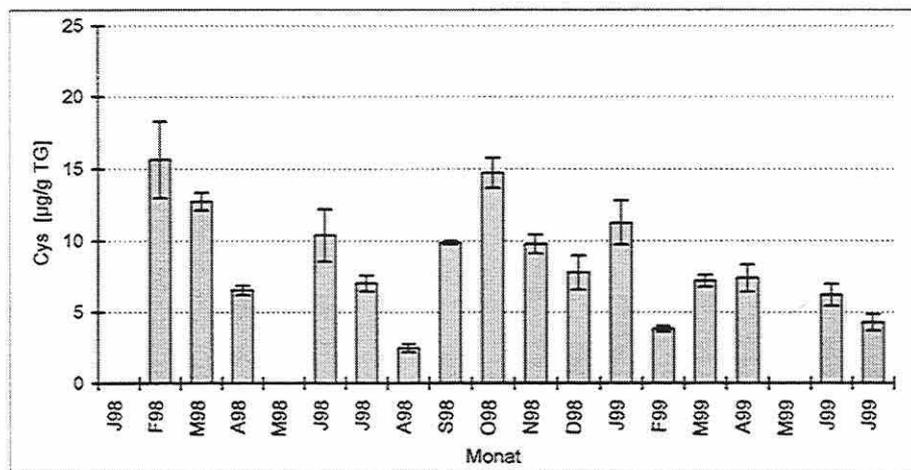


**Abb. 57:**  $\gamma$ -EC-Gehalte der Freilandproben am Standort Salzmünde, F98=Februar 1998 usw.; J98, S98, M99, J99 und J99 nicht gemessen; O98 und N98 nicht nachgewiesen; n=3.

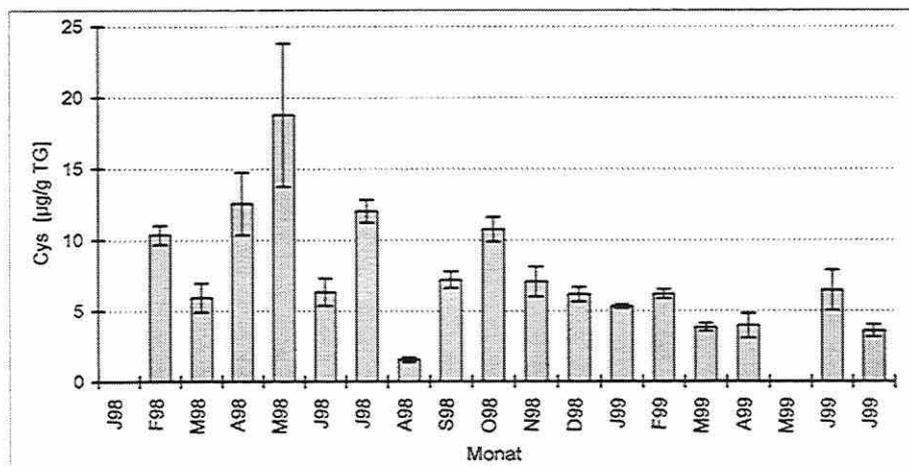
Die  $\gamma$ -EC-Gehalte der Proben weisen nicht den für den GSH-Gehalt beschriebenen Jahresgang auf. In den meisten Proben der Monate Oktober und November war kein  $\gamma$ -EC nachweisbar.

Inwieweit dies auf eine erhöhte GSH-Synthese zurückzuführen ist bleibt offen, da  $\gamma$ -EC wesentlich empfindlicher gegen Zersetzung während der Probenextraktion ist als GSH, wodurch zum Teil auch die hohen Standardabweichungen zu erklären sind. In Laboruntersuchungen an *F. antipyretica* (Kap. 4.7.3) zeigte sich, daß es zumindest bei diesem Moos zu einer Zunahme des  $\gamma$ -EC-Gehaltes unter erhöhter GSH-Synthese kommt. Eine Korrelation der  $\gamma$ -EC-Gehalte zu den GSH-Gehalten der Proben war nicht festzustellen. Die höchsten mittleren  $\gamma$ -EC-Gehalte wies das Moos des Standortes Hohenthurm 2 mit  $18,2 \mu\text{g/g TG} \pm 18,4$  und die niedrigsten das Moos vom Standort Salzmünde mit  $11,1 \mu\text{g/g TG} \pm 6,1$  auf.

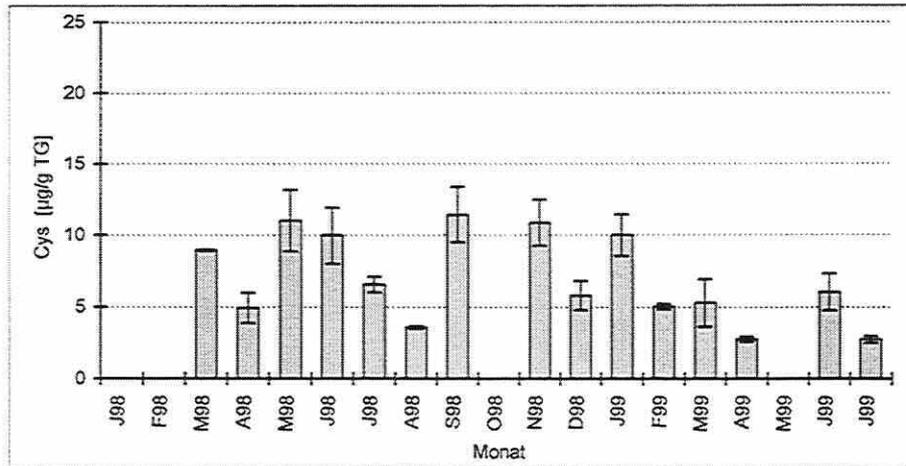
#### 4.11.3. Cystein-Gehalt



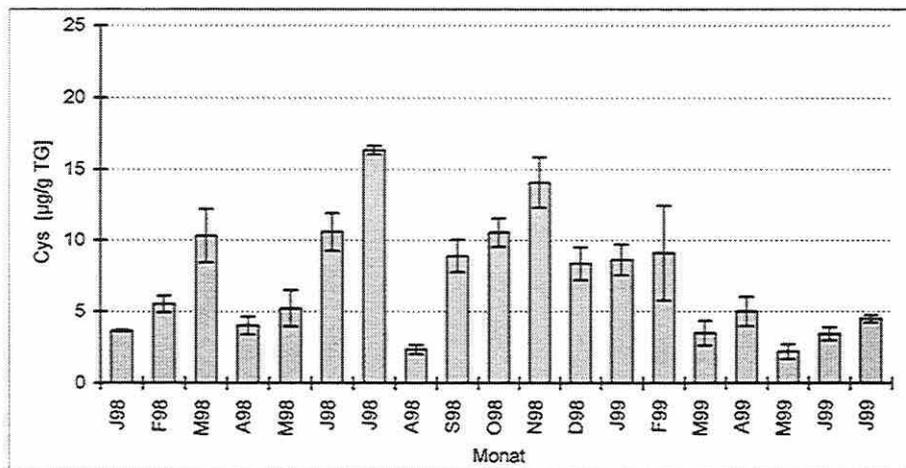
**Abb. 58:** Cys-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 1, F98=Februar 1998 usw.; J98 und M98 nicht gemessen; n=3.



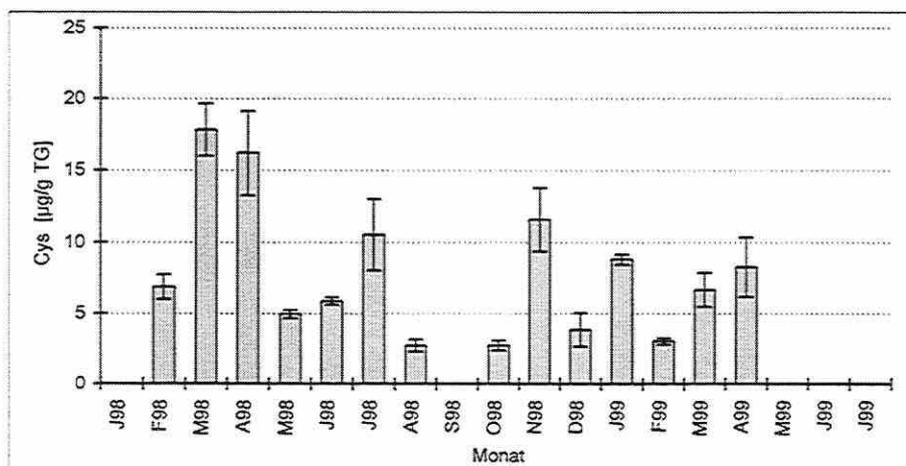
**Abb. 59:** Cys-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 2, F98=Februar 1998 usw.; J98 und M99 nicht gemessen; n=3.



**Abb. 60:** Cys-Gehalte der Freilandproben am Standort Hohenthurm 3, F98=Februar 1998 usw.; J98, F98, O98 und M99 nicht gemessen; n=3.



**Abb. 61:** Cys-Gehalte der Freilandproben am Standort Petersberg, F98=Februar 1998 usw.; n=3.



**Abb. 62:** Cys-Gehalte der Freilandproben am Standort Salzmünde, F98=Februar 1998 usw.; J98, S98, M99, J99 und J99 nicht gemessen; n=3.

Die mittleren Cys-Gehalte der Freilandpflanzen lagen mit  $7,0 \mu\text{g/g TG} \pm 3,0$  (Hohenthurm 3) bis maximal  $8,6 \mu\text{g/g TG} \pm 8,1$  (Hohenthurm 1) ca. 30-50 % unter dem Gehalt an  $\gamma$ -EC. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den Ergebnissen am aquatischen Moos *F. antipyretica* (BRUNS, 1997), bei dem im Laborversuch der  $\gamma$ -EC-Gehalt deutlich unter dem Cys-Gehalt lag. Eine Erklärung hierfür ist schwierig. Vermutlich handelt es sich um artspezifische Unterschiede. Signifikante saisonale Schwankungen des Cys-Gehaltes waren bei den Freilandproben nicht zu beobachten. Ebenso konnte keine Korrelation zu den GSH-Gehalten festgestellt werden.

#### 4.12. Interspezifische Vergleiche der biochemischen Reaktion auf Cd

Unterschiedliche Moosarten wurden im Labor auf ihre physiologisch/biochemische Reaktion auf Cd-Belastung untersucht.

Die Messungen erfolgten wie in Kap. 4.5.2. beschrieben. Aufgrund der Vielzahl von Arten war es nicht möglich, alle Spezies am selben Standort zu sammeln und zur gleichen Jahreszeit zu untersuchen.

Für einen Vergleich der "Thiolantwort" unterschiedlicher Arten auf Cd wurden lediglich die Arten *Scleropodium purum*, *Pleurozium schreberi*, *Hypnum cupressiforme* und *Rhytidiadelphus squarrosus* der Ordnung Hypnales herangezogen. Diese wurden zu selben Zeit am selben Standort (Nähe Hannover, Niedersachsen) gesammelt und im Labor unter den gleichen Bedingungen kultiviert.

**Tab. 9:** GSH-Gehalte in Moosarten bei Probenahme vom gleichen Standort sowie die Änderung des GSH-Gehaltes unter Einfluß von Cd. GSH [ $\mu\text{g/g FG}$ ]

Moosart	Ordnung	Kontrolle			100 $\mu\text{M Cd}$		
		Kulturdauer			Kulturdauer		
		2 Tage	4 Tage	10 Tage	2 Tage	4 Tage	10 Tage
<i>Scleropodium purum</i>	Hypnales	243,2	261,6	136,6	305,9	415,8	430,3
<i>Pleurozium schreberi</i>	Hypnales	98,3	101,9	97,3	145,1	234,8	335,5
<i>Hypnum cupressiforme</i>	Hypnales	71,8	57,9	50,3	64,1	108,0	134,1
<i>Rhytidiadelphus squarrosus</i>	Hypnales	222,7	252,8	208,4	201,7	296,5	462,3

Mit Ausnahme von *S. purum* und *R. squarrosus* zeigten alle Arten zu Beginn des Versuches unterschiedliche GSH-Gehalte in den Kontrollen. Alle Arten reagierten spätestens am 4. Tag nach Cd-Zugabe mit einem deutlichen Anstieg des GSH-Gehaltes. Mit Ausnahme von *H. cupressiforme* betrug die GSH-Zunahme in allen Arten ca.  $200 \mu\text{g/g FG}$ .

#### 4.13. Korrelation von Schwermetallgehalten als Summenparameter und physiologische Reaktion ('Thiolantwort')

Die Schwermetallgehalte der Freilandproben wurden den Thiolgehalten der Proben gegenüber gestellt. Eine Korrelation der beiden Parameter war jedoch nicht festzustellen. Die Schwermetallgehalte unterliegen offenbar saisonalen Schwankungen, wie sie auch bei MARKERT und WECKERT, 1989 festgestellt wurden. Ebenso gibt es auch bei den thiohaltigen Verbindungen GSH, Cys und  $\gamma$ -EC z. T. große Schwankungen.

#### 4.14. Auswirkungen von Cd-Belastungen auf unterschiedliche Moospezies

Es wurde in weiteren Versuchen überprüft, ob es auch bei anderen terrestrischen und aquatische Moosarten unter Cd zu einer Zunahme des GSH-Gehaltes kommt. Ebenso wurden die Arten auf Vorkommen und Induktion von PCs untersucht.

Tab. 10 zeigt die GSH-Gehalte verschiedener Moosarten während 2, 4 und 10 Tagen in Medium mit 100  $\mu$ M Cd sowie die entsprechenden Kontrollen.

**Tab. 10:** GSH-Gehalt unterschiedlicher Moosarten während 2,4 und 10 Tagen in Medium mit 100  $\mu$ M Cd sowie die entsprechenden Kontrollen. Die Werte sind Mittelwerte aus 2 Messungen; \* nicht gemessen; \*\* Pflanzenmaterial abgestorben; a = Verhältnis von Pflanzenmaterial zu Extraktionslösung 1 : 4, b = Pflanzenmaterial aus axenischer Laborkultur, c = 5  $\mu$ M Cd im Inkubationsmedium. Systematische Einordnung nach FRAHM und FREY, 1987.

Moosart	Ordnung	GSH [ $\mu$ g/g FG]					
		Kontrolle			100 $\mu$ M Cd		
		2 Tage	4 Tage	10 Tage	2 Tage	4 Tage	10 Tage
1. <i>Bartramia pomiformis</i> <sup>a</sup>	Bartramiales	16,6	*	37,3	25,4	*	71,1
2. <i>Brachythecium rutabulum</i>	Hypnales	70,1	45,6	54,6	157,5	256,5	223,1
3. <i>Coscinodon crispobrosus</i>	Grimmiales	31,7	39,2	25,1	57,0	65,6	97,7
4. <i>Dicranum scoparium</i>	Dicranales	4,1	6,6	7,8	8,0	15,4	10,6
5. <i>Homalia trichomanoides</i> <sup>a</sup>	Neckerales	51,2	*	85,7	131,9	*	220,0
6. <i>Hypnum cupressiforme</i>	Hypnales	71,8	57,9	50,3	64,1	108,0	134,1
7. <i>Leptobryum pyriforme</i> <sup>b</sup>	Bryales	23,2	24,1	18,6	59,6	64,0	50,8
8. <i>Marchantia polymorpha</i>	Marchantiales	6,7	7,4	2,7	5,2	8,2	2,7
9. <i>Mnium hornum</i>	Bryales	60,1	30,9	82,4	97,1	114,4	182,0
10. <i>Mnium undulatum</i>	Bryales	13,8	21,1	19,0	43,4	139,1	148,9
11. <i>Pellia epiphylla</i>	Metzgeriales	78,9	70,5	96,3	72,8	64,8	63,3
12. <i>Physcomitrella patens</i> <sup>b</sup>	Funariales	12,8	20,6	**	25,5	26,6	**
Zellkultur		*	43,5	*	81,4	125,5	*
13. <i>Pleurozium schreberi</i>	Hypnales	98,3	101,9	97,3	145,1	234,8	335,5
14. <i>Polytrichum formosum</i>	Polytrichales	72,6	95,2	95,9	44,9	99,4	103,7

15. <i>Polytrichum piliferum</i>	Polytrichales	16,8	14,5	20,9	61,9	48,1	38,5
16. <i>Rhynchostegium riparioides</i>	Hypnales	15,2	16,1	21,7	39,9	72,9	100,5
17. <i>Rhytidiadelphus squarrosus</i>	Hypnales	222,7	252,8	208,4	201,7	296,5	462,3
18. <i>Scleropodium purum</i>	Hypnales	243,2	261,6	136,6	305,9	415,8	430,3
19. <i>Sphagnum fallax</i>	Sphagnales	11,0	5,8	11,8	33,2	55,1	195,5

In allen untersuchten Arten konnte unter Cd-Einfluß ein deutlicher Anstieg des GSH-Gehaltes festgestellt werden. Lediglich die Vertreter der Ordnung *Marchantiales* und *Metzgeriales* zeigten keine Reaktion des GSH-Pools. Die Grundgehalte an GSH unterschieden sich z. T. stark. Dieses kann nicht unbedingt auf artspezifische Unterschiede zurückgeführt werden, sondern wird möglicherweise durch jahreszeitliche Einflüsse und Standortunterschiede verursacht. Lediglich einige Arten wurden unter vergleichbaren Bedingungen gesammelt und gleichzeitig kultiviert (s. Kap. 4.12).

PCs konnten in keiner der Arten nachgewiesen werden. Vermutlich spielt zumindest bei Laubmoosen die Synthese von PCs bei der Entgiftung von Schwermetallen keine bedeutende Rolle.

#### **4.15. Nutzen der spezifischen biochemischen Reaktionen als Indikator für Belastung und ökotoxikologisches Gefährdungspotential**

Phytochelatine waren in den untersuchten Moosen weder in der Langzeitbeprobung der natürlichen Standorte in Sachsen-Anhalt noch bei dem Vergleich unterschiedlicher Moospezies nachweisbar. Da dieser in höheren Pflanzen spezifische Indikator für Schwermetallaufnahme fehlte, wurden die Vorstufen der PCs GSH, Cys und  $\gamma$ -EC in Hinblick auf ihre Nutzung als potentieller Biomarker für Schwermetallbelastungen untersucht.

Der Gehalt an GSH,  $\gamma$ -EC und Cys in den Freilandmoosen von drei Standorten in Sachsen-Anhalt ergab keine Korrelation zu den Schwermetallgehalten der Proben (nicht dargestellt). Obwohl im Laborversuch der induzierte Anstieg des GSH-Spiegels von der gegebenen Cd-Menge und Inkubationsdauer abhängig ist, konnte dieses für die Freilandmoose nicht festgestellt werden. Da im Freilandmoos im Gegensatz zum Laborversuch nur geringe Mengen an Schwermetallen auf die Pflanzen wirken, ist davon auszugehen, daß hier andere Faktoren den GSH-Spiegel stärker beeinflussen als die aufgenommenen Schwermetalle. GSH ist an verschiedenen Mechanismen zur Vermeidung von Umweltstress in der Pflanze beteiligt (BRUNOLD, 1996). Dieses betrifft insbesondere die Reduktion toxischer Sauerstoff-Spezies durch reduziertes GSH unter Bildung der oxidierten Form zur Vermeidung von oxidativem Stress, wie er unter extremen Umweltbedingungen in Pflanzen auftritt (DALTON, 1995; KRANNER und GRILL, 1996; NOCTOR and FOYER, 1998; NOCTOR et al., 1998) sowie die Entgiftung verschiedener Xenobiotika (LAMOUREUX und RUSNESS, 1993). Eine weitere Funktion kommt GSH als physiologischer Schwefelspeicher und Regulator der Sulfataufnahme in Pflanzen zu (HERSCHBACH und RENNENBERG, 1994). All diese Faktoren beeinflussen den GSH-

Spiegel der Moose unter Freilandbedingungen vermutlich so stark, daß durch Schwermetalle hervorgerufene distinkte Veränderungen nicht mehr nachgewiesen werden können.

Eine Nutzung des GSH in terrestrischen Moosen als Biomarker für Schwermetallbelastungen an natürlichen Standorten ist nicht möglich. Ebenso ergaben die Gehalte an den GSH-Präkursoren Cys und  $\gamma$ -EC keine Möglichkeit, anhand ihrer Quantität in den Pflanzen auf eine Schwermetalldeposition zu schließen.

#### **4.16. Saisonale Varianz der Schwermetall-Akkumulation**

Saisonale Schwankungen der Schwermetallgehalte der Moosproben aus dem Freiland konnten nicht festgestellt werden. Lediglich an einigen Probenahmeterminen wurden deutlich erhöhte Werte gemessen. Diese waren für Standort Hohenthurm 1 September 98 Cd und Cu, August 98 Zn; für Hohenthurm 2 Juli 98 Cd und Pb, Januar 99 Zn; für Hohenthurm 3 Dezember 98 Cd und September 98 Pb; für Salzmünde Juli 98 Cd und Januar 99 Zn; für Petersberg Oktober und November 98 Zn. Auch wenn die höheren Belastungen vorwiegend in der Zeit von Juli bis Januar auftraten, kann noch nicht auf einen saisonalen Einfluß der Belastung geschlossen werden.

Für das höher entwickelte Moos *Polytrichum formosum* ist eine Abnahme der Schwermetallkonzentration während der Wachstumsphase beschrieben (MARKERT und WECKERT, 1989), die als Verdünnungseffekt durch Biomassezuwachs diskutiert wird. Inwieweit dies auch für die hier erhaltenen Befunde eine Rolle spielt, bleibt offen.

#### **4.17. Einfluß kurzfristiger Wetterereignisse auf den Thiolpeptidgehalt der Freilandpflanzen**

Die Ergebnisse der Messungen zum Gehalt thiolhaltiger Verbindungen in Freilandmoosen (Kap.4.11) wurden den Klimadaten der Probenahmezeiträume gegenübergestellt. Es wurden die Daten des Probenahmetages sowie die der zwei Tage zuvor (Anhang, Tab.16) in die Auswertung einbezogen. Eine Korrelation zu der mittleren Tagestemperatur, Niederschlägen oder Sonnenscheindauer konnte nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse sind nicht grafisch dargestellt.

Es ist daher davon auszugehen, daß am natürlichen Standort, der GSH-Gehalt weniger durch die Temperatur oder kurzfristige Temperaturänderungen beeinflusst wird. Auch die Sonnenscheindauer, die über die Photosyntheseaktivität der Pflanzen oder die Verursachung von UV-induziertem oxidativem Stress einen Einfluß auf die Synthese von thiolhaltigen Verbindungen haben könnte, zeigte keinen Effekt. Die Jahreszeit und somit eine hohe Komplexität von Parametern scheint in diesem Zusammenhang einen wesentlich deutlicheren Einfluß zu haben.

## 5. Zusammenfassung

Im Projekt wurden Untersuchungen zur Akkumulation von Schwermetallen in Moosen sowie die physiologisch-biochemischen Reaktion dieser Pflanzen auf die Umweltbelastung durchgeführt.

Objekte für Freiland-Untersuchungen waren terrestrische Moose (vorwiegend *Scleropodium purum*), die an verschiedenen Standorten Sachsen-Anhalts gesammelt wurden. Die Studien wurden durch Laborversuche ergänzt, wobei insbesondere das Wassermoose *Fontinalis antipyretica* als Modellorganismus für Experimente zur biochemischen Schwermetallstressantwort diente.

Die Untersuchungen am Moos-Objekt waren auf Veränderungen im Gehalt thiolhaltiger Verbindungen und auf die Bestimmung von  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnissen beschränkt. Das Anliegen war, Aussagen darüber zu erhalten, ob diese spezielle Stressantwort Rückschlüsse auf die Schwermetallbelastung dieser Pflanzen im Sinne eines Biomonitoring ermöglichen könnte.

- *Analytische Entwicklungsarbeiten*

Die Studien zur physiologischen Metall-Stressreaktion waren auf Veränderungen im Gehalt thiolhaltiger Peptide orientiert und erforderten Trenn- und Nachweisverfahren mit hoher Leistung und Empfindlichkeit.

- Die Derivatisierung der thiolhaltigen Verbindungen durch Monobrombiman zur HPLC-Bestimmung von fluoreszenzmarkiertem GSH,  $\gamma$ -EC und Cystein wurde optimiert und konnte für die Routineanalytik der Freilandproben erfolgreich eingesetzt werden.
- Bei der Nachsäulenderivatisierung mit DTNB konnten wir erstmalig zeigen, daß diese Methode nicht die in der Literatur beschriebene Spezifität für Thiolpeptide aufweist. Am Beispiel der terrestrischen Moose *Polytrichum formosum* und *Atrichum undulatum* wurde der Beleg geführt, daß auch Coumaringlykoside unter den Derivatisierungsbedingungen bei 410 nm nachgewiesen werden können.
- Unter Nutzung einer "on-column" Derivatisierung thiolhaltiger Peptide mit N-ethylmaleimid (NEM) wurde ein kapillarelektrophoretisches Verfahren entwickelt. Gegenüber der HPLC konnte die Analysenzeit verkürzt und die Probenmenge verkleinert werden.

- *Laborversuche*

Die Laborversuche dienten der Bewertung von Schwermetall-Akkumulationsdaten und biochemischer Reaktion im Gehalt an Thiolpeptiden für die Nutzung im Biomonitoring. In der Mehrzahl der Versuche wurde Cadmium eingesetzt.

- $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen werden offensichtlich durch *Fontinalis antipyretica* und *Polytrichum formosum* zunächst an die Zellwand gebunden und von dort aus kontinuierlich in die Zellen aufgenommen. Innerhalb der ersten 48 Stunden erfolgt hierbei die Einstellung eines Gleichgewichtes zur Cd-Konzentration im Medium.
- Im Laborversuch konnte jedoch bei *Fontinalis antipyretica* und anderen aquatischen und terrestrischen Moosen unter Cd-Belastung ein deutlicher Anstieg des Gehaltes an GSH festgestellt werden. Phytochelatine, wie aus höheren Pflanzen bekannt, wurden in keiner der untersuchten Arten nachgewiesen. Der Anstieg des GSH-Gehaltes ohne Bildung von Phytochelatinen ist eine aus dem Pflanzenreich bisher nicht bekannte Reaktion auf Schwermetallstress. Neben GSH war auch ein Anstieg der Gehalte an  $\gamma$ -EC und Cystein zu beobachten.

Die Chelatisierung von Schwermetallen durch GSH zur Detoxifizierung oder als Transportform dieser Metalle in der Zelle könnte die schnelle und hohe GSH-Synthese in Moosen erklären. Dazu wird gegenwärtig in der Arbeitsgruppe intensiv gearbeitet.

- Durch Einsatz von  $^{15}\text{N}$  als Stickstoffquelle konnte der Verlauf von Stickstoffaufnahme und -einbau in Aminosäuren und Proteine in *Fontinalis antipyretica* verfolgt werden. Nach Cd-Belastung war eine konzentrationsabhängige Verringerung der Inkorporation des markierten Stickstoffs in beide Fraktionen zu erkennen. Möglicherweise wird zum einen die Aufnahme von Stickstoff bei Schwermetallstress gehemmt, zum anderen auch die Aminosäure- und Proteinsynthese.
  - Für den Thiolstoffwechsel in Moosen ist eine ausgewogene Schwefelernährung wichtig. Unter Cd-Belastung kommt es zur Erhöhung des Glutathion-, aber auch des Cystein-,  $\gamma$ -Glutamylcystein- und GSSG-Spiegels. Diese Neusynthesen sind mit einem Verbrauch an Sulfat zu verbunden. Bei Cd-Stress wird die Sulfatassimilation zur GSH-Synthese in hohem Maße aktiviert. Nach Sulfatmangel reagiert *Fontinalis antipyretica* bei Gabe von Sulfat mit einer aktiven Aufnahme des Nährstoffes.
  - Die Laboruntersuchungen belegen nachdrücklich die Richtigkeit des ursprünglich formulierten Arbeitsansatzes des Projektes. Der Thiolstoffwechsel von Moosen ist sehr different zu anderen pflanzlichen Systemen. Dies äußert sich deutlich in der Stressreaktion auf Schwermetalle im Schwefelmetabolismus.
- *Bearbeitung von Freilandproben*
  - Das terrestrische Moos *Scleropodium purum* wurde von Standorten im Saalkreis in den Jahren 1997-1999 gesammelt, um durch Langzeitbeprobung Einflüsse der Jahreszeit bzw. des Wetters auf die Akkumulation von Schwermetallen und die Synthese thiolhaltiger Verbindungen im Freiland festzustellen.

Signifikante Unterschiede der Standorte in der Belastung mit Cd, Pb, Zn oder Cu konnten nicht festgestellt werden, da die Werte hohe Standardabweichungen aufweisen. Der Standort Petersberg war vergleichsweise hoch mit den Metallen Cd, Pb und Zn belastet. Unsere Befunde belegen deutlich saisonale Änderungen der Schwermetallgehalte. Im Jahresverlauf ergeben sich Schwankungen der Schwermetall- und Thiolpeptidgehalte.

- Da im Freilandmoos im Gegensatz zum Laborversuch nur geringe Mengen an Schwermetallen auf die Pflanzen wirken, ist davon auszugehen, daß hier andere Faktoren den Pool an GSH stärker beeinflussen als die aufgenommenen Schwermetalle. Eine Wirkung des GSH als Biomarker für Schwermetallbelastungen an natürlichen Standorten ist daher nicht möglich.
- Für die Belastung mit organischen Verbindungen konnten deutliche Unterschiede für einige Standorte ermittelt werden, mit zum Teil hoher Belastung an polyaromatischen Kohlenwasserstoffen.
- An vier unterschiedlichen Standorten der Region Hohenturm-Salzmünde werden an Landmoosen (*Scleropodium*) im Vergleich zu einem Referenzstandort am Stechlinsee die natürlichen  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse bestimmt. Signifikante Unterschiede, ergaben sich zwischen den regionalen Standorten, die auf unterschiedliche N-Belastungen (Einträge) schließen lassen.

*Scleropodium* ist im Hinblick auf die Analyse seiner Stickstoffisotopen-Verhältnisse als Bioindikationssystem anthropogener N-Belastungen geeignet. Eine Identifikation atmosphärischer Stickstoffquellen ist möglich und sollte als spezifische Streßantwort in Moosen zur Induktion von Schadstoffbelastungen in Ökosystemen genutzt werden.

Die vorgelegten Studien sind die ersten, die in diesem Umfang durchgeführt wurden. Wir konnten zeigen, daß die biochemische Reaktion von Moosen auf Schwermetallstreß von der höherer Pflanzen deutlich abweicht. Die Klärung der genauen Abläufe im Zellstoffwechsel erfordert weitergehende biochemische und molekularbiologische Untersuchungen.

Die bioindikative Nutzung der Thiolpeptid-Streßantwort auf Umweltbelastung am Standort ist nicht geeignet. Hoffnungsvoll erscheint die Nutzung der natürlichen  $^{15}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse der Moospflanze zur Indikation von Schadstoffbelastungen (N-Eintrag) am Standort.

## 6. Literatur

- Alscher, R. G. (1989) Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol. Plant.* 77: 457 - 646
- Anderson, M. E. (1989) Enzymatic and Chemical Methods for the Determination of Glutathione. In: Dolphin, D.; Poutson, R.; Avramovic, O. (eds.) *Glutathione. Part A*, Wiley Int. Sci. New York. 147 - 186
- Berlich, M.; Bruns, I.; Menge, S.; Krauss, G.-J. (2000) in Vorbereitung
- Bergmann, L.; Rennenberg, H. (1993) Glutathione metabolism in plants. In: De Kok, L. J.; Stulen, I.; Rennenberg, H.; Brunold, C.; Rauser, W. E. (eds.) *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants*, SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands. 109 - 123
- Bliefert, C. (1987) *Umweltchemie*, Wiley-VCH, Weinheim, 2. Aufl.
- Brouwer, M.; Brouwer-Hoexum, T. (1991) Interaction of Copper-Metallothioneins from the American Lobster, *Homarus americanus*, with Glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 290: 207 - 213
- Brown, D. H.; Sidhu, M. (1992) Heavy Metal Uptake, Cellular Location and Inhibition of Moss Growth. *Crypt. Bot.* 3: 82 - 85
- Brown, D. H.; Wells, J. M. (1988) Sequential elution technique for determining the cellular location of cations. In: Glime, J. M. (ed.) *Methods in Bryology. Proc. Bryol. Meth. Workshop, Mainz*. Hattori Bot. Lab., Nichinan. 227 - 233
- Brüning, F.; Kreeb, K. H. (1993) Mosses as Biomonitors of Heavy Metal Contamination within Urban Areas. In: Markert, B. (ed.) *Plants as biomonitors - Indicators for heavy metals in the terrestrial environment*. VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge. 395 - 401
- Brunold, C. (1996) Einführung. In: Brunold, C.; Rügsegger, A.; Brändle, R. (eds.) *Stress bei Pflanzen*. UTB Verlag Bern, Stuttgart, Wien. 15 - 34
- Bruns, I.; Siebert, A.; Baumbach, R.; Miersch, J.; Günther, D.; Markert, B.; Krauss, G.-J. (1995) Analysis of heavy metals and sulphur-rich compounds in the water moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw.. *Fresenius J. Anal. Chem.* 353: 101 - 104
- Bruns, I.; Friese, K.; Markert, B.; Krauss, G.-J. (1997) The use of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals. 2. Heavy metal accumulation and physiological reaction of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. in active biomonitoring in the river Elbe. *Sci. Total Environ.* 204: 161 - 176

- Bruns, I.; Friese, K.; Markert, B.; Krauss, G.-J. (1999) Heavy metal inducible compounds from *Fontinalis antipyretica* reacting with Ellman's reagent are not phytochelatins. *Sci Total Environ.* 241: 215-216
- Bruns, I. and Krauss, G.-J. (1999) Das aquatische Monitormoos *Fontinalis antipyretica* - Schwermetallakkumulation und Synthese spezifischer Streßmetaboliten. In: *Ökosystemare Ansätze in der Ökotoxikologie* (Oehlmann, J. and Markert, B., eds.), Ecomed-Verlag, Landsberg/Lech
- Bruns, I.; Friese, K.; Krauss, G.; Krauss, G.-J. (2000a) Assessment of metal pollution with the water moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. - from fundamental investigations to physiological effects. In: *Trace Metals in the Environment* (Markert, B. and Friese, K. eds.). Elsevier Science B.V., Amsterdam, in press
- Bruns, I.; Sutter, K.; Neumann, D.; Krauss, G.-J. (2000b) Glutathione accumulation - a specific response of mosses to heavy metal stress, In: *Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants: molecular, biochemical and physiological aspects* (Brunold, C.; Rennenberg, H.; De Kok, L.J.; Stulen, I.; Davidian, J. C., eds. ), Paul Haupt, Bern, 389-391
- Bruns, I.; Sutter, K.; Neumann, D.; Krauss, G.-J. (2000c) Heavy metals increase the glutathione pool in bryophytes, *J. Plant Physiol.*, submitted
- Chen, Y.; Huerta, A.J. (1997) Effects of sulfur nutrition on photosynthesis in cadmium-treated barley seedlings. *Journal of Plant Nutrition.* 20 (7&8): 845-856
- Chovanec, A.; Vogel, W. R. (1992) Schadstoffe in aquatischen Moosen und Sedimenten im Einflußbereich eines industriellen und urbanen Ballungsraumes. *Deutsche Gesellschaft für Limnologie.* 579 - 583
- Chovanec, A.; Vogel, W. R.; Lorbeer, G.; Hanus-Illyar, A.; Seif, P. (1994) Chlorinated organic compounds, PAHs, and heavy metals in sediment and aquatic mosses of two upper Austrian rivers. *Chemosphere* 29: 2117 - 2133
- Dalton, D. A. (1995) Antioxidant Defense of Plants and Fungi. In: Ahmad, S. (ed.) *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology.* Chapman & Hall New York, 298 - 342
- Dameron, C. T.; Smith, B. R.; Winge, D. R. (1989) Glutathione-coated Cadmium-Sulfide Crystallites in *Candida glabrata*. *J. Biol. Chem.* 264: 17355 - 17360
- Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70 - 77
- Ernst, W. H. O.; Peterson, P. J. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (4). *Terrestrial plants. Ecotoxicology* 3: 180 - 192
- Ernst, W. H. O.; Verkleij, J. A. C.; Schat, H. (1992) Metal tolerance in plants. *Acta Bot. Neerl.* 41: 213 - 220

- Foyer, C.H.; Rennenberg, H. (2000) Regulation of glutathione synthesis and its role in abiotic and biotic stress defence. In: Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants: molecular, biochemical and physiological aspects (Brunold, C.; Rennenberg, H.; De Kok, L.J.; Stulen, I.; Davidian, J. C., eds. ), Paul Haupt, Bern, 127-153
- Frahm, J. P.; Frey, W. (1987) Moosflora. UTB Ulmer Stuttgart. 398
- Freedmann, J. H.; Ciriolo, M. R.; Peisach, J. (1989) The Role of Glutathione in Copper Metabolism and Toxicity. *J. Biol. Chem.* 264: 5598 - 5605
- Frost, U. (1990) Transplantationsversuche mit Wassermoosen zur Indikation der Gewässergüte am Niederrhein. *Cryptog. Bryol. Lichenol.* 11: 339 – 352
- Grill, E.; Winnacker, E.-L.; Zenk, M. H. (1991) Phytochelatins. *Methods Enzymol.* 205: 333 - 341
- Gunkel, G. (1994) Bioindikation in aquatischen Ökosystemen. Fischer Verlag Jena, Stuttgart
- Gupta, S. C.; Goldsbrough, P. B. (1991) Phytochelatin Accumulation and Cadmium Tolerance in Selected Tomato Cell Lines. *Plant Physiol.* 97: 306 - 312
- Hafner, Ch.; Erdmenger, E.; Jung, K.; Gehre, M.; Schüürmann, G. (2000) Stable isotope tracer technique as tool to increase the sensitivity of plant growth bioassays - investigations with Pentachlorophenol, Trichloroacetic acid and  $\gamma$ -HCH. *Fresenius Environ. Bull.* 9: 225-231
- Hell, R.; Bergmann, L. (1988) Glutathione synthetase in tobacco suspension cultures: catalytic properties and localization. *Physiol. Plant.* 72: 70 - 76
- Hell, R.; Bergmann, L. (1990)  $\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization. *Planta* 180: 603 - 612
- Herpin, U.; Markert, B.; Siewers, U.; Lieth, H. (1994) Monitoring der Schwermetallbelastung in der Bundesrepublik Deutschland mit Hilfe von Moosanalysen. Forschungsbericht 108 02 087 UBA-FB. 94 - 125
- Herpin, U.; Berlekamp, J.; Markert, B.; Wolterbeek, B.; Grodzinska, K.; Siewers, U.; Lieth, H.; Weckert, V. (1996) The distribution of heavy metals in a transect of the three states The Netherlands, Germany and Poland, determined with the aid of moss monitoring. *Sci. Total Environ.* 187: 185 - 198
- Herschbach, C.; Rennenberg, H. (1994) Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulphate and sulphate transport in tobacco plants. *J. Exp. Bot.* 45: 1069 - 1076
- Hoffman, D.; Jung, K.; Bender, J.; Gehre, M.; Schüürmann, G. (1997) Using of natural isotope variations of nitrogen in plants as an early indicator of air pollution stress. *J. Mass Spectrom* 32: 855-863

Howden, R.; Goldsbrough, P. B.; Andersen, C. R.; Cobett, S. (1995) Cadmium-Sensitive, *cad1* Mutants of *Arabidopsis thaliana* Are Phytochelatin Deficient. *Plant Physiol.* 107: 1059 - 1066

Jackson, P. P.; Robinson, N. J.; Whitton, B. A. (1991) Low molecular weight metal complexes in the freshwater moss *Rhynchostegium riparioides* exposed to elevated concentrations of Zn, Cu, Cd and Pb in the laboratory and field. *Environ. Exp. Bot.* 31: 359 – 366

Jung, K.; Junghans, P. (1981) Untersuchungen des pflanzlichen Proteinturnovers unter Wirkstoffeinfluß mit Hilfe von <sup>15</sup>N-Tracerexperimenten und ihre Interpretation auf der Grundlage von Kompartimentmodellen. *Biol. Zbl.* 100: 217-226

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 abies* L.). *New Phytol.* 128: 505-508

Jung, M.; Zinsmeister, H.D.; Geiger, G. (1994) New three and tetraoxygenated coumarin glycosides from the mosses *Atrichum undulatum* and *Polytrichum formosum*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 49c: 697-702

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 polluted area. *Environ. Poll.* 97: 175-181

Jung, K.; Kaletta, K.; Segner, H.; Schüürmann, G. (1999) <sup>15</sup>N metabolic test for the determination of phytotoxic effects of chemical substances and environmental samples. *Environ. Sci. Pollut. Res.*: 6 (2), 72-76

Klapheck, S.; Latus, C.; Bergmann, L. (1987) Localization of glutathione synthetase and distribution of glutathione in leaf cells of *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* 131: 123 - 131

Kneer, R.; Zenk, M. H. (1992) Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry* 8: 2663 - 2667

Kneer, R.; Zenk, M. H. (1997) The formation of Cd-phytochelatin complexes in plant cell cultures. *Phytochemistry* 44: 69 - 74

Kranner, I.; Grill, D. (1996) Significance of Thiol-Disulfide Exchange in Resting Stages of Plant Development. *Bot. Acta* 109: 8 - 14

Lamoureux, G. L.; Rusness, D. G. (1993) Glutathione in the metabolism and detoxification of xenobiotics in plants. In: De Kok, L. J.; Stulen, I.; Rennenberg, H.; Brunold, C.; Rauser, W. E. (eds.) *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants*. SPB Academic Publishing The Hague, The Netherlands. 221 - 237

- Li, Z.S.; Lu, Y.R.; Zhen, R.G.; Szczypka, M.; Thiele, D.J., Rea, P.A. (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis (glutathionato) cadmium. Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 94: 42 - 47
- Lopez, J.; Vazquez, D. M.; Carballeira, A. (1994) Stress responses and metal exchange kinetics following transplant of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*. Freshwater Biol. 32: 185 - 198
- Markert, B. (ed.) (1993a) Plants as biomonitors - Indicators for heavy metals in the terrestrial environment. VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- Markert, B.; Weckert, V. (1989) Fluctuation of the element concentrations during the growing season of *Polytrichum formosum* (Hedw.). Water, Air, and Soil Pollution 43: 177 - 189
- Markert, B.; Weckert, V. (1993b) Time- and site integrated long-term biomonitoring of chemicals by means of mosses. Toxicol. Environ. Chem. 40: 43 - 56
- McMahon, P.J.; Anderson, J.W. (1998) Preferential allocation of sulphur into  $\gamma$ -glutamylcysteinyl peptides in wheat plants grown at low sulphur nutrition in the presence of cadmium. Physiologia Plantarum. 104: 440-448
- Mehra, R. K.; Mulchandani, P.; Hunter, T. C. (1994) Role of CdS quantum crystallites in cadmium resistance in *Candida glabrata*. Biochem. Biophys. Res. Com. 200: 1193 - 1200
- Meuwly, P.; Rauser, W. E. (1992) Alteration of Thiol Pools in Roots and Shoots of Maize Seedlings Exposed to Cadmium. Plant Physiol. 99: 8 - 15
- Mouvet, C. (1985) The use of aquatic bryophytes to monitor heavy metal pollution of freshwaters as illustrated by case studies. Verh. Internat. Verein. Limnol. 22: 2420 - 2425
- Möcker, D., Hoffmann, D.; Jung, K.; Bender, J.; Weigel, H.-J. (1996) The impacts of ozone on the <sup>15</sup>N incorporation and nitrogen assimilation of wheat and maize. Isotopes in Environ. Health Stud. 32 (2-3): 181-190
- Möcker, D.; Jung, K.; Förstel, H.; Schüürmann, G. (1998) Isotopic and enzymatic investigations into the assimilation and effect of NO<sub>2</sub> on C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. J. Appl. Bot. 72: 186-190
- Noctor, G.; Foyer, C. (1998) Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 249-79
- Noctor, G.; Arisi, A.C.M.; Jouanin, L.; Kunert, K.J.; Rennenberg, H. (1998) Glutathione: Biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. J. Exp. Bot. 49: 623-647
- Paulus, M.; Alteyer, M.; Klein, R.; Hildebrandt, A.; Ostapczuk, P.; Oxynos, K. (1994) Biomonitoring und Umweltprobenbank. Z. Umweltchem. Ökotox. 6: 375 - 383

- Prasad, M.N.V.; Hagemeyer, J. (Hrsgs.) (1999) Heavy metal stress in plants. Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Rea, P.A.; Li, Z.S.; Lu, Y.P.; Drozdowicz, Y.M.; Martinoia, E. (1998) From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 49: 727 - 760
- Rausser, W.E. (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochemistry and Biophysics* 31: 19-48
- Rausser, W.E. (2000) The role of thiols in plants under metal stress, In: Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants: molecular, biochemical and physiological aspects (Brunold, C.; Rennenberg, H.; De Kok, L.J.; Stulen, I.; Davidian, J. C., eds. ), Paul Haupt, Bern, 169-183
- Reese, R. N.; White, C. A.; Winge, D. R. (1992) Cadmium-Sulfide Crystallites in Cd-( $\gamma$ -EC)<sub>n</sub>-G Peptide Complexes from Tomato. *Plant Physiol.* 98: 225 - 229
- Reese, R. N.; Winge, D. R. (1988) Sulfide Stabilization of the Cadmium- $\gamma$ -Glutamyl Peptide Complex of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 263: 12832 - 12835
- Rennenberg, H.; Brunold, C. (1994) Significance of Glutathione Metabolism in Plants Under Stress. *Progress in Botany* 55: 142 - 155
- Rühling, A.; Tyler, G. (1968) An ecological approach to the lead problem. *Bot. Notiser.* 121: 321 - 342
- Rühling, A.; Tyler, G. (1973) Heavy metal deposition in Scandinavia. *Water, Air and Soil Pollution* 2: 445 - 455
- Schneider, St.; Bergmann, L. (1995) Regulation of Glutathione Synthesis in Suspension Cultures of Parsley and Tobacco. *Bot. Acta* 108: 34 - 40
- Schopfer, P.; Brennecke, A. (1999) Pflanzenphysiologie. 5. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokio. 298
- Schupp, R. (1991) Untersuchungen zur Schwefelernährung der Fichte (*Picea abies* L.): Die Bedeutung der Sulfatassimilation und des Transports von Thiolen. Dissertation, Institut für Botanik und Mikrobiologie, TU München.
- Siebert, A.; Bruns, I.; Krauss, G.-J.; Miersch, J.; Markert, B. (1996) The use of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals. 1. Fundamental investigations into heavy metal accumulation in *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw.. *Sci. Total Environ.* 177: 137 - 144
- Sievers, U.; Herpin, U. (1998) Schwermetalleinträge in Deutschland, Moosmonitoring 1995/96 , Geologisches Jahrbuch, Reihe D, Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart

- Steinnes, E. (1993) Some aspects of biomonitoring of air pollutants using mosses, as illustrated by the 1976 Norwegian survey. In: Markert, B. (ed.): Plants as biomonitors - Indicators for heavy metals in the terrestrial environment. VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge. 381 - 394
- Streit, B.; Stumm, W. (1993) Chemical Properties of Metals and the Process of Bioaccumulation in Terrestrial Plants. In: Markert, B. (ed.) Plants as biomonitors. VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge. 31 - 62
- Strohm, M.; Jouanin, L.; Kunert, K. J.; Pruvost, C.; Polle, A.; Foyer, C. H.; Rennenberg, H. (1995) Regulation of glutathione synthesis in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase. Plant J. 7: 141 - 145
- Sutter, K.; Friebe, S., Krauss, G.-J. (1999) Capillary electrophoresis of phytochelatin and their precursors using on-line derivatization with N-ethylmaleimide. Intern. J. Environ. Anal. Chem. 74: 167-178
- Tukendorf, A.; Rauser, W. (1990) Changes in glutathione and phytochelatin in roots of maize seedlings exposed to cadmium. Plant Science 70: 155 - 166
- Vazquez, M. D. ; Lopez, J.; Carballeira, A. (1999) Uptake of heavy metals to the extracellular and intracellular compartments in three species of aquatic bryophytes. Ecotoxicology and Environmental Safety 4: 12-24
- Wells, J. M.; Brown, D. H. (1987) Factors affecting the kinetic of intra- and extracellular cadmium uptake by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. New Phytol. 105: 123 - 137
- Wells, J. M.; Brown, D. H. (1990) Ionic control of intracellular and extracellular Cd uptake by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst.. New Phytol. 116: 541 - 553
- Wenzel, K.-D.; Weißflog, L.; Paladini, E.; Gantuz, M. Guerreiro, P.; Puliafito, C.; Schüürmann, G. (1997) Immission Patterns of Airborne Pollutants in Argentina and Germany. II. Biomonitoring Of Organochlorine Compounds and Polycyclic Aromatics. Chemosphere 34: 2505-2518
- Wenzel, K.-D.; Hubert, A.; Manz, M.; Weissflog, L.; Engewald, W.; Schüürmann, G. (1998) Accelerated Solvent Extraction of Semivolatile Organic Compounds From Biomonitoring Samples of Pine Needles and Mosses. Anal. Chem. 70: 4827-4835
- Zenk, M. H. (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - a review. Gene 179, 21-30

## 7. ANHANG

**Tab. 4:** GSTH- (GSH-Äquivalente) und GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Cd-haltigem Medium (100  $\mu$ M), n = 3, [ $\mu$ g/ g FG].

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

**Tab. 5:** Gehalte an Cys,  $\gamma$ -Glu-Cys und GSH in *F. antipyretica* während 10tägiger Inkubation in Cd-haltigem Medium (100  $\mu$ M), n = 3, [ $\mu$ g/g FG].

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

Tab. 6: Inkorporation von  $^{15}\text{N}$  in *Fontinalis* nach Belastung mit 200  $\mu\text{M}$  Cd, n=5

Probe [d]	Kontrolle		200 $\mu\text{M}$ Cd	
	NPN-Fraktion [ $^{15}\text{N}$ at.-% exc.]	P-Fraktion [ $^{15}\text{N}$ at.-% exc.]	NPN-Fraktion [ $^{15}\text{N}$ at.-% exc.]	P-Fraktion [ $^{15}\text{N}$ at.-% exc.]
1	0,261	0,0723	0,0281	0,0069
2	0,249	0,097	0,043	0,019
5	0,564	0,44	0,063	0,029
10	1,13	1,15	0,068	0,03

Standardabweichung:

Probe [d]	Kontrolle		200 $\mu\text{M}$ Cd	
	NPN-Fraktion	P-Fraktion	NPN-Fraktion	P-Fraktion
1	0,0006	0,0003	0,00011	0,00002
2	0,0007	0,0003	0,00011	0,00008
5	0,0006	0,0013	0,00057	0,00010
10	0,0023	0,0015	0,00029	0,00026

Tab. 7: Inkorporation von  $^{15}\text{N}$  in *Fontinalis* nach Belastung Cd verschiedener Konzentration, n=5

Probe	NPN-Fraktion [ $^{15}\text{N}$ at.-% exc.]	P-Fraktion [ $^{15}\text{N}$ at.-% exc.]
Kontrolle	0,995	0,884
25 $\mu\text{M}$ Cd	0,458	0,491
50 $\mu\text{M}$ Cd	0,355	0,337
100 $\mu\text{M}$ Cd	0,212	0,147
400 $\mu\text{M}$ Cd	0,183	0,068

Standardabweichung:

Probe	NPN-Fraktion [ $^{15}\text{N}$ at.-% exc.]	P-Fraktion [ $^{15}\text{N}$ at.-% exc.]
Kontrolle	0,0016	0,0054
25 $\mu\text{M}$ Cd	0,0018	0,0011
50 $\mu\text{M}$ Cd	0,0012	0,0007
100 $\mu\text{M}$ Cd	0,0009	0,0009
400 $\mu\text{M}$ Cd	0,0009	0,0006

**Tab. 8:** Thiolpeptidgehalte in *F. antipyretica* ohne Zugabe von Cd [ $\mu\text{mol/g FM}$ ]

Zeit	Cys	$\gamma$ -EC	GSH	GSSG
0 h	0,025	0	0,197	0,028
0,5 h	0,022	0,0025	0,171	0,051
1 h	0,024	0,0035	0,262	0,059
1,5 h	0,022	0,0066	0,273	0,054
2 h	0,016	0,0026	0,142	0,052
4 h	0,014	0,0067	0,207	0,057
6 h	0,021	0,0023	0,213	0,096
8 h	0,015	0,0068	0,214	0,058
12 h	0,017	0,0061	0,234	0,077
1 d	0,02	0,0076	0,217	0,078
2 d	0,018	0,0066	0,171	0,067
6 d	0,017	0,0067	0,164	0,089
10 d	0,016	0,0045	0,109	0,066
14 d	0,02	0,007	0,188	0,07

**Tab. 9:** Thiolpeptidgehalte in *F. antipyretica* nach Zugabe von 200  $\mu\text{M Cd}$  [ $\mu\text{mol/g FM}$ ]

Zeit	Cys	$\gamma$ -EC	GSH	GSSG
0 h	0,025	0	0,197	0,028
0,5 h	0,016	0	0,125	0,037
1 h	0,015	0	0,146	0,032
1,5 h	0,014	0	0,214	0,052
2 h	0,012	0	0,148	0,056
4 h	0,017	0	0,214	0,045
6 h	0,023	0	0,187	0,061
8 h	0,034	0	0,21	0,083
12 h	0,059	0,008	0,294	0,102
1 d	0,183	0,019	0,471	0,136
2 d	0,32	0,05	0,746	0,283
6 d	0,297	0,186	0,942	0,258
10 d	0,451	0,282	1,16	0,303
14 d	0,406	0,278	0,838	0,212

**Tab. 10:** Sulfatgehalte in *F. antipyretica* [ $\mu\text{mol/g FM}$ ]

Zeit	0 $\mu\text{M Cd}/0 \mu\text{M Sulfat}$	200 $\mu\text{M Cd}/0 \mu\text{M Sulfat}$
0 h	4,05	3,7
0,5 h	4,76	4,43
1 h	5,22	3,66
1,5 h	5,92	6,93
2 h	5,43	3,83
4 h	4,73	3,28
6 h	4,41	2,97
8 h	3,89	3,41
12 h	4,45	2,76
1 d	5,29	2,18
2 d	5,21	2,0
6 d	4,58	1,46
10 d	3,78	0,42
14 d	3,77	0,34

**Tab. 11:** Sulfat und GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während Inkubation in Medium ohne Sulfat

Zeit [Tage]	Sulfat [ $\mu\text{mol/g FM}$ ]	GSH [ $\mu\text{mol/g FM}$ ]
0	3,10	0,341
10	2,35	0,193
17	2,16	0,220
24	1,53	0,166
31	0,86	0,209
38	0,77	0,144

**Tab. 12:** Sulfat- und GSH-Gehalte in *F. antipyretica* während Inkubation in Medium mit unterschiedlichen Cd und/oder Sulfat-Konzentrationen

Zeit	µM	Sulfat [µmol/g FM]			
		0 Cd/0 SO <sub>4</sub>	100 Cd/0 SO <sub>4</sub>	0 Cd/ 500 SO <sub>4</sub>	100 Cd/500 SO <sub>4</sub>
0 h		0,35	0,64	0,78	0,64
0,5 h		0,5	0,48	0,9	1,06
2 h		0,57	0,32	1,3	1,09
6 h		0,71	0,4	1,11	1,82
1 d		0,26	0,27	2,88	2,15
2 d		0,85	0,39	2,35	3,44
3 d		0,57	0,18	2,18	2,91
6 d		0,74	0,17	2,21	2,68
10 d		0,66	0,09	2,17	2,31
22 d		0,25	0,07	3,33	1,15

Zeit	µM	GSH [µmol/g FM]			
		0 Cd/0 SO <sub>4</sub>	100 Cd/0 SO <sub>4</sub>	0 Cd/ 500 SO <sub>4</sub>	100 Cd/500 SO <sub>4</sub>
0 h		0,11	0,19	0,16	0,1
0,5 h		0,29	0,16	0,19	0,1
2 h		0,16	0,15	0,3	0,15
6 h		0,15	0,16	0,21	0,34
1 d		0,1	0,18	0,43	0,76
2 d		0,09	0,43	0,37	1,09
3 d		0,09	0,45	0,4	1,45
6 d		0,05	0,38	0,3	1,74
10 d		0,05	0,32	0,25	1,74
22 d		0,03	0,14	0,19	1,9

**Tab. 13:** Gehalte thiolhaltiger Verbindungen in Freilandproben von *Scleropodium purum* am Standort Hohenthurm 1 (H1) und Hohenthurm 2 (H2), n = 3

Standort	H1						H2					
	µg/g TG			SD			µg/g TG			SD		
Monat	GSH	γ-EC	Cys	GSH	γ-EC	Cys	GSH	γ-EC	Cys	GSH	γ-EC	Cys
J98												
F98	624.4	19.3	15.6	126.6	1.8	2.7	500.3	14.1	10.4	37.7	1.0	0.7
M98	240.2	16.0	12.8	35.7	1.5	0.6	174.1	7.6	5.9	13.5	1.1	1.0
A98	129.9	7.8	6.5	9.2	0.5	0.3	172.4	15.9	12.6	8.1	1.0	2.2
M98							165.2	34.3	18.8	26.4	12.8	5.0
J98	360.7	25.0	10.4	64.1	4.5	1.8	151.1	10.6	6.3	19.2	1.2	1.0
J98	118.1	13.4	7.0	17.8	1.2	0.6	201.0	35.7	12.0	6.9	2.7	0.8
A98	645.3	8.9	2.5	15.3	0.4	0.3	436.3	8.8	1.5	37.6	1.4	0.2
S98	712.0		9.9	21.6		0.1	279.4	57.9	7.2	51.9	21.4	0.6
O98	1032.3		14.7	74.6		1.0	646.9		10.8	65.3		0.9
N98	553.8		9.8	106.2		0.7	513.6	15.5	7.1	64.1	2.3	1.1
D98	435.3	12.9	7.8	93.2	1.7	1.2	381.7	20.1	6.2	49.3	4.7	0.5
J99	712.9	16.4	11.3	32.3	0.2	1.5	416.1	13.8	5.3	8.9	2.6	0.1
F99	216.5	9.1	3.8	52.7	0.5	0.2	260.3		6.2	25.7		0.3
M99	426.9	9.6	7.2	44.3	0.6	0.4	210.7	7.5	3.8	10.8	1.1	0.3
A99	278.1	13.8	7.4	55.6	3.2	1.0	225.5	10.8	3.9	75.0	3.3	0.9
M99	302.1	7.5		81.4	5.5							
J99	185.5	9.5	6.2	9.8	0.6	0.8	260.8	12.1	6.4	87.5	2.1	1.4
J99	196.3	9.2	4.3	42.9	1.2	0.6	523.4	7.7	3.6	62.2	1.0	0.4

**Tab. 14:** Gehalte thiolhaltiger Verbindungen in Freilandproben von *Scleropodium purum* am Standort Hohenthurm 3 (H3) und Petersberg (P), n = 3

Standort	H3						P					
	µg/g TG			SD			µg/g TG			SD		
	Monat	GSH	γ-EC	Cys	GSH	γ-EC	Cys	GSH	γ-EC	Cys	GSH	γ-EC
J98							71.9	9.4	3.7	18.7	1.9	0.1
F98							151.9	8.9	5.5	9.9	1.9	0.6
M98	237.9	14.7	8.9	16.8	1.9	0.1	104.8	11.4	10.3	9.4	1.5	1.9
A98	102.0	7.8	4.9	10.5	1.2	1.0	61.4	5.8	4.0	13.3	0.4	0.6
M98	455.1	15.0	11.0	93.4	2.7	2.2	161.3	14.3	5.2	18.2	4.1	1.3
J98	255.9	23.3	10.0	34.4	4.6	2.0	152.0	9.6	10.6	65.6	0.9	1.3
J98	86.4	8.2	6.5	6.2	1.1	0.5	175.7	28.8	16.3	15.3	3.3	0.3
A98	624.3	11.3	3.6	71.5	1.2	0.1	308.9	5.4	2.4	91.1	1.7	0.3
S98	163.8	11.3	11.4	18.3	1.6	1.9	213.1	10.8	8.9	29.4	2.5	1.1
O98							817.2		10.5	172.4		1.0
N98	716.6		10.9	199.0		1.6	974.3		14.1	127.0		1.8
D98	708.5	21.2	5.8	198.7	9.6	1.0	562.7	17.9	8.4	115.7	2.1	1.2
J99	689.2	28.1	10.0	157.3	3.8	1.5	490.4	20.4	8.6	109.7	2.3	1.1
F99	360.1	14.5	5.0	29.6	1.9	0.2	498.7	23.7	9.1	362.8	10.4	3.3
M99	456.8	11.8	5.3	119.3	0.7	1.6	222.7	7.8	3.5	81.3	2.2	0.9
A99	259.0	4.7	2.7	22.2	0.4	0.2	262.2	9.9	5.0	124.0	1.2	1.0
M99							294.7	5.7	2.2	65.0	1.0	0.5
J99	315.2	9.3	6.0	110.1	2.9	1.3	92.1	5.8	3.4	2.6	0.6	0.5
J99	273.7	5.9	2.7	6.3	0.5	0.2	409.6	9.7	4.5	30.3	0.5	0.2

**Tab. 15:** Gehalte thiolhaltiger Verbindungen in Freilandmoosen am Standort Salzmünde (S), n = 3

Standort	S					
	µg/g TG			SD		
	Monat	GSH	γ-EC	Cys	GSH	γ-EC
J98						
F98	385.1	7.4	6.9	99.9	0.6	0.9
M98	878.8	26.5	17.8	232.8	3.4	1.8
A98	309.3	15.5	16.2	71.4	1.0	2.9
M98	75.1	8.5	4.9	4.0	1.3	0.3
J98	91.1	6.8	5.9	25.1	1.0	0.3
J98	118.5	19.0	10.5	16.1	0.4	2.5
A98	250.5	8.1	2.7	28.5	1.7	0.4
S98						
O98	101.5	6.6	2.8	23.8	1.2	0.4
N98	617.1		11.6	103.1		2.2
D98	260.3		3.9	90.6		1.2
J99	523.7	8.8	8.8	20.1	0.3	0.4
F99	155.8	5.2	3.1	18.0	0.6	0.2
M99	368.2	7.5	6.7	22.0	0.6	1.2
A99	428.6	13.4	8.3	83.7	2.5	2.1
M99						
J99						
J99						

**Tab. 16:** Klimadaten der Probenahmetage sowie der letzten zwei Tage davor. Tagesmittelwerte einer Meßstation in Leipzig Schkeuditz.

Datum	Temperatur [°C]	Sonnenschein [h]	Niederschlag [mm]
04-Jan-98	6,9	2,9	0,3
05-Jan-98	7,1	4,5	1,2
<b>06-Jan-98</b>	<b>4,5</b>	<b>2,2</b>	<b>2</b>
08-Feb-98	2,8	4,8	0
09-Feb-98	4,3	1	0
<b>10-Feb-98</b>	<b>4,8</b>	<b>8,3</b>	<b>0</b>
28-Feb-98	3,5	1,4	4,7
01-Mrz-98	2	2,9	0,1
<b>02-Mrz-98</b>	<b>6,2</b>	<b>0,1</b>	<b>1</b>
05-Apr-98	11,6	6,6	0
06-Apr-98	9,7	5,9	1,4
<b>07-Apr-98</b>	<b>9,1</b>	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>
02-Mai-98	14,8	7,5	0,5
03-Mai-98	11,6	1,2	0
<b>04-Mai-98</b>	<b>9</b>	<b>2,3</b>	<b>0</b>
31-Mai-98	18,3	8	0,5
01-Jun-98	13,2	0,2	2
<b>02-Jun-98</b>	<b>17,4</b>	<b>11,2</b>	<b>9,8</b>
11-Jul-98	15,8	3,1	4,4
12-Jul-98	16,2	0,1	4
<b>13-Jul-98</b>	<b>17,4</b>	<b>0,8</b>	<b>5,4</b>
10-Aug-98	21	13,9	0
11-Aug-98	26,7	12,7	0
<b>12-Aug-98</b>	<b>23,6</b>	<b>6,5</b>	<b>0,1</b>
05-Sep-98	15,4	0,4	11,6
06-Sep-98	15,4	0	0,1
<b>07-Sep-98</b>	<b>17,1</b>	<b>7,8</b>	<b>0</b>
09-Okt-98	10	0	0
10-Okt-98	11,1	0,2	2,5
<b>11-Okt-98</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>2,6</b>
09-Nov-98	8,9	0	5,3
10-Nov-98	9,2	0	2
<b>11-Nov-98</b>	<b>5,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,2</b>
14-Dez-98	6,4	0	4,2
15-Dez-98	8,6	0	2,5
<b>16-Dez-98</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
12-Jan-99	-1	1	0
13-Jan-99	0,6	0,6	0,3
<b>14-Jan-99</b>	<b>3,3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
26-Feb-99	4,4	0	1,1
27-Feb-99	8	9	0
<b>28-Feb-99</b>	<b>6,2</b>	<b>7,1</b>	<b>0</b>
28-Mrz-99	4,6	0	0
29-Mrz-99	6,7	6,1	0
<b>30-Mrz-99</b>	<b>9,2</b>	<b>10,5</b>	<b>0</b>
24-Apr-99	13	9,1	2,4
25-Apr-99	12,8	9,8	0
<b>26-Apr-99</b>	<b>12,5</b>	<b>2,7</b>	<b>0</b>