

# **Schwermetalle in Raps und Sonnenblumen**

- ihre Verteilung und Bindungsformen -

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

**- Dr. rer. nat. -**

des Fachbereichs Chemie und Chemietechnik  
der Universität Paderborn

von

Stefan Wittke

Paderborn, 2002



*„Wer nichts als Chemie versteht,  
versteht auch die nicht recht.“*

Georg Christoph Lichtenberg

*Für Simone*



## Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Grote danke ich für die Überlassung des überaus interessanten Themas, die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit sowie für sein Verständnis und seine Geduld in einigen schwierigen Situationen während dieser Zeit.

Herrn Dir. u. Prof. Dr. Th. Betsche von der Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung (BAGKF) in Detmold danke ich für die Übernahme des Korreferates, für die vielen hilfreichen Diskussionen und seinen Ideenreichtum.

Herrn Dr. J. Brüggemann von der Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung (BAGKF) in Detmold danke ich für seine praktischen Ratschläge und die stete Diskussionsbereitschaft, welche wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hat.

Bei den Mitarbeitern des Institutes II der BAGKF in Detmold möchte ich mich für das ausgezeichnete Arbeitsklima und die tatkräftige Unterstützung während meiner Tätigkeit bedanken. Insbesondere danke ich Frau M.–T. Hanneforth.

Den Mitarbeitern des Arbeitskreises Analytische Chemie der Universität Paderborn danke ich für ihre Anteilnahme am Gelingen dieser Arbeit und für ihre moralische Unterstützung.

Ich danke Herrn Dr. W. Sailmeier von der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie in München-Garching für die Durchführung der Aminosäureanalysen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die finanzielle Unterstützung.



Die vorliegende Arbeit wurde im Fachbereich 13 Chemie und Chemietechnik der Universität Paderborn, Fachgebiet Analytische Chemie und an der Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung (BAGKF), Institut für Biochemie von Getreide und Kartoffel, in Detmold in der Zeit von März 1999 bis Januar 2002 unter Leitung von Prof. Dr. Manfred Grote erstellt.

Referent: Prof. Dr. M. Grote

Korreferent: Direktor und Prof. Dr. habil. Th. Betsche

Datum der Abgabe: 23.01.2002

Datum der mündlichen Prüfung: 09.04.2002





## Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit

1. **49. Tagung für Getreidechemie**, Arbeitsgemeinschaft Getreideforschung e.V., 17.-18.06.1998, Detmold. S. Wittke, J. Brüggemann, Th. Betsche, M. Grote. Abstract: Schwermetallbindende Substanzen in heimischen Ölpflanzen. (Poster)
2. **Symposium "European Research towards Safer and Better Foods"**, 18.-20.10.1998, Karlsruhe. J. Brüggemann, Th. Betsche, H. Ditters, H.-P. Thier, N. Tümmers, S. Wittke, M. Grote. Binding forms of Cd and other heavy metals in staple foods in the view of bioavailability, Abstract Nr. 2.2.24, 50. (Poster)
3. **ANAKON 99**, Gesellschaft Deutscher Chemiker, Fachgruppe Analytische Chemie, 07.-10.04.1999, Konstanz. S. Wittke, J. Brüggemann, Th. Betsche, M. Grote. Why is the Cadmium and Nickel content in sunflower seeds ten or five times higher than in rape seeds?, Abstract Nr. S60, 186. (Poster)
4. **Die biologische Bedeutung der Mengen- und Spurenelemente, 19. Arbeitstagung**, 03.-04.12.1999, Jena. J. Brüggemann, S. Wittke, M. Grote, Th. Betsche. Bindungsformen von Schwermetallen in Weizen und Ölsaaten. Abstract in: Mineralstoffe, Mengen- und Spurenelemente in der Prävention. Hrsg.: M. Anke, R. Müller, U. Schäfer, Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2001, 94 - 105. (Poster)
5. **Euroanalysis XI**, 03.-09.09.2000, European Conference on Analytical Chemistry, Division of Analytical Chemistry, Federation of European Chemical Societies, FECS Event n° 246, Lissabon. S. Wittke, M. Grote, J. Brüggemann, Th. Betsche. Heavy metal binding compounds in seeds, leaves, stems and roots of sunflower and rape plants: a comparative investigation. Abstract Nr. OC 74. (Vortrag)
6. **Botanikertagung 2000**, 17.-22.09.2000, Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft und der Vereinigung für Angewandte Botanik, Jena. S. Wittke, Th. Betsche, J. Brüggemann, M. Grote. Schwermetallbindende Substanzen in Sonnenblumen und Raps, Abstract Nr. P 14-10, 224. (Poster)
7. **Botanikertagung 2000**, 17.-22.09.2000, Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft und der Vereinigung für Angewandte Botanik, Jena. Th. Betsche, J. Brüggemann, M. Grote, H.P. Thier, N. Tümmers, S. Wittke. Schwermetalle und ihre Bindungsformen: Lokalisierung, Transport, Analyse, Abstract Nr. P 14-11, 225. (Poster)
8. **Regionalverbandstagung 2001 der Lebensmittelchemischen Gesellschaft**, Gesellschaft Deutscher Chemiker, Regionalverband NRW, 15.03.2001 Paderborn, M. Grote, S. Wittke, J. Brüggemann, Th. Betsche, Schwermetalle und ihre Bindungsformen in Sonnenblumen und Raps. Abstract in: Lebensmittelchemie **55**. 70, 2001. (Vortrag)



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Aufgabenstellung</b>	<b>1</b>
1.1	Schwermetalle in der Umwelt	2
1.2	Physiologische Wirkung von Schwermetallen	2
1.3	Wirkungspfade für Schwermetalle	5
1.4	Aufnahme und Transport von Schwermetallen in Pflanzen	6
1.5	Elementspeziesanalytik - Bindungsformen	8
1.6	Wie schützen sich Pflanzen vor Schwermetallen?	9
1.6.1	Immobilisierung	10
1.6.2	Vermeidung	10
1.6.3	Aktiver Efflux	10
1.6.4	Komplexierung: Zelluläre Komplexbildner	11
1.6.4.1	Nicht-peptidische Komplexbildner	11
1.6.4.2	Schwermetall-bindende Peptide: Metallothioneine	12
1.6.5	Kompartimentierung	15
1.7	Sonnenblumen und Raps: Stand der Forschung	16
1.7.1	Sonnenblumen ( <i>Helianthus annuus</i> )	16
1.7.2	Raps ( <i>Brassica napus</i> )	18
1.8	Zielsetzung	20
1.9	Untersuchungsmethodik	20
<b>2</b>	<b>Schwermetalle in Sonnenblumen und Rapspflanzen aus landwirtschaftlichem Anbau</b>	<b>26</b>
2.1	Sonnenblumenkerne	26
2.2	Rapssamen	26
2.3	Sonnenblumen	27
2.4	Raps	31
<b>3</b>	<b>Anzuchtversuche in Hydrokultur</b>	<b>35</b>
3.1	Sonnenblumen	36
3.2	Raps	38

---

3.3	<b>Schwermetallgehalte in Sonnenblumen- und Raps- pflanzen aus der Anzucht in Hydrokultur</b>	<b>39</b>
4	<b>Kompartimentierung von Schwermetallen in Organellen von Sonnenblumen und Raps</b>	<b>44</b>
4.1	<b>Chloroplasten</b>	<b>44</b>
4.2	<b>Mitochondrien und Peroxisomen</b>	<b>46</b>
5	<b>Zwischenfazit</b>	<b>50</b>
6	<b>Schwermetall-Bindungsformen in Sonnenblumen und Raps</b>	<b>51</b>
6.1	<b>Sonnenblumenkernextrakte</b>	<b>52</b>
6.2	<b>Rapssamenextrakte</b>	<b>58</b>
6.3	<b>Sonnenblumenkerne: Extraktion unter reduzierenden Bedingungen</b>	<b>60</b>
6.4	<b>Rapssamen: Extraktion unter reduzierenden Bedingungen</b>	<b>63</b>
6.5	<b>Sonnenblumenblätterextrakte</b>	<b>65</b>
6.6	<b>Rapsblätterextrakte</b>	<b>69</b>
6.7	<b>Sonnenblumenblätter: Extraktion unter reduzierenden Bedingungen</b>	<b>71</b>
6.8	<b>Rapsblätter: Extraktion unter reduzierenden Bedingungen</b>	<b>73</b>
6.9	<b>Sonnenblumen- und Rapsstängelextrakte</b>	<b>74</b>
6.10	<b>Sonnenblumenwurzelextrakte</b>	<b>75</b>
6.11	<b>Rapswurzelextrakte</b>	<b>77</b>
6.12	<b>Sonnenblumenwurzeln: Extraktion unter reduzierenden Bedingungen</b>	<b>78</b>
6.13	<b>Rapswurzeln: Extraktion unter reduzierenden Bedingungen</b>	<b>79</b>
7	<b>Isolierung von Cadmium-bindenden Substanzen aus Sonnen- blumen- und Rapspflanzen</b>	<b>83</b>
8	<b>Strukturanalytische Untersuchungen der aus Sonnenblumen- und Rapswurzeln isolierten Cadmium-bindenden Substanzen</b>	<b>87</b>

---

<b>8.1</b>	<b>Fluoreszenz-HPLC</b>	<b>87</b>
<b>8.2</b>	<b>Aminosäureanalyse der aus Sonnenblumen- und Raps- wurzeln isolierten Cadmium-bindenden Substanzen</b>	<b>88</b>
<b>8.3</b>	<b>ESI-MS (Ion Trap, LCQ)</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>Fazit</b>	<b>93</b>
<b>10</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>96</b>
<b>11</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>99</b>
<b>11.1</b>	<b>Anzucht von Sonnenblumen- und Rapspflanzen unter Hydrokulturbedingungen</b>	<b>100</b>
<b>11.2</b>	<b>Herstellung der Pflanzenextrakte</b>	<b>104</b>
<b>11.3</b>	<b>Gelfiltrationschromatographie (GFC)</b>	<b>105</b>
	11.3.1 Bestimmung des Ausschlussvolumens	108
	11.3.2 Bestimmung des Totalvolumens	108
	11.3.3 Kalibration der Säulen	109
<b>11.4</b>	<b>Ionenaustauscherchromatographie (IAC)</b>	<b>111</b>
<b>11.5</b>	<b>Fluoreszenz-HPLC</b>	<b>112</b>
	11.5.1 Synthese von Thiolagarose	114
	11.5.2 Derivatisierung von Thiolen mit Monobrombiman	114
<b>11.6</b>	<b>Mikrowellengestützter Druckaufschluss</b>	<b>116</b>
	11.6.1 System mls 1200 mega	116
	11.6.2 System ethos 1600	116
<b>11.7</b>	<b>Atomspektrometrische Verfahren</b>	<b>117</b>
	11.7.1 Bestimmung von Cadmium	119
	11.7.2 Bestimmung von Kupfer	120
	11.7.3 Bestimmung von Nickel	120
	11.7.4 Bestimmung von Eisen	121
	11.7.5 Bestimmung von Zink	121
	11.7.6 Bestimmung von Kupfer mit der DCP	121
<b>11.8</b>	<b>Electrospray-Massenspektrometrie (Ion-Trap-ESI-MSMS)</b>	<b>122</b>
<b>11.9</b>	<b>Bestimmung von Thiolgruppen nach Ellmann</b>	<b>123</b>
<b>11.10</b>	<b>Proteinbestimmung nach Bradford</b>	<b>124</b>

---

<b>11.11 Gewinnung von Wurzeldruck-Exudat (Xylemsaft)</b>	<b>125</b>
<b>11.12 Isolierung und Bestimmung von Organellen aus Kotyledonen von Sonnenblumen- und Rapskeimlingen</b>	<b>125</b>
11.12.1 Chloroplasten	125
11.12.2 Mitochondrien und Peroxisomen	126
<b>11.13 Vorbereitung der isolierten Cadmium-Bindungsformen zur Aminosäureanalyse</b>	<b>130</b>
<b>12 Literaturverzeichnis</b>	<b>131</b>
<b>Anhang</b>	
<b>A 1 Weitere Elutionsprofile der Gelchromatographie</b>	<b>A1</b>
<b>A 1.1 Sonnenblumenkerne</b>	<b>A1</b>
<b>A 1.2 Rapssamen</b>	<b>A6</b>
<b>A 1.3 Sonnenblumenblätter</b>	<b>A8</b>
<b>A 1.4 Rapsblätter</b>	<b>A9</b>
<b>A 1.5 Sonnenblumenwurzeln</b>	<b>A10</b>
<b>A 1.6 Rapswurzeln</b>	<b>A13</b>
<b>A 1.7 Sonnenblumen- und Rapsstängel</b>	<b>A15</b>
<b>A 1.8 Elutionsprofile der IAC</b>	<b>A16</b>
<b>A 2 Spektren der ESI-MS und ESI-MSMS</b>	<b>A18</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ABA	Abscisinsäure
<i>AtPCS1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> Phytochelatin-Synthase Gen
BAGKF	Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung
BMVEL	Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft
Cys	Cystein
DCP	Direct Current Plasma (Emissionsspektrometrie)
Dnp	Daten nicht präsentiert
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Electrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
EXAFS	extended x-ray absorption fine structure
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FS	Frischsubstanz
GCS	$\gamma$ -Glutamylcysteinyl Synthase
GFC	Gelfiltrationschromatographie
Glu	Glutamin
Gly	Glycin
GS	Glutathionsynthase
GSH	Glutathion
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
hsp	Hitze Schock Protein (Stressprotein)
IAC	Ionenaustauschchromatographie
IARC	International Agency for Research and Cancer
kD	kilo-Dalton (kg/mol)
mBBr	MonoBrombiman
MS	Massenspektrometrie
MT	Metallothionein
PC	Phytochelatin
PCS	Phytochelatin-Synthase
PWTI	Provisional Tolerable weekly intake
SBK	Sonnenblumenkerne
SH	Thiol
SM	Schwermetall
SpPCS1	Schizosaccharomyces pombe Phytochelatin-Synthase Gen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Trockensubstanz
XAS	X-ray absorption spectrometry

**Liste der Pflanzen und ihrer botanischen Bezeichnungen**

Champignon	<i>Agaricus bisporus</i>
Großsporechampignon	<i>Agaricus macrosporus</i>
Riesenstraußgras	<i>Agrostis gigantea</i>
Rotes Straußgras	<i>Agrostis tenuis</i>
Steinkraut	<i>Alyssum sp.</i>
Löwenmaul	<i>Antirrhinum majus</i>
Ackerschmalwand	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Erdnuss	<i>Arachis hypogaea</i>
Meerrettich	<i>Armoracia rusticana</i>
Indischer Senf	<i>Brassica juncea</i>
Raps	<i>Brassica napus</i>
Kohl	<i>Brassica oleracea</i>
Weißer Rübchen	<i>Brassica rapa</i>
Wiesenschaumkresse	<i>Cardaminopsis halleri</i>
Grünalge	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Gurke	<i>Cucumis sativus</i>
Stechapfel	<i>Datura innoxia</i>
Rasenschmiele	<i>Deschampsia caespitosa</i>
Rotschwingel	<i>Festuca rubra</i>
Sonnenblume	<i>Helianthus annuus</i>
Kresse	<i>Lepidium sativum</i>
Linsen	<i>Linum usitatissimum</i>
Apfelbaum	<i>Malus domestica</i>
Brotsschimmel	<i>Neurospora crassa</i>
Tabak	<i>Nicotiana tabacum</i>
Reis	<i>Oryza sativa</i>
Gartenbohne	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Erbse	<i>Pisum sativum</i>
Busch	<i>Psychotria douarrei</i>
Rauwolfie	<i>Rauvolfia serpentina</i>
Hundsrose	<i>Rosa canina</i>
Färberröte	<i>Rubia tinctorum</i>
Bäckerhefe	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Spalthefe	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
gewöhnliches Leimkraut	<i>Silene vulgaris / cucubalus</i>
Hellerkraut	<i>Thlaspi arvense</i>
Gebirghellerkraut	<i>Thlaspi caerulescens</i>
Täschelkraut	<i>Thlaspi goesingense</i>
Weizen	<i>Triticum aestivum</i>
Galmeiveilchen	<i>Viola calaminaria</i>
Mais	<i>Zea mays</i>



# 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Sonnenblumen- und Rapssaaten gehören zu den bedeutendsten Ölsaaten in der Bundesrepublik Deutschland. In den Jahren 1995/96 wurde die in Deutschland verarbeitete Menge an Rapssamen (ca.  $3300 \cdot 10^3$  t) und Sonnenblumenkernen (ca.  $450 \cdot 10^3$  t) nur von der Menge an verarbeiteten Sojabohnen (ca.  $3450 \cdot 10^3$  t) übertroffen. Die Weltproduktion an Ölsaaten zeigt Abbildung 1.

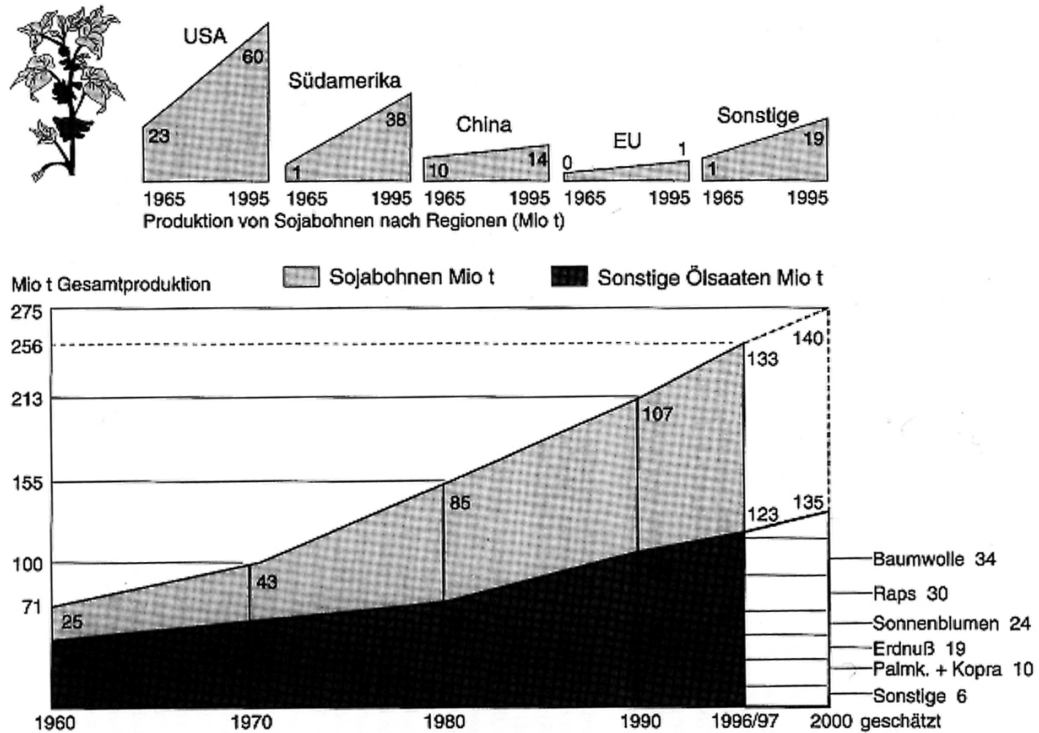


Abb. 1: Weltproduktion Ölsaaten (Quelle: Verband dt. Ölmühlen) [1]

Die Raps- und Sonnenblumensaat werden hauptsächlich zur Gewinnung von Ölen für die Nahrungsmittelindustrie verwendet. Die Schwermetallbelastung dieser Öle ist gering, weil bei der Ölproduktion die Schwermetalle im Pressrückstand verbleiben [2-4]. Der proteinreiche Pressrückstand wird in der Tierfütterung verwendet, sodass die in den Ölsaaten enthaltenen Schwermetalle in die Nahrungskette gelangen [1]. TRAULSEN beschreibt in diesem Zusammenhang, dass etwa 60 % des gesamten in Sonnenblumenpflanzen enthaltenen Cadmiums im Pressrückstand nachzuweisen sind. Für Raps beträgt dieser Anteil etwa 15 % [5].

Sonnenblumen und Raps sind zweikeimblättrige Pflanzen. Im Vergleich zu anderen zweikeimblättrigen Pflanzen akkumulieren Sonnenblumen, ähnlich wie einkeimblättrige Getreidepflanzen (z.B. Weizen), deutlich mehr Cadmium [6-8]. Untersuchungen von BRÜGGEMANN an der BAGKF in Detmold ergaben, dass der Cadmium- und Nickel-Gehalt in ausgereiften Sonnenblumenkernen durchschnittlich zehn- bzw. fünfmal höher ist als in Rapssamen (Tabelle 1) [7]. Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die Ursachen dieser unterschiedlichen Schwermetall-Gehalte von Sonnenblumenkernen und Rapssamen aufzuklären.

**Tab. 1: Durchschnittliche Schwermetallgehalte in Saaten von Sonnenblumen und Raps [8, 9]**

arithmetisches Mittel von  
 n = 665 Rapssamenmustern (BEE 1995 – 1997) bzw.  
 n = 249 Sonnenblumenkernmustern (Bundessortenamt, Wertprüfung 1996)

Ölsaaten	Cadmium	Nickel		Zink
		[mg/kg FS]		
Raps	0,041 ± 0,003	0,41 ± 0,04		41 ± 1
Sonnenblumen	0,365 ± 0,007	2,00 ± 0,08		52 ± 1

Woher stammen die Schwermetalle und wie gelangen sie in die Ölpflanzen?

## 1.1 Schwermetalle in der Umwelt

Metalle, deren spezifisches Gewicht einen Wert von  $4 \text{ g/cm}^3$  [10] bzw.  $5 \text{ g/cm}^3$  [11, 12] überschreitet, werden als Schwermetalle bezeichnet. Schwermetalle sind erst durch Verwitterungsprozesse, Vulkanismus und besonders durch anthropogenen Einfluss (Bergbau, Verbrennung fossiler Brennstoffe usw.) der Biosphäre vermehrt zugänglich [13]. Am Beispiel des Cadmiums sollen anthropogen bedingte Emissionen aufgezeigt werden.

**Tab. 2: Anthropogen bedingte Cadmiumemissionen (1983) [13, 14, 15]**

Anthropogene Ursache	Eintrag [ $10^3 \text{ t/Jahr}$ ]
Energiegewinnung	0,79
Stahlproduktion, Raffinerien	5,43
Verarbeitende Industrie	0,6
Müllverbrennung	0,75
Landwirtschaftliche Abwässer	2,2
Urbane Abfälle	4,2
Dünger	0,2
Kohlestaub	7,2
-----	
Gesamteintrag	29,2

Der auf menschliche Einflüsse zurückzuführende Schwermetalleintrag in die Umwelt betrug 1986:  $3 \cdot 10^4 \text{ t}$  Cadmium,  $1,1 \cdot 10^4 \text{ t}$  Quecksilber,  $10^5 \text{ t}$  Nickel,  $10^6 \text{ t}$  Blei,  $2,3 \cdot 10^6 \text{ t}$  Zink und  $2,2 \cdot 10^6 \text{ t}$  Kupfer [13]. Untersuchungen aus Deutschland, Österreich und der Schweiz belegen, dass bessere Filtersysteme und die Einführung des bleifreien Benzins bis 1995 zu einer Emissionsreduktion von 65 % bei Cadmium und 90 % bei Blei im Vergleich zum Höchststand der Emissionen führten. Beim Quecksilber beträgt die Reduktion ungefähr 70 % [16-19]. Dagegen wurde für Nickel keine Veränderung nachgewiesen [17].

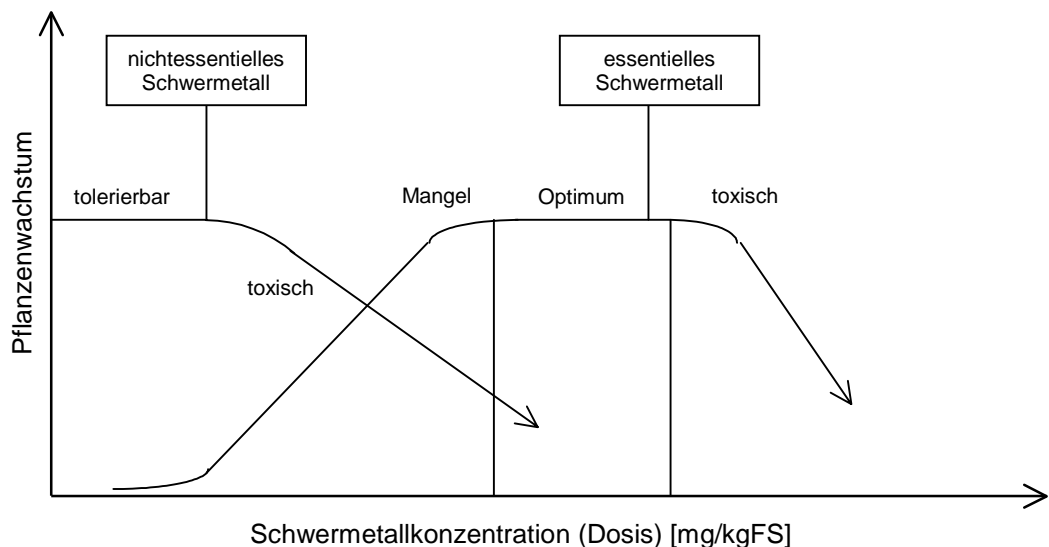
## 1.2 Physiologische Wirkung von Schwermetallen

Lebende Organismen bestehen zu 80-90 % aus Wasser. Die Trocken-substanz dieser Organismen enthält 44,5 % Kohlenstoff, 42,5 % Sauerstoff,

6,5 % Wasserstoff, 2,5 % Stickstoff sowie die Alkali- bzw. Erdalkalimetalle Kalium (1,9 %), Kalzium (1 %) und Magnesium (0,2 %) [20]. Zudem enthalten diese Organismen noch Spurenelemente, die für Stoffwechselfvorgänge von großer Bedeutung sind. Nahezu ein Drittel der bekannten Enzyme benötigt als Kofaktor die Anwesenheit eines Metallions. Beispiele für Metalloenzyme sind Alkohol-Dehydrogenase und Superoxid-Dismutase (jeweils Zink als Kofaktor) sowie Ascorbat-Oxidase (Kupfer). Weitere für Enzyme bedeutsame Schwermetalle sind u.a. Eisen, Kobalt, Mangan und Nickel. Eisen wird als Bestandteil von Cytochromen, Ferredoxin, Hämoglobin und Leghämoglobin benötigt. Kobalt wird im Vitamin B12 von Tieren gebraucht, Mangan ist ein Kofaktor von Enzymen im Photosystem II höherer Pflanzen und Nickel Bestandteil der Urease [21, 22].

Schwermetalle werden deshalb entsprechend ihrer physiologischen Wirkung in verschiedene Klassen eingeteilt [23, 24]:

- **Nicht-essenzielle Schwermetalle:** z.B. Arsen, Blei, Cadmium, Quecksilber, Platin und Zinn. Sie werden von pflanzlichen und tierischen Organismen nicht benötigt, in sehr niedrigen Konzentrationen allerdings toleriert.
- **Essenzielle Schwermetalle:** Pflanzliche und tierische Organismen benötigen Schwermetalle wie Eisen, Kupfer, Mangan, Nickel und Zink. Obwohl diese Schwermetalle essenziell sind, weisen sie ein toxisches Potenzial auf. Die optimale Konzentration der essenziellen Schwermetalle umfasst nur einen kleinen Konzentrationsbereich (Abbildung 2) [25]. Kupfer und Eisen wirken in höheren Konzentrationen durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Pflanzen toxisch [26].



**Abb. 2:** Abhängigkeit des Wachstums eines pflanzlichen Organismus von der Schwermetallkonzentration (grafisch bearbeitet nach [26])

Die Tabellen 3 a/b fassen die physiologischen Wirkungen von Cadmium, Kupfer, Nickel und Zink auf tierische und pflanzliche Organismen zusammen.

**Tab. 3 a: Vergleich der physiologischen Kenndaten von Cadmium und Kupfer für tierische und pflanzliche Organismen [3, 27-43]**

	<b>Cadmium</b>	<b>Kupfer</b>
<b>Bedeutung für Mensch und Tier</b>		
biolog. Bedeutung	Enzyme unbekannt; Cd-Thioneine	essenziell, Cu-Proteine, Enzyme
Minimalbedarf	Essenzialität nicht erwiesen	Mensch: 1-3 mg/Tag
Mangelsymptome	Muskelschwäche, reduzierte Futterraufnahme	Skelettschäden, Anämie, Wachstumsstörungen,
Aufnahme	oral; inhalativ	oral
Akkumulation	Nieren, Leber, Plazenta	Großhirn, Leber, Niere, Schilddrüse, Knochenmark
toxische Wirkung	Funktionsstörungen der Niere, kanzerogen, Dekalzifizierung	mutagene und karzin. Wirkung, chronische Toxizität
<b>Bedeutung für Pflanzen</b>		
biolog. Bedeutung	bisher nicht bekannt	essenziell (Enzymbestandteil)
Mangelsymptome	bisher nicht bekannt	Spitzen- und Blattchlorosen bzw. -nekrosen, Kümmerwuchs, Blüten- und Blattansatz behindert
Aufnahme	Wurzeln, Blätter	Wurzeln
Akkumulation	in Wurzeln und Spross	in Wurzel und Spross
toxische Wirkung	hohe Phytotoxizität in geringen Konzentrationen	toxisch für Algen, phytotoxisch bei Konzentrationen > 20 mg/kg

**Tab. 3 b: Vergleich der physiologischen Kenndaten von Nickel und Zink für tierische und pflanzliche Organismen [3, 27-38]**

	<b>Nickel</b>	<b>Zink</b>
<b>Bedeutung für Mensch und Tier</b>		
biolog. Bedeutung	essenziell	essenziell (in über 200 Enzymen)
Minimalbedarf	Mensch: 25-50 µg/Tag	Mensch: 2-10 mg/Tag
Mangelsymptome	vermind. Nahrungsaufnahme, Ca- u. Zn-Stoffwechsel gestört, Anämie, erhöhte Sterblichkeit	Hautkrankheiten, Sehstörungen, gestörte Immunabwehr, Zwergenwuchs
Aufnahme	inhalativ, oral	inhalativ, oral
Akkumulation	versch. Ni-Depots im Körper	Prostata, Knochen, Muskeln
toxische Wirkung	Allergen, mutagene / kanzerogene Wirkung, Störung Zn- u. Mg-Stoffw.	Anämie, Magen-Darm-Störungen
<b>Bedeutung für Pflanzen</b>		
biolog. Bedeutung	essenziell	essenziell
Mangelsymptome	Blattchlorosen u. -nekrosen, Kümmerwuchs	Chlorosen, Nekrosen, Hemmung Proteinsynthese, Kleinblättrigkeit,
Aufnahme	Wurzel	Wurzel, Blätter
Akkumulation	Zellwand Epidermis	rel. hohe Mobilität in Pflanzen
toxische Wirkung	Wurzelschäden, Chlorosen, Ertragsminderung, phytotoxisch bei Konzentrationen von 1-2 mg/kg	Chlorosen, Hemmung d. Längenwachstums, phytotoxisch bei Konzentrationen > 200 mg/kg

Die durch den Mangel an essenziellen Schwermetallen ausgelösten Symptome verschwinden zumeist durch die gezielte Applikation der entsprechenden Nährelemente. Die durch zu hohe Applikationen bedingten toxischen Wirkungen von Schwermetallen sind wegen deren Persistenz nicht ohne weiteres zu beheben. Die biologische Halbwertszeit von Cadmium, welches von tierischen Organismen in Leber und Niere angereichert wird, beträgt 25 Jahre [44]. Die Toxizität von Schwermetallen äußert sich in lebenden Organismen in der Denaturierung von Proteinen, der Permeabilitätsveränderung an Membranen und Ionenkanälen sowie der Enzymhemmung [21, 45]. Als Folge sind bei Pflanzen z.B. gehemmtes Wurzelwachstum, erniedrigte Photosynthese, Chlorosen, Nekrosen und Schädigungen des Wasserhaushaltes zu beobachten (Tabelle 3 a/b). Die Folgen der Schwermetallakkumulation im menschlichen Organismus demonstrieren die durch eine Cadmiumvergiftung ausgelöste „Itai-Itai-Krankheit“ sowie die von einer Quecksilbervergiftung hervorgerufene „Minamata-Krankheit“ [46].

### 1.3 Wirkungspfade für Schwermetalle

Die essenziellen und nicht-essenziellen Schwermetalle werden dem menschlichen Organismus hauptsächlich über die Ernährung zugeführt. Folgende Wirkungspfade werden unterschieden:

- Boden - **Nahrungspflanze** - Mensch
- Boden - **Futterpflanze** - Nutztier - Mensch
- Boden - (Sickerwasser -) Grundwasser (- Trinkwasser) - Mensch

Nach einer Studie der WHO nehmen Menschen etwa 50 % des Cadmiums aus pflanzlichen Nahrungsmitteln auf [47]. Die theoretische tägliche Cadmium-Aufnahme eines Erwachsenen in ländlich und industriell geprägten Gegenden verdeutlicht Tabelle 4:

**Tab. 4: Berechnete hypothetische tägliche Cadmiumaufnahme eines Erwachsenen [46]**

Eine Unterscheidung zwischen Raucher und Nichtraucher ist von Bedeutung, weil oral aufgenommenes Cadmium zu 4-8 %, inhaliertes Cadmium dagegen zu 15-40 % vom Körper absorbiert wird [46].

	<b>Cadmiumquelle</b>	<b>Aufnahme [<math>\mu\text{g}/\text{d}</math>]</b>
1. Nichtraucher in ländlicher Umgebung	Luft	0,0005
	Ernährung	4
	Wasser	2
	<b>Gesamt</b>	<b>6</b>
2. Raucher in industrieller Umgebung, der Cadmium-belastete Nahrungsmittel verzehrt	Luft	25
	Ernährung	84
	Wasser	2
	Tabak	4
	<b>Gesamt</b>	<b>115</b>

Tabelle 4 zeigt, dass der Hauptanteil des Cadmiums vom Menschen über die Nahrung aufgenommen wird. Im ungünstigsten Fall überschreitet die wöchentliche Cadmiumaufnahme eines Rauchers mit ~800 µg/kg den PTWI-Wert („Provisional Tolerable Weekly Intake“) von 400-500 µg/kg sehr deutlich [47-49]. Ein hoher Eintrag von Schwermetallen in die Nahrungskette ist deshalb unbedingt zu vermeiden, um die alimentäre Belastung des am Ende der Nahrungskette angesiedelten Menschen so gering wie möglich zu halten. Es stellt sich daher die Frage: Wie gelangen die benötigten und nicht benötigten Schwermetalle in pflanzliche Organismen und gibt es Mechanismen, die möglicherweise eine zu hohe Schwermetallaufnahme verhindern können?

#### **1.4 Aufnahme und Transport von Schwermetallen in Pflanzen**

Die Aufnahme von Schwermetallen durch Pflanzen aus dem Boden hängt von verschiedenen Faktoren ab. Die Bodenart, die Schwermetallkonzentration im Boden, Mikroorganismen (Mykorrhizapilze) und der pH-Wert des Bodens haben einen großen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit und damit auf die Aufnahme der Schwermetalle durch das Wurzelsystem [21]. Eine Einteilung der Schwermetalle auf Grund einer potenziellen Boden-Pflanze-Barriere („plant-soil-barrier“) findet sich bei CHANEY [50].

Verschiedene Untersuchungen belegen, dass hohe Cadmiumgehalte im Boden mit erhöhten Cadmiumgehalten in Sonnenblumenkernen korrelieren [55, 56]. Die Bioverfügbarkeit von Cadmium, Nickel und Zink steigt mit abnehmendem pH-Wert [33, 58]. Ein niedriger pH-Wert des Bodens ist deshalb ein Faktor, der für eine erhöhte Cadmiumanreicherung in Ölsaaten verantwortlich gemacht wird [5, 51-57]. Die niedrigen pH-Werte der Böden in den Hauptanbaugebieten für Sonnenblumen führen in den USA zu einer erhöhten Belastung der dort geernteten Sonnenblumenkerne mit Cadmium. Die Cadmiumgehalte dieser Sonnenblumenkerne überschreiten den Richtwert der Bundesrepublik Deutschland von 0,6 mgCd/kg FS z.T. sehr deutlich [51, 56].

Die Aufnahme von essenziellen und nicht-essenziellen Schwermetallen durch Pflanzen erfolgt in der Regel über das Wurzelsystem. Die Zellen der Wurzelhaare sind mit Hilfe von Protonenpumpen in der Lage,  $H_3O^+$ -Ionen an die Umgebung abzugeben und im Boden gebundene Kationen freizusetzen. Der radiale Weitertransport von Wasser und der darin gelösten Nährstoffe kann auf zwei Arten erfolgen. Entweder apoplastisch in den Zellwänden oder symplastisch von Zelle zu Zelle, d.h. mit Membrantransport. Der apoplastische Transport wird in der Endodermis durch den Casparyschen Streifen unterbrochen. Ab hier erfolgt der Weitertransport ausschließlich symplastisch bis in die Zellen des Xylem-Parenchyms. Dort erfolgt die Exkretion von Wasser und den Nährstoffen in die Xylem-Leitgefäße [22]. Das Xylem dient dem Ferntransport von Wasser und der darin gelösten Nährstoffe von der Wurzel in Spross und Blätter. Wie das Xylem mit Ionen beladen wird, ist bisher noch nicht endgültig geklärt. Am Aufnahme-System

von Aminosäuren in den Symplasten sind wahrscheinlich Aminosäure-Transporter beteiligt [59-63]. Untersuchungen zur Anionen-Leitfähigkeit des Plasmalemmas der Xylemparenchymzellen von Gerste-Wurzeln deuten an, dass die Beladung des Xylems mit  $K^+$ ,  $NO_3^-$  und  $Cl^-$  ein passiver Prozess ist [64]. Im Xylem liegen die anorganischen Ionen entweder frei oder an organische Säuren gebunden vor [65-71]. Nickel wird in Nickel-Hyperakkumulatoren in Form eines Nickel-Histidin-Komplexes transportiert [72]. Zwischen den Xylemstrahlen liegt im Leitbündel das Phloem. Im Phloem werden vor allem in den Blättern gebildete Photosyntheseprodukte wie Saccharose aber auch Kalium transportiert. Zielpunkte des Phloemstroms sind sämtliche generativen und vegetativen Pflanzenteile. Der Phloemtransport beruht auf einer Differenz des osmotischen Potenzials innerhalb der Siebelemente, die durch Beladung der Siebelemente im Bereich der „Source“-Gewebe erreicht wird („Druckstrom“-Theorie) [21, 73, 74].

Bisher sind die Transportwege und -mechanismen von Schwermetallionen innerhalb einer Pflanze nicht vollständig aufgeklärt. Für Blei, Magnesium, Natrium, Phosphor und Schwefel wird vermutet, dass der Transport hauptsächlich im Phloem stattfindet, im Gegensatz zu Kalzium, Lithium, Strontium und Bor, die keine ausgeprägte Phloemmobilität aufweisen [23]. Untersuchungen an Linsen-, Erdnuss- und Weizenpflanzen deuten an, dass die Cadmium- und Zinkverlagerung in die Saaten überwiegend über das Phloem erfolgt [75-79]. Experimente zur Translokation von Cadmium mit  $^{109}Cd$  zeigen, dass 95 % des auf Blätter von Weizenkeimlingen applizierten  $^{109}Cd$  dort verbleiben [80]. Ähnliche Untersuchungen an Weizenpflanzen während der Reifungsperiode beschreiben eine Verlagerung von 9-17 % des in Blätter oder Pflanzenstiele applizierten  $^{109}Cd$  in das Korn. Zudem wird beschrieben, dass beim Reifen des Kornes die Retranslokation des Cadmiums von Blättern („Source“) in den Stiel abnahm und gleichzeitig die Verlagerung in das Korn („Sink“) sich verstärkte [81]. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen zur Retranslokation von Kobalt, Nickel, Rubidium und Zink über das Phloem [78, 79, 82-84]. Allerdings wird von den Autoren beschrieben, dass die Remobilisierung von Zink [85] und Rubidium [86] aus Blättern um ein Vielfaches höher ist als die von Cadmium. MARSCHNER [23] führt in diesem Zusammenhang an, dass es bei dem Übergang von der Vegetations- zur Reifephase einer Pflanze zu gravierenden Veränderungen im „Source-Sink-Verhältnis“ kommen kann und reifende Samen die hauptsächlichste Senke von Schwermetallen für das Phloem werden. Mit Sonnenblumen und Raps wurden derartige Untersuchungen zur Remobilisierung von Schwermetallen bisher nicht durchgeführt.

Für Weizenkörner wurde am Beispiel des Mangans gezeigt, dass Spurenelemente, welche über das Xylem transportiert werden, sich überwiegend in den Spelzen anreichern [87]. Dagegen konnte für Cadmium nachgewiesen werden, dass die Spelzen nur sehr wenig Cadmium akkumulieren [88]. Für geschälte Sonnenblumenkerne wird Ähnliches beobachtet. Der Cadmiumgehalt ist in geschälten Kernen deutlich höher als in den Schalen [89, vgl. 2.3]. Die Aufnahme von Schwermetallionen in die Zelle erfolgt durch spezifische Membrantransportproteine [90-94], wie CPx-ATPasen. Diese transportieren

Schwermetalle wie Kupfer, Zink oder Cadmium. Für Grünalgen, das Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* und die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* sind Nramp-Proteine beschrieben, welche als Transporter für Cadmium und Eisen fungieren [21, 90, 95-97]. Zudem ist eine ZIP-Genfamilie beschrieben, welche bei *Arabidopsis thaliana*, Erbsen und dem Gebirgshellerkraut *Thlaspi caerulescens* für Fe/Zn-Transporter kodiert [21, 98, 99].

## 1.5 Elementspeziesanalytik (Bindungsformen)

Die bisher vorgestellten Untersuchungen basieren zum größten Teil auf der Bestimmung von Schwermetalltotalgehalten. Unterschiede im Schwermetallgehalt in den Pflanzenorganen (Wurzel, Stängel, Blatt, Frucht) sind für Phloem-mobile und nicht-Phloem-mobile Schwermetalle ansatzweise erklärbar. Allerdings wird nicht deutlich, warum für ein bestimmtes Schwermetall Unterschiede zwischen verschiedenen Pflanzen wie z.B. Sonnenblumen und Raps, existieren. Des Weiteren kann das Phänomen so genannter Metall-Hyperakkumulatoren nicht erklärt werden. Hyperakkumulatoren tolerieren hohe Konzentrationen bestimmter Schwermetalle ohne Wachstumsstörungen. Es sind Kupfer- und Kobaltakkumulierende sowie mehr als 300 Nickelakkumulierende Pflanzen bekannt [100]. Letztere sind zumeist Brassicaceen wie das Steinkraut *Alyssum* und das Hellerkraut *Thlaspi* [101-107]. *Arabidopsis* und *Thlaspi caerulescens* sind Cadmium/Zink-Hyperakkumulatoren [108-112]. Zink-Hyperakkumulatoren wie das Galmeiveilchen *Viola calaminaria* und die Wiesenschaumkresse *Cardaminopsis halleri* sind auf Abraumhalden zu finden. Die Existenz von Hyperakkumulatoren zeigt, dass die von Schwermetallen ausgehenden Gefährdungen nicht nur von den Elementtotalgehalten in den Pflanzen bestimmt werden. Es scheint vielmehr wichtig, in welcher Zustandsform Schwermetalle vorliegen.

Die meisten Schwermetalle üben ihre Wirkung in einem Organismus nicht als freie Atome oder Ionen, sondern als Bestandteile von Makromolekülen wie z.B. Peptiden, Proteinen, Hormonen, Enzymen usw. aus. Die Wirkungsweise von Schwermetallen hängt ebenso von deren Oxidationsstufe ab. Als Beispiel sei Chrom genannt, welches in der Oxidationsstufe III essenziell ist, in der Oxidationsstufe VI als Chromat jedoch ein starkes Zellgift darstellt [26]. In Anbetracht der vielfältigen Erscheinungsformen der Schwermetalle in verschiedensten Matrices ist die Erfassung von Elementtotalkonzentrationen nicht ausreichend, um Aussagen über die biologische Wirkungsweise von Analyten treffen zu können. Dieses gelingt erst anhand der Charakterisierung einer Verbindung hinsichtlich Oxidationsstufe und **Bindungsformen**, d.h. der Kenntnis der **Elementspezies** [26, 113, 114].

Daher steht heutzutage zur Aufklärung human-, phyto- und ökotoxikologischer Wirkungen von Schwermetallen zumeist eine qualitative und quantitative Bestimmung der Elementspezies im Vordergrund [26]. Diese so genannte Elementspeziesanalytik stellt hohe Ansprüche an Probenahme, Probenlagerung, -aufbereitung und die verwendeten Trenn- und Detektionsverfahren (vgl. 1.8). Die Kopplung möglichst speziesspezifischer Trenn-



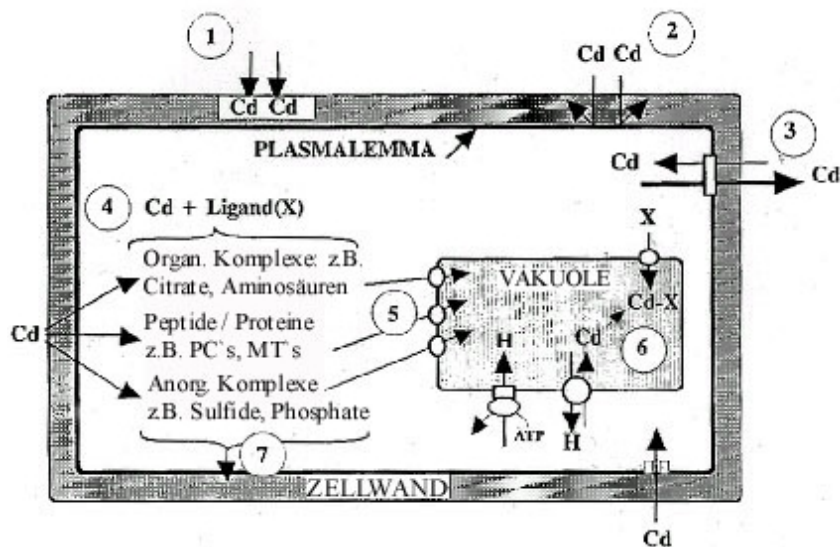
verfahren und Element-spezifischer Nachweisverfahren für das interessierende Spurenelement bilden hierfür die Grundlage.

Diese problemorientierte Speziesanalytik liefert erst die Ergebnisse, die Aussagen über die Bioverfügbarkeit und biologische Wirkung der Analyte ermöglichen, wobei allerdings eine projektbegleitende Qualitätssicherung (z.B. durch Massenbilanzierung, Verwendung von zertifizierten Standards, Validierung von Methoden) und eine sorgfältige Interpretation der ermittelten „Endergebnisse“ von großer Bedeutung ist. Verschiedene in der Literatur beschriebene und verwirklichte methodische Ansätze liefern allerdings Ergebnisse, die sich häufig sehr unterscheiden. Eine Ursache kann darin liegen, dass bei der Isolierung von Schwermetall-bindenden Substanzen aus organischen Matrices mit der Gelchromatographie ein und derselben Substanz - in Abhängigkeit von der Ionenstärke des verwendeten Puffersystems - unterschiedliche Molmassen zugeordnet werden (vgl. 1.6.4.2).

Auch bei den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen steht die Bestimmung der Schwermetallbindungsformen im Vordergrund. Es werden Untersuchungen vorgestellt, die sich mit Regulations- und Schutzmechanismen in Pflanzen als Folge eines Schwermetallstresses beschäftigen.

## 1.6 Wie schützen sich Pflanzen vor Schwermetallen?

Am Beispiel des Cadmiums sollen mögliche Mechanismen für die Toleranz von Pflanzen gegenüber Schwermetallen aufgezeigt werden [13, 115, 116]. Abbildung 4 illustriert die bisher in pflanzlichen und tierischen Organismen beobachteten Schutz- und Kontrollmechanismen.



**Abb. 4: Mögliche Mechanismen für die Kontrolle des Cadmiumgehaltes in Pflanzenzellen [grafisch verändert nach 116]**

Die in der Abbildung angegebenen Zahlen beziehen sich auf die folgende Aufstellung möglicher Ursachen für die Schwermetalltoleranz von Pflanzen

- **Immobilisierung (1):** Schwermetalle, wie z.B. Cadmium, werden an der Zellwand gebunden,
- **Vermeidung (2):** Die Pflanze schützt sich vor der Aufnahme des Schwermetalles,

- **Aktiver Efflux (3):** Unter Energieverbrauch werden die Metallionen bzw. die Cadmiumkomplexe aus der Zelle entfernt,
- **Komplexierung (4):** Schwermetallionen werden durch Proteine komplexiert. Hierbei sind besonders Proteine mit Schwefel-haltigen funktionellen Gruppen zu nennen. Zu dieser Gruppe von Polypeptiden werden die Metallothioneine gezählt. Aber auch andere funktionelle Gruppen körpereigener Substanzen (-COOH, -OH, -NH<sub>2</sub>) können Schwermetalle binden.
- **Kompartimentierung (5, 6, 7):** Schwermetallionen bzw. ihre entsprechenden Komplexe werden in der Zellwand oder der Vakuole abgelagert bzw. gespeichert. Carrierproteine übernehmen den Transport von Schwermetallen bzw. Schwermetallkomplexen in die Vakuole.

### 1.6.1 Immobilisierung

In Wurzeln und Blättern von Bohnen *Phaseolus vulgaris* binden erhebliche Mengen an Cadmium hauptsächlich an Pektine und Histidiny-Gruppen in den Zellwänden [13, 117]. Dotierungsexperimente zur Untersuchung der Cadmiumverteilung in Bohnen und Tabakpflanzen zeigen größere Cadmiummengen in Fraktionen, welche die unlöslichen Zellbestandteile (Zellwände) enthalten [118, 119]. Tomatenzellen aus Zellsuspensionskulturen und Zellwände aus Wurzeln des Leimkrautes *Silene cucubalus* weisen dagegen vernachlässigbare Cadmiummengen auf. Cadmiumtolerante und normale Stämme von *Silene cucubalus* binden jeweils wenig Cadmium in den Zellwänden [116, 120, 121]. Dagegen ist im Nickeltoleranten Hyperakkumulator *Thlaspi goesingense* Nickel zu etwa 70 % an die Zellwand gebunden [122, 123].

### 1.6.2 Vermeidung

Ein Weg von Cadmium in die Zelle scheint die Aufnahme über Kalziumkanäle in der Plasmamembran zu sein [124]. Zudem sind für *Arabidopsis thaliana* und *Saccharomyces cerevisiae* Cd/Zn-Transporter beschrieben [90-97]. Hinweise darauf, dass die Cadmium-Aufnahme für Pflanzen unvermeidlich ist, liefern Untersuchungen an Tabakzellkulturen. Diese zeigen eine schnelle Angleichung der Cadmiumkonzentrationen in den Zellen und der Nährlösung [125].

### 1.6.3 Aktiver Efflux

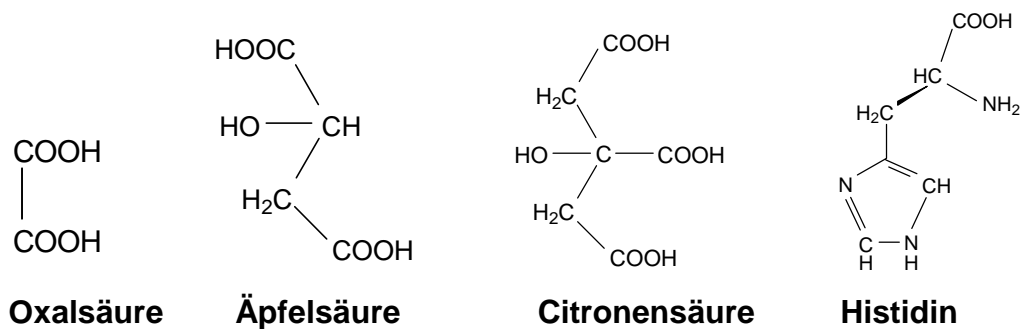
Für das Bakterium *Staphylococcus* ist die plasmidkodierte Fähigkeit beschrieben, Cadmiumionen unter Energieverbrauch aus der Zelle auszuschleusen [115, 127]. Bei *Ralstonia metallidurans* CH34 wird die Schwermetallresistenz gegenüber Kobalt, Cadmium und Zink auf aktiven Efflux zurückgeführt [128]. Ein von Bakterien genutztes aktives Effluxsystem zur Entfernung von Schwermetallen unter Energieverbrauch aus der Zelle ist nach derzeitigem Kenntnisstand bei Pflanzen von untergeordneter Bedeutung [126].

### 1.6.4 Komplexierung durch zelluläre Metallkomplexbildner

Bei tierischen und pflanzlichen Organismen kommt es als Folge von Schwermetallstress zur Synthese von Stresspolypeptiden bzw. -proteinen, die Schwermetalle komplexieren. Die wichtigsten Vertreter dieser Substanzklassen sind die **Metallothioneine**. Ferner kommen **organische Säuren** als Komplexbildner infrage. Die potenziell Schwermetall-bindenden Substanzen enthalten Stickstoff, Schwefel und Sauerstoff als mögliche Bindungspartner. Die metallischen Elemente werden auf Grund ihrer unterschiedlichen Affinität gegenüber diesen Bindungspartnern in drei Gruppen eingeteilt [12]:

- Klasse A: Metalle, die Liganden bevorzugt über O-Atome binden (Alkali-, Erdalkalimetalle, Aluminium)
- Klasse B: Metalle, welche Liganden über schwefelhaltige Gruppen binden (Silber, Gold, Quecksilber, Platin)
- „Borderline“-Ionen: Metalle, die sich nicht eindeutig zuordnen lassen (Chrom, Kobalt, Eisen, Nickel, Cadmium, Zink)

#### 1.6.4.1 Nicht-peptidische Komplexbildner



**Abb. 5: Nicht-peptidische Komplexbildner für Schwermetallionen**

Die erhöhte Konzentration von Malaten in Zink-toleranten Ökotypen des Leimkrautes *Silene vulgaris*, von *Festuca rubra* und *Psychotria douarrei* wird als Hinweis interpretiert, dass Schwermetalltoleranz u.a. durch organische Säuren vermittelt wird [129-132]. In Blättern von *Silene vulgaris* ist der Malonsäuregehalt in zinktoleranten Pflanzen vier- bis siebenfach erhöht im Vergleich zu nichttoleranten Pflanzen [133]. In den Wurzeln der Rasenschmiele *Deschampsia caespitosa* steigt der Gehalt an Zitronensäure bei der Zugabe von Zink [134]. Nickel ist außerdem in einem Nickel-Citrat-Komplex fixiert [135, 136]. In Vakuolen des Täschelkrautes *Thlaspi goesingense* liegt Nickel ebenfalls als Citrat vor [122]. In *Alyssum* wird von einem Anstieg der Histidinkonzentration im Xylemsaft in Abhängigkeit von der Nickelkonzentration berichtet [72]. Des Weiteren sind Zinkphytate beschrieben [137–140]. Der Nachweis einer Beeinflussung der Schwermetalltoleranz von Pflanzen durch nicht-peptidische Komplexbildner, ist wegen ihrer konstitutiv bedingten hohen Konzentration schwer zu führen. Für schwermetallbindende Peptide und Proteine ist dieser Nachweis einfacher, weil sie von Pflanzen häufig als Reaktion auf einen Schwermetallstress vermehrt gebildet werden. Wichtigste Vertreter der Schwermetall-bindenden Peptide sind Metallothioneine.

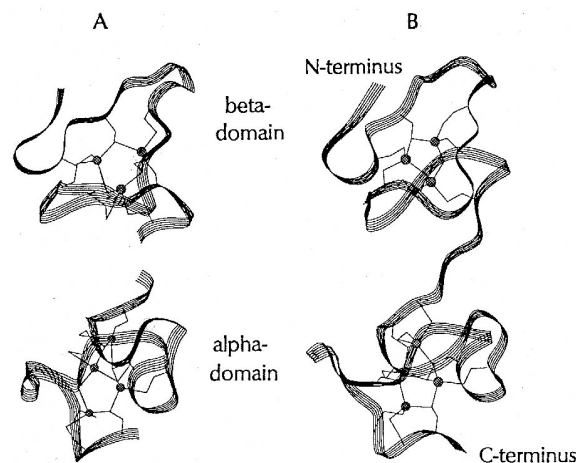
### 1.6.4.2 Schwermetall-bindende Peptide: Metallothioneine

Erstmalig wurde ein Metallothionein 1957 aus der Pferdeniere isoliert [141]. In der Zwischenzeit wurden ähnliche Proteine, die Cadmium, Kupfer oder Zink binden, in Säugetieren, Vögeln, Fischen, Pilzen und Pflanzen nachgewiesen [100, 142-149].

Metallothioneine (MT) werden in 3 Klassen unterteilt [150]:

#### Metallothioneine der Klasse I

Die Metallothioneine der Klasse I (MT I) kommen in Säugetieren und einigen Pilzen vor. Sie bestehen aus etwa 60 Aminosäuren, wobei aromatische Aminosäuren, Histidine und Disulfide nicht auftreten. Die Molmasse beträgt 6-7 kD. Bis zu sieben zweiwertige bzw. zwölf einwertige Metallionen können gebunden werden und zwar als Metall-Thiolat-Cluster in zwei Domänen: einem  $\text{Me}_3\text{Cys}_9$ -Cluster und einem  $\text{Me}_4\text{Cys}_{11}$ -Cluster (Abbildung 6).



**Abb. 6: Strukturmodelle eines MT aus Ratten [151]**

basierend auf 2D-NMR Aufnahmen (A) sowie kristallographischen Daten (B). Die  $\beta$ -Domäne enthält einen  $\text{Me}_3\text{Cys}_9$ -Cluster und die  $\alpha$ -Domäne einen  $\text{Me}_4\text{Cys}_{11}$ -Cluster

#### Metallothioneine der Klasse II

Die MT II wurden aus wirbellosen Tieren, der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und Cyanobakterien wie *Synechococcus* isoliert. Sie unterscheiden sich von den MT I durch eine geringere Molmasse sowie durch eine andere Anordnung der Cysteinbausteine. Bei KÄGI [150] findet sich eine Übersicht über Metallothioneine der Klasse I und II.

Die Bildung der Metallothioneine der Klasse I und II wird auf Ebene der Genexpression von Metallionen, wie  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{+2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ , induziert. Eine Induktion der MT-Synthese wird auch nach physiologischem Stress in Verbindung mit der Ausschüttung von Stresshormonen beobachtet [152, 153].

#### Metallothioneine der Klasse I und II in Pflanzen

Aus Weizenembryos wurde bisher das einzige pflanzliche Protein isoliert, welches Ähnlichkeiten zu Metallothioneinen aufweist [100, 154]. Dieses sogenannte „early Cys-labeled“  $\text{E}_c$ -Protein [155-157] bindet  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ . Bislang wurden aus Pflanzen 58 verschiedene Gene isoliert, die für

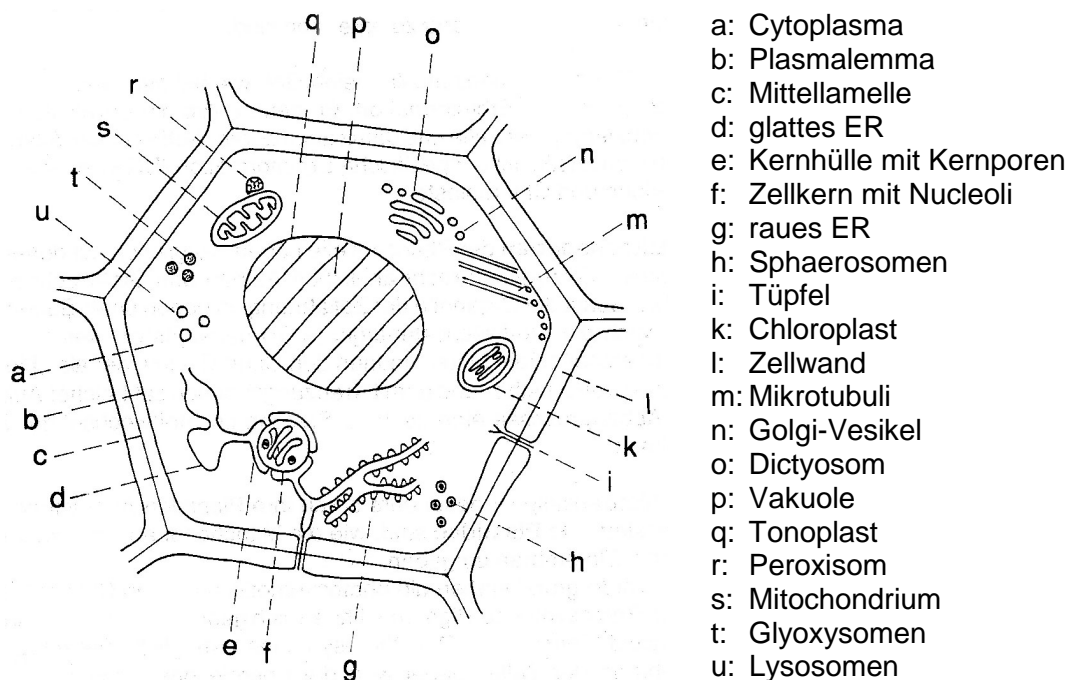




Cadmium auch Kupfer und Zink. Je nach Ionenstärke des Puffersystems sind für den HMW-Komplex Molmassen von bis zu 8 kD beschrieben [202]. GRILL ET AL. konnten Phytochelatin-Komplexe mit  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Pb}^{2+}$  aus pflanzlichen Zellkulturen reinigen [44]. Die Rekonstitution von Phytochelatin-Komplexen gelang mit  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  und  $\text{Hg}^{2+}$  [192, 205-209]. Für Phytochelatine werden verschiedene Funktionen in der Metallentgiftung und dem Schwermetallmetabolismus diskutiert. *In vitro*-Experimente haben gezeigt, dass Kupfer-Phytochelatine die apo-Form des Enzyms Diamino-Oxidase, welches Kupfer als Kofaktor benötigt, reaktivieren können. Zink-Phytochelatine reaktivieren die apo-Form der Carboanhydrase [210]. Phytochelatinen wird deshalb eine Funktion bei der Homöostase von Metallen zugesprochen [100, 201]. Hinweise auf die Bedeutung von Phytochelatinen für die Schwermetallentgiftung liefern Untersuchungen an *cad1*-Mutanten von *Arabidopsis* und *S. pombe*, die kein Phytochelatin bilden. Diese Mutanten sind sensitiver gegenüber Cadmium und Arsenat [194, 195]. Bei niedrigen Cd-Konzentrationen von  $0,6 \mu\text{mol/L}$  ist zudem eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Cadmium im Vergleich zu den Wildtypen dieser Pflanzen festzustellen. Algen reagieren mit der Produktion von Phytochelatinen auf erhöhte Schwermetallkonzentrationen [211-214].

### 1.6.5 Kompartimentierung

Die Kompartimentierung von Schwermetallen ist von großer Bedeutung für die Schwermetalltoleranz von Pflanzen. Das zentrale Entsorgungsorganell in der Pflanzenzelle ist die Vakuole, welche als größtes Organell bis zu 80 % des Volumens einer Zelle einnimmt (Abbildung 9).



**Abb. 9: Schema einer jungen Pflanzenzelle [215]**

Gereinigte Vakuolen aus Tabakblättern enthalten praktisch die gesamte Menge an Cadmium und Phytochelatinen [125, 216, 217]. Zudem wurde

gezeigt, dass Cadmium-haltige Präzipitate in Vakuolen Cd-Phytochelatin-Komplexe sind [218]. Möglicherweise spielen in der sauren Vakuole auch andere Liganden eine Rolle; zumindest in Computersimulationen ist der Citrat-Cd-Komplex bei vakuolärem pH-Wert vorherrschend [219-221]. In den Vakuolen des Täschelkrautes ist Nickel in einem Citrat-Komplex fixiert. Für Zellsuspensionskulturen von Tabakpflanzen ist beschrieben, dass Cadmium und Zink in der Vakuole abgesondert werden und dort an organische Säuren gebunden sind [125].

## 1.7 Sonnenblumen und Raps: Stand der Forschung

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die physiologische Wirkung von Schwermetallen auf tierische und pflanzliche Organismen sowie mögliche Schutz- und Toleranzmechanismen von pflanzlichen Organismen gegenüber Schwermetallen ausführlich vorgestellt. Im Folgenden werden bisherige Ergebnisse der Forschung an Sonnenblumen und Raps entsprechend der zentralen Thematik dieser Arbeit beschrieben.

### 1.7.1 Sonnenblumen



Die Sonnenblume (*Helianthus annuus*) gehört zur Familie der Korbblütler (Asteraceae). Sie stammt aus dem westlichen und mittleren Amerika. In den Anbaugebieten (Russland, Nordamerika) ist der Sommer kurz und heiß. Sonnenblumen wachsen zu 1,5 - 2,5 m hohen Pflanzen heran. Die Blätter sind herzförmig, gegenständig bis wechselständig, am Rand gezähnt und lang gestielt. Die Blütenköpfe sind mit einer Breite von 10 - 40 cm sehr groß.

**Abb. 10: Sonnenblume (*Helianthus annuus*) [1]**

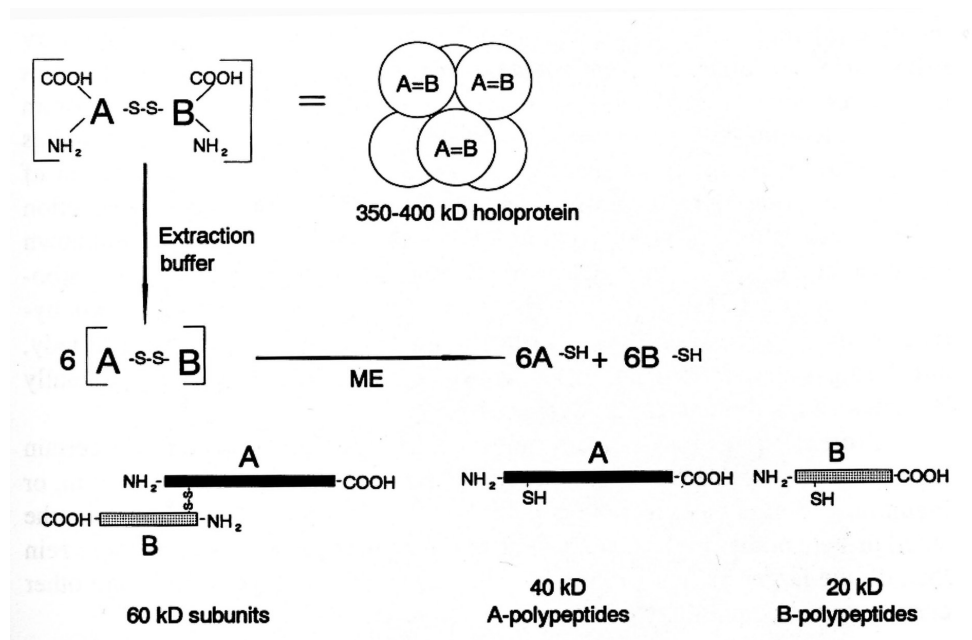
Der Blütenstand ist von Hochblättern, den so genannten Hüllkelchblättern, umgeben. Die einzelnen Blüten sitzen auf dem Korbboden. Die Frucht der Sonnenblume ist eine „Achäne“ mit einem Samen, bei der Fruchtwand und Samenschale fest verbunden sind. Die Früchte sind 0,8-1,7 cm lang, 0,4-0,9 cm breit und enthalten 40-50 % fettes Öl, ca. 25 % Eiweiß sowie Saccharose, Lecithin, Cholin, Betain und Gerbstoffe. Industrielle Nutzung finden die Sprossachsen von Sonnenblumen als Ausgangsmaterial für Faserplatten und Zellulose [222].

Sonnenblumenkerne sind intensiv auf ihre Inhaltstoffe wie Schwermetalle (vgl. Tabelle 1), Proteine und Fette untersucht worden.

Mithilfe der Gelchromatographie konnten in Sonnenblumenkernextrakten fünf Proteinfractionen nachgewiesen werden. Ein 15-S-Globulin mit einer



Molmasse von >600 kD sowie Helianthinin, ein 11-S-Globulin mit einer Molmasse von 300-400 kD. Zudem wurden ein 7-S-Globulin (100 kD) und kleinere Proteine bei 20 kD bzw. <12 kD nachgewiesen [223, 224]. Verschiedene Untersuchungen beschäftigten sich mit der Isolierung und Charakterisierung von Helianthinin [225, 226-233]. Dabei wurde festgestellt, dass es aus Untereinheiten von 60 kD sowie 40 kD bzw. 20 kD aufgebaut ist (Abbildung 11). Diese Bausteine bilden sich aus dem ursprünglichen Protein durch den Einsatz von Proteasen wie Alcalase [230-233] oder durch Disulfidbrücken spaltendes Mercaptoethanol [225]. In Kapitel 1.5.4 werden Schwermetall-bindende Proteine mit Thiol- oder Carboxyl-Gruppen ausführlich diskutiert. Abbildung 11 zeigt, dass derartige funktionelle Gruppen auch in den Speicherproteinen aus Sonnenblumenkernen enthalten sind. Bisher ist allerdings noch ungeklärt, ob die beschriebenen Speicherproteine eine Rolle bei der Komplexierung von Schwermetallen in Sonnenblumenkernen spielen.



**Abb. 11: Bausteine eines 11-S-Globulins [225]**

Das Protein („holoprotein“) besteht aus sechs Untereinheiten, welche jeweils aus einem acidischen (A) und einem basischen (B) Polypeptid aufgebaut sind. Durch den Einfluss des Puffersystems (pH 8,0; Phosphat/NaCl-Puffer; 0,05 mol/L) zerfällt das 11-S-Globulin in seine Untereinheiten [A-B]. Der Einfluss von ME führt zur Dissoziation in die Polypeptide A und B

Des Weiteren wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Cadmiumgehalt in Sonnenblumenpflanzen und deren Wachstum bzw. einer Schädigung des Photosystems besteht. Diese Untersuchungen wiesen nach, dass Pflanzen, die Cadmiumstress ausgesetzt waren, weniger Chlorophyll und lösliche Saccharide enthalten [57, 210, 234-237]. Ferner wurde festgestellt, dass Eisen und Cadmium eine Abnahme der Superoxid Dismutase-Aktivität zur Folge haben [210], während Kupfer deren Aktivität erhöht. Zudem setzen Cadmium, Eisen und Kupfer die Aktivität von Katalase, Ascorbat-Peroxidase, Glutathion-Reductase und Dehydroascorbat-Reductase in Sonnenblumen herab. Die Autoren schließen, dass Cadmium,

Eisen und Kupfer in Sonnenblumenblättern oxidativen Stress ausüben [210]. JOVANOVIĆ ET AL. untersuchten die Aufnahme und Verteilung von Uran in Sonnenblumen-, Soja- und Maispflanzen [238]. Sonnenblumen akkumulieren um den Faktor zwei bis drei mehr Uran als Mais- und Sojapflanzen. Die Autoren postulieren, dass Sonnenblumen für die Uranremediation geeignet seien, weil die höheren Urangelhalte keine Wachstumsstörungen auslösen. Erst wenige Untersuchungen beschäftigten sich mit dem Transport von Nährstoffen in Sonnenblumen. GLINKA ET AL. stellten fest, dass Abscisinsäure (ABA), ein in Pflanzen vorliegendes Stresshormon, den Wassertransport und die Ionenabgabe in das Xylem von Sonnenblumenwurzeln verstärkt [239]. QUINTERO ET AL. untersuchten den Einfluss von ABA, Kalzium und Quecksilber auf den Wassertransport in Wurzeln von 20 Tage alten Sonnenblumen [240, 241]. Es gelang, Aquaporine in Sonnenblumenwurzeln nachzuweisen. Aquaporine sind Membranproteine, die als wasserspezifische Kanäle möglicherweise den Wassertransport innerhalb der Wurzeln kontrollieren [242]. Eine Veröffentlichung beschreibt den Einfluss von Rhizosphärebakterien auf das Wachstum und die Stickstoffaufnahme von Sonnenblumen [243]. Es wurde gezeigt, dass das Rhizobakterium *Rhizobium* sp. YAS34 als Wachstumspromotor wirkt, indem es die Stickstoffaufnahme erhöht sowie die Auswirkungen von Wasserstress reduziert. Wenig untersucht sind Schwermetallspezies wie Metallothioneine, allerdings wiesen GALLEGU ET AL. in Sonnenblumenblättern Phytochelatine nach [210, 235].

### 1.7.2 Raps

Raps (*Brassica napus* L.) gehört zur Familie der Kreuzblütler (Cruciferen) und der Gattung *Brassica*, in der sich ebenfalls Rüben (*B. rapa*) und Gemüsekohl (*B. oleracea*) finden. Raps wird weltweit, insbesondere in China, der EU und Indien, angebaut. Die Blütezeit des Raps ist von April bis September. Rapspflanzen sind 60-140 cm hohe Pflanzen mit blaugrünen Blättern. Rapsblüten sind goldgelb (Abbildung 12a).



Abb. 12: Blühender Raps (links) und Fruchtstand von Raps (rechts) [1]

Die Frucht des Raps (Schote) besteht aus zwei großen, bei der Fruchtreife meist abspringenden Klappen und einem Plazentar-Rahmen (Replum), in dem die falsche Scheidewand ("Silberhäutchen") ausgespannt ist. Das Replum trägt beiderseits die Plazenten mit den Samen [244].

Rapssamen enthalten ca. 42 % fettes Öl, sind 1,5 bis 2,5 mm groß, kugelig und dunkelbraun. Raps wird zur Gewinnung von fettem Öl angebaut. Außerdem ist das Rapsschrot mit einem Rohproteingehalt von über 30 % ein wertvolles Futtermittel [245-247]. Charakteristisch für die Arten der Gattung *Brassica* sind die sich von Thiohydroxaminosäureestern ableitenden Glucosinolate, die in allen Teilen der Pflanze vorkommen [248]. Die Verwendung von Rapsöl, welches eine ernährungsphysiologisch hervorragende Fettsäurezusammensetzung hat, war früher durch den Gehalt an Glucosinolaten (Senfölglycoside) und Erucasäure eingeschränkt. Seit der Züchtung des so genannten „00“-Raps mit einem geringeren Anteil an Senfölglycosiden und Erucasäure ist dieses Problem beseitigt.

Im Vergleich zu Sonnenblumen gibt es für Raps weniger Untersuchungen. Dieses ist möglicherweise auf die taxonomische Ähnlichkeit von *Brassica napus* und *Arabidopsis* [160] zurückzuführen. Wie bei Sonnenblumen wurden beim Raps die Saaten vor allem wegen ihrer Bedeutung für die Ölgewinnung und Tierernährung intensiv untersucht. Im Samen von Raps gibt es zwei Haupt-Speicherproteine, das 12-S-Globulin Cruciferin und das 2-S-Albumin Napin, die 60 % bzw. 20-30 % der Gesamtproteinmenge ausmachen [249, 250]. Cruciferin ist ein salzlösliches Hexamer mit einer Molmasse von 300-350 kD welches aus drei Untereinheiten: cru1, cru2/3 und cru4 besteht [251-253]. Napin ist wasserlöslich (13 kD) und enthält zwei durch Disulfid-Bindungen gekoppelte Polypeptide (9 kD und 4 kD) [254-256].

Einen Schwerpunkt der Forschung an Raps bildet die Charakterisierung von so genannten „metallothionein-like-genes“ (vgl. 1.5.4.2). Diese Gene wurden einerseits in Brassicaceen nachgewiesen [160], aber auch die Expression von MT II kodierenden Genen in *Brassica napus* ist beschrieben [246]. Die Genexpression resultiert in einer stark erhöhten Cadmiumtoleranz der untersuchten transgenen Pflanzen [257]. In anderen Untersuchungen wurden Kalzium-bindende Proteine aus Rapsblütenstaub isoliert. Es wurde ein Gen isoliert, welches für eines dieser Proteine (8,6 kD) kodiert. Das Gen wird als BPC1 (*Brassica napus* pollen calcium-binding protein 1) bezeichnet [258]. Eine Veröffentlichung beschreibt die Isolierung von Cadmium- und Thallium-bindenden Substanzen aus Rapsblättern. Es wurden hoch- (>80 kD) und niedermolekulare (4,4 kD) Cadmium-Bindungsformen isoliert. Die Aminosäureanalyse dieser Substanzen ergab keine schwefelhaltigen Aminosäuren [259], so dass es sich nicht um Metallothioneine handelt. Zudem wurden Phytochelatine in den Blättern von Raps nachgewiesen [182].

Keine der vorliegenden Veröffentlichungen hat sich den Ursachen für die im Vergleich zu Rapssamen hohen Cadmium- und Nickelgehalte in Sonnenblumenkernen gewidmet. Beschrieben ist, dass Sonnenblumen sich in ihrer Cadmiumaufnahme von anderen zweikeimblättrigen Pflanzen unterscheiden. Sonnenblumen nehmen ähnlich wie einkeimblättrige Pflanzen

(z.B. Weizen), größere Mengen an Cadmium auf [6]. Die Ursachen für diese Unterschiede sind allerdings nicht systematisch untersucht worden.

## 1.8 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die Ursachen der Unterschiede in den Cadmium- und Nickelgehalten von Sonnenblumen und Raps aufzuklären. Folgende Kernfragen stehen dabei im Mittelpunkt:

### Lokalisierung von Schwermetallen:

- In welchem Maße werden verschiedene Schwermetalle von Sonnenblumen und Raps akkumuliert?
- Existieren Unterschiede bei der Schwermetallakkumulation durch Sonnenblumen und Raps?
- In welchen Pflanzenorganen und Zellorganellen werden die Schwermetalle bevorzugt akkumuliert?

### Transport von Schwermetallen

- Inwieweit sind Unterschiede im Schwermetalltransport für die Unterschiede im Schwermetallgehalt von Sonnenblumen- und Rapspflanzen verantwortlich? Orientierende Untersuchungen des Xylemsaftes sollen erste Rückschlüsse ermöglichen.

### Analyse der Bindungsformen von Schwermetallen

- An welche löslichen und unlöslichen Zellbestandteile sind Schwermetalle in Sonnenblumen und Raps gebunden? Lösliche Zellbestandteile sind Komplexbildner wie Metallothioneine oder organische Säuren. Zu den unlöslichen Zellbestandteilen zählen die Zellwände und Zellmembranen.
- Welche Schutz- bzw. Regelungs-Mechanismen (vgl. 1.6) sind an der Schwermetall-Toleranz von Sonnenblumen und Raps beteiligt?
- Unterscheiden sich die von den Ölsaaten genutzten Mechanismen?

## 1.8 Untersuchungsmethodik

Vor diesem Hintergrund werden bei Sonnenblumen und Raps vergleichende Untersuchungen bezüglich Verteilung, Transport, Speicherung und Bindungsformen von Cadmium, Nickel, Eisen, Kupfer und Zink durchgeführt.

### Auswahl der analysierten Schwermetalle

Cadmium und Nickel wurden wegen des in Tabelle 1 dargestellten Unterschiedes in der Schwermetallakkumulation von Sonnenblumenkernen und Rapssamen ausgewählt, Kupfer wegen dessen hoher Affinität zu Phytochelatinen [260]. Eisen und Zink wurden als essenzielle Elemente mit einbezogen. Zudem ist der anthropogen bedingte Elementeintrag in die Umwelt für die ausgesuchten Schwermetalle sehr hoch [20]. Auf Untersuchungen für Blei wurde verzichtet, weil der anthropogen bedingte Eintrag von Blei in die Umwelt während der vergangenen Jahre deutlich

reduziert wurde [16-19]. Ferner deuten bisherige Untersuchungen an, dass Blei von Pflanzen überwiegend aus der Luft (40-100 %) und nicht über das Wurzelsystem aufgenommen wird [261]. Unterschiede in den Bleigehalten von Pflanzen wären demnach weniger auf pflanzenspezifische als auf anthropogene Ursachen zurückzuführen.

Abbildung 13 zeigt schematisch die im Rahmen dieser Arbeit vorgesehene methodische Untersuchungsweise.

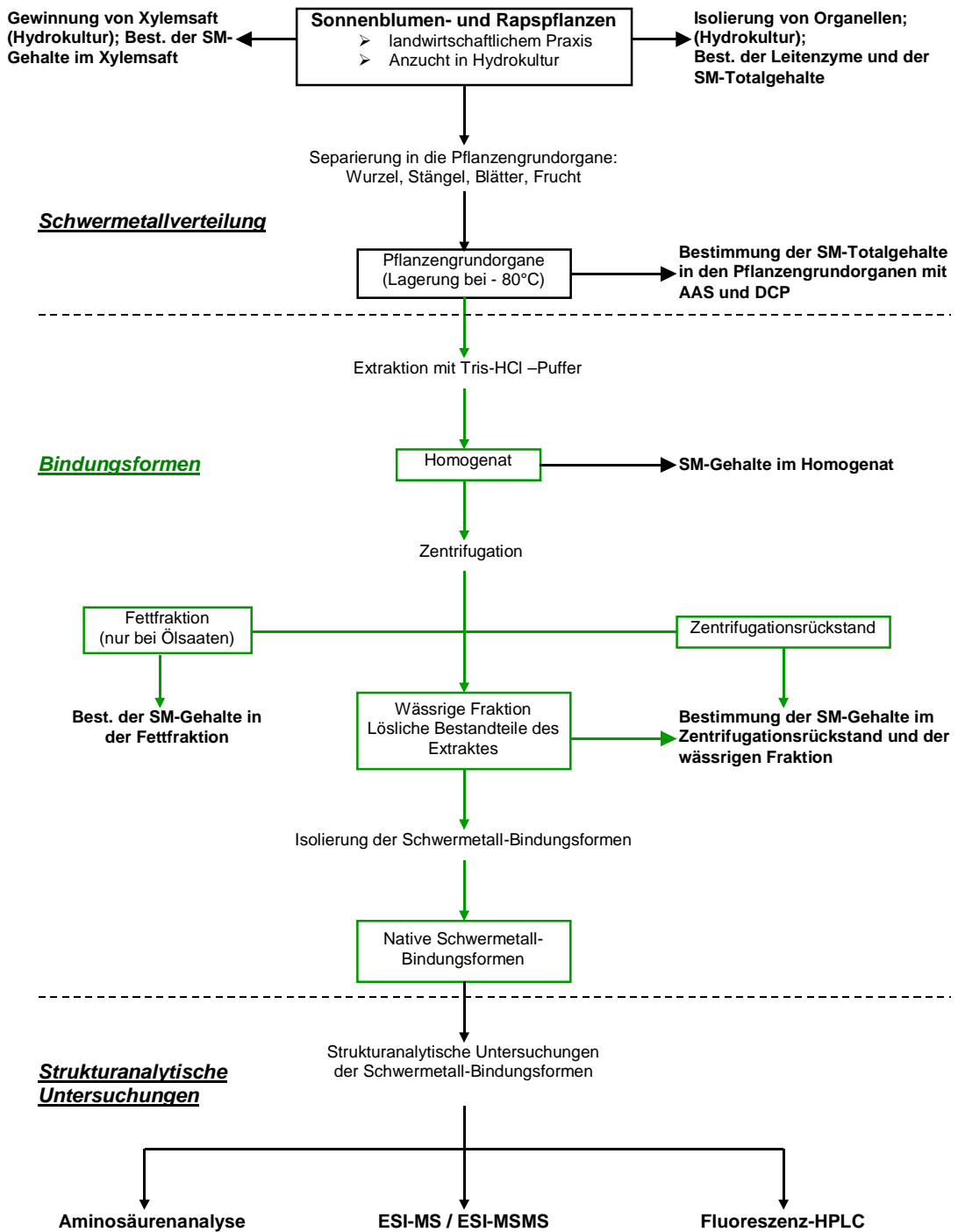


Abb. 13: Schematische Darstellung der Untersuchungsmethodik

### **Sonnenblumen und Raps aus landwirtschaftlichem Anbau**

Zunächst werden die Probenahmen von Sonnenblumen- und Rapspflanzen aus der landwirtschaftlichen Praxis durchgeführt. Die Probenahme und Probenaufbereitung sind entscheidende Arbeitsschritte bei der Speziesanalytik. Denn die unsachgemäße Probenahme und Lagerung der Proben führt bereits zu einer Veränderung der ursprünglichen („nativen“) Schwermetallspezies bzw. -Bindungsformen. Deshalb ist bei der Probenahme auf eine schnelle Überführung der Proben in einen stabilen Zustand zu achten. Dieses bedeutet im Allgemeinen, dass die Proben nach Reinigung und Separierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden [26, 113, 262]. Für die eigenen Untersuchungen werden die erhaltenen Pflanzen zunächst in ihre Grundorgane Wurzel, Stängel, Blatt, Saaten zerlegt, mit destilliertem Wasser gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, homogenisiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Zwischen der Probenahme auf dem Feld und dem Ende der Probenaufbereitung im Labor liegen maximal 5 Stunden. Es wird daher angenommen, dass eine Veränderung der natürlichen („nativen“) Elementspezies weitestgehend vermieden wird (vgl. 1.5).

### **Anzucht von Sonnenblumen und Raps in Hydrokultur**

Sonnenblumen und Raps werden unter definierten Wachstumsbedingungen in Hydrokultur angezchtet, wobei Anzuchtversuche in Cadmium-dotierter Nährlösung von besonderer Bedeutung sind (vgl. 11.1). Verschiedene Cadmium-Konzentrationen werden angewendet, um den Einfluss von  $\text{Cd}^{2+}$  auf die Entwicklung von Sonnenblumen- und Rapspflanzen sowie auf die Cadmiumaufnahme systematisch zu erfassen (vgl. Kapitel 3).

### **Schwermetallverteilung in Sonnenblumen und Raps**

Die Verteilung von Cadmium, Eisen, Kupfer, Nickel und Zink wird in den Grundorganen (Wurzel, Stängel, Blätter, Frucht) von Sonnenblumen- und Rapspflanzen aus dem landwirtschaftlichen Anbau und der Anzucht in Hydrokultur bestimmt werden. Bei diesen Untersuchungen sollten Elementspezifische physiologische Barrieren in Sonnenblumen- und Rapspflanzen identifiziert werden. Es wird z.B. erwartet, dass der Eisengehalt in den Wurzeln von Sonnenblumen- und Rapspflanzen im Vergleich zum übrigen Pflanzenteilen sehr viel höher ist [22, 263].

Eine weitere Differenzierung der Metallverteilung erfolgt durch Analyse der Schwermetallgehalte in verschiedenen **Zellorganellen** wie Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen. Die Isolierung der Organellen erfolgt aus Kotyledonen von fünf Tage alten Sonnenblumen- und Rapskeimlingen. Dazu werden die Keimlingsblätter von Sonnenblumen und Raps in isotonischen Medien (Mannitol, Saccharose) homogenisiert und über Percoll-Dichtegradienten zentrifugiert (vgl. 11.12). Auf diese Weise werden Fraktionen gewonnen, die Organellen (Chloroplasten, Peroxisomen, Mitochondrien) oder Zellwände angereichert enthalten [264-268]. In den Fraktionen wird nach einem mikrowellengestützten oxidierenden Nassaufschluss (vgl. 11.6)

der Schwermetallgehalt mit der Atomabsorptions- und Atomemissionspektrometrie (AAS, DCP) bestimmt. Die Qualität der Analysendaten wird durch zertifizierte Referenz-Standards überprüft (vgl. 11.7).

### Schwermetalltransport

Zur Charakterisierung des Ferntransports in der Pflanze werden auch Schwermetallkonzentrationen in Xylemsaft bestimmt. Für die Gewinnung von Xylemsaft (vgl. 11.11) werden 25 Tage alte Sonnenblumen- und Rapspflanzen aus der Anzucht in Hydrokultur eingesetzt. Die Bestimmung der Schwermetallgehalte erfolgt nach Nassaufschluss.

### Schwermetallbindungsformen

Die bisher geplanten Untersuchungen beschäftigen sich ausschließlich mit der Bestimmung von Elementtotalgehalten. Wie in Kapitel 1.5 beschrieben, ist die Bindungsform entscheidend für die Bioverfügbarkeit eines Schwermetalles, d.h. für dessen Mobilität und biologische Wirkungsweise. Sowohl für Sonnenblumen als auch Raps liegen zu den Schwermetallbindungsformen nur wenige Erkenntnisse vor (vgl. 1.7). Deshalb sollen verschiedene Bindungsformen von Cadmium, Kupfer, Nickel und Zink aus den vegetativen und generativen Pflanzenteilen von Sonnenblumen und Raps extrahiert und nachgewiesen werden.

Der Erhalt der „nativen“ Bindungsformen während aller analytischen Arbeitsschritte stellt die entscheidende Voraussetzung für diese Zielsetzung dar [26, 269, 270], wobei die Auswahl eines geeigneten Puffersystems für die Extraktion der Schwermetall-Bindungsformen aus pflanzlichen Matrices von entscheidender Bedeutung ist, um die Bildung von so genannten „Artefakten“, d.h. von nicht-nativen Schwermetall-Bindungsformen weitestgehend zu verhindern. Für Zink, Kupfer und Cadmium sind z.B. pH-Werte unter 5 zu vermeiden, weil ansonsten diese Schwermetalle aus den Bindungsformen herausgelöst werden [271]. Von der IUPAC („Comission on Microchemical Techniques and Trace Analysis“) wurden Anforderungen beschrieben, die eine bei der Extraktion von Schwermetall-Bindungsformen eingesetzte Pufferlösung erfüllen sollte [271]:

- geringe Komplexbildungseigenschaften.
- Ausreichend hohe Ionenstärke des Puffers, um Wechselwirkungen der Schwermetall-Bindungsformen mit dem Säulenmaterial bei der Gelchromatographie zu unterdrücken.

Ein häufig verwendetes Pufferreagenz ist Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris).

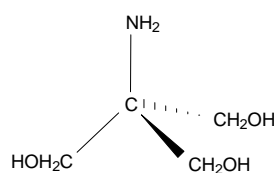


Abb. 14: Strukturformel von Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)

Tris ( $pK_s$  8,3) ist über einen weiten pH-Bereich stabil, wobei der gewünschte pH-Wert der Pufferlösung bevorzugt mit verdünnter Salzsäure eingestellt wird (vgl. 11.2). Tris-Puffer zeichnet sich durch eine geringe Ionenstärke und eine geringe Neigung zur Komplexbildung mit zweiwertigen Schwermetallionen aus [272-275] und erscheint daher besonders geeignet, die Schwermetall-Bindungsformen in ihrer nativen Form zu belassen [271-275]. Häufig wird ein Tris-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4–9 und einer Konzentration von 10–50 mmol/L zur Extraktion von Schwermetall-Bindungsformen eingesetzt. Diese Vorgehensweise ist z.B. für **Extrakte** aus Rapspflanzen, dem Gras *Agrostis gigantea*, der Rauwolfie *Rauvolfia serpentina*, Hafer, Weizen und zahlreiche weitere Pflanzen beschrieben [44, 143, 259, 271, 276-280]. Im Gegensatz zum Tris-Puffer lassen Pufferlösungen mit hoher Ionenstärke wie Ammoniumacetat- und Kaliumchloridlösungen nur die Isolierung von Ionen bzw. niedermolekularen Schwermetall-bindenden Substanzen zu. Erst bei geringer Ionenstärke sind mit diesen Puffersystemen auch höhermolekulare Schwermetall-Bindungsformen nachweisbar [276, 277]. Bei den eigenen Untersuchungen wird entgaster **Tris-Puffer** (0,05 mol/L; pH 8,0) zur Extraktion der löslichen Schwermetall-Bindungsformen aus Sonnenblumen- und Rapspflanzen verwendet (vgl. Kapitel 6).

Die Ermittlung der Extraktionsausbeuten erfolgt durch eine Bilanzierung der Schwermetalle. Der Extraktionsrückstand wird ebenfalls auf seinen Schwermetallgehalt untersucht, um den Anteil des an unlösliche Zellbestandteile (Organellmembranen, Zellwände usw.) gebundenen Schwermetalles abzuschätzen.

Eine Standardmethode zur Trennung von Schwermetall-bindenden Substanzen unter Erhalt der Bindungsformen, die auch im Rahmen dieser Arbeit angewendet wird, ist die **Gelfiltrationschromatographie** (GFC) [26, 259, 262, 271, 277]. Ein UV-Detektor misst die Absorption bei 280 nm und ein nachgeschalteter Leitfähigkeits-Detektor die zugehörige Leitfähigkeit des Eluates.

Als Gelmaterial dienen Dextrangele. Diese haben gegenüber Silicagelen den Vorteil, dass niedermolekulare Proteine in geringerem Maße von dem Säulenmaterial adsorbiert werden [271, 276, 277, 281-283]. Die Substanztrennung erfolgt bei der GFC nach der Molekülgröße.

Als Elutionsmittel dient ebenfalls die zuvor bei der Extraktion verwendete entgaste Tris-HCl-Pufferlösung (0,05 mol/L; pH 8,0). Einige Autoren beschreiben den Zusatz von Mercaptoethanol zum Elutionspuffer [271, 276, 284, 285]. Das reduktive Milieu soll eine Oxidation der Schwermetall-Bindungsformen durch Luftsauerstoff bei der Gelfiltration sowie die Adsorption von Proteinen an der Geloberfläche verhindern.

Freie Cadmium-Ionen im Extrakt werden durch Mercaptoethanol abgefangen, ein Abspalten von Cadmium aus den nativen Bindungsformen unter Bildung von Komplexen mit Mercaptoethanol ist dagegen nicht beschrieben [271]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die Schwermetall-bindenden Komponenten daher sowohl unter nicht-



reduzierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen aus den Pflanzenorganen extrahiert und mit der Gelfiltration getrennt (vgl. 6.3).

Die Kalibration der verwendeten Chromatographiesäulen mit zertifizierten Proteinstandards (z.B. Albumin) und die Elutionsbedingungen bei der Gelfiltration sind in Kapitel 11.3 ausführlich beschrieben.

Durch die Analyse der Cadmium-, Kupfer-, Nickel- und Zinkgehalte in den Fraktionen der Gelfiltration mit AAS und DCP (vgl. 11.7) lassen sich den löslichen Schwermetall-bindenden Substanzen an Hand der chromatographischen Kenngrößen Molmassen zuordnen (vgl. 11.3).

### **Strukturanalytische Untersuchungen der Bindungsformen**

Die löslichen Cadmium-Bindungsformen aus Sonnenblumen- und Raps-wurzeln sowie den Ölsaaten sollen unter Erhalt der Bindungsform von dem Überschuss an Begleitstoffen getrennt und anschließend strukturanalytisch untersucht werden. Zur Aufreinigung kann unter anderem die **Ionenaustauscher-Chromatographie** (IAC) verwendet werden [271, 276, 286-288]. Die IAC (vgl. 11.4) hat den Vorteil, dass die zu isolierende Substanz konzentriert wird, nachdem zuvor bei der GFC eine Verdünnung erfolgt ist. Die Cadmium-haltigen Fraktionen der IAC werden durch GFC umgepuffert und anschließend lyophilisiert.

Die lyophilisierten Cadmium-haltigen Substanzen werden strukturanalytisch untersucht. Als mögliche Cadmium-bindende Substanzen werden Phytochelatine vermutet, welche Thiolgruppen enthalten. Mit der HPLC wird daher geprüft, ob die isolierten Substanzen Thiolgruppen enthalten. Im Rahmen dieser Arbeit wird die **Fluoreszenz-HPLC** (vgl. 11.5) nach vorheriger Derivatisierung der thiolhaltigen Substanzen mit Monobrombiman verwendet [199, 289, 290-295]. Diese Methode hat gegenüber der alternativ anwendbaren Nachsäulenderivatisierung mit Ellmann's Reagenz den Vorteil einer um den Faktor 1000 niedrigeren Nachweisgrenze von 3 pmol [290]. Die optimalen Derivatisierungsbedingungen sind ebenso wie der Gradientenverlauf im Rahmen einer dem Projekt angegliederten weiteren Diplomarbeit erarbeitet worden [296].

Ein Teil der lyophilisierten Cadmium-haltigen Substanzen wird für eine **Aminosäureanalyse** vorbereitet (vgl. 11.13), um an Hand des Aminosäureprofils zu klären, ob es sich bei den isolierten Cadmium-Bindungsformen um Phytochelatine handelt oder nicht. Weitere strukturanalytische Informationen erhoffen wir uns von dem Einsatz der **Elektrospray-MS** [297, 298].

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der beschriebenen Untersuchungsmethoden bzw. -verfahren dargestellt und interpretiert.

## 2 Schwermetalle in Sonnenblumen- und Rapspflanzen aus landwirtschaftlichem Anbau

Allgemein ist der Schwermetallgehalt in den verschiedenen Pflanzengrundorganen sehr unterschiedlich [66, 216, 299-301]. Die Schwermetallverteilung in landwirtschaftlichen Kulturpflanzen zeigt in der Regel einen abnehmenden Gradienten von der Wurzel über Stiel und Blatt bis zur Frucht [51, 302-304]. Ausnahmen sind Salat, Kohl, Wasserkresse, in denen der Schwermetallgehalt in den Wurzeln niedriger ist als im Spross [64]. Für Sonnenblumen und Raps liegen nur wenige Ergebnisse zur Schwermetallverteilung vor (vgl. 1.7).

Im Folgenden wird deshalb die Verteilung von Cadmium, Nickel, Kupfer, Eisen und Zink in den Grundorganen (Wurzel, Stängel, Blätter, Frucht) von Sonnenblumen- und Rapspflanzen aus dem landwirtschaftlichen Anbau untersucht.

### 2.1 Sonnenblumenkerne

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Sonnenblumenkerne stammen von Proben der staatlichen „Wertprüfung“ von Sonnenblumenkernen aus verschiedenen deutschen Anbaugebieten. Ein großer Teil der Untersuchungen wurde an Sonnenblumenkernen der Sorte „Petra“ der Ernten 1996-98 durchgeführt.

Tabelle 5 zeigt die Schwermetallgehalte in den untersuchten bzw. für die Pflanzenanzucht verwendeten Sonnenblumenkernen.

**Tab. 5: Schwermetallgehalte der untersuchten Sonnenblumenkernmuster**

Mittelwert; geschälte Sonnenblumenkerne (n = 5);

Mittelwerte; Sonnenblumenkerne der Sorte „Petra“, Ernte 1996-98 (n = 3)

Ölsaaten	Cadmium	Nickel	Kupfer	Eisen	Zink
SBK (Mischmuster, geschält)	0,505	4,0	25	56	56
SBK (Sorte Petra, 1996)	0,232	2,3	20	50	36
SBK (Sorte Petra, 1997)	0,215	2,0	18	58	51
SBK (Sorte Petra, 1998)	0,288	2,1	22	49	51

### 2.2 Rapssamen

Die untersuchten Rapssamen stammen von Mustern der „Besonderen Ernteterminierung“ (BEE) einer Monitoring-Untersuchung des Bundes und der Länder, die an der BAGKF in Detmold durchgeführt wurde. Weitere Rapssamen stammen von Probenahmen auf Feldern in der Nähe von Detmold (1998, 2000). Die Schwermetallgehalte der untersuchten Rapssamen sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tab. 6: Schwermetallgehalte der untersuchten Rapssamenmuster**

Mittelwerte, n = 3

Ölsaaten	Cadmium	Nickel	Kupfer	Eisen	Zink
Rapssamen (Mischmuster)	0,046	0,46	15	90	44
Rapssamen (BEE 1996)	0,039	0,43	7,5	70	40
Rapssamen (Dt-Mosebeck, 1998)	0,048	0,31	3,3	85	46
Rapssamen (Dt-Mosebeck, 2000)	0,036	0,49	2,6	63	35

Der in Tabelle 1 gezeigte Unterschied der Cadmium- und Nickelakkumulation in Sonnenblumen- und Rapssamen wird auch beim Vergleich von Tabelle 5 und 6 deutlich. Die untersuchten Sonnenblumenkerne akkumulieren fünf bis zehnmals so viel Cadmium und Nickel wie Rapssamen. Demgegenüber unterscheidet sich der Eisen- und Zinkgehalt nur unwesentlich. Auffällig sind die unterschiedlichen Kupfergehalte. Der Kupfergehalt ist in den Mischmustern deutlich höher als in den Einzelproben. Eine ähnliche Beobachtung wird bei den Sonnenblumenkernen der Sorte „Petra“ gemacht, deren Cadmiumgehalt ebenfalls sehr viel niedriger ist als in den untersuchten Sonnenblumenmischmustern. Es ist zu vermuten, dass diese Ergebnisse auf Unterschiede in der Bioverfügbarkeit der Schwermetalle zurückzuführen und somit geogen bedingt sind.

### 2.3 Sonnenblumen

Die für diese Untersuchungen verwendeten Sonnenblumenpflanzen stammen von zwei Standorten. Die erste Probenahme fand im August 1998 in Unterfranken und eine weitere im August 1999 in der Nähe von Vinsebeck (Ostwestfalen) jeweils während der Reifeperiode statt. Das Reifestadium der Sonnenblumenkerne wird anhand des Wasser- und Fettgehaltes der Proben abgeschätzt. In den nicht ausgereiften Sonnenblumenkernen der Probenahmen in Unterfranken und Vinsebeck ist der Wassergehalt mit 85 % deutlich höher als in den ausgereiften mit weniger als 10 %. Dagegen ist der Fettgehalt in den nicht ausgereiften Sonnenblumenkernen mit etwa 15 % deutlich niedriger als in den reifen Sonnenblumenkernen mit ca. 50 %.

**Tab. 7: Schwermetallgehalte in Sonnenblumenpflanzen aus landwirtschaftlichem Anbau während der Reifeperiode (Unterfranken, 1998)**

Mittelwerte, n = 5

Pflanzenteil	Cadmium	Nickel	Kupfer	Eisen	Zink
Wurzeln	0,785	5,3	17	<b>1500</b>	31
Stängel	0,170	0,4	4,3	46	9,2
Blätter	0,523	2,9	39	255	48
Korb	0,220	1,4	9,3	50	19
Sonnenblumenkerne	0,166	4,2	14	71	47

Auffällig ist der sehr hohe Eisengehalt in den Wurzeln (1500 mg/kg TS), welcher sich innerhalb der Pflanze nicht in gleichem Maße fortsetzt. Die Cadmium- und Nickelgehalte sind ebenfalls in den Wurzeln am höchsten. Zink wird bevorzugt in den Blättern (48 mg/kg TS) und Saaten (47 mg/kg TS) akkumuliert. Eisen und Kupfer sind Bestandteile des Photosyntheseapparates, was erklärt, warum die höchsten Kupfer- (39 mg/kg TS) und erhöhte Eisengehalte (255 mg/kg TS) in den Blättern zu beobachten sind. Die Cadmium-, Nickel-, Kupfer- und Zinkgehalte sind in den aus Vinsebeck stammenden Sonnenblumen zumeist etwas höher als in den Sonnenblumen aus Unterfranken. Einzig der Eisengehalt ist in den Wurzeln der Sonnenblumen aus Vinsebeck mit 900 mg/kg TS niedriger als in den Wurzeln der Sonnenblumen aus Unterfranken. Tabelle 8 vergleicht exemplarisch die Cadmium- und Nickelgehalte.

**Tab. 8: Vergleich der Cadmium- und Nickelgehalte in Sonnenblumen aus der landwirtschaftlichen Praxis für die Probenahmen 1998 in Unterfranken und 1999 in Vinsebeck**

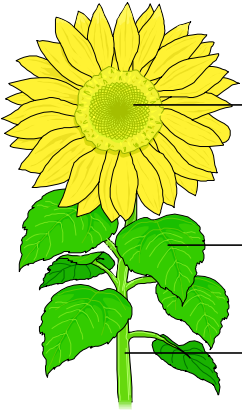
	Unterfranken 1998		Virsebeck 1999	
	Cadmium	Nickel	Cadmium	Nickel
	[µg/kgTS]			
 SB-Kerne	0,166	4,21	0,196	7,2
Blätter	0,523	2,88	1,03	2,40
Stängel	0,170	0,35	0,29	0,32
Wurzeln	0,785	5,32	1,00	13,6

Tabelle 8 zeigt, dass der Cadmiumgehalt in den Sonnenblumen aus Vinsebeck höher ist als in den Sonnenblumen aus Unterfranken. Der Nickelgehalt ist in den Wurzeln (14 mg/kg TS) und den Kernen (7 mg/kg TS) der Sonnenblumen aus Vinsebeck in etwa doppelt so hoch wie in den Sonnenblumen aus Unterfranken. Auffällig ist, dass für beide Sonnenblumenpflanzen der Nickelgehalt in den Blättern mit 2-3 mg/kg TS ähnlich hoch ist. Ein erhöhter Nickelgehalt in den Wurzeln von Sonnenblumen ist anscheinend nicht mit einer Erhöhung des Nickelgehaltes in den Blättern verbunden.

Der Cadmiumgehalt ist in den nicht ausgereiften Sonnenblumenkernen (Abbildung 15) mit etwa 0,2 mg/kg TS deutlich niedriger als in den Ausgereiften mit durchschnittlich 0,4 mg/kg TS (Tabelle 1). Demgegenüber sind die Kupfer-, Nickel- und Zink-Gehalte in nicht ausgereiften und ausgereiften Sonnenblumenkernen, bezogen auf die Trockensubstanz, in der gleichen Größenordnung. Möglicherweise ist die Einlagerung von Cadmium in die Sonnenblumenkerne zum Zeitpunkt der Probenahme noch nicht abgeschlossen. Dieses wäre ein Hinweis darauf, dass der Cadmiumgehalt in

den Sonnenblumenkernen ähnlich wie der Cadmiumgehalt in Weizenkörnern vom Reifestadium abhängt.

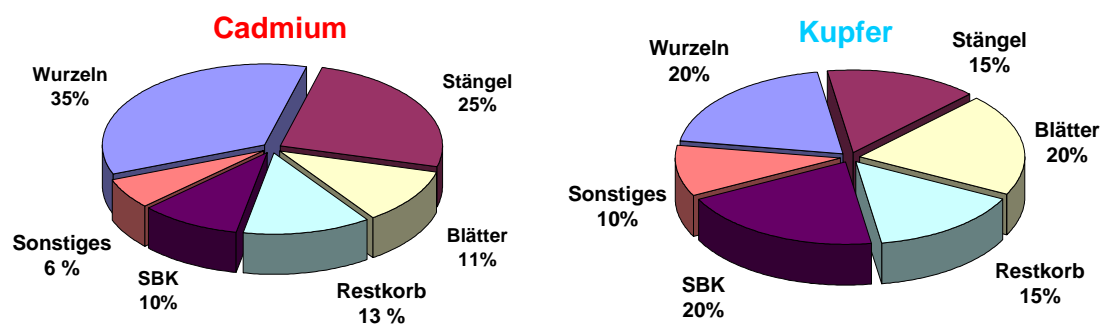
Sonnenblumen und Raps sind zweikeimblättrige Pflanzen. Im Gegensatz zum Raps akkumulieren Sonnenblumen allerdings ähnlich wie einkeimblättrige Pflanzen (z.B. Weizen) größere Mengen an Cadmium. In Kapitel 1.4 wurde für Weizen beschrieben, dass Cadmium, Nickel und Zink während der Reifeperiode in Weizenkörnern angereichert werden. Hierfür wird eine Remobilisierung dieser Schwermetalle während der generativen Wachstumsphase über das Phloem verantwortlich gemacht [79-88]. Untersuchungen zum Schwermetallgehalt in den Schalen von Sonnenblumenkernen könnten einen ersten Hinweis liefern, dass die für Weizen beschriebene Remobilisierung von Cadmium, Nickel und Zink über das Phloem bei Sonnenblumen ebenfalls eine Rolle spielt. Tabelle 9 zeigt die Schwermetallverteilung in geschälten Sonnenblumenkernen der Ernte 1996:

**Tab. 9: Schwermetallgehalte in Schalen und geschälten Kernen von Sonnenblumen (Mischmuster 1996, geschält)**

Mittelwerte; n = 3

	Cadmium	Nickel	Kupfer	Zink
	[mg/kgTS]			
Kerne	0,51	4,0	25	56
Schale	0,20	2,0	21	23

Bei Sonnenblumenkernen ist der Gehalt an Cadmium, Nickel und Zink im geschälten Kern deutlich höher (Faktor 2-3) als in der Schale. Demgegenüber ist der Kupfergehalt in den Schalen und den geschälten Sonnenblumenkernen nahezu identisch. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen entsprechen den Beobachtungen für Weizenkörner. In den Spelzen von Weizenkörnern werden Phloem-mobile Schwermetalle wie Cadmium, Nickel und Zink im Gegensatz zu Xylem-mobilen wie Mangan nur in geringem Maße angereichert [88]. Es ist daher zu vermuten, dass die höheren Cadmiumgehalte in den Sonnenblumenkernen wie bei Erdnuss, Weizen, und Linsen auf einen Cadmiumtransport über das Phloem zurückzuführen sind. Die Abbildungen 15 a-c zeigen für Sonnenblumenpflanzen der Probenahmen 1998 und 1999 die prozentuale Verteilung von Cadmium, Kupfer, Eisen, Nickel und Zink in Sonnenblumen- und Rapspflanzen.



**Abb. 15 a: Verteilung von Cadmium und Kupfer auf die vegetativen Pflanzenteile von Sonnenblumen**

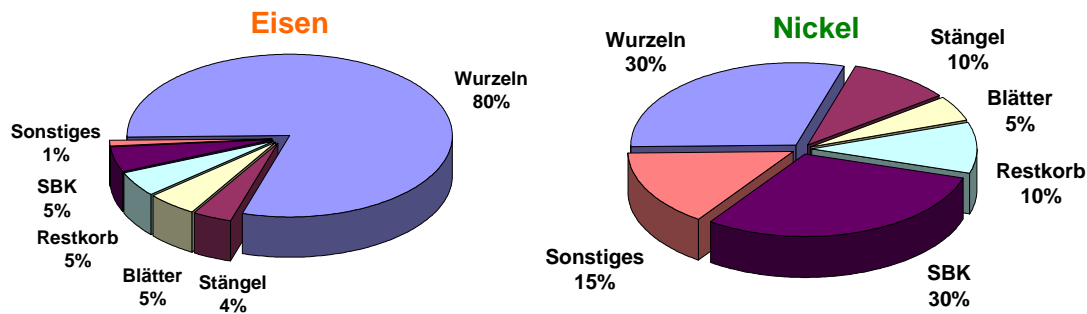


Abb. 15 b: Verteilung von **Eisen** und **Nickel** auf die vegetativen Pflanzenteile von Sonnenblumen

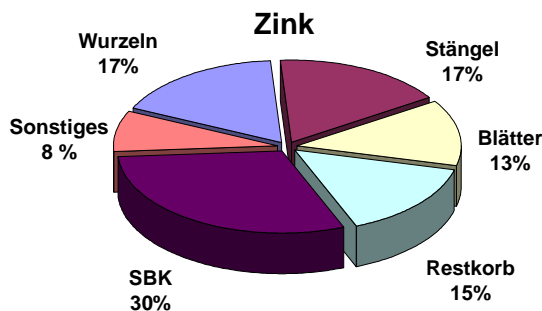


Abb. 15 c: Verteilung von **Zink** auf die vegetativen Pflanzenteile von Sonnenblumen

Abbildungen 15 a-c zeigen, welches Pflanzengrundorgan von Sonnenblumen eine Senke (engl. „sink“) für Schwermetalle darstellt. Cadmium, Kupfer und Zink werden zu etwa 50-60 % in die oberirdischen vegetativen Pflanzenteile verlagert. Dagegen ist dieser Anteil für Nickel mit 40 % deutlich geringer. **Sonnenblumenkerne** scheinen zu diesem Reifestadium keine Senke für Cadmium (10 %) und Eisen (5 %) zu sein, während 20-30 % des gesamten Kupfers, Nickels und Zinks in den Kernen nachzuweisen sind. **Sonnenblumenstängel** sind für Cadmium (25 %) eine Schwermetallsenke. Zudem wird deutlich, dass die **Blätter** von Sonnenblumen mit Ausnahme von Kupfer (20 %) nicht als ausgeprägte Schwermetallsenke fungieren. Die Wurzeln enthalten zwischen 20 und 35 % des gesamten Cadmiums, Kupfers, Nickels und Zinks sowie 80 % des gesamten Eisens. Im Übergang von den Wurzeln zu den oberirdischen Pflanzenteilen existiert für Eisen somit eine besonders effektive Barriere.

Des Weiteren verdeutlichen die Ergebnisse, dass die Akkumulation von Cadmium in den nicht ausgereiften Sonnenblumenkernen zum Zeitpunkt der Probenahme noch nicht abgeschlossen ist. Der in den Sonnenblumenkernen enthaltene Cadmiumanteil beträgt etwa 20 % des in den oberirdischen Pflanzenteilen enthaltenen Cadmiums (Abbildung 16 a).

TRAULSEN [5] berichtet hingegen, dass dieser Anteil bei ausgereiften Sonnenblumenkernen mit etwa 60 % sehr viel höher ist. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei Sonnenblumen ähnlich wie bei Weizen die Cadmiumeinlagerung während der gesamten Entwicklung der Kerne anhält.

## 2.4 Raps

Im Folgenden werden die Ergebnisse von Untersuchungen an Rapspflanzen aus landwirtschaftlicher Anzucht vorgestellt. Für Rapspflanzen wurden drei Probenahmen in Detmold-Mosebeck (Ostwestfalen) durchgeführt. Im Juli 1998 und 2000 jeweils zum Ende der Reifeperiode sowie im April 2000 während der Blütephase von Rapspflanzen.

**Tab. 10: Schwermetallgehalte in Rapspflanzen aus landwirtschaftlichem Anbau zum Zeitpunkt der Blüte (Detmold-Mosebeck; April 2000)**

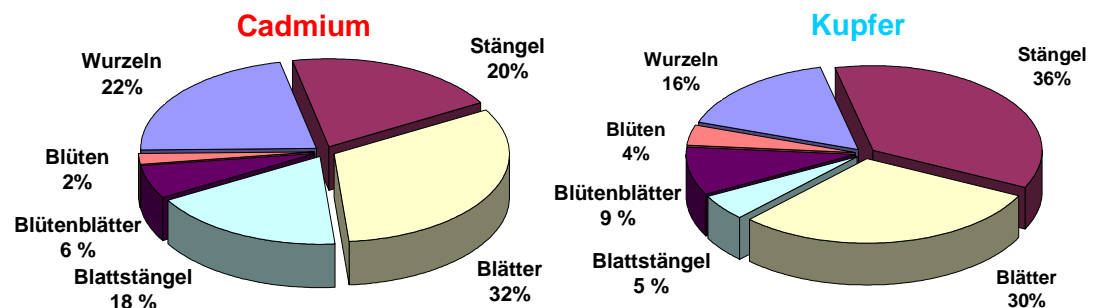
Mittelwerte; n = 5

Pflanzenteil	Cadmium	Nickel	Kupfer	Eisen	Zink
Wurzeln	0,356	1,80	4,64	610	78
Stängel	0,117	0,40	2,86	50	27
Blattstängel	0,261	0,41	1,36	70	13
Blätter	0,255	0,69	3,96	190	28
Blüten (komplett)	0,260	2,20	10,3	130	110

Die höchsten **Kupfer-** und **Zink**gehalte sind in Wurzeln, den Blüten sowie den Blättern von Rapspflanzen nachweisbar, wobei die höheren Gehalte in den oberirdischen Pflanzenteilen zu finden sind. **Nickel** wird hauptsächlich in den Wurzeln und den Blüten angereichert. Auffällig ist, dass die Blätter mit 0,7 mg/kg TS nur sehr wenig Nickel enthalten. Der **Cadmium**gehalt ist in den Grundorganen von Rapspflanzen mit 0,26-0,36 mg/kg TS ähnlich.

Der höchste **Eisen**-Gehalt (610 mg/kg TS) wird, wie zuvor bei Sonnenblumen, in den Wurzeln von Rapspflanzen beobachtet. Im Gegensatz zu Sonnenblumen (Tabelle 7) wird Eisen in Rapspflanzen auch zu einem beträchtlichen Teil in die Blätter und Blüten verlagert.

Wie zuvor bei Sonnenblumen wird auch bei Rapspflanzen die Verteilung der untersuchten Schwermetalle zwischen den verschiedenen Pflanzenorganen vergleichend betrachtet, um mögliche Schwermetallsenken zu erkennen.



**Abb. 16 a: Verteilung von Cadmium und Kupfer auf die vegetativen Pflanzenteile von Raps**

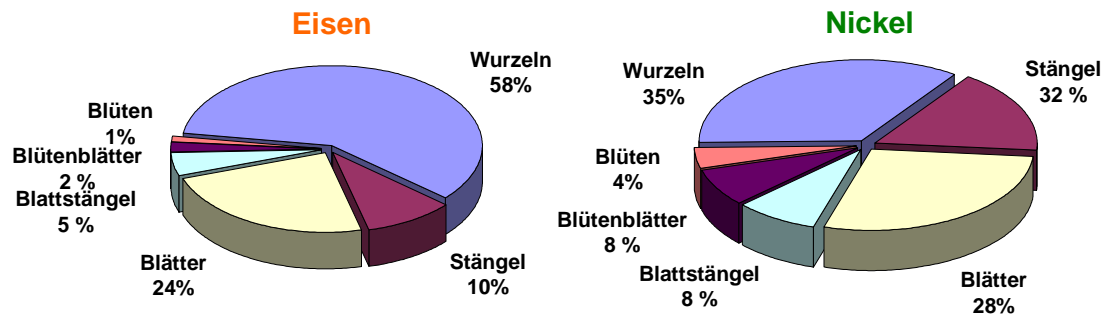


Abb. 16 b: Verteilung von Eisen und Nickel auf die vegetativen Pflanzenteile von Raps

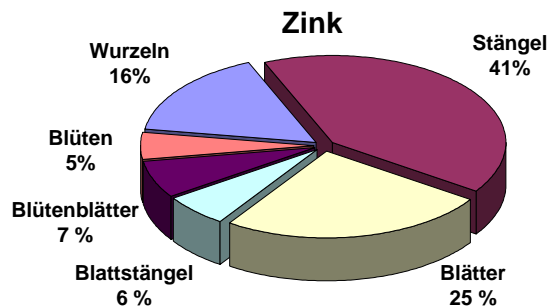


Abb. 16 b: Verteilung von Zink auf die vegetativen Pflanzenteile von Raps

80-85 % des gesamten in der Rapspflanze enthaltenen Cadmiums, Kupfers und Zinks werden in den oberirdischen Pflanzenteilen angereichert. Dieser Anteil ist für Nickel mit 65 % und Eisen mit 40 % deutlich geringer. Im Gegensatz zu Sonnenblumen sind die Blätter bei Rapspflanzen für Cadmium, Kupfer, Eisen, Nickel und Zink eine bedeutende Schwermetall-senke. Eisen wird bei Rapspflanzen ebenfalls zum überwiegenden Teil in den Wurzeln akkumuliert (60 %).

Nachfolgend werden die Schwermetallgehalte in Rapspflanzen beschrieben, die 1998 und 2000 jeweils zum Ende der Reifungsperiode geerntet wurden. Während der Reifungsperiode der Rapspflanzen verholzen die Stiele und die Blätter sterben ab. Daher stehen bei diesen Pflanzen ausschließlich Wurzel, Pflanzenstiel und die Rapsschoten für die Schwermetallanalytik zur Verfügung (vgl. Abbildung 12 b). Die Rapsschoten wurden weiter unterteilt. Es wurden die Schotenklappen, die Scheidewand und die Samen (vgl. 1.7) separiert [244, 305, 306] und auf ihren Schwermetallgehalt untersucht. Die Bestimmung der Schwermetall-Verteilungsmuster war bei diesen Pflanzen nicht möglich, weil die Schoten bei der Ernte aufplatzten und daher eine Bilanzierung der Biomasse für die Rapssamen nicht möglich war.



**Tab. 11: Schwermetallgehalte in Rapspflanzen mit reifen Samen aus landwirtschaftlichem Anbau (Detmold-Mosebeck; Juli 1998 und 2000)**

Mittelwerte; n = 3

Pflanzenteil Erntezeitpunkt	Cadmium		Nickel		Kupfer		Eisen		Zink	
	07.98	07.00	07.98	07.00	07.98	07.00	07.98	07.00	07.98	07.00
	[mg/kgTS]									
Wurzeln	0,265	0,310	3,5	3,7	4,1	4,3	<b>650</b>	<b>625</b>	31	33
Stängel	0,172	0,176	0,5	0,5	1,4	1,4	23	25	9,3	9,5
Schotenklappen	0,220	0,235	0,8	0,8	2,9	3,0	50	52	7,0	7,2
Scheidewand	0,222	0,230	0,7	0,7	3,2	3,1	60	58	7,1	6,9
Samen	<b>0,042</b>	<b>0,037</b>	0,4	0,4	3,4	2,9	74	73	41	42

Für Cadmium, Nickel, Kupfer, Eisen und Zink sind die höchsten Gehalte in den Wurzeln der Rapspflanzen nachzuweisen. Es sind allerdings einige Besonderheiten zu erkennen, die möglicherweise Erklärungsansätze für den zwischen Sonnenblumenkernen und Rapssamen beobachteten Unterschied im Cadmium- und Nickelgehalt liefern.

Die **Cadmium**gehalte von Rapspflanzen zur Blütezeit (Tabelle 10) und zum Ende der Reifeperiode (Tabelle 11) sind in den Wurzeln und dem Stängel annähernd gleich. Des Weiteren fällt auf, dass der Cadmiumgehalt in den Schotenklappen und der Scheidewand ähnlich hoch ist wie im Rest der Pflanze. Dagegen ist der Cadmiumgehalt in den Rapssamen, welche in die untersuchten Schoten eingelagert sind, um den Faktor fünf bis sieben niedriger als im Rest der Rapsanlage. In Kapitel 1.7 ist beschrieben, dass die Rapssamen in den Rapsschoten in eine Plazenta eingebettet sind. Zum Untersuchungszeitpunkt ist diese Plazenta vollkommen eingetrocknet, sodass es nicht mehr möglich war, deren Schwermetallgehalt zu bestimmen. Trotzdem ist zu vermuten, dass die Plazenta eine physiologische Barriere darstellt, die den Eintrag von Cadmium in die Rapssamen behindert.

Dagegen wird der Transport der essenziellen Schwermetalle Kupfer, Eisen, Nickel und Zink anscheinend nicht wesentlich beeinträchtigt. Die Gehalte dieser Schwermetalle sind in den vegetativen Pflanzenteilen, den Schotenbestandteilen und den Samen ähnlich.

Auch für **Nickel** zeigt sich eine Besonderheit. Der Nickel-Gehalt in Wurzeln ist um den Faktor fünf bis zehn höher als im Rest der Rapsanlage. Dieser Unterschied deutet sich auch für Rapspflanzen an, die während der Blütezeit geerntet wurden. Der Nickelgehalt in den Wurzeln (Tabelle 9) ist um den Faktor fünf höher als in den Blättern und im Stängel.

Der **Eisengehalt** ist wie bei Sonnenblumen und den während der Blüteperiode geernteten Rapspflanzen in den Wurzeln mit 650 mg/kgTS besonders hoch. Die möglichen Ursachen für diese eisenspezifische Barriere in Sonnenblumen- und Rapswurzeln werden im Rahmen der Wachstumsversuche mit Sonnenblumen- und Rapspflanzen unter Hydrokulturbedingungen in Kapitel 5 ausführlich beschrieben.

### Zwischenbetrachtung

Die Untersuchungen zur Schwermetallverteilung von Cadmium, Nickel, Kupfer, Eisen und Zink haben für Sonnenblumen und Raps aus der landwirtschaftlichen Praxis einige wichtige Unterschiede aufgezeigt.

- ✓ Die Cadmium-, Nickel-, Kupfer-, Eisen- und Zinkgehalte sind in den verschiedenen Pflanzenteilen von Rapspflanzen im Allgemeinen niedriger als in Sonnenblumenpflanzen. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen anderer Untersuchungen [5].
- ✓ Bei Rapspflanzen wurden deutliche Hinweise für eine physiologische Barriere für Cadmium zwischen Schoten (Plazenta) und den Samen erhalten.
- ✓ Für Nickel deutet sich bei den untersuchten Rapspflanzen im Gegensatz zu Sonnenblumen eine physiologische Barriere im Übergangsbereich vom Wurzelsystem zu den oberirdischen Pflanzenteilen an.
- ✓ Sonnenblumenkerne akkumulieren im Vergleich zu Rapssamen mehr Cadmium. Es deutet sich an, dass die Akkumulation von Cadmium während der gesamten Entwicklung der Sonnenblumenkerne anhält. Möglicherweise findet während der Reifungsperiode, wie beim Weizen, über das Phloem eine Cadmiumverlagerung aus den Blättern und dem Stängel in die Sonnenblumenkerne statt.

### 3 Anzuchtversuche in Hydrokultur

Neben den Untersuchungen an Sonnenblumen- und Rapspflanzen aus der landwirtschaftlichen Praxis wurden auch Anzuchtversuche unter Hydrokulturbedingungen durchgeführt (Abbildung 13). Bei der Anzucht in Hydrokultur ist im Gegensatz zum landwirtschaftlichen Anbau gewährleistet, dass Faktoren wie

- der pH-Wert des Bodenmaterials,
- die Pflanzenverfügbarkeit der Nährstoffe,
- die Konstanz der Nährstoffkonzentration,
- die Wachstumsbedingungen

bei jeder Anzucht unverändert sind. Es ist daher möglich, durch die Variation eines Anzuchtparameters - z.B. der Cadmiumkonzentration der Nährlösung - direkt die Folgen dieser Veränderung zu beobachten [307, 308].

Dabei wurden die folgenden Versuchsbedingungen optimiert bzw. variiert:

#### 1. Optimierung von Keimung, Nährlösung und Anzuchtbedingungen:

Besondere Bedeutung hat die Optimierung der Keimung, weil aus den Kotyledonen von fünf Tage alten Sonnenblumen- und Rapskeimlingen Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen isoliert werden sollen.

Die angezuchteten Sonnenblumen- und Rapspflanzen werden für die Gewinnung von Xylemsaft sowie zur Bestimmung der Schwermetallverteilung und -Bindungsformen verwendet.

#### 2. Einfluss der Cadmium-Konzentration

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Isolierung von Cadmium-bindenden Substanzen aus Sonnenblumen- und Rapswurzeln. Um eine ausreichend hohe Cadmium-Konzentration in den Wurzeln zu gewährleisten und um mögliche Schutzmechanismen der Pflanzen gegenüber Cadmiumstress zu erkennen, werden Sonnenblumen- und Rapspflanzen in Cadmium-dotierter Nährlösung angezogen. Steigende Konzentrationen von 1, 2, 5, 10, 20 und 50  $\mu\text{mol/L}$  Cadmium sollen zeigen, wie viel Cadmium die Pflanzen vertragen, ohne stark geschädigt zu werden. Die hierbei erhaltenen Cadmium-belasteten Pflanzen werden zudem zur Gewinnung von Xylemsaft und für die Bestimmung der Schwermetallverteilung unter Cadmiumstress verwendet. Die Konzentrationsbereiche wurden ausgewählt, weil bei vergleichbaren Experimenten mit Mais die Wachstumsrate bei 9  $\mu\text{mol/L}$  Cadmium um die Hälfte [309], bei Gerste dagegen erst ab einer Konzentration von 44  $\mu\text{mol/L}$  Cadmium sank [309].

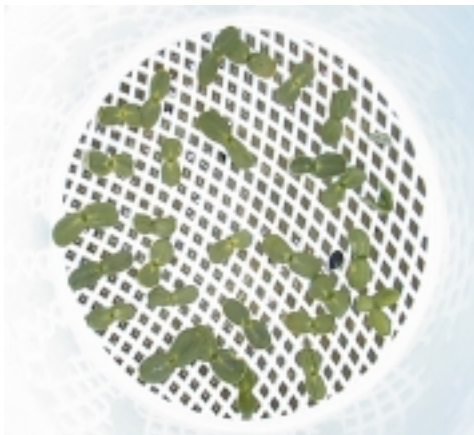
Bei der Interpretation der Ergebnisse von Anzuchtversuchen in Hydrokultur ist aber zu berücksichtigen, dass die Wachstumsbedingungen nicht den Verhältnissen der landwirtschaftlichen Praxis entsprechen. Insbesondere die Bioverfügbarkeit der Schwermetalle ist unter Hydrokulturbedingungen sehr viel größer als unter natürlichen Bedingungen [283, 310]. Für die Untersuchungen ist aber die Reproduzierbarkeit der Wachstumsbedingungen von

größter Bedeutung. Diese Reproduzierbarkeit ist nur durch die Anzucht in Hydrokultur in einer Wachstumskammer annähernd gewährleistet.

Die Beurteilung der Entwicklungsstadien der Sonnenblumen- und Rapspflanzen erfolgt nach STAUB ET AL. [311]. Hierbei wird zunächst das Makrostadium beurteilt. Bei der Anzucht in Hydrokultur wurde die Anzucht nach 25 Tagen beendet, sodass sowohl für Sonnenblumen als auch Rapspflanzen das Makrostadium 1 die so genannte Blatentwicklung vorliegt. Die weitere Einteilung erfolgt nach der Zahl der entfaltenen Blattpaare (Sonnenblumen) bzw. der Anzahl der entfaltenen Laubblätter (Raps) (vgl. 11.1).

### 3.1 Sonnenblumen

Für die Anzucht werden die Sonnenblumenkerne zunächst oberflächenentkeimt. Anschließend findet eine Keimung der Saaten statt. Nach zwei Tagen werden die Sonnenblumenkerne auf Siebe umgesetzt, wo nach weiteren drei Tagen mehrere Zentimeter lange Wurzeln gebildet wurden (vgl. Abbildung 17).



**Abb. 17: Sonnenblumenkeimlinge in nicht-dotierter Nährlösung**

Die Keimlinge sind 5 Tage alt. Sie wurden einen Tag lang dem Licht ausgesetzt und befinden sich seit einem Tag in der Nährlösung.



a)



b)

**Abb. 18 a/b: Sonnenblumen in nicht-dotierter Nährlösung (Kontrollpflanzen)**

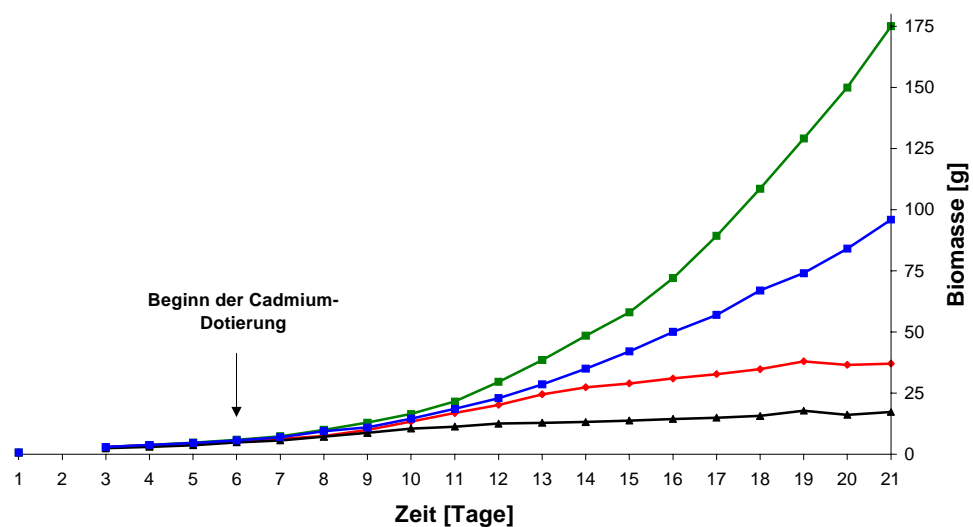
Es sind keine Schädigungen der Pflanzen bzw. des Wurzelsystems zu erkennen. Die Pflanzen sind insgesamt 25 Tage alt; Entwicklungsstadium: 16.



**Abb. 19 a/b: Anzucht von Sonnenblumen in Hydrokultur mit 1  $\mu\text{mol/L}$  Cd (a) und 2  $\mu\text{mol/L}$  Cd (b) in der Nährlösung**

Die Pflanzen sind bei Zugabe von 1  $\mu\text{mol/L}$  Cd deutlich größer (Entwicklungsstadium: 16) als bei der Anzucht mit 2  $\mu\text{mol/L}$  Cd (Entwicklungsstadium: 14). Gelbfärbung der Blätter ist erkennbar; Kontrollanzucht vgl. Abbildung 19 a.

Die Abbildungen 19 a und b zeigen den Einfluss von Cadmium auf die Entwicklung von Sonnenblumenpflanzen. Bei einer Cadmium-Konzentration von 1-2  $\mu\text{mol/L}$  im Nährmedium ist im Gegensatz zu den Kontrollpflanzen (Abbildung 18 a) eine Gelbfärbung der Blätter zu beobachten, die auf Schäden im Photosystem hinweist (Chlorose). Diese Vermutung wird auch von der Veränderung des Chlorophyllgehaltes der Sonnenblumenblätter in Abhängigkeit vom Cadmiumgehalt der Nährlösung bestätigt (Dnp). Andere Autoren berichten ebenfalls von einer Gelbfärbung der Blätter von Sonnenblumen [236, 237, 312, 313]. STOBART ET AL. führen den Rückgang an Chlorophyll auf die Hemmung der Protochlorophyllid-Reduktase sowie der  $\delta$ -Aminolävulinatbildung durch Cadmium zurück [314].



**Abb. 20: Entwicklung der Biomasse bei der Anzucht von Sonnenblumen mit und ohne Cadmiumdotierung der Nährlösung**

Cd-Dotierung: Kontrollpflanzen, 2  $\mu\text{mol/L}$  Cd, 10  $\mu\text{mol/L}$  Cd, 20  $\mu\text{mol/L}$  Cd

Bei 1  $\mu\text{mol/L}$  Cadmium im Nährmedium entspricht die Bildung der Biomasse von Sonnenblumen in etwa der Entwicklung in der Kontrollprobe.

Abbildung 20 zeigt für Sonnenblumenpflanzen die Entwicklung der Biomasse bei der Anzucht in Hydrokultur. Die Dotierung der Nährlösung mit  $1 \mu\text{mol/L}$  Cadmium hat noch keinen hemmenden Einfluss auf die Entwicklung der Pflanzen. Die nach 25 Tagen gebildete Biomasse (ca. 170 g) ist ähnlich hoch wie bei den Kontrollpflanzen in nicht-dotierter Nährlösung mit 175 g. Dagegen ist bei einer Cadmiumkonzentration von  $2 \mu\text{mol/L}$ , die nach 25 Tagen gebildete Biomasse mit 100 g deutlich geringer.

Bei Cadmiumdosen über  $20 \mu\text{mol/L}$  sind die Pflanzen bereits fünf Tage nach der ersten Dotierung komplett abgestorben. Im Gegensatz zu Mais und Gerste [309] zeigen Sonnenblumen- und Rapspflanzen schon bei einer sehr niedrigen Cadmiumkonzentration von  $1 \mu\text{mol/L}$  erste Schäden im Photosystem. Drastische Einbußen bei der gebildeten Biomasse traten ab einer Cadmiumkonzentration von  $2\text{-}3 \mu\text{mol/L}$  auf (Abbildung 21). Dieses könnte möglicherweise auf den häufigen Wechsel der Nährlösung zurückzuführen sein. Vorversuche zeigten, dass ein Wechsel der Nährlösung nach 2 Tagen in nicht-dotierter Nährlösung eine schnellere Entwicklung der Sonnenblumenpflanzen zur Folge hat. Dieser Wechselrhythmus wurde auch bei der Zugabe von Cadmium eingehalten.

### 3.2 Raps



a)



b)

**Abb. 21 a/b: Anzucht von Raps in Hydrokultur  
Kontrollanzucht (a) Wachstumsstadium 15;  
Dotierung mit  $2 \mu\text{mol/L}$  Cadmium (b); (Wachstumsstadium 14)**

Die Abbildungen 21 a und b verdeutlichen, dass auch die Entwicklung von Rapspflanzen durch Cadmium beeinträchtigt wird. Gezeigt sind die Kontrollanzucht sowie Rapspflanzen die in einer mit  $2 \mu\text{mol/L}$  Cadmium dotierten Nährlösung angezchtet wurden. Wie zuvor für Sonnenblumen beschrieben, hat die Dotierung der Nährlösung mit  $1$  bzw.  $2 \mu\text{mol/L}$  Cadmium auch bei Rapspflanzen eine Gelbfärbung der Blätter zur Folge. Ebenso ist auch für Rapsblätter eine Verringerung des Chlorophyllgehaltes in Abhängigkeit vom Cadmiumgehalt der Nährlösung zu erkennen (Dnp). Bei der Kontrollanzucht in nicht-dotierter Nährlösung sowie bei der Anzucht in einer mit  $1 \mu\text{mol/L}$  dotierten Nährlösung, erreichen die Rapspflanzen nach 25 Tagen jeweils das Entwicklungsstadium 15 und die gesamte gebildete Biomasse ist mit etwa



33 g in beiden Fällen ähnlich hoch. Dagegen ist die gebildete Biomasse von Rapspflanzen, bei einer Cadmium-Konzentration von 2  $\mu\text{mol/L}$ , nach 25 Tagen mit 27 g deutlich geringer und es wird lediglich das Entwicklungsstadium 14 erreicht (Abbildung 21 b). Diese Beobachtungen werden von LARSSON ET AL. bestätigt [313], die beschreiben, dass das Wachstum von Rapspflanzen bereits ab einer Cadmium-Konzentration von 2  $\mu\text{mol/L}$  stark reduziert wird.

### Zwischenbetrachtung

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass es sowohl für Sonnenblumen als auch Raps gelungen ist, die Wachstumsbedingungen so zu optimieren, dass bei der Anzucht in nicht-dotierter Nährlösung keine merklichen Wachstumschäden auftreten (Abbildung 19 a und 22 a).

Ebenso gelang es, eine Cadmiumkonzentration zu finden, die eine hohe Akkumulation von Cadmium in den angezuchteten Pflanzen gewährleistet, ohne das Pflanzenwachstum zu beeinträchtigen. Für die Anzucht von Sonnenblumen- und Rapspflanzen wurde eine Cadmiumkonzentration von 1  $\mu\text{mol/L}$  in der Nährlösung gewählt. Bei dieser Konzentration unterscheidet sich die gebildete Biomasse nicht wesentlich von der gebildeten Biomasse der, in nicht-dotierter Nährlösung angezuchteten, Pflanzen.

### 3.3 Schwermetallgehalte in Sonnenblumen- und Rapspflanzen aus der Anzucht in Hydrokultur

In den in Hydrokultur angezuchteten Pflanzen werden die Schwermetalltotalgehalte der Pflanzenorgane (Wurzel, Stängel, Blatt) bestimmt.

Die Untersuchungen sollen zunächst eine Übersicht über die Schwermetallverteilung in 25 Tage alten Sonnenblumen- und Rapspflanzen unter Hydrokulturbedingungen liefern. Diese Ergebnisse werden mit den Daten für Sonnenblumen- und Rapspflanzen aus der landwirtschaftlichen Praxis verglichen. Ziel ist, den Einfluss der höheren Bioverfügbarkeit der Schwermetalle in der Nährlösung auf den Schwermetallgehalt in den Pflanzen zu bewerten. Zudem sollen diese Untersuchungen mögliche Korrelationen zwischen dem Cadmiumgehalt und den Gehalten der weiteren untersuchten Schwermetalle in Sonnenblumen- und Rapspflanzen aufdecken.

**Tab. 12: Schwermetallgehalte in den Wurzeln von 25 Tage alten Sonnenblumen- und Rapspflanzen (Anzucht in Hydrokultur ohne und mit Cadmiumdotierung der Nährlösung)**

Mittelwerte; n= 3

Pflanzenteil	Cadmium	Nickel	Kupfer	Eisen	Zink
<u>SB</u> -Wurzeln (Kontrollpflanzen)	0,10	2,2	58	510	10
<u>SB</u> -Wurzeln (Anzucht mit 1 $\mu\text{mol/L}$ Cd)	<b>38,0</b>	1,9	51	630	<b>20</b>
<u>Raps</u> wurzeln (Kontrollpflanzen)	0,04	2,2	32	740	44
<u>Raps</u> wurzeln (Anzucht mit 1 $\mu\text{mol/L}$ Cd)	<b>22,8</b>	2,1	<b>53</b>	790	<b>88</b>

Wie Tabelle 12 veranschaulicht, nimmt erwartungsgemäß bei einer höheren **Cadmium**konzentration in der Nährlösung der Cadmiumgehalt in den Sonnenblumen- und Rapswurzeln deutlich zu. Ein ähnliches Verhalten wurde ebenfalls bei Dotierungsexperimenten mit Vanadium und Beryllium bei Gerste [283, 315, 316] und Weidelgras [316, 317] beobachtet.

Auffällig ist, dass der **Zink**gehalt in Sonnenblumen und Rapswurzeln im Vergleich zum Zinkgehalt in den Kontrollpflanzen ebenfalls deutlich steigt (Faktor 2), obwohl sich der Zinkgehalt in der Nährlösung nicht ändert. Diese Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen von anderen Autoren [263, 312], welche von einer Zunahme des Zinkgehaltes in Sonnenblumenpflanzen berichten, wenn der Cadmiumgehalt in Sonnenblumen durch künstliche Cadmiumzufuhr ansteigt. Vergleichbare Ergebnisse für Raps liegen zum jetzigen Zeitpunkt nicht vor. Die Erhöhung des Zinkgehaltes wird von WALKER auf eine Verringerung des Pflanzenwachstums zurückgeführt [318]. Die eigenen Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser Zusammenhang nicht besteht. Wie zuvor beschrieben, sind die Anzuchtbedingungen so gewählt worden, dass keine Beeinträchtigung des Wachstums von Sonnenblumen bzw. Raps auftrat.

Der **Eisen**- und **Nickel**gehalt in den Sonnenblumen- und Rapswurzeln wird durch die Dotierung der Nährlösung nicht beeinflusst. Dieses kann als Hinweis auf unterschiedliche Aufnahmemechanismen in Pflanzen für Cadmium im Vergleich zu Nickel und Eisen gewertet werden.

Ob die beobachtete Beeinflussung des Zinkgehaltes von Sonnenblumen- und Rapswurzeln durch Cadmium einen Einfluss auf den Schwermetalltransport in den untersuchten Pflanzen ausübt, wird durch die Analyse von Xylemsaft überprüft.

**Tab. 13: Schwermetallgehalt im Xylemsaft von Sonnenblumen- und Rapspflanzen (Anzucht in Hydrokultur ohne und mit Cadmium-Dotierung der Nährlösung)**

Mittelwerte; n = 3

Pflanze	Cadmium	Nickel	Kupfer [mg/mL]	Eisen	Zink
<u>Sonnenblume</u> (Kontrollpflanzen)	0,01	0,06	0,25	1,20	0,37
<u>Sonnenblume</u> (Anzucht mit 1 µmol/L Cd)	0,37	0,04	0,28	1,21	0,69
<u>Raps</u> (Kontrollpflanzen)	0,01	0,09	0,60	1,80	0,92
<u>Raps</u> (Anzucht mit 1 µmol/L Cd)	0,28	0,06	0,45	1,20	1,16

Tabelle 13 zeigt, dass die Dotierung der Nährlösung mit 1 µmol/L Cadmium eine deutliche Erhöhung des Cadmiumgehaltes im Xylemsaft von Sonnenblumen- und Rapspflanzen zur Folge hat. Ebenso steigt der Zinkgehalt im Xylemsaft. Für Sonnenblumenpflanzen ist zu erkennen, dass der Zinkgehalt im Xylemsaft nahezu doppelt so hoch ist, wenn die Nährlösung mit 1 µmol/L Cadmium dotiert wird. Demgegenüber verändert sich der Kupfer-, Eisen- und Nickelgehalt im Xylemsaft von Sonnenblumen- und Rapspflanzen in Folge der Cadmiumdotierung der Nährlösung nicht. Bei



Rapspflanzen ist eine Reduzierung des Eisen- und Kupfergehaltes im Xylemsaft nach Dotierung der Nährlösung mit Cadmium festzustellen.

**Tab. 14: Schwermetallgehalte in Sonnenblumen- und Rapsblättern (Anzucht unter Hydrokulturbedingungen ohne und mit Cadmium-Dotierung der Nährlösung)**

Mittelwerte; n = 3

Pflanzenteil	Cadmium	Nickel	Kupfer	Eisen	Zink
	[mg/kgTS]				
<u>SB</u> -Blätter (Kontrollpflanzen)	0,09	1,64	33	120	130
<u>SB</u> -Blätter (Anzucht mit 1 µmol/L Cd)	26,8	1,10	28	90	120
<u>Raps</u> blätter (Kontrollpflanzen)	0,05	1,34	102	72	72
<u>Raps</u> blätter (Anzucht mit 1 µmol/L Cd)	148	1,51	497	70	85

Die Dotierung der Nährlösung mit 1 µmol/L an Cadmium hat eine erhöhte Anreicherung von **Cadmium** in den Blättern von Sonnenblumen- und Rapspflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zur Folge. Demgegenüber sind die Gehalte an Nickel und Zink in den Blättern unverändert. Der **Kupfer**gehalt in den Sonnenblumenblättern wird von den Cadmiumgehalten in der Nährlösung nicht beeinflusst, allerdings sinkt der Eisengehalt in den Blättern. Diese Beobachtungen entsprechen den Ergebnissen der Untersuchungen von RAJ [312].

Dagegen steigt der **Kupfer**gehalt in den Rapsblättern nach Dotierung der Nährlösung mit Cadmium deutlich an (Faktor fünf), während für Nickel, Eisen und Zink keine Veränderungen festzustellen sind. Die Erhöhung des Kupfergehaltes in den Rapsblättern ist nicht auf einen verstärkten Transport von Kupfer über das Xylem zurückzuführen (Tabelle 13). Ob in Rapspflanzen das Phloem am Transport von Kupfer beteiligt ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

Für Stängel (Dnp) von Sonnenblumen- und Rapspflanzen aus Anzuchtversuchen in Hydrokultur ist ein Zusammenhang zwischen der Cadmium- und Zinkkonzentration ebenfalls nicht nachweisbar.

Für die in Cadmium-dotierter Nährlösung angezüchteten Sonnenblumen fällt auf, dass der **Cadmium**gehalt in den Wurzeln höher ist als in den Blättern. Eine ähnliche Anreicherung von Cadmium in den Wurzeln ist auch für Bohnen, Erbsen, Zwiebeln, Petersilie und Weizen beschrieben worden [319]. Bemerkenswert ist die Anreicherung von Cadmium in den Blättern von Rapspflanzen aus Anzuchtversuchen in Hydrokultur. Der Transport von Cadmium in die vegetativen Pflanzenteile von Raps ist anscheinend nicht behindert. Der Cadmiumgehalt in den Rapsblättern ist um den Faktor fünf höher als in den Wurzeln. Ein ähnliches Verhalten ist für Mais, Tomaten und Radieschen beschrieben [319]. TRAULSEN bemerkt in diesem Zusammenhang, dass Raps im Vergleich zu Sonnenblumen einen höheren Anteil des Gesamt-Cadmiums in den vegetativen Pflanzenteilen akkumuliert [5].

Der **Nickel**gehalt ist in den Sonnenblumenpflanzen aus Hydrokulturversuchen um den Faktor 2-5 niedriger als in den Pflanzen aus landwirtschaft-

licher Praxis. Die unter Hydrokulturbedingungen angezogenen Rapspflanzen enthalten in den Wurzeln in etwa gleich viel Nickel wie die Rapspflanzen aus der landwirtschaftlichen Praxis. In den Rapsblättern ist der Nickelgehalt unter Hydrokulturbedingungen höher als unter landwirtschaftlichen Bedingungen. Allerdings ist auch in den angezuchteten Rapspflanzen die vermutete biochemische Barriere im Übergangsbereich von den Wurzeln zu den oberirdischen Pflanzenteilen festzustellen.

Für **Kupfer** und **Zink** werden deutliche Unterschiede zwischen den Ölpflanzen beobachtet. Sonnenblumen akkumulieren Kupfer bevorzugt in den Wurzeln, während Zink überwiegend in den Blättern angereichert wird. Bei Raps wird dagegen Kupfer zu einem deutlich höheren Anteil in den Blättern akkumuliert. Zink wird im Gegensatz zu Sonnenblumen in den Wurzeln und Blättern von Rapspflanzen in gleichem Maße angereichert.

Für **Eisen** lassen sich keine Unterschiede zwischen Sonnenblumen- und Rapspflanzen beobachten. Beide Pflanzen akkumulieren Eisen überwiegend in den Wurzeln, während in der restlichen Pflanze der Eisengehalt deutlich niedriger ist. Diese Beobachtung gilt auch für die Sonnenblumen- und Rapspflanzen, die in Cadmium-dotierter Nährlösung angezogen werden. Im Übergang von Wurzeln zum oberirdischen Teil der Pflanze existiert bei Sonnenblumen und Raps für Eisen eine Barriere.

Der Transport dieses Metalls in oberirdische Pflanzenteile ist für Sonnenblumen und Raps bisher nicht untersucht worden. Bei Tomaten, dem Ackerschmalwand, Grünalgen und der Bäckerhefe übernehmen spezifische Eisentransporter wie IRT1 („iron regulated transporter“) und IRT2, welche zur ZIP-Familie („zinc-iron-protein“) der Metall-Transporter gehören, den Transport von Eisen in den Spross [320]. Weitere Schwermetalltransporter aus Grünalgen, der Bäckerhefe und *Arabidopsis* gehören zur Klasse der NRAMP-Proteine („natural resistance-associated macrophage protein“). In *Arabidopsis thaliana* wurden sechs Pflanzenanaloga der NRAMP-Transporter gefunden. Für AtNRAMP3 und AtNRAMP4 wurde nachgewiesen, dass sie neben Eisen auch Cadmium in die Pflanze transportieren [21, 90-97]. Auf Grund der taxonomischen Ähnlichkeit von *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* erscheint zumindest für Raps eine vergleichbare Steuerung des Eisentransportes in die oberirdischen Pflanzenteile als wahrscheinlich.

### Zwischenbetrachtung

Die Untersuchungen zur Schwermetallverteilung von Cadmium, Nickel, Kupfer, Eisen und Zink haben für Sonnenblumen- und Rapspflanzen aus Anzuchtversuchen unter Hydrokulturbedingungen folgende Gemeinsamkeiten und Unterschiede aufgezeigt.

#### Gemeinsamkeiten:

- Die Dotierung der Nährlösung mit **Cadmium** hat eine Schädigung des Photosystems bei den Ölpflanzen zur Folge. Diese wird durch eine Gelbfärbung der Blätter sowie durch einen geringeren Chlorophyllgehalt der Blätter sichtbar.
- Die Dotierung der Nährlösung mit 1 µmol/L Cadmium hat keine Beeinträchtigung des Wachstums von Sonnenblumen- und Raps-

pflanzen zur Folge. Höhere Cadmiumkonzentrationen in der Nährlösung führen bei beiden Ölpflanzen zu einer Reduzierung des Pflanzenwachstums. Oberhalb einer Konzentration von 20  $\mu\text{mol/L}$  sterben die Pflanzen nach wenigen Tagen ab.

- Sonnenblumen und Raps akkumulieren **Eisen** in überwiegendem Maße in den Wurzeln.
- Die erhöhte Aufnahme von Cadmium durch Sonnenblumen- und Rapswurzeln in einer mit 1  $\mu\text{mol/L}$  Cadmium dotierten Nährlösung hat eine drastische Erhöhung der **Zink**gehalte von Sonnenblumen- und Rapswurzeln zur Folge. Die Zunahme des Zinkgehaltes ist nicht durch eine Verminderung des Pflanzenwachstums zu erklären.
- Zudem konnte erstmalig gezeigt werden, dass ein erhöhter Cadmiumgehalt in Sonnenblumen- und Rapswurzeln nicht nur eine Erhöhung des Cadmiumgehaltes im Xylemsaft zur Folge hat, sondern dass sich ebenfalls der Zinkgehalt im Xylemsaft deutlich erhöht.

#### **Unterschiede:**

- In Sonnenblumen wird **Cadmium** verstärkt in den Wurzeln angereichert, während bei den Rapspflanzen die höheren Cadmiumgehalte in den Blättern beobachtet werden. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen bei Sonnenblumen- und Rapspflanzen aus der landwirtschaftlichen Praxis überein.
- Für **Zink** ist bei Sonnenblumen eine erhöhte Anreicherung in den Blättern nachweisbar. Demgegenüber ist bei den Rapspflanzen eine Gleichverteilung von Zink zwischen den Wurzeln und den Blättern zu erkennen. Diese Unterschiede werden ebenfalls bei Sonnenblumen- und Rapspflanzen aus der landwirtschaftlichen Praxis beobachtet.
- **Kupfer** wird in Sonnenblumen unter Hydrokulturbedingungen hauptsächlich in den Wurzeln angereichert. Der Kupfergehalt in den Wurzeln ist mit 55 mg/kgTS etwa doppelt so hoch wie in den Blättern. Für Rapspflanzen aus Anzuchtversuchen wird dagegen beobachtet, dass Kupfer bevorzugt in den Blättern akkumuliert wird. Der Kupfergehalt ist in Rapsblättern mit 100-500 mg/kgTS je nach Anzuchtbedingungen um den Faktor 2-10 höher als in den Wurzeln. In Sonnenblumen aus landwirtschaftlicher Anzucht ist der Kupfergehalt in den Blättern mit 40 mg/kgTS etwa doppelt so hoch wie in den Wurzeln. Bei Rapspflanzen aus der landwirtschaftlichen Praxis sind die Kupfergehalte in den Wurzeln und den Blättern etwa gleich hoch.

#### **Vergleich landwirtschaftliche Praxis / Anzucht in Hydrokultur**

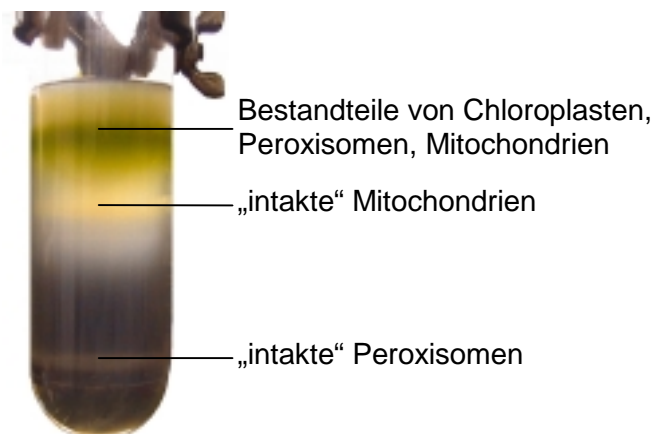
Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Ergebnisse der Untersuchungen zur Schwermetallverteilung in Sonnenblumen- und Rapspflanzen aus Anzuchtversuchen in Hydrokultur gut mit den Ergebnissen für Pflanzen aus der landwirtschaftlichen Praxis übereinstimmen. Die einzige Ausnahme ist Kupfer, bei dem wahrscheinlich die höhere Bioverfügbarkeit in der Nährlösung, im Vergleich zum Ackerboden, die Ergebnisse beeinflusst.

## 4 Kompartimentierung von Schwermetallen in Organellen von Sonnenblumen und Raps

Im bisherigen Verlauf der Untersuchungen wurden Totalgehalte von Cadmium, Nickel, Kupfer, Eisen und Zink in den Pflanzenorganen von Sonnenblumen und Raps bestimmt.

Nachfolgend werden Experimente zur Isolierung von Organellen aus Kotyledonen (Keimblättern) von angekeimten Sonnenblumen- und Raps- saaten beschrieben. Diese sollen Informationen über die intrazelluläre Verteilung von Cadmium, Nickel, Kupfer, Eisen und Zink in Sonnenblumen und Raps liefern. Die Isolierung und Trennung der Organellen aus „trockenen“ ungekeimten Sonnenblumenkernen und Rapssamen gelang nicht.

Die Trennung von Plastiden (Chloroplasten), Mitochondrien und Peroxisomen erfolgt in osmotisch angepassten Medien durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugation [264, 266, 268, 321]. Abbildung 22 zeigt exemplarisch die Trennung von Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen aus grünen Sonnenblumenkotyledonen durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugation.



Der Percollgradient ist so aufgebaut, dass Peroxisomen und Mitochondrien unterschiedlich weit in den Gradienten eindringen. Die beschädigten Organellen dringen unter den gewählten Bedingungen nicht in den Gradienten ein.

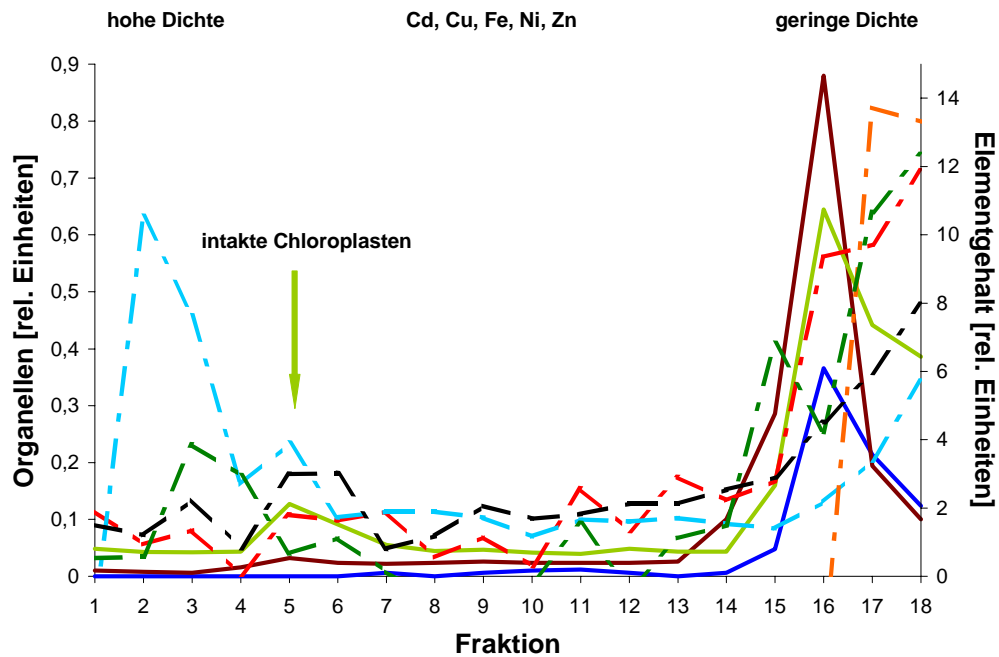
**Abb. 22: Percoll-Dichtegradientenzentrifugation von Homogenaten für die Trennung von Mitochondrien und Peroxisomen aus Sonnenblumenkotyledonen**

Intakte Chloroplasten werden mit dieser Aufarbeitungsmethode nicht isoliert

In Kapitel 1.6.5 wurde erörtert, dass Vakuolen eine bedeutende Senke für Schwermetalle innerhalb der Zelle darstellen. Mit der zuvor beschriebenen Methode zur Isolierung von Organellen aus Kotyledonen von Sonnenblumen- und Rapskeimlingen können allerdings Vakuolen nicht erfasst werden. Eine Isolationsmethode für Vakuolen aus Sonnenblumen und Raps liegt nicht und ihre Entwicklung war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

### 4.1 Chloroplasten

Abbildung 23 zeigt ein Verteilungsprofil von Leitenzymen bzw. -substanzen für Organellen aus grünen Kotyledonen von Sonnenblumenkeimlingen sowie die Verteilung von Cadmium, Nickel, Kupfer, Zink und Eisen auf 1 mL-Fractionen nach Percoll-Dichtegradientenzentrifugation.



**Abb. 23: Verteilung von Schwermetallen im Percoll-Gradienten zur Isolierung von Chloroplasten aus Kotyledonen fünf Tage alter Sonnenblumenkeimlinge.**

**Chloroplasten:** Einheit mg/mL;

**Mitochondrien:** Cytochrom c-Oxidaseaktivität: Einheit  $\Delta E/\text{min}$  bei 550 nm,

**Peroxisomen:** Katalaseaktivität: Einheit  $\Delta E/\text{min}$  bei 230 nm.

**Cd** 1 Einheit ng/mL, **Cu** 1 Einheit 250 ng/mL,

**Fe** 1 Einheit 250 ng/mL, **Ni** 1 Einheit 10 ng/mL, **Zn** 1 Einheit 250 ng/mL,

Aufarbeitungsmedium: Phosphatpuffer mit EDTA

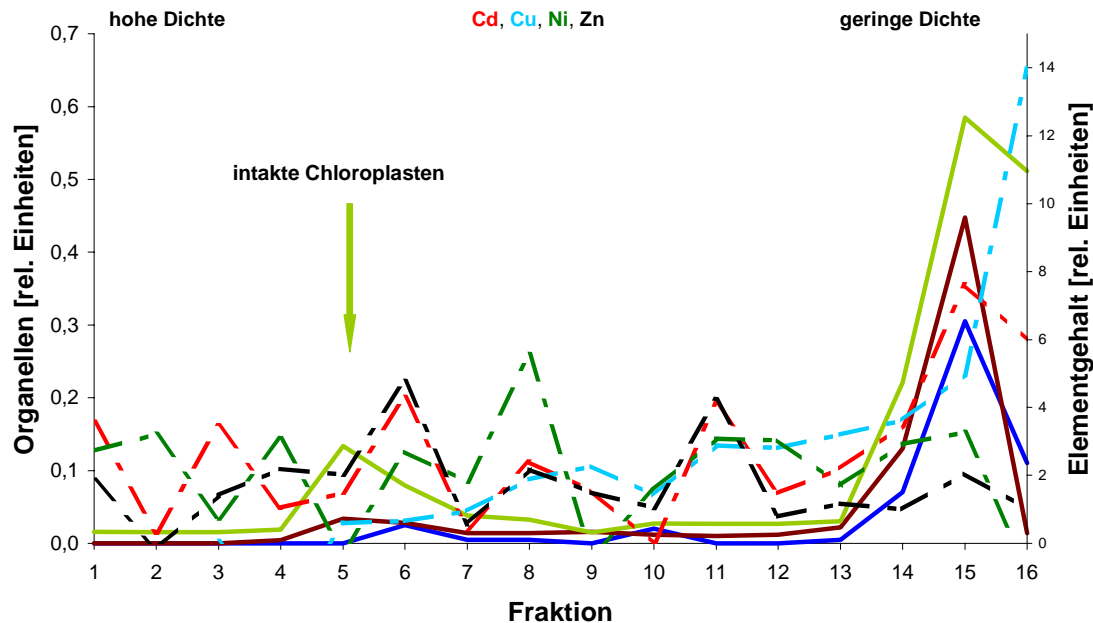
Weil Chloroplasten beim Ergrünen aus den Plastiden der ungekeimten Samen hervorgehen, dürften die Chloroplasten bezüglich Cadmium und Nickel den Zustand für Plastiden in ungekeimten Samen wiedergeben. Bei der Isolierung von Chloroplasten aus Sonnenblumenkotyledonen wurde ein erkennbares Maximum intakter Chloroplasten bei hoher Dichte festgestellt. Das starke Chlorophyllmaximum bei niedriger Dichte ist auf Thylakoidmembranen von beschädigten Chloroplasten zurückzuführen. Das Verhältnis von intakten Chloroplasten zu beschädigten Chloroplasten ist 1:6. Die Aufarbeitungsmethode ergab eine sehr geringe Ausbeute an „intakten“ Peroxisomen und Mitochondrien.

Der Vergleich der Organellenverteilung mit der Schwermetall-Verteilung im Gradienten ergab keine Hinweise auf wesentliche Schwermetall-Pools in den Chloroplasten von Sonnenblumenkotyledonen. Die Hauptanteile der untersuchten Schwermetalle wurden im Bereich geringer Dichte nachgewiesen. Diese Fraktionen enthalten zerstörte Organellen einschließlich der Vakuolenbestandteile und Vesikel.

Für Kupfer ist erwartungsgemäß ein Maximum in den Fraktionen der intakten Chloroplasten (Fraktion 5) zu erkennen, denn Kupfer ist in Form von Plastocyanin in Chloroplasten enthalten. Plastocyanin enthält pro Molekül zwei Kupferatome und stellt ein Redoxsystem in der photosynthetischen Elektronentransportkette des Photosystems dar [22].

Abbildung 24 zeigt, dass aus Rapskeimlingsblättern ebenfalls intakte Chloroplasten erhalten wurden. Das Verhältnis von intakten zu beschädigten

Chloroplasten beträgt für Raps 1:5, d. h. die Ausbeute an intakten Chloroplasten aus Rapskotyledonen ist etwas höher als bei Sonnenblumen und kann als befriedigend angesehen werden.



**Abb. 24: Verteilung von Schwermetallen im Percoll-Gradienten zur Isolierung von Chloroplasten aus Kotyledonen fünf Tage alter Rapskeimlinge.**

**Chloroplasten:** Einheit mg/mL;

**Mitochondrien:** Cytochrom c-Oxidaseaktivität: Einheit  $\Delta E/\text{min}$  bei 550 nm,

**Peroxisomen:** Katalaseaktivität: Einheit  $\Delta E/\text{min}$  bei 230 nm.

**Cd** 1 Einheit ng/mL, **Cu** 1 Einheit 75 ng/mL, **Ni** 1 Einheit 10 ng/mL,

**Zn** 1 Einheit 250 ng/mL

Aufarbeitungsmedium: Phosphatpuffer mit EDTA

Der Vergleich der Chloroplastenverteilung mit der Verteilung der untersuchten Schwermetalle ergibt auch für Rapskotyledonen keine Hinweise, dass Chloroplasten, und damit wohl auch die Plastiden der ungekeimten Samen, eine bedeutende Schwermetallsenke darstellen.

Allerdings wird die Schwermetallverteilung im Percoll-Gradienten durch die verwendeten Zerkleinerungs- und Aufarbeitungsmedien beeinflusst. Diese enthalten starke Komplexbildner wie EDTA sowie Phosphate, sodass möglicherweise die nativen Bindungsformen der untersuchten Schwermetalle nicht mehr vorliegen. Deshalb wurde in weiteren Untersuchungen auf den Einsatz der üblicherweise verwendeten Phosphatpuffer verzichtet. Alternativ wurde ein Aufarbeitungsmedium verwendet, welches 340 mmol/L Sorbitol, 0,4 mmol/L KCl und 2,0 mmol/L HEPES-KOH bei einem pH-Wert von 7,8 enthält [321]. Auf den Einsatz des Chelatbildners EDTA wurde ebenfalls verzichtet. Bisher ist es allerdings nicht gelungen, intakte Chloroplasten mit diesem Aufarbeitungsmedium mit ausreichender Ausbeute zu isolieren.

## 4.2 Mitochondrien und Peroxisomen

Die Abbildungen 25 und 26 zeigen grafisch die Trennung von Peroxisomen und Mitochondrien aus Sonnenblumen- und Rapskotyledonen unter Einsatz einer anderen Isolierungs- und Trennmethode an Percoll.

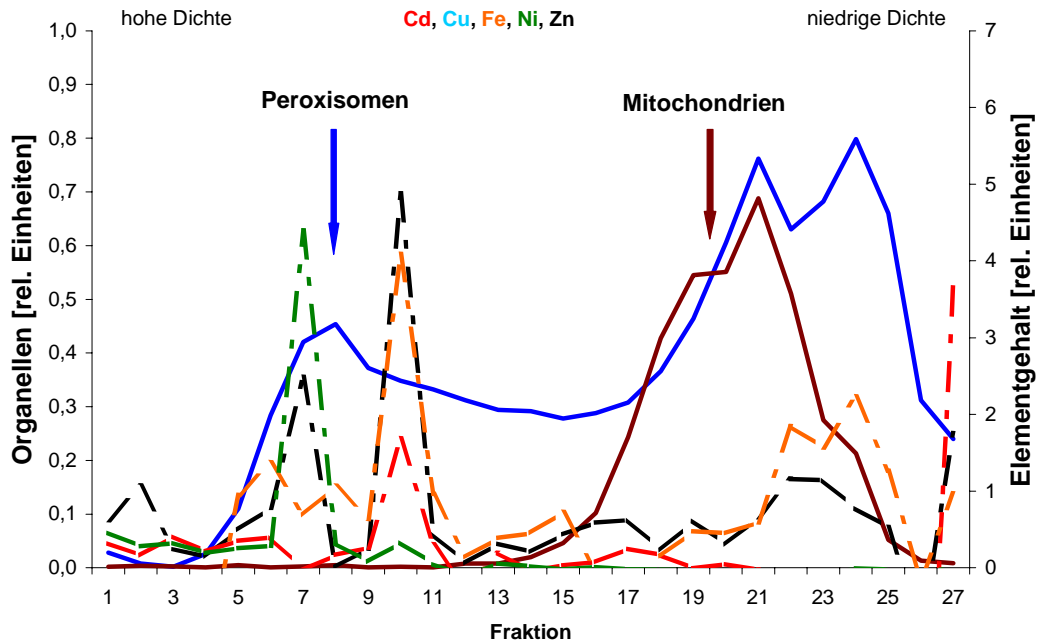


Abb. 25: Verteilung von Schwermetallen im Percoll-Gradienten zur Isolierung von **Mitochondrien** und **Peroxisomen** aus Kotyledonen fünf Tage alter **Sonnenblumenkeimlinge**.

**Mitochondrien:** Cytochrom c-Oxidaseaktivität  $\Delta E/\text{min}$  bei 550 nm,

**Peroxisomen:** Katalaseaktivität  $\Delta E/\text{min}$  bei 230 nm,

**Cd** 1 Einheit ng/mL, **Ni** 1 Einheit 40 ng/ml, **Fe** 1 Einheit 200 ng/mL

**Zn** 1 Einheit 100 ng/mL

Aufarbeitungsmedium 1 mit EDTA:

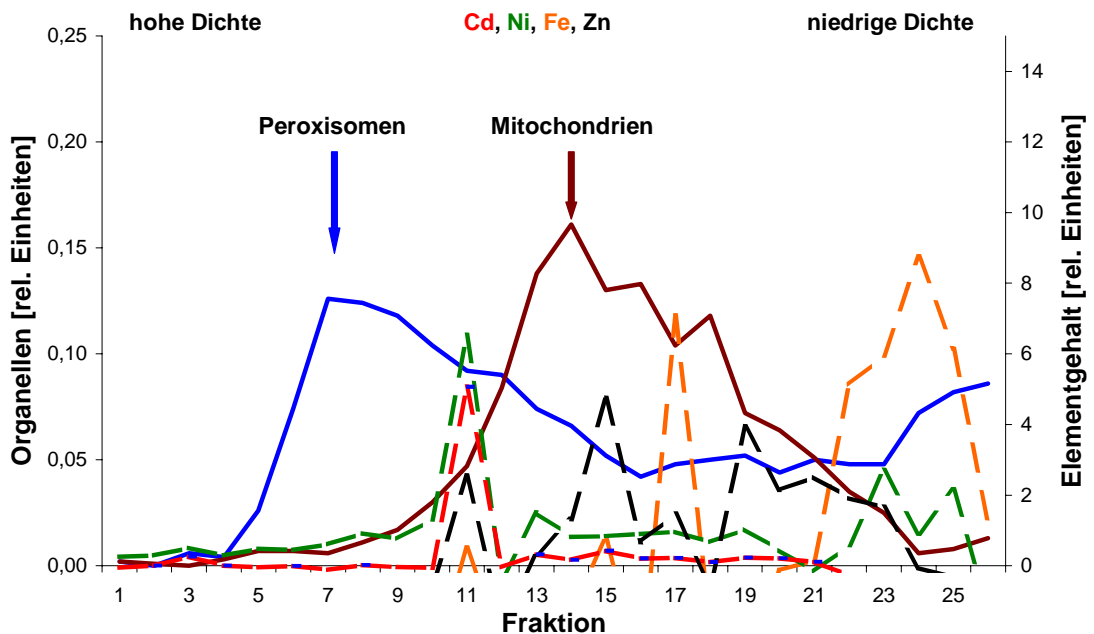


Abb. 26: Verteilung von Schwermetallen im Percoll-Gradienten zur Isolierung von **Mitochondrien** und **Peroxisomen** aus Kotyledonen fünf Tage alter **Rapskeimlinge**.

**Mitochondrien:** Cytochrom c-Oxidaseaktivität  $\Delta E/\text{min}$  bei 550 nm,

**Peroxisomen:** Katalaseaktivität  $\Delta E/\text{min}$  bei 230 nm,

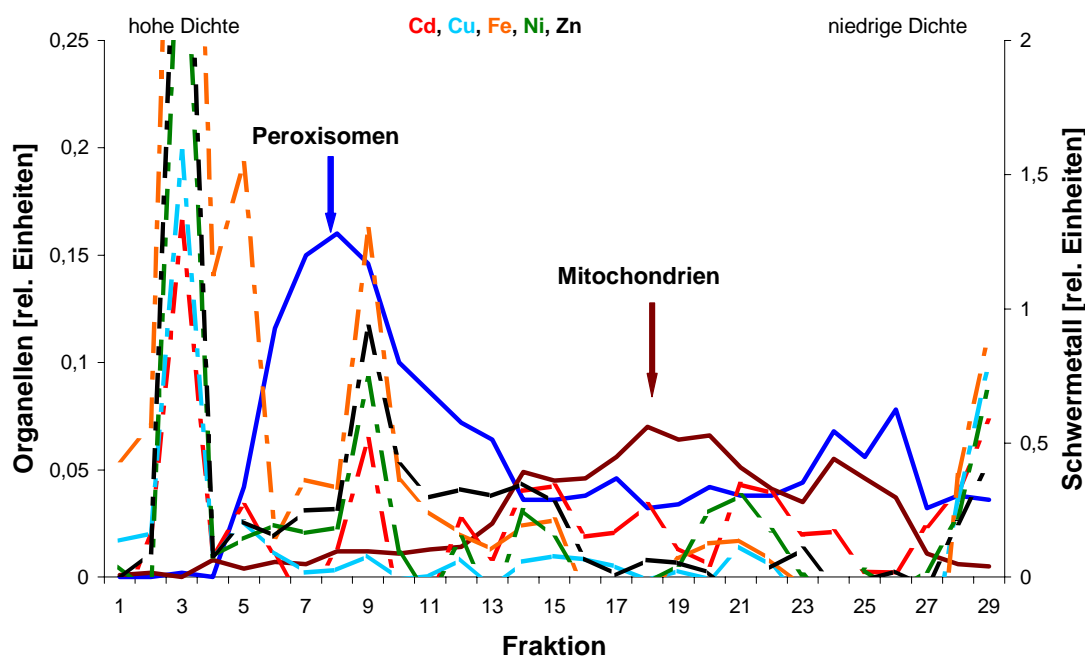
**Cd** 1 Einheit ng/mL, **Ni** 1 Einheit 40 ng/ml, **Fe** 1 Einheit 200 ng/mL

**Zn** 1 Einheit 100 ng/mL

Aufarbeitungsmedium 1 mit EDTA

Intakte Peroxisomen wandern infolge ihrer höheren Dichte tiefer in den Gradienten als intakte Mitochondrien [264]. Der Vergleich der Organellen- und Schwermetallverteilung im Gradienten zeigt, dass für Sonnenblumenkotyledonen (Abbildung 25) im Bereich der Fraktion 7 und 10 zwei Peaks für Nickel, Zink bzw. für Zink, Eisen und Cadmium auftraten. Für Kotyledonen von Rapskeimlingen (Abbildung 26) trat im Bereich von Fraktion 11 ein Peak für Nickel, Cadmium und Zink auf. Es ist anzunehmen, dass sich unter dem breiten „Peak“ der Verteilung des Leitenzyms für Peroxisomen (Katalase) verschiedene „Populationen“ von Peroxisomen und gegebenenfalls anderer zellulärer Bestandteile verbergen, die für die Schwermetallpeaks verantwortlich sind. Allerdings ist auch bei der Interpretation dieser Ergebnisse zu beachten, dass das verwendete Aufarbeitungsmedium EDTA enthält, welches als starker Komplexbildner die untersuchten Schwermetalle aus den Bindungsformen lösen kann.

In weiteren Experimenten wurde, aus den zuvor genannten Gründen, auf den Einsatz von EDTA auch bei der Isolierung von Peroxisomen und Mitochondrien verzichtet. Abbildung 27 zeigt exemplarisch für Kotyledonen von Raps die Ergebnisse dieser Untersuchungen.



**Abb. 27: Verteilung von Schwermetallen im Gradienten zur Isolierung von Mitochondrien und Peroxisomen aus Kotyledonen von fünf Tage alten Rapskeimlingen.**

**Mitochondrien:** Cytochrom c-Oxidaseaktivität  $\Delta E/\text{min}$  bei 550 nm,

**Peroxisomen:** Katalaseaktivität  $\Delta E/\text{min}$  bei 230 nm,

**Cd** 1 Einheit ng/mL, **Cu** 1 Einheit 125 ng/mL, **Ni** 1 Einheit 20 ng/mL,

**Fe** 1 Einheit 200 ng/mL, **Zn** 1 Einheit 100 ng/mL.

Aufarbeitungsmedium 2 ohne EDTA

Die vorgenommenen Veränderungen im Aufarbeitungsmedium haben auf die Ausbeute an intakten Mitochondrien ebenso wie auf die Verteilung der Schwermetalle im Gradienten einen beträchtlichen Einfluss. Dagegen scheint



dieses Aufarbeitungsmedium für die Isolierung von Peroxisomen besser geeignet zu sein, weil der Anteil an intakten Peroxisomen sehr hoch ist.

Die Schwermetalle wandern bei dieser Methode zu einem großen Teil zu Zonen höchster Dichte (Fraktion 3). Als Bindungspartner kommen für die Schwermetalle in Fraktion 3 Zellwandbestandteile und Proteinkörper (die Helianthinin enthalten) infrage [322].

Auffällig ist zudem, dass die Peaks für Cadmium, Eisen, Nickel und Zink in Fraktion 9 in etwa deckungsgleich zu **Peroxisomen** sind. In der Literatur ist beschrieben, dass Peroxisomen u.a. mit Proteinkörpern oder deren Bestandteilen verunreinigt sein können [322]. Diese Proteinkörper könnten daher die eigentlichen Schwermetallpools in Fraktion 9 sein. Für Eisen und Zink ist dies unwahrscheinlich, weil Peroxisomen Eisen in der Katalase und Zink in der Superoxid-Dismutase enthalten. Die Maxima in der Schwermetallverteilung von Eisen und Zink in Fraktion 9 können daher den Peroxisomen zugeordnet werden. Cadmium und Nickel sind im Schwermetallprofil deckungsgleich mit Eisen und Zink.

Diese Ergebnisse sind Anhaltspunkte dafür, dass Peroxisomen einen intrazellulären Teilpool für Cadmium und Nickel darstellen. In welcher Form diese Elemente vorliegen kann mit der in einem Gradienten enthaltenen Menge nicht untersucht werden. Das „Poolen“ vieler Gradienten ist dafür erforderlich.

Die intakten Mitochondrien sind unter den gewählten Bedingungen über einen weiten Dichtebereich verteilt. Es deutet sich an, dass die Mitochondrien mit anderen Bestandteilen des Homogenates z.B. "Microsomen" oder Lipidkörpern assoziiert sind [322]. Dennoch sind für Cadmium, Nickel, Eisen und Zink Maxima in den Fraktionen 14 und 15 festzustellen, die Mitochondrien zugeordnet werden können.

## 5 Zwischenfazit

Das Ziel dieser Arbeit ist, Unterschiede in der Aufnahme und Verteilung von Schwermetallen in Sonnenblumen und Rapspflanzen zu erkennen. Im Vordergrund dieser Untersuchungen stehen die Schwermetalle Cadmium und Nickel, weil der durchschnittliche Cadmium- und Nickelgehalt in Sonnenblumenkernen etwa zehn- bzw. fünfmal höher ist als in Rapssamen. Die bisherigen Ergebnisse zur Schwermetallverteilung in Sonnenblumen- und Rapspflanzen ergaben einige Besonderheiten, die mögliche Erklärungsansätze liefern können:

### Ölpflanzen aus landwirtschaftlicher Praxis

- Der **Cadmium**gehalt ist in Rapssamen um den Faktor sechs niedriger als in den übrigen Pflanzenteilen (Wurzel, Stängel, Blätter, Schotenklappen). Die Rapssamen sind in den Rapsschoten in eine Plazenta eingebettet, die eine physiologische Barriere für Cadmium darstellen könnte. In Sonnenblumen wurden keine Anzeichen für eine Barriere gefunden.
- Die **Nickel**gehalte in Wurzeln und Saaten von Sonnenblumen liegen in ähnlicher Größenordnung (4–5 mg/kg TS Unterfranken bzw. 7–13 mg/kg TS Vinsebeck). Bei Rapspflanzen ist der Nickelgehalt in Rapswurzeln mit 4 mg/kgTS um den Faktor fünf bis zehnmal höher als in den Blättern von Rapspflanzen (0,69 mg/kg TS) bzw. Rapssamen (~0,4 mg/kg TS). Im Gegensatz zu Sonnenblumen existiert für Nickel in Rapspflanzen möglicherweise eine physiologische Barriere im Übergang vom Wurzelbereich zum Rapsstängel.
- Der Cadmium-, Nickel- und Zinkgehalt ist in geschälten Sonnenblumenkernen doppelt so hoch, wie in den Schalen. Es ist daher zu vermuten, dass die höheren Cadmiumgehalte in den Sonnenblumenkernen wie bei Erdnuss, Weizen und Linsen auf einen Cadmiumtransport über das Phloem zurückzuführen sind.
- Der Eisengehalt in Sonnenblumen- und Rapspflanzen ist in den Wurzeln um den Faktor sechs bis zehnmal höher als in den oberirdischen Pflanzenteilen.

### Ölpflanzen aus Hydrokultur

- Sonnenblumen- und Rapspflanzen zeigen eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber Cadmiumstress. Bei Cadmiumkonzentrationen über 1 µmol/L sind für beide Ölpflanzen deutliche Einschränkungen des Pflanzenwachstums festzustellen. Zudem senkt Cadmium den Chlorophyllgehalt der Blätter (Chlorose).
- Durch Dotierung der Nährlösung mit Cadmium steigen bei beiden Ölpflanzen sowohl die Cadmium-Gehalte als auch die Zink-Gehalte in den Wurzeln und im Xylemsaft.
- Abhängig von den verwendeten Aufarbeitungsmedien werden neben Eisen und Zink, die in Form von Katalase bzw. Superoxid-Dismutase in Peroxisomen natürliche Pools bilden, auch Cadmium und Nickel nachgewiesen.

## 6 Schwermetall-Bindungsformen in Sonnenblumen und Raps

Die bisherigen Ergebnisse der Schwermetallgehalte in Ölpflanzenproben führten zu der Annahme, dass im Gegensatz zu Sonnenblumen Rapspflanzen über physiologische Barrieren verfügen, welche für die Unterschiede der Cadmium- und Nickelgehalte verantwortlich sein könnten. Wie in Kapitel 1.5 beschrieben, sind für Aussagen über die Bioverfügbarkeit und die biologische Wirkungsweise von Schwermetallen in Pflanzen Kenntnisse über Bindungsformen notwendig, die für Sonnenblumen und Raps bisher nur gering sind (vgl. 1.7). Im weiteren Verlauf der Untersuchungen werden daher die Bindungsformen von Cadmium, Kupfer, Nickel und Zink aus Sonnenblumen und Raps extrahiert und analysiert. Im Einzelnen soll aufgeklärt werden,

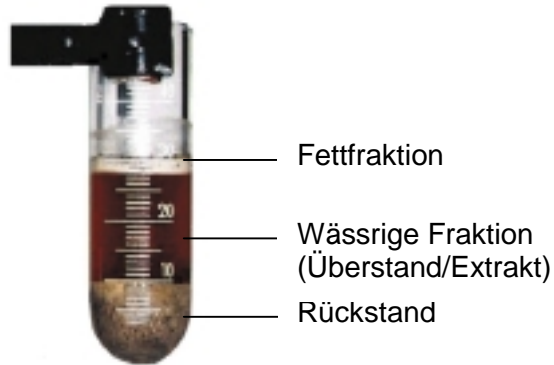
- ob sich die Cadmium-, Kupfer-, Nickel- und Zink-bindenden Substanzen in den vegetativen und generativen Pflanzenteilen von Sonnenblumen bzw. Raps unterscheiden. Dabei ist zu klären, ob Phytochelatine in Raps- und Sonnenblumenpflanzen eine Rolle bei der Komplexbildung dieser Schwermetalle spielen,
- ob Schutz- und Toleranz-Mechanismen, wie z.B. Immobilisierung und Komplexbildung in Raps- und Sonnenblumenpflanzen von Bedeutung sind (vgl. Kapitel 1.6).

### Untersuchungsmethodik

Der Erhalt der Bindungsformen (vgl. 1.8) stellt die entscheidende Voraussetzung der Charakterisierung nativer Schwermetallbindungsformen dar [26, 269, 270]. Die Verwendung von Tris-HCl (pH 8,0; 0,05 mol/L) als Extraktionspuffer (vgl. 1.8) und die gewählten Extraktionsbedingungen (vgl. 11.2) sollen gewährleisten, dass bei der Extraktion die Denaturierung der ursprünglichen Bindungsformen vermieden wird. Die Trennung der nativen Schwermetall-Bindungsformen erfolgt mit der Gelfiltrationschromatographie (GFC) in Kombination mit atomspektrometrischen Verfahren (vgl. 1.8, 11.3). Die Leistungsfähigkeit des verwendeten Puffersystems sowie der gewählten Extraktions- und Elutionsbedingungen wurden im Rahmen einer Diplomarbeit überprüft [278]. Schon durch einmalige Extraktion werden die Hauptanteile der Schwermetalle aus Sonnenblumenkernen und Rapssamen extrahiert. Der Einsatz eines Schutzgases (Stickstoff) hat auf die Extrahierbarkeit von Cadmium, Nickel und Zink aus Sonnenblumenkernen und Rapssamen sowie die Schwermetallelutionsprofile bei der Gelchromatographie keinen Einfluss. Dagegen zeigte sich, dass eine Eiskühlung der Proben bei allen Arbeitsschritten (Homogenisierung, Zentrifugation, Gelfiltration) unbedingt zu gewährleisten ist. Die Extraktion bei Raumtemperatur führte zum Nachweis von Cadmium- und Zink-bindenden Substanzen mit deutlich niedrigeren Molmassen bei gleichzeitig reduzierter Extrahierbarkeit. Es ist zu vermuten, dass die nativen Bindungsformen durch den Einfluss höherer Temperaturen zerstört werden [323].

Nachfolgend soll die Extraktion von Schwermetall-bindenden Substanzen aus Ölsaaten kurz vorgestellt werden (vgl. 11.2):

Das Probenmaterial wird mit einem dreifachen Überschuss an Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L) versetzt und unter Eiskühlung mit einem Ultra-



Turrax homogenisiert. Das Homogenat wird zentrifugiert und die wässrige Fraktion für die GFC verwendet. Der Zentrifugationsrückstand wird, ebenso wie die Fettfraktion, nach Mikrowellen-druckaufschluss auf den Schwermetallgehalt untersucht. In einem Aliquot der wässrigen Fraktion werden ebenfalls die Schwermetallgehalte bestimmt (Schwermetallbilanzierung).

**Abb 28: Zentrifugationsfraktionen von Ölsaatenextrakten**

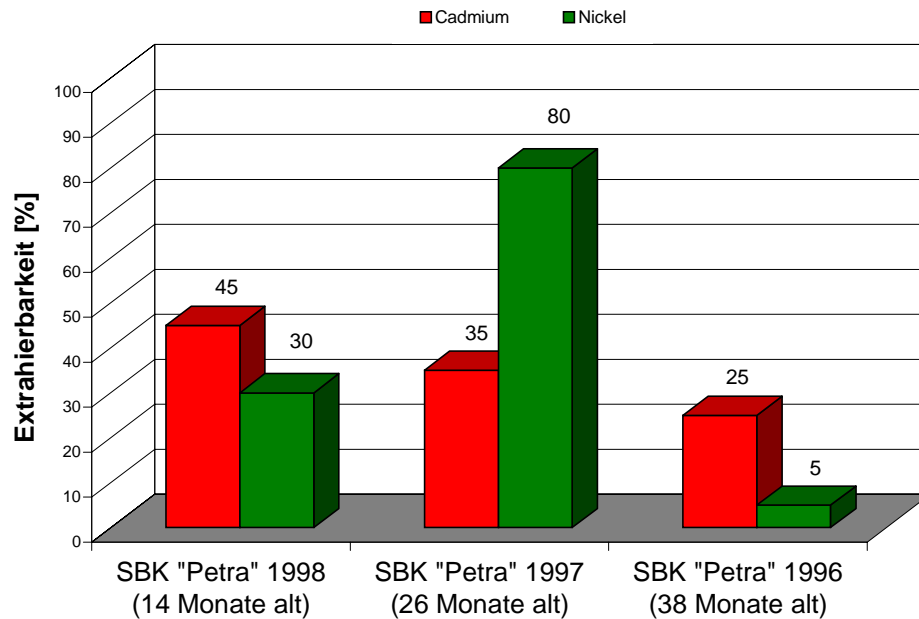
## 6.1 Sonnenblumenkernextrakte

Es wurden ausgereifte Sonnenblumenkerne der Sorte „Petra“ der Ernten 1996-98 sowie die nicht ausgereiften Sonnenblumenkerne der Probenahmen in Unterfranken (1998) und Vinsebeck (1999) untersucht. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen sind die Sonnenblumenkerne der Sorte „Petra“ 14 bis 38 Monate alt. In der Zwischenzeit sind diese Proben bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss in Glasgefäßen gelagert worden. Die Sonnenblumenkerne der Probenahmen in Unterfranken sowie in Vinsebeck sind zum Untersuchungszeitpunkt etwa 4 Wochen alt und werden bei - 80°C aufbewahrt.

**Tab. 15: Durchschnittliche Schwermetallverteilung auf die Zentrifugationsfraktionen von Sonnenblumenkernextrakten**

Fraktion	Cadmium	Kupfer	Nickel [%]	Zink	Eisen
<b>Fett</b>	< 10	< 5	< 5	<10	15
<b>Wässrige Fraktion</b>	25 - 45	65	5 - 80	20	10
<b>Rückstand</b>	50 - 70	30	15 - 70	70	75

Mit dem Tris-Puffer werden aus Sonnenblumenkernen 65 % des Kupfers, 20 % des Zinks und 10 % des Eisens extrahiert. Cadmium ist zu 25-45 % und Nickel zu 5-80 % aus Sonnenblumenkernen extrahierbar. Auffällig ist, dass für Cadmium die Extrahierbarkeit bei den nicht ausgereiften Sonnenblumenkernen sowie den Sonnenblumenkernen der Sorte „Petra“ (Ernte 1998) mit 45 % am höchsten ist.



**Abb. 29: Extrahierbarkeit von Cadmium und Nickel aus Sonnenblumenkernen der Sorte „Petra“ in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer**

Abbildung 29 zeigt, dass der Anteil des aus Sonnenblumenkernen extrahierbaren Cadmiums in Abhängigkeit vom Alter der untersuchten Probe von 45 % für Sonnenblumenkerne der Ernte 1998 auf 25 % für die Proben der Ernte 1996 sinkt. Für Nickel ist keine eindeutige Tendenz zu erkennen. Nickel ist aus der ältesten Probe (1996) nahezu nicht extrahierbar. Aus den Sonnenblumenkernen der Ernte 1998 lässt sich Nickel zu etwa 30 % extrahieren. Demgegenüber wurde für Sonnenblumenkerne von 1997 für Nickel eine Extrahierbarkeit von 80 % festgestellt.

Die beobachteten Unterschiede in der Extrahierbarkeit dieser Schwermetalle könnten u.a. folgende Ursachen haben:

1. Cadmium und Nickel sind in den geernteten Pflanzen möglicherweise an Substanzen gebunden, die während der **Lagerung** durch den Einfluss von Luftsauerstoff zu höheren Molmassen aggregieren. Denkbar ist, dass sich thiolhaltige Schwermetall-bindende Substanzen über intermolekular gebildete Disulfidbrücken [225, 271] zu Molekülen mit höherer Molmasse vereinigen. Die aggregierten Schwermetall-Bindungsformen könnten eine schlechtere Wasserlöslichkeit im Vergleich zu nicht-aggregierten Bindungsformen aufweisen. Der Zusatz eines milden Reduktionsmittels zum Extraktionsmedium sollte diesen Einfluss erkennbar machen (vgl. 6.3).
2. Es ist auch möglich, dass während der **Extraktion** eine Aggregation der Schwermetall-Bindungsformen durch den in die Extraktionslösung eingetragenen Sauerstoff erfolgt (vgl. 1.8). Im Rahmen einer dem Projekt angegliederten Diplomarbeit [323] wurde festgestellt, dass der Einsatz von Stickstoff als Schutzgas die Extrahierbarkeit der untersuchten Schwermetalle aus Sonnenblumenkernen nicht beeinflusst. Der Einfluss des Luftsauerstoffes bei der Extraktion der Schwermetall-Bindungsformen ist daher als gering einzuschätzen.

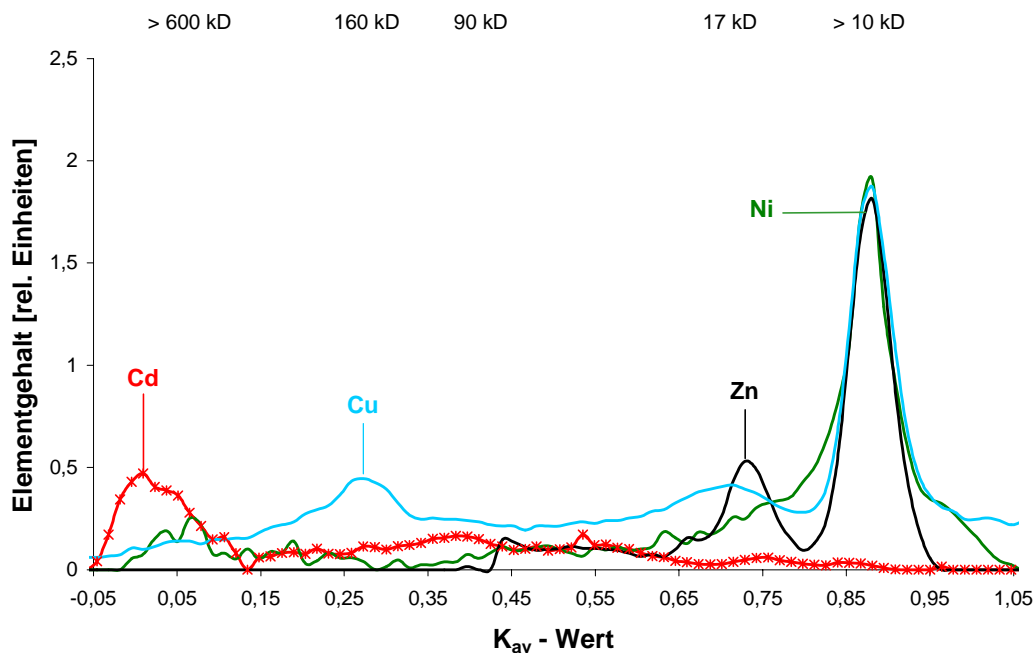
Die Extrahierbarkeit der untersuchten Schwermetalle aus Sonnenblumenkernen hängt in hohem Maße von der Bindungsform der Schwermetalle ab. Die wasserlöslichen Schwermetall-bindenden Komponenten sind möglicherweise Proteine, Peptide oder organische Säuren (vgl. 1.6). Für die nicht in Lösung befindlichen Schwermetallanteile ist eine Bindung an hochmolekulare Zellwandbestandteile, aber auch eine Komplexbildung durch lipophile Pflanzeninhaltsstoffe denkbar.

### Gelchromatographische Auftrennung

Die löslichen Cadmium-, Nickel-, Kupfer- und Zink-bindenden Substanzen im Extrakt (Wässrige Fraktion der Zentrifugation) werden mit der Gelfiltration entsprechend ihrer Molekülgröße getrennt. Die verwendeten Gelfiltrationsmedien sind im Experimentellen Teil beschrieben (vgl. 11.3). Der Gesamt-Trennbereich der verwendeten Gele umfasst einen Molmassenbereich von 0,1 bis 600 kD.

Eisen wird in diese Untersuchungen nicht mit einbezogen, weil der pH-Wert der Pufferlösung 8,0 beträgt, wobei Eisen-(III)-salze ausgefällt werden.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der ermittelten Schwermetall-Elutionsprofile mit den Daten publizierter Untersuchungen zu gewährleisten, wird in dieser Arbeit das Elutionsvolumen in Form des von den Säulendimensionen unabhängigen  $K_{av}$ -Wertes dargestellt. Das Eluat wird in Fraktionen von 1 mL aufgefangen (vgl. Abbildung 30). Die Definition des  $K_{av}$ -Wertes (11.3) sowie die Nachweisgrenzen für die analysierten Schwermetalle (11.7) sind im Experimentellen Teil aufgeführt. Dort wird ebenfalls die Kalibration der verwendeten Chromatographiesäulen mit zertifizierten Proteinstandards bekannter Molmasse beschrieben (11.3).



**Abb. 30: Sonnenblumenkerne (Sorte „Petra“; 1996): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**

**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 150 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 75 ng/mL)

**Zn** (1 Einheit 200 ng/mL);

Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl (pH 8,0; 0,05 mol/L); Superdex S200.

Fraktionsgröße 1 mL; die Fraktionen sind im Cadmium-Elutionsprofil markiert.

Tab. 16: **Sonnenblumenkerne: GFC – Fraktionierungsbereiche an Superdex S200: prozentuale Verteilung der Schwermetalle (s. Abb. 30)**

	Fraktionierungsbereich / Molmasse [kD]				
	> 600	300	90	17	< 10
	[%]				
<b>Cadmium</b>	60	<----- 40 ----->			3
<b>Kupfer</b>	5	<----- 50 ----->			45
<b>Nickel</b>	7		1	10	65
<b>Zink</b>				20	65

Abbildung 30 zeigt die Elutionsprofile von Cadmium, Kupfer, Nickel und Zink für Sonnenblumenkernextrakte (Ernte 1996) und Tabelle 16 die prozentuale Verteilung dieser Metalle auf ausgewählte Molmassenbereiche. Danach ist **Cadmium** hauptsächlich (60 %) an hochmolekulare Substanzen (> 600 kD) gebunden. Möglicherweise handelt es sich bei den hochmolekularen Cadmium-Bindungsformen um Globuline (z.B. ein 15-S-Globulin) [226, 227]. **Nickel** und **Zink** eluieren überwiegend bei einer Molmasse von 17 kD und im Totalvolumen der Säule (< 10 kD). Die im Totalvolumen fraktionierenden Nickel- und Zink-bindenden Substanzen wurden an Superdex Peptide (Trennbereich 7-0,1 kD; Abbildung A1) weiter aufgetrennt. Nickel und Zink eluieren dabei wiederum im Totalvolumen (< 0,1 kD) und könnten an organische Säuren wie Zitronensäure, Äpfelsäure oder Aminosäuren gebunden sein (vgl. 1.5.4.1).

Die Hälfte des extrahierbaren Kupfers ist über einen weiten Molmassenbereich verteilt (15-300 kD), mit Maxima bei 17 kD und 160 kD. Niedermolekulare Kupferspezies eluieren im Bereich von 2,5 kD sowie im Totalvolumen (< 0,1 kD).

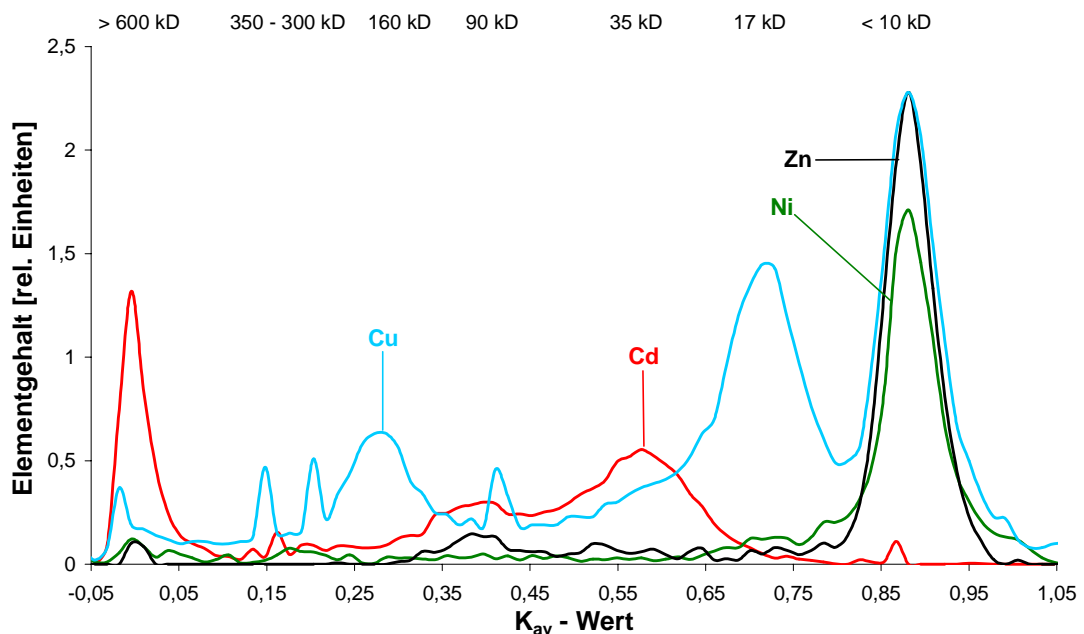


Abb. 31: **Sonnenblumenkerne (Sorte „Petra“; 1997): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**

**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 100 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 100 ng/mL)  
**Zn** (1 Einheit 300 ng/mL); Extraktionsbedingungen vgl. Abb. 30.

Tab. 17: **Sonnenblumenkerne: GFC-Fraktionierbereiche an Superdex S200: prozentuale Verteilung der Schwermetalle (s. Abb. 31)**

	Fraktionierbereich / Molmasse [kD]					
	> 600	160	90	35	17	< 10
	[%]					
<b>Cadmium</b>	35	←-----60----->				1
<b>Kupfer</b>	4	10	5	10	25	35
<b>Nickel</b>	4	2	2	3	7	75
<b>Zink</b>	1	1	5	5	3	80

Das Elutionsprofil für Sonnenblumenkerne der Ernte 1997 und Tabelle 17 veranschaulichen, dass **Cadmium** zu 35 % an hochmolekulare Substanzen (> 600 kD) gebunden ist. Dieser Anteil ist somit deutlich geringer als in den Sonnenblumenkernen der Ernte 1996 (Abbildung 30). Zudem sind 60 % des Cadmiums an Substanzen im Bereich von 160-20 kD gebunden. **Nickel** und **Zink** finden sich hauptsächlich in niedermolekularen Fraktionen (< 0,1 kD, Abbildung A1 im Anhang).

Die extrahierbaren **Kupfer**-bindenden Substanzen sind über einen weiten Molmassenbereich verteilt. 25 % des Kupfers sind an Substanzen mit der mittleren Molmasse von 17 kD gebunden. 35 % des Kupfers erscheinen im Totalvolumen (< 10 kD), wobei an Superdex Peptide Kupfer-bindende Substanzen der mittleren Molmasse 2,5 kD fraktionieren (Abbildung A 2).

Für Sonnenblumenkerne der Ernte 1998 (Abbildung A3) ist festzustellen, dass lediglich 25 % des Cadmiums hochmolekular (> 600 kD) gebunden sind. 70 % des Cadmiums sind über einen weiten Molmassenbereich (20-200 kD) verteilt mit Maxima bei 90 kD und 40 kD. Die Untersuchungen an Sonnenblumenkernen zeigen, dass die abnehmende Extrahierbarkeit von Cadmium (Abbildung 29) mit einer Zunahme des Anteils an hochmolekularen Cadmium-bindenden Substanzen korreliert (Tabelle 16, 17).

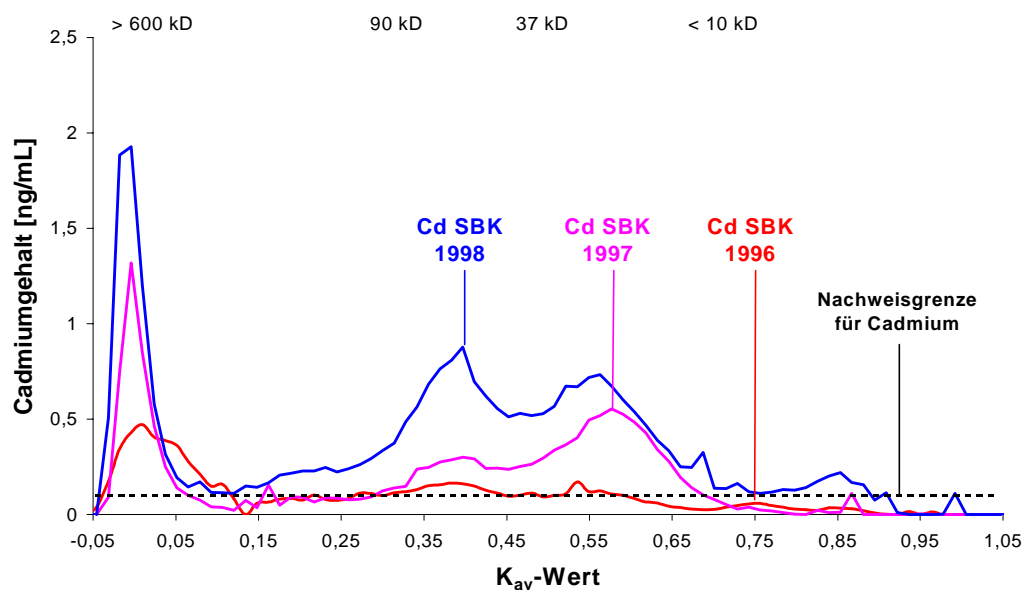
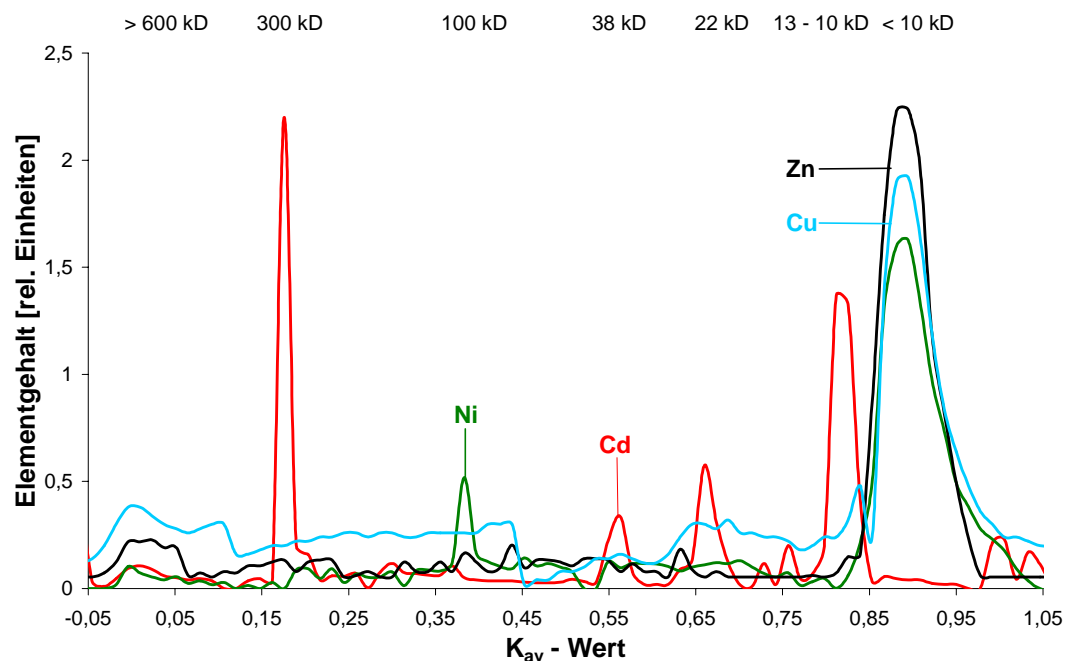


Abb. 32: **Sonnenblumenkerne (Sorte „Petra“; 1996 - 98): Vergleich der GFC-Elutionsprofile der wässrigen Fraktionen von ausgereiften Sonnenblumenkernen der Ernten 1996 - 98 für Cadmium**



Offenbar werden in Sonnenblumenkernen die Molmassen der Cadmium-Bindungsformen mit zunehmendem Alter der Probe zu höheren Molmassen verschoben (Abbildung 32). Entsprechend sinkt die Extrahierbarkeit des Cadmiums, was auf eine Aggregation der Cadmium-bindenden Substanzen während der Lagerung hindeutet.

BRÜGGEMANN ET AL. zeigten, dass die Molmassen der Cadmium-bindenden Komponenten aus Weizenkörnern ebenfalls vom Alter der Probe abhängen [326]. In den jüngsten Körnern (1 Jahr) war Cadmium fast vollständig an Substanzen mit der Molmasse von 15 kD gebunden, während es nach fünf Jahren nur noch 50 % waren. Allerdings wurden zusätzliche Cadmium-Bindungsformen bei 30, 60 und 100 kD nachgewiesen. In acht Jahre alten Körnern waren die 15 kD-Komponenten vollkommen verschwunden und die Hälfte des Cadmiums eluierte bei Molmassen > 100 kD. Die Autoren vermuten, dass es sich bei den höhermolekularen Substanzen um Aggregate handelt, wobei die Aggregation über oxidativ gebildete intermolekulare Disulfidbrücken erfolgt. Wurde die Extraktion bei acht Jahre alten Weizenkörnern unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt, fraktionierten 50 % des Cadmiums bei 15 kD und 30 % bei 7 kD [276, 277, 324].



**Abb. 33: Sonnenblumenkerne (Unterfranken; 1998): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**

**Cd** (1 Einheit 3 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 50 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 50 ng/mL), **Zn** (1 Einheit 150 ng/mL); Extraktionsbedingungen vgl. Abb. 30.

Kupfer, Nickel und Zink sind in nicht-ausgereiften Sonnenblumenkernen an niedermolekulare Substanzen (< 0,1 kD) gebunden. **Nickel** fraktioniert außerdem bei 100 kD und 2,5 kD (Abbildung A4). Im Gegensatz zu den ausgereiften Sonnenblumenkernen sind aus nicht-ausgereiften Kernen niedermolekulare **Cadmium**-bindende Komponenten extrahierbar (38 kD, 22 kD, 13 kD, 0,5 kD), was belegt, dass die Cadmium-Bindungsformen mit zunehmendem Reifestadium der Sonnenblumenkerne zu höheren Molmassen aggregieren.

Auffällig ist in Abbildung 33 der **Cadmium**-Peak bei einer Molmasse von etwa 300 kD. In der Literatur finden sich bisher keine Untersuchungen zu Cadmiumspezies in Sonnenblumenkernen, jedoch ist für Sojabohnen beschrieben, dass Cadmium, Kupfer und Zink an höhermolekulare Substanzen (> 100 kD) gebunden sind. Nach dem Zusatz von Mercaptoethanol zum Extraktions- und Elutionsmittel (Tris-HCl-Puffer; pH 7,4; 0,01 mol/L) eluieren Cadmium, Kupfer und Zink nicht mehr im Ausschlussvolumen, sondern in einer Fraktion von etwa 10 kD. Die Autoren postulieren, dass die hochmolekularen Cadmium-, Kupfer- und Zinkbindenden Substanzen unter dem Einfluss von Mercaptoethanol in niedermolekulare Substanzen dissoziieren [325]. Zudem ist für Sojabohnen beschrieben, dass das Speicherprotein Glycinin Cadmium bindet [325, 326]. Glycinin ist ein 12-S-Globulin mit einer Molmasse von 330 kD. Unter dem Einfluss von Mercaptoethanol dissoziiert es in Untereinheiten mit Molmassen von 19 kD, 37 kD und 42 kD [225]. Diese Untersuchungen an Sojabohnen zeigen, dass Speicherproteine in Ölsaaten Cadmium binden. Für Sonnenblumen aber auch für Raps könnte dies bedeuten, dass auch Speicherproteine, wie z.B. das 11-S-Globulin Helianthinin (M = 300-350 kD), Cadmium koordinieren (vgl. Abbildung 33). Der Zusatz eines milden Reduktionsmittels wie Mercaptoethanol zum Extraktions- und Elutionspuffer könnte daher erste Hinweise liefern, ob Speicherproteine auch bei Sonnenblumenkernen und Rapssamen als Cadmium-Bindungsformen infrage kommen (vgl. 6.3 und 6.4)

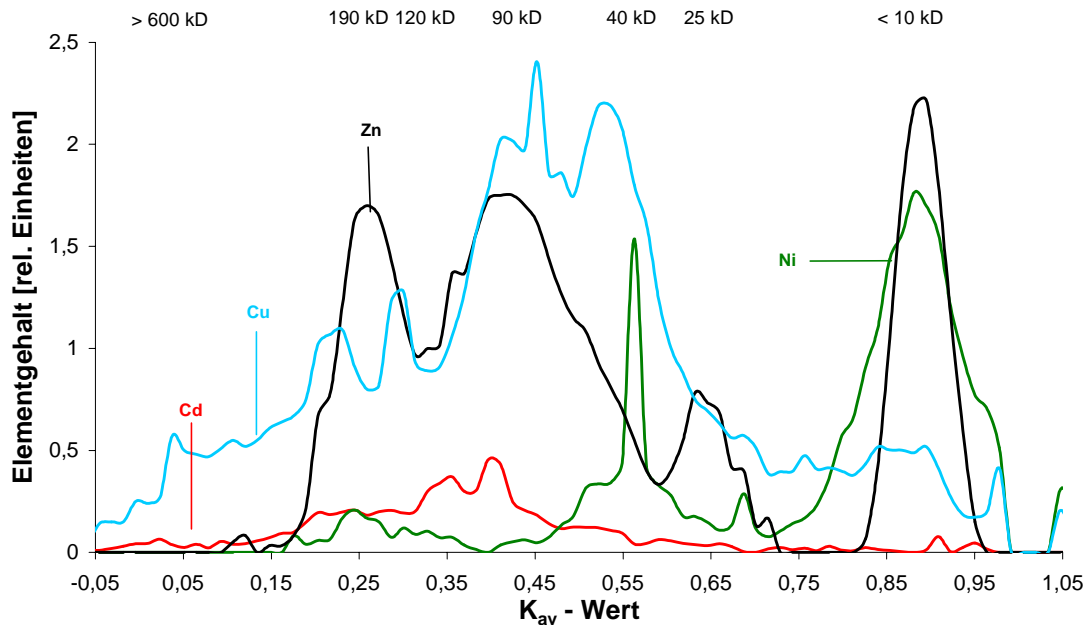
## 6.2 Rapssamenextrakte

Für diese Untersuchungen werden Rapssamen der „BEE“ 1996 sowie ein weiteres Rapsmischmuster eingesetzt (Tabelle 6). Die untersuchten Proben sind zum Zeitpunkt der Untersuchungen 24 bis 48 Monate alt. Während der Lagerung wurden die Rapssamen in Kunststoffgefäßen bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss aufbewahrt.

**Tab. 18: Durchschnittliche Schwermetallverteilung auf die Fraktionen von Rapssamenextrakten**

Fraktion	Cadmium	Kupfer	Nickel	Zink	Eisen
			[%]		
Fett	10	7	6	10	10
Überstand	25	25	25	15	8
Rückstand	65	65	60	70	75

Wie Tabelle 18 zeigt, sind 25 % des Cadmiums, Kupfers und Nickels sowie 15 % des Zinks aus reifen Rapssamen extrahierbar. Im Vergleich zu Sonnenblumenkernen sind für Cadmium und Kupfer aus Rapssamen deutlich geringere Werte ermittelt worden, weil diese Schwermetalle in Rapssamen vermutlich zu höheren Anteilen an unlösliche Zellstrukturen (Zellwände, Zellmembranen) gebunden sind. Nickel, Zink und Eisen sind aus Rapssamen in gleichem Maße extrahierbar wie aus Sonnenblumenkernen.



**Abb. 34: Rapssamen (BEE 1996): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**

**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 10 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 50 ng/mL)  
**Zn** (1 Einheit 60 ng/mL), Extraktionsbedingungen vgl. Abb. 30.

Abbildung 34 veranschaulicht, dass die Cadmium-, Kupfer- und Zinkbindenden Substanzen in reifen Rapssamen über einen weiten Molmassenbereich (300–20 kD) verteilt sind. Hochmolekulare **Cadmium**-bindende Komponenten (> 600 kD) sind nicht nachweisbar. Ebenso sind im Gegensatz zu Sonnenblumenkernen in Rapssamen keine Cadmium-Bindungsformen mit einer Molmasse von 300 kD zu beobachten. Das in Rapssamen enthaltene Speicherprotein Cruciferin, ein 12-S-Globulin (Molmasse 300–350 kD), kommt daher nicht als Cadmium-bindende Substanz infrage. Gleiches gilt für das 2-S-Globulin Napin (Molmasse 13 kD). **Nickel** und **Zink** sind in Rapssamen an niedermolekulare (< 0,1 kD) aber auch an höhermolekulare Komponenten (Ni: 40 kD; Zn: 300–40 kD, 25 kD) gebunden.

### Zwischenbetrachtung

Die bisherigen Untersuchungen zur Extrahierbarkeit von Cadmium, Kupfer, Nickel und Zink sowie zu deren Bindungsformen in Sonnenblumenkernen und Rapssamen haben weitere Unterschiede zwischen den beiden Ölsaaten aufgezeigt.

- **Cadmium** ist aus Rapssamen nur zu einem geringen Anteil (25 %) extrahierbar. Es ist daher zu vermuten, dass der Anteil des an unlösliche Zellstrukturen (Zellwand, Zellmembran) gebundenen Cadmiums in Rapssamen höher ist als in Sonnenblumenkernen (40–60 %).
- Die Extrahierbarkeit der Cadmium-Bindungsformen aus Sonnenblumenkernen ist von der Lagerungsdauer abhängig. Die geringere Extrahierbarkeit aus älteren Sonnenblumenkernen ist offenbar auf eine Aggregation der Cadmium-bindenden Substanzen zurückzuführen. Ähnliche Beobachtungen werden für Rapssamen nicht gemacht.

- Für Sonnenblumenkerne und Rapssamen deutet sich an, dass **Nickel** zu einem beträchtlichen Teil (bis zu 90 %) an unlösliche Zellstrukturen gebunden ist (vgl. Tabelle 15 und 18). Ferner sind die Molmassen der löslichen Nickel-Bindungsformen aus Sonnenblumenkernen und Rapssamen sehr niedrig ( $< 0,1$  kD).
- **Kupfer** ist aus Sonnenblumenkernen in höherem Maße (60 %) extrahierbar als aus Rapssamen (25 %). Zudem unterscheiden sich die Molmassen der wasserlöslichen Kupfer-Bindungsformen. In Sonnenblumenkernen sind hauptsächlich niedermolekulare (2,5 kD,  $< 0,1$  kD), in Rapssamen dagegen höhermolekulare Kupfer-Bindungsformen mit Molmassen von 200-25 kD zu detektieren.
- Aus Sonnenblumenkernen und Rapssamen ist **Zink** nur zu einem kleinen Anteil (15 %) extrahierbar. Zink ist in beiden Ölsaaten offensichtlich bevorzugt an unlösliche Zellstrukturen gebunden. Die löslichen Zink-Bindungsformen aus Sonnenblumenkernen sind niedermolekulare Substanzen ( $< 0,1$  kD), während in Rapssamen Zink im Molmassenbereich von 200-25 kD fraktioniert.

### 6.3 Sonnenblumenkerne: Extraktion unter reduzierenden Bedingungen

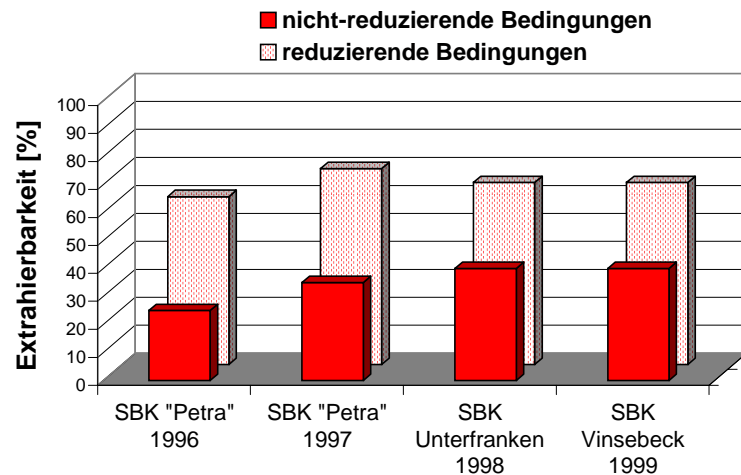
Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, sind die aus Sonnenblumenkernen und Rapssamen extrahierten Cadmium-, Kupfer- und Zink-bindenden Substanzen über einen weiten Molmassenbereich verteilt. Dieses könnte ebenso wie der für Cadmiumspezies festgestellte Alterungseffekt auf eine Aggregation der Schwermetall-Bindungsformen in Sonnenblumenkernen und Rapssamen deuten (vgl. Abbildung 32 und 34). Diese Hypothese soll durch den Einsatz eines milden Reduktionsmittels geprüft werden (vgl. 1.8). In zahlreichen Untersuchungen wird Mercaptoethanol als Disulfidbrücken spaltendes Reagenz verwendet [67, 188, 225, 270, 276, 284, 324, 325]. Für die Extraktionsversuche unter reduzierenden Bedingungen werden die Sonnenblumenkerne der Sorte „Petra“ der Ernten 1996-97 sowie Sonnenblumenkerne der Probenahmen in Unterfranken (1998) und Vinsebeck (1999) eingesetzt.

**Tab. 19: Durchschnittliche Schwermetallverteilung auf die Fraktionen von Sonnenblumenkernextrakten unter reduzierenden Bedingungen**

Fraktion	Cadmium	Kupfer	Nickel [%]	Zink	Eisen
<b>Fett</b>	5	10	15	$< 5$	5
<b>Überstand</b>	<b>65</b>	65	30	20	5
<b>Rückstand</b>	30	25	60	65	90

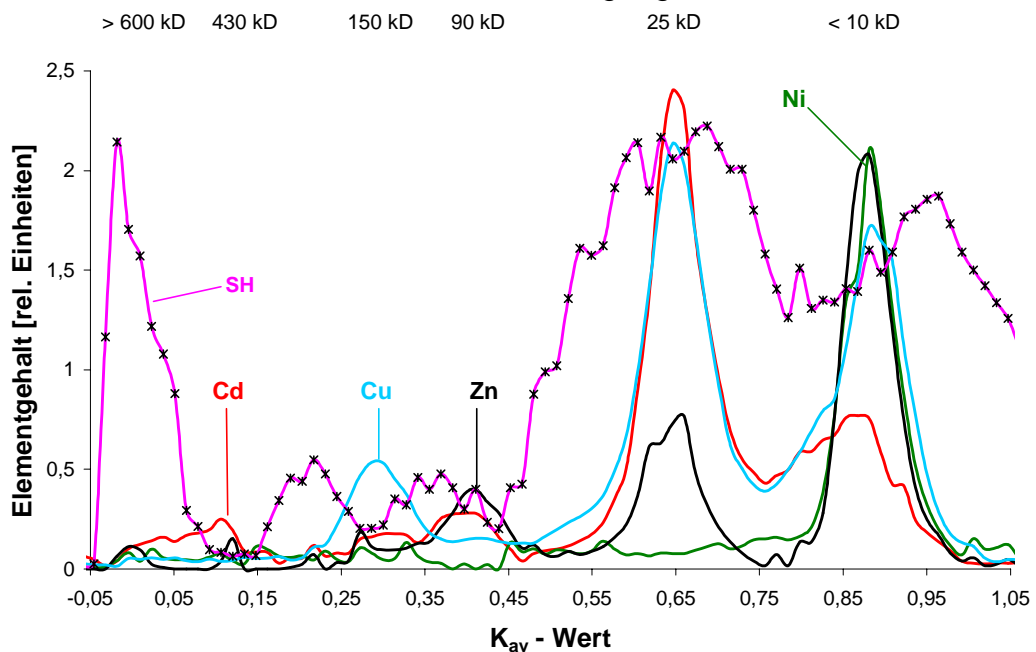
Bei der Extraktion unter reduzierenden Bedingungen werden 65 % des **Cadmiums** und **Kupfers** in die wässrige Fraktion überführt. **Nickel** ist zu etwa 30 %, **Zink** zu 20 % aus Sonnenblumenkernen extrahierbar. Während die Extrahierbarkeit von Kupfer, Zink und Eisen von dem milden Reduktions-

mittel nicht beeinflusst wird, zeigt Abbildung 35, dass ein großer Einfluss auf die Extrahierbarkeit von Cadmium besteht.



**Abb. 35: Einfluss von Mercaptoethanol auf die Extrahierbarkeit von Cadmium aus Sonnenblumenkernen**

Unter nicht-reduzierenden Bedingungen ist Cadmium zu 25-45 % aus Sonnenblumenkernen zu extrahieren (Tabelle 15). Dagegen steigt die Extrahierbarkeit unter reduzierenden Bedingungen auf 60 - 70 %.



**Abb. 36: Sonnenblumenkerne (Sorte „Petra“; 1997): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion unter reduzierenden Bedingungen.**

**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 100 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 50 ng/mL), **Zn** (1 Einheit 125 ng/mL),

**Thiol-Gruppen** (1 Einheit 300 mg/L Cysteiniumchlorid)

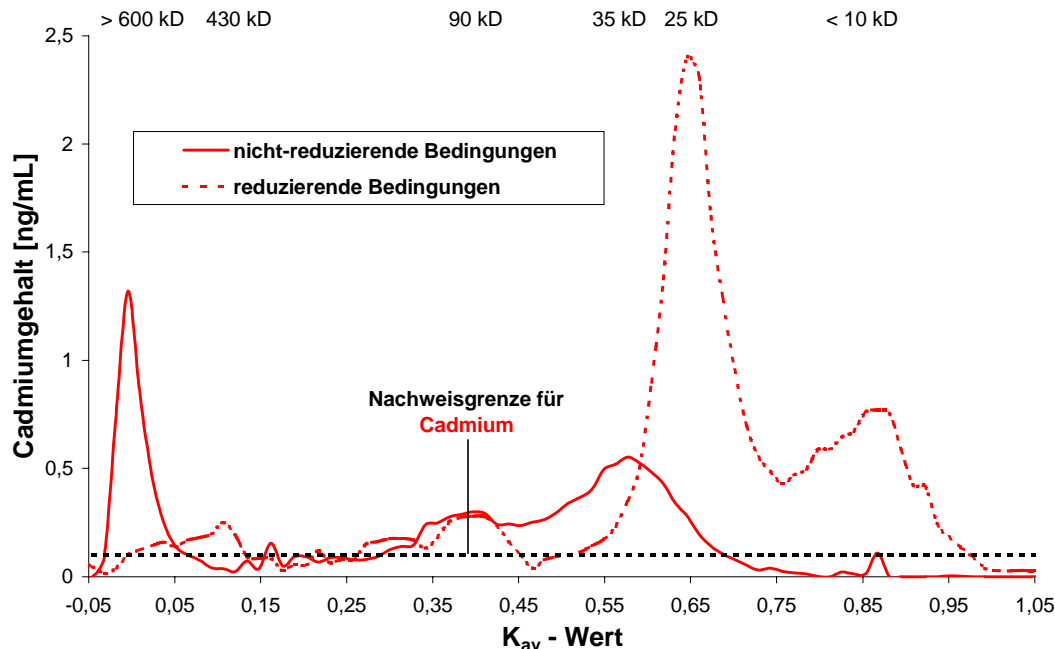
Extraktions-/Elutionspuffer: Tris-HCl (pH 8,0; 0,05 mol/L, 10 mmol/L ME), Superdex S200.

Abbildung 36 veranschaulicht, dass **Cadmium** unter reduzierenden Bedingungen überwiegend (50 %) bei einer Molmasse von 25 kD sowie im Totalvolumen (< 10 kD) eluiert wird. Weitere Cadmium-bindende Substanzen fraktionieren bei 90 und 430 kD. **Nickel** eluiert im Totalvolumen (< 0,1 kD).

**Zink** ist an Substanzen mit der Molmasse von 90 kD, 25 kD, 2,5 kD bzw. < 0,1 kD gebunden. **Kupfer**-bindende Komponenten werden bei 150 kD, 25 kD und im Totalvolumen (2,5 kD; < 0,1 kD) beobachtet.

Weil Thiolgruppen, wie z.B. bei Metallothioneinen, die Koordinierung von Schwermetallen ermöglichen, wurde auch der Thiolgehalt in den Fraktionen der Gelfiltration bestimmt. Abbildung 36 zeigt Maxima des Elutionsprofiles für SH-Gruppen-haltige Komponenten im Ausschlussvolumen (> 600 kD), bei 300 kD, 100 kD, zwischen 50 und 15 kD sowie im Totalvolumen. Das Elutionsprofil für SH-Gruppen zeigt, dass die Cadmium-, Kupfer- bzw. Zink-bindenden Substanzen im Molmassenbereich von 25 kD Thiolgruppen enthalten können.

Nachfolgend wird der Einfluss des Reduktionsmittels auf das Elutionsprofil von Cadmium betrachtet. Auf das Elutionsprofil der Nickel-bindenden Komponenten hat der Zusatz von Mercaptoethanol keinen Einfluss, daher wird auf eine weitere Erörterung verzichtet.



**Abb. 37: Sonnenblumenkerne (Sorte „Petra“, 1997): Vergleich der Elutionsprofile von Cadmium bei der Gelfiltration der wässrigen Fraktion unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen**

Extraktions-/Elutionspuffer: Tris-HCl (pH 8,0; 0,05 mol/L); unter reduzierenden Bedingungen werden 10 mmol/L Mercaptoethanol zugesetzt.

Für Cadmium ist festzustellen, dass bei der Gelfiltration unter reduzierenden Bedingungen keine hochmolekularen Cadmium-bindenden Substanzen (> 600 kD) mehr zu erkennen sind. Dagegen können Cadmium-bindende Substanzen mit der Molmasse von 25 kD und 2,5 kD beobachtet werden, die unter nicht-reduzierenden Extraktions- und Elutionsbedingungen nicht auftreten. Wie in Kapitel 7.1 angedeutet, führt die Zugabe des milden Reduktionsmittels zu einer drastischen Veränderung des Cadmium-Elutionsprofils bei Sonnenblumenkernen. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass das Cadmium-Elutionsprofil für die Sonnenblumenkerne der Ernte 1996 (Sorte „Petra“) mit dem für die Kerne der Ernte 1997 übereinstimmt (vgl. Abbildung A9). Diese Beobachtung ist als Hinweis zu werten, dass die Cadmium-bindenden Substanzen mit zunehmender Lagerungsdauer zu Substanzen

mit höheren Molmassen aggregieren. Zudem sind die höhermolekularen Cadmium-Bindungsformen schlechter löslich (vgl. Tabelle 15, Abbildung 32).

## 6.4 Rapssamen: Extraktion unter reduzierenden Bedingungen

Extraktionsversuche mit Rapssamen unter Zusatz von Mercaptoethanol sollten, wie bereits bei Sonnenblumenkernen, zeigen, ob sich unter reduzierenden Bedingungen die Extrahierbarkeit von Cadmium, Kupfer, Nickel oder Zink verändert. Für diese Untersuchungen werden Rapssamen der „BEE“ 1996 sowie ein weiteres Rapsmischmuster eingesetzt (Tabelle 6)

Tab. 20: Durchschnittliche Schwermetallverteilung auf die Fraktionen von Rapssamenextrakten unter reduzierenden Bedingungen

Fraktion	Cadmium	Kupfer	Nickel	Zink	Eisen
			[%]		
Fett	< 5	< 5	< 10	10	< 5
Überstand	25	25	30	10	< 5
Rückstand	70	70	60	80	85

Allgemein ist festzustellen, dass die Extrahierbarkeit von Cadmium, Kupfer, Nickel, Zink und Eisen aus Rapssamen von der Zugabe des Reduktionsmittels Mercaptoethanol nicht beeinflusst wird. Im Vergleich zu Sonnenblumenkernen ist die Extrahierbarkeit dieser Schwermetalle aus Rapssamen sowohl unter oxidierenden als auch reduzierenden Bedingungen geringer.

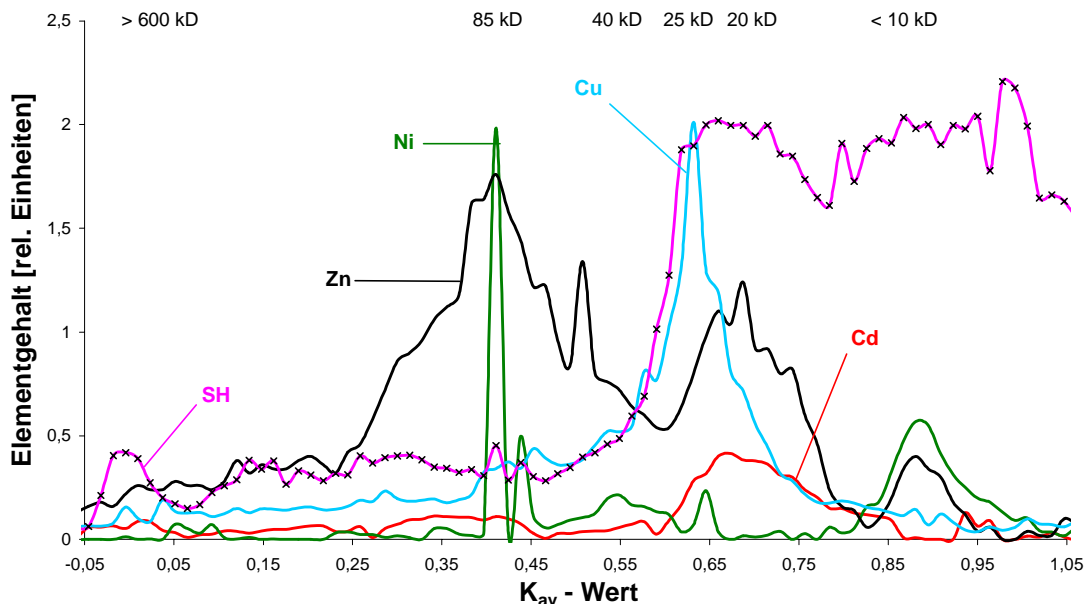


Abb. 38: Rapssamen („BEE“ 1996): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion unter reduzierenden Bedingungen

Cd (1 Einheit 1 ng/mL), Cu (1 Einheit 40 ng/mL), Ni (1 Einheit 75 ng/mL)

Zn (1 Einheit 50 ng/mL),

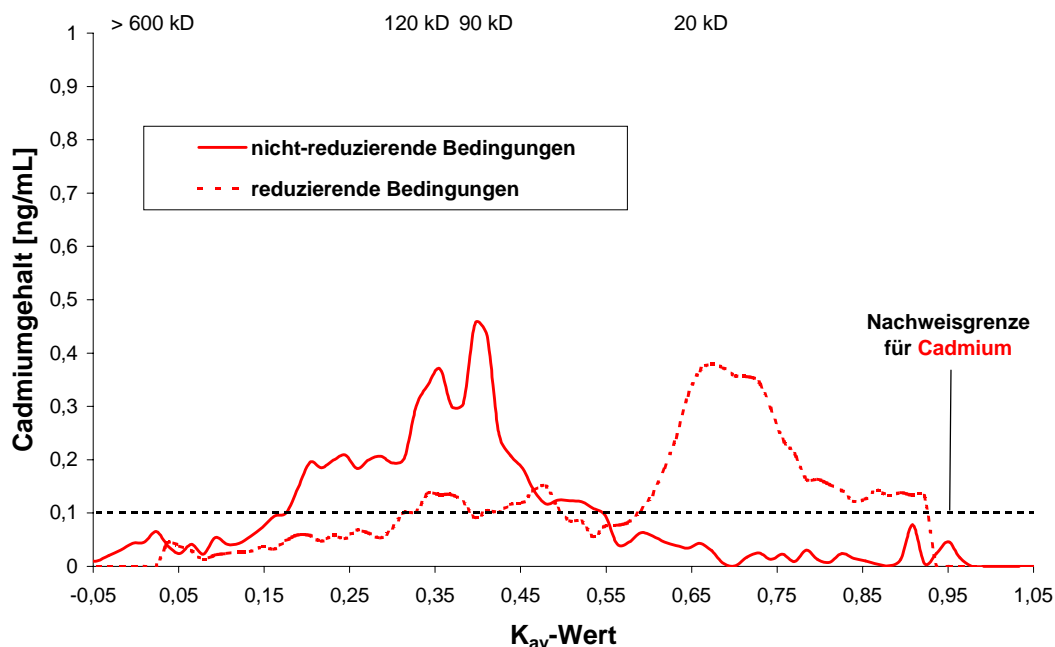
SH-Gruppen (1 Einheit normiert auf 600 mg/L Cysteiniumchlorid)

Extraktionsbedingungen vgl. Abbildung 36.

**Tab. 21: Rapssamen: GFC-Fraktionierbereiche an Superdex S200: prozentuale Verteilung der Schwermetalle (s. Abb. 38)**

	Fraktionierbereich / Molmasse [kD]				
	> 600	200 - 50	40	30 - 15	< 10
	[%]				
<b>Cadmium</b>	5	20		50	
<b>Kupfer</b>		25		45	
<b>Nickel</b>		35	10		40
<b>Zink</b>		50		25	5

Der Vergleich von Abbildung 34 und 38 verdeutlicht, dass auch für Raps-samenextrakte eine drastische Veränderung der Schwermetallelutionsprofile durch Zugabe von Mercaptoethanol zu beobachten ist. Abbildung 39 demonstriert diesen Effekt am Beispiel des Elutionsprofils für Cadmium.



**Abb. 39: Rapssamen (1996): Vergleich der Elutionsprofile von Cadmium bei der Gelfiltration der wässrigen Fraktion unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen**

Extraktionsbedingungen vgl. Abbildung 37.

Wie bei Sonnenblumenkernen werden auch aus Rapssamen unter reduzierenden Bedingungen **Cadmium**-, **Kupfer**- und **Zink**-bindende Substanzen mit einer Molmasse von 20-25 kD extrahiert (vgl. Abbildung 39). Dieser SH-Gruppen-reiche Fraktionierbereich (Abbildung 38) enthält 50 % des Cadmiums, 45 % des Kupfers sowie 25 % des Zinks. Dagegen treten höhermolekulare Komponenten (> 30 kD) mit SH-Gruppen nur in geringem Maße auf. **Nickel** ist in Rapssamen - im Gegensatz zu Sonnenblumenkernen - hauptsächlich an höhermolekulare Substanzen (85 kD bzw. 40 kD) gebunden. Der Hauptanteil des Zinks (50 %) sowie 20 % des Cadmiums und Kupfers ist über einen Fraktionierbereich von 200-50 kD verteilt.



### Zwischenbetrachtung

**Cadmium** ist aus Sonnenblumenkernen in größeren Anteilen (25-45 %) zu extrahieren als aus Rapssamen (25 %). Die Extrahierbarkeit von Cadmium kann bei Sonnenblumenkernen durch die Zugabe von Mercaptoethanol zum Extraktionspuffer auf 65 % gesteigert werden. Bei Rapssamen bewirkt der Zusatz des milden Reduktionsmittels keine Veränderung der Extrahierbarkeit.

In Sonnenblumenkernen ist Cadmium anscheinend in einem hohen Maße (> 65 %) an zum Teil aggregierte lösliche Proteine und Peptide gebunden. Dagegen ist bei **Rapssamen** der Anteil des an lösliche Substanzen gebundenen Cadmiums mit ca. 20 % sehr viel geringer. Dieses kann als Hinweis interpretiert werden, dass Cadmium in Rapssamen zu einem deutlich höheren Anteil (> 70 %) an unlösliche Zellstrukturen gebunden ist als in Sonnenblumenkernen (< 25 %). Dieses würde bedeuten, dass der Anteil an mobilem Cadmium in Rapssamen deutlich geringer ist als in Sonnenblumenkernen (vgl. 1.8). Es ist daher zu klären, ob auch in anderen Grundorganen von Rapspflanzen (Wurzel, Stängel, Blätter) Cadmium bevorzugt an unlösliche Zellstrukturen immobilisiert wird. Falls ja, wäre erklärbar, warum Cadmium in Rapspflanzen zum überwiegenden Anteil in den vegetativen Pflanzenteilen und nicht in den Samen akkumuliert wird.

Für **Nickel** lassen sich keine Unterschiede in der Extrahierbarkeit aus Sonnenblumenkernen und Rapssamen feststellen. Nickel ist in beiden Ölsaaten bevorzugt an niedermolekulare Substanzen - möglicherweise organische Säuren (vgl. 1.6.5) - gebunden.

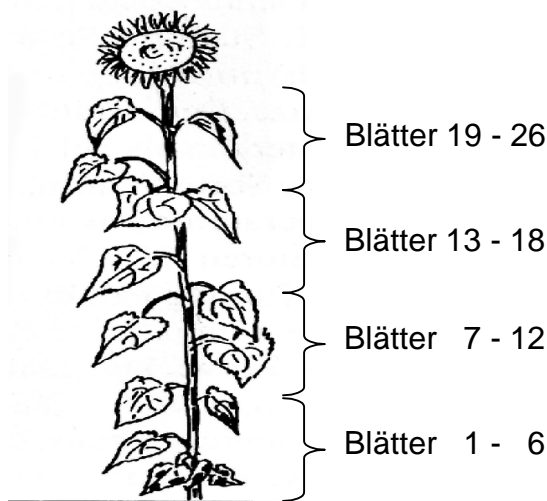
Der Totalgehalt von **Kupfer** ist in Sonnenblumenkernen und Rapssamen zwar ähnlich hoch (Tabelle 1), aber die Extrahierbarkeit ist sehr unterschiedlich. So lassen sich unabhängig vom Zusatz des Reduktionsmittels aus Sonnenblumenkernen 60-70 %, aus Rapssamen dagegen lediglich 25 % des Kupfers extrahieren. Deutliche Unterschiede zeigen sich ebenfalls im gelchromatographischen Verhalten der Kupfer-bindenden Substanzen von Sonnenblumenkernen und Rapssamen:

In Sonnenblumenkernen sind fünf Kupfer-haltige Fraktionen bei 170 kD, 25 kD, 17 kD, 2,5 kD und im Totalvolumen (< 0,1 kD) nachweisbar. Demgegenüber eluieren die Kupfer-bindenden Substanzen aus Rapssamen ausschließlich bei höheren Molmassen (200-25 kD).

Für die **Zink**-bindenden Substanzen zeigen sich ebenfalls Unterschiede. In Sonnenblumenkernen ist Zink hauptsächlich niedermolekular (< 0,1 kD) gebunden. In Rapssamen ist Zink dagegen bevorzugt an Substanzen mit Molmassen von 200-15 kD gebunden.

## 6.5 Sonnenblumenblätterextrakte

Die untersuchten Sonnenblumenblätter stammen von 25 Tage alten Pflanzen der Anzucht in Hydrokultur und von Pflanzen, die während der Reifeperiode direkt vom Feld geerntet wurden (Marktbreit in Unterfranken 1998; Vinsebeck 1999). Die untersuchten Blätter waren grün und wiesen keine vertrockneten Stellen auf. Während die Pflanzen aus Unterfranken in die Pflanzen-



grundorgane Wurzel, Stängel, Blätter und Frucht zerlegt wurden, sind bei den Sonnenblumen aus Vinsebeck (1999) die einzelnen Sprossabschnitte untersucht worden. Dazu wurde der Pflanzenstängel in 4 Teile mit jeweils 6 Blättern zerlegt (Abbildung 40). Es sollen mögliche Unterschiede in den Schwermetallgehalten und Bindungsformen für Cadmium, Nickel, Kupfer, Eisen und Zink in den einzelnen Sprossabschnitten untersucht werden.

**Abb. 40: Unterteilung des Sprosses von Sonnenblumenpflanzen in vier Abschnitte bei der Probenahme in Vinsebeck (1999)**

Für Cadmium, Kupfer, Nickel und Zink konnten in den Blättern entlang der Sprossachse von Sonnenblumen keine signifikanten Unterschiede im Schwermetallgehalt festgestellt werden. Der Eisengehalt in den untersten Blättern (1-6) ist jedoch etwa doppelt so hoch wie in den übrigen Blättern.

**Tab. 22: Durchschnittliche Schwermetallverteilung auf die Fraktionen von Sonnenblumenblätterextrakten**

Fraktion	Cadmium	Kupfer	Nickel [%]	Zink	Eisen
Überstand	20	60 - 70	20 - 50	40	5
Rückstand	80	20 - 30	50 - 80	60	95

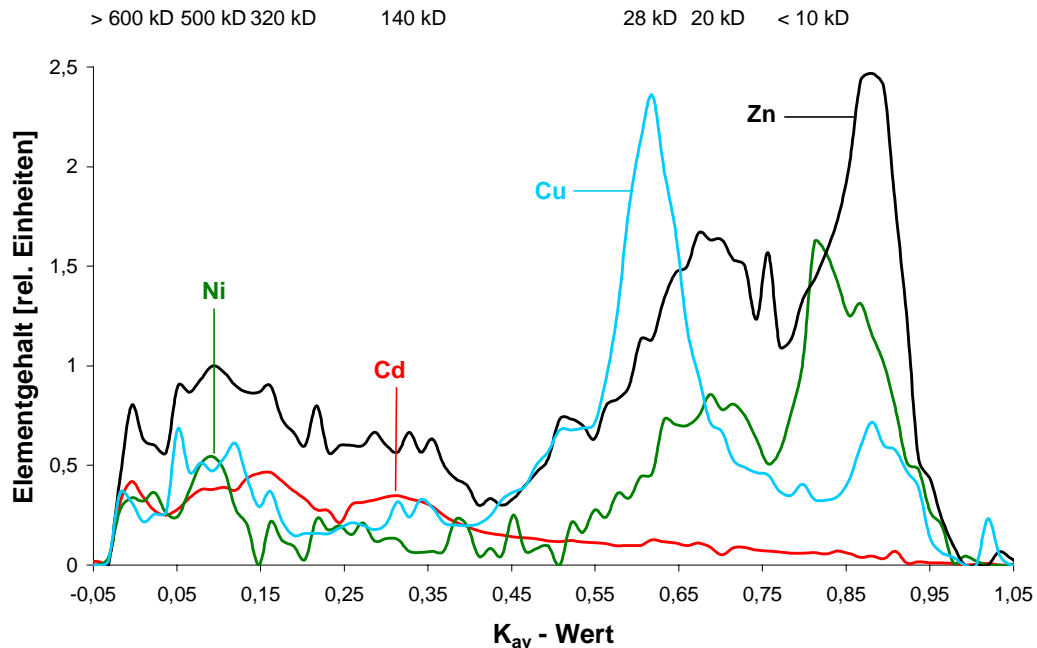
Mit dem Tris-HCl-Puffersystem werden etwa 20 % des Cadmiums, 20-50 % des Nickels, 60-70 % des Kupfers, 40 % des Zinks und 5 % des Eisens in die wässrige Phase überführt.

Im Vergleich zu Sonnenblumenkernen (25-45 %) ist verhältnismäßig wenig **Cadmium** aus Sonnenblumenblättern extrahierbar.

Für **Nickel** hängt die Extrahierbarkeit stark von Herkunft der Pflanzen und den Anzuchtbedingungen ab. So zeigen die Pflanzen aus Hydrokultur und von einem Feld in Marktbreit (Unterfranken) eine hohe Extrahierbarkeit für Nickel (50 %), während bei den Sonnenblumen aus Vinsebeck (Ostwestfalen) nur geringe Mengen an Nickel (20 %) aus den Blättern zu extrahieren sind. Diese geringe Extrahierbarkeit von Nickel gilt sowohl für die unteren Blätter (1-6) als auch für die obersten Blätter (19-26).

Die Nickelgehalte in den Blättern der Pflanzen aus landwirtschaftlichem Anbau sind annähernd gleich hoch (vgl. Tabelle 8); ebenso ist das Reifestadium der Pflanzen vergleichbar, wie der Fettanteil in den Sonnenblumenkernen verdeutlicht (vgl. 2.3). Zudem fungieren die Blätter in den Sonnenblumen aus Unterfranken und Vinsebeck in gleichem Maße als

Schwermetallsenke (vgl. Abbildung 16b). Es ist deshalb zu klären, ob die löslichen Nickel-Bindungsformen in Blättern von Sonnenblumen eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede liefern können (vgl. Abbildung 42).



**Abb. 41: Sonnenblumenblätter (Blätter 1-6; Vinsebeck, 1999):**  
**Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**  
**Cd (1 Einheit 1 ng/mL), Cu (1 Einheit 10 ng/mL), Ni (1 Einheit 25 ng/mL),**  
**Zn (1 Einheit 30 ng/mL); Extraktionsbedingungen vgl. Abbildung 30.**

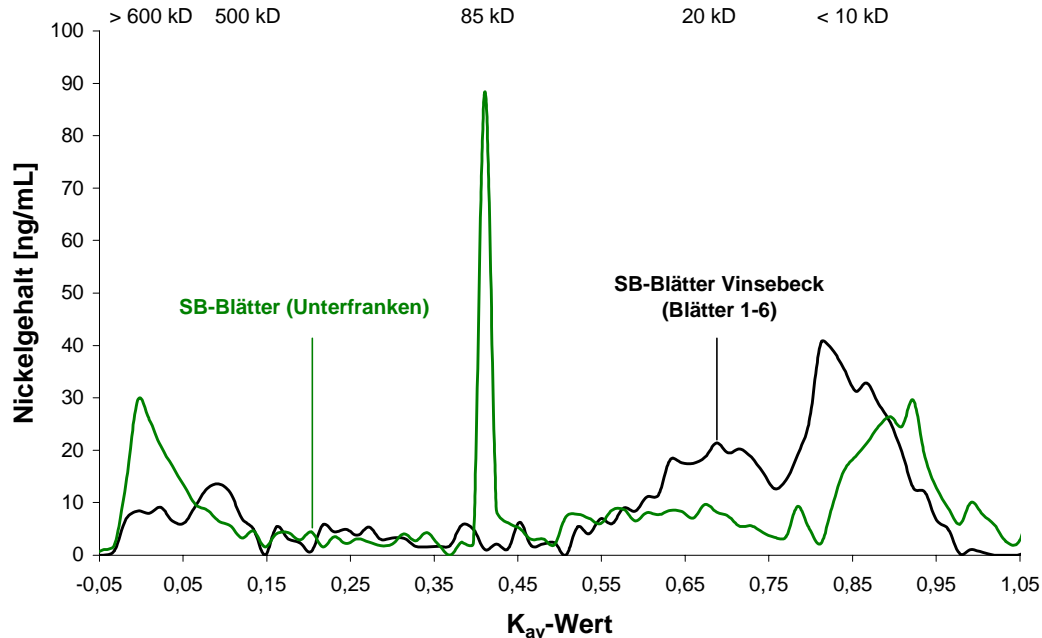
Abbildung 41 und Abbildung A23 zeigen, dass in Sonnenblumenblättern der Pflanzen aus Vinsebeck (Blätter 1-6) die Cadmium-, Kupfer-, Nickel- und Zinkspezies über einen weiten Molmassenbereich verteilt sind.

**Cadmium** ist überwiegend höhermolekular gebunden (600-50 kD), sowie **Nickel** und **Zink** bevorzugt niedermolekular (30 - <10 kD). An „Superdex Peptide“ (Abbildung A20) fraktionieren Nickel-bindende Substanzen mit der Molmasse von 2,5 kD. Der größte Teil des Nickels und Zinks eluiert im Totalvolumen (< 0,1 kD). Zudem können **Kupfer**-bindende Substanzen mit der Molmasse von 28 kD und 3 kD im Eluat nachgewiesen werden. An Superdex S75 ließen sich die Kupfer-Bindungsformen mit der Molmasse von 28 kD weiter auftrennen, sodass Komponenten bei 26 kD und 19 kD detektiert wurden (Dnp).

Neben den untersten Blättern (1-6) der Sonnenblumen sind zusätzlich die obersten Blätter (19-26) der Sonnenblumenpflanzen aus Vinsebeck auf die Bindungsformen von Cadmium, Kupfer, Nickel und Zink untersucht worden (Abbildung A21). Es zeigten sich allerdings keine wesentlichen Unterschiede in den Schwermetall-Elutionsprofilen.

Gleiches gilt für Sonnenblumenblätter aus der Anzucht in Hydrokultur (Kontrollanzucht ohne Cd-Dotierung). **Cadmium** ist an Substanzen mit Molmassen > 35 kD gebunden. **Nickel** und **Zink** eluieren sowohl im Ausschluss- (> 35 kD) als auch im Totalvolumen (< 1,5 kD). **Kupfer** ist fast ausschließlich niedermolekular (< 1,5 kD) gebunden. Zudem fraktionieren Kupfer-bindende Substanzen bei 20 kD.

Es bleibt zu untersuchen, ob die höhere Extrahierbarkeit von **Nickel** aus Blättern der Pflanzen aus Unterfranken im Vergleich zu den Sonnenblumen aus Vinsebeck auf unterschiedliche Bindungsformen zurückzuführen ist. Abbildung 42 zeigt das Nickel-Elutionsprofil für die Blätter der in Unterfranken (1998) und Vinsebeck (1999, Blätter 1-6) geernteten Sonnenblumen.



**Abb. 42: Sonnenblumenblätter: Vergleich der Elutionsprofile von Nickel bei der Gelfiltration der wässrigen Fraktion für Sonnenblumen aus Vinsebeck (Ostwestfalen) und Marktbreit (Unterfranken)**  
Extraktionsbedingungen vgl. Abbildung 30.

Im Vergleich zu den bisherigen Elutionsprofilen fällt das markante Maximum für **Nickel** bei einer Molmasse von 85 kD auf. In diesem Molmassenbereich sind 20 % des Nickels gebunden. Zudem können, im Gegensatz zu den Sonnenblumenblättern der Pflanzen aus Vinsebeck, Nickel-bindende Komponenten mit einer Molmasse von 2,5 kD aus den Blättern der Sonnenblumen aus Unterfranken extrahiert werden. Der Anteil der hochmolekularen Nickelspezies (> 500 kD) ist in allen untersuchten Sonnenblumenblätterproben in einer ähnlichen Größenordnung. Dieses gilt ebenfalls für den Anteil des an niedermolekulare Substanzen (< 0,1 kD) gebundenen Nickels.

Diese Beobachtungen können als Hinweise interpretiert werden, dass die Unterschiede in der Extrahierbarkeit von Nickel auf eine Sortenabhängigkeit der Bindungsformen zurückzuführen sind.

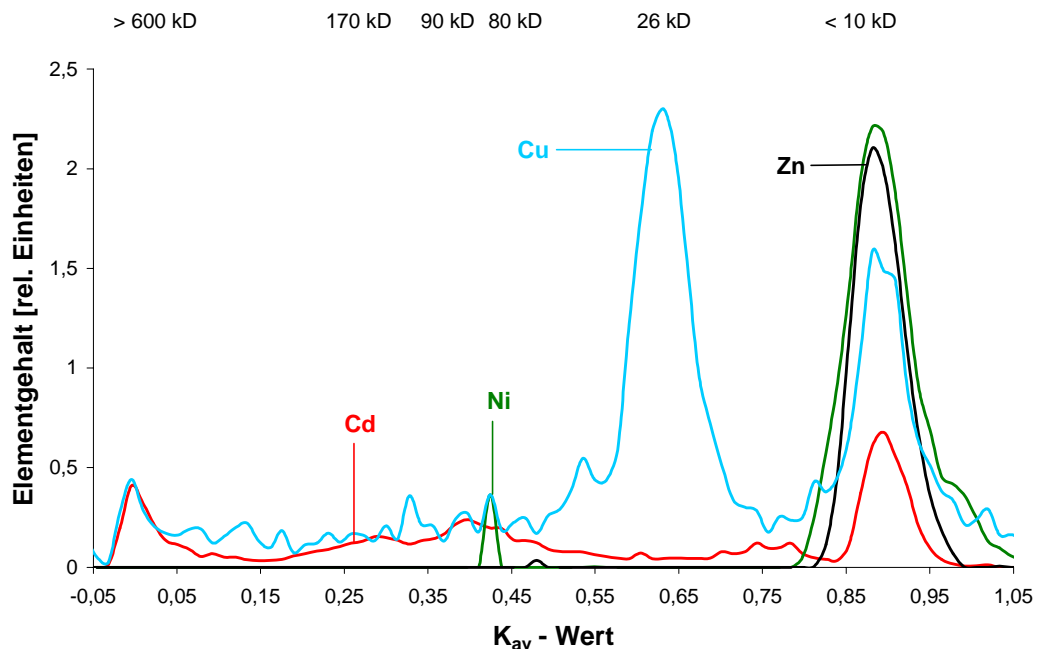
## 6.6 Rapsblätterextrakte

Die für diese Untersuchungen verwendeten Blätter stammen von Rapspflanzen aus der Anzucht in Hydrokultur sowie von der Probenahme im April 2000 in Detmold-Mosebeck.

**Tab. 23: Durchschnittliche Schwermetallverteilung auf die Fraktionen von Rapsblättereextrakten**

Fraktion	Cadmium	Kupfer	Nickel [%]	Zink	Eisen
Überstand	45	65	15	50	10
Rückstand	55	35	80	50	90

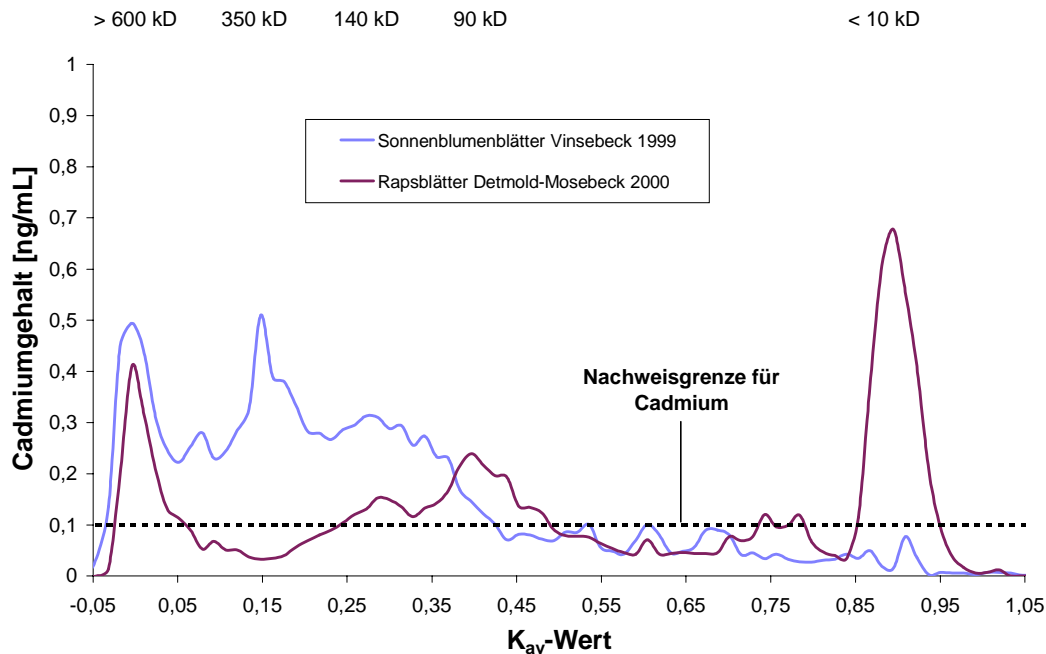
Aus Rapsblättern sind **Cadmium** und **Zink** zu etwa 50 % extrahierbar. Die höchste Extrahierbarkeit mit 65 % weist Kupfer auf. Auffällig ist, dass Nickel lediglich zu 15 % aus Rapsblättern zu extrahieren ist. Mehr als 80 % des Nickels sind demnach an unlösliche Zellbestandteile, wie z.B. Zellwände und Zellmembranen, gebunden. Vergleichbares ist bisher nur für Nickel-Hyperakkumulatoren wie das Täschelkraut *Thlaspi goesingense* beschrieben [120]. Im Vergleich zu Rapssamen (Tabelle 19) ist die Extrahierbarkeit der Schwermetalle aus Rapsblättern - mit Ausnahme von Nickel - deutlich höher.



**Abb. 43: Rapsblätter (Detmold-Mosebeck, April 2000):**  
**Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**  
**Cd (1 Einheit 1 ng/mL), Cu (1 Einheit 25 ng/mL), Ni (1 Einheit 40 ng/mL),**  
**Zn (1 Einheit 200 ng/mL); Extraktionsbedingungen vgl. Abbildung 30.**

Die wasserlöslichen **Zink-** und **Nickel-**bindenden Substanzen eluieren nahezu vollständig im Totalvolumen (< 0,1 kD; Abbildung A25). Als Bindungspartner sind Malat, Citrat und Histidin zu vermuten, wie es für Blätter des gewöhnlichen Leimkrautes *Silene vulgaris* beschrieben ist [100]. Höhermolekulare **Kupfer-**Bindungsformen (> 100 kD) scheinen im Gegensatz zu nieder-molekularen (< 0,1 kD) weder in Sonnenblumen- noch in Rapsblättern von Bedeutung zu sein (Abbildung A25). Kupfer ist sowohl in Raps- als auch Sonnenblumenblättern an Substanzen im Molmassenbereich von 25-28 kD gebunden.

Die **Cadmium**-bindenden Substanzen aus Rapsblättern sind über einen weiten Molmassenbereich (40 - > 600 kD) verteilt. Im Gegensatz zu Sonnenblumenblättern werden aus Rapsblättern auch niedermolekulare Cadmium-Bindungsformen (< 0,1 kD) extrahiert, die 30 % des Cadmiums enthalten und wohl die leichte Extrahierbarkeit des Cadmiums aus Rapsblättern (65 %) ermöglichen.



**Abb. 44: Vergleich der Cadmium-Elutionsprofile bei der Gelfiltration der wässrigen Fraktion von Sonnenblumenblättern (Vinsebeck 1999; Blätter 19-26) und Rapsblättern (Detmold-Mosebeck, 2000) unter Hydrokulturbedingungen werden ähnliche Unterschiede beobachtet (Dnp)**

Bei den Liganden der niedermolekularen Cadmium-Bindungsformen könnte es sich um Citrate handeln, wie für Zellsuspensionskulturen von Tabakpflanzen beschrieben ist [123].

### Zwischenbetrachtung

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Kupfer, Nickel und Zink aus Rapsblättern in einer ähnlichen Größenordnung wie aus Sonnenblumenblättern extrahierbar sind. Cadmium ist aus Rapsblättern in einem höheren Maße extrahierbar als aus Sonnenblumenblättern.

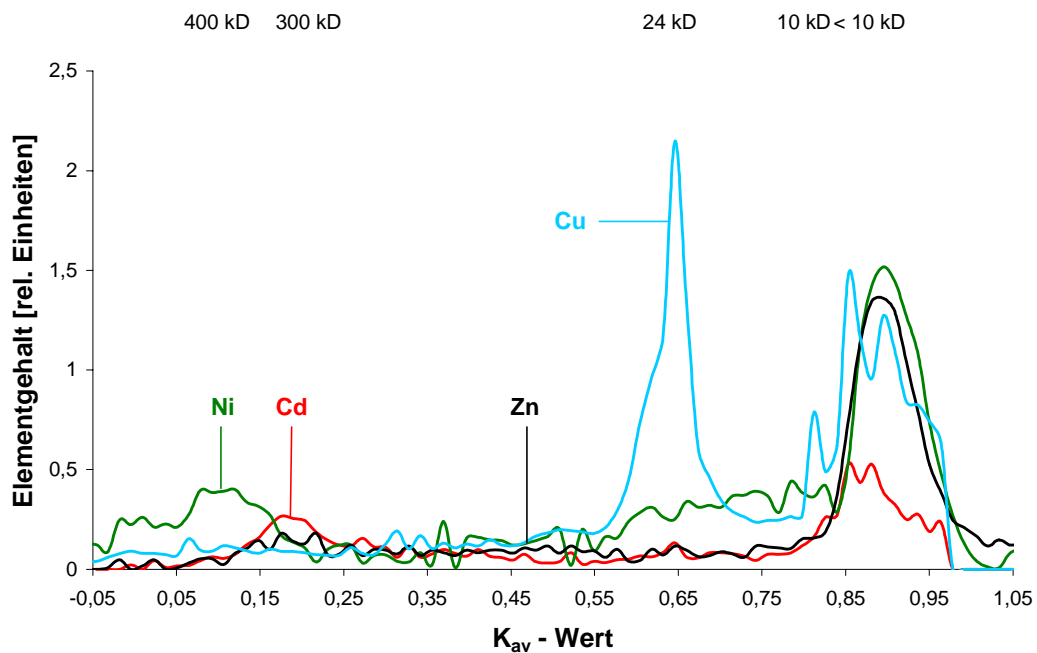
Deutliche Unterschiede werden zwischen den Schwermetall-Elutionsprofilen bei Sonnenblumen- und Rapsblättern festgestellt. **Cadmium** ist in Rapsblättern zu einem hohen Anteil (> 30 %) niedermolekular (< 0,1 kD) gebunden, in Sonnenblumenblättern dagegen ausschließlich höhermolekular.

**Nickel** ist aus den Blättern von Sonnenblumen, die in Vinsebeck geerntet wurden, zu 20 % extrahierbar, während aus den Blättern der Sonnenblumen aus Unterfranken 50 % des Nickels extrahierbar sind. Zusätzlich sind in den Blättern der Pflanzen aus Unterfranken Nickel-bindende Substanzen der Molmassen 85 kD und 2,5 kD nachweisbar. In Rapsblättern ist Nickel ausschließlich niedermolekular gebunden.

Der Hauptanteil des **Kupfers** wird sowohl in Sonnenblumen- als auch in Rapsblättern von Substanzen im Molmassenbereich von 25-28 kD komplexiert. Kupfer ist ferner niedermolekular (< 0,1 kD) gebunden. In Sonnenblumenblättern fraktionieren nieder- (< 0,1 kD) und höhermolekulare **Zink**-Bindungsformen (> 600 bis 20 kD). Im Unterschied dazu ist Zink in Rapsblättern ausschließlich niedermolekular (< 0,1 kD) gebunden.

## 6.7 Sonnenblumenblätter: Extraktion unter reduzierenden Bedingungen

Die extrahierbaren Anteile von Cadmium, Kupfer, Nickel und Zink aus Sonnenblumenblättern (Vitsebeck 1999, Blätter 19-26) werden durch den Zusatz von Mercaptoethanol zum Extraktionsmedium nicht beeinflusst.

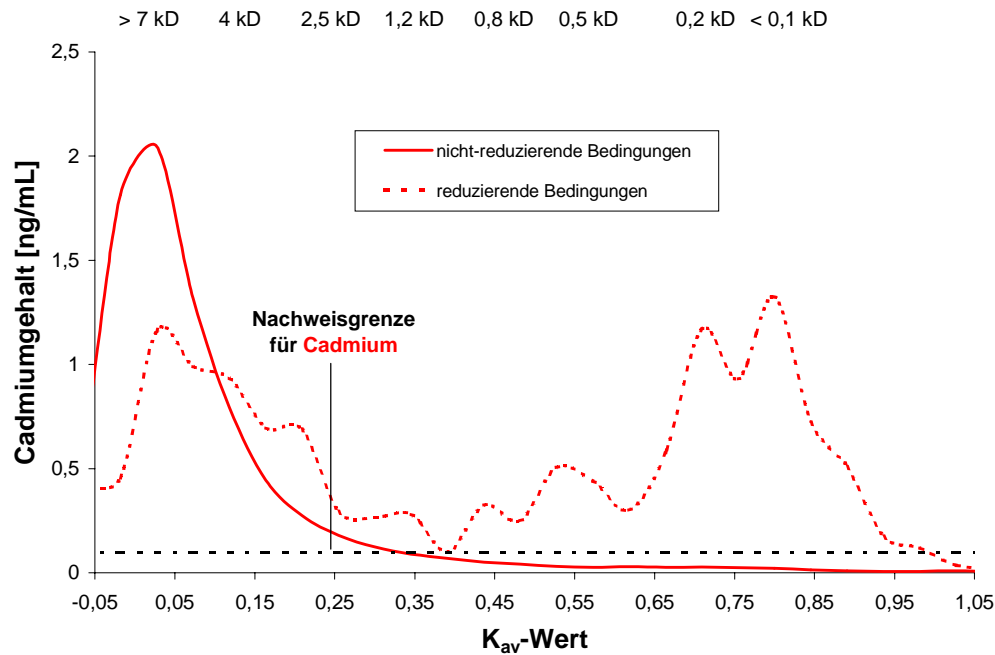


**Abb 45: Sonnenblumenblätter (Blätter 19-26, Vitsebeck, 1999): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion unter reduzierenden Bedingungen**  
**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 40 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 25 ng/mL)  
**Zn** (1 Einheit 250 ng/mL); Extraktionsbedingungen vgl. Abbildung 36.

Aber beim Vergleich von Abbildung 45 und Abbildung A17 fällt für Kupfer und Cadmium unter reduzierenden Bedingungen eine deutliche Veränderung des Schwermetall-Elutionsprofils auf.

**Kupfer** ist hauptsächlich an Substanzen mit der Molmasse von 24 kD gebunden. Die Schulter des Kupferpeaks zeigt, dass die Auflösung der Gelfiltration nicht ausreicht, um die Kupferspezies zu trennen. An Superdex S75 eluieren Kupfer-bindende Komponenten bei 26 kD und 19 kD.

**Cadmium** ist unter reduzierenden Bedingungen nicht mehr ausschließlich an hochmolekulare Substanzen gebunden (vgl. Abbildung 46). Zusätzlich zu hochmolekularen Cadmium-Bindungsformen (300 kD) werden Cadmium-bindende Substanzen im Totalvolumen detektiert.



**Abb 46: Sonnenblumenblätter (Vinsebeck 1999; Blätter 19-26): Vergleich der Cadmium-Elutionsprofile der wässrigen Fraktion unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen**

Extraktions-/Elutionspuffer: Tris-HCl (pH 8,0; 0,05 mol/L); unter reduzierenden Bedingungen werden 10 mmol/L Mercaptoethanol zugesetzt. Superdex Peptide.

An Superdex-Peptide (Abbildung 46) fraktionieren niedermolekulare Cadmium-Bindungsformen im Molmassenbereich von 0,5 - 2,5 kD. Es ist zu vermuten, dass es sich bei diesen Cadmium-haltigen Substanzen um Phytochelatin-Monomere handelt, weil GALLEGRO ET AL. diese in Sonnenblumenblättern unter reduzierenden Bedingungen nachwies [210, 236]. Die Cadmium-bindende Substanz bei 0,5 kD könnte demnach PC<sub>2</sub> (Molmasse 542 g/mol) sein. Die weiteren Cadmium-bindenden Substanzen bei 0,8, 1,2 und 2,5 kD könnten ebenfalls Phytochelatine darstellen, entweder Monomere wie PC<sub>3</sub> (Molmasse 774 kD) oder PC<sub>4</sub> (Molmasse 1 kD) bzw. Aggregate aus verschiedenen Phytochelatin-Monomeren. Allerdings steht ein detaillierter Nachweis mit LC-MS und durch eine Aminosäureanalyse noch aus.

## 6.8 Rapsblätter: Extraktion unter reduzierenden Bedingungen

Die extrahierbaren Anteile von Cadmium, Kupfer, Nickel und Zink aus Rapsblättern werden durch den Zusatz von Mercaptoethanol zum Extraktionsmedium nicht beeinflusst.

Abbildung 44 zeigt, dass **Cadmium** in Rapsblättern zu erheblichen Anteilen höhermolekular gebunden ist. Es ist zu vermuten, dass es sich bei diesen Cadmium-Bindungsformen, wie bei Sonnenblumenblättern, um Aggregate von niedermolekularen Cadmium-Phytochelatinen handelt, weil OSWALD mit Tris-HCl-Puffer (pH 8,5; 0,05 mol/L) Cadmium-Phytochelatine aus Rapsblättern extrahierte [182]. Die Elutionsprofile von **Nickel** und **Zink** werden durch das Reduktionsmittel nicht beeinflusst.



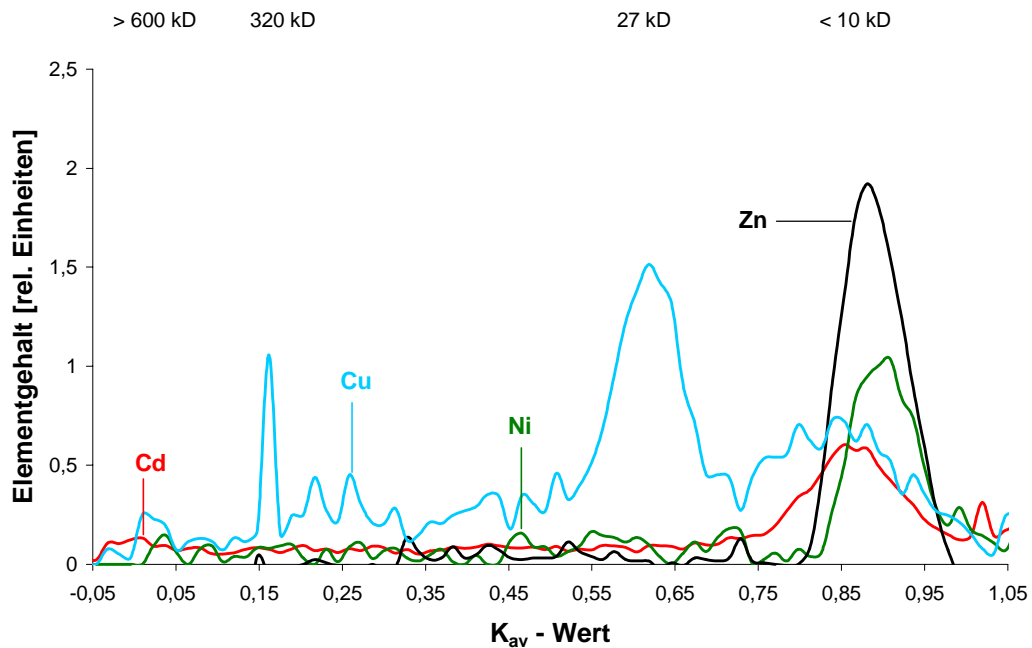


Abb. 47: **Rapsblätter (Detmold-Mosebeck, 2000): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion unter reduzierenden Bedingungen**  
**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 10 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 25 ng/mL), **Zn** (1 Einheit 125 ng/mL), Extraktionsbedingungen vgl. Abbildung 36.

Für **Kupfer** werden bei 320 kD zuvor nicht beobachtete Kupfer-bindende Substanzen nachgewiesen. Allerdings ist zu vermuten, dass unter reduzierenden Bedingungen die nativen Kupfer-bindenden Substanzen teilweise zerstört werden, weil unter diesen Bedingungen keine niedermolekularen Kupfer-bindenden Substanzen (< 0,1 kD) mehr nachweisbar sind (Abbildung A19). **Cadmium** eluiert an Superdex Peptide unter reduzierenden Bedingungen ausschließlich bei 0,6 kD (Abbildung 48). Dabei könnte es sich um die von Oswald beschriebenen Phytochelatine handeln (vgl. 6.7).

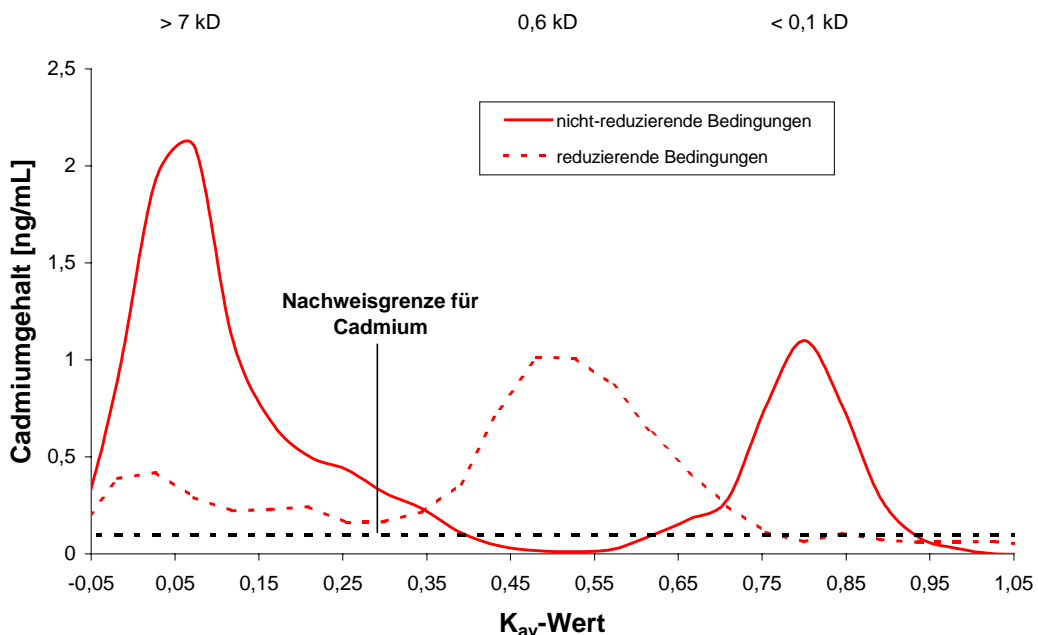


Abb. 48: **Rapsblätter (Detmold-Mosebeck, 2000): Vergleich der Cadmium-Elutionsprofile der wässrigen Fraktion unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen** Extraktionsbedingungen vgl. Abbildung 46.

### Zwischenbetrachtung

**Cadmium**-bindende Substanzen in Sonnenblumen- und Rapsblättern treten in einem weiten Molmassenbereich (600-100 kD) auf. Der Einsatz von Mercaptoethanol führt zur Spaltung dieser Komponenten, da sich die nativen hochmolekularen Substanzen aus niedermolekularen Untereinheiten zusammensetzen (vgl. 1.6.4). Aus **Rapsblättern** können neben hochmolekularen auch niedermolekulare Cadmium-Bindungsformen (< 0,1 kD) extrahiert werden. Letztere sind möglicherweise für höhere Extraktionsgrade des Cadmiums aus Rapsblättern (65 %) im Vergleich zu Sonnenblumenblättern (20 %) verantwortlich. Sie sind unter reduzierenden Bedingungen allerdings nicht stabil (vgl. Abbildung 48). **Nickel** und **Zink** sind in Sonnenblumenblättern zu 50 % an Substanzen mit Molmassen von 20-600 kD gebunden. Des Weiteren lassen sich niedermolekulare Nickel- und Zink-Bindungsformen aus Sonnenblumenblättern extrahieren. Dagegen sind höhermolekulare Nickel- und Zink-bindende Substanzen in Rapsblättern nicht nachweisbar. In Sonnenblumen- und Rapsblättern sind **Kupfer**-bindende Substanzen im Molmassenbereich von 26-28 kD nachweisbar, die gegenüber Mercaptoethanol stabil sind.

## 6.9 Sonnenblumen- und Rapsstängelextrakte

Tabelle 24 zeigt, dass Nickel aus den Stängeln von Rapspflanzen fast nicht (< 5 %) zu extrahieren ist. Dieses gilt auch für Sonnenblumenstängel (20 %). Cadmium und Zink sind aus Sonnenblumen- und Rapsstängeln in gleichem Maße herauszulösen. Kupfer ist aus Sonnenblumenstängeln zu 65 %, aus Rapsstängeln dagegen nur zu 35 % zu extrahieren.

**Tab. 24: Durchschnittliche Schwermetallverteilung auf die Fraktionen von Sonnenblumen- und Rapsstängelextrakten**

Fraktion	Cadmium	Kupfer	Nickel	Zink	Eisen
			[%]		
Wässrige Fraktion <u>Sonnenblume</u>	50	60	20	30	< 5
Wässrige Fraktion <u>Raps</u>	40	35	< 5	35	< 5

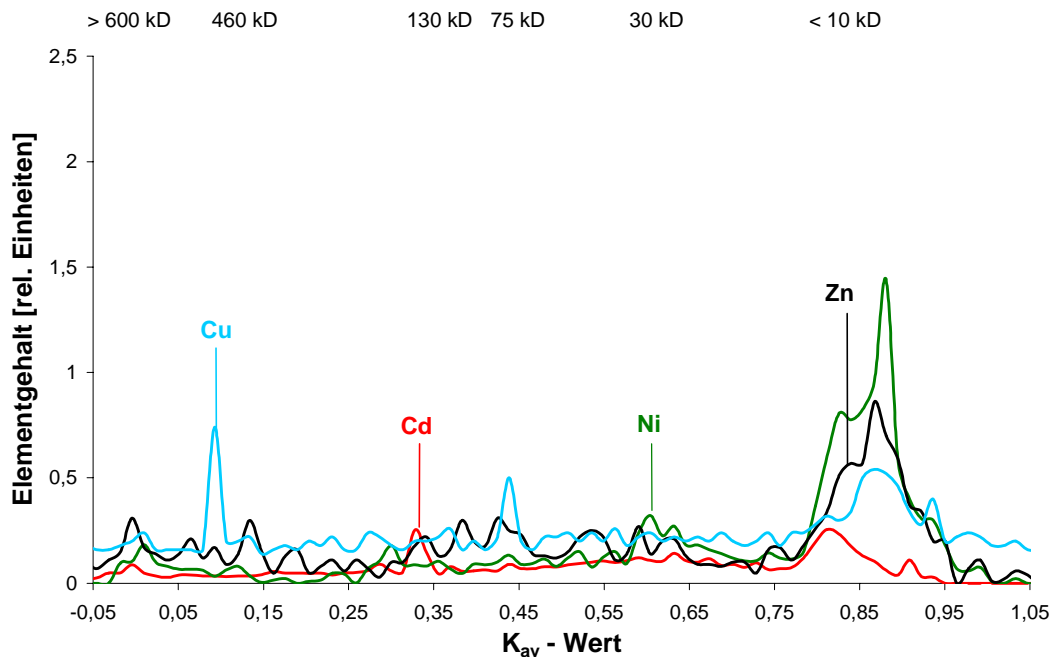
Die wässrigen Fraktionen aus Sonnenblumen- und Rapsstängeln wurden ebenfalls mit der GFC untersucht. Die im Anhang dargestellten Schwermetall-Elutionsprofile (Abbildung A29 und A30) sind zu den Elutionsprofilen für Sonnenblumen- und Rapswurzeln ähnlich.

## 6.10 Sonnenblumenwurzelextrakte

**Tab. 25: Durchschnittliche Schwermetallverteilung auf die Fraktionen von Sonnenblumenwurzelextrakten**

Fraktion	Cadmium	Kupfer	Nickel	Zink	Eisen
			[%]		
Überstand	40	70	65	35	5
Rückstand	60	30	35	65	95

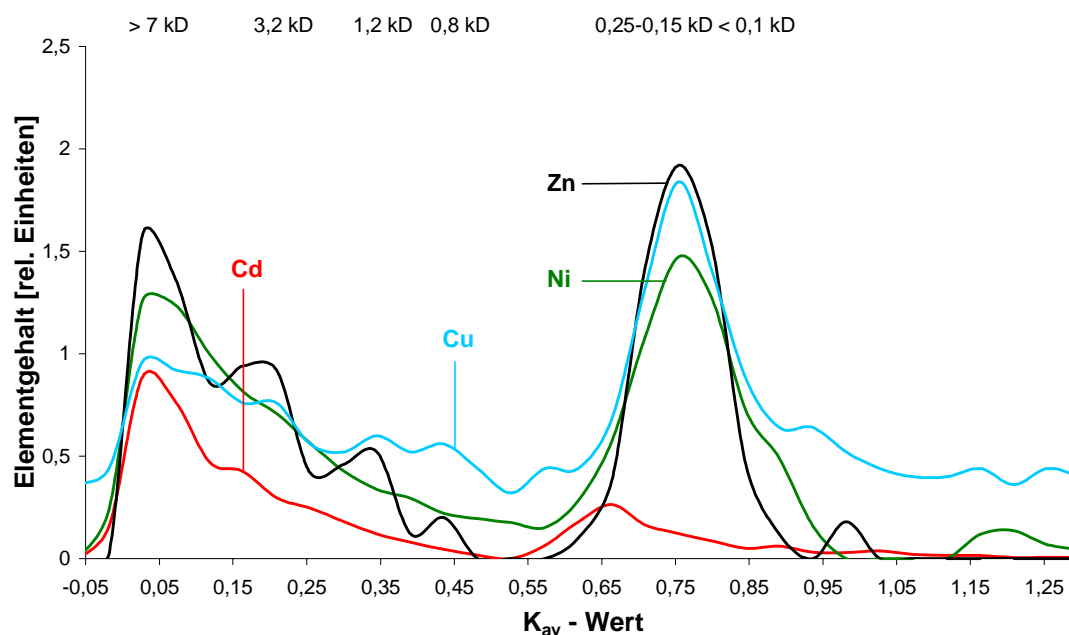
Aus Sonnenblumenwurzeln sind Cadmium und Nickel mit 40 % bzw. 65 % zu deutlich höheren Anteilen extrahierbar als aus den Blättern (Tabelle 23). Im Vergleich zu den Sonnenblumensaaten (Tabelle 19) sind Cadmium, Kupfer, Nickel und Zink zu einem größeren Teil aus den Wurzeln extrahierbar.



**Abb. 49: Sonnenblumenwurzeln (Vinsebeck, 1999):**  
**Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**  
**Cd (1 Einheit 1 ng/mL), Cu (1 Einheit 50 ng/mL), Ni (1 Einheit 50 ng/mL),**  
**Zn (1 Einheit 100 ng/mL); Extraktionsbedingungen vgl. Abb. 30.**

**Cadmium**-bindende Komponenten eluieren bei 130 kD und im Totalvolumen (< 10 kD). Das Elutionsprofil für Cadmium an Superdex S75 und Superdex Peptide zeigt Peaks bei 6-7 kD (vgl. auch Abbildung A21). Ob es sich bei diesen Cadmium-Bindungsformen um Phytochelatine handelt, wurde nicht geklärt. Dieses erscheint zumindest möglich, weil Untersuchungen an Bohnen-, Mais- und Tomatenwurzeln sowie dem Gras *Agrostis gigantea* Phytochelatine identifizierten, die mit Cadmium Komplexe von 10 kD bilden [44, 140, 141, 269, 270]. Wie zuvor schon für Sonnenblumenkerne und Sonnenblumenblätter beobachtet, ist **Nickel** auch in Sonnenblumenwurzeln bevorzugt an niedermolekulare Komponenten (< 0,1 kD) gebunden (Abbildung 50). Höhermolekulare Nickel-Bindungsformen eluieren im Molmassenbereich von 20-30 kD.

**Zink** ist überwiegend (60 %) im Totalvolumen (< 10 kD) nachweisbar. Etwa 40 % des Zinks eluieren über einen weiten Molmassenbereich mit Maxima bei 100 kD und im Ausschlussvolumen. **Kupfer** eluiert bei 460 kD, 75 kD sowie im Totalvolumen (< 0,1 kD). Die Kupfer-bindenden Substanzen im Totalvolumen fraktionieren an Superdex S75 (Abbildung A25) bei 7,5 kD. 30 % des Kupfers eluieren außerhalb des Trennbereiches der verwendeten Säulen. Auffällig ist das wellenförmige Elutionsprofil für Zink an Superdex Peptide (Abbildung 50). Zink-bindende Komponenten eluieren bei 0,8 kD. Weitere Zink-Maxima finden sich bei 1,2 kD und 3,2 kD (vgl. Abbildung 53).



**Abb. 50: Sonnenblumenwurzel (Vinsebeck, 1999): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion.**

**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 25 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 50 ng/mL),

**Zn** (1 Einheit 50 ng/mL);

Extraktions-/Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);

Superdex Peptide HR.

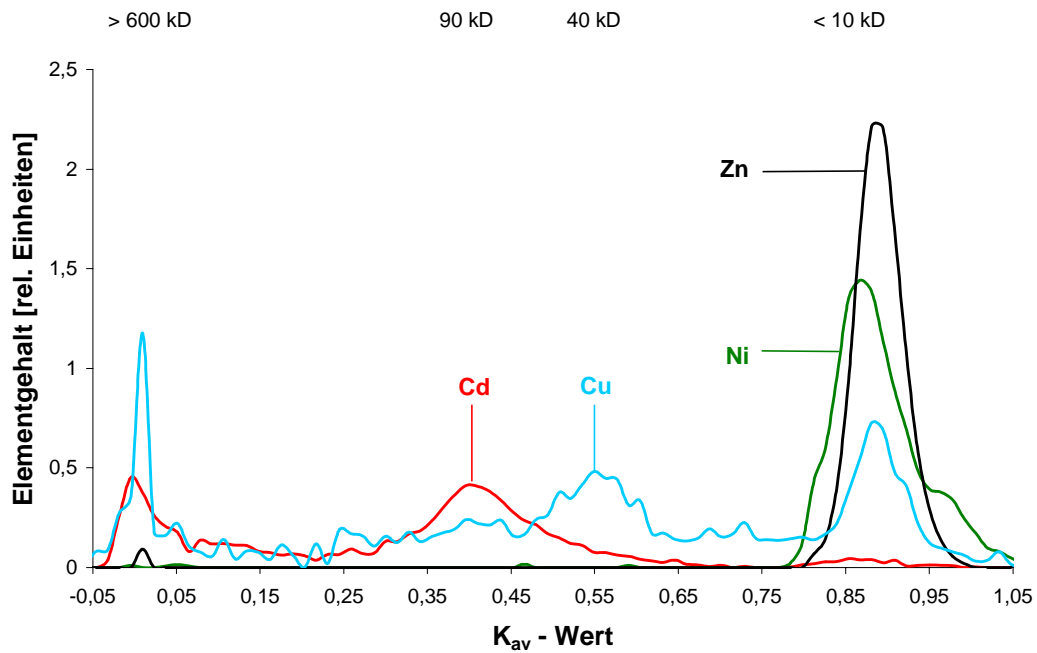
Cadmium-bindende Substanzen mit einer Molmasse von 10 kD sowie höhermolekulare Cadmium-, Nickel- und Zink-bindende Komponenten (> 30 kD) können auch in den Sonnenblumenwurzeln aus der Anzucht in Hydrokultur nachgewiesen werden (Abbildung A22).

## 6.11 Rapswurzelextrakte

**Tab. 26: Durchschnittliche Schwermetallverteilung auf die Fraktionen von Rapswurzelextrakten**

Fraktion	Cadmium	Kupfer	Nickel	Zink	Eisen
			[%]		
Überstand	40	50	10	35	5
Rückstand	60	50	90	65	90

Mit dem verwendeten Puffersystem lassen sich lediglich 10 % des Nickels aus Rapswurzeln extrahieren. Im Vergleich zu Sonnenblumenwurzeln (Tabelle 25) ist Nickel aus Rapswurzeln zu einem deutlich geringeren Anteil extrahierbar, weil es vermutlich überwiegend an unlösliche Zellstrukturen (Zellwand, Zellmembran) gebunden ist. Der daraus resultierende geringere Anteil an mobilem Nickel könnte ein Grund für die niedrigen Nickelgehalte in den oberirdischen Pflanzenteilen von Raps sein (Tabelle 10, 11). Dagegen ist die Extrahierbarkeit von Cadmium, Kupfer und Zink in Sonnenblumen- und Rapswurzeln ähnlich hoch.



**Abb. 51: Rapswurzeln (Detmold-Mosebeck, 2000):**  
**Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**  
**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 10 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 100 ng/mL),  
**Zn** (1 Einheit 250 ng/mL); Extraktionsbedingungen vgl. Abbildung 30.

**Tab. 27: Rapswurzeln: GFC-Fraktionierungsbereiche an Superdex S200:**  
**prozentuale Verteilung der Schwermetalle (s. Abb. 51)**

	Fraktionierungsbereich / Molmasse [kD]			
	> 600	90	40	< 10
	[%]			
<b>Cadmium</b>	20	30	4	4
<b>Kupfer</b>	15	5	10	30

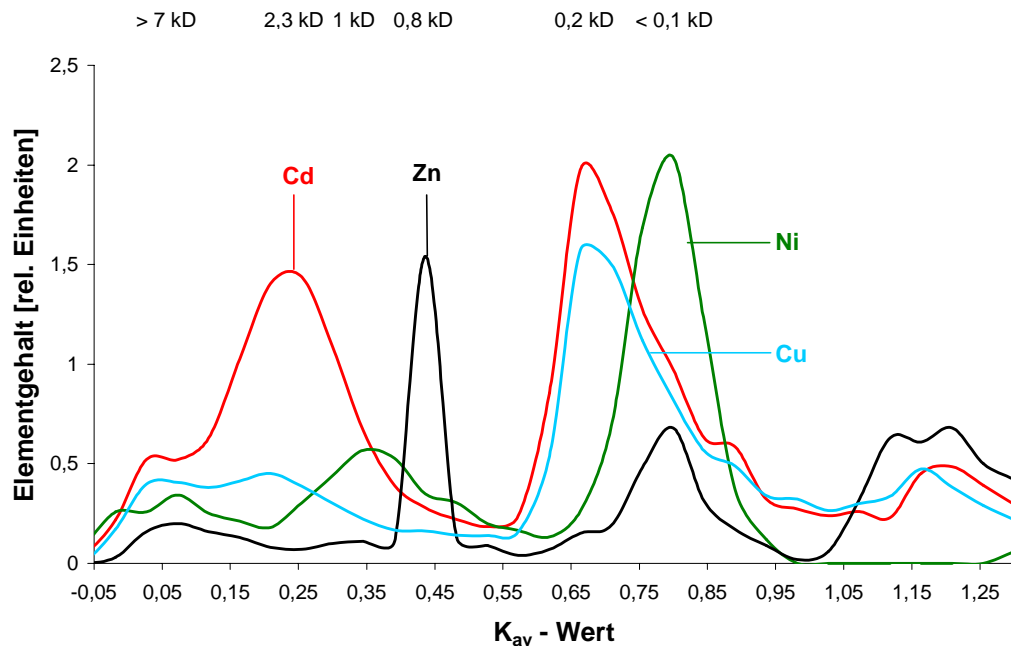
Die aus Rapswurzeln extrahierten **Cadmium**-Bindungsformen eluieren über einen weiten Molmassenbereich (> 600-30 kD) mit Maxima bei 90 kD und im Ausschlussvolumen der Säule (> 600 kD). **Kupfer**-bindende Substanzen werden im hochmolekularen Bereich (> 600 kD), bei 40 kD sowie im niedermolekularen Bereich bei 3,2 kD (Abbildung A31) nachgewiesen. **Nickel** und **Zink** sind bevorzugt niedermolekular (< 0,1 kD) gebunden.

### Zwischenbetrachtung

Die Elutionsprofile für die Schwermetall-bindenden Substanzen aus Sonnenblumen- und Rapswurzeln unterscheiden sich deutlich. Während in Sonnenblumenwurzeln **Cadmium** und **Kupfer** überwiegend an niedermolekulare Substanzen (< 15 kD) gebunden sind, treten in Rapswurzeln Cadmium ausschließlich und Kupfer zu weiten Teilen höhermolekular (> 40 kD) auf. **Nickel** und **Zink** sind in Sonnenblumen- und Rapswurzeln bevorzugt niedermolekular gebunden. Die Molmassen der Nickel- und Zinkspezies in Sonnenblumenwurzeln liegen bei 2-10 kD. Dagegen sind die niedermolekularen Zink- und Nickel-bindenden Komponenten aus Rapswurzeln ausschließlich im Totalvolumen (< 0,1 kD) nachzuweisen.

## 6.12 Sonnenblumenwurzeln: Extraktion unter reduzierenden Bedingungen

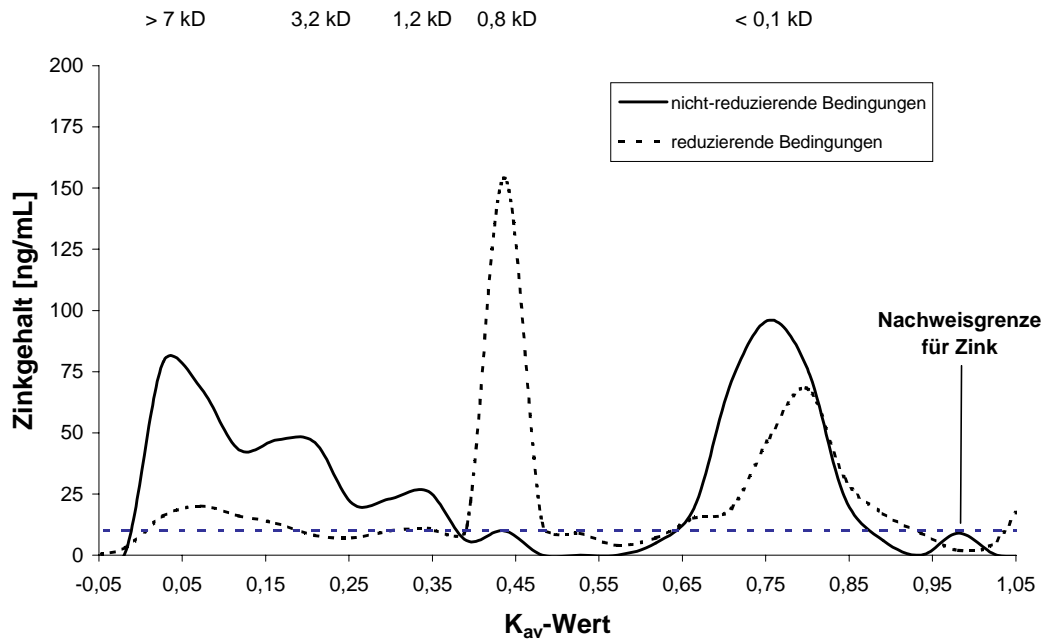
Im Vergleich zur Extraktion ohne Reduktionsmittel (40 %) ist Cadmium unter reduzierenden Bedingungen zu etwa 75 % aus Sonnenblumenwurzeln extrahierbar (Dnp). Die Extrahierbarkeit von Nickel, Kupfer und Zink wird von Mercaptoethanol nicht beeinflusst.



**Abb. 52:** Sonnenblumenwurzeln (Vinsebeck, 1999): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion unter reduzierenden Bedingungen  
**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 50 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 50 ng/mL),  
**Zn** (1 Einheit 100 ng/mL); Extraktionsbedingungen vgl. Abbildung 36.

Unter reduzierenden Bedingungen sind Cadmium, Kupfer, Nickel und Zink überwiegend niedermolekular gebunden (Abbildung 52). Etwa 30 % des **Cadmiums** eluieren bei 2,3 kD. Im Ausschlussvolumen (> 7 kD) ist unter diesen Bedingungen weniger Cadmium nachweisbar als bei der Extraktion ohne Mercaptoethanol (Abbildung 50). Es ist zu vermuten, dass die Cadmium-haltigen Substanzen bei 2,3 kD Untereinheiten der zuvor bei 10 kD fraktionierenden Cadmium-haltigen Substanzen sind. **Nickel** wird überwiegend im Totalvolumen (< 0,1 kD) sowie bei 1 kD eluiert.

Der Hauptanteil des **Kupfers** eluiert bei 0,2 kD. Zudem werden Kupferspezies mit der Molmasse von 12 kD nachgewiesen. Auffällig ist der markante **Zinkpeak** bei 0,8 kD, welcher bei der Extraktion ohne Mercaptoethanol nicht zu beobachten ist (Abbildung 50).

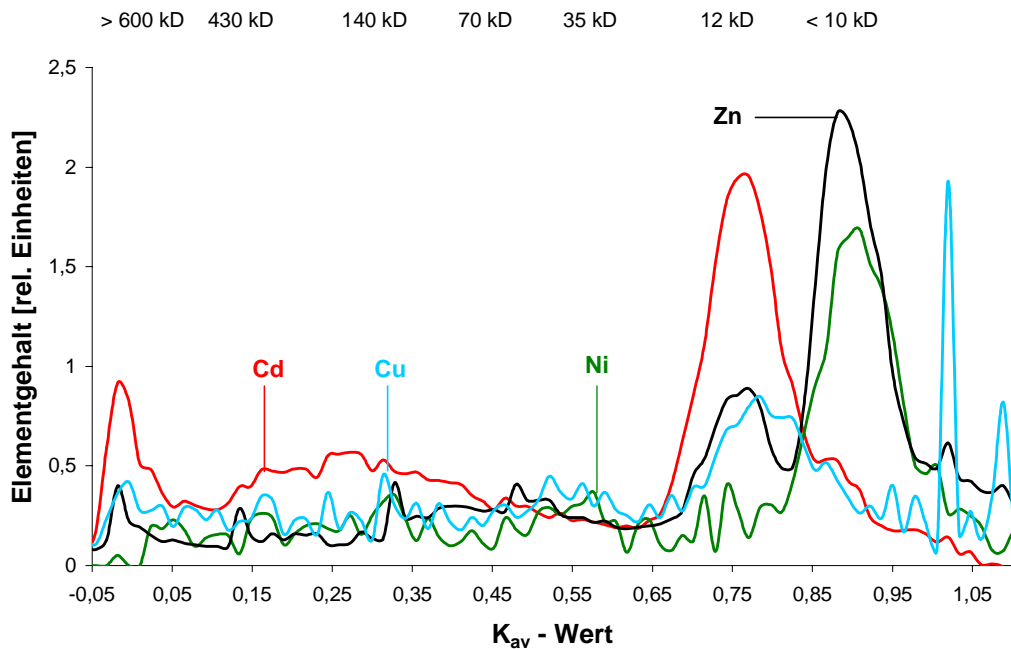


**Abb. 53: Sonnenblumenwurzeln (Vinsebeck 1999): Vergleich der Zink-Elutionsprofile der wässrigen Fraktion unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen.** Extraktionsbedingungen vgl. Abbildung 46.

Die Zink-bindenden Substanzen bei 3,2 und 1,2 kD werden unter reduzierenden Bedingungen nicht mehr beobachtet. Möglicherweise handelt es sich dabei um Aggregate der Substanzen bei 0,8 kD. In der Literatur sind Zink-Phytate beschrieben [147-150]. Es ist daher wahrscheinlich, dass Phytate (Myoinositol-Hexaphosphat; Molmasse 660 g/mol) in Sonnenblumenwurzeln an der Komplexbildung von Zink beteiligt sind. Dagegen ist eine Bindung von Zink an Phytochelatine nicht zu vermuten, wie Untersuchungen von WALDNER ET AL. für verschiedene Gemüsesorten zeigen [327].

### 6.13 Rapswurzeln: Extraktion unter reduzierenden Bedingungen

Der Zusatz von Mercaptoethanol erhöht die Cadmium-Extrahierbarkeit von 40 % auf 70 %. Es ist daher zu vermuten, dass auch in den Rapswurzeln die hochmolekularen Cadmium-Bindungsformen Aggregate von Untereinheiten mit sehr viel geringerer Molmasse darstellen. Die Extrahierbarkeit von Kupfer, Nickel und Zink wird durch Mercaptoethanol nicht beeinflusst.



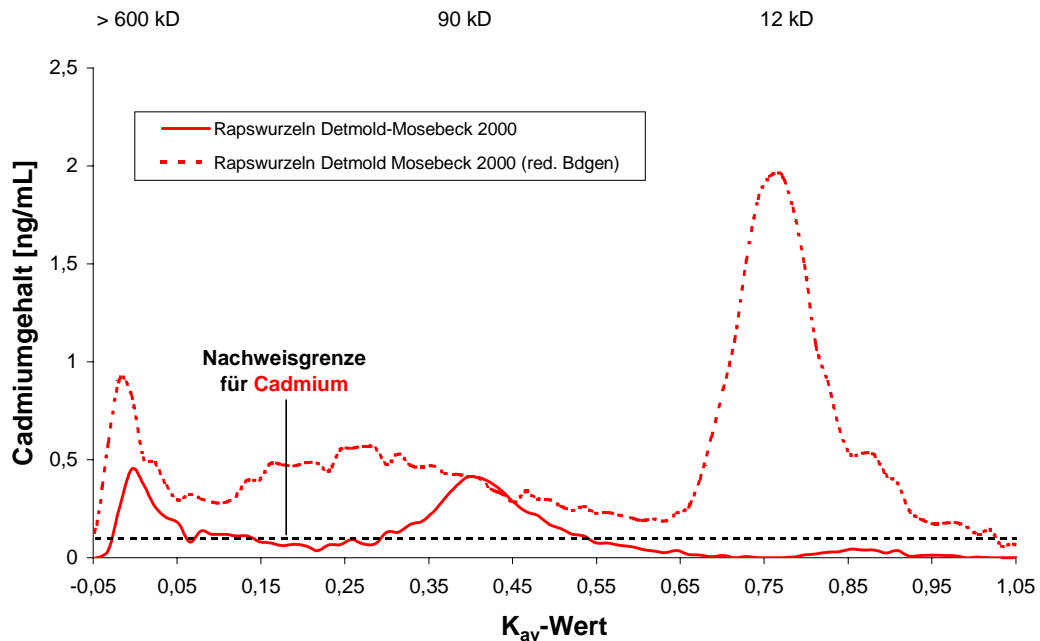
**Abb. 54: Rapswurzeln (Detmold-Mosebeck, 2000): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion unter reduzierenden Bedingungen**  
**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 15 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 20 ng/mL), **Zn** (1 Einheit 125 ng/mL); Extraktionsbedingungen vgl. Abbildung 36.

**Tab. 28: Rapswurzeln: GFC-Fraktionierungsbereiche an Superdex S200: prozentuale Verteilung der Schwermetalle (s. Abb. 54)**

	Fraktionierungsbereich / Molmasse [kD]				
	> 600	430 - 70	35 [%]	12	< 10
<b>Cadmium</b>	10	30	2	40	10
<b>Kupfer</b>	10	20	10	25	30
<b>Nickel</b>	2	20	5	10	55
<b>Zink</b>	5	15	2	15	55

**Zink** eluiert überwiegend im Totalvolumen (< 10 kD) und bei 12 kD. An Superdex Peptide fraktionieren unter reduzierenden Bedingungen zuvor nicht beobachtete Zink-bindende Komponenten bei 0,5 kD (Abbildung A26). Der Hauptanteil des Zinks eluiert zusammen mit **Nickel** bei 0,2 kD. **Kupfer** ist zu 25 % an Komponenten mit der Molmasse von 12 kD gebunden. Der überwiegende Anteil des Kupfers eluiert bei 0,6 kD (Abbildung A26). Abbildung 54 zeigt, dass **Cadmium** unter reduzierenden Bedingungen zum größten Teil an Substanzen mit einer Molmasse von 12 kD gebunden ist. Weiterhin werden Cadmium-haltige Komponenten im Bereich von 1,5-0,5 kD nachgewiesen. Abbildung 55 veranschaulicht die Veränderungen des Cadmium-Elutionsprofils durch die Zugabe von Mercaptoethanol.





**Abb. 55: Rapswurzeln (Detmold-Mosebeck, 2000): Vergleich der Cadmium-Elutionsprofile der wässrigen Fraktion unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen;**  
Extraktionsbedingungen vgl. Abbildung 37.

### Zwischenbetrachtung

Für Sonnenblumen- und Rapswurzeln aus der landwirtschaftlichen Praxis und der Anzucht in Hydrokultur lassen sich auf Grund der bisherigen Untersuchungsergebnisse folgende Gemeinsamkeiten und Unterschiede formulieren:

#### Gemeinsamkeiten

- **Cadmium** (40 %) und **Zink** (40 %) sind aus Sonnenblumen- und Rapswurzeln zu ähnlichen Anteilen extrahierbar.
- Durch die Zugabe des milden Reduktionsmittels Mercaptoethanol wird die Extrahierbarkeit von **Cadmium** aus Sonnenblumen- und Rapswurzeln von 40 % auf 70 % erhöht.
- Mercaptoethanol beeinflusst die Extrahierbarkeit von Kupfer, Nickel und Zink weder bei Sonnenblumen- noch bei Rapswurzeln.

#### Unterschiede

- **Nickel** ist aus Sonnenblumenwurzeln zu 65 % extrahierbar, während aus Rapswurzeln lediglich 20 % zu extrahieren sind. Der höhere Anteil an mobilem Nickel in den Wurzeln von Sonnenblumen sollte für die höheren Nickelgehalte in den vegetativen Pflanzenteilen der Sonnenblumen im Vergleich zu Rapspflanzen verantwortlich sein.
- **Cadmium** und **Kupfer** sind in Sonnenblumenwurzeln auch an niedermolekulare Komponenten gebunden (15-7 kD). Dagegen ist Cadmium in Rapswurzeln ausschließlich und Kupfer zu einem hohen Anteil (40 %) in Fraktionen mittel- bis hochmolekularer Komponenten (< 600 - 40 kD) enthalten. Diese werden durch Mercaptoethanol in Unterheiten mit einer Molmasse von 12 kD gespalten.

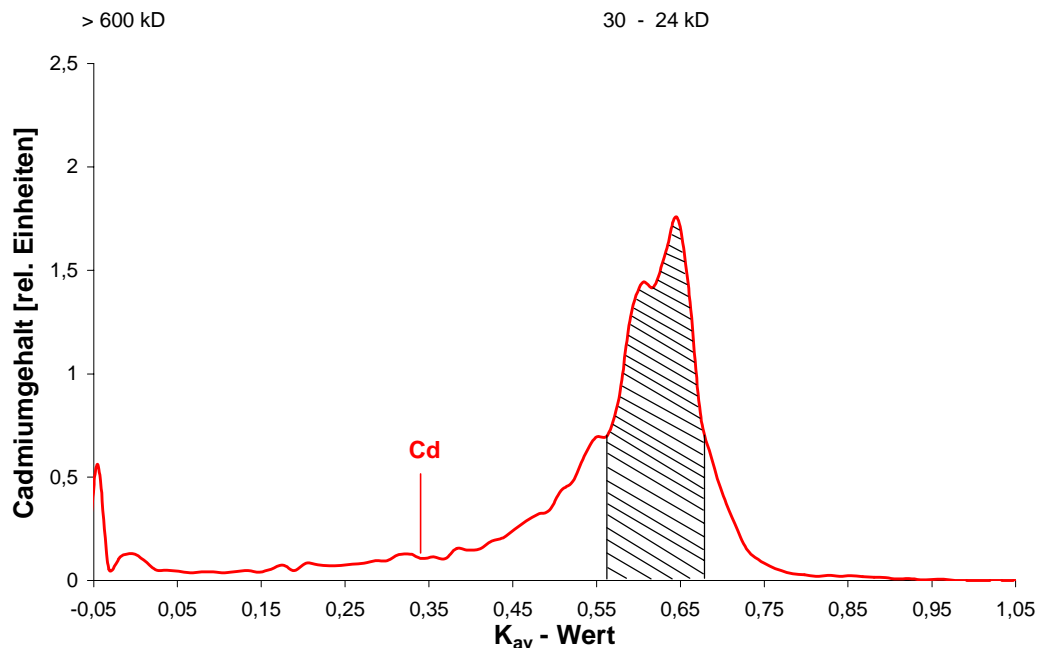
- **Nickel** und **Zink** sind in Rapswurzeln ausschließlich niedermolekular (< 0,1 kD) gebunden. Dagegen werden aus Sonnenblumenwurzeln auch Nickel- und Zinkspezies mit Molmassen von 7-10 kD extrahiert. Diese Zink-Bindungsformen werden unter dem Einfluss von Mercaptoethanol in Untereinheiten von 0,8 kD gespalten.

## 7 Isolierung von Cadmium-bindenden Substanzen aus Sonnenblumen und Raps

In Kapitel 1.7 ist beschrieben, dass die Cadmium-Bindungsformen in Sonnenblumen und Raps bisher wenig bekannt sind. Einzig in den Blättern wurden bisher Cadmium-Phytochelatine nachgewiesen [182, 210, 236]. Daher werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit Cadmium-bindende Komponenten aus Sonnenblumenkernen und Rapssamen sowie aus den Wurzeln von Sonnenblumen- und Rapspflanzen isoliert und strukturanalytisch untersucht.

Für die Isolierung der Cadmium-Bindungsformen aus den Wurzeln werden Pflanzen verwendet, die unter definierten Bedingungen in Cadmium-dotierter Nährlösung angezogen wurden (vgl. Kap. 3). Es ist notwendig auf die unter Hydrokulturbedingungen angezuchteten Pflanzen als Modellpflanzen auszuweichen, weil die Cadmium-bindenden Substanzen in den aus der landwirtschaftlichen Praxis stammenden Pflanzen in zu geringer Konzentration vorliegen (vgl. Abbildung 49 und 51).

Die Isolierung der Cadmium-Bindungsformen aus Pflanzenkompartimenten folgt immer dem gleichen Schema und soll exemplarisch am Beispiel von Sonnenblumenwurzeln (Abbildung 56) beschrieben werden (vgl. 1.8).

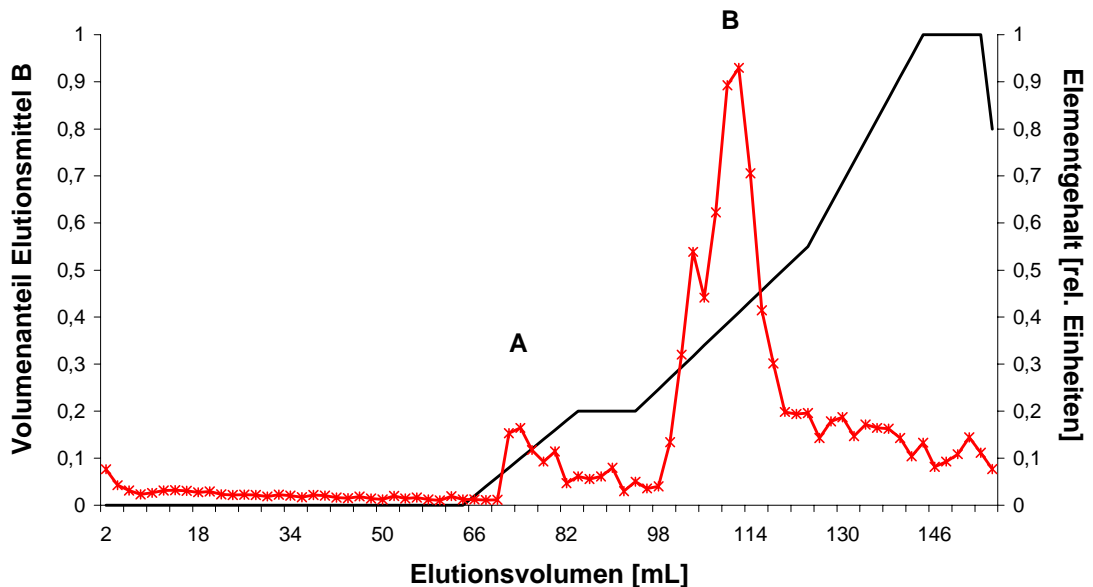


**Abb. 56: Sonnenblumenwurzeln (Anzucht in Hydrokultur, 1  $\mu\text{mol/L}$  Cd):  
Cadmium-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**

**Cd (1 Einheit 5 ng/mL);** Extraktionsbedingungen vgl. Abbildung 30.

Zunächst werden die Cadmium-haltigen Substanzen aus dem Molmassenbereich von 20 - 35 kD gelchromatographisch von Begleitsubstanzen

getrennt (Abbildung 58, gekennzeichnete Bereich) und nachfolgend mit der Ionenaustauscherchromatographie (IAC) weiter gereinigt (Abbildung 59). Die Chromatographie an Bio-Scale Q5 ergab, dass die aus Sonnenblumen- und Rapswurzeln isolierten Cadmium-bindenden Komponenten zunächst vollständig retardiert werden (Abbildung 57, A34) und anschließend mit einem NaCl-Gradienten eluiert werden.



**Abb. 57: Elutionsprofil der Cadmium-bindenden Substanzen aus Sonnenblumenwurzeln (Molmasse 25kD)**

SBK: **Cd** (1 Einheit 7 ng/mL);  
 Laufmittel A: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);  
 Laufmittel B: 1 mol/L NaCl in Tris-HCl (pH 8,0; 0,05 mol/L).

### Sonnenblumenwurzeln

Sowohl für die unter nicht-reduzierenden (Abbildung 56) als auch unter reduzierenden Bedingungen (Abbildung A23) durch GFC isolierten Cadmium-Bindungsformen lassen sich bei der IAC zwei Hauptfraktionen unterscheiden:

#### **Nicht-reduzierende Bedingungen** (Abbildung 57):

**Substanz A:** 10 % des Cadmiums; 0,10-0,15 mol/L NaCl.

**Substanz B:** 60 % des Cadmiums; 0,38-0,45 mol/L NaCl.

#### **Reduzierende Bedingungen** (Abbildung A33):

**Substanz A:** 50 % des Cadmiums; 0,10-0,15 mol/L NaCl.

**Substanz B:** 20 % des Cadmiums; 0,38-0,45 mol/L NaCl.

Die Fraktionen der Cadmium-haltigen Substanzen A und B der IAC werden gepoolt und anschließend an Sephadex G25 entsalzen.

Die Cadmium-haltigen Fraktionen im Ausschlussvolumen der Entsalzungssäule (> 4kD) werden vereinigt und gefriergetrocknet. Es werden unter reduzierenden Bedingungen 4,6 mg der **Substanz A** und 1,5 mg der **Substanz B** erhalten.

### Rapswurzeln

Ebenso wie zuvor für Sonnenblumenwurzeln beschrieben, wurden auch aus Rapswurzeln Cadmium-haltige Komponenten im Molmassenbereich von 25-35 kD isoliert (Abbildung A27 und A28). Bei der nachfolgenden IAC werden für die unter nicht-reduzierenden Bedingungen isolierten Komponenten drei Cadmium-haltige Fraktionierbereiche nachgewiesen (Abbildung A34):

- Substanz I:** 2 % des Cadmiums; 0,15 mol/L NaCl,
- Substanz II:** 40 % des Cadmiums; 0,45 mol/L NaCl,
- Substanz III:** 25 % des Cadmiums; 0,78 mol/L NaCl.

Unter reduzierenden Bedingungen (Abbildung A34) werden demgegenüber zwei Cadmium-haltige Fraktionierbereiche beobachtet:

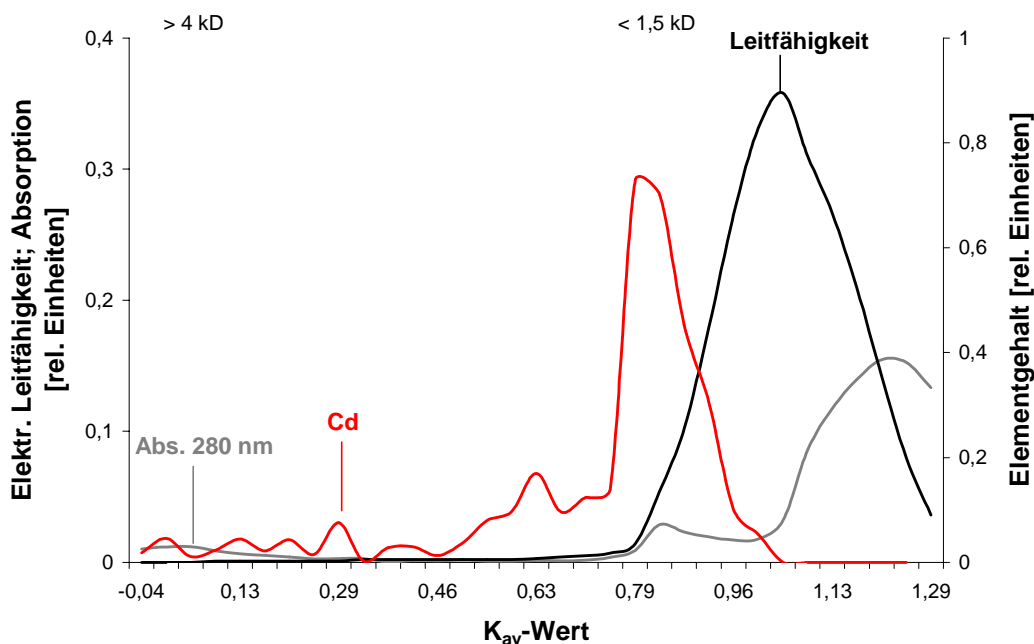
- Substanz Ia:** 40 % des Cadmiums; 0,15 mol/L NaCl,
- Substanz IIa:** 40 % des Cadmiums; 0,45 mol/L NaCl.

Bei der Isolierung ohne Zusatz von Mercaptoethanol wurden 1,2 mg der **Substanz I** und 6,9 mg der **Substanz II** erhalten. Substanz III konnte nicht isoliert werden, weil möglicherweise Cadmium während des Umpufferns abgespalten wurde.

Die Isolierung der Cadmium-Bindungsformen unter reduzierenden Bedingungen ergab 4,5 mg der **Substanz Ia** und 1,5 mg der **Substanz IIa**.

### Sonnenblumenkerne und Rapssamen

Für Sonnenblumenkerne und Rapssamen wurden die Cadmium-Bindungsformen des Molmassenbereiches von 20-25 kD ausgewählt (Abbildung 37 und 39), die unter reduzierenden Bedingungen die bevorzugte Bindungsform für Cadmium sind und möglicherweise Untereinheiten von hochmolekularen Speicherproteinen wie Helianthinin und Cruciferin darstellen (vgl. 6.1, 6.2).



**Abb. 58: Entsalzung der durch IAC gereinigten Cadmium-Bindungsformen aus Sonnenblumenkernen und Rapssamen**

Cd (1 Einheit 1 ng/mL);

Leitfähigkeit (1 Einheit 0,1  $\mu$ S); Absorption 280 nm (1 Einheit 0,1 mV).

Wie Abbildung 58 zeigt, eluieren die aus den Sonnenblumenkernen und Rapssamen isolierten und mit IAC gereinigten Cadmium-bindenden Komponenten nicht im Ausschlussvolumen ( $> 4$  kD) der Entsalzungssäule, obwohl dieses auf Grund der Molmasse von 20-25 kD zu erwarten wäre.

Demnach haben sich während der Aufkonzentrierung (IAC, Abbildung A31) oder der Entsalzung an Sephadex G25 die aus Sonnenblumenkernen und Rapssamen isolierten Cadmium-bindenden Komponenten chemisch verändert. Der Verlauf der UV-Absorption bei 280 nm zeigt, dass die Cadmium-Bindungsformen noch nicht von sämtlichen Begleitstoffen getrennt werden (Abbildung 58). Es ist daher möglich, dass  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen aus den ursprünglichen (nativen) Bindungsformen herausgelöst werden und mit anderen Komplexbildnern reagieren.

Für die Isolierung der Cadmium-bindenden Komponenten aus Sonnenblumenkernen und Rapssamen ist somit eine andere Strategie erforderlich. Denkbar ist z.B. der Einsatz von Ultrafiltration kombiniert mit der präparativen Isoelektrischen Fokussierung (IEF). Bei dieser Methode würden die Cadmium-Bindungsformen nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es allerdings nicht mehr möglich, diese Methoden anzuwenden.

Im Folgenden wurden die aus Sonnenblumen- und Rapswurzeln unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen isolierten Cadmium-haltigen Substanzen durch Fluoreszenz-HPLC, Aminosäureanalyse und ESI-MS strukturanalytisch untersucht.

## 8 Strukturanalytische Untersuchungen der aus Sonnenblumen- und Rapswurzeln isolierten Cadmium-bindenden Substanzen

### 8.1 Fluoreszenz-HPLC

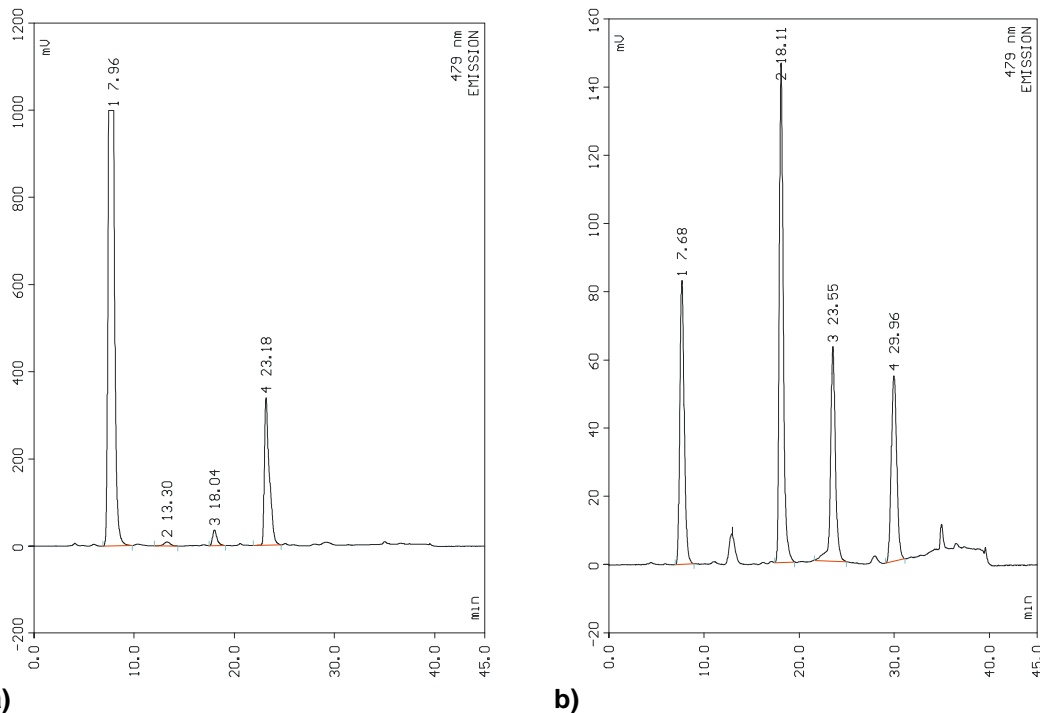
Wie in Kapitel 1.9 beschrieben, wird mit der Fluoreszenz-HPLC geprüft, ob die aus den Wurzeln isolierten Cadmium-haltigen Substanzen Thiolgruppen enthalten. Der Nachweis von Thiolgruppen wäre ein Hinweis auf cysteinreiche Proteine [289-293].

Jeweils ein Teil der aus Raps- und Sonnenblumenwurzeln isolierten und lyophilisierten Cadmium-bindenden Komponenten wird mit Monobrombiman derivatisiert (vgl. 11.5). Monobrombiman reagiert mit Thiolgruppen unter Bildung von fluoreszierenden Thioethern, die mit der Fluoreszenz-HPLC quantifiziert werden.

Abbildung 59 a zeigt für die aus Rapswurzeln isolierte **Substanz IIa** das erhaltene Chromatogramm, das mit den anderen Chromatogrammen der aus Sonnenblumen- und Rapswurzeln isolierten Cadmium-Bindungsformen nahezu übereinstimmt (Dnp). Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 59 b das Chromatogramm des reinen Derivatisierungsreagenz.

Da Monobrombiman selbst eine fluoreszierende Substanz ist, wird es aus dem Derivatisierungsgemisch durch die Reaktion mit Thiolagarose entfernt (vgl. 11.5), damit keine störenden HPLC-Signale auftreten. Allerdings führt

die Hydrolyse von Monobrombiman doch zur Bildung weiterer fluoreszierender Verbindungen [290], deren Signale in Abbildung 59 b zu erkennen sind.



**Abb. 59 a/b:** Chromatogramme der Fluoreszenz-HPLC für die aus Raps-  
wurzeln isolierte Substanz IIa (a) sowie für Monobrombiman (b)  
**Laufmittel A:** 10 % (v/v) Methanol, 0,25 % (v/v) Essigsäure, pH 3,9  
**Laufmittel B:** 90 % (v/v) Methanol, 0,25 % (v/v) Essigsäure, pH 3,9  
**Detektion:** Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}}$ : 268 nm  
 Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{em}}$ : 479 nm

Beim Vergleich von Abbildung 59 a mit 59 b fällt auf, dass die im Chromatogramm der Substanz II zu erkennenden Peaks ausschließlich Hydrolyseprodukten von Monobrombiman zuzuordnen sind. Signale von Thiolgruppen-haltigen Substanzen, wie z.B. Cystein, sind nicht zu erkennen. Demnach enthalten die aus Sonnenblumen und Rapswurzeln isolierten Cadmium-haltigen Substanzen keine nachweisbaren Thiolgruppen.

## 8.2 Aminosäureanalyse der aus Sonnenblumen- und Rapswurzeln isolierten Cadmium-Bindungsformen

Die lyophilisierten Cadmium-bindenden Substanzen aus Sonnenblumen- und Rapswurzeln werden zunächst, um das Cystein zu Cystinsäure zu oxidieren, mit Perameisensäure oxidiert [328] und auf ihre Aminosäuregehalte analysiert<sup>1</sup>. Tabellen 29 -31 zeigen die Ergebnisse der Aminosäureanalyse (vgl. 11.13).

<sup>1</sup> Herrn Dr. W. Sailmeier von der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie in München-Garching ist für die Durchführung der Aminosäureanalysen zu danken.

**Tab 29: Aminosäureanalyse der aus Sonnenblumenwurzeln unter reduzierenden Bedingungen isolierten Cadmium-bindende Substanzen (Abb. 57)**

Aminosäure	Substanz A		Substanz B	
	[nmol]	[mol %]	[nmol]	[mol %]
Ser	0,658	23	0,284	20
His	0,604	21	-	-
Gly	0,565	20	0,301	21
Ala	0,272	10	0,223	16
Asp	0,207	7	0,112	8
Glu	0,143	5	0,111	8
Val	0,131	5	-	-
Cys	0,117	4	0,212	15
Thr	0,112	4	0,045	3
Lys	0,107	4	0,058	4
Leu	0,086	3	0,059	4
Ile	0,069	2	0,046	3

**Tab 30: Aminosäureanalyse der aus Rapswurzeln unter nicht-reduzierenden Bedingungen isolierten Cadmium-bindenden Substanzen (Abb. A33)**

Aminosäure	Substanz I		Substanz II	
	[nmol]	[mol %]	[nmol]	[mol %]
Ser	0,198	20	0,286	22
His	0,179	18	-	-
Gly	0,197	20	0,252	20
Ala	0,137	14	0,161	13
Asp	0,052	5	0,090	7
Glu	0,005	1	0,059	5
Val	0,018	2	0,067	5
Cys	0,08	8	0,222	20
Thr	0,018	2	0,036	3
Lys	0,077	8	0,055	4
Leu	-	-	0,018	2
Ile	0,019	2	0,024	2

**Tab 31: Aminosäureanalyse der aus Rapswurzeln unter reduzierenden Bedingungen isolierten Cadmium-bindenden Substanzen (Abb. A34)**

Aminosäure	Substanz Ia		Substanz IIa	
	[nmol]	[mol %]	[nmol]	[mol %]
Ser	0,510	24	0,307	25
His	0,345	16	-	-
Gly	0,378	18	0,290	24
Ala	0,233	11	0,123	10
Asp	0,146	7	0,086	7
Glu	0,122	6	-	-
Val	0,07	3	-	-
Cys	0,096	5	0,167	14
Thr	0,077	4	0,077	6
Phe	0,026	1	0,064	5
Lys	-	-	0,036	3
Leu	0,059	3	0,240	2
ILe	0,051	3	0,045	4

Die Aminosäureanalysen (Tabelle 29-31) ergeben als Hauptkomponenten die Aminosäuren Serin, Alanin und Glycin. Auffällig ist, dass die Aminosäureanalyse für die aus Sonnenblumen isolierte **Substanz A** (Tabelle 29) die gleiche Zusammensetzung ergibt wie für die aus Rapswurzeln isolierte **Substanz I** (Tabelle 30) und **Substanz Ia** (Tabelle 31). Diese Cadmiumhaltigen Substanzen sind reich an Histidin, enthalten nur sehr wenig Cystein.

Die aus Sonnenblumenwurzeln isolierte **Substanz B** und die aus Rapswurzeln isolierte **Substanz II** besitzen die gleiche Aminosäurezusammensetzung. Neben den Hauptbestandteilen Serin, Glycin und Alanin enthalten diese Cadmium-Bindungsformen Cystein, aber kein Histidin.

Die Ergebnisse der Aminosäureanalysen (Tabelle 29-31) in Verbindung mit der Fluoreszenz-HPLC führen zu der Schlussfolgerung, dass die aus Sonnenblumen- und Rapswurzeln isolierten Cadmium-bindenden Substanzen keine Phytochelatine sind. Denn Phytochelatine bestehen hauptsächlich aus den drei Aminosäuren Glutamin, Cystein, Glycin im Verhältnis 3:3:1 [44, 143, 167, vgl. 1.6.4]. Diese stöchiometrischen Verhältnisse entsprechen nicht den Analyseergebnissen.

Möglicherweise handelt es sich bei den isolierten Substanzen um „Stressproteine“ [13], welche für zahlreiche Pflanzen beschrieben sind und Schwermetalle über S-freie Donorgruppen koordinieren können. Es wurde gezeigt, dass die DNA von Zellen, die Cadmiumstress ausgesetzt sind, mRNA-Transkripte produzieren, welche die Bildung von Stressproteinen regulieren [13]. In Wurzeln der Gartenbohne *Phaseolus vulgaris* wurden Stressproteine mit Molmassen von 42 kD [329] sowie 52 und 19 kD [330] nachgewiesen. In Zellsuspensionskulturen des großblütigen Stechapfels



*Datura innoxia* induzierte Cadmium die Bildung von Stressproteinen mit Molmassen von 70-20 kD [331]. LEVINSON ET AL. berichten zudem, dass durch Hitzestress induzierte Proteine bei der Gelfiltration zusammen mit Proteinen eluieren, die durch Cadmium-, Kupfer-, Quecksilber- bzw. Zinkstress induziert werden [332]. Die genaue Struktur und die Funktionen insbesondere der kleineren Stressproteine sind bisher noch nicht aufgeklärt [13]. Die Bestimmung der Aminosäuresequenz für das Stressprotein hsp70 aus dem Apfelbaum *Malus domestica* ergab eine Aminosäurekette von mehreren hundert Aminosäuren [333].

In diesem Zusammenhang könnte auch ein Cadmium-bindendes Protein mit der Molmasse von 12 kD von Bedeutung sein, welches aus dem Pilz *Agaricus macrosporus* isoliert wurde [334].

**Tab. 32: Aminosäurezusammensetzung einer Cadmium-bindenden Substanz aus dem Pilz *Agaricus macrosporus* [334]**

Aminosäure	[mol %]
Glutaminsäure	20,3
Asparaginsäure	15,0
Glycin	16,5
Alanin	8,2
Serin	7,8
Prolin	7,1
Lysin	4,6
Threonin	4,3
Phosphoserin	4,2
Valin	3,6
Leucin	2,5
Arginin	1,9
Histidin	1,7
Isoleucin	1,6
Phenylalanin	1,0

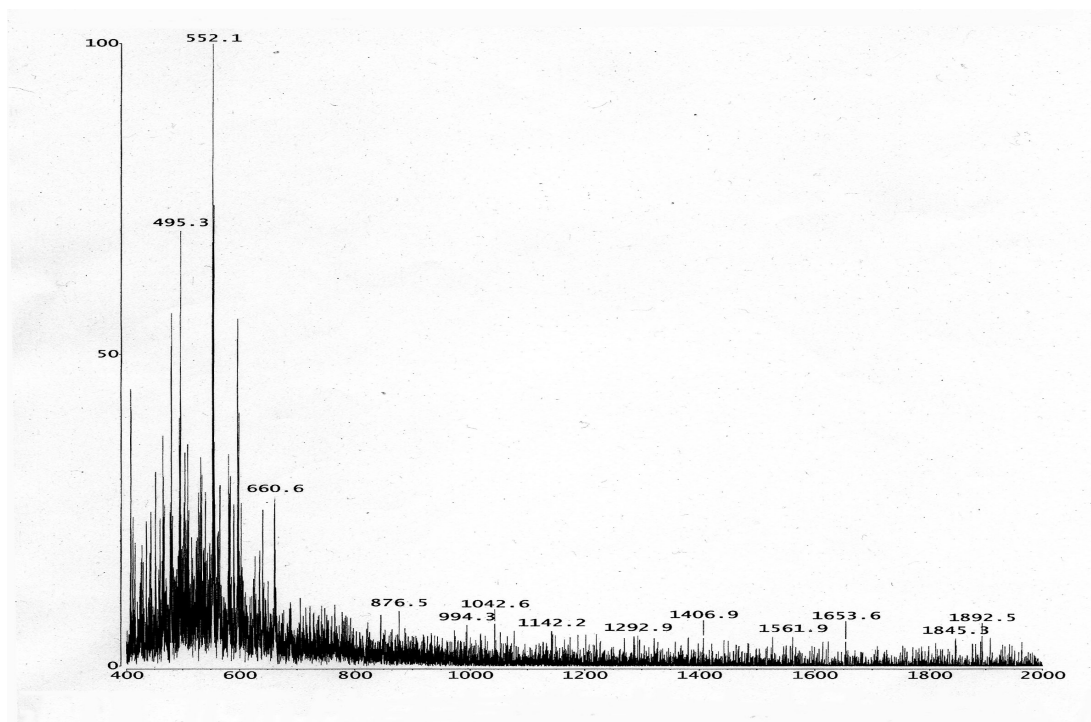
Dieses Cadmium-haltige Protein enthält, ähnlich wie die aus Sonnenblumen- und Rapswurzeln isolierten Substanzen A und I, ebenfalls kein Cystein und als Hauptbestandteile Glutaminsäure, Asparaginsäure, Glycin, Serin und Alanin (Tabelle 32). Eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung ist auch für zwei Kupfer-bindende Proteine aus dem Riesenstraußgras *Agrostis gigantea* beschrieben [335].

### 8.3 ESI-MS (Ion-Trap, LCQ)

Für die Untersuchungen mit der **ESI-MS** stand nur von der aus **Rapswurzeln** unter nicht-reduzierenden Bedingungen isolierten **Substanz II** ausreichend Probenmaterial zur Verfügung. Abbildung 60 zeigt das Massenspektrum dieser Substanz.

Bei den im Folgenden präsentierten Messungen mit der ESI-MS handelt es sich um Vorversuche, die eine weitere Optimierung der Messbedingungen erfordern. Die gewählten Bedingungen orientieren sich an Untersuchungen

von YEN ET AL., die mit einem LCQ Ion Trap-Massenspektrometer (ThermoFinnigan) Phytochelatine nachgewiesen haben [298]. Die massenspektrometrischen Messungen wurden im positiv-Modus durchgeführt.



**Abb. 60: ESI-MS-Spektrum der aus Rapswurzeln unter nicht-reduzierenden Bedingungen isolierten Cadmium-bindenden Substanz II (LCQ Advantage, ThermoFinnigan)**

Probenaufgabe:	50 $\mu$ L/min
Temperatur Transferkapillare:	250 $^{\circ}$ C
Spannung ESI-Nadel	5 kV
Sheath-Gas	Stickstoff, 25
Kapillarspannung:	35 V
Tube lens:	5 V
m/z-Bereich:	250-2000

Das registrierte Massenspektrum (Abbildung 60) zeigt keinerlei Ähnlichkeiten mit den für Phytochelatine publizierten Spektren. Daher kann es sich bei der aus Rapswurzeln isolierten Cadmium-haltigen Substanz II nicht um ein Phytochelatin handeln.

Die Massenspektren der Phytochelatine werden unter Electrospray-Bedingungen von protonierten Molekül-Massenpeaks  $[M+H]^+$  und wenigen Fragment-Ionen dominiert [174], deren zu erwartende m/z-Verhältnisse (Tabelle 33) mit den aus Abbildung 60 abzulesenden Masse-Ladungs-Verhältnissen nicht übereinstimmen.

Bei Molekülen mit einer molaren Masse < 1000 g/mol werden in der Regel einfach positiv bzw. negativ geladene Quasimolekülionen beobachtet. Diese entstehen durch Protonierung  $[M+H]^+$  oder Kationenanlagerung  $[M+Kat]^+$  mit **Kat** = **Na**, **K** bei positiver Ionendetektion. Im Fall von negativer Polarität werden intensive Ionen des Typs  $[M-H]^-$  gebildet.

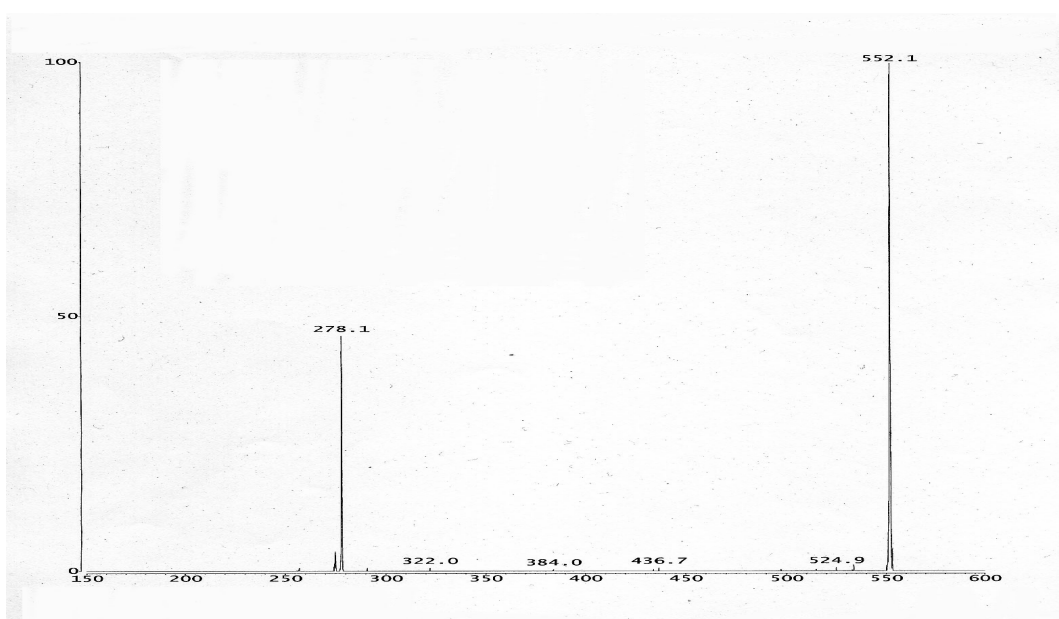
Tabelle 33 gibt einige der für Phytochelatine zu erwartenden Masse-Ladungsverhältnisse für PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub> wieder [188, 297, 298].

**Tab. 33: Aufstellung der für PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub> zu erwartenden Massenpeaks bei der ESI-MS [188, 336]**

Die nachfolgend aufgeführten Massenpeaks wurden an einem LCQ-Gerät (Thermo Finnigan) mit PC<sub>2</sub> und PC<sub>3</sub> Standardsubstanzen ermittelt.

m/z	Phytochelatin	Identifikation
538	PC <sub>2</sub> [MH] <sup>+</sup>	intramolekular oxidiertes PC <sub>2</sub>
539	PC <sub>2</sub> [M+1H] <sup>+</sup>	intramolekular oxidiertes PC <sub>2</sub>
540	PC <sub>2</sub> [MH] <sup>+</sup>	
541	PC <sub>2</sub> [M+1H] <sup>+</sup>	
542	PC <sub>2</sub> [M+2H] <sup>+</sup>	
562	PC <sub>2</sub> [M+Na] <sup>+</sup>	Bildung von [M+Na] statt [M+H]
578	PC <sub>2</sub> [M+K] <sup>+</sup>	Bildung von [M+Na] statt [M+H]
772	PC <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup>	
794	PC <sub>3</sub> [M+Na] <sup>+</sup>	Bildung von [M+Na] statt [M+H]
810	PC <sub>3</sub> [M+K] <sup>+</sup>	Bildung von [M+Na] statt [M+H]

Es ist zu vermuten, dass Substanz II bei der ESI-MS mehrfach geladene Fragmentationen bildet. Diese Vermutung wird auch von Stoßexperimenten (MSMS) mit Helium für Ionen mit dem m/z-Verhältnis von 552,1 bestätigt. Abbildung 61 zeigt das entsprechende Massenspektrum.

**Abb. 61: Spektrum bei der ESI-MSMS der aus Rapswurzeln isolierten Substanz II (LCQ Advantage, ThermoFinnigan)**

Probenaufgabe: 50 µL/min  
 Temperatur Transferkapillare: 250 °C  
 Spannung ESI-Nadel: 5 kV  
 Sheath-Gas: Stickstoff, 25  
 Kapillarspannung: 35 V  
 Tube lens: 5 V

**normierte Kollisionsenergie: 20 %**

Stoßgas: Helium

Bei einer Kollisionsenergie von 40 % ist das Signal bei m/z = 552 nicht mehr nachweisbar.

Für das Ion (Precursor) mit dem Masse-Ladungsverhältnis 552,1 ist eine Fragmentierung in Produktionen mit  $m/z = 278,1$  festzustellen (Abbildung 61), wobei ab einer normierten Kollisionsenergie von 40 % ausschließlich die Fragmentionen vorliegen. Diese Beobachtung ist als ein Hinweis auf eine Dimerisierung der Cadmium-bindenden Substanz II zu interpretieren und könnte durch die Annahme einer Vierfach-Ionisierung der Precursor- und Produkt-Ionen erklärt werden:

**Precursor-Ion:**

Ionen-Peak  $[M+H+H+H+H]^{4+}$ :  $m/z = 552,1$   
Masse des Moleküls: 2192,4 g/mol

**Produkt-Ion**

Produkt-Ionen  $[M+H+H+H+H]^{4+}$ :  $m/z = 278,1$   
Molekülmasse des Produktes: 1096,2 g/mol

Die aus Rapswurzeln isolierte Cadmium-bindende Substanz wurde auch bei höherer Temperatur (300 °C) und einer Kapillarspannung von 13 V mit der ESI-MS untersucht (Abbildung A35). Hierbei überwiegt im Massenspektrum ein Masse-Ladungsverhältnis von 353,3. Auch dieses ist als Hinweis zu interpretieren, dass die Cadmium-Bindungsform (Substanz II) aus Rapswurzeln mehrfach geladene Molekül-Ionen bildet.

## 9 Fazit

Das Ziel dieser Arbeit ist, die Ursachen für die unterschiedlichen Cadmium- und Nickelgehalte in Sonnenblumenkernen und Rapssamen aufzuklären. Hierzu wurden bei Sonnenblumen und Raps vergleichende Untersuchungen bezüglich Transport, Verteilung und Bindungsformen von Cadmium und Nickel sowie Kupfer und Zink durchgeführt.

### Cadmium

Die Untersuchungen zur Cadmiumverteilung in Sonnenblumen- und Rapspflanzen zeigen, dass die niedrigen Cadmiumgehalte in den Rapssamen auf eine **physiologische Barriere** zurückzuführen sind.

Der Cadmiumgehalt ist in den Grundorganen (Wurzel, Stängel, Blätter, Schoten) von Raps annähernd gleich hoch, in den Rapssamen dagegen um den Faktor sechs niedriger (Tabelle 11). Rapssamen sind in den Rapsschoten in eine Plazenta eingebettet. Es wird daher vorgeschlagen, dass die Plazenta eine **physiologische Barriere** für Cadmium darstellt.

Demgegenüber ist für Sonnenblumen ein abnehmender Gradient für die Cadmiumverteilung von der Wurzel bis zur Frucht zu beobachten (Tabelle 7).

Die Anteile an löslichen, extrahierbaren Cadmium-Bindungsformen in den verschiedenen vegetativen Pflanzenteilen von Sonnenblumen und Raps sind ähnlich (Abbildung 62). Die Löslichkeit dieser Bindungsformen ist daher kein wesentlicher Faktor für die unterschiedliche Schwermetallverteilung in Sonnenblumen und Raps.

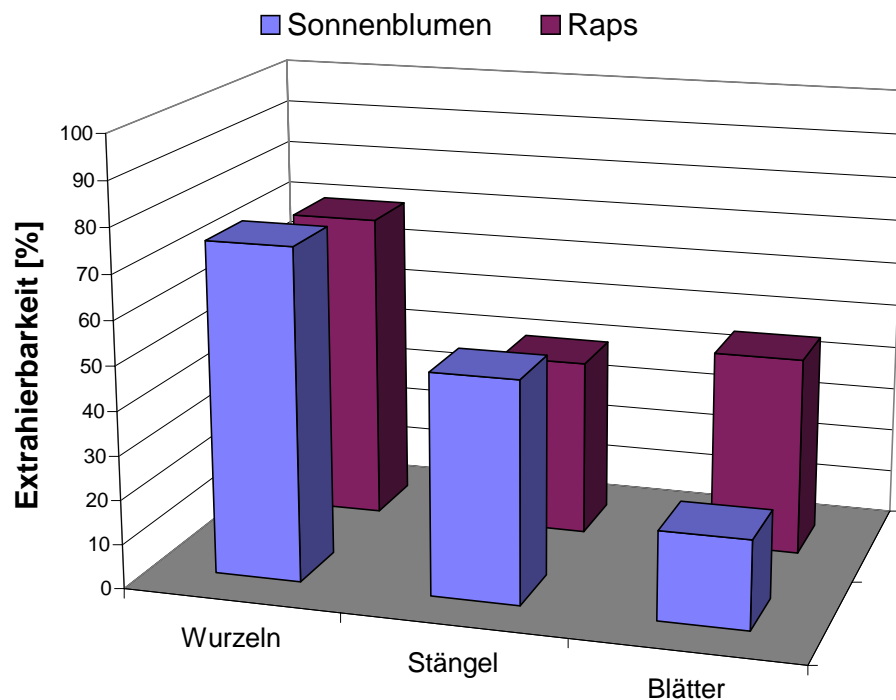


Abb. 62: Vergleich der Extrahierbarkeit von Cadmium aus den vegetativen Pflanzenteilen von Raps und Sonnenblumen

Im Folgenden werden Ergebnisse der Bindungsform-Analysen, unter Berücksichtigung der gelchromatographisch getroffenen Zuordnungen von Molmassen aufgeführt, die bei den untersuchten Ölpflanzen Gemeinsamkeiten und Ähnlichkeiten für Cadmium charakterisieren.

- ✓ In den **Sonnenblumenkernen** und **Rapssamen** ist Cadmium möglicherweise - ähnlich wie in Sojabohnen [325, 326] - an Speicherproteine, wie Globuline, gebunden. Ferner zeigte sich, dass die Anteile wasserlöslicher Cadmium-Bindungsformen (40-60 %) in Sonnenblumenkernen mit steigendem Reifegrad und längerer Lagerzeit geringer werden, da offenbar niedermolekulare Cadmium-bindende Komponenten zu höhermolekularen (> 600 kD) aggregieren. Aus Raps-samen lässt sich Cadmium nur zu einem vergleichsweise geringen Anteil (25 %) extrahieren.
- ✓ In **Sonnenblumen- und Rapsblättern** sind die Cadmium-bindenden Substanzen über einen weiten Molmassenbereich (50 - 600 kD) verteilt. Der Einsatz von Mercaptoethanol führt zur reduktiven Spaltung (Disulfidbrücken) dieser hochmolekularen Stoffe zu niedermolekularen Untereinheiten, die vermutlich Phytochelatine darstellen.
- ✓ Aus **Rapsblättern** wurden neben den hochmolekularen auch niedermolekulare Cadmium-Bindungsformen (< 0,1 kD) extrahiert, welche wohl die leichte Extrahierbarkeit des Cadmiums aus Rapsblättern (65 %) ermöglichen. Zum Vergleich: Bei Sonnenblumenblättern, die überwiegend hochmolekulare Cadmium-Bindungsformen enthalten, wurde nur ein Extraktionsgrad von 20 % erreicht.
- ✓ Die Elutionsprofile für Schwermetall-bindende Substanzen aus **Sonnenblumen- und Rapswurzeln** unterscheiden sich deutlich. Während in Sonnenblumenwurzeln Cadmium überwiegend an niedermolekulare Substanzen (< 30 kD) gebunden ist, wird in Raps-wurzeln Cadmium ausschließlich höhermolekular (> 40 kD) gebunden.
- ✓ Aus **Sonnenblumen- und Rapswurzeln**, die bei der Anzucht in **Hydrokultur** Cadmiumstress ausgesetzt waren, konnten Cadmium-haltige Komponenten isoliert werden, die jeweils reich an Serin, Glycin und Alanin sind. Mit der IAC konnten zwei Cadmium-haltige Komponenten anhand ihrer Ladung unterschieden werden. Die schwächer negativ geladenen Cadmium-Bindungsformen (Substanz A bzw. Substanz I) enthalten größere Mengen an Histidin, während in den stärker negativ geladenen Cadmium-Bindungsformen (Substanz B bzw. Substanz II) kein Histidin nachweisbar ist. Mit der ESI-MS konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Substanzen nicht um Phytochelatine handelt.

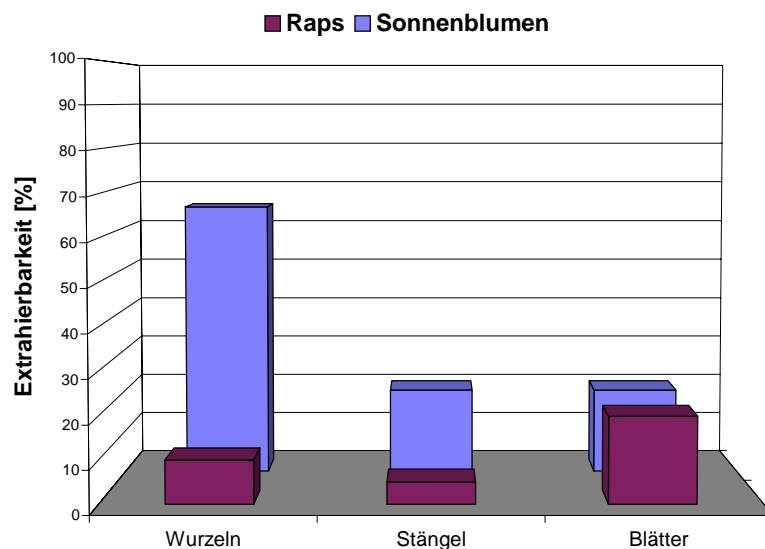
Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass die unterschiedlichen **Cadmium-Bindungsformen** die in Sonnenblumen- und Rapspflanzen gebildet werden, nicht für die beobachteten Unterschiede im Cadmiumgehalt von Sonnenblumenkernen und Rapssamen verantwortlich sind.

## Nickel

Für Nickel ist zu dagegen festzustellen, dass die Bindungsformen einen entscheidenden Einfluss auf die Nickel-Verteilung in Sonnenblumen und Rapspflanzen aufweisen.

Nickel ist aus den Wurzeln und dem Stängel von Sonnenblumen zu einem hohen Anteil zu extrahieren. Der hohe Extraktionsgrad des Nickels aus Sonnenblumenwurzeln (65 %) kann als Indiz gewertet werden, dass Nickel in Sonnenblumen in größerem Maße von der Wurzel in den Spross und damit auch in die Sonnenblumenkerne verlagert werden kann (Abbildung 63).

Anders dagegen in **Rapswurzeln** und **-stängeln**, aus denen Nickel fast nicht zu extrahieren ist (Abbildung 63).



**Abb. 63: Vergleich der Extrahierbarkeit von Nickel aus den vegetativen Pflanzenteilen von Raps und Sonnenblumen**

Dieses ist als Hinweis zu interpretieren, dass Nickel in Rapswurzeln überwiegend an unlösliche Zellbestandteile gebunden und daher in den Wurzeln und im Stängel nur zu einem geringen Anteil mobil ist (vgl. 1.6.1). Ein solches Verhalten ist bisher ausschließlich für Nickel-Hyperakkumulatoren wie das Täschelkraut *Thlaspi goesingense* beschrieben [122, 123].

Diese Beobachtung könnte auch erklären, warum der Nickel-Gehalt in den Wurzeln von Rapspflanzen mit 4 mg/kgTS um den Faktor 5-10 höher ist als in den Blättern (0,69 mg/kgTS) bzw. den Samen (~ 0,4 mg/kgTS).

Die Untersuchungen der löslichen **Nickel-Bindungsformen** zeigen, dass sowohl in den vegetativen und generativen Pflanzenteilen von Sonnenblumen als auch Raps Nickel bevorzugt an niedermolekulare Substanzen (~ 0,1 kD) gebunden ist. Bei diesen Bindungsformen könnten z.B. nicht-peptidische Chelatbildner wie Citrat, Malat oder Histidin beteiligt sein.

Abschließend ist festzustellen, dass Rapspflanzen offenbar über eine physiologische Barriere für Cadmium verfügen, die anscheinend in der Plazenta, welche die heranreifenden Samen versorgt, lokalisiert ist.

Anders ist die Situation beim **Nickel**, das sich aus den Wurzeln und dem Stängel von Rapspflanzen nur spurenweise extrahieren lässt, da es überwiegend an unlösliche Zellbestandteile gebunden und somit nur gering mobil ist.

Im Unterschied dazu belegt der hohe Extraktionsgrad des Nickels (65 %) aus Wurzeln der Sonnenblumen, dass mehr Nickel für den Weitertransport aus der Wurzel in den Spross bis zu den Samen verfügbar ist als in Raps.



## 10 Zusammenfassung

Sonnenblumen- und Rapssaaten, die eine große Bedeutung für die menschliche Ernährung (Speiseöle) und als Futtermittelzusatzstoffe (proteinhaltige Pressrückstände) in der Tiermast haben, enthalten toxikologisch relevante Schwermetalle. Ölsaaten stellen daher eine Eintragsquelle für Schwermetalle in die Nahrungskette dar. Untersuchungen an der BAGKF Detmold hatten ergeben, dass trotz der physiologischen Ähnlichkeit beider Saaten der Cadmium-Gehalt von Sonnenblumenkernen (~ 0,5 mg/kg TS) zehnmal und der Nickel-Gehalt (~ 5 mg/kg TS) fünfmal höher ist als in Rapssamen. Derartig auffällige Unterschiede traten bei Kupfer, Eisen und Zink nicht auf. Mit welchen Schutzmechanismen gelingt es den Rapspflanzen, die Schwermetallkonzentrationen niedriger zu halten?

Aus dieser Fragestellung resultierte die zentrale Zielsetzung dieser Arbeit, die einen Beitrag zur Aufklärung der Ursachen für die unterschiedlichen Schwermetallgehalte von Raps- und Sonnenblumensaaten leistet. Dazu wurden umfangreiche analytische Untersuchungen zur Verteilung und zum Transport der Schwermetalle Cadmium, Nickel, Kupfer, Eisen, Zink sowie ihrer Bindungsformen in Sonnenblumen- und Rapspflanzen durchgeführt. Neben Ölpflanzen aus landwirtschaftlicher Praxis wurden unter kontrollierten Bedingungen (Klimakammern) Pflanzen in Hydrokultur mit und ohne Schwermetalldotierung angezogen und analysiert.

Die **Verteilung der Schwermetalle** in den Pflanzen wurde durch Analyse der **Schwermetalltotalgehalte** der Grundorgane Wurzel, Stängel, Blatt und Frucht bestimmt. Analysen von Zellorganellen (Chloroplasten, Mitochondrien, Peroxisomen) auf Schwermetallpools ergaben erste Hinweise zur intrazellulären Verteilung auf diese Zellkompartimente. Ergebnisse zum **Ferntransport** von Schwermetallen wurden durch Analysen von Xylemsaft erhalten.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Cadmium-, Nickel-, Kupfer-, Eisen- und Zinkgehalte der verschiedenen Pflanzenteile von Rapspflanzen allgemein niedriger sind als von Sonnenblumenpflanzen. Cadmium ist auf die vegetativen Pflanzenteile von Raps annähernd gleich verteilt, im Rapssamen aber mit 0,04 mg/kg TS um den Faktor sechs niedriger enthalten. Allerdings wurde beim Raps ein Konzentrationssprung zwischen Schote und Samen festgestellt, bei Sonnenblumen dagegen ein abnehmender Gradient der Cadmiumgehalte von der Wurzel über den Pflanzenkörper bis zur Frucht und den Samen.

Rapspflanzen verfügen offenbar über eine physiologische Barriere für Cadmium, die wohl in der Plazenta, welche die heranreifenden Samen versorgt, lokalisiert ist. Die Zinkaufnahme stieg sowohl bei Sonnenblumen als auch beim Raps drastisch in Cadmium-dotierten Nährlösungen an, ein Effekt, der nicht auf eine Minderung des Pflanzenwachstums durch Cadmiumstress zurückzuführen ist. Vielmehr stiegen auch die Metallgehalte des Xylemsaftes der Ölpflanzen an, was eine verstärkte Metallaufnahme nahe legt.

Zur Untersuchung, ob in der Pflanzenzelle neben der Vakuole noch andere **Zellorganellen** Cadmium und Nickel enthalten, wurden mit einer vormals für andere Pflanzengewebe erprobten Dichtegradienten-Zentrifugationsmethode (Percoll) Chloroplasten als Plastiden, Mitochondrien und Peroxisomen aus angekeimten Samen isoliert und getrennt. Die Ausbeute an intakten Chloroplasten war gering; Plastiden aus ungekeimten Samen wurden nicht isoliert.

Bei Raps wurden gute Ausbeuten (Peroxisomen, Mitochondrien) an intakten Organellen erzielt. Was die **intrazelluläre Verteilung** anbetrifft, wurden in gereinigten Sonnenblumen- und Rapsplastiden weder Cadmium noch Nickel nachgewiesen, wohl aber Kupfer (Plastocyanin enthält Kupfer). In den Peroxisomenfraktionen wurden dagegen Nickel, Cadmium und Zink (Superoxiddismutase) gefunden. Der sehr deutliche Einfluss von EDTA auf die Verteilung der Schwermetalle im Gradienten legt nahe, dass die Peroxisomenfraktionen heterogen waren oder noch andere Organellen (Proteinkörper, Endoplasmatisches Retikulum) enthielten. Wegen der methodenbedingten niedrigen Organellenausbeute waren in den orientierenden Untersuchungen Analysen der Bindungsformen von Cadmium, Nickel und andere Schwermetalle nicht möglich.

**Schwermetall-Bindungsformen** aus den vegetativen und generativen Pflanzenteilen von Sonnenblumen und Raps konnten mit Methoden der Speziierungsanalytik nachgewiesen sowie isoliert und charakterisiert werden. Um zu gewährleisten, dass der native Zustand der löslichen Schwermetall-Bindungsformen so weit wie möglich erhalten blieb, wurden zunächst Verfahren der Probenaufbereitung, wie Homogenisierung, Extraktion mit Tris-HCl-Puffer unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen (Mercaptoethanol-Zusatz) und der gelchromatographischen Auftrennung von Homogenat-Aliquoten in Kombination mit atomspektrometrischen Bestimmungsmethoden, optimiert.

Ausführliche Bilanzierungsstudien belegen, dass die Anteile an löslichen, extrahierbaren **Cadmium-Spezies** in den verschiedenen vegetativen Pflanzenteilen von Sonnenblumen und Raps ähnlich sind. Daraus wird geschlossen, dass die Löslichkeit dieser Bindungsformen kein wesentlicher Faktor für die unterschiedliche Schwermetallverteilung in Sonnenblumen und Raps ist.

Anders verhält sich **Nickel**, das aus Wurzeln und Stängeln von Rapspflanzen nur in Spuren extrahiert werden konnte. Offensichtlich ist Nickel in Raps-wurzeln weitgehend wasserunlöslich und somit wahrscheinlich auch *in vivo* nicht für den Ferntransport verfügbar. Aus Sonnenblumenwurzeln wurden 65% des Nickels extrahiert. Daraus wird abgeleitet, dass bei Sonnenblumen mehr Nickel für den Weitertransport aus der Wurzel in den Spross bis zu den Samen verfügbar ist als in Raps.

Die Identifizierung dieser unterschiedlich verteilten und effizienten „Schwermetall-Barrieren“ wird als ein wesentlicher Beitrag zur Aufklärung der Mechanismen gewertet, die für die unterschiedlichen Schwermetall-Konzentrationen in Raps- und Sonnenblumenpflanzen verantwortlich sind.

Im Folgenden werden weitere Ergebnisse der Bindungsform-Analysen, unter Berücksichtigung gelchromatographisch getroffener Zuordnungen von Molmassen aufgeführt, die bei den untersuchten Ölpflanzen Gemeinsamkeiten und Ähnlichkeiten charakterisieren.

In allen Grundorganen der Sonnenblumen- und Rapspflanzen wurden unterschiedliche Schwermetall-bindende, nieder- und höhermolekulare Komponenten im Molmassenbereich von 10 - 600 kD nachgewiesen.

Es zeigte sich, dass die Anteile wasserlöslicher Cadmiumspezies (40-60 %) in Sonnenblumenkernen mit steigendem Reifegrad und längerer Lagerzeit geringer werden, da offenbar niedermolekulare Cadmium-bindende Komponenten zu höhermolekularen (> 600 kD) aggregieren. Aus Raps-samen lässt sich **Cadmium** nur zu einem vergleichsweise geringen Anteil (25 %) extrahieren. Noch geringere Extraktionsgrade sind für **Nickel** sowohl bei Sonnenblumenkernen als auch bei Rapssamen ermittelt worden.

Der Totalgehalt an **Kupfer** ist in Sonnenblumenkernen und Rapssamen zwar ähnlich, aber die Extrahierbarkeit sehr unterschiedlich. Unabhängig vom verwendeten Redoxmilieu bei der Extraktion (mit und ohne Mercaptoethanol-Zusatz) sind aus Sonnenblumenkernen 60-70 %, aus Rapssamen dagegen lediglich 25 % des Kupfers löslich. Diese Bindungsformen des **Kupfers** sind in Sonnenblumenkernen hauptsächlich niedermolekulare (<2,5 kD) und in Rapssamen dagegen höhermolekulare Pflanzeninhaltsstoffe (25 - 200 kD). Vergleichbare Verhältnisse wurden beim **Zink** beobachtet, das aus beiden Ölsaaten nur mit geringen Extraktionsgraden abtrennbar ist (~15 %): In Sonnenblumenkernen überwiegen niedermolekulare lösliche Zink-Bindungsformen (< 0,1 kD), in Rapssamen Molmassenbereiche von 25 - 200 kD.

In **Sonnenblumen- und Rapsblättern** sind die **Cadmium**-bindenden Substanzen über einen weiten Molmassenbereich (100 - 600 kD) verteilt. Der Einsatz von Mercaptoethanol führt offenbar zur reduktiven Spaltung (Disulfidbrücken) dieser hochmolekularen Stoffe zu niedermolekularen Untereinheiten.

Aus **Rapsblättern** wurden neben den hochmolekularen auch niedermolekulare Cadmium-Bindungsformen (< 0,1 kD) extrahiert, die wohl die leichte Extrahierbarkeit des Cadmiums aus Rapsblättern (65 %) ermöglichen. Zum Vergleich: Bei Sonnenblumenblättern, die überwiegend hochmolekulare Cadmium-Bindungsformen enthalten, wurde nur ein Extraktionsgrad von 20 % erreicht.

**Nickel** und **Zink** sind in Sonnenblumenblättern zu 50 % an Substanzen mit Molmassen von 20 - 600 kD gebunden. Außerdem lassen sich niedermolekulare Nickel- und Zink-Bindungsformen aus Sonnenblumenblättern

herauslösen. Dagegen sind höhermolekulare Nickel- und Zink-bindende Komponenten in Rapsblättern nicht nachweisbar.

Im Molmassenbereich von 26-28 kD wurden aus Sonnenblumen- und Rapsblättern **Kupfer**-bindende Substanzen extrahiert, die gegenüber Mercaptoethanol stabil sind.

Die Elutionsprofile für Schwermetall-bindende Komponenten aus **Sonnenblumen- und Rapswurzeln** unterscheiden sich deutlich. Während in Sonnenblumenwurzeln Cadmium und Kupfer überwiegend an niedermolekulare Substanzen (< 15 kD) gebunden sind, wird in Rapswurzeln Cadmium ausschließlich und Kupfer zu weiten Teilen höhermolekular (> 40 kD) gebunden. Nickel und Zink treten in Sonnenblumen- und Rapswurzeln bevorzugt niedermolekular auf. Die Molmassen der Nickel- und Zink-Bindungsformen in Sonnenblumenwurzeln liegen bei 2-10 kD. Dagegen sind die niedermolekularen Zink- und Nickel-bindenden Komponenten aus Rapswurzeln ausschließlich im Totalvolumen (< 0,1 kD) nachzuweisen.

Aus den Wurzelextrakten von in Hydrokultur angezuchteten Sonnenblumen- und Rapspflanzen konnten Cadmium-haltige Substanzen (~ 25 kD) isoliert und mit ESI-MS, Fluoreszenz-HPLC und Aminosäureanalyse analysiert werden. Danach handelt es sich bei diesen Cadmium-Bindungsformen nicht um Phytochelatine (cysteinreiche Peptide), sondern offenbar um andere Proteine (Stressproteine ?), die das Schwermetall über S-freie Donorgruppen koordinieren können.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und angewandten Trenn- und Nachweisverfahren und deren Ergebnisse schaffen eine Grundlage für weiterführende analytische und pflanzenphysiologische Forschungsarbeiten (Zellmembranen, Organellen) und Strukturuntersuchungen an isolierten Schwermetall-Bindungsformen unter Anwendung von z.B. ESI-MSMS, EXAFS und Röntgenstrukturanalyse.

## 11 Experimenteller Teil

### 11.1 Anzucht von Sonnenblumen- und Rapspflanzen unter Hydrokulturbedingungen

#### Geräte

Wachstumschammer: Fa Conviron, London, Modell E 15 (bis 10. 99)  
 Fa Vötsch, Typ 1514/S (ab 05.00)

Kunststoffgefäße, Volumen 2,5 l

Kunststoffsiebe

Aquariumpumpe

#### Verwendete Reagenzien

Tween-80-Lösung (0,1 %): 0,5 g /500 mL Tween 80 (Fa Merck, Darmstadt, Nr. 822187)

Natriumhypochloritlösung (0,5 g / 100 mL): 1,5 mL konz. Natriumhypochloritlösung (Riedel-de Haen, Nr. 13440) mit Wasser auf 100 mL auffüllen.

Wasserstoffperoxidlösung (0,75 g/ 100 mL): 1,9 mL Wasserstoffperoxidlösung (35 %; Merck Nr. 108600) mit Wasser auf 100 mL auffüllen.

Cadmium-Stammlösung (100 µmol/mL): 5,13 g Cadmiumsulfat-hydrat p.a. (Merck Nr. 102026) in Wasser lösen und auf 100 mL auffüllen. Die verwendeten Cd-Lösungen wurden aus dieser Stammlösung angesetzt.

#### Nährlösung

Die Nährlösung in Anlehnung an Hoagland [307] wurde aus drei Stammlösungen gebildet. Lösung I und II stellten die Mengenelemente und Lösung III enthielt die Spurenelemente. Die Zugabe von Nickel zur Spurenelementlösung war nicht notwendig, da auf Grund von Chemikalienverunreinigungen ausreichend Nickel vorhanden war.

#### **Stammlösung I:**

- |                                                                 |                       |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------|
| • $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Merck Nr. 105886) | 49,296 g / 2 l Wasser |
| • $\text{KNO}_3$ (Merck Nr. 5063)                               | 103,132 g / 2 l “     |
| • $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Merck Nr. 1126)           | 46,012 g / 2 l “      |

#### **Stammlösung II:**

- |                                                                            |                        |
|----------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| • $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (Merck-Nr. 102120) | 188,921 g / 2 l Wasser |
|----------------------------------------------------------------------------|------------------------|

#### **Stammlösung III (Spurenelementlösung):**

- |                                                           |                       |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------|
| • $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$              | 0,5406 g / 2 l Wasser |
| • $\text{H}_3\text{BO}_3$                                 | 0,5713 g / 2 l “      |
| • $\text{MnCl}_2$                                         | 0,2290 g / 2 l “      |
| • $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$              | 0,0500 g / 2 l “      |
| • $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$              | 0,0160 g / 2 l “      |
| • $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$    | 0,0498 g / 2 l “      |
| • $\text{Na}_2\text{SiO}_4$                               | 0,0138 g / 2 l “      |
| • $\text{CoCl}_2$                                         | 0,0026 g / 2 l “      |
| • $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ | 0,0095 g / 2 l “      |

Zum Herstellen der Nährlösung wurden jeweils 50 ml der Stammlösungen in einen Erlenmeyerkolben pipettiert und auf das Volumen von fünf Litern aufgefüllt. Eisen wurde der Nährlösung als Fe (III) zugesetzt. In der Stammlösung III (pH 6,5) lag Eisen daher als amorphes Eisen (III)-Hydroxid in Form einer rotbraunen gallertartigen Masse vor. Der pH-Wert der Nährlösung lag bei etwa 5,3. Eisen dürfte in der Nährlösung daher bevorzugt in Form von mehrkernigen Isopolyoxo-Komplexen vorliegen [12]. Unter dem Einfluss der Wurzelsäuren kann sich dieses allerdings ändern.

In Vorversuchen wurde herausgefunden, dass es sinnvoll ist, die Nährlösung jeden zweiten Tag zu wechseln und mit einer Aquariumpumpe zu belüften.

Zur Verminderung von Algenwachstum bzw. Aufheizung der Nährlösung in den Kunststoffbehältern über die Umgebungstemperatur (Strahlungswärme) wurden die Behälter mit Aluminiumfolie ummantelt. Dieses hatte zur Folge, dass nur wenig Licht in den Wurzelbereich gelangte und somit die natürlichen Bedingungen (kein Licht unter der Erde) besser simuliert wurden. Eine noch effektivere Verringerung des Algenwachstums gelingt, wenn auch der Boden der Siebe mit Aluminiumfolie ausgelegt wird.

Seit Mai 2000 steht im Institut für Biochemie und Analytik von Getreide und Kartoffeln der BAGKF in Detmold eine neue Wachstumskammer der Fa Vötsch Typ VB 1514/S zur Verfügung. Tabelle 34 fasst die Anzuchtbedingungen für diese Wachstumskammer zusammen:

**Tab. 34: Parameter zur Steuerung der Wachstumskammer**

Programmschritt	Uhrzeit	Temperatur [°C]	rel. Feuchte [%]	Beleuchtung [%]
1	0:01	22	60	42
2	0:31	20	65	0
3	6:00	22	60	42
4	6:31	25	55	99

### Arbeitsweise

Die im Folgenden beschriebene Vorgehensweise bei der Keimung und Anzucht von Pflanzenproben gilt sowohl für die Anzucht von Sonnenblumen als auch von Raps. Die erhaltenen Pflanzen wurden zur Bestimmung der Elementgehalte in den Pflanzengrundorganen, zur Gewinnung von Xylemsaft sowie zur Analyse der Schwermetallbindungsformen verwendet.

Um die Reproduzierbarkeit der Anzuchtversuche zu kontrollieren, wurden alle Versuche mehrfach und jeweils in zwei Sieben parallel durchgeführt.

#### **1. Oberflächenentkeimung**

Um einem Pilzbefall bei der Keimung vorzubeugen, wurde eine Oberflächenentkeimung der Sonnenblumenkerne bzw. Rapssamen durchgeführt. Hierzu wurden eine Tween-80-Lösung, eine Natriumhypochlorit-Lösung und eine Wasserstoffperoxid-Lösung verwendet.

1. Zunächst wurden die Ölsaaten mit Wasser gewaschen und vorgequollen.

2. Anschließend wurden sie 5 min in einer 0,1 %-igen Tween-80-Lösung geschüttelt und nachfolgend gründlich mit Wasser gewaschen.
3. Danach wurden die Ölsaaten zwei Minuten mit einer 0,5 %-igen NaOCl-Lösung geschüttelt. Nachfolgend wurde so lange mit Wasser gewaschen, bis kein Hypochloritgeruch mehr zu bemerken war.
4. Zuletzt wurde eine Minute in einer 0,75 %-igen Wasserstoffperoxid-Lösung geschüttelt. Nach nochmaligem gründlichen Waschen mit Wasser war die Oberflächenentkeimung der Ölsaaten abgeschlossen.

## **2. Keimung (1. - 4. Tag)**

1. Die Ölsaaten wurden nun auf nassem Papier ausgebreitet und in ein Sieb gelegt, welches in einen Kunststoffrog gestellt wurde. Dieser Behälter war bis zum Boden des Siebes mit Wasser gefüllt.
2. Das Sieb wurde anschließend mit feuchtem Papier abgedeckt und mit einem Deckel verschlossen. Der abgedeckte Behälter wurde für 48 Stunden zur Vorkeimung in der Wachstumskammer bei 90 % Luftfeuchtigkeit und 25°C abgestellt.
3. Die angekeimten Sonnenblumenkerne/Rapssamen wurden auf verschiedene Siebe verteilt (5 Stück/ 15 Stück pro Sieb) und die Kunststoffbehälter jeweils bis zum Boden des Siebes mit Wasser gefüllt.
4. Die Siebe wurden mit feuchtem Haushaltspapier abgedeckt und, um ein Austrocknen der Keimlinge zu verhindern, wurde noch ein Kunststoffdeckel aufgesetzt.
5. Die Keimung erfolgte nun weitere 2 Tage lang im Dunkeln, wobei täglich kontrolliert wurde, ob das Papier, welches zum Abdecken der Siebe diente, noch feucht war. Die Keimung wurde in der Wachstumskammer bei 90 % Luftfeuchtigkeit und 25°C durchgeführt. Schlecht wachsende Keimlinge wurden entfernt und ersetzt.

## **4. Anzucht (5. – 10. Tag)**

Nach Abschluss der Keimung, wurde das Wasser in den Kunststoffbehältern durch undotierte Hoagland-Nährlösung ersetzt.

Während der gesamten Anzucht wurde die Entwicklung der Biomasse durch Wiegen und die Bestimmung des Entwicklungsstadiums [311] kontrolliert (Tabelle 36). Um einen möglichen Einfluss durch Ungleichmäßigkeiten in der Wachstumskammer (Lichtintensitätsgradient, Temperaturgradient, Zugluft) zu minimieren wurden die Positionen der Siebe täglich nach einem festen Schema gewechselt.

## **5. Dotierung der Nährlösungen (11. - 25. Tag)**

Die Dotierung mit Cadmium erfolgte durch Zugabe eines definierten Volumens an Schwermetall-Lösung. Als Ausgangslösung für die Dotierung der Nährlösung mit Cadmium (Zugabevolumen Cd) diente eine Cadmiumsulfatlösung mit einem Cadmiumgehalt von 2 mmol/L.

**Tab. 35: Cadmiumdotierung bei den Anzuchtversuchen (Volumen der Nährlösung 1,7 L)**

Zugabevolumen Cadmium-Lsg [ml]	Cadmiumkonzentration in der Nährlsg [µmol/L]
0	0
0,085	1
0,170	2
0,850	10
1,700	20

## 6. Ernte (25. Tag)

1. Die Wurzeln wurden mit Papier vorsichtig abgetrocknet.
2. Die Pflanzenorgane Wurzel, Stängel und Blatt wurden getrennt und zur Bestimmung der Biomasse jeweils gewogen.
3. Ausmessen der Wurzellänge, Stängellänge und der Blattgröße.
4. Waschen der Wurzeln in einem Sieb mit destilliertem Wasser um eine Beeinflussung der folgenden Arbeiten und Messungen durch evtl. anhaftende Reste der Nährlösung zu vermeiden.
5. Die jeweiligen Pflanzengrundorgane wurden im Mörser mit flüssigem Stickstoff übergossen und homogenisiert.
6. Die homogenisierten Grundorgane wurden in einem geschlossenen Gefäß im Gefrierschrank bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

**Tab. 36: Codierung der Entwicklungsstadien von dikotylen Pflanzen [311]**

### Mais, Raps, Faba-Bohne, Sonnenblume und Erbse

Code	Mais	Raps	Faba-Bohne	Sonnenblume	Erbse
<b>Makrostadium 1: Blattentwicklung (Hauptspieß)<sup>1</sup></b>					
10	1. Laubblatt aus der Koleoptile ausgetreten	Keimblätter voll entfaltet	2 schuppenförmige Niederblätter sichtbar	Keimblätter voll entfaltet	2 schuppenförmige Niederblätter sichtbar
11	1. Laubblatt entfaltet	1. Laubblatt entfaltet	1. Laubblatt entfaltet		1. Laubblatt mit Stipeln (oder 1. Ranke entfaltet)
12	2. Laubblatt entfaltet	2. Laubblatt entfaltet	2. Laubblatt entfaltet	2 Laubblätter (1. Blattpaar) entfaltet	2. Laubblatt mit Stipeln + Ranke (oder 2. Ranke) entfaltet
13	3. Laubblatt entfaltet	3. Laubblatt entfaltet	3. Laubblatt entfaltet		3. Laubblatt mit Stipeln + komplexe Ranke entfaltet
14	4. Laubblatt entfaltet	4. Laubblatt entfaltet	4. Laubblatt entfaltet	4 Laubblätter (2. Blattpaar) entfaltet	
15	5. Laubblatt entfaltet fortlaufend bis ...	5. Laubblatt entfaltet fortlaufend bis ...	5. Laubblatt entfaltet fortlaufend bis ...	5 Laubblätter entfaltet fortlaufend bis ...	fortlaufend bis ...
19	9 und mehr Laubblätter entfaltet	9 und mehr Laubblätter entfaltet (Internodien noch nicht gestreckt)	9 und mehr Laubblätter entfaltet	9 und mehr Laubblätter entfaltet	9 und mehr Laubblätter entfaltet

<sup>1</sup> Bei deutlich sichtbarem Längenwachstum (Internodien gestreckt) ist auf die Codes des Makrostadiums 3 überzugehen.



## 11.2 Herstellung der Pflanzenextrakte

### Geräte

Ultra-Turrax , Typ 18/10, 20000 U/min, mit 2 K-Schaft aus Titan (Janke & Kunkel, Staufen)

Kunststoff – Zentrifugengläser, 50 ml (Beckmann, München)

Kühlzentrifuge ´Avanti™ Centrifuge´ J-25 mit Rotor JA-25.50 (Beckmann, München)

Analysenwaage MC 210 P (Sartorius, Göttingen)

Retsch – Mühle, Sieb mit Maschenweite 2,0 mm

### Verwendete Reagenzien

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan. (Tris) p.a. (Roth Nr. 4855.2)

Salzsäure 1 mol/L : Salzsäure 32% p.a. (Merck Nr. 100319)

Die eingesetzte Salzsäure wurde durch zweimalige Oberflächenverdampfungs–Destillation in einer entsprechenden Apparatur (Modell Acidest, Fa Heraeus, Hanau) gereinigt. Die verd. Salzsäure wurde in bidestilliertem Wasser angesetzt.

Mercaptoethanol (Merck Nr. 1.15433)

### Extraktionslösungen

#### **Tris-HCl-Puffer 0,05 mol/L, pH 8,0**

Die Lösung von 24,228 g Tris in 3,5 L bidestilliertem Wasser wurde mit etwa 120 mL Salzsäure (1,0 mol/L) auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und auf 4 L aufgefüllt. Die Pufferlösung wurde vor Gebrauch im Wasserstrahlvakuum (Witt`scher Saugtopf) entgast.

#### **Tris-HCl-Puffer 0,05 mol/L, pH 8,0; 10mmol/L Mercaptoethanol**

1 L der entgasten Extraktionslösung wurde unmittelbar vor der Extraktion mit 1,72 mL Mercaptoethanol (10 mmol) versetzt.

### Durchführung

Die Ölsaaten wurden zunächst mit einer Titanmühle zu einem feinen Mehl vermahlen. Bei den übrigen Proben (Blätter, Wurzeln, Pflanzenstiele usw.) konnte auf einen Einsatz der Mühle verzichtet werden.

Die zu homogenisierenden Substanzen wurden anschließend in einem Becherglas eingewogen und mit 15 ml je 5 g Probensubstanz an vorgekühltem (4°C) und entgastem Tris-HCl-Puffer (0,05 mol/L; pH 8,0) versetzt. Mit einem Ultra-Turrax wurde die jeweilige Probe nachfolgend unter Eiskühlung fünf Minuten homogenisiert. Die Qualität des Zellaufschlusses wurde in einigen Fällen mit einem Mikroskop überprüft.

Das Homogenat wurde 60 Minuten mit 20000 U/min (42000 g) bei 4°C zentrifugiert. Die überstehende wässrige Lösung (vgl. Abbildung 20) wurde entweder abdekantiert oder bei Vorhandensein einer Fettschicht (reife Ölsaaten) mit einer Kunststoffspritze entnommen. Die wässrige Fraktion wurde direkt für die Gelchromatographie eingesetzt. In einem Aliquot der wässrigen Fraktion wurde der Gehalt an Cadmium, Kupfer, Eisen, Nickel und Zink bestimmt. Die Fettschicht wurde vom Rückstand getrennt und in Aliquoten vom Rückstand und der Fettschicht wurde nach vorheriger Homogenisierung der Schwermetallgehalt bestimmt.

### 11.3 Gelfiltrationschromatographie (GFC)

Die Gelfiltration ist eine Ausschlusschromatographie, d.h. die größten Moleküle, welche nicht in die Poren des Säulenmaterials diffundieren können, eluieren im Ausschlussvolumen der Säule ( $V_0$ ). Diesen Molekülen steht ausschließlich das Volumen zwischen den einzelnen Körnern der stationären Phase zur Verfügung. Kleinere Moleküle diffundieren in die Poren des Gels und eluieren im Trennbereich der Säule nach abnehmender Molekülgröße ( $V_e$ ). Weil in den Poren des Gels die mobile Phase stagniert, bewegen sich die Moleküle darin nur durch Diffusion vorwärts und werden somit gegenüber den Größeren retardiert. Die kleinsten Probenmoleküle, die vom linearen Trennbereich der Säule nicht mehr erfasst werden, eluieren im Totalvolumen ( $V_t$ ) der Säule.

$V_0$ ,  $V_e$  und  $V_t$  sind säulenspezifische Werte. Deshalb wurde ein vom Säulenvolumen unabhängiger Faktor der  $K_{av}$ -Wert definiert. Dieser gewährleistet, dass die Untersuchungen mit der GFC bei gleichem Säulenmaterial unabhängig von Säulenvolumen und Packungsdichte des verwendeten Gels sind. Wird eine Säule mit Stoffen bekannter Molekularmassen kalibriert, so ist der  $K_{av}$ -Wert für eine Molekülmasse unabhängig vom Säulenvolumen immer gleich. Der  $K_{av}$ -Wert ist definiert als:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad \text{mit: } \begin{array}{l} V_0 = \text{Ausschlussvolumen} \\ V_e = \text{Elutionsvolumen} \\ V_t = \text{Totalvolumen} \end{array}$$

Das Eluat der GFC wird nach dem Säulenausgang durch einen UV-Detektor und eine Leitfähigkeitsmesszelle geleitet. Die Messung der UV-Absorption bei 280 nm ermöglicht die Registrierung von aromatischen Aminosäuren und Proteinen.

#### Geräte

Niederdruck-Chromatographiesystem bestehend aus Schlauchpumpe, UV-Detektor (280 nm), Schreiber, Fraktionssammler und Steuereinheit (Modell Econo, Fa Bio-Rad, München).

Niederdruck-Chromatographiesystem: Schlauchpumpe (Fa Serva, Heidelberg), UV-Detektor (Fa LKB Uvicord, Gräfelfing; heute Fa Pharmazia, Modell Detector Unit Type 8303 A), Verstärker (LKB,

Ultraviolet Absorptiometer Control Unit Typ 8301 A), Schreiber und Fraktionssammler (LKB, Modell 7000 Ultrarac Fraction Collector).  
Mitteldruck-Chromatographiesystem (Modell Bio-Logic, Bio-Rad, München):  
UV-Detektor, Leitfähigkeitsdetektor, Fraktionssammler (Modell 2128) und Steuereinheit.

Chromatographieschrank

Polyethylen-Schläuche (Ø 1mm)

Chromatographiesäule Superdex™ 200 HR (Pharmazia)

Chromatographiesäule Superdex S75 (selbst gepackt, prep. grade; Pharmazia Nr. 17-1044)

Chromatographiesäule Superdex Peptide HR (Pharmazia)

Chromatographiesäule Sephadex G25 (fine, Pharmazia Nr. 17-0032)

Chromatographiesäule Sephadex G50 (superfine, Pharmazia Nr. 17-0041)

Chromatographiesäule Sephadex G100 (fine, Pharmazia Nr. 17-0060)

### Verwendete Reagenzien

Tris-HCl-Pufferlösung (0,05 mol/L; pH 8,0; A2.2)

Natriumazid reinst. (Merck Nr. 6688)

Titriplex III p.a. (Merck Nr. 8418)

Reinigungslösungen:

- 100 mg/L Natriumazid in 1000 mL bidest. Wasser zur Vermeidung von Bakterien.

5,6 mg/L Titriplex III in 1000 mL bidest. Wasser, um vom Säulenmaterial gebundene Schwermetallionen zu entfernen.



**Abb. 64: Verwendetes Mitteldrucksystem (FPLC der Fa. Bio-Rad) für die GFC**

### Verwendete Säulen

Für die Trennungen mit der GFC wurden fertige Trennsäulen der Fa Pharmazia mit einem Gesamttrennbereich von 0,1–600 kD verwendet. Die Packung der Säulen ist ein poröses Material (Polyglucosen). Der Trennbereich der ausgewählten Säulen erwies sich für die Untersuchungen als ausreichend. Nur für Sonnenblumenkerne wurden Substanzen in der Extraktionslösung nachgewiesen, die Molekularmassen von > 600 kD aufwiesen (vgl. Tabelle 37).

**Tab. 37: Trennbereich der Gele für die GFC mit Säulenparametern**  
(1) linearer Trennbereich

	Säulenmaterial	Trennbereich <sup>(1)</sup> [kD]	Säulenparameter	
			Länge [cm]	Ø [cm]
<b>Mischungen aus Dextrangel und Agarose</b>				
(1)	Superdex S 200	10 - 600	90	1,6
(2)	Superdex S 75 prep grade	4 - 70	60	1,6
(3)	Superdex Peptide HR	0,1 - 7	30	1,0
<b>Dextrangele, vernetzt mit Epichlorhydrin</b>				
(4)	Sephadex G 25	1 - 5	30	1,6
(5)	Sephadex G 50	1,5 - 30	100	5
(6)	Sephadex G100	4 - 150	100	5

Die Säulen eins bis vier wurden am Mitteldruck-Chromatographiesystem betrieben. Die Säulen fünf und sechs an einem Niederdruck-Chromatographiesystem.

### **Niederdruck-Chromatographiesystem**

Die an diesem System verwendeten Säulen wurden selbst angefertigt. Es handelt sich um 100 cm lange Säulen aus Plexiglas mit einem Innendurchmesser von 5 cm.

Etwa 150 g trockenes Sephadex G100 bzw. 250 g trockenes Sephadex G50 wurden in 3 L Tris-HCl-Puffer aufgeschlämmt. Die Suspensionen wurden zum Quellen des Gels für 24 h (G50) bzw. 72 h (G100) stehen gelassen. Anschließend wurden die Suspensionen im Wasserstrahlvakuum mit einem Witt'schen Saugtopf so lange entgast, bis keine Gasblasen mehr aufstiegen. Danach wurde die Suspension im Kühlraum auf 4°C abgekühlt.

Die 100 cm langen Chromatographiesäulen wurden mit einem weiteren Rohr um etwa die Hälfte verlängert und die vorbereitete Suspension auf einmal an einem Glasstab entlang in die Säule gegossen. Danach ließ man die Säule bei einem Fluss von ca. 1 ml/min absitzen. Wenn das Gelbett über einen Zeitraum von etwa 6 Stunden nicht weiter absank, wurde das Verlängerungsrohr mit dem überstehenden Gel abgenommen und die Säule verschlossen.

Alle GFC-Trennungen mit dem Niederdruck-Chromatographiesystem wurden in einem Kühlraum bei 4°C mit Tris-HCl-Puffer (0,05 mol/L; pH 8,0) als Elutionsmittel durchgeführt. Die Schlauchpumpe wurde hinter die Säule geschaltet und saugte permanent etwa 30 mL/h des Elutionsmittels auf die Säule. Mit einem UV-Detektor wurde kontinuierlich die Absorption des Eluates bei 280 nm gemessen und mit einem Zweikanalschreiber aufgezeichnet. Der Fraktionssammler fing das Eluat in Fraktionen von 15 mL auf, in denen „offline“ der Cadmium-, Kupfer-, Nickel- und Zinkgehalt bestimmt wurde.

### **Mitteldruck-Chromatographiesystem**

Alle GFC-Trennungen mit dem Mitteldruck-Chromatographiesystem erfolgten unter Kühlung bei 4 - 6 °C in einem Chromatographieschrank. Als Elutionsmittel diente Tris-HCl-Puffer (0,05 mol/L; pH 8,0). Die Säulen wurden mit einem Volumenstrom von 1 mL/min gegen die Schwerkraft betrieben. Das aufgegebene Probenvolumen betrug bei Superdex S75 und Superdex S200 jeweils 1,5 mL und für Superdex Peptide HR 1,0 mL.

Ein UV-Detektor mit Durchflussküvette maß die Absorption bei 280 nm und ein nachgeschalteter Leitfähigkeits-Detektor die zugehörige Leitfähigkeit des Eluats. Diese Werte wurden durch eine angeschlossene Rechneinheit kontinuierlich aufgenommen. Der Fraktionssammler fing das Eluat in Fraktionen zu je 1,0 mL auf. In den Fraktionen wurde der Cadmium-, Kupfer-, Nickel- und Zinkgehalt ohne Nassaufschluss mit AAS oder DCP analysiert.

Die Reinigungslösungen wurden sowohl am Nieder- als auch am Mitteldrucksystem regelmäßig auf die Säulen aufgegeben, um eine Verunreinigung der Säulen zu vermeiden.

### **11.3.1 Bestimmung des Ausschlussvolumens**

#### **Verwendete Reagenzien**

Dextranblau (Roth Nr. 5958.1)

#### **Durchführung**

Zwei Spatelspitzen Dextranblau wurden in 20 mL bidestilliertem Wasser gelöst. Von dieser Lösung wurden 10 mL auf die 100 cm langen Säulen des Niederdruck-Chromatographiesystems bzw. 1,5 mL auf die Säulen des Mitteldruck-Systems gegeben. Der Volumenstrom betrug für das Niederdrucksystem 0,5 mL/min und am Mitteldrucksystem 1 mL/min. Bei der Elution sollte der Farbstoff als schmale Bande über die Säule laufen. Das Ausschlussvolumen ( $V_0$ ) entspricht dem Elutionsvolumen des Absorptionsmaximum bei 280 nm.

### **11.3.2 Bestimmung des Totalvolumens**

#### **Geräte**

Spektralphotometer: Unicam UV-VIS4

#### **Verwendete Reagenzien**

Natriumchlorid-Lösung (5 g/100 mL): Natriumchlorid (p.a., Merck Nr. 106404)  
Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (2 g/100 mL) Kaliumdihydrogenphosphat (p.a.; Merck Nr. 4873, Darmstadt) in Tris-HCl-Pufferlösung.

Verdünnte Salpetersäure: 100 mL konz. Salpetersäure (65 %; p.a.; Merck Nr. 456) mit 200 mL Wasser verdünnt.

Ammoniumvanadat-Lösung: 0,2 g Ammoniummetavanadat (p.a.; Riedel Nr. 31153) in 70 mL heißem Wasser lösen, abkühlen, 2 mL konz. Salpetersäure (65 %; p.a.; Merck Nr. 456) zugeben und mit Wasser auf 100 mL auffüllen.

Ammoniumheptamolybdat-Lösung: 5 g Ammoniumheptamolybdat-tetrahydrat (p.a.; Merck Nr. 1182) in 70 mL heißem Wasser lösen, abkühlen und auf 100 mL auffüllen.

Reagenzlösung: Unmittelbar vor der Verwendung werden 20 mL Ammoniumvanadat-Lösung, 20 mL verdünnte Salpetersäure und 20 mL Ammoniummolybdatlösung vermischt.

### **Durchführung**

Es wurden 10 mL Kaliumhydrogenphosphatlösung auf die Säulen der Niederdruck-Gelchromatographie aufgetragen und mit 30 mL/h Tris-HCl-Puffer eluiert. Von jeder Fraktion (15 mL) wurden 0,5 mL mit 0,5 mL verdünnter Salpetersäure, 0,75 mL Reagenzlösung und 5 mL Wasser versetzt. Die Mischung wurde eine Stunde stehen gelassen und die entstandene Gelbfärbung im Photometer bei 430 nm bestimmt. Das Totalvolumen ( $V_t$ ) der Säule ist das Eluatvolumen im Maximum der Absorption.

Beim Arbeiten mit den Superdex-Säulen am Mitteldrucksystem (Bio-Logic-System) wurde stattdessen eine Natriumchloridlösung (5 g/100 mL) zur Bestimmung des Totalvolumens verwendet. Es wurde kontinuierlich die Leitfähigkeit im Eluat gemessen. Das Totalvolumen entspricht dem Volumen des Eluates im Maximum der Leitfähigkeit. Die Bestimmung des Ausschluss- und Totalvolumens wurde am Mitteldrucksystem in einer Messung durchgeführt.

### **11.3.3 Kalibration der Säulen**

#### **Verwendete Reagenzien**

Eichkit für Gelfiltration, niedermolekular (LMW), aus Rinderserum-Albumin, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A und Ribonuclease A (Pharmazia Nr. 17-0442)

Eichkit für Gelfiltration, hochmolekular (HMW), Ferritin, Katalase, Aldolase (Pharmazia Nr. 17-0441)

Myoglobin (Serva Nr. 29895)

Cytochrom c (Sigma Nr. C 3381)

Bacitracin (Serva Nr. 14420)

Glutathion (Serva Nr. 23150)

#### **Durchführung**

Es wurden je 20 mg von zwei Proteinen mit großer Molmassendifferenz in Tris-HCl-Puffer gelöst. Auf die 100 cm langen Säulen des Niederdruck-

Systems wurden je 5 mL, auf die Säulen des Mitteldrucksystems je 1 mL dieser Lösungen aufgegeben und die Proteine unter den zuvor beschriebenen Bedingungen eluiert (Tabelle 38, 39).

**Tab. 38: Kalibration der am Mitteldrucksystem verwendeten Säulen**

Kalibriersubstanz	molare Masse [g/mol]	log M	Superdex S200		Superdex S75		Superdex Peptide HR	
			$V_e$ [mL]	$K_{av}$	$V_e$ [mL]	$K_{av}$	$V_e$ [mL]	$K_{av}$
$V_0$			46,3	0	42,5	0	8,7	0
Ferritin	440.000	5,64	54,7	0,12				
Aldolase	158.000	5,20	70,0	0,33				
Albumin	67.000	4,83	76,8	0,42	48,6	0,12		
Ovalbumin	43.000	4,63	80,6	0,47	51,2	0,17		
Chymotrypsinogen	25.000	4,40	100,8	0,75	68,9	0,52		
Ribonuclease	13.700	4,14	104,1	0,80	70,9	0,56		
Cytochrom c	12.600	4,10						
Bacitracin	1.450	3,16					12,0	0,30
Glutathion (ox.)	613	2,79					14,2	0,50
Glutathion (red.)	308	2,49					15,5	0,618
$V_t$			118,6	1	93,5	1	19,7	1

**Tab. 39: Kalibration der am Niederdrucksystem verwendeten Säulen**

Kalibriersubstanz	molare Masse [g/mol]	log M	Sephadex G100		Sephadex G50	
			$V_e$ [mL]	$K_{av}$	$V_e$ [mL]	$K_{av}$
$V_0$			650	0	630	0
Albumin	67.000	4,83	948	0,24		
Ovalbumin	43.000	4,63	1063	0,34	660	0,03
Chymotrypsinogen	25.000	4,40	1333	0,56	815	0,17
Myoglobin	17.200	4,24			917	0,268
Ribonuclease	13.700	4,14	1513	0,70		
Cytochrom c	12.600	4,10	1513	0,70	1004	0,35
Bacitracin	1.450	3,16			1626	0,931
$V_t$			1880	1	1700	1

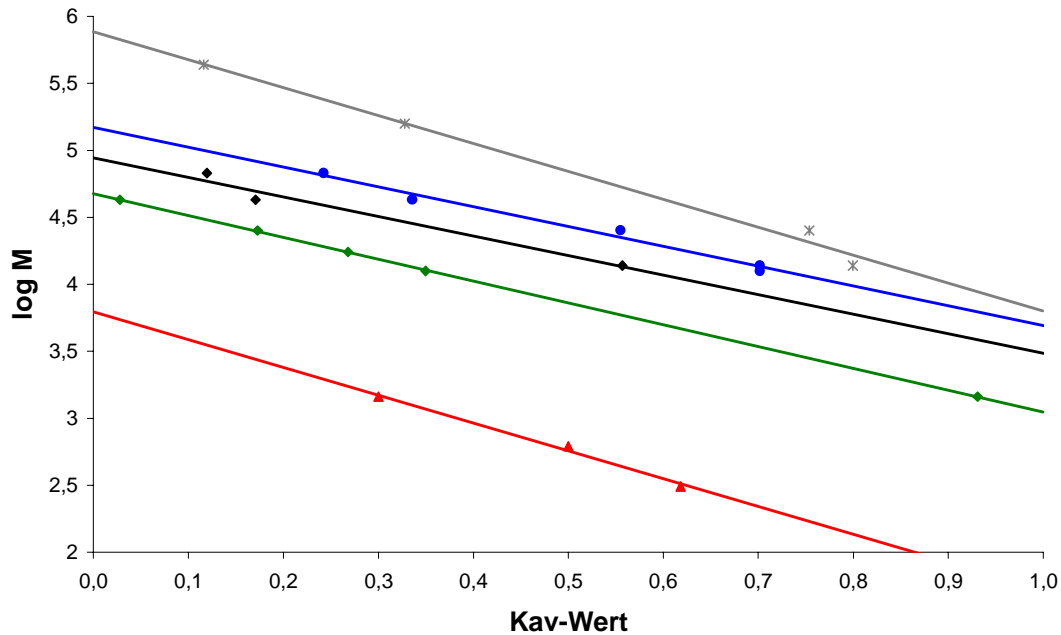


Abb. 65: Kalibrationsgeraden und Kalibrierfunktionen für:

Superdex Peptide HR	$(y = -2,0788x + 3,796)$ ,	$R^2 = 0,9924$
Sephadex G50	$(y = -1,6306x + 4,6766)$ ,	$R^2 = 0,9941$
Superdex S75	$(y = -1,4612x + 4,9459)$ ,	$R^2 = 0,9684$
Sephadex G100	$(y = -1,4775x + 5,1696)$ ,	$R^2 = 0,9849$
Superdex S200	$(y = -2,0852x + 5,8862)$ ,	$R^2 = 0,9906$

## 11.4 Ionenaustauscherchromatographie (IAC)

### Geräte

Mitteldruck-Chromatographiesystem (Modell Biologic, Bio-Rad, München) mit UV-Detektor, Leitfähigkeitsdetektor, Fraktionssammler (Modell 2128) und Steuereinheit

Ionenaustauschersäule Bio-Scale Q5 Column, (Bio-Rad Nr. 751-0005)

### Verwendete Reagenzien

Tris-HCl-Pufferlösung (0,05 mol/L; pH 8,0)

NaCl-Lösung (1 mol/L)

2-Mercaptoethanol (Merck Nr. 112006)

### Durchführung

Die Ionenaustauscherchromatographie mit starken Anionenaustauschern wird vielfach zur Isolierung cadmiumbindender Substanzen aus den vegetativen und generativen Pflanzenteilen von Sonnenblumen- und Rapspflanzen verwendet. Beispiele sind die IAC an QAE-Sephadex A-25 zur Isolierung von Phytochelatinen aus Maiswurzeln [286, 288] und die Isolierung von Phytochelatinen aus Zellextrakten von *Rauvolfia serpentina* [188].



Für die eigenen Arbeiten wurde eine vorgepackte Mono-Q5-Säule (5 mL Säulenvolumen; Biorad, Hercules, CA, USA) verwendet, welche an dem Mitteldruck-Chromatographiesystem (Bio-Logic-System, Fa Bio-Rad) betrieben wurde. Die IAC-Trennungen wurden in einem Chromatographieschrank bei 4 - 6°C durchgeführt. Etwa 50 mL Probenlösung (gepoolte Fraktionen der GFC) wurden mit einer Flussrate von 1 mL/min auf die Austauschersäule aufgegeben. Anschließend wurde der in Tabelle 40 dargestellte Tris-HCl/NaCl-Gradient gestartet. Das Eluat wurde durch einen UV- (280 nm) und einen Leitfähigkeitsdetektor geleitet und in Fraktionen von 2 mL gesammelt. In den Fraktionen wurden die Cadmium- und Kupfergehalte „offline“ bestimmt. Die erhaltenen cadmiumhaltigen Fraktionen wurden gepoolt, an Sephadex G 25 entsalzen, gefriergetrocknet und die getrocknete Substanz zur Aminosäureanalyse vorbereitet.

**Tab. 40: Programm für den Tris-HCl / NaCl-Gradienten bei der IAC**

Programmschritt	Elutionsvolumen [mL]	Tris-HCl- Pufferlösung [%]	1 mol/L NaCl in Tris-HCl-Puffer [%]	NaCl- Konzentration [mol/L]
1	isokratisch	0 - 20	100	0
2	Gradient	20 - 40	100 - 85	0 - 0,15
3	isokratisch	40 - 50	85	0,15
4	Gradient	50 - 80	85 - 45	0,15 - 0,55
5	isokratisch	80 - 90	45	0,55
6	Gradient	90 - 110	45 - 0	0,55 - 1,0
7	isokratisch	110 - 120	0	1,0

## 11.5 Fluoreszenz-HPLC

### Geräte:

Entgaser	Degasys-DG-1310 (Fa Gynkotek)
Pumpe	P 580 A LPG, HPLC-Pumpe (Fa Gynkotek)
Autosampler	GINA 50 (Fa Gynkotek)
Säulenofen	T-6300 Column Thermostat (Merck)
Vorsäule	LiChrospher RP 18, 40-50 µm, 40 x 4,6 mm (Yenmez)
Säule	LiChrospher RP 18, 10 µm, 250 x 4 mm
Detektor	HPLC Fluoreszenz-Detektor RF-2000 (Fa Dionex)
Auswertung	Gynkosoftware Chromatographie-Datensystem, PCD Version 5.50, Gynkotek HPLC, Peakflächenmethode

### Verwendete Reagenzien

Acetonitril (gradient grade, 99,8 %, Merck Nr. 100003)

Ammoniumdihydrogencarbonat (p.a., Merck Nr. 101131): 200 mg  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  werden in 250 mL bidestilliertem Wasser gelöst (10 mmol/L) und mit 1 mol/L Salzsäure auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt.

Dithiothreitol (für biochemische Zwecke, > 99 %, Merck Nr. 111474)  
Epichlorhydrin (Fluka Chemie)  
Essigsäure (100 %, Fa Roth)  
Ethyldiamintetraacetat (EDTA), Titriplex III (p.a. Merck Nr. 108418):  
In 100 mL Wasser werden 0,0372 g EDTA (1,0 mmol/L) gelöst  
Kaliumdihydrogenphosphat (p.a., Merck Nr. 101960)  
Methanol (für HPLC)  
Monobrombiman (Fluka Chemie): 25 mg Monobrombiman wurden in 20 mL Acetonitril gelöst (4,38 mmol/L) und unter Lichtausschluss bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Zur Derivatisierung wurde auf 1 mmol/L verdünnt.  
di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (p.a., Riedel de Haen)  
Zur Herstellung eines Phosphatpuffers pH 6,3 werden 2,62 g di-Natriumhydrogen-phosphat und 7,07 g Kaliumhydrogenphosphat in 1000 mL Wasser gelöst.  
Natriumhydroxidplättchen (p.a., Merck Nr. 106462)  
Natriumthiosulfat (wasserfrei, Fluka Chemie): 3,224 g Natriumthiosulfat wurden in 10 mL Wasser für eine 2 mmol/L Lösung angesetzt.  
Sepharose 4B (Pharmazia Biotech)

## Elutionsbedingungen

### Mobile Phase:

**Laufmittel A:** 10 % (v/v) Methanol, 0,25 % (v/v) Essigsäure, pH 3,9

**Laufmittel B:** 90 % (v/v) Methanol, 0,25 % (v/v) Essigsäure, pH 3,9

**Flussrate** 1 mL/min

**Injektionsvolumen:** 100 µL

**Detektion:** Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}}$ : 268 nm  
Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{em}}$ : 479 nm

### Fluoreszenz-HPLC:

Bei dieser Methode wird die thiolhaltige Schwermetall-bindende Substanz zunächst mit Monobrombiman derivatisiert. Monobrombiman ist ein sehr spezifisches SH-Reagenz und bildet mBBBr-SH-Addukte, die stark fluoreszieren und in Verbindung mit einer HPLC-Trennung bei Fluoreszenzdetektion zu niedrigen Nachweisgrenzen führen. Im Vergleich zur Methode mit Nachsäulenderivatisierung ist die Nachweisgrenze bei der Fluoreszenz-HPLC mit 0,3 pmol um den Faktor 1000 niedriger [290].

Die Trennung der Monobrombimanderivate erfolgte auf einer LiChrospher RP18 10 µm-Säule (250 x 4 mm; Merck, Darmstadt) mit einer Flussrate von 1 mL/min nach der Methode von NEWTON [291-293] unter Berücksichtigung der von HACIOSMANOGLU [296] vorgenommenen Modifikationen für Gradienten und Säulendimension. Um eine Kontamination der Säule zu vermeiden, wurde eine Vorsäule (LiChrospher RP18, 30-40 µm, 40 x 4,6 mm) vorgeschaltet. Die Trennung erfolgte unter Verwendung des folgenden Gradienten:

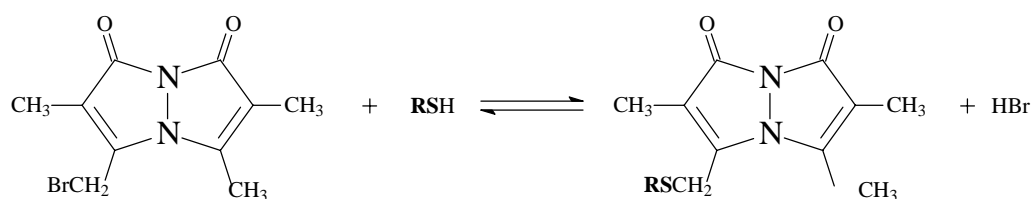
**Tab. 41: Gradientenverlauf bei der Trennung von Monobrombimanderivaten mit der HPLC**

Zeit [min]	Laufmittel A [%(v/v)]	Laufmittel B [%(v/v)]
0	98	2
10	92	8
20	60	40
25	60	40
30	10	90
32	0	100
35	0	100
36	98	2
45	98	2

### 11.5.1 Synthese von Thiolagarose

Die Thiolagarose wurde nach der von KNEER [199, 289] beschriebenen Methode hergestellt. 12 g Sepharose 4B wurden in 6 mL 1 mol/L Natronlauge suspendiert. Zur Epoxyaktivierung wurden 6 mL Epichlorhydrin zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 2 Stunden bei 60°C im thermostatierten Wasserbad geschüttelt. Das aktivierte Gelmaterial wurde mit Phosphat-Puffer pH 6,3 gewaschen und in 12 mL dieses Puffers aufgenommen. Anschließend wurden 10 mL einer 2 mol/L Natriumthiosulfatlösung zugegeben und über Nacht auf einem Rundschüttler (100 U/min, RT) inkubiert. Die erhaltene Thiolagarose wurde mit bidestilliertem Wasser gewaschen und im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurde die Thiolagarose durch Suspendieren in einer Lösung von Dithiothreitol (1 h, RT, vier Spatelspitzen DTT auf 6 mL bidestilliertes Wasser) frisch reduziert.

### 11.5.2 Derivatisierung von Thiolen mit Monobrombiman

**Abb. 66: Reaktionsschema für die Derivatisierung von Thiolen mit Monobrombiman**

Die Derivatisierung erfolgte in Anlehnung an die Methode von KNEER [199, 289]. Der Derivatisierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

20 µL	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (10 mmol/L)
20 µL	EDTA (1 mmol/L)
20 µL	Monobrombiman (1 mmol/L)
10 µL	wässrige Lösung der thiolhaltigen Substanz

Mit bidestilliertem Wasser wird auf ein Volumen von 250 µL aufgefüllt.

Dieser Ansatz wurde 30 Minuten bei 40°C in einem thermostatierten Rundschtüttler (100 U/min) unter Lichtausschluss inkubiert. Um überschüssiges Derivatisierungsreagenz abzufangen, wurden anschließend ca. 0,5 g frisch reduzierte Thiolagarose in das Derivatisierungsgemisch gegeben und das Gemisch 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Vortex-Mixer geschüttelt. Das Gel wurde mit einer Eppendorf-Zentrifuge (10 min, 10000 g, RT) abzentrifugiert und der klare Überstand nach geeigneter Verdünnung (in der Regel 1:10) mithilfe der Fluoreszenz-HPLC analysiert.

## 11.6 Mikrowellengestützter Druckaufschluss

### Geräte:

- **Detmold:**
  - Mikrowellenofen, MLS 1200 mega
  - Programmsteuerungseinheit, mega 240
  - Absaugeinheit, milestone EM-45
  - 12 Autoklaven mit 30 Teflonaufschlussgefäßen
  - Rotoreinheit, HPR 1000/6
  - Temperatur- und Drucksensoreinheit
  
- **Paderborn:**
  - Mikrowellenofen, mls ethos 1600
  - Rotoreinheit, HPR 1000/10
  - 10 Autoklaven mit 10 Quarz- und 20 Teflonaufschlussgefäßen
  - Temperatur- und Drucksensoreinheit
  - Computersteuerung, Softwareversion 3.03

### Verwendete Reagenzien

Salpetersäure 65 % reinst. (Merck Nr. 100443), welche vor der Verwendung durch dreimalige Oberflächenverdampfungsdestillation (Apparatur Acidest, Fa Heraeus, Hanau) gereinigt wurde.

Wasserstoffperoxid (35 %) reinst. (Merck Nr. 108600)

### Durchführung

Für die Bestimmung der Cadmium-, Kupfer-, Eisen-, Nickel- und Zinkgehalte in den vegetativen und generativen Pflanzenteilen, den Zentrifugationsrückständen und den bei der Zentrifugation anfallenden Fettfraktionen wurden die Proben zunächst mit einem Hochtemperatur-Druck-Aufschluss in einer Mikrowelle aufgeschlossen. Als Aufschlussmittel diente eine Mischung aus konzentrierter Salpetersäure und Wasserstoffperoxid.

Es wurden jeweils 1,0 g der Probe eingewogen und je nach Höhe des organischen Anteiles mit 2-4 mL Salpetersäure und 1 mL Wasserstoffperoxid versetzt. Nach einem vorgewählten Programm wurde die Lösung im Autoklaven auf ca. 180°C erhitzt. Die klare Aufschlusslösung wurde mit bidestilliertem Wasser auf ein Volumen von 25 mL aufgefüllt und die Lösung zur Messung der Schwermetallgehalte mit der AAS bzw. DCP verwendet.

### 11.6.1 System mls 1200 mega

Bei diesem System können bis zu 6 Aufschlüsse gleichzeitig angefertigt werden. Die Aufheizung geschieht mittels einer gepulsten Mikrowellenstrahlung von bis zu 1200 Watt. Das Temperatur-Zeit-Programm für den Aufschluss von Sonnenblumen- und Rapsproben wurde selbst entwickelt.

**Tab. 42: Programmparameter für den Aufschluss von Ölpflanzenproben mit dem Mikrowellensystem mls 1200 mega**

Programmschritt	Leistung [W]	Zeit [min]
1	250	1
2	0	2
3	250	5
4	450	5
5	400	2,5
6	0	5

Die bei den Ölsaaten anfallenden Fettfraktionen wurden nach einem gesonderten Programm aufgeschlossen.

**Tab. 43: Programmparameter für den Aufschluss von Fettfraktionen mit dem Mikrowellensystem mls 1200 mega**

Programmschritt	Leistung [W]	Zeit [min]
1	250	1
2	0	2
3	250	1
4	0	2
5	250	5
6	0	5

### 11.6.2 System ethos 1600

Dieses System erlaubt die gleichzeitige Durchführung von bis zu 10 Aufschlüssen. Das Gerät verfügt über eine Temperatur- und Drucksensoreinheit in den Autoklaven sowie einen zusätzlichen Infrarotsensor zur Kontrolle der Manteltemperatur der Autoklaven. Des Weiteren ist das „ethos 1600“ computergesteuert mit einer kontinuierlichen Messwerterfassung für Druck und Temperatur ausgestattet.

**Tab. 44: Programmparameter für den Aufschluss von Ölpflanzenproben mit dem Mikrowellensystem ethos 1600**

Programmschritt	Leistung [W]	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	1000	110	3
2	0	110	4
3	1000	160	5
4	1000	175	5
5	0	25	10

Die angegebenen Leistungsparameter sind Maximalwerte, die nur über kurze Zeiträume erreicht werden. Die aktuellen Leistungswerte liegen zumeist deutlich niedriger (Abbildung 68). Zudem sind die Temperaturwerte nicht als

festen Werte zu verstehen, sondern sie werden zum Ende der angegebenen Zeiträume erreicht (linearer Anstieg). Sollte zu einem Zeitpunkt des Aufschlussvorganges einer der vorgegebenen Parameter überschritten werden, reduziert das System automatisch die Leistung der Magnetrons. Abbildung 68 zeigt die vorgegebenen **Temperaturparameter** für den Aufschluss von Ölsaaten. Zudem werden die Leistungsabgabe (**Power**) der Magnetrons, der Temperaturverlauf in der Probe (**Temp. 1**) sowie die Manteltemperatur der Aufschlussgefäße (**Temp. 2**) grafisch dargestellt.

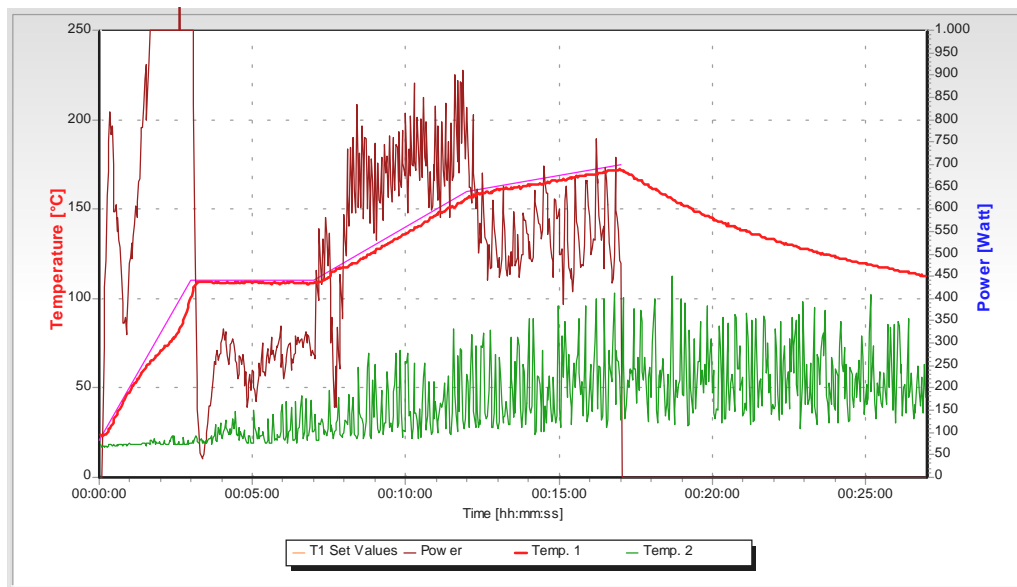


Abb. 67: Temperatur-Leistungs-Verlauf beim Aufschluss von Ölsaaten

## 11.7 Atomspektrometrische Verfahren

Tab. 45: Verwendete Messtechniken sowie zur Verfügung stehende Geräte

Schwermetall	Messtechnik	Gerät
Fe, Zn	Flammen AAS	Perkin Elmer Analyst 100
Cd, Cu, Ni	Graphitrohrfen-AAS	Perkin Elmer ZAAS 3030 Perkin Elmer SIMAA 6000
Cu	DCP	ARL FISONS DCP SPECTRASPAN 7

Eisen und Zink wurden mit der Flammen-AAS quantitativ bestimmt. Die Flammentechnik ist unempfindlich gegenüber unspezifischen Untergrundabsorptionen, sodass auf eine Deuteriumuntergrundkompensation verzichtet werden kann. Die Nachweisgrenzen der Flammen-AAS waren für die Bestimmung von Eisen und Zink in den Aufschlusslösungen und in den Fraktionen der Gelchromatographie ausreichend.

Mit der Graphitrohrfen-AAS wurden Cadmium, Kupfer und Nickel bestimmt. Diese Schwermetalle können im Vergleich zur Flammen-AAS etwa um den Faktor 1000 empfindlicher gemessen werden. Die zur Verfügung stehenden Geräte bieten die Möglichkeit der Zeeman-Untergrundkompensation. Diese ist der Kompensationstechnik mit Deuteriumlampe deutlich überlegen [270], sodass Cadmium, Kupfer und Nickel ohne Nassaufschluss in den Fraktionen

der Gelfiltration bestimmt wurden. Zur Absicherung der Methoden wurde ein zertifiziertes Referenzmaterial der FAO mit der Bezeichnung FAO Standard Nr. 68; ARC/CL (Weizenmehl) verwendet. Die erhaltenen Messwerte lagen immer innerhalb der im Zertifikat angegebenen Vertrauensintervalle. Für die bei der GFC in den Fraktionen auftretenden Matrices existieren keine Referenzmaterialien. Diese Messungen wurden daher über Wiederfindungsraten abgesichert.

Tabelle 46 zeigt die Nachweisgrenzen für die Bestimmung von Cadmium, Kupfer, Nickel, Eisen und Zink. Die Bestimmung der Nachweisgrenzen erfolgte nach dem 3-Sigma (*blind*)-Konzept (DIN-32645, 1994):

**Tab. 46: Nachweisgrenzen der Atomabsorptionsspektroskopie und lineare Messbereiche**

a: Nachweisgrenze für die Bestimmung in saurer Lösung  
b: Nachweisgrenze bei der Bestimmung in Tris-HCl-Puffer

Schwermetall	linearer Messbereich [ng/mL]	Nachweisgrenze [ng/mL] <sup>a</sup>	Nachweisgrenze [ng/mL] <sup>b</sup>
Cadmium	0,5 - 2,0	0,1	0,1
Kupfer	10,0 - 100,0	0,5	0,5
Nickel	30,0 - 80	5,0	10
Eisen	200 - 6000	0,1	0,1
Zink	100 - 1000	10	10

### Geräte

- Graphitrohfen-AAS: Zeemann AAS 3030 (Perkin Elmer, Überlingen)
  - Elektrothermaler Graphitrohfen HGA 600
  - Probenautomat AS-60
  - Powersupply für EDL-Lampen
  - Cd-EDL
  - Ni HKL (Nr. N006-1207), betrieben mit 25 mA
  - Pyro-Graphitrohr für L`vov-Plattform (PE Nr. 109322) und L`vov-Plattform aus Pyrokohlenstoff (PE Nr. 109324)
- Graphitrohfen-AAS: SIMAA 6000 (Perkin-Elmer, Überlingen)
  - Elektrothermaler Graphitrohfen HGA 700
  - Probenautomat AS 72 für 40 oder 80 Proben
  - Furnace Cooling System
  - Dell Dimension XPS 400 Rechneinheit
  - AAWinLab Software-Version 2.51
  - Cd-EDL (PE Nr. 10281)
  - Cu, Fe, Ni Multielement-HKL
  - THGA Graphitrohr (PE Nr. B0508884)
- Flammen-AAS: Aanalyst 100 (Perkin Elmer, Überlingen)
  - Multielement HKL für Ca, Mg und Zn
  - Dell Optiplex GXa Rechneinheit
  - AAWinLab Software Version 2.6
- ARL Fisons DCP SPECTRASPAN 7

**Verwendete Reagenzien**

Cadmium-Stammlösung:	1,000 g/L; Titrisol (Merck Nr. 109989)
Kupfer-Stammlösung:	1,000 g/L, Titrisol (Merck Nr. 109987)
Eisen-Stammlösung:	1,000 g/L, Titrisol (Merck Nr. 102616)
Nickel-Stammlösung:	1,000 g/L, Titrisol (Merck Nr. 107289)
Zink-Stammlösung:	1,000 g/L, Titrisol (Merck Nr. 109929)
Matrixmodifikator:	3 mL Palladiummodifizier (Merck Nr. 7289) und 2 mL Magnesiummodifizier (Merck Nr. 5813) mit bidest. Wasser auf 20 mL auffüllen.
Gase:	Acetylen, Luft, Stickstoff, Argon
Salpetersäure (65 %):	(Merck Nr. 100443), Verwendung nach dreimaliger Oberflächenverdampfungsdestillation.
Referenzmaterial:	FAO Standard Nr. 68; ARC/CL Wheat flour

Für die Messung der Schwermetallgehalte in den Aufschluslösungen wurden die Kalibrationslösungen in 2 % (v/v) Salpetersäure angesetzt. Für die Bestimmung der Schwermetallgehalte in den Fraktionen der FPLC wurden die Kalibrationslösungen in Tris-HCL-Puffer (0,05 mol/L; pH 8,0) angesetzt.

**11.7.1 Bestimmung von Cadmium**

Gerät:	Perkin Elmer ZAAS 3030 Perkin Elmer SIMAA 6000
Wellenlänge:	228,8 nm
Spalt:	0,7 nm
Probenvolumen (ZAAS 3030/ SIMAA 6000):	20 µL / 10 µL
Modifiervolumen (ZAAS 3030/ SIMAA 6000):	20 µL / 5 µL
Messzeit:	3 s
Kalibration:	linear, 0,5/1,0/1,5/2,0 ng/mL
Signalauswertung:	Peakfläche

**Tab. 47: THGA-Temperaturprogramm Perkin Elmer Z 3030 zur Bestimmung von Cadmium**

Schritt	Temperatur [°C]	Aufheizzeit [s]	Haltezeit [s]	Interner Gasfluss [mL/min]
1	150	5	30	300
2	450	5	20	300
3	1600	0	3	300
4	2800	1	2	0
5	20	1	20	300



**Tab. 48: THGA-Temperaturprogramm Perkin Elmer SIMAA 6000 zur Bestimmung von Cadmium**

Schritt	Temperatur [°C]	Aufheizzeit [s]	Haltezeit [s]	Interner Gasfluss [mL/min]
1	110	5	20	250
2	150	15	20	250
3	500	10	20	250
4	1600	0	3	0
5	2450	1	3	250
6	20	1	15	250

**11.7.2 Bestimmung von Kupfer**

Gerät:	Perkin Elmer SIMAA 6000
Wellenlänge:	324,8 nm
Spalt:	0,7 nm
Probenvolumen:	10 µl
Modifiervolumen:	5 µl
Messzeit:	5 s
Kalibration:	linear, 10/25/50/100 ng/mL
Signalauswertung:	Peakfläche

Das im Folgenden für Kupfer beschriebene Messprogramm wurde auch für die Multielementbestimmung von Cadmium und Kupfer verwendet.

**Tab. 49: THGA-Temperaturprogramm SIMAA 6000 zur Bestimmung von Kupfer bzw. zur Multielementbestimmung von Cadmium und Kupfer**

Schritt	Temperatur [°C]	Aufheizzeit [s]	Haltezeit [s]	Interner Gasfluss [mL/min]
1	110	1	20	250
2	130	15	20	250
3	600	10	60	250
4	2050	0	5	0
5	2450	1	3	250
6	20	1	15	250

**11.7.3 Bestimmung von Nickel**

Gerät:	Perkin Elmer Z 3030
Wellenlänge :	232,0 nm
Spalt:	0,2 nm
Probenvolumen:	20 µl
Messzeit:	4 s
Kalibration:	linear, 30/50/80 ng/mL
Signalauswertung:	Peakfläche

**Tab. 50: THGA-Temperaturprogramm Perkin Elmer Z 3030 zur Bestimmung von Nickel**

Schritt	Temperatur [°C]	Aufheizzeit [s]	Haltezeit [s]	Interner Gasfluss [mL/min]
1	150	5	30	300
2	400	10	5	300
3	1400	15	20	300
4	2500	0	5	0
5	2600	1	2	300
6	30	1	20	300

**11.7.4 Bestimmung von Eisen**

Gerät:	Perkin Elmer Analyst 100
Wellenlänge:	248,6 nm
Spalt:	0,2 nm
Messzeit:	5 s
Kalibration:	linear, 0,2/0,5/1/2/3/4/6 ng/mL
Signalauswertung:	Peakfläche
Gasstrom:	Acetylen 2,5 L/min Luft 4 L/min

**11.7.5 Bestimmung von Zink**

Gerät:	Aanalyst 100
Wellenlänge :	213,9 nm
Spalt:	0,7 nm
Messzeit:	5 s
Kalibration:	linear, 0,1/0,2/0,4/0,6/0,8/1,0 ng/L
Signalauswertung:	Peakfläche
Gasstrom:	Acetylen: 2,5 l/min Luft: 4,0 l/min

**11.7.6 Bestimmung von Kupfer mit der DCP**

Gerät:	ARL Fisons DCP SPECTRASPAN 7
Wellenlänge:	324,75 nm
Messzeit:	10 s
Kalibration:	0,1 – 2,5 µg/L
Signalauswertung:	Fläche
Gasstrom:	Argon

**Tab. 51: Nachweisgrenze der DCP und linearer Messbereich für Kupfer**

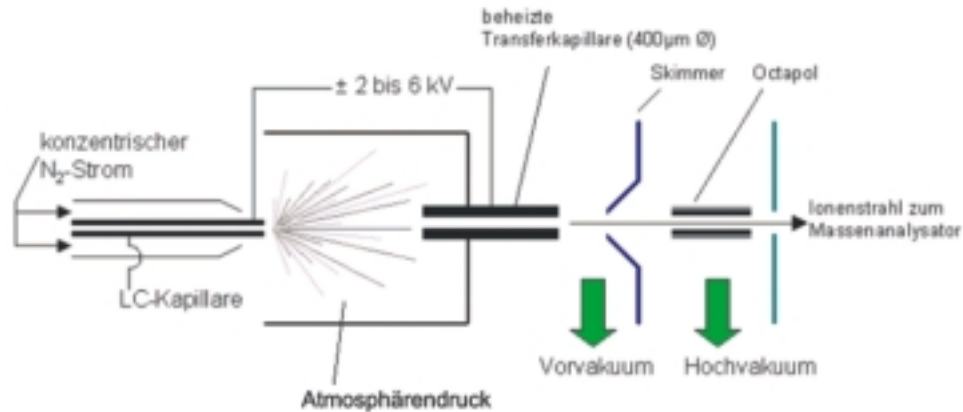
a: Nachweisgrenze für die Bestimmung in saurer Lösung

b: Nachweisgrenze bei der Bestimmung in Tris-HCl-Puffer

Schwermetall	linearer Messbereich [µg/mL]	Nachweisgrenze [µg/mL] <sup>a</sup>	Nachweisgrenze [µg/mL] <sup>b</sup>
Kupfer (DCP)	0,02 – 10	0,002	0,002

## 11.8 Electrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS/ESI-MSMS)

Die ESI-MS ist eine der modernsten Analysetechniken für die Elementspeziesanalytik [270, 297, 298, 335 342-344]. Zur Detektion von Proteinen und Peptiden dient ein Quadrupol-Massenspektrometer. Die Ionisation der Proben erfolgt im Elektrospray-Verfahren (Abbildung 76). Die Nachweisgrenze für die Analyse von Peptiden und Proteinen liegt bei  $10^{-15}$  mol [292].



**Abb. 68: Schematischer Aufbau einer Elektrospray-Ionisationsquelle**

Zudem ist es möglich, mit der ESI-MS im so genannten MSMS-Modus zu messen. Hierbei werden in einer Stoßkammer (Ionenfalle) die entstandenen Molekülionen mit Helium oder Argon beschossen, wodurch charakteristische Zerfallsprodukte entstehen. Dieser Prozess wird als „collision-induced dissociation“ (CID) bezeichnet. Die CID ermöglicht im MSMS-Modus u. a. die Bestimmung der Aminosäuresequenz von Peptiden wie Phytochelatinen [297].

Die Ionenfalle („Ion Trap“) besteht im Wesentlichen aus einer Ringelektrode und zwei Endkappenelektroden mit zentralen Öffnungen. Die Ringelektrode kann als in sich gebogener, an den Enden verbundener Quadrupolstab verstanden werden [345, 346]. Soll ein größerer Massenbereich gescannt werden, ist es am günstigsten an der Ringelektrode ausschließlich mit einer Wechselspannung zu arbeiten, wodurch ein dreidimensionales, rotationssymmetrisches Quadrupolfeld entsteht. Ionen der ausgewählten Masse/Ladungs-Verhältnisse werden in diesem Feld auf stabilen Umlaufbahnen fokussiert. Wenn die Amplitude der Wechselspannung erhöht wird, werden die Umlaufbahnen der Ionen in Reihenfolge steigender  $m/z$ -Quotienten instabil und die Ionen werden in Richtung Detektor aus der Falle ausgeworfen. Die Ionenfalle arbeitet diskontinuierlich; es wird ein bestimmter Zyklus von Füllung und Massenanalyse durchlaufen. Wichtig ist, eine optimale Füllung der Falle sicherzustellen. Sind zu viele Ionen in der Falle, stören sie sich gegenseitig und die Auflösung wird verschlechtert; sind dagegen zu wenig Ionen eingefangen worden, ist die Empfindlichkeit schlecht. Die Massenanalyse läuft in folgenden Schritten ab [347]:

**Für MS:**

- I. Einfangen der Ionen durch Anlegen einer Wechsellspannung an die Ringelektrode und Einstrom von Helium als Dämpfungsgas.
- II. Sequenzielle Massenanalyse und Detektion.

**Für MS/MS:**

- III. Auswahl der gewünschten Ionen:
  - a) Erhöhung der Amplitude der Wechsellspannung.  
=>kleinere Massen werden instabil,
  - b) zusätzliche Waveform-Spannung  
=>größere Massen werden instabil,
  - c) Stabilisierung der gewünschten Masse.
- IV. Anlegen einer zusätzlichen Gleichspannung  
=>Beschleunigung der Ionen und Fragmentierung durch Kollision mit den Helium-Atomen.

**Gerät**

ThermoFinnigan LCQ Advantage

**Messbedingungen**

## 1. MS-Betrieb:

Probenaufgabe:	5 µL/min
Temperatur Transferkapillare:	250 °C
Spannung ESI-Nadel	5 kV
Sheath-Gas	Stickstoff, 25 scale
Kapillarspannung:	13 V
Tube lens:	5 V

## 2. MSMS-Betrieb:

Kollisionsgas:	Helium
Kollisionsenergie (normiert):	10 – 40 %

**11.9 Bestimmung von Thiol-Gruppen nach Ellmann [348]****Geräte**

Spektralphotometer (Unicam UV-VIS 4)

Quarzküvetten, Schichtdicke 1 cm

**Verwendete Reagenzien**

di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (reinst, Merck Nr. 6576)

Natriumdihydrogenphosphat-monohydrat (p.a., Merck Nr. 6346)

Phosphat-Pufferlösung nach Sørensen (0,1 mol/L; pH 8,0):

236,75 mL di-Natriumhydrogenphosphatlösung (0,2 mol/L) und 13,25 mL Natriumdihydrogenphosphat-Lösung (0,2 mol/L) im Messkolben mit destilliertem Wasser auf 500 mL auffüllen.

DTNB-Reagenz: 39,6 mg 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoesäure) (reinst, Ellmann's Reagenz, Serva Nr. 20735) in einem Gemisch aus 5 mL Phosphatpuffer nach Sørensen und 5 mL Methanol lösen.

Kalibrationslösungen: 100 mg L-Cysteiniumchlorid-Monohydrat (für biochemische Zwecke, Merck Nr. 2839) in destilliertem Wasser lösen und auf 100 mL auffüllen. Die Stammlösung wurde mit destilliertem Wasser auf 5/10/30/50 mg/L verdünnt.

### **Durchführung**

Zu 0,5 mL einer Fraktion der GFC oder der Kalibrationslösung wurden nacheinander 2,4 mL Phosphatpufferlösung und 0,1 mL DTNB-Reagenz pipettiert. Es wurde kurz vermischt und sofort in einer Quarzküvette im Spektralphotometer bei 412 nm gegen Luft die Extinktion gemessen. Als Blindwert dienen 0,5 mL destilliertes Wasser.

## **11.10 Proteinbestimmung nach Bradford [349, 350]**

Der verwendete Farbstoff Coomassie Brilliantblue G-250 oder Servablau-G liegt in saurer Lösung in einer blauen und einer orangen Form vor. Proteine binden bevorzugt die blaue Form, wobei ein Komplex entsteht, dessen Extinktionskoeffizient um vieles größer ist als der des freien Farbstoffes.

**Lösung 1:** 70 mg Coomassie Brilliantblue G-250 (Servablau-G) wurden in 50 mL 96 %-igen Ethanol gelöst.

**Lösung 2:** 100 mL 86 %-ige Phosphorsäure mit 600 mL Wasser verdünnen.

*Farbreagenz:* Lösung 1) und 2) wurden gemischt und mit Wasser auf 1 L aufgefüllt, gut gemischt und wenn nötig filtriert. Eine Eichkurve wurde anschließend im Bereich von 0-15 µg Protein (Rinderserumalbumin) erstellt. 50 µl Probelösung wurden mit 1 mL Farbreagenz versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Blindwert wurden 50 µl des Puffers der Probe mit 1 mL Farbreagenz versetzt und anschließend die Extinktion bei 595 nm bestimmt.

## **11.11 Gewinnung von Wurzeldruck-Exudat (Xylemsaft)**

Die hierbei verwendeten Pflanzen werden in Hydrokultur in der Wachstumskammer angezogen. Die Gewinnung des Xylemsaftes wurde während der Lichtperiode durchgeführt. Mit einem Messer wurde der Stängel der Pflanzen ca. 3 cm oberhalb der Wurzeln durchgeschnitten, wobei keine Blätter mehr auf dem übrigen Teil des Stängels verblieben. Um Kontaminationen durch beschädigte Zellen zu vermindern, wurde der erste Tropfen verworfen. Der durch den Wurzeldruck herauskommende Saft in Eppendorfgefäßen gesammelt und bei -80°C bis zur Analyse gelagert. Es wurde das in den ersten 45 min nach dem Abschnitt austretende Exudat gesammelt [351-353].

## 11.12 Isolierung von Organellen aus Kotyledonen von Sonnenblumen- und Rapskeimlingen

### 11.12.1 Chloroplasten [321]

#### Geräte

Kühlzentrifuge ´Avanti Centrifuge´ J-25; Rotor JA-25.50 (Beckmann, München)

Zentrifugenröhrchen

Schlauchpumpe

Spektralphotometer (Unicam UV-VIS4)

#### Verwendete Reagenzien

Di-Kaliumhydrogenphosphat

Kaliumdihydrogenphosphat (p.a., Merck, Darmstadt):

Phosphatpuffer (20 mmol/L; pH 7,4) 2,72 g Kaliumdihydrogenphosphat und 4,56 g Di-Kaliumhydrogenphosphat wurden in 1000 mL Wasser gelöst.

Mannit (für die Mikrobiologie; Merck Nr. 105982)

Magnesiumchlorid (p.a.; Merck Nr. 105833)

Rinderserumalbumin (Fraktion V; für Molekularbiologie; Merck Nr. 112003)

Dithiothreitol (für biochemische Zwecke, > 99 %, Merck Nr. 111474)

Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Titriplex III (p.a. Merck Nr. 108418)

N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N´-(2-ethansulfonsäure) (HEPES)

Natriumhydroxidplätzchen (p.a., Merck Nr. 106462)

Zerkleinerungsmedium: 6,0126 g Mannitol (330 mmol), 0,1017 g Magnesiumchlorid (5 mmol), 0,1 g Rinderserumalbumin (0,1 %), 0,0155 g Dithiothreitol (1 mmol) und 0,0293 g EDTA (1 mmol) wurden in 100 mL Phosphatpuffer (20 mmol, pH 7,4) gelöst.

Waschmedium: 6,0126 g Mannitol (330 mmol) und 0,0293 g EDTA (1 mmol) wurden in 100 mL Phosphatpuffer gelöst.

Sorbitol (Merck Nr. 103583)

80 %-ige Percolllösung: 3,0058 g Sorbitol (330 mmol/L) und 0,119 g HEPES (10 mmol/L) wurden in 40 mL Percoll gelöst und mit destilliertem Wasser auf 50 mL aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit 1 mol/L Natronlauge auf pH 7,8 eingestellt.

40 %-ige Percolllösung: 3,0058 g Sorbitol (330 mmol/L) und 0,119 g HEPES (10 mmol/L) wurden in 20 mL Percoll gelöst und mit destilliertem Wasser auf 50 mL aufgefüllt. Der pH-Wert von 7,8 wurde mit 1 mol/L Natronlauge eingestellt.

#### Durchführung

Etwa 10 g grüne Kotyledonen von Sonnenblumen- bzw. Rapskeimlingen (Anzucht vgl. 9.1) wurden geerntet und in 20 mL eisgekühltem Homogenisationsmedium konserviert. Anschließend wurden die Kotyledonen vorsichtig im Zerkleinerungsmedium unter Eiskühlung für ca. zwei Minuten gemörsert (glasierter Porzellanmörser). Das Homogenat wurde durch eine Lage

Miraclloth (Calbiochem) und vier Lagen Verbandmull (NOBA Verbandmittel) gepresst und danach 20 Minuten in einer Kühlzentrifuge (4°C) bei 1500 g zentrifugiert. Der Bodensatz der Zentrifugation mit den Chloroplasten wurde in 2 mL Waschmedium aufgenommen. Diese Suspension wurde auf einen Percollgradienten aufgetragen, welcher aus 6 mL einer 80 %-igen und 12 mL einer 40 %-igen Percolllösung aufgebaut ist. Der Gradient wurde zentrifugiert (4°C, 1600 g), mit schwacher Beschleunigung und schwacher Bremse. Nach der Zentrifugation konnte oberhalb der 80 %-igen Percolllösung eine grüne Schicht mit intakten Chloroplasten beobachtet werden. Der Gradient wird mit einer Schlauchpumpe von unten nach oben in Fraktionen von ca. 1 mL aufgenommen. In den Fraktionen wird der Chlorophyllgehalt gemessen. Dazu werden 100 µL der Fraktion und 800 µL 80 % Ethanol (v/v) gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur verschlossen inkubiert. Darauf folgt für 10 Minuten eine Zentrifugation bei 3000 U/min. Die Absorption des Überstandes wird bei 652 nm gegen einen Blindwert aus 80 %-igem Ethanol bestimmt. Die Konzentration an intakten Chloroplasten berechnet sich nach:

$$c(\text{Chloroplasten})[\text{mg} / \text{mL}] = \frac{E(652 \text{ nm})}{34,2} * \text{VF}$$

mit VF: Verdünnungsfaktor

### 11.12.2 Mitochondrien und Peroxisomen

Zur Isolierung von Mitochondrien und Peroxisomen wurden verschiedene Aufarbeitungsmedien ausgetestet. Insbesondere der übliche Zusatz von EDTA zum Aufarbeitungsmedium ist als problematisch für die Schwermetallverteilung anzusehen. Daher wurde bei einigen Untersuchungen auf den Einsatz von EDTA verzichtet (vgl. Kapitel 5.1), um Vergleichsdaten zu erhalten.

#### Geräte

Kühlzentrifuge 'Avanti™ Centrifuge' J-25 mit Rotor JA-25.50 (Beckmann, München)

Schlauchpumpe

Spektralphotometer (Unicam UV-VIS4)

Quarzmikroküvetten 1 mL

Gradientenmischer

#### Verwendete Chemikalien

Mannit (für Mikrobiologie; Merck Nr. 105982)

Saccharose (für Mikrobiologie; Merck Nr. 107651)

Tricin (N-[(Trishydroxymethyl)-methyl]-glycin) (Merck Nr. 108602)

Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Titriplex III (p.a. Merck Nr. 108418)

Rinderserumalbumin (Fraktion V; für biochem. Zwecke; Merck Nr. 112018)

2-Mercaptoethanol (für Molekularbiologie; Merck Nr. 112006)

Natriumhydroxidplätzchen (p.a., Merck Nr. 106462)

Natriumdithionit (technisch; Merck Nr. 106505)

Triton x-100

Wasserstoffperoxid (35 %) (Riedel Nr. 18304)

Cytochrom c (Sigma C 3381)

(N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES) (p.a., Roth Nr. 9105.4)

Di-Kaliumhydrogenphosphat (p.a., Merck Nr. 105099)

Kaliumdihydrogenphosphat (reinst., Merck Nr. 104801)

Phosphatpuffer (10 mmol/L; pH 7,4): 1,36 g Kaliumdihydrogenphosphat und 2,28 g Di-Kaliumhydrogenphosphat wurden in 1000 mL Wasser gelöst.

Aufarbeitungsmedium 1:

5,466 g Mannit (0,3 mol/L), 1,7917 g Tricin (0,1 mol/L) und 0,1 g Rinderserumalbumin (0,1 %) wurden in 100 mL Wasser gelöst. Bei den Untersuchungen mit EDTA wurden 0,293 g EDTA (1 mmol/L) hinzugefügt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 mol/L Natronlauge auf pH 7,5 eingestellt. Direkt vor der Verwendung wurden 11,7 µL/10mL Mercaptoethanol (0,014 mmol/L) zugefügt.

Percoll-Saccharose-Gradient 1 (Tricin, pH 7,5):

10,269 g Saccharose (0,3 mol/L), 0,1792 g Tricin (10 mmol) und gegebenenfalls 0,0292 g EDTA (1 mmol) wurden in 100 mL 100 %-igem Percoll (für die 100 %-ige Percolllösung) oder in 50 mL Percoll + 50 mL Wasser gelöst (für die 50 %-ige Percolllösung) bzw. in 15 mL Percoll + 85 mL Wasser (für die 15 %-ige Percolllösung) aufgelöst.

Aufarbeitungsmedium 2:

5,466 g Mannit (0,3 mol/L), 0,5958 g HEPES (0,025 mol/L) und 0,1 g Rinderserumalbumin (0,1 %) wurden in 100 mL Wasser gelöst. Bei den Untersuchungen mit EDTA wurden 0,293 g EDTA (1 mmol/L) hinzugefügt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 N Natronlauge auf pH 7,5 eingestellt. Direkt vor der Verwendung des Aufarbeitungsmediums wurden 10 µL/10mL 2-Mercaptoethanol zugefügt.

Percoll-Saccharose-Gradient 2 (HEPES, pH 7,5):

10,269 g Saccharose (0,3 mol/L) und 0,1192 g HEPES (5 mmol) wurden analog zu Percoll-Gradienten Lösung 1 entweder in 100 mL Percoll, 50 mL Percoll + 50 mL Wasser oder in 15 mL Percoll + 85 mL Wasser gelöst.

## **Durchführung**

Die Vorgehensweise zur Isolierung von intakten Mitochondrien und Peroxisomen aus Kotyledonen von Sonnenblumen und Raps war für beide Aufarbeitungsmedien identisch.

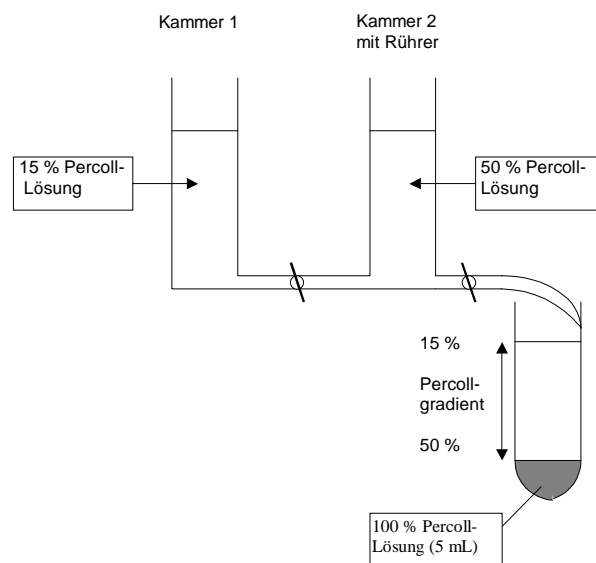
Zur Vorbereitung des kontinuierlichen Percollgradienten wurden in einem Zentrifugenröhrchen 5 mL von 100 %-igem Percoll vorgelegt. In einem Gradientenmischer wurden in Kammer eins 13 mL einer 15 %-igen bzw. in Kammer zwei 13 mL einer 50 %-igen Percoll-Saccharose-Lösung gegeben. Unter ständigem Rühren mischte sich ein kontinuierlicher Gradient von 50–15 % der eingesetzten Percolllösung.



Bei der Erstellung des kontinuierlichen Gradienten war darauf zu achten, dass Turbulenzen im Gradienten vermieden wurden durch:

- Vorsichtiges Öffnen der Verschlussschraube am Gradientenmischer,
- Kontakt des Auslaufstutzens mit der Gefäßwand des Zentrifugenglases,
- geringe Ausfließgeschwindigkeit,
- vorsichtigen Transport der fertigen Gradienten,
- Verwendung von vorgekühlten Reagenzien um einen Temperaturgradienten zu vermeiden.

Etwa 10 g der fünf Tage alten nicht-grünen Kotyledonen (Anzucht vgl. 9.1; Lichtausschluss) wurden mit 20 mL vorgekühltem Aufarbeitungsmedium unter Eiskühlung gemörsert. Die zermörserten Keimlingsblätter wurden sanft durch drei Lagen Miracloth (Calbiochem) und eine Lage Verbandmull (NOBA Verbandmittel) gepresst. Das Filtrat wurde anschließend für zehn Minuten bei 2500 g zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde für 20 Minuten bei 11000 g zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde in 2 mL des jeweiligen Aufarbeitungsmediums aufgenommen und die entstehende Suspension auf den Percollgradienten aufgetragen.



**Abb. 69: Schematischer Aufbau einer Percollgradientenmischeinheit**

Der Percollgradient wurde 30 Minuten bei 20000 U/min (44000 g) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren drei verschiedene Zonen unterscheidbar. Direkt oberhalb des 100 %-igen Percoll war häufig eine weißlich-trübe Zone zu erkennen, welche intakte Peroxisomen enthielt. Zudem zeigte sich im mittleren Teil des Gradienten eine Schicht, die intakten Mitochondrien zuzuordnen war. Oberhalb des eigentlichen Gradienten war eine Zone mit beschädigten Peroxisomen, Mitochondrien, Chloroplasten und sonstigen Zellbestandteilen (Abbildung 23). Der Gradient wurde anschließend mit einer Schlauchpumpe von unten nach oben abgesaugt und in Fraktionen von etwa 1 mL unterteilt. In den Fraktionen wurden die intakten Peroxisomen und Mitochondrien anhand organellenspezifischer „Leitenzyme“ bestimmt.

## Bestimmung der Leitenzyme

Die Enzymtests wurden photometrisch bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Messung wurden Quarz- oder Kunststoffküvetten mit einer Schichtdicke von einem Zentimeter verwendet. Die Messungen erfolgten direkt aus den Gradientenfraktionen ohne weitere Probenvorbereitung.

- **Peroxisomen**

Das zur Identifizierung von Peroxisomen verwendete Leitenzym ist Katalase. Katalase ist konstitutiv in Peroxisomen vorhanden und dient dazu, dass durch peroxisomale Oxidasen gebildete Wasserstoffperoxid in Sauerstoff und Wasser zu zersetzen. Diese von AEBI [354] beschriebene Reaktion wurde zusammen mit den von MÜLLER [264] beschriebenen Modifikationen eingesetzt, um Peroxisomen nachzuweisen. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte mit einem Spektralphotometer bei 230 nm. Die Messdauer betrug 30 Sekunden. Die Katalaseaktivität errechnete sich aus der Differenz der Extinktion zu Beginn der Messung und nach 30 Sekunden.

**Messpuffer:**

Phosphatpuffer (10 mmol/L, pH 7,0) mit 116 µL Wasserstoffperoxid (35 %, 11,8 mmol/L)

**Testansatz:**

Referenzküvette: 1020 µL Phosphatpuffer (10 mmol/L; pH 7,0)  
Messküvette: 1000 µL Messpuffer  
20 µL Probenlösung

- **Mitochondrien**

Das zur Bestimmung von intakten Mitochondrien genutzte Enzym ist die Cytochrom c-Oxidase (Ferrocytochrom c-Sauerstoff Oxidoreduktase). In der Atmungskette fungiert eine Serie von Cytochromen als Überträger von Elektronen von Ubichinon auf den Sauerstoff, wobei die letzten Glieder der Serie (Cytochrom a und a<sub>3</sub>) Bestandteile eines Enzymkomplexes sind, der als Cytochrom-Oxidase bezeichnet wird [21, 22]. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgt nach Schnarrenberger [355] bei 550 nm im Spektralphotometer. Die Cytochrom c-Oxidaseaktivität berechnet sich aus der Differenz der Extinktion vor Messbeginn und nach einer Messdauer von 30 Sekunden.

**Messpuffer:**

Phosphatpuffer (10 mmol/L, pH 7,0)

**Testansatz:**

Referenzküvette: 1040 µL Messpuffer  
100 µL Cytochrom c (red.) (0,8 mmol)  
Testküvette: 1000 µL Messpuffer  
20 µL Triton x-100 (red., 1 %)  
100 µL Cytochrom c (red.) (0,8 mmol)  
20 µL Probensubstanz

## **Reduktion des Cytochrom c**

1-2 mL Cytochrom c-Lösung (0,8 mmol) wurden in einer Kunststoff-Makromessküvette gegeben und mit einer Spatelspitze Natriumdithionit reduziert (hellroter Farbumschlag). Anschließend wurde so viel Cytochrom c-Lösung zugegeben, bis diese dunklen Tropfen gerade nicht mehr hellrot wurden (Th. Betsche, persönl. Mitteilung). Der Reduktionszustand der Cytochrom c-Lösung wurde durch Messung der Extinktion bei 550 nm gegen Phosphatpuffer geprüft.

Die Extinktion der reduzierten Cytochrom c-Lösung lag bei etwa 1,8.

## **11.13 Vorbereitung der isolierten Substanzen zur Aminosäureanalyse [328, 356]**

### **Geräte und Reagenzien**

Gefriertrocknungsanlage,

Reaktionsgefäße mit Deckel, 2,5 mL, (Fa Eppendorf)

Ameisensäure p. a. (98 – 100 %) (Merck Nr. K14306564)

Wasserstoffperoxid-Lösung (35 %) (Riedel Nr. 18304)

Methanol p. a. (Merck Nr. 6009)

### **Durchführung**

950 µL Ameisensäure wurden in einem Reaktionsgefäß mit 50 µL Wasserstoffperoxid-Lösung gemischt und 2 h bei Raumtemperatur sowie anschließend in einem Eisbad weitere 30 Minuten, stehen gelassen.

In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 1 mg der isolierten Substanz mit 250 µL Ameisensäure und 50 µL Methanol vermischt und ebenfalls 30 Minuten in einem Eisbad stehen gelassen. Zu diesem Gemisch wurden 0,5 mL der im ersten Reaktionsgefäß entstandenen Perameisensäure zugegeben und 2,5 Stunden in einem Eisbad stehen gelassen. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit eiskaltem Wasser auf ca. 15 mL aufgefüllt und die Lösung in der Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert, bis nur noch ein trockener weißer Rückstand vorlag.

## 12 Literaturverzeichnis

- [1] L. Roth, K. Kormann (2000): Ölpflanzen Pflanzenöle, Fette Wachse Fettsäuren Botanik Inhaltstoffe Analytik. Ecomed Verlagsgesellschaft. Landsberg/Lech.
- [2] H. Hugger (1989): Sonnenblumen; Züchtung, Anbau, Verarbeitung. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- [3] A. Klocke (1992): Ursachen und Bewertung von Bodenbelastungen in Deutschland. Schriftenreihe HLBS: Immissionen und Altlasten in der Landwirtschaft. Heft 137, 7 - 45.
- [4] J. Brüggemann (1996): Cadmium-Gehalte in heimischen Ölsaaten 1995 (1996): In: Jahresbericht 1995. Bundesanstalt für Getreide- Kartoffel- und Fettforschung (BAGKF). Detmold.
- [5] B. D. Traulsen, G. Schönhard, Th. Strumpf (1997): Grundlegende Untersuchungen zur Festlegung von Grenzwerten in Ölpflanzenprodukten. Gesunde Pflanzen **7**, 215 - 219.
- [6] M. J. McLaughlin, D. R. Parker, J. M. Clarke (1999): Metals and micronutrients – food safety issue. Field Crop Research **60**, 143 - 163.
- [7] C. A. Grant, W. T. Buckley, L. D. Bailey, F. Selles (1998): Cadmium accumulation in crops. Can. J. Plant Sci. **78**, 1 - 17.
- [8] J. Brüggemann (1997): Mineralstoffe und Spurenelemente: Cadmium in Getreide, Kartoffeln und Ölsaaten. In: Jahresbericht 1996: Bundesanstalt für Getreide- Kartoffel- und Fettforschung (BAGKF). Detmold, 49 - 51.
- [9] J. Brüggemann (1998): Cadmium-, Nickel- und Zinkgehalte in der Rapsernte aus Bayern, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern und Thüringen. Detmold: Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung in Detmold und Münster (1997). 8. Bll..
- [10] E. Nieboer, D. H. S. Richardson (1980): The replacement of the nondescriptive term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. Environmental Pollution (Series B) **1**, 3 - 26.
- [11] H. Passow, A. Rothstein, T.W. Clarkson (1961): The general pharmacology of heavy metals. Pharmac. Rev. **13**, 185 - 224.
- [12] N. Wiberg (1985): Hollemann-Wiberg Lehrbuch der Anorganischen Chemie (91.-100.Auflage). de Gruyter, Berlin, 868.
- [13] L. S. di Toppi, R. Gabbrielli (1999): Response to cadmium in higher plants. Environmental and Experimental Botany **41**, 105 - 130.
- [14] J. O. Nriagu, J .M. Pacyna (1988): Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils with trace metals. Nature **333**, 134 - 139.
- [15] G. N. Mhatre, C. E. Pankhrust (1997): Bioindicators to detect contamination of soils with special reference to heavy metals. In: Biological Indicators of Soil Health and Sustainable Productivity. Hrsg. C.E. Pankhrust, B.M. Doube, V.V.S.R. Gupta. CAB International, New York, 349 - 369.
- [16] A. Schulte, A. Balazs, J. Block, J. Gehrman (1996a): Entwicklung der Niederschlags-Deposition von Schwermetallen in West-Deutschland. 1. Blei und Cadmium. Z. Pflanzenernähr. Bodenk. **159**, 377 – 383.

- [17] A. Schulte, A. Balazs, J. Block, J. Gehrman (1996b): Entwicklung der Niederschlags-Deposition von Schwermetallen in West-Deutschland. 2. Arsen, Chrom, Kobalt, Nickel. Z. Pflanzenernähr. Bodenk. **159**, 385 - 389.
- [18] Botschaft zur Ratifikation des Protokolls vom 24. Juni 1998 zum Übereinkommen von 1979 über weiträumige grenzüberschreitende Luftverunreinigung, betreffend Schwermetalle, Schweizer Nationalrat, 1.3.2000.
- [19] 6. Umweltkontrollbericht (2001): 6. Umweltkontrollbericht zur Vorlage beim Nationalrat; Umweltbundesamt Republik Österreich, 2001.
- [20] R. Seim, G. Tischendorf (1990): Grundlagen der Geochemie. 1. Auflage, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffchemie, Leipzig.
- [21] B. B. Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones (2000): Biochemistry & Molecular Biology of Plants. 1. Auflage. American Society of Plant Physiologists. Rockville.
- [22] U. Lüttge, M. Kluge, G. Bauer (1988): Botanik, Ein grundlegendes Lehrbuch, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- [23] H. Marschner (1995) Mineral nutrition of higher plants (2. Auflage). Academic Press, London.
- [24] R. M. Welch, J. J. Hart, W. A. Norvell, L. A. Sullivan, L. V. Kochian (1999): Effects of nutrient solution zinc activity on net uptake, translocation, and root export of cadmium and zinc by separated sections of intact durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) seedling roots. Plant and Soil **208**, 243 - 250.
- [25] G. Schwedt (1997): Elementspeziesanalytik. Chemie in unserer Zeit **4**, 183 - 189.
- [26] K.-J. Dietz, M. Baier, U. Krämer (1999): Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: M. N. V. Prasad, J. Hagemeyer, eds, Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems. Springer, Berlin, 73 - 97.
- [27] R. J. Henkin (1984): Zink. In: Metalle in der Umwelt. Verteilung, Analytik und biologische Relevanz, Merian (Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim.
- [28] A. Oskasson (1984): Nickel. In: Metalle in der Umwelt. Verteilung, Analytik und biologische Relevanz, Merian (Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim.
- [29] I. H. Scheinberg (1984): Kupfer. In: Metalle in der Umwelt. Verteilung, Analytik und biologische Relevanz, Merian (Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim.
- [30] M. Stoppler (1984): Cadmium. In: Metalle in der Umwelt. Verteilung, Analytik und biologische Relevanz, Merian (Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim.
- [31] K. Mengel (1991): Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze. 7. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- [32] S. Silbernagel, A. Despopoulos (1991): Taschenatlas der Physiologie. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York.
- [33] H. J. Fiedler, H. J. Rösler (1993): Spurenelemente in der Umwelt, Gustav Fischer Verlag, Jena.
- [34] C. Bliefe (1994): Umweltchemie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim/ New York/ Basel/Cambridge/Tokio.

- [35] R. Koch (1995): Umweltchemikalien: Physikalisch-chemische Daten, Toxizitäten, Grenzwert und Richtwerte, Umweltverhalten. 3. Auflage. VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim/New York/Basel/Cambridge/Tokio.
- [36] J. Berndt (1996): Umweltbiochemie. UTB 1838. G. Fischer Verlag, Jena .
- [37] S. Auth (1995): Untersuchungen zur Schwermetallaufnahme und –einlagerung bei Raps (*Brassica napus L.*) Diplomarbeit JLU Giessen.
- [38] P.R. Wallnöfer, G. Engelhardt (1995): Schadstoffe aus dem Boden. In: B. Hock, E. F. Elstner (Hrsg.): Schadwirkungen auf Pflanzen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 118 - 140.
- [39] S. J. Lippard, J. M. Berg (1995): Bioanorganische Chemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [40] P. H. T. Beckett, R. D. Davis (1977): Upper critical levels of toxic elements in plants. New Phytologist **79**, 95 - 106.
- [41] A. J. M. Baker, P. L. Walker (1989): Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. Chem. Spec. Bioavail. **1**, 7 - 17.
- [42] E. Merian (1991): Metal and their compounds in the environment. Occurance, Analysis and Relevance. VCH-Verlag, Weinheim.
- [43] K. Dörner (1992): Akute und chronische Toxizität von Spurenelementen. WVG (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft) , Weinheim.
- [44] E. Grill, M. H. Zenk (1989): Wie schützen sich Pflanzen vor toxischen Schwermetallen. Chemie in unserer Zeit **6**, 193 - 199.
- [45] H. Passow, A. Rothstein, T. W. Clarkson (1961): The general pharmacology of heavy metals. Pharmac. Rev. **13**, 185 - 224.
- [46] J. P. Groten, P. J. van Bladeren (1994): Cadmium bioavailability and health risk in food. Trends in Food Science & Technology. **5**, 50 - 55.
- [47] WHO (1972). Evaluation of certain Food Aditives and the Contaminants Mercury, Lead and cadmium: a Consensus Report. Technical Report Series 505, World Health Organization.
- [48] Commission of the European Communities (1997): Reports of the Scientific Committee for Food. Opinions for Food on Lead and Cadmium.
- [49] J. H. J. Copius Peereboom-Stegemann, J. W. Copius –Stegemann (1989). Ecotox. Environ. Safety **18**, 93 - 108.
- [50] R. L. Chaney (1980): Health risks associated with toxic metals in municipal sludge. In: G. Bitton, B. L. Damro, G. T. Davidson, J. M. Davidson (Eds.), Sludge – Health Risks of Land Application. Ann Arbor. Sci. Publ.. Ann Arbor, MI, USA, 59 - 83.
- [51] Chaney et al. (1993): Progress in developing technologies to produce low Cd-concentration sunflower kernels. In: Proc. Sunflower Research Workshop, 15<sup>th</sup>, Fargo, ND. 14-15 Jan. 1993. Natl. Sunflower Assoc., Bismarck, ND, 80 - 92.
- [52] Y.-M. Li, R. L. Chaney, A. A. Schneiter (1994): Effect of soil chloride on cadmium concentration in sunflower kernels. Plant and soil **167**, 275ff.
- [53] Y.-M. Li, R. L. Chaney, A. A. Schneiter, J. F. Miller (1995): Genotypic Variation in Kernel Cadmium Concentration in Sunflower Germplasm under varying Soil Conditions. Crop Science **35**, 137 - 141.

- [54] Y.-M. Li, R. L. Chaney, A. A. Schneiter, J. F. Miller (1995): Combining Ability and Heterosis Estimates for Kernel Cadmium Level in Sunflower. Crop Science **35**, 1015 - 1019.
- [55] Y.-M. Li, R. L. Chaney, A. A. Schneiter, B. L. Johnson (1996): Effect of field limestone applications on cadmium content of sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves and kernels. Plant and Soil **180**, 297 - 302.
- [56] Y.-M. Li, R. L. Chaney, A. A. Schneiter, J. F. Miller, E. M. Elias, J. J. Hammond (1997): Screening for low grain cadmium phenotypes in sunflower, durum wheat and flax. Euphytica **94**, 23 - 30.
- [57] G. B. Raj, M. C. Patnaik (1999): Effect of Cadmium on growth, yield and nutrient composition of Sunflower. L. Oilseeds Res. **16 (1)**, 51 - 55.
- [58] U. Herms (1989): Löslichkeit von Schwermetallen in Böden unter variierenden Milieubedingungen. In: Beurteilung von Schwermetallkontaminationen in Boden, DECHEMA- Fachgespräche Umweltschutz Frankfurt am Main.
- [59] C. Schobert, E. Komor (1990): Transfer of amino acids and nitrate from the roots into the xylem of *Ricinus communis* seedlings. Planta **181**, 85 - 90.
- [60] K. Weston, J. L. Hall, L. E. Williams (1995): Characterization of amino-acid transport in *Ricinus communis* roots using isolated membrane vesicles. Planta **196**, 166 - 173.
- [61] L. E. Williams, J. A. Bick, A. Neelam, K. N. Weston, J. L. Hall (1996): Biochemical and molecular characterization of sucrose and amino acid carriers in *Ricinus communis*. J. Exp. Bot. **47**, 1211 - 1216.
- [62] W. N. Fischer, B. André, D. Rentsch, S. Krolkiewicz, M. Tegeder, K. Breikreuz, W. B. Frommer (1998): Amino acid transport in plants. Trends Plant Sci. **3**, 188 - 195.
- [63] S. C. Jarvis, L. H. P. Jones, M. J. Hopper (1976): Cadmium uptake from solution by plants and its transport from roots to shoots. Plant and soil **44**, 179 - 191.
- [64] B. Köhler, K. Raschke (2000): The delivery of salts to the xylem. Three types of anion conductance in the plasmalemma of the xylem parenchyma of roots of barley. Plant Physiol. **122 (1)**, 243 - 254.
- [65] S. Delrot, R. Atanassova, L. Maurousset (2000): Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes **1465 (1-2)**, 281 - 306.
- [66] P. J. Florijn, J. A. De Knecht, M. L. Van Beusichem (1993): Phytochelatin concentrations and binding state of Cd in roots of maize differing in Shoot/Root Cd partitioning. J. Plant Physiol. **142**, 537 – 542.
- [67] M. Friedrich (1996): Phytochelatine: Präparative, enzymatische Synthese und Untersuchungen zum Ferntransport von Schwermetallen in Pflanzen. Dissertation Universität München.
- [68] M. White, R. L. Chaney (1981): Metal complexation in xylem fluid. Plant Physiol. **67**, 292 - 315.
- [69] T. Herren, U. Feller (1994): Transfer of zinc from xylem to phloem in the peduncle of wheat. J. Plant Nutr. **17**, 1587 - 1598.
- [70] T. Herren, U. Feller (1996): Effect of locally increased zinc contents on zinc transport from the flag leaf lamina to the maturing grains of wheat. J. Plant Nutr. **19**, 379 - 387.

- [71] J. N. Pearson, Z. Rengel (1995): Uptake and distribution of  $^{65}\text{Zn}$  and  $^{54}\text{Mn}$  in wheat grown at sufficient and deficient levels of Zn and Mn. II. During grain development. J. Exp. Bot. **46**, 841 - 845.
- [72] U. Krämer, J. D. Cotter-Howells, J. M. Charnock, A. J. M. Baker, J. A. C. Smith (1996) Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. Nature **379**, 635 - 638.
- [73] R. Wandtner (1997): Das verborgene Herz der Pflanzen. Frankfurter Allgemeine Zeitung vom 02.07.1997. **150**, N 3.
- [74] E. Münch (1930): Die Stoffwechselbewegungen in der Pflanze. Fischer Verlag, Jena.
- [75] J. C. Popelka, S. Schubert, R. Schulz, A. P. Hansen (1996): Cadmium uptake and translocation during reproductive development of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Angewandte Botanik. **70**, 140 - 143.
- [76] M. Becher, A. Wörner, S. Schubert (1997): Cd translocation into generative organs of linseed (*Linum usitatissimum* L.). Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde **160**, 505 - 510.
- [77] T. Herren, U. Feller (1994): Transfer of zinc from xylem to phloem in the peduncle of wheat. J. Plant Nutr. **17**, 1587 - 1598.
- [78] T. Herren, U. Feller (1996): Effect of locally increased zinc contents on zinc transport from the flag leaf lamina to the maturing grains of wheat. J. Plant Nutr. **19**, 379 - 387.
- [79] T. Herren, U. Feller (1997): Transport of Cadmium via xylem and phloem in maturing wheat shoots: comparison with the translocation of zinc, strontium and rubidium. Annals of Botany **80**, 623 - 628.
- [80] I. Cakmak, R. M. Welch, J. Hart, W. A. Norvell, L. Oztürk, L. V. Kochian (2000): Uptake and retranslocation of leaf applied cadmium ( $^{109}\text{Cd}$ ) in diploid, tetraploid and hexaploid wheats. Journal of Experimental Botany **51**, 221 - 226.
- [81] N. S. Harris, G. J. Taylor (2001): Remobilization of cadmium in maturing shoots of near isogenic lines of durum wheat that differ in grain cadmium accumulation. Journal of Experimental Botany **52 (360)**, 1473 - 1481.
- [82] D. Schenk, U. Feller (1990): Rubidium export from individual leaves of maturing wheat. Journal of Plant Physiology **137**, 175 - 179.
- [83] J. J. Hart, R. M. Welch, W.A. Novell, L. A. Sullivan, L. Kochian (1998): Characterization of cadmium binding, uptake and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. Plant Physiology. **116**, 1413 - 1420.
- [84] S. Zeller, U. Feller (1999): Long-distance transport of cobalt and nickel in maturing wheat. European Journal of Agronomy **10**, 91 - 98.
- [85] R. M. Welch, J. J. Hart, W. A. Norvell, L. A. Sullivan, L. V. Kochian (1999): Effects of nutrient solution zinc activity on net uptake, translocation, and root export of cadmium and zinc by separated sections of intact durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) seedling roots. Plant and Soil **208**, 243 - 250.
- [86] I. Cakmak, R. M. Welch, B. Erenoglu, V. Römfeld, W. A. Norvell, L. V. Kochian (2000): Influence of varied zinc supply on retranslocation of cadmium ( $^{109}\text{Cd}$ ) and rubidium ( $^{86}\text{Rb}$ ) applied on mature leaf of durum wheat seedlings. Plant and Soil **219**, 279 - 284.



- [87] J. N. Pearson, Z. Rengel (1995): Uptake and distribution of  $^{65}\text{Zn}$  and  $^{54}\text{Mn}$  in wheat grown at sufficient and deficient levels of Zn and Mn. 2. During grain development. Journal of Experimental Botany **46**, 841 - 845.
- [88] J. N. Pearson, Z. Rengel (1994): Distribution and remobilization of Zn and Mn during grain development in wheat. Journal of Experimental Botany **45**, 1829 - 1835.
- [89] J. Brüggemann, H. Zwingelberg, H.-D. Ocker (1995): Die Verteilung der Schwermetallgehalte von Blei, Cadmium und Nickel auf Kerne und Schalen bei Sonnenblumenkernen. Lebensmittelbrief Nr. 8.
- [90] L. E. Williams, J. K. Pittman, J. L. Hall (2000): Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. Biochimica et Biophysica Acta **1465**, 104 - 126.
- [91] F. L. Theodoulou (2000): Plant ABC transporters. Biochimica et Biophysica Acta **1465**, 79 - 103.
- [92] H. E. Neuhaus, R. Wagner (2000): Solute pores, ion channels, and metabolite transporters in the outer and inner envelope membranes and higher plant plastids. Biochimica et Biophysica Acta **1465**, 307 - 323.
- [93] D. F. Ortiz, T. Ruscitti, K. F. McCue, D. W. Ow (1995): Transport of Metal-binding Peptides by HMT1, A Fission Yeast ABC-type Vacuolar Membrane Protein. The Journal of Biological Chemistry. **270 (9)**, 4721 - 4728.
- [94] G. C. Krijger, K. E. M. Evans, P. J. Baccarini, J. K. Pittman, J. L. Hall, L. E. Williams (2001): CPx-ATPases in Arabidopsis. Abstract P1.09. SEB Canterbury Meeting 2001.
- [95] A. Rosakis, W. Köster (2001): Nramp homologue of Chlamydomonas reinhardtii. Abstract C1.107. SEB Canterbury Meeting 2001.
- [96] C. Curie, J. Alonso, F. Dédaldechamp, M. Lejean, J. Ecker, J. F. Briat (2001): Involvement of Arabidopsis thaliana NRAMP1 protein in iron transport. Abstract C1.108. SEB Canterbury Meeting 2001.
- [97] J. K. Pittman, R. J. Vaughan, G. C. Krijger, J. L. Hall, L. E. Williams (2001): AtNramps- a family of metal cation transporters in Arabidopsis. Abstract P1.11. SEB Canterbury Meeting 2001.
- [98] M. L. Guerinot (2000): The ZIP family of metal transporters A Review. Biochimica et Biophysica Acta **1465**, 190 - 198.
- [99] T. C. Fox, M. L. Guerinot (1998): Molecular Biology of Cation Transport in Plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **49**, 669 - 696.
- [100] W. E. Rauser (1999): Structure and Function of Metal Chelators Produced by Plants. Cell Biochemistry and Biophysics. **31**, 19 - 48.
- [101] W. Ernst (1974): Schwermetallvegetation der Erde. Gustav Fischer, Stuttgart.
- [102] G. de Plaen, F. Malaisse, R. R. Brooks (1982): The 'copper flowers' of Central Africa and their significance for prospecting and archaeology. Endeavour, New Series **6**, 72 - 77.
- [103] A. J. M. Baker, R. R. Brooks (1989): Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. Biorecovery **1**, 81 - 126.
- [104] U. Krämer, R. D. Smith, W. W. Wenzel, I. Raskin, D. E. Salt (1997): The Role of Metal Transport and Tolerance in Nickel Hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Hálácsy. Plant Physiology **115**, 1641 - 1650.

- [105] Z. G. Shen, F. J. Zhao (1997): Uptake and transport of zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and the non-hyperaccumulator *Thlaspi ochroleucum*. Plant, Cell and Environment **20**, 898 - 906.
- [106] A. G. L. Assuncao, P. da Costa Martins, S. de Folter, R. Vooijs, H. Schat, M. G.M. Aarts (2001): Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Plant, Cell and Environment **24**, 217 - 226.
- [107] R. A. Ingle, M. M. Campbell, J. A. C. Smith (2001): The molecular basis of nickel-induced histidine biosynthesis in the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*. Abstract C1.119. SEB Canterbury Meeting 2001.
- [108] V. Bert, N. Verbruggen (2001): Cd-tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*: Identification of genes using a cDNA-AFLP approach. Abstract C1.118. SEB Canterbury Meeting 2001.
- [109] K. L. Tearall, J. R. Howarth, F. J. Zhao, S. P. Mc Grath, M. J. Hawkesford (2001): Identification of genes involved in cadmium hyper-accumulation in a higher plant, *Thlaspi caerulescens*. Abstract C1.120. SEB Canterbury Meeting 2001.
- [110] M. R. McNair, S. B. Huitson (2001). Zinc hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. Abstract P1.101. SEB Canterbury Meeting 2001.
- [111] R. S. Boyd, S. N. Martens (1998): Nickel Hyperaccumulation by *Thlaspi montanum* var. *montanum* (Brassicaceae): A constitutive trait. American Journal of Botany **85 (2)**, 259 – 265.
- [112] S. D. Cunningham, D. W. Ow (1996): Promises and Prospects of Phytoremediation. Plant Physiol. **110**, 715 – 719.
- [113] L. Dunemann, J. Begerow (1995). Kopplungstechniken zur Elementspeziesanalytik. VCH-Verlag. Weinheim.
- [114] B. Michalke (1999): Metall-Speziesanalytik – Theorie, Grundlagen und Beispiele. Abstract S. 44. ANAKON 1999.
- [115] A. B. Tomsett, D. A. Thurman (1988): Molecular biology of metal tolerances of plants. Plant, Cell and Environment **11**, 383 - 394.
- [116] G. J. Wagner (1993): Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. Advances in Agronomy. **51**, 173 - 212.
- [117] L. Leita, M. DeNobili, S. Cesco, C. Mondini (1996): Analysis of intercellular cadmium forms in roots and leaves of bush bean. J. Plant Nutr. **19**, 527ff.
- [118] H. J. Weigel, H. J. Jager (1980): Subcellular distribution and chemical form of cadmium in bean plants. Plant Physiol. **65**, 480 - 482.
- [119] G. J. Wagner, R. Yeagan (1986): Variation in Cadmium accumulation potential and tissue distribution of cadmium in tobacco. Plant Physiol. **82**, 274 - 279.
- [120] J. A. C. Verkleij, H. Schat (1990): Mechanisms of metal tolerance in higher plants. In: J. Show (Hg.) Evolutionary Aspects of Heavy Metal Tolerance in Plants. CRC Press, Boca Raton, 179 - 193.
- [121] J. A. C. Verkleij, P. Koevoets, J. van't Riet, R. Bark, Y. Mijdam, W. H. O. Ernst (1990): Poly ( $\gamma$ -glutamylcysteinyl)-glycines or phytochelatins and their role in cadmium tolerance of *Silene vulgaris*. Plant, Cell and Environment **13**, 913 - 921.

- [122] U. Krämer, I. J. Pickering, R. C. Prince, I. Raskin, D. E. Salt (2000): Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. Plant Physiology **122**, 1343 - 1353.
- [123] M. D. Vázquez, J. Barceló, Ch. Poschenrieder, J- Mádico, P. Hatton, A. J. M. Baker, G. H. Cope (1992): Localization of Zinc and Cadmium in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), a Metallophyte that can Hyperaccumulate both Metals. J. Plant Physiol. **140**, 350 - 355.
- [124] A. Rivetta, N. Negrini, M. Cocucci (1997): Involvement of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin in Cd<sup>2+</sup> toxicity during early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. Plant, Cell and Environment **20**, 600 - 608.
- [125] R. M. Krotz, B. P. Evanoglu, G. J. Wagner (1989): Relationships between Cadmium, Zinc, Cd-Peptide, and Organic Acid in Tobacco Suspension Cells. Plant Physiology **91**, 780 - 787.
- [126] J. R. Cumming, G. J. Taylor (1990): Mechanisms of metal tolerance in plants: physiological adaptations for exclusion of metal ions from cytoplasm. In: Stress responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms. Wiley-Liss, New York, 329 - 356.
- [127] G. Nuciflora, L. Chu, T. K. Misra, S. Silver (1989): Cadmium resistance from *S. aureus* plasmid PI258 CadA gene results from a cadmium efflux ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 3544 - 3548.
- [128] T. Hoffmann, A. Anton, D. H. Nies (2001): Establishing proteomics with *Rastonia metallidurans* CH34. SEB Canterbury Meeting 2001, Abstract C1.136, 87.
- [129] D. L. Godbold, W. J. Horst, J. C. Collins, D. A. Thurman, H. Marschner (1984): Accumulation of zinc and organic acids in roots of zinc tolerant and non-tolerant ecotypes of *Deschampsia caespitosa*. Journal of Plant Physiology **116**, 59 - 69.
- [130] H. Harmens, P. L. M. Koevoets, J. A. C. Verkleij, W. H. O. Ernst (1994): The role of low molecular weight organic acids in the mechanism of increased zinc tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. New Phytologist **126**, 615 - 621.
- [131] C. F. Harrington, D. J. Roberts, G. Nickless (1996): The effect of cadmium, zinc, and copper on the growth, tolerance index, metal uptake, and production of malic acid in two strains of the grass *Festuca rubra*. Canadian Journal of Botany **74**, 1742 - 1752.
- [132] W. J. Kersten, R. R. Brooks, R. D. Reeves, T. Jaffré (1980): Nature of nickel complexes in *Psychotria douarrei* and other nickel-accumulating plants. Phytochemistry. **19**, 1963 - 1965.
- [133] W. Mathys (1977): The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zinc-resistance in herbage plants. Physiol. Plant. **40**, 130 - 136.
- [134] D. L. Godbold, W. J. Horst, D. A. Thurmann, H. Marschner (1984): Accumulation of zinc and organic acids in roots of zinc tolerant and nontolerant ecotypes of *Deschampsia caespitosa*. J. Plant Physiol. **116**, 59 - 69.
- [135] J. Lee, R. D. Reeves, R. R. Brooks, T. Jaffré (1978): The relation between nickel and citric acid in some nickel-accumulating plants. Phytochemistry **17**, 1033 - 1035.

- [136] S. Sanger, R. Kneer, G. Wanner, J.-P. Cosson, B. Deus-Neumann, M. H. Zenk (1998): Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. Phytochemistry **47**, 339 - 347.
- [137] H. B. Collier (1981): A Zn<sup>2+</sup> binding constituent of fabaceans. Biochimica et Biophysica Acta **675**, 427 - 429.
- [138] R. F. M. van Steveninck, M. E. van Steveninck, D. R. Fernando (1992): Heavy-metal (Zn, Cd) tolerance in selected clones of duck weed (*Lemna minor*). Plant and Soil **146**, 271 - 280.
- [139] R. F. M. van Steveninck, A. Babare, D. R. Fernando, M. E. van Steveninck (1993): The binding of zinc in root cells of crop plants by phytic acid. Plant and Soil **155/156**, 525 - 528.
- [140] R. F. M. van Steveninck, A. Babare, D. R. Fernando, M. E. van Steveninck (1994) The binding of zinc, but not cadmium, by phytic acid in roots of crop plants. Plant and Soil **167**, 157 - 164.
- [141] M. Margoshes, B. L. Vallee (1957): A Cadmium protein from equine kidney cortex. J. Am. Chem. Soc. **79**, 4813 - 4814.
- [142] J. C. Steffens (1990): The heavy metal-binding peptides of plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **41**, 553 - 575.
- [143] W. E. Rauser (1990): Phytochelatins. Annu. Rev. Biochem. **59**, 61 - 86.
- [144] G. N. Reddy, M. N. V. Prasad (1990): Heavy metal binding proteins/peptides: occurrence, structure, synthesis and functions. A Review. Environmental and Experimental Botany. **30**, 251 - 264.
- [145] W. H. O. Ernst, J. A. C. Verkleij, H. Schat (1992): Metal tolerance in plants. Acta Bot. Neerl. **41**, 229 - 248.
- [146] W. E. Rauser (1993):  $\gamma$ -Glutamylcysteinyl-isopeptides: structure, synthesis and metal-binding complexes. In: Metallothionein III Hrsg. K. T. Suzuki, N. Imura, M. Kimura. Birkhäuser Verlag. Basel (Schweiz), 225 - 242.
- [147] W. E. Rauser (1993): Metal-binding peptides in plants. Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants, 239 - 251.
- [148] M. N. V. Prasad (1995): Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. Environmental and Experimental Botany. **35**, 525 - 545.
- [149] W. E. Rauser (1995): Phytochelatins and related peptides. Plant Physiology **109**, 1141 - 1149.
- [150] J. H. R. Kaegi (1991): Overview of metallothionein. Methods in Enzymology **205**, 613 - 626.
- [151] J. H. R. Kaegi (1993): Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: An overview. In: Metallothionein III Hrsg. K. T. Suzuki, N. Imura, M. Kimura. Birkhäuser Verlag. Basel (Schweiz), 29 - 56.
- [152] M. Karin (1985): Metallothioneins: Proteins in search of function. Cell **41**, 9 - 10.
- [153] D. H. Hamer (1986): Metallothionein. Annu. Rev. Biochem. **55**, 913 - 951.
- [154] N. J. Robinson, A. M. Tommey, C. Kuske, P. J. Jackson (1993): Plant metallothioneins. Biochem. J. **295**, 1 - 10.
- [155] I. Kawashima, Y. Inokuchi, M. Chino, M. Kimura, N. Shimizu (1991): Isolation of a gene for a metallothionein-like protein from soybean. Plant Cell Physiology **32**, 913 - 916.

- [156] I. Kawashima, T. D. Kennedy, M. Chino, B. G. Lane (1992): Wheat E<sub>c</sub> metallothionein genes: like mammalian Zn<sup>2+</sup> metallothionein genes, wheat Zn<sup>2+</sup> metallothionein genes are conspicuously expressed during embryogenesis. European Journal of Biochemistry **209**, 971 - 976.
- [157] B. Lane, R. Kajioka, T. Kennedy (1987): The wheat-germ E<sub>c</sub> protein is a zinc-containing metallothionein. Biochemistry and Cell Biology **65**, 1001 - 1005.
- [158] J. M. Zhou, P. B. Goldsbrough (1994): Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. Plant Cell **6**, 875 - 884.
- [159] J. M. Zhou, P. B. Goldsbrough (1995): Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. Molecular and General Genetics **248**, 318 - 328.
- [160] V. Buchanan-Wollaston (1994): Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of a gene encoding a senescencespecific metallothionein-like protein. Plant Physiology **105**, 839 - 846.
- [161] H.-M. Hsieh, W.-K. Liu, P. C. Huang (1995): A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice. Plant Molecular Biology **28**, 381 - 389.
- [162] H.-M. Hsieh, W.-K. Liu, A. Chang, P. C. Huang (1996): RNA expression patterns of a type 2 metallothionein-like gene from rice. Plant Molecular Biology **32**, 525 - 529.
- [163] D. Choi, H. M. Kim, H. K. Yun, J.-A. Park, W. T. Kim, S. H. Bok (1996): Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. Plant Physiology **112**, 353 - 359.
- [164] R. C. Foley, K. B. Singh (1994): Isolation of a *Vicia faba* metallothionein-like gene, expression in foliar trichomes. Plant Molecular Biology **26**, 435 - 444.
- [165] J. R. de Miranda, M. A. Thomas, D. A. Thurman, A. B. Tomsett (1990): Metallothionein genes from the flowering plant *Mimulus guttatus*. FEBS Letters **260**, 277 - 280.
- [166] A. Murphy, J. Zhou, P. B. Goldsbrough, L. Taiz (1997): Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology **113**, 1293 - 1301.
- [167] E. Grill (1987): Phytochelatine: Die schwermetallbindenden Peptide der höheren Pflanzen. Dissertation Universität München.
- [168] N. Kondo, M. Isobe, K. Imai, T. Goto (1983): Structure of cadystin, the unit-peptide of cadmiumbinding peptides induced in a fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. Tetrahedron Letters **24**, 925 - 928.
- [169] N. Kondo, K. Imai, M. Isobe, T. Goto, A. Murasugi, C. Wada-Nakagawa, Y. Hayashi (1984): Cadystin A and B, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast - separation, revision of structures and synthesis. Tetrahedron Letters **25**, 3869 - 3872.
- [170] B. A. Fowler, C. E. Hildebrand, Y. Kojima, M. Webb (1987): Nomenclature of metallothionein. In J. H. R. Kägi, Y. Kojima, eds, Metallothionein II: Proceedings of the "Second international meeting on metallothionein and other low molecular weight metalbinding proteins", Zürich, August 21-24, 1985. Birkhäuser, Basel, 19 - 22.

- [171] E. Grill, W. Gekeler, E.-L. Winnacker, M. H. Zenk (1986): Homophytochelatinen sind schwere Metallbindende Peptide von Homo-glutathionen, die Fabales enthalten. FEBS Letters **205**, 47 - 50.
- [172] S. Klapheck, B. Chrost, J. Starke, H. Zimmerman (1992).  $\gamma$ -Glutamylcysteinylserine: ein neues Homologes von Glutathion in Pflanzen der Familie Poaceae. Bot. Acta **105**, 174 - 179.
- [173] S. Klapheck, W. Fliegner, I. Zimmer (1994): Hydroxymethyl-phytochelatinen [ $\gamma$ -Glutamylcysteinyl-Serine] sind metallinduzierte Peptide der Familie Poaceae. Plant Physiology **104**, 1325 - 1332.
- [174] Meuwly et al., (1995): Drei Familien von Thiolpeptiden werden durch Cadmium in Mais induziert. Plant Journal **7** (3), 391 - 400.
- [175] H. Kubota, K. Sato, T. Yamada, T. Maitani (2000): Phytochelatin-Homologe, induziert in behaarten Wurzeln von Meerrettich. Phytochemistry **53**, 239 - 245.
- [176] W. R. Bernard, H. R. Kägi (1987). Reinigung und Charakterisierung von atypischen Cadmium-bindenden Peptiden von *Zea mays*. Experientia **52** (Suppl.), 309 - 315.
- [177] R. K. Mehra, D. R. Winge (1988) Cu(I) Bindung an die *Schizosaccharomyces pombe*  $\gamma$ -Glutamylpeptide mit variierenden Kettenlängen. Archives of Biochemistry and Biophysics **265**, 381 - 389.
- [178] W. Gekeler (1988): Phytochelatine: Vorkommen im Pflanzenreich und Untersuchungen zur Biosynthese. Dissertation Universität München.
- [179] W. Gekeler, E. Grill, E.-L. Winnacker, M. H. Zenk (1988): Algen sequestrieren Schwermetalle durch Synthese von Phytochelatin-Komplexen. Archives of Microbiology **150**, 197 - 202.
- [180] W. Gekeler, E. Grill, E.-L. Winnacker, M. H. Zenk (1989): Überblick über die Fähigkeit der Pflanzenwelt, Schwermetalle durch Phytochelatine zu binden. Zeitschrift für Naturforschung Sektion B **44**, 361 - 369.
- [181] S. M. Gallego, M. P. Benavides, M. L. Tomaro (1996): Einfluss von Schwermetallionen auf Sonnenblumenblätter: Hinweise auf oxidative Stress. Plant Science **121**, 151 - 159.
- [182] A. Oswald (2000): Physiologische Grundlagen der Akkumulation von Schwermetallionen beim Faserhanf (*Cannabis sativa* L.) und das Nutzungspotential bei der Phytoremediation. Dissertation. Bergische Universität/Fachhochschule Wuppertal.
- [183] R. K. Mehra, E. B. Tarbet, W. R. Gray, D. R. Winge (1988): Metall-spezifische Synthese von zwei Metallothioneinen und  $\gamma$ -Glutamylpeptiden in *Candida glabrata*. Proc. Natl. Acad. Sci. **85**, 8815 - 8819.
- [184] R. Howe; R. L. Evans; S. W. Ketteridge (1997): Kupfer-bindende Proteine in ectomykorrhizalen Pilzen. New Phytologist **135**, 123 - 131.
- [185] A. Hochberger (1993): Phytochelatine: Regulation und Mechanismus der Biosynthese sowie Untersuchungen zum Abbau. Dissertation Universität München.
- [186] J. Chen, J. Zhou, P. B. Goldsbrough (1997): Charakterisierung der Phytochelatin-Synthase aus Tomaten. Physiologia Plantarum **101**, 165 - 172.
- [187] M. E. V. Schmöger, M. Oven, E. Grill (2000): Entgiftung von Arsen durch Phytochelatine in Pflanzen. Plant Physiology. **122**, 793 - 801.

- [188] M. E. V. Schmöger (2000): Phytochelatine Komplexierung von Metallen und Metalloiden Untersuchungen zur Phytochelatin-Synthese. Dissertation Unioersität München.
- [189] Fujita et al. (1993): Fate of Cadmium bound to phytochelatin in rats. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology **82**, 357 - 365.
- [190] K. L. Davies, M. S. Davies, D. Francis (1991): The influence of an inhibitor of phytochelatin synthesis on root growth and root meristematic activity in *Festuca rubra* L. in response to zinc. New Phytol. **118**, 565 - 570.
- [191] Maitani et al. (1996): The composition of metal bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. Plant Physiol. **110**, 1145 - 1150.
- [192] H. Harmens, P. R. den Hartog, W. M. Ten Bookum, J. A. C. Verkleij (1993): Increased zinc tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) garcke is not due to increased production of phytochelatins. Plant Physiology. **103**, 1305 - 1309.
- [193] C. S. Cobett (2000): Phytochelatin biosynthesis and function in heavy metal detoxification. Current opinion in Plant Biology. **3**, 211 - 216.
- [194] C. S. Cobbett (2000): Phytochelatins and their role in heavy metal detoxification. Plant Physiology **123**, 825 - 832.
- [195] C. S. Cobett, M. J. May, R. Howden, B. Rolls (1998): The glutathione-deficient cadmium-sensitive mutant, *cad2-1* of *Arabidopsis thaliana* is deficient in  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. Plant J. **16**, 73 - 78.
- [196] S. Clemens, E. J. Kim, D. Neumann, J. I. Schroeder (1999): Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. The EMBO Journal. **18**, 3325 - 3333.
- [197] S.-B. Ha, A. P. Smith, R. Howden, W. M. Dietrich, S. Bugg, M. J. O'Connell, P. B. Goldsborough, C. S. Cobett (1999): Phytochelatin Synthase Genes from *Arabidopsis* and the Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. The Plant Cell. **11**, 1153 - 1163.
- [198] O. K. Vatamaniuk, S. Mari, Y. - P. Lu, P. A. Rea (1999): AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: Isolation and in vitro reconstitution. Proc. Natl. Acad. Sci. **96**, 7110 - 7115.
- [199] R. Kneer, M. H. Zenk (1992): Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. Phytochemistry **31**, 2663 - 2667.
- [200] D. J. Plocke, J. H. R. Kägi (1992): Spectral characteristics of cadmium-containing phytochelatin complexes isolated from *Schizosaccharomyces pombe*. European Journal of Biochemistry **207**, 201 - 205.
- [201] M. H. Zenk (1996): Heavy metal detoxification in higher plants - a review. Gene **179**, 21 - 30.
- [202] R. Kneer, M. H. Zenk (1997): The formation of Cd-phytochelatin complexes in plant cell cultures. Phytochemistry **44**, 69 - 74.
- [203] D. F. Ortiz, T. Ruscitti, K. F. McCue, D. W. Ow (1995): Transport of Metal-binding Peptides by HMT1, A Fission Yeast ABC-type Vacuolar Membrane Protein. The Journal of Biological Chemistry. **270** (9), 4721 - 4728.
- [204] D. E. Salt, G. J. Wagner (1993): Cadmium transport across tonoplasts of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-antiport activity. J. Biol. Chem. **268**, 12297 - 12302.

- [205] R. K. Mehra, D. R. Winge (1991): Metal ion resistance in fungi: molecular mechanisms and their regulated expression. Journal of Cellular Biochemistry **45**, 30 - 40.
- [206] R. K. Mehra, R. Kodati, R. Abdullah (1995): Chain length-dependent Pb(II)-coordination in phytochelatins. Biochemical and Biophysical Research Communications **215**, 730 - 736.
- [207] R. K. Mehra, P. Mulchandani (1995): Glutathione-mediated transfer of Cu(I) into phytochelatins. Biochemical Journal **307**, 697 - 705.
- [208] R. K. Mehra, J. Miclat, V. R. Kodati, R. Abdullah, T. C. Hunter, P. Mulchandani (1996): Optical spectroscopic and reverse-phase HPLC analyses of Hg(II) binding to phytochelatins. Biochemical Journal **314**, 73 - 82.
- [209] R. K. Mehra, K. Tran, G. W. Scott, P. Mulchandani, S. S. Saini (1996): Ag(I)-binding to phytochelatins. Journal of Inorganic Biochemistry **61**, 125 - 142.
- [210] J. Thumann, E. Grill, L.-E. Winnacker, M. H. Zenk (1991): Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. FEBS Letters **284**, 66 - 69.
- [211] B. A. Ahner, N. M. Price, F. M. M. Morel (1994): Phytochelatin production by marine phytoplankton at low free metal ion concentrations: laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **91**, 8433 - 8436.
- [212] B. A. Ahner, S. Kong, F. M. M. Morel (1995): Phytochelation production in marine algae. 1. An interspecies comparison. Limnology and Oceanography **40**, 649 - 657.
- [213] B. A. Ahner, F. M. M. Morel (1995): Phytochelation production in marine algae. 2. Induction by various metals. Limnology and Oceanography **40**, 658 - 665.
- [214] B. A. Ahner, F. M. M. Morel, J. W. Moffett (1997): Trace metal control of phytochelatin production in coastal waters. Limnology and Oceanography **42**, 601 - 608.
- [215] G. Throm (1993). Grundlagen der Botanik. UTB für Wissenschaft. Quelle & Meyer-Verlag. Heidelberg.
- [216] Vögeli - Lange et al. (1996): Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. Plant Science **114**, 11 - 18.
- [217] R. Vögeli-Lange, G.J. Wagner (1990): Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. Plant Physiol. **92**, 1086 - 1093.
- [218] O. Lichtenberger, D. Neumann (1997): Analytical electron microscopy as a powerful tool in plant cell biology: examples using electron energy loss spectroscopy and X-ray microanalysis. European Journal of Cell Biology **73**, 378 - 386.
- [219] J. Wang, B. P. Evangelou, M. T. Nielsen, G. J. Wagner (1991): Computer-simulated evaluation of possible mechanisms for quenching heavy metal ion activity in plant vacuoles I. Cadmium. Plant Physiology **97**, 1154 - 1160.
- [220] J. Wang, B. P. Evangelou, M. T. Nielsen, G. J. Wagner (1992): Computer-simulated evaluation of possible mechanisms for sequestering metal ion activity in plant vacuoles II. Zinc. Plant Physiology **99**, 621 - 626.



- [221] J. Johanning, H. Strasdeit (1998): Eine komplexchemische Basis für die biologische Funktion der Phytochelatine. Angewandte Chemie **110**, 2642 - 2644.
- [222] W. H. Schuster (1993): Die Züchtung der Sonnenblume (*Helianthus annuus* L.). In: Fortschritte der Pflanzenzüchtung. Beihefte zur Zeitschrift für Pflanzenzüchtung. Scientific Publishers. Berlin , Hamburg.
- [223] F. J. Joubert (1955): Sunflower Seed Proteins. Biochimica Et Biophysica Acta **16**, 520 - 523.
- [224] M. A. Sabir, F. W. Sosulski, S. L. MacKenzie (1973): Gel Chromatography of sunflower proteins. J. Agr. Food Chem. **21 (6)**, 988 - 993.
- [225] J. D. Bewley, M. Black (1994): Seeds Physiology of Development and Germination. Plenum Press, 2. Auflage, London, New York.
- [226] K. D. Schwenke, M. Schultz, K.-J. Linow, J. Uhlig, Cl. Franzke (1974): Über Samenproteine. 4. Mitt. Isolierung der Globulin-Hauptkomponente aus Sonnenblumensamen. Die Nahrung **18 (6/7)**, 709 - 719.
- [227] K. D. Schwenke, M. Schultz, K.-J. Linow (1975): Über Samenproteine. 5. Mitt. Dissoziationsverhalten des 11-S-Globulins aus Sonnenblumensamen. Die Nahrung **19 (5/6)**, 425 - 432.
- [228] K. D. Schwenke, W. Pätz, K.-J. Linow, B. Raab, M. Schultz (1979): On seed proteins. Part 11. Purification, Chemical Composition and Some Physico-Chemical Properties of the 11-S-Globulin (*Helianthinin*) in Sunflower Seed. Die Nahrung **23 (3)**, 241 - 254.
- [229] R. H. Sammour, M. N. El-Shourbagy, A.M. Abo-Shady, A.M. Abasary (1995): Charcterization of Sunflower Seed Proteins by Electrophoretic Techniques. Arab. Gulf J. Scient. Res. **13 (3)**, 591 - 604.
- [230] J. Bautista, I. Hernandez-Pinzon, M. Alaiz, J. Parrado, F. Mmillan (1996): Low Molecular weight Sunflower Protein Hydrolysates with Low Concentration in Aromatic Amino Acids.
- [231] E. H. Rahma, M. S. Narasinga Rao (1981): Isolation and Characterization of the Major Protein Fraction of Sunflower Seeds. J. Agric. Food Chem. **29**, 518 - 521.
- [232] A. Villanueva, J. Vioque, R. Sánchez-Vioque, A. Clemente, J. Pedroche, J. Bautista, F. Millán (1999): Peptide Characteristics of Sunflower Protein Hydrolysates. JAOCS **76**, 1455 - 1460.
- [233] J. Bautista, R. Corpas, O. Cremades, I. Hernández-Pinzón, R. Ramos, A. Villanueva, R. Sanchez-Vioque, A. Clemente, J. Pedroche, J. Vioque, J. Parrado, F. Millán (2000): Sunflower Protein Hydrolysates for Dietary Treatment of Patients with Liver Failure. JAOCS **77**, 121 - 126.
- [234] M. A. A. Gadallah (1995): Effects of Cadmium and kinetin on chlorophyll content, saccharides and dry matter accumulation in sunflower plants. Biologia Plantarum **37 (2)**, 233 - 240.
- [235] S. M. Gallego, M. P. Benavides, M. L. Tomaro (1996): Oxidative damage caused by cadmiumchloride in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. Int. J. Experimental Botany **58**, 41 - 52.
- [236] M. A. A. Gadallah (1996): Phytotoxic Effects of Industrial and Sewage Waste Waters on Growth, Chlorophyll Content, Transpiration Rate and Relative Water Content of potted Sunflower Plants. Water, Air and Soil Pollution **89**, 33 - 47.

- [237] S. M. Gallego, M. P. Benavides, M. L. Tomaro (1999): Effect of cadmium ions on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. Biologia Plantarum **42 (1)**, 49 - 55.
- [238] L. Jovanovic, S. Cupac, V. Jancij (2001): Uptake and distribution of uranyl nitrate in soybean, sunflower and maize plants. Abstract P1.06. SEB Canterbury Meeting 2001.
- [239] Z. Glinka (1980): Abscisic acid promotes both volume flow and ion release to the xylem of sunflower roots. Plant Physiology **65**, 537 - 540.
- [240] J. M. Quintreo, J. M. Fornier, J. Ramos, M. Benlloch (1998): K<sup>+</sup> status and ABA affect both exudation rate and hydraulic conductivity in sunflower roots. Physiologia Plantarum **102**, 279 - 284.
- [241] J. M. Quintreo, J. M. Fornier, M. Benlloch (1999): Water transport in sunflower root systems: effects of ABA, Ca<sup>2+</sup> status and HgCl<sub>2</sub>. Journal of Experimental Botany **50 (339)**, 1607 - 1612.
- [242] M. J. Chrispeels, C. Maurel (1994): Aquaporins: The molecular basis of facilitated water movement through living plant cells? Plant Physiology **105**, 9 - 13.
- [243] Y. Alami, W. Achouak, C. Marol, T. Heulin (2000): Rhizosphere Soil Aggregation and Plant Growth Promotion of Sunflowers by an Exopolysaccharide-Producing Rhizobium sp. Strain Isolated from Sunflower Roots. Applied and Environmental Microbiology **66 (8)**, 3393 - 3398.
- [244] <http://www-ang.kfunigraz.ac.at/~scheuer/Familien.html>
- [245] B. Z. Kaminska, F. Brzoska, B. Skraba (2000): High-protein fraction of 00 type rapeseed meal in broiler nutrition. J. Animal Feed Sci. **9 (1)**, 123 - 136.
- [246] T. Kokkonen, M. Tuori, V. Leivonen, L. Syrjala-Qvist (2000): Effect of silage dry matter content and rapeseed meal supplementation on dairy cows. 1. Milk production and feed utilisation. Animal Feed Science Techn. **84 (3-4)**, 213 - 228.
- [247] B. P. Mullan, J. R. Pluske, J. Allen, D. J. Harris (2000): Evaluation of Western Australian canola meal for growing pigs. Aust. J. Agric. Res. **51 (5)**, 547 - 553.
- [248] G. Geisler (1980): *In: Pflanzenbau – Ein Lehrbuch*, Verlag Paul Parey.
- [249] M. L. Crouch, I. M. Sussex (1981): Development and storage-protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos *in vivo* and *in vitro*. Planta **153**, 64 - 74.
- [250] S. Sjö Dahl, H.-O. Gustavsson, J. Rödin, L. Rask (1995): Deletion analysis of the *Brassica napus* cruciferin gene *cru 1* promoter in transformed tobacco: promoter activity during early and late stages of embryogenesis is influenced by *cis*-acting elements in partially separate regions. Planta **197**, 264 - 271.
- [251] K. D. Schwenke, B. Raab, P. Plietz, G. Damaschun (1983): The structure of the 12S globulin from rapeseed (*Brassica napus* L.). Die Nahrung **27**, 165 - 167.
- [252] J. Rödin, L. Rask (1990) The relationship between mature chains and their precursors of cruciferin, the 12S storage protein of *Brassica napus*. Plant Science **70**, 57 - 63.

- [253] S. Sjö Dahl, H.-O. Gustavsson, J. Rödin, M. Lenman, A.-S. Höglund, L. Rask (1993): Cruciferin gene families are expressed coordinately but with tissue-specific differences during *Brassica napus* seed development. Plant. Mol. Biol. **23**, 1165 - 1176.
- [254] S. R. Scofield, M. L. Crouch (1987): Nucleotide sequence of a member of the napin storage protein family from *Brassica napus*. J Biol Chem. **262**, 12202 - 12208.
- [255] L.-G. Josefsson, M. Lenman, M. L. Ericsson, L. Rask (1987): Structure of a gene encoding the 1.7S storage protein, napin, from *Brassica napus*. J Biol Chem. **262**, 12196 - 12201.
- [256] T. J. V. Higgins (1984): Synthesis and regulation of major proteins in seeds. Annu Rev Plant Physiol. **35**, 191 - 221.
- [257] S. Misra, L. Gedamu (1989): Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. and *Nicotiana tabacum* L. plants. Theor. Appl. Genet. **78**, 161 - 168.
- [258] K. Rozwadoski, R. Zhao, L. Jackman, T. Huebert, W. E. Burkhart, S. M. Hemmingsen, J. Greenwood, S. J. Rothstein (1999): Characterization and Immunolocalization of a cytosolic Calcium-binding Protein from *Brassica napus* and Arabidopsis Pollen. Plant Physiology **120**, 787 - 797.
- [259] K. Günther, F. Umland (1988): Speziesanalytik von Cadmium und Thallium in nativen Rapspflanzen (*Brassica napus*). Fresenius Z. Anal. Chem. **331**, 302 - 309.
- [260] S. L. Abrahamson, D. M. Speiser, D. W. Ow (1992): A Gel Elektrophoresis Assay for Phytochelatins. Anal. Biochemistry **200**, 239 - 243.
- [261] R. Tahvonen (1996): Contents of lead and cadmium in foods and diets. Food Reviews International **12**, 1 - 70.
- [262] K. Günther, G. Weber (1998): Elementspeziesanalytik: Ein Überblick. In: Analytiker Taschenbuch. Band 20. Springer Verlag. Heidelberg, 71 - 103.
- [263] L. Simon (1998): Cadmium Accumulation and Distribution in Sunflower Plant. Journal of Plant Nutrition **21 (2)**, 341 - 352.
- [264] G. Müller (1985): Isolierung intakter Peroxisomen zur Untersuchung der Permeabilitätseigenschaften der peroxisomalen Membran. Diplomarbeit Universität Münster.
- [265] H. Rivière-Rolland, P. Contard, T. Betsche (1996): Adaptation of pea to elevated atmospheric CO<sub>2</sub>: rubisco, phosphoenolpyruvate carboxylase and chloroplast phosphate translocator at different levels of nitrogen and phosphorus nutrition. Plant, Cell and Environment **19**, 109 - 117.
- [266] B. Gerhardt, Th. Betsche (1976): The change of microbodies from glyoxysomal to peroxysomal function within fatty, greening cotyledons: hypotheses, results, problems. Ber. Deutsch. Bot. Ges. **89**, 321 - 334.
- [267] Th. Betsche (1987): Glycolate: dichlorphenol indophenol reductase activity of glycolate oxidase in the presence of oxygen: experiments with crude enzyme, purified enzyme, and peroxysomes from pea leaves Hrg.: J. Biggens. Proceedings of the VIIth International Congress on Photosynthesis, Providence, Rhode Island, USA, August 10-15, 1986. In: Progress in Photosynthesis Research, Vol III, 561-564. Dordrecht, Netherlands.
- [268] R. Eising (1983): Quantitative Analyse von Abbau und Synthese der Katalase während der Funktionsänderung der Peroxisomen in Sonnenblumen-kotyledonen. Dissertation. Universität Münster.

- [269] A. Kettrup (1993): "Analytische Chemie und Qualitätssicherung". Hrsg.: E. Flammenkamp. In: Proceedings GSF-Symposium München, 24.-26. November 1993, ecomed, Landsberg.
- [270] K. Lange-Hesse, L. Dunemann, G. Schwedt (1994): Properties and binding forms of cadmium and nickel in protein extracts from bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). Fresenius J. Anal. Chem. **349**, 460 - 464.
- [271] J. Szpunar, R. Lobinski (1999). Species-Selective Analysis for Metal-Biomacromolecular complexes using hyphenated techniques (Technical Report). Pure Appl. Chem. **71 (5)**, 888 - 918.
- [272] N. E. God, S. Izawa (1968): Hydrogen ion buffers. Method Enzymol. **24 (Part B)**, 53 - 68.
- [273] N. E. God, G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa, R. M. M. Singh (1966): Hydrogen ion buffers for biological research. Biochemistry **5**, 464 - 477.
- [274] N. E. God, S. Izawa (1972): Hydrogen Ion Buffers. Methods in Enzymology **24**, 53 - 63.
- [275] J. L. Casterline, N. M. Barnett (1982): Cadmium-binding components in soybean plants. Plant Physiology **69**, 1004 - 1007.
- [276] N. Tümmers (1998): Isolierung und Charakterisierung von cadmiumbindenden Substanzen aus Weizen. Dissertation Universität Münster.
- [277] H. Ditters (1991): Untersuchungen zur Bindung von Cadmium, Nickel und Zink in Getreidekörnern. Dissertation Universität Münster.
- [278] L. Leita, M. Contin, a. Maggioni (1991): Distribution of cadmium induced Cd-binding proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris*. Plant Science **77**, 139 - 147.
- [279] M. Bartolf, E. Brennan, C. A. Price (1980): Partial characterization of a cadmium-binding protein from roots of cadmium-treated tomato. Plant Physiology **66**, 438 - 441.
- [280] H. Lue-Kim, W. Rauser (1986): Partial characterization of cadmium-binding protein from roots of tomato. Plant Physiology **81**, 896 - 900.
- [281] Gelfiltration: Principles and Methods. Pharmacia Biotechnology. 5<sup>th</sup> edition.
- [282] V. R. Meyer (1992): Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. 7. Auflage. Salle + Sauerländer Verlag.
- [283] J. Hoefele (1996): Untersuchungen zur Beryllium-Aufnahme durch Gerste – Verteilung und Bindungsformen. Dissertation. Universität-Gesamthochschule Paderborn.
- [284] M. Lacorn (1999): Einfluß natürlicher und anthropogener Stressoren auf die Induktion von Metallothionein-Isoformen der Kliesche (*Limanda limanda* L.). Dissertation. Universität Hamburg.
- [285] B. Berger, R. Dallinger, A. Thomaser (1995): Quantification of metallothionein as a biomarker for cadmium exposure in terrestrial gastropods. Environ. Toxicol. Chem. **14**, 781 - 791.
- [286] M. Kondo, M. Imagawa, K. Maruyama, Y. Okada, S. Tsunasawa, T. Nishihara (1990): Biochemical and immunochemical characterization of *Caenorhabditis elegans* metallothioneins I and II induced by cadmium. Biomed. and Environm. Science **3** 315 - 325.

- [287] W. E. Rauser (1991): Cadmium-binding peptides from plants. Methods in Enzymology **205**, 319 - 333.
- [288] M. Vasak (1991). Standard isolation procedure for metallothionein. Methods in Enzymology **205**, 41 - 44.
- [289] R. Kneer (1993): Phytochelatine: Analytik, Komplexstruktur, Schwermetalltoleranz, Verbreitung im Pilzreich und präparative, enzymatische Synthese. Dissertation Universität München.
- [290] F. E. C. Sneller, L. M. van Heerwarden, P. L. M. Koevoets, R. Vooijs, H. Schat, J. A. C. Verkleij (2000): Derivatization of Phytochelatins from *Silene vulgaris*, induced upon Exposure to Arsenate and Cadmium: Comparison of Derivatization with Ellman`s Reagent and Monobrombimane. J. Agric. Food Chemistry. **48**, 4014 - 4019.
- [291] R. C. Fahey, G. L. Newton, R. Dorian, E.M. Kosower (1980): Analysis of biological thiols: derivatization with monobromotrimethylammoniumbimane and characterization by electrophoresis and chromatography. Analytical Biochemistry **107**, 1 - 10.
- [292] R. C. Fahey, G. L. Newton, R. Dorian, E. M. Kosower (1981): Analysis of biological thiols: quantitative determination of thiols at the picomole level based upon derivatization with monobrombimanes and separation by cation-exchange chromatography. Analytical Biochemistry **111**, 357 - 365.
- [293] G. L. Newton, R. Dorian, R. C. Fahey (1981): Analysis of biological thiols: Derivatization with Monobrombimane and separation by reverse-phase High-Performance Liquid Chromatography. Analytical Biochemistry **114**, 383 - 387.
- [294] S. Klapheck, S. Schlunz, L. Bergmann (1995): Synthesis of phytochelatins and homo-phytochelatins in *Pisum sativum* L. Plant Physiology **107**, 515 - 521.
- [295] R. Kneer (1989): Untersuchungen zur Schwermetalltoleranz pflanzlicher Suspensionskulturen. Diplomarbeit. Universität Ulm.
- [296] B. Haciosmanoglu (2000): Bestimmung schwermetallbindender schwefelreicher Substanzen in Ölpflanzenextrakten mit der HPLC. Diplomarbeit. Universität-Gesamthochschule Paderborn.
- [297] V. Vacchina, H. Chassigne, M. Oven, M. H. Zenk, R. Lobinski (1999): Characterization and determination of phytochelatins in plant extracts by electrospray tandem mass spectrometry. Analyst. **124**, 1425 - 1430.
- [298] T.-Y. Yen, J. A. Villa, J. G. DeWitt (1999): Analysis of Phytochelatin-cadmium complexes from plant tissue culture using Nano-electrospray ionization Tandem Mass Spectrometry and Capillary Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. Journal of Mass Spectrometry. **34**, 930 - 941.
- [299] P. J. Florijn, M. L. Van Beusichem (1993): Uptake and distribution of cadmium in maize inbred lines. Plant and soil **150**, 25 - 32.
- [300] P. J. Florijn, M. L. Van Beusichem (1993): Cadmium distribution in maize inbred lines: effects of pH and level of Cd supply. Plant and soil **153**, 79 - 84.
- [301] Wenzel et al. (1996): Effects of soil properties and cultivar on cadmium accumulation in wheat grain. Z. Pflanzenernähr. Bodenk. **159**, 609 - 614.

- [302] M. Choudhary, L. D. Bailey, C. A. Grant (1995): Effect of Zn on the concentration of Cd and Zn in plant tissue of two durum wheat lines. Canadian Journal of Plant Science **75**, 445 - 448.
- [303] H.-D. Ocker, J. Brüggemann, C. S. Rühl, H. Klein (1991): Cadmium in Sonnenblumenkernen, Mohn und Sesam. Bundesgesundheitsblatt **34**.
- [304] Fodor et al. (1995): The effect of cadmium on the fluidity and H<sup>+</sup>-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. J. Plant Physiol. **147**, 87 - 92.
- [305] <http://www-public.tu-bs.de:8080/~y0012692/Seiten/brassicaceae.html>
- [306] <http://www.biologie.uni-ulm.de/lehre/bestueb/brassica.htm>
- [307] D. R. Hoagland, D. I. Arnon (1950): The water-culture method for growing plants without soil. Calif. Agric. Exp. Sta. Circ. **347**.
- [308] <http://www.agnet.org/library/data/eb/eb329/eb329.pdf>
- [309] A. L. Page, F. T. Bingham, C. Nelson (1972): Cadmium absorption and growth of various plant species as influenced by solution cadmium concentration. J. Environ. Quality **1**, 288 - 291.
- [310] [http://ehs.sph.berkeley.edu/ucbtsp/General\\_Prog\\_Info/2000-2001/Schaider\\_L\\_absprp.pdf](http://ehs.sph.berkeley.edu/ucbtsp/General_Prog_Info/2000-2001/Schaider_L_absprp.pdf)
- [311] R. Strauß, H. Bleiholder, T. van den Boom, L. Buhr, H. Hack, M. Heß, R. Klose, U. Meier, E. Weber (1994): Einheitliche Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien mono- und dikotyle Pflanzen. Gemeinschaftsarbeit der BBA, des BSA und des IVA unter Mitwirkung anderer Institutionen. Zusammengestellt von Ciba-Geigy AG. Basel.
- [312] G. Bhupal Raj, M. C. Patnaik (1999): Effect of Cadmium on growth, yield and nutrient composition of sunflower. J. Oilseeds Res. **16 (1)**, 41 - 55.
- [313] E. H. Larsson, J. F. Bornman, H. Asp (1998): Influence of UV-B radiation and Cd<sup>2+</sup> on chlorophyll fluorescence, growth and nutrient content in *Brassica napus*. Journal of Experimental Botany **49 (323)**, 1031 - 1039.
- [314] A. K. Stobart, W. T. Griffiths, I. Ameen-Bukhari, R. P. Sherwood (1985): The effect of Cd<sup>2+</sup> on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. Physiol. Plant. **63**, 293 - 298.
- [315] M. Grote, J. Hofele, M. Sietz (1996): Untersuchung der Berylliumaufnahme von Agrarpflanzen: Verteilung und Elementspeziation. BIOforum **12**, 566.
- [316] J. Kowalzik (1998): Untersuchungen zur Phytotoxizität und Pflanzenverfügbarkeit von Vanadium. Dissertation. Universität Paderborn.
- [317] M. Grote, M. Sietz, J. Hofele, J. Kowalzik (1997): Investigations on the phytoavailability of beryllium and vanadium. Fresenius Environmental Bulletin **6**, 37.
- [318] W. M. Walker, J. E. Miller, J. J. Hassett (1979): Effect of lead and cadmium upon boron, copper, manganese and zinc concentration of young corn plants. Communications in Soil Science **8**, 57 - 66.
- [319] H.-J. Weigel (1991): Zur Ökotoxikologie des Schwermetalls Cadmium: Untersuchungen über Aufnahme, Verteilung und Wirkung des Metalls bei Pflanze und Tier. Habilitationschrift Technische Universität Braunschweig.
- [320] G. Vert, F. Dédaldéchamp, F. Gaynard, J. F. Briat, C. Curie (2001): Expression and function of the iron transporters IRT1 and IRT2 from *Arabidopsis thaliana*. Abstract C1.113. SEB Canterbury Meeting 2001.

- [321] R. Douce, J. Joyard (1982): Purification of the chloroplast envelope. In: *Methods in chloroplast molecular biology*, Edelman (Hrsg.), 239 - 256.
- [322] B. Gerhardt (1978): Microbodies/Peroxisomen pflanzlicher Zellen. In: *Cell Biology Monographs Continuation of Protoplasmatologia Vol. 5*. Springer Verlag. Wien, New York.
- [323] L. Mönkhoff (2000): Der Einfluß der Probenvorbereitung auf die Zusammensetzung schwermetallhaltiger Ölpflanzenextrakte. Diplomarbeit. Universität Paderborn.
- [324] J. Brüggemann, N. Tümmers, H. P. Thier, T. Betsche (1996): Cadmium binding compounds in wheat: occurrence and partial characterisation. In: Natural Antioxidants and Food Quality in Atherosclerosis and Cancer Prevention. Hrsg.: J. T. Kumpulainen, J. T. Salonen. Special Publication 181. The Royal Society of Chemistry, 417 - 422.
- [325] S. Yoshida, R. Tanaka, T. Kashimoto (1985): Gel Filtration Profiles of Cadmium in Soybeans from Cadmium-Polluted Field. J. Food Hyg. Soc. Japan **27 (1)**, 64 - 69.
- [326] S. Kojima, M. Kiyozumi, M. Kamiya, Y. Ishimatsu (1979): Eisei Kagaku **25**, 245 - 250.
- [327] H. Waldner, K. Günther (1996): Charakterisierung niedermolekularer Zinkspezies in handelsüblichen Lebensmitteln. Z. Lebensm. Unters. Forsch. **202**, 256 - 262.
- [328] C. H. W. Hirs (1956): The oxidation of ribonuclease with performic acid. J. Biol. Chem. **219**, 611 - 621.
- [329] L. Leita, M. Contin, A. Maggioni (1991): Distribution of cadmium and induced cadmium-binding-proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris*. Plant Science **77**, 139 - 147.
- [330] S. Marchetti, L. Leita (1995): Risposta sporofitica e gametofitica allo stress da cadmio in *Pisum sativum*. In: *Atti XXXIX Convegno Annuale Società Italiana di Genetica Agraria, Vasto Marina, Italy*, 207. Zitiert nach [13].
- [331] E. Delhaize, P.J. Jackson, L. D. Lujan, N. J. Robinson (1989): Effects of cadmium on gene expression in cadmium-tolerant and cadmium-sensitive *Datura innoxia* cells. Plant Mol. Biol. **12**, 487 - 497.
- [332] W. Levinson, H. Oppermann, J. Jackson (1980): Transition series metals and sulfhydryl reagents induce the synthesis of four proteins in eukaryotic cells. Biochem. Biophys. Acta **606**, 170 - 180.
- [333] J. H. Bowen, M. Lay Yee (2000). An Apple (*Malus domestica* L. Borkh vs Braeburn) cDNA Clone for a High Molecular Weight Heat Shock Protein. Plant Physiol. **122 (1)**, 292.
- [334] H.-U. Meisch, I. Beckmann, A. Schmitt (1983): Biochim. Biophys. Acta **745**, 259ff.
- [335] W. E. Rauser, N. R. Curvetto (1980): Metallothionein occurs in roots of *Agrostis* tolerant to excess copper. Nature **287**, 563 - 564.
- [336] H. Chassigne, V. Vaccina, T. M. Kutchan, M. H. Zenk (2001): Identification of phytochelatin-related peptides in maize seedlings exposed to cadmium and obtained enzymatically in vitro. Phytochemistry **56**, 657 - 668.
- [337] E. Derbyshire, D. J. Wright, D. Boulter (1976): Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. Phytochemistry **15**, 3 - 24.

- [338] R. Casey, C. Domoney (1984): The biochemical genetics of pea storage proteins. Kulturpfl. **32**, 99 - 108.
- [339] P. Plietz, D. Zirwer, B. Schlesier, K. Gast, G. Damaschun, K. D. Schwenke (1984): Comparison of the structures of different 11S and 7S globulins by small-angle X-ray scattering, quasi-elastic light scattering and circular dichroism spectroscopy. Kulturpfl. **32**, 159 - 163.
- [340] S. P. Singh, V. K. Nayyar (1994): Accumulation characteristics of cadmium in selected forage species. Journal of Indian Society of Soil Science **42**, 96 - 100.
- [341] B. Waters, D. G. Blevins (2001): FRO1, a *Pisum sativum* ferric reductase involved in Fe uptake. Abstract C1.111. SEB Canterbury Meeting 2001.
- [342] P. Kebarle, L. Tang (1993): Anal. Chem. **65**, 972A - 986A.
- [343] G. Schmelzeisen-Redeker, L. Buttering, F. W. Röllgen (1989): Int. J. Mass Spectrom. IonProcesses **90**, 139 - 150.
- [344] J. V. Iribarne, B. A. Thomson (1976): J. Chem. Phys. **64**, 2287 - 2292.
- [345] C. Eckerskorn (1998): Massenspektrometrie. In: F. Lottspeich, H. Zorbach (Hrsg.). Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin, 323 - 368.
- [346] W. D. Lehmann (1996): Massenspektrometrie in der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin.
- [347] <http://www.finnigan.com/newfeatures/animation.html>. Animation Ionenfalle.
- [348] G. L. Ellman (1959): Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. **82**, 70 - 77.
- [349] M. M. Bradford (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**, 248 - 254.
- [350] R. Scopes (1982): Protein purification, principles and practice. Springer Verlag. Heidelberg.
- [351] D. E. Salt, R. C. Prince, I. J. Pickering, I. Raskin (1995): Mechanism of cadmium mobility and accumulation in Indian Mustard. Plant Physiol. **109**, 1427 - 1433.
- [352] T. F. Neales, A. L. McLeod (1991): Do leaves contribute to the abscisic acid present in the xylem sap of "droughted" sunflower plants. Plant, Cell and Environment **14**, 979 - 986.
- [353] T. Gollan, U. Schurr, E.-D. Schulze (1992): Stomatal response to drying soil in relation to changes in the Xylem sap composition of *Helianthus annuus*. I. The concentration of cations, anions, aminoacids in, and pH of, the xylem sap. Plant, Cell and Environment **15**, 551 - 559.
- [354] H. Aebi (1974): Katalase. In: Methoden der enzymatischen Analyse. H. Bergmeyer (Hrsg.). Verlag Chemie. Weinheim (Bergstraße), 713 - 739.
- [355] C. Schnarrenberger, A. Oeser, N. E. Tolbert (1971): Development of microbodies in sunflower cotyledons and castor bean endosperm during germination. Plant Physiology **48**, 566 - 574.
- [356] Y. Kojima, P. E. Hunziker (1991): Amino acid analysis of metallothionein. Methods in Enzymology **205**, 419 - 421.



## A 1: Weitere Elutionsprofile der GFC

### A 1.1 Sonnenblumenkerne

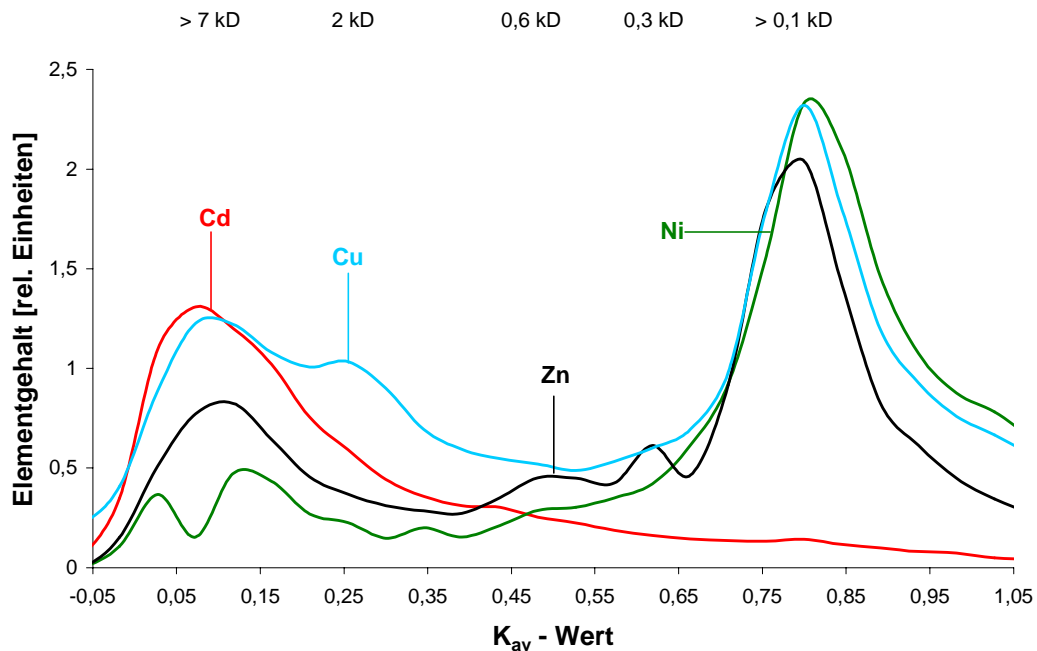


Abb. A1: Sonnenblumenkerne (Sorte „Petra“; 1997): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion

Cd (1 Einheit 3 ng/mL), Cu (1 Einheit 250 ng/mL), Ni (1 Einheit 150 ng/mL)

Zn (1 Einheit 750 ng/mL)

Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);

Superdex Peptide HR.

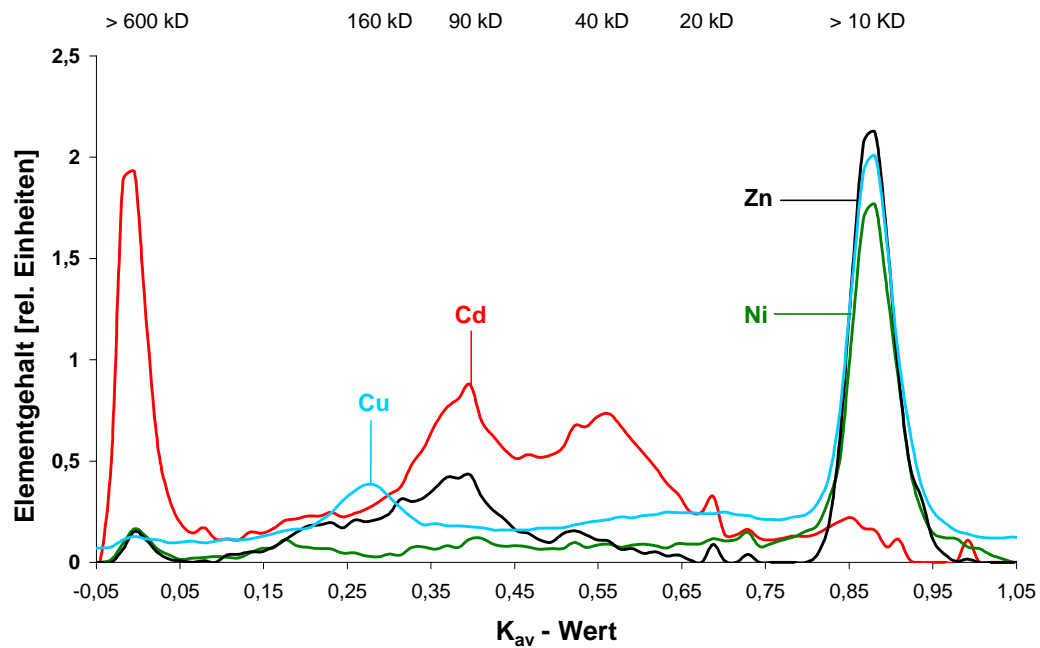


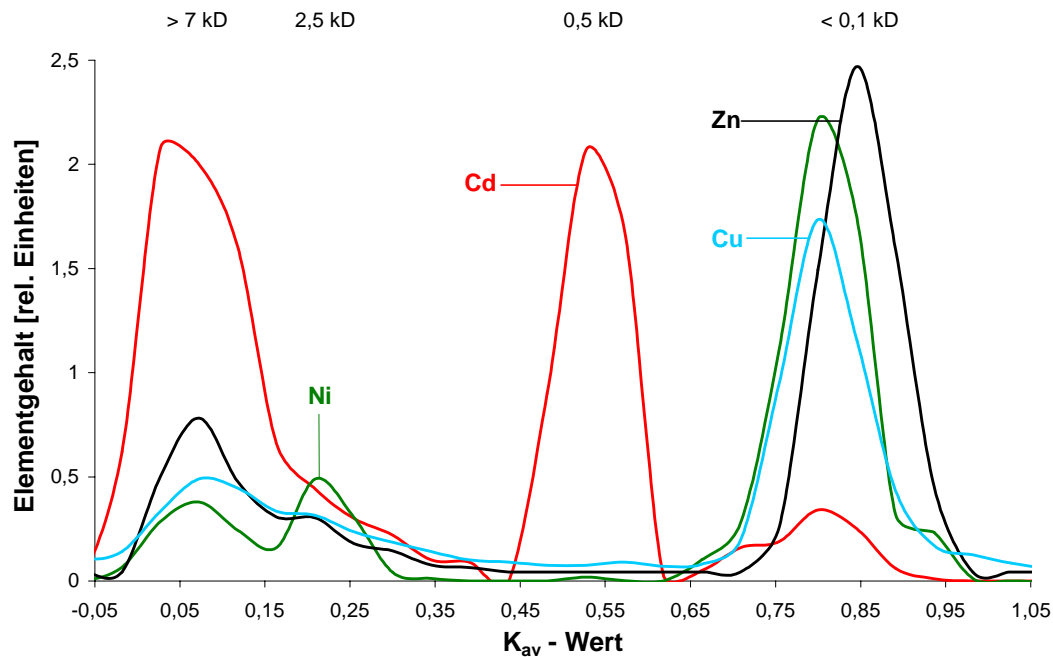
Abb. A2: Sonnenblumenkerne (Sorte Petra 1998): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion

Cd (1 Einheit 1 ng/mL), Cu (1 Einheit 250 ng/mL), Ni (1 Einheit 150 ng/mL)

Zn (1 Einheit 250 ng/mL),

Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl (pH 8,0; 0,05 mol/L);

Superdex S200.



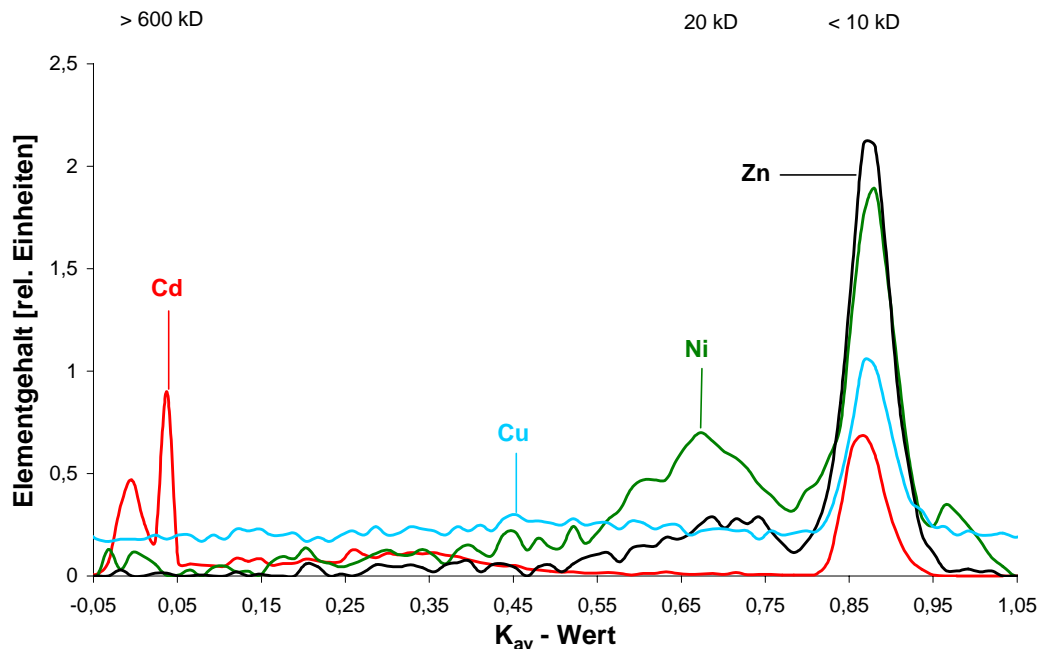
**Abb. A3: Sonnenblumenkerne (Unterfranken; 1998): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**

**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 200 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 100 ng/mL)

**Zn** (1 Einheit 300 ng/mL);

Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);

Superdex Peptide HR.



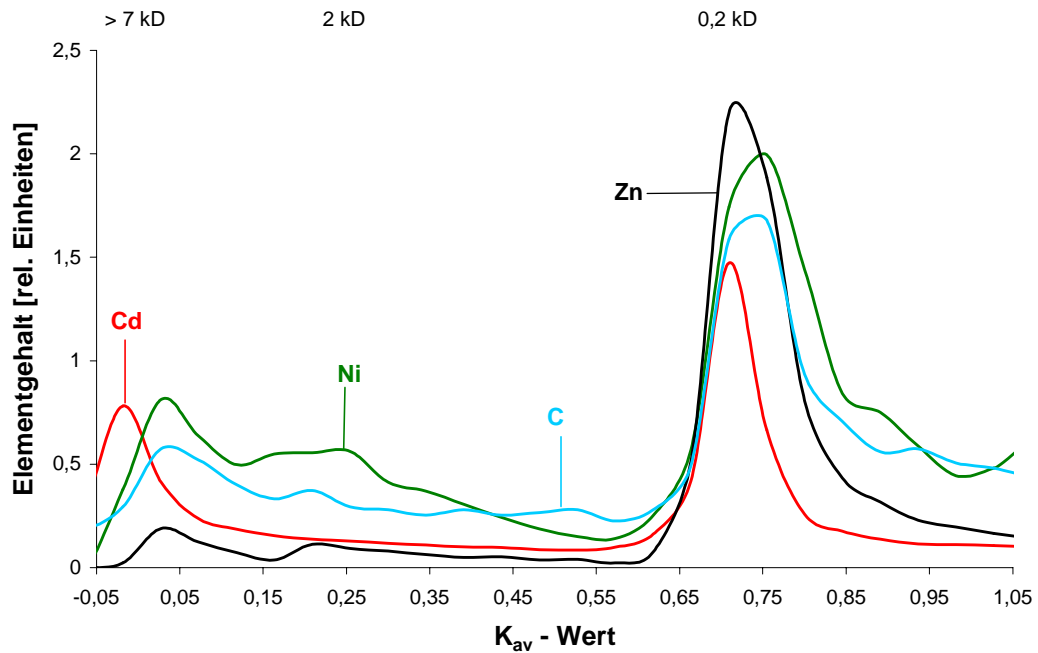
**Abb. A4: Sonnenblumenkerne (äußere SBK; Vinsebeck; 1999): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**

**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 100 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 40 ng/mL),

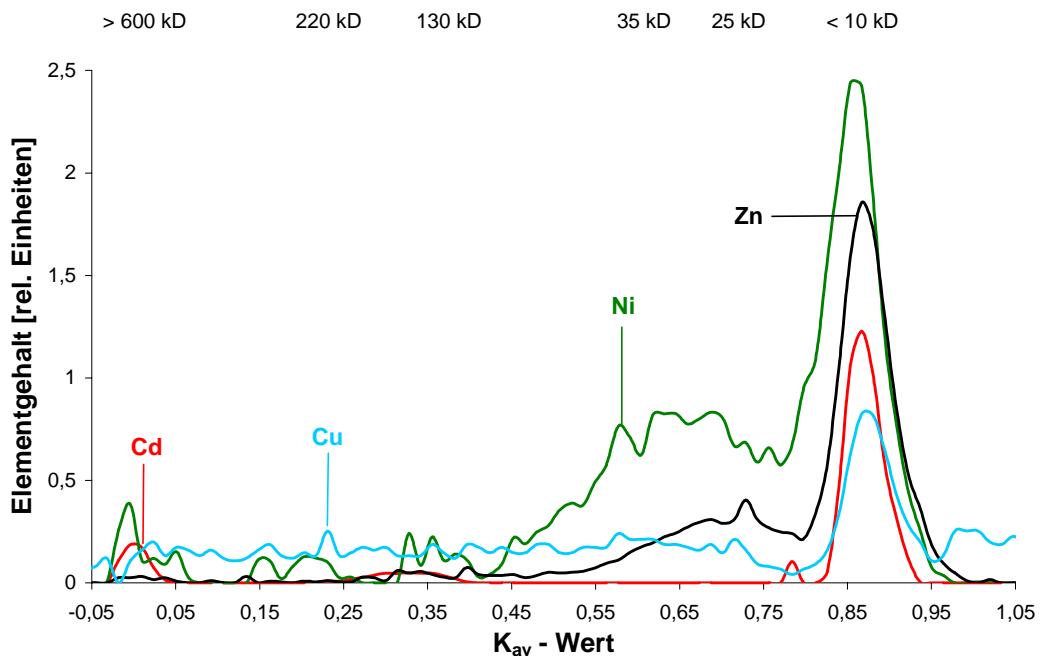
**Zn** (1 Einheit 200 ng/mL);

Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);

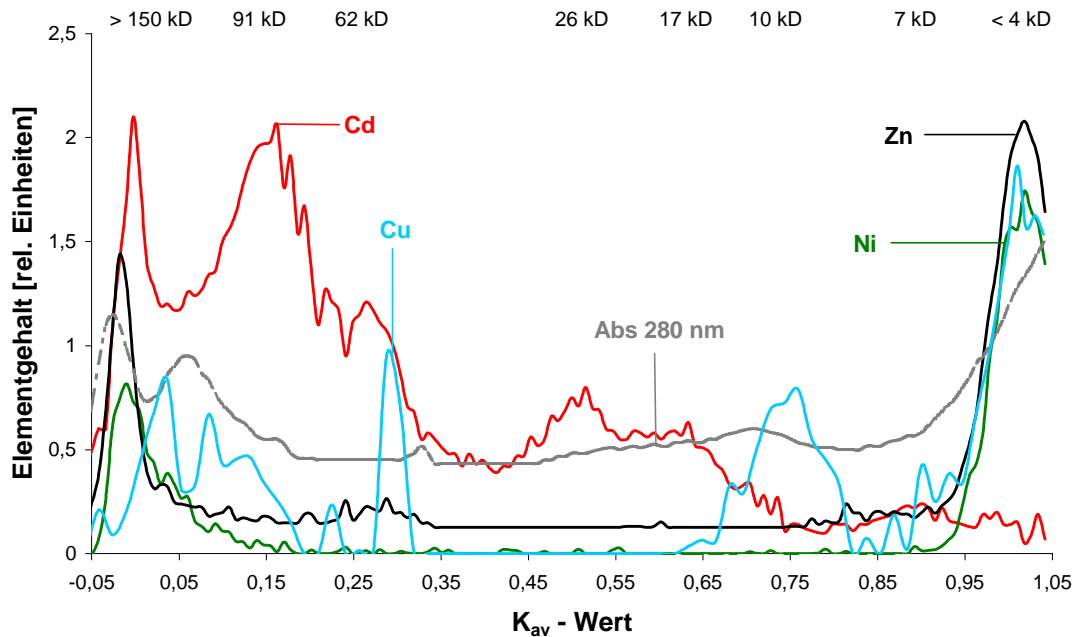
Superdex S200.



**Abb. A5: Sonnenblumenkerne (äußere SBK; Vinsebeck; 1999):**  
**Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**  
**Cd (1 Einheit 1 ng/mL), Cu (1 Einheit 75 ng/mL), Ni (1 Einheit 40 ng/mL),**  
**Zn (1 Einheit 500 ng/mL);**  
 Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);  
 Superdex Peptide HR.

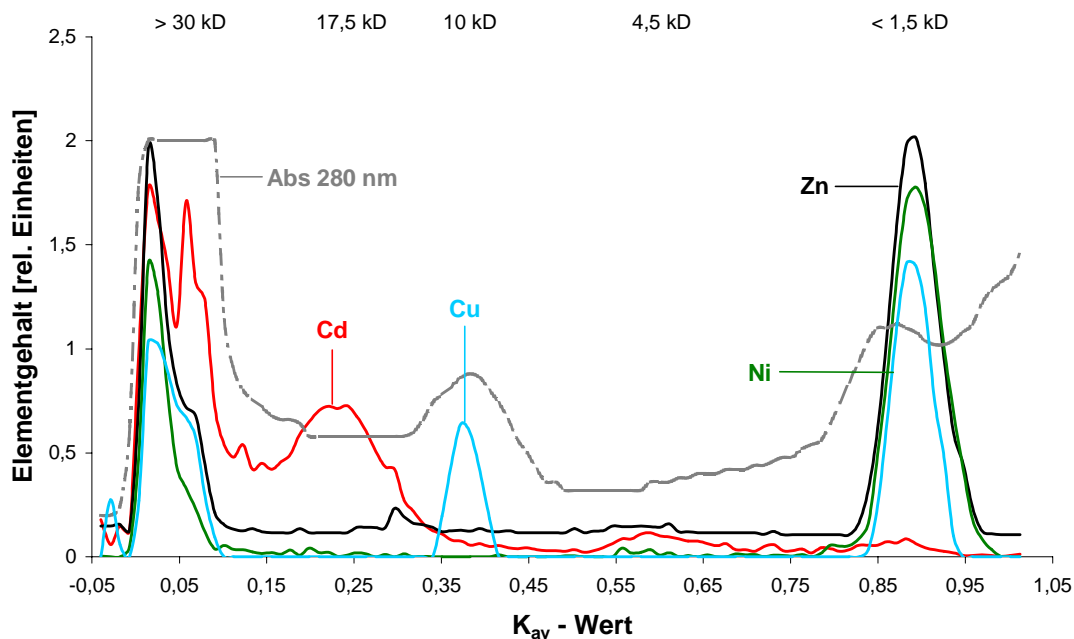


**Abb. A6: Sonnenblumenkerne (innere SBK; Vinsebeck; 1999):**  
**Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**  
**Cd (1 Einheit 1 ng/mL), Cu (1 Einheit 75 ng/mL), Ni (1 Einheit 25 ng/mL),**  
**Zn (1 Einheit 250 ng/mL);**  
 Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);  
 Superdex S200.



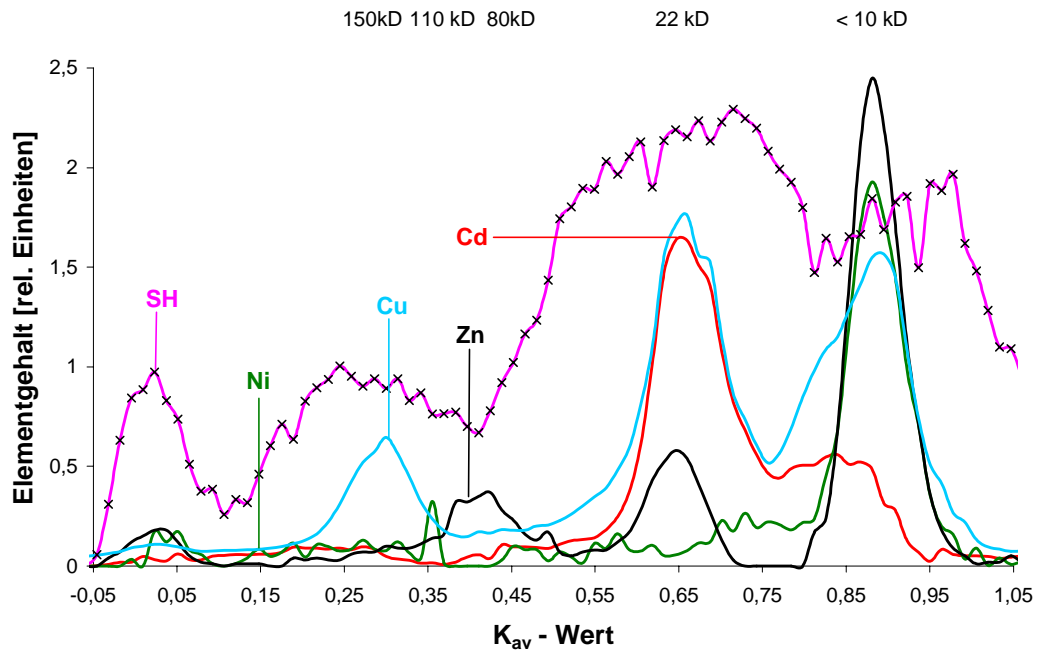
**Abb. A7: Sonnenblumenkerne (geschält): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**

**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 200 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 150 ng/mL), **Zn** (1 Einheit 200 ng/mL), **Absorption 280 nm** (1 Einheit 50 mV);  
 Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);  
 Sephadex G100.

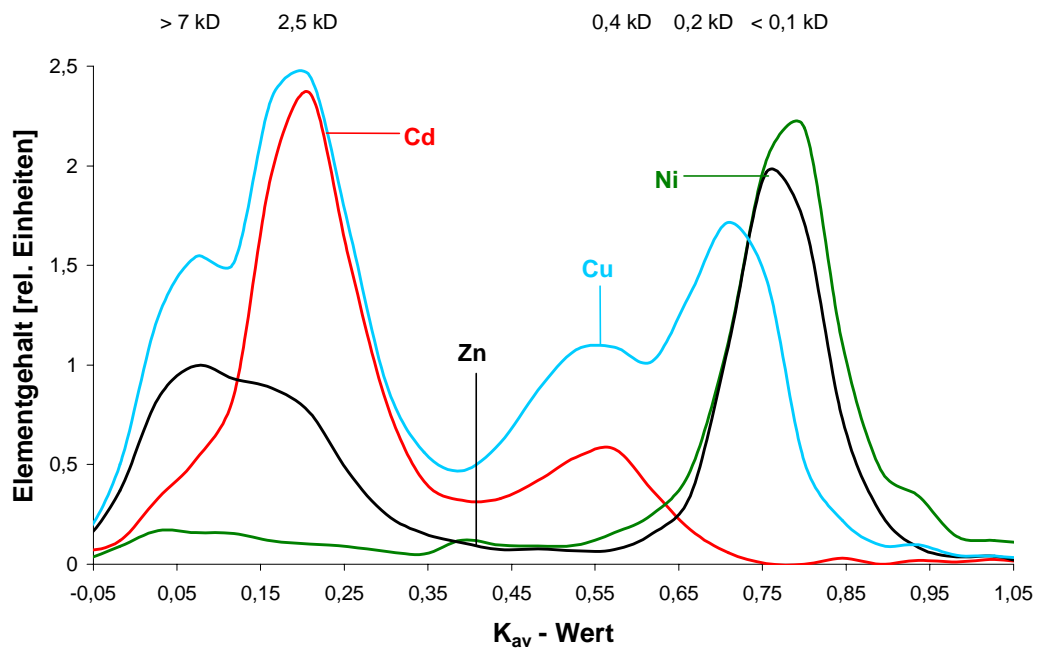


**Abb. A8: Sonnenblumenkerne (geschält): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**

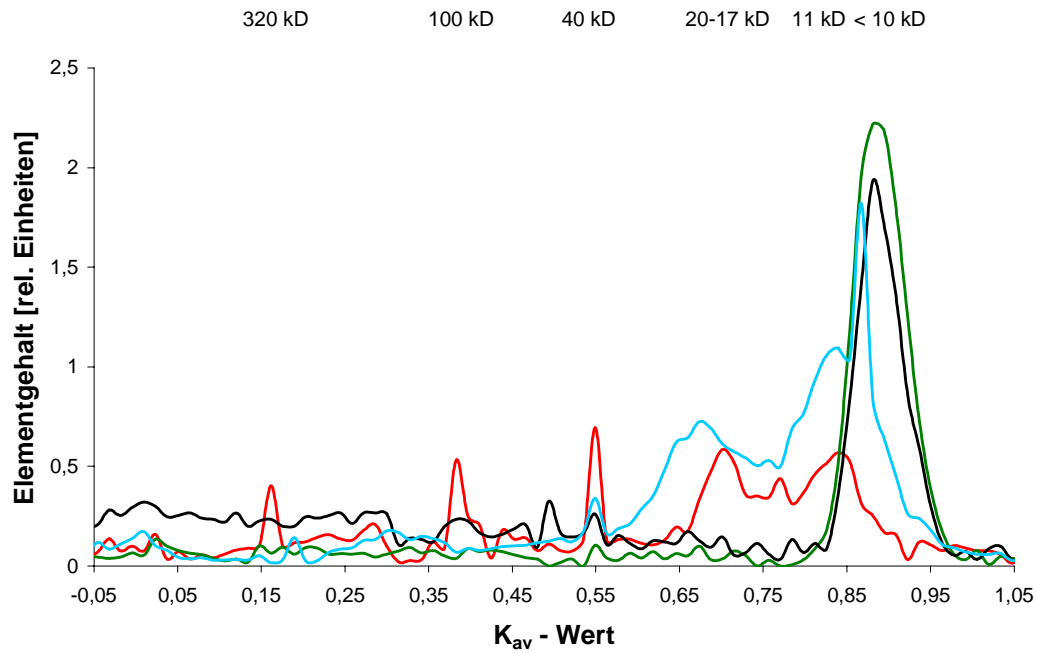
**Cd** (1 Einheit 4 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 200 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 150 ng/mL), **Zn** (1 Einheit 250 ng/mL) **Absorption 280 nm** (1 Einheit 50 mV);  
 Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);  
 Sephadex G50.



**Abb. A9:** Sonnenblumenkerne (Sorte „Petra“; 1996): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion unter reduzierenden Bedingungen  
**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 100 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 40 ng/mL), **Zn** (1 Einheit 100 ng/mL),  
**freies SH** (1 Einheit normiert auf 300 mg/L Cysteiniumchlorid)  
 Extraktions-/Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L, 10 mmol/L ME); Superdex S200.

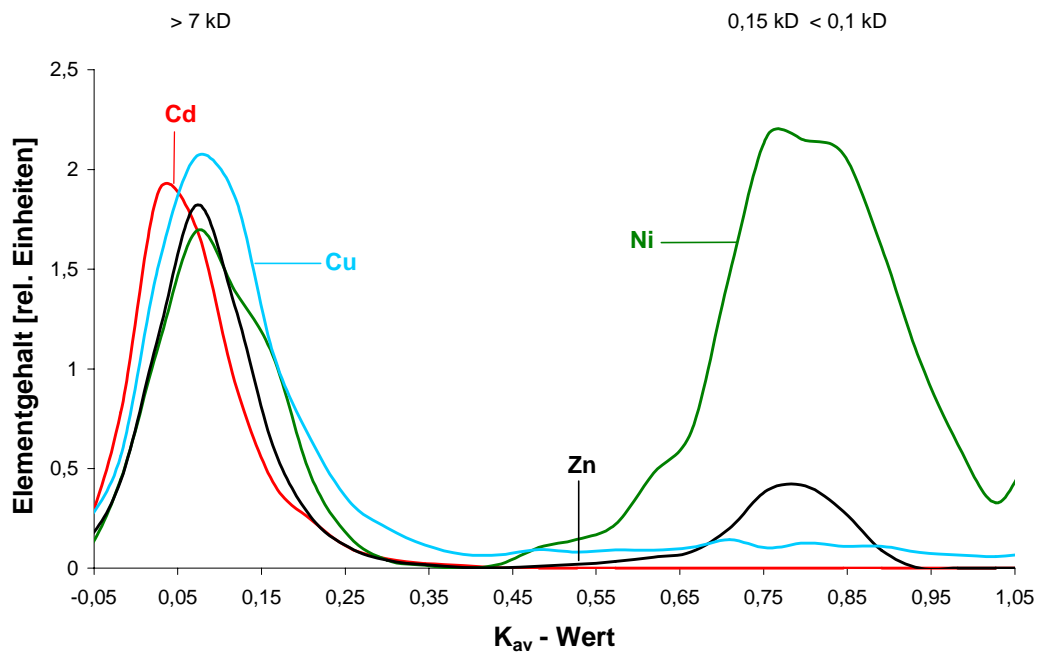


**Abb. A10:** Sonnenblumenkerne (Sorte „Petra“; 1996): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion unter reduzierenden Bedingungen  
**Cd** (1 Einheit 3 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 250 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 75 ng/mL), **Zn** (1 Einheit 300 ng/mL);  
 Extraktions-/Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L, 10 mmol/L ME); Superdex Peptide HR.



**Abb. A11: Sonnenblumenkerne (Unterfranken, 1998): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion unter reduzierenden Bedingungen**  
**Cd (1 Einheit 1 ng/mL), Cu (1 Einheit 40 ng/mL), Ni (1 Einheit 50 ng/mL), Zn (1 Einheit 150 ng/mL);**  
 Extraktions-/Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L, 10 mmol/L ME); Superdex S200.

## A 1.2 Rapssamen



**Abb. A12: Rapssamen (BEE; 1996): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion unter reduzierenden Bedingungen**  
**Cd (1 Einheit 1 ng/mL), Cu (1 Einheit 250 ng/mL), Ni (1 Einheit 150 ng/mL), Zn (1 Einheit 500 ng/mL);**  
 Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L); Superdex Peptide HR.

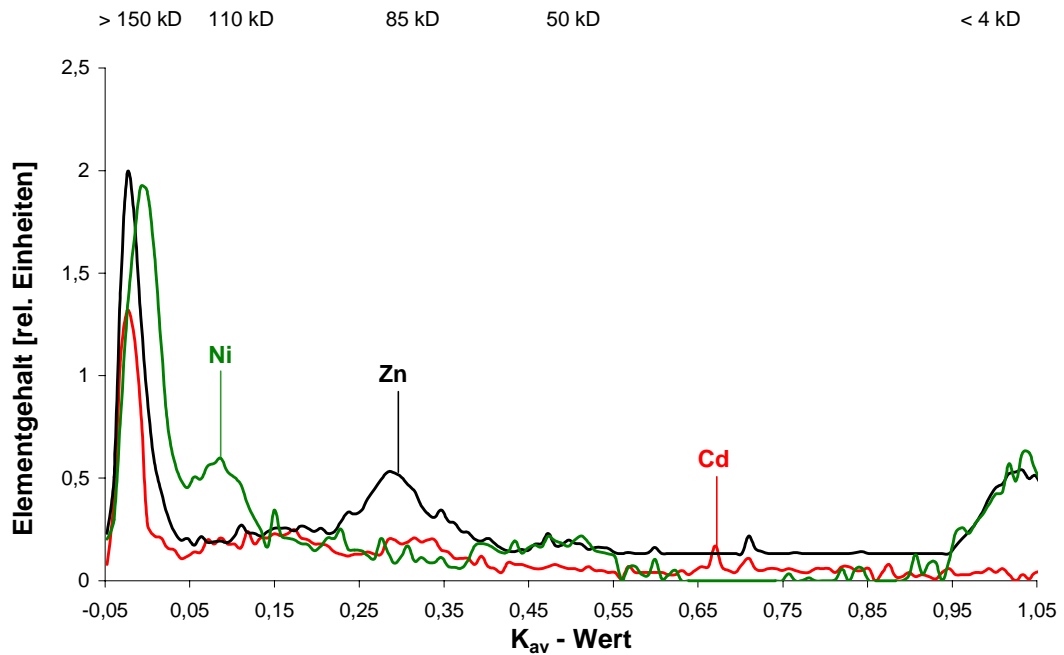


Abb. A13: **Rapssamen (Mischmuster, 1996): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**

**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 40 ng/mL), **Zn** (1 Einheit 200 ng/mL);  
 Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);  
 Sephadex G100.

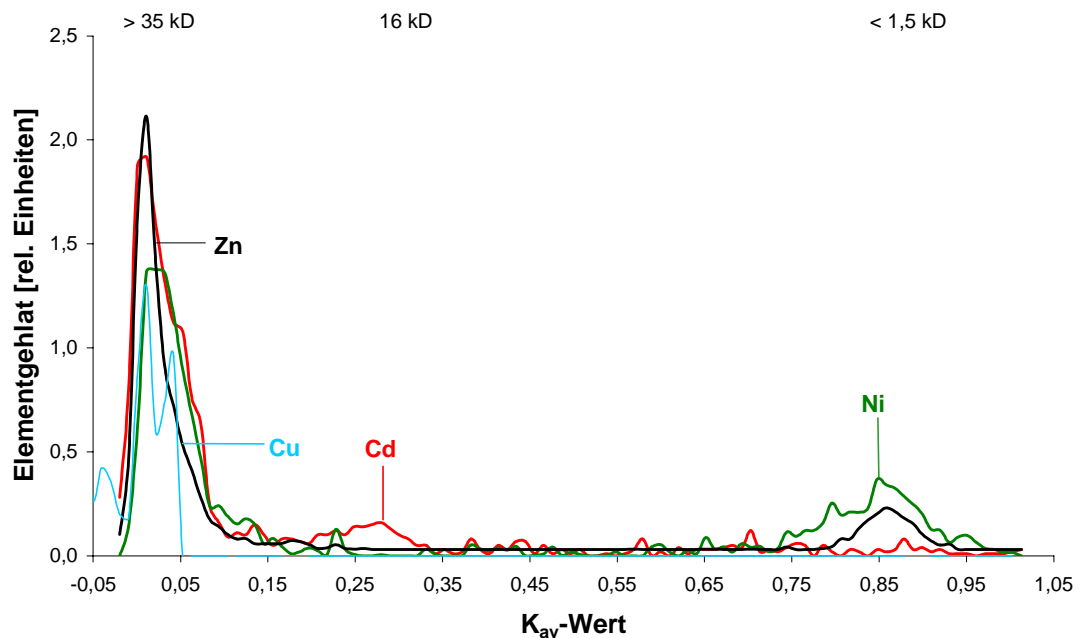


Abb. A14: **Rapssamen (Mischmuster, 1996): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**

**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 250 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 150 ng/mL),  
**Zn** (1 Einheit 500 ng/mL);  
 Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);  
 Sephadex G50.

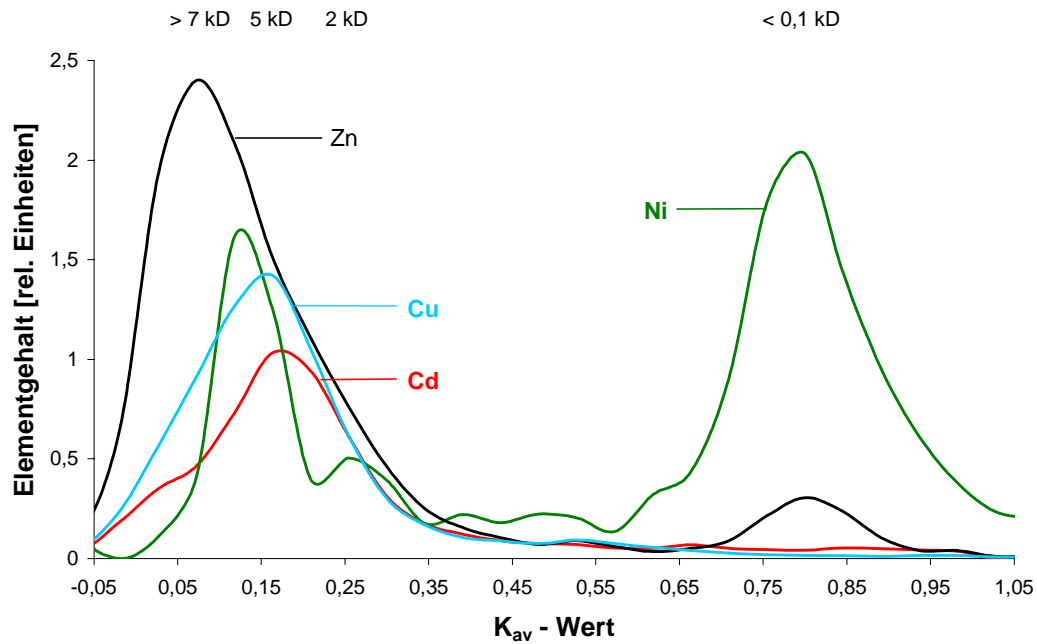


Abb. A15: **Rapssamen (BEE 1996): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion unter reduzierenden Bedingungen**

**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 600 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 100 ng/mL), **Zn** (1 Einheit 250 ng/mL);

Extraktions-/Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L, 10 mmol/L ME); Superdex Peptide HR.

### A 1.3 Sonnenblumenblätter

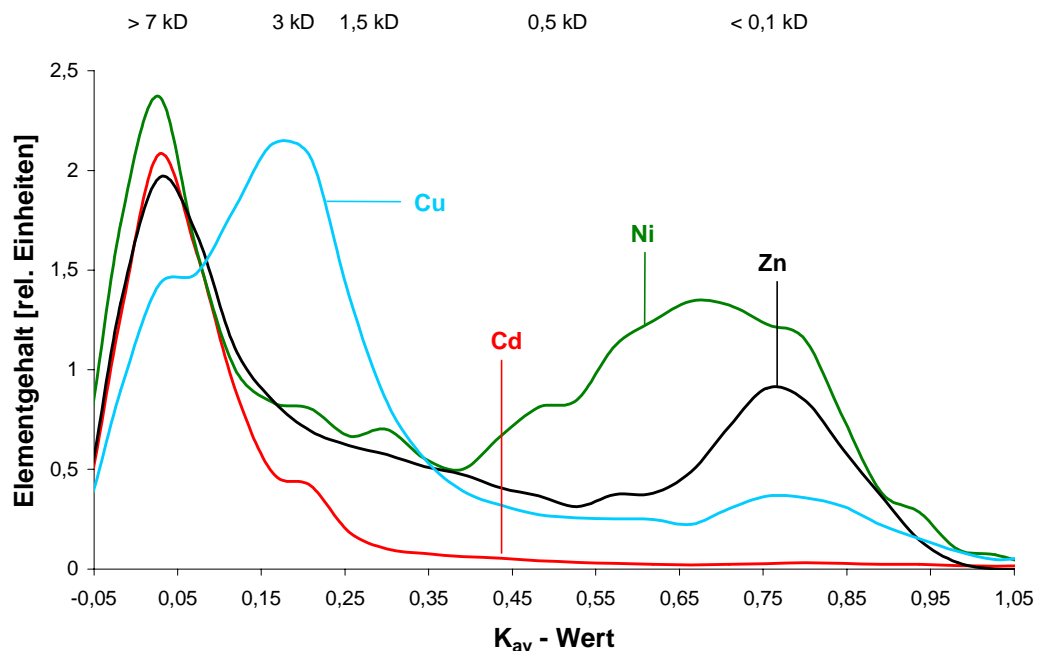
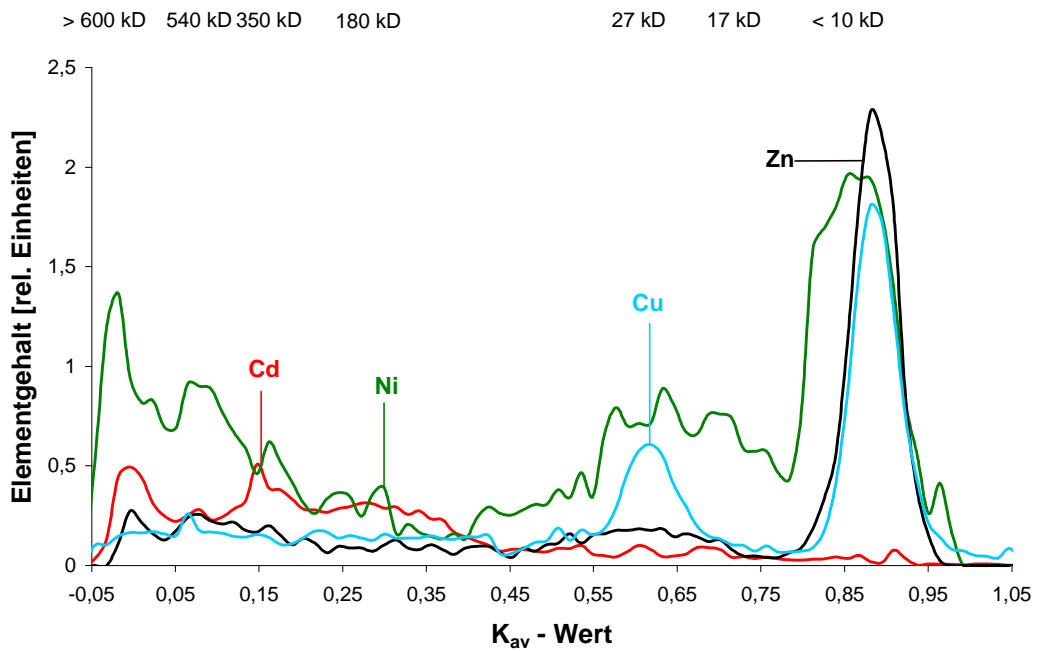


Abb. A16: **Sonnenblumenblätter (Blätter Nr. 1-6; Vinsebeck, 1999): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**

**Cd** (1 Einheit 3 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 30 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 25 ng/mL), **Zn** (1 Einheit 150 ng/mL);

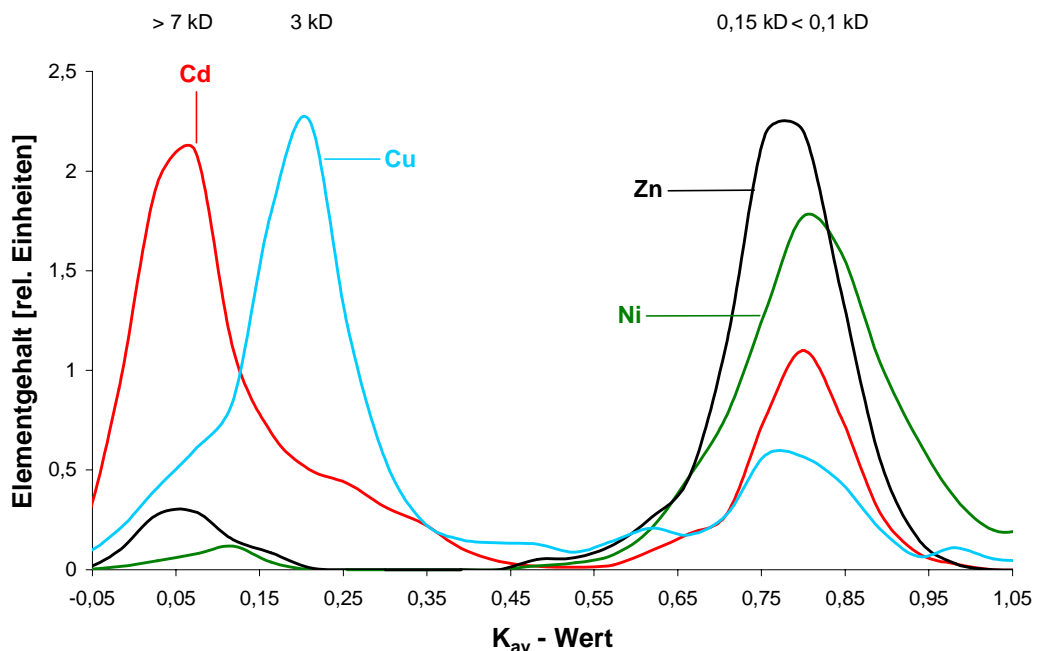
Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L); Superdex Peptide HR.



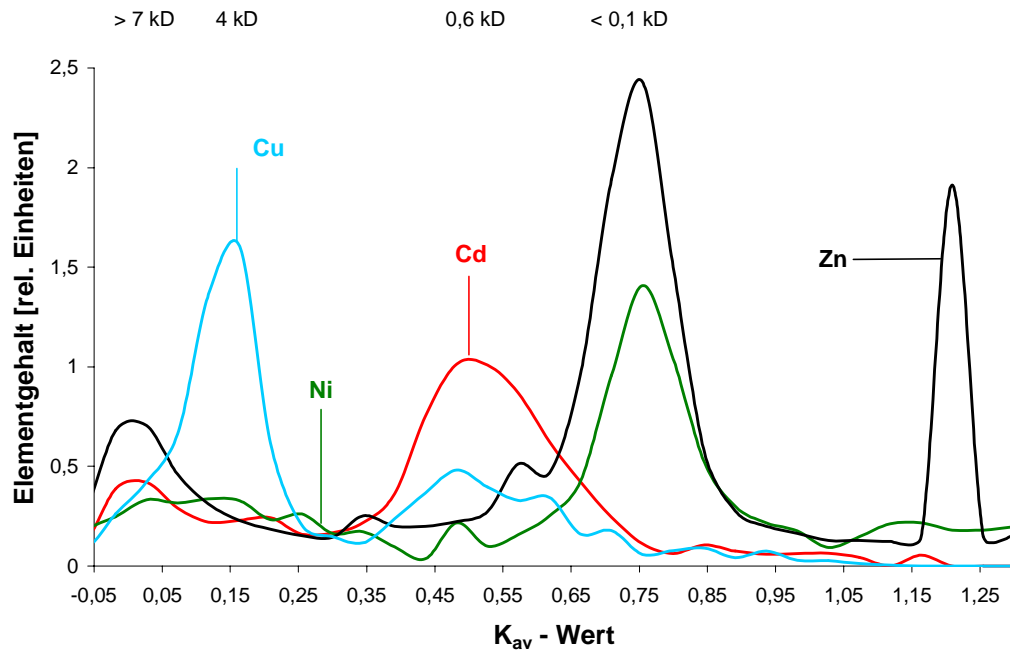


**Abb. A17: *Sonnenblumenblätter (Blätter 19-26; Vinsebeck, 1999):***  
**Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**  
**Cd (1 Einheit 1 ng/mL), Cu (1 Einheit 50 ng/mL), Ni (1 Einheit 15 ng/mL),**  
**Zn (1 Einheit 125 ng/mL);**  
 Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);  
 Superdex S200.

## A 1.4 Rapsblätter

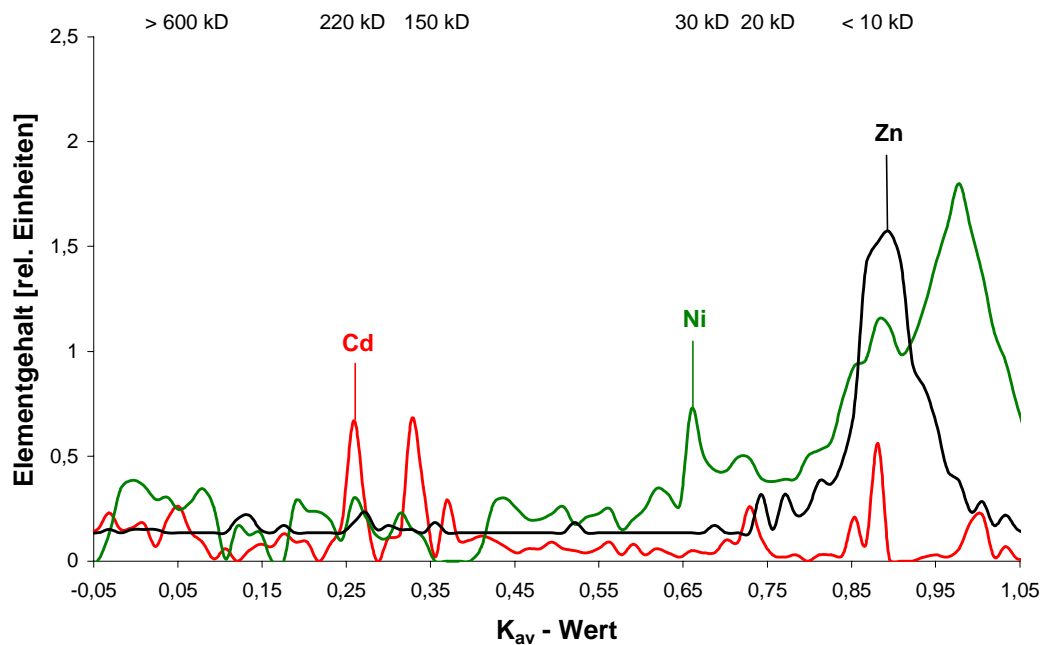


**Abb. A18: *Rapsblätter (Detmold-Mosebeck, 2000):***  
**Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**  
**Cd (1 Einheit 1 ng/mL), Cu (1 Einheit 25 ng/mL), Ni (1 Einheit 40 ng/mL),**  
**Zn (1 Einheit 200 ng/mL);**  
 Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);  
 Superdex Peptide HR.

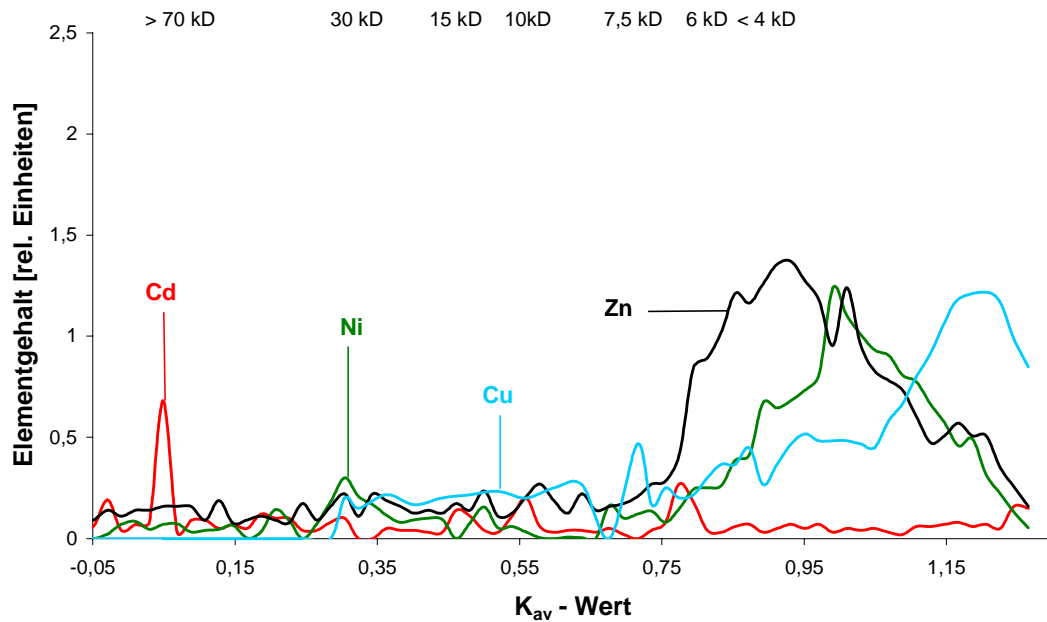


**Abb. A19: *Rapsblätter (Detmold-Mosebeck, 2000):* Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion unter reduzierenden Bedingungen**  
**Cd (1 Einheit 1 ng/mL), Cu (1 Einheit 25 ng/mL), Ni (1 Einheit 25 ng/mL), Zn (1 Einheit 250 ng/mL)**  
 Extraktions-/Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L; 10 mmol/L ME) Superdex Peptide HR.

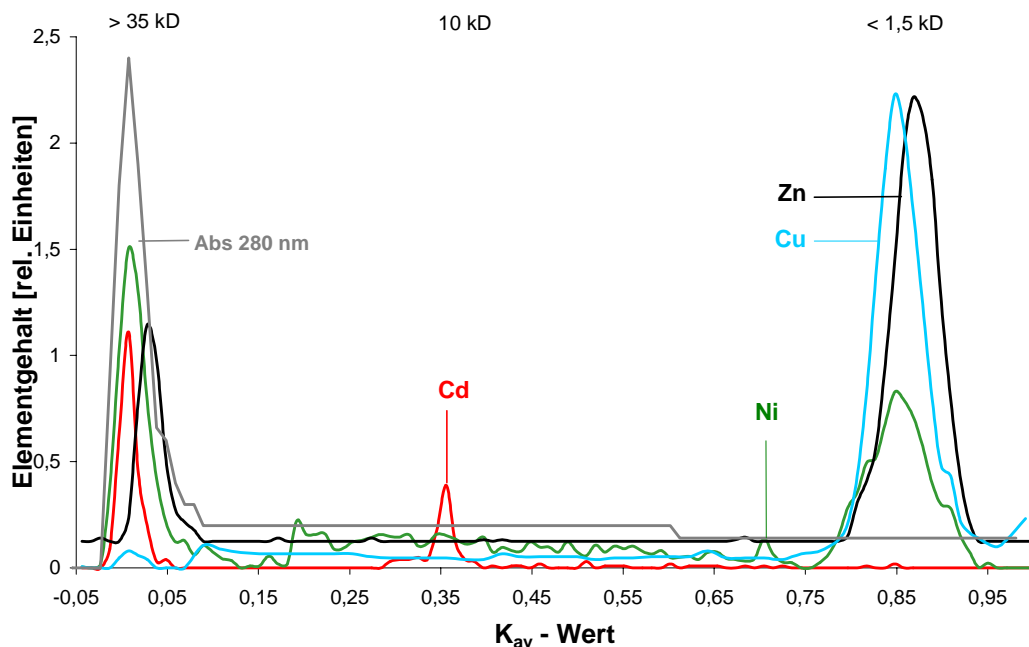
## A 1.5 Sonnenblumenwurzeln



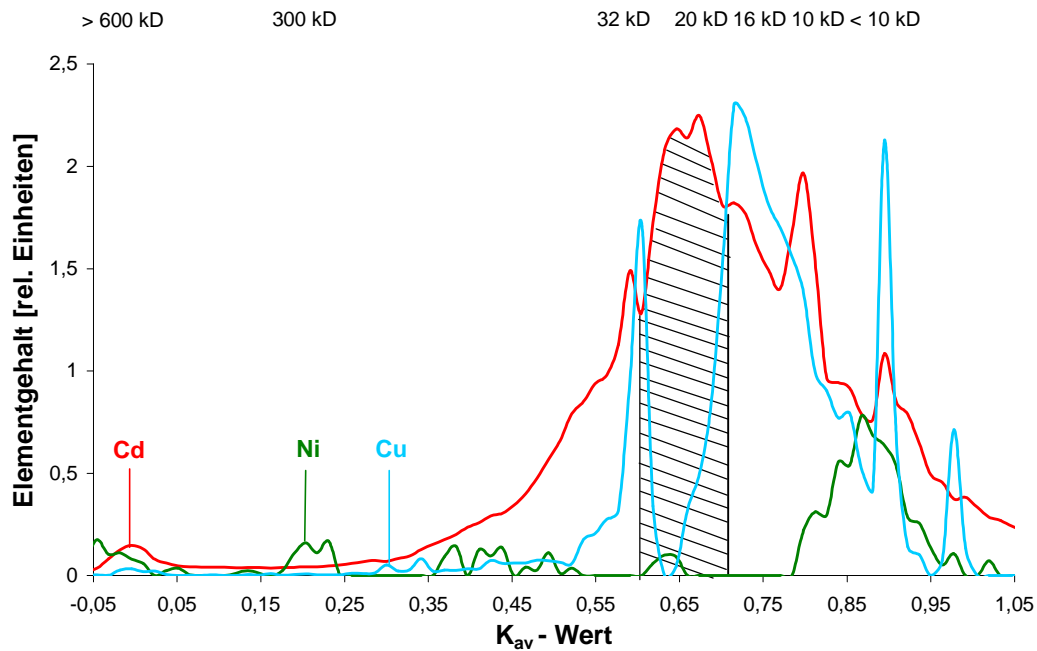
**Abb. A20: *Sonnenblumenwurzeln (Unterfranken, 1998):* Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**  
**Cd (1 Einheit 1 ng/mL), Cu (1 Einheit 25 ng/mL), Ni (1 Einheit 20 ng/mL), Zn (1 Einheit 80 ng/mL);**  
 Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L); Superdex S200.



**Abb A21: Sonnenblumenwurzeln (Unterfranken, 1998):**  
**Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**  
**Cd (1 Einheit 1 ng/mL), Cu (1 Einheit 50 ng/mL), Ni (1 Einheit 40 ng/mL),**  
**Zn (1 Einheit 75 ng/mL);**  
 Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);  
 Superdex S75.

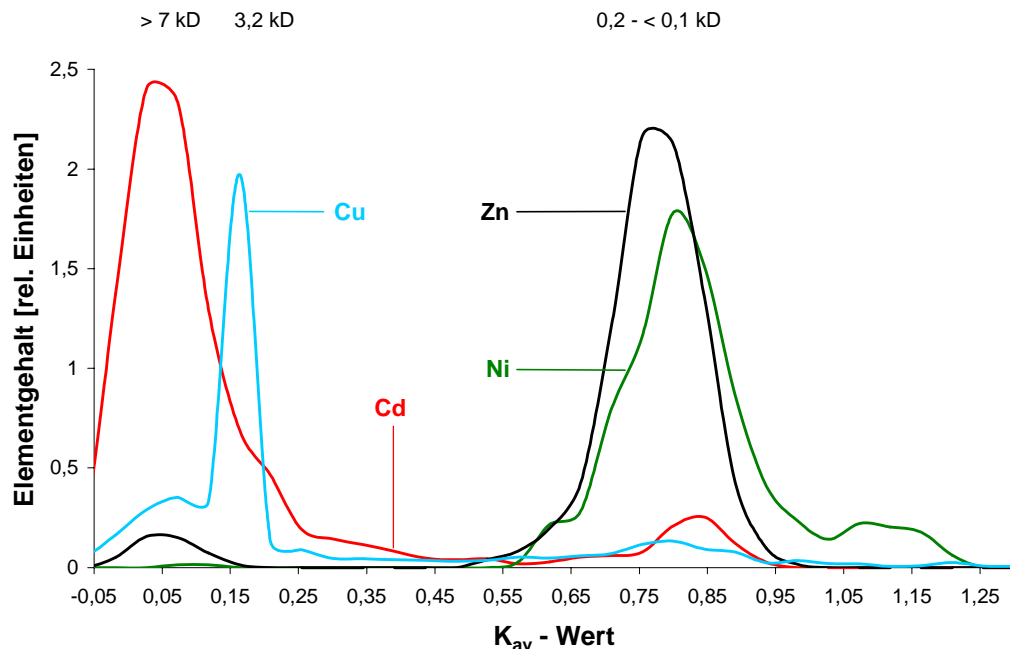


**Abb. A22: Sonnenblumenwurzeln (Anzucht in Hydrokultur):**  
**Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**  
**Cd (1 Einheit 1 ng/mL), Cu (1 Einheit 15 ng/mL), Ni (1 Einheit 75 ng/mL),**  
**Zn (1 Einheit 125 ng/mL);**  
 Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);  
 Sephadex G100.



**Abb. A23: Sonnenblumenwurzeln (Anzucht in Hydrokultur; 1  $\mu$ mol/L, Cd): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion unter reduzierenden Bedingungen**  
**Cd** (1 Einheit 40 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 30 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 25 ng/mL),  
**Zn** (1 Einheit 100 ng/mL);  
 Extraktions-/Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L; 10 mmol/L ME);  
 Superdex Peptide HR.

## A 1.6 Rapswurzeln:



**Abb. A24: Rapswurzeln (Detmold-Mosebeck, 2000): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**  
**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 75 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 50 ng/mL),  
**Zn** (1 Einheit 300 ng/mL);  
 Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);  
 Superdex Peptide HR.

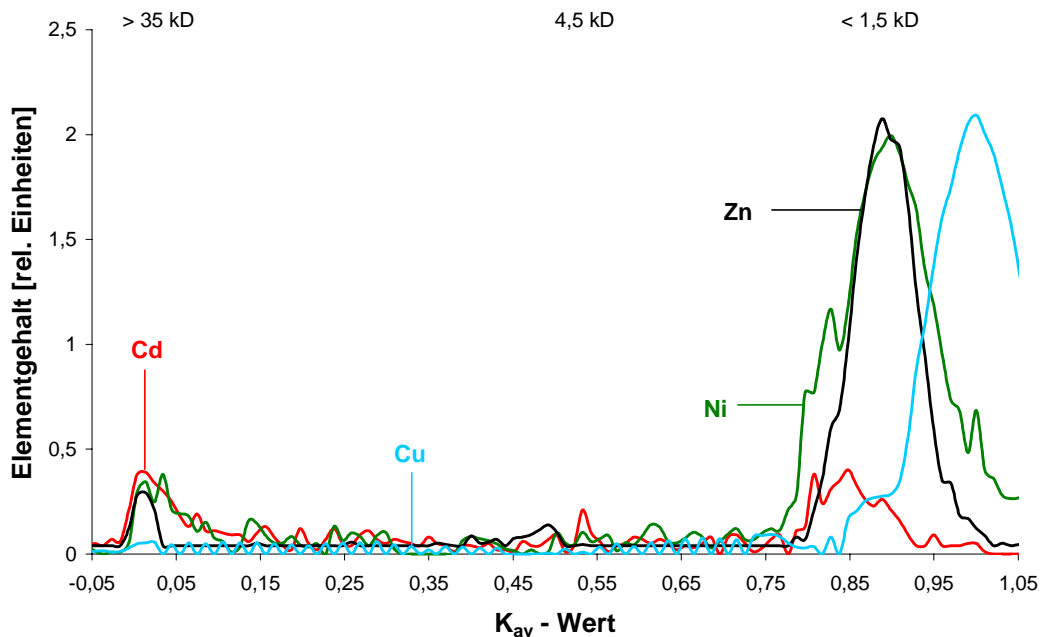


Abb. A25: Rapswurzeln (Detmold-Mosebeck, 1998): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion

**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 250 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 25 ng/mL), **Zn** (1 Einheit 125 ng/mL);

Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);  
Sephadex G50.

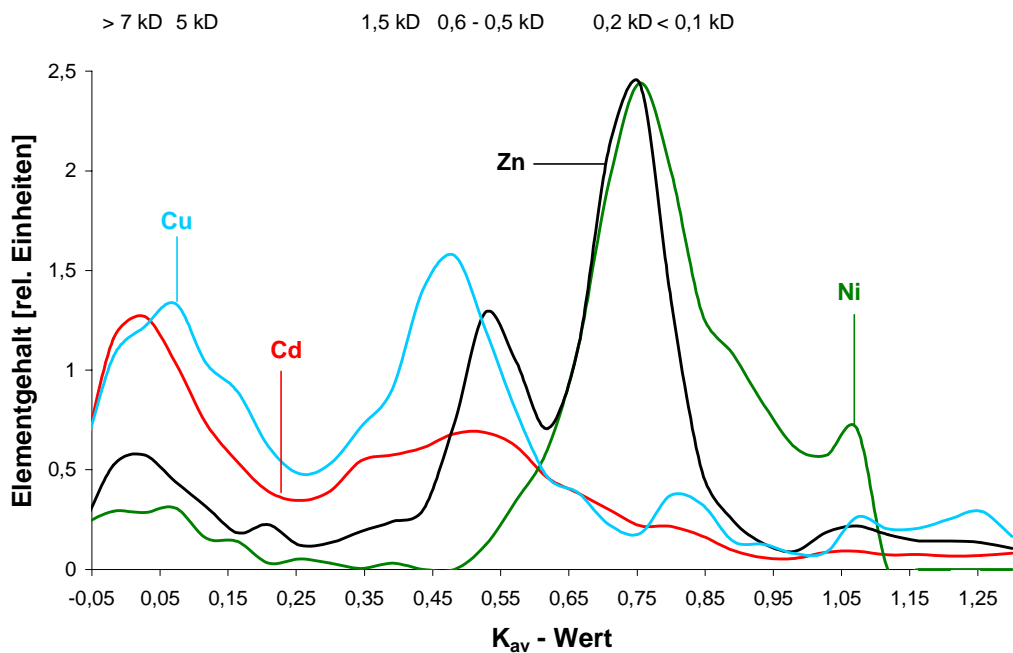
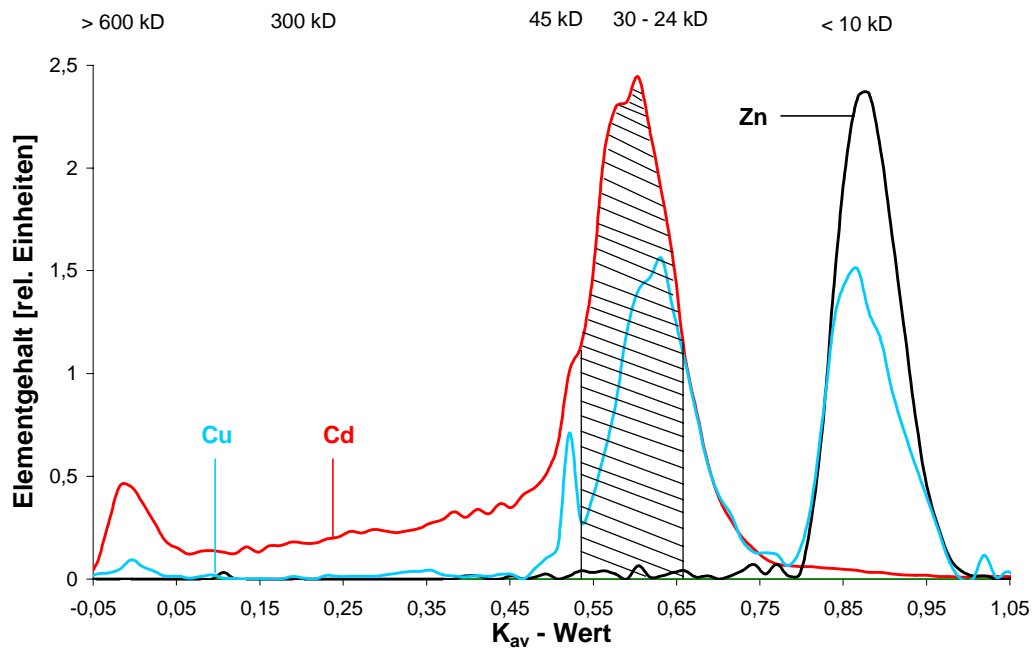


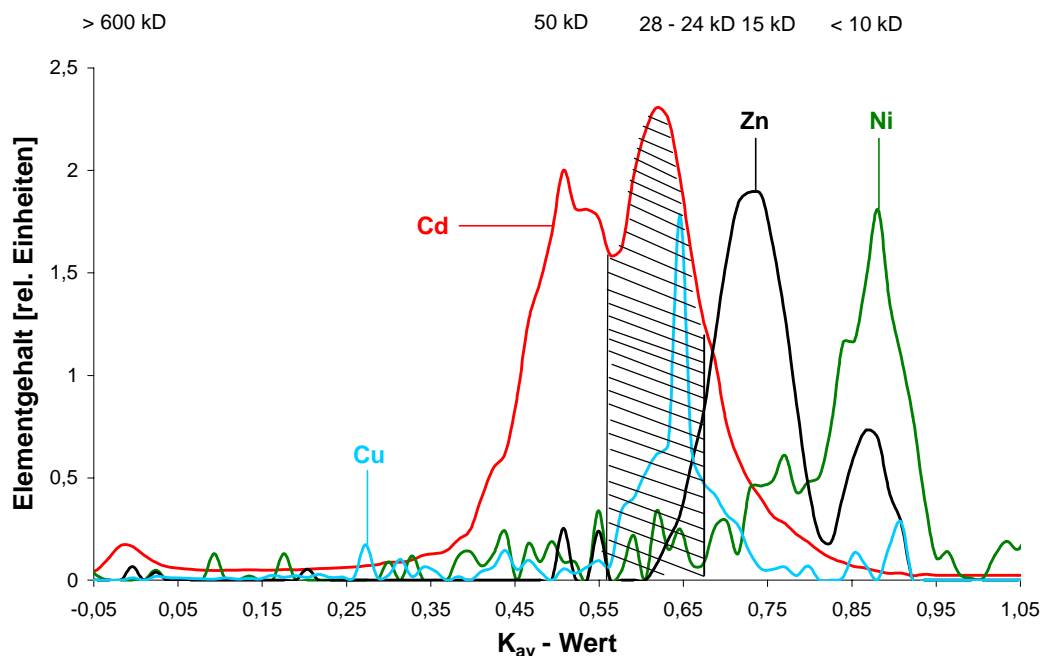
Abb. A26: Rapswurzeln (Detmold-Mosebeck, 2000): Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion unter reduzierenden Bedingungen

**Cd** (1 Einheit 1 ng/mL), **Cu** (1 Einheit 15 ng/mL), **Ni** (1 Einheit 25 ng/mL), **Zn** (1 Einheit 350 ng/mL);

Extraktions-/Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L; 10 mmol/L ME)  
Superdex S200.

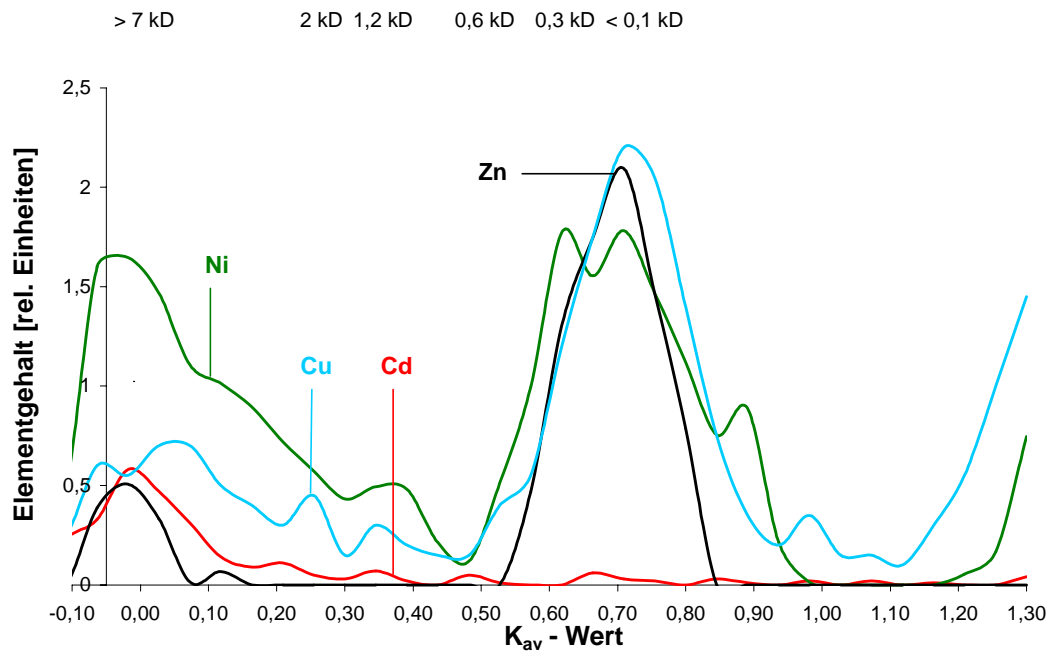


**Abb. A27: *Rapswurzeln (Anzucht in Hydrokultur; 1  $\mu\text{mol/L}$  Cd-Dotierung):***  
**Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**  
**Cd (1 Einheit 80 ng/mL), Cu (1 Einheit 25 ng/mL), Zn (1 Einheit 125 ng/mL);**  
 Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);  
 Superdex S200

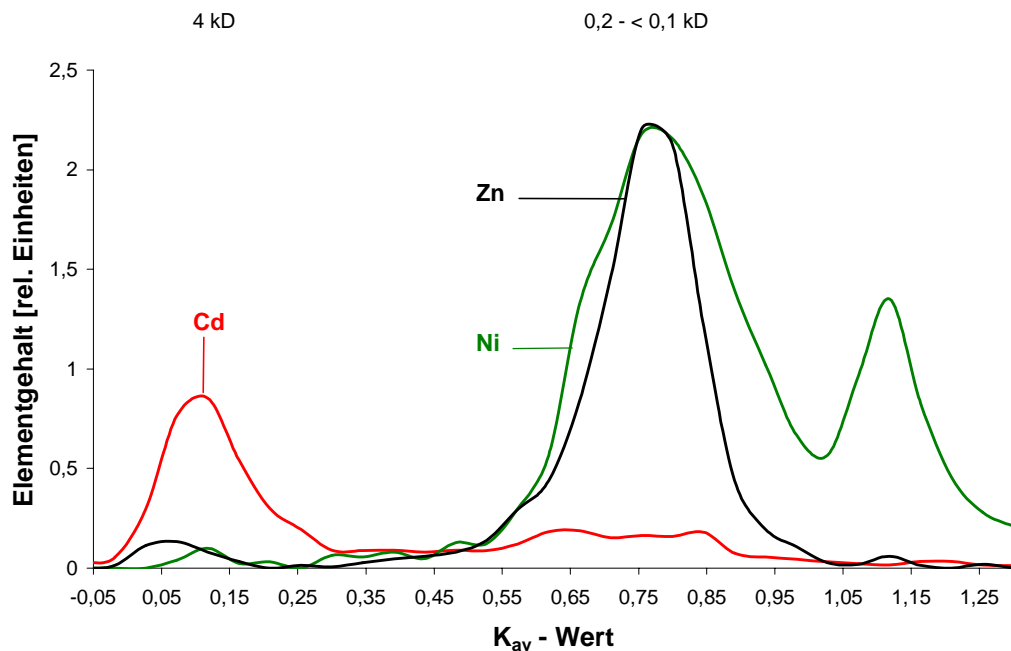


**Abb. A28: *Rapswurzeln (Anzucht in Hydrokultur, 1  $\mu\text{mol/L}$  Cd):***  
**Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion unter reduzie-**  
**renden Bedingungen**  
**Cd (1 Einheit 60 ng/mL), Cu (1 Einheit 50 ng/mL), Ni (1 Einheit 10 ng/mL),**  
**Zn (1 Einheit 75 ng/mL);**  
 Extraktions-/Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L; 10 mmol/L ME);  
 Superdex Peptide HR.

## A 1.7 Sonnenblumen- und Rapsstängel

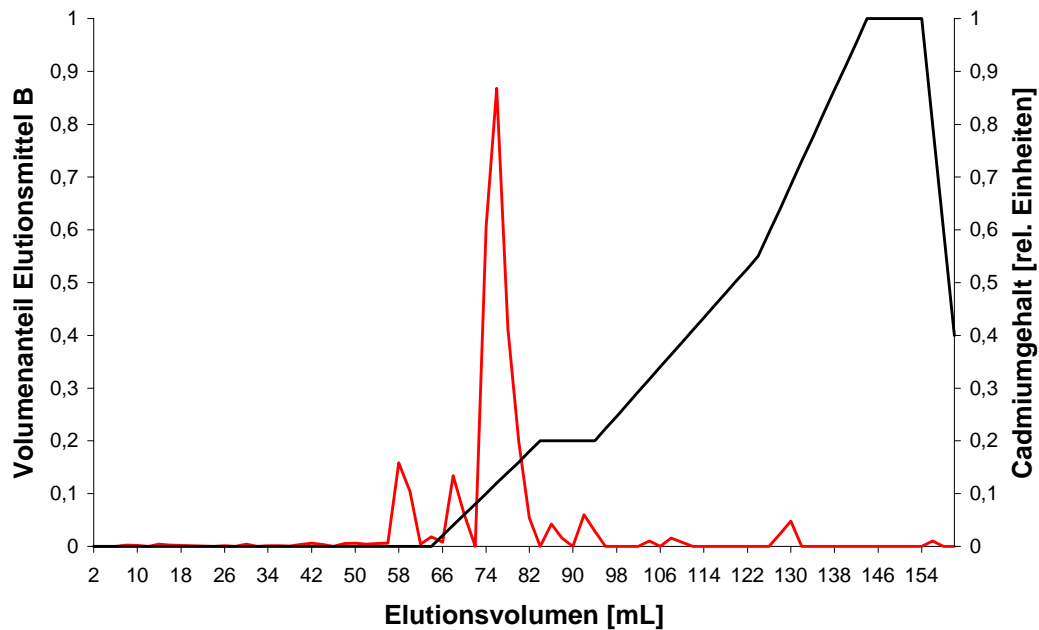


**Abb. A29: Sonnenblumenstängel (Unterfranken, 1998):**  
**Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**  
**Cd (1 Einheit 1 ng/mL), Cu (1 Einheit 20 ng/mL), Ni (1 Einheit 15 ng/mL),**  
**Zn (1 Einheit 75 ng/mL);**  
 Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer pH 8,0; 0,05 mol/L;  
 Superdex Peptide HR.



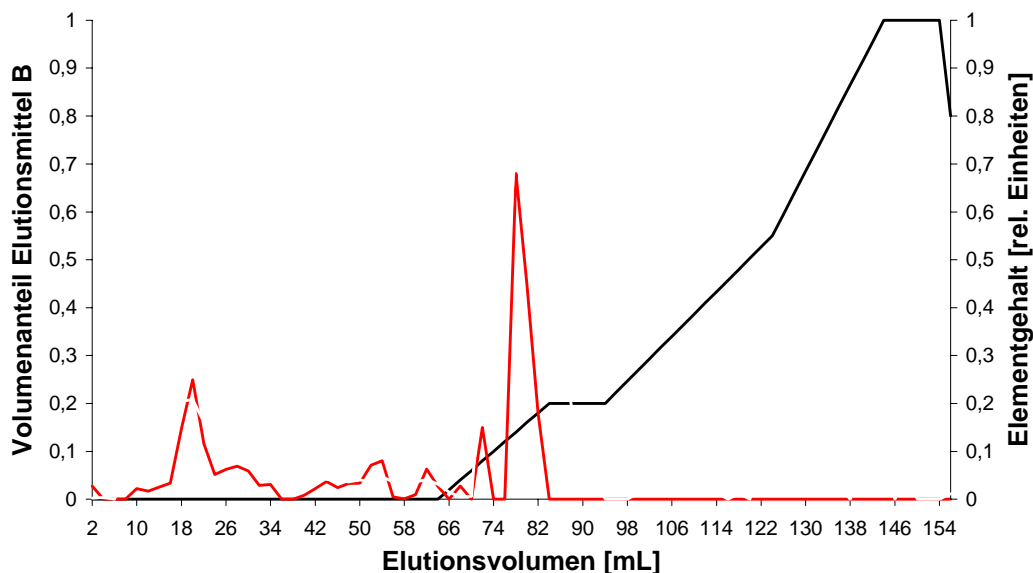
**Abb. A30: Rapsstängel (Detmold-Mosebeck, 1998):**  
**Schwermetall-Elutionsprofil der wässrigen Fraktion**  
**Cd (1 Einheit 60 ng/mL), Ni (1 Einheit 10 ng/mL);**  
 Extraktions- und Elutionspuffer: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);  
 Superdex Peptide HR:

## A 1.8 Elutionsprofile der IAC



**Abb. A31: Elutionsprofil der Cadmium-bindenden Substanz aus Sonnenblumenkernen (Molmasse 25kD) bei der IAC**

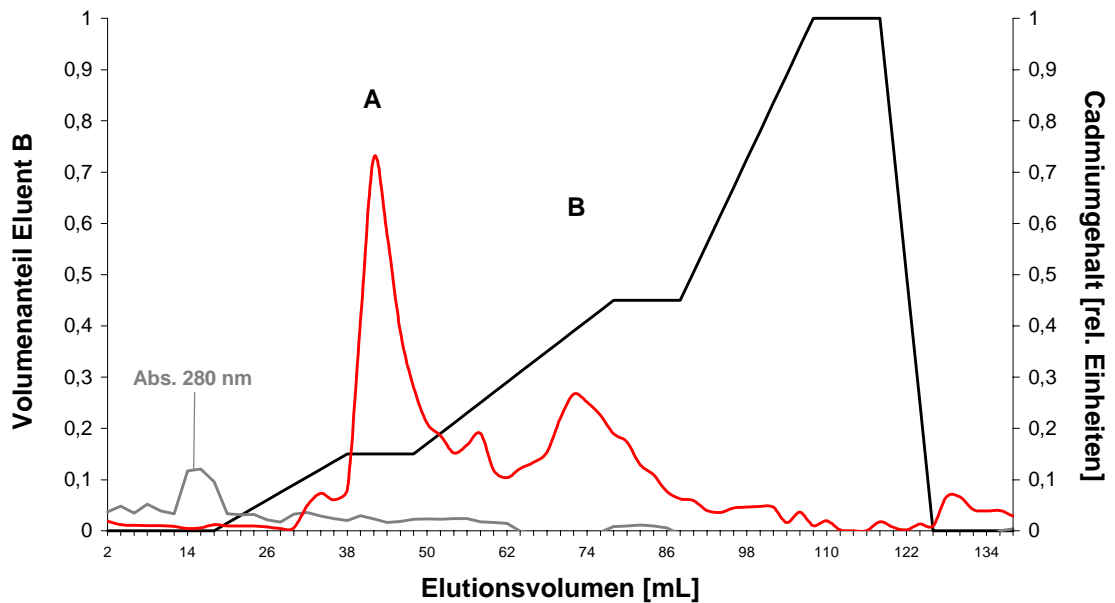
SBK: **Cd (1 Einheit 5 ng/mL)**  
 Laufmittel A: Tris-HCl-Puffer  
 Laufmittel B: Tris-HCl-Puffer + 1 mol/L NaCl



**Abb. A32: Elutionsprofil der Cadmium-bindenden Substanz aus Rapssamen (Molmasse 25kD) bei der IAC**

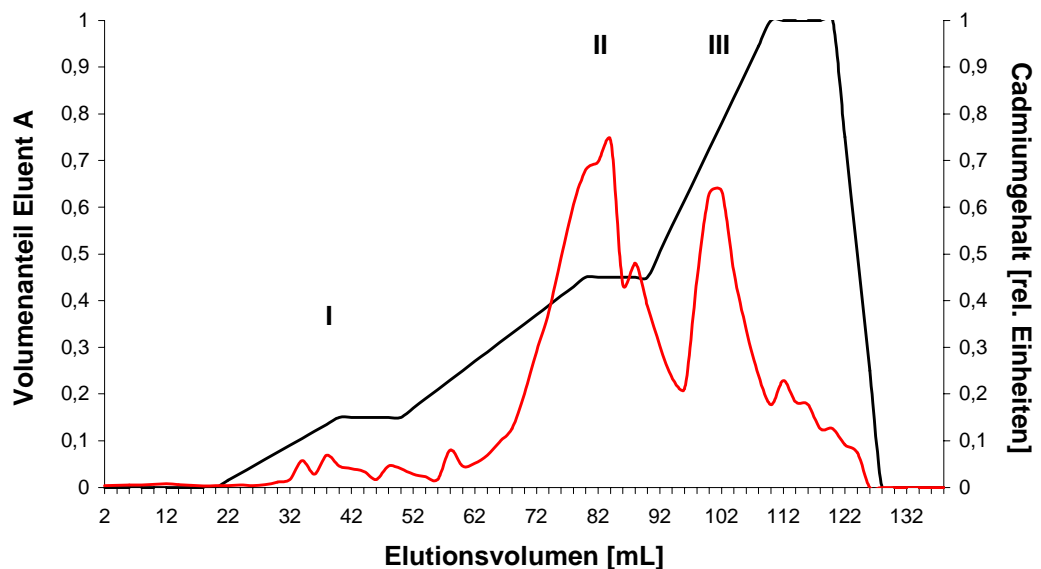
SBK: **Cd (1 Einheit 1 ng/mL)**  
 Laufmittel A: Tris-HCl-Puffer  
 Laufmittel B: Tris-HCl-Puffer + 1 mol/L NaCl





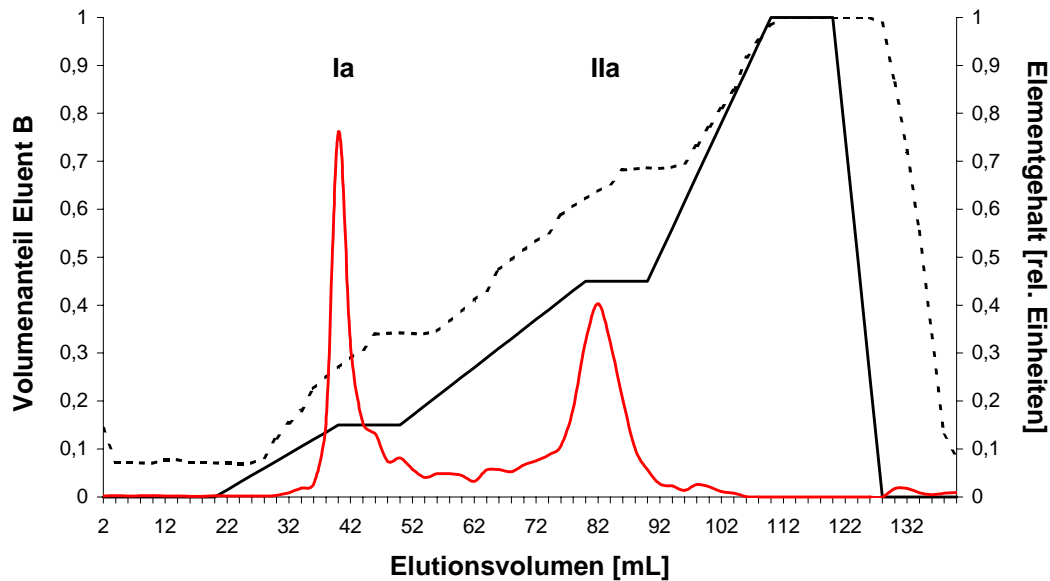
**Abb. A33: Elutionsprofil der Cadmium-bindenden Substanz aus Sonnenblumenwurzeln (Molmasse 25kD) unter reduzierenden Bedingungen bei der IAC**

SBK: **Cd (1 Einheit 20 ng/mL);**  
 Laufmittel A: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L; 10 mmol/L ME);  
 Laufmittel B: 1 mol/L NaCl in Tris-HCl (pH 8,0; 0,05 mol/L; 10 mmol/L ME).



**Abb. A34: Elutionsprofil der Cadmium-bindenden Substanz aus Rapswurzeln (Molmasse 25kD) bei der IAC**

SBK: **Cd (1 Einheit 35 ng/mL);**  
 Laufmittel A: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L);  
 Laufmittel B: 1 mol/L NaCl in Tris-HCl (pH 8,0; 0,05 mol/L).



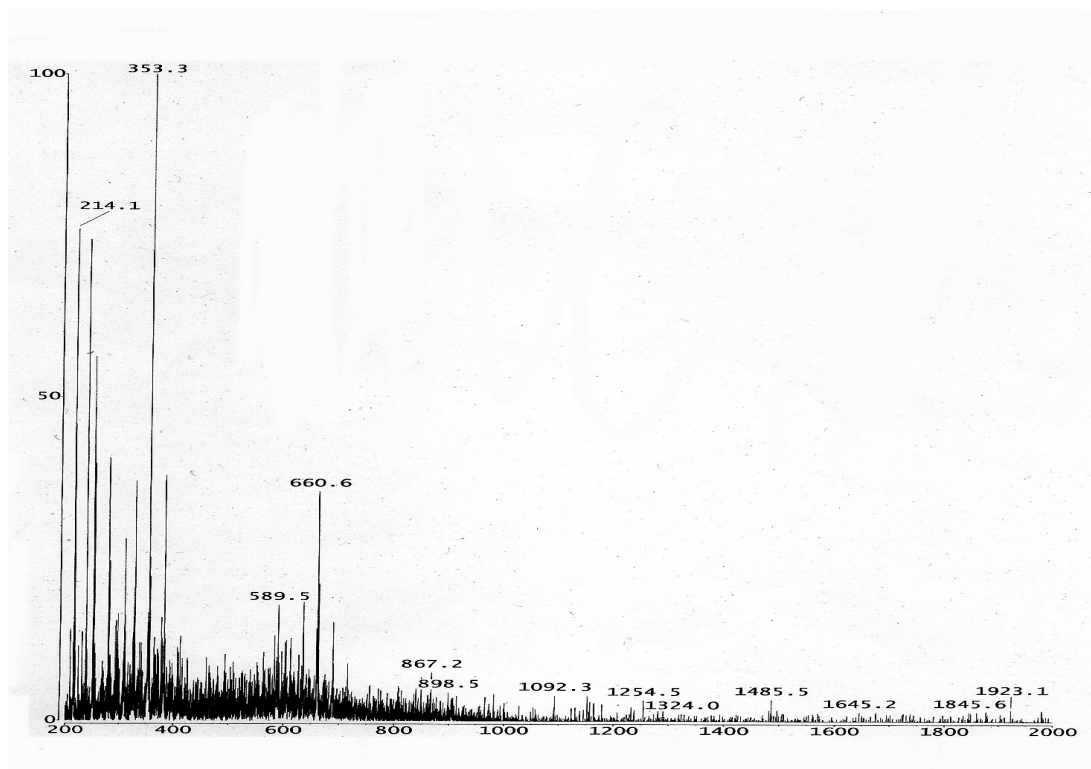
**Abb. A35: Elutionsprofil der Cadmium-bindenden Substanz aus Rapswurzeln (Molmasse 25kD) unter reduzierenden Bedingungen bei der IAC**

SBK: **Cd (1 Einheit 75 ng/mL);**

Laufmittel A: Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 0,05 mol/L; 10 mmol/L ME);

Laufmittel B: 1 mol/L NaCl in Tris-HCl (pH 8,0; 0,05 mol/L; 10 mmol/L ME).

### A 3 Spektren der ESI-MS und der ESI-MSMS



**Abb. A36: Spektrum bei der ESI-MS der aus Rapswurzeln isolierten Cadmiumspezies (Substanz II)**

Probenaufgabe: 5  $\mu$ L/min

Temperatur Transferkapillare: **300 °C**

Spannung ESI-Nadel 5 kV

Sheath-Gas Stickstoff, 25 scale

Kapillarspannung: **13 V**

Tube lens: 5 V