

**Physiologische Grundlagen der Akkumulation von  
Schwermetallionen beim Faserhanf (*Cannabis sativa* L.)  
und das Nutzungspotential bei der Phytoremediation**



Dissertation

vorgelegt von  
Anke Ostwald  
aus  
Salzkotten

angefertigt in der  
Physiologischen Chemie der Pflanzen  
Fachbereich 9, Naturwissenschaften II  
der Bergischen Universität/Gesamthochschule Wuppertal

Wuppertal 2000

Diese Arbeit wurde vom Oktober 1995 bis zum Juni 2000 unter der Leitung von

Prof. Dr. R. R. Theimer angefertigt.

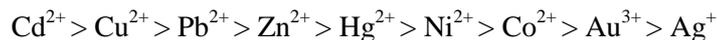
Tag der mündlichen Prüfung: 04. Juli 2000

## Abstract

The accumulation of heavy metals and their influence on the synthesis of phytochelatins in fibre hemp plants and cell cultures (*Cannabis sativa* L.) were investigated and compared with other plants and cell cultures during this study. Additionally the potential of fibre hemp for remediation of heavy metal contaminated soils and the use of the harvested raw materials have been assessed. Callus cultures of hemp (*Cannabis sativa* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) responded to heavy metals, especially  $\text{Cd}^{2+}$ , in the growth medium by synthesis of phytochelatins ( $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{Gly}$ , PCs).  $\text{Cd}^{2+}$  containing growth medium lead to the accumulation of  $\text{PC}_2$ ,  $\text{PC}_3$  und  $\text{PC}_4$  in hemp callus cultures. In  $\text{Cd}^{2+}$ -resistant tomato callus cultures  $\text{PC}_2$  to  $\text{PC}_8$  were detected. In both callus cultures the induction of PC synthesis depended on the  $\text{Cd}^{2+}$  concentration in the growth medium. In addition some minor peaks in the HPLC elution profile of tomato callus cultures were identified as a novel variant of PCs with a missing amino-terminal glutamic acid ( $\text{Cys}-(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Gly}$ ). As for now these structures can be explained as degradation products of PCs. Their role in the detoxification of cadmium has yet to be determined.

The accumulation of  $\text{Cd}^{2+}$  was investigated in hemp suspension cultures over a period of 6 days. The increase of fresh weight wasn't affected negatively by  $\text{Cd}^{2+}$  concentrations up to 40  $\mu\text{M}$  over the whole growing period. The amount of  $\text{Cd}^{2+}$  in the cells was always higher than the amount of PCs. Evidently the detoxification of  $\text{Cd}^{2+}$  in hemp cell suspension cultures is not exclusively a result of complexation by PCs. Hemp suspension cultures accumulated mainly  $\text{PC}_3$  (59 %) when exposed to  $\text{Cd}^{2+}$ .

The accumulation of PCs in hemp suspension cultures depended on the heavy metal concentration in the growth medium and on the incubation time. Metals can be grouped according to their ability to induce PC formation in hemp suspension cultures:



The growth of roots and shoots of the hemp plants (variety: Felina 34) growing under greenhouse conditions was reduced by heavy metals in the soil. The reduction of the shoot growth was slighter in all cases than the reduction of root growth. An increase in the  $\text{Cd}^{2+}$  concentration of the soil resulted in a similar increase in the accumulation of  $\text{Cd}^{2+}$  by roots of hemp plants. In roots of 10 day old plants up to 1100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}/\text{g}$  dw or 880  $\text{nM}/\text{g}$  dw  $\text{Pb}^{2+}$  were detected. An increase in the  $\text{Cd}^{2+}$  concentration from 0,1 mM to 20 mM in the soil resulted in a 4-fold higher PC content in roots of hemp plants.  $\text{PC}_3$  is the most abundant PC in hemp plants under these conditions (71,7 %).

Hemp plants responded like hemp suspension cultures immediately to  $\text{Cd}^{2+}$  accumulated from the soil. After 10 minutes of exposure to soil contaminated with 10 mM  $\text{Cd}^{2+}$  a rapid decline in the levels of GSH (40 % reduction) and  $\gamma\text{-GluCys}$  (70 % reduction) was detected. At the same time  $\text{PC}_2$  appeared for the first time. The typical PC pattern of hemp plants was reached 4h after adding  $\text{Cd}^{2+}$  to the soil.

Transport of  $\text{Cd}^{2+}$  from roots to shoots resulted in accumulation of PCs in the above ground organs of hemp plants. 8 weeks after planting 82 % of the total amount of  $\text{Cd}^{2+}$  was detected in the above ground organs. In Wheat plants (*Triticum aestivum* L.) 60 % of the  $\text{Cd}^{2+}$  was located in the roots and 40 % in the shoot after growing under the same conditions as hemp plants.

The cultivation of different crop and wild plants on soil contaminated with sewage sludge was used to investigate the potential of these plants for remediation of heavy metal polluted soils. The cultivated plants were grouped according to the absolute amounts of  $\text{Cd}^{2+}$  accumulated by them:

*Zea mays* > *Symphytum officinale* > *Impatiens glandulifera* > *Rumex crispus* > *Cannabis sativa* > *Brassica napus* > *Triticum aestivum* > *Matricaria inodora* > *Urtica dioica*

The amount of  $\text{Cd}^{2+}$  in the organs of the different plants showed that, with the exception of *Triticum aestivum*, *Urtica dioica* and *Rumex crispus*, all plants were root accumulators. The investigation of the amounts of  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  in the raw materials deriving from hemp plants (fibres, chives, leaves and fruits) showed that the highest heavy metal contents can be found in the leaves. The amount of  $\text{Ni}^{2+}$  was always higher in the different raw materials than the amount of  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$ . Comparison of heavy metal contents in the raw materials with the valid limits showed that the use of this resource for energy production in bio power stations is possible. The use of fibres deriving from the renewable resource hemp for the production of fertilizers or home textiles can't be recommended because of the high heavy metal contamination found in the raw material. Building materials and some industrial used textiles made of contaminated fibres and chives can be used but it has to be impounded, for example by thermic utilization, that the following disposal is not harmful to the environment.

**Das Unbekannte ist die ultimative Versuchung.**

Alex Lowe

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einführung</b> .....	1
1.1 <i>Biologie von Cannabis sativa L.</i> .....	2
1.2 <i>Bedeutung von Cannabis sativa L. als nachwachsender Rohstoff</i> .....	2
1.3 <i>Schwermetalle in der Umwelt</i> .....	4
1.3.1 <i>Schwermetalltoleranz</i> .....	5
1.3.2 <i>Phytoremediation</i> .....	5
1.3.3 <i>Mechanismen der Schwermetalltoleranz</i> .....	6
1.4 <i>Pflanzliche Adaption an Schwermetallstress</i> .....	8
1.4.1 <i>Glutathion</i> .....	8
1.4.2 <i>Metallothioneine</i> .....	9
1.4.3 <i>Phytochelatine</i> .....	9
1.4.3.1 <i>Struktur der Phytochelatine</i> .....	10
1.4.3.2 <i>Physiologische Rolle der Phytochelatine</i> .....	11
1.4.3.3 <i>Phytochelatin-Biosynthese</i> .....	12
1.5 <i>Zielsetzung</i> .....	13
<b>2. Material und Methoden</b> .....	14
2.1 <i>Bezugsquellen für Chemikalien und Gerätschaften</i> .....	14
2.2 <i>Pflanzenmaterial und Kultivierungsbedingungen</i> .....	15
2.2.1 <i>Kultivierung der Hanf-Zellkulturlinien</i> .....	15
2.2.2 <i>Kultivierung der Tomaten-Zellkulturlinien</i> .....	17
2.2.3 <i>Wachstum der Zellkulturen und Bestimmung des Frischgewichtes</i> .....	18
2.2.4 <i>Kultivierung der Pflanzen und Probennahme im Gewächshaus</i> .....	18
2.2.5 <i>Kultivierung und Probennahme im Freilandversuch</i> .....	20
2.3 <i>Mineralstoffanalytik</i> .....	22
2.3.1 <i>Kationengehalte im Pflanzenmaterial und in Zellen aus Suspensionskulturen</i> .....	23
2.3.2 <i>Kationengehalte im Kulturmedium</i> .....	23
2.4 <i>Extraktion und Analytik thiolhaltiger Verbindungen</i> .....	24
2.4.1 <i>Extraktion thiolhaltiger Peptide</i> .....	24
2.4.2 <i>Analytik thiolhaltiger Peptide</i> .....	24
2.4.3 <i>Optimierung der Analytik thiolhaltiger Peptide</i> .....	25
2.5 <i>Anreicherung der Phytochelatine mittels Säulenchromatographie</i> .....	28
2.5.1 <i>Probenvorbereitung</i> .....	28
2.5.2 <i>Säulenchromatographie</i> .....	28
2.5.3 <i>Bestimmung des Gesamtthiolgehaltes</i> .....	29
2.6 <i>Identifikation der Phytochelatine</i> .....	29
2.6.1 <i>Probenvorbereitung</i> .....	29
2.6.2 <i>Massenspektrometrie</i> .....	29

2.6.3 Identifikation unbekannter Thiolverbindungen mittels LC-MS.....	30
2.7 Aminosäureanalyse.....	31
2.7.1 Hydrolyse.....	31
2.7.2 Dünnschichtchromatographie.....	31
2.7.3 Derivatisierung.....	31
2.8 Bestimmung des pH-Wertes der belasteten Erde.....	32
2.9 Statistische Auswertung.....	33
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
3.1 Vergleich der Phytochelatinsynthese in Kalluskulturen von <i>Cannabis sativa L.</i> und <i>Lycopersicon esculentum Mill.</i> .....	35
3.1.1 Akkumulation thiolreicher Verbindungen in Tomaten-Kalluskulturen.....	35
3.1.2 Anreicherung thiolreicher Verbindungen aus Tomaten-Kalluskulturen.....	37
3.1.3 Identifikation von Phytochelatinen in Tomaten-Kalluskulturen.....	38
3.1.4 Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung thiolreicher Verbindungen aus Tomaten-Kalluskulturen.....	41
3.1.5 Akkumulation thiolreicher Verbindungen in Hanf-Kalluskulturen.....	45
3.1.6 Anreicherung thiolreicher Verbindungen aus Hanf-Kalluskulturen.....	47
3.1.7 Identifikation von Phytochelatinen in Hanf-Kalluskulturen.....	48
3.2 Aufnahme von Schwermetallen und Akkumulation von Phytochelatinen in Hanf-Suspensionskulturen.....	52
3.2.1 Wachstum von Hanf-Suspensionskulturen unter Einfluss von Cadmium.....	52
3.2.2 Akkumulation von Cadmium in Hanf-Suspensionskulturen.....	53
3.2.3 Akkumulation von Phytochelatinen in Hanf-Suspensionskulturen.....	55
3.2.4 Akkumulation anderer Schwermetalle in Hanf-Suspensionskulturen.....	58
3.2.5 Akkumulation von Phytochelatinen in Hanf-Suspensionskulturen unter Einfluss verschiedener Schwermetalle.....	59
3.2.6 Phytochelatinähnliche Thiolverbindungen in Hanf-Suspensions- und Tomaten-Kalluskulturen.....	63
3.3 Aufnahme von Schwermetallen und Akkumulation von PC's in Hanfpflanzen.....	67
3.3.1 Einfluss verschiedener Schwermetalle auf die Keimung von Hanf- und Rapspflanzen.....	67
3.3.1.1 Einfluss von Cadmium und Blei auf das Wachstum von Hanf- und Rapskeimlingen.....	67
3.3.1.2 Aufnahme von Cadmium, Blei und Kupfer im Verlauf der Keimung von Hanfpflanzen.....	71
3.3.2 Akkumulation von Schwermetallen und Phytochelatinen im Wachstumsverlauf von Hanfpflanzen.....	74
3.3.2.1 Akkumulation von Phytochelatinen im Verlauf der Keimung von Hanfpflanzen auf schwermetallbelasteten Böden.....	74

3.3.2.2 Verteilung von Schwermetallen und Phytochelatinen in den Organen der Hanfkeimlinge.....	81
3.3.2.3 Einfluss von Cadmium auf das Wachstum von Hanf- und Weizenpflanzen.....	85
3.4 Freilandversuch zur Akkumulation von Cadmium in Faserhanf im Vergleich zu verschiedenen Nutz- und Wildpflanzen.....	92
3.4.1 Akkumulation von Cadmium und Phytochelatinen in Hanfpflanzen ( <i>Cannabis sativa</i> L.).....	92
3.4.2 Akkumulation von Cadmium und Phytochelatinen in Rapspflanzen ( <i>Brassica napus</i> L.).....	97
3.4.3 Akkumulation von Cadmium und Phytochelatinen in Weizenpflanzen ( <i>Triticum aestivum</i> L.).....	101
3.4.4 Akkumulation von Cadmium durch Maispflanzen ( <i>Zea mays</i> L.).....	102
3.4.5 Akkumulation von Cadmium und Phytochelatinen in Kamillepflanzen ( <i>Matricaria inodora</i> L.).....	103
3.4.6 Akkumulation von Cadmium und Phytochelatinen in Springkrautpflanzen ( <i>Impatiens glandulifera</i> Royle.).....	106
3.4.7 Akkumulation von Cadmium und Phytochelatinen in Brennesselpflanzen ( <i>Urtica dioica</i> L.).....	107
3.4.8 Akkumulation von Cadmium und Phytochelatinen in Ampferpflanzen ( <i>Rumex crispus</i> L.).....	109
3.4.9 Akkumulation von Cadmium und Phytochelatinen in Beinwellpflanzen ( <i>Symphytum officinale</i> L.).....	111
3.4.10 Vergleich der Cadmiumgehalte in verschiedenen Nutz- und Wildpflanzen.....	112
<b>4. Diskussion</b> .....	114
4.1 Induktion der Phytochelatinsynthese in Tomaten-Kalluskulturen.....	118
4.2 Induktion der Phytochelatinsynthese in Hanf-Kalluskulturen.....	120
4.3 Induktion der Phytochelatinsynthese in Hanf-Suspensionskulturen.....	124
4.4 Wachstum von Hanfpflanzen unter Einfluss von Schwermetallen.....	133
4.5 Einfluss von Cadmium auf Hanf- bzw. Weizenpflanzen im Laufe einer Wachstumsperiode.....	145
4.6 Akkumulation von Schwermetallen in Nutz- und Wildpflanzen im Freiland.....	150
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	163
<b>6. Literatur</b> .....	165

## Abkürzungsverzeichnis

$\beta$ -Ala	$\beta$ -Alanin
$\gamma$ -EC	$\gamma$ -Glutamylcystein
$\beta$ -IES	$\beta$ -Indolessigsäure
AAB	$\alpha$ -Aminobutyrat
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Abb.	Abbildung
AbfKlärV	Klärschlammverordnung
ACN	Acetonitril
ATP	Adenosin-5-triphosphat
BImSchV	Bundesimmissionsschutzverordnung
BioAbfVO	Bioabfallverordnung
Bl/B	Blätter
Blt.-Std.	Blütenstand
C. sativa	Cannabis sativa
CAD	Collisionally Activated Decomposition
Cys	Cystein
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	1,4-Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray Ionization
FAO	Food Additives Organization
FG	Frischgewicht
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GSH	Glutathion
HMW	High Molecular Weight-Komplex
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
Hypok.	Hypokotyl
IN	Internodium
Kotyl.	Kotyledonen
KrW-/AbfG	Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetz
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
m/z	Masse pro Ladung
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

## Abkürzungsverzeichnis

---

Max	Maximum
min	Minuten
Min.	Minimum
MS	Massenspektrometrie
MS-Medium	Kulturmedium nach Murashige und Skoog
MT	Metallothionein
n	Anzahl der Einzelwerte
n.n.	nicht nachweisbar
n.u.	nicht untersucht
NMR	Nuclear Magnetic Resonance-Spektroskopie
PC	Phytochelatin
ppm	parts per million
PVC	Polyvinylchlorid
R2K/R4K/R6K	Cd <sup>2+</sup> -resistente Zellkulturlinien (Tomate)
Ret.-Zeit	Retentionszeit
Ser	Serin
SM	Schwermetall
Sp/S	Spross
SSA	5'-Sulfosalicylsäure
St.	Standard
Stg.	Stengel
t	Tonne
TA	Technische Anweisung
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Trockengewicht
THC	Δ <sup>9</sup> -Tetrahydrocannabinol
TNB	5-Thio-2-nitrobenzoesäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
W	Wurzel
w/v	Masse pro Volumen
WHO	World Health Organization
ZEBS	Zentrale Erfassungs- und Bewertungsstelle für Umweltchemikalien

## 1. Einführung

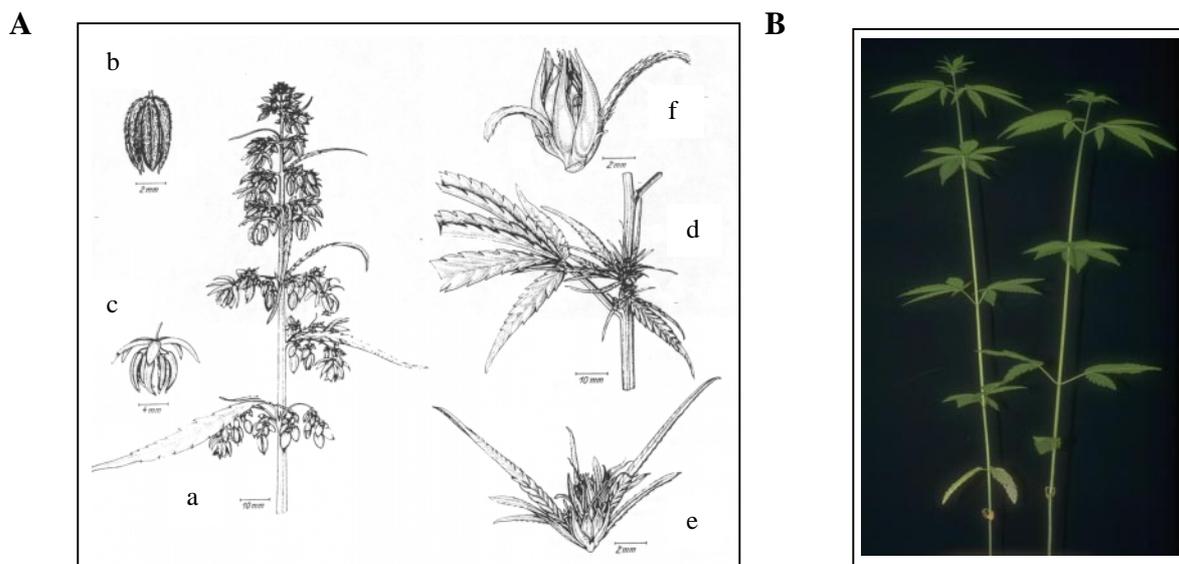
Die weitverbreitete Kontamination unserer Umwelt mit organischen und anorganischen Schadstoffen beeinträchtigt in zunehmendem Maße die Gesundheit von Menschen, Tieren und Pflanzen. Vor allem durch Akkumulation über die Nahrungskette erhöht sich das toxische Potential verschiedener Schadstoffe für den Menschen. Kontaminationen mit Schwermetallen stellen uns vor besondere Probleme, da diese für viele Jahre im Boden verbleiben und zu Schädigungen der dort lebenden Pflanzen und Tiere beitragen (Merian, 1984; Bliefert, 1994). Je nach Zusammensetzung des Bodens kann z. B. Blei zwischen 150 und 5.000 Jahre im Boden gebunden bleiben (Friedland, 1990). Es besteht daher ein hoher Bedarf an Remediations-Technologien zur Dekontamination des Bodens. Ob eine der vorhandenen Technologien dazu in Frage kommt, hängt stark von der Anlage des kontaminierten Geländes, der Art und Konzentrationen der Kontaminanten und der Effektivität der Remediations-Technologie ab. Der Einsatz konventioneller Technologien wie Auswaschung des Bodens, Stabilisierung der Kontaminanten mittels chemischer Reaktionen oder das Abtragen und Deponieren kontaminierten Erdreichs, beschränkt sich aus Kostengründen oft auf kleine Gebiete (Saxena et al., 1999). Zudem erscheint ein Einsatz dieser kostenintensiven Technologien in Bereichen geringer, aber dennoch über den Grenzwerten liegender Kontaminationen ökonomisch wenig attraktiv.

Photosynthetisch aktive Organismen leben in einer Umwelt, die essentielle Mineralien wie Zink, Kupfer und Nickel zur Verfügung stellt, aber auch nicht-essentielle Metalle wie Cadmium, Quecksilber und Blei beinhaltet (Kovari, 1997). Die Konzentrationen dieser Metalle in der Umwelt sind sehr verschieden und abhängig von den natürlichen Bedingungen und anthropogenen Einflüssen (Peterson and Alloway, 1979). Pflanzen sind daher darauf angewiesen, Mechanismen zu entwickeln, die die intrazellulären Metallkonzentrationen so regulieren, daß weder toxische Konzentrationen erreicht werden, noch ein Defizit an essentiellen Metallionen entsteht.

Aufgrund erster Hinweise auf eine hohe Anreicherung von Schwermetallen in verschiedenen *Cannabis sativa* L. - Varietäten (Phytotech, 1998) und nur geringer Wachstumsbeeinträchtigung unter Einfluß verschiedener Schwermetalle (Kozlowski et al., 1995), ist der mögliche Einsatz von *Cannabis sativa* L. zur Phytoremediation von besonderem Interesse.

## 1.1 Biologie von *Cannabis sativa* L.

Die in dieser Arbeit Verwendung findenden Faserhanfsorten der Gattung *Cannabis sativa* L. gehören zur Familie der Hanfgewächse (*Cannabaceae*), die der Ordnung Urticales angehören (Schmeil-Fitschen, 1968). *Cannabis sativa* L. (Abb. 1.1) ist eine einjährige, zumeist zweihäusige Pflanze, die eine Höhe von 1 - 5 m erreichen kann. Die weiblichen Pflanzen sind in der Regel größer, stärker verzweigt und stärker belaubt als die männlichen Pflanzen. *Cannabis sativa* L. bildet eine Pfahlwurzel, die bis zu zwei Meter tief in den Boden reichen kann. Die Blätter sind langgestielt, stark behaart und verfügen über 5 bis 9 Fiedern mit stark gezähnten Rändern. Hanfblätter sind, außer im Blütenstand, gegenständig am Stengel angeordnet. Die männlichen Blüten sind zu einer lockeren, rispenartigen Trugdolde zusammengefaßt, die ungestielten weiblichen Blüten sitzen jeweils zu zweit in den Achseln von Tragblättern und bilden eine Scheinähre (Krupinska, 1997). Die Früchte der Hanfpflanzen sind kleine, runde Nüsse mit grauer bis brauner Farbe. Das Ursprungsgebiet von *Cannabis sativa* L. ist vermutlich Zentralasien, wo heute noch Wildformen gefunden werden können (Körber-Grohne, 1988).



**Abb. 1.1:** A: Schematische Darstellung weiblicher und männlicher Blütenstände von *C. sativa* L.; a) männliche Pflanze mit Blüten; b) geschlossene männliche Einzelblüte; c) geöffnete männliche Blüte; d) Sprossstück von weiblicher Pflanze mit Blüten; e) weibliche Blüte, offen; f) weibliche Blüte, geschlossen (nach Mansfield, 1986); B: Pflanzen der Faserhanfsorte Felina 34

## 1.2 Bedeutung von *Cannabis sativa* L. als nachwachsender Rohstoff

Seit mehr als 5000 Jahren wird Hanf in verschiedenen Regionen auf der ganzen Welt zur Gewinnung wertvoller Rohstoffe eingesetzt. Vor etwa sechs Jahren begann weltweit die Wiederentdeckung von Hanf als universeller nachwachsender Rohstoff. Derzeit finden in nahezu

allen westeuropäischen Ländern Aktivitäten auf Forschungs- und kommerzieller Ebene zum Thema Hanfanbau und -verwertung statt (Höppner and Menge-Hartmann, 1994; Karus, 1995; Theimer et al, 1997). In Westeuropa wird der Hanfanbau seit der Legalisierung bestimmter Faserhanfsorten 1996 wieder betrieben (Karus et al., 1995; Waskow, 1995). Diese Faserhanfsorten dürfen maximal 0,3 % Tetrahydrocannabinol in der Trockenmasse enthalten. Faserhanf besitzt einige wichtige agronomische Eigenschaften. Dazu zählt die geringe Anfälligkeit gegenüber Schädlingen und die Unterdrückung von Unkräutern durch sehr schnellen Wuchs. Daher kann in der Regel auf den Einsatz von Pestiziden und Herbiziden verzichtet werden (Karus, 1995). Bei eher durchschnittlichem Entzug von Nährstoffen aus dem Boden werden im Vergleich zu anderen Kulturpflanzen hohe Biomasseerträge erreicht (Marquart, 1919; Bocsá and Karus, 1997).

Hanf bildet ein großes Spektrum sekundärer Stoffwechselprodukte. Die bekanntesten sind die von weiblichen Pflanzen in den Köpfeindrüsen ihrer Tragblätter gebildeten Cannabinole, vor allem das Tetrahydrocannabinol (THC), das den Hauptwirkstoff in Haschisch und Marihuana darstellt. Die pharmazeutische Anwendung der Cannabinole ist jedoch älter als ihr Missbrauch als illegales Rauschmittel in der westlichen Welt. Die heute wichtigsten Anwendungsgebiete sind Augeninnendrucksenkung, Antibrechmittel, Appetitanreger bei der Krebs-, Chemo- und Aidstherapie sowie Schmerzmittel bei Tiefenschmerz und Migräne (Karus, 1995; Pate, 1995; Robinson, 1996; AG "Cannabis als Medizin", 2000).

Hanf liefert eine Reihe wertvoller Rohstoffe wie Fasern, Protein und Öl. Die Fasern werden besonders zur Produktion von Baustoffen (Isoliermaterial, Verbundwerkstoffe), Papier (Filter, Teebeutel, Geldscheine) und Textilien verwendet. Die bei der Faserherstellung anfallenden holzhaltigen Schäben eignen sich zur Herstellung von Dämmstoffen und anderen Baustoffen (Dambroth, 1993; Waskow, 1995). Hanffrüchte haben einen sehr hohen Gehalt an wichtigen Mineralien, z. B. Calcium, Magnesium, Phosphor, Natrium und Schwefel. Dagegen besitzen sie einen niedrigen Gehalt an Schwermetallen wie Strontium, Thorium und Arsen. Hanffrüchte enthalten bis zu 30 % Protein, das zum Typ der Legumin-Proteine gezählt wird (Patel et al., 1994). Eine Hand voll Früchte deckt bereits den Tagesbedarf an Protein für Erwachsene. Das Hanfprotein enthält alle 8 essentiellen Aminosäuren in der für die menschliche Ernährung notwendigen Zusammensetzung. Verwendung finden die Hanfsamen als Vogelfutter aber auch zur Herstellung von Gebäck oder Müsli. Die Früchte der Hanfpflanze enthalten zudem etwa 35 % fettes Öl. Es zeichnet sich durch einen hohen und vor allem sehr ausgewogenen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren aus und enthält die in der Muttermilch

vorkommende  $\gamma$ -Linolensäure (Theimer et al., 1997). Damit gehört es zu den wertvollsten und gesündesten pflanzlichen Ölen, das sich gut als Salatöl eignet. Die guten Gleiteigenschaften des Öls sind für technische Anwendungen im Bereich der Farben und Lacke, aber auch in der Kosmetikindustrie von Bedeutung (Karus et al., 1995; Rausch, 1995; Wirtschaftler, 1995). Faserhanf ist als nachwachsender Rohstoff auch unter ökologischen Gesichtspunkten interessant. Im Zuge verstärkter arbeitsmedizinischer Vorschriften zur Verwendung synthetischer Fasern ist zu erwarten, dass die Hanfpflanze als Lieferant gesundheitlich unbedenklicher Naturfasern auch bei der Industrie auf vermehrtes Interesse stößt (Krupinska, 1997).

### 1.3 Schwermetalle in der Umwelt

Schwermetalle können als Elemente bezeichnet werden, die metallische Eigenschaften (Leitfähigkeit, Formbarkeit, Dichte, stabile Kationen) und eine Ordnungszahl größer als 20 besitzen (Bahadir et al., 1995). Im biologischen Sinne werden Schwermetalle klassifiziert als essentiell (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo) und nicht essentiell (Pb, Cd, Hg). Im Boden sind Schwermetalle als natürliche Komponenten oder als ein Ergebnis anthropogener Einflüsse vorhanden. Natürlich vorkommende Mineralienlager, die hohe Schwermetallgehalte aufweisen, lassen sich in vielen Regionen auf der ganzen Erde finden (Foy et al., 1978). Diese Regionen besitzen oft eine charakteristische Flora (Baker, 1995), z. B. Serpentin-Pflanzen, die auf Böden mit hohen Ni-, Cr-, Mg- oder Co-Gehalten wachsen, selenifere Pflanzen, die auf selenreichen Böden vorkommen, uranifere Pflanzen, die auf uranreichen Böden wachsen und calamine Pflanzen, die auf cadmium- bzw. zinkreichen Böden vorkommen. Als ein Ergebnis dieser Assoziation mit spezifischen Erzlagern werden viele Pflanzen als Indikatoren der Schwermetalle im Boden benutzt (Birke and Rauch, 1993).

Die toxische Wirkung der Metalle hängt wesentlich davon ab, in welcher chemischen Form die Elemente vorliegen (Heintz and Reinhardt, 1996). Adsorption an organische Partikel bzw. die Bildung anorganischer Komplexe (Hydroxide, Sulfide) führt zu einer Immobilisierung der Metalle (Fiedler and Rösler, 1993). Eine Absenkung des pH-Wertes führt zu einer Remobilisierung gebundener Metalle und somit zur Erhöhung der Pflanzenverfügbarkeit und der Phytotoxizität (Förstner and Salomons, 1991; Wallnöfer and Engelhardt, 1995).

Das in der vorliegenden Arbeit in der Hauptsache verwendete Schwermetall Cadmium kommt in der Natur selten vor und wird normalerweise als Sekundärprodukt der Verhüttung anderer

Metalle, z. B. von Zink und Blei, deren Erze Cadmium als Verunreinigung enthalten, erhalten. Kontaminationen können auch durch die Herauslösung von Cadmium aus galvanisierten Eisenrohren und den Gebrauch von galvanisierten Materialien in der Lebensmittelproduktion hervorgerufen werden. Erhöhte Cadmium-Konzentrationen in der Umgebung industrieller Betriebe haben die Aufmerksamkeit auf die bekannten toxischen Auswirkungen dieses Metalles gelenkt. In nahezu allen Getränken und Lebensmitteln läßt sich Cadmium nachweisen. Es ist bekannt, dass Tabakblätter hohe Cadmiumgehalte akkumulieren, und als Konsequenz daraus lassen sich erhöhte Cadmiumwerte in den Lebern und Nieren von Rauchern nachweisen (Scherer and Barkemeyer, 1983).

### **1.3.1 Schwermetalltoleranz**

Toxische Schwermetallgehalte in der Umgebung von Pflanzen führen zu Störungen des pflanzlichen Stoffwechsels. Die Inaktivierung vieler Enzyme führt schließlich zum Absterben der Pflanzen (Ernst, 1996). Einige Pflanzen sind in der Lage, auf toxische Konzentrationen eines Stoffes zu reagieren und sich auf diese Bedingungen einzustellen. Diese Reaktionen umfassen sowohl morphologische als auch physiologische Anpassungen, die mögliche Schädigungen des Organismus minimieren (Harbourne, 1992; Brunold, 1996). Die Fähigkeit, Konzentrationen bestimmter Schwermetalle im Wachstumsmedium (aquatisch bzw. terrestrisch) zu überleben, die sich toxisch auf nichttolerante Pflanzen derselben oder anderer Spezies auswirken, wird als Toleranz bezeichnet (Baker, 1981). Die Toleranz gegenüber Schwermetallen und die Akkumulation dieser Metalle im Spross sind von Bedeutung, wenn man abschätzen möchte, ob eine Pflanze für die Remediation schwermetallbelasteter Böden einsetzbar ist.

### **1.3.2 Phytoremediation**

Der Einsatz neuer, alternativer Remediations-Technologien wird vor allem dann interessant, wenn der zu säubernde Boden weiterhin landwirtschaftlich genutzt werden soll. Die Technologien, die Pflanzen oder Mikroorganismen zur Säuberung von Boden oder Wasser einsetzen, werden unter dem Begriff Phytoremediation zusammengefasst. Phytoremediation kann als Prozess definiert werden, in dem Pflanzen Kontaminanten in ihrem jeweiligen Lebensraum absorbieren, akkumulieren oder mittels chemischer Prozesse in ungiftige Stoffe umwandeln (Ensley, 1995). Ein Einsatz dieser Techniken ist auch auf größeren Flächen möglich, vergleichsweise kostengünstig, umwelterhaltend und reduziert, je nach Pflanzenart, durch Ernte

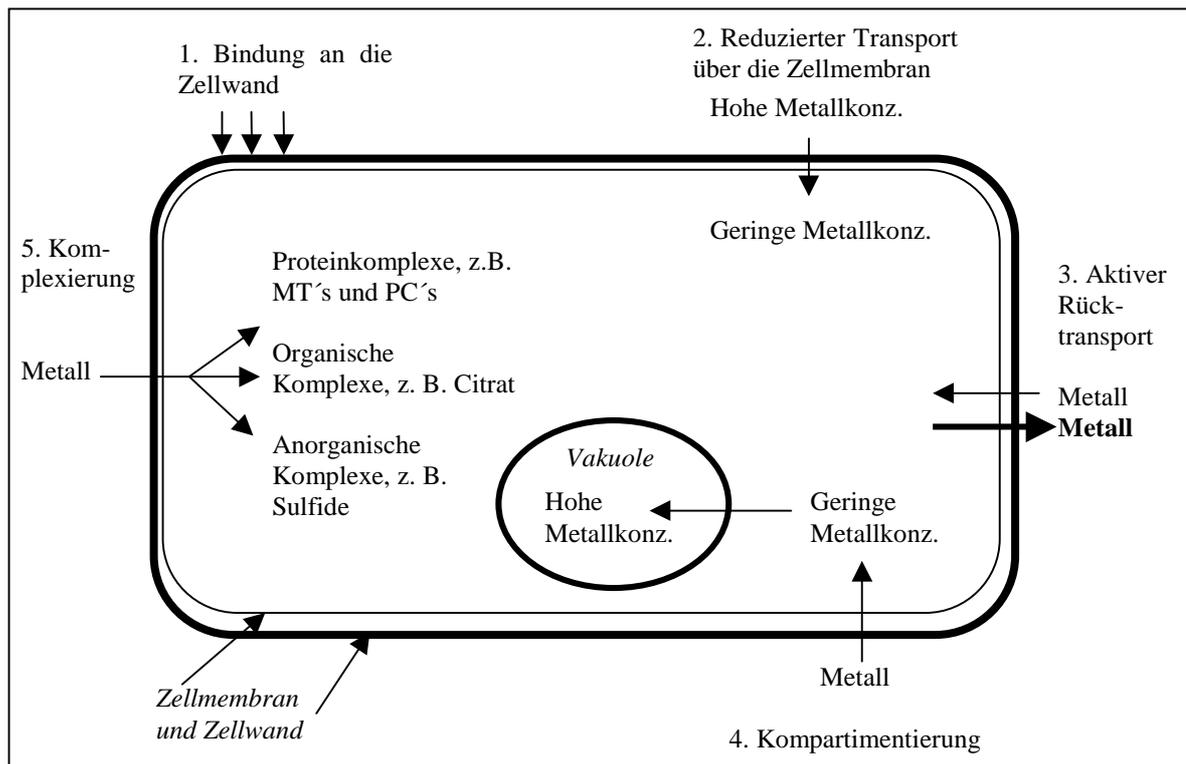
und Verkauf pflanzlicher Rohstoffe die Kosten der Remediation (Chaney et al., 1995; Saxena et al., 1999). Dabei finden unterschiedliche Methoden Anwendung (Cunningham et al., 1995):

- 1) **Phytostabilisation:** Bestimmte Pflanzen können zur Rekultivierung des Bodens angebaut werden. Die Wurzeln dieser Pflanzen stabilisieren durch Sekretion verschiedener Substanzen (Zucker, organische Säuren, phenolische Verbindungen) den Boden, immobilisieren und reduzieren damit die Verfügbarkeit der Metalle (Mench et al., 1988). In diesem Fall ist es notwendig, dass die Pflanzen eine hohe Toleranz gegenüber Schwermetallen aufweisen, viele landwirtschaftliche Nutzpflanzen haben sich in dieser Hinsicht als geeignet erwiesen.
- 2) **Rhizofiltration:** Die Wurzeln der Pflanzen werden dazu verwendet, Metalle zu adsorbieren bzw. zu absorbieren. Die Metalle werden dem Boden durch Ernte der ganzen Pflanze entzogen (Dushenkov et al., 1995). Diese Methode kann für viele Metalle Anwendung finden. Als Beispiele für die in der Rhizofiltration eingesetzten Pflanzen seien hier besonders verschiedene *Helianthus*-, *Brassica*- und *Thlaspi*-Arten genannt (Saxena et al., 1999).
- 3) **Phytoextraktion:** Zur Phytoextraktion besonders geeignet sind die sogenannten Hyperakkumulatorpflanzen. Geerntet werden nur die oberirdischen Organe, die ganze Pflanze muss sich aber gegenüber hohen Schwermetallkonzentrationen als tolerant erweisen. Die Akkumulation ungewöhnlich hoher Schwermetallkonzentrationen in den oberirdischen Sprosssteilen (mehr als 1000 µg/g Frischgewicht für Schwermetalle wie Nickel oder Zink) ist Voraussetzung, um als sogenannter Hyperakkumulator zu gelten (Brooks, 1994). Es handelt sich hierbei um Pflanzen, die zum Großteil auf Böden mit natürlichem hohem Schwermetallgehalt beheimatet sind (z. B. Erzlagerstätten), wie z. B. *Brassica juncea* L. oder verschiedene *Thlaspi*-Arten (Brown et al., 1995). Die Aufnahme von Metallen durch Hyperakkumulatorpflanzen wird bislang nur wenig verstanden (Chaney et al., 1997).

### **1.3.3 Mechanismen der Schwermetalltoleranz**

In vielen Experimenten, die die Schwermetalltoleranz von Pflanzen untersuchten, wurde Cadmium verwendet, da dieses Metall für das Pflanzenwachstum nicht essentiell ist (Ernst et al., 1992). Es ist daher nicht notwendig, zwischen den für das Wachstum benötigten

Konzentrationen und denen, die sich toxisch auf die Pflanzen auswirken, zu unterscheiden. Pflanzen verfolgen zwei verschiedene Strategien (Baker and Walker, 1989) als Antwort auf Schwermetallstress: Ausschluß von Metallen (Verhinderung des Eindringens von Metallen in die Pflanze) und Aufnahme von Metallen (Indikator- und Hyperakkumulatorpflanzen). Pflanzen, die Metalle nicht vollständig ausschließen, verfügen über einen oder mehrere der fünf in Abb. 1.2 gezeigten Toleranzmechanismen (Tomsett and Thurman, 1988):



**Abb. 1.2:** Mögliche Mechanismen der Schwermetalltoleranz von Pflanzen (Tomsett and Thurman, 1988)

Abb. 1.2 illustriert verschiedene Mechanismen der Metalltoleranz in Pflanzen (Tomsett and Thurman, 1988). Cadmiumtoleranz bei Gräsern, die auf blei- und zinkhaltiger Erde in Belgien und Deutschland wuchsen, wurde erstmals von Simon (1977) beschrieben. Seit Cadmium karzinogene und mutagene Eigenschaften zugeschrieben werden (Degraeve, 1981), begann eine verstärkte Untersuchung der Aufnahme und Toleranz von Pflanzen von bzw. gegenüber Cadmium. Die Rolle von Phytochelatinen in der Cadmiumtoleranz wurde besonders mit Hilfe von Zelllinien, die Mutationen im Bereich der Glutathion- bzw. Phytochelatinsynthese aufwiesen, demonstriert (Howden and Cobbett, 1992; Salt and Wagner, 1993; Ortiz et al., 1995).

## 1.4 Pflanzliche Adaption an Schwermetallstress

Einige im Tier- und Pflanzenreich scheinbar universell vorkommende thiolreiche Proteine und Peptide (Metallothioneine) stellen die unmittelbare Reaktion der Organismen auf die intrazelluläre Schwermetallaufnahme dar (Grill et al., 1987; Gekeler et al., 1989; Rauser, 1990, 1993, 1995; Zenk, 1996). Metallothioneine (MT's) sind in der Lage, Metallionen mittels der Thiolgruppen des Cysteins zu binden und somit die Regulierung der zellulären Konzentration von freien Metallionen zu gewährleisten (Hamer, 1986; Rauser, 1990; Steffens, 1990; Robinson et al., 1993). Sie bilden mit Schwermetallen wie Cadmium oder Kupfer Komplexe, die z. B. zur Entgiftung des Cadmiums (Steffens et al.; 1986; Grill et al., 1987; Delhaize et al., 1989) und zur Kupfer-Homöostase beitragen (Grill et al., 1988). Dagegen zeigen sie nur eine geringe Affinität für Zink und Aluminium (Grill et al., 1985). Diese thiolreichen Polypeptide sind im Tier- und Pflanzenreich sehr weitverbreitet, möglicherweise universell, und konnten auch in Mikroorganismen nachgewiesen werden (Margoshes and Vallee, 1957; Grill et al., 1985; Robinson et al., 1992).

### 1.4.1 Glutathion

Glutathion (GSH) dient als Substrat zur intrazellulären Synthese einer als MT III bezeichneten Klasse der Metallothioneine (Grill and Zenk, 1989). Das Tripeptid Glutathion wurde in nahezu allen Zellen nachgewiesen und stellt das wichtigste nicht proteinogene Thiol pflanzlicher, tierischer und prokaryotischer Zellen dar (Kosower and Kosower, 1978; Rennenberg, 1987). Glutathion übt Funktionen im Metabolismus, in Transport und Speicherung von reduziertem Schwefel und Cystein (Meister and Tate, 1976; Rennenberg et al., 1979; Rennenberg, 1982), im zellulären Schutz gegen oxidativen Stress (Alscher, 1989; Larson, 1988; Foyer et al., 1994), der Entgiftung verschiedener Xenobiotika (Lamoureux and Rusness, 1993) und im zellulären Schutz gegen einige Schwermetalle (Baker, 1981) aus. In pflanzlichen Zellen erfolgt die GSH-Synthese sowohl in den Chloroplasten als auch im Cytosol (Klapheck et al., 1987; Hell and Bergmann, 1988, 1990; Hausladen and Alscher, 1993). Im ersten Schritt werden Glutamat (Glu) und Cystein (Cys) durch eine ATP-abhängige  $\gamma$ -Glutamylcysteinase aneinander gebunden um  $\gamma$ -Glu-Cys zu erhalten (Lancaster et al., 1989; Steffens and Williams, 1989; Hell and Bergmann, 1990; Ruegsegger and Brunold, 1992). Im zweiten Schritt der Glutathionsynthese wird Glycin (Gly) mittels einer ATP-abhängigen Glutathionsynthetase an das Dipeptid synthetisiert (Law and

Halliwell, 1986; Klapheck et al., 1987; Hell and Bergmann, 1988; Ruegsegger et al., 1990). Das so entstandene Glutathion wird deshalb auch mit  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly abgekürzt.

### **1.4.2 Metallothioneine**

Der Name Metallothionein wurde erstmals 1957 dazu benutzt, ein Cadmium-bindendes Protein zu beschreiben (Margoshes and Vallee, 1957). Dieses aus Pferdenieren isolierte Protein enthielt vergleichsweise hohe Cadmium- und Schwefelgehalte. Während der vergangenen 40 Jahre ist es gelungen, Metallothioneine aus verschiedenen Organismengruppen zu isolieren und zu zeigen, dass diese Komplexe aus Proteinen und Metallionen wie  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  (Hamer, 1986; Kagi and Schaffer, 1988) gebildet werden. Metallothioneine, die aus Prokaryoten isoliert wurden, komplexierten ebenfalls Metallionen (Olafson et al., 1988; Robinson et al., 1992). Basierend auf Hamer's Definition (1986) enthalten Metallothioneine keine aromatischen Aminosäuren, kein Histidin und 4 bis 12 Schwermetallionen pro Proteinmolekül. Der Cysteinanteil beträgt 20 bis 30 %. Metallothioneine lassen sich, basierend auf ihrer Aminosäurezusammensetzung, in drei Klassen einteilen (Kagi and Schaffer, 1988). Metallothioneine der Klasse MT I bestehen aus Proteinen, die eine hochgradige Übereinstimmung in der Anordnung der Cysteingruppen zeigen. Es handelt sich hauptsächlich um Metallothioneine der Vertebraten. Die Klasse MT II beinhaltet unter anderem Metallothioneine aus Hefen, Bakterien, Weizen und Seeigeln. Diese Gruppe besitzt nicht die Homologien der Metallothioneine der Klasse I. Ähnlichkeiten zwischen den Metallothioneinen der Klasse II sind hauptsächlich durch die große Anzahl an Cysteingruppen bedingt. Metallothioneine der Klasse MT III werden als Phytochelatine bezeichnet (PC's). Bei Phytochelatinen handelt es sich, im Unterschied zu den Metallothioneinen der Klassen MT I und MT II, nicht um Proteine sondern um nur aus wenigen Aminosäuren zusammengesetzte Peptide (Steffens, 1990). In vielen Organismen wird die Bildung von Metallothioneinen durch die Schwermetalle, an die sie binden, induziert (Beach and Palmiter, 1981; Fogel and Welch, 1982; Fogel et al., 1983).

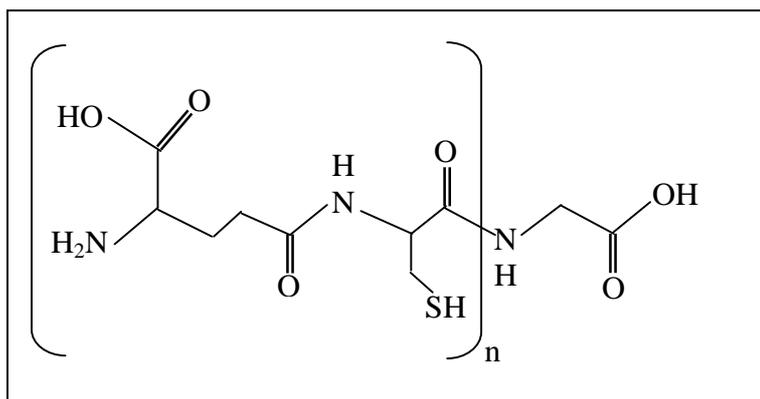
### **1.4.3 Phytochelatine**

In einer aquatischen oder terrestrischen Umgebung, in der sich die Konzentrationen von Metallen wie Cadmium, Kupfer, Blei und Zink verändern können, sind Pflanzen sich ändernden intrazellulären Konzentrationen dieser und anderer bioreaktiver Metalle unterworfen. Aus diesem Grunde profitieren Pflanzen von Mechanismen, die (1) die intrazellulären

Konzentrationen der essentiellen Metalle in bestimmten Grenzen stabilisieren, und (2) die Konzentrationen nicht-essentieller Metalle unterhalb des toxischen Niveaus halten. Während der Suche nach Molekülen, die für die zelluläre Homöostase und Detoxifikation der Metalle in Pflanzen verantwortlich sind, wurden Peptide isoliert, die reich an Cystein-, Glutamat- und Glycin waren. Dieser hohe Anteil der drei Aminosäuren stimmte nicht mit der Zusammensetzung der Metallothionein genannten Proteine aus Pferdenieren überein (Grill et al., 1985).

### 1.4.3.1 Struktur der Phytochelatine

Eine mit Bäckerhefe (Kondo et al., 1984) und eine andere, mit Zellkulturen von *Rauwolfia serpentina* (Grill et al., 1985) arbeitende Gruppe, zeigten, daß diese Cadmium-bindenden Moleküle einer Peptidfamilie mit der Struktur  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  angehören ( $n = 2 - 11$ ). Grill et al. (1985) nannten diese Peptide Phytochelatine (PC's). Kondo et al. (1984) bezeichneten sie als Cadystine. Unter anderem fanden auch die Bezeichnungen  $\gamma$ -Glutamylpeptide und  $\gamma$ -EC-Peptide Verwendung. Dabei wird  $\gamma\text{-(Glu-Cys)}_n\text{-Gly}$  mit  $n = 1$  mit dem Namen Glutathion bezeichnet. Bei der Bindung des sich wiederholenden Glu-Cys-Paares handelt es sich um eine  $\gamma$ -Carboxylamid-Bindung. Die Entdeckung dieser  $\gamma$ -Peptidbindung (Abb. 1.3), und nicht der normalen  $\alpha$ -Peptidbindung, in den Phytochelatinen, legte den Schluss nahe, dass diese Peptide in den Zellen nicht durch Translation entstanden sind (Steffens, 1990).



**Abb. 1.3:** Struktur der Phytochelatine  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ,  $n = 2 - 11$ ), nach Steffens (1990)

Seit der ursprünglichen Entdeckung der PC's wurden 5 verschiedene Familien von  $\gamma$ -Glu-Cys-Peptiden identifiziert, die an der Komplexierung von Metallionen in Pflanzen und Hefen beteiligt sind (Meuwly et al., 1995):

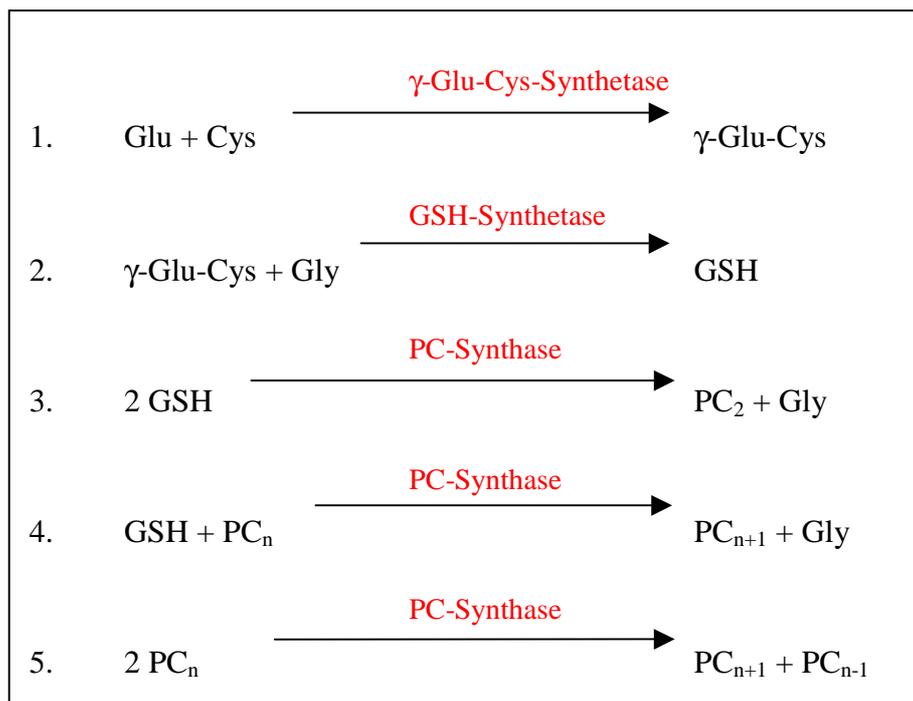
- $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  (Phytochelatine)
- $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$  (Desphytochelatine)
- $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$  (bislang nicht benannt)
- $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$  (Homophytochelatine)
- $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$  (Hydroxymethyl-Phytochelatine)

#### 1.4.3.2 Physiologische Rolle der Phytochelatine

Phytochelatine sind in der Lage, die cytoplasmatische Toxizität der Metalle durch Komplexierung und Transport der Komplexe in die Vakuole zu reduzieren (Grill et al., 1988; Thumann et al., 1991; Kneer and Zenk, 1992). Die Rolle der PC's in der Detoxifizierung der Metalle wurde besonders mit Hilfe von pflanzlichen Zellkulturen untersucht, die cadmiumhaltigem Medium ausgesetzt waren (Huang et al., 1987). Cadmium-resistente Zellen komplexierten mehr als 80% des zellulären Cadmiums in Cd-PC-Komplexen. Die Aufnahme von Cadmium in Cadmium-resistenten Zelllinien war höher als in nicht resistenten Linien, die zudem ein langsames Wachstum zeigten und vorzeitig abstarben (Steffens et al., 1986; Huang and Goldsbrough, 1988; Delhaize et al., 1989). Die vermutete Rolle der PC's in der Detoxifizierung von Schwermetallen wird durch die Beobachtung unterstützt, dass eine Inhibierung der PC-Synthese die Sensitivität der Pflanzen und Zellsuspensionskulturen gegenüber Schwermetallen erhöht (Reese and Wagner, 1987; Salt et al., 1989; Chen and Goldsbrough, 1994). Da die Phytochelatine bei der Suche nach Molekülen, die für die Detoxifizierung von Schwermetallen verantwortlich sind und dadurch manchen Pflanzen einen Selektionsvorteil an schwermetallbelasteten Standorten verschaffen, gefunden wurden, war zu vermuten, dass Phytochelatine auch für die Schwermetalltoleranz bei Faserhanf von Bedeutung sind.

### 1.4.3.3 Phytochelatin-Biosynthese

In Zellkulturen von *R. serpentina* wird die Synthese von Phytochelatinen durch die Zugabe von Nitrat- bzw. Sulfatsalzen unterschiedlicher Schwermetalle ausgelöst (Grill et al., 1986; Grill et al., 1987; Reddy und Prasad, 1990). Die Belastung mit Schwermetallen führt zur Synthese von  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_2\text{-Gly}$ , gefolgt von größeren Oligomeren (Grill et al., 1987; Klapheck et al., 1994; Meuwly et al., 1995). Glutathion wird als Substrat von der metallaktivierten PC-Synthase ( $\gamma\text{-Glutamylcystein-dipeptidyltranspeptidase}$ ) für die Biosynthese der Phytochelatine eingesetzt, die eine  $\gamma\text{-Glutamylcystein-Einheit}$  des Glutathions entweder an ein weiteres Glutathionmolekül oder an ein vorher synthetisiertes Phytochelatinmolekül transferiert (Grill and Zenk, 1989; Loeffler et al., 1989). Die biosynthetischen Reaktionen, die zur Synthese von Glutathion und Phytochelatinen führen zeigt Abb. 1.4 (Scheller et al., 1987; Mutoh and Hayashi, 1988; Berger et al., 1989; Howden et al., 1995 a und b; Mendum et al., 1990).



**Abb. 1.4:** Biosynthese der Phytochelatine

## 1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Akkumulation von Schwermetallen und die Synthese thiolhaltiger Peptide unter Schwermetallstress in *Cannabis sativa* L. zu untersuchen. Dabei stand die Bearbeitung folgender Kernfragen im Vordergrund:

- Welche Schwermetalle werden von den Hanfpflanzen bzw. Zellkulturen aufgenommen?
- In welchen Organen werden die Schwermetalle bevorzugt akkumuliert?
- Wie funktioniert die Detoxifikation der Schwermetalle in Faserhanf?
- Eignet sich Faserhanf zur Dekontamination schwermetallbelasteter Böden?
- Lassen sich kontaminierte Pflanzenteile nutzbringend und ohne Beeinträchtigung der Umwelt verwerten?

Vor diesem Hintergrund wurden Untersuchungen an Hanf-Suspensionskulturen der Zelllinie CST 1 und Pflanzen der Faserhanfsorten Felina 34, Fedora und USO 31 durchgeführt. Als Grundlage für die nachfolgenden Freilandversuche wurde in der Hauptsache die Akkumulation von Cadmium in Zellsuspensionskulturen und Pflanzen ermittelt. Zudem wurde die Induktion thiolhaltiger Verbindungen, wie Phytochelatine und Glutathion, unter Einfluß von Cadmium, Blei und Kupfer untersucht. Die Phytochelatin- und Glutathiongehalte sowie die Schwermetallgehalte der Zellsuspensionskulturen wurden den Gehalten in den Pflanzen gegenübergestellt. Begleitend zu den Laborversuchen wurde die unter natürlichen Bedingungen stattfindende Schwermetallaufnahme und -translokation in Faserhanf auf einem mit Klärschlamm gedüngten Feld untersucht und mit im Laborversuch erhaltenen Ergebnissen verglichen. Zu Vergleichszwecken wurden auch andere Spezies wie Tomaten, Weizen oder Mais herangezogen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Bezugsquellen für Chemikalien und Gerätschaften

Quelle	Chemikalien
Serva	EDTA; TFA (reinst)
Roth	Acetonitril (ACN, Rotisolv <sup>®</sup> HPLC); Agar; n-Butanol; CaCl <sub>2</sub> ; DTT p.A.; Essigsäureanhydrid; Essigsäureethylester; Folsäure; H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; Methanol p.A.; NH <sub>4</sub> -Acetat; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; Tris
Merck	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ; Cholinchlorid; CuSO <sub>4</sub> ; Cystein; Dichlormethan; Essigsäure p.A.; Ethanol p.A.; FeSO <sub>4</sub> , HCl p.A.; HNO <sub>3</sub> (65%ig); β-IES; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; Myo-Inositol; MgSO <sub>4</sub> ; MnSO <sub>4</sub> ; NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ; Nicotinsäureamid; Perchlorsäure; Pyridoxalhydrochlorid; SSA; Threonin; ZnSO <sub>4</sub>
Sigma	Acetylchlorid; N-Acetyl-L-cystein; α-Aminobutyrat; Biotin; CdCl <sub>2</sub> ; CdSO <sub>4</sub> ; Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; DE 52; DTNB; Glutamin; GSH; Heptafluorbuttersäureanhydrid; HAuCl <sub>2</sub> ; HgCl <sub>2</sub> ; Kinetin; KJ; KNO <sub>3</sub> ; MS-Salz; NiCl <sub>2</sub> ; Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; Riboflavin; Saccharose; Thiamin
Fluka	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%ig); Ninhydrin
Degussa	AgNO <sub>3</sub>
Schuchardt	Na-Panhotensäure
Pharmacia	QAE –Sephadex A 25; Sephadex -G50

Geräte (sofern nicht im Text angegeben)	Hersteller
Photometer	Perkin-Elmer, Lambda 3B, UV/Vis Spectrophotometer
Gefriertrockner	Freezemobile 12, Virtis Company
Fraktionssammler	Gilson, MicroFractionator
Pumpe	Gilson, Minipuls 2
Schüttler	New Brunswick Scientific, G 10, 120 rpm
Tischzentrifuge	Fischer Micro-Centrifuge, Model 235 B
Klimaschrank, Licht	B. Braun Melsungen AG
Steril-Arbeitsbank	Assab Medizin AB, Horizontal, H4

<b>Geräte</b> (sofern nicht im Text angegeben)	<b>Hersteller</b>
Whirl-Mix	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Labinco 524
Kühlzentrifuge	Beckman Instruments, J2-21 M/E, Rotor JA 20
Trockenschrank	Memmert GmbH. TV 30
Feinwaage	Sartorius GmbH, H 51, Sartorius handy
Toplader-Waage	Sartorius GmbH, L 420 L Sartorius laboratory
Digital-pH-Meter	Knick, Typ 647
pH-Elektrode	Ingold KG, Typ 405
Atomabsorptionsspektrometer	Perkin-Elmer, Varian SpectAA-300
Photometer	Kontron Spektrometer, Uvicon 810
Wasserbad	B. Braun Melsungen AG, Thermomix 1420
Ultraschallbad	Bandelin electronic, Sonorex Super RK 106

## 2.2 Pflanzenmaterial und Kultivierungsbedingungen

### 2.2.1 Kultivierung der Hanf-Zellkulturlinien

Untersucht wurden Kalluskulturen und Zellsuspensions-Kulturen der Zelllinie CST 1 aus einem Hypokotylkallus aus Faserhanfkeimlingen (*Cannabis sativa* L.). Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen, d. h. an der Steril-Arbeitsbank, mit autoklavierten oder sterilisierten Arbeitsgeräten und mit Abflämmen aller möglicherweise kontaminierten Arbeitsmittel und Flächen.

Die Kalluskulturen wurden auf Agarplatten bei Licht (16 h Licht, 8 Stunden Dunkelheit) auf Medium nach Linn und Staba (1961), modifiziert nach Bacher (1980) angezogen und nach 2-wöchigem Wachstum subkultiviert. Die Suspensionskulturen wurden in je 300 ml Kulturmedium im 1 l Erlenmeyerkolben auf Rundschüttlereinsätzen mit 100 Upm im Klimaschrank bei 27 °C unter drei Tageslichtleuchten (Osram L18W/2 Lumilux Tageslicht de Luxe) gehalten und wöchentlich subkultiviert. Der Wechsel des Mediums erfolgte durch Dekantieren des gebrauchten Kulturmediums und eines Teiles der Zellen (zur Reduzierung der Zelldichte) und durch anschließendes Auffüllen mit ca. 300 ml frischem Nährmedium.

<b>Komponente</b>	<b>Einwaage für 1000 ml</b>	<b>Konzentration [mM]</b>
Myo-Inositol	1 g	5,5
Saccharose	20 g	58,4
$\beta$ -Indolessigsäure	0,6 mg	0,003
Kinetin	0,5 mg	0,002
Threonin	15 mg	0,125
Glutamin	0,74 g	5,0
Stammlösung A	100 ml	
Stammlösung B	100 ml	
Fe-EDTA-Lösung **	5 ml	10,0
Agar *	5-8 g	

<b>Komponente Stammlösung A</b>	<b>Einwaage [mg/1000 ml]</b>	<b>Konzentration [mM]</b>
$\text{KNO}_3$	9500	94
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	7200	90
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1850	7,5
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	1660	11,3
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1360	10,0

<b>Komponente Stammlösung B</b>	<b>Einwaage [mg/1000 ml]</b>	<b>Konzentration [<math>\mu\text{M}</math>]</b>
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	70	414,2
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	40,5	140,8
$\text{H}_3\text{BO}_3$	24	388,1
KJ	3,75	22,6
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$	4	0,003
Biotin	10	40,9
Cholinchlorid	10	71,6
Nicotinsäureamid	10	81,9
Na-Panhotensäure	10	41,4
Pyridoxal	10	49,1
Thiamin	10	29,6

Komponente Stammlösung B	Einwaage [mg/1000 ml]	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]
Riboflavin	1	4,1
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ***	0,1	0,4
Folsäure ****	10	22,6

**Tab. 2.1:** Nährmedium nach Bacher (1980), \* Agar: wurde nur für festes Medium verwendet; \*\* Fe-EDTA-Lösung: 557 mg  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  zusammen mit 645 mg EDTA in 100 ml Wasser erwärmen; \*\*\*  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ : 10 mg  $\text{CuSO}_4$  / 100 ml Wasser lösen, 1 ml der Lösung zur Stammlösung B geben; \*\*\*\* Folsäure: 10 mg in 200 ml heißem Wasser vollständig lösen und zur Stammlösung B geben; die Lagerung der Stammlösungen erfolgte bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ; der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  auf 5,5 eingestellt

Die Medien wurden in Aliquots von 500 ml 20 min im Autoklaven autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  wurden die Agarmedien in Petrischalen gegossen. Die Agarplatten wurden nach dem Gelieren mit Parafilm<sup>®</sup>-Streifen umwickelt, in Kunststofftüten verpackt und ebenso wie die Flüssigmedien bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.2.2 Kultivierung der Tomaten-Zellkulturlinien

Vier Kalluskulturen aus Tomaten (*Lycopersicon esculentum* Mill., Varietät: VFNT-Cherry) wurden für die Vergleichsexperimente mit den Hanf-Kalluskulturen (Kap. 3.1) verwendet. Die als Wildtyp bezeichnete Tomaten-Zelllinie (Huang et al., 1987) und die Cadmium-resistenten Zelllinien R2K, R4K und R6K, die auf Medium angezogen wurden, dass 2, 4 bzw. 6 mM Cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ) enthielt, stammten aus dem Labor von Prof. Peter Goldsbrough (Purdue University). Die Wildtyp-Kalluskulturen wurden auf Murashige and Skoog - Medium (MS) angezogen (Gupta and Goldsbrough, 1991). Dem MS-Medium, in dem resistente Zellen angezogen wurden, wurden noch 2, 4 bzw. 6 mM  $\text{CdCl}_2$  sowie 2, 4 bzw. 6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  zugesetzt. Die Kalluskulturen wurden auf Agarplatten im Dunkeln angezogen und nach 2-wöchigem Wachstum subkultiviert.

Komponente	Einwaage für 1000 ml	Konzentration [mM]
MS-Salze	4,35 g	
Saccharose	30 g	87,6
Agar	7 g	

**Tab. 2.2:** Nährmedium nach Murashige and Skoog, modifiziert nach Gupta and Goldsbrough (1991); der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren mit KOH auf 6,0 eingestellt

### **2.2.3 Wachstum der Zellkulturen und Bestimmung des Frischgewichtes**

Wachstum und Entwicklung der zu untersuchenden Suspensionskulturen wurden über einen Zeitraum von 7 - 12 Tagen in Messabständen von ein bis zwei Tagen verfolgt. Der Tag des Transfers der Zellen in frisches Kulturmedium entsprach dabei Kulturtag 0 des jeweiligen Experimentes. Die Tageszeit der Probennahme innerhalb jedes Experimentes wurde ca.  $\pm 1$  h eingehalten.

An jedem Messtag wurden 5 ml der durch horizontales Schwenken möglichst homogen gehaltenen Zellsuspensionen mit Glaspipetten abgenommen. Die Zellen wurden an der Wasserstrahlpumpe über vorher gewogene Membranfilter mit 0,45  $\mu\text{m}$  Porenweite abgesaugt. Da das Medium zu weiteren Messungen verwendet werden sollte, wurden die Zellen nicht mit Wasser abgespült. Der Membranfilter wurde erneut gewogen und das Frischgewicht (FG) der Zellmasse bestimmt. Zu Vergleichszwecken wurde das Frischgewicht auf 1 ml der untersuchten Zellkultur bezogen. Die frische Zellmasse wurde in Aliquots von 300 - 1000 mg in Eppendorf-Reaktionsgefäßen eingewogen und zusammen mit dem ebenfalls aliquotierten Medium bis zur Verwendung für weitere Untersuchungen bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **2.2.4 Kultivierung der Pflanzen und Probennahme im Gewächshaus**

Die für die verschiedenen Untersuchungen verwendeten Pflanzen wurden im Gewächshaus auf handelsüblicher Blumenerde (CompoSANA<sup>®</sup> Qualitäts-Blumenerde aus Kultursubstrat, Typ II für Pflanzen mit höherem Nährstoffbedarf zur Pflanzung von Topfpflanzen) angezogen. Angaben laut Herstelleretikett:

pH-Wert ( $\text{CaCl}_2$ ): 5,5-6,5

Leitfähigkeit, Salz g/l: 1,0-2,0

Nährstoffgehalte: 200-300 mg/l N (Stickstoff verfügbar)

200-300 mg/l  $\text{P}_2\text{O}_4$  (Phosphat verfügbar)

300-400 mg/l  $\text{K}_2\text{O}$  (Kaliumoxid verfügbar)

(Aufgrund eines unterschiedlichen Feuchtigkeitsgehaltes können die Nährstoffgehalte schwanken)

Ausgangsstoffe: Hochmoortorf (Zersetzungsgrad:  $\text{H}_5\text{-H}_7$ ) 95 %, Kalk, Perlite und alle wichtigen Pflanzennährstoffe.

Erzeugungsland: Deutschland

Verantwortlicher Inverkehrbringer in Deutschland:

COMPO GmbH

Postfach 2107

D-48008 Münster

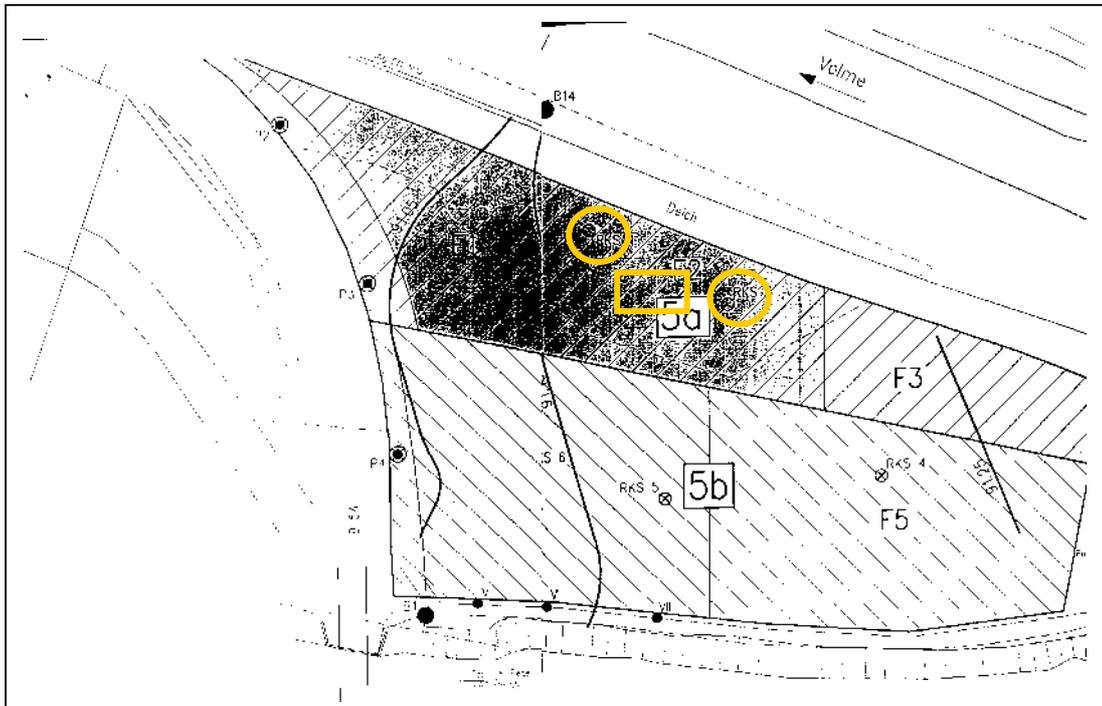
Um den Fehler der unterschiedlichen Zusammensetzung der Erde zu minimieren, wurde nur Erde von der gleichen Charge verwendet. Samen der käuflich erworbenen Hanfvarietäten Felina 34, Fedora und Uso 31 sowie einer Weizenvarietät (unbekannte Sorte) und einer Rapsvarietät (Pronto) wurden in Kunststoffschalen eingesät und im Gewächshaus aufgestellt (Abb. 2.1). Die Erde wurde vor Versuchsbeginn mit den jeweiligen Schwermetalllösungen kontaminiert und über einen Zeitraum von mehreren Tagen durchmischt. Der Tag der Aussaat wurde als Keimungstag 0 definiert. Die Ernte der Pflanzen erfolgte 1 - 90 Tage nach der Aussaat. Um Artefakte durch die biologische Variabilität der Proben gering zu halten, wurde das Pflanzenmaterial zu einer Mischprobe vereinigt, das Frischgewicht bestimmt und für die Versuchsansätze entsprechende Teilmengen entnommen. Die Proben wurden mehrfach mit einfach-destilliertem Wasser gewaschen und bei -30 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.



**Abb. 2.1.:** Hanf- und Weizenkeimlinge 10 Tage nach der Aussaat, angezogen im Gewächshaus

### 2.2.5 Kultivierung und Probennahme im Freilandversuch

Parallel zu den Versuchen im Gewächshaus wurden Versuche im Freiland mit kontaminierter Erde durchgeführt.



**Abb. 2.2:** Plan des mit Klärschlamm gedüngten Areals und Lageangabe der für die Versuche verwendeten Anbaufläche (gelbes Viereck) in Hagen (nach Hygiene-Institut des Ruhrgebietes, 1997)

Das Umweltamt Hagen ermöglichte den Kontakt zu dem Besitzer eines durch Klärschlammdüngung stark schwermetallbelasteten Areals (Abb. 2.2), der die Ausbringung von Saatgut und die Entnahme von Bodenproben freundlicherweise gestattete. Die Freilandversuche wurden in Zusammenarbeit mit Judith Haensler (Universität Düsseldorf) durchgeführt. Die verwendete Anbaufläche (gelbes Viereck, Abb. 2.2) lag zwischen den beiden im Bodengutachten angegebenen Messpunkten (gelbe Kreise, Abb. 2.2) RKS1 und RKS3 (Hygiene-Institut des Ruhrgebietes, 1997). An den beiden Messpunkten wurden die in Tab. 2.3 angegebenen Cadmiumgehalte nachgewiesen.

Messpunkt	Entnahmetiefe [m]	Cadmiumgehalt [mg/kg]
RKS1	0,0 - 0,3	236
	0,3 - 0,5	81
	0,5 - 0,8	9,7
	0,8 - 1,4	5,0
	1,4 - 1,8	2,8
	1,8 - 2,6	0,47
	2,6 - 2,8	0,8
	2,8 - 3,0	< 0,3
RKS3	0,0 - 0,4	99
	0,4 - 1,0	8,7
	1,0 - 1,6	0,44
	1,6 - 2,0	1,2
	2,0 - 3,0	0,47

**Tab. 2.3:** Untersuchung von Bodenproben (Rammkernsondierung) auf ihren Cadmiumgehalt an den Messpunkten RKS1 und RKS3 (nach Hygiene-Institut des Ruhrgebietes, 1997)

Der Tag der Aussaat wurde als Keimungstag 0 definiert. Pflanzenproben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet, mit einfach destilliertem Wasser gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -30 °C eingefroren. Für diese Versuche wurde neben Saatgut der Faserhanfsorte USO 31 auch Saatgut der Rapsorte Pronto, einer Mais- und einer Weizenvarietät ausgebracht. Auf dem schwermetallbelasteten Areal wachsende Wildpflanzen wurden, wie die ausgebrachten Pflanzen, zur Bestimmung der Schwermetallgehalte herangezogen, um einen Vergleich der Aufnahme von Cadmium zwischen den Nutzpflanzen und wild wachsenden Pflanzen ziehen zu können (Abb. 2.3). Verwendet wurden die folgenden Pflanzenarten:

*Cannabis sativa* L. (Faserhanf, Sorte: Uso 31)

*Triticum aestivum* L. (Weizen)

*Brassica napus* L. (Raps, Sorte: Pronto)

*Zea mays* L. (Mais)

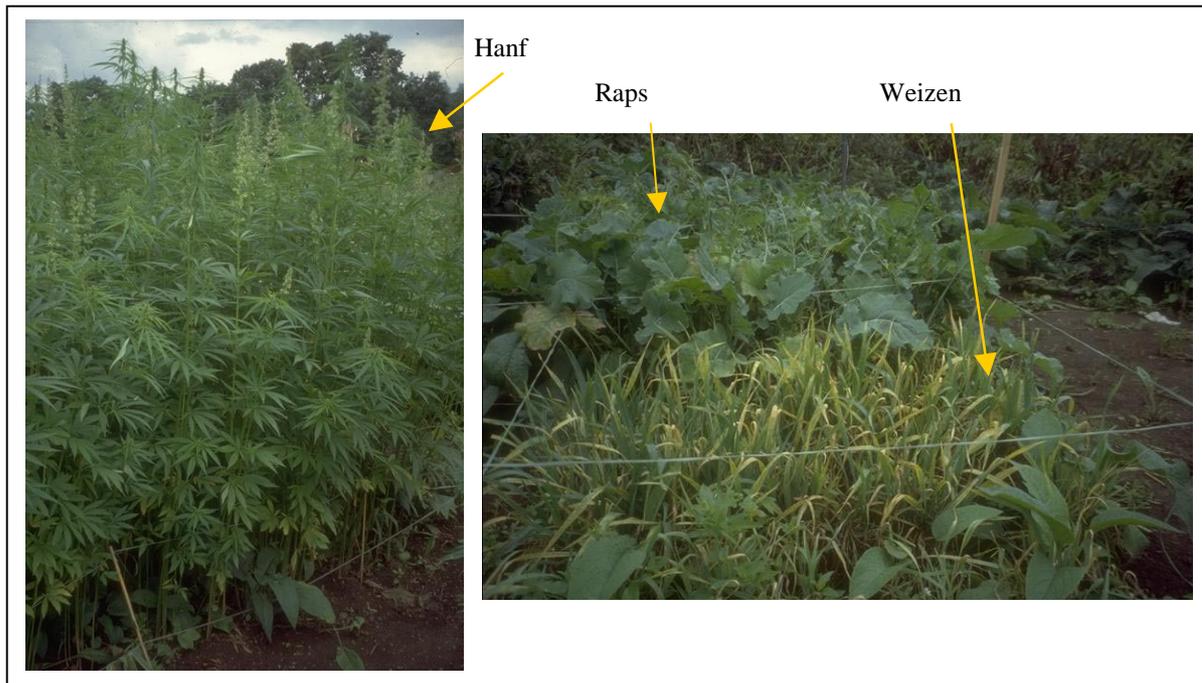
*Symphytum officinale* L. (Gemeiner Beinwell)

*Rumex crispus* L. (Krauser Ampfer)

*Matricaria inodora* L. (Geruchlose Kamille)

*Urtica dioica* L. (Große Brennnessel)

*Impatiens glandulifera* Royle (Drüsiges Springkraut)



**Abb. 2.3:** Hanf-, Raps- bzw. Weizenpflanzen auf dem im Freilandversuch verwendeten Areal in Hagen, 80 Tage nach der Aussaat

## 2.3 Mineralstoffanalytik

Alle Gefäße und Geräte für die Ermittlung der Kationengehalte wurden vor ihrer Verwendung einmal mit 10%iger  $\text{HNO}_3$  (v/v) und anschließend mehrmals mit Aqua dest. gespült. Der Kationengehalt der Proben wurde an einem Atomabsorptionsspektrometer (AAS) ermittelt.

Die Probenlösung wird dabei mittels einer Düse fein zerstäubt und mit Pressluft und Acetylen zu einem brennbaren Gemisch verwirbelt. Die Atomisierung der Inhaltsstoffe erfolgt in einer Flamme im AAS. Die verdampfte Probe wird von einer Hohlkathodenlampe durchstrahlt, die das zu bestimmende Element enthält und damit ein für das Element charakteristisches Linienspektrum erzeugt (Tab. 2.4). Die verdampften Atome absorbieren die Strahlung und schwächen sie dadurch ab. Die Strahlungsschwächung ist ein Maß für die Konzentration des Elementes. Durch Kalibrierung des Gerätes mit Lösungen bekannter Metallkonzentration kann die Konzentration des Elementes in den Proben ermittelt werden (Kretschmar, 1991). Für jedes Element wurde das AAS-Gerät mit 5 Standards, die den linearen Messbereich abdeckten, kalibriert. Die Standardlösungen wurden mit der gleichen Matrix wie die Probenlösungen hergestellt. Es wurden jeweils 3 Messungen der gleichen Probe durchgeführt. Die Richtigkeit der vorgenommenen Kalibrierung wurde in regelmäßigen Abständen (nach 10 Proben) überprüft und gegebenenfalls neu kalibriert.

Schwermetall	Wellenlänge [nm]	Schwermetall	Wellenlänge [nm]
Cadmium	228,8	Zink	213,9
Blei	217,0	Nickel	232,0
Kupfer	324,5	Kobalt	240,7

**Tab. 2.4:** Bedingungen der Schwermetall-Bestimmung mittels AAS, Messmethode: Absorption; Spaltbreite: 0,5 nm, Flamme: Luft-Acetylen

### ***2.3.1 Kationengehalte im Pflanzenmaterial und in Zellen aus Suspensionskulturen***

Um die Kationen, die in der Zelle zu einem Großteil als Salze organischer Säuren vorliegen, in Lösung zu bringen, wurde das zu untersuchende Pflanzenmaterial mittels eines Perchlorsäure/Wasserstoffperoxid-Aufschlusses vollständig oxidiert. Das pflanzliche Material wurde bis zur Gewichtskonstanz bei 60 °C getrocknet und das Trockengewicht bestimmt. Das getrocknete Pflanzenmaterial wurde mit Hilfe eines Mixers homogenisiert und zwischen 10 und 1000 mg Homogenat in Reaktionsgefäße eingewogen, mit je 2 ml Perchlorsäure und 4 ml Wasserstoffperoxid (30%ig) versetzt und bei 240 °C für 2 - 6 Stunden im Sandbad erhitzt. Dabei wurde solange H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugesetzt, bis eine klare Lösung erhalten wurde, die filtriert (Blaubandfilter) und auf ein definiertes Volumen aufgefüllt wurde. Das Aufschlussverfahren wurde durch Blind- und Referenzproben (unbelastetes Saatgut) kontrolliert. Die Ermittlung der Elementgehalte von Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> und Cu<sup>2+</sup> erfolgte mittels AAS direkt in der Lösung.

Proben, deren Elementgehalte außerhalb des Eichbereiches lagen, wurden entsprechend verdünnt und die durchgeführten Verdünnungsschritte in die Berechnung der Elementgehalte einbezogen.

### ***2.3.2 Kationengehalte im Kulturmedium***

Die entnommenen Mediumproben wurden filtriert (Blaubandfilter) und mit 3%iger Salpetersäure angesäuert. Die Ermittlung der Elementgehalte (Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) erfolgte mittels AAS direkt in der Lösung. Proben, deren Elementgehalte außerhalb des Eichbereiches lagen, wurden entsprechend verdünnt und die durchgeführten Verdünnungsschritte in die Berechnung der Elementgehalte einbezogen. Die Standardlösungen wurden mit der gleichen Matrix wie die Probenlösungen hergestellt.

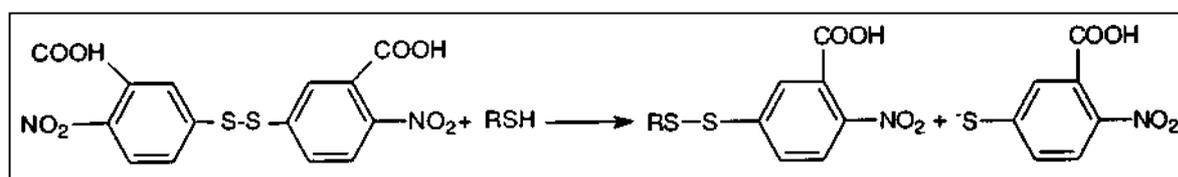
## 2.4 Extraktion und Analytik thiolhaltiger Verbindungen

### 2.4.1 Extraktion thiolhaltiger Peptide

Das Pflanzen- bzw. Zellkulturmaterial wurde in flüssigem Stickstoff homogenisiert. 200 - 400 mg der Proben wurde für die Extraktion der thiolhaltigen Peptide eingesetzt. Den Proben wurden, den eingesetzten Probenmengen entsprechende, Volumina (w/v) 10%iger Sulfosalicylsäure (SSA) zugesetzt (Gupta and Goldsbrough, 1991). Durch den Zusatz von SSA wurde der pH-Wert unter 2,0 gesenkt, die Proteine ausgefällt und S-gebundene Schwermetalle dissoziiert. Die Proben wurden mindestens 10 min auf Eis inkubiert und zwischenzeitlich mehrfach kräftig gemischt. Das so entstandene Lysat wurde bei 12.000 Upm bei 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand filtriert (0,2 µM, 25 mm Filter Unit. NY PP Non-St., Midwest Scientific). Die sauren Extrakte wurden bei -70 °C bis zur Analyse der Thiolpeptide tiefgefroren.

### 2.4.2 Analytik thiolhaltiger Peptide

Die Analytik der thiolhaltigen Peptide (Cystein, Glutathion und seine Vorstufen sowie die Phytochelatine) erfolgte mittels Reversed-Phase HPLC und nachfolgender Online-Nachsäulen-Derivatisierung mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Gupta and Goldsbrough, 1991; Grill et al., 1991) aus 250 µl der in Kap. 2.4.1 beschriebenen Pflanzenextrakte, denen je 50 µl eines Standards (N-Acetyl-L-cystein, 2 mM) zugesetzt worden waren. Das bei der Reaktion von DTNB mit SH-Gruppen freigesetzte 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB; Ellmann, 1959) kann als gelber Farbstoff bei 410 nm detektiert werden (Abb. 2.4).



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

5-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB)

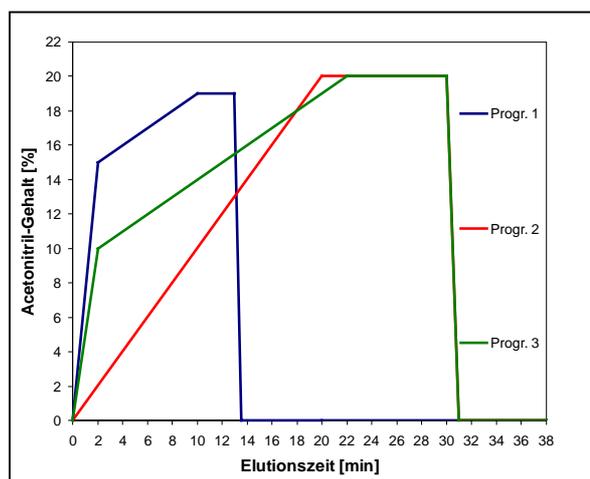
**Abb. 2.4:** Reaktion von DTNB mit Thiolen unter Freisetzung von TNB (nach Anderson, 1989)

### 2.4.3 Optimierung der Analytik thiolhaltiger Peptide

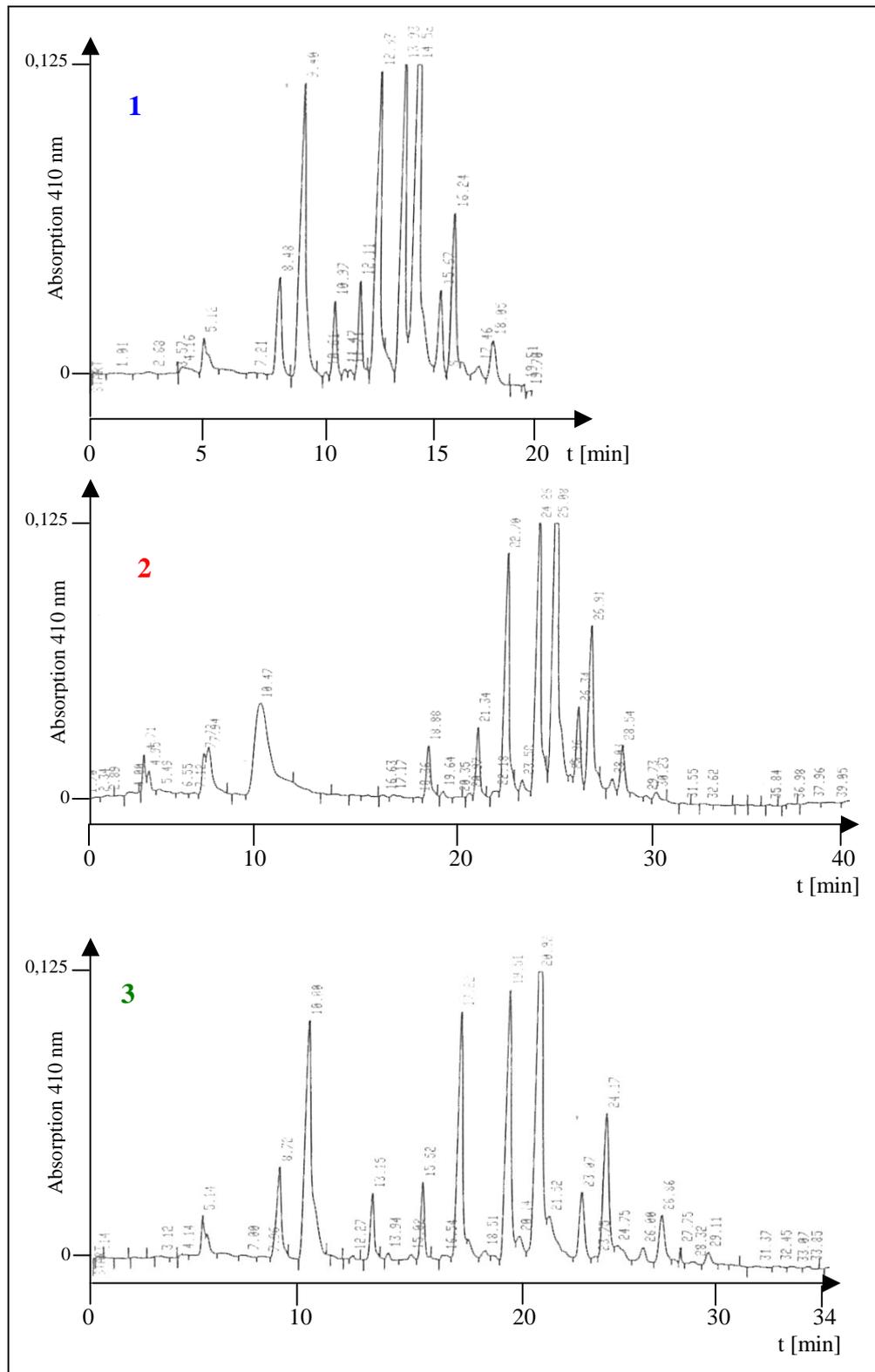
Zur Bestimmung der Thiolpeptidgehalte in den erhaltenen Extraktionsüberständen wurden verschiedene Acetonitril- (ACN-) Gradienten getestet, um ein optimales Verhältnis zwischen Trennung der Peaks und der Chromatographiedauer zu ermitteln (Tab. 2.5, Abb. 2.5). Das Hauptaugenmerk lag jedoch darauf, eine ausreichende Trennung der einzelnen Thiolverbindungen voneinander zu erreichen, die eine Isolierung der einzelnen Peaks nach erfolgter Säulenchromatographie ermöglichen sollte (Abb. 2.6). Folgende Gradienten wurden getestet:

Gradientenprogramm 1		Gradientenprogramm 2		Gradientenprogramm 3	
Zeit [min]	ACN [%]	Zeit [min]	ACN [%]	Zeit [min]	ACN [%]
0 - 2	15	0 - 20	20	0 - 2	10
2.1 - 10	19	20.1 - 30	20	2.1 - 20	20
10.1 - 13	19	30.1 - 40	0	20.1 - 30	20
13 - 20	0			30.1 - 42	0

**Tab. 2.5:** Optimierung des einzusetzenden ACN-Gradienten zur Trennung thiolreicher Verbindungen mittels HPLC



**Abb. 2.5:** Optimierung des einzusetzenden ACN-Gradienten zur Trennung thiolreicher Verbindungen mittels HPLC



**Abb. 2.6:** Elutionsprofile der mittels verschiedener ACN-Gradienten getrennten Thiolverbindungen aus R2K (Tomatenkallus-Kultur angezogen auf 2 mM  $\text{Cd}^{2+}$ ); A: Gradient 1; B: Gradient 2; C: Gradient 3; Detektion bei 410 nm

Die nach der Optimierung in den folgenden Untersuchungen verwendeten HPLC-Bedingungen (ACN-Gradient 3) zur Trennung der Thiolverbindungen aus Hanfpflanzen- und zellkulturen

(Kap. 3.1 bis 3.3) sind in Tab. 2.6 dargestellt. Die in Kap. 3.4 beschriebenen Trennungen thiolreicher Verbindungen wurden an einem zweiten HPLC-System durchgeführt. Die Bedingungen dieser Trennungen sind in Tab. 2.6 kursiv und in Klammern aufgeführt.

<b>HPLC-Bedingungen:</b>		
Controller		Beckman, 421 A ( <i>LKB System One</i> )
Solvent Delivery Module		Beckman, 110 B ( <i>LKB System One</i> )
Einspritzeinheit		Beckman System Organizer ( <i>LKB System One</i> )
Integrator		Hewlett Packard 330 A ( <i>LKB System One</i> )
Derivatisierungspumpe		Milton-Roy, mini Pump VS ( <i>Pharmacia Pump P-3500</i> )
Detektor		Beckman, 163 Variable Wavelength Detector ( <i>LKB System One</i> )
Säule		Microsorb-MV, 86-200-C5, C18 5 µm 100 A, Rainin Instrument Company Inc. ( <i>C-18 SuperpacPep S, Pharmacia, 5 µm</i> )
Mobile Phase	A	H <sub>2</sub> O, pH 3,0 mit Trifluoressigsäure (TFA)
	B	ACN
Gradient		0-10 % B in A in 2 min; 2-20 % B in 18 min; 20.1 - 30 min 20 % B; 30.1 - 42 min 0 % B
Fluß		1 ml / min
<b>Nachsäulenderivatisierung:</b>		
DTNB		300 µM in 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer, pH 8,0
Fluss		0,2 ml/min
Reaktionsschleife		1 ml
Detektion		410 nm

**Tab. 2.6:** Bedingungen zur Analytik thiolreicher Verbindungen mittels HPLC

Die Konzentrationen der Peptide wurden über Eichkurven mit Standards der einzelnen Thiolverbindungen berechnet (Gupta and Goldsbrough, 1991), wobei die Peakfläche der den Proben zugesetzten Standardverbindung (N-Acetyl-L-cystein) für jede Messung den Bezugswert von 100 % darstellt.

## **2.5 Anreicherung der Phytochelatine mittels Säulenchromatographie**

### **2.5.1 Probenvorbereitung**

Etwa 20 g des zur Anreicherung der thiolhaltigen Peptide (Phytochelatine) zu verwendenden Zellmaterials (Kalluskulturen von Tomate bzw. Hanf, Kap. 2.2) wurden in 40 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris, pH 8,5) bei 4 °C homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 10.000 Upm bei 4 °C für 10 min zentrifugiert (SS34 Rotor, Sorvall RC5B). Der erhaltene Überstand wurde 10 min auf 65 °C erhitzt und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der aus der zweiten Zentrifugation erhaltene Überstand wurde zur Anreicherung der Thiolpeptide auf eine Säule (QAE Sephadex A 25) aufgetragen, das Sediment wurde verworfen.

### **2.5.2 Säulenchromatographie**

Das zur Anreicherung der Cd-PC-Komplexe verwendete Säulenmaterial (QAE Sephadex A 25) wurde in 500 mM Tris pH 8,0 (10 g QAE Sephadex A 25/ 50 ml Puffer) dreimal für jeweils 2 Stunden und anschließend einmal für 2 Stunden in 50 mM Tris pH 8,0 equilibriert. Diese Arbeitsschritte und das Gießen der Säule mit dem equilibrierten Material fanden bei 4 °C im Kühlraum statt (Gupta und Goldsbrough, 1991).

Die Thiolpeptide enthaltenden Proben wurden auf die vorbereitete Säule (QAE Sephadex A 25) aufgetragen und die Säule anschließend mit zweifachem Säulenvolumen 50 mM Tris (pH 8,0) gewaschen. Die Eluierung der Cd-PC-Komplexe erfolgte mittels eines Kochsalzgradienten (0 - 1,0 M NaCl in 50 mM Tris pH 8,0). Es wurden Fraktionen, bestehend aus je 80 Tropfen (ca. 27 µl/Tropfen), aufgefangen. Die Bestimmung des Thiolgehaltes in den einzelnen Fraktionen erfolgte photometrisch (Kap. 2.5.3).

Die einzelnen Fraktionen wurden mittels HPLC auf ihre Phytochelatin-Zusammensetzung untersucht. Die Fraktionen mit den höchsten Thiolgehalten wurden vereinigt und über 2 Tage bei -80 °C lyophilisiert (300 mTorr). Nach Aufnahme des Lyophilisats in 500 µl Wasser wurde die Proben bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### 2.5.3 Bestimmung des Gesamtthiolgehaltes

Die Bestimmung des Gesamtthiolgehaltes erfolgte aus den in Kap. 2.4.1 bzw. 2.5.2 beschriebenen Extrakten über die Farbreaktion mit DTNB (Kap. 2.4.2). Die Messung erfolgte nach 5 min bei 410 nm photometrisch gegen einen Blindwert ohne Probe mit 100 µl Wasser (Tab. 2.7). Anhand einer Glutathion-Eichkurve im Bereich von 1 - 100 µg GSH/l wurden die Gesamtthiolgehalte der Proben ermittelt.

<b>Testansatz</b>	
Probe	10-100 µl
DTNB	990 - 900 µl

**Tab 2.7:** Testansatz zur photometrischen Bestimmung des Gesamtthiolgehaltes

## 2.6 Identifikation der Phytochelatine

### 2.6.1 Probenvorbereitung

Die Analytik der angereicherten Phytochelatine (Kap. 2.5) erfolgte mittels Reversed-Phase HPLC ohne nachfolgende Online-Nachsäulenderivatisierung. 250 µl der in Kap. 2.5.2 erhaltenen Fraktionen wurden mittels HPLC getrennt. Die Detektion erfolgte im UV-Bereich bei 220 nm. Die den einzelnen Phytochelatinen zugeordneten Peaks wurden nach der Detektion aufgefangen und bei -30 °C eingefroren. Diese Schritte wurden 10 - 15 mal wiederholt. Die Phytochelatin-Fractionen mit identischen Retentionszeiten wurden miteinander vereinigt und über 2 Tage lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden in 100 µl Wasser aufgenommen und zur massenspektrometrischen Analyse sowie zur Aminosäureanalyse (Kap. 2.7.1) eingesetzt.

### 2.6.2 Massenspektrometrie

Die Aufnahme der Massenspektren der thiolhaltigen Peptide wurde mit einem Perseptive Voyager BioSpectrometry-Massenspektrometer (Methode: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)) durchgeführt (Wood, 1982; Budzikiewicz, 1986). Für jede Messung wurde 1 µl Probe mit 1 µl einer Matrix (10 mg/ml  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure in 0,1 % TFA/ACN (1:1)) versetzt und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

### 2.6.3 Identifikation unbekannter Thiolverbindungen mittels LC-MS

Zur Analyse bislang unbekannter Thiolverbindungen wurden Extrakte aus Tomatenkallus-Kulturen- bzw. Hanfsuspensions-Kulturen (Kap. 2.4.1) mittels Säulenchromatographie, die einem Massenspektrometer vorgeschaltet war (LC-MS, Thermospray/FinniganMAT LCQ, Methode: Elektrospray), analysiert. Zur Analyse wurden 10  $\mu\text{l}$  des sauren Extraktes mit Methanol verdünnt. Die LC-Bedingungen entsprachen den in Kap. 2.4.2 beschriebenen Bedingungen, die MS-Bedingungen sind in Tab. 2.8 dargestellt. Da auf eine Nachsäulenderivatisierung verzichtet wurde, erfolgte die Detektion der Verbindungen vor Eintritt in das Massenspektrometer im UV-Bereich bei 220 nm.

<b>LC-MS-Bedingungen:</b>	
Quellspannung	3,51 kV
Kapillarspannung	6 V
Kapillartemperatur	119,5 °C
Druck der Ionenquelle	$9,2 \times 10^{-6}$ Torr
Flußrate (Probe)	10 $\mu\text{l}$ / min
Gas	Stickstoff

**Tab. 2.8:** Bedingungen der massenspektrometrischen Analyse von Thiolverbindungen

Nach Bestimmung der Molekülmassen wurde für verschiedene Thiolverbindungen eine zweite massenspektrometrische Analyse durchgeführt, in der durch Fragmentierung (Tandem-MS) die Zusammensetzung dieser Verbindungen ermittelt werden sollte. Die Fragmentierung der massenspektrometrisch zu analysierenden Verbindungen wurde durch Kollision dieser Moleküle mit Heliumatomen (CAD, Collisionally Activated Decomposition) herbeigeführt. Die Kollisionsenergie wurde auf 30 % der maximal erreichbaren Spannung von 5 V eingestellt.

## **2.7 Aminosäureanalyse**

### **2.7.1 Hydrolyse**

Lyophilisate aus Tomaten- bzw. Hanfkallus-Kulturen (Kap. 2.6.1) wurden zur Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung in 100  $\mu$ l 6 N HCl aufgenommen. Die Proben wurden 6 h bei 120 °C in Glasmikroreaktions-Gefäßen mit Teflon-Septum im Heizblock hydrolysiert und anschließend im Luftstrom getrocknet. Je nach Thiolgehalt (Kap. 2.5.3) wurde den Proben die entsprechende Konzentration des Standards  $\alpha$ -Aminobutyrat (10 mM, AAB) zugesetzt. 2  $\mu$ l des Gemisches wurden zur weiteren Verwendung (Dünnschichtchromatographie, Kap. 2.7.2) abgenommen. Die restliche Probe wurde erneut im Luftstrom getrocknet und zur Derivatisierung eingesetzt (Kap. 2.7.3).

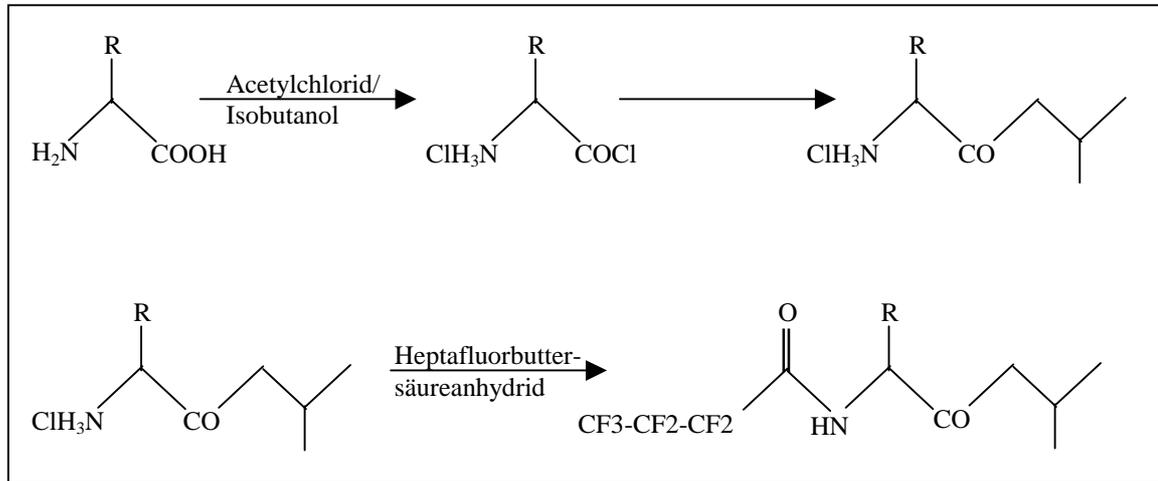
### **2.7.2 Dünnschichtchromatographie**

Die nach Hydrolyse erhaltenen Proben (Kap. 2.7.1) wurden neben Vergleichsstandards auf einer Silicagelplatte (AL SIL G, 20 x 20 cm) aufgetragen. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (60:20:20) verwendet. Zum Nachweis der einzelnen Aminosäuren wurden die Platten nach erfolgter Trennung mit 0,1 % Ninhydrinlösung (in Ethanol) besprüht und mit Hilfe eines Föns erhitzt. Das Ninhydrin reagiert unter diesen Bedingungen mit den Aminosäuren, dieses führt zur Ausbildung gefärbter Spots (rosa bis violett) auf der Silicagelplatte. Die  $R_f$ -Werte der erhaltenen Spots wurden ermittelt und mit den  $R_f$ -Werten der Aminosäure-Standards verglichen (Rhodes, 1998).

### **2.7.3 Derivatisierung**

Den getrockneten Proben (Kap. 2.7.1) wurden 100  $\mu$ l Methylenchlorid zugesetzt. Nach erneuter Trocknung der jetzt wasserfreien Proben wurden 200  $\mu$ l eines Isobutanol/Acetylchlorid-Gemisches (5 ml kaltes Isobutanol + 1 ml Acetylchlorid) zugesetzt und die Proben für 20 min auf 120 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur und Trocknung im Luftstrom wurden den Proben 100  $\mu$ l Heptafluorbuttersäureanhydrid zugesetzt und erneut für 20 min bei 120 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur und Trocknung der Proben wurden diese in einem dem Thiolgehalt proportionalen Volumen eines Ethylacetat/Essigsäureanhydrid-Gemisches (1:1, v/v) aufgenommen. Die Aminosäure-Zusammensetzung der Proben wurde

mittels GC-MS (Finnigan GCQ, EI) analysiert. In Abb. 2.7 sind die durchgeführten Derivatisierungsschritte dargestellt.



**Abb. 2.7:** Derivatisierung der Aminosäuren zur Bestimmung der Aminosäure-Zusammensetzung thiolreicher Peptide in Tomaten- bzw. Hanfkallus-Kulturen mittels GC/MS

## 2.8 Bestimmung des pH-Wertes der belasteten Erde

Der pH-Wert des Bodens ist wichtig für die Aufnahmekapazität der Pflanzen für die essentiellen Nährstoffe. Die günstigen Bodenverhältnisse für Hanf liegen bei pH-Werten zwischen 5,8 und 6,0 (Bocsa and Karus, 1997).

Die Erde wurde im Trockenschrank bis zur Massenkonstanz getrocknet. 10 g Erde wurden mit 75 ml 1 M KCl-Lösung versetzt und 1 Stunde lang kräftig geschüttelt. Im Anschluss daran wurde die Erde von der Lösung abfiltriert und der pH-Wert der Lösung bestimmt (Alef, 1991). Der pH-Wert wurde mit einem Digital pH-Meter, an dem eine KCl/AgCl-250-Elektrode angeschlossen war, bestimmt.

Die in der vorliegenden Arbeit in den im Gewächshaus stattfindenden Versuchen Verwendung findenden  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen beeinflussten den pH-Wert des Bodens nur unwesentlich. Die gemessenen pH-Werte (5,75 – 5,8 für  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen zwischen 0,1 und 40 mM) lagen nur geringfügig unter dem für Hanf als optimal eingestuften Bereich von pH 5,8 - 6,0 (Leise, 1998).

## 2.9 Statistische Auswertung

Die Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichungen und Korrelationskoeffizienten erfolgte durch computergestützte Tabellenkalkulation (MS Excel 97). Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich die Standardabweichungen auf drei parallele Versuchsansätze. Sind keine Standardabweichungen dargestellt, wurden die Ergebnisse in mindestens einer Versuchswiederholung bestätigt.

Die Berechnungen der Akkumulationsfaktoren für die Langzeitversuche im Gewächshaus wurden nach folgender Formel durchgeführt (Bruns, 1998):

$$\sum \frac{SM_P - SM_K}{SM_E} : n$$

$SM_P$  = Schwermetallgehalt der Probe [ $\mu\text{g} / \text{kg TG}$ ]  
 $SM_E$  = Schwermetallgehalt in der Anzuchterde [ $\mu\text{g} / \text{kg}$ ]  
 $SM_K$  = Schwermetallgehalt der Kontrollproben [ $\mu\text{g} / \text{kg TG}$ ]  
 $n$  = Anzahl der Proben

Es wurden nur Werte berücksichtigt, deren Abweichung von der Kontrolle  $> 10\%$  betrug.

### 3. Ergebnisse

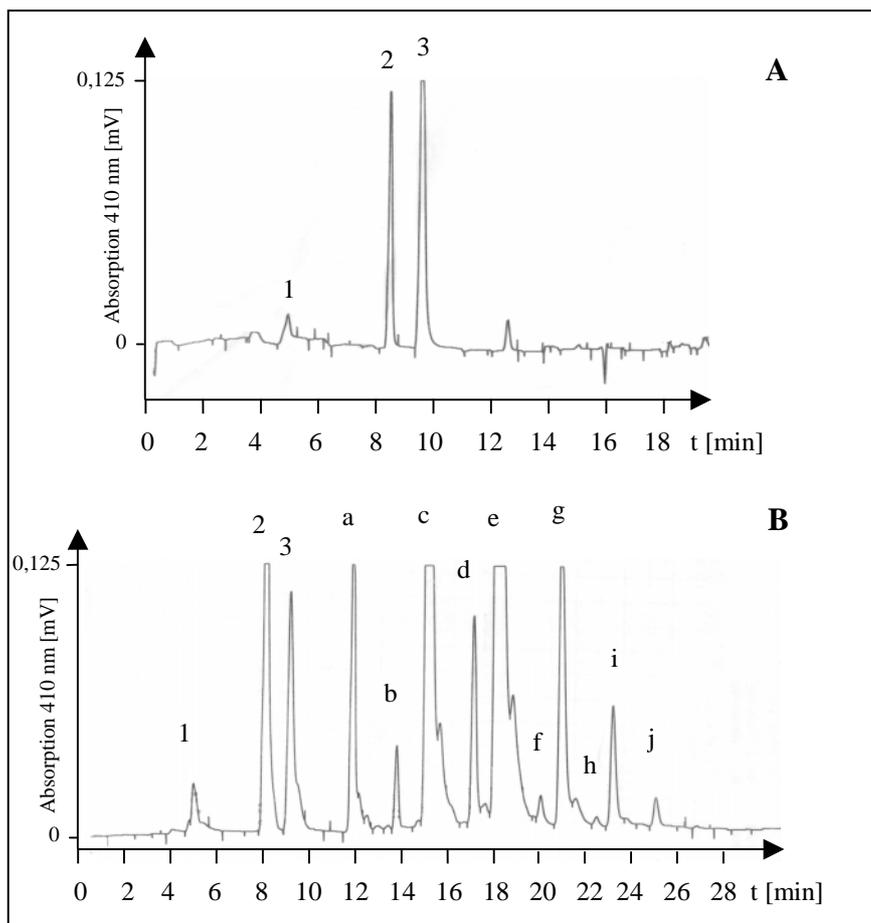
Aufgrund der zum Teil hohen Toxizität der Schwermetalle Cadmium, Blei, Zink und Kupfer, ist die Kontrolle ihres Eintrages in die Umwelt ein wichtiger Bestandteil der heutigen Umweltüberwachung (Bliefert, 1994). Die Toxizität dieser Elemente beruht vor allem auf der Blockierung funktioneller Gruppen, der Verdrängung essentieller Metalle aus Enzymen und in Veränderungen der Molekülkonformation (Mason and Jenkins, 1995). Der Einfluss von Schwermetallen auf den pflanzlichen Organismus kann zu Störungen des Stoffwechsels, z. B. zur Verringerung der Chlorophyll-Synthese, zur Bildung freier Radikale oder zur Reduktion der Transpiration führen (De Vos et al., 1991; Gupta and Devi, 1994; Ernst, 1996). Durch morphologische oder physiologische Adaption sind Pflanzen aber in der Lage, schwermetallreiche Umgebungen zu besiedeln (Grill and Zenk, 1989; Harbourne, 1992; Streit and Stumm, 1993).

Hanf (*Cannabis sativa* L.) ist eine wichtige Ölpflanze und bietet sich neben Raps, Mais und Sonnenblumen als nachwachsender Rohstoff an. Allen voran besitzt Hanf zusätzlich zu seiner Fähigkeit, hochwertiges Öl, Fasern und Schäben zu produzieren, die ökologisch wichtige Eigenschaft, dem Boden Schwermetalle zu entziehen (Mankowski, 1995). Hanf kann möglicherweise als Rekultivierer oder Sanierer kontaminierter Böden eingesetzt werden und liefert zudem Produkte mit hoher Wertschöpfung, die nach den bislang vorliegenden Erkenntnissen nicht oder nur wenig belastet sind (Kozlowski et al., 1995). Untersuchungen zur physiologischen Reaktion von Faserhanf auf Schwermetallstress erfolgten zunächst in Laborexperimenten (Zellkulturen) und im Gewächshaus (Pflanzen). Die hierfür dem Anzuchtmedium zugesetzten Schwermetallkonzentrationen lagen zwischen 5 und 1.000  $\mu\text{M}$  (0,5 bis 112 ppm) für Kallus- und Suspensionskulturen und 50 und 100.000  $\mu\text{M}$  (5,5 bis 11.200 ppm) für in Erde angezogene Pflanzen. Die in den Experimenten eingesetzten Cadmium- ( $\text{Cd}^{2+}$ -) Konzentrationen wurden so gewählt, dass unter Laborbedingungen eine unmittelbare Reaktion von Hanf auf Schwermetallstress erfolgte. Die zur Trennung, Isolation und Identifikation thiolreicher Verbindungen aus Hanf-Kalluskulturen verwendeten Methoden wurden im Vorfeld mittels einer  $\text{Cd}^{2+}$ -resistenten Tomaten-Kalluskultur, die nachweislich Phytochelatine akkumulierte, optimiert (Kap. 2.4.3, Gupta and Goldsbrough, 1991). Die Akkumulation von Phytochelatinen in diesen Tomatenkulturen wird im Folgenden mit der in nicht  $\text{Cd}^{2+}$ -resistenten Hanf-Kalluskulturen, die für zwei Wochen auf 25 - 1.000  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  angezogen wurden (Kap. 2.2.1), verglichen.

### 3.1 Vergleich der Phytochelatinsynthese in Kalluskulturen von *Cannabis sativa* L. und *Lycopersicon esculentum* Mill.

#### 3.1.1 Akkumulation thiolreicher Verbindungen in Tomaten-Kalluskulturen

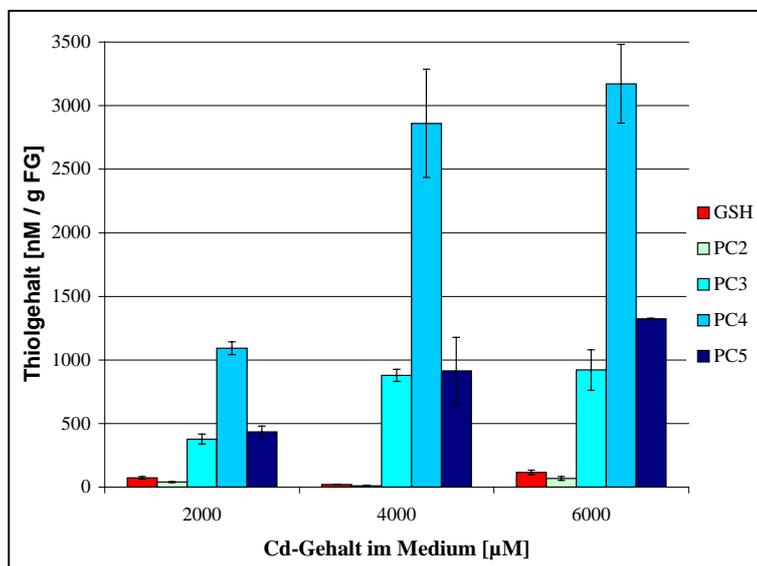
$\text{Cd}^{2+}$ -resistente Kalluskulturen von Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) akkumulierten neben anderen thiolhaltigen Verbindungen auch Phytochelatine in hohen Konzentrationen (Gupta and Goldsbrough, 1991). Die Tomaten-Kalluskulturen wurden über einen Zeitraum von 6 Jahren auf 2.000 - 6.000  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  im Anzuchtmedium angezogen (Kap. 2.2.2). Der eigentliche Wachstumszyklus betrug 2 Wochen. Typische HPLC-Elutionsprofile (Kap. 2.4.2) thiolreicher Verbindungen aus zwei Wochen alten, unbelasteten bzw. auf 6.000  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  gewachsenen Zellen (R6K) sind in Abb. 3.1 dargestellt.



**Abb. 3.1:** HPLC-Chromatogramme thiolhaltiger Verbindungen in Tomaten-Kalluskulturen; A: Kontrolle; B: nach zweiwöchiger Inkubation auf Medium mit 6.000  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  (R6K); 1: Cys; 2: GSH +  $\gamma$ -EC; 3: Standard (N-Acetyl-L-cystein); a, c, e, g, i: Phytochelatine  $\text{PC}_2$  –  $\text{PC}_6$  (Identifikation siehe Kap. 3.1.5); b, d, f, h, j: bisher nicht identifiziert (Identifikation siehe Kap. 3.2.6)

Die Thiolverbindungen Cystein (Cys) und Glutathion (GSH bzw.  $\gamma$ -GluCysGly) und dessen Vorläuferverbindung  $\gamma$ -Glutamylcystein ( $\gamma$ -EC bzw.  $\gamma$ -GluCys) lassen sich sowohl in der unbelasteten als auch in der auf  $6.000 \mu\text{M Cd}^{2+}$  gewachsenen Tomaten-Kalluskultur (R6K) nachweisen. Die belasteten Kalluskulturen akkumulierten jedoch zusätzlich eine große Anzahl verschiedener Thiolverbindungen (a-j, Abb. 3.1), die nach säulenchromatographischer Trennung unter den verwendeten Bedingungen (Kap. 2.4.3) nach 10 bis 30 Minuten eluierten.

In Abb. 3.2 sind die aus den Peakflächen berechneten Gehalte der verschiedenen schwefelreichen Verbindungen in Abhängigkeit von den eingesetzten  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen dargestellt.



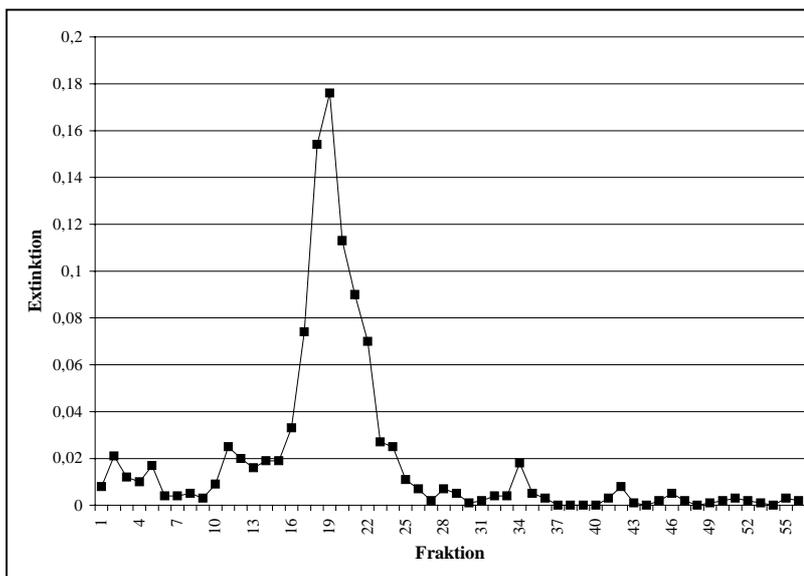
**Abb. 3.2:** Gehalte der Thiolverbindungen in Tomaten-Kalluskulturen in Abhängigkeit von der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration, nach 2 Wochen Wachstum auf  $2.000$  (R2K),  $4.000$  (R4K) und  $6.000 \mu\text{M Cd}^{2+}$ ;  $n=3$

Bei den untersuchten Thiolverbindungen handelte es sich um die Phytochelatine  $\text{PC}_2$  bis  $\text{PC}_5$ , deren Identifizierung in Kapitel 3.1.3 näher beschrieben wird. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines zugesetzten Standards (Kap. 2.4.2). Grundlegende qualitative Veränderungen der HPLC-Profile waren in Abhängigkeit von der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration nicht feststellbar. Lediglich das Verhältnis der Flächen einzelner Peaks änderte sich. Eine Erhöhung der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration im Medium von  $2.000$  ( $2019 \text{ nM/g FG}$ ) auf  $6.000 \mu\text{M Cd}^{2+}$  ( $5603 \text{ nM/g FG}$ ) führte zu einem 2,5-fach höheren Gehalt der verschiedenen Thiolverbindungen in den Zellen. Dabei handelte es sich um eine nicht proportionale Zunahme der Thiolgehalte, die zwischen  $2.000$  und  $4.000 \mu\text{M Cd}^{2+}$  (auf  $232 \%$ ) wesentlich stärker erfolgte als zwischen  $4.000$  und  $6.000 \mu\text{M Cd}^{2+}$  (auf  $119 \%$ ).  $\text{PC}_4$  stellte den Hauptanteil der Thiolverbindungen dar (im Mittel  $58,7 \%$ ), während

nur sehr geringe Gehalte an PC<sub>2</sub> (1,2 %) nachweisbar waren. In 2 Wochen alten Kontrollkulturen ließ sich nur die Thiolverbindung Glutathion nachweisen (151 nM/g FG).

### 3.1.2 Anreicherung thiolreicher Verbindungen aus Tomaten-Kalluskulturen

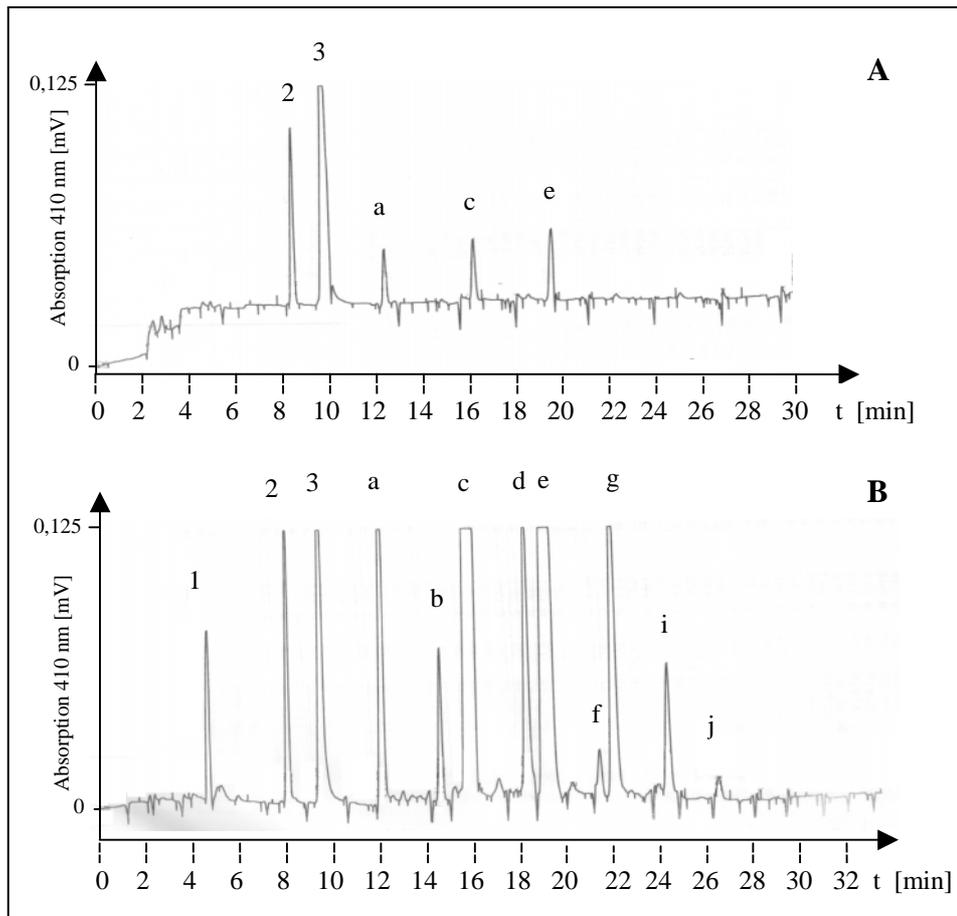
Zur Identifikation der durch HPLC nachgewiesenen Thiolverbindungen wurden Rohextrakte von Tomaten-Kalluskulturen (R6K) mittels Säulenchromatographie (Kap. 2.5.2) angereichert. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf ihren Thiolgehalt hin photometrisch untersucht (Kap. 2.5.3). Abb. 3.3 zeigt die Thiolgehalte der einzelnen Fraktionen.



**Abb. 3.3:** Thiolgehalte der nach Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen aus dem Rohextrakt von R6K (Kap. 3.1.1)

Dabei ergaben sich für die Fraktionen 11 bis 24 die höchsten Thiolgehalte (bis zu 13  $\mu\text{M}$ ), die photometrisch mittels einer Glutathion-Eichkurve ( $y = 0,0137x - 0,0029$ ;  $R^2 = 0,9965$ ) quantifiziert wurden.

Die Zusammensetzung der thiolhaltigen Verbindungen in den einzelnen Fraktionen wurde mittels HPLC bestimmt. Abb. 3.4 zeigt die Elutionsprofile der Fraktionen 15 (1,4  $\mu\text{M}$  GSH-Äquivalente) und 19 (12,8  $\mu\text{M}$  GSH-Äquivalente). Die Elutionsprofile der Fraktionen 19, 20 und 21 entsprachen qualitativ und quantitativ weitestgehend dem des Rohextraktes. Diese Fraktionen wurden zusammengeführt und für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet.

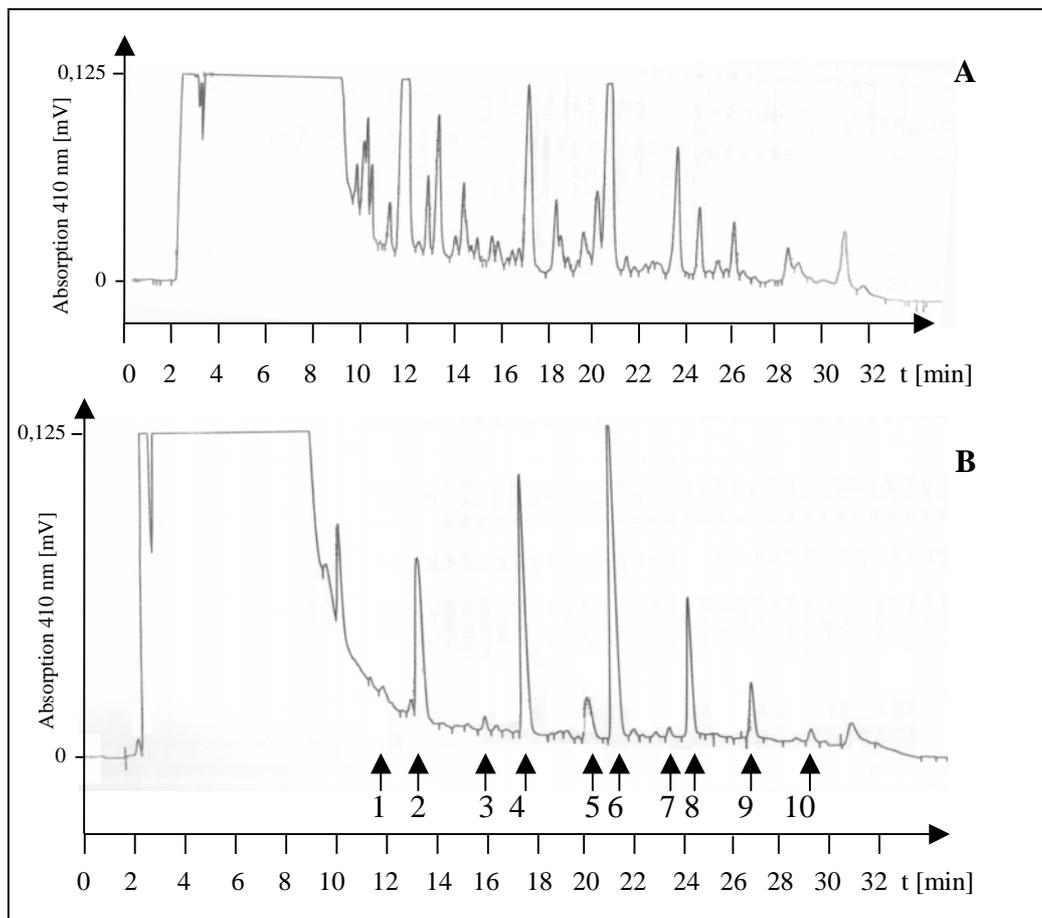


**Abb. 3.4:** HPLC-Elutionsprofile thiolhaltiger Verbindungen nach Säulenchromatographie des Rohextraktes von R6K; A: Fraktion 15; B: Fraktion 19; 1: Cys; 2: GSH +  $\gamma$ -GluCys; 3: Standard (N-Acetyl-L-cystein); a, c, e, g, i: Phytochelatine PC<sub>2</sub> – PC<sub>6</sub> (Identifikation siehe Kap. 3.1.5); b, d, f, h, j: bisher nicht identifiziert (Identifikation siehe Kap. 3.2.6)

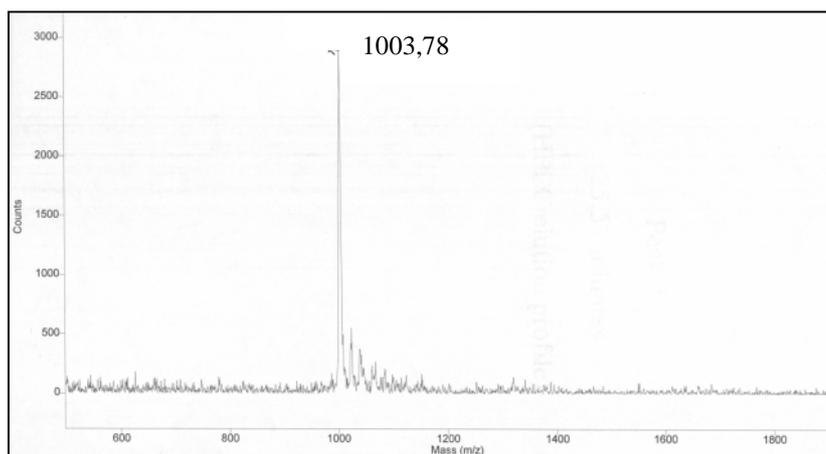
### 3.1.3 Identifikation von Phytochelatinen in Tomaten-Kalluskulturen

Zur Identifikation der thiolhaltigen Verbindungen in Tomaten-Kalluskulturen (R6K) wurden die zusammengeführten Fraktionen 19, 20 und 21 mittels HPLC getrennt (Kap. 2.6.1).

Um die einzelnen Thiolverbindungen isolieren und für die nachfolgende massenspektrometrische Analyse einsetzen zu können, wurde auf eine Nachsäulenderivatisierung mit DTNB verzichtet (Kap. 2.4.2). Die Detektion erfolgte bei 220 nm. Das Elutionsprofil der angereicherten Fraktion (Abb. 3.5 B) wies bei 220 nm erhebliche Unterschiede zu dem des Rohextraktes auf (Abb. 3.5 A). In der angereicherten Fraktion fanden sich im relevanten Bereich (Retentionszeit zwischen 10 und 30 Minuten) nur wenige Peaks, deren Retentionszeit größtenteils denen der Thiolverbindungen im Elutionsprofil bei 410 nm entsprachen.



**Abb. 3.5:** HPLC-Chromatogramme (220 nm) thiohaltiger Verbindungen aus *L. esulentum*; A: R6K, Rohextrakt; B: Fraktion 19; 1 – 10: isolierte Peaks



**Abb. 3.6:** Massenspektrogramm der Substanz in Peak 6

Die Analyse der isolierten Fraktionen erfolgte mittels Massenspektrometrie (Elektrospray-Ionisation, ESI). Abb. 3.6 zeigt das Massenspektrogramm der Substanz in Peak 6, das einen dominanten Peak mit der Masse 1004 aufweist. Mit kleinsten Substanzmengen kann die relative

Molekülmasse, aber auch die Elementarzusammensetzung einer Verbindung mit Hilfe eines Massenspektrometers bestimmt werden (Budzikiewicz, 1972; Fresenius and Lüderwald, 1988). Aus dem Fragmentierungsmuster, das durch den Zerfall der Probe unter Elektronenbeschuss (Collisionally Activated Decomposition, CAD) in einem zweiten Massenspektrometer entsteht (Tandem-MS), lassen sich zudem Aussagen über die Struktur der analysierten Verbindung gewinnen. Die den Peaks 1 – 10 entsprechenden Probenvolumina wurden getrennt aufgefangen, lyophilisiert und nach Aufnahme in Wasser mittels Massenspektrometrie analysiert (Kap. 2.6.2). In Tab. 3.1 sind die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der isolierten Peaks dargestellt.

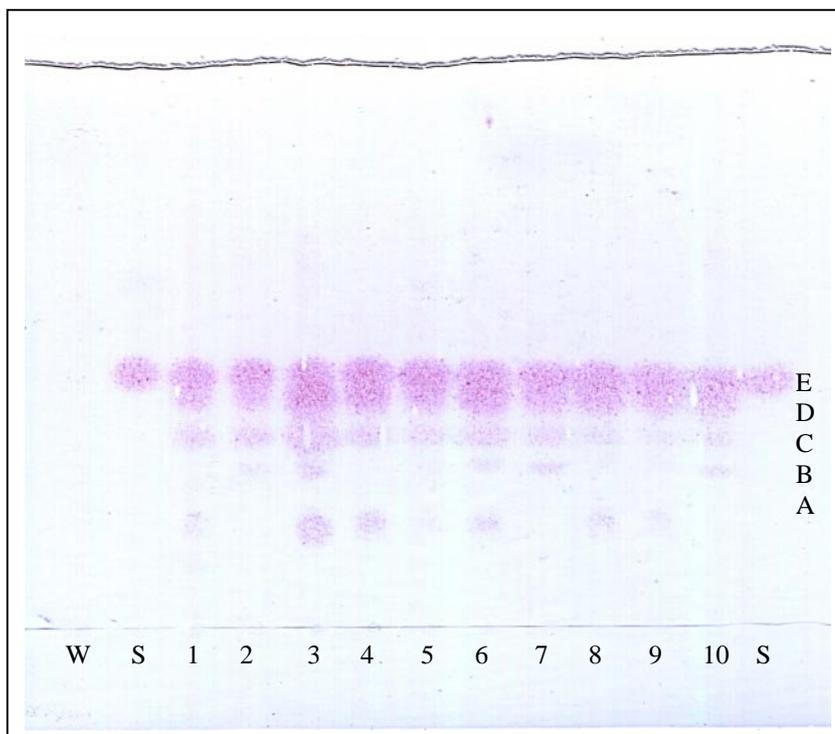
Peak	Molekülmasse [M+H] <sup>+</sup>	Identifik.	Peak	Molekülmasse [M+H] <sup>+</sup>	Identifik.
<b>1</b>	---	---	<b>6</b>	1004	PC <sub>4</sub>
<b>2</b>	540	PC <sub>2</sub>	<b>7</b>	897	---
<b>3</b>	440	---	<b>8</b>	1236	PC <sub>5</sub>
<b>4</b>	772	PC <sub>3</sub>	<b>9</b>	1468	PC <sub>6</sub>
<b>5</b>	875	---	<b>10</b>	1698	(PC <sub>7</sub> )

**Tab. 3.1:** Auflistung der aus massenspektrometrischen Analysen erhaltenen Molekülmassen und Identifizierung der Peaks 1 – 10, R6K

Die Verbindungen in den Peaks 2, 4, 6, 8 und 9 konnten eindeutig als Phytochelatine PC<sub>2</sub> – PC<sub>6</sub> identifiziert werden. Der Nachweis, dass es sich bei Peak 10 um das Phytochelatin PC<sub>7</sub> handelt, konnte jedoch nicht eindeutig erbracht werden.

### 3.1.4 Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung thiolreicher Verbindungen aus Tomaten-Kalluskulturen

Die Zusammensetzung der verschiedenen thiolreichen Verbindungen (Fraktion 1 - 10, Kap. 3.1.3) aus Tomaten-Kalluskulturen sollte mit Hilfe einer Aminosäureanalyse bestimmt werden (Kap. 2.7.3). Im Vorfeld der Aminosäureanalyse mittels GC-MS wurde eine dünnschichtchromatographische Trennung (Abb. 3.7) der mit 6 N HCl hydrolysierten, und so in ihre Aminosäurebestandteile zerlegten, thiolhaltigen Peptide durchgeführt (Kap. 2.7.2).



**Abb. 3.7:** Dünnschichtchromatographische Trennung thiolreicher Peptide (Fraktion 1 - 10, Kap. 3.1.3) aus Tomaten-Kalluskulturen (R6K); W = Wasser; S =  $\alpha$ -Aminobutyrat (Standard); A - E = Aminosäure-Spots

Nach dünnschichtchromatographischer Trennung wurden in den untersuchten Fraktionen 5 verschiedene Aminosäuren nachgewiesen. Die aus Abb. 3.7 ermittelten  $R_f$ -Werte der einzelnen Spots und die  $R_f$ -Werte ebenfalls dünnschichtchromatographisch getrennter Aminosäure-Standards (Rhodes, 1998) sind in Tab. 3.2 dargestellt.

**A**

Aminosäure	R <sub>F</sub> -Wert	Aminosäure	R <sub>F</sub> -Wert
Alanin	0,361	Leucin	0,570
<i>β</i> -Alanin	0,409	Lysin	0,115
Arginin	0,157	Methionin	0,500
Asparagin	0,273	Phenylalanin	0,583
Aspartat	0,319	Prolin	0,272
<i>Cystein</i>	0,170	<i>Serin</i>	0,328
<i>Glutamat</i>	0,386	Threonin	0,351
Glutamin	0,288	Tryptophan	0,587
Glycin	0,306	Tyrosin	0,557
Histidin	0,147	Valin	0,484
Isoleucin	0,576	<i>α</i> -Aminobutyrat	0,452

**B**

Spot	R <sub>F</sub> -Wert	Aminosäure
<b>A</b>	0,171	<i>Cystein</i>
<b>B</b>	0,285	<i>Glutamat</i>
<b>C</b>	0,333	<i>Serin</i>
<b>D</b>	0,408	<i>β</i> -Alanin
<b>E</b>	0,452	<i>α</i> -Aminobutyrat

**Tab. 3.2:** R<sub>F</sub>-Werte der nach DC-Trennung erhaltenen Aminosäure-Spots; A: Aminosäure-Standards; B: Spots A - E aus thiolreichen Verbindungen aus Tomaten-Kalluskulturen

Zugeordnet werden konnten die Aminosäuren Cystein, Glutamat, Serin und *β*-Alanin. Die in Phytochelatinen vorkommende Aminosäure Glycin konnte nach dünnschichtchromatographischer Trennung nicht nachgewiesen werden. Die Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung nach Derivatisierung (Kap. 2.7.3) erfolgte mittels GC-MS, einer aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit gewählten, bis in den ng-Bereich reichenden, Methodik. Das Aminosäure-Gemisch wurde in einem Gaschromatographen (GC) getrennt. Der Ausgang der GC-Säule wurde direkt mit der Ionenquelle des Massenspektrometers verbunden. Die aus der Säule ausströmenden einzelnen Komponenten wurden ionisiert und im Anschluss massenspektrometrisch untersucht (Gudzinowicz et al., 1976). Die einzelnen Aminosäuren ließen sich durch ihren charakteristischen Massenpeak bzw. durch ihr Fragmentierungsmuster identifizieren (Budzikiewicz, 1987).

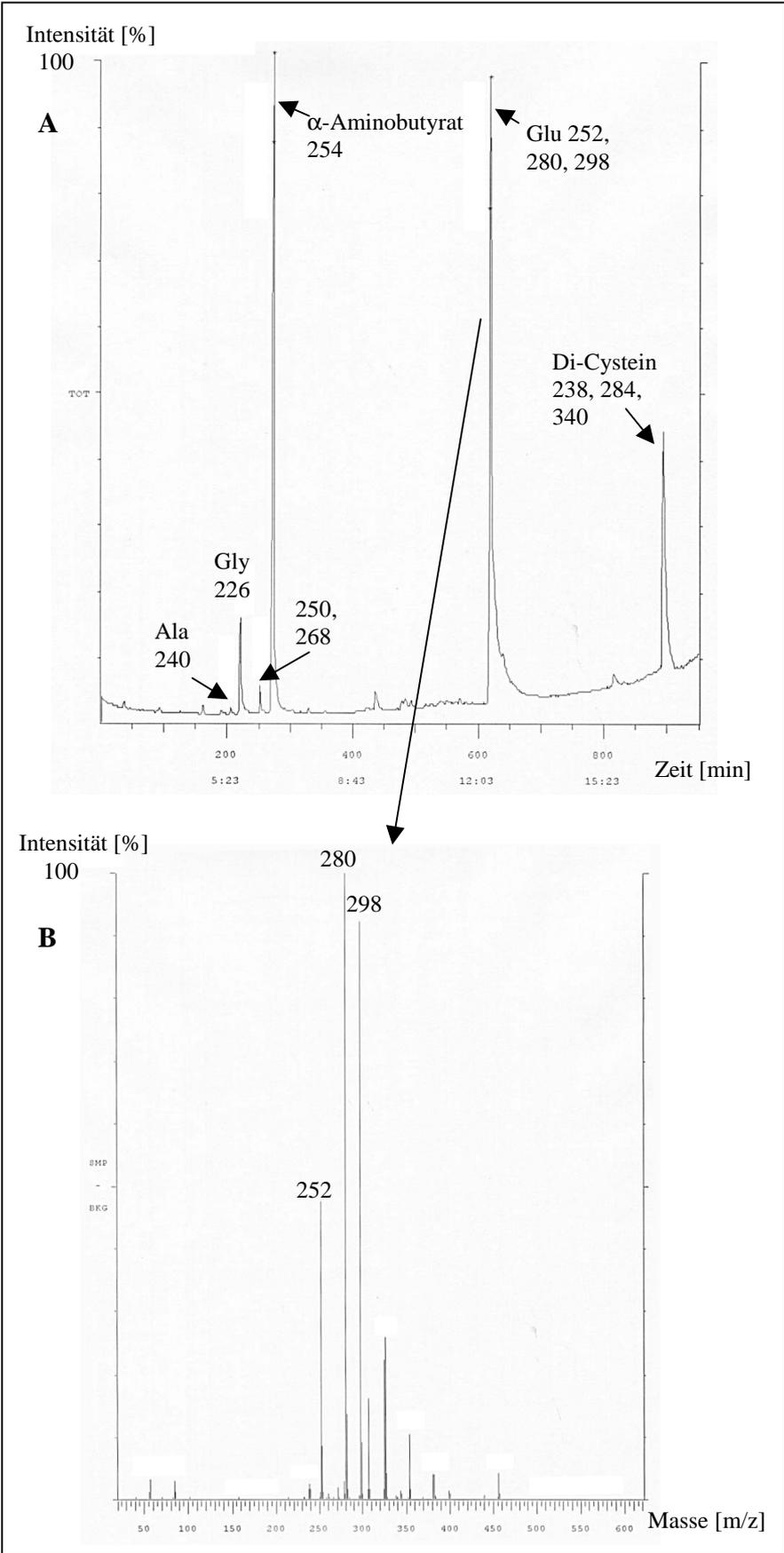


Abb. 3.8: A: Gaschromatographische Trennung der Aminosäuren aus Peak 4; B: Fragmentierung des Glutamat-Peaks (Glu)

In Abbildung 3.8 ist die gaschromatographische Trennung der Aminosäuren der als PC<sub>3</sub> identifizierten Probe (Peak 4; Kap. 3.1.3) und die anschließende Fragmentierung des mittels GC-MS nachgewiesenen Glutamats mit Hilfe eines zweiten Massenspektrometers (Tandem-MS) gezeigt.

Die Bestimmung der Aminosäure-Zusammensetzung thiolreicher Peptide aus Tomaten-Kalluskulturen ergab, dass in nahezu allen, den Peaks 1 – 10 entsprechenden, Proben die für Phytochelatine typischen Aminosäuren Glutamat, Glycin und Cystein (in Form seines Dimers Cystin) nachweisbar waren. Zudem wurden in allen Proben geringe Mengen an Alanin nachgewiesen. In den Peaks 1, 2, 3 und 7 wurden Spuren der Aminosäuren Serin, Valin bzw. Threonin gefunden. Eine eindeutige Identifikation dieser Aminosäuren war jedoch nicht möglich, da nur ein Teil der für die Aminosäuren Serin, Valin bzw. Threonin charakteristischen Fragment-Ionen im Massenspektrogramm gefunden werden konnten. Die Ergebnisse der Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung sind in Tab. 3.3 zusammengefasst.

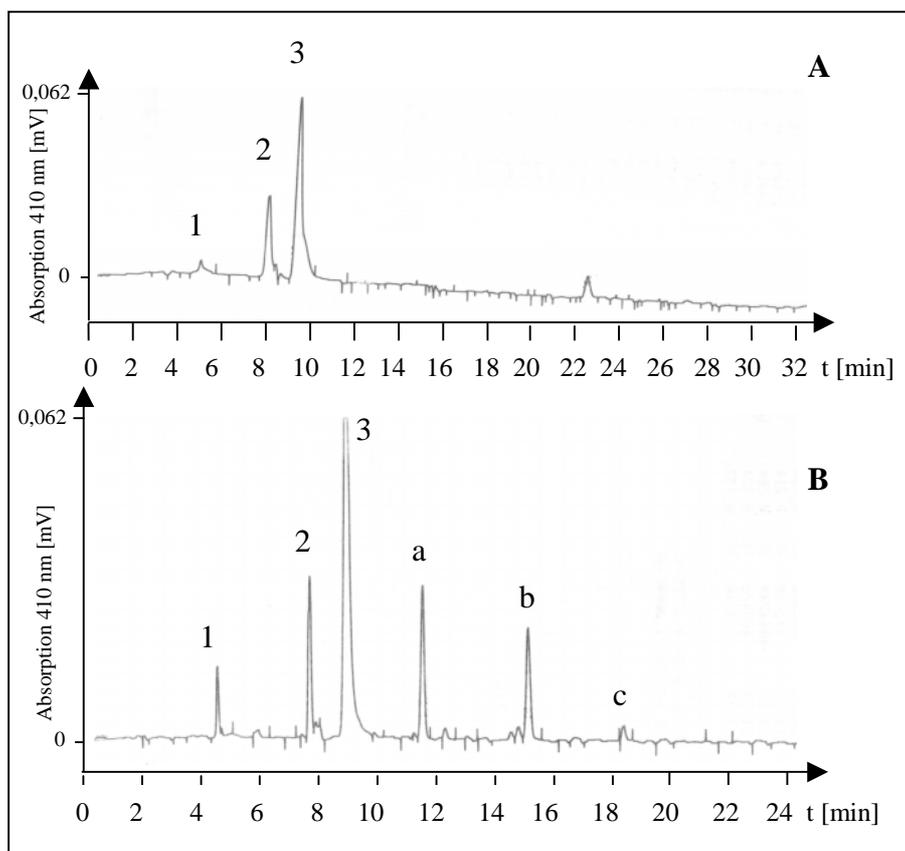
Masse	Identifikation	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
240	Alanin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
226	Glycin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
254	$\alpha$ -Aminobutyrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
253, 268	(Valin)	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
252	(Threonin)	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
238	(Serin)	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
252, 280, 298	Glutamat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
238, 284, 340	Cystin	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-

**Tab. 3.3:** Fragment-Massen und voraussichtliche Aminosäure-Zusammensetzung thiolreicher Peptide isoliert aus Tomaten-Kalluskulturen (R6K); Fraktion 1 - 10 (Kap. 3.1.5)

Die endgültige Identifikation der bislang unbekanntesten thiolreichen Verbindungen (Peaks 1, 3, 5, 7 und 10) aus Tomaten-Kalluskulturen wird in Kap. 3.2.6 beschrieben.

### 3.1.5 Akkumulation thiolreicher Verbindungen in Hanf-Kalluskulturen

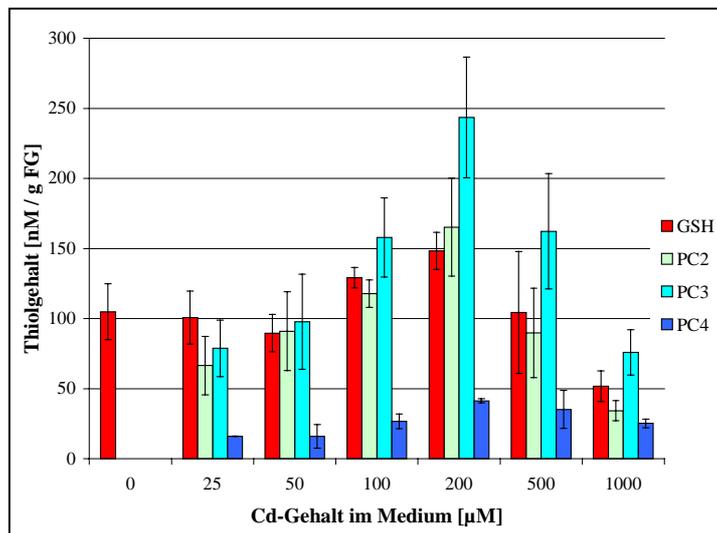
Nach zweiwöchigem Wachstum auf einem Medium, dem 25 – 1000  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  zugesetzt wurden, konnte in Hanf-Kalluskulturen die Synthese schwefelreicher Verbindungen gemessen werden (Möller et al., 1997). HPLC-Elutionsprofile unbelasteter und  $\text{Cd}^{2+}$ -belasteter Hanf-Kalluskulturen sind in den Abb. 3.9 dargestellt. Die Thiolverbindungen Cystein (Cys) und Glutathion (GSH) und dessen Vorläuferverbindung  $\gamma$ -Glutamylcystein ( $\gamma$ -EC) fanden sich sowohl in der unbelasteten als auch in der auf 100  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  gewachsenen Hanf-Kalluskultur.



**Abb. 3.9:** HPLC-Chromatogramme thiolhaltiger Verbindungen in Hanf-Kalluskulturen; A: Kontrolle; B: nach zweiwöchiger Inkubation auf Medium mit 100  $\mu\text{M Cd}^{2+}$ ; 1: Cys; 2: GSH +  $\gamma$ -EC; 3: Standard (N-Acetyl-L-cystein); a, b, c: Phytochelatine  $\text{PC}_2$  –  $\text{PC}_4$  (Identifikation siehe Kap. 3.1.7)

Die belasteten Kulturen akkumulierten zusätzlich weitere Thiolverbindungen (a - c, Abb. 3.9), die nach chromatographischer Trennung (HPLC) unter den verwendeten Bedingungen (Kap. 2.4.2) zwischen 10 und 20 Minuten eluierten. Die Retentionszeiten dieser Thiolverbindungen entsprachen denen als Phytochelatine identifizierten thiolhaltigen Verbindungen aus den Tomaten-Kalluskulturen (Kap. 3.1.1), woraus sich schließen lässt, dass es sich bei den thiolreichen Verbindungen aus Hanf-Kalluskulturen um Phytochelatine handelt.

In Abb. 3.10 sind die Thiolgehalte in Abhängigkeit von der eingesetzten  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration (0 - 1000  $\mu\text{M Cd}^{2+}$ ) dargestellt. Die Thiolgehalte wurden, wie bereits in Kap. 3.1.1 beschrieben, durch Zusatz eines Standards quantifiziert.

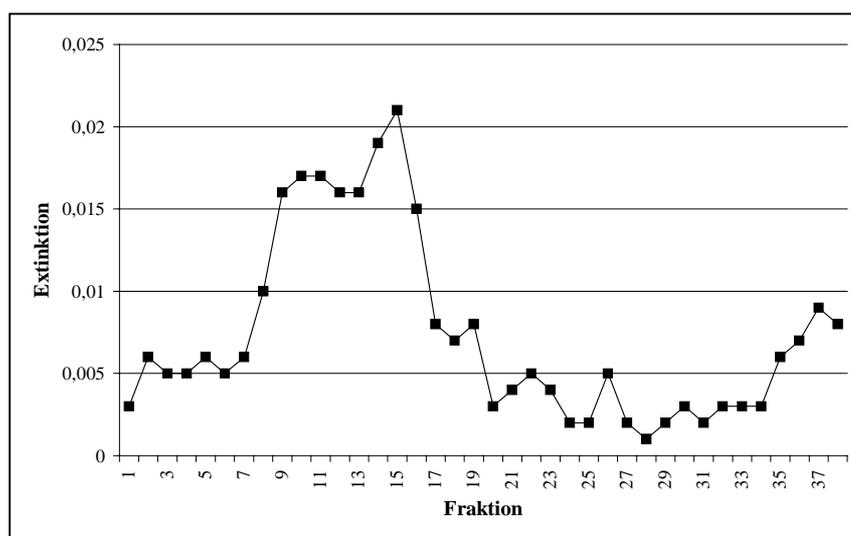


**Abb. 3.10:** Gehalte der Thiolverbindungen in Hanf-Kalluskulturen in Abhängigkeit von der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration, 2 Wochen gewachsen auf 0, 25, 50, 100, 200, 500 und 1.000  $\mu\text{M Cd}^{2+}$ ; n=3

Betrachtet man Abb. 3.10, so lässt sich erkennen, dass sich bei höherer  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration (bis 200  $\mu\text{M Cd}^{2+}$ ) auch die Thiolgehalte in den Hanfzellen erhöhten. Dabei ist jedoch zu beobachten, dass  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte  $> 200 \mu\text{M}$  dazu führten, dass sowohl der Glutathiongehalt als auch der Gehalt an Phytochelatinen gegenüber  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen bis einschließlich 200  $\mu\text{M}$  geringer ausfiel.  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen  $< 25 \mu\text{M}$  und  $> 1.000 \mu\text{M}$  führten nur zu einer geringen Akkumulation von Phytochelatinen (Daten nicht gezeigt). Auf 200  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  gewachsene Hanf-Kalluskulturen akkumulierten 40 % mehr GSH als unbelastete Kulturen. Der in Kalluskulturen, die auf 1.000  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  angezogen wurden, gemessene GSH-Gehalt betrug nur 35 % des für 200  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  nachgewiesenen GSH-Gehaltes. Im Gegensatz zu den Tomaten-Kalluskulturen akkumulierten Hanf-Kalluskulturen vor allem PC<sub>2</sub> (37 %) und PC<sub>3</sub> (54 %), aber nur geringe Mengen PC<sub>4</sub> (9 %). Der Gehalt an Phytochelatinen in Hanf-Kalluskulturen (449 nM/g FG, gewachsen auf 200  $\mu\text{M Cd}^{2+}$ ) betrug demnach 1/12 des PC-Gehaltes in Tomaten-Kalluskulturen (5.487 nM/g FG, gewachsen auf 6.000  $\mu\text{M Cd}^{2+}$ ) bei gleichzeitig 30-fach niedrigerer  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration.

### 3.1.6 Anreicherung thiolreicher Verbindungen aus Hanf-Kalluskulturen

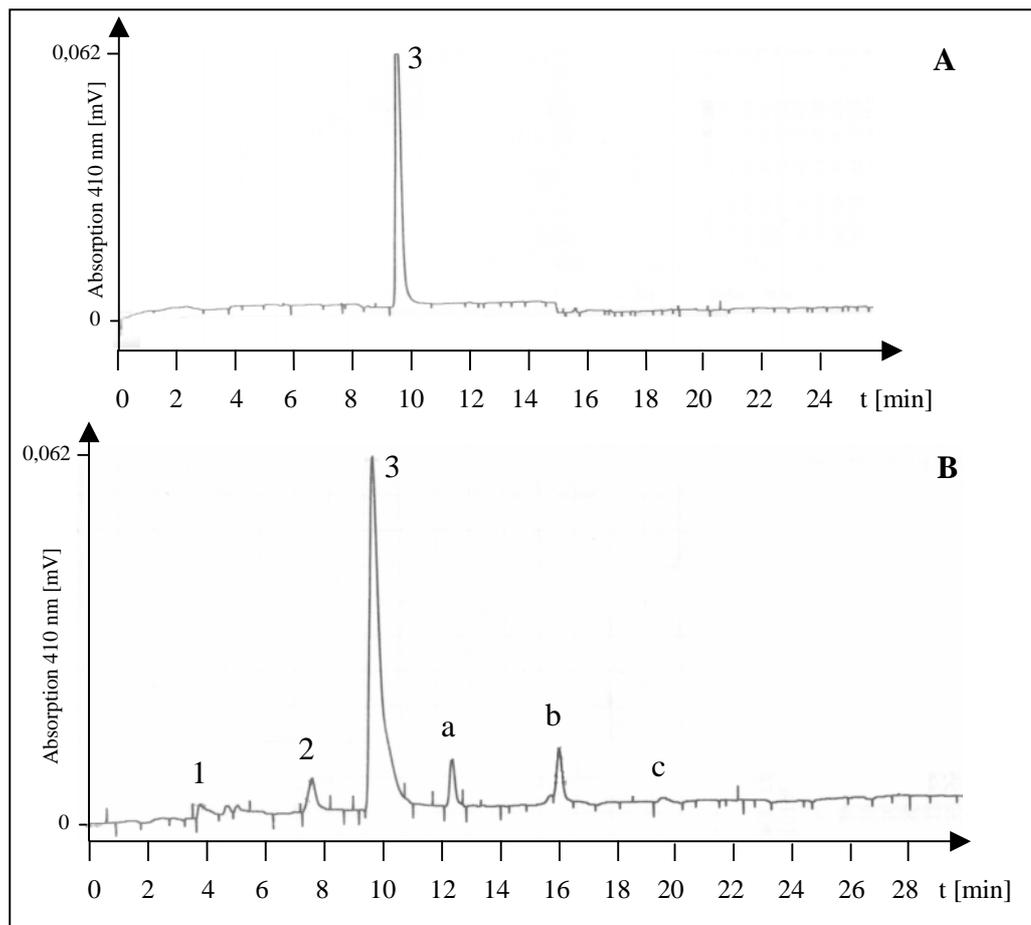
Die in Kap. 3.1.2 beschriebene Anreicherung der Cd-PC-Komplexe wurde auch für Hanf-Kalluskulturen durchgeführt, die für eine Woche auf 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  im Medium angezogen wurden. Abbildung 3.11 gibt die Thiolgehalte in den nach Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen wieder.



**Abb. 3.11:** Thiolgehalte der nach Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen aus dem Rohextrakt von Hanf-Kalluskulturen

Im Vergleich zu den nach Säulenchromatographie in den verschiedenen Fraktionen aus Tomaten-Kalluskulturen gefundenen Thiolgehalten, waren die in den Fraktionen der Hanf-Kalluskulturen nachgewiesenen Thiolgehalte um den Faktor 8 geringer. Die Fraktionen 9 – 19 enthielten die höchsten Thiolgehalte (bis zu 1,3  $\mu\text{M}$  GSH-Äquivalente).

In Abb. 3.12 sind Elutionsprofile der Fraktionen 16 (1,3  $\mu\text{M}$  GSH-Äquivalente) und 18 (0,4  $\mu\text{M}$  GSH-Äquivalente) dargestellt. Die im Rohextrakt nachgewiesenen Thiolverbindungen ließen sich jedoch nur in den Fraktionen 14, 15 und 16 in ähnlicher qualitativer und quantitativer Zusammensetzung wiederfinden. Diese Fraktionen wurden zusammengeführt und für die nachfolgende Identifizierung der Phytochelatine verwendet (Kap. 3.1.7).



**Abb. 3.12:** HPLC-Chromatogramme thiolhaltiger Verbindungen nach Säulenchromatographie des Rohextraktes von Hanf-Kalluskulturen; A: Fraktion 18; B: Fraktion 16; 1: Cys; 2: GSH +  $\gamma$ -GluCys; 3: Standard (N-Acetyl-L-cystein); a, b, c: Phytochelatine PC<sub>2</sub> – PC<sub>4</sub> (Identifikation siehe Kap. 3.1.7)

### 3.1.7 Identifikation von Phytochelatinen in Hanf-Kalluskulturen

Die in Kap. 3.1.3 beschriebene Auftrennung der angereicherten Thiolverbindungen wurde auch für die zusammengeführten Fraktionen 14, 15 und 16 aus der Anreicherung der Thiolverbindungen aus Hanf-Kalluskulturen durchgeführt. Das Elutionsprofil der angereicherten Fraktionen (Abb. 3.13 B) wies erhebliche Unterschiede zu dem Profil des Rohextraktes der nicht auf Cd<sup>2+</sup> angezogenen Kontrollkulturen (Abb. 3.13 A) auf. Die detektierbaren Verbindungen eluierten im Bereich der für Thiolverbindungen typischen Retentionszeiten. Die den Peaks mit den Nummern 1 – 4 entsprechenden Proben wurden isoliert, lyophilisiert, in Wasser aufgenommen und mittels Massenspektrometrie analysiert.



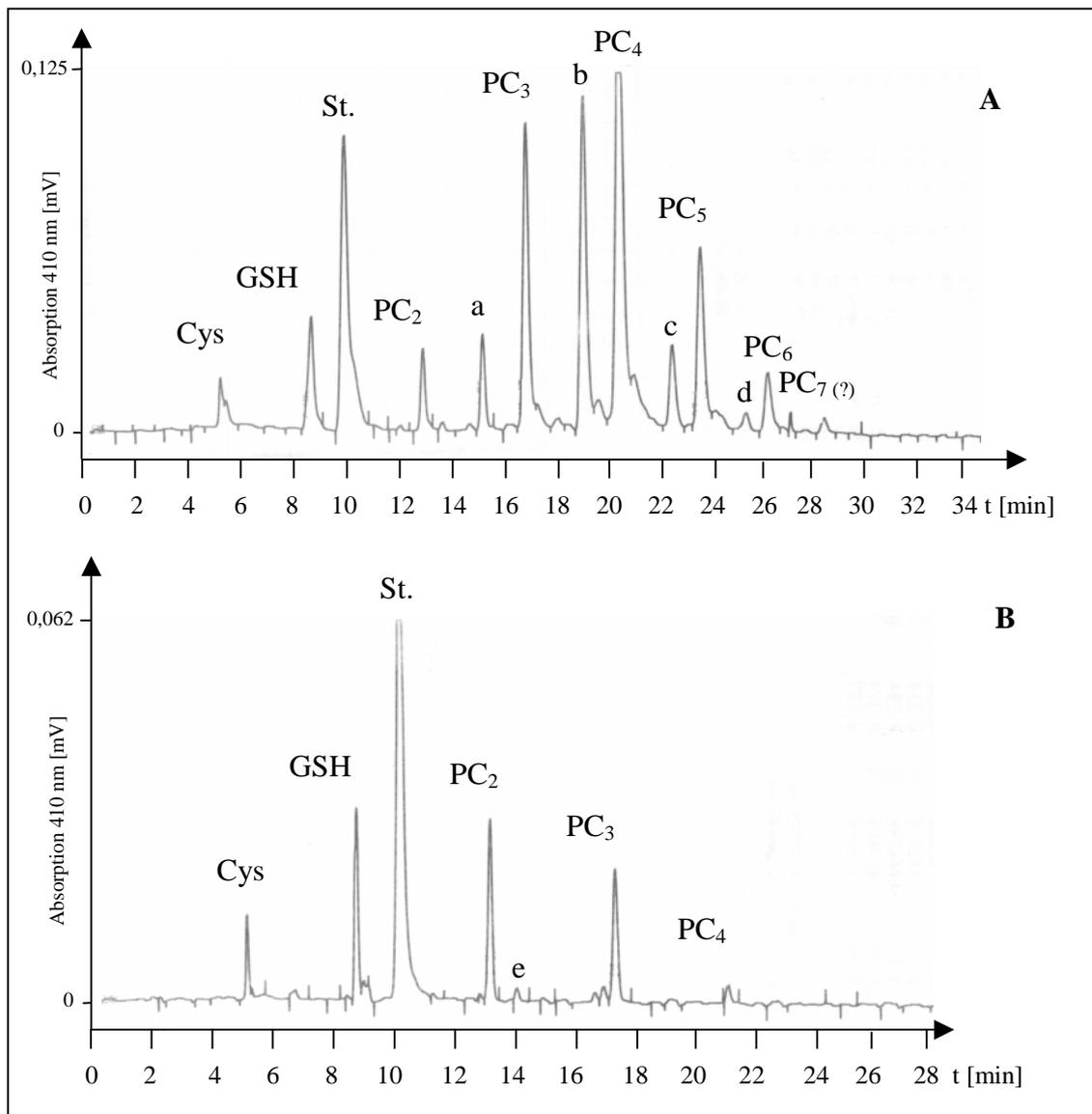
Abb. 3.14 zeigt das Massenspektrogramm der Peak 1 entsprechenden Probe, das einen dominanten Massenpeak bei der Masse 540 aufweist. In Tab. 3.4 sind die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der den Peaks 1 – 4 entsprechenden Proben dargestellt. Die Peaks 1, 3 und 4 konnten eindeutig den Phytochelatinen PC<sub>2</sub> bis PC<sub>4</sub> zugeordnet werden. Im Gegensatz zu den Experimenten mit Tomaten-Kalluskulturen (PC<sub>2</sub> – PC<sub>6</sub>, eventuell PC<sub>7</sub>) ließen sich in Hanf-Kalluskulturen keine höheren Phytochelatine als PC<sub>4</sub> nachweisen.

Peak-Nr.	Molekülmasse [M+H] <sup>+</sup>	Identifikation
1	540	PC <sub>2</sub>
2	480	---
3	772	PC <sub>3</sub>
4	1004	PC <sub>4</sub>

**Tab. 3.4:** Auflistung der aus massenspektrometrischen Analysen erhaltenen Molekülmassen und Zuordnung der Peaks 1 – 4, *C. sativa*

Die Bestimmung der Aminosäure-Zusammensetzung thiolreicher Peptide aus Hanf-Kalluskulturen ergab, dass die 4 untersuchten Fraktionen die für Phytochelatine typischen Aminosäuren Glutamat, Glycin und Cystein (in Form eines Dimers) enthielten, die auch in den entsprechenden Fraktionen aus Tomaten-Kalluskulturen gefunden wurden (Kap. 3.1.4)

Aus den oben dargestellten Untersuchungsergebnissen ergibt sich die folgende Zusammensetzung der in Tomaten- bzw. Hanf-Kalluskulturen nachgewiesenen thiolhaltigen Verbindungen (Abb. 3.15). Dabei wurden sowohl im Elutionsprofil der Tomaten- als auch im Elutionsprofil der Hanf-Kalluskulturproben einzelne Peaks im für Phytochelatine relevanten Retentionsbereich gefunden (Peaks a - e), die bisher nicht als Phytochelatine beschrieben wurden. Die Identifikation dieser bislang unbekanntten Verbindungen wird in Kapitel 3.2.6 beschrieben.



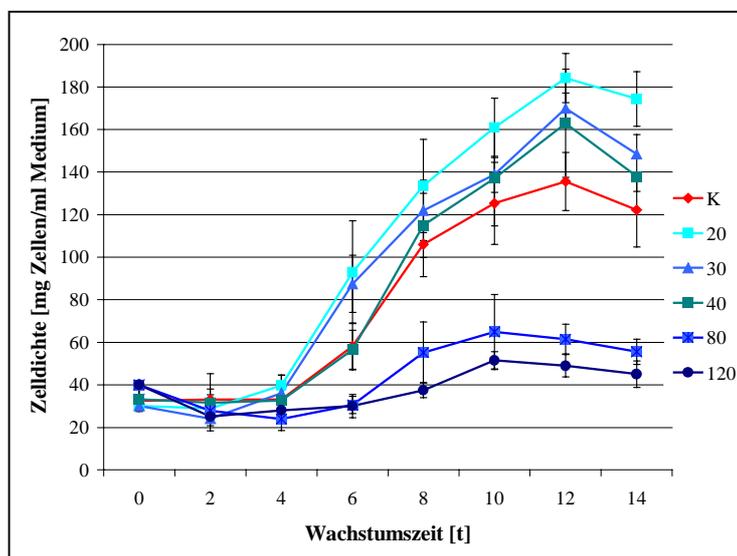
**Abb. 3.15:** HPLC-Chromatogramme (410 nm) thiolhaltiger Verbindungen; A: Tomaten-Kalluskulturen; B: Hanf-Kalluskulturen, a-e: bislang nicht identifizierte Thiolverbindungen

### 3.2 Aufnahme von Schwermetallen und Akkumulation von Phytochelatinen in Hanf-Suspensionskulturen

Hanf-Kalluskulturen sind in der Lage, Schwermetalle aufzunehmen und als Reaktion auf das toxische Metall Phytochelatine zu akkumulieren (Kap. 3.1; Theimer et al., 1997). Da sich jedoch nur wenige Zellen einer Kalluskultur in Kontakt mit dem kontaminierten Medium befinden, erschien es sinnvoll, für die weiterführenden Experimente eine Hanf-Suspensionskultur einzusetzen, bei der ein direkter Kontakt der Zellen mit dem sie umgebenden, kontaminierten Medium sichergestellt war.

#### 3.2.1 Wachstum von Hanf-Suspensionskulturen unter Einfluss von Cadmium

Einen ersten Anhaltspunkt über die Auswirkungen von Schwermetallen auf Hanf-Suspensionskulturen lieferten die Frischgewichtszunahmen unter Einfluss verschiedener Cadmium-Konzentrationen. Abbildung 3.16 zeigt die Zunahme der Frischgewichte von Hanf-Suspensionskulturen, die über einen Zeitraum von 2 Wochen auf 5 verschiedenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen im Medium (0 - 120  $\mu\text{M Cd}^{2+}$ ) angezogen wurden.



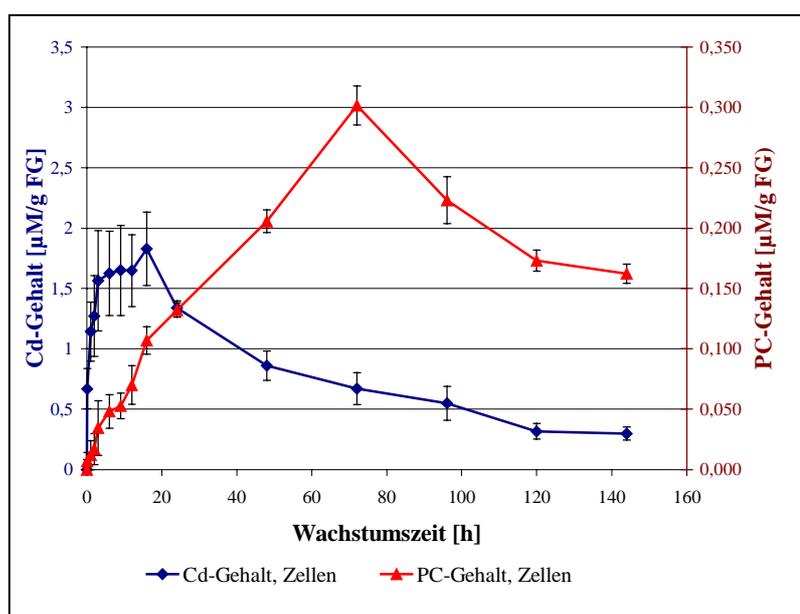
**Abb. 3.16:** Frischgewichte von Hanf-Suspensionskulturen, 14 Tage gewachsen auf 0, 20, 30, 40, 80 bzw. 120  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  im Medium,  $n = 3$

Vergleicht man das Wachstum von Hanf-Suspensionskulturen auf unbelastetem Medium mit dem auf mit 20, 30 bzw. 40  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  kontaminiertem Medium, so wird deutlich, dass ab einer Wachstumszeit von 6 Tagen das Frischgewicht der Kulturen in Gegenwart der 3 verschiedenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen höher lag als das der unbelasteten Kontrollkulturen. Dabei war das

Frischgewicht der Suspensionskultur bei  $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$  im Medium ( $174,4 \text{ mg Zellen/ml Medium}$ ) am Wachstumstag 14 um ca. 43 % höher als bei unbelastetem Medium ( $122,2 \text{ mg/ml}$ ). Für  $40 \mu\text{M Cd}^{2+}$  im Medium ließ sich noch eine Differenz von 13 % nachweisen ( $138 \text{ mg/ml}$ ). Höhere  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen führten zu einer gegenüber der Kontrolle reduzierten Frischgewichtszunahme. Am Wachstumstag 14 betrug das Frischgewicht der Suspensionskultur bei  $80 \mu\text{M Cd}^{2+}$  ca. 50 % ( $61,5 \text{ mg/ml}$ ) des Frischgewichtes der Kontrollkulturen. Kulturen, die bei  $120 \mu\text{M Cd}^{2+}$  im Medium gewachsen waren, erreichten nur ca. 37 % des Frischgewichtes ( $45 \text{ mg/ml}$ ) der Kontrollkulturen. Für alle 6 betrachteten Kulturen war eine lag-Phase des Wachstums von 4 Tagen zu beobachten. Aus diesem Grunde wurden für alle weiteren unter Schwermetalleinfluss durchgeführten Versuche Suspensionskulturen verwendet, die diese lag-Phase hinter sich gelassen hatten und sich in der Wachstumsphase befanden. Den Hanf-Suspensionskulturen wurden demnach am 5. Wachstumstag Schwermetalle wie z. B. Cadmium oder Blei zugesetzt.

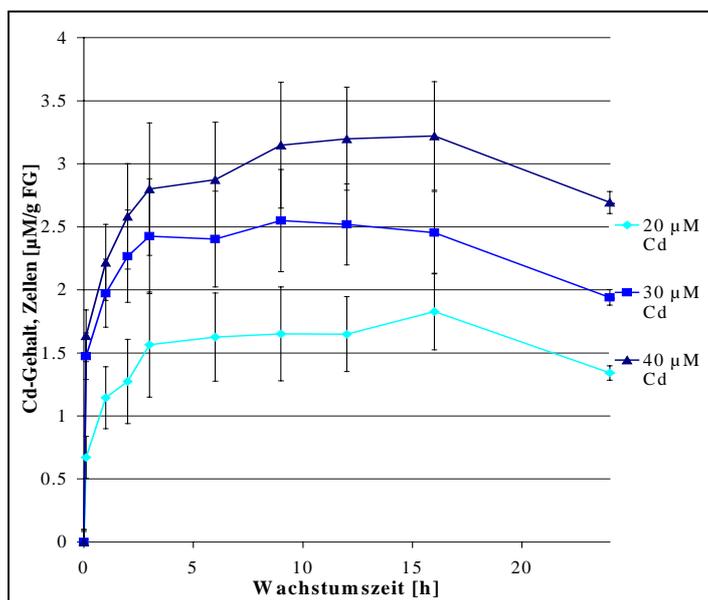
### 3.2.2 Akkumulation von Cadmium in Hanf-Suspensionskulturen

Untersuchungen zur Akkumulation von  $\text{Cd}^{2+}$  in Hanf-Suspensionskulturen wurden durch Zusatz von  $\text{Cd}^{2+}$  zum Kulturmedium und Bestimmung des  $\text{Cd}^{2+}$ -Anteils in den Zellen durchgeführt (Kap. 2.3.1). In Abb. 3.17 ist der Gehalt an  $\text{Cd}^{2+}$  und die Akkumulation von Phytochelatinen in den Zellen dargestellt (Ostwald et al., 1999 b).



**Abb. 3.17:** Akkumulation von  $\text{Cd}^{2+}$  und PC's in Zellen von Hanf-Suspensionskulturen, 6 Tage gewachsen auf  $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$ ;  $n = 4$

Während der ersten 16 h nach Zugabe von  $\text{Cd}^{2+}$  zum Medium wurde  $\text{Cd}^{2+}$  verstärkt in den Zellen akkumuliert. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich  $1,82 \mu\text{M/g}$  FG des dem Medium zugesetzten  $\text{Cd}^{2+}$  in den Zellen. Es ließ sich beobachten, dass der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt im Medium während der ersten 16 h deutlich abnahm. 16 h nach der Cadmiumzugabe stieg der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt im Medium wieder leicht an (Daten nicht gezeigt). Der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den Zellen nahm bis zum 6. Tag nach der  $\text{Cd}^{2+}$ -Zugabe auf  $0,298 \mu\text{M/g}$  FG ab, 16 % des nach 16 h in den Zellen nachgewiesenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes. Bereits wenige Minuten nach der  $\text{Cd}^{2+}$ -Zugabe wurde die Akkumulation von Phytochelatinen in den Zellen nachgewiesen. 3 Tage nach der Zugabe des  $\text{Cd}^{2+}$  erreichte die Phytochelatin-Akkumulation in den Zellen ein Maximum ( $0,3 \mu\text{M/g}$  FG), um während der folgenden 3 Tage auf 54 % des Maximalgehaltes abzusinken. Vergleicht man die Gehalte an  $\text{Cd}^{2+}$  und PC's in den Zellen, so zeigt sich, dass ab 72 h nach  $\text{Cd}^{2+}$ -Zugabe bis zu dreimal höhere  $\text{Cd}^{2+}$ - als PC-Gehalte in den Zellen gefunden wurden. Zum Zeitpunkt des maximalen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes in den Zellen (16 h nach  $\text{Cd}^{2+}$ -Zugabe) wurden 17-mal höhere  $\text{Cd}^{2+}$  als PC-Gehalte in den Zellen nachgewiesen. Es ist daher davon auszugehen, dass die Detoxifizierung von  $\text{Cd}^{2+}$  durch Hanf-Suspensionskulturen nicht nur durch die Bildung von  $\text{Cd}^{2+}$ -PC-Komplexen erfolgte. Abbildung 3.18 gibt die Akkumulation von  $\text{Cd}^{2+}$  durch Hanf-Suspensionskulturen, gewachsen auf verschiedenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen, wieder.



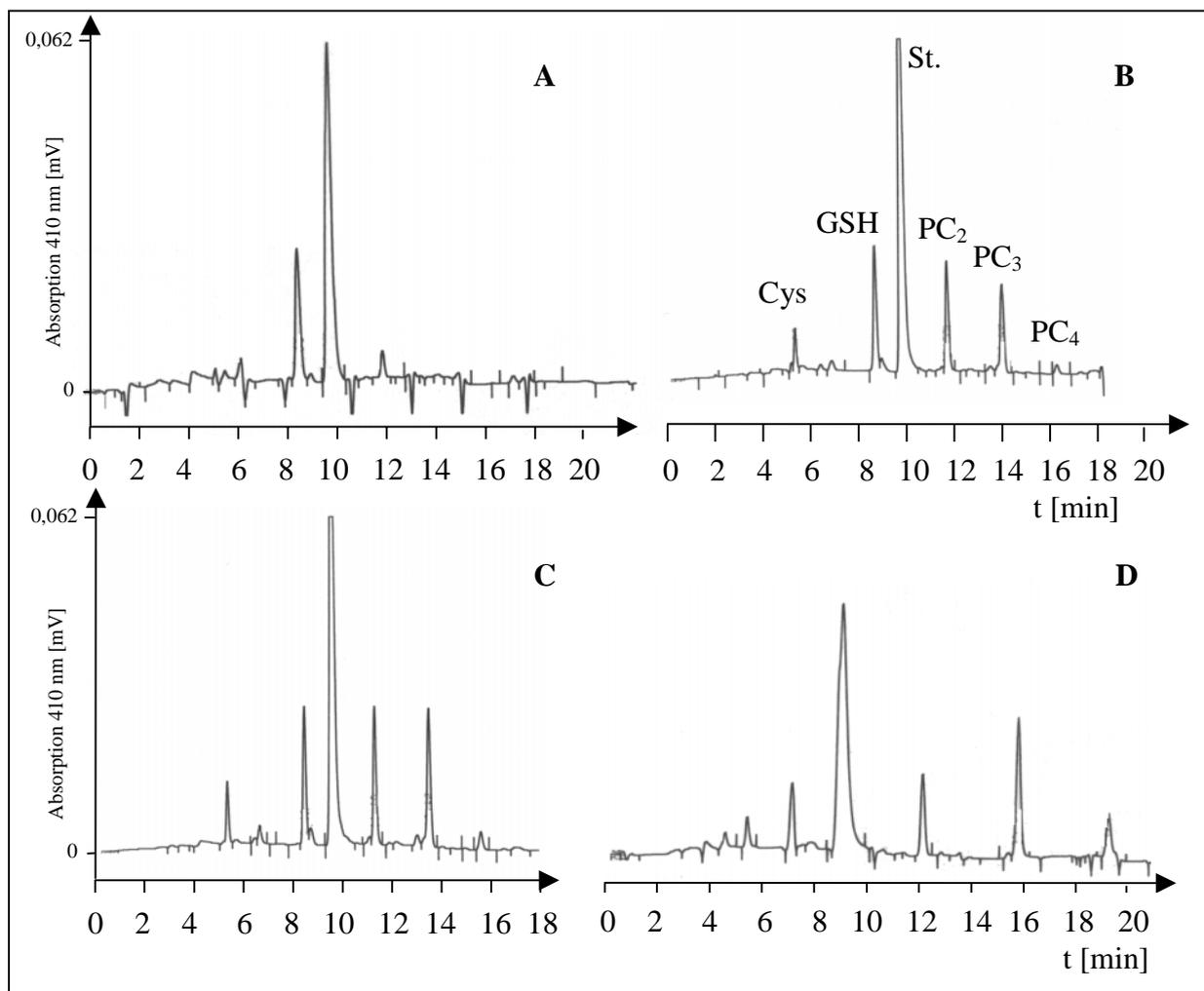
**Abb. 3.18:** Akkumulation von  $\text{Cd}^{2+}$  in Hanf-Suspensionskulturen in Abhängigkeit von der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration im Medium;  $n = 3$

Innerhalb der ersten 3 h wurde ein Großteil des im Medium befindlichen  $\text{Cd}^{2+}$  in die Zellen aufgenommen. Der Verlauf der  $\text{Cd}^{2+}$ -Akkumulation in den Zellen war dabei für alle 3  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen (20, 30 bzw.  $40 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ ) gleich. Das Maximum des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes in den

Zellen wurde 16 h nach  $\text{Cd}^{2+}$ -Zugabe zum Medium erreicht. Danach nahm der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den Zellen leicht ab. Bei höheren  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalten im Medium wurde eine verstärkte Akkumulation von  $\text{Cd}^{2+}$  in den Zellen nachgewiesen. Eine Erhöhung von  $20 \mu\text{M}$  auf  $40 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  im Medium führte zu einem um 76 % erhöhten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den Zellen.

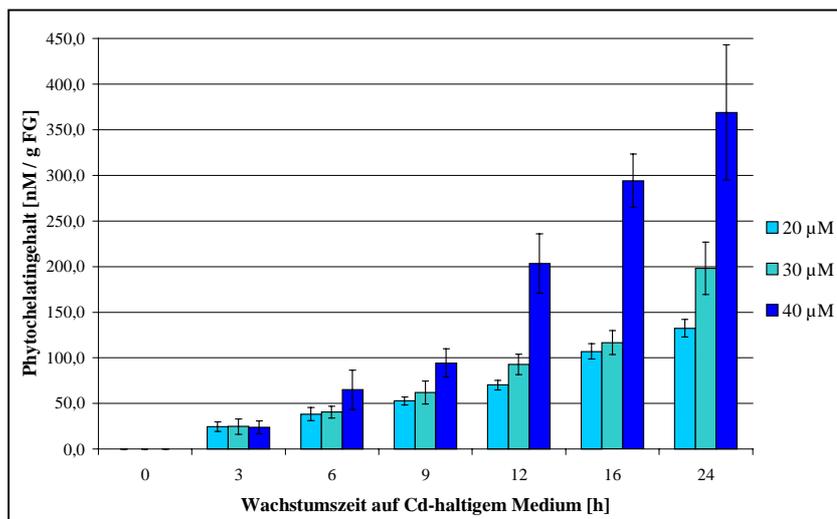
### 3.2.3 Akkumulation von Phytochelatinen in Hanf-Suspensionskulturen

Wie die in Abb. 3.17 dargestellten Daten zeigen, akkumulieren Hanf-Suspensionskulturen unter  $\text{Cd}^{2+}$ -Einfluß thiolhaltige Peptide, die als Phytochelatine bezeichnet werden. Die Akkumulation von Phytochelatinen durch die Zellen ist dabei von der im Medium befindlichen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration und der Kontaminationsdauer abhängig (Ostwald et al, 1999 b). Abbildung 3.19 gibt Elutionsprofile thiolhaltiger Verbindungen aus Hanf-Suspensionskulturen wieder, die auf verschiedenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen angezogen wurden.



**Abb. 3.19:** Elutionsprofile thiolhaltiger Verbindungen aus Hanf-Suspensionskulturen in Abhängigkeit von der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration im Medium, Wachstumszeit: 24 h; A: Kontrolle; B:  $20 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ ; C:  $30 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ ; D:  $40 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$

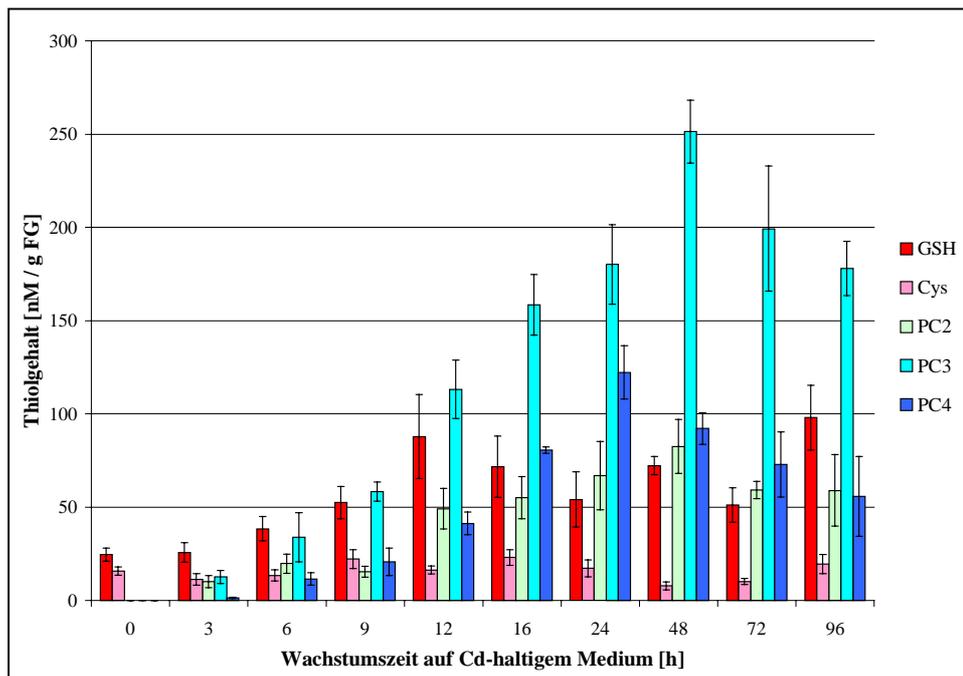
In den Kontrollkulturen konnte PC<sub>2</sub> aufgrund der im Medium befindlichen essentiellen Metalle in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Neben Cystein, Glutathion und PC<sub>2</sub> konnten in den Elutionsprofilen der Proben aus für 24 h unter Cd<sup>2+</sup>-Einfluss angezogenen Kulturen noch weitere thiolhaltige Verbindungen nachgewiesen werden. Hanf-Suspensionskulturen akkumulierten unter Cd<sup>2+</sup>-Einfluß die Phytochelatine PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> und PC<sub>4</sub> (Kap. 3.1.6). Die Konzentration der einzelnen Phytochelatine hing dabei von der eingesetzten Cd<sup>2+</sup>-Konzentration ab. Eine Cd<sup>2+</sup>-Konzentration von 20 µM im Medium führte zu einer Akkumulation von PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub>. PC<sub>4</sub> wurde im Elutionsprofil nur in geringen Konzentrationen gefunden, PC<sub>2</sub> stellte den Hauptanteil der Phytochelatine dar. Wurden dem Medium 30 µM Cd<sup>2+</sup> zugesetzt, so wurden die Phytochelatine PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub> in gleichen Teilen im Elutionsprofil nachgewiesen. PC<sub>4</sub> wurde nur in geringem Umfang akkumuliert. 40 µM Cd<sup>2+</sup> im Medium führten zu verstärkter Akkumulation von PC<sub>3</sub>. Verglichen mit den niedrigeren Cd<sup>2+</sup>-Konzentrationen führte eine Konzentration von 40 µM Cd<sup>2+</sup> im Medium zu einer deutlichen Akkumulation von PC<sub>4</sub> in den Zellen.



**Abb. 3.20:** Akkumulation von Phytochelatinen in Abhängigkeit von der Wachstumszeit für verschiedene Cd<sup>2+</sup>-Konzentration im Medium (20, 30 bzw. 40 µM Cd<sup>2+</sup>); n=5

Betrachtet man den Verlauf der Phytochelatin-Akkumulation (Abb. 3.20) so zeigt sich, dass die Akkumulation der Phytochelatine stark von der Cd<sup>2+</sup>-Konzentration und der Wachstumszeit auf kontaminiertem Medium abhängt. In den ersten 3 h wurden Phytochelatine unabhängig von der Cd<sup>2+</sup>-Konzentration in etwa gleichen Mengen akkumuliert. 6 h nach Zugabe des Cd<sup>2+</sup> zum Medium stieg die Akkumulation von Phytochelatinen in der Kultur mit 40 µM Cd<sup>2+</sup> (65 nM/g FG) stärker an als in den anderen Kulturen (40 nM/g FG). Bis einschließlich 16 h nach der Cd<sup>2+</sup>-Zugabe unterschieden sich die Phytochelatin-Akkumulationen der auf 20 bzw. 30 µM Cd<sup>2+</sup> gewachsenen Kulturen nur wenig voneinander (107 bzw. 116 nM/g FG). 24 h nach

Zugabe des  $\text{Cd}^{2+}$  ließen sich in der auf  $30 \mu\text{M Cd}^{2+}$  gewachsenen Kultur um 50 % höhere Phytochelatingehalte ( $198 \text{ nM/g FG}$ ) nachweisen, als in der auf  $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$  gewachsenen Hanf-Suspensionskultur ( $132 \text{ nM/g FG}$ ). Ein doppelt so hoher  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt von  $40 \mu\text{M}$  gegenüber  $20 \mu\text{M}$  im Medium führte in den Hanf-Suspensionskulturen zu einem 2,8-fach höheren PC-Gehalt ( $369 \text{ nM/g FG}$ ). Betrachtet man die Zusammensetzung der Phytochelatine in Abhängigkeit von der Wachstumszeit auf  $\text{Cd}^{2+}$ -kontaminiertem Medium ( $40 \mu\text{M}$ ), so lassen sich deutliche Unterschiede in der Konzentration der einzelnen Phytochelatine erkennen (Abb. 3.21).



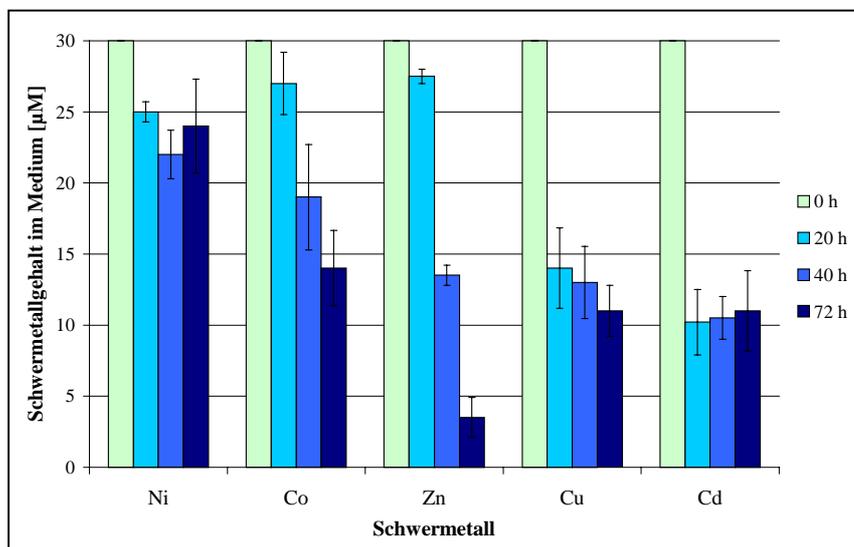
**Abb. 3.21:** Zusammensetzung der Thiolverbindungen in Hanf-Suspensionskulturen in Abhängigkeit von der Wachstumszeit gewachsen auf  $40 \mu\text{M Cd}^{2+}$ ;  $n = 3$

Hanf-Suspensionskulturen akkumulierten in der Hauptsache  $\text{PC}_3$ . Bis einschließlich 12 h nach  $\text{Cd}^{2+}$ -Zugabe zum Medium stellte  $\text{PC}_3$  den Hauptanteil der Phytochelatine ( $113 \text{ nM/g FG}$ ), gefolgt von  $\text{PC}_2$  ( $49 \text{ nM/g FG}$ ) und geringeren Gehalten an  $\text{PC}_4$  ( $41 \text{ nM/g FG}$ ). Das Maximum der Phytochelatin-Akkumulation wurde 48 h nach Zugabe von  $\text{Cd}^{2+}$  zum Medium erreicht.  $\text{PC}_3$  stellte auch zu diesem Zeitpunkt die Hauptkomponente der Phytochelatine ( $251 \text{ nM/g FG}$ ) dar. Die Zellen akkumulierten in dieser Wachstumsphase verstärkt  $\text{PC}_4$  ( $92,1 \text{ nM/g FG}$ ) und weniger  $\text{PC}_2$  ( $82,5 \text{ nM/g FG}$ ), welches das Ausgangsprodukt zur Synthese der höheren Phytochelatine darstellt. Im weiteren Wachstumsverlauf (bis 96 h) verringerte sich der Gehalt an PC's in den Zellen gegenüber dem Maximum ( $425 \text{ nM/g FG}$ ) um 31 % ( $292 \text{ nM/g FG}$ ). Dabei ergab sich für  $40 \mu\text{M Cd}^{2+}$  im Kulturmedium ein ähnlicher zeitlicher Verlauf der PC-Akkumulation wie für  $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$  (Kap. 3.2.2). Die Gehalte an Glutathion und Cystein schwankten während der betrachteten Wachstumsphase. Der nachgewiesene maximale PC-Gehalt in Hanf-Suspensions-

kulturen, angezogen auf  $40 \mu\text{M Cd}^{2+}$  im Medium (48 h, 425 nM PC/g FG), entsprach dem maximal nachweisbaren PC-Gehalt in Hanf-Kalluskulturen nach 2-wöchigem Wachstum auf einer 5-fach höheren  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration im Medium ( $200 \mu\text{M Cd}^{2+}$ , 449 nM/g FG), was wie erwartet auf eine bessere Verfügbarkeit der  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen im flüssigen Kulturmedium hindeutet.

### 3.2.4 Akkumulation anderer Schwermetalle in Hanf-Suspensionskulturen

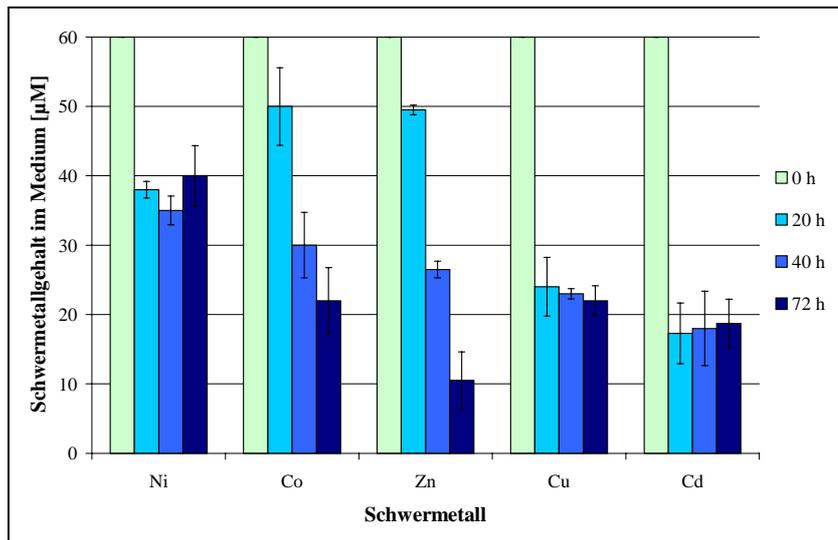
In Hanf-Suspensionskulturen konnte eine Akkumulation von Cadmium nachgewiesen werden (siehe Kap. 3.2.3). Es war daher von Interesse, die Akkumulation anderer Schwermetalle und ihre Abhängigkeit von der Schwermetallkonzentration und der Kontaminationsdauer in Hanf-Suspensionskulturen zu untersuchen (Abb. 3.22 und 3.23).



**Abb. 3.22:** Akkumulation von verschiedenen Schwermetallen in Hanf-Suspensionskulturen in Abhängigkeit von der Wachstumszeit, gewachsen auf schwermetallbelastetem Medium (Konz.:  $30 \mu\text{M}$ );  $n = 3$

Dabei zeigte sich, dass die Akkumulation der Schwermetalle in den Hanf-Suspensionskulturen sehr unterschiedlich verlief. Hanf-Suspensionskulturen akkumulierten nur wenig Nickel ( $5 \mu\text{M}$ , 17 % des dem Medium zugesetzten  $\text{Ni}^{2+}$ ). Der Nickelgehalt änderte sich im Zeitraum von 20 h bis 72 h nach der Zugabe zum Medium nur geringfügig. Die Akkumulation von Kobalt und Zink verlief langsamer als die Akkumulation von Kupfer und Cadmium und schien 3 Tage nach der Zugabe zum Medium noch nicht ihren Maximalwert erreicht zu haben. Zink wurde von Hanf-Suspensionskulturen in großem Maße akkumuliert. 3 Tage nach der Zink-Zugabe waren dem Medium 88 % ( $26,5 \mu\text{M}$ ) des zugesetzten Zinks durch die Zellen entzogen worden. Die Akkumulation von Kupfer verlief anfänglich schneller als die von Zink. 72 h nach der Zugabe von Kupfer befanden sich jedoch noch ca. 30 % ( $11 \mu\text{M}$ ) des zugesetzten Kupfers im Medium.

Die Akkumulation von  $\text{Cd}^{2+}$  entsprach der bereits in Abb. 3.17 beschriebenen Akkumulation von  $\text{Cd}^{2+}$  aus dem mit  $20 \mu\text{M}$  Cd belasteten Medium. 20 h nach der Zugabe von  $30 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  hatte die Akkumulation von  $\text{Cd}^{2+}$  in den Zellen bereits ein Maximum ( $19,8 \mu\text{M}$ , 66 %) erreicht. Im weiteren Verlauf wurde keine signifikante Änderung des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes im Medium mehr festgestellt.



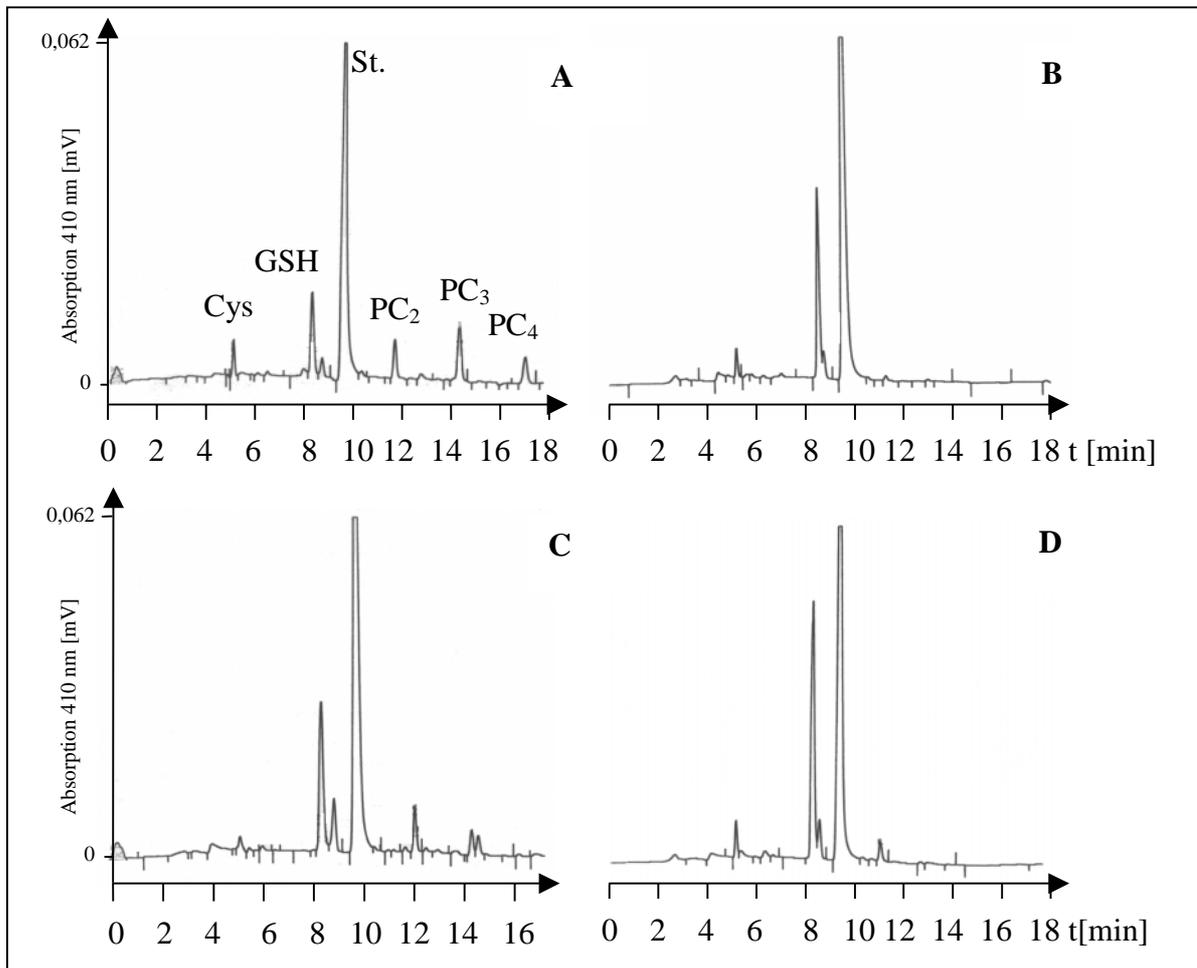
**Abb. 3.23:** Akkumulation verschiedener Schwermetalle in Hanf-Suspensionskulturen in Abhängigkeit von der Wachstumszeit, gewachsen auf mit Schwermetallen belastetem Medium (Konz.:  $60 \mu\text{M}$ );  $n=3$

Wurden  $60 \mu\text{M}$  des jeweiligen Schwermetalls eingesetzt, so ergab sich ein ähnlicher Verlauf der Schwermetall-Akkumulation in den Hanf-Suspensionskulturen wie für  $30 \mu\text{M}$  (Abb. 3.23). Es wurde nur wenig Nickel ( $20 \mu\text{M}$ ) akkumuliert. Die Akkumulation von Kobalt ( $38 \mu\text{M}$ ) und Zink ( $49,5 \mu\text{M}$ ) verlief langsamer, als die von Kupfer und Cadmium und war nach 72 h noch nicht abgeschlossen. Trotzdem waren dem Medium 72 h nach der Zugabe von Zink mehr als 80 % des Zinks durch die Zellen entzogen worden. Die Akkumulation von Kupfer ( $38 \mu\text{M}$ , 63 %) und Cadmium ( $42,3 \mu\text{M}$ , 70 %) verlief sehr schnell und erreichte 20 h nach der Zugabe des Schwermetalls zum Medium ihr Maximum.

### 3.2.5 Akkumulation von Phytochelatinen in Hanf-Suspensionskulturen unter Einfluss verschiedener Schwermetalle

Die in Kap. 3.2.4 dargestellten Daten zeigen, dass Hanf-Suspensionskulturen neben Cadmium auch andere Schwermetalle akkumulierten. Da bekannt ist, dass nicht alle Schwermetalle in gleichem Maße die Biosynthese von Phytochelatinen in höheren Pflanzen induzieren (Gekeler et al., 1989), sollte im folgenden die Akkumulation von Phytochelatinen in Hanf-

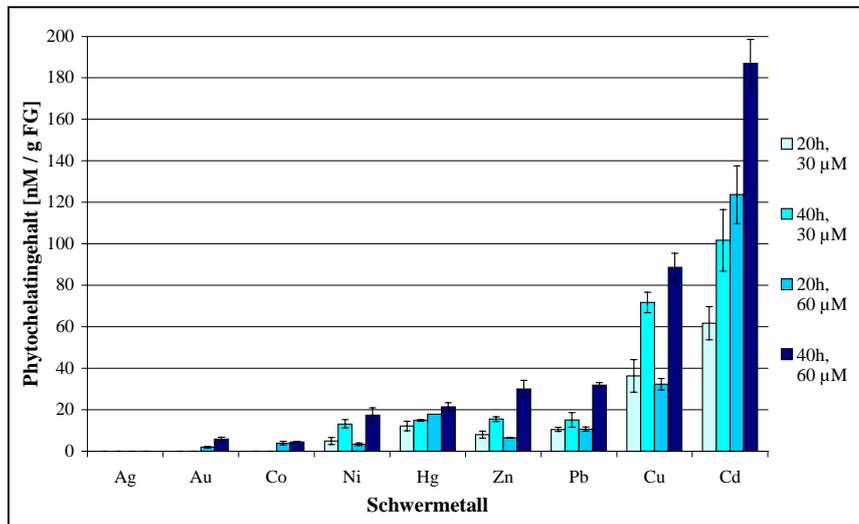
Suspensionskulturen in Abhängigkeit von der Art des eingesetzten Schwermetalls untersucht werden.



**Abb. 3.24:** Elutionsprofile von Thiolverbindungen aus Hanf-Suspensionskulturen, nach 20 h gewachsen auf 30  $\mu\text{M}$  Schwermetall im Medium; A:  $\text{Cd}^{2+}$ ; B:  $\text{Co}^{2+}$ ; C:  $\text{Cu}^{2+}$ ; D:  $\text{Pb}^{2+}$

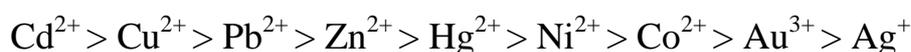
Abbildung 3.24 zeigt Elutionsprofile von Thiolverbindungen aus Hanf-Suspensionskulturen, die 20 h dem Einfluss von 30  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  bzw.  $\text{Pb}^{2+}$  im Anzuchtmedium ausgesetzt waren. Dabei ließen sich deutliche Unterschiede im Muster der Thiolverbindungen in Abhängigkeit vom eingesetzten Schwermetall erkennen. Die Gehalte an Cystein, Glutathion und  $\gamma$ -GluCys schwankten ebenso wie die Gehalte und die Zusammensetzung der Phytochelatine.  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  führten zu einer deutlichen Akkumulation von Phytochelatinen. In  $\text{Cd}^{2+}$ -haltigem Kulturmedium wurden  $\text{PC}_2$ ,  $\text{PC}_3$  und  $\text{PC}_4$  akkumuliert (Abb. 3.24 A).  $\text{Cu}^{2+}$ -haltiges Medium führte zu einer nachweisbaren Akkumulation von  $\text{PC}_2$  und  $\text{PC}_3$  sowie einer bisher nicht identifizierten Thiolverbindung, die direkt vor  $\text{PC}_3$  eluierte (Abb. 3.24 C) und bei der es sich um ein Mitglied einer anderen Phytochelatin-Familie handeln könnte (Kap. 1.4.3.1). In  $\text{Pb}^{2+}$ -haltigem Medium wurde besonders Glutathion und in geringem Umfang

PC<sub>2</sub> angereichert (Abb. 3.24 D). Zugabe von Co<sup>2+</sup> führte, verglichen mit Cd<sup>2+</sup>, zu einer verstärkten Akkumulation von Glutathion und einer geringfügigen Akkumulation von PC<sub>2</sub> (Abb. 3.24 B).

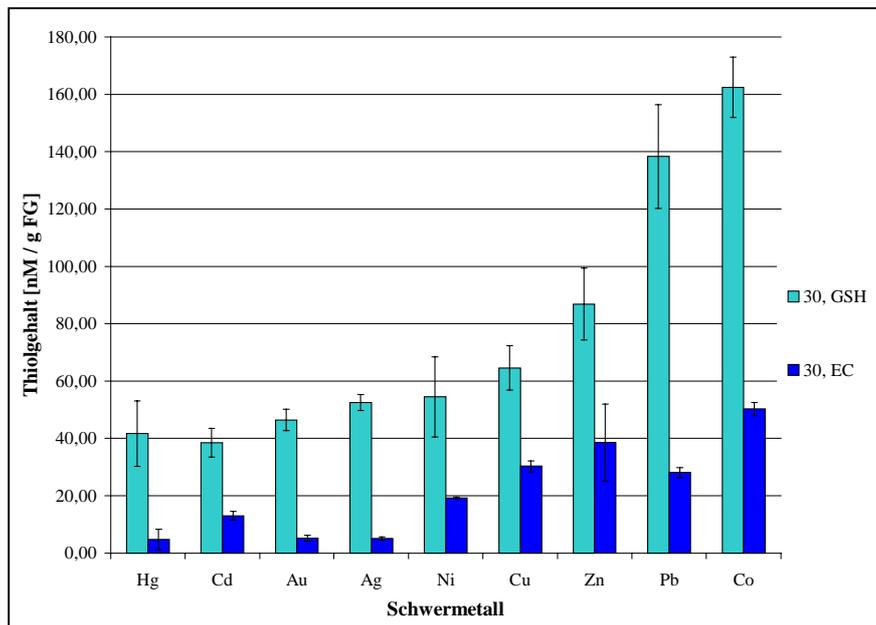


**Abb. 3.25:** Gesamtphytochelatingehalte aus Hanf-Suspensionskulturen in Abhängigkeit vom Schwermetall, der Schwermetallkonzentration und der Wachstumszeit; n = 3

Betrachtet man die Gesamtphytochelatingehalte in den mit verschiedenen Schwermetallen belasteten Kulturen (Abb. 3.25), so lassen sich deutliche Unterschiede feststellen. Unter gleichen Versuchsbedingungen wurde durch Cd<sup>2+</sup>-Zugabe zum Medium die stärkste Akkumulation von PC's induziert (187 nM/g FG). Ag<sup>+</sup> dagegen rief in Hanf-Suspensionskulturen keine nennenswerte Biosynthese von Phytochelatinen hervor. Höhere Konzentrationen (60 µM) Au<sup>3+</sup> bzw. Co<sup>2+</sup> im Medium lösten die Akkumulation von Phytochelatinen aus (5,8 bzw. 4,5 nM/g FG), die jedoch nur 3 % der durch Cd<sup>2+</sup>-bedingten Phytochelatin-Akkumulation betrug. Ni<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> und Pb<sup>2+</sup> führten zu einer deutlicheren Akkumulation (17,4 bis 31,9 nM/g FG) von Phytochelatinen, die zwischen 9 und 17 % der Cd<sup>2+</sup>-induzierten Phytochelatin-Akkumulation ausmachte. Die eingesetzten Hanf-Suspensionskulturen akkumulierten unter Cu<sup>2+</sup>-Belastung 2,7-mal mehr Phytochelatine (88,5 nM/g FG) als unter Pb<sup>2+</sup>-Belastung. Anhand der in Abb. 3.25 gezeigten Daten lassen sich die Schwermetalle aufgrund ihrer Fähigkeit, die Synthese von Phytochelatinen in Hanf-Suspensionskulturen zu induzieren, in folgender Reihe einordnen:

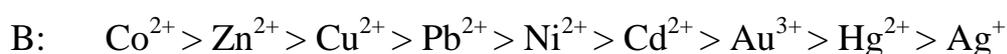
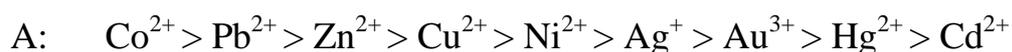


In Abb. 3.26 sind die Gehalte an Glutathion und  $\gamma$ -GluCys in Abhängigkeit vom eingesetzten Schwermetall aufgetragen.



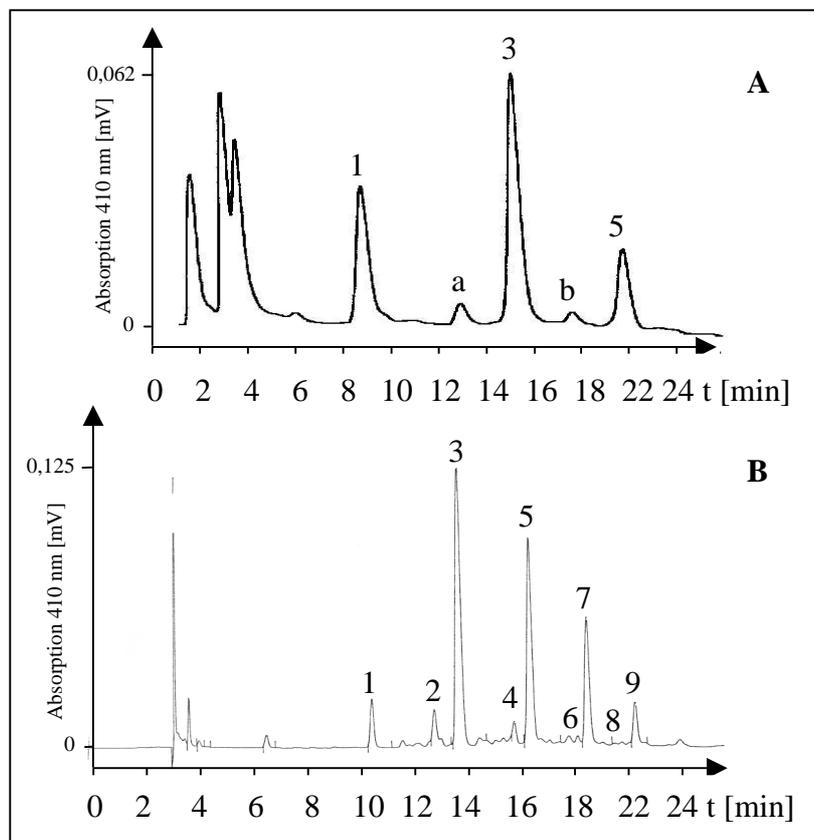
**Abb. 3.26:** Glutathion- (GSH) und  $\gamma$ -GluCys- ( $\gamma$ -EC) Gehalte in Hanf-Suspensionskulturen in Abhängigkeit vom eingesetzten Schwermetall, 20 h Wachstumszeit auf 30  $\mu$ M Schwermetall im Medium; n = 3

Auch für die GSH- und  $\gamma$ -EC-Gehalte der Hanf-Suspensionskulturen ließen sich deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom eingesetzten Schwermetall nachweisen. Auf  $\text{Cd}^{2+}$  gewachsene Kulturen wiesen den geringsten Gehalt an GSH auf (38 nM/g FG).  $\text{Co}^{2+}$ -belastete Kulturen enthielten viermal mehr GSH (162,4 nM/g FG) als  $\text{Cd}^{2+}$ -belastete Kulturen. Auf  $\text{Ag}^+$  gewachsene Kulturen wiesen den geringsten Gehalt an  $\gamma$ -EC auf (5,1 nM/g FG), 10-mal geringer als der in  $\text{Co}^{2+}$ -belasteten Kulturen nachgewiesene  $\gamma$ -EC-Gehalt (50,2 nM/g FG). Anhand der in Abb. 3.26 gezeigten Daten, lassen sich in Abhängigkeit vom eingesetzten Schwermetall folgende Reihen zur Akkumulation von GSH (A) bzw.  $\gamma$ -EC (B) in Hanf-Suspensionskulturen aufstellen:



### 3.2.6 Phytochelatinnähnliche Thiolverbindungen in Hanf-Suspensions- und Tomaten-Kalluskulturen

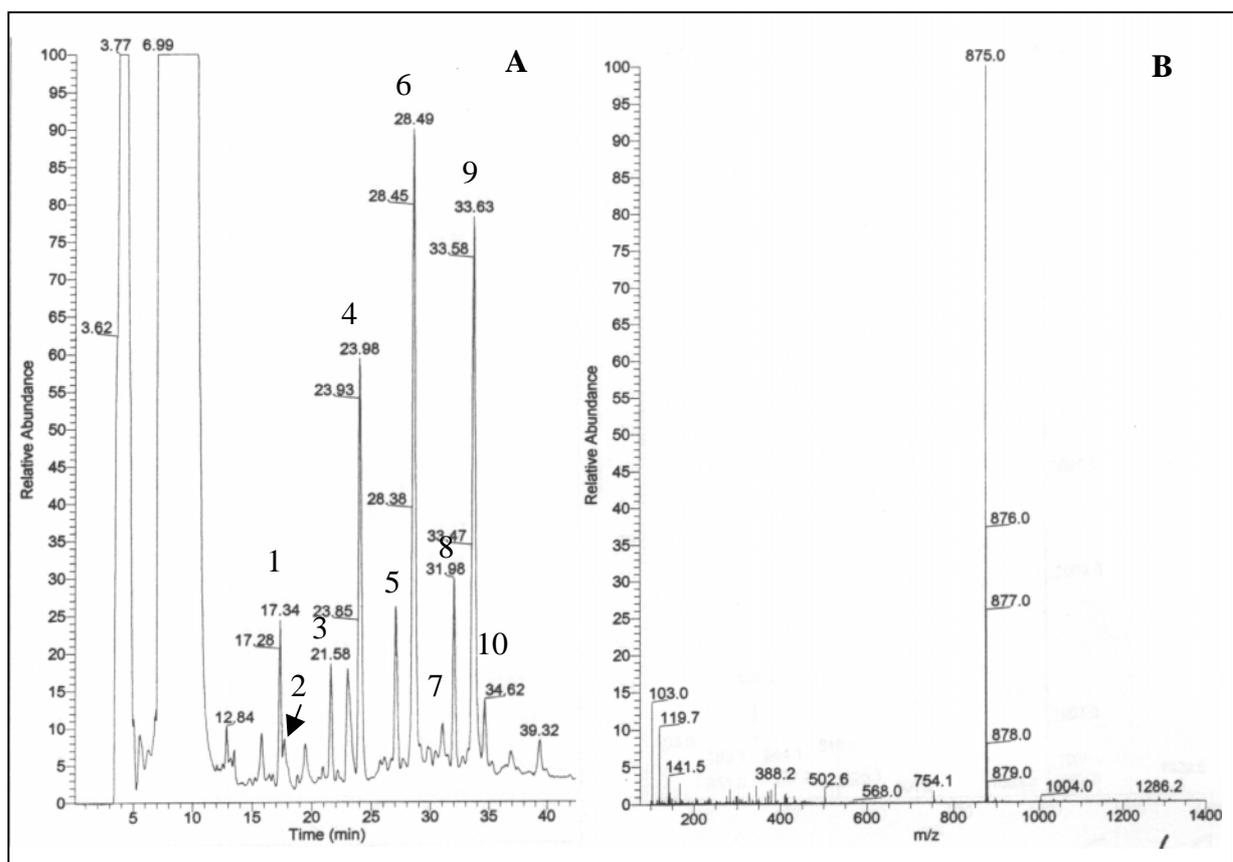
Neben den zuvor identifizierten Phytochelatinen wurden in Elutionsprofilen von Hanf-Suspensionskulturen und Tomaten-Kalluskulturen weitere Thiolverbindungen gefunden (Kap. 3.1.4 und 3.1.7). Diese Thiolverbindungen traten in geringen Konzentrationen auf und eluierten zwischen den bereits im Vorfeld identifizierten Phytochelatinen. Abbildung 3.27 zeigt Elutionsprofile von Hanf-Suspensionskulturen, die 3 Tage auf  $40 \mu\text{M Cd}^{2+}$  im Medium angezogen bzw. von  $\text{Cd}^{2+}$ -resistenten Tomaten-Kalluskulturen, die 2 Wochen auf  $2 \text{ mM Cd}^{2+}$  im Medium angezogen wurden.



**Abb. 3.27:** Elutionsprofile von Thiolverbindungen in A: Hanf-Suspensionskulturen, 3 Tage auf  $40 \mu\text{M Cd}^{2+}$  gewachsen; B: Tomaten-Kalluskulturen, 2 Wochen auf  $2 \text{ mM Cd}^{2+}$  gewachsen

Die Zusammensetzung der thiolhaltigen Peptide im Rohextrakt, der auf  $2 \text{ mM Cd}^{2+}$  gewachsenen Tomaten-Kalluskultur, wurde mittels LC-MS untersucht. Im ersten Schritt wurden die eingesetzten Proben flüssigkeitschromatographisch (LC) getrennt. Die Detektion der verschiedenen Verbindungen erfolgte mit einem UV-Detektor. Nach Eintritt der Verbindungen in das Massenspektrometer (MS) wurden diese ionisiert (Elektrospray-Verfahren, ESI),

fokussiert und anschließend analysiert (Arpino, 1989). Mittels zweier hintereinander geschalteter Massenanalytoren (Tandem-MS) konnten zusätzlich zur Masse weitere Daten über die zu untersuchenden Verbindungen erhalten werden. Durch Stoßreaktionen im zweiten Massenanalysator wurden die im Vorfeld erhaltenen Ionen fragmentiert, aufgetrennt und analysiert (Collisionally Activated Decomposition, CAD). Aus den erhaltenen Daten lassen sich strukturelle Informationen gewinnen (Yost and Fetterolf, 1983; McLafferty, 1983; Schwarz, 1989). Abbildung 3.28 zeigt das Elutionsprofil des Rohextraktes aus Tomaten-Kalluskulturen nach LC (Abb. 3.28 A) und das Massenspektrogramm der Peak 5 entsprechenden Verbindung (Abb. 3.28 B).



**Abb. 3.28:** A: Elutionsprofil des Rohextraktes aus Tomaten-Kalluskulturen (UV-Detektion); B: Massenspektrogramm der Peak 5 entsprechenden Verbindung mit der Masse 875, nach LC/MS

Peak 5 enthielt eine Verbindung mit der Masse 875 (Abb. 3.28 B). Mit Hilfe der Tandem-MS wurde die Zusammensetzung dieses Moleküls bestimmt (Abb. 3.29). Die Molekülmasse 875 würde demnach einer Thiolverbindung entsprechen, die aus dem Phytochelatin PC<sub>4</sub> besteht, dem die Amino-terminale Glutaminsäure fehlt (Abb. 3.29). Für diese Verbindung, die im Folgenden als Cys-PC<sub>3</sub> (m/z 875) bezeichnet wird, wurde das folgende (Abb. 3.29), in Abbildung 3.30 schematisch dargestellte, Fragmentierungsmuster gefunden.

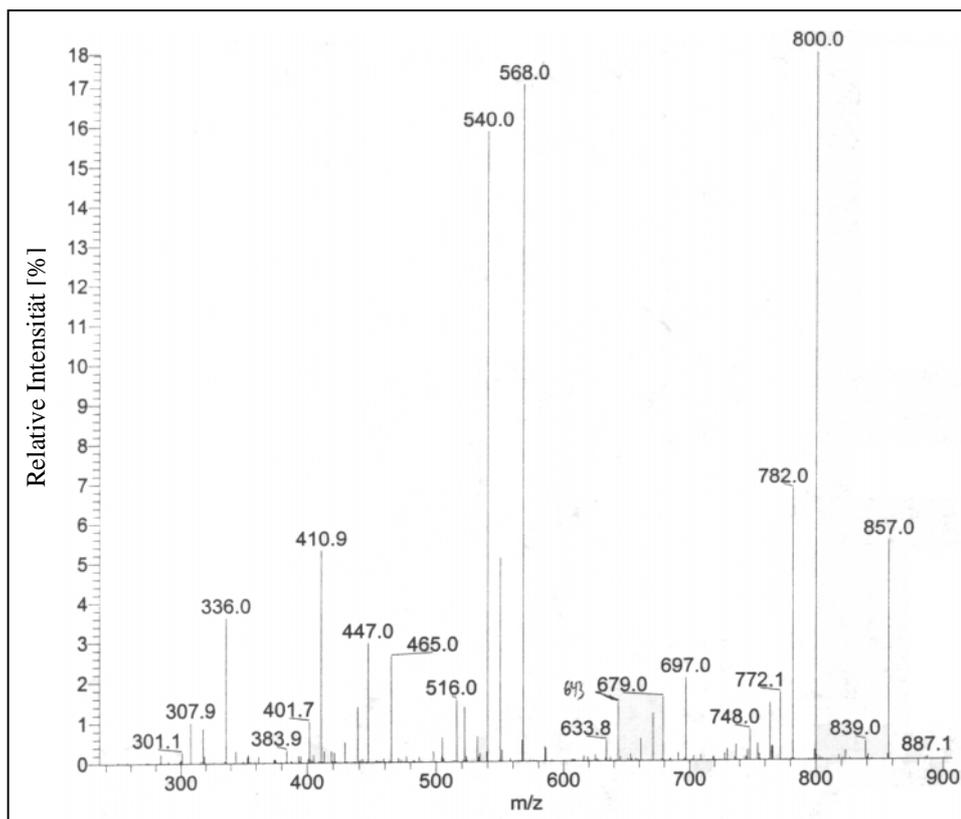


Abb. 3.29: Tandem-MS-Spektrogramm der Verbindung mit der Masse 875

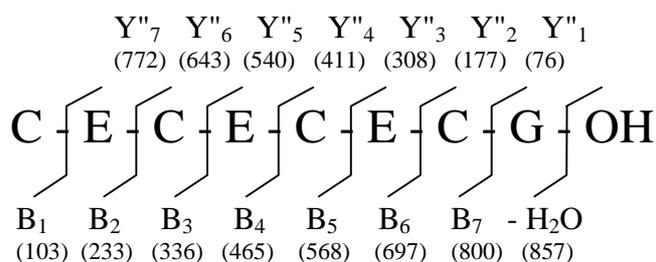


Abb. 3.30: Fragmentierung von Cys-PC<sub>3</sub> (Masse: 875); Y''<sub>n</sub>: Fragmentierung ausgehend vom Amino-terminalen Ende; B<sub>n</sub>: Fragmentierung ausgehend vom C-terminalen Ende (Nomenklatur nach Biemann, 1990)

Eine nach LC/MS nachgewiesene Verbindung mit der Molekülmasse 875 wurde nach Fragmentierung auch im Tandem-MS-Spektrogramm von PC<sub>4</sub> gefunden. Diese Masse entspricht einer der oben beschriebenen Thiolverbindungen, die aus dem Phytochelatin PC<sub>4</sub> besteht, dem die Amino-terminale Glutaminsäure fehlt. Tabelle 3.5 gibt die Molekülmassen und die Zusammensetzung der thiolhaltigen Peptide wieder (Abb. 3.28 A, Peaks 1 - 10). Peak 11 und 12 wurden in einer später erfolgten massenspektrometrischen Analyse separat untersucht (Daten nicht gezeigt). Bei den bisher nicht identifizierbaren thiolhaltigen Verbindungen im

Elutionsprofil auf 2 mM Cd<sup>2+</sup>-gewachsener Tomaten-Kalluskulturen handelte es sich demnach um eine bislang unbekannte Klasse phytochelatin-ähnlicher Peptide, denen die Amino-terminale Glutaminsäure fehlt. Eine physiologische Funktion dieser Verbindungen ist bisher nicht bekannt. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass sie in der Lage sind, Cadmium oder andere Schwermetalle zu komplexieren.

Peak-Nr.	[M+H] <sup>+</sup>	Peptid	Identifikation
1	540	E-C-E-C-G	PC <sub>2</sub>
2	643	C-E-C-E-C-G	Cys-PC <sub>2</sub>
3	772	E-C-E-C-E-C-G	PC <sub>3</sub>
4	875	C-E-C-E-C-E-C-G	Cys-PC <sub>3</sub>
5	1004	E-C-E-C-E-C-E-C-G	PC <sub>4</sub>
6	1107	C-E-C-E-C-E-C-E-C-G	Cys-PC <sub>4</sub>
7	1236	E-C-E-C-E-C-E-C-E-C-G	PC <sub>5</sub>
8	1339	C-E-C-E-C-E-C-E-C-E-C-G	Cys-PC <sub>5</sub>
9	1468	E-C-E-C-E-C-E-C-E-C-E-C-G	PC <sub>6</sub>
10	1571	C-E-C-E-C-E-C-E-C-E-C-E-C-G	Cys-PC <sub>6</sub>
11	1700	E-C-E-C-E-C-E-C-E-C-E-C-E-C-G	PC <sub>7</sub>
12	1932	E-C-E-C-E-C-E-C-E-C-E-C-E-C-E-C-G	PC <sub>8</sub>

**Tab. 3.5:** Aminosäure-Zusammensetzung thiolhaltiger Peptide in Tomaten-Kalluskulturen

Die im Elutionsprofil von Proben aus auf 40 µM Cd<sup>2+</sup> gewachsener Hanf-Suspensionskulturen (Abb. 3.27 A) nachgewiesenen Thiolverbindungen konnten bislang nicht identifiziert werden. Es liegt aber die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Verbindungen um ähnliche Peptide handelt wie in Tomaten-Kalluskulturen. Diese Peptide konnten erst nach einer Wachstumszeit von 3 Tagen auf Cd<sup>2+</sup>-haltigem Medium in den Hanf-Suspensionskulturen nachgewiesen werden, was die Vermutung bekräftigte, dass es sich bei diesen Verbindungen um Phytochelatin-Abbauprodukte handelt. Dieses Postulat wird auch dadurch unterstützt, dass die Phytochelatin-ähnlichen Peptide in Wildtyp-Kalluskulturen von Tomaten, die einer Konzentration von 100 µM Cd<sup>2+</sup> im Medium ausgesetzt waren, erst nach mehr als 1 Woche Inkubationsdauer nachgewiesen werden konnten. Nur in Cd<sup>2+</sup>-resistenten Tomaten-Kalluskulturen, die permanent auf 2 - 6 mM Cd<sup>2+</sup> im Anzuchtmedium angezogen wurden, traten diese Peptide kontinuierlich und in höheren Konzentrationen auf.

### 3.3 Aufnahme von Schwermetallen und Akkumulation von PC's in Hanfpflanzen

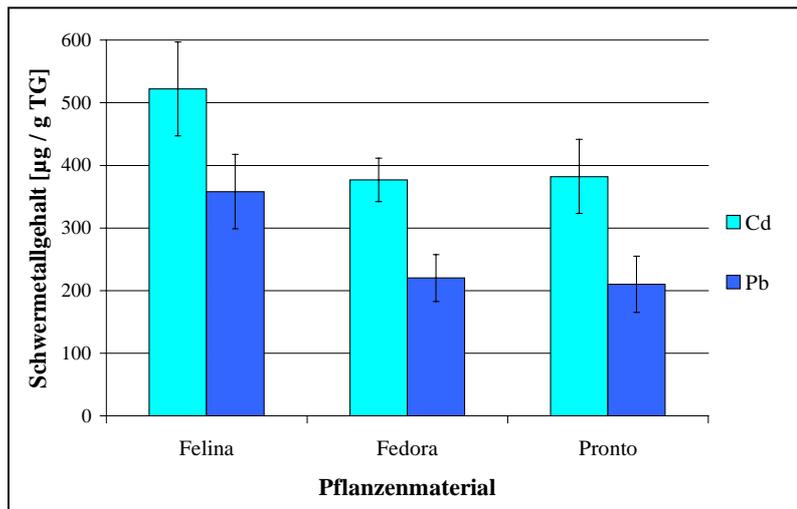
#### 3.3.1 Einfluss verschiedener Schwermetalle auf die Keimung von Hanf- bzw. Rapspflanzen

An Kallus- und Zellsuspensionskulturen von Faserhanf konnte die Aufnahme von Schwermetallen und die Akkumulation von Phytochelatinen gezeigt werden. Um die Möglichkeit eines Einsatzes von Faserhanf in der Phytoremediation zu prüfen, wurden Hanfpflanzen auf schwermetallbelasteter Erde (Kap. 2.2.4 und 2.8) im Gewächshaus angezogen. Im nachfolgenden Kapitel wird die Aufnahme von Schwermetallen und die Akkumulation von Phytochelatinen während der Keimung und der ersten Wachstumsstade (bis Tag 15 nach der Aussaat) von Hanfpflanzen beschrieben. Des Weiteren wurden auch Daten zur Akkumulation von Cadmium während des vollständigen Wachstumszyklus erhoben (Kap. 3.3.2).

##### 3.3.1.1 Einfluss von Cadmium und Blei auf das Wachstum von Hanf- bzw. Rapskeimlingen

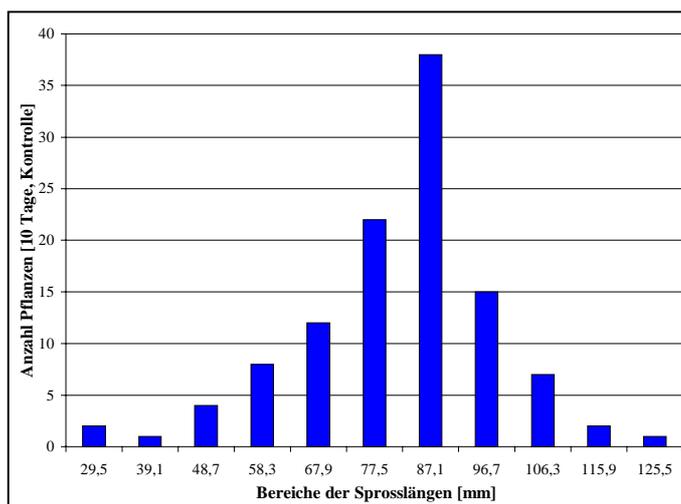
Untersuchungen zur Akkumulation von Schwermetallen wurden mit im Gewächshaus auf Erde angezogenen Keimlingen von Faserhanf (*Cannabis sativa* L.) und Raps (*Brassica napus* L.) durchgeführt. Die Hanfsorte Felina 34, die zu Beginn der Experimente bereits in Süddeutschland angebaut wurde, erwies sich für die weiterführenden Experimente als gut geeignet.

Hanfkeimlinge der Sorte Felina 34 wurden bezüglich der Aufnahme von  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Pb}^{2+}$  (10 mM in der Erde) mit Keimlingen der ebenfalls freigegebenen Sorte Fedora (Höppner und Hartmann, 1994) und Keimlingen der Ölpflanze Raps (Sorte: Pronto) verglichen (Abb. 3.31). Felina 34-Keimlinge akkumulierten innerhalb der ersten 6 Tage nach der Aussaat 38 % mehr  $\text{Cd}^{2+}$  und 63 % mehr  $\text{Pb}^{2+}$  als Fedora – Keimlinge bzw. 36 % mehr  $\text{Cd}^{2+}$  und 70 % mehr  $\text{Pb}^{2+}$  als Keimlinge der Raps-Varietät Pronto.



**Abb. 3.31:** Aufnahme von  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Pb}^{2+}$  durch 6 Tage alte Keimlinge der Hanf-Varietäten Felina 34 und Fedora sowie der Raps-Varietät Pronto, angezogen auf Erde, kontaminiert mit 10 mM  $\text{Cd}^{2+}$  bzw.  $\text{Pb}^{2+}$

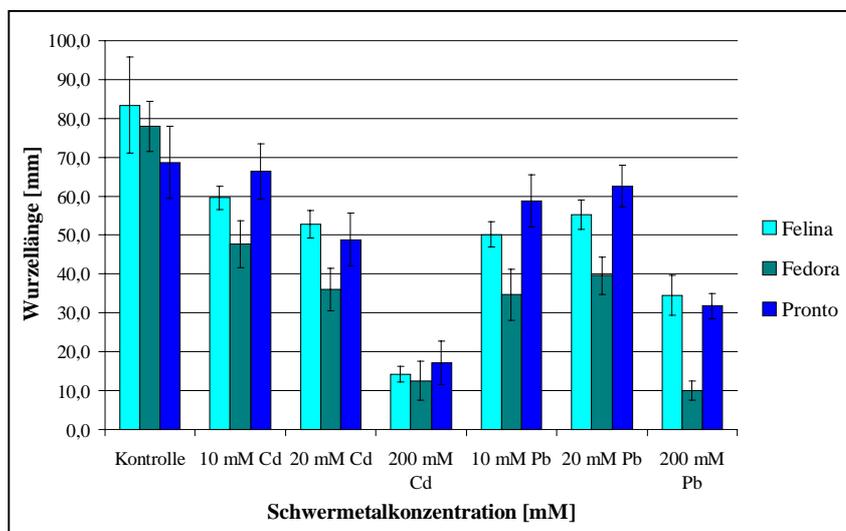
Da sich Schwermetalle unter anderem negativ auf das Wachstum von Pflanzen auswirken können (Baker and Walker, 1989; Verkleij, 1993; Wallnöfer and Engelhardt, 1995), wurde der Einfluss verschiedener  $\text{Cd}^{2+}$ - bzw.  $\text{Pb}^{2+}$ -Konzentrationen auf das Wachstum der Hanfsorten Felina 34 und Fedora sowie auf die Rapssorte Pronto untersucht. Abb. 3.32 zeigt eine typische Verteilung der Wurzellängen am 10. Tag nach Aussaat auf unbelasteter Erde.



**Abb. 3.32:** Verteilung der Wurzellängen von Felina 34-Keimlingen, 10 Tage nach der Aussaat auf unbelastetem Medium; Bereich "29,5" entsprach Sprosslängen von 0 bis 29,5 cm, etc.

Die Wurzellängen variierten zwischen 30 und 122,5 mm. 64,9 % der Keimlinge zeigten Wurzellängen in einem Bereich von 68 – 96,7 mm. Daraus ergab sich eine mittlere Wurzellänge

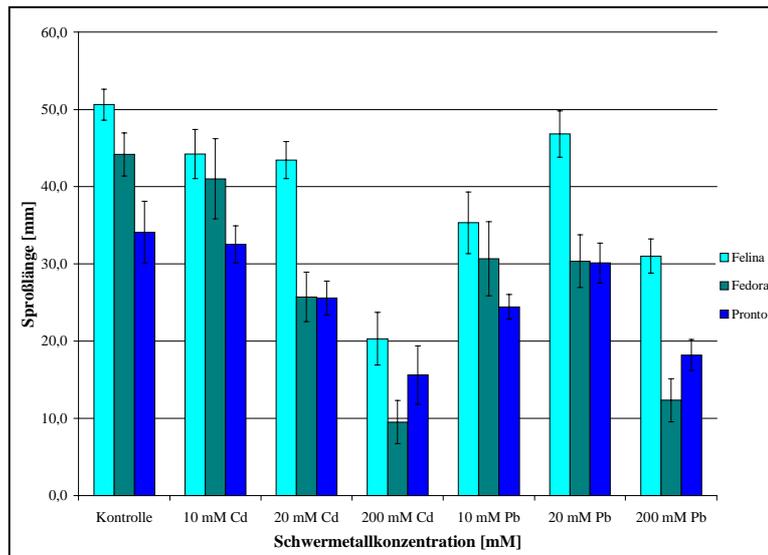
von  $83,4 \text{ mm} \pm 12,4 \text{ mm}$ . In Abb. 3.33 sind die mittleren Wurzellängen von Felina 34-, Fedora- bzw. Pronto-Keimlingen in Abhängigkeit von der Schwermetallbelastung in der Erde dargestellt.



**Abb. 3.33:** Wurzellängen von Felina 34 -, Fedora – bzw. Prontokeimlingen unter Einfluss verschiedener  $\text{Cd}^{2+}$  bzw.  $\text{Pb}^{2+}$  -Konzentrationen, 10 Tage nach der Aussaat

Aus Abb. 3.33 lässt sich entnehmen, dass die Wurzeln der Raps-Varietät Pronto am wenigsten von den dem Boden zugesetzten Schwermetallen beeinflusst wurden. Für Rapspflanzen der Sorte Pronto, angezogen auf mit  $20 \text{ mM Cd}^{2+}$  belasteter Erde, betrug die Differenz in der Wurzellänge zu den Kontrollpflanzen 28 % ( $20 \text{ mM Pb}^{2+}$ : 9 %). Wurzeln von Felina 34 - Pflanzen, gezogen auf  $20 \text{ mM Cd}^{2+}$ , waren 36 % kürzer als die Wurzeln der Kontrollpflanzen ( $20 \text{ mM Pb}^{2+}$ : 34 %). Für Pflanzen der Sorte Fedora betrug diese Differenz 54 % ( $20 \text{ mM Pb}^{2+}$ : 50 %). Im Vergleich zum unbelasteten Boden konnte auf mit  $200 \text{ mM Cd}^{2+}$  belastetem Boden ein zurückbleiben der Wurzellänge der Rapspflanzen von 75 % nachgewiesen werden ( $200 \text{ mM Pb}^{2+}$ : 55 %). Pflanzen der Varietät Felina 34 zeigten auf  $200 \text{ mM Cd}^{2+}$  eine um durchschnittlich 83 % geringere Wurzellänge ( $200 \text{ mM Pb}^{2+}$ : 69 %). Die stärksten Auswirkungen wurden für die Hanf-Varietät Fedora festgestellt. Die Länge der Wurzeln auf  $200 \text{ mM Cd}^{2+}$  war, verglichen mit auf unbelastetem Boden gewachsenen Fedorapflanzen, um 84 % ( $200 \text{ mM Pb}^{2+}$ : 87 %) geringer. Vergleicht man die Länge der Wurzeln von Felina 34, angezogen auf mit  $200 \text{ mM Cd}^{2+}$  belastetem Boden, mit Felina 34, gewachsen auf  $200 \text{ mM Pb}^{2+}$  belastetem Boden, so zeigt sich, dass die Wurzeln der mit  $\text{Cd}^{2+}$ -belasteten Pflanzen 41 % der Länge von Wurzeln  $\text{Pb}^{2+}$ -belasteter Pflanzen erreichten (Fedora: 120,0 %; Pronto 55 %).

In Abb. 3.34 sind die mittleren Sprosslängen von Felina 3 -, Fedora- bzw. Prontokeimlingen in Abhängigkeit von der Schwermetallbelastung in der Erde dargestellt.



**Abb. 3.34:** Sproßlängen von Felina 34 -, Fedora - bzw. Pronto-Keimlingen unter Einfluss verschiedener  $\text{Cd}^{2+}$  bzw.  $\text{Pb}^{2+}$  -Konzentrationen, 10 Tage nach der Aussaat

Aus Abb. 3.34 lässt sich entnehmen, dass das Sprosswachstum der Raps-Varietät Pronto am wenigsten von den dem Boden zugesetzten Schwermetallen beeinflusst wurde. Die Sprosse von Felina 34 - Pflanzen, angezogen auf mit  $20 \text{ mM Cd}^{2+}$  belastetem Boden, waren 14 % kürzer als die der Kontrollpflanzen ( $20 \text{ mM Pb}^{2+}$ : 7,5 %). Für Pflanzen der Sorte Fedora betrug diese Differenz 43 % ( $20 \text{ mM Pb}^{2+}$ : 32 %). Für Rapspflanzen der Sorte Pronto, angezogen auf  $20 \text{ mM Cd}^{2+}$ , wurde, verglichen mit den Kontrollpflanzen, ein um 26 % kürzerer Spross nachgewiesen ( $20 \text{ mM Pb}^{2+}$ : 12 %). Im Vergleich zum unbelasteten Boden wurden auf mit  $200 \text{ mM Cd}^{2+}$  belastetem Boden um 56 % geringere Sproßlängen erreicht ( $200 \text{ mM Pb}^{2+}$ : 47 %). Der Minderwuchs der Sprosse von Pflanzen der Varietät Felina 34, angezogen auf mit  $200 \text{ mM Cd}^{2+}$  belasteter Erde, betrug im Vergleich zu den Kontrollpflanzen 60 % ( $200 \text{ mM Pb}^{2+}$ : 38%). Auf mit  $200 \text{ mM Cd}^{2+}$  belasteter Erde blieben die Sprosse der Fedorapflanzen 79 % kürzer als die der Kontrollpflanzen ( $200 \text{ mM Pb}^{2+}$ : 73 %).

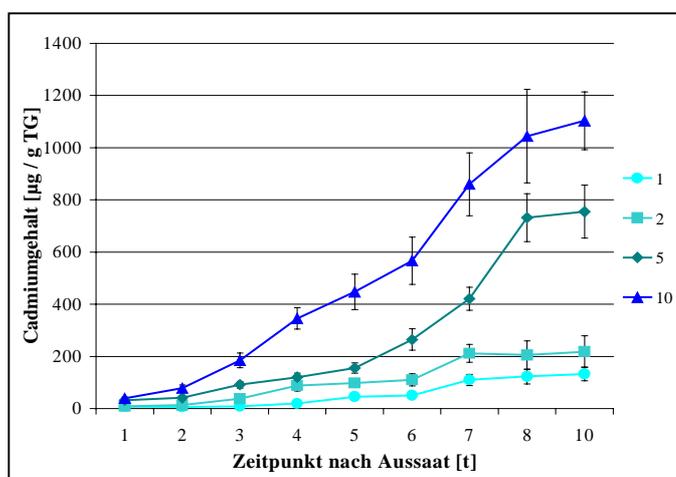
Vergleicht man die Sproßlängen von Felina 34 - Pflanzen, die auf mit  $200 \text{ mM Cd}^{2+}$  belastetem Boden angezogen wurden, mit Felina 34 - Pflanzen, gewachsen auf  $200 \text{ mM Pb}^{2+}$ , so zeigt sich, dass der Spross der mit  $\text{Cd}^{2+}$ -belasteten Pflanzen 35 % kürzer blieb, als der Spross  $\text{Pb}^{2+}$ -belasteter Pflanzen (Fedora: 25 %; Pronto 17 %).

Der Minderwuchs der Sprosse unter Einfluss von Schwermetallen war, verglichen mit dem Rückgang der Wurzellänge, für Felina 34, Fedora und Pronto geringer. Im Vergleich der

verschiedenen Sorten lässt sich sagen, dass die Hanfvarietät Felina 34 und die Raps-Varietät Pronto unter Einfluss von Cadmium und Blei ein ähnlich verringertes Wachstum der Wurzeln und Sprosse zeigten. Die Hanf-Varietät Fedora wuchs am schlechtesten auf dem schwermetall-belasteten Boden. Da die eingesetzten Schwermetalle einen geringeren Einfluss auf das Wachstum der Felina 34-Pflanzen ausübte, wurden alle weiterführenden Untersuchungen in der Regel mit der Hanf-Varietät Felina 34 durchgeführt.

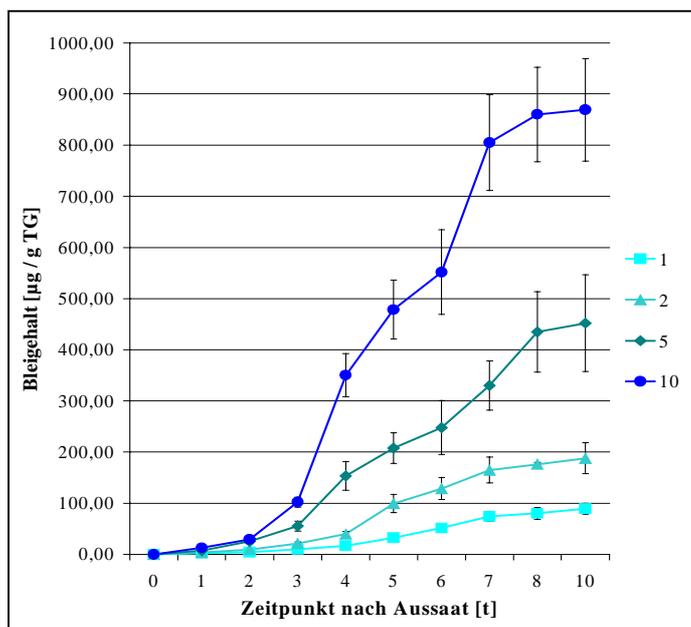
### 3.3.1.2 Aufnahme von Cadmium, Blei und Kupfer im Verlauf der Keimung von Hanfpflanzen

Die in Kap. 3.3.1.1 dargestellten Daten zeigen, dass sich Schwermetalle im Boden negativ auf das Wachstum von Hanfpflanzen auswirkten. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob die im Boden befindlichen Schwermetalle ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) von den untersuchten Hanfpflanzen der Sorte Felina 34 aufgenommen werden und ob diese Aufnahme von der Konzentration der eingesetzten Schwermetalle abhängt (Ostwald et al., 1999 a). Abbildung. 3.35 gibt den Verlauf der Akkumulation von  $\text{Cd}^{2+}$  in Wurzeln von Hanfpflanzen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach der Aussaat und der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration wieder. Aus Abb. 3.35 lässt sich entnehmen, dass der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den Wurzeln von Felina 34-Pflanzen im Keimungsverlauf zunahm. Ab dem 8. Tag nach der Aussaat trat eine Verlangsamung der  $\text{Cd}^{2+}$ -Akkumulation durch die Hanfkeimlinge ein. Der Gehalt an  $\text{Cd}^{2+}$  in den Wurzeln auf 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  gewachsener Pflanzen stieg vom 5. Tag (46  $\mu\text{g/g}$  TG) bis zum 10. Tag (133  $\mu\text{g/g}$  TG) nach der Aussaat auf 289,8 % an. Für Pflanzen, die auf 10 mM  $\text{Cd}^{2+}$  angezogen wurden, konnte ein Anstieg des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes auf 246 % (1120  $\mu\text{g/g}$  TG) beobachtet werden.



**Abb. 3.35:** Aufnahme von Cadmium durch die Wurzeln von Hanfpflanzen (Felina 34) während der Keimung, eingesetzte  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen: 1, 2, 5 und 10 mM  $\text{Cd}^{2+}$

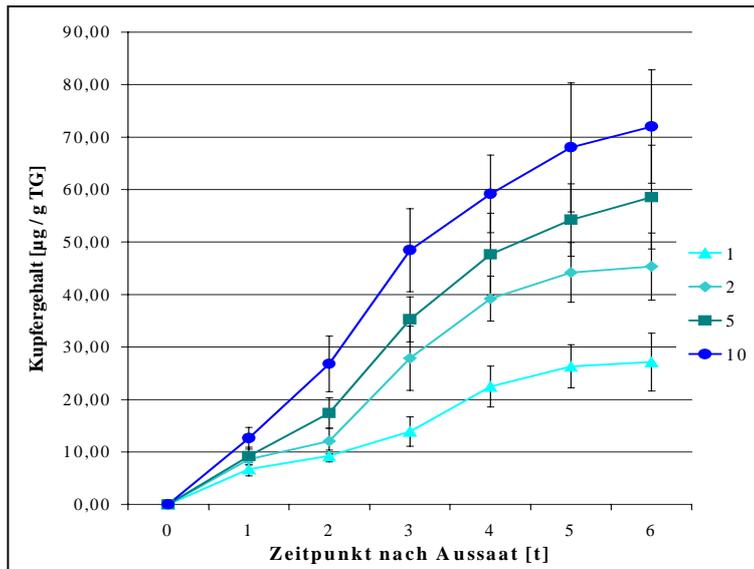
Insgesamt wurden innerhalb der ersten 10 Keimungstage in Pflanzen, die auf 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  in Erde angezogen wurden, 12 % des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes von, auf 10 mM  $\text{Cd}^{2+}$  gewachsenen Pflanzen, gefunden. Anhand der erhaltenen Daten lässt sich sagen, dass ein höherer  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in der Erde vergleichbar höhere Akkumulation von Cadmium in den Wurzeln der Hanfpflanzen zur Folge hatte. Abbildung 3.36 gibt den Verlauf der Akkumulation von  $\text{Pb}^{2+}$  in Wurzeln von Hanfpflanzen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach der Aussaat und der  $\text{Pb}^{2+}$ -Konzentration wieder.



**Abb. 3.36:** Aufnahme von Blei durch die Wurzeln von Hanfpflanzen (Felina 34) während der Keimung, eingesetzte  $\text{Pb}^{2+}$ -Konzentrationen: 1, 2, 5 und 10 mM  $\text{Pb}^{2+}$

Aus Abb. 3.36 lässt sich entnehmen, dass der  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehalt in den Wurzeln von Felina 34 im Keimungsverlauf zunimmt. Ab dem 8. Tag nach der Aussaat trat, wie auch bereits für die Aufnahme von  $\text{Cd}^{2+}$  nachgewiesen, eine Verlangsamung der  $\text{Pb}^{2+}$ -Akkumulation ein. Der Gehalt an  $\text{Pb}^{2+}$  in den Wurzeln auf 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  gewachsener Pflanzen stieg zwischen dem 5. Tag und dem 10. Tag nach der Aussaat um 278 % an. Für Pflanzen, die auf 10 mM  $\text{Pb}^{2+}$  wuchsen, wurde ein Anstieg des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes auf 181 % beobachtet. Wie für  $\text{Cd}^{2+}$  ließ sich auch für  $\text{Pb}^{2+}$  ein linearer Zusammenhang zwischen der  $\text{Pb}^{2+}$ -Konzentration in der Erde und der Akkumulation von  $\text{Pb}^{2+}$  durch die Pflanzen feststellen.

In Abb. 3.37 ist der Verlauf der Akkumulation von  $\text{Cu}^{2+}$  in Wurzeln von Hanfpflanzen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach der Aussaat und der  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration dargestellt.



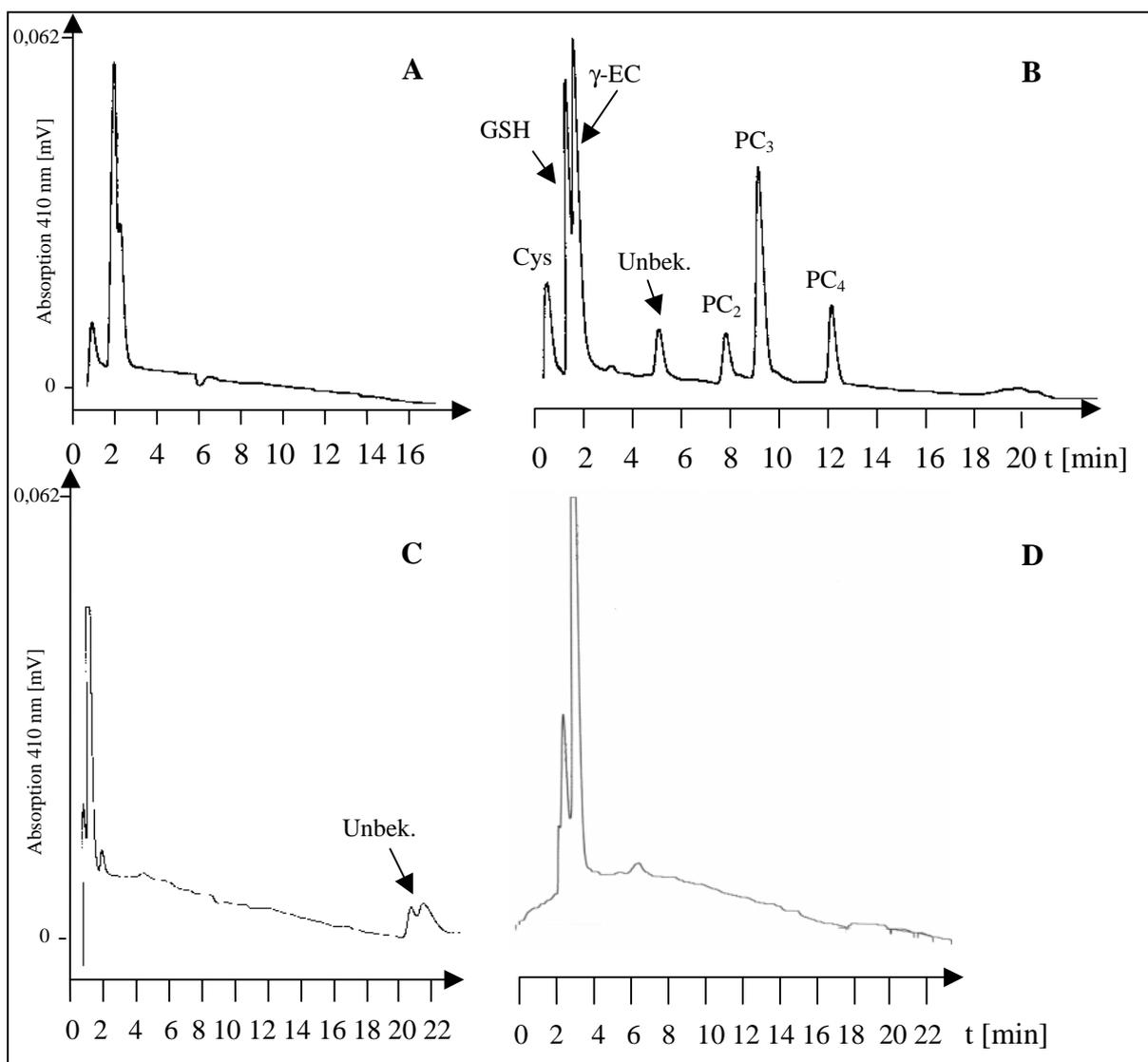
**Abb. 3.37:** Aufnahme von Kupfer durch die Wurzeln von Hanfpflanzen (Felina 34) während der Keimung, eingesetzte  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen: 1, 2, 5 und 10 mM  $\text{Cu}^{2+}$

Die in Abb. 3.37 dargestellten Daten zeigen, dass der  $\text{Cu}^{2+}$ -Gehalt in den Wurzeln von Felina 34-Pflanzen im Keimungsverlauf zunahm. Ab dem 5. Tag nach der Aussaat trat eine Verlangsamung der  $\text{Cu}^{2+}$ -Akkumulationsrate ein. Die durchschnittliche Steigerung der  $\text{Cu}^{2+}$ -Gehalte durch Hanfpflanzen vom 5. zum 6. Keimungstag lag bei 5 %. Für Pflanzen, die auf  $\text{Cd}^{2+}$ - bzw.  $\text{Pb}^{2+}$ -kontaminierter Erde gezogen wurden, lag die durchschnittliche Erhöhung des  $\text{Cd}^{2+}$ - bzw.  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehaltes in den Wurzeln bei 30 %. Die für  $\text{Cu}^{2+}$  erhaltenen Daten lassen, wie bereits für  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Pb}^{2+}$  nachgewiesen, eine Zunahme der Akkumulation von  $\text{Cu}^{2+}$  in den Wurzeln von Hanfpflanzen mit zunehmendem  $\text{Cu}^{2+}$ -Gehalt in der Erde erkennen.

### 3.3.2 Akkumulation von Schwermetallen und Phytochelatinen im Wachstumsverlauf von Hanfpflanzen

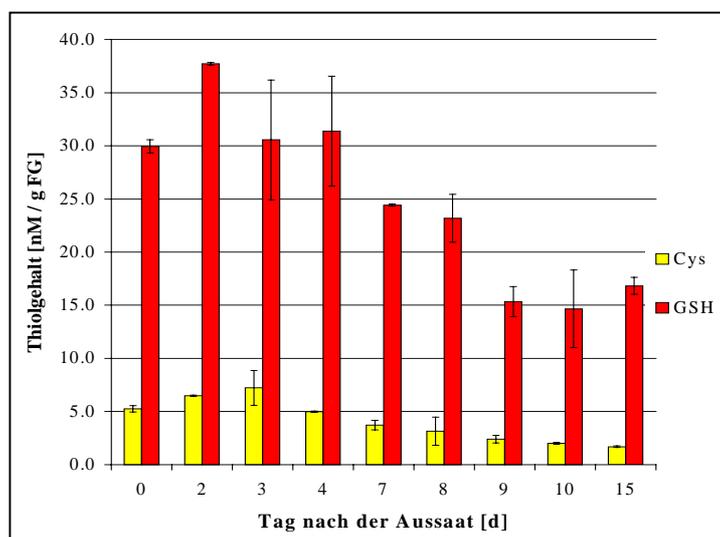
#### 3.3.2.1 Akkumulation von Phytochelatinen im Verlauf der Keimung von Hanfpflanzen auf schwermetallbelasteten Böden

Die in Kap. 3.3.1.2 gezeigten Daten machen deutlich, dass Hanfkeimlinge Schwermetalle wie Cadmium, Blei und Kupfer aus dem Boden aufnehmen können. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die im Boden befindlichen Schwermetalle ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) zur Akkumulation thiolreicher Peptide, vor allem von Phytochelatinen, in Hanfpflanzen der Sorte Felina 34 führen. Zudem war es von Interesse, ob die Anreicherung von Phytochelatinen von der Konzentration der eingesetzten Schwermetalle abhängt.



**Abb. 3.38:** Elutionsprofile thiolreicher Peptide aus Hanfkeimlingen, Tag 8 nach der Aussaat auf schwermetallbelasteter Erde; A: Kontrolle, B: 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$ , C: 1 mM  $\text{Pb}^{2+}$ , D: 1 mM  $\text{Cu}^{2+}$

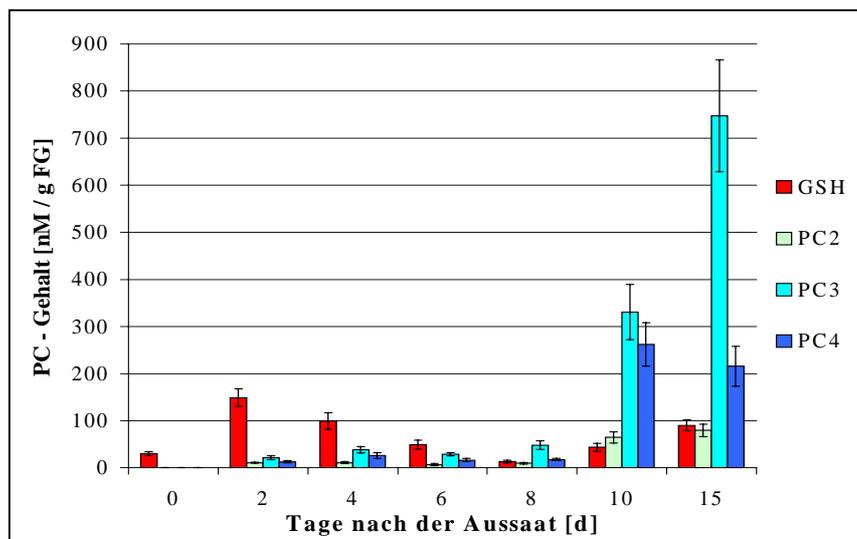
Abb. 3.38 gibt die Elutionsprofile thiolreicher Peptide aus Wurzelextrakten 8 Tage alter Hanfpflanzen, gewachsen auf unkontaminierter Erde bzw. 1 mM Cadmium, Blei oder Kupfer, wieder. Im Gegensatz zu Hanfsuspensions-Kulturen (Kap 3.2.5) wurden in den Extrakten der Kontrollpflanzen und der mit Blei bzw. Kupfer belasteten Pflanzen keine Phytochelatine gefunden. Extrakte cadmiumbelasteter Pflanzen zeigten, neben einer bislang unbekanntem Thiolverbindung, das für Hanf typische Muster thiolreicher Peptide (Kap. 3.1 und 3.2). Wie bereits für Hanfsuspensions-Kulturen nachgewiesen (Kap 3.2.5), ist der GSH- und  $\gamma$ -EC-Gehalt abhängig vom eingesetzten Schwermetall. Cystein, GSH und seine Vorstufe,  $\gamma$ -EC, wurden in allen Proben nachgewiesen.



**Abb. 3.39:** Cystein- und Glutathiongehalt unbelasteter Hanfkeimlinge im Keimungsverlauf, n = 3

Abb. 3.39 gibt die Cystein- und Glutathion-Gehalte in unbelasteten Hanfkeimlingen während der ersten 15 Wachstumstage nach der Aussaat wieder. Sowohl der GSH-Gehalt (37,7 nM/g FG) als auch der Gehalt an Cystein (6,5 nM/g FG) stieg während der ersten beiden Tage nach der Aussaat um 28 % an. Innerhalb der folgenden zwei Wochen ging der Cysteingehalt um 74 % zurück (1,7 nM/g FG). Der GSH-Gehalt sank auf 45 % ab (16,8 nM/g FG).

Da sich bei der Untersuchung der Zellkulturen zeigte, dass die Zusammensetzung der thiolreichen Peptide auch von der Inkubationsdauer mit schwermetallbelastetem Medium abhing (Kap. 3.2.3), wurden diese Daten auch während der Keimung und der anschließenden Wachstumsphase von Hanfpflanzen auf  $\text{Cd}^{2+}$ -belastetem Boden erhoben (Abb. 3.40).



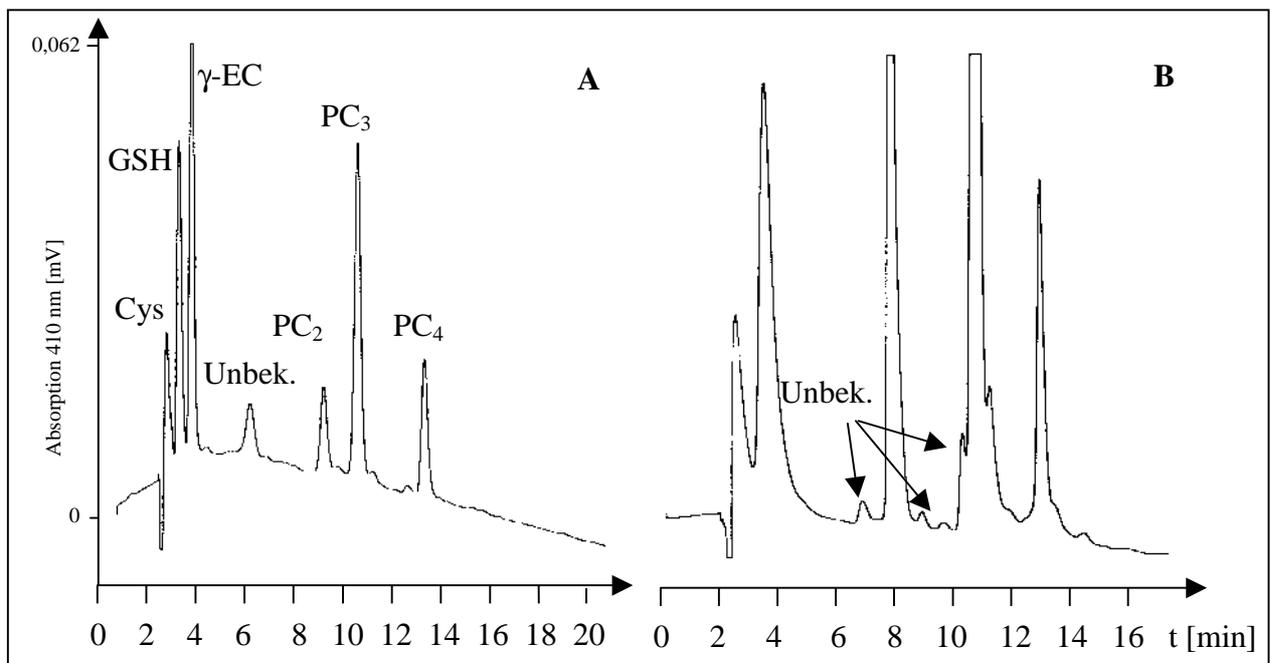
**Abb. 3.40:** Gehalte der verschiedenen thiolreichen Peptide in Hanfpflanzen während des Wachstums auf  $\text{Cd}^{2+}$ -belasteter Erde (5 mM),  $n = 3$

Der GSH-Gehalt in auf mit 5 mM  $\text{Cd}^{2+}$  belastetem Boden angezogenen Hanfkeimlingen stieg während der ersten zwei Tage nach der Aussaat auf das 5-fache an (148,8 nM/g FG), sank im weiteren Keimungsverlauf aber wieder ab. Am 15. Tag nach der Aussaat erreichte der GSH-Gehalt 90,2 nM/g FG, d.h. das 3-fache des Gehaltes im trockenen Samen (30,0 nM/g FG). Im gleichen Zeitraum stieg der Cysteingehalt um das 7-fache des im trockenen Samen (5,2 nM/g FG) gefundenen Gehaltes an (Daten nicht gezeigt). Am 15. Tag nach der Aussaat ließ sich in belasteten Keimlingen das 22-fache des Cysteingehaltes unbelasteter Keimlinge nachweisen. Die GSH-Gehalte belasteter Keimlinge betragen am 2. Tag nach der Aussaat 390 % und am 15. Tag 535% des für unbelastete Keimlinge gefundenen Wertes.

Am 2. Tag nach der Aussaat auf Erde, die mit 5 mM  $\text{Cd}^{2+}$  belastet war, wurde in Hanfkeimlingen ein Gesamt-PC-Gehalt von 44,7 nM/g FG nachgewiesen. Der Gesamt-PC-Gehalt setzte sich aus 24 %  $\text{PC}_2$ , 47,7 %  $\text{PC}_3$  und 28,3 %  $\text{PC}_4$  zusammen. Bis zum 15. Tag nach der Aussaat stieg der Gesamt-PC-Gehalt auf das 23-fache des Gehaltes (1042,2 nM/g FG) am 2. Tag nach der Aussaat an. Auch die Zusammensetzung der Phytochelatine änderte sich deutlich im beobachteten Wachstumszeitraum von 15 Tagen. Am 15. Tag nach der Aussaat betrug der Anteil von  $\text{PC}_2$ : 7,6 %,  $\text{PC}_3$ : 71,7 % und  $\text{PC}_4$ : 20,7 % am Gesamt-PC-Gehalt.  $\text{PC}_3$  nahm im Verlauf der Keimung scheinbar eine dominierende Stellung bei der Komplexbildung des Cadmiums ein. Der Anteil an  $\text{PC}_2$  ging stark zurück, während sich der Anteil an  $\text{PC}_4$  nur geringfügig änderte.

Der maximal nachgewiesene PC-Gehalt in Hanfpflanzen (2 Wochen nach der Aussaat auf 20 mM Cd<sup>2+</sup>, 1042 nM PC/g FG) entsprach dem 2,5-fachen des maximalen PC-Gehaltes in Hanf-Suspensionskulturen (48 h Wachstum auf 40 µM Cd<sup>2+</sup>, 425 nM PC/g FG) bei gleichzeitig 500-fach höherer Cd<sup>2+</sup>-Konzentration im Anzuchtmedium bzw. dem 2,3-fachen des PC-Gehaltes in Hanf-Kalluskulturen (2 Wochen Wachstum auf 200 µM Cd<sup>2+</sup>, 449 nM PC/g FG) bei 100-fach höherer Cd<sup>2+</sup>-Konzentration im Anzuchtmedium.

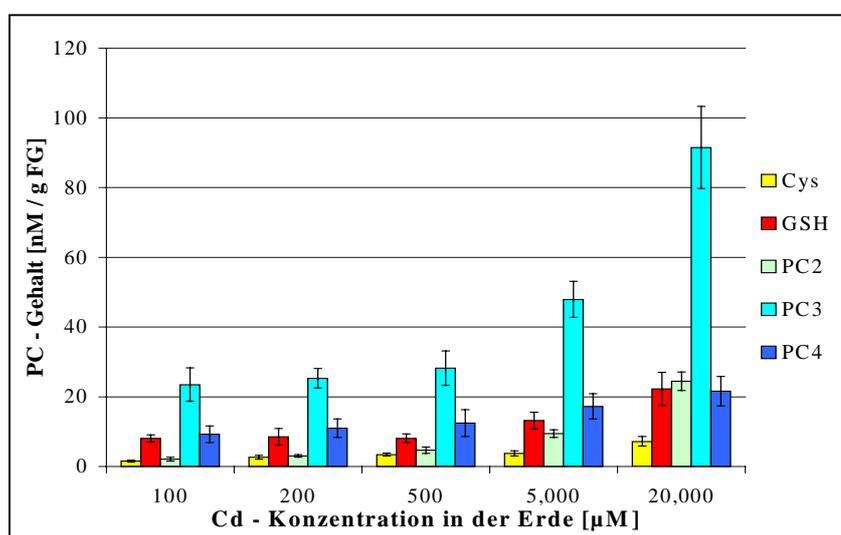
Nicht nur die Inkubationsdauer sondern auch die Konzentration des Schwermetalls spielten eine Rolle bei der Akkumulation von Phytochelatinen in Hanfsuspensions- und Kalluskulturen (Kap. 3.2.3). Abbildung 3.41 gibt die Elutionsprofile thiolreicher Peptide aus Hanfkeimlingen, 9 Tage nach der Aussaat auf mit 0,5 bzw. 20 mM Cd<sup>2+</sup> kontaminierter Erde, wieder.



**Abb. 3.41:** Elutionsprofile thiolreicher Verbindungen aus Extrakten aus Hanfkeimlingen, 9 Tage nach der Aussaat auf A: 0,5 mM Cd<sup>2+</sup>; B: 20 mM Cd<sup>2+</sup>

Aus Abb. 3.41 A und B lässt sich erkennen, dass die stärker belasteten Keimlinge (B: 20 mM Cd<sup>2+</sup>) deutlich mehr Phytochelatine akkumulierten als die weniger stark belasteten Keimlinge (A: 0,5 mM Cd<sup>2+</sup>). In beiden Fällen ließen sich neben Phytochelatinen noch andere, bislang nicht identifizierte Thiolverbindungen nachweisen, die jedoch nur in geringen Konzentrationen vorlagen.

Die Akkumulation von Phytochelatinen ist in Abb. 3.42 in Abhängigkeit von der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration dargestellt. Die Thiolgehalte in Hanfkeimlingen waren erwartungsgemäß 9 Tage nach der Aussaat mit steigendem  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt im Boden stärker angestiegen. Dabei war zu beobachten, dass ein 50-fach höherer  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt (von 100 auf 5.000  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ ) nur zu einem 2,5-fachen Cysteingehalt bzw. einem 1,6-fachen GSH-Gehalt führte. Für die einzelnen Phytochelatine ließen sich deutlich unterschiedliche Zunahmen des Gehaltes bei einer 50-fach höheren  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration nachweisen. Dabei nahm der Gehalt an  $\text{PC}_2$  um das 4,5-fache,  $\text{PC}_3$  um das 2-fache und  $\text{PC}_4$  um das 1,9-fache zu. Eine Vervierfachung des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes in der Erde von 5.000  $\mu\text{M}$  auf 20.000  $\mu\text{M}$  führte zu einer weiteren Zunahme des Cystein- (2-fach) und des GSH-Gehaltes (1,7-fach).

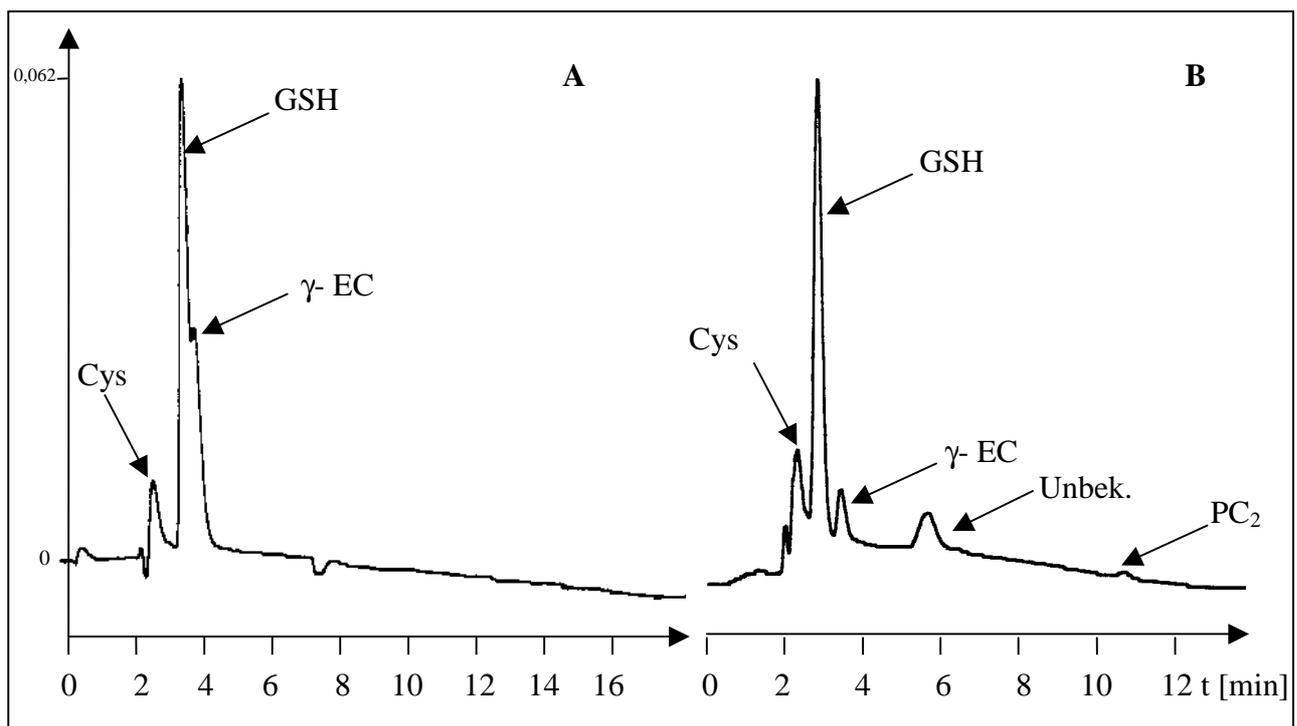


**Abb. 3.42:** Thiolgehalte in Hanfkeimlingen in Abhängigkeit von der Cadmiumbelastung, Tag 9 nach der Aussaat; n = 3

Bei einer Erhöhung der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration in der Erde von 5.000  $\mu\text{M}$  auf 20.000  $\mu\text{M}$  fielen die Steigerungen der Gehalte der einzelnen Phytochelatine ebenfalls sehr unterschiedlich aus. Der Gehalt an  $\text{PC}_2$  stieg um das 2,6-fache,  $\text{PC}_3$  um das 1,9-fache und  $\text{PC}_4$  um das 1,3-fache an. Aus Abb. 3.42 wird deutlich, dass eine Vervierfachung des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes im Boden von 5.000  $\mu\text{M}$  auf 20.000  $\mu\text{M}$  zum Teil nur wenig geringere Steigerungen der Gehalte aller Thiolverbindungen hervorrief, als die 50-fache Erhöhung des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes im Boden von 100 auf 5.000  $\mu\text{M}$ . Insgesamt stieg der Gesamt-PC-Gehalt von 100  $\mu\text{M}$  Cadmium (34,8 nM/g FG) zu 20.000  $\mu\text{M}$  Cadmium (137,6 nM/g FG) im Boden auf das 4-fache an. Die Anteile der einzelnen Phytochelatine am Gesamt-PC-Gehalt änderten sich in Abhängigkeit von der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration wie folgt: In auf mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  belasteter Erde gewachsenen Keimlingen

betrug der Anteil von PC<sub>2</sub> am Gesamt-PC-Gehalt 6 %, von PC<sub>3</sub> 67,4 % und PC<sub>4</sub> 26,6 %. In auf 20.000 µM Cd<sup>2+</sup> im Boden angezogenen Keimlingen betrug der Anteil an PC<sub>2</sub> 17,8%. Der Anteil an PC<sub>3</sub> lag nahezu unverändert bei 66,5 %. Dagegen nahm der Anteil von PC<sub>4</sub> am Gesamt-PC-Gehalt auf 15,7 % ab.

Da bereits wenige Minuten nach Zugabe von Cd<sup>2+</sup> zum Medium in Hanfsuspensions-Kulturen eine Phytochelatin-Akkumulation nachgewiesen wurde (Abb. 3.17), war es von Interesse, die Auswirkungen von Cd<sup>2+</sup> auf die thiolreichen Peptide in Hanfkeimlingen direkt nach der Zugabe von Cadmium zur Erde zu untersuchen. Dazu wurden Hanfkeimlinge 8 Tage auf unbelasteter Erde angezogen. Am 9. Tag nach der Aussaat wurden der Erde 10 mM Cadmium zugesetzt und die Zusammensetzung und die Mengen der thiolreichen Peptide in den Hanfkeimlingen in Abständen von 10 bis 60 Minuten über eine Inkubationszeit von 4 Stunden untersucht. Abb. 3.43 zeigt Elutionsprofile von Extrakten aus unbelasteten und 40 Minuten mit 10 mM Cadmium inkubierten Hanfkeimlingen.

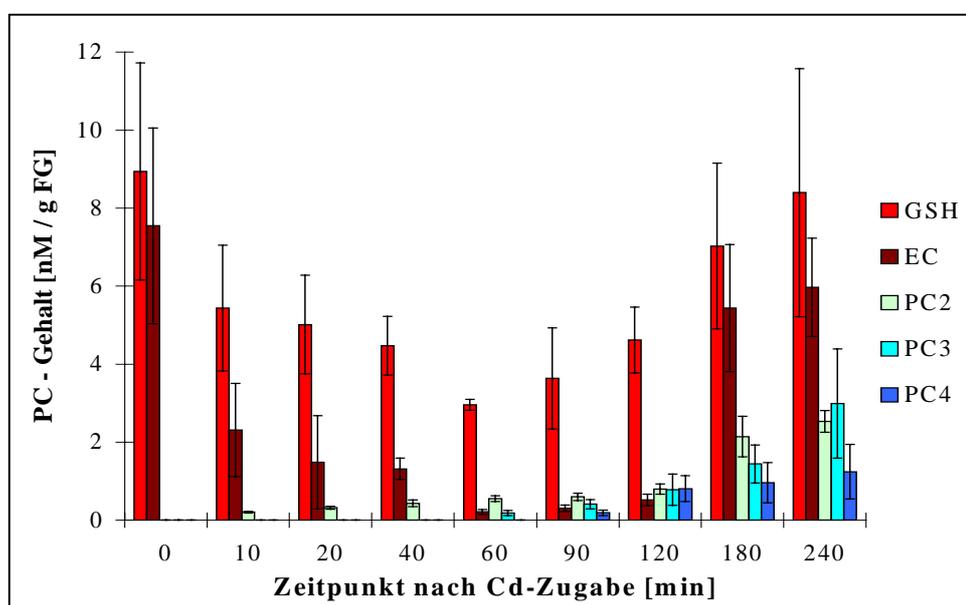


**Abb. 3.43:** Elutionsprofile thiolreicher Peptide von Extrakten aus Hanfkeimlingen, Tag 8 nach der Aussaat auf unbelasteter Erde; A: vor Zugabe von 10 mM Cd<sup>2+</sup>; B: 40 min nach Zugabe von 10 mM Cd<sup>2+</sup>

40 Minuten nach Zugabe der Cd<sup>2+</sup>-Lösung zur Erde war der Gehalt der GSH-Vorstufe γ-EC gegenüber der unbelasteten Probe deutlich zurückgegangen. Zudem ließen sich neben Cystein, GSH und γ-EC weitere thiolreiche Peptide im Elutionsprofil der 40 Minuten mit 10 mM

Cadmium belasteten Keimlinge nachweisen. Bei einer dieser Verbindungen handelte es sich um PC<sub>2</sub>, die zweite thiolreiche Verbindung konnte bislang nicht identifiziert werden. Der Gehalt der nicht identifizierten Verbindung ging aber im Laufe der Inkubationsdauer stark zurück (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 3.44 gibt die Gehalte der unterschiedlichen Thiolverbindungen aus 9 Tage alten Hanfkeimlingen während der ersten 4 Inkubations-Stunden mit 10 mM Cadmium wieder und macht deutlich, dass eine unmittelbare Reaktion der Hanfkeimlinge auf das zugesetzte Schwermetall (10 mM Cd<sup>2+</sup>) erfolgte. Bereits 10 Minuten nach Zugabe von 10 mM Cd<sup>2+</sup> zur Erde wurde ein 40 %iger Rückgang des GSH-Gehaltes auf 5,4 nM/g FG und ein 70 %iger Rückgang des  $\gamma$ -EC-Gehaltes auf 2,3 nM/g FG in 9 Tage alten Hanfkeimlingen beobachtet. Innerhalb der ersten 60 Minuten nach Zugabe des Cadmiums ging der GSH-Gehalt auf 33 % (2,95 nM/g FG), der  $\gamma$ -EC-Gehalt auf 2,6 % (0,21 nM/g FG) des ursprünglichen Gehaltes in den noch unbelasteten Keimlingen zurück. Im weiteren Verlauf (nach 4-stündiger Inkubation mit 10 mM Cd<sup>2+</sup>) erreichten diese Thiolverbindungen 93 % (GSH, 8,3 nM/g FG) bzw. 78 % ( $\gamma$ -EC, 5,96 nM/g FG) ihres Anfangsgehaltes.



**Abb. 3.44:** Gehalte thiolreicher Verbindungen in Hanfkeimlingen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit 10 mM Cd<sup>2+</sup>; 9 Tage gewachsen auf unbelasteter Erde; n = 3

10 Minuten nach Zugabe von 10 mM Cd<sup>2+</sup> zur Erde wurden erstmals Phytochelatine in Hanfkeimlingen nachgewiesen. Hierbei handelte es sich jedoch ausschließlich um PC<sub>2</sub>. PC<sub>3</sub> und PC<sub>4</sub> wurden erst 60 Minuten nach erfolgter Cd<sup>2+</sup>-Zugabe in den Hanfkeimlingen gefunden. Insgesamt stieg der Gesamt-PC-Gehalt im Zeitraum von 10 Minuten (0,20 nM/g FG) bis

60 Minuten (0,75 nM/g FG) nach  $\text{Cd}^{2+}$ -Zugabe auf 371 % an. Während der folgenden drei Stunden erhöhte sich der Gesamt-PC-Gehalt auf 900 % (6,76 nM/g FG) des nach 10 Minuten gemessenen PC-Gehaltes. Dabei veränderten sich die Anteile der einzelnen PC's am Gesamt-PC-Gehalt wie folgt: 60 Minuten nach Zugabe von 10 mM  $\text{Cd}^{2+}$  ließen sich 73,2 %  $\text{PC}_2$  und 26,8 %  $\text{PC}_3$  nachweisen. 4 Stunden nach  $\text{Cd}^{2+}$ -Zugabe betrug der Anteil an  $\text{PC}_4$  18,4 %. Der Anteil an  $\text{PC}_3$  erhöhte sich deutlich auf 44,2 %, während der  $\text{PC}_2$ -Anteil auf 37,4 % zurückging. Wie bereits beschrieben (Abb. 3.43), kommt  $\text{PC}_3$  eine dominante Rolle bei der Komplexierung von Cadmium in Hanf-Suspensionskulturen und Pflanzen zu.

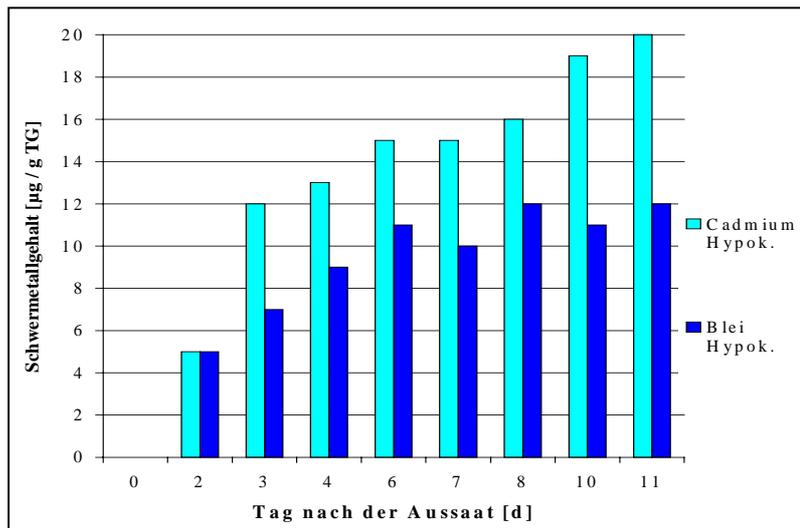
### 3.3.2.2 Verteilung von Schwermetallen und Phytochelatinen in den Organen der Hanfkeimlinge

Wie von Ensley (1995) beschrieben, können Pflanzen zur Rekultivierung eines mit Schwermetallen belasteten Bodens beitragen. Die Wurzeln bestimmter Pflanzen stabilisieren durch Sekretierung verschiedener Substanzen, z. B. Zucker oder organischer Säuren, den Boden und immobilisieren damit Metalle bzw. reduzieren deren Verfügbarkeit (Mench et al., 1988). Verschiedene landwirtschaftliche Nutzpflanzen haben sich in dieser Hinsicht als geeignet erwiesen. Die Schwermetalle verbleiben jedoch in aller Regel im Boden.

Die Toleranz gegenüber Schwermetallen und die Akkumulation dieser Metalle im Spross sind von Bedeutung, wenn man abschätzen möchte, ob eine Pflanze für die Remediation schwermetallbelasteter Böden einsetzbar ist. Pflanzen, die zur Phytoextraktion verwendet werden sollen, werden auf kontaminierten Böden angebaut und müssen eine hohe Toleranz gegenüber hohen Schwermetallkonzentrationen besitzen. Da nur die oberirdischen Pflanzenteile geerntet werden, ist die Akkumulation sehr hoher Schwermetallkonzentrationen in den oberirdischen Organen Voraussetzung, um als sogenannter Hyperakkumulator zu gelten (Brooks, 1994). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Hanfpflanzen in der Lage sind, die durch die Wurzeln aufgenommenen Schwermetalle (Kap. 3.3.1.2) in den Spross zu transportieren um damit erste Hinweise auf das Phytoremediations-Potential der Hanfpflanze zu erhalten.

Abbildung 3.45 gibt den Verlauf der Akkumulation von  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Pb}^{2+}$  im Hypokotyl, also dem Pflanzenabschnitt zwischen Keimblättern (Kotyledonen) und Wurzel, von Hanfpflanzen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach der Aussaat wieder. Es wurde festgestellt, dass sowohl der  $\text{Cd}^{2+}$ - als auch der  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehalt im Hypokotyl (Abb. 3.45) und in den Kotyledonen (Daten nicht gezeigt) von Felina 34-Pflanzen im Keimungsverlauf zunahm. In Pflanzen, die auf 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$

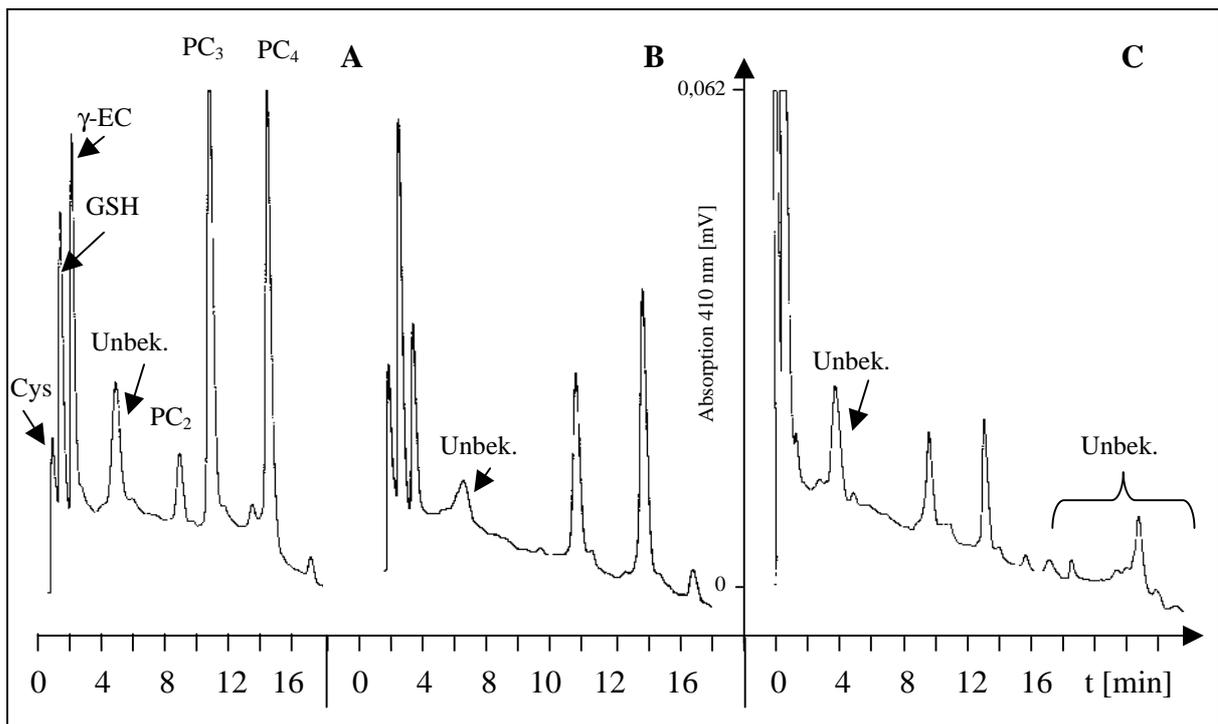
angezogen wurden, betrug der Anstieg des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes im Hypokotyl während der ersten 11 Keimungstage 400 % (Kotyledonen: 250 %). Die  $\text{Cd}^{2+}$ -Akkumulation in den Kotyledonen verlief im Laufe der ersten 11 Tage nach der Aussaat demnach langsamer als im Hypokotyl. Der Anstieg des  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehaltes im Hypokotyl betrug zwischen Tag 2 und Tag 11 des Wachstums auf 1 mM  $\text{Pb}^{2+}$  240 % (Kotyledonen: 300 %).



**Abb. 3.45:** Gehalt von Cadmium und Blei im Hypokotyl auf 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  keimender Hanfpflanzen (Felina 34),  $n = 2$

Der Gehalt an  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Pb}^{2+}$  in den Wurzeln (Kap. 3.3.1.2) auf 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  gewachsener Pflanzen betrug am 10. Tag nach der Aussaat  $133 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g TG}$  bzw.  $89 \mu\text{g Pb}^{2+}/\text{g TG}$ . In Pflanzen, die 11 Tage auf 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  angezogen wurden, betrug der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt im Hypokotyl 15 % ( $20 \mu\text{g/g TG}$ ) des in Wurzeln 10 Tage alter Hanfpflanzen nachgewiesenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes (Kotyledonen: 3,7 % bzw.  $5 \mu\text{g/g TG}$ ). Wurden die Pflanzen 11 Tage auf 1 mM  $\text{Pb}^{2+}$  angezogen, betrug der  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehalt im Hypokotyl 13,4 % ( $12 \mu\text{g/g TG}$ ) des in Wurzeln 10 Tage alter Hanfpflanzen beobachteten  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehaltes (Kotyledonen: 6,7 % bzw.  $6 \mu\text{g/g TG}$ ). Anhand der erhaltenen Daten lässt sich sagen, dass bereits während der Keimung ein, wenn auch geringer, Transport von Schwermetallen in die oberirdischen Sprossabschnitte stattfand.

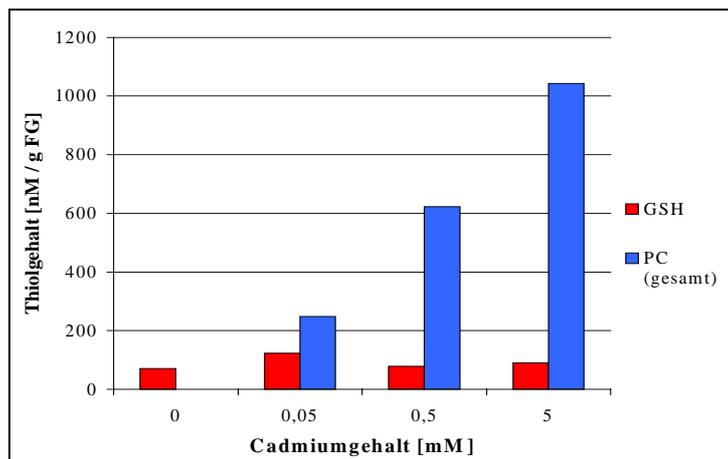
Im Folgenden sollte untersucht werden, ob das im Boden befindliche  $\text{Cd}^{2+}$  zur Anreicherung von thiolreichen Peptiden, vor allem Phytochelatinen, in den oberirdischen Organen von Hanfpflanzen der Sorte Felina 34 führte (Abb. 3.46). Zudem war von Interesse, ob die Akkumulation von Phytochelatinen ähnlich wie in den Wurzeln (Kap. 3.3.2.1) von der Konzentration des eingesetzten Schwermetalls abhängt.



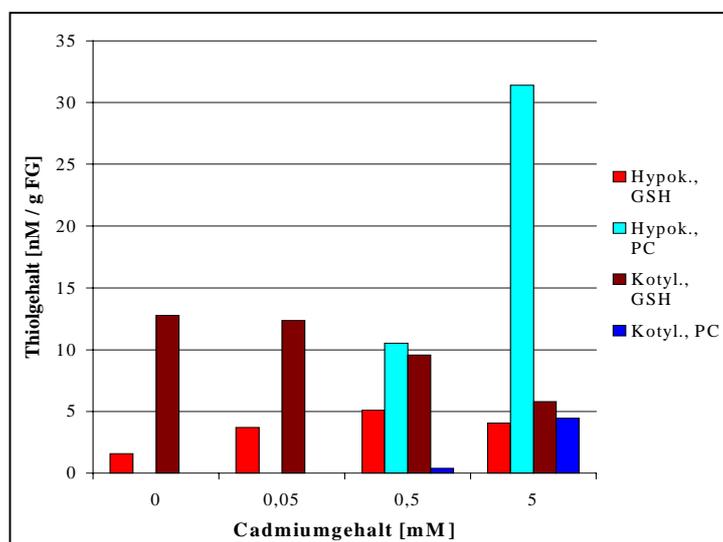
**Abb. 3.46:** Elutionsprofile thiolreicher Peptide aus Hanfkeimlingen, Tag 15 nach der Aussaat auf 5 mM Cd<sup>2+</sup>; A: Wurzel; B: Hypokotyl; C: Kotyledonen

Die Hypokotyle und Kotyledonen Cd<sup>2+</sup>-belasteter Hanfpflanzen zeigten das für Hanfwurzeln typische Muster thiolreicher Peptide (Kap. 3.3.2.1). Es wurde jedoch deutlich, dass der Phytochelatingehalt im Hypokotyl (Abb. 3.46 B) geringer war als in den Wurzeln (Abb. 3.48 A). Den niedrigsten Phytochelatingehalt wiesen die Kotyledonen auf (Abb. 3.48 C). In den Elutionsprofilen der Proben aus allen drei Organen fand sich zusätzlich zwischen 4 und 5 Minuten Retentionszeit eine bislang nicht identifizierte Verbindung, die auch in früheren Experimenten nachweisbar war (Abb. 3.44, Kap. 3.3.2.1). Im Elutionsprofil der Extrakte aus Kotyledonen traten zudem noch weitere Verbindungen auf, die mit einer Retentionszeit > 18 min eluierten und auch im Folgenden nur in grünen Geweben gefunden wurden. Bei diesen Verbindungen, die massenspektrometrisch untersucht, aber bislang nicht identifiziert werden konnten, handelte es sich nicht um Phytochelatine oder Phytochelatin-ähnliche Substanzen. Ein quantitativer Vergleich der Thiolgehalte in den verschiedenen Organen von Hanfkeimlingen soll im Folgenden anhand der Abb. 3.47 und 3.48 durchgeführt werden.

In den folgenden Abbildungen sind die Thiolgehalte in den Wurzeln (Abb. 3.47) bzw. im Hypokotyl und den Kotyledonen (Abb. 3.48) 15 Tage alter Hanfpflanzen in Abhängigkeit von der im Boden hergestellten Cd<sup>2+</sup>-Konzentration dargestellt.



**Abb. 3.47:** Thiolgehalte in Wurzeln 15 Tage alter Hanfpflanzen in Abhängigkeit von der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration im Boden,  $n = 2$



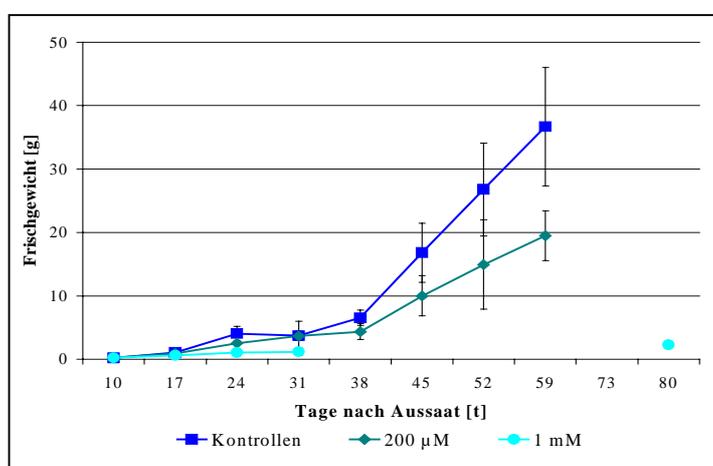
**Abb. 3.48:** Thiolgehalte im Hypokotyl bzw. in den Kotyledonen 15 Tage alter Hanfpflanzen in Abhängigkeit von der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration im Boden,  $n = 2$

Der Vergleich der Daten aus Abb. 3.47 und 3.48 zeigt, dass die Hanfpflanzen (Kontrolle) im Hypokotyl 2,3 % und in den Kotyledonen 18 % des in Wurzeln gefundenen GSH-Gehaltes enthielten. Bei einer  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration von 0,05 mM im Boden wurde nur in den Wurzeln der Hanfpflanzen eine Akkumulation von Phytochelatinen beobachtet (248,8 nM/g FG). Bei 10-fach höherer  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration im Boden (0,5 mM) war der in Wurzeln nachgewiesene PC-Gehalt (622,7 nM/g FG) 60-mal höher als der in den Hypokotylen (10,5 nM/g FG) und 1640-mal höher als in den Kotyledonen (0,38 nM/g FG). Eine noch höhere  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration von 5 mM im Boden führte zu einer stärkeren Akkumulation von Phytochelatinen in allen untersuchten Organen. Die Wurzeln (1042,2 nM/g FG) wiesen einen 33-mal höheren PC-Gehalt als die

Hypokotyle (31,4 nM/g FG) und einen 233-mal höheren PC-Gehalt als die Kotyledonen (4,47 nM/g FG) auf. Der Phytochelatin-Gehalt in den Hypokotylabschnitten war damit 7-mal höher als der in den Kotyledonen. Die 10-fach höhere  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration im Boden von 0,5 gegenüber 5 mM  $\text{Cd}^{2+}$  führte in den Wurzeln zu einer Erhöhung des PC-Gehaltes von 167 % (Hypokotyl: 300 %; Kotyledonen: 1176 %). Mit zunehmender  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration von 0 auf 5000  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  im Boden stiegen die GSH-Gehalte im Hypokotyl auf 257 % an und nahmen in den Kotyledonen auf 45 % ab. Der Transport von  $\text{Cd}^{2+}$  in die oberirdischen Sprosssteile führte demnach zur Akkumulation von Phytochelatinen in diesen Organen (Abb. 3.45), war aber, wie in Wurzeln, stark von der im Boden befindlichen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration abhängig.

### 3.3.2.3 Einfluss von Cadmium auf das Wachstum von Hanf- und Weizenpflanzen

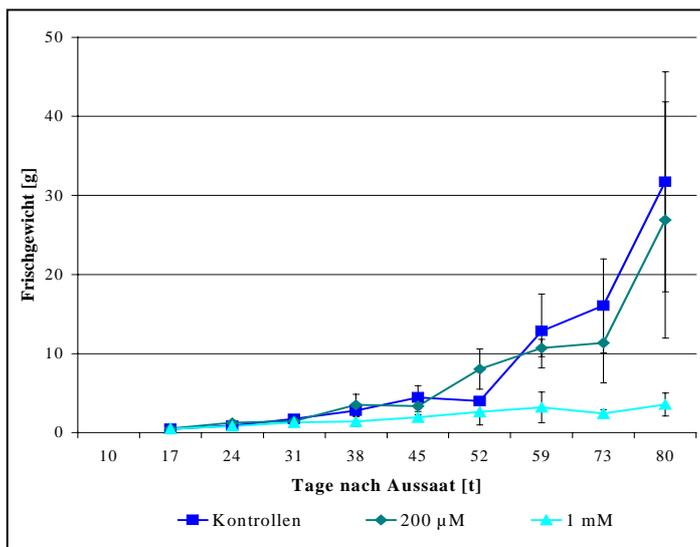
Bislang wurde die Aufnahme von Schwermetallen und die Akkumulation von Phytochelatinen während der Keimung und der frühen Wachstumsphase (bis 15 Tage nach der Aussaat) gezeigt. Ein geringer Transport von Schwermetallen in die oberirdischen Sprosssteile von bis zu 15 Tage alten Hanfpflanzen konnte nachgewiesen werden (Kap. 3.3.2.2). Die Analyse der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte im Wachstumsverlauf sollte zeigen, ob sich der Transport im Laufe der Wachstumsperiode (ca. 80 Tage im Gewächshaus) fortsetzt und ob die  $\text{Cd}^{2+}$ -Akkumulation in den oberirdischen Organen ausreicht, um einen Einsatz von Hanf in der Phytoremediation erfolgversprechend zu machen. Erste Voraussetzung dafür wäre ein gutes Wachstum des Hanfs auf schwermetallbelasteten Böden. In Abb. 3.49 und Abb. 3.50 sind die Frischgewichte von Hanf- und Weizenpflanzen für verschiedene  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration im Boden über einen Zeitraum von 80 (Hanf) bzw. 90 Tagen (Weizen) dargestellt.



**Abb. 3.49:** Frischgewichtszunahme von Hanfpflanzen unter Einfluss verschiedener  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen über einen Zeitraum von 80 Tagen,  $n = 3$

Einen ersten Anhaltspunkt für die Auswirkungen von Schwermetallen auf die Hanfpflanzen lieferten die Frischgewichtszunahmen unter Einfluss verschiedener  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen (Kontrolle, 200  $\mu\text{M}$  und 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$ ). Vergleicht man die Frischgewichtszunahme der Hanfpflanzen auf unbelastetem Boden mit der Frischgewichtszunahme von auf mit 200  $\mu\text{M}$  bzw. 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  belastetem Boden angezogenen Pflanzen, so wird deutlich, dass innerhalb der ersten 17 Tage nach der Aussaat kaum Unterschiede zu beobachten waren (0,59 g FG). In den folgenden 14 Tagen erhöhte sich das Frischgewicht der Kontrollpflanzen und der auf mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  belastetem Boden angezogenen Pflanzen auf 600 % (3,6 g FG), während das Frischgewicht der auf 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  im Substrat (Erde) angezogenen Pflanzen nur auf 190 % stieg (1,17 g FG). Zudem waren 31 Tage nach der Aussaat alle bis auf eine der auf mit 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  belastetem Substrat angezogenen Hanfpflanzen abgestorben. Ab dem 38. Tag nach der Aussaat ließ sich sowohl bei den Kontrollpflanzen als auch bei den auf 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  im Substrat angezogenen Pflanzen eine starke Zunahme des Frischgewichtes beobachten. Am 45. Tag nach der Aussaat hatte sich das Frischgewicht der Kontrollpflanzen auf 260 % (16,79 g FG) gegenüber dem 38. Tag erhöht. Die Zunahme des Frischgewichtes der auf mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  belasteten Erde angezogenen Hanfpflanzen betrug 227 % (10 g FG). Am 60. Tag nach der Aussaat betrug das Frischgewicht der Kontrollpflanzen das 5,6-fache (36,7 g FG) des Frischgewichtes am 38. Tag nach der Aussaat. Dagegen nahm das Frischgewicht der auf mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  belasteten Erde angezogenen Hanfpflanzen nur um das 4,4-fache (19,5 g FG) des Frischgewichtes am 38. Tag nach der Aussaat zu. Die einzig verbliebene, auf 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  im Substrat angezogene Hanfpflanze hatte jedoch 80 Tage nach der Aussaat ihr Frischgewicht vom 38. Tag nur verdoppelt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kontrollpflanzen im Durchschnitt ein doppelt so hohes Frischgewicht erreichten als die auf mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  belastetem Boden angezogenen Hanfpflanzen.

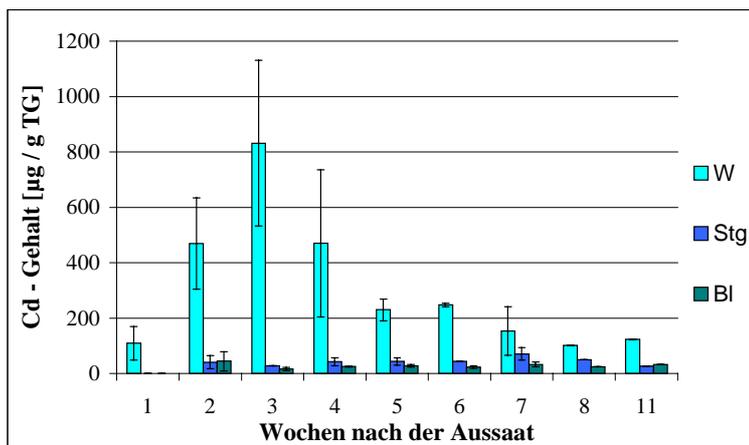
Wie bei den Hanfpflanzen waren innerhalb der ersten 17 Tage nach der Aussaat kaum Unterschiede in der Frischgewichtszunahme zwischen den auf unbelastetem Boden, mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  bzw. mit 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  belastetem Boden angezogenen Weizenpflanzen zu beobachten (0,48 g FG). Während der folgenden 28 Tage erhöhte sich das Frischgewicht der Kontrollpflanzen auf 927 % (4,45 g). Das Frischgewicht der auf 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  im Substrat gewachsenen Pflanzen erhöhte sich auf 697 % (3,35 g). Dagegen erhöhte sich das Frischgewicht der auf 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  im Substrat angezogenen Pflanzen nur auf 404 % (1,94 g). Ein vermehrtes Absterben der auf mit 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  belastetem Boden angezogenen Weizenpflanzen war aber nicht zu beobachten.



**Abb. 3.50:** Frischgewichtszunahme von Weizenpflanzen unter Einfluss verschiedener  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen über einen Zeitraum von 90 Tagen,  $n = 3$

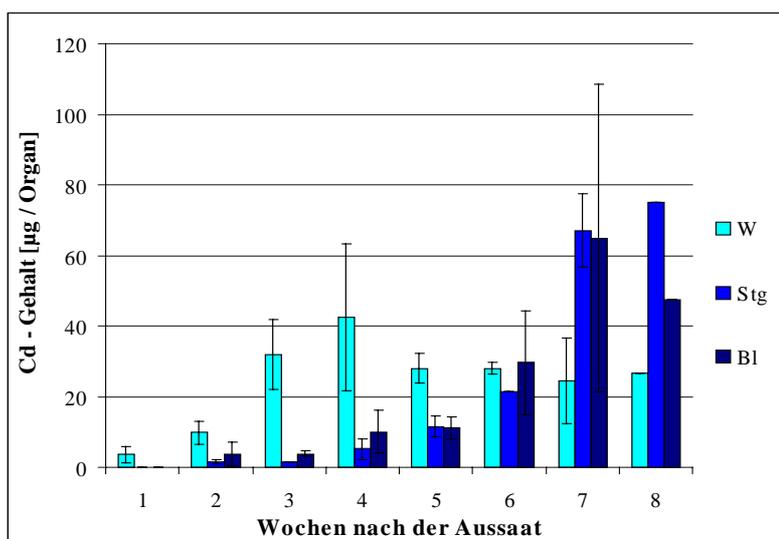
Ab dem 52. Tag nach der Aussaat ließ sich sowohl bei den Kontrollpflanzen als auch bei den auf  $200 \mu\text{M Cd}^{2+}$  im Substrat angezogenen Pflanzen eine starke Zunahme des Frischgewichtes beobachten. Am 80. Tag nach der Aussaat betrug das Frischgewicht der Kontrollpflanzen das 7-fache ( $31,7 \text{ g FG}$ ) des Frischgewichtes am 45. Tag nach der Aussaat. Die Zunahme des Frischgewichtes der auf mit  $200 \mu\text{M Cd}^{2+}$  belasteten Erde angezogenen Weizenpflanzen betrug das 8-fache ( $26,9 \text{ g FG}$ ) des Frischgewichtes am 45. Tag nach der Aussaat. Die auf  $1 \text{ mM Cd}^{2+}$  im Substrat angezogenen Weizenpflanzen erreichten dagegen 80 Tage nach der Aussaat nur das 1,8-fache ( $3,6 \text{ g FG}$ ) ihres Frischgewichtes vom 45. Tag nach der Aussaat. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kontrollpflanzen im Durchschnitt ein 1,2-mal höheres Frischgewicht besaßen als die auf mit  $200 \mu\text{M Cd}^{2+}$  belastetem Boden angezogenen Weizenpflanzen. Die auf mit  $1 \text{ mM Cd}^{2+}$  belastetem Boden angezogenen Weizenpflanzen erreichten, ähnlich wie die auf mit  $1 \text{ mM Cd}^{2+}$  belastetem Boden angezogenen Hanfpflanzen, nur  $1/8$  des Frischgewichtes der Kontrollpflanzen.

In Abb. 3.51 und 3.52 sind die relativen bzw. absoluten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in Hanfpflanzen, die auf  $200 \mu\text{M Cd}^{2+}$  im Boden angezogen wurden, im Wachstumsverlauf dargestellt. Aus Abb. 3.51 wird ersichtlich, dass der Gehalt an  $\text{Cd}^{2+}$  in den Wurzeln in der 3. Woche nach der Aussaat ein Maximum ( $839,7 \mu\text{g/g TG}$ ) erreichte und im Laufe der folgenden 8 Wochen auf  $122,8 \mu\text{g/g TG}$  absank. Über einen Zeitraum von 11 Wochen veränderten sich die  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte im Stengel ( $25,9 \mu\text{g/g TG}$ , 11. Woche) bzw. in den Blättern ( $32,3 \mu\text{g/g TG}$ , 11. Woche) nur wenig.



**Abb. 3.51:** Cd<sup>2+</sup>-Gehalt in Organen von Hanfpflanzen im Wachstumsverlauf, angezogen auf 200 µM Cd<sup>2+</sup>, W = Wurzel, Stg. = Stengel, Bl = Blatt; n = 3

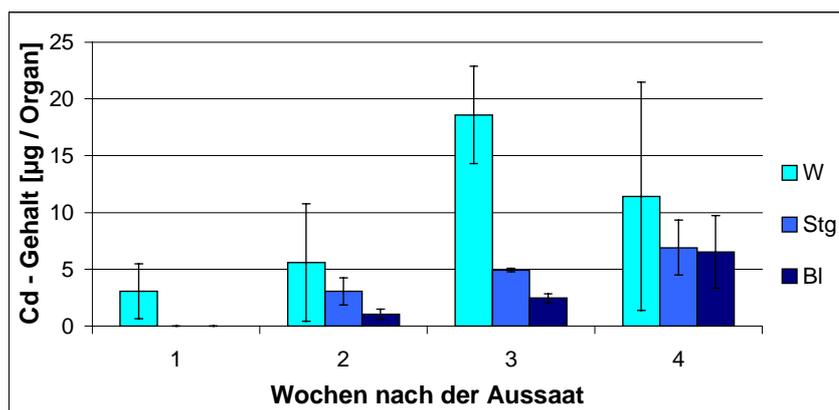
Da das Frischgewicht der Pflanzen (Abb. 3.49), ab der 4. Woche nach der Aussaat stark zunahm, war es von Interesse, neben dem relativen Cd<sup>2+</sup>-Gehalt (µg Cd<sup>2+</sup>/g TG) auch den absoluten Cd<sup>2+</sup>-Gehalt (µg Cd<sup>2+</sup>/Organ) in den einzelnen Pflanzenteilen zu bestimmen (Abb. 3.52). Dieser Wert sollte genauere Aussagen über die Aufnahme und den Transport von Cd<sup>2+</sup> in die verschiedenen, in der Wachstumsphase befindlichen, Organe ermöglichen. Aus diesem Grund sind in den folgenden Abbildungen zur Aufnahme von Cd<sup>2+</sup> durch Hanf- bzw. Weizenpflanzen die absoluten Cd<sup>2+</sup>-Gehalte in den einzelnen Organen der Pflanzen dargestellt.



**Abb. 3.52:** Absoluter Cd<sup>2+</sup>-Gehalt in verschiedenen Organen von Hanfpflanzen im Wachstumsverlauf, angezogen auf 200 µM Cd<sup>2+</sup>, W = Wurzel, Stg. = Stengel, Bl = Blatt n = 3

Aus Abb. 3.52 wird deutlich, dass der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den Wurzeln auf mit  $200 \mu\text{M Cd}^{2+}$  belastetem Boden gewachsener Hanfpflanzen innerhalb der ersten 4 Wochen nach der Aussaat um das 12-fache zunahm ( $42,4 \mu\text{g/Wurzel}$ ). Im weiteren Wachstumsverlauf ging der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den Wurzeln jedoch auf einen Wert von  $26,5 \mu\text{g}$  zurück. Gleichzeitig ließ sich ein verstärkter Transport des aufgenommenen  $\text{Cd}^{2+}$  in die oberirdischen Pflanzenteile (Stengel und Blätter) beobachten. Von der 3. Woche ( $1,68 \mu\text{g Cd}^{2+}$ /Stengel) bis zur 8. Woche nach der Aussaat stieg der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt im Stengel auf  $75,2 \mu\text{g}$ , damit also um das 45-fache an. In den Blättern 8 Wochen alter Hanfpflanzen ließen sich  $47,9 \mu\text{g Cd}^{2+}$ /Gesamt-Blätter nachweisen. Das entsprach dem 13-fachen des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes in den Blättern ( $3,8 \mu\text{g}$ ) 3 Wochen alter Pflanzen. Der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt 8 Wochen alter Hanfpflanzen ( $149,2 \mu\text{g/Pflanze}$ ) lag damit um das 2,6-fache höher als der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt 4 Wochen alter Hanfpflanzen ( $57,6 \mu\text{g/Pflanze}$ ). Das Frischgewicht der Pflanzen nahm im betrachteten Zeitraum dagegen um das 5-fache zu (Abb. 3.49).

Anhand der in Abb. 3.52 dargestellten Daten wird deutlich, dass  $\text{Cd}^{2+}$  in einer frühen Wachstumsphase (bis 4 Wochen nach der Aussaat) hauptsächlich in den Wurzeln blieb. Später fand verstärkt ein Transport von  $\text{Cd}^{2+}$  aus den Wurzeln in die oberirdischen Pflanzenteile statt (ab 4 Wochen nach der Aussaat). Das aufgenommene  $\text{Cd}^{2+}$  gelangte in dieser Wachstumsphase zu einem größeren Teil (82 %) in Stengel und Blätter der Hanfpflanzen, die zu diesem Zeitpunkt 92,3 % der Biomasse der Hanfpflanzen ausmachten (Stengel: 34,9 %; Blätter: 57,4 %).

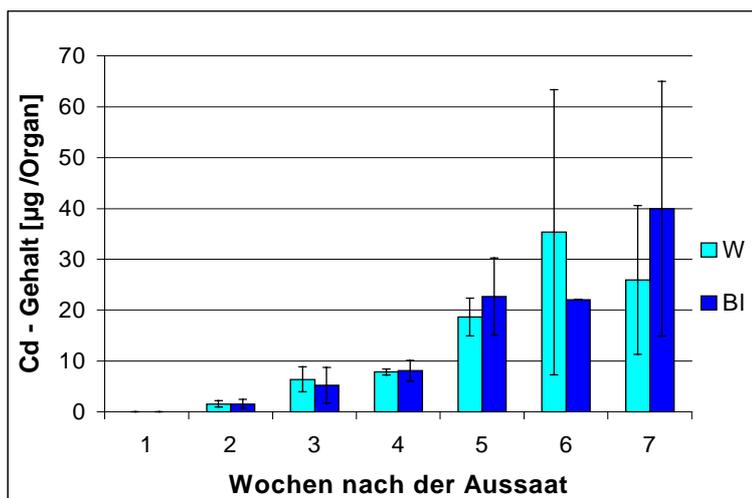


**Abb. 3.53:** Absoluter  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in verschiedenen Organen im Wachstumsverlauf von Hanfpflanzen, angezogen auf  $1 \text{ mM Cd}^{2+}$ ,  $n = 3$

Aus Abb. 3.53 lässt sich entnehmen, dass der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den Wurzeln auf mit  $1 \text{ mM Cd}^{2+}$  belastetem Boden angezogener Hanfpflanzen innerhalb der ersten 4 Wochen nach der Aussaat um das 3,7-fache zunahm ( $11,4 \mu\text{g/Wurzel}$ ). Zudem muss ein Transport des aufgenommenen  $\text{Cd}^{2+}$  in die oberirdischen Pflanzenteile (Stengel und Blätter) stattgefunden haben. Von der 2. Woche

(3,18  $\mu\text{g Cd}^{2+}$ /Stengel) bis zur 4. Woche nach der Aussaat stieg der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt im Stengel auf 6,9  $\mu\text{g}$ , damit also um das 2,2-fache an. In den Blättern 4 Wochen alter Hanfpflanzen wurden 6,5  $\mu\text{g Cd}^{2+}$ /Gesamt-Blätter nachgewiesen. Das entspricht dem 6,5-fachen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den Blättern 2 Wochen alter Hanfpflanzen (1,0  $\mu\text{g Cd}^{2+}$ /Gesamt-Blätter). 4 Wochen nach der Aussaat hatte zunehmend ein Transport von  $\text{Cd}^{2+}$  aus den Wurzeln in die oberirdischen Pflanzenteile (3 Wochen: 29 %) stattgefunden. Das aufgenommene  $\text{Cd}^{2+}$  war in dieser Wachstumsphase vermehrt (54 %) in Stengel und Blätter der Hanfpflanzen gelangt. 4 Wochen nach der Aussaat ließen sich jedoch bei einem Großteil der auf 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  angezogenen Pflanzen starke Schädigungen feststellen, die innerhalb der folgenden 2 Wochen zum Absterben der Pflanzen führten. 10 Wochen nach der Aussaat wurde der Gesamt- $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in der einzigen verbliebenen Hanfpflanze bestimmt. Dieser lag bei 165,1  $\mu\text{g/Pflanze}$  und damit um das 6,6-fache höher als 4 Wochen nach der Aussaat (24,86  $\mu\text{g/Pflanze}$ ).

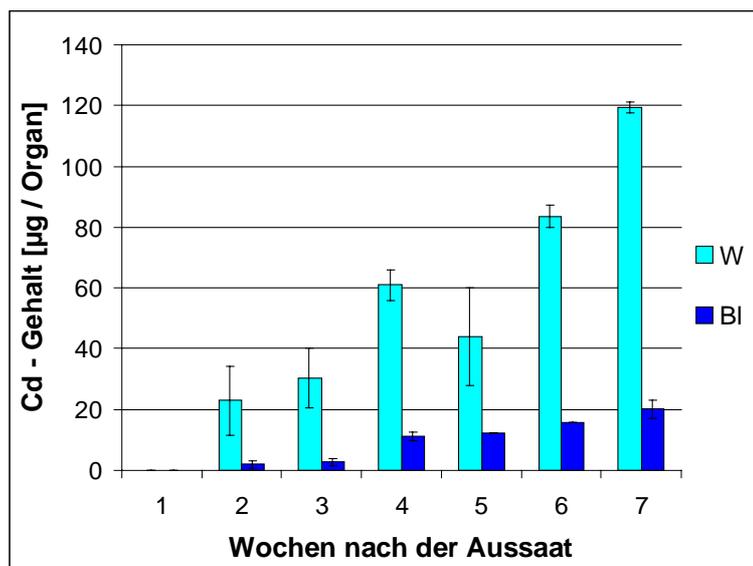
In Abb. 3.54 ist der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in verschiedenen Organen von Weizenpflanzen, angezogen auf mit 200  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  belastetem Boden, dargestellt. Der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den Wurzeln und in den Blättern auf 200  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  im Substrat gewachsener Weizenpflanzen nahm zwischen der 2. und der 4. Woche nach der Aussaat um das 5-fache zu (7,8  $\mu\text{g/Organ}$ ). Im weiteren Wachstumsverlauf stieg der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den Wurzeln auf einen Wert von 25,9  $\mu\text{g/Wurzel}$  (7. Woche). Von der 2. Woche (1,6  $\mu\text{g Cd}^{2+}$ /Gesamt-Blätter) bis zur 7. Woche nach der Aussaat stieg der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den Blättern auf 39,9  $\mu\text{g}$ , damit also um das 25-fache an.



**Abb. 3.54:** Absoluter  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in verschiedenen Organen im Wachstumsverlauf von Weizenpflanzen, angezogen auf 200  $\mu\text{M Cd}^{2+}$ , n = 3

Eine verstärkte Ablagerung des aufgenommenen  $\text{Cd}^{2+}$  in den Blättern (60 %) ließ sich erst ab der 7. Woche nach der Aussaat beobachten. Der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt 7 Wochen alter Weizenpflanzen

(65,9  $\mu\text{g}/\text{Pflanze}$ ) lag damit um das 4-fache höher als ihr  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt nach 4 Wochen (15,0  $\mu\text{g}/\text{Pflanze}$ ). Das Frischgewicht der Pflanzen nahm im betrachteten Zeitraum dagegen um das 7-fache zu (Abb. 3.50). Anhand der in Abb. 3.54 dargestellten Daten wird deutlich, dass in auf 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  im Substrat angezogenen Weizenpflanzen, im Gegensatz zu Hanfpflanzen (Abb. 3.52), das aufgenommene  $\text{Cd}^{2+}$  während des Wachstumsverlaufes relativ gleichmäßig in Wurzeln und Blätter, die zu diesem Zeitpunkt 74,3 % der Biomasse der Hanfpflanzen ausmachten, gelangte.



**Abb. 3.55:** Absoluter  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in verschiedenen Organen im Wachstumsverlauf von Weizenpflanzen, angezogen auf 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$ , n = 3

Betrachtet man Abb. 3.55 so zeigt sich, dass der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den Wurzeln auf mit 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  belasteter Erde gewachsener Weizenpflanzen zwischen der 2. und der 4. Woche nach der Aussaat um das 2,6-fache zunahm (60,9  $\mu\text{g}/\text{Wurzel}$ ). Im weiteren Wachstumsverlauf stieg der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den Wurzeln auf einen Wert von 119,5  $\mu\text{g}$  (7. Woche). Während der ersten 4 Wochen nach der Aussaat fand offenbar ein Transport des aufgenommenen  $\text{Cd}^{2+}$  von den Wurzeln in die Blätter statt. Von der 2. Woche (1,9  $\mu\text{g}$   $\text{Cd}^{2+}/\text{Gesamt-Blätter}$ ) bis zur 4. Woche nach der Aussaat stieg der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den Blättern auf 11,2  $\mu\text{g}$ , damit also um das 5,9-fache an. Danach nahm der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den Blättern auf 20,12  $\mu\text{g}$  und damit um das 1,8-fache zu. Der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt 7 Wochen alter Weizenpflanzen (139,6  $\mu\text{g}/\text{Pflanze}$ ) lag um das 2-fache höher als der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt 4 Wochen alter Weizenpflanzen (72,1  $\mu\text{g}/\text{Pflanze}$ ). Die in Abb. 3.55 dargestellten Daten zeigen, dass auf mit 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  belastetem Boden angezogene Weizenpflanzen, im Gegensatz zu denen auf 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  im Boden angezogenen Weizenpflanzen (Abb. 3.54), das aufgenommene  $\text{Cd}^{2+}$  während des Wachstumsverlaufes zu einem Großteil (85 %) in ihren Wurzeln hielten.

### 3.4 Freilandversuch zur Akkumulation von Cadmium in Faserhanf im Vergleich zu verschiedenen Nutz- und Wildpflanzen

Um eine Pflanzenart effektiv zur Phytoremediation schwermetallbelasteter Böden nutzen zu können, sollte ein möglichst großer Teil der Schwermetalle in den oberirdischen Organen der Pflanzen angereichert sein, um sie durch einfaches Ernten entfernen zu können (Cunningham et al., 1995). Von zusätzlichem ökonomischen Vorteil wäre es, wenn dabei noch wichtige pflanzliche Rohstoffe, wie Stärke, Öl, Fasern und Zellulose gewonnen werden könnten. Es muss jedoch sichergestellt werden, dass diese Rohstoffe keine Gefährdung für den Menschen und die Umwelt darstellen (CMA, 1997; Fachagentur nachwachsende Rohstoffe, 1998).

Hanf-, Raps-, Weizen- und Maispflanzen wurden auf einer Parzelle eines durch mehrmalige Düngung mit Klärschlämmen stark schwermetallbelasteten Areals (Kap. 2.2.5) angezogen. Diese Nutzpflanzen und die am Rand dieser Parzelle wild wachsenden Kamille-, Springkraut-, Brennessel-, Sauerampfer- und Beinwellpflanzen wurden auf ihre Cadmium- und Phytochelatingehalte hin untersucht. Die Untersuchung von Oberbodenmischproben (Hygieneinstitut des Ruhrgebietes, 1997) eines größeren Teilstückes des belasteten Areals, in dem sich die oben angesprochene Parzelle befindet, ergab die folgenden Schwermetallgehalte (Tab. 3.6). Der pH-Wert des Oberbodens betrug 6,72, und lag damit im neutralen Bereich aber deutlich über dem für Hanf als optimal eingestuften pH-Bereich von 5,8 bis 6,0 (Kap. 2.8).

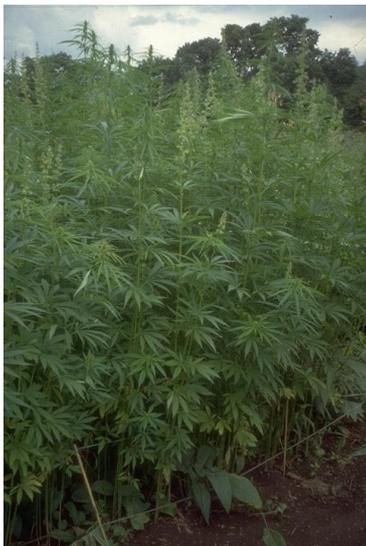
Schwermetall	Gehalt [mg/kg]
Cadmium	102
Nickel	419
Blei	454

**Tab. 3.6:** Schwermetallgehalte im Oberboden des belasteten Areals (Hygieneinstitut des Ruhrgebietes, 1997)

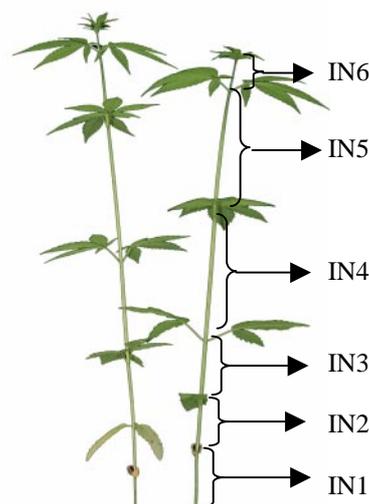
#### 3.4.1 Akkumulation von Cadmium und Phytochelatinen in Hanfpflanzen (*Cannabis sativa* L.)

Herer und Bröckers postulierten 1993, das aufgrund der unüberschaubaren Palette an Produkten, die heute aus Hanf hergestellt werden können, der Anbau von Hanfpflanzen zur Produktion von Fasern, Schäben und Öl auch der Landwirtschaft in Deutschland neue Perspektiven bieten

könnte. Wie schon gezeigt werden konnte, sind Hanfpflanzen (Abb. 3.56) unter Gewächshausbedingungen in der Lage, Schwermetalle aus dem Boden aufzunehmen und zu einem gewissen Grad in ihre oberirdischen Organe zu transportieren (Kap. 2.2.4 bzw. 3.3). Die Ergebnisse, die durch den Freilandanbau von Hanfpflanzen auf schwermetallbelastetem Boden erhalten wurden (Kap. 2.2.5), sollen einen Beitrag dazu leisten, das Phytoremediations-Potential der Hanfpflanze einzuschätzen. Eine wichtige Fragestellung war dabei, inwieweit die aus den Pflanzen erhaltenen Rohstoffe (Fasern, Schäben, Öl) mit Schwermetallen belastet sind. Der Spross wurde, je nach Größe (Internodienzahl = IN) der Pflanze, in bis zu 14 Abschnitte unterteilt (IN1 - IN14). Der unterste Abschnitt der Sprossachse stellt IN1 dar. Der Blattansatz bildet das obere Ende jedes Abschnittes (Abb. 3.57). Diese Sprossabschnitte wurden neben den Wurzeln und Blütenständen auf ihren Cadmiumgehalt hin untersucht. Abbildung 3.58 gibt die Cadmiumgehalte in den einzelnen Organen bzw. in verschiedenen Sprossabschnitten wieder.

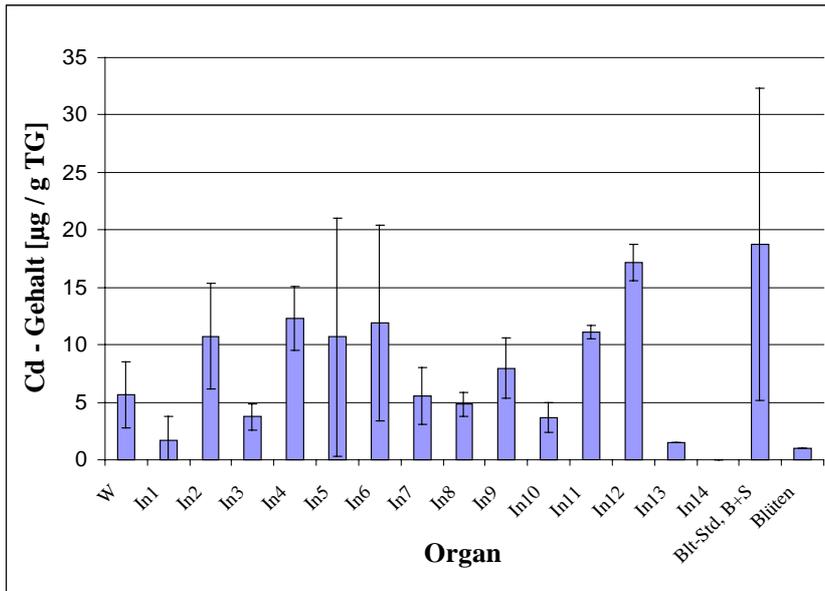


**Abb. 3.56:** Hanfpflanzen, angezogen auf dem im Freilandversuch verwendeten Areal, 80 Tage nach der Aussaat



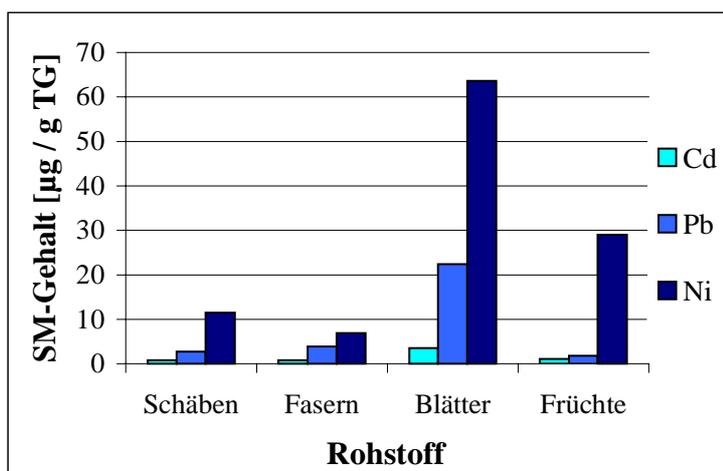
**Abb. 3.57:** Unterteilung des Sprosses der Hanfpflanzen in Abschnitte

In biologischen Proben lassen sich generell große Varianzen in den zu bestimmenden Parametern beobachten. Dieses gilt auch für die hier untersuchten Schwermetallgehalte (Abb. 3.58). Die 8 untersuchten Pflanzen wiesen im Abschnitt IN5  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte zwischen 0,3 und 20,9  $\mu\text{g/g}$  TG auf. Dieses entspricht einer Standardabweichung von 97 % vom errechneten Mittelwert. Dagegen ergab sich für IN11 nur eine Standardabweichung von 5 % vom Mittelwert. Isolierte Blüten wiesen den geringsten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt auf (0,9  $\mu\text{g/g}$  TG). Der höchste  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt (18,7  $\mu\text{g/g}$  TG) wurde im gesamten Blütenstand nachgewiesen. Die einzelnen Sprossabschnitte unterschieden sich in ihrem  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt um das 10,6-fache.



**Abb. 3.58:** Relative Cd<sup>2+</sup>-Gehalte in verschiedenen Abschnitten von Hanfpflanzen, angezogen auf Cd<sup>2+</sup>-belastetem Boden (Kap. 2.2.5), n = 8

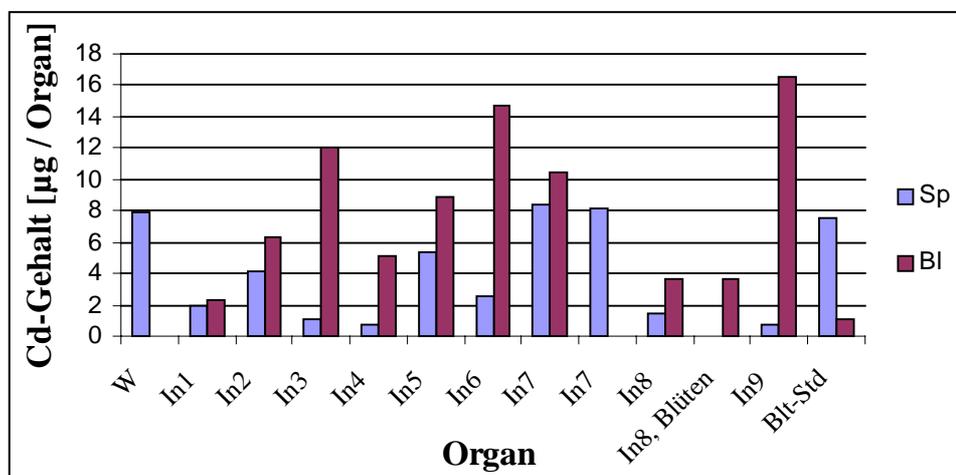
Dabei ergaben sich für IN1 und IN13 der geringste (1,6 µg/g TG) und für IN12 der höchste Cd<sup>2+</sup>-Gehalt (17,1 µg/g TG). In Abb. 3.59 sind die Cd<sup>2+</sup>-Gehalte dargestellt, die sich in den als Rohstoffe verwertbaren Pflanzenteilen nachweisen ließen. Dazu wurden 100 Hanfpflanzen 100 Tage nach der Aussaat geerntet und nach industriellem Verfahren aufbereitet. Die Blätter und Früchte wurden vor der Fasergewinnung (Röste) abgetrennt. Nach erfolgter Röste wurden die Cd<sup>2+</sup>-, Pb<sup>2+</sup>- bzw. Ni<sup>2+</sup>-Gehalte in den verschiedenen Rohstoffen bestimmt.



**Abb. 3.59:** Schwermetallgehalte in verschiedenen Rohstoffen aus Hanf, angezogen auf schwermetallbelastetem Boden (Kap. 2.2.5), (Bestimmung durchgeführt von J. Müssig, Faserinstitut Bremen)

Die in Abb. 3.59 dargestellten Schwermetallgehalte stellen Mittelwerte aus 100 Pflanzen dar. Wie oben bereits beschrieben wurde, muss jedoch von einer erheblichen Varianz der Gehalte in den einzelnen Pflanzen ausgegangen werden. In den Blättern ( $3,5 \mu\text{g/g TG}$ ) wurden 4,4-mal höhere  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte als in den Fasern nachgewiesen ( $0,8 \mu\text{g/g TG}$ ). Der  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehalt in den Blättern ( $22,4 \mu\text{g/g TG}$ ) betrug das 5,9-fache des  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehaltes in den Fasern ( $3,8 \mu\text{g/g TG}$ ). Der  $\text{Ni}^{2+}$ -Gehalt in den Blättern ( $63,6 \mu\text{g/g TG}$ ) war 9,2-fach so hoch wie der in den Fasern ( $6,9 \mu\text{g/g TG}$ ). Die in den untersuchten Rohstoffen gefundenen  $\text{Ni}^{2+}$ -Gehalte lagen deutlich über den  $\text{Cd}^{2+}$ - bzw.  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehalten. In den Blättern der geernteten Hanfpflanzen wurden 18,2-mal höhere Gehalte an  $\text{Ni}^{2+}$  als an  $\text{Cd}^{2+}$  gefunden, obwohl der Boden nur 4,1-mal soviel  $\text{Ni}^{2+}$  ( $419 \mu\text{g/g TG}$ ) wie  $\text{Cd}^{2+}$  ( $102 \mu\text{g/g TG}$ ) enthielt. Betrachtet man das Verhältnis der  $\text{Ni}^{2+}$ - und  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehalte in den Blättern der Hanfpflanzen, so konnten 2,8-mal höhere Gehalte an  $\text{Ni}^{2+}$  als an  $\text{Pb}^{2+}$  nachgewiesen werden. Der Boden war dagegen gleichmäßig mit  $\text{Ni}^{2+}$  ( $419 \mu\text{g/g TG}$ ) und  $\text{Pb}^{2+}$  ( $454 \mu\text{g/g TG}$ ) belastet.

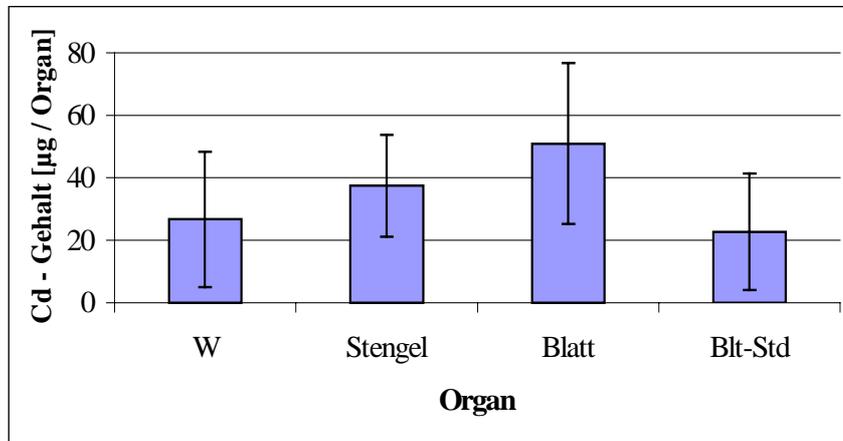
Die absoluten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in den Organen und Sprossabschnitten der betrachteten Hanfpflanzen sind in Abb. 3.60 dargestellt.



**Abb. 3.60:**  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte (absolut) in verschiedenen Abschnitten einer Hanfpflanze, angezogen auf  $\text{Cd}^{2+}$ -belastetem Boden (Kap. 2.2.5)

Die in der untersuchten Pflanze gefundenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte wichen in den einzelnen Abschnitten erheblich voneinander ab. In den Stengeln der untersuchten Sprossabschnitte wurden  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte zwischen  $0,7 \mu\text{g/Stengelabschnitt}$  (IN 9) und  $8,3 \mu\text{g/Stengelabschnitt}$  (IN 7) nachgewiesen. Dieser Wert entsprach dem 11,8-fachen des in IN 9 gefundenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes. Auch in den Blättern der untersuchten Sprossabschnitte konnten zum Teil erhebliche Unterschiede im  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt beobachtet werden. Die nachgewiesenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte lagen

zwischen 2,3  $\mu\text{g}/\text{Blätter}$  (IN 1) und 16,5  $\mu\text{g}/\text{Blätter}$  (IN 9). Die Blüten wiesen einen geringen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt auf (1,1  $\mu\text{g}/\text{Blüten}$ ). Abb. 3.61 gibt die mittleren, absoluten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in Organen von Hanfpflanzen wieder.



**Abb. 3.61:**  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte (absolut) in den Organen mehrerer Hanfpflanzen, angezogen auf  $\text{Cd}^{2+}$ -belastetem Boden (Kap. 2.2.5);  $n = 8$

Betrachtet man die mittleren absoluten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in verschiedenen Organen von Hanfpflanzen so wird deutlich, dass die Blätter die höchsten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte aufwiesen (Abb. 3.61). In den Blättern wurde 35 % mehr  $\text{Cd}^{2+}$  (50,9  $\mu\text{g}/\text{Gesamt-Blätter}$ ) gefunden als in den Stengeln (37,5  $\mu\text{g}/\text{Stengel}$ ). Die Wurzeln enthielten 52 % (26,7  $\mu\text{g}/\text{Wurzel}$ ) des in den Blättern nachgewiesenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes. Im Blütenstand wurden 44 % (22,8  $\mu\text{g}/\text{Blütenstand}$ ) des in Blättern nachgewiesenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes gefunden. Die oberirdischen Sprossabschnitte enthielten im Mittel das 4,1-fache (111,2  $\mu\text{g}/\text{Spross}$ ) des in den Wurzeln nachgewiesenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes.

Das Elutionsprofil thiolhaltiger Verbindungen (Kap. 2.4.2) aus Blättern 100 Tage alter Hanfpflanzen aus dem Freilandversuch (Kap. 2.2.5) ist in Abb. 3.62 dargestellt. Unter den verwendeten Bedingungen (Gradientenprogramm 1, Kap. 2.4.3, mit auf 30 Minuten verlängerter Laufzeit) wurde erwartet, dass Phytochelatine bzw. Phytochelatine-ähnliche Verbindungen im Bereich von 7 bis 18 min Retentionszeit eluierten (E. Püschel, Universität Halle-Wittenberg, persönliche Mitteilung). In diesem Bereich des Chromatogramms aus Blättern 100 Tage alter Hanfpflanzen ließen sich zwei schwache Peaks (8,63 min und 12,78 min) erkennen. Im Bereich  $> 17$  min Retentionszeit wurden mehrere Peaks bislang unbekannter Verbindungen gefunden.

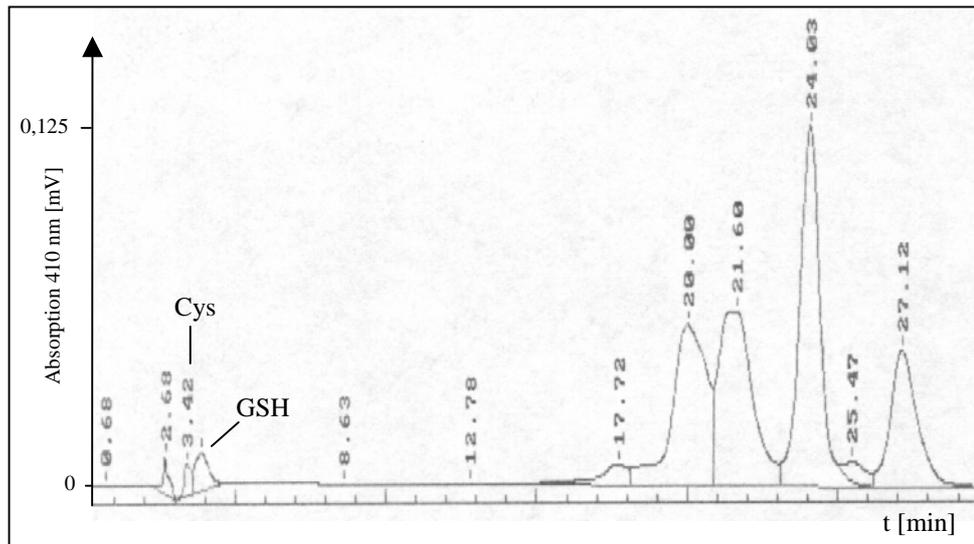


Abb. 3.62: Elutionsprofil thiolreicher Verbindungen aus Hanf-Blättern

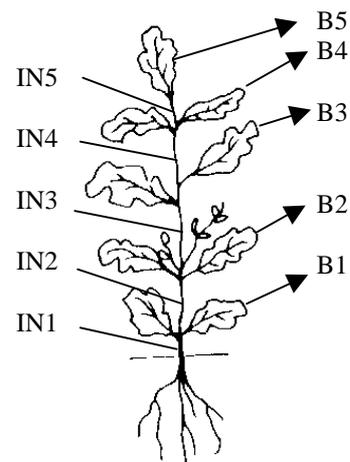
### 3.4.2 Akkumulation von Cadmium und Phytochelatinen in Rapspflanzen (*Brassica napus* L.)

Weltweit werden zahlreiche Ölpflanzen angebaut, die sich besonders in der Zusammensetzung der Fettsäuren ihrer Fette voneinander unterscheiden. Raps (Abb. 3.63) ist die am besten an deutsche Anbaubedingungen angepasste Ölpflanze. Erucasäurearme Rapssorten, wie die hier Verwendung findende Sorte Pronto, liefern ein hochwertiges Speiseöl (CMA, 1997). Die erucasäurereichen Rapssorten eignen sich dagegen zur Herstellung von Kunststoffen, Tensiden, Lacken und Pharmazeutika. Raps stellt damit einen der wichtigsten nachwachsenden Rohstoffe in Deutschland dar (CMA, 1997). Die Gehalte an Cadmium und die Akkumulation von Phytochelatinen in Rapspflanzen, die im Freilandversuch 100 Tage auf schwermetallbelastetem Boden angezogen wurden, sind im folgenden dargestellt.

Abbildung 3.64 gibt die Einteilung der oberirdischen Organe in einzelne Sprossabschnitte und die dazugehörigen Blätter, die zur Bestimmung des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes verwendet wurden, wieder.

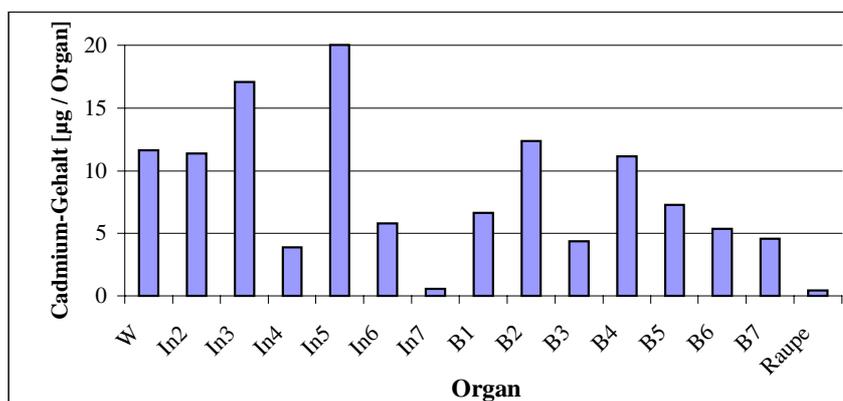


**Abb. 3.63:** Rapspflanzen, auf dem im Freilandversuch verwendeten Areal, 80 Tage nach der Aussaat



**Abb. 3.64:** Unterteilung des Sprosses der Rapspflanzen in Abschnitte und dazugehörige Blätter

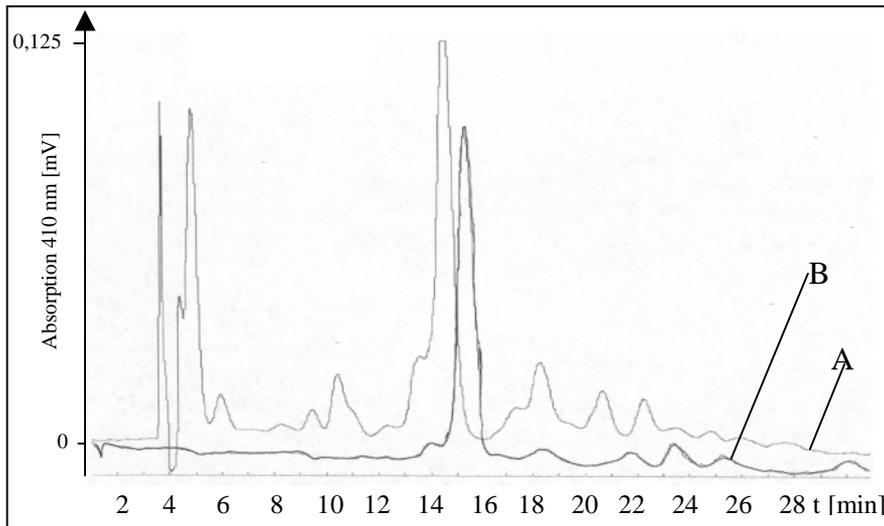
In Abb. 3.65 sind die absoluten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in verschiedenen Organen bzw. Sprossabschnitten der Rapspflanzen dargestellt. Zudem wurde der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in Larven der Kohlschabe (*Plutella maculipennis*), die sich von den Blättern der zu untersuchenden Rapspflanzen ernährten, bestimmt. Die in den untersuchten Pflanzen gefundenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte unterschieden sich in den einzelnen Abschnitten zum Teil erheblich.



**Abb. 3.65:**  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte (absolut) in verschiedenen Abschnitten von auf  $\text{Cd}^{2+}$ -belastetem Boden angezogen Rapspflanzen (Kap. 2.2.5);  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in Kohlschaben-Larven (*Plutella maculipennis*);  $n = 2$

In den Stengelabschnitten wurden  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte zwischen  $0,6 \mu\text{g}/\text{Stengelabschnitt}$  (IN 7) und  $20,0 \mu\text{g}/\text{Stengelabschnitt}$  (IN 5) nachgewiesen. Dieser Wert entsprach dem 33,3-fachen des in IN 7 gefundenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes. Die Blätter der Rapspflanzen wiesen geringere Unterschiede im  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt auf als die zugehörigen Stengelabschnitte. Die  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in den Blättern lagen

zwischen 4,3 µg/Blätter (B3) und 12,4 µg/Blätter (B2). Die untersuchten Kohlschaben-Larven wiesen einen geringen, jedoch deutlich nachweisbaren  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt von 0,4 µg/Larve auf. Die oberirdischen Sprossabschnitte enthielten insgesamt das 9,5-fache (110,4 µg/Spross) des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes in den Wurzeln (1,6 µg/Wurzel). Das Elutionsprofil thiolhaltiger Verbindungen (Kap. 2.4.2) aus Blättern 100 Tage alter Rapspflanzen aus dem Freilandversuch (Kap. 2.2.5 bzw. 3.4) ist in Abb. 3.66 dargestellt.



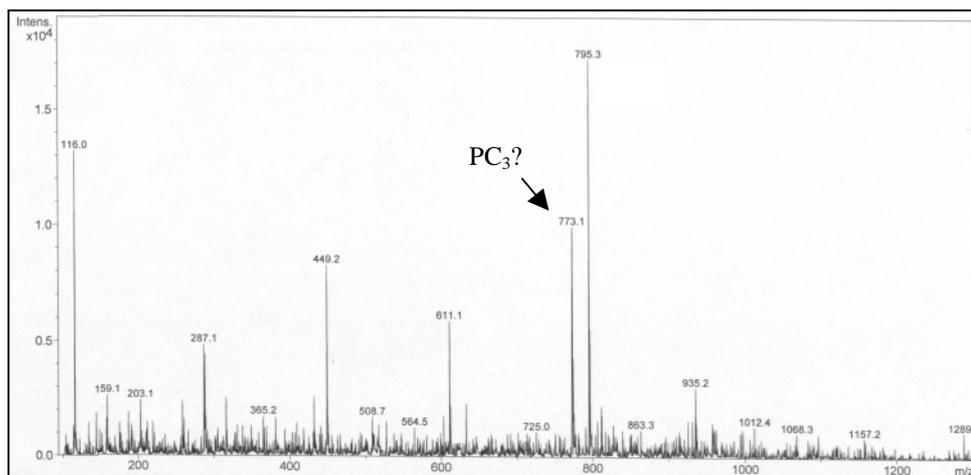
**Abb. 3.66:** Elutionsprofile thiolreicher Verbindungen aus Rapsblättern; A: Derivatisierung mit DTNB nach säulenchromatographischer Trennung; B: ohne Derivatisierung mit DTNB

Unter den verwendeten Bedingungen (siehe Kap. 3.4.1) wurde erwartet, dass Phytochelatine bzw. Phytochelatin-ähnliche Verbindungen im Bereich von 7 bis 18 min Retentionszeit eluieren. In diesem Bereich des Elutionsprofils (Abb. 3.66 A) aus Blättern 100 Tage alter Rapspflanzen waren 9 Peaks (4,47 min bis 17,32 min) zu beobachten. Im Bereich > 18 min Retentionszeit konnten zudem weitere Peaks bislang unidentifizierter Verbindungen nachgewiesen werden. Zudem wurde eine chromatographische Trennung des verwendeten Rapsblatt-Extraktes durchgeführt, bei der auf den Zusatz des Derivatisierungsreagenzes DTNB (Kap. 2.4.2) verzichtet wurde. Die Detektion erfolgte bei 410 nm (Abb. 3.66 B).

Vergleicht man die Elutionsprofile A und B (Abb. 3.66) miteinander, so wird deutlich, dass im Bereich bis 14 min Retentionszeit im Profil B keine Peaks, auch nicht Cystein oder Glutathion, nachzuweisen waren. Allgemein lässt sich sagen, dass die in Profil B nachgewiesenen Peaks eine wesentlich geringere Peakfläche zeigten als die Peaks in Profil A. Die Umrechnung der Peakflächen in GSH-Äquivalente erfolgte mittels einer GSH-Eichgerade. Auch der Peak mit der höchsten Peakfläche im Profil A (13,55 min, 306,64 µg GSH/g FG) zeigt im Profil B eine

wesentlich geringere Peakfläche (15,86 min, 70,79  $\mu\text{g/g}$  FG). Die ab 14 min Retentionszeit im Profil A auftretenden Peaks konnten zu einem großen Teil auch im Profil B nachgewiesen werden. Dieser Umstand legt den Schluss nahe, dass es sich bei diesen Peaks nicht um thiolreiche Verbindungen handelt, sondern um bislang nicht identifizierte Substanzen, die ebenfalls bei 410 nm absorbieren.

Die im Profil A bei 13,55 min und im Profil B bei 15,68 min angezeigte Verbindung, die die jeweils größte Peakfläche ergab, wurde massenspektrometrisch analysiert (Kap. 2.6.2). Die Isolierung der Verbindung erfolgte mittels Fraktionierung nach säulenchromatographischer Trennung (Kap. 2.6.1). Die isolierte Verbindung wurde zur Überprüfung der Fraktionierung erneut säulenchromatographisch analysiert. Dabei wurde ein Peak detektiert, der eine Retentionszeit von 15,33 min besaß. Die erhaltene Peakfläche entsprach 5,39  $\mu\text{g}$  GSH/g FG. Abb. 3.67 gibt das Massenspektrogramm der isolierten Verbindung wieder.

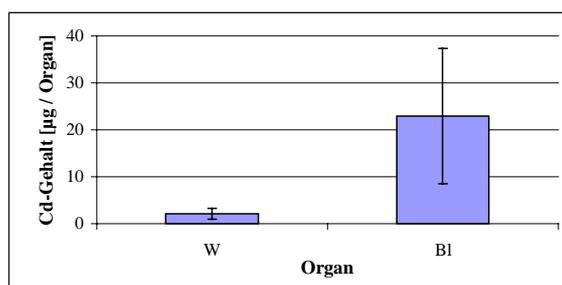


**Abb. 3.67:** Massenspektrogramm der bei 15,33 min eluierenden Verbindung aus Rapsblättern

Im Massenspektrogramm (Abb. 3.67) der bei 15,33 min eluierenden Verbindungen ließ sich ein Peak mit der Masse 773  $[\text{M}+\text{H}]^+$  nachweisen, bei dem es sich möglicherweise um  $\text{PC}_3$  handeln könnte. Andere Phytochelatine wurden in Rapsblättern jedoch nicht nachgewiesen. Sollte es sich bei dieser Verbindung um  $\text{PC}_3$  handeln, stellt sich die Frage, ob es sich bei den vor  $\text{PC}_3$  eluierenden Verbindungen um andere thiolreiche, möglicherweise phytochelatinähnliche Verbindungen handelt. Eine Identifizierung dieser Verbindungen und ein endgültiger Nachweis, dass es sich bei der bei 15,33 min eluierenden Verbindung um  $\text{PC}_3$  handelt, ist bislang nicht erfolgt.

### 3.4.3 Akkumulation von Cadmium und Phytochelatinen in Weizenpflanzen (*Triticum aestivum* L.)

Zu den wirtschaftlich wichtigsten Getreidearten, die in Deutschland zur Stärkegewinnung angebaut werden, gehört neben den Kartoffeln und dem Mais der Weizen. Das Kohlenhydrat Stärke ist ein wichtiger Nährstoff für den menschlichen und tierischen Organismus. Der nachwachsende Rohstoff Stärke spielt aber auch in der Industrie eine große Rolle. Stärke wird zur Herstellung von Papier, Chemikalien, Klebstoffen und neuerdings auch von kunststoffähnlichen Materialien eingesetzt (CMA, 1997). Die im Freilandversuch angebaute Weizenpflanzen zeigten gegenüber den im Gewächshaus angezogenen ein deutlich reduziertes Wachstum (Abb. 3.69). In Abb. 3.68 sind die absoluten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in Wurzeln und Blättern von Weizenpflanzen aus dem Freilandversuch dargestellt.

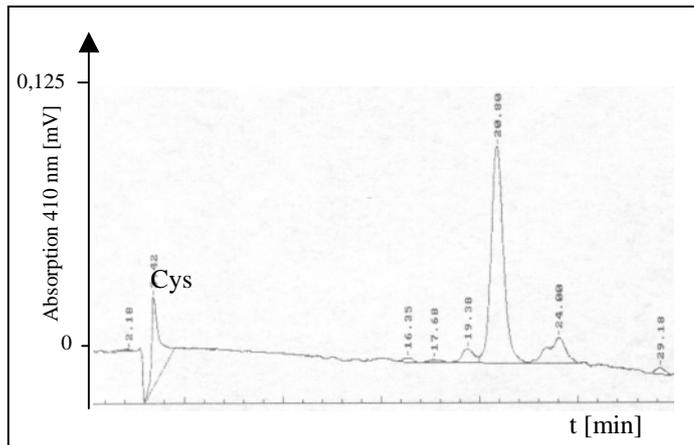


**Abb. 3.68:**  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte (absolut) in Organen von Weizenpflanzen, angezogen auf  $\text{Cd}^{2+}$ -belastetem Boden (Kap. 2.2.5);  $n = 4$



**Abb. 3.69:** Weizenpflanzen, auf dem im Freilandversuch verwendeten Areal, 80 Tage nach der Aussaat

Betrachtet man die mittleren absoluten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in verschiedenen Organen von Weizenpflanzen so zeigt sich, dass in den Blättern ( $22,9 \pm 14,4 \mu\text{g}/\text{Gesamt-Blätter}$ ) das 10,9-fache des in den Wurzeln ( $2,1 \pm 1,1 \mu\text{g}/\text{Wurzel}$ ) gefundenen absoluten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes nachgewiesen werden konnte. Das Elutionsprofil thiolhaltiger Verbindungen (Kap. 2.4.2) aus Blättern 100 Tage alter Weizenpflanzen aus dem Freilandversuch (Kap. 2.2.5) ist in Abb. 3.70 dargestellt.



**Abb. 3.70:** Elutionsprofil thiolreicher Verbindungen aus Weizenblättern

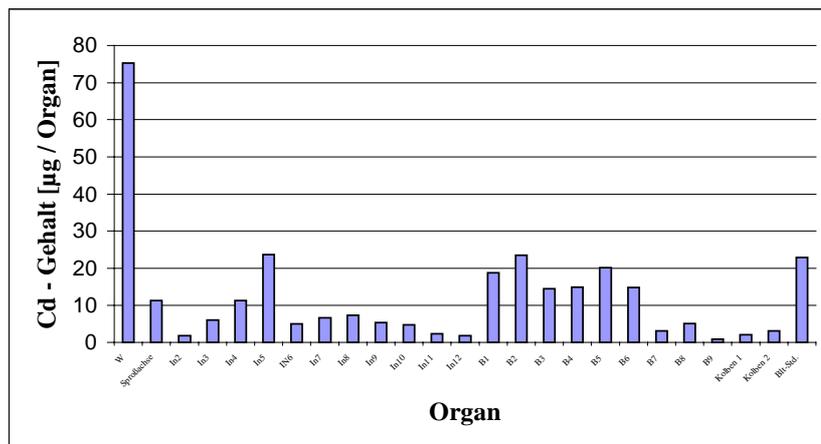
Im Elutionsprofil des Extraktes aus Weizenblättern (Abb. 3.70) traten im relevanten Bereich von 7 bis 18 min Retentionszeit nur 2 Peaks auf (16,25 und 17,68 min). Wie auch in den Proben aus Hanf- bzw. Rapsblättern wurden in den Extrakten aus Weizenblättern im Bereich < 18 min Retentionszeit Peaks bislang nicht identifizierbarer Verbindungen nachgewiesen.

### 3.4.4 Akkumulation von Cadmium in Maispflanzen (*Zea mays* L.)

Der mengenmäßig bedeutendste Stärkelieferant in Deutschlands ist der Mais (Abb. 3.71). Ebenso wie die Stärke aus Weizen oder Kartoffeln stellt die aus Mais gewonnene Stärke einen vielseitigen Rohstoff dar, der zur Herstellung von Baustoffen, Papier, kunststoffähnlichen Materialien, und Pharmazeutika verwendet wird (Fachagentur nachwachsende Rohstoffe, 1998). Abb. 3.72 gibt die absoluten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in den einzelnen Organen bzw. Sprossabschnitten mit den dazugehörigen Blättern wieder.



**Abb. 3.71:** Maispflanze (Center for Agroecology and Sustainable Food Systems, University of California, Santa Cruz)



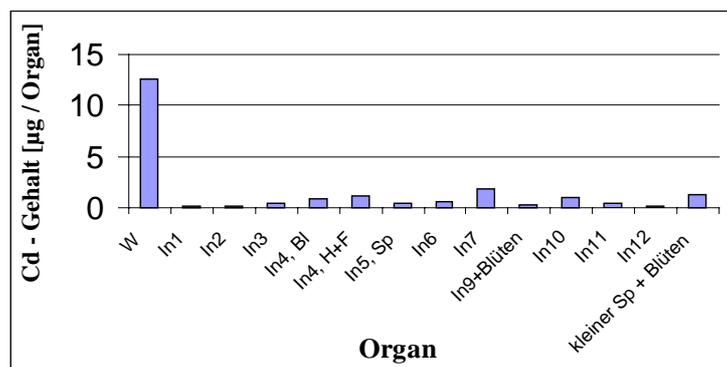
**Abb. 3.72:** Cd<sup>2+</sup>-Gehalte (absolut) in verschiedenen Abschnitten aus Maispflanzen, angezogen auf Cd<sup>2+</sup>-belastetem Boden (Kap. 2.2.5)

Die höchsten Cd<sup>2+</sup>-Gehalte wurden in den Wurzeln (75,3 µg/Wurzel) der im Freiland angezogenen Maispflanzen nachgewiesen (Abb. 3.72). Die Cd<sup>2+</sup>-Gehalte in den verschiedenen Stengelabschnitten wichen mit Werten zwischen 1,9 µg/Stengelabschnitt (IN2) und 23,7 µg/Stengelabschnitt (IN5) deutlich voneinander ab. Im Mittel enthielten die Stengelabschnitte  $7,3 \pm 6,1$  µg Cd<sup>2+</sup>/Stengelabschnitt. Die höchsten Cd<sup>2+</sup>-Gehalte in den Blättern wurden in Blatt 2 (B2: 23,5 µg/Blätter) gefunden. Im Mittel betrug der Cd<sup>2+</sup>-Gehalt in den Blättern  $12,8 \pm 7,9$  µg Cd<sup>2+</sup>. Auch in den Kolben ( $2,7 \pm 0,8$  µg Cd<sup>2+</sup>/Kolben) und in den Blütenständen (22,8 µg Cd<sup>2+</sup>/Blütenstand) der Maispflanzen konnte Cd<sup>2+</sup> nachgewiesen werden. Insgesamt enthielten die Stengelabschnitte 87,6 µg Cd<sup>2+</sup>/Stengel. In den Blättern wurden in der Summe 115,7 µg Cd<sup>2+</sup>/Gesamt-Blätter gefunden, in den Kolben ein Cd<sup>2+</sup>-Gehalt von 5,3 µg/Gesamt-Kolben. Die oberirdischen Organe der Maispflanzen enthielten damit das 3,1-fache (231,4 µg/Spross) des Cd<sup>2+</sup>-Gehaltes der Wurzeln. Eine Analyse der thiolreichen Verbindungen wurde für Maisblätter nicht durchgeführt.

### 3.4.5 Akkumulation von Cadmium und Phytochelatinen in Kamillepflanzen (*Matricaria inodora* L.)

Auf dem im Freilandversuch verwendeten Areal wuchsen neben den ausgebrachten Nutzpflanzen Hanf, Raps, Weizen und Mais auch verschiedene Wildpflanzen, darunter die Geruchlose Kamille (Abb. 3.74). Die Geruchlose oder Falsche Kamille wächst in Mitteleuropa von den Niederungen bis in Gebirgslagen auf Feldern, Schuttplätzen und an Wegrändern

(Pflanzen und Kräuter, 1987). Die Geruchlose Kamille kann nicht als nachwachsender Rohstoff eingestuft werden. Dennoch ist es von Interesse, die Aufnahme von  $\text{Cd}^{2+}$  durch die Pflanzen zu untersuchen, da sie in größeren Beständen auf dem belasteten Areal zu finden waren und demnach eine gewisse Toleranz gegen Schwermetalle wie Cadmium besitzen müssen. Abbildung 3.73 gibt die absoluten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in verschiedenen Organen und Sprossabschnitten der Kamillepflanzen wieder.

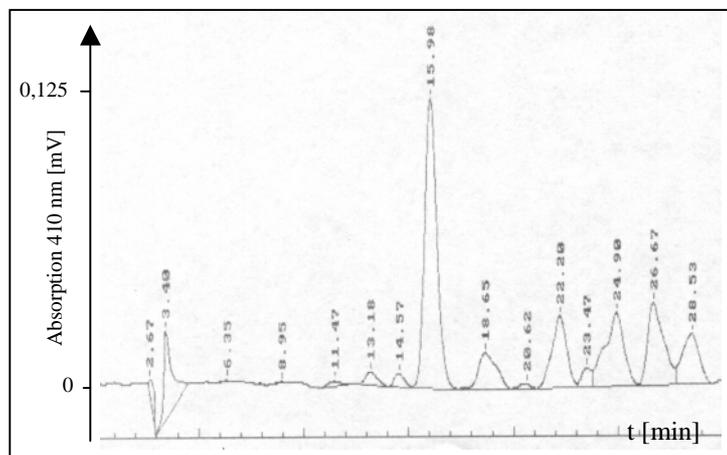


**Abb. 3.73:**  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte (absolut) in verschiedenen Abschnitten aus Kamillepflanzen, gewachsen auf  $\text{Cd}^{2+}$ -belastetem Boden (Kap. 2.2.5)



**Abb. 3.74:** Geruchlose Kamille (*Matricaria inodora* L.)

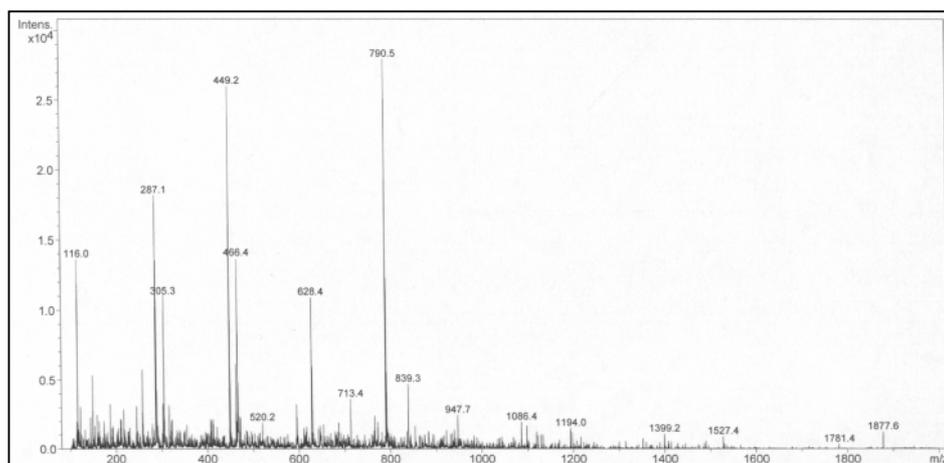
Die höchsten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte wurden in den Wurzeln ( $12,6 \mu\text{g}/\text{Wurzel}$ ) der Kamillepflanzen beobachtet (Abb. 3.73). Die  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in den verschiedenen Stengelabschnitten schwankten stark und lagen zwischen  $0,1 \mu\text{g}/\text{Stengelabschnitt}$  (IN1, 2 und 12) und  $1,8 \mu\text{g}/\text{Stengelabschnitt}$  (IN7). Im Mittel wurden  $0,6 \pm 0,5 \mu\text{g Cd}^{2+} / \text{Stengelabschnitt}$  gefunden. Die mittleren  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in den Blütenständen betragen  $0,8 \pm 0,5 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{Blütenstand}$ . Die Wurzeln der Kamillepflanzen enthielten das 1,5-fache des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes in den oberirdischen Organen ( $8,2 \mu\text{g}/\text{Spross}$ ).



**Abb. 3.75:** Elutionsprofil thiolreicher Verbindungen aus Blättern der Geruchlosen Kamille

Das Elutionsprofil thiolhaltiger Verbindungen (Kap. 2.4.2) aus Blättern der Geruchlosen Kamille ist in Abb. 3.75 dargestellt. Im Elutionsprofil traten verschiedene Peaks auf, die Retentionszeiten im relevanten Bereich zwischen 7 und 18 min aufwiesen. Der dominante Peak besaß eine Retentionszeit von 15,9 min. Es wurden aber auch mehrere Peaks mit Retentionszeiten > 18 min detektiert.

Da die im Retentionsbereich > 18 min auftretenden Peaks auch in Extrakten aus Blättern der Geruchlosen Kamille und den anderen untersuchten Pflanzenarten nachgewiesen werden konnten, wurde der Peak mit der größten Peakfläche (21,2 min) massenspektrometrisch analysiert. Die Isolierung dieser Verbindung erfolgte durch Fraktionierung nach erfolgter säulenchromatographischen Trennung (Kap. 2.6.1). Die isolierte Verbindung wurde zur Überprüfung der Fraktionierung säulenchromatographisch (HPLC) analysiert. Dabei wurde ein Peak detektiert, der eine Retentionszeit von 21,44 min besaß. Die erhaltene Peakfläche entsprach 7,18 µg GSH/g FG. Abbildung 3.76 gibt das Massenspektrogramm der isolierten Verbindung wieder.

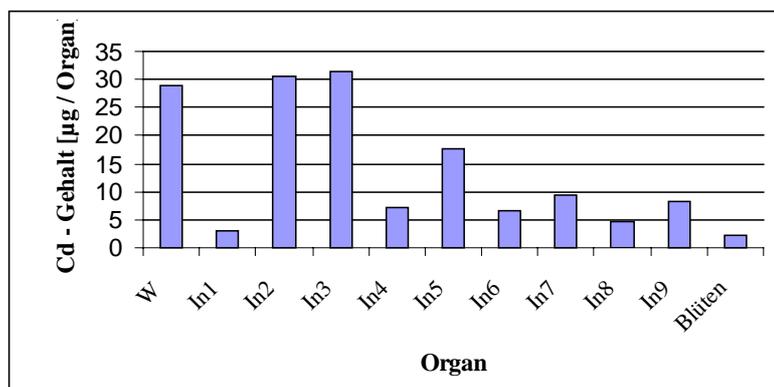


**Abb. 3.76:** Massenspektrogramm der bei 21,44 min eluierenden Verbindung aus Wurzeln der Geruchlosen Kamille

Im Massenspektrogramm (Abb. 3.76) der bei 21,44 min eluierenden Verbindungen ließ sich keiner der nachgewiesenen Massenpeaks einer bislang in Elutionsprofilen thiolreicher Verbindungen auftretenden Verbindung oder dem Fragment einer Verbindung zuordnen. Eine Identifizierung dieser Verbindungen könnte mit Hilfe anderer Methoden (NMR oder Tandem-MS) erfolgen, wurde aber im Rahmen dieser Dissertation nicht durchgeführt.

### 3.4.6 Akkumulation von Cadmium und Phytochelatinen in Springkrautpflanzen (*Impatiens glandulifera* Royle)

Auf dem in Ufernähe der Volme liegenden Areal wuchsen neben der Geruchlosen Kamille noch andere Wildpflanzen, darunter das Drüsige Springkraut (Abb. 3.78). Das Drüsige Springkraut wächst in Mitteleuropa vor allem an Bachufern und in Auwäldern (Schmeil und Fitschen, 1968). Die Aufnahme von  $\text{Cd}^{2+}$  durch die Pflanzen war von Interesse, da sie in größeren Beständen auf dem belasteten Areal zu finden waren, dort eine Höhe von bis zu 2 m erreichten und demnach, wie die Geruchlose Kamille, eine gewisse Toleranz gegen Schwermetalle wie Cadmium besitzen müssen. Abbildung 3.77 gibt die absoluten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in verschiedenen Organen und Sprossabschnitten der Springkrautpflanzen wieder.

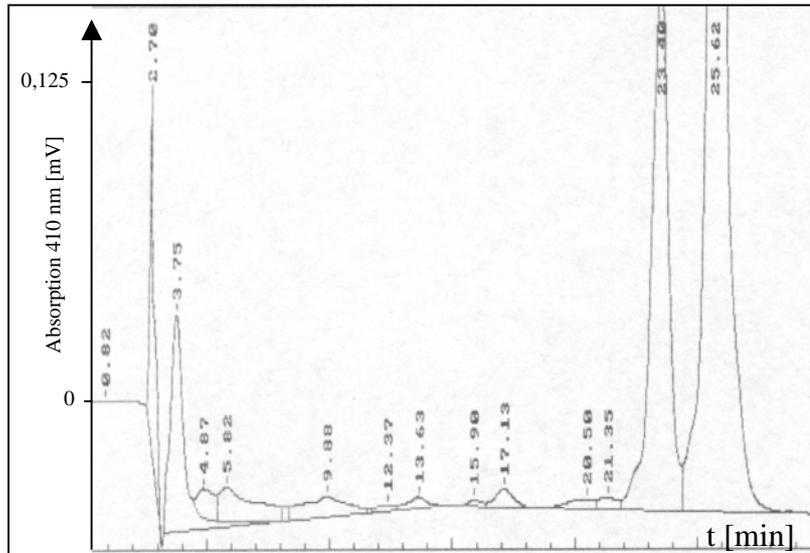


**Abb. 3.77:**  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte (absolut) in Springkrautpflanzen, gewachsen auf  $\text{Cd}^{2+}$ -belastetem Boden (Kap. 2.2.5)



**Abb. 3.78:** Drüsiges Springkraut, auf dem im Freilandversuch verwendeten Areal

Die höchsten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in Springkrautpflanzen wurden nicht in den Wurzeln ( $28,8 \mu\text{g}/\text{Wurzel}$ ; Abb. 3.77), sondern im Sprossabschnitt IN3 ( $31,4 \mu\text{g}/\text{Sprossabschnitt}$ ) gemessen. Die  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in den verschiedenen Sprossabschnitten (einschließlich der Blätter) schwankten stark und lagen zwischen  $2,9 \mu\text{g}/\text{Sprossabschnitt}$  (IN1) und  $31,4 \mu\text{g}/\text{Sprossabschnitt}$  (IN3). Im Mittel wurden  $13,2 \pm 10,9 \mu\text{g} \text{Cd}^{2+}/\text{Sprossabschnitt}$  in den Sprossabschnitten bestimmt. Der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den Blüten betrug  $2,3 \mu\text{g}/\text{Blüten}$ . Die oberirdischen Organe enthielten das 4,2-fache ( $120,8 \mu\text{g}/\text{Spross}$ ) des in den Wurzeln nachgewiesenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes. Das Elutionsprofil thiolhaltiger Verbindungen (Kap. 2.4.2) aus Blättern des Drüsigen Springkrautes ist in Abb. 3.79 dargestellt.

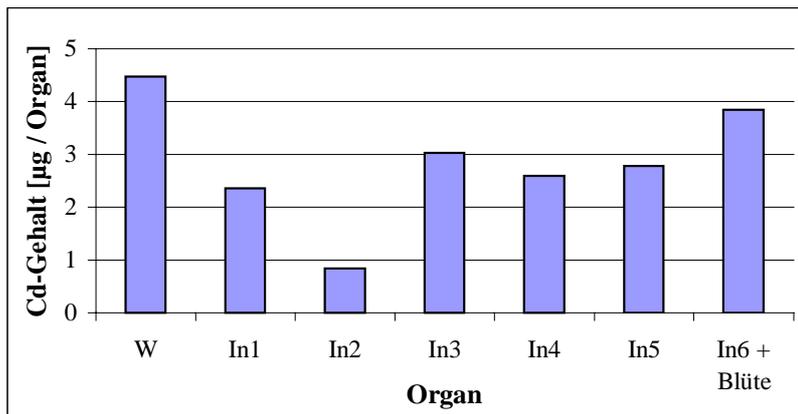


**Abb. 3.79:** Elutionsprofil thiolreicher Verbindungen aus Blättern des Drüsiges Springkrautes

Im Elutionsprofil von Extrakten aus Blättern des Drüsiges Springkrautes (Abb. 3.79) traten verschiedene Peaks auf, die Retentionszeiten im relevanten Bereich zwischen 7 und 18 min aufwiesen. Zudem wurden 4 Peaks mit Retentionszeiten  $> 18$  min gefunden. Der dominante Peak besaß eine Retentionszeit von 25,6 min. Eine Identifikation dieser Verbindungen ist bislang nicht erfolgt.

### **3.4.7 Akkumulation von Cadmium und Phytochelatinen in Brennesselpflanzen (*Urtica dioica* L.)**

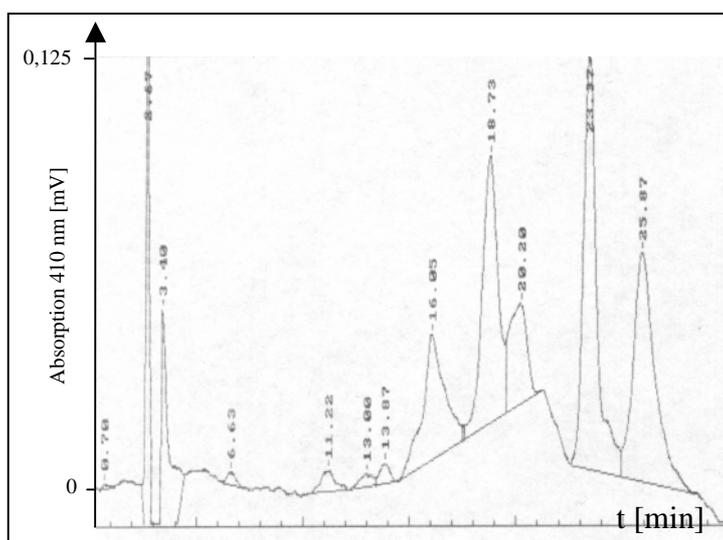
Auf dem im Freilandversuch mit Klärschlamm gedüngten Areal ließ sich eine größere Population der Großen Brennessel (Abb. 3.81) finden. Die Große Brennessel bildet vor allem auf stark gedüngten Böden größere Bestände und besitzt eine gute Toleranz gegen die im Boden vorhandenen hohen Schwermetallkonzentrationen. Die jungen Blätter der Brennessel sind besonders reich an Vitamin C, organischen Säuren (z. B. Ameisensäure), Provitamin A und Pantothenensäure und können als Gemüse gekocht und gegessen werden (Pflanzen und Kräuter, 1987). Abb. 3.80 gibt die absoluten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in verschiedenen Organen und Sprossabschnitten der Brennesselpflanzen wieder.



**Abb. 3.80:**  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte (absolut) in verschiedenen Abschnitten aus Brennnesselpflanzen, gewachsen auf  $\text{Cd}^{2+}$ -belastetem Boden (Kap. 2.2.5)

**Abb. 3.81:** Große Brennessel (*Urtica dioica* L.)

Die höchsten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte wurden in den Wurzeln ( $4,5 \mu\text{g}/\text{Wurzel}$ ) der im Freiland gewachsenen Brennnesselpflanzen nachgewiesen (Abb. 3.81). Der Sprossabschnitt IN2 zeigte den niedrigsten ( $0,8 \mu\text{g}/\text{Sprossabschnitt}$ ), der Sprossabschnitt IN6 einschließlich Blüte den höchsten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt ( $3,8 \mu\text{g}/\text{Sprossabschnitt}$ ). Im Mittel wurden  $2,5 \pm 0,9 \mu\text{g} \text{Cd}^{2+} / \mu\text{g} \text{Sprossabschnitt}$  in den Sprossabschnitten gemessen. Die oberirdischen Organe enthielten das 3,4-fache ( $15,3 \mu\text{g}/\text{Spross}$ ) des in den Wurzeln bestimmten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes. Das Elutionsprofil thiolhaltiger Verbindungen (Kap. 2.4.2) aus Blättern der Großen Brennessel ist in Abb. 3.82 dargestellt.



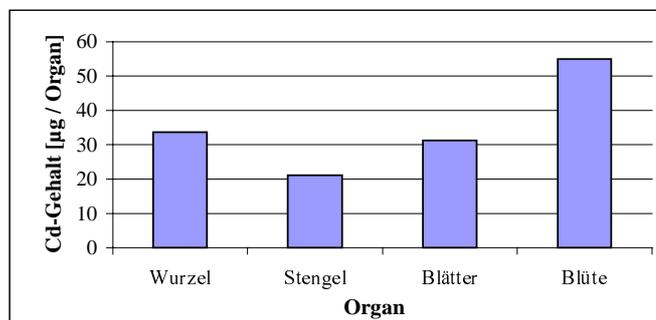
**Abb. 3.82:** Elutionsprofil thiolreicher Verbindungen aus Blättern der Großen Brennessel

Im Elutionsprofil von Extrakten aus Blättern der Großen Brennessel (Abb. 3.82) traten 5 Peaks mit Retentionszeiten im relevanten Bereich zwischen 7 und 18 min auf. Bei den Substanzen, die

den Peaks mit den Retentionszeiten 6,63 min, 11,22 min, 13,0 min, 16,05 min entsprechen, könnte es sich um thiolreiche Verbindungen, möglicherweise auch um Phytochelatine, handeln. Ebenso wie in den Elutionsprofilen der Proben aus anderen Pflanzenarten wurden mehrere Peaks mit Retentionszeiten  $> 18$  min gefunden. Der dominante Peak besaß eine Retentionszeit von 23,37 min. Eine Identifikation dieser Verbindungen erfolgte jedoch bislang nicht.

### 3.4.8 Akkumulation von Cadmium und Phytochelatinen in Ampferpflanzen (*Rumex crispus* L.)

Auf dem im Freilandversuch verwendeten mit Klärschlamm gedüngten Areal wuchsen neben den bisher beschriebenen Wildpflanzen auch verschiedene Ampferarten, darunter der Krause Ampfer (Abb. 3.84). Der Krause Ampfer ist eine Staude und wächst vor allem auf Schuttplätzen, Äckern und Wiesen. Die Wurzel enthält Anthrachinone, die als Heilmittel gegen Hauterkrankungen eingesetzt werden (Pflanzen und Kräuter, 1987). Abbildung 3.83 gibt die absoluten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in verschiedenen Organen und Sprossabschnitten der Ampferpflanzen wieder.



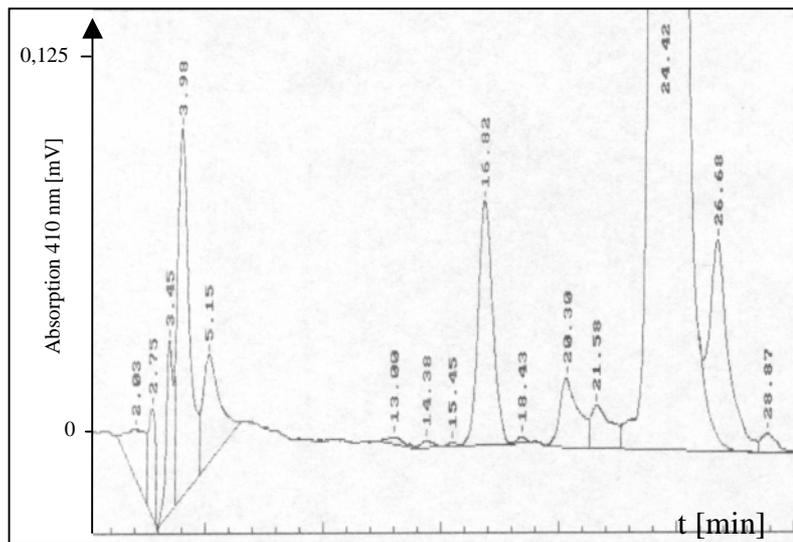
**Abb. 3.83:**  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte (absolut) in verschiedenen Abschnitten von Ampferpflanzen, gewachsen auf  $\text{Cd}^{2+}$ -belastetem Boden (Kap. 2.2.5);  $n = 2$



**Abb. 3.84:** Krauser Ampfer (*Rumex crispus* L.) auf dem im Freilandversuch verwendeten Areal

Die höchsten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte wurden in den Blüten ( $54,9 \mu\text{g}/\text{Blüten}$ ) der im Freiland gewachsenen Ampferpflanzen gemessen (Abb. 3.83). Die geringsten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte wiesen die blätterlosen Sprossbereiche ( $21,1 \mu\text{g}/\text{Stengel}$ ) auf. Die  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in den Blättern und Wurzeln lagen bei  $31,3$  bzw.  $33,6 \mu\text{g}/\text{Organ}$ . Die oberirdischen Organe enthielten das 3,2-fache ( $107,3 \mu\text{g}/\text{Spross}$ )

des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes der Wurzeln. Das Elutionsprofil thiolhaltiger Verbindungen (Kap. 2.4.2) aus Blättern des Krausen Ampfers ist in Abb. 3.85 dargestellt.

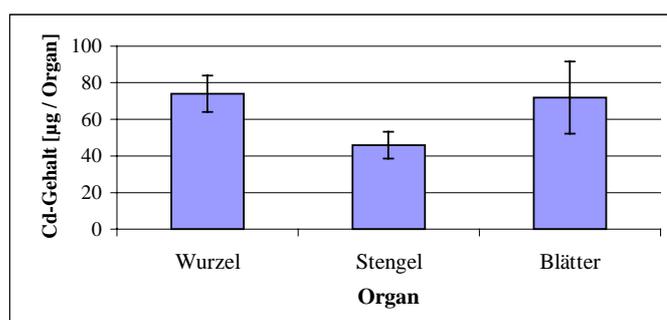


**Abb. 3.85:** Elutionsprofil thiolreicher Verbindungen aus Blättern des Krausen Ampfers

Im Elutionsprofil der Verbindungen aus Blättern des Krausen Ampfers (Abb. 3.85) traten unter Standardbedingungen 4 Peaks auf, die Retentionszeiten im relevanten Bereich zwischen 7 und 18 min aufwiesen. Ebenso wie in den Elutionsprofilen, die bei der Untersuchung der anderen Pflanzenarten erhalten wurden, gab es mehrere Peaks mit Retentionszeiten  $> 18$  min. Der dominante Peak mit einer Retentionszeit von 24,4 min und der größten Peakfläche (24,4 min: 1544,4  $\mu\text{g}$  GSH/g FG) wurde massenspektrometrisch weiter untersucht. Die Isolierung dieser Verbindung erfolgte durch Fraktionierung nach der säulenchromatographischen Trennung (Kap. 2.6.1). Die isolierte Substanz wurde zur Überprüfung der Fraktionierung säulenchromatographisch analysiert. Dabei wurde ein dominanter Peak detektiert, der eine Retentionszeit von 25,36 min besaß. Die erhaltene Peakfläche entsprach 52,04  $\mu\text{g}$  GSH/g FG. Im Massenspektrogramm, der bei 24,44 min eluierenden Verbindungen, konnte keiner der nachgewiesenen Massenpeaks einer bekannten Verbindung oder dem Fragment einer bekannten Verbindung zugeordnet werden.

### 3.4.9 Akkumulation von Cadmium und Phytochelatinen in Beinwellpflanzen (*Symphytum officinale* L.)

Der Gemeine Beinwell (Abb. 3.87) stellte die größte Population aller auf dem im Freilandversuch verwendeten Areal wachsenden Wildpflanzen dar. Der Gemeine Beinwell ist eine feuchtigkeitsliebende Staude, deren Wirkstoffe aus den Wurzeln oft zur Behandlung von Knochenbrüchen verwendet wurden (Pflanzen und Kräuter, 1987). Da die Beinwellpflanzen selbst die ausgebrachten Nutzpflanzen, mit Ausnahme der Hanfpflanzen, überwucherten, war es von Interesse, die Aufnahme von  $\text{Cd}^{2+}$  durch diese Pflanzen zu untersuchen, da ihnen dieser schwermetallbelastete Lebensraum scheinbar gute Wachstumsmöglichkeiten bot. Abbildung 3.86 gibt die absoluten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in verschiedenen Organen und Sprossabschnitten der Beinwellpflanzen wieder.



**Abb. 3.86:**  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte (absolut) in Beinwellpflanzen, gewachsen auf  $\text{Cd}^{2+}$ -belastetem Boden (Kap. 2.2.5); n = 3



**Abb. 3.87:** Gemeiner Beinwell, auf dem im Freilandversuch verwendeten Areal

In den Wurzeln der im Freiland gewachsenen Beinwellpflanzen wurde ein  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt von 74,0  $\mu\text{g}/\text{Wurzel}$  gefunden (Abb. 3.86). Im Stengel wurde ein  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt von 45,8  $\mu\text{g}/\text{Stengel}$ , in den Blättern ein  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt von 71,8  $\mu\text{g}/\text{Gesamt-Blätter}$  bestimmt. Die oberirdischen Organe der Beinwellpflanzen enthielten demnach das 1,6-fache (117,6  $\mu\text{g}/\text{Spross}$ ) des in den Wurzeln gefundenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes. Das Elutionsprofil thiolhaltiger Verbindungen (Kap. 2.4.2) aus Blättern des Beinwells ist in Abb. 3.88 dargestellt.

Im Elutionsprofil von Extrakten aus Blättern des Gemeinen Beinwells (Abb. 3.88) fanden sich mehrere Peaks mit Retentionszeiten im relevanten Bereich zwischen 7 und 18 min, die aber nicht als Phytochelatine identifiziert werden konnten. Zudem wurden Peaks mit Retentionszeiten > 18 min detektiert, die jedoch keine dominante Rolle spielten. Der dominante Peak besaß eine Retentionszeit von 13,55 min (306,6  $\mu\text{g}$  GSH/g FG).

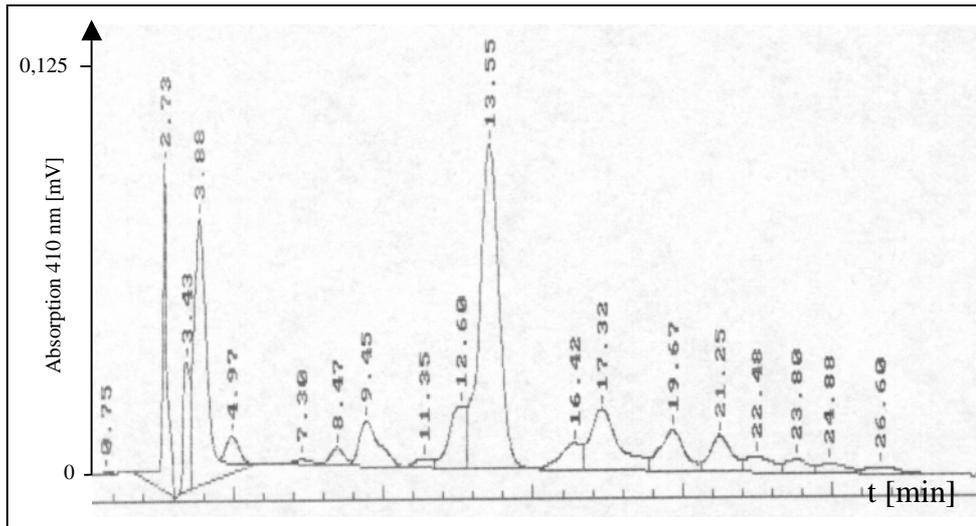


Abb. 3.88: Elutionsprofil thiolreicher Verbindungen aus Blättern des Gemeinen Beinwells

### 3.4.10 Vergleich der Cadmiumgehalte in verschiedenen Nutz- und Wildpflanzen

Vergleicht man die Summen der in den einzelnen Pflanzenarten nachgewiesenen absoluten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte, so ergibt sich das in Abb. 3.89 gezeigte Diagramm.

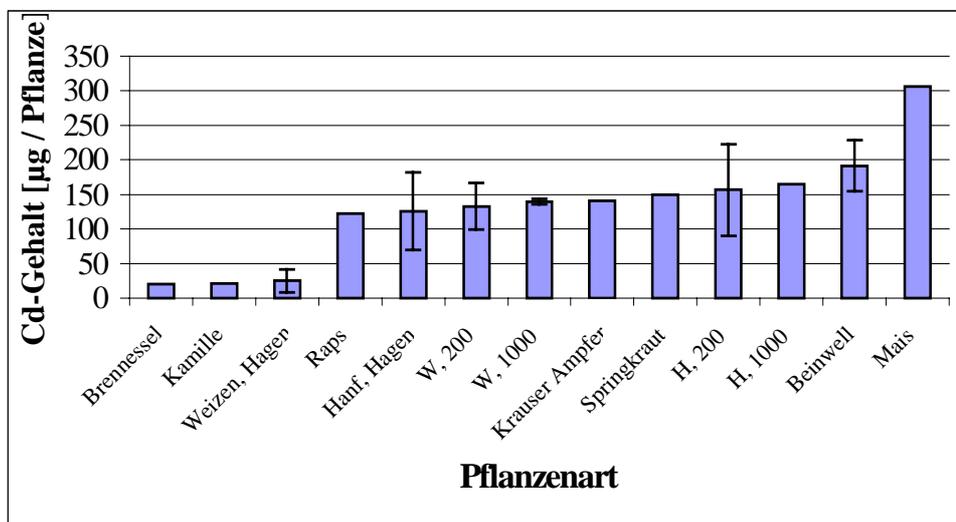


Abb. 3.89:  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in verschiedenen Nutz- und Wildpflanzen, gewachsen auf  $\text{Cd}^{2+}$ -belastetem Boden (Kap. 2.2.5)

Anhand der in Abb. 3.89 aufgetragenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte lassen sich die verschiedenen untersuchten Nutz- und Wildpflanzen anhand ihrer Fähigkeit,  $\text{Cd}^{2+}$  aus dem belasteten Boden aufzunehmen, in 5 Gruppen einteilen.

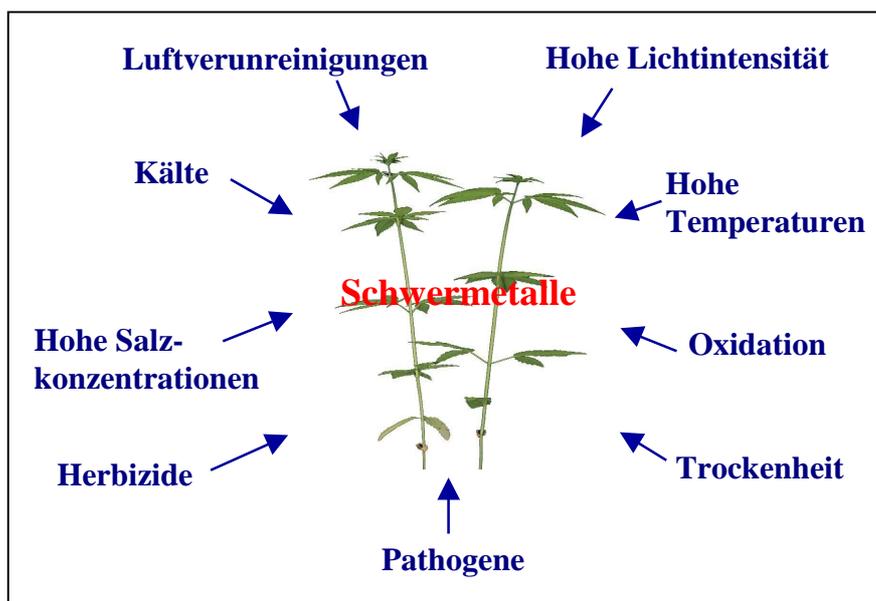
- 1: Große Brennessel (Hagen), Geruchlose Kamille (Hagen), Weizen (Hagen)
- 2: Raps (Hagen), Hanf (Hagen), Weizen (200  $\mu\text{M Cd}^{2+}$ ), Weizen (1000  $\mu\text{M Cd}^{2+}$ ), Krauser Ampfer (Hagen)
- 3: Drüsiges Springkraut, Hanf (200  $\mu\text{M Cd}^{2+}$ ), Hanf (1000  $\mu\text{M Cd}^{2+}$ )
- 4: Gemeiner Beinwell
- 5: Mais (Hagen)

Definiert man den im Mais (Hagen) nachgewiesenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt (307,0  $\mu\text{g/Pflanze}$ ) als 100 %, so akkumulierte der Gemeine Beinwell (Gruppe 4) 62,4 % des in Mais gefundenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes. Die Pflanzen in Gruppe 3 enthielten im Mittel 51,2 % (157,1  $\pm$  7,7  $\mu\text{g Cd}^{2+}$ /Pflanze) des in Mais bestimmten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes. In Gruppe 2 wurden 43,1 % (132,2  $\pm$  8,1  $\mu\text{g/Pflanze}$ ) dieses  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes gefunden. Die Pflanzen in Gruppe 1 zeigten mit 7,1 % den mit Abstand niedrigsten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt (21,9  $\pm$  2,6  $\mu\text{g/Pflanze}$ ). Erhebliche Unterschiede im  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt ließen sich zwischen den im Gewächshaus bzw. im Freilandversuch angezogenen Weizenpflanzen erkennen. Weizenpflanzen aus dem Gewächshaus (1000  $\mu\text{M Cd}^{2+}$ ) akkumulierten 5,6-mal (139,6  $\mu\text{g/Pflanze}$ ) mehr  $\text{Cd}^{2+}$  als die im Freilandversuch angezogenen Weizenpflanzen (24,9  $\mu\text{g/Pflanze}$ ). Zudem wurde im Freilandversuch, gegenüber dem Gewächshausversuch, ein stark verzögertes Wachstum der Weizenpflanzen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Ein großer Teil der Blätter des Freiland-Weizens zeigte eine gelbliche Färbung (Abb. 3.69), die auf den Beginn einer Nekrose schließen ließ. Zur Ausbildung von Ähren kam es im beobachteten Zeitraum nicht.

Dagegen zeigten sich zwischen im Gewächshaus (165,1  $\mu\text{g Cd}^{2+}$ /Pflanze) und im Freilandversuch angezogenen Hanfpflanzen (125,8  $\mu\text{g/Pflanze}$ ) nur geringe Unterschiede in der  $\text{Cd}^{2+}$ -Akkumulation. Die Hanfpflanzen aus dem Freiland zeigten ein schnelles Wachstum und machten einen sehr gesunden Eindruck. Bei einem Großteil der im Freiland angezogenen Hanfpflanzen kam es zur Ausbildung von Fruchtständen. Die Samenreife war ca. 110 Tage nach der Aussaat erreicht. Die anderen im Freilandversuch untersuchten Nutz- und Wildpflanzen wurden nicht zusätzlich im Gewächshaus angezogen. Der für Weizen- bzw. Hanfpflanzen durchgeführte Vergleich der  $\text{Cd}^{2+}$ -Akkumulation unter verschiedenen Anzuchtbedingungen war damit für sie nicht möglich. Aus den in Abb. 3.89 dargestellten Ergebnissen und den oben genannten Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die Hanfpflanzen mit den im Freilandversuch vorherrschenden Bedingungen deutlich besser zurechtkamen als die Weizenpflanzen.

## 4. Diskussion

In stark industrialisierten Gebieten, wie den Standorten der Stahlproduktion oder des Bergbaus in Deutschland, Polen oder Russland, lassen sich hohe Schwermetallgehalte im Boden nachweisen. Der zur Zeit am häufigsten praktizierte Weg dieses Problem zu lösen, beruht darauf, den belasteten Boden zu entfernen und durch unkontaminierte Erde zu ersetzen. Dieser vergleichsweise schnell durchführbare Prozess ist jedoch mit hohen Kosten verbunden (Saxena et al., 1999). Eine Alternative dazu bietet die Nutzung von Pflanzen zur partiellen Reinigung dieser Böden. Viele Pflanzen sind in der Lage, hohe Schwermetallgehalte aus dem Boden aufzunehmen, z. B. *Brassica juncea* oder *Thlaspi montanum*, bei denen es sich um einen sogenannten Nickel-Hyperakkumulator handelt (Baker, 1995; Brown et al., 1995; Chaney et al., 1995). Es ist bekannt, dass faserreiche Pflanzen wie Hanf auf schwermetallbelasteten Böden wachsen können (Kozłowski et al., 1995). Diese Pflanzen extrahieren Schwermetalle aus dem Boden (Theimer et al., 1997; Ostwald et al., 1999 a) und erreichen eine hohe Biomasse, die zur Energieerzeugung genutzt werden kann. Die Schwermetalle verbleiben zu einem Großteil in der Asche und können gelagert oder, wenn der Metallgehalt hoch genug ist, wiederverwertet werden (Chaney et al., 1995 b).



**Abb. 4.1:** Auf Pflanzen in der Umwelt einwirkende Stressfaktoren

Pflanzen sind in ihrer Umgebung vielen verschiedenen Stressarten ausgesetzt (Abb. 4.1). In der Phytoremediation von Schwermetallen zu verwendende Pflanzen wachsen im Normalfall nicht unter idealen Bedingungen, da sie neben den Schwermetallen auch anderen Stressfaktoren

ausgesetzt sind, z. B. Trockenheit oder Kälte. Aus diesem Grunde müssen die Pflanzen eine gewisse Toleranz gegenüber verschiedenen Stressfaktoren besitzen, um für einen Einsatz in der Phytoremediation in Frage zu kommen (Baker, 1981; Brunold, 1996). Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte neben der Aufnahme von Schwermetallen durch Hanfpflanzen und Hanfzellkulturen vor allem die physiologische Reaktion der Pflanzenzellen auf die aufgenommenen Schwermetalle untersucht werden. In erster Linie wurden die Versuche mit Zellkulturen im Labor bzw. Hanfpflanzen im Gewächshaus und nicht im Freiland durchgeführt, um die Beeinflussung der durch Schwermetallstress ausgelösten physiologischen Reaktionen durch andere Stressfaktoren zu begrenzen.

Es konnte gezeigt werden, dass Schwermetalle durch Inaktivierung von Enzymen den Tod von Pflanzenzellen herbeiführen können. In der Hauptsache geschieht dies durch Interaktionen mit metallsensitiven Gruppen wie Thiolen oder Histidinen, die sie katalytisch inaktivieren (Van Assche and Clijsters, 1990). Essentielle Mikronährstoffe wie Kupfer und Zink sind ebenfalls in der Lage, mit den SH-Gruppen der Proteine zu reagieren, wenn sie den optimalen Konzentrationsbereich überschreiten. Aus diesem Grunde haben Pflanzen und andere Organismen einige biochemische Mechanismen entwickelt, die eine Adaptation und Toleranz gegenüber Schwermetallionen ermöglichen (Rauser, 1995). Einige im Pflanzenreich universell vorkommende thiolreiche Peptide (Phytochelatine) stellen diese unmittelbare Reaktion der Pflanzen auf die intrazelluläre Schwermetallaufnahme dar (Grill et al., 1987; Gekeler et al., 1989; Rauser, 1990, 1993, 1995; Zenk, 1996). Die einfachste und schnellste Methode zum Nachweis von Phytochelatinen (PC's) ist die Trennung der thiolreichen Peptide mittels HPLC unter komplexdissoziierenden Bedingungen, kombiniert mit einer Nachsäulenderivatisierung der Thiolgruppen mit DTNB (Grill et al., 1991). Die Identifizierung der Verbindungen erfolgt dabei durch Vergleich der Retentionszeiten mit bereits charakterisierten Phytochelatinen oder durch Standardaddition gereinigter Phytochelatine. Bei ausschließlicher Analyse der PC's mittels HPLC ist es jedoch nahezu unmöglich, diese richtig in die bereits bekannten PC-Homologe einzuordnen (( $\gamma$ -EC)<sub>n</sub>-Gly, ( $\gamma$ -EC)<sub>n</sub>-Glu, ( $\gamma$ -EC)<sub>n</sub>- $\beta$ -Ala, ( $\gamma$ -EC)<sub>n</sub>-Ser, ( $\gamma$ -EC)<sub>n</sub>; Rauser, 1990, 1991). Daten von Bruns et al. (1999) zeigen, dass es sich bei den mittels HPLC nachgewiesenen Verbindungen, die bei für PC's charakteristischen Retentionszeiten eluierten, nicht unbedingt um PC's handelt. Im Wassermoos *Fontinalis antipyretica* wurde die Akkumulation von Phytochelatinen mittels Standardaddition nachgewiesen (Bruns et al., 1995). Eine dominante Rolle nahm dabei eine Verbindung ein, die die Retentionszeit des zugesetzten PC<sub>4</sub> aus Cd<sup>2+</sup>-resistenten Tomatenkulturen aufwies. Diese als PC<sub>4</sub> bezeichnete Verbindung aus *F. antipyretica* wurde mittels Massenspektrometrie und NMR charakterisiert. Es konnte gezeigt

werden, dass es sich nicht um ein Phytochelatin, sondern um die Verbindung 5,8-Dihydroxy-7-methoxy-coumaryl-5- $\beta$ -glucopyranosid handelte (Herr Dr. J. Miersch, pers. Mitteilung). Die biologische Bedeutung der Coumarine ist vielschichtig. Neben einer präinfektionalen und herbivoren Schutzwirkung hemmen Coumarine die Zellulosebiosynthese (Harborne, 1995; Hock and Elstner, 1995). Bislang wurde jedoch keine Induzierung der Coumarinsynthese durch Schwermetalle nachgewiesen. Um sicherstellen zu können, dass es sich bei den mittels HPLC nachgewiesenen Verbindungen um Phytochelatine handelt, ist es demnach notwendig, weitere Verfahren zur Charakterisierung dieser Verbindungen, z. B. Massenspektrometrie oder Aminosäure-Analyse, anzuwenden (Grill et al., 1986; Steffens et al., 1986; Rauser, 1991; Meuwly et al., 1995).

Um erste Hinweise auf die Akkumulation von Phytochelatinen in Hanf-Zellkulturen zu erhalten, wurden die Elutionsprofile saurer Extrakte von  $\text{Cd}^{2+}$ -resistenten Tomatenkulturen (Gupta and Goldsbrough, 1991) mit denen mit  $\text{Cd}^{2+}$ -Salzen im Anzuchtmedium gewachsenen Hanf-Zellkulturen unter gleichen Bedingungen aufgenommen und miteinander verglichen. Bei Untersuchungen zur Akkumulation von Phytochelatinen in den verwendeten Tomatenkulturen wurden von Gupta und Goldsbrough (1991) einige, bislang aber nicht identifizierte, Verbindungen im Elutionsprofil der Tomatenkulturen nachgewiesen. Gupta und Goldsbrough (1991) vermuteten, dass es sich bei diesen Verbindungen um Phytochelatin-Homologe, möglicherweise  $(\gamma\text{-EC})_n$ , handeln könnte, die auch in anderen Pflanzenarten nachweisbar waren (Grill et al., 1986; Klapheck et al., 1994; Meuwly et al., 1993, 1995). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Versuch unternommen werden, diese Verbindungen zu charakterisieren und in die bereits bekannte Reihe der Phytochelatin-Homologe einzuordnen.

#### 4.1 Induktion der Phytochelatinsynthese in Tomaten-Kalluskulturen

Die verwendeten  $\text{Cd}^{2+}$ -resistenten Tomatenkulturen wurden seit 10 Jahren kontinuierlich auf 2, 4 bzw. 6 mM  $\text{Cd}^{2+}$  im Medium angezogen (R2K, R4K, R6K; Gupta and Goldsbrough, 1991). Im Elutionsprofil von R6K ließ sich eine Vielzahl thiolreicher Verbindungen nachweisen (Kap. 3.1.1, Abb. 3.1), darunter  $\text{PC}_2$  bis  $\text{PC}_6$ . Howden et al. (1995 b) vermuteten, dass es sich bei den bislang nicht identifizierbaren Substanzen um PC-ähnliche Verbindungen handeln könnte. Wie bereits von Goldsbrough et al. (1995) beschrieben, war die Akkumulation der thiolreichen Peptide in den Tomaten-Zellkulturen von der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration im Medium abhängig. Dabei wurde eine Korrelation zwischen dem  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt im Medium und dem PC-Gehalt in den

Zellen beobachtet (2 mM Cd<sup>2+</sup>: 2019 nM PC/g FG; 6 mM Cd<sup>2+</sup>: 5603 nM PC/g FG; Kap. 3.1.1, Abb. 3.2). Diese für Tomaten-Zellkulturen gefundene Abhängigkeit der PC-Akkumulation von der Cd<sup>2+</sup>-Konzentration im Medium wurde auch für andere Pflanzen nachgewiesen (Grill et al., 1988; De Knecht et al., 1994; Ahner et al., 1994, 1995; Morel, 1995).

Die Zusammensetzung der Phytochelatine ist von verschiedenen Faktoren wie der Pflanzenart, der eingesetzten Schwermetallkonzentration und der Inkubationsdauer abhängig (Rauser, 1991). In Wurzeln von Maiskeimlingen stiegen in der Hauptsache die Gehalte an PC<sub>3</sub> und PC<sub>4</sub> mit steigender Cd<sup>2+</sup>-Konzentration an (Tukendorf and Rauser, 1990). Längere Phytochelatinketten erhöhen die Stabilität der Schwermetall-Bindung in den Cd<sup>2+</sup>-PC-Komplexen und damit die Effektivität der Schwermetall-Detoxifikation (Thumann et al., 1991; Mehra et al., 1995). In Cd<sup>2+</sup>-resistenten Tomatenkulturen wurden verstärkt höhere Phytochelatine bis PC<sub>6</sub> nachgewiesen (Gupta and Goldsbrough, 1991). Den Hauptanteil der Phytochelatine stellte in allen drei untersuchten Tomaten-Zellkulturen (R2K, R4K, R6K) jedoch PC<sub>4</sub> mit im Mittel 58,1 %. PC<sub>2</sub> wurde nur in geringen Konzentrationen gefunden (1,2 %; Kap. 3.1.1, Abb. 3.2). Es ist davon auszugehen, dass PC<sub>2</sub> unter den vorliegenden Bedingungen von den Zellen dazu verwendet wurde höhere PC's zu bilden, um die hohen Cd<sup>2+</sup>-Konzentrationen im Medium überleben zu können (Grill et al., 1987; Robinson et al., 1988; Meuwly and Rauser, 1992).

Den ersten Schritt zur Charakterisierung der unbekanntem Verbindungen aus R6K stellte die Anreicherung der Cd<sup>2+</sup>-PC-Komplexe mittels Säulenchromatographie auf einem Anionenaustauscher dar (Rauser, 1990; Gupta and Goldsbrough, 1991). Die angereicherten Phytochelatin-Komplexe wurden mittels HPLC getrennt und die jetzt Cd<sup>2+</sup>-freien thiolreichen Peptide isoliert (Kap. 3.1.2, Abb. 3.3, Abb. 3.4). Das Elutionsprofil der angereicherten PC-Fraktion zeigte im relevanten Bereich eine Vielzahl von Peaks mit den für Phytochelatine charakteristischen Retentionszeiten sowie einige der bislang nicht identifizierten Verbindungen. Andere Peaks konnten bei einer Wellenlänge von 220 nm nicht detektiert werden, was auf eine selektive Anreicherung der Cd<sup>2+</sup>-PC-Komplexe durch den Anionenaustauscher schließen lässt (Kap. 3.1.3, Abb. 3.5). Eine nachfolgend durchgeführte, massenspektrometrische Analyse der 10 isolierten Fraktionen ergab, dass es sich bei den Peaks 2, 4, 6, 8, 9 und 10 um die Phytochelatine PC<sub>2</sub> bis PC<sub>7</sub> handelte. Eine Identifizierung der bislang unbekanntem Verbindungen war mit Hilfe dieser Methode nicht möglich (Kap. 3.1.3, Tab. 3.1).

Eine im folgenden vorgenommene Aminosäure-Analyse der isolierten Fraktionen sollte zeigen, ob es sich auch bei den unbekanntem Verbindungen auch um thiolreiche Peptide handeln könnte.

Die Aminosäure-Analyse von Phytochelatinen aus Leguminosen ergab, dass nur Glu, Cys und eine nicht proteinogene Aminosäure ( $\beta$ -Ala) nachweisbar waren ( $(\gamma\text{-EC})_n$ - $\beta$ -Ala; Homo-PC's; Grill et al., 1986). In Phytochelatinen aus Mitgliedern der Familie *Poaceae* wurden Glu, Cys und Ser nachgewiesen ( $(\gamma\text{-EC})_n$ -Ser; Hydroxymethyl-PC's, Klapheck et al., 1994). Klapheck et al. (1994) konnten zeigen, dass die in *Poaceen* nachgewiesenen PC-Homologen  $(\gamma\text{-EC})_n$  und  $(\gamma\text{-EC})_n$ -Ser vor dem zugehörigen  $(\gamma\text{-EC})_n$ -Gly eluieren. Meuwly et al. (1995) fand nur Glu und Cys in Phytochelatinen aus *Zea mays*. Eine massenspektrometrische Untersuchung dieser Phytochelatine zeigte, dass in *Zea mays* neben PC-Homologen der Zusammensetzung  $(\gamma\text{-EC})_n$ -Gly und  $(\gamma\text{-EC})_n$  auch  $(\gamma\text{-EC})_n$ -Glu an der Schwermetall-Detoxifikation beteiligt ist. In allen 10 aus R6K isolierten Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie die Aminosäuren Cys, Glu, Ser und  $\beta$ -Ala nachgewiesen (Kap. 3.1.4, Abb. 3.7, Tab. 3.2). Die für Phytochelatine typische Aminosäure Glycin konnte unter den verwendeten Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Die Derivatisierung und anschließende Analyse der Aminosäuren in den 10 Fraktionen mittels GC-MS zeigte, dass in allen Fraktionen Cys, Glu und Gly den Hauptteil der Aminosäuren stellten. Ser und  $\beta$ -Ala konnten nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden und stellten wahrscheinlich Verunreinigungen durch andere Peptide dar (Kap. 3.1.4, Abb. 3.8, Tab. 3.3). Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den bislang nicht identifizierten Verbindungen aus Tomaten-Zellkulturen um thiolreiche Peptide handelt, die möglicherweise mit einem der bereits bekannten PC-Homologe (Meuwly et al., 1995) identisch sind.

Die endgültige Identifikation der bislang nicht einzuordnenden Thiolpeptide erfolgte mittels massenspektrometrischer Verfahren. Phytochelatine lassen sich gut mittels Massenspektrometrie untersuchen, da die Spektrogramme der Phytochelatine von ausgeprägten Molekül-Massenpeaks  $[M+H]^+$  und wenigen Fragment-Ionen dominiert werden. Dieser Umstand ist besonders darauf zurückzuführen, dass Phytochelatine nur wenige Protonierungsstellen aufweisen, die zur Abspaltung von Fragment-Ionen verwendet werden können (Meuwly et al., 1995). Rohextrakte von R6K-Kulturen wurden mittels LC-MS getrennt (Detektion bei 220 nm) und massenspektrometrisch analysiert. Mit Hilfe dieser vergleichsweise neuen Methode wurden neben  $\text{PC}_2$  bis  $\text{PC}_7$  auch  $\text{PC}_8$  nachgewiesen (Kap. 3.2.6, Abb. 3.28), was in vorangegangenen Untersuchungen nicht möglich war (Gupta and Goldsbrough, 1991). Die Molekülmassen der bislang nicht identifizierten Verbindungen wurden bestimmt. Eine nachfolgende Charakterisierung einer Verbindung mit der Masse 875 (Kap. 3.2.6., Abb. 3.29, Abb. 3.30) mittels Tandem-MS, die zwischen  $\text{PC}_3$  und  $\text{PC}_4$  eluierte, ergab, dass es sich bei dieser

Verbindung um ein PC<sub>4</sub>-ähnliches Thiolpeptid handelte, dem die aminoternale Glutaminsäure fehlte (Ostwald et al., 1999). Die Nomenklatur der Fragmente (N-terminal: B<sub>n</sub>; C-terminal: Y''<sub>n</sub>) erfolgte nach Biemann (1990). Anhand der erhaltenen Daten lässt sich sagen, dass es sich bei den zwischen den PC's eluierenden Thiolpeptiden um eine neue Klasse von Phytochelatinen handelt, denen die aminoternale Glutaminsäure fehlt (Kap. 3.2.6, Tab. 3.5). Diesen Phytochelatin-Homologen mit der Struktur Cys-(γ-EC)<sub>n</sub>-Gly wurde der Name Cys-PC gegeben. Bislang wurden, wie bereits beschrieben, 5 Klassen von Phytochelatinen in verschiedenen Pflanzenarten nachgewiesen (Tab. 4.1), die sich alle in der C-terminalen Aminosäure unterscheiden (Rauser, 1999). Die in den Cd<sup>2+</sup>-resistenten Tomaten-Zellkulturen nachgewiesenen Cys-PC's stellen damit ein Novum unter den bislang bekannten Phytochelatin-Klassen dar, da sie sich nicht in der C-terminalen sondern der N-terminalen Aminosäure von den bislang bekannten Phytochelatinen unterscheiden.

Art	Autor	Klasse	Name
Höhere Pflanzen und Pilze	Grill et al., 1986	(γ-EC) <sub>n</sub> -Gly	Phytochelatine (PC)
<i>Glycine max</i>	Grill et al., 1986	(γ-EC) <sub>n</sub> -β-Ala	Homo-PC
<i>Oryza sativa</i>	Rauser and Meuwly, 1993	(γ-EC) <sub>n</sub>	DesGly-PC
<i>Oryza sativa</i>	Klapheck et al., 1994	(γ-EC) <sub>n</sub> -Ser	Hydroxymethyl-PC
<i>Zea mays</i>	Meuwly et al., 1995	(γ-EC) <sub>n</sub> -Glu	---
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Ostwald et al, 1999 a (eigene Daten)	Cys-(γ-EC) <sub>n</sub> -Gly	Cys-PC's

**Tab. 4.1:** Bislang bekannte Phytochelatin-Klassen, sowie in Tomaten-Kalluskulturen neu entdeckte Klasse von Phytochelatinen (Cys-PC's)

Da die Cys-PC's nur in Cd<sup>2+</sup>-resistenten Tomatenkulturen bzw. in Wildtyp-Kulturen von Tomaten gefunden wurden, die mehr als 7 Tage auf Cd<sup>2+</sup>-belastetem Medium angezogen wurden (Daten nicht gezeigt), könnte es sich bei diesen Phytochelatin-Homologen um Abbauprodukte handeln. Meuwly et al. (1995) fanden erste Hinweise darauf, dass das von Ihnen nachgewiesene PC-Homolog (γ-EC)<sub>n</sub>-Glu ein Phytochelatin-Abbauprodukt darstellt. Dazu würde eine γ-Glutamyl-Transpeptidase benötigt, da eine γ-Glu-Bindung am C-terminalen Ende der Phytochelatine geschlossen werden muss. Da davon ausgegangen werden kann, dass Cys-PC's, wie die anderen PC-Homologe, in der Lage sind Cd<sup>2+</sup> zu binden, ist es jedoch möglich, dass sie wie die PC's der Struktur (γ-EC)<sub>n</sub>-Gly an der Detoxifizierung von Cd<sup>2+</sup>, z.B. in der Vakuole, beteiligt sind.

## 4.2 Induktion der Phytochelatinsynthese in Hanf-Kalluskulturen

Bisher wurden Phytochelatine in mehr als 200 verschiedenen Pflanzenarten und Zellkulturen, auch in *Cannabis sativa* L., nachgewiesen (Gekeler et al., 1989). Die Synthese von Phytochelatinen in den untersuchten Pflanzen wurde in der Hauptsache durch Vergleich der Retentionszeiten mit gut charakterisierten Phytochelatinen einiger weniger Pflanzenarten und Zellkulturen belegt. Eine massenspektrometrische Überprüfung fand nicht statt. Die Abhängigkeit der PC-Akkumulation von der Schwermetall-Konzentration wurde von Gekeler et al. (1989) ebenfalls nicht untersucht.

Pflanzliche Zellkulturen stellen beliebte Modellsysteme zur Untersuchung der Reaktion von Zellen auf Schwermetalle dar, da sie weniger physiologische Parameter aufweisen als intakte Pflanzen (Rauser, 1990). In Zellkulturen verläuft die Induktion der PC's zumeist schneller als in ausdifferenzierten Pflanzen (Robinson et al., 1988). Generell lässt sich sagen, dass die Synthese von Phytochelatinen nur in schwermetallbelasteten Geweben induziert wird (Gekeler et al., 1989; Rauser, 1990). In Kontrollen von Tomaten- bzw. Hanf-Kalluskulturen wurden Cys, GSH und  $\gamma$ -EC, jedoch keine Phytochelatine nachgewiesen (Kap. 3.1.1, Abb. 3.1; Kap. 3.1.5, Abb. 3.9). Als physiologische Reaktion auf Schwermetalle im Anzuchtmedium konnten Phytochelatine in Hanf-Kalluskulturen mittels HPLC nachgewiesen werden (Kap. 3.1.5, Abb. 3.9). Die Induktion der Phytochelatinsynthese erfolgte durch mehrtägiges Wachstum der Kalluskulturen auf Medien, die  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen zwischen 2 und 6 mM enthielten. Es zeigte sich, dass die Akkumulation der Phytochelatine von der eingesetzten  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration abhing. Eine Verdoppelung der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration im Anzuchtmedium führte zu einer im Mittel 1,4-fachen Erhöhung des PC-Gehaltes in den Hanfzellen (Kap. 3.1.5, Abb. 3.10). Die für Hanf-Kalluskulturen nachgewiesene Abhängigkeit der PC-Synthese von der Schwermetall-Konzentration ist auch für andere Pflanzen bekannt (Grill et al., 1988 a; De Knecht et al., 1994; Ahner et al., 1994, 1995; Ahner and Morel, 1995). Daten anderer Autoren lassen sich jedoch aufgrund verschiedener Versuchsbedingungen (Inkubationsbedingungen, Extraktionsmethode, eingesetzte Schwermetall-Konzentration, Pflanzenart) nur bedingt mit den Ergebnissen aus Hanf-Kalluskulturen vergleichen.

Das Maximum der PC-Synthese in Hanf-Kalluskulturen wurde bei 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  im Medium erreicht (449 nM/g FG). Der maximale PC-Gehalt in Hanf-Kalluskulturen entsprach 1/12 des in  $\text{Cd}^{2+}$ -resistenten Tomaten-Kalluskulturen (R6K, 6 mM  $\text{Cd}^{2+}$ ) gefundenen maximalen PC-Gehaltes bei einem 30-fach niedrigerem  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt im Medium (Kap. 3.1.5, Abb. 3.10;

Kap. 3.1.1, Abb. 3.2). Möglicherweise nahmen die Hanfzellen das im Medium befindliche  $\text{Cd}^{2+}$  schneller auf als die Tomatenzellen, so dass eine vermehrte Synthese der PC's erforderlich war. Zudem ist bekannt, dass  $\text{Cd}^{2+}$ -resistente Tomatenkulturen das durch PC's komplexierte  $\text{Cd}^{2+}$  in die Vakuole transportieren und dort als  $\text{Cd}^{2+}$ - $\text{S}^{2-}$ -PC-Komplex lagern (HMW: high molecular weight complex; Rauser, 1999). Auf diese Weise werden dringend benötigte Aminosäuren aus den Phytochelatinen freigesetzt und für andere Aufgaben im Metabolismus wieder zur Verfügung gestellt (Gupta and Goldsbrough, 1991; Reese et al., 1992; Kneer and Zenk, 1997). Höhere  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen als 200  $\mu\text{M}$  im Medium führten zu einem deutlichen Rückgang des Wachstums und einer bräunlichen Färbung der ansonsten grünen Hanf-Kalluskulturen (Daten nicht gezeigt). Unter dem Einfluss steigender  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen stieg der extrahierbare GSH-Gehalt aus Hanf-Kalluskulturen um 42 % von 105 nM/g FG auf 148 nM/g FG an (Kap. 3.1.5, Abb. 3.10). Im Allgemeinen kommt es in Pflanzen zu einer signifikanten Abnahme des GSH-Gehaltes, die auf die Synthese von Phytochelatinen zurückführbar ist (Grill and Zenk, 1989; Rauser et al., 1991; Tukendorf and Rauser; 1990; Meuwly and Rauser, 1992; Gupta et al., 1995). Für einzelne Pflanzen ist jedoch unter Einfluss von Schwermetallen eine Zunahme des GSH-Pools nachgewiesen worden. In *Zea mays* stieg der GSH-Gehalt unter Einfluss von  $\text{Cu}^{2+}$  um 45 % an (Tukendorf and Rauser, 1990). Chen and Goldsbrough (1994) konnten in  $\text{Cd}^{2+}$ -resistenten Tomatenkulturen eine Zunahme des GSH-Gehaltes von 350 % nachweisen. Im Wassermoos *Fontinalis antipyretica* nahm der Gehalt an intrazellulärem GSH unter Einfluss von  $\text{Cd}^{2+}$  um 500 % zu (Bruns, 1998).

Art	Autor	GSH [nM/g FG]	Schwermetall
<i>Zea mays</i>	Tukendorf and Rauser (1990)	640	$\text{Cu}^{2+}$
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Chen and Goldsbrough (1991)	450	$\text{Cd}^{2+}$
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Howden et al. (1995 a)	250	$\text{Cd}^{2+}$
<i>Fontinalis antipyretica</i>	Bruns (1998)	1630	$\text{Cd}^{2+}$
<i>Cannabis sativa</i>	eigene Daten	148	$\text{Cd}^{2+}$

**Tab. 4.2:** GSH-Gehalte in verschiedenen Pflanzen unter dem Einfluss von Schwermetallen

Auch für tierische Zellen und Hefen wurde die Bildung von Schwermetall-GSH-Komplexen nachgewiesen (Dameron et al., 1989). Bruns (1998) konnte jedoch zeigen, dass die Bildung von  $\text{Cd}^{2+}$ -GSH-Komplexen in einem Gemisch aus  $\text{Cd}^{2+}$  und GSH spontan und deshalb auch während der Probenvorbereitung erfolgen kann. *In vitro* ließen sich  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen von GSH auf PC's übertragen (Mehra and Mulchandani, 1995). Für Pflanzen liegen aber nur wenige Hinweise auf

eine *in vivo* - Chelatisierung von Schwermetallen durch GSH vor.  $\text{Cd}^{2+}$ -PC-Komplexe aus *R. serpentina* enthielten neben verschiedenen PC's bis zu 3,7 % GSH (Strasdeit et al., 1993). Es ist vorstellbar, dass GSH als erste Reaktion auf in die Zelle gelangende Schwermetalle zur Chelatisierung oder zum Transport auf PC's eingesetzt wird. Der Vorteil einer Komplexierung durch GSH anstatt durch Phytochelatine scheint jedoch gering, da die Effektivität der Detoxifikation von Schwermetallen durch GSH im Vergleich zu PC's 1000-fach geringer ist und die PC-Synthese durch Schwermetallionen unmittelbar nach ihrem Eintritt in die Zelle induziert wird (Kneer and Zenk, 1992). Die in Hanf-Kalluskulturen nachgewiesenen erhöhten GSH-Gehalte lassen eine Beteiligung von GSH an der Chelatisierung von  $\text{Cd}^{2+}$  aber möglich erscheinen. GSH ist in Pflanzen an einer Vielzahl weiterer Prozesse beteiligt, die dem Schutz der Pflanze vor schädlichen Umwelteinwirkungen (Kap. 4, Abb. 4.1) dienen (Dalton, 1995; Kranner and Grill, 1996). Eine Erhöhung des GSH-Pools in einigen Pflanzen bzw. Zellkulturen könnte daher auch eine unspezifische Reaktion auf Stress darstellen.

Unter Einfluss von  $\text{Cd}^{2+}$  wurden in Hanf-Kalluskulturen vor allem  $\text{PC}_2$  und  $\text{PC}_3$  akkumuliert. Höhere Phytochelatine als  $\text{PC}_4$  wurden, im Gegensatz zu den Tomaten-Kalluskulturen (bis  $\text{PC}_8$ ) nicht detektiert. Neben  $\text{PC}_3$  scheint  $\text{PC}_2$  der Detoxifizierung von  $\text{Cd}^{2+}$  in Hanf-Kalluskulturen zu dienen, da es im Vergleich zu dem höhermolekularen  $\text{PC}_4$  in wesentlich größeren Mengen vorliegt (Kap. 3.1.5, Abb. 3.10). Die Biosynthese höhermolekularer PC's erfolgt durch Addition von  $\gamma$ -EC-Einheiten an niedermolekulare PC's (Robinson et al., 1988; Meuwly and Rauser, 1992). Die vermehrte Synthese höhermolekularer PC's wird in vielen Pflanzen gefunden. Die bevorzugte Synthese einzelner PC's (*Lycopersicon esculentum*:  $\text{PC}_4$ ; *Viola calaminaria*:  $\text{PC}_3$ ) hängt dabei jedoch von der Schwermetallkonzentration, der Inkubationsdauer und der Pflanzenart ab (Tab. 4.3).

Art	Autor	$\text{PC}_2$	$\text{PC}_3$	$\text{PC}_4$	$\text{PC}_5$
<i>Pinus pinea</i>	Gekeler et al., 1989	83,0	14,6	2,4	---
<i>Viola calaminaria</i>	Gekeler et al., 1989	30,5	50,3	14,6	4,6
<i>Rauwolfia serpentina</i>	Grill et al., 1987	19,6	44,9	35,5	---
<i>Lycopersicon esculentum</i> (WT)	eigene Daten	1,2	16,6	58,1	23,6
<i>Cannabis sativa</i>	eigene Daten	36,7	54,2	9,1	---

Tab. 4.3: Anteile der einzelnen PC's in verschiedenen Pflanzen und Zellkulturen unter Einfluss von  $\text{Cd}^{2+}$  (*L. esculentum*: Gehalt an  $\text{PC}_6$  -  $\text{PC}_8$  in der Summe ca. 0,5 %)

Die Unterschiede in der Zusammensetzung der Phytochelatine lassen sich vermutlich auf die artspezifische Aktivität der PC-Synthase und die Dynamik des GSH-Pools zurückführen (Thumann et al., 1991; Mehra et al., 1995). Die Chelatisierung von  $\text{Cd}^{2+}$  in Hanf-Kalluskulturen

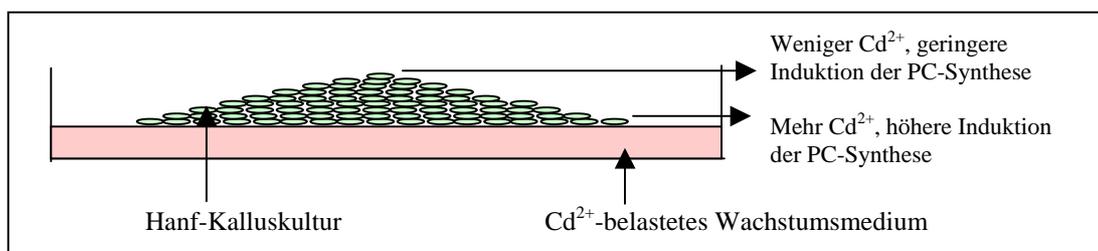
scheint durch den Mangel an höhermolekularen PC's, die in anderen Pflanzen die Effektivität der Schwermetalldetoxifikation erhöhen (Mehra et al., 1995), nicht beeinträchtigt zu werden. Möglicherweise besitzt GSH, dessen Gehalt in Hanf-Kalluskulturen bei steigender  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration zunahm, ebenfalls einen Anteil an der Komplexbildung der Schwermetallionen. Es ist zudem vorstellbar, dass die  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration in den Zellen so hoch ist, dass die Bildung höhermolekularer PC's nicht erfolgen kann, um eine Anreicherung freier  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen in der Zelle zu verhindern. Die gebildeten  $\text{Cd}^{2+}$ -PC-Komplexe könnten unmittelbar nach ihrer Bildung in die Vakuolen transportiert werden. Die Bildung höherer PC's würde dann durch den ständigen Turnover der Phytochelatine verhindert.

Die Retentionszeiten der Phytochelatine im Elutionsprofil von Hanf-Kalluskulturen (Kap. 3.1.5, Abb. 3.9) entsprachen denen der Phytochelatine  $\text{PC}_2$  bis  $\text{PC}_4$  im Elutionsprofil von  $\text{Cd}^{2+}$ -resistenten Tomaten-Kalluskulturen. Die massenspektrometrische Analyse der Phytochelatine sollte zeigen, ob es sich bei den PC's aus Hanf-Kalluskulturen um PC's der Klasse  $(\gamma\text{-EC})_n\text{-Gly}$  handelte. Dazu war es notwendig, die thiolreichen Verbindungen anzureichern. Die Anreicherung der  $\text{Cd}^{2+}$ -PC-Komplexe erfolgte mittels Säulenchromatographie auf einem Anionenaustauscher (Rauser, 1990; Gupta and Goldsbrough, 1991). In den thiolreichsten Fraktionen wurden dabei bis  $1,3 \mu\text{M}$  GSH-Äquivalente,  $1/8$  des in der thiolreichsten Fraktion von R6K gefundenen GSH-Gehaltes (Kap. 3.1.2, Abb. 3.3), nachgewiesen. Das Elutionsprofil der angereicherten PC-Fraktion zeigte im relevanten Bereich drei Peaks, mit den für die Phytochelatine  $\text{PC}_2$  bis  $\text{PC}_4$  charakteristischen Retentionszeiten. Die angereicherten Phytochelatin-Komplexe aus Hanf-Kalluskulturen wurden mittels HPLC getrennt und die jetzt  $\text{Cd}^{2+}$ -freien thiolreichen Peptide isoliert (Kap. 3.1.6, Abb. 3.11, Abb. 3.12). Bei  $220 \text{ nm}$  konnten neben den Phytochelatinen nur wenige andere Verbindungen detektiert werden, was auf eine selektive Anreicherung der  $\text{Cd}^{2+}$ -PC-Komplexe durch den Anionenaustauscher schließen lässt (Kap. 3.1.7, Abb. 3.13). Eine nachfolgend durchgeführte massenspektrometrische Analyse der 4 isolierten Fraktionen ergab, dass es sich bei den Peaks 1, 3 und 4 um die Phytochelatine  $\text{PC}_2$ ,  $\text{PC}_3$  und  $\text{PC}_4$  der Struktur  $(\gamma\text{-EC})_n\text{-Gly}$  handelte (Kap. 3.1.7, Abb. 3.14, Tab. 3.4).

Die Identifizierung der nach  $\text{PC}_2$  eluierenden Verbindung (Kap. 3.1.7, Abb. 3.15) war weder mittels Massenspektrometrie noch durch Aminosäure-Analyse möglich, da diese Verbindung nur in sehr geringen Konzentrationen im Elutionsprofil auftrat und im Laufe des Verfahrens zur Anreicherung der Phytochelatine nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Es ist jedoch zu vermuten, dass es sich bei dieser Verbindung um eine thiolreiche Verbindung, möglicherweise ein DesGly-PC oder ein Cys-PC, handelt.

### 4.3 Induktion der Phytochelatinsynthese in Hanf-Suspensionskulturen

Wie bereits beschrieben, lassen sich Daten zur Aufnahme von Schwermetallen und Akkumulation von Phytochelatinen durch unterschiedliche Pflanzen oder Zellkulturen nur schwer miteinander vergleichen (Rauser, 1990). Es ist jedoch nicht bekannt, inwiefern sich die Aufnahme von Schwermetallen und die Induktion der PC-Synthese zwischen Kallus- bzw. Suspensionskulturen der gleichen Pflanzenart unterscheiden. Der Kontakt nur weniger Zellen mit dem schwermetallbelasteten Medium stellt die Besonderheit der Kalluskultur dar. Es ist davon auszugehen, dass sich ein Gradient der Schwermetallkonzentration in der Kalluskultur ausbildet, wobei die Zellen, die Kontakt zum Medium besitzen, die höchsten Schwermetallgehalte aufweisen. Aus diesem Grunde stellen die mit Kalluskulturen erhaltenen Daten nur Mittelwerte über die gesamte Kultur dar.



**Abb. 4.2:** Ausbildung eines Gradienten im Cd<sup>2+</sup>-Gehalt in Kalluskulturen

Das Wachstum von Zellen in einer Suspensionskultur bietet wesentlich homogenere Bedingungen (Street, 1977). In Suspensionskulturen, die keine großen Zellaggregate ausbilden, ist ein Großteil der Zellen dem Einfluss der Schwermetalle ausgesetzt (Rauser, 1990). Man kann deshalb davon ausgehen, dass Suspensionskulturen eine geringere Variabilität in der Reaktion auf Schwermetalle im Medium zeigen als Kalluskulturen, und damit genauere Bestimmungen der physiologischen Parameter ermöglichen.

Das Wachstum von Suspensionskulturen wird durch die im Medium befindliche Cd<sup>2+</sup>-Konzentration beeinflusst. In Tabakzellkulturen wurde für 50 - 200 µM Cd<sup>2+</sup> eine gegenüber den Kontrollkulturen um 24 - 66 % reduzierte Frischgewichtszunahme gefunden. 300 µM Cd<sup>2+</sup> im Medium führten zu einem gleichbleibenden Frischgewicht. Ab 400 µM Cd<sup>2+</sup> im Medium wurde das Absterben der Tabakkulturen beobachtet (Huang and Goldsbrough, 1988). Cd<sup>2+</sup>-resistente Tomaten-Suspensionskulturen zeigten gegenüber den Kontrollen (Wildtyp) eine um bis zu 25 % reduzierte Zunahme des Frischgewichtes (Gupta and Goldsbrough, 1991). Bis Tag 6 wurde in Hanf-Suspensionskulturen kein Unterschied im Frischgewicht der auf 0 - 120 µM Cd<sup>2+</sup> im

Medium angezogenen Kulturen beobachtet. Das Frischgewicht änderte sich gegenüber Tag 0 in dieser Phase nicht (lag-Phase, Kap. 3.2.1, Abb. 3.16). In der log-Phase (Tag 7 - Tag 12) wurde für die niedrigeren  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen eine gegenüber der Kontrolle (100 %) verstärkte Zunahme des Frischgewichtes gefunden ( $20\mu\text{M Cd}^{2+}$ : 143 %,  $30\mu\text{M Cd}^{2+}$ : 121,5 %,  $40\mu\text{M Cd}^{2+}$ : 113 %). Höhere  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen führten gegenüber der Kontrolle zu einer deutlichen Reduktion der Frischgewichtszunahme ( $80\mu\text{M Cd}^{2+}$ : 50 %,  $120\mu\text{M Cd}^{2+}$ : 37 %). Zudem färbten sich die den höheren  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen ausgesetzten Zellkulturen bräunlich, was auf einen vermehrten Zelltod hindeuten kann, während die auf niedrigeren  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen angezogenen Zellkulturen ihre anfängliche grüne Färbung behielten. Eine  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration von  $200\mu\text{M}$  im Medium, wie sie für die Versuche mit Hanf-Kalluskulturen eingesetzt wurde (Kap. 3.1.5, Abb. 3.10), führte zu einem raschen Absterben der Suspensionskulturen. Die Zugabe der Schwermetalle zum Wachstumsmedium sollte erst in der Phase des logarithmischen Wachstums (log-Phase) erfolgen, wenn sich der Metabolismus der Zellkulturen an die durch die Zugabe von frischem, nährstoffreichen Medium veränderten Bedingungen angepasst hat (Grill et al., 1991). In den nachfolgenden Experimenten wurden die Schwermetalle den Suspensionskulturen aus diesem Grunde am Tag 6 nach Beginn der Kulturzeit zugegeben.

Die Aufnahme von Schwermetallen durch pflanzliche Zellkulturen erfolgt im Allgemeinen in mehreren Schritten. In Suspensionskulturen der Tomate konnte unmittelbar nach Zusatz von  $1\text{ mM Cd}^{2+}$  zum Medium auch  $\text{Cd}^{2+}$  in der Zellfraktion nachgewiesen werden (Gupta and Goldsbrough, 1990). Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei zu einem Großteil um an Zellen angelagertes  $\text{Cd}^{2+}$  handelte. Im weiteren Verlauf wurde ein Teil des  $\text{Cd}^{2+}$  an die Zellwand gebunden, während ein Teil des  $\text{Cd}^{2+}$  aus dem Medium durch unspezifischen Transport in die Zellen gelangte und dort die Synthese von Phytochelatinen induzierte. Überschüssiges  $\text{Cd}^{2+}$  wurde im Laufe der Wachstumsphase aus der Zellwand langsam in das Zellinnere abgegeben, während etwa 25 % des in den Zellwänden befindlichen  $\text{Cd}^{2+}$  in der Zellwand gebunden blieben (Wells and Brown, 1987, 1990; Rauser, 1990; Brown and Sidhu, 1992). In Hanf-Suspensionskulturen konnte 5 min nach Zugabe von  $\text{Cd}^{2+}$  bereits ein geringer Gehalt an  $\text{Cd}^{2+}$  in der Zellfraktion nachgewiesen werden (Kap. 3.2.2, Abb. 3.17). Der Gehalt an  $\text{Cd}^{2+}$  in den Zellen stieg innerhalb der ersten 16 Wachstumsstunden auf  $1,82\mu\text{M Cd}^{2+}/\text{g FG}$  an, um im Laufe der folgenden 5 Wachstumstage auf 16 % des maximalen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes abzusinken (Tag 6:  $0,298\mu\text{M}/\text{g FG}$ ). Gegenüber dem Medium kam es zu einer maximalen 18-fachen Anreicherung von  $\text{Cd}^{2+}$  durch die Zellen. Gupta and Goldsbrough (1990) erklärten diese

Reduktion des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes, die auch in Tomaten-Suspensionskulturen während der log-Phase beobachtet wurde, durch eine starke Zunahme des Frischgewichtes.

Die Akkumulation von  $\text{Cd}^{2+}$  und Phytochelatinen erreichte in Tomaten-Suspensionskulturen 4 Tage nach Zugabe von  $\text{Cd}^{2+}$  zum Medium ein gemeinsames Maximum (Gupta and Goldsbrough, 1990). Das in Tomatenzellkulturen gefundene Maximum der Akkumulation von Phytochelatinen während der log-Phase wurde auch in Suspensionskulturen von *R. serpentina* (Tag 7) nachgewiesen (Grill, 1989; Zenk, 1996). In Hanf-Suspensionskulturen wurde das Maximum der PC-Akkumulation nach 72 h ( $0,3 \mu\text{M}$  PC/g FG), 56 h nach dem Erreichen des maximalen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes (16 h:  $0,11 \mu\text{M}$  PC/g FG), erreicht (Kap. 3.2.2, Abb. 3.17). In den folgenden 72 h nahm der PC-Gehalt gegenüber dem Maximum um 46 % ab ( $t_{\text{H}}$  ca. 3 Tage). Ein ähnlicher Verlauf der Akkumulation von  $\text{Cd}^{2+}$  in der Zellfraktion ließ sich auch für die anderen, dem Medium zugesetzten  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen ( $30 \mu\text{M}$  bzw.  $40 \mu\text{M}$ ), nachweisen. Eine Verdoppelung des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes von  $20$  auf  $40 \mu\text{M}$  führte nach 16 h zu einem um 76 % erhöhten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in der Zellfraktion (Kap. 3.2.2, Abb. 3.18).

Die am Beginn der Wachstumsphase gebildeten PC's dienen der schnellen Detoxifizierung der in das Zellinnere gelangenden  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen. Am Ende der Wachstumsphase und in der stationären Phase wird ein Teil der gebildeten PC's abgebaut, um dem Metabolismus wieder dringend benötigte Aminosäuren zuführen zu können. Die Halbwertszeit ( $t_{\text{H}}$ ) der Abnahme des PC-Gehaltes beträgt dabei in vielen Pflanzen und Suspensionskulturen 2,5 bis 3 Tage. Die Komplexierung des  $\text{Cd}^{2+}$  erfolgt zu diesem Zeitpunkt zu einem Großteil in der Vakuole, in Form der sogenannten HMW's (high molecular weight complex), die als  $\text{Cd}^{2+}$ - $\text{S}^{2-}$ -PC-Komplexe vorliegen und einen deutlich geringeren PC-Anteil aufweisen als  $\text{Cd}^{2+}$ -PC-Komplexe (Rauser, 1990; Kneer and Zenk, 1992, 1997; Salt and Rauser, 1995; Goldsbrough et al., 1995).

In Tomatenkulturen wurde eine gegenüber den Hanfkulturen stärkere Abnahme des PC-Gehaltes zwischen Tag 4 (maximaler PC-Gehalt:  $5,1 \mu\text{M}$  PC/g FG) und Tag 8 ( $1,25 \mu\text{M}$  PC/g FG) von 75 % festgestellt (Gupta and Goldsbrough, 1990). Daten zur Zusammensetzung der HMW-Komplexe aus Hanf-Suspensionskulturen liegen nicht vor, aber es ist vorstellbar, dass die gegenüber den Hanfkulturen stärkere Abnahme des PC-Gehaltes in den Tomatenkulturen durch den vermehrten Einbau von  $\text{S}^{2-}$  in die  $\text{Cd}^{2+}$ -PC-Komplexe erklärbar ist. In Tomatenkulturen wurde während der gesamten log-Phase ein Verhältnis ( $\mu\text{M}/\text{g}$  FG) von  $\text{Cd}^{2+}$  zu PC's von 1:8 nachgewiesen (Gupta and Goldsbrough, 1990). In den Hanf-Suspensionskulturen lag das Verhältnis von  $\text{Cd}^{2+}$  zu PC's in der Zellfraktion zum Zeitpunkt des maximalen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes

bei 17:1 (Kap. 3.2.2, Abb. 3.17). Im weiteren Wachstumsverlauf stellte sich ein Verhältnis von 3:1 ein. Diese Daten lassen einen zusätzlichen Detoxifizierungs-Mechanismus in Hanf-Suspensionskulturen vermuten, der ebenfalls bereits für andere Zellkulturen diskutiert wird (Gupta and Goldsbrough, 1990; Kneer and Zenk, 1992, 1997). Eine wichtige Rolle könnte dabei der Zellwand zukommen, in die möglicherweise ein erheblicher Teil des in der Zellfraktion nachgewiesenen  $\text{Cd}^{2+}$  eingelagert wird (Kap. 4.4, Abb. 4.3) und die einen Teil des gebundenen  $\text{Cd}^{2+}$  langsam in das Zellinnere abgibt, was die um 56 h verschobene Maxima im  $\text{Cd}^{2+}$ - bzw. PC-Gehalt erklären könnte. Möglicherweise sind auch andere Verbindungen wie Glutathion an der Detoxifizierung von  $\text{Cd}^{2+}$  in den Zellen der Hanf-Suspensionskultur beteiligt.

Steffens (1990) konnte nachweisen, dass die Akkumulation und die Zusammensetzung der Phytochelatine von der eingesetzten Schwermetallkonzentration abhängig war. Eine höhere  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration im Medium führte zu einer erhöhten Akkumulation von Phytochelatinen, die mit der verstärkten Bildung höhermolekularer PC's einherging (Steffens, 1990; Gupta and Goldsbrough, 1991). Elutionsprofile unterschiedlich stark mit  $\text{Cd}^{2+}$  belasteter Hanf-Suspensionskulturen zeigen, dass die Synthese der Phytochelatine von der eingesetzten  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration abhing (Kap. 3.2.3, Abb. 3.30). In den Kontrollen ließen sich wie erwartet keine PC's nachweisen. Das Verhältnis zwischen  $\text{PC}_2$ ,  $\text{PC}_3$  und  $\text{PC}_4$  verschob sich bei Erhöhung des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes im Medium von 20 auf 40  $\mu\text{M}$  dabei in Richtung verstärkter Bildung von  $\text{PC}_3$  und auch  $\text{PC}_4$ , (Kap. 3.1.5, Abb. 3.10) und einem Rückgang des Gehaltes an  $\text{PC}_2$ . Neben den identifizierten Phytochelatin-Peaks traten in Hanf-Suspensionskulturen Peaks anderer thiolhaltiger Verbindungen auf (Kap. 3.2.6, Abb. 3.27). Mit den in dieser Arbeit beschriebenen Methoden war eine endgültige Identifizierung dieser Peaks jedoch bislang nicht möglich. Es ist aber zu vermuten, dass es sich bei diesen Thiolpeptiden um Abbauverbindungen von Phytochelatinen, z. B. DesGly-PC's oder Cys-PC's, handelte, da sie frühestens 3 Tage nach Beginn der Kulturzeit auf  $\text{Cd}^{2+}$ -belastetem Medium nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Der Gesamt-PC-Gehalt in Hanf-Suspensionskulturen, gewachsen auf 20, 30 bzw. 40  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  im Medium, zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und dem  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt im Medium (Kap. 3.2.3, Abb. 3.20). 3 h nach Beginn der Kulturzeit auf belastetem Medium zeigten die Kulturen keine Unterschiede in der Akkumulation von PC's (24 nM/g FG). 16 h nach Zugabe von 20 bzw. 30  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  zum Medium unterschieden sich PC-Gehalte ebenfalls nur wenig voneinander (107 bzw. 116 nM/g FG). Der PC-Gehalt von 16 h auf 40  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  angezogenen Kulturen (294 nM/g FG) lag jedoch deutlich über den in den anderen Kulturen

gefundenen PC-Gehalten. 24 h nach Zugabe von 20  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  zum Anzuchtmedium wurde in den Hanf-Suspensionskulturen ein PC-Gehalt von 132 nM/g FG nachgewiesen. Auf 30  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  angezogene Kulturen enthielten den 1,5-fachen (198 nM/g FG), auf 40  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  angezogene Kulturen den 2,8-fachen PC-Gehalt (369 nM/g FG) der auf 20  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  angezogenen Kulturen. Insgesamt stieg der PC-Gehalt in auf 20 - 40  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  angezogenen Kulturen in der Zeit zwischen 3h und 24 h nach Beginn der Kulturzeit um das 5 - 15,5-fache an. In Tomaten-Suspensionskulturen konnte dagegen nur ein bis zu 5-facher Anstieg des PC-Gehaltes während des ersten Wachstumstages nachgewiesen werden (Gupta and Goldsbrough, 1990).

Die Zusammensetzung der PC's sowie der Gehalt an Cys und GSH änderte sich in Hanf-Suspensionskulturen, angezogen auf 40  $\mu\text{M Cd}^{2+}$ , in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (Kap. 3.2.3, Abb. 3.21). In verschiedenen Zellsuspensionskulturen wurde die Reduzierung des GSH-Pools um mindestens 50 % im Laufe der ersten 3 h nach Zugabe des  $\text{Cd}^{2+}$  nachgewiesen (Rauser, 1990). Der GSH-Pool erreichte im Allgemeinen nach 24 h wieder den Ausgangszustand. Gupta and Goldsbrough (1990) fanden in den von ihnen bearbeiteten  $\text{Cd}^{2+}$ -resistenten Tomatenkulturen einen anderen Verlauf des GSH-Gehaltes. Der Gehalt an GSH nahm innerhalb der ersten beiden Tage deutlich zu und nach Erreichen des maximalen Phytochelatin-Gehaltes (Tag 4) langsam wieder ab. In Hanf-Suspensionskulturen konnte während der ersten 12 h nach Zugabe von  $\text{Cd}^{2+}$  eine Zunahme des GSH-Pools um 262 % (von 24 auf 87 nM/g FG) nachgewiesen werden (Kap. 3.2.3, Abb. 3.21). Im weiteren Wachstumsverlauf stellte sich der GSH-Gehalt auf ca. 60 nM/g FG ein, ohne dass ein klarer Verlauf, z. B. eine langsame Abnahme, in der Änderung des GSH-Gehaltes erkennbar war. Die mögliche Depotwirkung der Zellwand kann dazu führen, dass trotz eines deutlich reduzierten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes im Medium noch ausreichend  $\text{Cd}^{2+}$  in die Zellen gelangt, um einen Anstieg des GSH-Gehaltes zu induzieren (Wells and Brown, 1990; Brown and Sidhu, 1992) Der Gehalt an Cystein in Hanf-Suspensionskulturen folgte keinem klar erkennbaren Verlauf, erreichte aber zum Zeitpunkt des maximalen PC-Gehaltes (72 h) ein Minimum.

Es konnte gezeigt werden, dass es im Anfangsstadium des Wachstums von Zellkulturen auf  $\text{Cd}^{2+}$ -belastetem Medium zu einer vermehrten Synthese von  $\text{PC}_2$ , in einigen Fällen auch  $\text{PC}_3$ , kommt. Die niedermolekularen PC's können in dieser Phase nicht in höhermolekulare PC's umgewandelt werden, da sie zur unmittelbaren Detoxifizierung des in die Zellen gelangenden  $\text{Cd}^{2+}$  benötigt werden (Rauser, 1990; Steffens, 1990; Zenk, 1996). Zur Synthese der höhermolekularen PC's kommt es, abhängig von der Pflanzenart, erst 20 min - 7 h nach Zugabe des  $\text{Cd}^{2+}$  zum Medium. Es ist möglich, dass zur Synthese höhermolekularer PC's die *de novo* -

Synthese von GSH bzw.  $\gamma$ -EC erfolgen muss (Gupta and Goldsbrough 1990; Rauser, 1990; Steffens, 1990). Die Zusammensetzung der PC's in Hanf-Suspensionskulturen wurde während der beobachteten Wachstumsphase (96 h) von PC<sub>3</sub> dominiert. 3 h nach Beginn der Kulturzeit auf mit 40  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup> belastetem Medium wurde die folgende Zusammensetzung der PC's gefunden: PC<sub>2</sub> : 43 %, PC<sub>3</sub>: 52 %, PC<sub>4</sub>: 5 %. Der Anteil an PC<sub>3</sub> änderte sich im Laufe der folgenden 45 h nur geringfügig auf 59 %, währenddessen der Anteil an PC<sub>4</sub> am Gesamt-PC-Gehalt deutlich auf 21,6 % zunahm (PC<sub>2</sub> : 19,4 %). Der Gesamt-PC-Gehalt nahm in der Wachstumsperiode zwischen 3 h und 48 h nach Cd<sup>2+</sup>-Zugabe um 1750 % zu (425 nM/g FG), um während der folgenden 48 h auf 1170 % des nach 3 h nachgewiesenen PC-Gehaltes abzusinken. Das Maximum der PC-Synthese wurde in den auf 40  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup> gewachsenen Hanf-Suspensionskulturen 24 h früher erreicht als in auf 20  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup> angezogenen Kulturen. Der Gesamt-PC-Gehalt stieg bei einer Verdoppelung des Cd<sup>2+</sup>-Gehaltes im Medium jedoch nur auf 141 % an. Diese Daten könnten die Theorie bestätigen, nach der ein Großteil des Cd<sup>2+</sup> in den Zellwänden eingelagert wird und nur langsam oder nie das Zellinnere erreicht (Kneer and Zenk, 1992, 1997).

In verschiedenen vorangegangenen Arbeiten wurde das Potential unterschiedlicher Schwermetalle zur Induktion der Phytochelatinsynthese untersucht. Schwermetalle wie Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> und Pb<sup>2+</sup> induzierten die Synthese von Phytochelatinen, wurden also in die Zellen aufgenommen und dort detoxifiziert. Ein Großteil der dabei erhaltenen Daten kann jedoch nicht miteinander verglichen werden, da die Inkubationsdauer und die Konzentrationen der eingesetzten Schwermetalle stark voneinander abwichen (Grill et al., 1987).

Hanf-Suspensionskulturen wurden für 72 h auf 30  $\mu$ M unterschiedlicher Schwermetalle (Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>) im Wachstumsmedium angezogen (Kap. 3.2.4, Abb. 3.22). 72 h nach erfolgter Ni<sup>2+</sup>-Zugabe ließen sich 17 % des im Medium befindlichen Ni<sup>2+</sup> in der Zellfraktion nachweisen. Die Aufnahme von Ni<sup>2+</sup> in die Zellfraktion schien zudem nach 20 h Inkubationszeit abgeschlossen zu sein und änderte sich im Laufe der folgenden 52 h nur unwesentlich. Die Aufnahme von Co<sup>2+</sup> bzw. Zn<sup>2+</sup> verlief während der ersten 20 h langsamer als die von Ni<sup>2+</sup>. 72 h nach erfolgter Schwermetallzugabe ließen sich jedoch 53 % des eingesetzten Co<sup>2+</sup> bzw. 88 % des eingesetzten Zn<sup>2+</sup> in der Zellfraktion nachweisen. Cu<sup>2+</sup> und Cd<sup>2+</sup> wurden schneller in die Zellfraktion aufgenommen als die anderen untersuchten Metalle. Die Aufnahme der Metalle schien jedoch nach 72 h (Cu<sup>2+</sup>) bzw. 20 h (Cd<sup>2+</sup>, Max. bei 16 h, Kap. 3.2.2, Abb. 3.17) einen Sättigungszustand zu erreichen. In der Zellfraktion wurden 72 h nach erfolgter Schwermetallzugabe 70 % des eingesetzten Cu<sup>2+</sup> bzw. Cd<sup>2+</sup> nachgewiesen. Wurden dem Medium 60  $\mu$ M eines der verwendeten Schwermetalle zugegeben, so ließen sich, gegenüber der

geringeren Schwermetallkonzentration (30  $\mu\text{M}$ ), leichte Unterschiede in der Aufnahme der Metalle in die Zellfraktion feststellen (Kap. 3.2.4, Abb. 3.23). 72 h nach erfolgter Zugabe von 60  $\mu\text{M}$  Schwermetall wurden die folgenden Schwermetallgehalte in den untersuchten Zellfraktionen gefunden:  $\text{Ni}^{2+}$ : 33 %,  $\text{Co}^{2+}$ : 63 %,  $\text{Zn}^{2+}$ : 82 %,  $\text{Cu}^{2+}$ : 63 %,  $\text{Cd}^{2+}$ : 69 %.

Die erhaltenen Daten machen deutlich, dass große Unterschiede in der Anlagerung bzw. die Aufnahme der Schwermetalle durch die Zellen bestehen. Gleiche Konzentrationen von  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  im Medium bedeuten nicht, dass die Konzentrationen der Metalle in der Zellfraktion und damit ihre Auswirkungen auf den Zellmetabolismus vergleichbar sind.  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  wurden in Moosen vergleichsweise schnell von extrazellulären Bindungsstellen in die Zellen aufgenommen (Wells and Brown, 1987, 1990).  $\text{Pb}^{2+}$  besitzt dagegen eine höhere Zellwandaffinität und gelangt nur langsam in die Zellen (Tyler, 1990).

Die Wirkungen der eingesetzten Metalle auf den pflanzlichen Organismus unterscheiden sich deutlich voneinander. Während Metalle wie  $\text{Cu}^{2+}$  oder  $\text{Zn}^{2+}$  strukturelle und katalytische Komponenten von Proteinen und Enzymen darstellen, wirken sich Metalle wie  $\text{Cd}^{2+}$  oder  $\text{Pb}^{2+}$  stark toxisch auf die Pflanzenzellen aus (Steffens, 1990; Rauser 1999). Die Pflanzen besitzen verschiedene Mechanismen, um die Toleranz gegenüber Schwermetallen zu erhöhen. Neben der Kompartimentierung (Zellwand, Vakuole) werden, wie bereits erwähnt, Schwermetalle in den Zellen durch unterschiedliche Liganden (Citrat, Histidin, GSH, Phytochelatine, Metallothioneine) komplexiert und damit detoxifiziert (Rauser, 1999).

Im Induktionsprofil von  $\text{Cd}^{2+}$ -belasteten Hanf-Suspensionskulturen wurden die Phytochelatine  $\text{PC}_2$ ,  $\text{PC}_3$  und  $\text{PC}_4$  nachgewiesen (Kap. 3.2.5, Abb. 3.24). Im Vergleich dazu wurde durch Zugabe von  $\text{Pb}^{2+}$  zum Wachstumsmedium (30  $\mu\text{M}$  SM, 20 h Inkubationszeit) nur die Biosynthese von  $\text{PC}_2$ , durch  $\text{Cu}^{2+}$  die Biosynthese von  $\text{PC}_2$  und  $\text{PC}_3$  (Doppelpeak) und durch Zugabe von  $\text{Co}^{2+}$  zum Medium keine Phytochelatinbiosynthese induziert. Zudem ließ sich eine Abhängigkeit des GSH bzw.  $\gamma\text{-EC}$ -Gehaltes vom eingesetzten Schwermetall erkennen.

Um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurden gleiche Konzentrationen aller Metalle eingesetzt. Vergleicht man die Gesamt-PC-Gehalte, induziert durch die Zugabe verschiedener Schwermetalle (60  $\mu\text{M}$ , Inkubationszeit: 40 h) miteinander, wird deutlich, dass  $\text{Cd}^{2+}$  den stärksten Induzierer der Phytochelatinsynthese darstellt (187 nM/g FG = 100 %, Kap. 3.2.5, Abb. 3.25). Nach Zugabe von  $\text{Ag}^+$  zum Medium wurde keine Induktion der Phytochelatinsynthese festgestellt. Die Induktion der PC-Synthese durch Metalle wie  $\text{Au}^{3+}$  und

$\text{Co}^{2+}$  im Medium betrug 3 % der Induktion durch  $\text{Cd}^{2+}$ .  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Au}^{3+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  erwiesen sich als toxisch und führten zu einem sichtbaren Vitalitätsverlust der Zellen (Braunfärbung, Abbau des Chlorophylls). Zugabe von  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Pb}^{2+}$  zum Medium führte zu einer deutlichen Induktion der PC-Synthese (9-17 %). Neben  $\text{Cd}^{2+}$  stellte  $\text{Cu}^{2+}$  mit 50 % den stärksten Induzierer der PC-Synthese dar. Eine Abhängigkeit der PC-Synthese von der eingesetzten Schwermetallkonzentration (30 bzw. 60  $\mu\text{M}$ ) ließ sich für die Metalle  $\text{Cd}^{2+}$  (1,9-mal mehr PC's),  $\text{Cu}^{2+}$  (1,2-fach),  $\text{Pb}^{2+}$  (2,1-fach),  $\text{Zn}^{2+}$  (2-fach),  $\text{Hg}^{2+}$  (1,5-fach) und  $\text{Ni}^{2+}$  (1,3-fach) feststellen. Die Abhängigkeit der PC-Synthese von der Schwermetallkonzentration im Medium wurde auch für viele andere Pflanzen nachgewiesen (De Knecht et al., 1994; Ahner and Morel, 1995).

$\text{Co}^{2+}$ -belastete Suspensionskulturen akkumulierten 4,3-mal höhere GSH-Gehalte als  $\text{Cd}^{2+}$ -belastete Kulturen. Eine Beteiligung von GSH an der Detoxifizierung von  $\text{Co}^{2+}$  oder  $\text{Pb}^{2+}$  (3,3-mal mehr GSH) ist von daher denkbar. Zudem wurden starke Schwankungen im  $\gamma$ -EC-Gehalt der Suspensionskulturen beobachtet.  $\text{Co}^{2+}$ -belastete Kulturen akkumulierten die höchsten  $\gamma$ -EC-Gehalte, 10-mal mehr als in  $\text{Ag}^+$ -belasteten Kulturen (Kap. 3.2.5, Abb. 3.26). Im Mittel betrug der in den Hanf-Suspensionskulturen nachgewiesene Gehalt an  $\gamma$ -EC 28 % des GSH-Gehaltes. Die Abhängigkeit der PC-Synthese und der GSH- bzw.  $\gamma$ -EC-Gehalte vom eingesetzten Schwermetall in Hanf-Suspensionskulturen, sowie die von Grill et al. (1987) aufgestellte Reihe zur Induktion von Phytochelatinen in *R. serpentina*-Zellkulturen ist in Tab. 4.4 dargestellt:

Pflanze	Autor	Thiolpeptid	Induktion thiolreicher Peptide
<i>Rauwolfia serpentina</i>	Grill et al., 1987	PC's	$\text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Sb}^{3+} > \text{Ag}^+ > \text{Ni}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Sn}^{2+} > \text{Au}^{3+}$
<i>Cannabis sativa</i>	Ostwald et al., 1999 a (eigene Daten)	PC's	$\text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Au}^{3+} > \text{Ag}^+$
<i>Cannabis sativa</i>	eigene Daten	GSH	$\text{Co}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Ag}^+ > \text{Au}^{3+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$
<i>Cannabis sativa</i>	eigene Daten	$\gamma$ -EC	$\text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Au}^+ > \text{Hg}^{2+} > \text{Ag}^+$

**Tab. 4.4:** Induktion der Thiolpeptid-Synthese in Abhängigkeit vom eingesetzten Schwermetall und der Pflanzenart

$\text{Cd}^{2+}$  stellte in *R. serpentina* und *C. sativa* den jeweils stärksten Induzierer der PC-Synthese dar.  $\text{Cu}^{2+}$  nahm den 2. Rang als Induzierer der PC-Synthese in *C. sativa*-Zellkulturen ein. Dagegen

nahm  $\text{Cu}^{2+}$  in den Experimenten zur PC-Induktion in *R. serpentina*-Zellkulturen nur den 8. Rang ein. Diese Unterschiede in der Fähigkeit, die Synthese von Phytochelatinen in verschiedenen pflanzlichen Zellkulturen zu induzieren, können von pflanzenspezifischen Toleranzmechanismen, aber auch von der eingesetzten Konzentration des Schwermetalls und der Inkubationszeit herrühren. In von Grill et al. (1987) und Maitani et al. (1996) durchgeführten Experimenten wurden bis zu 100-fach unterschiedliche Schwermetallkonzentrationen eingesetzt ( $10 \mu\text{M Hg}^{2+}$ ,  $1000 \mu\text{M Pb}^{2+}$  bzw.  $\text{Zn}^{2+}$ ), die einen Vergleich der verschiedenen Daten zur Induktion der Phytochelatinsynthese nahezu unmöglich machen.

Für  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  im Medium wurden bis zu 40-mal höhere GSH- als PC-Gehalte in Hanf-Kalluskulturen nachgewiesen. Eine Komplexierung dieser Metalle durch GSH wäre damit durchaus vorstellbar. Unterstützt wird diese Theorie auch durch den für diese Metalle nachgewiesenen, gegenüber der Kontrolle und Cd-belasteten Kulturen, bis zu 13-fach erhöhten Gehalt an  $\gamma\text{-EC}$ , das zur Synthese von GSH benötigt wird (Kap. 3.2.5, Abb. 3.25, Abb. 3.26). Es ist bekannt, dass das im Cytosol befindliche  $\text{Cu}^{2+}$  zu 60 % an GSH gebunden wird (Rauser, 1991). Goldsbrough et al. (1995) konnte zeigen, dass in *Arabidopsis thaliana* Phytochelatine zur Detoxifizierung von  $\text{Cd}^{2+}$  und Metallothioneine zur Komplexierung von  $\text{Cu}^{2+}$  synthetisiert werden. Es ist denkbar, dass die elementspezifischen Unterschiede der GSH- bzw.  $\gamma\text{-EC}$ -Induktion in der unterschiedlichen Aktivierung der an der GSH-Synthese beteiligten Enzyme begründet ist (Grill et al., 1986). Als Ursache kommen aber auch verschiedene Zellwandaffinitäten und Aufnahmemechanismen in Frage. Für die unterschiedlichen Induktionen ist aber vermutlich das Zusammenwirken mehrerer Mechanismen verantwortlich (Lopez et al., 1994).

Phytochelatine stellen in allen bisher untersuchten Pflanzenarten die adaptive Antwort der Zellen auf durch Cadmium ausgelösten Stress dar. Phytochelatine spielen auch in der Toleranz gegenüber anderen Metallen eine Rolle. Diese ist jedoch für die verschiedenen Pflanzenarten und Metalle unterschiedlich (Steffens, 1990). Aus den bislang bekannten Daten wird deutlich, dass weitere Toleranzmechanismen wie z. B. Metallothioneine in den Pflanzenzellen benötigt werden, wenn andere Metalle als Cadmium detoxifiziert werden müssen. Alkali- und Erdalkali-Ionen induzieren nicht die Synthese von Phytochelatinen, da sie nur eine geringe Affinität zu SH-Gruppen besitzen (Grill et al., 1989). Murphy and Taiz (1997) konnten eine vermehrte Expression des MT2-Gens durch  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$ , aber nicht durch  $\text{Al}^{3+}$ , nachweisen. Möglicherweise dienen in einigen Pflanzen Phytochelatine zur Homöostase von  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  (Grill et al., 1987). Eine Induktion der Phytochelatinsynthese durch Metalle wie  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,

$\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  oder  $\text{Zn}^{2+}$  im Medium wurde von mehreren Autoren beobachtet. Eine Bindung dieser Metalle an Phytochelatine konnte aber bislang nicht sicher nachgewiesen werden (Grill et al., 1985, 1987, 1989; Steffens, 1990; Howden et al., 1995 b, Ostwald et al., 1999 b).

#### 4.4 Wachstum von Hanfpflanzen unter Einfluss von Schwermetallen

Metalle wie  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  oder  $\text{Pb}^{2+}$  sind im Boden zu einem großen Teil an feste Bodenbestandteile wie Silikate, Ton, Kalk oder Huminstoffe gebunden. An Feststoffe gebundene oder in der flüssigen Phase vorliegende Metalle können von Pflanzen durch Austauschadsorption mobilisiert werden. Vor allem die Wurzeln der Pflanzen sind den Metallen im Boden ausgesetzt (Rauser, 1990). Durch die Wurzeln aufgenommenes und in die Blätter transportiertes  $\text{Cd}^{2+}$  behindert die Integration der Chlorophyllmoleküle in die photosynthetisch aktiven Komplexe und inhibiert die Chlorophyllsynthese (Parekh et al., 1990; Horvath et al., 1996). Pflanzen stellen damit einen potentiellen Eintrittspunkt für Schwermetalle in die Nahrungskette dar. 75 % des durch die Nahrung aufgenommenen  $\text{Cd}^{2+}$  stammt aus Gemüse, Kartoffel- und Getreideprodukten (Rauser, 1990; Jansson and Öborn, 1997). Die Halbwertszeit von  $\text{Cd}^{2+}$  im menschlichen Körper beträgt ca. 20 Jahre. Von der WHO wurde aus diesem Grunde eine maximale Aufnahme von 60-70  $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{Tag}$  festgesetzt (WHO, 1972).

Neben dem essentiellen Nährstoff  $\text{Cu}^{2+}$  wurden in den hier beschriebenen Untersuchungen die nicht essentiellen Schwermetalle  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Pb}^{2+}$  eingesetzt, die zudem die stärksten Induzierer der PC-Synthese in Hanf-Suspensionskulturen darstellten. Untersuchungen zur Aufnahme von Schwermetallen durch Hanfpflanzen wurden, wie von Rauser (1998) gefordert, so durchgeführt, dass die Schwermetallgehalte im Boden zwischen stark gedüngten und stark belasteten Böden liegen. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten maximalen Schwermetallkonzentrationen (Tab. 4.5) entsprachen denen in mit Klärschlamm gedüngten Böden im Raum Hagen nachgewiesenen Schwermetallkonzentrationen (Hygieneinstitut des Ruhrgebietes, 1997). Da die eingesetzten Metalle in einem Wettbewerb zur Aufnahme und Akkumulation durch die Pflanzen stehen, wurden sie in den durchgeführten Experimenten nicht als Gemisch eingesetzt, um die Auswirkungen der einzelnen Metalle auf die Pflanzen untersuchen zu können. In der jüngeren Vergangenheit wurden weltweit viele Böden auf ihren  $\text{Cd}^{2+}$ -,  $\text{Cu}^{2+}$ - bzw.  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehalt hin untersucht (Tab. 4.5).

<b>Autor</b>	<b>Region</b>	<b>Schwermetall</b>	<b>Schwermetallgehalt im Boden [ppm]</b>
Kahle et al. (1989)	Bielefeld	Cd <sup>2+</sup>	0,2 - 47
		Pb <sup>2+</sup>	62 - 1333
Keller et al. (1997)	Salez (Schweiz)	Cd <sup>2+</sup>	0,2 - 70
		Pb <sup>2+</sup>	30 - 820
		Cu <sup>2+</sup>	40 - 500
Jansson and Öborn (1997)	Schweden	Cd <sup>2+</sup>	0,062 - 0,873
Pulford et al. (1995)	Schottland (Sprengstoffproduktion)	Pb <sup>2+</sup>	300 - 2420
		Cu <sup>2+</sup>	80 - 1020
Riddel-Black et al. (1995)	England (landw. Nutzfläche)	Cd <sup>2+</sup>	5,35
		Cu <sup>2+</sup>	143
Mench and Martin (1991)	Frankreich	Cd <sup>2+</sup>	0,4 - 5,4
Theimer et al. (1997)	Blumenerde, künstlich belastet	Cd <sup>2+</sup>	1120 - 112000
		Cu <sup>2+</sup>	6350 - 63500
eigene Untersuchungen	Blumenerde, künstlich belastet	Cd <sup>2+</sup>	11,2 - 1120
		Pb <sup>2+</sup>	20,7 - 2070
		Cu <sup>2+</sup>	6,4 - 635

**Tab. 4.5:** Schwermetallgehalte belasteten Böden verschiedener Regionen bzw. in der in den Gewächshaus-Experimenten eingesetzten, künstlich mit Schwermetallen versetzten Blumenerde

Regional wurden sehr unterschiedlich Schwermetallgehalte nachgewiesen, abhängig vor allem von der in der Region angesiedelten Industrie (Erz- und Kohleminen, Erzhütten, Stahlwerke).

Untersuchungen zur Aufnahme von Schwermetallen durch Pflanzen wurden bislang in den meisten Fällen im Gewächshaus mit standardisierter Erde oder in Nährlösungen durchgeführt (Gawel et al., 1995; Randall, 1995; Theimer et al., 1997; Rauser, 1998). Labor- bzw. Gewächshausexperimente können jedoch nur schwer natürliche Feldbedingungen simulieren. Daten zum Wachstum und zur Schwermetallaufnahme durch Pflanzen im Freiland gibt es dagegen nur wenig (Randall, 1995; Salt and Raskin, 1995; Schat et al., 1997).

Alle höheren Pflanzen sind in der Lage, Schwermetalle aus dem Boden aufzunehmen. Die Aufnahme hängt jedoch stark von der Pflanzenart, dem Metall, dem pflanzeninternen Transport der Metalle und der Toleranz gegenüber den Metallen ab (Baker, 1995; Baker et al., 1997; Schat et al., 1997). Zur Phytoremediation geeignete Pflanzen sollten neben einer großen Biomasse eine

hohe Toleranz besitzen und die Schwermetalle in der Hauptsache im Spross akkumulieren. Zu diesen Hyperakkumulatoren genannten Pflanzenarten zählen *Thlaspi caerulescens* (bis zu 4 %  $\text{Ni}^{2+}$  in der Trockenmasse) und *Brassica juncea* (Raskin et al., 1994; Baker, 1995; Kumar et al., 1995). Schwermetallakkumulierende Nutzpflanzen wie *Brassica juncea* stellen aber auch ein Problem dar, wenn belastete Rohstoffe zu Nahrungsmitteln verarbeitet werden und die Schwermetalle so in die Nahrungskette gelangen (Landberg and Greger, 1995).

Die Aufnahme von Schwermetallen kann auch in verschiedenen Sorten von Pflanzen einer Spezies sehr unterschiedlich sein. Zur Zeit werden Weizensorten auf ihre Fähigkeit hin untersucht,  $\text{Cd}^{2+}$  aus dem Boden aufzunehmen. Von besonderem Interesse ist es, die Verteilung des  $\text{Cd}^{2+}$  in den Pflanzen zu untersuchen. Zur landwirtschaftlichen Nutzung wären nur Weizensorten geeignet, die das aufgenommene  $\text{Cd}^{2+}$  in einem möglichst großen Umfang in den Wurzeln und nicht in den Ähren speichern (Rauser; 1998). Theimer et al. (1997) untersuchten die sorten- und konzentrationsspezifischen Unterschiede in der Aufnahme von Schwermetallen durch Hanfkeimlinge. Dabei ergaben sich deutliche Unterschiede in der Toleranz der Hanfsorten gegenüber den Metallen Kupfer, Chrom und Zink. Für einen Vergleich der Aufnahme von  $\text{Cd}^{2+}$  bzw.  $\text{Pb}^{2+}$  wurden zwei verschiedene in Deutschland angebaute Hanfsorten (Felina 34, Fedora) und ein Vertreter der *Brassicaceen* (Raps, Sorte: Pronto) verwendet. 6 Tage nach der Aussaat auf 10 mM  $\text{Cd}^{2+}$  bzw.  $\text{Pb}^{2+}$  im Boden (1120 bzw. 2070 ppm) wurden in Keimlingen der Hanfsorte Felina 34 bis zu 38 % höhere  $\text{Cd}^{2+}$ - bzw. 70 % höhere  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehalte als in den anderen beiden Pflanzensorten nachgewiesen (Kap. 3.3.1.1, Abb. 3.31). Die Akkumulation von Schwermetallen im Vergleich zum Schwermetallgehalt (SM-Gehalt) im Boden lässt sich folgendermaßen berechnen (Macnair, 1997):

$$\text{Akkumulation} = \frac{\text{SM-Gehalt in belasteten Pflanzen}[\mu\text{g/g TG}] - \text{SM-Gehalt in Kontrollpflanzen} [\mu\text{g/g TG}]}{\text{SM-Gehalt im belasteten Boden} [\mu\text{g/g TG}]}$$

Es ist bekannt, dass im Boden befindliches  $\text{Pb}^{2+}$  stark an Mineralien und Huminstoffe gebunden wird und damit nur in geringem Umfang für die Pflanzen verfügbar ist (Huang et al., 1997; Fan and Higashi, 1995). Keimlinge der Hanfsorte Felina 34 zeigten eine deutliche Aufnahme der Metalle aus dem Boden. Von einer Anreicherung kann in diesem frühen Wachstumsstadium aber noch nicht gesprochen werden. Zudem wurde  $\text{Pb}^{2+}$  in wesentlich geringerem Umfang in den Keimlingen akkumuliert als  $\text{Cd}^{2+}$ . 6 Tage nach der Anzucht auf mit 10 mM  $\text{Cd}^{2+}$ - bzw.  $\text{Pb}^{2+}$ -belastetem Boden wurde für Felina 34-Keimlinge ein Akkumulationsfaktor von 0,46 ( $\text{Cd}^{2+}$ ) bzw. 0,17 ( $\text{Pb}^{2+}$ ) berechnet.

Wurzeln sind den toxischen Schwermetallen am stärksten ausgesetzt und üben die Kontrolle über den Transport der Metalle in den Spross aus. Von daher ist es von besonderem Interesse, die in den Wurzeln lokalisierten Toleranzmechanismen zu untersuchen (Rauser, 1990). Die Toleranz von Pflanzen gegenüber Schwermetallen lässt sich folgendermaßen berechnen (Macnair, 1995):

$$\text{Toleranz} = \frac{\text{Wurzellänge (belastete Pflanzen)}}{\text{Wurzellänge (Kontrollpflanzen)}}$$

Die verwendeten Hanf- bzw. Rapssorten Felina 34, Fedora und Pronto reagierten sehr unterschiedlich auf die im Boden befindlichen Schwermetalle (0, 10, 20 bzw. 200 mM  $\text{Cd}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ ). Der geringste Einfluss der Schwermetalle auf das Wachstum wurde für die Rapssorte Pronto nachgewiesen. Besonders stark wurde das Wurzel- und Sprosswachstum der Hanfsorte Fedora beeinflusst (Kap. 3.3.1.1, Abb. 3.33, Abb. 3.34). Aufgrund der erhaltenen Daten wurde die Hanfsorte Felina 34 für die weiteren Versuche eingesetzt. Für die verwendeten Sorten wurden die in Tab. 4.6 dargestellten Toleranzfaktoren gegenüber den verschiedenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen im Boden berechnet.

	<b><math>\text{Cd}^{2+}</math>-Gehalt im Boden [mM]</b>		
	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>200</b>
<b>Wurzeln</b>			
Felina 34	0,71	0,64	0,17
Fedora	0,60	0,46	0,15
Pronto	0,97	0,72	0,25
<b>Spross</b>			
Felina 34	0,88	0,86	0,40
Fedora	0,93	0,59	0,20
Pronto	0,94	0,73	0,44

**Tab. 4.6:** Toleranzfaktoren der Hanfsorten Felina 34 und Fedora sowie der Rapssorte Pronto gegenüber verschiedenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen im Boden

Es wird deutlich, dass die Ausbildung der Wurzeln stärker durch die Schwermetalle beeinflusst wurde als das Wachstum des Sprosses. Für viele Pflanzen wurde eine Reduktion des Wurzel- bzw. Sprosswachstums in Abhängigkeit von der im Wachstumsmedium befindlichen Schwermetallkonzentration beobachtet, die sich durch einen erhöhten Energiebedarf zur

Detoxifizierung der Schwermetalle durch die Pflanzen erklären lässt (Kahle et al., 1989; Macnair, 1995; Theimer et al., 1997).

Pflanzen nehmen im Boden befindliche toxische Schwermetalle durch Mechanismen auf, die zur Aufnahme essentieller Nährstoffe gebraucht werden. Dabei kann es sich um eine passive (Ionenkanäle in der Plasmamembran) oder eine aktive (Carrierproteine in der Plasmamembran) Aufnahme handeln (Grill, 1989; Steffens, 1990; Baker, 1995; Kochian, 1997). Die Mobilisierung der im Boden gebundenen Schwermetalle erfolgt hauptsächlich durch von Wurzeln sekretierte Proteine, Zucker und organische Säuren (Mench and Martin, 1991; Cunningham, 1995; Fan and Higashi, 1995; Welch and Novell, 1997). Die eingesetzten Schwermetalle  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  wurden durch Wurzeln der Hanfpflanzen im Keimungsverlauf in unterschiedlichem Maß aufgenommen (Kap. 3.3.1.2, Abb. 3.35 - 3.37). Ein Ausschluss der Schwermetalle durch die Wurzeln, wie er von Baker (1995) für andere Pflanzenarten beschrieben wurde, fand durch Hanfpflanzen nicht statt. In vielen Untersuchungen korrelierte die Aufnahme der Schwermetalle durch die Wurzeln mit der im Boden befindlichen Schwermetallkonzentration (Blum, 1997; Keller et al., 1997). Für Felina 34-Pflanzen ließ sich im Wachstumsverlauf eine Korrelation der Schwermetallaufnahme mit dem Schwermetallgehalt im Boden für  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Pb}^{2+}$  nachweisen. Die Verzehnfachung des  $\text{Cd}^{2+}$ - bzw.  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehaltes im Boden führte zu einem 8,3-fach bzw. 10,8-fach höheren  $\text{Cd}^{2+}$  bzw.  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehalt in den Hanfpflanzen.

Die berechneten Akkumulationsfaktoren zeigen, dass nur  $\text{Cd}^{2+}$  in einem ähnlichen Maße in den Wurzeln von Hanfkeimlingen angereichert wurde, die dem im Boden befindlichen Schwermetallgehalt entsprach. 10 Tage nach der Aussaat auf 10 mM  $\text{Cd}^{2+}$  konnte ein maximaler Akkumulationsfaktor von 0,98 nachgewiesen werden (Tag 5: 0,40). Die Akkumulation von  $\text{Pb}^{2+}$  (Tag 5: 0,23, Tag 10: 0,42) betrug etwa 50 %, die Akkumulation von  $\text{Cu}^{2+}$  nur etwa 25 % (Tag 5: 0,11) der  $\text{Cd}^{2+}$ -Akkumulation in Hanfpflanzen. Die Bindung von  $\text{Pb}^{2+}$  an im Boden befindliche Huminstoffe (Cunningham, 1995; Fan and Higashi, 1995) kann eine Erklärung dafür darstellen, dass weniger  $\text{Pb}^{2+}$  (869  $\mu\text{g/g}$  TG) als  $\text{Cd}^{2+}$  (1103  $\mu\text{g/g}$  TG) durch die Hanfpflanzen aufgenommen wurde (Kap. 3.3.1.2, Abb. 3.35 - 3.37).  $\text{Cu}^{2+}$  wurde im geringsten Umfang durch die Hanfpflanzen aufgenommen. Hohe  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen erwiesen sich zudem als toxisch (Daten nicht gezeigt).

Die Regulation des Metallhaushaltes in Pflanzen kann durch unterschiedliche Mechanismen wie der Bindung an die Zellwände, reduzierter Transport über die Membranen, Komplexierung oder Kompartimentierung erfolgen (Gekeler et al., 1989; Macnair, 1997). Pflanzen synthetisieren

verschiedene Liganden, die zur Komplexierung von Metallen eingesetzt werden können. Im Vordergrund stehen dabei die bereits im Vorfeld erwähnten organischen Säuren wie Citrat oder Malat, thiolhaltige Verbindungen wie PC's, GSH oder MT's, aber auch Polyhydroxyphenole (Reese and Wagner, 1987; Howden et al., 1995 a und b; Neumann et al., 1995; Rauser, 1999).

Viele Metalle sind in der Lage, die Synthese von Phytochelatinen zu induzieren ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ). Es wird vermutet, dass PC's an der Homöostase von  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  beteiligt sind. In der Entgiftung von  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  spielen PC's jedoch nur eine geringe Rolle (Grill et al., 1987; Howden et al., 1995 b). Auf  $\text{Cd}^{2+}$ -,  $\text{Pb}^{2+}$ - bzw.  $\text{Cu}^{2+}$ -belastetem Boden (1 mM) gewachsene, 8 Tage alte Hanfpflanzen wurden auf ihren Phytochelatingehalt hin untersucht. Elutionsprofile dieser Pflanzen zeigen, dass weder in der Kontrolle noch in den mit  $\text{Pb}^{2+}$ - bzw.  $\text{Cu}^{2+}$ -belasteten Pflanzen Phytochelatine nachweisbar waren (Kap. 3.3.2.1, Abb. 3.38). In diesen Elutionsprofilen konnten die Thiolverbindungen Cys, GSH und  $\gamma$ -EC nachgewiesen werden. In Hanf-Suspensionskulturen stellten  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Pb}^{2+}$  neben  $\text{Cd}^{2+}$  dagegen die stärksten Induzierer der Phytochelatinsynthese dar (Kap. 3.2.5, Abb. 3.25). Die Detoxifizierung von  $\text{Cu}^{2+}$  scheint in verschiedenen Pflanzen durch unterschiedliche Mechanismen zu erfolgen. In der gemeinen Grasnelke wurde  $\text{Cu}^{2+}$  an Polyhydroxyphenole und an die Zellwände gebunden (Neumann et al., 1995). Zudem wurden als Reaktion auf den  $\text{Cu}^{2+}$ -Stress Heat Shock Proteine (HSP's) gebildet. Gupta and Goldsbrough (1990) konnten in Tomatenkulturen ebenfalls die Bildung von HSP's und die Bindung von  $\text{Cu}^{2+}$  an GSH nachweisen. In *Arabidopsis* wurde die Existenz verschiedener MT-Gene nachgewiesen. Es wird davon ausgegangen, dass Metallothioneine ebenfalls an der Detoxifizierung von  $\text{Cu}^{2+}$  beteiligt sind (Robinson et al., 1993; Zhou and Goldsbrough, 1994). Eine Komplexierung von Schwermetallen durch PC's konnte bislang nur sicher für  $\text{Cd}^{2+}$  nachgewiesen werden (Gupta and Goldsbrough, 1991).

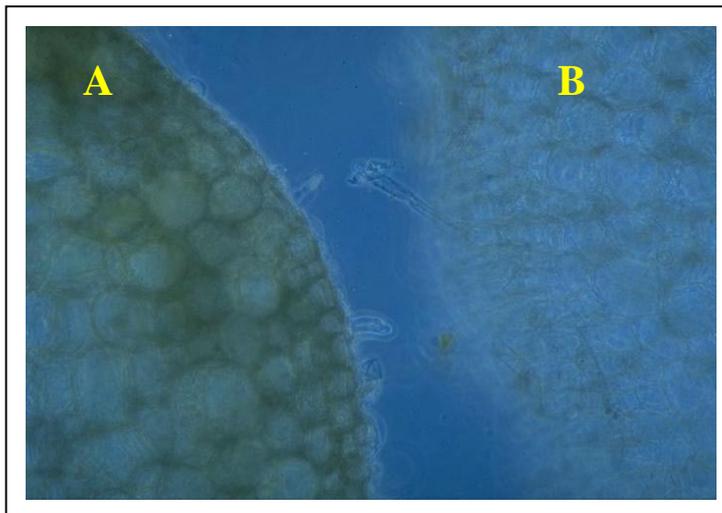
Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen zur Induktion der Phytochelatinsynthese von Pflanzen in ihrer natürlichen Umgebung. In mehreren Gemüsesorten wurde bei niedriger  $\text{Cd}^{2+}$ -Belastung im Boden eine Bindung von  $\text{Cd}^{2+}$  an organische Säuren gefunden. Erst bei höheren  $\text{Cd}^{2+}$ -Belastungen im Boden wurde das aufgenommene  $\text{Cd}^{2+}$  durch PC's komplexiert und so detoxifiziert (Gawel et al., 1995; Wagner et al., 1995). Geringe  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen im Boden (< 50  $\mu\text{M}$ ) führten zu keiner detektierbaren PC-Induktion in Hanfpflanzen (Daten nicht gezeigt). Das Elutionsprofil  $\text{Cd}^{2+}$ -belasteter Pflanzen (1 mM) zeigte das für Hanf typische Muster thiolreicher Peptide. Neben Cys, GSH und  $\gamma$ -EC wurden die Phytochelatine  $\text{PC}_2$ ,  $\text{PC}_3$  und  $\text{PC}_4$  detektiert.  $\text{PC}_3$  nahm dabei, wie auch bereits in Hanf-Kallus- bzw. Suspensionskulturen, eine dominierende Stellung ein.

Betrachtet man die Gehalte an Cystein und GSH im Keimungsverlauf unbelasteter Pflanzen, so zeigt sich, dass beide Gehalte im Laufe der ersten beiden Tage nach der Aussaat um 28 % (6,5 nM/g FG bzw. 38 nM/g FG) anstiegen, um im Laufe der folgenden 13 Tage um 74 % (Cys) bzw. 55 % (GSH) zurückzugehen (Kap. 3.3.2.1, Abb. 3.39). Wurden Hanfpflanzen auf  $\text{Cd}^{2+}$ -belastetem Boden (5 mM) angezogen, nahm der Gehalt an GSH innerhalb der ersten beiden Tage nach der Aussaat um das 5-fache (148 nM/g FG) und damit wesentlich stärker zu als in den Kontrollpflanzen (Kap. 3.3.2.1, Abb. 3.40). In verschiedenen Pflanzen konnte eine bis zu 6,5-fache Zunahme des GSH-Gehaltes während des Wachstums auf  $\text{Cd}^{2+}$ -belasteten Böden beobachtet werden (Vögeli-Lange and Wagner, 1990). Der GSH-Gehalt in den Hanfpflanzen nahm im Laufe der folgenden 6 Tage stark ab. Zwischen dem 8. und dem 15. Tag nach der Aussaat stieg der GSH-Gehalt schließlich auf das 5-fache des Gehaltes der Kontrollpflanzen an. Der in  $\text{Cd}^{2+}$ -belasteten, 15 Tage alten Hanfpflanzen nachgewiesene Cys-Gehalt betrug das 22-fache des in den Kontrollpflanzen nachgewiesenen Cys-Gehaltes.

Der Gehalt an Phytochelatinen in Hanfpflanzen nahm im Laufe der betrachteten Wachstumsphase (0 - 15 Tage nach der Aussaat) deutlich zu (Kap. 3.3.2.1, Abb. 3.40). Diese Abhängigkeit des PC-Gehaltes, aber auch der Zusammensetzung der Phytochelatine, von der Inkubationsdauer wurde bisher von mehreren Autoren beschrieben. Die bislang vorliegenden Daten wurden jedoch nahezu ausschließlich durch Untersuchungen an Zellkulturen und nicht an auf Erde gezogenen Pflanzen erhalten und sind damit nur wenig mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten vergleichbar (Gupta and Goldsbrough 1990; Rauser, 1990; Steffens, 1990; Ostwald et al., 1999 b).

In Hanf-Suspensionskulturen wurde bereits nach 72 h eine Abnahme des PC-Gehaltes nachgewiesen (Kap. 3.2.2, Abb. 3.17). Der Gesamt-PC-Gehalt in den Hanfpflanzen nahm zwischen dem 2. und dem 15. Tag nach der Aussaat dagegen um das 23-fache zu. Bis zum 8. Tag nach der Aussaat konnten nur geringere Differenzen im PC-Gehalt der Hanfpflanzen nachgewiesen werden (Tag 2: 43 nM/g FG; T8: 73 nM/g FG), die die starke Abnahme des GSH-Gehaltes nicht erklären können. Möglicherweise wurde das GSH in anderen, stressbedingten Reaktionen benötigt (Baker, 1981). Ab dem 10. Tag nach der Aussaat wurde ein starker Anstieg der PC-Synthese festgestellt (T10: 655 nM/g FG; T15: 1042 nM/g FG). Die verstärkte Akkumulation von PC's ab dem 10. Tag nach der Aussaat (9-fach, zwischen Tag 8 und Tag 10 nach der Aussaat) ging mit einer eher stagnierenden Akkumulation von  $\text{Cd}^{2+}$  durch die Hanfpflanzen einher (Kap. 3.3.1.2, Abb. 3.35). Während der Phase der stärksten  $\text{Cd}^{2+}$ -Akkumulation (19-fach, zwischen Tag 2 und Tag 8 nach der Aussaat) stieg der PC-Gehalt

nur um das 1,7-fache an (Kap. 3.3.2.1, Abb. 3.40). Es ist vorstellbar, dass in der frühen Wachstumsphase ein Grossteil des aufgenommenen  $\text{Cd}^{2+}$  in der Zellwand an Pektine gebunden wurde (Abb. 4.3). Ein geringer Anteil an  $\text{Cd}^{2+}$  gelangt möglicherweise durch unspezifische Aufnahme (Ionenkanäle) in die Zellen und löste die geringe Induktion der PC-Synthese aus. Ab dem 8. Tag nach der Aussaat gelangte offensichtlich eine größere Menge  $\text{Cd}^{2+}$  in die Zellen, möglicherweise bedingt durch erhöhten aktiven bzw. inaktiven Transport oder durch eine Freisetzung des  $\text{Cd}^{2+}$  aus den Zellwänden, was auf eine verstärkte Synthese von Phytochelatinen hindeuten könnte (Gekeler et al., 1989; Gawel et al., 1995; Wagner et al., 1995; Macnair, 1997).



**Abb. 4.3:** Wurzelschnitte A:  $\text{Cd}^{2+}$ -belasteter (200 mM  $\text{Cd}^{2+}$  im Substrat) bzw. B: unbelasteter Hanfkeimlinge,  $\text{Cd}^{2+}$  gefällt mit  $\text{H}_2\text{S}$

Auch die Zusammensetzung der Phytochelatine änderte sich zwischen dem 2. und 15. Tag nach der Aussaat.  $\text{PC}_3$  nahm zu jedem Zeitpunkt die dominierende Stellung ein (47,7 bzw. 71,7 %). Der Anteil an  $\text{PC}_2$  ging im Laufe der Wachstumsphase stark zurück (von 24 % auf 7,6 %), während sich der Anteil an  $\text{PC}_4$  am Gesamtphytochelatingehalt nur geringfügig änderte (von 28,3 % auf 20,7 %). Diese Dominanz einzelner PC's wurde auch von Gupta and Goldsbrough (1990, 1991) in Tomaten-Kulturen und in Hanf-Kallus- bzw. Suspensionskulturen (Ostwald et al., 1999 a) nachgewiesen.

Die Toleranz von Pflanzen gegenüber  $\text{Cd}^{2+}$  kann durch eine schnellere Reaktion auf das toxische Schwermetall und durch die vermehrte Synthese von längerkettigen PC's erhöht werden (Verkleij et al., 1995). In Elutionsprofilen der Extrakte aus auf 0,5 mM bzw. 20 mM  $\text{Cd}^{2+}$  im Boden angezogenen Hanfpflanzen (9 Tage alt) konnten die Phytochelatine  $\text{PC}_2$ ,  $\text{PC}_3$  und  $\text{PC}_4$  nachgewiesen werden (Kap. 3.3.2.1, Abb. 3.41). Der Phytochelatingehalt hing dabei von der im

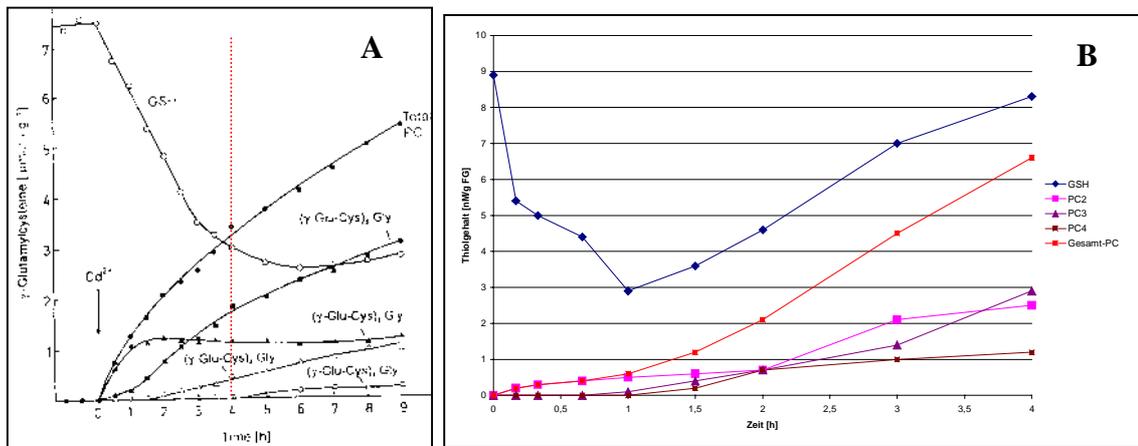
Boden befindlichen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration ab. Eine Betrachtung der Abhängigkeit der PC-Synthese in Hanfpflanzen von der im Boden befindlichen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration ergab, dass eine 50-fache Erhöhung des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes (100  $\mu\text{M}$  auf 5000  $\mu\text{M}$ ) nur eine 2,2-fache Erhöhung des PC-Gehaltes zur Folge hatte. Wurde der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt im Boden von 100 auf 500  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  erhöht, konnte nur eine geringfügige Erhöhung des PC-Gehaltes in den Hanfpflanzen nachgewiesen werden. Eine weitere Erhöhung der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration im Boden um das 4-fache (von 5000 auf 20000  $\mu\text{M}$ ) hatte eine 1,8-fache Erhöhung des PC-Gehaltes zur Folge. Es scheint ein Grenzwert der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration im Boden zu existieren, bis zu dem die Synthese von Phytochelatinen nur in geringerem Umfang zur Detoxifizierung des  $\text{Cd}^{2+}$  in den Wurzelzellen der Hanfpflanzen benötigt wird. Das aufgenommene  $\text{Cd}^{2+}$  wird entweder an die Zellwand gebunden oder durch andere Mechanismen, z. B. durch Bindung an organische Säuren, entgiftet (Wagner et al., 1995). Erst höhere  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen im Boden ( $> 500 \mu\text{M}$ ) machen eine verstärkte Synthese von PC's notwendig, um das nun verstärkt in die Zellen gelangende  $\text{Cd}^{2+}$  zu detoxifizieren.

In beiden Elutionsprofilen (Kap. 3.3.2.1, Abb. 3.41) war  $\text{PC}_3$  das eindeutig dominant vertretene Phytochelatin. Zwischen den PC-Peaks wurde eine Vielzahl kleiner Peaks bislang nicht identifizierter Verbindungen detektiert, bei denen es sich um Abbauprodukte wie Cys-PC's oder DesGly-PC's handeln könnte, wie sie in Elutionsprofilen von Tomatenkulturen (Cys-PC's, Kap. 3.2.6, Tab. 3.5) gefunden wurden. Zudem wurde in verschiedenen Pflanzenarten die Induktion von Heat Shock Proteinen und anderen bislang nicht identifizierten Peptiden, als Reaktion auf  $\text{Cd}^{2+}$ -Stress, nachgewiesen (Vögeli-Lange and Wagner, 1990; Neumann et al., 1995; Didierjean et al., 1996).

Die Induktion der PC-Synthese ist eine adaptive Antwort auf  $\text{Cd}^{2+}$ -Stress. Höhere  $\text{Cd}^{2+}$ -Belastungen im Boden führen zu einer verstärkten Synthese besonders höherer Phytochelatine (Gupta and Goldsbrough, 1990; Vögeli-Lange and Wagner, 1990; Wager et al., 1995; Zenk, 1996). Die Zusammensetzung der Phytochelatine änderte sich in Hanfpflanzen mit zunehmender  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration im Boden. Sowohl bei 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  als auch bei 20.000  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  im Boden stellte  $\text{PC}_3$  das dominierende Phytochelatin dar (67,4 % bzw. 66,5 %; Kap. 3.3.2.1, Abb. 3.42). Die Anteile von  $\text{PC}_2$  (6 % bzw. 17,8 %) und  $\text{PC}_4$  (26,6 % bzw. 15,7 %) änderten sich dagegen deutlich mit steigender  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration im Boden. Dabei fällt auf, dass höhere  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen zu einer stärkeren Akkumulation von  $\text{PC}_2$  und nicht dem länger-kettigen  $\text{PC}_4$  führten, wie sie für andere Pflanzen und Suspensionskulturen nachgewiesen wurde (Gupta and Goldsbrough, 1990, 1991; Kap. 3.2.3, Abb. 3.19). Es ist möglich, dass die Synthese von  $\text{PC}_4$

aufgrund der sehr hohen  $\text{Cd}^{2+}$ -Belastung der Hanfpflanzen nicht erfolgen kann, da die zur Synthese von  $\text{PC}_4$  benötigten  $\text{PC}_3$ -Moleküle umgehend zur Komplexierung des in den Zellen befindlichen  $\text{Cd}^{2+}$  benötigt werden und so auch eine Akkumulation des zur Synthese höherer  $\text{PC}$ 's benötigten  $\text{PC}_2$  stattfindet (Bruns, 1998).

Gelangen  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen in das Innere einer Zelle (Cytosol), so müssen diese umgehend deaktiviert werden, um den Tod der Zelle zu vermeiden. Eine lag-Phase in der Synthese der Phytochelatine darf es demnach nicht geben (Zenk, 1996). Setzt man auf unbelastetem Medium angezogene *R. serpentina*-Zellen einem  $\text{Cd}^{2+}$ -belasteten Medium aus, so ließ sich nahezu unmittelbar nach der  $\text{Cd}^{2+}$ -Zugabe ein starker Rückgang des GSH-Gehaltes nachweisen. Dieser Rückgang wird von der Synthese von  $\text{PC}_2$  begleitet. Erst mehrere Stunden nach erfolgter  $\text{Cd}^{2+}$ -Zugabe konnte die Akkumulation höherer  $\text{PC}$ 's nachgewiesen werden ( $\text{PC}_3$ : 1 1/2 h,  $\text{PC}_4$ : 3 h; Grill, 1989; Zenk, 1996; Rauser, 1998). Nach Zugabe von 10 mM  $\text{Cd}^{2+}$  zu 9 Tage alten, auf unbelastetem Boden gewachsenen Hanfpflanzen konnte eine unmittelbare Reaktion auf das in die Wurzelzellen gelangende  $\text{Cd}^{2+}$  nachgewiesen werden (Kap. 3.3.2.1, Abb. 3.43, Abb. 3.44).



**Abb. 4.4:** Bildung von Phytochelatinen nach Zugabe von  $\text{Cd}^{2+}$  (200  $\mu\text{M}$  bzw. 10 mM) zu A: einer *R. serpentina*-Zellkultur (Zenk, 1996) bzw. B: 9 Tage alten Hanfpflanzen

Aus den in Abb. 4.4 dargestellten Diagrammen ist ersichtlich, dass die PC-Akkumulation als Reaktion auf zugesetztes  $\text{Cd}^{2+}$  in den beiden Systemen (*R. serpentina* bzw. Hanfpflanzen) unterschiedlich verlief. 10 Minuten nach erfolgter  $\text{Cd}^{2+}$ -Zugabe wurde ein 40%-iger (70%-iger) Rückgang des GSH- ( $\gamma$ -EC-) Gehaltes und die beginnende Synthese von  $\text{PC}_2$  nachgewiesen. Die GSH- und  $\gamma$ -EC-Gehalte erreichten 60 Minuten nach der  $\text{Cd}^{2+}$ -Zugabe ein Minimum, das in *R. serpentina*-Zellkulturen erst nach 6 h erreicht wurde (Zenk, 1996), während sich der GSH-Gehalt in den Hanfpflanzen nach 4 h nahezu vollständig erholt hatte. Die Abnahme des GSH-/ $\gamma$ -EC-Gehaltes in den Hanfpflanzen führte nicht zu einer äquivalenten Zunahme der

PC-Akkumulation. Der Verbrauch von GSH durch andere, stressbedingte Stoffwechselwege erscheint dabei am wahrscheinlichsten (Baker, 1981).

Der Gehalt an PC<sub>2</sub> stieg in Hanfpflanzen 4 h nach der Zugabe von Cd<sup>2+</sup> weiter an (Abb. 4.4; Kap. 3.3.2.1, Abb. 3.44), während der PC<sub>2</sub>-Gehalt in *R. serpentina* nach 2 h eher stagnierte. Der Gehalt an PC<sub>3</sub> überstieg den Gehalt an PC<sub>2</sub> nach 3,5 h (*R. serpentina*: 2,5 h). Der Gesamt-PC-Gehalt in den Hanfpflanzen war deutlich geringer als in *R. serpentina*-Zellkulturen und überstieg während der ersten 4 h nach Cd<sup>2+</sup>-Zugabe zu keinem Zeitpunkt den GSH-Gehalt. Es wird aber deutlich, dass die Zugabe von Cd<sup>2+</sup> zum Boden zu einer ebenso schnellen Reaktion der Wurzelzellen führte, wie die Zugabe von Cd<sup>2+</sup> zu auf flüssigem Nährmedium angezogenen *R. serpentina*-Zellkulturen, in dem Cd<sup>2+</sup> besser verfügbar sein sollte als im Huminstoff- oder Ton-enthaltenden Boden. Allerdings wurde nach 4 h in den Hanfpflanzen 6,6 nM/g FG) nur 1/500 des in den *R. serpentina*-Zellkulturen nachgewiesenen PC-Gehaltes (3,2 µM/g FG) gefunden.

Die bisher diskutierten Daten beschäftigten sich nahezu ausschließlich mit der Aufnahme von Schwermetallen und der Induktion der PC-Synthese in den Wurzeln von Hanfpflanzen. Die Wurzeln üben die Kontrolle über den Transport von Nährstoffen in die oberirdischen Organe aus. Je nach Ziel (Phytostabilisation mit Nutzung der Rohstoffe oder Phytoextraktion) ist es von Interesse, ob die aufgenommenen Schwermetalle in den Wurzeln verbleiben oder in den Spross transportiert werden. Viele Pflanzen sind in der Lage, Schwermetalle in ihre oberirdischen Organe zu transportieren (Rauser, 1990, 1998; Smith et al., 1995). Dieser Transport wird durch mehrere Faktoren limitiert bzw. beeinflusst. Dazu zählt z. B. die Verfügbarkeit von Cd<sup>2+</sup> in der Rhizosphäre, die Art des in den Wurzeln stattfindenden Transportes (apoplastisch bzw. symplastisch) und die Komplexbildung der Ionen in den Vakuolen der Wurzelzellen (Salt and Raskin, 1995). Pb<sup>2+</sup>-Ionen werden zu einem Großteil in den Wurzeln komplexiert und gelagert, aber in nur sehr geringem Umfang in die oberirdischen Organe transportiert (Huang et al., 1997). Während der frühen Wachstumsphase von Hanfpflanzen (Tag 0 - Tag 11) auf belasteten Böden fand nur ein geringer Transport von Cd<sup>2+</sup> bzw. Pb<sup>2+</sup> in die oberirdischen Organe statt (Kap. 3.3.2.2; Abb.3.45). Im Stengel (Blatt) 11 Tage alter Hanfpflanzen konnten bis zu 15 % (6,7 %) des in den Wurzeln gefundenen Cd<sup>2+</sup>- bzw. Pb<sup>2+</sup>-Gehaltes nachgewiesen werden. Diese Daten lassen aber noch keine Rückschlüsse auf die Verteilung der Schwermetalle in den Pflanzen am Ende der Vegetationsperiode zu.

Im Spross können Schwermetalle über das Phloem und über das Xylem transportiert werden. Dabei binden sie vor allem an organische Säuren, Histidin und wahrscheinlich auch PC's (Salt and Raskin, 1995; Popelka et al., 1996). In den Blättern müssen die  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen umgehend inaktiviert werden, da sie sich negativ auf die Chlorophyll-Biosynthese und andere Stoffwechselwege auswirken (Kneer and Zenk, 1992). Diese Inaktivierung kann durch Bindung an organische Säuren oder PC's erfolgen, wozu jedoch nur sehr wenige Untersuchungen durchgeführt wurden (Rauser, 1990, 1998; Smith et al., 1995). Die Elutionsprofile der einzelnen Organe  $\text{Cd}^{2+}$ -belasteter Hanfpflanzen (Tag 15, 5 mM  $\text{Cd}^{2+}$  im Boden) zeigen, dass sowohl im Stengel als auch in den Blättern PC's akkumuliert wurden, jedoch in wesentlich geringerem Maße als in den Wurzeln (Kap. 3.3.2.2; Abb. 3.46). Die Quantifizierung der PC-Gehalte in den Extrakten der einzelnen Organe ergab, dass der PC-Gehalt in den oberirdischen Organen von der im Boden befindlichen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration linear abhängig war (Kap. 3.3.2.2; Abb. 3.47, Abb. 3.48). Eine Verzehnfachung der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration von 0,5 auf 5 mM im Boden führte zu einem 1,7-fach höheren PC-Gehalt in den Wurzeln (Stengel: 3-fach; Blätter: 11,8-fach). Demnach gelangte bei höheren  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen im Boden ein größerer Anteil des aufgenommenen  $\text{Cd}^{2+}$  in die Blätter der Hanfpflanzen und wurde dort vermehrt durch PC's komplexiert. In den Wurzeln auf 5 mM  $\text{Cd}^{2+}$  im Boden angezogener Hanfpflanzen wurden 33-mal höhere PC-Gehalte nachgewiesen als in den Stengeln und 233-mal mehr als in den Blättern. Damit entsprach die Akkumulation von Phytochelatinen nicht den in den oberirdischen Organen nachgewiesenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalten. Eine Komplexierung des  $\text{Cd}^{2+}$  in den Blättern durch organische Säuren könnte die Erklärung dafür sein, dass nur geringe PC-Gehalte in den Blättern detektierbar waren (Smith et al, 1995). Neben den Phytochelatinen wurden vor allem in den Blättern eine Vielzahl anderer Verbindungen nachgewiesen, die in der Regel später als die PC's eluierten, bislang aber nicht identifiziert wurden. Daten zur Komplexierung von  $\text{Cd}^{2+}$  durch andere Liganden als Phytochelatine wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht erhoben.

#### 4.5 Einfluss von Cadmium auf Hanf- bzw. Weizenpflanzen im Laufe einer Wachstumsperiode

In der Phytoremediation oder -stabilisation Verwendung findende Pflanzenarten müssen sich als resistent gegenüber Schwermetallen und eventuell schlechten Bodenqualitäten erweisen (Punshon and Dickinson, 1997). Während der ersten 17 Tage nach der Aussaat wurden kaum Unterschiede in der Frischgewichtszunahme von Hanfpflanzen, angezogen auf 0 (Kontrolle), 200  $\mu\text{M}$  bzw. 1000  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  im Boden, festgestellt (Kap. 3.3.2.3; Abb. 3.49). Zwischen Tag 17 und Tag 31 erhöhte sich das Frischgewicht der Kontrolle und der auf mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  belastetem Boden angezogenen Pflanzen um 600 % auf 4,3 g (1000  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ : 190 % bzw. 1,2 g, nur noch eine Pflanze übrig). Nach 60 Tagen besaßen die Kontrollpflanzen ein im Mittel doppelt so hohes Frischgewicht (36,7 g) wie die auf 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  im Boden angezogenen Hanfpflanzen (19,5 g, Toleranzfaktor: 0,53). Das Frischgewicht der einzigen auf 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  im Boden überlebenden Hanfpflanze verdoppelte sich auf 2,2 g (Toleranzfaktor: 0,06). Es wird deutlich, dass die Hanfpflanzen mit einer starken Reduktion der Frischgewichtszunahme auf das im Boden befindliche  $\text{Cd}^{2+}$  reagierten. Wie bereits erwähnt geht die Toleranz von Pflanzen bzw. pflanzlichen Zellkulturen gegenüber Schwermetallen oft mit einem verringerten Wachstum einher, da die zur Toleranz benötigten Mechanismen einen hohen Energiebedarf besitzen (Kahle et al., 1989; Macnair, 1995, 1997; Theimer et al., 1997).

Als Vergleich zu den Hanfpflanzen wurden Weizenpflanzen unter gleichen Bedingungen im Gewächshaus angezogen. Zwischen Tag 0 und Tag 17 nach der Aussaat wurden nur geringe Unterschiede in der Frischgewichtszunahme von Weizenpflanzen, angezogen auf 0 (Kontrolle), 200  $\mu\text{M}$  bzw. 1000  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  im Boden, beobachtet (Kap. 3.3.2.3; Abb. 3.50). Zwischen Tag 17 und Tag 45 erhöhte sich das Frischgewicht der Kontrollpflanzen auf 927 % (4,4 g). Die auf mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  bzw. 1000  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  belastetem Boden angezogenen Weizenpflanzen zeigten eine Frischgewichtszunahme auf 697 % (3,3 g) bzw. 404 % (1,9 g). Nach 80 Tagen besaßen die Kontrollpflanzen ein im Mittel 1,2-mal so hohes Frischgewicht (31,7 g) wie die auf 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  angezogenen Weizenpflanzen (26,9 g, Toleranzfaktor: 0,85). Das Frischgewicht auf 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  angezogene Weizenpflanzen betrug 1/8 des Frischgewichtes der Kontrollpflanzen (3,6 g, Toleranzfaktor: 0,11). Anhand dieser Daten lässt sich sagen, dass auf niedrigeren  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen angezogene Weizenpflanzen eine gegenüber Hanfpflanzen erhöhte Toleranz besitzen. Eine Aussage über die Aufnahme und den Transport von  $\text{Cd}^{2+}$  durch die beiden Pflanzenarten war jedoch anhand der erhaltenen Daten noch nicht möglich.

Zur Abschätzung des Phytoremediationspotentials ist es von Interesse, die Aufnahme des zu entfernenden Schwermetalls durch die Pflanzen im Laufe und am Ende einer Vegetationsperiode zu bestimmen (Blum, 1997; Rauser, 1998). Eine Dekontamination des belasteten Bodens ist nur dann möglich, wenn die eingesetzten Pflanzenarten einen Großteil des aufgenommenen Schwermetalls in den oberirdischen Spross teilen akkumulieren. Der Transport von Schwermetallen in den oberirdischen Spross hängt sowohl von der eingesetzten Pflanzenart als auch vom Metall und der Konzentration des Metalls im Boden ab (Baker, 1981; Smith et al., 1995; Schat et al., 1997). Zur Berechnung der Akkumulationsfaktoren wird der relative  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt ( $\text{mg Cd}^{2+}/\text{kg TG}$ ) in den verschiedenen Organen herangezogen (Kap. 3.3.2.3, Abb. 3.51). Das Maximum der  $\text{Cd}^{2+}$ -Akkumulation in auf mit  $200 \mu\text{M Cd}^{2+}$  belastetem Boden angezogenen Hanfpflanzen wurde 3 Wochen nach der Aussaat erreicht ( $839 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g TG}$  in den Wurzeln, Akkumulationsfaktor: 36,9). Im Stengel betrug der maximale  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt  $70,6 \mu\text{g/g TG}$  (8. Woche, Akkumulationsfaktor: 3,14), in den Blättern  $44,3 \mu\text{g/g TG}$  (2. Woche, Akkumulationsfaktor: 1,9). Im Laufe der Wachstumsperiode von 11 Wochen änderten sich die  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in den Stengeln und den Blättern nur wenig. Die  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in den Wurzeln nahmen zwischen der 3. Woche und der 11. Woche stark ab ( $122,8 \mu\text{g/g TG}$ , Akkumulationsfaktor: 5,43), was besonders durch die ab der 5. Woche einsetzende starke Frischgewichtszunahme, ohne gleichzeitig stattfindende vergleichbare Aufnahme von  $\text{Cd}^{2+}$  in die Wurzeln, erklärbar ist (Gupta and Goldsbrough, 1990).

In vorausgegangenen Untersuchungen konnte eine 4-fache (Tomatenzellkultur, Gupta and Goldsbrough, 1990) bzw. 500-fache (*Brassica juncea*, Salt and Raskin, 1995) Anreicherung von Schwermetallen in unterschiedlichen Pflanzen bzw. pflanzlichen Zellkulturen nachgewiesen werden. Die maximalen Akkumulationsfaktoren in den Organen der auf  $200 \mu\text{M}$  bzw.  $1000 \mu\text{M Cd}^{2+}$  im Substrat angezogenen Hanf- bzw. Weizenpflanzen sind in Tab. 4.7 zusammengefasst.

	<b>Wurzel</b>	<b>Stengel</b>	<b>Blatt</b>
Hanf, $200 \mu\text{M Cd}^{2+}$	36,9	3,1	1,9
Hanf, $1000 \mu\text{M Cd}^{2+}$	7,8	1,9	0,6
Weizen, $200 \mu\text{M Cd}^{2+}$	7,5	---	2,8
Weizen, $1000 \mu\text{M Cd}^{2+}$	6,7	---	1,1

**Tab. 4.7:** maximale Akkumulationsfaktoren von  $\text{Cd}^{2+}$  in den Organen von Hanf- bzw. Weizenpflanzen in Abhängigkeit von der im Boden befindlichen  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration

Mench and Martin (1991) konnten zeigen, dass es sich bei *Nicotianum tabacum* um einen sogenannten Blattakkumulator und bei *Zea mays* um einen Wurzelakkumulator von  $\text{Cd}^{2+}$  handelte. In auf 1 ppm  $\text{Cd}^{2+}$  in Nährlösung angezogenen Jungbuchen (45 Tage alt) wurde bis zu 0,96 ppm  $\text{Cd}^{2+}$  in den Blättern nachgewiesen (Kahle et al., 1989). Von einer Anreicherung kann hier aber nicht gesprochen werden. Der in den Blättern nachgewiesene  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt entsprach lediglich dem  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt des Nährmediums. Sowohl bei Hanf als auch bei Weizen handelte es sich um Wurzelakkumulatoren (Tab. 4.7).

Pflanzen, die mehr als 1000  $\mu\text{g Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  bzw.  $\text{Pb}^{2+}$  in ihren oberirdischen Organen anreichern, werden als Hyperakkumulatoren bezeichnet. Eine Ausnahme bildet  $\text{Cd}^{2+}$ . Als  $\text{Cd}^{2+}$ -Hyperakkumulatoren werden solche Pflanzen bezeichnet, die mehr als 100  $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g TG}$  in ihren Blättern akkumulieren (Baker, 1995). Salt et al. (1997) sowie Kumar et al. (1995) fanden bei der Nutzpflanze *Brassica juncea*, die eine hohe Biomasse erreicht und im oberirdischen Spross viel  $\text{Cd}^{2+}$  akkumulieren kann, einen Akkumulationsfaktor von 500 für  $\text{Cd}^{2+}$  und stuften *Brassica juncea* damit als  $\text{Cd}^{2+}$ -Hyperakkumulator ein (Raskin et al., 1994). In den untersuchten Hanfpflanzen konnte zu keinem Zeitpunkt während der Vegetationsperiode mehr als 44  $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g TG}$  in den Blättern nachgewiesen werden. Die Weizenpflanzen akkumulierten in der 5. Woche 123  $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g TG}$ . Zu allen anderen Zeitpunkten lagen die  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in den Blättern aber deutlich unter den als Grenzwert festgelegten 100  $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g TG}$ .

Um Aussagen über die Verteilung von  $\text{Cd}^{2+}$  in den Pflanzen machen zu können, wurden neben den relativen auch die absoluten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in den einzelnen Organen der Hanf- bzw. Weizenpflanzen bestimmt. Der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den Wurzeln auf 200  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  im Boden angezogener Hanfpflanzen nahm innerhalb der ersten 4 Wochen der Vegetationsperiode um das 12-fache zu (42,4  $\mu\text{g}$ ) und ging im Laufe der folgenden 4 Wochen auf 26,5  $\mu\text{g}$  zurück (Kap. 3.3.2.3, Abb. 3.52). Dieser Rückgang ging mit einem verstärkten Transport von  $\text{Cd}^{2+}$  in den oberirdischen Spross (Stengel: 50,3 %, bzw. Blätter: 31,8 %) einher. Nach 8 Wochen befanden sich 82 % des in den Hanfpflanzen bestimmten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes (149,2  $\mu\text{g}$ ) in den oberirdischen Sprossabschnitten, die zu diesem Zeitpunkt 92,3 % der Biomasse ausmachten. Nach 11 - 12 Wochen kam es bei den untersuchten Hanfpflanzen zur Ausbildung von Fruchtständen. Der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in den verwertbaren Rohstoffen (Fasern, Schäben, Früchte) wurde nur von im Freiland unter realen Bedingungen angezogenen Hanfpflanzen bestimmt (Kap. 4.5). Bei den auf mit 1 mM  $\text{Cd}^{2+}$  belastetem Boden angezogenen Pflanzen wurde in der 4. Woche noch eine Zunahme des Transportes von  $\text{Cd}^{2+}$  in die oberirdischen Organe beobachtet (54 %, gleichverteilt auf Stengel und Blätter). Von den auf 1000  $\mu\text{M Cd}^{2+}$  angezogenen

Hanfpflanzen überlebte nur eine die 4. Woche nach der Aussaat (Kap. 3.3.2.3, Abb. 3.53). Der Gesamt-Cd<sup>2+</sup>-Gehalt in dieser Pflanze betrug nach 10 Wochen Wachstum 165,1 µg.

Der Cd<sup>2+</sup>-Gehalt in Wurzeln und Blättern von Weizenpflanzen, angezogen auf mit 200 µM Cd<sup>2+</sup> belastetem Boden, war im Verlauf der Vegetationsperiode eher gleich verteilt (Kap. 3.3.2.3, Abb. 3.54). In der 7. Woche nach der Aussaat wurden 60 % des Gesamt-Cd<sup>2+</sup>-Gehaltes (65,9 µg) in den Blättern nachgewiesen (39,9 µg), die zu diesem Zeitpunkt 74,3 % der Biomasse ausmachten. Auf 1000 µM Cd<sup>2+</sup> angezogene Weizenpflanzen (Kap. 3.3.2.3, Abb. 3.55) akkumulierten 7 Wochen nach der Aussaat 85 % (199,5 µg) des Gesamt-Cd<sup>2+</sup>-Gehaltes (139,6 µg) in ihren Wurzeln. Ein Transport des aufgenommenen Cd<sup>2+</sup> scheint bei diesen Cd<sup>2+</sup>-Konzentrationen im Boden nicht mehr möglich zu sein. Bei den untersuchten Weizenpflanzen kam es auch nach 12 Wochen Wachstum nicht zur Ausbildung von Blüten bzw. Ähren. Die im Gewächshaus vorherrschenden Bedingungen schienen demnach für die normale Entwicklung der Weizenpflanzen nicht geeignet zu sein.

Will man Nutzpflanzen, z. B. Weizen oder Leinsamen, zur Phytostabilisierung einsetzen, muss sichergestellt werden, dass toxische Metalle nicht in die zu nutzenden Organe der Pflanzen transportiert, sondern in den Wurzeln abgelagert werden (Rauser, 1998). Um schädliche Schwermetalle wie Cd<sup>2+</sup> weitestgehend aus der Nahrungskette zu entfernen, hat die Codex Alimentarius Commission der WHO einen Grenzwert für Cd<sup>2+</sup> in Nahrungsmitteln festgelegt, der bei 0,1 µg/kg des landwirtschaftlichen Produktes liegt. Laut WHO (1972) und FAO/WHO (1995) kann ein Mensch bis zu 70 µg Cd<sup>2+</sup>/Tag zu sich nehmen, ohne mit Kurz- oder Langzeitschäden (z. B. Nierenschäden oder Osteoporose) rechnen zu müssen. Von Marquard et al. (1990) untersuchte Leinsamen enthielten bis zu 300 µg Cd<sup>2+</sup>/kg. Neuere Untersuchungen von Grant and Bailey (1997) ergaben sogar bis zu 527 µg Cd<sup>2+</sup>/kg Leinsamen, wenn diese auf mäßig belasteten Böden angebaut wurden. Derartig hoch belastete Leinsamen, die in Backwaren oder Müsli Verwendung finden, könnten ein Gesundheitsrisiko darstellen und wären zur Ernährung und zur Phytostabilisation bzw. -remediation nicht geeignet (Keller et al., 1997; Welch and Norvell, 1997). Cd<sup>2+</sup>-Gehalte in den Wurzeln bzw. im oberirdischen Spross von Hanf- bzw. Weizenpflanzen wurden mit den in anderen Nutzpflanzen nachgewiesenen Cd<sup>2+</sup>-Gehalten verglichen (Tab. 4.8; Blum, 1997).

Pflanzenart	Cd <sup>2+</sup> -Gehalt [mg/kg TG]		
	Oberirdischer Spross	Wurzel	Verhältnis (W : Sp)
Mais	11,5	57,5	5
Lucerne	3,1	33,4	10,8
Rote Beete	21,1	151,1	7,2
Rettich	1,8	33,6	18,7
Salat	15,0	48,3	3,2
Tomate	5,6	121,6	21
Hanf (200 µM Cd <sup>2+</sup> )	8,8	23,7	2,7
Hanf (1000 µM Cd <sup>2+</sup> )	11,9	81,6	6,8
Weizen (200 µM Cd <sup>2+</sup> )	12,2	19,6	1,6
Weizen (1000 µM Cd <sup>2+</sup> )	13,2	121,9	9,2

**Tab. 4.8:** Cd<sup>2+</sup>-Gehalte in den Wurzeln und im oberirdischen Spross verschiedener Nutzpflanzen (angezogen auf 0,1 µM Cd<sup>2+</sup> in Nährlösung; Blum, 1997) und in auf 200 µM bzw. 1000 µM Cd<sup>2+</sup> angezogenen Hanf- bzw. Weizenpflanzen (eigene Daten)

Cd<sup>2+</sup> reichert sich neben Leinsamen auch in vielen anderen Getreiden und Gemüsen an, die in der menschlichen Ernährung eine wichtige Rolle spielen. Internationale Organisationen wollen den Handel mit belasteten Nahrungsmitteln wie Weizen, Leinsamen, Erdnüssen oder Sonnenblumenkernen wenn möglich begrenzen, um das Gesundheitsrisiko durch Schwermetalle in der Nahrung so gering wie möglich zu halten. Neben dem Salat (Blum, 1997) zeigten die auf 1000 µM Cd<sup>2+</sup> angezogenen Hanf- bzw. Weizenpflanzen die höchste Anreicherung von Cd<sup>2+</sup> in den oberirdischen Organen. Ein Einsatz in der Phytoremediation wäre somit nicht ausgeschlossen, auch wenn es sich bei Hanf und Weizen nicht um Cd<sup>2+</sup>-Hyperakkumulatoren handelt. Hanf zeigt ein schnelles Wachstum, erzeugt eine hohe Biomasse und erfüllt damit weitere wichtige Kriterien für einen möglichen Einsatz in der Phytoremediation. Die Möglichkeit eines Einsatzes zur Phytostabilisation kann dagegen nur dann erfolgen, wenn die von den Weizen- und Hanfpflanzen produzierten Rohstoffe gering bzw. nicht schwermetallbelastet sind.

## 4.6 Akkumulation von Schwermetallen in Nutz- und Wildpflanzen im Freiland

Die herkömmliche Sanierung belasteter Böden ist dann häufig weder ökologisch noch ökonomisch sinnvoll, wenn es sich um großflächige Kontaminationen handelt (Gerth, 1994). Als Alternative zu den herkömmlichen Dekontaminierungsverfahren kann die Akkumulation von Schwermetallen durch Pflanzen Verwendung finden (Mühleisen, 1992; Kahle et al., 1994; Gerth, 1994; Bilow, 1995; Comis, 1995). Besonders die gegenüber bislang angewendeten Verfahren stark reduzierten Kosten, ein nach der Dekontamination ökologisch intakter Boden und die verringerte Gefahr des Schadstoffaustrages durch Bodenerosion und Auswaschung stellen große Vorteile dieses relativ neuen, sanften Verfahrens zur Remediation belasteter Böden dar (Cunningham et al., 1995; Salt et al., 1995).

Die Sanierung belasteter landwirtschaftlicher Nutzflächen könnte in Zukunft z. B. mit Hilfe nachwachsender Rohstoffe erfolgen, deren Produkte (wenn unbelastet) weiterverarbeitet oder einer thermischen Verwertung zugeführt werden können (Gerth, 1994; Haensler, 1999). Die in der Phytoremediation an die Pflanzen gestellten Anforderungen, wie schnelles Wachstum, Toleranz gegenüber Schwermetallen sowie keine spezifischen Standortansprüche, werden von der Nutzpflanze Hanf zumindest zum Teil erfüllt. In vorangegangenen Untersuchungen konnte nur eine geringe Beeinträchtigung des Wachstums von Hanfpflanzen durch erhöhte Schwermetallgehalte im Boden unter Freilandbedingungen nachgewiesen werden (Mankowski, 1995; Sonnenberg, 1995, Kehlenbeck, 1996). Hanf stellt in unseren Breiten die ertragreichste Nutzpflanze mit im Mittel 8 t Biomasse/ha dar (2,5 t Fasern; 4 t Schäben; 1 t Früchte; 0,5 t Heu und Blätter). Besonders die in Europa zum Anbau freigegebenen Faserhanfsorten wie Felina 34, Fedora oder Uso 31 können neben der Remediation belasteter Flächen auch neue Perspektiven für die Landwirtschaft bieten. Faserhanf besitzt einen Primärfaseranteil von bis zu 30 % und liefert sowohl die dauerhafteste als auch die festeste Naturfaser. Hanffasern werden heute vor allem im Fahrzeuginnenbau, zu Geotextilien, Nadelfilzteppichen und Bio-Kunststoffen verarbeitet (Waskow, 1995; Nature, 1996; Sonnenpost, 1997).

Als unbelastet geltende Böden können sehr unterschiedliche  $\text{Cd}^{2+}$ - oder  $\text{Pb}^{2+}$ -Mengen enthalten. Kloke (1974) gab  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehalte von 2 - 20 ppm im Boden als Normalgehalt an. Garber (1970), Mengel (1991) und Scheffer (1992) hielten einen  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehalt von 15 - 68 ppm und einen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt von 0,2 - 0,6 ppm im Boden für normal. Im Raum Freiburg wurden im Mittel 51 ppm  $\text{Pb}^{2+}$  und 0,5 ppm  $\text{Cd}^{2+}$  im Boden nachgewiesen (Trüby and Raba, 1990). Hornburg and

Brümmer (1993) bzw. Kehlenbeck (1996) fanden in Schleswig-Holstein und im Raum Hamburg bis zu 36 ppm  $Pb^{2+}$  und 0,65 ppm  $Cd^{2+}$  im Oberboden.

In belasteten Böden in der Nähe von Metallschmelzöfen wurden zwischen 10 und 47 ppm  $Cd^{2+}$  bzw. 36 und 1070 ppm  $Pb^{2+}$  nachgewiesen (Morishita and Boratynski, 1992). Flugstaubbelastete Böden im Raum Hamburg, auf denen zu Versuchszwecken Hanfpflanzen der Sorte Felina 34 angebaut wurden, enthielten bis zu 4 ppm  $Cd^{2+}$  und 281 ppm  $Pb^{2+}$  (Kehlenbeck, 1996). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Schwermetallaufnahme durch verschiedene Nutz- und Wildpflanzen wurden auf einem Areal in Hagen durchgeführt, das in den Jahren 1962 - 1979 mit Klärschlämmen aus der Abwasserreinigungsanlage Vorhalle in Hagen gedüngt wurde (Hygiene-Institut des Ruhrgebietes, 1997; Kap. 2.2.5, Abb. 2.2, Tab. 2.3). Dabei kam es vor allem im Oberboden (0 - 40 cm) zu einer ungewöhnlich hohen Anreicherung von  $Cd^{2+}$  (81 - 236 ppm) und anderen Schwermetallen (ca. 400 ppm, zehnfach höher als die Hintergrundbelastung im Raum Hagen). Die in der Klärschlammverordnung (AbfKlärV, 1992) festgelegten Grenzwerte für  $Cd^{2+}$  (1 ppm) bzw.  $Pb^{2+}$  (100 ppm) wurden demnach im Oberboden der belasteten Fläche in Hagen bis zu 230-fach ( $Pb^{2+}$ : 4-fach) überschritten. Als Richtwerte zur Nutzung landwirtschaftlicher Nutzflächen werden bislang  $Cd^{2+}$ -Gehalte zwischen 0,7 und 2 ppm im Boden angegeben (Eikmann and Kloke, 1994; Heymann and Wiechmann, 1996).

In der Zeit zwischen 1987 und 1997 konnte trotz landwirtschaftlicher Nutzung des Geländes in den Jahren 1987-1991 bzw. 1996-1997 keine Verringerung der Kontaminationen im Oberboden nachgewiesen werden. Eine Auslaugung des Bodens oder der Austrag von Schwermetallen durch Ernte der angebauten Mais- bzw. Wintergerstepflanzen fand demnach nicht statt. Die Verfügbarkeit der Schwermetalle wird jedoch durch den humusreichen Oberboden und den pH-Wert von 6,7 stark reduziert. Nur etwa 7 % des  $Cd^{2+}$  sind für die Pflanzen verfügbar (Hygiene-Institut des Ruhrgebietes, 1997). Zudem verringert das im Boden vorliegende Schwermetallgemisch durch Ionenkonkurrenz die Aufnahme einzelner Schwermetalle durch die Pflanzen (Haensler, 1999). Trotz der sehr hohen Schwermetallbelastung konnte auf dem kontaminierten Gelände ein dichter Bewuchs aus verschiedenen Wildpflanzen beobachtet werden. Besonders große Populationen bildeten Brennesseln, Beinwell und Drüsiges Springkraut. Neben diesen Wildpflanzen sollten die Nutzpflanzen Faserhanf (Uso 31), Raps (Pronto), Weizen und Mais auf dem Gelände in Hagen angezogen und ihre Fähigkeit zur Aufnahme von  $Cd^{2+}$  aus dem Boden untersucht werden.

Die im Freilandversuch bepflanzte Parzelle besaß einen Gehalt von 102 ppm  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\text{Pb}^{2+}$ : 454 ppm,  $\text{Ni}^{2+}$ : 419 ppm; Kap. 3.4, Tab. 3.6) im Oberboden und entsprach damit der höchsten in den Gewächshausversuchen eingesetzten  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration von 112 ppm (Kap. 3.3.2.3). Die Pflanzenverfügbarkeit des im Boden befindlichen  $\text{Cd}^{2+}$  (7 ppm in Hagen, pH 6,7) dürfte aber in der im Gewächshaus verwendeten Blumenerde durch den niedrigeren pH-Wert von 5,8 und einen höheren Humusanteil wesentlich höher liegen. Viele Pflanzen zeigen bei  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentrationen von 5 - 10 ppm ( $\text{Pb}^{2+}$ : 10 - 20 ppm) eine deutliche Reduktion des Wachstums und des Ertrages (Sauerbeck, 1982). Für Porree wird ein Gehalt von 16 ppm  $\text{Cd}^{2+}$  bzw. 205 ppm  $\text{Pb}^{2+}$  im Boden als ertragsmindernd angesehen (Grünhage and Jäger, 1985). Es wurde deutlich, dass die im Freiland angezogenen, bis zu 2 m hohen Hanfpflanzen stärkere Sprossachsen und eine größere Anzahl Blätter ausbildeten und damit einen wesentlich gesünderen Eindruck hinterließen als die im Gewächshaus gezogenen Hanfpflanzen derselben Sorte. Bei nahezu allen Pflanzen kam es zur Ausbildung von Blütenständen und Früchten (Kap. 3.4.1, Abb. 3.56). Diese geringe Wachstums- und Ertragsbeeinträchtigung der Hanfpflanzen durch hohe Schwermetallkonzentrationen im Boden konnte auch von anderen Autoren beobachtet werden (Mankowski et al., 1995; Sonnenberg, 1995; Kehlenbeck, 1996).

Aus der Literatur ist bekannt, dass Weizenpflanzen ab einem  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt von 3 ppm im Boden deutliche Wachstumsdepressionen aufweisen (Sommer and Stritesky, 1976). Dagegen wurde das Wachstum der Weizenpflanzen im Freilandversuch stark beeinträchtigt. Die Weizenpflanzen erreichten nur eine Höhe von max. 30 cm und zeigten starke Chlorosen (Kap. 3.4.3, Abb. 3.69). Zur Ausbildung von Blüten bzw. Fruchtständen kam es nicht. Bei im Freiland angezogenen Rapspflanzen kam es ebenfalls nicht zur Ausbildung von Blütenständen. Ein Teil der Rapspflanzen wurde zudem von Larven der Kohlschabe befallen und damit möglicherweise zusätzlich in ihrer Entwicklung beeinträchtigt (Kap. 3.4.2, Abb. 3.63). Die auf dem belasteten Areal wild wachsenden Pflanzen zeigten keine Auffälligkeiten im Wuchs bzw. Aussehen. Das schnelle Wachstum des Gemeinen Beinwells auf allen Parzellen wurde nur auf der mit Hanf bepflanzten Parzelle vollständig unterdrückt, was die von anderen Autoren beschriebenen unkrautunterdrückenden Eigenschaften von Hanf bestätigt (Karus, 1995).

Die in den Organen der im Freilandversuch verwendeten Pflanzen gemessenen Schwermetallgehalte unterschieden sich deutlich voneinander (Kap. 3.4). In der Literatur sind nur wenige Daten zum absoluten Gehalt von Schwermetallen in den Organen von Pflanzen bekannt. Kehlenbeck (1996) konnte, in auf flugstaubgedüngten Böden gewachsenen

Hanfpflanzen der Sorte Felina 34, bis zu 380  $\mu\text{g Cd}^{2+}$  im Spross bzw. 150  $\mu\text{g Cd}^{2+}$  in den Wurzeln nachweisen (Boden: 4 ppm  $\text{Cd}^{2+}$  verfügbar).

	Min. [ $\mu\text{g Cd}^{2+}$ ]	Max. [ $\mu\text{g Cd}^{2+}$ ]	Hanf [ $\mu\text{g Cd}^{2+}$ ]
<b>Wurzel</b>	2,1 (Weizen)	75 (Mais, Beinwell)	26,7
<b>Stengel</b>	5,9 (Kamille)	113,7 (Springkraut)	37,5
<b>Blätter</b>	22,9 (Weizen)	115,6 (Mais)	50,8
<b>Blüten/Früchte</b>	2,4 (Kamille, Springkraut)	54,9 (Sauerampfer)	22,8

**Tab. 4.9:** Absolute  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in Organen verschiedener Nutz- und Wildpflanzen (Kap. 3.4.1 - 3.4.9)

Mankowski et al. (1995) fanden bis zu 120  $\mu\text{g Cd}^{2+}$  im Spross bzw. 4  $\mu\text{g Cd}^{2+}$  in den Wurzeln von Hanfpflanzen, die auf schwermetallbelasteten Böden in der Nähe von Metallschmelzöfen in Polen angebaut wurden (0,2 ppm  $\text{Cd}^{2+}$  verfügbar). Besonders die aus der Literatur bekannten Daten zur Anreicherung von  $\text{Cd}^{2+}$  in den Wurzeln unterscheiden sich um das 40-fache. Im Oberboden des belasteten Areals in Hagen waren max. 7 ppm  $\text{Cd}^{2+}$  für die Pflanzen verfügbar. Die in Hagen angezogenen Hanfpflanzen (Wurzel: 26,7  $\mu\text{g Cd}^{2+}$ , 101  $\mu\text{g Cd}^{2+}$  im Spross bzw. 27,5  $\mu\text{g Cd}^{2+}$  im Stroh) akkumulierten ähnliche  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte im Spross wie die von Mankowski et al. (1995) untersuchten Hanfpflanzen. Die Anreicherung von  $\text{Cd}^{2+}$  in den Wurzeln überstieg die von Mankowski et al. (1995) nachgewiesenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte um das 6,6-fache (Kap. 3.4.1, Abb. 3.61). Es kann aber davon ausgegangen werden, dass die Anreicherung von  $\text{Cd}^{2+}$  in Hanfpflanzen stark von dem im Boden befindlichen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt, der Pflanzenverfügbarkeit des  $\text{Cd}^{2+}$  und den Witterungsbedingungen abhängig ist (Kehlenbeck, 1996). Geringere  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte im Boden führten zu einer verstärkt stattfindenden Anreicherung von  $\text{Cd}^{2+}$  im oberirdischen Spross (Baker, 1981; Schat et al., 1997).

In Sandkultur angezogene Maispflanzen reicherten bis zu 610  $\mu\text{g Cd}^{2+}$  im Spross bzw. 160  $\mu\text{g Cd}^{2+}$  in den Wurzeln an (nach Haensler, 1999). Im Freilandversuch angezogene Maispflanzen akkumulierten bis zu 232  $\mu\text{g Cd}^{2+}$  im Spross bzw. 75  $\mu\text{g Cd}^{2+}$  in ihren Wurzeln (Kap. 3.4.4, Abb. 3.72). Im Mittel akkumulierten Maispflanzen die höchsten  $\text{Cd}^{2+}$ -Mengen (307  $\mu\text{g Cd}^{2+}$ /Pflanze) und damit das 2,4-fache der auf dieser Parzelle angebauten Hanf- und Rapspflanzen bzw. das 12,3-fache der Weizenpflanzen (Kap. 3.4.10, Abb. 3.89). Von den auf dem belasteten Areal wachsenden Wildpflanzen akkumulierte Beinwell die höchsten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte (191  $\mu\text{g Cd}^{2+}$ /Pflanze) und damit das 0,6-fache der Maispflanzen. Die wie Hanf zu den *Urticaceen* gehörenden Brennesselpflanzen akkumulierten mit dem 0,04-fachen des in Mais

gefundenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes die geringsten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte ( $10,9 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{Pflanze}$ ). Ein Vergleich der relativen Schwermetallgehalte (in ppm) der, auf dem mit Klärschlamm gedüngtem Areal, gewachsenen Pflanzen mit Daten aus der Literatur ist in Tab. 4.10 zusammengestellt.

Autor	$\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt [ppm]			Verh.
	Pflanzenart	Wurzeln	Spross	W : Sp
Kehlenbeck, 1996	Hanf (Felina 34)	4,81	1,15	4,2
	<i>Reynoutria japonica</i>	0,86	2,61	0,3
Haensler, 1999	Mais	54	54	1
	<i>Centaurea cyanus</i>	158	91	1,7
Kinzel, 1982	<i>Thlaspi alpestre</i>	337	562	0,6
Klein et al., 1979	Mais	33	148	0,22
Morishita and Boratynski, 1992	Versch. Pflanzen	14,8-158	1,65-94,8	---
eigene Daten (Kap. 3.3.2.3)	Hanf, Gewächshaus	82,2	33,1	2,5
eigene Daten (Kap. 3.4.1 bis 3.4.9)	Hanf, Freiland	7,9	2,4	3,3
	Raps	6,9	4,1	1,7
	Weizen	5,4	20,5	0,3
	Mais	20,5	8,2	2,5
	Kamille	7,4	2,22	3,3
	Springkraut	47,4	18,96	2,5
	Brennessel	1,32	1,85	0,7
	Sauerampfer	2,7	7,6	0,4
	Beinwell	8,23	5,8	1,4

**Tab. 4.10:** Schwermetallgehalte in verschiedenen Pflanzenorganen

Von Foroughi et al. (1975, 1981) wurden Gehalte von max.  $0,5 \text{ ppm Cd}^{2+}$  bzw.  $3 \text{ ppm Pb}^{2+}$  in Tomaten, Spinat oder Buschbohnen, gewachsen auf unbelasteten Böden, bestimmt. In Getreidewurzeln werden bis zu  $0,2 \text{ ppm Cd}^{2+}$  bzw.  $1,8 \text{ ppm Pb}^{2+}$  als Normalgehalte angesehen (Gebhardt et al., 1988). Grasschnitt enthielt im Mittel  $0,94 - 2,35 \text{ ppm Cd}^{2+}$  bzw.  $2,4 - 6,8 \text{ ppm Pb}^{2+}$ . Diese Normalgehalte wurden in allen untersuchten Pflanzen zum Teil deutlich überschritten (Tab. 4.10). Vor allem für  $\text{Cd}^{2+}$ -belasteten Mais wurden sehr unterschiedliche  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte gemessen. Allerdings sind die Daten aufgrund der unterschiedlichen Verfügbarkeit des  $\text{Cd}^{2+}$  im Nährmedium nur bedingt vergleichbar, da z. B. Haensler (1999) die Maispflanzen in Sandkultur angezogen hatte. Die von Kehlenbeck (1996) gefundenen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in

Hanfpflanzen (flugstaubgedüngter Boden) stimmen dagegen mit denen im Freilandversuch angezogener Hanfpflanzen gut überein. Das ermittelte Wurzel/Spross-Verhältnis der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte von 3,3 zeigte, dass es sich bei Hanf um einen sogenannten Wurzelakkumulator handelt. Die aus den oben dargestellten Daten ermittelten Akkumulationsfaktoren für  $\text{Cd}^{2+}$  betragen in Hanfwurzeln: 1,16; -sprossachsen: 0,18; -blättern: 0,44 und -blüten: 1,3. Die Akkumulationsfaktoren von  $\text{Cd}^{2+}$  in den Organen der Hanfpflanzen stimmen überwiegend gut mit Daten anderer Autoren überein. Kehlenbeck (1996) gab Akkumulationsfaktoren von 0,44 - 1,5 für  $\text{Cd}^{2+}$  in Hanfwurzeln, 0,17 - 0,36 für -sprossachsen an. Von Sonnenberg (1995) wurde ein Akkumulationsfaktor von 0,65 für  $\text{Cd}^{2+}$  in Hanfwurzeln angegeben.

Morishita and Boratynski (1992) fanden bis zu 158 ppm  $\text{Cd}^{2+}$  in Wurzeln (Spross: bis 94,8 ppm) verschiedener Pflanzenarten, die in unmittelbarer Umgebung von Metallschmelzöfen beheimatet waren. Im Raum Aachen wurden Galmeiveilchen gefunden, die bis zu 123 ppm  $\text{Cd}^{2+}$  bzw. 1699 ppm  $\text{Pb}^{2+}$  in ihren Blättern akkumulierten (Ernst, 1975). Im Rahmen dieser Arbeit im Freiland gewachsener Hanf akkumulierte 1/10 des in Gewächshauspflanzen bestimmten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes bzw. nur einen Bruchteil des von  $\text{Cd}^{2+}$ -Hyperakkumulatoren wie *Thlaspi alpestre* im oberirdischen Spross angereicherten  $\text{Cd}^{2+}$ . Unter den vorherrschenden Freilandbedingungen wurden demnach keine ungewöhnlich hohen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in Wurzeln oder im oberirdischen Spross der Hanfpflanzen angereichert. Dieser Befund wird auch durch Daten von Mankowski et al. (1995) bestätigt. In Poznan (Polen) angebaute Hanf- und Flachspflanzen reicherten  $\text{Cd}^{2+}$  ebenfalls in der Hauptsache in den Wurzeln an (Hanf: 1,2 ppm  $\text{Cd}^{2+}$ , Flachs: 2,8 ppm  $\text{Cd}^{2+}$ ). Der Ertrag beider Pflanzenarten wurde durch die im Boden befindlichen Schwermetalle ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) nur unwesentlich beeinträchtigt. Die von Mankowski et al. (1995) untersuchten Hanffasern enthielten mehr  $\text{Pb}^{2+}$  (4,2 ppm) als Flachsfasern (0,4-1,8 ppm). Zudem ergab Hanf eine höhere Biomasse, die durch die Schwermetalle im Boden nicht beeinflusst wurde. Unter den gegebenen Bedingungen entzogen Hanfpflanzen dem Boden demnach mehr  $\text{Pb}^{2+}$  und geringfügig mehr  $\text{Cd}^{2+}$  als Flachspflanzen.

Die Isolierung von Fasern und Schäben aus 100 auf dem mit Klärschlamm belasteten Areal, angebauten Hanfpflanzen wurde nach industrieller Vorgehensweise durchgeführt (J. Müssig, Faserinstitut Bremen). Dabei wurden die  $\text{Cd}^{2+}$ -,  $\text{Pb}^{2+}$ - bzw.  $\text{Ni}^{2+}$ -Gehalte der einzelnen Rohstoffe bestimmt (Fasern, Schäben, Blätter und Früchte; Kap. 3.4.1, Abb. 3.59). In Tab. 4.11 sind Daten anderer Autoren und eigene Daten zum Gehalt von Schwermetallen in Rohstoffen aus Hanf- und Flachspflanzen zusammengefasst.

Autor	Schwermetall	Schäben	Fasern	Blätter	Früchte
Kehlenbeck (1996)	Cd <sup>2+</sup>	n. n.	n. n.	0,21	0,31
	Pb <sup>2+</sup>	9,06	1,07	8,05	0,2
Mankowski et al. (1995)	Cd <sup>2+</sup>	n. u.	< 1	n. u.	< 1
	Pb <sup>2+</sup>		4,2		3,5
	Cd <sup>2+</sup> (Flachs)		1,5		< 1
	Pb <sup>2+</sup> (Flachs)		1,8		4,5
eigene Daten (industriell aufgearbeitete Rohstoffe)	Cd <sup>2+</sup>	0,8	0,8	3,5	1,1
	Pb <sup>2+</sup>	2,8	3,9	22,4	1,8
	Ni <sup>2+</sup>	11,5	6,9	63,6	29,0
eigene Daten (im Labor aufbereitete Rohstoffe)	Cd <sup>2+</sup>	0,6	0,7	3,1	---

**Tab. 4.11:** Schwermetallgehalte in Rohstoffen aus Hanf- und Flachspflanzen

Die in Blättern von Hanfpflanzen nachgewiesenen Cd<sup>2+</sup>-Gehalte von etwa 3,5 ppm führten in anderen Pflanzen bereits zu deutlichen Ertragsrückgängen. Bohnen, Erbsen und Lauch zeigten Ertragsrückgänge bei 0,7 ppm, 2 ppm bzw. 3 ppm Cd<sup>2+</sup> in der Blatt-Trockensubstanz (Klein et al., 1981). Die Erträge von Grünkohl, Tomaten und Salat wurden dagegen von Cd<sup>2+</sup>-Gehalten um 3 ppm in ihren Blättern nicht beeinflusst. Vom Bundesgesundheitsamt wurde der Richtwert für Blattgemüse mit 0,1 ppm Cd<sup>2+</sup> im Frischgewicht angegeben (ZEBS, 1993). Diese Werte wurde in den Blättern aller im Freiland angezogenen Pflanzen ausnahmslos überschritten, obwohl es sich, bis auf Weizen, Brennesseln und Sauerampfer, unter den vorherrschenden Bedingungen um sogenannte Wurzelakkumulatoren handelte (Tab. 4.10, Tab. 4.11). Auch der in der Futtermittelverordnung festgelegte Grenzwert für Einzel- und Grünfuttermittel (FuttermittelVO, 1988) von 1 ppm Cd<sup>2+</sup> wurde deutlich überschritten. Eine Nutzung der Blätter als Grünfutter muss deshalb ausgeschlossen werden.

Die Blätter, aber auch andere Rohstoffe der auf dem belasteten Gebiet angezogenen Nutz- und Wildpflanzen können nach der Bioabfallverordnung (BioAbfVO, 1998) als unbehandelte Bioabfälle eingestuft und verwertet werden. Die Erzeuger bzw. Verwerter müssen neben einer seuchen- und phytohygienischen Unbedenklichkeit sicherstellen, dass die von ihnen produzierten

bzw. verwerteten Bioabfälle keine überhöhten Schadstoffgehalte aufweisen. Unter Verwertung wird die Aufbringung auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich bzw. gärtnerisch genutzte Flächen verstanden. Nach §4 BioAbfV Abs. 3 bzw. §6 Abs. 1 Satz 1 + 2 dürfen im Laufe von 3 Jahren 20 t Bioabfälle (Trockengewicht) auf landwirtschaftliche Nutzflächen ausgebracht werden, sofern die in den Bioabfällen nachgewiesenen Schwermetallgehalte die Grenzwerte von 1,5 ppm  $\text{Cd}^{2+}$ , 150 ppm  $\text{Pb}^{2+}$  bzw. 50 ppm  $\text{Ni}^{2+}$  nicht überschreiten. In den Blättern der im Faserinstitut Bremen aufbereiteten Hanfpflanzen (Kap. 3.4.1, Abb. 3.59) wurden 3,5 ppm  $\text{Cd}^{2+}$ , 22,4 ppm  $\text{Pb}^{2+}$  bzw. 63,6 ppm  $\text{Ni}^{2+}$  nachgewiesen. Dagegen würden die in den Schäben, Fasern bzw. Früchten nachgewiesenen Schwermetallgehalte die in der Bioabfallverordnung vorgeschriebenen Grenzwerte nicht überschreiten und könnten als Biodünger verwertet werden. Eine Ausbringung von Bioabfällen wird jedoch nur dann genehmigt, wenn die zu düngenden Böden mit weniger als 1,5 ppm  $\text{Cd}^{2+}$ , 100 ppm  $\text{Pb}^{2+}$  bzw. 70 ppm  $\text{Ni}^{2+}$  belastet sind (normale bis niedrig belastete Böden). Der auf diesem Wege stattfindende Austrag der Schwermetalle vom belasteten Areal, in möglicherweise bislang nicht oder gering belastete Regionen, widerspricht jedoch in jeglicher Hinsicht den Zielen der Phytoremediation (Cunningham et al., 1995; Salt et al., 1995) und kann somit nicht empfohlen werden.

Hanffasern und -schäben lassen sich zur Produktion verschiedenster Erzeugnisse einsetzen. Von besonderem Interesse ist zur Zeit der Einsatz von Fasern und Schäben in der Bekleidungsindustrie, für Vliese zur Unterfütterung von Bodenbelägen, Faserverbundstoffe in der Automobilindustrie (Nature, 1996), Geotextilien im Deponie-, Wasser- und Straßenbau sowie kompostierbare Einweg-Fußbodenbeläge im Messebau (bislang Teppiche aus PVC, die als Sondermüll entsorgt werden müssen) und als Dämm- bzw. Baustoff (Sonnenpost, 1997). Zur Produktion von Kleidungsstücken verwendete Hanffasern müssen strengen Auflagen in Bezug auf den Gehalt verschiedenster Schadstoffe genügen. Textil- und Bekleidungshersteller in Deutschland bemühen sich, ihre Produkte weitestgehend schadstoffarm, d. h. frei von Schwermetallen, Formaldehyd, Pestiziden, gesundheitsschädlichen Farbstoffen, zu produzieren. Beim Anbau von Hanf kann in der Regel auf den Einsatz von Pestiziden und Herbiziden verzichtet werden (Karus, 1995). Der vom Forschungsinstitut Hohenstein (Öko-Tex-Initiative, 2000) entwickelte Öko-Tex Standard 100 stellt einen mittlerweile allgemein anerkannten humanökologischen Standard zur Begutachtung von Textilien dar. Um dem Menschen schaden zu können, muss eine Substanz vom Textil auf den Menschen übergehen können. Die Migration kann durch Feuchtigkeit, über die Atemluft oder durch Hautkontakt erfolgen (Öko-Tex-Initiative, 2000). Im Öko-Tex Standard 100 werden Textilien und Vorprodukte von Textilien in

4 Produktklassen eingeteilt. Jeder Produktklasse wurde ein Grenzwert für die Schwermetalle  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  bzw.  $\text{Zn}^{2+}$  zugeordnet (Tab. 4.12).

Produktklasse	I:	Babybekleidung und deren Vorprodukte
	II:	Produkte mit Hautkontakt
	III:	Produkte ohne Hautkontakt
	IV:	Ausstattungsmaterialien

Produktklasse	I	II	III	IV	Hanffasern (Hagen)
$\text{Cd}^{2+}$	0,1	0,1	0,1	0,1	0,8
$\text{Pb}^{2+}$	0,2	1,0	1,0	1,0	3,9
$\text{Ni}^{2+}$	1,0	4,0	4,0	4,0	6,9

**Tab. 4.12:** Grenzwerte für Schwermetalle in Textilien (Öko-Tex Standard 100) und in Hanffasern nachgewiesene Schwermetallgehalte

Die schwermetallbelasteten Hanffasern überschreiten alle im Öko-Tex Standard 100 festgesetzten Grenzwerte für Schwermetalle in Textilien. Die Nutzung der Fasern, der auf dem belasteten Feld angezogenen Hanfpflanzen, zur Produktion von Heimtextilien wie Bekleidung oder Ausstattungsmaterialien ist demnach nicht möglich. Der hohe  $\text{Ni}^{2+}$ -Gehalt birgt besondere Risiken, da ein nicht unerheblicher Teil der deutschen Bevölkerung bei Kontakt mit  $\text{Ni}^{2+}$ -enthaltenden Schmuckstücken und Textilien allergische Reaktionen zeigt (Öko-Tex-Initiative, 2000).

Die Verarbeitung von schwermetallbelasteten Hanffasern- und -schäben zu Bau- und Dämmstoffen birgt gegenüber der Verarbeitung zu Textilien deutlich geringere Risiken. Ein Kontakt von Menschen zu verbauten Dämmstoffen findet im Allgemeinen nur bei der Herstellung, Verbauung und Entsorgung statt. Nach § 4 BImSchV 6.1.7 (1997) dürfen bei der Verarbeitung von Holz und holzenthaltenden Materialien 20 mg Holzstaub/ $\text{m}^3$  Abluft nicht überschritten werden. Die Immissionswerte IW I für Flugstaub und die von der WHO herausgegebenen Leitwerte für die Schwermetalle  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$  im Flugstaub sind in Tab. 4.13 zusammengefasst.

	$\text{Cd}^{2+}$ [ng/m <sup>3</sup> ]	$\text{Pb}^{2+}$ [ng/m <sup>3</sup> ]	$\text{Ni}^{2+}$ [ng/m <sup>3</sup> ]
Immissionswert IW I	40	2000	10
WHO-Leitwert	10-20	55	--- (kanzerogen)
Hanf-Schäben	16	56	230
Hanf-Fasern	16	78	138

**Tab. 4.13:** Grenz- und Leitwerte sowie in bei der Verarbeitung von belasteten Hanfprodukten anfallende Schwermetallgehalte im Flugstaub (berechnet auf 20 mg Holzstaub/m<sup>3</sup> Abluft)

Die im Holzstaub enthaltenen Schwermetalle stellen ein nicht zu unterschätzendes Gesundheitsrisiko am Arbeitsplatz dar. Der  $\text{Ni}^{2+}$ -Gehalt in der Abluft bei der Verarbeitung in Hanffasern bzw. -schäben würde den Immissionswert von 10 ng/m<sup>3</sup> um das 23-fache überschreiten. Der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt bewegte sich im Rahmen des Immissionswertes IW I und des WHO-Leitwertes (WHO, 1987). Der  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehalt in der Abluft bewegte sich ebenfalls im Rahmen des von der WHO herausgegebenen Leitwertes und unterschritt den Immissionswert IW I um das 25-fache. Eine Verarbeitung von schwermetallbelasteten Hanffasern und -schäben sollte demnach nur unter besonderen Sicherheitsvorkehrungen, die aus Absauganlagen bestehen können, erfolgen. Diese Sicherheitsauflagen werden aber zum Teil bereits von der Industrie erfüllt (Textilforschungsinstitut Krefeld, Fr. Dr. Moll, pers. Mitteilung).

Die Entsorgung von aus schwermetallbelasteten Hanffasern bzw. -schäben hergestellten Baumaterialien unterliegt unter anderem den vom Landesumweltamt NRW herausgegebenen "Richtwerten zur umweltverträglichen Verwertung und Beseitigung von Gebrauchtholz" (Winkler, 1997). Bei der Beurteilung der Holzabfälle werden unterschiedliche Rechtsbereiche tangiert (Abfallrecht, Immissionsschutzrecht, Chemikalienrecht und Düngemittelrecht). Bei der thermischen Verwertung bzw. Beseitigung von Holzabfällen fallen sogenannte Sekundärstoffe an, die einer weiteren stofflichen Verwertung oder Beseitigung (Deponierung) zugeführt werden müssten. Bei der der Verwertung vorausgehenden Aufbereitung der Holzabfälle kann es wiederum zu nennenswerten Holzstaubemissionen kommen (siehe oben), bei denen geeignete Schutz- und Absaugmaßnahmen vorgenommen werden müssen, um eine gesundheitliche Gefährdung der Menschen und der Umwelt zu vermeiden.

Holzabfälle werden in verschiedene Güteklassen eingeteilt. Zur stofflichen (S) oder thermischen (E) Verwertung können nur Holzabfälle der Güteklassen H1 (unbehandeltes Gebrauchtholz; 1. BImSchV, 1975) und H2 (behandeltes, aber nicht mit Holzschutzmitteln behandeltes

Gebrauchtholz; 1. BImSchV) verwendet werden (Winkler, 1997). Die stoffliche Verwertung von Holzabfällen könnte als Strukturmaterial im Kompost zur Verbesserung der Bodenqualität erfolgen (§ 4 Abs. 3 KrW-/AbfG für Gebrauchtholz, 1996). Die thermische Verwertung in speziellen Bio-Heizkraftwerken, in denen Schadstoffe durch Rauchgaswäsche aus den Abgasen entfernt werden, trägt zudem zur Schonung fossiler Brennstoffressourcen bei (Kehlenbeck, 1996). Nach §22 KrW-/AbfG für Gebrauchtholz müssen schadstoffhaltige Holzabfälle gekennzeichnet werden, um die umweltverträgliche Verwertung bzw. Beseitigung der Abfälle sicherzustellen. Die Entsorgung unverwertbarer Abfälle muss nach §27 Abs.1 KrW-/AbfG in Abfallbeseitigungsanlagen erfolgen, bei denen es sich um Feuerungsanlagen, die nach der BImSchV höheren Auflagen als die zur thermischen Verwertung genutzten Anlagen unterliegen, handelt. Die Einordnung von Gebrauchtholz in Qualitätsgruppen erfolgt unter anderem anhand ihres Schwermetallgehaltes (Winkler, 1997, Tab. 4.14).

	<b>Cd<sup>2+</sup> [ppm]</b>	<b>Pb<sup>2+</sup> [ppm]</b>
<i>H1 (S/E)</i>	0,5	3
<i>H2 (S)</i>	3	30
<i>H2 (E)</i>	> 0,5	> 3
Hanffasern	0,8	3,9
Hanf-schäben	0,8	2,8
Hanfblätter	3,5	22,4
Hanf-früchte	1,1	1,8

**Tab. 4.14:** Grenzwerte für Schwermetalle in Gebrauchtholz, sortiert nach Qualitätsgruppen (Winkler, 1997) und Schwermetallgehalte in zu verwertenden Hanffasern und -schäben

Auf mit Klärschlamm gedüngtem Boden angezogene Hanfpflanzen lassen sich gemäß der in Hanffasern bzw. -schäben nachgewiesenen Cd<sup>2+</sup>- bzw. Pb<sup>2+</sup>-Gehalte in die Qualitätsgruppen H2 (S) bzw. H2 (E) einordnen. Diese Rohstoffe, aber auch Blätter und Früchte der belasteten Hanfpflanzen, könnten demnach einer thermischen Verwertung zugeführt werden. Der bei der thermischen Verwertung anfallende Sekundärabfall (Asche) muss dann einer abschließenden Verwertung zugeführt werden. Dabei kommt neben einer geordneten Deponierung auch die Ausbringung auf land- bzw. forstwirtschaftlich genutzten Flächen in Frage (Pohlandt, 1996). Die verschiedenen anfallenden Aschen enthalten neben den Schadstoffen viele für Pflanzen notwendige Haupt- und Spurenelemente und müssen den Anforderungen des §4 KrW-/AbfG zur

stofflichen Verwertung bzw. der AbfKlärV (1992) genügen, wenn sie als Dünger in der Landwirtschaft verwendet werden sollen. Spezielle Grenzwerte für Sekundärabfälle aus der thermischen Verwertung von Holzabfällen existieren nicht (Pohlandt, 1996). Die nach Pohlandt (1996) in der Klärschlammverordnung angegebenen Grenzwerte für  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  bzw.  $\text{Ni}^{2+}$  betragen 10 ppm, 900 ppm bzw. 200 ppm. Da in der vorliegenden Arbeit keine Veraschung von Hanffasern bzw. -schäben vorgenommen wurde, ist die Beurteilung des in der Asche vorliegenden Schwermetallgehaltes in Bezug auf die AbfKlärV bzw. die KrW-/AbfG nicht möglich. Aufgrund der relativ hohen  $\text{Pb}^{2+}$ - bzw.  $\text{Ni}^{2+}$ -Gehalte in den Rohstoffen kann aber davon ausgegangen werden, dass die in den jeweiligen Verordnungen festgelegten Grenzwerte für die Verwertung von Aschen aus Holzabfällen überschritten sein könnten. Damit käme nur noch eine geordnete Deponierung (TA Siedlungsabfall, 1993) oder, bei entsprechend hohen Schwermetallgehalten, eine Rückgewinnung der Schwermetalle aus der Asche in Frage (Chaney et al., 1995 a).

Der Einsatz belasteter Fasern und -schäben in Geotextilien oder als Armierung in Reifen wird in der Industrie zur Zeit diskutiert (Conti-Gummi, pers. Mitteilung). In weitergehenden Untersuchungen müsste jedoch sichergestellt werden, dass die in den Fasern gebundenen Schwermetalle nicht durch Regen oder andere Umwelteinflüsse ausgewaschen werden können. In Deutschland gibt es neben hochbelasteten auch viele gering, aber über die gültigen Grenzwerten hinaus, schwermetallbelastete landwirtschaftlich nutzbare Flächen, die möglicherweise zum Anbau des schwermetalltoleranten Faserhanfes verwendet werden könnten. Der Einsatz von belasteten Hanffasern in der Produktion kompostierbarer Fußbodenbeläge wäre vorstellbar, wenn die Schwermetallgehalte in den Fasern deutlich unter den in der Bioabfallverordnung angegebenen Grenzwerten liegen. In jedem Fall muss jedoch eine anschließende stoffliche bzw. thermische Verwertung der belasteten Materialien im Rahmen der vorliegenden Gesetze bzw. Verordnungen sichergestellt werden.

Die Abschätzung des Remediationspotentials von Hanfpflanzen nach dem Anbau auf schwermetallkontaminierten Böden wurde von Kehlenbeck (1996, berechnet nach Chaney et al., 1995 b bzw. Comis, 1995) durchgeführt. Die Sanierung eines mit Flugstaub gedüngten Bodens in Hamburg, der bis zu 4 ppm  $\text{Cd}^{2+}$  enthielt, würde nach dem von Comis (1995) vorgestellten Modell einer linear verlaufenden Dekontamination nach 1071 Jahren abgeschlossen sein. Dieser nicht sehr effiziente Prozess stellt keine sinnvolle Alternative zur Dekontamination des klärschlammgedüngten Areals in Hagen dar (7 ppm  $\text{Cd}^{2+}$  für Pflanzen verfügbar, 95 ppm  $\text{Cd}^{2+}$  nicht verfügbar). Die Rekultivierung durch Aufforstung mit Laubbäumen wie Pappeln oder

Weiden (Phytostabilisation), wie sie auch von Macnair (1995) beschrieben wurde, stellt für derartig hoch mit Schwermetallen belastete Areale eine wesentlich attraktivere und sinnvollere Alternative dar. Die Mechanismen, die im Laufe einer Vegetationsperiode zur Toleranz gegenüber hohen Schwermetallkonzentrationen beitragen, müssten in weitergehenden Untersuchungen jedoch näher charakterisiert werden, um eventuell günstige Eigenschaften bestimmter Pflanzenarten zur Züchtung neuer Sorten nutzen zu können. Zur Zeit gibt es außer für Raps (Kap. 3.4.2; Abb. 3.67) keine Hinweise darauf, dass Pflanzen, die sich im Endstadium ihrer Vegetationsperiode befinden, aufgenommene Schwermetalle durch Phytochelatine komplexieren (Kap. 3.4.1 bis 3.4.9).

Verschiedene Faserhanfsorten haben sich als tolerant gegenüber leicht bis mittel mit Schwermetallen belasteten Böden erwiesen. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten zeigen, dass die Toleranz gegenüber hohen Cadmiumkonzentration im Boden, besonders während der Keimung und der frühen Wachstumsphase, durch die Biosynthese von Phytochelatinen, insbesondere PC<sub>3</sub>, und die Einlagerung von Cadmium in den Zellwänden der Wurzelzellen hervorgerufen wird. Die Anreicherung von Cd<sup>2+</sup> in den Wurzeln überstieg die aus der Literatur bekannten Anreicherungen von Cd<sup>2+</sup> in Hanfpflanzen (Mankowski et al., 1995) um das bis zu 6,6-fache. Eine besonders hohe Anreicherung von Schwermetallen in den oberirdischen Organen von Hanfpflanzen, wie sie für Hyperakkumulatoren beschrieben wurde (Kinzel, 1982), konnte aber nicht nachgewiesen werden. Anhand der erhaltenen Daten kann der Anbau von Faserhanf auf schwermetallbelasteten Böden unter bestimmten Voraussetzungen aber durchaus empfohlen werden. Der Anbau von Hanf erfordert kaum Einsatz von Pestiziden bzw. Herbiziden, zudem wird der Boden durch ein umfangreiches Wurzelwerk aufgelockert. Durch die Verwendung von Hanffasern und -schäben zur Produktion von bestimmten Textilien oder Baustoffen bzw. einer thermischen Verwertung in Bio-Heizkraftwerken kann zumindest ein Teil der zur Rekultivierung schwermetallbelasteter Flächen aufzuwendenden Kosten abgedeckt werden (Karus, 1995; Sonnenberg, 1995; Kehlenbeck, 1996). Für den Landwirt könnte der Anbau des schwermetalltoleranten, nachwachsenden Rohstoffes Faserhanf auf leicht bis mäßig mit Schwermetallen belasteten Böden demnach durchaus nicht nur ökologisch, sondern auch ökonomisch interessant sein.

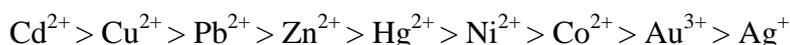
## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen der Arbeit sollte die Akkumulation von Schwermetallen sowie deren Einfluss auf die Synthese von Phytochelatinen in Faserhanfpflanzen - bzw. Zellkulturen (*Cannabis sativa* L.) untersucht und mit anderen Pflanzen oder Zellkulturen verglichen werden. Zudem sollte die Einsatzfähigkeit von Faserhanf zur Remediation schwermetallbelasteter Böden bewertet und Nutzungsmöglichkeiten für das geerntete Pflanzenmaterial aufgezeigt werden.

Pflanzliche Kalluskulturen von Hanf (*Cannabis sativa* L.) und Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill., Cd<sup>2+</sup>-resistent) reagierten auf Schwermetalle, besonders auf Cd<sup>2+</sup>, im Anzuchtmedium mit der Synthese von Phytochelatinen (PC's, (γ-GluCys)<sub>n</sub>-Gly). Cd<sup>2+</sup>-haltiges Anzuchtmedium führte in Hanf-Kalluskulturen zur Akkumulation der Phytochelatine PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> und PC<sub>4</sub>. In den Cd<sup>2+</sup>-resistenten Tomaten-Kalluskulturen konnten die Phytochelatine PC<sub>2</sub> bis PC<sub>8</sub> nachgewiesen werden. Die Induktion der PC-Synthese war in beiden Kalluskulturen von der eingesetzten Cd<sup>2+</sup>-Konzentration abhängig. Neben den Phytochelatinen ließen sich in Tomaten-Kalluskulturen eine Vielzahl bislang unbekannter thiolhaltiger Verbindungen nachweisen, bei denen es sich um PC-ähnliche Peptide handelte, denen die Amino-terminale Glutaminsäure fehlt (Cys-(γ-GluCys)<sub>n</sub>-Gly). Die physiologische Funktion dieser neuen Klasse von PC-Homologen, bei denen es sich um Abbauprodukte von PC's handeln könnte, ist bislang nicht bekannt.

In Hanf-Suspensionskulturen wurde die Akkumulation von Cd<sup>2+</sup> über einen Zeitraum von 6 Tagen untersucht. Die Frischgewichtszunahme wurde während des betrachteten Zeitraumes von Cd<sup>2+</sup>-Konzentrationen bis 40 µM im Medium nicht negativ beeinflusst. Da zu allen Zeitpunkten höhere Cd<sup>2+</sup>- als PC-Gehalte in den Zellen nachweisbar waren, kann davon ausgegangen werden, dass die Detoxifizierung von Cd<sup>2+</sup> in Hanf-Suspensionskulturen nicht ausschließlich über Komplexierung des Cd<sup>2+</sup> durch PC's erfolgte.

Hanf-Suspensionskulturen akkumulierten in der Hauptsache PC<sub>3</sub> (59 %). Die Akkumulation von PC's hing stark von der eingesetzten Schwermetallkonzentration im Medium und der Inkubationsdauer ab. Die dem Medium zugesetzten Schwermetalle ließen sich, aufgrund ihrer Fähigkeit die Synthese von PC's in Hanf-Suspensionskulturen zu induzieren, folgendermaßen einordnen:



Im Boden befindliche Schwermetalle reduzierten das Wurzel- bzw. Sprosswachstum von im Gewächshaus angezogenen Hanfpflanzen der Sorte Felina 34 in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration. Die Reduktion des Sprosswachstums durch im Boden befindliche Schwermetalle war in allen Fällen geringer als die Reduktion des Wurzelwachstums. Eine

Erhöhung des  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes im Boden ging mit einer vergleichbaren Erhöhung der Akkumulation von  $\text{Cd}^{2+}$  in den Wurzeln der Hanfpflanzen einher. In Wurzeln 10 Tage alter Hanfpflanzen ließen sich bis zu  $1100 \mu\text{M Cd}^{2+}/\text{g TG}$  bzw.  $880 \text{ nM/g TG Pb}^{2+}$  nachweisen.

Eine Erhöhung der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration von  $0,1 \text{ mM}$  auf  $20 \text{ mM}$  im Boden führte zu einer Vervierfachung des PC-Gehaltes in den Wurzeln der Hanfpflanzen.  $\text{PC}_3$  nahm wie erwartet eine dominierende Stellung bei der Komplexierung des  $\text{Cd}^{2+}$  in Hanfpflanzen ein ( $71,7 \%$ ). Hanfpflanzen reagierten wie Hanf-Suspensionskulturen unmittelbar auf das aus dem Boden aufgenommenen  $\text{Cd}^{2+}$ . 10 Minuten nach Zugabe von  $10 \text{ mM Cd}^{2+}$  zum Boden ließ sich in den Wurzeln 9 Tage alter Hanfpflanzen eine  $40 \%$ ige Reduktion des GSH-Gehaltes bzw.  $70 \%$ ige Reduktion des  $\gamma\text{-EC}$ -Gehaltes sowie die Synthese von  $\text{PC}_2$  nachweisen. Die für Hanf typische PC-Zusammensetzung wurde  $4 \text{ h}$  nach erfolgter  $\text{Cd}^{2+}$ -Zugabe erreicht.

Ein Transport von  $\text{Cd}^{2+}$  aus den Wurzeln in den oberirdischen Spross führte zur Akkumulation von PC's in diesen Organen. 8 Wochen nach der Aussaat wurden  $82 \%$  des in den Hanfpflanzen befindlichen Gesamt- $\text{Cd}^{2+}$ -Gehaltes in den oberirdischen Organen akkumuliert. Unter gleichen Bedingungen angezogene Weizenpflanzen akkumulierten dagegen das aufgenommene  $\text{Cd}^{2+}$  während des Wachstumsverlaufes zu  $60 \%$  in den Wurzeln und zu  $40 \%$  in den oberirdischen Organen.

Durch den Anbau verschiedener Nutz- bzw. Wildpflanzen auf mit Klärschlamm gedüngtem Boden im Freiland sollte die Einsatzmöglichkeit dieser Pflanzenarten zur Sanierung schwermetallbelasteter Böden untersucht werden. Betrachtet man die absoluten  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte der untersuchten Pflanzen, so lässt sich die folgende Reihe zur Akkumulation von  $\text{Cd}^{2+}$  aufstellen:

Mais > Beinwell > Springkraut > Sauerampfer > Hanf > Raps > Weizen > Kamille > Brennessel

Betrachtet man die relativen  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalte in den Organen der verschiedenen Pflanzen, so wird deutlich, dass es sich, außer bei Weizen, Brennessel und Sauerampfer, grundsätzlich um sogenannte Wurzelakkumulatoren handelte. Die Untersuchung der  $\text{Cd}^{2+}$ -,  $\text{Pb}^{2+}$ - bzw.  $\text{Ni}^{2+}$ -Gehalte in den als nachwachsende Rohstoffe verwertbaren Organen von Hanfpflanzen (Fasern, Schäben, Blätter und Früchte) ergab, dass sich die höchsten Schwermetallgehalte in den Blättern nachweisen ließen. Die in den untersuchten Rohstoffen nachgewiesenen  $\text{Ni}^{2+}$ -Gehalte lagen in allen Fällen deutlich über den  $\text{Cd}^{2+}$ - bzw.  $\text{Pb}^{2+}$ -Gehalten. Der Vergleich der Schwermetallgehalte mit den zur Zeit gültigen Grenzwerten zeigte, dass ein Einsatz dieser Rohstoffe zur Energiegewinnung in Bio-Heizkraftwerken möglich wäre. Der Einsatz zur Erzeugung von Biodünger oder zur Produktion von Heimtextilien kann aufgrund der hohen Schwermetallbelastung nicht empfohlen werden. Dämmstoffe auf Grundlage der belasteten Fasern oder Schäben könnten dagegen Verwendung finden, wenn eine umweltgerechte Entsorgung, z.B. durch thermische Verwertung, sichergestellt ist.

## 6. Literatur

AbfG (Abfallgesetz). Bundesgesetzblatt 1990 Teil II: 885

AbfKlärV (Klärschlammverordnung). Bundesgesetzblatt 1992 Teil I: pp. 912 - 916

Adler PR, Wilcox GE (1985)

Rapid perchloric acid digest methods for analysis of major elements in plant tissue. Commun. Soil Sci. Plant Anal. **16**: 1153 - 1163

Ahner BA, Price NM, Morel FMM (1994)

Phytochelatin production by marine phytoplankton at low free metal ion concentrations: Laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 8433 - 8436

Ahner BA, Kong, S, Morel FMM (1995)

Phytochelatin production in marine algae. 1. An interspecies comparison. Limnol. Oceanogr. **40**: 649 - 657

Ahner BA, Morel FMM (1995)

Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. Limnol. Oceanogr. **40**: 658 - 665

Alef, K (1991)

Methoden Handbuch Bodenmikrobiologie. Ecomed 1. Auflage

Alscher RG (1989)

Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. Physiol. Plant. **77**: 457 - 464

Anderson ME (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

AG "Cannabis als Medizin" (2000)

Cannabis als Medizin. [www.hanfnet.org/infohanf/medizin/23Seite.htm](http://www.hanfnet.org/infohanf/medizin/23Seite.htm)

Arpino P (1989)

Combined Liquid Chromatography Mass Spectrometry. Part I. Coupling by Means of a Moving Belt Interface. *Mass Spectrom. Rev.* **8**: 35

Bacher W (1980)

Untersuchungen zur Frage der Korrelation von Wachstum und Shikimat-Stoffwechsel am Beispiel einer *Cannabis sativa* – Suspensionskultur. Dissertation, Universität Mainz

Bahadir M, Parlar H, Spiteller M (1995)

Springer Umweltlexikon. Springer Verlag Berlin, Heidelberg: 928

Baker AJM (1981)

Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutrition* **3**: 643 - 654

Baker AJM (1995)

Metal hyperaccumulation by plants: our present knowledge of the ecophysiological phenomenon. Will Plants have a Role in Bioremediation. 14. Annual Symposium, University of Missouri: 7 - 8

BakerAJM, Walker PL (1989)

Physiological response of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. *Chem. Speciation Bioavailab.* **1**: 7 - 17

Baker AJM, Reeves RD, Smith JAC (1997)

Metal Hyperaccumulator Plants: A Review of the Biological Resource and its Possible Exploitation in the Phytoremediation of Metal-Polluted Soils. Bioavailability of Trace Elements. Symposium, University of California: 621 - 622

Beach LR, Palmiter RD (1981)

Amplification of the metallothionein-I gene in cadmium-resistant mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 2110 - 2114

Berger JM, Jackson PJ, Robinson NJ, Lujan LD, Delhaize E (1989)

Precursor-product relationships of poly( $\gamma$ -glutamylcysteineyl)glycine biosynthesis in *Datura innoxia*. *Plant Cell Rep.* **7**: 632 - 635

Biemann K (1990)

Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods in Enzymology* **193**: 886 - 887

Bilow U (1995)

Eiserner Knöterich: Können Pflanzen vergifteten Boden reinigen? *DIE ZEIT*, Nr. **40** (29.09.1995): 44 - 45

BImSchG (Bundes-Immissionsschutzgesetz). *Bundesgesetzblatt 1997 Teil I*: 805

BImSchV (Bundes-Immissionsschutzgesetz). *Verordnung zur Auswurfbegrenzung von Holzstaub. Bundesgesetzblatt 1975 Teil I*: 3133

BioAbfV (Bioabfallverordnung). *Bundesgesetzblatt 1998 Teil I*

Birke M, Rauch U (1993)

Environmental aspects of the regional geochemical survey in the southern part of East Germany. *J. Geochem. Explor.* **49**: 35 - 61

Bliefert C (1994)

*Umweltchemie*. VCH Weinheim, New York, Cambridge: 336 - 355

Blum WEH (1997)

Cadmium Uptake by Higher Plants; Bioavailability of Trace Elements. *Symposium, University of California*: 109 - 110

Bocsa I, Karus M (1997)

*Der Hanfanbau*. C.F. Müller

Bowler C, Van Montagu M, Inze D (1992)

Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**: 83 - 116

Brooks RR (1994)

Plants that hyperaccumulate heavy metals. In: Farago ME (ed) *Plants and the Chemical Elements*. VCH New York: 87 - 105

Brown DH, Sidhu M (1992)

Heavy Metal Uptake, Cellular Location, and Inhibition of Moss Growth. *Crypt. Bot.* **3**: 82 - 85

Brown SL, Chaney RL, Angle JS, Baker AJM (1995)

Zinc and cadmium uptake by *Thlaspi caerulescens* and *Silene vulgaris* grown in nutrient solution. *Soil Sci Soc Am J* **59**: 125 - 133

Brunold C (1996)

Einführung. In: Brunold C, Ruegesegger A, Brändle R (eds) *Stress bei Pflanzen*. UTB Verlag Bern, Stuttgart, Wien: 15 - 34

Bruns I (1998)

Induktion thiolhaltiger Peptide im Wassermoos *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. unter Schwermetalleinfluss und deren Nutzung als Biomarker für Schwermetallbelastungen aquatischer Systeme. Dissertation, Universität Halle-Wittenberg

Bruns I, Siebert A, Baumbach R, Miersch J, Günther, D, Markert B, Krauss GJ (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 GJ (1999)

Heavy metal inducible compounds from *Fontinalis antipyretica* reacting with Ellman's reagent are not phytochelatin. *The Science of the Total Environment* **241**: 215 - 216

Budzikiewicz H (1972)

Massenspektrometrie - Eine Einführung. Verlag Chemie, Weinheim

Budzikiewicz H (1986)

Selected Reviews on Mass Spectrometric Topics: Field Ionisation and Field Desorption.  
Mass Spectrom. Rev. **5**: 99

Budzikiewicz H (1987)

Selected Reviews on Mass Spectrometer Topics: Amino Acids, Peptides, and Proteins.  
Mass Spectrom. Rev. **6**: 537

Chaney RL, Brown SL, Li JM, Angle JS, Gree C (1995 a)

Potential use of heavy metal accumulators. Mining Environ Manage **3**: 9 - 11

Chaney RL, Li YM, Brown SL, Angle JS, Baker AJM (1995 b)

Hyperaccumulator based phytoremediation of metal-rich soils. Will Plants have a Role in  
Bioremediation. 14. Annual Symposium; University of Missouri: 33 - 34

Chaney RL, Malik M, Li YM, Brown SL, Brewer EP, Angle JS, Baker AJM (1997)

Phytoremediation of soil metals. Current Opinion in Biotechnology **8**: 279 - 284

Chen J, Goldsbrough PB (1994)

Increased activity of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase in tomato cells selected for cadmium  
tolerance. Plant Physiol. **106**: 233 - 239

Chen J, Zhou J, Goldsbrough PB (1997)

Characterization of phytochelatin synthase from tomato. Physiol. Plant. **101**: 105 - 172

CMA (1997)

Nachwachsende Rohstoffe. Centrale Marketing-Gesellschaft der deutschen Agrar-  
wirtschaft m.b.H; Bonn

Comis D (1995)

Metal-scavenging plants to cleanse the soil. Agricultural Research **43** (11): 4 - 9

Cunningham SEI (1995)

Phytoremediation of Pb Contaminated Soils and Sludges. Will Plants have a Role in  
Bioremediation. 14. Annual Symposium, University of Missouri: 38 - 39

Cunningham SD, Berti WR, Huang JWW (1995)

Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol* **13**: 393 - 397

Dalton DA (1995)

Antioxidant Defense of Plants and Fungi. In: Ahmad S (ed.), *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Chapman & Hall New York: 105 - 114

Dambroth M (1993)

Hanfanbau nicht weiter verteufeln. *Land und Forst* **47**: 32 - 33

Dameron CT, Smith BR, Winge DR (1989)

Glutathione-coated Cadmium-Sulfide Crystallites in *Candida glabrata*. *J. Biol. Chem.* **264**: 17355 - 17360

Degraeve N (1981)

Carcinogenic, teratogenic and mutagenetic effects of cadmium. *Mutation Res.* **86**: 115 - 135

De Knecht JA, Van Dillen M, Koevoets PLM, Schat H, Verkleij JAC Ernst WHO (1994)

Phytochelatins in Cadmium-Sensitive and Cadmium-Tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiol.* **104**: 255 - 261

Delhaize E, Jackson PJ, Lujan L, Robinson NG (1989)

Poly( $\gamma$ -glutamylcysteinyl)glycine synthesis in *Datura innoxia* and binding with cadmium: role in cadmium tolerance. *Plant Physiol.* **89**: 700 - 706

De Vos CHR, Schat H, De Waal MAM, Vooijs R, Ernst WHO (1991)

Increased resistance to copper-induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Physiol. Plant.* **82**: 523 - 528

Didierjean L, Frendo P, Nasser W, Genot G, Marivet J, Burkard G (1996)

Heavy-metal-responsive genes in maize: identification and comparison of their expression upon various forms of abiotic stress. *Planta* **199**: 1 - 8

Dushenkov V, Kumar PBAN, Motto H, Raskin I (1995)

Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environ Sci Technol* **29**: 1239 - 1245

Eikmann T, Kloke A (1994)

Ableitungskriterien für die Eikamnn-Kloke-Werte. In: Kreysa G, Wiesner J (Hrsg.): Beurteilung von Schwermetallen in Böden von Ballungsgebieten: Arsen, Blei und Cadmium. Dechema, Frankfurt/Main: 469 - 500

Ellman GL (1959)

Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**: 70 - 77

Ensley BD (1995)

Will Plants have a Role in Bioremediation? Will Plants have a Role in Bioremediation. 14. Annual Symposium; University of Missouri: 1 - 2

Ernst WHO (1975)

Physiology of heavy metal resistance in plants. In: Hutchinsn TC (Hrsg.). Proceedings of 1<sup>st</sup> International Conference on Heavy Metals in the Environment, Vol. II, University of Toronto: 121 - 136

Ernst WHO, Verkleij JAC, Schat H (1992)

Metal tolerance in plants. *Acta Bot. Neerl.* **41**: 213 - 220

Ernst WHO (1996)

Schwermetalle. Einführung. In: Brunold C, Ruegesegger A, Brändle R (eds) Stress bei Pflanzen. UTB Verlag Bern, Stuttgart, Wien: 191 - 220

Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (1998)

Informationsbroschüre zur Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., Gülzow

Fan TWM, Higashi RM (1995)

Environmental Considerations of Phytoremediation. Will Plants have a Role in Bioremediation. 14. Annual Symposium, University of Missouri: 57 - 58

FAO/WHO (1995)

Joint Committee on Food Additives and Contaminants. Position Paper on Cadmium (prepared by France). 27<sup>th</sup> Session, The Hague, Netherlands

Fiedler HJ, Rösler HJ (1993)

Spurenelemente in der Umwelt. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart

Fischbeck G, Heyland KU, Knauer N (1982)

Spezieller Pflanzenbau. 2. Auflage, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart

Förstner U, Salomons W (1991)

Mobilization of Metals from Sediments. In: Merian E (ed) Metals and their Compounds in the Environment. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge: 379 - 398

Foroughi M, Hoffmann G, Teicher K, Venter F (1975)

Der Einfluss unterschiedlich hoher Gaben von Cadmium, Chrom oder Nickel auf Tomaten in Nährlösung. Landw. Forschung, Sonderh. **32/I**: 37 - 48

Foroughi M, Venter F, Teicher K (1981)

Experimentelle Ermittlung der Schwermetallanreicherung und -verteilung in Buschbohnen (*Phaseolus vulgaris* L.). Landw. Forschung, Sonderh. **38**: 239 - 248

Fogel S, Welch JW (1982)

Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**: 5342 - 5346

Fogel S, Welch JW, Cathala G, Karin M (1983)

Gene amplification in yeast: *CUPI* copy number regulates copper resistance. Curr. Genet. **7**: 347 - 355

Foy CD, Chaney RL, White MC (1978)

The physiology of metal toxicity in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. **29**: 511 - 566

Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994)

Photooxidative stress in plants. Physiol. Plant. **92**: 696 - 717

Fresenius W, Lüderwald I (1988)

Element Trace Analysis by Mass Spectrometry. Fresenius W, Lüderwald I (Hrsg.)  
Fresenius Zeitschrift Analyt. Chemie: 103 - 222

Friedland AJ (1990)

The movement of metals through soils and ecosystems. In: Shaw AJ (ed) Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. CRC Press, Boca Raton: 7-19

FuttermittelVO (Futtermittelverordnung). 1988

Garber K (1970)

Luftverunreinigung durch schwermetallhaltige Stäube - Wirkungen auf Pflanzen. Landw. Forschung, Sonderh. **25/I**: 59 - 68

Gawel JE, Ahner BE, Friedland AJ, Trick CG, Morel FMM (1995)

Patterns of phytochelatin concentrations in the field: Seasonal and spatial characteristics. Will Plants have a Role in Bioremediation. 14. Annual Symposium, University of Missouri: 110

Gebhardt H, Grün R, Pusch F (1988)

Zur Anreicherung von Schwermetallen in Böden und Kulturpflanzen durch praktische Klärschlamm Düngung. Z. Pflanzenernähr. Bodenk. **151**: 307 - 310

Gekeler W, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1989)

Survey of the Plant Kingdom for the Ability to Bind Heavy Metals through Phytochelatins. Z. Naturforsch. **44**: 361 - 169

Gerth A (1994)

Biologische Sanierung schwermetallkontaminierter Böden mit Pflanzen. In: Alef K (Hrsg.): Biologische Bodensanierung: Methodenbuch. VCH, Weinheim: 227 - 250

Goldsbrough P, Zhou J, Chen J, Kovari I (1995)

Phytochelatin and Metallothioneins: Complementary Mechanisms for Metal Tolerance? Will Plants have a Role in Bioremediation- 14. Annual Symposium, University of Missouri: 15 - 16

Grant CA, Bailey LD (1997)

Effects of Phosphorus and Zinc Fertiliser Management on Cadmium Accumulation in Flaxseed. *J. Sci. Food Agric.* **73**: 307 - 314

Grill E (1989)

Phytochelatin in Plants. In: *Metal Ion Homeostasis: Molecular Biology and Chemistry*. Liss AR, Inc.: 283 - 300

Grill E, Winnacker EL; Zenk MH (1985)

Phytochelatin: the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. *Science* **230**: 74- 676

Grill E, Gekeler W, Winnacker EL, Zenk MH (1986)

Homo-phytochelatin are heavy metal-binding peptides of homo-glutathione containing Fabales. *FEBS* **205**: 46 - 50

Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1987)

Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 439 - 443

Grill E, Thumann J, Winnacker EL, Zenk, MH (1988)

Induction of heavy-metal binding phytochelatin by inoculation of cell cultures in standard media. *Plant Cell Rep.* **7**: 375 - 378

Grill E, Zenk MH (1989)

Wie schützen sich Pflanzen vor toxischen Schwermetallen? *Chemie in unserer Zeit* **6**: 193 - 199

Grill E, Löffler S, Winnacker EL, Zenk MH (1989)

Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6838 - 6842

Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1991)

Phytochelatin. *Methods Enzymol.* **205**: 333 - 341

Grünhage L, Jäger, HJ (1985)

Wirkung von Schwermetallen auf Wachstum und Schadstoffgehalte von *Allium porrum* L. und *Pisum sativum* L. Angew. Botanik **59**: 11 - 27

Gudzinowicz BJ, Gudzinowicz MJ, Martin HF (1976)

Fundamentals of Integrated GC-MS. Marcel Dekker Inc., New York

Gupta SC, Goldsbrough PB (1990)

Phytochelatin accumulation and stress tolerance in tomato cells exposed to cadmium. Plant Cell Rep **9**: 466 - 469

Gupta SC, Goldsbrough PB (1991)

Phytochelatin accumulation and cadmium tolerance in selected tomato cell lines. Plant Physiol. **97**: 306 - 312

Gupta M, Devi S (1994)

Chronic toxicity of cadmium in *Pteris vittata*, a roadside fern. Ecotoxicology **3**: 235 - 247

Gupta SC, Rai UN, Tripathi RD, Chandra P (1995)

Lead induced changes in glutathione and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle. Chemosphere **30**: 2011 - 2020

Haensler J (1999)

Bioremediation schwermetallkontaminierter Böden durch einjährige Pflanzen in Einzel- und Mischkultur. Bericht über den Stand der wissenschaftlichen Vorhabens, Universität Düsseldorf

Hamer DH (1986)

Metallothionein. Annu. Rev. Biochem **55**: 913 - 951

Harborne JB (1995)

Ökologische Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford: 322 - 323

Harbourne JB (1992)

Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto: 19 - 22

Hausladen A, Alscher RG (1993)

Glutathione. In: Alscher RG, Hess JL (eds) Antioxidants in Higher Plants. CRC Press Inc., Boca Raton: 1 - 29

Heintz A, Reinhardt GA (1996)

Chemie in der Umwelt. Vieweg Verlag, Braunschweig, Wiesbaden: 233 - 257

Hell R, Bergmann L (1988)

Glutathione synthetase in tobacco suspension cultures: catalytic properties and localization. *Physiol. Plant.* **72**: 70 - 76

Hell R, Bergmann L (1990)

$\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization. *Planta* **180**: 603 - 612

Herer J, Bröckers (1993)

Die Wiederentdeckung der Nutzpflanze Hanf. Katalyse, Verlag Zweitausendeins, Frankfurt/Main

Heymann H, Wiechmann H (1996)

Cadmiumverfügbarkeit für Gemüsepflanzen in Kleingartenböden. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **159**: 400 - 424

Hock B, Elstner E (Hrsg.) (1995)

Schadwirkungen auf Pflanzen. Lehrbuch der Pflanzentoxikologie. 3. Überarb. Aufl.; Spektrum, Heidelberg

Höppner F, Menge-Hartmann U (1994)

Anbauversuche zur Stickstoffdüngung und Bestandesdichte von Faserhanf. *Landbauforschung Völkenrode* **44** (4): 314 - 324

Hornburg V, Brümmer GW (1993)

Verhalten von Schwermetallen in Böden: 1. Untersuchungen zur Schwermetallmobilität. Z. Pflanzenern. Bodenk. **156**: 467 - 477

Horvath G, Droppa M, Oravec A, Raskin IV, Marder JB (1996)

Formation of the photosynthetic apparatus during greening of cadmium-poisoned barley leaves. *Planta* **199**: 238 - 243

Howden R, Cobbett CS (1992)

Cadmium-Sensitive Mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **99**: 100 - 107

Howden R, Andersen C, Cobbett CS, Goldsbrough PB (1995 a)

A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **107**: 1067 - 1073

Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS (1995 b)

Cadmium sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol.* **107**: 1059 - 1066

Huang B, Hatch E, Goldsbrough PB (1987)

Selection and characterization of cadmium tolerant cells in tomato. *Plant Science* **52**: 211 - 221

Huang B, Goldsbrough PB (1988)

Cadmium tolerance in tobacco cell culture and its relevance to temperature stress. *Plant Cell Rep.* **7**: 119 - 122

Huang JW, Chen, J, Berti WR, Cunningham SD (1997)

Phytoremediation of Lead-Contaminated Soils: Role of Synthetic Chelates in Triggering Lead Hyperaccumulation in Plants. Bioavailability of Trace Elements. Symposium, University of California: 471 - 472

Hygiene-Institut des Ruhrgebietes (1997)

Aufforstung schwermetallbelasteter Flächen in Hagen-Vorhalle: Umwelthygienische Begutachtung. Hygiene-Institut des Ruhrgebietes, Gelsenkirchen

Jansson GK, Öborn IE (1997)

A Field Study on Cadmium Content in Carrots and the Influence of Soil Factors. Bioavailability of Trace Elements. Symposium, University of California: 123 - 124

Kagi JHR, Schaffer A (1988)

Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* **27**: 8509 - 8515

Kahle H, Bertels C, Noack G, Röder U, Rüter P, Breckle SW (1989)

Wirkungen von Blei und Cadmium auf Wachstum und Mineralstoffhaushalt von Buchenjungwuchs. *Allgemeine Forst-Zeitschrift* **29/30**: 783 - 788

Karus (1995)

Hanf - Ökorohstoff mit Zukunft? Bioresource Hemp Symposium Frankfurt, 1995

Karus M, Linden W, Murr C, Waskow F (1995)

Weshalb der Hanf wiederkehren wird: Über die universelle Nutzpflanze Hanf. In: Bröckers M (hrsg.) Die Wiederentdeckung der Nutzpflanze Hanf. Verlag Zweitausendeins, Frankfurt a. M.: 299 - 351

Kehlenbeck K (1996)

Schwermetallaufnahme ausgewählter Pflanzenarten an einem flugstaubgedüngten Standort in Süd-Schleswig-Holstein, Diplomarbeit Universität Hamburg

Keller C, Attinger W, Furrer G, Kayser A, Keller A, Lothenbach B, Ludwig C, Merki M, Stenz B, Schulin R (1997)

Extraction of Heavy Metals from Contaminated Agricultural Soils by Crop Plants. Bioavailability of Trace Elements. Symposium; University of California: 473 - 474

Kinzel H (1982)

Pflanzenökologie und Mineralstoffwechsel. Ulmer, Stuttgart

Klapheck S, Latus C, Bergmann L (1987)

Localization of glutathione synthetase and distribution of glutathione in leaf cells of *Pisum sativum* L. *J. Plant Physiol.* **131**: 123 - 131

Klapheck S, Fliegner W, Zimmer I (1994)

Hydroxymethyl-phytochelatins  $[(\gamma\text{-glutamylcysteine})_n\text{-serine}]$  are metal induced peptides of the *Poaceae*. *Plant Physiol.* **104**: 1325 - 1332

Klein H, Jensch UE, Jäger HJ (1979)

Die Schwermetallaufnahme von Maispflanzen aus Zink-, Cadmium- und Kupferoxid-kontaminierten Böden. *Angew. Botanik* **53**: 19 - 30

Klein H, Priebe A, Jäger HJ (1981)

Grenzen der Belastbarkeit von Kulturpflanzen mit dem Schwermetall Cadmium. *Angew. Botanik* **55**: 295 - 308

Kloke A (1974)

Blei – Zink – Cadmium: Anreicherung in Böden und Pflanzen. *Staub-Reinhalt. Luft* **34** (1):. 18 - 21

Kneer R, Zenk MH (1992)

Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry* **44**: 69 - 74

Kneer R, Zenk MH (1997)

The formation of Cd-phytochelatin complexes in plant cell cultures. *Phytochemistry* **44**: 69 - 74

Kochian LV (1997)

Mechanisms of Heavy Metal and Radionuclide Transport in hyperaccumulating Plant Species. *Bioavailability of Trace Elements. Symposium, University of California*: 631 - 632

Körber-Grohne (1988)

Nutzpflanzen in Deutschland. Konrad Theiss Verlag, Stuttgart

- Kondo N, Imai K, Isobe M, Goto T, Murasugi A, Wada-Nakagawa C, Hayashi Y (1984)  
Cadystin A and B, major subunit peptides comprising cadmium binding peptides induced in fission yeast-separation, revision of structures and synthesis. *Tetrahedron Lett.* **25**: 3869 - 3872
- Kozlowski P, Baraniecki P, Grabowska L, Mankowski J (1995)  
Recultivation of Degraded Areas through Cultivation of Hemp. *Bioresource Hemp Symposium, Frankfurt, 1995*
- Kosower NS, Kosower EM (1978)  
The Glutathione Status of cells. *Int. Rev. Cytol.* **54**: 109 - 160
- Kovari IA (1997)  
Genes for Glutathione Synthesis from Tomato: Structure, Expression and Role in Cadmium Tolerance. Dissertation; Purdue University, USA
- Kranner I, Grill D (1996)  
Significance of Thiol-Disulfide Exchange in Resting Stages of Plant Development. *Bot. Acta* **109**: 8 - 14
- Kretschmar R (1991)  
Kulturtechnisch-bodenkundliches Praktikum: Ausgewählte Laboratoriumsmethoden. Eine Anleitung zum selbstständigen Arbeiten an Böden. 7. Aufl., Selbstverlag, Univ. Kiel
- Krupinska K (1997)  
*Cannabis sativa* L.: Nutzpflanze mit Vergangenheit und Zukunft. *Biologie in unserer Zeit* **27** (2): 123 - 129
- KrW-/AbfG (Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetz). *Bundesgesetzblatt 1996 Teil I*: 1354
- Kumar PBAN, Dushenkov V, Motto H, Raskin I (1995)  
Phytoextraction: The Use of Plants To Remove Heavy Metals from Soils. *Environ. Sci. Technol.* **29**: 1232 - 1238

Lamoureux GL, Rusness DG (1993)

Glutathione in the metabolism and detoxification of xenobiotics in plants. In: De Kok JC et al. (eds) Sulfur Nutrition and Assimilation in higher plants. SPB Academic Publishing bv. The Hague, The Netherlands: 221 - 237

Lancaster JE, Reynolds PHS, Shaw ML, Domisse EM, Munro J (1989)

Intra-cellular localization of the biosynthetic pathway to flavor precursors in onion. *Phytochemistry* **28**: 461 - 464

Landberg T, Greger M (1995)

Is heavy-metal tolerance important in phytoremediation? Will Plants have a Role in Bioremediation. 14. Annual Symposium, University of Missouri: 95

Larson RA (1988)

The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **27**: 969 - 978

Law MY, Halliwell B (1986)

Purification and properties of glutathione synthetase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Plant Sci.* **43**: 185 - 191

Leise A (1998)

Einfluss von Cadmium und Zink auf das Keimungsverhalten von Hanfsaat (*Cannabis sativa* L.). Diplomarbeit; Universität Wuppertal

Linn ML, Staba EJ (1961)

Peppermint and Spearmint Tissue Cultures. I. Callus Formation and Submerged Culture. *Lloydia* **24**: 139 - 145

Loeffler S, Hochberger A, Grill E, Winnacker EL, zenk MH (1989)

Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. *FEBS Lett.*: 42 - 46

Lopez J, Vazquez DM, Carballeira A (1994)

Stress responses and metal exchange kinetics following transplant of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*. *Freshwater Biol.* **32**: 185 - 198

Macnair MR (1995)

The Genetics of Heavy Metal Tolerance in Higher Plants. Will Plants have a Role in Bioremediation. 14. Annual Symposium, University of Missouri: 13 - 14

Macnair MR (1997)

The Genetics of Metal Tolerance and Accumulation by Plants. Bioavailability of Trace Elements. Symposium, University of California: 647 - 648

Maitani T, Kubota H, Sato K, Yamada T (1996)

The composition of metals bound to class III metallthionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. Plant Physiol. **110**: 1145 - 1150

MAK-Werte (Grenzwerte in der Luft am Arbeitsplatz). TRGS 900 (1998)

Mankowski J, Grabowska L, Baraniecki P (1995)

Hemp and Flax Cultivated on the Soil Polluted with Heavy Metals - A Biological Purification of the Soil and a Raw Material for the Pulp Industry. Bioresource Hemp Symposium Frankfurt, 1995

Mansfield R (1986)

Verzeichnis landwirtschaftlicher und gärtnerischer Kulturpflanzen (ohne Zierpflanzen). Bd. 1. Springer-Verlag, Berlin

Margoshes M, Vallee BL (1957)

A cadmium protein from equine kidney cortex. J. Am. Chem. Soc. **79**: 4813 - 4814

Marquart B (1919)

Der Hanfbau. Paul Parey Verlag, Berlin

Marquard VR, Bohm H, Friedt W (1990)

Untersuchungen über Cadmiumgehalte in Leinsaat (*Linum usitatissimum* L.). Fat Sci. Technol. **92**: 468 - 472

Mason AZ, Jenkins KD (1995)

Metal detoxification in aquatic organisms. In: Tessier, A; Turner DR (eds). Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. UPAC 3. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore: 479 - 607

McLafferty FW (1983)

Tandem Mass Spectrometry. McLafferty (hrsg.). Wiley-Interscience, New York

Mehra RK, Mulchandani P (1995)

Glutathione-mediated transfer of Cu (I) into phytochelatins. Biochem. J.: 697 - 705

Mehra RK, Kodati R, Abdullah R (1995)

Chain length-dependent Pb(II)-coordination in phytochelatins. Biochem. Biophys. Res. Comm. **215**: 730 - 736

Meister A (1983)

Selective modification of glutathione metabolism. Science **220**: 472 - 476

Meister A (1985)

Glutathione synthetase from rat kidney. Meister A (ed) Methods in Enzymology **113**: 393 - 399

Meister A, Tate SS (1976)

Glutathione and related  $\gamma$ -glutamyl compounds: Biosynthesis and utilization. Ann. Rev. Biochem. **45**: 559 - 564

Meister A, Anderson ME (1983)

Glutathione. Annu. Rev. Biochem. **52**: 711 - 760

Mench M, Martin E (1991)

Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates of *Zea mays* L., *Nicotiana tabacum* L. and *Nicotiana rustica* L.. Plant and Soil **132**: 187 - 196

Mench MK, Morel JL, Guckert B (1988)

Metal binding with root exudates of low molecular weight. J. Soil Sci. **39**: 521 - 527

Mendum ML, Gupta SC, Goldsbrough PB (1990)

Effect of glutathione on phytochelatin synthesis and cadmium tolerance in tomato cells. *Plant Physiol.* **93**: 484 - 488

Mengel K (1991)

Ernährung und Stoffwechsel der Pflanzen. 7., überarb. Aufl., Fischer, Jena

Merian E (1984)

Metalle in der Umwelt. 2. Aufl., Verlag Chemie

Meuwly P, Rauser, WE (1992)

Alteration of thiol pools in roots and shoots of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Physiol.* **99**: 8 - 15

Meuwly P, Thibault P, Rauser WE (1993)

$\gamma$ -Glutamylcysteinylglutamic acid - a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. *FEBS Letters* **336**: 472 - 476

Meuwly P, Thibault P, Schwan AL, Rauser WE (1995)

Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant J* **7**: 391 - 400

Mölleken H, Ostwald A, Theimer RR (1995)

*In vitro* Versuche zum Anbau verschiedener Hanfsorten auf schwermetallkontaminierten Böden und Nachweis von Phytochelatinen. Bioresource Hemp Symposium Frankfurt, 1995

Morel FMM, Ahner BA, Gawel J (1995)

Phytochelatinas as Indicators of Metal Stress in Aquatic and Land Plants. Will Plants have a Role in Bioremediation. 14. Annual Symposium, University of Missouri: 67

Morishita T, Boratynsky JK (1992)

Accumulation of cadmium and other metals in organs of plants growing around metal smelters in Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.* **38**: 781 - 785

Mühleisen S (1992)

Pflanzen reinigen Ackerböden. Bild der Wissenschaft **6**/1992: 125

Murphy A, Taiz L (1995)

Correlation between seedling copper-tolerance and metallthionein gene expression in ten *Arabidopsis* ecotypes. Will Plants have a Role in Bioremediation. 14. Annual Symposium, University of Missouri: 128

Mutoh N, Hayashi Y (1988)

Isolation of mutations of *Schizosaccharomyces pombe* unable to synthesize cadystin, small Cd-binding peptides. Biochem. Biophys. Res. Commun. **151**: 32 - 39

Nature (1996)

Car-maker turns to cannabis - for fibre. Nature **384**: 95

Neumann D, Zur Nieden U, Lichtenberger O, Leopold I (1995)

How does *Armeria maritima* Tolerate High Heavy Metal Concentrations?; J. Plant Physiol. Vol. **146**: 704 - 717

Öko-Tex-Initiative (2000)

Öko-Tex Standard 100. Forschungsinstitut Hohenstein, Bönningheim

Olafson RW, McCubbin WD, Kay CM (1988)

Primary- and secondary-structural analysis of a unique prokaryotic metallothionein from a *Synechococcus* sp. *Cyanobacterium*. Biochem. J. **251**: 691 - 699

Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF, ow DW (1995)

Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vascular membrane protein. J. Biol. Chem. **270**: 4721 - 4728

Ostwald A, Goldsbrough P, Theimer R (1999 a)

Uptake of heavy metals and phytochelatin synthesis in fibre hemp. Plant Biology'99: Poster Nr. 442

Ostwald A, Leise, A; Goldsbrough P, Theimer R (1999 b)

Uptake of heavy metals and phytochelatin synthesis in fibre hemp. Plant Biology'99:  
Vortrag Nr. 22003

Parekh D, Puranik RM, Srivastava HS (1990)

Inhibition of chlorophyll biosynthesis by cadmium in greening maize leaf segments.  
Biochem. Physiol. Pflanzen **186**: 239 - 242

Pate DW (1994)

Chemical ecology of *Cannabis*. Journal of the International Hemp Association **1** (2):  
29 - 36

Pate DW (1995)

*Cannabis*: The Chemistry of its Ecology and Evolution. Bioresource Hemp Symposium  
Frankfurt, 1995

Patel S, Cudney R, McPherson A (1994)

Crystallographic Characterization and Molecular Symmetry of Edestin, a Legumin from  
Hemp. J. Mol. Biol. **235**: 361 - 363

Peterson PJ, Alloway BJ (1979)

Cadmium in soils and vegetation. In: Webb M(ed) The chemistry, biochemistry and  
biology of cadmium. Elsevier / North Holland Biomedical Press: 93 - 132

Pflanzen und Kräuter (1987)

Ein Führer durch Europas Wildpflanzen. 2. Auflage, Naumann & Göbel,  
Verlagsgesellschaft Köln

Phytotech (1998)

Evaluation of Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) Phytoremediation Potential Summary.  
By: Phytotech, Inc., Monmouth Junction, NJ

Pohlandt K (1996)

Zusammensetzung von Holzaschen. VDI-Symposium "Alt- und Restholz", Düsseldorf

Popelka JC, Schubert S, Schulz R, Hansen AP (1996)

Cadmium Uptake and Translocation during Reproductive Development of Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Angew. Bot.* **70**: 140 - 147

Pulford ID, McGregor SD, Duncan HJ, Wheeler CT (1995)

Uptake of Heavy Metals from Contaminated Soil by Trees. 14. Annual Symposium; University of Missouri: 49 - 50

Punshon T, Dickinson NM (1997)

Heavy Metal Resistance in *Salix*: Pre-Treatment and Acclimation; Bioavailability of Trace Elements. Symposium, University of California: 35 - 36

Randall M (1995)

Plant Uptake of Heavy Metals. 14. Annual Symposium, University of Missouri: 111

Raskin I, Kumar PBAN, Dushenkov S, Salt D (1994)

Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology* **5**: 285 - 290

Raskin I, Dushenkov S, Kumar PBAN, Salt D (1995)

Rhizofiltration - Using plants for remediation of heavy metals in water. 14. Annual Symposium, University of Missouri

Rausch P (1995)

Verwendung von Hanfsamenöl in der Kosmetik. Bioresource Hemp Symposium Frankfurt, 1995

Rausser WE (1990)

Phytochelatin. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 61 - 86

Rausser WE (1991)

Phytochelatin. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 61 - 86

Rauser WE (1993)

Metal-Binding Peptides in Plants. In: De Kok LJ, Stulen I, Rennenberg H, Brunold C, Rauser WE (eds) Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants. SPB Academic Publishing The Hague, The Netherlands: 239 - 251

Rauser WE (1995)

Phytochelatins and Related Peptides. *Plant Physiol.* **109**: 1141 - 1149

Rauser WE (1998)

Metal binding in plants: role in stress response and metal detoxification; application for a grant

Rauser WE (1999)

Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* **31** (1): 19 - 48

Rauser WE, Schupp R, Rennenberg H (1991)

Cysteine,  $\gamma$ -Glutamylcysteine, and Glutathione Levels in Maize Seedlings. *Plant Physiol.* **97**: 128 - 138

Rauser WE, Meuwly P (1993)

Part of the cadmium in roots is bound by certain thiolate isopeptides *Plant Physiol.* **102**: 163

Reddy GN, Prasad MNV (1990)

Heavy metal-binding proteins/peptides: occurrence, structure, synthesis and functions. A review. *Env. Exp. Bot.* **30**: 252 - 264

Reese RN, White CA, Winge DR (1992)

Cadmium-Sulfide Crystallites in Cd-( $\gamma$ EC)<sub>n</sub>-G Peptide Complexes from Tomato. *Plant Physiol.* **98**: 225 - 229

Reese RN, Wagner GJ (1987)

Effects of buthionine sulfoximine on Cd<sup>2+</sup>-binding peptide levels in suspension-cultures tobacco cells treated with Cd, Zn, or Cu. *Plant Physiol.* **84**: 574 - 577

Rennenberg H, Schmitz K, Bergmann L (1979)

Long-distance transport of sulfur in *Nicotiana tabacum*. *Planta* **147**: 57 - 62

Rennenberg H (1982)

Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* **21**: 2771 - 2781

Rennenberg H (1987)

Aspects of glutathione function and metabolism in plants. In: Von Wettstein D, Chua NH (eds) *Plant Molecular Biology*. Plenum Publishing, New York: 279 - 292

Rhodes D (1998)

Analysis of Amino Acids. Skript zum Praktikum. Hort 301, Purdue University

Riddell-Black D, Rowlands, C, Snelson A (1995)

Heavy Metal Uptake from Sewage Sludge Amended Soil by *Salix* and *Populus* Species Grown for Fuel. 14. Annual Symposium, University of Missouri: 51 - 52

Robinson R (1996)

Hanf - Droge, Heilmittel, Nahrung, Faser. Naturhaus, VGS Verlagsgesellschaft

Robinson NJ, Ratlief RL, Anderson PJ, Delhaize E, Berger J, Jackson PJ (1988)

Biosynthesis of Poly( $\gamma$ -glutamylcysteinyl)glycines in cadmium-tolerant *Datura innoxia* (Mill.) Cells. *Plant Science* **56**: 197 - 204

Robinson NJ, Evans IM, Mulcrone J, Bryden J, Tommey AM (1992)

Genes with similarity to metallothionein genes and copper, zinc ligands in *Pisum sativum* L. *Plant and Soil* **146**: 291 - 298

Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C, Lackson PJ (1993)

Plant metallothioneins. *Biochem. J* **295**: 1 - 10

Rueggsegger A, Schmutz D, Brunold C (1990)

Regulation of glutathione synthesis by cadmium in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol.* **93**: 1579 - 1584

Ruegsegger A, Brunold C (1992)

Effect of cadmium on  $\gamma$ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. *Plant Physiol* **99**: 428 - 433

Salt DE, Thurmann DA, Tomsett AB, Sewell AK (1989)

Copper phytochelatin of *Mimulus guttatus*. *Proc. R. Soc. Lond.* **236**: 79 - 89

Salt DE, Wagner GJ (1993)

Cadmium transport across tonoplast vesicles from oat roots. Evidence for a  $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiport activity. *J. Biol. Chem.* **268**: 12297 - 12302

Salt DE, Blaylock M, Kumar PBAN, Dushenkov, V, Ensley BD, Chet I, Raskin I (1995)

Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. *Biotechnology Vol.* **13**: 468 - 474

Salt DE, Raskin I (1995)

Cadmium Transport and Accumulation in Plants. 14. Annual Symposium, University of Missouri: 23 - 24

Salt DE, Rauser, WE (1995)

MgATP-Dependent Transport of Phytochelatin Across the Tonoplast of Oat Roots. *Plant Physiol.* **107**: 1293 - 1301

Salt DE, Pickering IJ, Prince RC, Gleba D, Dushenkov S, Smith RB, Raskin I (1997)

Metal Accumulation by Aquacultured Seedlings of Indian Mustard. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 1636 - 1644

Sauerbeck D (1982)

Welche Schwermetalle in pflanzen dürfen nicht überschritten werden, um Wachstumsbeeinträchtigungen zu vermeiden? *Landw. Forschung, Sonderh.* **39**: 108 - 129

Saxena PK, KrishnaRaj S, Dan T, Perras MR, Vettakkorumakankav NN (1999)

Phytoremediation oh heavy metals contaminated and polluted soils. In: Prasad MNV, Hagemeyer J (eds) *Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 305 - 329

Scandalios JG (1993)

Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.* **101**: 7 - 12

Schat H, Llugany M, Bernhard R (1997)

Metal- Specific Patterns of Tolerance, Uptake and Transport of Heavy Metals in Hyperaccumulating and Non-Hyperaccumulating Metallophytes. Bioavailability of Trace Elements. Symposium, University of California: 637 - 638

Scheffer F (1992)

Lehrbuch der Bodenkunde: Scheffer, Schachtschabel. 13., durchgesehene Aufl., Enke, Stuttgart

Scheller HV, Huang B, Hatch E, Goldsbrough PB (1987)

Phytochelatins synthesis and glutathione levels in response to heavy metals in tomato cells. *Plant Physiol.* **85**: 1031 - 1035

Scherer G, Barkemeyer H (1983)

Cadmium concentrations in tobacco and tobacco smoke. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **7**: 71 - 78

Schmeil-Fitschen (1968)

Flora von Deutschland und seinen angrenzenden Gebieten. Rau W, Senghas K (eds) Quelle & Meyer, Heidelberg: 258

Schwarz H (1989)

Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). *Analytiker-Handbuch*: 199

Seelig GF, Meister A (1985)

$\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase from erythrocytes. Meitser (ed) *Methods in Enzymology* **113**: 390 - 392

Simon E (1977)

Cadmium tolerance in populations of *Agrostis tenuis* and *Festuca ovina*; *Nature*, London **265**: 328 - 330

Smith JA, Krämer U, Maker AJM (1995)

Role of metal transport and chelation in nickel hyperaccumulation in the genus *Alyssum*. Will Plants have a Role in Bioremediation. 14. Annual Symposium, University of Missouri: 11 - 12

Sommer G, Stritesky A (1976)

Gefäßversuche zur Ermittlung der Schadgrenzen von Cadmium, Kupfer, Blei und Zink im Hinblick auf den Einsatz von Abfallstoffen in der Landwirtschaft. Landw. Forschung **29**: 88 - 100

Sonnenberg (1995)

Schwermetallaufnahme aus kontaminierten Böden durch *Cannabis sativa* und Verwendung der pflanzlichen Biomasse. Diplomarbeit. Universität Oldenburg (unveröffentlicht)

Sonnenpost (1997)

Kennen Sie Hanf? Rosenheimer Solarförderverein e.V., Rosenheim

Steffens JC (1990)

The heavy metal-binding peptides of plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. **41**: 553 - 575

Steffens JC, Hunt DF, Williams BG (1986)

Accumulation of non-protein metal-binding polypeptides ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl)<sub>n</sub>-glycine in selected cadmium-resistant tomato cells. J. Biol. Chem. **261**: 13879 - 13882

Steffens LC, Williams BG (1989)

Metal Ion Homeostasis: Molecular Biology and Chemistry. Liss AR, Inc.: 359 - 366

Strasdeit H, Duhme AK, Johanning J (1993)

Cadmiumkomplexe mit pflanzlichen Chelatbildnern. GIT Fachz. Labor **8**: 678 - 681

Street HE (1977)

In: Plant tissue and cell culture. Botanical Micrographs, Vol. 11. Street HE (Hrsg.); Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne

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

TA Luft (Technische Anleitung zur Reinhaltung der Luft). GMBI 1986: 3133

TA Siedlungsabfall (Technische Anleitung zur Verwertung, Behandlung und sonstigen  
Entsorgung von Siedlungsabfällen). BAnz 1993. Nr. 99a

Theimer RR, Mölleken H, Hoppe A (1997)

Oils from Cannabis sativa L. - valuable food and raw materials for pharmaceuticals and  
other industrial products. Bioresource Hemp Symposium; Frankfurt/Main: 56

Thumann J, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1991)

Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. FEBS  
**284**: 66 - 69

Tomsett AB, Thurman DA (1988)

Molecular biology of metal tolerances in plants. Plant, cell and Environment **11**:  
383 - 394

Trüby P, Raba A (1990)

Schwermetallaufnahme von Gartenpflanzen der Freiburger Rieselfelder. Agrabiol. Res.  
**43**: 139 - 146

Tukendorf A, Rauser WE (1990)

Changes in glutathione and phytochelatin in roots of maize seedlings exposed to  
cadmium. Plant Sci. **70**: 155 - 166

Tyler G (1990)

Bryophytes and heavy metals: A literature review. Bot. J. Linn. Soc. **104**: 231 - 253

Van Assche F, Clijsters H (1990)

Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment* **13**: 195 - 206

Verkleij JAC (1993)

The Effects of Heavy Metal Stress on Higher Plants and their Use as Biomonitors. In: Markert B (ed) *Plants as biomonitors - Indicators for heavy metals in the terrestrial environment*. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge: 415 - 424

Verkleij JAC, De Knecht JA, Harmens H, Schat H (1995)

Physiological studies on Zn and Cd<sup>2+</sup> tolerance in higher plants. Will Plants have a Role in Bioremediation. 14. Annual Symposium, University of Missouri: 25 - 26

Vögeli-Lange R, Wagner GJ (1990)

Subcellular Localization of Cadmium and Cadmium-Binding Peptides in Tobacco Leaves. *Plant Physiol.* **92**: 1086 - 1093

Wagner GJ, Salt D, Gries G, Donachie K, Wang R, Yan X (1995)

Biochemical Studies of Heavy Metal Transport in Plants. 14. Annual Symposium, University of Missouri: 21 - 22

Wallnöfer PR, Engelhardt G (1995)

Schadstoffe aus dem Boden. In Hock B, Elstner EF (eds) *Schadwirkungen auf Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford: 118 - 140

Waskow F (1995)

Hanf & Co. *Die Renaissance der heimischen Faserpflanzen*. Verlag die Werkstatt, Göttingen

Wells JM, Brown DH (1987)

Factors affecting the kinetic of intra- and extracellular cadmium uptake by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. *New Phytol.* **105**: 123 - 137

Wells JM, Brown DH (1990)

Ionic control of intracellular and extracellular Cd uptake by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. *New Phytol.* **116**: 541 - 553

Welch RM, Norvell WA (1997)

Plant Mechanisms for Rhizosphere-Mobilization, Root-Uptake, Translocation, and Deposition of Cadmium. Symposium, University of California: 665 - 666

Winkler, HD (1997)

Umweltmedienübergreifendes Gesamtkonzept zur Entsorgung von Gebrauchtholz - Richtwerte zur umweltverträglichen Verwertung und Beseitigung. Jahresbericht 1997, Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen

Wirtshafter D (1995)

Why Hemp seeds? Bioresource Hemp Symposium Frankfurt, 1995

WHO (1972)

Evaluation of certain food additives and of the contaminants mercury, lead and cadmium (FAO Nutrition Report Series No 51 WHO Technical Report Series 505). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy

WHO (1987)

Air Quality Guidelines for Europe

Wood GW (1982)

Field Desorption Mass Spectrometry: Applications. Mass Spectrom. Rev. **1**: 63

Yost RA, Fetterolf DD (1983)

Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) Instrumentation. Mass Spectrom. Rev. **2**: 1

ZEBS (Richtwerte für Schadstoffe in Lebensmittel). Bundesgesundheitsblatt 1993. **36** (5): 210 - 211

Zenk MH (1996)

Heavy metal detoxification in higher plants - a review. Gene **179**: 21 - 30

Zhou J, Goldsbrough PB (1994)

Functional homologs of fungal metallthionein genes from *Arabidopsis*. Plant Cell **6**: 875 - 884

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, auch den hier nicht namentlich genannten Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Diese Dissertation wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Roland R. Theimer an der Bergischen Universität/Gesamthochschule Wuppertal, Fachbereich 9, Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Pflanzen, angefertigt. Herrn Prof. Roland R. Theimer danke ich an dieser Stelle für die positiven Impulse, sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und für seine Bereitschaft, mich einen Teil der Experimente im Labor von Peter Goldsbrough (Purdue University, USA) durchführen zu lassen. Den Herren Dr. Rainer Büchter, Dr. Jörg Kobert, Dr. Peter Linger, Tim Kreutzer sowie Jochen Schäfer und Frau Dr. Helga Mölleken danke ich für die vielseitigen Anregungen und Hilfestellungen, vor Allem bei der Pflege und dem Ernten der Hanfpflanzen und -zellkulturen. Frau Astrid Leise danke ich für die vielen anregenden Gespräche während der Sortierung und Abzählung des Saatgutes und die moralische Unterstützung in "Krisensituationen".

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. P. Goldsbrough, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor, die unermüdliche Bereitschaft, Fragen zu beantworten, für die vielen fachkundigen Hinweise und nicht zuletzt für die kritischen und hilfreichen Anmerkungen zur Ausarbeitung der Plant Biology '99 - Beiträge. Bei Herrn Dr. Karl Wood und Herrn Dr. David Rhodes möchte ich mich besonders für die kompetente und freundliche Einführung in die LC-MS- und AAS-Technik sowie die Aminosäureanalyse bedanken. Ferner gilt mein Dank auch den Mitarbeitern des Forestry, Horticulture, Soil Science bzw. Food Science Departments der Purdue University für die Bereitstellung der unentbehrlichen Aufschluss-, AAS-, GC-MS, MS- und LC-MS-Geräte. Ganz besonders möchte ich mich bei allen Mitarbeitern von Herrn Dr. P. Goldsbrough für die herzliche Atmosphäre und die tatkräftige Unterstützung bei allen Problemen im Labor und der Erschließung neuer Sportmöglichkeiten bedanken. Bernie Leinberger möchte ich für die unschätzbare Hilfe beim Kultivieren der Zellkulturen und der Meisterung technischer und alltäglicher Probleme danken. Mein besonderer Dank gilt auch Rafaela Ruiz Heras, deren kleines Appartement in Notzeiten auch zwei Leute beherbergen konnte. Mandy Brandt, Jennifer Boatright, Weenun Bundithaya, Iris Perez, Jeremy Zhou und Dale Karlson danke ich für die Freundschaft und die gemeinsame Zeit, vor allem im Brew Pub, beim Golfspielen und Inline-Skaten.

Ferner gilt mein Dank Herrn Dr. Jürgen Miersch und den Mitarbeitern von Prof. Dr. G.-J. Krauss an der Universität Halle/Wittenberg für die unbürokratische Bereitstellung eines HPLC-Gerätes in letzter Minute und die anregenden Gespräche zum Thema "Eindeutige Identifizierung von Phytochelativen mittels HPLC?".

Zudem danke ich allen Freunden und Verwandten, vor Allem meiner Mutter Ingrid Ostwald, Kerstin Rohrig, Andree Meier und Jürgen Beniermann, für kritisches und sorgfältiges Korrekturlesen des Manuskriptes. Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Andree und meinen Eltern für ihre Geduld, ihr Verständnis (auch für meine langen Aufenthalte in den USA) und ihre uneingeschränkte Unterstützung, die die Erstellung dieser Arbeit erst ermöglicht hat.