

**Wachstum und physiologisches Verhalten von *Zea mays*  
bei multiplem Streß unter besonderer Berücksichtigung  
des Wurzelsystems**

**Dissertation**

**zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Birgit Degenhardt  
aus  
Königshofen**

**Würzburg 2000**

Eingereicht am: \_\_\_\_\_

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: \_\_\_\_\_

Gutachter: \_\_\_\_\_

Gutachter: \_\_\_\_\_

Tag des Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Streß und Streßfaktoren .....	2
1.2 Unterschied zwischen Hydrokultur und festem Bodensubstrat .....	5
1.3 Reaktionen auf verschiedene Streßbedingungen .....	6
1.4 Aufgabenstellung .....	8
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>9</b>
2.1 Material .....	9
2.1.1 Pflanzenmaterial .....	9
2.1.1.1 Anzucht der Versuchspflanzen .....	9
2.1.2 Kultursubstrate .....	10
2.1.2.1 MHKW-Schlacke .....	10
2.1.2.2 Gewaschene Schlacke .....	10
2.1.2.3 Gartenerde .....	11
2.1.2.4 Nährlösung .....	11
2.2 Methoden .....	12
2.2.1 Untersuchung der Bodensubstrate und ihrer Bodenlösung .....	12
2.2.1.1 Elementanalyse mittels ICP-AES .....	12
2.2.1.2 Röntgenfluoreszenzanalyse .....	14
2.2.1.3 CHN-Analyse .....	14
2.2.1.4 Sequentielles Extraktionsverfahren nach Tessier .....	15
2.2.1.5 Bestimmung der Lagerungsdichte .....	16
2.2.1.6 Mechanischer Widerstand .....	16
2.2.1.7 Unterdruck-Filtration .....	16
2.2.1.8 Anionenchromatographie .....	17
2.2.1.9 Ammoniumbestimmung .....	17
2.2.1.10 pH-Wert-Bestimmung .....	17
2.2.1.11 Bestimmung der Leitfähigkeit .....	18
2.2.1.12 Bestimmung des Keimgehaltes der Bodensubstrate .....	18
2.2.1.13 Sukzessionsbeete .....	18
2.2.2 Mikroskopische Untersuchungen .....	19
2.2.2.1 Fixierung und Herstellung der Schnitte .....	19

---

2.2.2.2 Lichtmikroskopie / Fluoreszenzmikroskopie.....	19
2.2.2.3 Berberin/Thiocyanat-Färbung .....	19
2.2.2.4 Berberin-Toluidinblau-Färbung .....	20
2.2.2.5 Phloroglucin/HCl-Färbung (Weisner-Reaktion) (Weisner, 1878).....	20
2.2.2.6 Sudan III-Färbung .....	21
2.2.3 Gewinnung und Analyse von Zellwandisolaten.....	21
2.2.3.1 Zellwandisolierung .....	21
2.2.3.2 Thioacidolyse .....	22
2.2.3.3 Umesterung .....	22
2.2.3.4 GC/MS .....	23
2.2.3.5 Aminosäureanalyse.....	24
2.2.4 Analytische und physiologische Untersuchungen des Pflanzenmaterials.	24
2.2.4.1 Bestimmung des Frisch- und Trockengewichtes.....	24
2.2.4.2 Bestimmung des Elementgehaltes.....	24
2.2.4.3 Bestimmung der löslichen Aminosäuren .....	25
2.2.4.4 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes.....	25
2.2.4.5 Bestimmung des photosynthetischen Elektronentransports mit Hilfe des PAM-Chlorophyllfluorometers .....	26
2.2.4.6 Gewinnung von Apoplastensaft (Interzelluläre Waschflüssigkeit IWF)	27
2.2.4.7 Bestimmung des Verdünnungsgrades von IWF.....	27
2.2.4.8 Reinheitsprüfung des Apoplastensaftes.....	28
2.2.4.9 Bestimmung des ABA-Gehaltes (ELISA-Test) .....	28
2.2.4.10 Ellman-Test.....	29
2.2.4.11 <sup>31</sup> P-NMR.....	30
2.2.4.12 Peroxidaseaktivität.....	31
2.2.4.13 Proteinbestimmungn mit BCA-Reagenz.....	32
2.2.4.14 ATP-ADP-AMP-Bestimmung (Feuerfliegen-Test) .....	33
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1 Charakterisierung der verwendeten Bodensubstrate .....	35
3.1.1 Chemische Eigenschaften der festen Substrate .....	35
3.1.1.1 Elementare Zusammensetzung .....	35
3.1.1.2 Sequentielles Extraktionsverfahren nach Tessier .....	38
3.1.2 Bodenlösungen .....	39
3.1.3 Bodenphysikalische Parameter.....	43

---

3.1.4	Bodenbiologische Faktoren.....	44
3.2	Allgemeine Charakterisierung der Versuchspflanzen .....	49
3.2.1	Äußeres Erscheinungsbild .....	49
3.2.2	Wachstum .....	52
3.2.2.1	Photosynthese .....	53
3.2.3	Ernährungszustand.....	55
3.2.3.1	Elementgehalte von Blättern und Wurzeln .....	57
3.2.3.2	Anionenkonzentration .....	61
3.2.4	Morphologie und Anatomie des Wurzelsystems .....	62
3.2.4.1	Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.....	63
3.2.4.2	Permeabilitätsstudien.....	67
3.2.5	Chemische Zusammensetzung der Zellwände .....	68
3.2.5.1	Lignin .....	69
3.2.5.2	Suberin.....	73
3.2.5.3	Aminosäuren.....	77
3.2.5.4	Schwermetalle .....	77
3.3	Spezielle physiologische Parameter .....	81
3.3.1	Energiestatus .....	81
3.3.2	Peroxidase .....	82
3.3.2.1	Reinheit des Apoplastensaftes aus Wurzeln.....	82
3.3.2.2	Peroxidaseaktivität.....	83
3.3.3	Abscisinsäure (ABA) .....	86
3.3.4	Gehalt an Sulfhydrylgruppen.....	90
3.3.5	<sup>31</sup> P-NMR .....	91
3.3.6	Lösliche Aminosäuren.....	93
3.3.7	Lösliche Zucker.....	95
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>97</b>
4.1	MHKW-Schlacke als Bodensubstrat .....	98
4.1.1	Hoher Salzgehalt .....	98
4.1.2	Osmotischer Streß .....	98
4.1.3	Nährstoffangebot und Schwermetalle .....	99
4.1.4	Bodenphysikalische und -biologische Eigenschaften.....	101
4.2	Entwicklung und Streßreaktionen von Mais .....	102
4.2.1	Beeinträchtigtetes Wachstum und erhöhtes Wurzel-zu-Sproß-Verhältnis	102

---

4.2.2	Aufnahme von Nährstoffen und Schwermetallen .....	104
4.2.3	Transferkoeffizienten .....	106
4.2.4	Reaktionen auf Salzbelastung .....	109
4.2.5	Osmotische Anpassung .....	110
4.2.6	Peroxidaseaktivität und Sulfhydrylkonzentration.....	111
4.2.7	Energieversorgung.....	113
4.2.8	Wurzelarchitektur .....	113
4.2.9	Veränderte Chemie der Zellwände .....	115
4.2.10	Abscisinsäure.....	116
4.2.11	pH-Regulation.....	120
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>121</b>
<b>6.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>125</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>128</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>131</b>

## 1. Einleitung

Die vorliegende Doktorarbeit leitet sich ursprünglich aus einem Forschungsvorhaben der angewandten Botanik ab, das in der Arbeitsgruppe Gimmler (Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Würzburg) durchgeführt wurde und derzeit im Auftrag des Bayerischen Staatsministeriums für Landesentwicklung und Umweltfragen fortgesetzt wird. In diesem Projekt wurde in „worst case“-Studien die Umweltverträglichkeit von Müllheizkraftwerk (MHKW)- Schlacke untersucht (Fuchs et al., 1997; Gimmler et al., 1998a).

MHKW-Schlacke fällt in größeren Mengen bei der Verbrennung von Haus- und Gewerbemüll an und wird in Deutschland beispielsweise als Baumaterial im Tiefbau verwendet, sofern bestimmte gesetzliche Einschränkungen eingehalten werden (LAGA, 1994). Die Richtlinie nach LAGA (Länderarbeitsgemeinschaft Abfallwirtschaft) unterscheidet verschiedene Einbauklassen bzw. Zuordnungswerte bei der Nutzung von Schlacke, wobei zum einen bautechnische Anforderungen, wie Dichte und Kornverteilung, zugrunde gelegt werden, zum anderen Eigenschaften hinsichtlich auslaugbarer Bestandteile. Die Ausbringung von MHKW-Schlacke ist jedoch politisch umstritten, weil Schlacke einen hohen Gehalt an Schwermetallen aufweist. Im Verlauf der Untersuchungen zur Umweltverträglichkeit der Schlacke ergaben sich immer wieder wissenschaftlich interessante Fragestellungen, die über das eigentliche Projekt mit umweltpolitischem Hintergrund hinausgingen und sich vor allem mit dem Wachstum und physiologischen Verhalten von Pflanzen auf Schlacke befaßten. Schlacke ist für pflanzenphysiologische Untersuchungen ein etwas ungewöhnliches Bodensubstrat, da Schlacke in Bezug auf Streß ein multifaktorielles System darstellt (Alkali-Streß, Schwermetall-Streß, Nährstoffmangel). Solche Systeme erschweren die Kausalanalyse, d.h. die Zuordnung experimentell beobachteter Effekte zu den einzelnen Stressoren. Es zeigte sich aber in dieser Arbeit, daß unter bestimmten Bedingungen auch bei dem System Schlacke zwischen der Wirkung verschiedener Streßfaktoren unterschieden werden kann und Schlacke als Modellsystem für ein extrem alkalisches Bodensubstrat dienen kann. Darüber hinaus repräsentieren multifaktorielle Systeme die Verhältnisse in der Natur besser als die auf einen Faktor reduzierten unifaktoriellen Systeme, wie sie meist im Labor untersucht werden. Letztere sind kausalanalytisch zwar besser zu behandeln, die

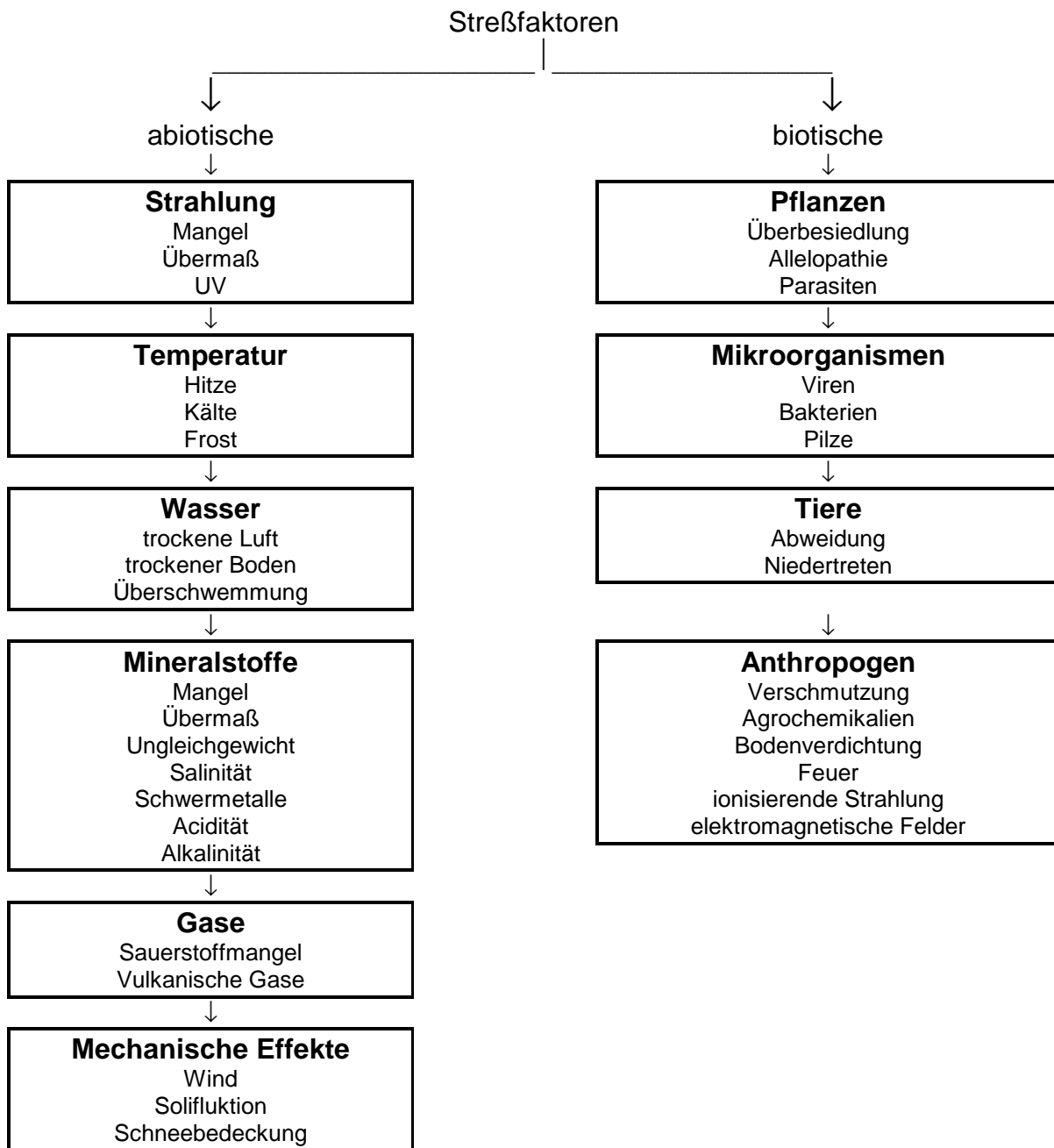
Aussagen sind aber häufig relativ eingeschränkt, z.B. auf die im Labor vorgegebenen artifiziellen Versuchsbedingungen. Ein klassisches Beispiel dafür ist die Untersuchung des anthropogen bedingten Waldsterbens. Laboruntersuchungen führten sehr früh zu der Annahme, daß die durch  $\text{SO}_2$ -Aufnahme verursachte interne Ansäuerung der Primärschaden bei Waldsterben ist. Erst die Untersuchungen von Bodenkundlern und Forstwissenschaftlern machten deutlich, daß das Waldsterben viel komplexere Ursachen hat. Aber auch natürlich vorkommende, scheinbar unifaktorielle Systeme, wie z.B. das Tote Meer mit seinem hohen Salzgehalt, sind in Wirklichkeit ein multifaktorielles System, in dem der Salzstreß gleichzeitig einen hohen osmotischen Streß bewirkt. Zudem bedingt die hohe Dichte des Wasserkörpers eine geringere Löslichkeit von Gasen, was nicht ohne Einfluß auf die Photosynthese bleibt. Der hohe Gehalt an Magnesium im Toten Meer (höher als NaCl) unterdrückt die Zellteilung von in diesem Habitat vorkommenden Einzellern. Deshalb wird im Labor bei der Analyse der Salzresistenz die Magnesiumkonzentration um den Faktor 100 reduziert und der Natriumgehalt heraufgesetzt. Das repräsentiert aber keineswegs die Verhältnisse am natürlichen Standort. Die Komplexität des Systems MHKW-Schlacke ist auch deshalb nicht störend, weil die Kombination der Stressoren Alkalität - Salinität - Nährstoffmangel ebenfalls an natürlichen Standorten (z.B. in Tansania oder Nordindien) vorkommt und dort ein beträchtliches landwirtschaftliches Problem darstellt.

## 1.1 Streß und Streßfaktoren

Pflanzen haben im Laufe der Evolution viele Mechanismen und Strategien entwickelt, um auf Veränderungen in ihrer Umwelt zu reagieren und sich den neuen Lebensbedingungen anzupassen. Dabei müssen sie mit den verschiedensten Umweltfaktoren fertig werden und Streßsituationen bewältigen. Was ist damit gemeint, wenn man von Streß spricht? Wenn eine Pflanze einem Streßfaktor ausgesetzt ist, sind die Lebensbedingungen nicht optimal und der Organismus reagiert mit Veränderungen und Antworten auf allen funktionellen Stufen (Larcher, 1995). Ein Streßfaktor ruft also eine Anpassung, sprich eine Streßantwort hervor. Es wird zwischen biotischen und abiotischen Streßfaktoren unterschieden (Abb. 1-1). Zu



den abiotischen Faktoren gehört eine Vielzahl von klimatischen Gegebenheiten. Biotischer Streß wirkt sich vor allem an dicht besiedelten Standorten und auf Weiden aus. Zusätzlich zu diesen biotischen Faktoren hat die Tätigkeit des Menschen dazu beigetragen, daß sich die natürlichen Umweltbedingungen verschlechtert haben. Durch die industrielle Tätigkeit kam es zu einer Verdichtung des Bodens und zu einer Akkumulation von Schwermetallen und anderen toxischen Verbindungen, sowohl in den Böden als auch in der Luft. Die Pflanze hat zwei Möglichkeiten, mit solchen Streßfaktoren umzugehen. Sie kann sie entweder tolerieren (Streßtoleranz) oder muß versuchen, sie zu umgehen (Streßvermeidung). Zu den möglichen Mechanismen der Toleranz gehören streßtolerante Enzyme, veränderte Membranpermeabilität, aktiver Efflux der toxischen Substanzen, Kompartimentierung oder Komplexierung. Die Stoffwechselaktivitäten werden so trotz eventueller Schadstoff-Akkumulation aufrechterhalten. Eine andere Strategie mit Streßsituationen umzugehen ist die Streßvermeidung. Unter Vermeidung versteht man, daß Ausschlußmechanismen existieren, die verhindern, daß der Stressor in dem lebenden Teil der Pflanze, dem Protoplasten, wirksam wird.



**Abb. 1-1** Streßfaktoren in der Umwelt, abiotischen und biotischen Ursprungs, nach Levitt (1980); Kreeb et al. (1989).

## 1.2 Unterschied zwischen Hydrokultur und festem Bodensubstrat

Bei der Analyse der Reaktionen von Wurzeln auf Streß spielt die Art der Kultur eine große Rolle. Die Anzucht in Hydrokultur ermöglicht durch Zusatz von Salzen oder Schwermetallen die Erzeugung künstlicher Streßsituationen. Der Vorteil von Hydrokulturen ist, daß die Nährlösung eine definierte Zusammensetzung hat, und die Untersuchung der Wurzel ohne weitere Reinigungsschritte möglich ist.

Im Fall einer Kultur in festem Bodensubstrat sind die experimentellen Bedingungen schwieriger zu kontrollieren und die direkte Wurzelbeobachtung ist behindert. Dennoch sind die Ergebnisse, die durch eine solche Kultur erhalten werden, besser mit natürlichen Bedingungen vergleichbar. In natürlichen Bodensubstraten sind die Wurzeln nicht nur einem einzigen Bodenbestandteil oder chemischen Element ausgesetzt, sondern es existiert eine Vielzahl von Interaktionen. Ein Boden ist ein heterogenes Mehrphasensystem, in dem feste, flüssige und gasförmige Bereiche vorkommen (Scheffer und Schachtschabel, 1992). Zudem spielt die Lösungschemie sowie Adsorptions- und Desorptionsprozesse bei der Nährstoffdynamik eine wichtige Rolle. Die Nährelemente liegen nicht vollständig als gelöste Salze vor wie in einer Hydrokultur-Nährlösung, sondern die Verfügbarkeit ist durch Festlegung in der Bodenstruktur eingeschränkt. Pflanzen erhalten ihre Nährstoffe aus der Bodenlösung, nur dieser geringe Teil an gelösten Stoffen ist für die Aufnahme durch die Wurzeln direkt verfügbar.

Aufbauend auf Experimenten einer Staatsexamensarbeit (Fuchs, 1995) und einem Forschungsprojekt der Arbeitsgruppe Gimmler wurde MHKW-Schlacke als ein interessantes Bodensubstrat für die Streßphysiologie entdeckt. MHKW-Schlacke wird entsprechend den Richtlinien der Länderarbeitsgemeinschaft Abfallwirtschaft (LAGA, 1994) als Versatz- und Baumaterial für Straßendämme und Tragschichten verwendet. Dieses Substrat anthropogenen Ursprungs kann als Modellsubstrat für diverse pflanzenphysiologische Untersuchungen dienen. Da MHKW-Schlacke wegen des Verbrennungsprozesses (800 - 1000 °C) frei von Mikroben und fast frei von organischen Substanzen ist (Gimmler et al., 1998b), ist sie ein geeignetes Substrat, um Prozesse zu untersuchen, bei denen Interaktionen zwischen Wurzeln und der Mikroflora ausgeschlossen werden sollen oder die Anwesenheit von organischer Substanz störend wirkt. Auch für die Quantifizierung von organischen Exsudaten

durch die Wurzel ist dieses Bodensubstrat gut geeignet, da der Background an organischen Substanzen niedrig ist, und die ausgeschiedenen Substanzen nicht durch Mikroben abgebaut werden können. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ist vor allem wichtig, daß MHKW-Schlacke ein geeignetes Modell für ein alkalisches Bodensubstrat darstellt. Die Schlacke-Bodenlösung weist einen höheren pH-Wert auf, als er bei den meisten natürlichen alkalischen Substraten beobachtet werden kann (Fuchs et al., 1997; Gimmler et al., 1998a; Track et al., 1998). Dadurch können die Effekte, hervorgerufen durch einen alkalischen pH-Wert, besser erarbeitet werden. Alkalische Böden von extremen Standorten sind oft auch sehr salzhaltig, vor allem sehr reich an NaCl. Das trifft auch auf MHKW-Schlacke zu. Die Alkalisalze sind aber leicht löslich und können so schnell ausgewaschen werden. Durch eine entsprechende Vorbehandlung der Schlacke kann also die Salzfracht entfernt werden, der alkalische pH-Wert bleibt dagegen bestehen. Dadurch kann zwischen diesen beiden Faktoren differenziert werden. Ein festes Bodensubstrat stellt zudem andere mechanische Voraussetzungen an die Wurzeln als eine Flüssigkeit. Beim Wachstum sind größere Kraftaufwendungen für das Ein- und Vordringen im Boden notwendig, was sich auf die Wurzelarchitektur auswirken kann.

### **1.3 Reaktionen auf verschiedene Streßbedingungen**

Da die Wurzel das Pflanzenorgan ist, das in direktem Kontakt mit dem Bodensubstrat steht und so vorhandenen Schadfaktoren unmittelbar ausgesetzt ist, wurden in dieser Arbeit hauptsächlich die Wurzeln für die Untersuchungen herangezogen. Um festzustellen, ob die Versuchspflanzen unter Streß leiden, müssen Kriterien gefunden werden, anhand derer das Ausmaß der Streßsituation oder der Schädigung festgemacht werden kann. Diese Frage kann aber nur beantwortet werden, wenn man den Normalzustand kennt. Es muß daher ein Bezugssystem bestehen, dessen Zustand und Versorgung als optimal gilt. In dieser Arbeit wurde Gartenerde als Kontrollsubstrat verwendet. Gartenerde enthält genügend Nährstoffe für die Versorgung der Versuchspflanzen und ist relativ arm an Schadstoffen. Die Reaktionen von Maiswurzeln bei Kultur auf Schlacke wurden mit denen auf Gartenerde verglichen und eingeordnet. Dabei wurde zunächst der

Ernährungszustand der Versuchspflanzen untersucht. Die Versorgung mit Nährelementen ist ein wichtiger Umweltfaktor für die normale Entwicklung und das Funktionieren aller Stoffwechselprozesse. Die Versorgung der Pflanze mit anorganischen Nährstoffen ist eine der Hauptaufgaben der Wurzel. Dabei steht die Pflanze im Konflikt zwischen Nährstoffaufnahme und Schadstoffvermeidung. Einige Schwermetalle, wie z.B. Kupfer, Molybdän oder Zink, zählen zu den Spurenelementen und sind in geringer Konzentration essentiell für die Pflanze, z.B. als Bestandteil von Enzymen oder zur Enzymaktivierung. In höherer Konzentration wirken sie dagegen toxisch. Anpassungen, die die Wurzel unter Streßbedingungen durchläuft, können anatomisch / morphologischer oder physiologischer Art sein. In einer Vielzahl von Studien wurden die Veränderungen der Wurzelarchitektur als Folge verschiedenster Streßbedingungen untersucht (Neumann et al., 1994; Shannon et al., 1994; Tsegaye und Mullins, 1994; Plaut et al., 1997). Man weiß, daß Pflanzen auf Salzstreß beispielsweise mit einer Reduzierung im Wurzelwachstum reagieren. Ebenso kann eine hohe Metallkonzentration im Boden die Wurzelentwicklung negativ beeinflussen. Außer Veränderungen in der Wurzelmorphologie können Änderungen in der Feinstruktur der Wurzel beobachtet werden. Shannon et al. (1994) konnten zeigen, daß durch Salzbelastung die Suberinisierung der Hypodermis und Endodermis gefördert werden und der Casparysche Streifen näher an der Wurzelspitze ausgebildet wird als in nicht salzbelasteten Wurzeln. In Wurzeln von Baumwoll-Pflanzen kann durch Salzstreß die Bildung einer Exodermis induziert werden (Reinhardt und Rost, 1995).

Auf physiologischer Ebene gibt es mehrere Hinweise für den Zustand der Pflanze. So können Veränderungen in der Enzymaktivität als erstes Indiz für Schadeinwirkungen herangezogen werden. Als unspezifische Antwort auf eine Vielzahl von Streßfaktoren dient beispielsweise die Bestimmung der Peroxidaseaktivität (Castillo, 1986, 1992; Van Assche und Clijsters, 1990). Diese ist unter Streßeinwirkung erhöht. In dieser Arbeit wurde daher die Peroxidaseaktivität in verschiedenen Wurzelkompartimenten untersucht.

Einen weiteren Anhaltspunkt für Streß erhält man durch Bestimmung der Abscisinsäure (ABA)- Konzentration. ABA spielt eine signifikante Rolle als Streßhormon (Hartung und Turner, 1997), sowohl in höheren als auch in niederen Pflanzen. Die ABA-Synthese ist unter verschiedenen Streßbedingungen erhöht. Dabei spielen die Wurzeln eine nicht unerhebliche Rolle. ABA ist zudem ein

Streßsignal von der Wurzel zum Sproß (Davies und Zhang, 1991; Bano et al., 1993). Eine erhöhte ABA-Produktion konnte unter hohen Salzkonzentrationen (Hartung und Davies, 1993; Jeschke et al., 1997) beobachtet werden, unter Nährstoffmangel (Chapin, 1990; Jeschke, 1997) oder wenn hohe Bodenimpedanz (Mulholland et al., 1996; Tardieu et al., 1991) vorliegt.

Ein Kriterium für Schwermetallstreß kann der Nachweis sogenannter Phytochelatine sein. Manche Pflanzenarten reagieren auf hohe Schwermetall-Konzentrationen mit der Bildung niedermolekularer, reich an Sulfhydrylgruppen-haltiger Proteine (Grill et al., 1985; Rauser, 1990). Die SH- haltigen Gruppen haben eine hohe Affinität zu kationischen Schwermetall-Ionen und können diese komplexieren. Dadurch wird die Schädigung erheblich vermindert.

## **1.4 Aufgabenstellung**

In der vorliegenden Arbeit sollten im Zusammenhang mit der Ausbringung von MHKW-Schlacke im Freiland als Bauversatzmaterial wissenschaftliche Grundlagen über die Umweltverträglichkeit der Schlacke, insbesondere die Reaktionen und das physiologische Verhalten von Pflanzen bei Wachstum auf Schlacke untersucht und erarbeitet werden. Die Verwendung fester Bodensubstrate als Kulturmedien (MHKW-Schlacke als anthropogen belastetes Bodensubstrat und Gartenerde als Kontrollsubstrat) erforderte zunächst ihre Charakterisierung in chemischer und bodenphysikalischer Hinsicht. Eine Aufgabe dabei war, die Streßfaktoren, die von MHKW-Schlacke ausgehen, herauszuarbeiten. Weiterhin mußten Kriterien gefunden werden, anhand derer die Phytotoxizität von Schlacke für die Versuchspflanzen sichtbar gemacht werden konnte.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pflanzenmaterial

Für die Versuche wurden *Zea mays* (L. cv. Garant FAO 240, Asgrow GmbH, Bruchsal) und *Vicia faba* (Dreifache Weiße, Fa. Sperling & Co, Lüneburg) verwendet.

##### 2.1.1.1 Anzucht der Versuchspflanzen

Maiskaryopsen bzw. Samen von *Vicia faba* wurden über Nacht in Wasser, belüftet mit Preßluft, vorgequollen. Die Anzucht erfolgte im Gewächshaus entweder in Fünfergruppe in Tonschalen (Durchmesser 17 cm) oder einzeln in Tontöpfen (Durchmesser 9 cm). Die Pflanzen wurden bis zu einem Alter von 20 - 25 Tagen kultiviert. In den Gewächshaus-Zellen herrschten folgende Bedingungen:

	Temperatur [°C]		rel. Luftfeuchte [%]	Tag / Nacht-Rhythmus [h]
	Tag	Nacht		
<i>Zea mays</i>	20	16	70	16 / 8
<i>Vicia faba</i>	16	6	keine Steuerung	10 / 14

**Tab.2-1** Anzuchtbedingungen.

Die Pflanzen wurden täglich mit Leitungswasser gegossen.

## **2.1.2 Kultursubstrate**

### **2.1.2.1 MHKW-Schlacke**

Probennahme: Für die Versuche dieser Arbeit wurde Schlacke aus dem Müllheizkraftwerk (MHKW) Würzburg verwendet, die in der Schlackeaufbereitungsanlage (CC Reststoff-Aufbereitungs GmbH, Würzburg) nachbehandelt und mindestens drei Monate auf der Reststoffdeponie Hopferstadt gelagert wurde. Mehrere Zentner dieser Schlacke wurden in Säcke gefüllt und in das Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften gebracht. Das Material stammt von der Oberfläche der Deponie (maximale Grabtiefe 50 cm). Alle Analysen dieser Arbeit beziehen sich auf diese spezielle Schlacke-Charge. Vor der Verwendung wurden grobe Bestandteile (> 2 cm) aus der Schlacke entfernt.

Lagerung: Bei der Lagerung auf dem Institutsgelände wurde durch Folien sichergestellt, daß die Schlacke weder durch Bodenwasser noch durch Niederschläge feucht wurde. Kleinere Probenmengen wurden in Glasgefäßen im Labor für analytische Zwecke gelagert.

### **2.1.2.2 Gewaschene Schlacke**

Um zwischen alkalischem Streß und Salzstreß unterscheiden zu können, wurde die Salzfracht der Schlacke durch Waschen mit dem dreifachen Volumen an Wasser entfernt. Hierzu wurde ein definiertes Volumen Schlacke in einen Erlenmeyerkolben gefüllt, das gleiche Volumen an Wasser hinzugefügt und die Mischung 1h geschüttelt. Nach dem Absetzen der Schlacke wurde das Wasser entfernt und die Schlacke mit frischem Wasser resuspendiert. Diese Prozedur wurde insgesamt dreimal wiederholt. Der Überstand wurde verworfen, die Schlacke bei 105°C getrocknet und bis zur weiteren Verwendung gelagert.



### 2.1.2.3 Gartenerde

Als Vergleichssubstrat für die meisten Experimente wurde Gartenerde benutzt. Dabei handelt es sich um hauseigene Einheitserde, die aus Komposterde, Torf und Sand im Volumenverhältnis 4 : 2 : 1 besteht. Die Komposterde wurde vor der Verwendung in Mieten dampferhitzt (20 Min, 90°C), um Unkrautsamen und Schleimpilze abzutöten.

### 2.1.2.4 Nährlösung

Für ein Experiment wurde Nährlösung als Kulturmedium verwendet. Sie war nach Pirson und Seidel folgendermaßen zusammengesetzt:

<b>Makronährelemente</b>	Konzentration	Einwaage für Stocklösung 10x [g / l]
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.5 mM	2.0
$\text{KNO}_3$	2 mM	2.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1 mM	1.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1 mM	2.5
<b>Mikronährelemente</b>		Einwaage für Stocklösung 1000x [g / l]
FeNaEDTA	18 $\mu\text{M}$	6.6
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1.5 $\mu\text{M}$	0.3
$\text{H}_3\text{BO}_3$	8 $\mu\text{M}$	0.5

Von den Makronährelementen wurde eine 10-fach konzentrierte Stocklösung hergestellt, von den Mikronährelementen eine 1000-fach konzentrierte Stocklösung.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Untersuchung der Bodensubstrate und ihrer Bodenlösung

#### 2.2.1.1 Elementanalyse mittels ICP-AES

Die Atomemissionsspektrometrie (AES) mit einem induktiv gekoppelten Plasma (ICP) als Anregungsquelle ist für die Bestimmung aller Elemente mit Ausnahme von Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff, den Edelgasen und den Halogenen (Jod kann gemessen werden) geeignet. Bei diesem Verfahren wird die wäßrige Probenlösung fein zerstäubt und mittels eines Trägergases (Argon) als Aerosol in ein induktiv gekoppeltes Plasma transportiert. Das ICP ist ein durch induktives Erhitzen in der Spule eines Hochfrequenzgenerators erzeugtes ionisiertes Gas (=Plasmagas). Hier wird meistens Argon verwendet, da es relativ leicht zu ionisieren ist. In diesem Plasmagas wird die Probe zunächst verdampft, die Moleküle in Atome gespalten und diese zur Strahlung angeregt. Aufgrund der hohen Plasmatemperatur (ca. 8000°C) treten neben Atomlinien auch Ionenlinien auf, was zu einem linienreichen Spektrum führt. Die Emissionslinien werden in einem Spektrometer spektral zerlegt und die Intensitäten mit einem Photomultiplier gemessen. Die so gemessenen Intensitäten können mit den in der Kalibrierung ermittelten Koeffizienten in Konzentrationen umgerechnet werden. Die Kalibrierung erfolgte mit ICP-Standardreferenzlösungen der Firmen Alfa-Products und Spex.

Vor der Messung wurde das feste Probenmaterial (Pflanzenmaterial, Bodensubstrate) nach entsprechender Vorbehandlung (Trocknen, Mahlen) einer HNO<sub>3</sub>-Naßveraschung unterzogen. Hierzu wurden ca. 100 mg Probenmaterial mit 1 ml suprareiner Salpetersäure (65%) in Quarzreagenzgläsern, die in Teflonbehälter eingepaßt sind, bei 170°C für 10h aufgeschlossen (Schramel et al., 1980). Die so erhaltenen Probenlösungen wurden anschließend mit einem Jobin Yvon ICP-Spektrometer (Fa. ISA GmbH, Grasbrunn) vermessen, wobei die Elemente entweder gleichzeitig (simultan) oder nacheinander (sequentiell) bestimmt wurden (Tab. 2-2).

Nachweisgrenze bedeutet, daß erst ab dieser Konzentration ein Signal erkannt wird. Die untere Bestimmungsgrenze beträgt aber das Dreifache der Nachweisgrenze. Bei dieser Konzentration darf die relative Standardabweichung noch 33% betragen, d.h.

erst ab dieser Größenordnung ist eine signifikante Aussage über ein Ergebnis zu machen.

Die Bodenlösungen (Saugkerzen) wurden ebenso mit der ICP-Methode auf Schwermetalle untersucht. Da es sich hier bereits um flüssige Proben handelte, entfiel der Aufschluß mit Salpetersäure.

Element	Wellenlänge [nm]	Nachweisgrenze [ $\mu\text{g/l}$ ]	Art der Messung
Schwefel	181.98	50	simultan
Molybdän	202.00	5	sequentiell
Bor	208.96	2	simultan
Zink	213.86	2	simultan
Phosphor	214.91	30	simultan
Blei	220.35	10	sequentiell
Cadmium	228.80	1	sequentiell
Nickel	231.60	2	sequentiell
Mangan	257.61	0.4	simultan
Eisen	259.94	2	simultan
Chrom	267.72	1	sequentiell
Magnesium	279.08	10	simultan
Calcium	317.93	5	simultan
Kupfer	327.39	1	sequentiell
Aluminium	396.15	7	simultan
Natrium	589.59	5	simultan
Kalium	766.49	20	simultan

**Tab. 2-2** Wellenlänge, Nachweisgrenze und Art der Messung der einzelnen Elemente.

### 2.2.1.2 Röntgenfluoreszenzanalyse

In einigen Fällen wurde als Ergänzung zur ICP-Methode eine Röntgenfluoreszenzanalyse (RFA) durchgeführt.

*Prinzip:* Infolge des Entfernens von Elektronen aus inneren Elektronenschalen und der Wiederbesetzung der Leerplätze durch Elektronen aus weiter außen liegenden Schalen, tritt eine für das jeweilige Atom charakteristische Fluoreszenzstrahlung auf (Schwedt, 1992).

Die zu untersuchende Probe wird dabei mit der polychromatischen Strahlung einer Röntgenröhre zur Aussendung der Fluoreszenzstrahlung angeregt. Ist die Energie der anregenden Strahlung größer als die Bindungsenergie eines Elektrons in einer bestimmten Schale, so verläßt das Elektron bei einer Energieübertragung die Elektronenhülle. Zur quantitativen Analyse wird neben der Wellenlänge auch die Intensität der emittierten Strahlung gemessen, denn diese ist dem Gehalt des betreffenden Elementes in der Probe proportional. Die Aufbereitung der Probe erfolgt mittels Borat-Aufschluß, bei dem das Probenmaterial in eine glasartige Matrix eingebettet wird.

Da eine RFA-Apparatur im Institut nicht zur Verfügung stand, erfolgte die Durchführung der Analysen per Auftrag durch das Institut Fresenius, Tauberstein.

### 2.2.1.3 CHN-Analyse

Die Bestimmung der Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffgehalte erfolgte mit einem CHN-Analyser (CHN-O-Rapid, Fa. Heraeus) durch quantitativen Aufschluß mittels oxidativer Verbrennung (Lang, 1994). Für diesen Aufschluß wird die zu analysierende Probe (getrocknetes, pulverisiertes Pflanzen- bzw. Bodenmaterial) in Zinnschiffchen eingewogen und das verschlossene Schiffchen durch einen automatischen Probengeber in das Verbrennungsrohr aus Quarzglas geworfen. Dort verbrennt die Probe in reinem Sauerstoffstrom bei einer Temperatur von 950 bis 1050°C explosionsartig. Als Oxidationskatalysator dient Kupferoxid. Dabei entstehen die Oxidationsprodukte Wasser, Kohlendioxid und verschiedene Stickoxide, sowie molekularer Stickstoff. Die Stickoxide werden an einem Kupferkontakt bei einer Temperatur von ca. 550°C quantitativ zu Stickstoff reduziert. Die Detektion und Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgt über Messung der Wärmeleitfähigkeit.

Als Träger- und Spülgas dient hoch reines Helium. Vor Eintritt in die Meßkammer werden Wasser und Kohlendioxid an geeignete Silikagelsäulen adsorbiert, so daß Stickstoff als erste Komponente in die Wärmeleitfähigkeitsmeßzelle eintritt. Die Desorption von Kohlendioxid und Wasser erfolgt durch Erhitzen der beladenen Säulen. Durch Integration der Peakflächen wird das Ergebnis in prozentuale bzw. absolute Elementgehalte umgerechnet.

#### 2.2.1.4 Sequentielles Extraktionsverfahren nach Tessier

MHKW-Schlacke wurde mit verschiedenen Extraktionslösungen gemäß dem sequentiellen Extraktionsverfahren nach Tessier et al. (1979) behandelt. Dadurch können die Bindungsformen von Schwermetallen im Bodensubstrat ermittelt werden. Schlacke wurde bei 105°C getrocknet, homogenisiert und anschließend mit den folgenden Extraktionsprozeduren in fünf Fraktionen unterteilt:

	Fraktion	Extraktionslösung
1	austauschbare Kationen	1 M MgCl <sub>2</sub> pH 7.0
2	gebunden an Carbonate	1 M NaOAc pH 5.0
3	gebunden an Fe- und Mn-Oxide	0.04 M NH <sub>2</sub> OH · HCl in 25% (v/v) HOAc
4	organisch gebunden	0.02 M HNO <sub>3</sub> / 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pH 2.0; 3.2 M NH <sub>4</sub> OAc in 20% (v/v) HNO <sub>3</sub>
5	Residualfraktion	HNO <sub>3</sub> 65%

**Tab. 2-3** Fraktionen und Extraktionsbedingungen.

Für *Fraktion 1* wurde jeweils 1 g Schlacke in Zentrifugengläser eingewogen, mit 8 ml Extraktionslösung versetzt und 1h bei Raumtemperatur geschüttelt. Zum Abtrennen von Feststoffanteilen wurden die Proben im Anschluß zentrifugiert (25000 g, 30 Min.) bzw. membranfiltriert (0.45 µm). Der Überstand entspricht den austauschbaren Kationen.

*Fraktion 2:* Das Pellet von Fraktion 1 wurde mit 5 ml H<sub>2</sub>O dest. aufgeschüttelt, 20 Min. bei 25000 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde mit 8 ml 1M NaOAc pH 5.0 (eingestellt mit Essigsäure) versetzt, 2h bei Raumtemperatur geschüttelt und abzentrifugiert.

*Fraktion 3:* Das Pellet von Fraktion 2 wurde mit 20 ml Extraktionslösung 3 versetzt und 2-5 h bis zur vollständigen Extraktion bei 96°C mit gelegentlichem Schütteln erhitzt, dann zentrifugiert.

*Fraktion 4:* Zu dem Rückstand von 3 wurden 3 ml 0.02 M HNO<sub>3</sub> und 5 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mit HNO<sub>3</sub> auf pH 2.0 eingestellt) zugegeben, das Reaktionsgemisch auf 85°C erhitzt und gelegentlich geschüttelt. Nach 2h wurden erneut 3 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben und das Gemisch weitere 3h bei 85°C gehalten. Nach dem Abkühlen wurden 5 ml 3.2 M NH<sub>4</sub>OAc in 20% (v/v) HNO<sub>3</sub> zugefügt, auf 20 ml verdünnt und 30 Min. geschüttelt, anschließend Zentrifugation.

*Fraktion 5:* Zur Bestimmung des Metallgehaltes der Restfraktion wurde der Rückstand mit 65% HNO<sub>3</sub> versetzt und der Druckveraschung (siehe 2.2.1.1) unterzogen.

Die Schwermetallgehalte der Lösungen und der Restfraktion wurden mittels ICP-AES ermittelt (vgl. 2.2.1.1).

### **2.2.1.5 Bestimmung der Lagerungsdichte**

Unter Lagerungsdichte versteht man die Masse an getrocknetem Boden pro Volumen. In einem kalibrierten Glaszylinder wurde nach lockerer Schüttung das Volumen von Schlacke und Gartenerde gemessen. Anschließend wurde von diesen Proben mit definiertem Volumen das Gewicht bestimmt. Aus diesen Daten wurde die sogenannte Lagerungsdichte oder scheinbare Dichte  $\rho_a$  errechnet (Gisi, 1990).

### **2.2.1.6 Mechanischer Widerstand**

Der mechanische Widerstand (Anzeige in kg Druck pro cm<sup>2</sup>) der Bodensubstrate wurde mit Hilfe eines Handpenetrometers (Ele, England) bestimmt.

Er ist ein Maß für den Kraftaufwand, den eine Wurzel zum Eindringen in das Bodensubstrat aufbringen muß.

### **2.2.1.7 Unterdruck-Filtration**

Zur Gewinnung von Bodenlösungen wurden Saugkerzen (Keramik-Saugkerzen, Fa. Oekos, Göttingen), die mit einem dünnen Plastikschlauch (innerer Durchmesser 0.5 cm) verbunden waren, in die zuvor gut gewässerten Bodensubstrate gesteckt.

Der Plastikschauch führte in eine Sammelfalle aus Glas, an die mittels einer Membranpumpe (KNF Neuberger Laboport, Freiburg) ein Vakuum ( $\leq 8$  mbar) angelegt wurde.

#### **2.2.1.8 Anionenchromatographie**

Lösliche Anionen wie Chlorid, Nitrat, Sulfat und Phosphat wurden durch isokratische Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit Hilfe eines Anionenchromatographen (Ionenchromatograph IC 1000 mit Sample Injector BT 7041, Fa. Biotronic), gekoppelt mit einem Chromatopac Integrator C-R1BJ, Fa. Shimadzu, analysiert (Lang, 1994). Das Nachweisprinzip für die durch HPLC- getrennten Anionen beruht auf Leitfähigkeitsmessung. Die Standardisierung erfolgte nach jeweils sechs Meßproben mit einer Mischung der Anionen in Form ihrer Kaliumsalze mit einer Konzentration von 0.1 mM. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei etwa 1  $\mu$ M.

#### **2.2.1.9 Ammoniumbestimmung**

Die Ammoniumgehalte wurden an einem Ammonium-Analysator (GAT-WESCAN) im Durchflußverfahren bestimmt.

*Prinzip:* Zunächst werden alle Proben mit einer Lösung aus 2.5% KOH und 1% EDTA auf einen pH-Wert zwischen 11 und 12 eingestellt, so daß alle Ammoniumionen als Ammoniak vorliegen. Diese Probenlösung wird kontinuierlich an einer nur für Gase durchlässigen Membran vorbei geführt. Jenseits der Membran wird im Gegenstromverfahren Säure (0.5% Borsäure, 0.1 mM  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) entlang gepumpt. Der Ammoniak diffundiert durch die Membran in die Säure und wird dort zu Ammonium protoniert. Die Leitfähigkeit der Säure wird vor und nach dem Vorbeifluß an der Membran in einer Meßzelle bestimmt und die Leitfähigkeitsänderung in ein Schreibersignal umgewandelt. Der Meßbereich der Methode liegt zwischen 0 und 100  $\mu$ M. Die Kalibrierung erfolgte mit Verdünnungen einer 1 mM Ammoniumchlorid-Stammlösung.

#### **2.2.1.10 pH-Wert-Bestimmung**

Die pH-Werte wurden mit einer Glaselektrode (Einstabmeßkette), die mit einem pH-Meter (WTW, Typ 530) verbunden war, bestimmt.

### 2.2.1.11 Bestimmung der Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeit wurde mit einem Mikroprozessor-Konduktometer (Typ LF323, WTW Weilheim) bestimmt. Das Gerät wurde vor der Messung mit einem Kontrollstandard für Leitfähigkeitsmeßzellen kalibriert (0.01 mol / l KCl, DIN 38404 ISO 788, WTW, Weilheim).

### 2.2.1.12 Bestimmung des Keimgehaltes der Bodensubstrate

5 g Bodensubstrat wurden mit 25 ml sterilem Wasser 1h geschüttelt. Nach Sedimentation wurden 10-100 µl des Überstandes unter sterilen Bedingungen auf 1.5%igen Hefeagar (Bacto-Agar, Fa. DIFCO) gegeben und bei 30°C bebrütet. Nach 24h wurden die Kolonien per Auge ausgezählt.

Die gemessenen Keimzahlen reflektieren nicht die absolute Zahl der Keime pro Gramm Bodensubstrat, sondern nur die Zahl an Keimen, die bei der verwendeten Extraktions- bzw. Suspensionsmethode aus einem Gramm Bodensubstrat herausgeholt werden kann.

Für 100 ml Hefeagar:	0.5 g Bacto-Pepton
(ergibt 4-5 Agarplatten)	1.0 g Glucose
	0.3 g Yeast-Extrakt
	0.3 g Malzextrakt

### 2.2.1.13 Sukzessionsbeete

In einem Langzeitexperiment sollte die Wiederbelegung des Bodensubstrates Schlacke mit Bodenmikroben und höheren Pflanzen untersucht werden. Hierzu wurden zwei Betonbecken (1.40 m Länge x 1.40 m Breite x 0.75 m Tiefe) auf brach liegendem Feld im Botanischen Garten aufgestellt. Die Becken wurden zunächst mit einer 30 cm tiefen Sandschicht beschickt und dann mit 30 cm Gartenerde bzw. MHKW-Schlacke aufgefüllt. Die Beete wurden weder bewässert noch gedüngt oder auf eine andere Weise beeinflusst. Versuchsbeginn: Juli 1996.



## **2.2.2 Mikroskopische Untersuchungen**

### **2.2.2.1 Fixierung und Herstellung der Schnitte**

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden ca. 5 mm lange Wurzelstücke in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.4) mit 3.7% Formalin (v/v) vakuumfiltriert und für 24 - 48h fixiert. Zum Herstellen von 20 µm dünnen Schnitten wurden die Wurzelsegmente auf einem Objektisch in Einbettmedium (Microm Laborgeräte, Walldorf) aufgenommen und in ein Kryomikrotom mit Gefriervorrichtung (Cryostat H 500 M, Microm) eingespannt. Die so erhaltenen Schnitte wurden auf einen Objektträger überführt und in einem Tropfen Glycerin / Wasser-Gemisch (1:1, v/v) mit Deckglas versehen.

### **2.2.2.2 Lichtmikroskopie / Fluoreszenzmikroskopie**

Die Schnitte wurden mittels eines Axioplan-Fluoreszenzmikroskops (Zeiss, Oberkochen) mit Durchlicht oder fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Als Anregungsquelle für die Fluoreszenzmikroskopie diente eine Quecksilberdampflampe (HBO 50W, Osram), aus deren Linienspektrum durch verschiedene Filtersätze (Zeiss) einzelne Wellenlängen zur Verfügung standen. Ein Bildaufzeichnungssystem (Seescan, Infas, Göttingen) ermöglichte die Visualisierung und digitale Speicherung mikroskopischer Bilder.

### **2.2.2.3 Berberin/Thiocyanat-Färbung**

Um die Permeabilitätseigenschaften von „Phi-Verdickungen“ zu untersuchen, wurde die Berberin/Thiocyanat-Färbung angewendet (Enstone und Peterson, 1992). Berberin, ein apoplastischer Farbstoff, bildet mit Kaliumthiocyanat fluoreszierende Kristalle. Das Eindringen des Fluoreszenzfarbstoffes wurde unter Blaulicht (460 nm) mit einem axioplanen Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) verfolgt.

Das Wurzelmaterial wurde vorsichtig von anhaftendem Bodensubstrat befreit und mehrmals mit Wasser gewaschen. Es war streng darauf zu achten, die Wurzeloberfläche nicht zu verletzen, um einen Leckeinstrom des Farbstoffes zu vermeiden. Entsprechende Wurzelabschnitte wurden in 1-2 cm lange Stücke geschnitten und die Enden mit Paraffinwachs versiegelt. Diese Stücke wurden 1h in

0.05% (w/v) Berberin-Hemisulphat gelöst in Kaliumphosphat-Puffer (50 mM + 0.5 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , pH 6.0) inkubiert. Anschließend wurden die Wurzelsegmente mehrmals mit Phosphatpuffer gewaschen und für 1h in 50 mM Kaliumthiocyanatlösung gelegt. Gegen Ende wurde die Hälfte der Thiocyanat-Lösung durch Phosphatpuffer ersetzt. So wurden die Segmente bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Vor dem Anfertigen von Handschnitten mit einer Rasierklinge wurden die Segmente kurz mit frischer Thiocyanat-Lösung gespült und trocken getupft.

#### **2.2.2.4 Berberin-Toluidinblau-Färbung**

Die Casparyschen Streifen der Hypodermis und Endodermis konnten sichtbar gemacht werden, indem die Mikrotomschnitte mit 0.1% (w/v) Berberin-Hemisulphat behandelt wurden. Nach 1h wurden die Schnitte mehrmals mit Wasser gespült und dann für 30 Min. in 0.5% (w/v) Toluidinblau-Lösung (anstelle von Anilinblau aus der Originalvorschrift) überführt. Anschließend wurden die Schnitte erneut mit Wasser gewaschen und dann in Einbettmedium (0.1% (w/v)  $\text{FeCl}_3$  in 50% (v/v) Glycerin) auf einem Objektträger unter violetter Fluoreszenzanregung untersucht (Brundrett et al., 1988).

#### **2.2.2.5 Phloroglucin/HCl-Färbung (Weisner-Reaktion) (Weisner, 1878)**

Die Reaktion beruht auf einer Rotfärbung von Lignin, die durch eine säurekatalysierte Kondensation von Phloroglucin mit den in Ligninen vorkommenden Aldehydgruppen (v.a. Coniferylaldehyd) verursacht wird (Dean, 1997).

Die mittels Rasierklinge hergestellten Handschnitte wurden auf einen Objektträger überführt und mit einigen Tropfen Phloroglucin-Lösung versetzt (gesättigte Lösung (ca.1% w/v) von Phloroglucin in 92%igem Ethanol). Nach einigen Minuten Einwirkungszeit wurde ein Tropfen Salzsäure auf den Schnitt gegeben, mit Deckglas versehen und unter Durchlicht mikroskopisch untersucht.

### **2.2.2.6 Sudan III-Färbung**

Diese Färbemethode ist zum Sichtbarmachen von Suberinlamellen und anderen lipophilen Substanzen geeignet.

Für die Herstellung der Färbelösung wurden ca. 2 g Sudan III (Merck) in 100 ml 92%igem Ethanol gelöst. Von dieser Stammlösung wurden 5 ml entnommen und mit 5 ml Glycerin versetzt. Einige Tropfen dieser Mischung wurden auf die auf Objektträgern befindlichen Schnitte gegeben und auf einer Heizplatte für 10 Min. auf 70°C erhitzt. Anschließend wurden die Schnitte gründlich mit Glycerin / H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) gewaschen und mikroskopisch untersucht.

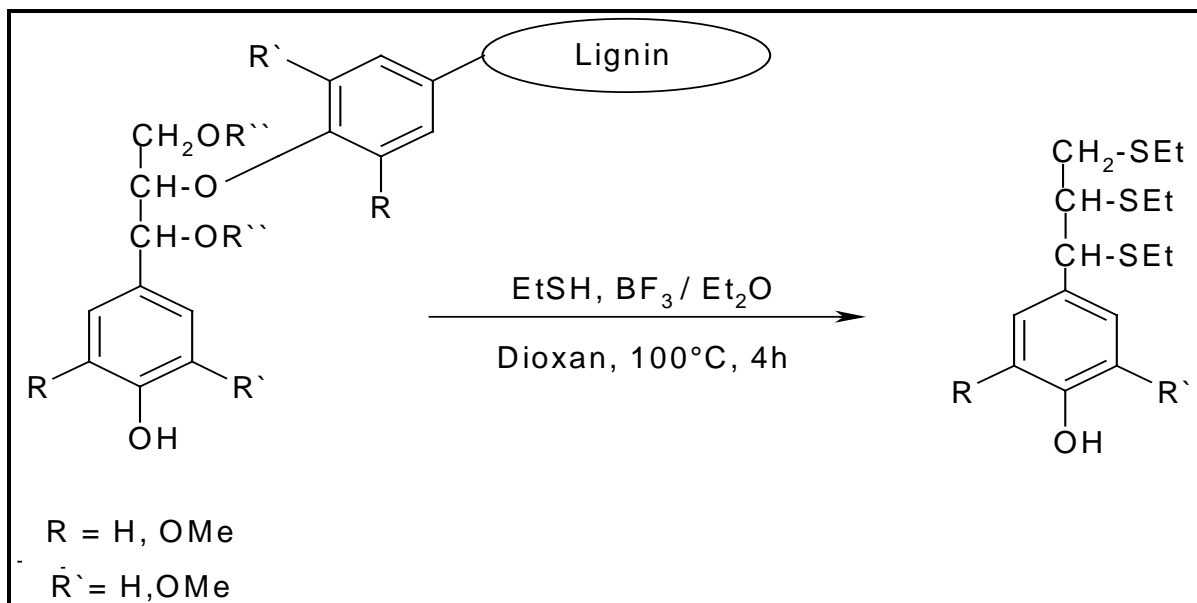
## **2.2.3 Gewinnung und Analyse von Zellwandisolaten**

### **2.2.3.1 Zellwandisolierung**

Wurzelmaterial von *Zea mays* wurde von anhaftendem Bodensubstrat befreit und in 2-3 cm lange Stücke geschnitten. Die Wurzelstücke wurden in einer Enzymlösung, bestehend aus je einer Spatelspitze Cellulase, Pectinase und Hemicellulase (Onozuka R-10 und Macerozym R-10, Serva, Heidelberg) in 10 mM Citratpuffer pH 3 mit Azidzusatz, inkubiert und ca. 3 Wochen lang einer enzymatischen Verdauung unterzogen. Lignifizierte und suberinisierte Zellwände bleiben vom Verdauungsprozeß unangetastet, die Zellwände des Wurzelcortex werden dagegen vollständig verdaut. Mittels eines Binokulars (Leitz, Wetzlar) und zwei Uhrmacherpinzetten wurden rhizodermale / hypodermale, endodermale und Xylemzellwände voneinander getrennt. Die so erhaltenen Zellwandisolate wurden dreimal für jeweils 1h mit 10 mM Boratpuffer (pH-Wert = 9) und dreimal für je 10 Min. mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie im Trockenschrank bei 70°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und im Exsikkator aufbewahrt.

### 2.2.3.2 Thioacidolyse

Um das Biopolymer Lignin zu analysieren, wurde das isolierte Zellwandmaterial einer Thioacidolyse unterzogen (Lapierre et al., 1991) (Abb. 2-1). Hierzu wurde in einem Druckschlenkrohr eine Argon-Schutzatmosphäre erzeugt, 40  $\mu\text{l}$   $\text{BF}_3/\text{Et}_2\text{O}$  und 160  $\mu\text{l}$  Ethanthiol in 350  $\mu\text{l}$  Dioxan gelöst und weitere 1.1 ml Dioxan zugegeben. Ca. 1 mg Zellwandisolat wurde in diesem Gemisch 4h bei 100°C unter Rühren erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch quantitativ in ein Schnappdeckelgläschen überführt und mit 2 ml  $\text{H}_2\text{O}$  nachgespült. Es folgte die Zugabe von 20  $\mu\text{g}$  Dotriacontan als internen Standard und eine dreimalige Extraktion mit je 3 ml  $\text{CHCl}_3$ . Die organischen Phasen wurden vereinigt, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und auf ein Endvolumen von 200  $\mu\text{l}$  aufkonzentriert.

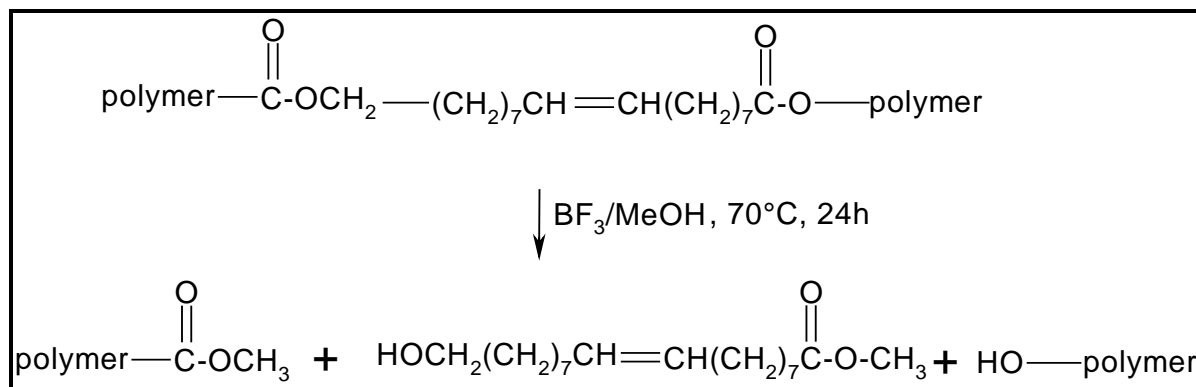


**Abb. 2-1** Reaktionsschema der Thioacidolyse.

### 2.2.3.3 Umesterung

Der Abbau des Zellwandmaterials für die Detektion von Suberin wurde entsprechend der Methode von Kolattukudy und Agrawal (1984) durchgeführt (Abb. 2-2). Ca. 1 mg Zellwandisolat wurde mit 1 ml einer 10%igen  $\text{BF}_3/\text{Methanol}$ -Lösung versetzt und für 24h auf 70°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionslösung von dem Zellwandmaterial entfernt und getrennt aufbewahrt. Das Zellwandisolat wurde 3x mit je 1 ml  $\text{CHCl}_3$  gewaschen, die organischen Phasen mit der Reaktionslösung vereinigt

und mit 20 µg Dotriacontan als internen Standard versetzt. Anschließend wurde 2x mit je 1 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und auf ein Endvolumen von 100 µl aufkonzentriert.



**Abb. 2-2** Reaktionsschema der Umesterung.

#### 2.2.3.4 GC/MS

Zur Analyse der Reaktionsprodukte, die bei der Umesterung und Thioacidolyse entstanden sind, wurde ein Gaschromatograph (HP 5890 Series, Hewlett Packard, Kalifornien) mit einem Flammenionisationsdetektor (GC/FID, Hewlett Packard 5890 Series II) verwendet. Als Trennsäulen dienten 20-30 cm lange Fused-Silica-Kapillarsäulen (DB-1, Fisons, Folsom, CA) mit einem Innendurchmesser von 0.32 mm und einer Filmschichtdicke von 0.1 µm. Qualitative Analysen wurden mit einem massenselektiven Quadrupoldetektor (GC/MS, Hewlett Packard 5971A) durchgeführt. Die Massenspektren wurden bei 70eV aufgenommen.

Vor der Injektion (1 µl) wurden die Proben mit 20 µl getrocknetem Pyridin und 20 µl BSTFA (*N,N*-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamid, Macherey-Nagel, Düren) für 30 Min. auf 70°C erhitzt. Dabei werden freie Hydroxyl- oder Carboxylgruppen in die entsprechenden leichter flüchtigen Trimethylsilylether bzw. -ester derivatisiert.

Die Datenanalyse und Integration der Peakflächen erfolgte PC-unterstützt mit HP-Software (GC/MS: Version B.00.01).

### **2.2.3.5 Aminosäureanalyse**

Zur Analyse der in Proteinen gebundenen Aminosäuren wurde das Zellwandmaterial einer sauren Hydrolyse unterzogen. 2-3 mg Zellwandisolat wurden in einem Bördelkappengefäß (Macherey-Nagel, Düren) mit 1 ml 6N HCl versetzt und 24h bei 130°C unter Argonatmosphäre erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Hydrolysat durch eine mit Watte, Seesand und Celite gefüllte Pasteurpipette filtriert und mit Wasser nachgespült. Die Salzsäure wurde mittels eines Rotationsverdampfers im Vakuum entfernt, der Rückstand in 1 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und erneut abrotiert. Dieser Waschvorgang wurde ein zweites Mal wiederholt. Anschließend wurde der Rückstand in 200 µl Verdünnungspuffer (0.1 M Lithiumcitrat, 68.5 mM Citronensäure, 20 mM Bis-(2-hydroxyethyl)-sulfid, pH 2.2) aufgenommen und mittels HPLC (LC 5001 Biotronic, Eppendorf, Hamburg) analysiert. Die Aminosäuren wurden als Ninhydrinderivate bei 570 nm (Prolin und Hydroxyprolin bei 440 nm) detektiert. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten und Peakflächen einer Standardlösung mit bekannter Konzentration.

## **2.2.4 Analytische und physiologische Untersuchungen des Pflanzenmaterials**

### **2.2.4.1 Bestimmung des Frisch- und Trockengewichtes**

Das Frischgewicht von Blättern und Wurzeln wurde unmittelbar nach der Ernte durch Wiegen bestimmt. Wurzeln wurden vorher durch sorgfältiges Waschen von Bodenpartikeln befreit. Anschließend wurde durch Abtupfen mit saugfähigem Zellstoff das anhaftende Wasser entfernt.

Nach der Frischgewichtsbestimmung wurde das Pflanzenmaterial in einem Umluft-trockenschrank bei 70°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Dann wurde das Trockengewicht ebenfalls durch Wiegen bestimmt.

### **2.2.4.2 Bestimmung des Elementgehaltes**

Frisches Blatt- bzw. Wurzelmaterial wurde wie oben beschrieben gereinigt und getrocknet. Nach dem Trocknen wurde es mittels einer Schwingmühle (Retsch, Typ MM 2, Haan) in Teflonmahlbechern mit Mahlkugel zu Pulver homogenisiert und der

ICP-Analyse (siehe 2.2.1.1) zugeführt. Für eine Analyse wurden ca. 100 mg Trockenmaterial benötigt.

#### 2.2.4.3 Bestimmung der löslichen Aminosäuren

Zur Vorbereitung der Proben wurde ca. 0.5 g frisches oder bei -80°C gelagertes Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit der 10-fachen Menge Wasser versetzt. Zum Ausfällen der Proteine wurde 1-2 Min. gekocht und 15 Min. bei 25000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und eingefroren. Für die Analyse wurde 75 µl Überstand mit 75 µl Probenverdünnungspuffer (0.1 M Lithiumcitrat, 68.5 mM Citronensäure, 20 mM Bis-(2-hydroxyethyl)-sulfid, pH 2.2) vermischt und mittels HPLC (LC 5001 Biotronic, Eppendorf, Hamburg) analysiert (vgl. 2.2.3.5).

#### 2.2.4.4 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Das Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff zu Pulver zerrieben, mit 5 ml 80% Aceton versetzt, und der Extrakt über Nacht bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Die unlöslichen Bestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation bei 6000 x g abgetrennt. Die Extraktion wurde falls notwendig solange wiederholt, bis das Sediment chlorophyllfrei, also farblos war. Die Acetonüberstände wurden vereinigt und die Extinktion bei 645 und 663 nm gegen 80% Aceton gemessen (Spektralphotometer VARIAN, Typ DMS 80).

Der Chlorophyllgehalt der Proben errechnet sich nach folgender Formel (McKinney, 1941):

$$\text{Chlorophyllgehalt [ } \mu\text{g / g FG ]} = \frac{[(E_{663} \cdot 8.02) + (E_{645} \cdot 20.2)] \cdot F \cdot V}{FG}$$

FG: Blattfrischgewicht in g

E: Extinktion bei der jeweiligen Wellenlänge

F: Verdünnungsfaktor

V: Gesamtextraktionsvolumen in ml

### 2.2.4.5 Bestimmung des photosynthetischen Elektronentransports mit Hilfe des PAM-Chlorophyllfluorometers

Mit Hilfe des PAM-Chlorophyllfluorometers (Pulsed Amplitude Modulation) (Mini-PAM, Fa. Walz, Effeltrich) kann die Elektronenflußrate und die Quantenausbeute an intakten Blättern bestimmt werden. Bei der Photosynthese wird Lichtenergie in chemisch fixierte Energie umgewandelt. Die Umwandlung erfolgt an den Reaktionszentren von Photosystem I und II durch photochemischen Elektronentransport. Der durch Lichtabsorption entstandene Anregungszustand kann entweder durch photochemische Ladungstrennung, durch Fluoreszenz-Emission F oder durch Wärmedissipation D abreagiert werden. Die Summe dieser alternativen Wege ergibt einen Wert von 1 und wird durch die Quantenausbeute beschrieben. Die photochemische Quantenausbeute P kann aufgrund der leicht zu messenden Quantenausbeute der Chlorophyllfluoreszenz bestimmt werden (Schreiber et al., 1993).

Bei der PAM-Chlorophyllfluoreszenz-Methode fällt ein Strahl sehr niedriger Lichtintensität (Meßstrahl) auf das Blatt und erzeugt die minimale Fluoreszenz  $F_0$ . Durch einen sättigenden Starklichtimpuls werden alle Elektronenakzeptoren des Photosystems II reduziert, eine photochemische Energieumwandlung kann nicht mehr stattfinden. Die absorbierte Energie muß einen dissipativen Weg gehen, nämlich den der Fluoreszenz.  $F_M$  bezeichnet die maximale Fluoreszenzausbeute im Dunkelzustand, als F wird die variable Gesamtfluoreszenz bezeichnet. Die photochemische Quantenausbeute P kann folgendermaßen berechnet werden:

$$P = \frac{F_M - F}{F_M} = \frac{\Delta F}{F_M}$$

Die Messungen, die auf Fluoreszenzänderungen (Kautsky-Effekt) beruhen, spiegeln nur die Effizienz der Energieumwandlung in den Reaktionszentren des Photosystems II wider. Das Chlorophyll des Photosystems I zeigt normalerweise keine variable Fluoreszenzausbeute. Die Reaktionszentren des PS I wandeln die Anregungsenergie bei blockierter Photosynthese ausschließlich in Wärme um.

Vor der Aufnahme der Lichtsättigungskurven wurden die Pflanzen für ca. 30 Min. dunkeladaptiert.



#### 2.2.4.6 Gewinnung von Apoplastensaft (Interzelluläre Waschflüssigkeit IWF)

Wurzeln von *Zea mays* wurden vorsichtig von anhaftendem Bodensubstrat befreit und für 30 Min. mit 10 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung vakuumfiltriert. Hierzu wurden die Wurzeln portionsweise in ein Maschennetz eingeschlagen und in ein Becherglas, das mit Infiltrationsmedium gefüllt war, gelegt. Mit einem zweiten leeren Becherglas wurde sichergestellt, daß die Wurzeln in der Lösung eingetaucht blieben. In einem Exsikkator, gefüllt mit Eis, wurde mittels einer Membranpumpe mit zwischengeschalteter Kühlfalle ein Vakuum ( $\leq 8$  mbar) angelegt. Etwa alle 5 Minuten wurde das Vakuum unterbrochen, um die Infiltration des Wurzelgewebes zu erleichtern. Vor dem Abzentrifugieren (15 Min., 20000 g, 4°C) wurden die Wurzeln vorsichtig trocken getupft, um eine weitere Verdünnung des Apoplastensaftes zu vermeiden. Die infiltrierten Wurzeln wurden in Kunststoff-Tubes mit durchlöcherter Boden, eingesetzt in konisch zulaufende Kunststoffgefäße, zentrifugiert. Der gewonnene Apoplastensaft wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten oder bei -80°C eingefroren.

#### 2.2.4.7 Bestimmung des Verdünnungsgrades von IWF

Der durch die Infiltrationsmethode gewonnene Apoplastensaft besteht sowohl aus interzellulärer Waschflüssigkeit, als auch zu einem gewissen Anteil aus Infiltrationsmedium. Zusätzlich entsteht ein gewisser Fehler durch an die Wurzeloberfläche anhaftendes Infiltrationsmedium. Um den Grad der Verdünnung zu bestimmen, wurden zwei verschiedene Methoden angewendet:

*Wägemethode:* Wiegen der Wurzeln vor der Infiltration (1)  
Wiegen nach der Infiltration (2)  
nach Zentrifugation gewonnene IWF (3)  
Wiegen der abzentrifugierten Wurzeln (4)  
(1) - (4) = reiner Apoplastensaft  
(2) - (4) bzw. (3) = verdünnter Apoplastensaft  
 $[(1) - (4) / (2) - (4)] \cdot 100 = \% \text{ IWF}$

*Zusatz von Dextranblau:* Das Infiltrationsmedium wurde mit dem Farbstoff Dextranblau versetzt (1.5 mg / ml). Das Molekül Dextranblau ist groß genug, um nicht

die Plasmamembran passieren zu können. Außerdem geht es keine Wechselwirkungen mit der Zellwandphase ein. Es wurden verschiedene Verdünnungsstufen (0, 5, 12.5, 25, 50, 75, 100%) hergestellt und die Extinktion bei 620 nm gemessen. Anhand der erstellten Kalibriergeraden konnte der Verdünnungsgrad des IWF, dessen Extinktion ebenfalls bei 620 nm gemessen wurde, errechnet werden. Der IWF von auf Erde kultivierten Wurzeln besteht zu 50% aus Apoplastensaft und zu 50% aus Infiltrationsmedium im Vergleich zu 40 und 60% bei Schlacke-Wurzeln.

Mit Dextranblau versetzter IWF wurde nicht für Enzymtests verwendet.

#### **2.2.4.8 Reinheitsprüfung des Apoplastensaftes**

Der gewonnene Apoplastensaft wurde auf eventuelle Verunreinigungen mit cytoplasmatischen Bestandteilen geprüft, indem der ATP-Gehalt bestimmt wurde. Zur Durchführung der ATP-Bestimmung mit dem Feuerfliegen-Test siehe 2.2.4.14.

#### **2.2.4.9 Bestimmung des ABA-Gehaltes (ELISA-Test)**

Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) wurde mittels eines immunbiologischen Tests bestimmt (Weiler, 1986).

*Extraktion und Reinigung:* Frische oder tiefgefrorene Wurzelproben wurden in einem Zentrifugenglas mit Glasstab unter flüssigem Stickstoff zu Pulver zerrieben, in 80% Methanol suspendiert und für 24 - 48h bei 4°C extrahiert. Durch Zentrifugation (20000 g, 10 Min.) wurde der unlösliche Probenanteil entfernt. Anschließend wurden die Extrakte durch eine Fertigsäule (Sep-Pak cartridge, Typ C18) gegeben, um störendes Lipidmaterial und Pigmente abzutrennen. Das Extraktionsmittel Methanol wurde an einer Unterdruckzentrifuge (Typ Speed Vac) abgedampft, der restliche wäßrige Rückstand in 1 ml Wasser aufgenommen und mit 1N HCl auf einen pH-Wert von 2-3 eingestellt. Danach wurden die angesäuerten Extrakte dreimal 2 Min. lang mit je 1ml Ethylacetat ausgeschüttelt, die organischen Phasen vereinigt und im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt. Die wäßrigen Phasen wurden zur Bestimmung der an Glucoseester gebundenen ABA aufgehoben. Die eingeeengten Proben wurden in 0.3 ml Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>)

aufgenommen, die Wandbeläge im Ultraschallbad gelöst und die Proben mit Puffer entsprechend verdünnt. Diese Proben enthalten die freie ABA.

Die wäßrigen Phasen, in denen ABA-Glucoseester (ABA-GE) gelöst ist, wurden einer alkalischen Hydrolyse unterzogen, um die ABA aus der Esterbindung zu lösen. Hierzu wurde der wäßrige Rückstand mit 3N NaOH für 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert (auf 1ml Rückstand 500 µl NaOH). Anschließend wurden die Lösungen vorsichtig mit rauchender HCl auf pH 2-3 angesäuert und erneut dreimal gegen Ethylacetat ausgeschüttelt und wie oben beschrieben behandelt.

*ELISA-Test:* Die so erhaltenen Probelösungen wurden mittels ELISA-Test (enzyme-linked immunosorbent assay) auf ihren ABA-Gehalt hin untersucht. Der Test beruht auf einer Antigen-Antikörperreaktion zwischen einem spezifischen Antikörper und ABA bzw. Tracer als Antigen. Die Empfindlichkeit dieses Biotests liegt im Bereich zwischen 0.02 und 0.5 pmol. Die Durchführung des Tests erfolgte wie von Weiler (1986) beschrieben.

#### **2.2.4.10 Ellman-Test**

Zum Nachweis von nicht proteingebundenen SH-Gruppen wurde die Methode von Ellman (1959) verwendet. Aliphatische Thiole reagieren mit 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB) zum gelb gefärbten p-Nitrothiophenolat-Anion, dessen Bildung aufgrund seiner Absorption bei 412 nm photometrisch verfolgt werden kann. Da die in Pflanzenextrakten enthaltenen Pigmente ebenfalls bei dieser Wellenlänge absorbieren können, wird eine Parallelmessung ohne DTNB durchgeführt. Der so erhaltene Leerwert wird als Korrektur vom eigentlichen Meßwert abgezogen. Aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit von SH-Gruppen wird als Extraktionsmittel eine 0.15 %ige (w/v) Natrium-Ascorbatlösung verwendet. Cystein ist zudem in Proben mit pH-Werten alkalischer als 6 innerhalb kürzester Zeit nicht mehr meßbar (100% Verlust bei pH 6.8 und 30°C nach 60 Min.), so daß der pH-Wert bis zur eigentlichen Messung unter 6 liegen sollte (5% Verlust bei einem pH-Wert von 5.8 und 30°C nach 60 Min.) (Brune, 1994). Für die Extraktion wurde frisches oder bei -80°C gelagertes Wurzelmaterial in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert, mit Ascorbatlösung versetzt (0.5 ml Ascorbatlösung / g FG) und 10 Min. auf Eis extrahiert. Anschließend wurde 10 Min. bei 40000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Denaturierung der Proteine 4 Min. bei 100°C erhitzt und die festen

Bestandteile durch 15-minütige Zentrifugation bei 40000 g, 4°C entfernt. Der Überstand wurde bis zur Messung auf Eis aufbewahrt.

Die Kalibriergerade wurde mittels einer 1 mM Cysteinlösung erstellt (1µl ≡ 1 nmol Cystein).

Messen der Proben:

	Leerwert	Probenwert
300 mM MES-NaOH pH 5.8	50 µl	50 µl
Probe	550 µl	550 µl
250 mM K-Phosphatpuffer pH 8.0	700 µl	700 µl
20 mM K-Phosphatpuffer pH 7.0	100 µl	—
10 mM DTNB (in 20 mM Phosphatpuffer pH 7.0)	—	100 µl

**Tab. 2-4** Pipettierschema.

Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 412 nm gemessen. Zur Nullpunktseinstellung wurde das Probenvolumen durch Na-Ascorbatlösung ersetzt.

Die durch SH-Gruppen der Probe hervorgerufene Extinktionsänderung errechnet sich wie folgt:

$$E_{\text{gesamt}} = E_{\text{Probenwert}} - E_{\text{Leerwert}}$$

#### 2.2.4.11 <sup>31</sup>P-NMR

Paramagnetisches <sup>31</sup>P kommt in Metaboliten wie anorganischem Phosphat, Zuckerphosphaten und Nucleotiden in ausreichender Konzentration vor, so daß es ohne externen Zusatz mit Hilfe der <sup>31</sup>P-NMR-Methode bestimmt werden kann. Die chemische Verschiebung („chemical shift“) von P in Phosphaten, d.h. die Lage im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum, reagiert empfindlich auf Veränderungen des pH-Wertes. Anhand der chemischen Verschiebung des Phosphatsignals einer biologischen Probe kann deshalb in vivo der cytoplasmatische und vakuoläre pH-Wert bestimmt werden (Ratcliffe, 1996).

Die Messungen wurden an einem Bruker AMX 500 Spektrometer, 202.46 MHz, durchgeführt. Als externer Standard wurde Methylendiphosphonsäure (MDH) verwendet.

Die Wurzeln von *Zea mays* wurden vorsichtig von anhaftendem Bodensubstrat befreit und bis zur eigentlichen Messung in belüfteter 10 mM CaSO<sub>4</sub>-Lösung aufbewahrt. Das Wurzelmaterial wurde in NMR-Probenröhrchen (Durchmesser 2 cm) mit entsprechender Pufferlösung in den Probenkopf eingebaut. Die Anregungssequenz bestand aus einem Rechteckpuls und anschließender Detektion des FID. Die Repetitionszeit lag bei 0.22 - 1.4 sec. Bei den Messungen wurden 2000 - 10000 Mittelungen durchgeführt, je nach Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Um eine Hypoxie des Wurzelgewebes zu vermeiden, wurde das Medium mit Hilfe eines Pump-Schlauchsystems ständig erneuert und mit Sauerstoff begast. Zur Erzeugung der Spektren wurde eine Basislinienkorrektur durchgeführt und ein Exponentialfilter mit 20 Hz angewendet. Dem folgte eine Fouriertransformation mit anschließender Phasenkorrektur. Aus der chemischen Verschiebung der Phosphatresonanzen lässt sich unter Verwendung einer Kalibrierkurve der jeweilige pH-Wert bestimmen.

Die <sup>31</sup>P-NMR-Experimente wurden am Lehrstuhl Physik V mit freundlicher Unterstützung der Diplomphysiker A. Greiser und T. Neuberger durchgeführt.

#### **2.2.4.12 Peroxidaseaktivität**

Zur Bestimmung der Peroxidaseaktivität wurde das Wurzelmaterial in verschiedene Fraktionen zerlegt. Zuerst wurde der Apoplastensaft aus der Zellwandphase entfernt (vgl. 2.2.4.6). Anschließend wurde ca. 0.5 g Wurzelmaterial in flüssigem Stickstoff zermörsert, mit 3 ml 50 mM K-Phosphatpuffer (pH 6.9) homogenisiert und 15 Min. bei 25000 g, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand enthält die lösliche cyto-plasmatische Enzymfraktion. Das Pellet wurde 2x mit Puffer, der 1% (v/v) Triton X-100 enthält, und 3x mit reinem Puffer gewaschen, um Spuren von cytoplas-matischen Verunreinigungen zu entfernen. Das gewaschene Pellet wurde danach mit 2 ml gepufferter 1M NaCl-Lösung resuspendiert, 30 Min. auf Eis geschüttelt und 15 Min. bei 25000 g, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde als Quelle für die ionisch an die Zellwand gebundene Enzymfraktion verwendet.

Für die Aktivitätsbestimmung wurde die Geschwindigkeit der Farbstoffbildung bei der POD-katalysierten Oxidation von Guaiacol mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemessen. Zur Bildung von

1 Mol Tetraguaiacol werden 4 Mole  $\text{H}_2\text{O}_2$  benötigt. Zur Berechnung des umgesetzten Substrates ist daher die durch den Farbstoff angezeigte Extinktion mit 4 zu multiplizieren. In einer 3 ml Glasküvette wurden 2 ml K-Phosphatpuffer (100 mM, pH 6.5), 5-100  $\mu\text{l}$  Probe und 100  $\mu\text{l}$  Guaiacol-Lösung (5  $\mu\text{l}$  auf 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) vorgelegt. Mit Zugabe von 5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (25  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  30% auf 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) wurde die Reaktion gestartet. Mit einem an das Spektralphotometer (UV-VIS Spektrophotometer Varian DMS 80, Darmstadt) angeschlossenen Schreiber wurde die Extinktionsänderung bei 470 nm protokolliert und aus der Anfangssteigung die Extinktionsänderung pro Minute abgelesen. Die Umsatzrate in  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{ml}$  lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$\frac{dE / \text{min} \cdot 4 \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v}$$

dabei ist:	dE/min	=	Extinktionsänderung pro Minute
	$\varepsilon$	=	Extinktionskoeffizient für Tetraguaiacol (25.5 $\text{cm}^2/\mu\text{M}$ bei 470nm)
	d	=	Schichtdicke in cm
	V	=	Ansatzvolumen in ml
	v	=	Probenvolumen in ml

#### 2.2.4.13 Proteinbestimmung mit BCA-Reagenz

Die Bestimmung beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der  $\text{Cu}^{2+}$  -Ionen in alkalischem Medium von aromatischen Aminosäuren zu  $\text{Cu}^+$  - Ionen reduziert werden. Diese bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, der bei 562 nm sein Absorptionsmaximum zeigt.

Die Kalibriergerade wurde mit BSA-Lösung (1mg/ml) als Proteinstandard im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 70  $\mu\text{g}$  Protein pro Ansatz erstellt.

Zum Messen der Proben wurden 50  $\mu\text{l}$  Extrakt (eventuell verdünnt) mit 1ml BCA-Reagenz (50 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B) versetzt und 30 Min. bei 37°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde die Absorption bei 562 nm gemessen und anhand der Kalibriergeraden in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

Das BCA-Reagenz wurde von der Firma Pierce Chemical Company, Out-Beijerland, Niederlande bezogen.

#### 2.2.4.14 ATP-ADP-AMP-Bestimmung (Feuerfliegen-Test)

Zur Bestimmung des „adenylate energy charge“ (AEC) wurden die Gehalte der drei Adenosinphosphate gemessen. Die Bestimmung erfolgt mit Firefly-Reagenz (enthält Luziferin und Luziferase), das chemische Energie (ATP) in Lichtenergie (Lumineszenz) umwandelt. Dazu wurde ca. 0.5 g frisches Wurzelmaterial mit flüssigem Stickstoff zermörsert, mit 3 ml 4.5% HClO<sub>4</sub> versetzt und 1h auf Eis gestellt. Nach 10 Min. Zentrifugation bei 25000 g, 4°C wurde der Überstand abgenommen, mit 75 µl 2M Tris-Puffer versetzt und mit 5M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung langsam auf einen pH-Wert von 7.8 eingestellt. Das entstandene KClO<sub>4</sub> wurde abzentrifugiert (25000 g, 10 Min., 4°C) und der Überstand in aliquots bei -80°C eingefroren. Von jeder Probe wurden drei Reaktionsansätze vorbereitet. Der erste diente dem Messen des ATP-Gehaltes des Extraktes. Zum zweiten Ansatz wurden zusätzlich Pyruvatkinase und PEP zugesetzt. Dieses Enzym phosphoryliert unter Verbrauch von PEP ADP zu ATP. Im dritten Ansatz wurden Pyruvatkinase und Myokinase zum Extrakt gegeben. Myokinase wandelt ATP und AMP zu ADP um, das analog der Reaktion im zweiten Ansatz zu ATP umgesetzt wird.

Reaktionsansätze:

1. ATP	200 µl Extrakt
	50 µl PEP (20 mg in 133 mM MgSO <sub>4</sub> , 266 mM KCl)
	750 µl 100 mM HEPES pH 7.8 + 20 mM MgCl <sub>2</sub>
2. ADP	dto. + 10 µl Pyruvatkinase
	(1:10 verdünnt = 1 mg / ml)
3. AMP	dto. + 10 µl Pyruvatkinase
	+ 10 µl Myokinase (1:2 verdünnt = 500 U / ml)

Die Reaktionsansätze werden 50 Min. bei 37°C inkubiert und anschließend bis zur Messung auf Eis gestellt.

Für den Meßansatz werden 10-50 µl Reaktionsansatz in Probenröhrchen (Tube No 55.476, Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert, mit 50 mM HEPES pH 7.8 + 5 mM MgCl<sub>2</sub> auf

500 µl aufgefüllt und in das Meßgerät (LUMAT, Typ LB 9501, Berthold) gegeben. Hier wird automatisch 100 µl Firefly-Reagenz (50 mg + 50 ml H<sub>2</sub>O) injiziert und die Messung gestartet. Die entstehende Lichtmenge, die dem ATP-Gehalt proportional ist, wird in relativen Lichteinheiten (RLU = Relative Light Unit) gemessen. Mittels einer Kalibriergeraden auf der Matrix der Wurzelextrakte können die RLU in ATP-Gehalte umgerechnet werden.

Der AEC errechnet sich nach folgender Formel (Atkinson, 1968):

$$\frac{0.5 \cdot ([ADP] + [ATP])}{[AMP] + [ADP] + [ATP]}$$



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der verwendeten Bodensubstrate

##### 3.1.1 Chemische Eigenschaften der festen Substrate

###### 3.1.1.1 Elementare Zusammensetzung

Da die Mineralversorgung sehr wichtig für die Entwicklung und den Stoffwechsel der Pflanzen ist, soll im Folgenden auf die chemische Zusammensetzung der verwendeten Bodensubstrate eingegangen werden. Im Vergleich zu Gartenerde ist MHKW-Schlacke durch ihren hohen Gehalt an Bor, Calcium, Eisen, Natrium, Mangan und Schwefel charakterisiert (Tab. 3-1).

Element	Gartenerde	Schlacke	Verhältnis Schlacke / Erde
Aluminium	9.7 - 10.3	31 - 40	3 - 4
Bor	0.02	0.2	10
Calcium	15 - 17	99 - 126	6 - 8
Eisen	12 - 23	69 - 100	3 - 8
Kalium	5.8 - 7.1	5.1 - 10	0.7 - 1.7
Magnesium	4.2 - 5.3	9.4 - 13	2 - 3
Mangan	0.275	1.6 - 1.7	6
Natrium	0.2	7.7 - 15	38 - 75
Phosphor	0.87 - 1.4	2.2 - 7.1	1.5 - 8
Schwefel	0.36 - 0.75	6.3 - 8.1	8 - 22
Stickstoff	1.1 - 5.2	0.04 - 0.2	0.008 - 0.2

**Tab. 3-1** Hauptelemente von Gartenerde und MHKW-Schlacke in g pro kg; die meisten Daten wurden mittels ICP-AES ermittelt, Stickstoff wurde über CHN gemessen.

Auch der Phosphorgehalt der Schlacke ist höher als der von Gartenerde. Das Element Stickstoff ist dagegen in geringerer Konzentration vorhanden als im Kontrollsubstrat. Der niedrige Stickstoff-Gehalt ist auf die Entstehung der Schlacke durch Verbrennung bei 800-1000°C zurückzuführen. Vergleicht man die Bodensubstrate auf ihren Schwermetall-Gehalt hin, so stellt man in Schlacke eine starke Erhöhung fest (Tab. 3-2). Im Vergleich zu Gartenerde sind in Schlacke hauptsächlich die Schwermetalle Kupfer (Faktor 40-275), Cadmium (bis Faktor 50), Blei (Faktor 25-60) und Zink (Faktor 20-60) angereichert. Da absolute Zahlenwerte allein oft nicht sehr aussagekräftig sind, wurden die Daten für Schwermetalle zur besseren biologischen Einschätzung den durch den Gesetzgeber festgesetzten Grenzwerten gegenübergestellt (Tab. 3-2).

Schwermetall	Gehalt [mg kg <sup>-1</sup> ]		
	Gartenerde	Schlacke	Grenzwerte
Blei	26 - 35	800 - 1600	50-300
Cadmium	0.2 - 2	4 - 10	1-3
Chrom	19 - 45	320 - 515	100
Kupfer	13 - 30	1260 - 3600	50-140
Molybdän	< 3	10 - 90	5
Nickel	11- 20	190 - 600	50
Zink	97 - 170	3255 - 5900	50-300

**Tab. 3-2** *Schwermetallgehalt der verwendeten Bodensubstrate; Grenzwerte für Elementgehalte im Boden nach Blume (1990).*

Der Vergleich zeigt, daß alle in Schlacke vorkommenden Schwermetalle die gesetzlich zugelassenen Grenzwerte für Ackerböden deutlich überschreiten. Das bedeutet, MHKW-Schlacke wäre aus diesem Grund als Bodensubstrat zur Kultur von Pflanzen nicht zugelassen. Eine flächenhafte Ausbringung von Schlacke auf Böden wäre von diesem Verbot nicht betroffen. Sie wird in einigen Ländern der dritten Welt sogar praktiziert, da Schlacke aufgrund ihres hohen Phosphor- und Kalium-Gehaltes als Düngerersatz Verwendung findet (Bache und Lisk, 1990).

Zusätzlich zu den durch ICP-AES ermittelten Daten wurden die Bodensubstrate durch ein weiteres Verfahren, die Röntgenfluoreszenzanalyse (RFA), charakterisiert (Tab. 3-3). Dieses Analysenverfahren ermöglicht die Erfassung zusätzlicher Elemente, die durch ICP-AES nicht bestimmt werden können, wie z.B. Silicium und Chlor. Hierbei wird deutlich, daß Schlacke weniger Silicium enthält als Gartenerde, aber mehr Chlor. Vergleicht man die Ergebnisse der beiden Analysenverfahren ICP-AES und RFA, so stellt man eine größenordnungsmäßige Übereinstimmung der Zahlenwerte fest.

Element	Gartenerde	Schlacke	Erdkruste
Blei	0.07-0.12	2.8-3.2	0.013
Cadmium	0.002	0.015	0.0002
Calcium	16.8-18.8	126	36-41
Chlor	0.1	8	0.13-0.5
Chrom	0.08	0.40-0.79	0.1
Eisen	13.6-16.9	80	51-56
Kalium	16	13.5	21-26
Kupfer	0.044	3.1-5.8	0.06
Magnesium	4.2-4.6	13.9	20-23
Mangan	0.39-0.45	2.1	0.9
Natrium	1.7-2.5	15	24-28
Nickel	0.046	0.14-0.44	0.08
Phosphor	1.1-1.4	9.1	1.1-1.2
Schwefel	n.g.	35	0.6
Silicium	350	120	276-280
Zink	0.24-0.28	7.6-12	0.07

**Tab. 3-3** Ergebnisse der Röntgenfluoreszenzanalyse; Angaben in  $g\ kg^{-1}$ ; n.g.: nicht gemessen; Werte der Erdkruste nach Davies, 1980; Mengel und Kirkby, 1982.

In diesem Zusammenhang wurde die Zusammensetzung der Schlacke auch mit der der Lithosphäre verglichen. In den Gesteinen der Erdkruste kommen Schwermetalle nur in geringer Konzentration vor. Diese natürliche Grundkonzentration wird durch anthropogenen Einfluß allmählich gesteigert und führt zu einer Anreicherung von

potentiell toxischen Elementen, was sich auch in den Schwermetall-Gehalten der Schlacke widerspiegelt.

Tabelle 3-1 bis 3-3 geben die Gesamtgehalte der Elemente wider, ohne Berücksichtigung der molekularen Zusammensetzung und der Mobilität der Elemente. Für die Abschätzung der Phytotoxizität von Bodensubstraten in Bezug auf einzelne Elemente ist aber die Konzentration in der Bodenlösung besser geeignet als die Gesamtgehalte der festen Bodensubstrate (vgl. 3.1.2).

### 3.1.1.2 Sequentielles Extraktionsverfahren nach Tessier

Die Mobilität und damit die Pflanzenverfügbarkeit von Schwermetallen in einem Bodensubstrat hängt in entscheidendem Maß von ihrer Bindung an einzelne Bodenbestandteile ab. Die Ergebnisse des sequentiellen Extraktionsverfahrens nach Tessier et al. (1979) können dabei als Orientierungshilfe dienen (Tab. 3-4).

gebundener Metallanteil [%]							
Fraktion	Zn	Al	Cu	Mo	Pb	Ni	Cr
austauschbare Kationen	0.017	0.0008	0.019	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
gebunden an Carbonate	9.3	0.34	2.3	n.n.	3.6	0.43	0.22
gebunden an Fe- und Mn-Oxide	15.5	3.3	5.2	1.4	11.9	3.9	1.4
organisch gebunden	2.5	1.1	1.3	0.47	1.9	0.44	0.12
Residualfraktion	72.6	95.2	91.3	98.1	81.9	95.2	98.3

**Tab. 3-4** Ergebnisse der sequentiellen Extraktion von Schlacke nach Tessier et al. (1979); n.n.: nicht nachweisbar.

Die Ergebnisse dieses sequentiellen Extraktionsverfahren zeigen, daß der Großteil der in MHKW-Schlacke enthaltenen Schwermetalle in der Residualfraktion und damit in schwer mobilisierbarer Bindungsform vorliegen. Residualfraktion bedeutet, die

Metalle sind in die Gitterstruktur der Bodenminerale integriert (in Form von Silikaten oder Oxiden) und dort festgelegt.

### 3.1.2 Bodenlösungen

Für Pflanzenwurzeln ist nicht der Gesamtgehalt eines Elementes, sondern nur die lösliche Fraktion für die Aufnahme verfügbar (Davies, 1994). In Tabelle 3-5 ist die chemische Zusammensetzung der Bodenlösungen, gewonnen durch Saugkerzen, dargestellt. Die Bodenlösungen von Schlacke und gewaschener Schlacke sind stark alkalisch (pH 8.1 - 9.0), während der pH-Wert der Bodenlösung von Gartenerde nur leicht alkalisch ist (7.4 - 7.9). Die Schlacke-Bodenlösung wird dominiert durch die Kationen Natrium, Kalium und Calcium, deren Konzentration im Bereich zwischen 25 - 275 mM liegt. Als prominenteste Anionen liegen Chlorid und Sulfat vor (30 - 200 mM). Im Gegensatz dazu liegen die Konzentrationen sowohl von essentiellen als auch von nicht essentiellen Mikronährstoffen im  $\mu\text{M}$ -Bereich. Die Konzentrationen potentiell toxischer Schwermetalle liegen damit in der für Trinkwasser erlaubten Größenordnung (TVO, 1990). Obwohl der Gehalt an Phosphor und Eisen in der Schlacke selbst ziemlich hoch ist, ist die Konzentration dieser Elemente in der Bodenlösung sehr niedrig. Auch Stickstoff ist nur in sehr geringer Konzentration in der Schlacke-Bodenlösung vorhanden, sowohl in Form von Nitrat als auch in Form von Ammonium.

Weiterhin zeigt die elektrische Leitfähigkeit der Bodenlösung von Schlacke eine 10 mal höhere Konzentration an löslichen Salzen auf als in der Bodenlösung des Kontrollsubstrates. Zum Vergleich: Die elektrische Leitfähigkeit von Meerwasser beträgt ungefähr 45 mS / cm (Epstein, 1983). Als Daumenregel kann man als obere Grenze für Keimung und dauerhaftes Wachstum von Pflanzen einen Wert von 20 mS / cm angeben, das entspricht einem osmotischen Potential von -0.7 MPa (Larcher, 1995). Der Hauptunterschied zwischen Schlacke und gewaschener Schlacke ist der unterschiedliche Gehalt an leicht löslichen Salzen, vor allem an Alkalichloriden.

	<b>Gartenerde</b>	<b>Schlacke</b>	<b>Schlacke gewaschen</b>
<b>pH-Wert</b>	7.4-7.9	8.4-9.0	8.1-8.4
<b>Leitfähigkeit [mS cm<sup>-1</sup>], 20°C</b>	0.9-2.5	21-33	3.3-6.7
<b>Aluminium [µM]</b>	0.7-2.2	11.1-35.2	n.n.
<b>Blei [µM]</b>	n.n.	n.n.	n.n.
<b>Bor [mM]</b>	0.02-0.04	0.3-0.4	0.2-0.25
<b>Cadmium [µM]</b>	n.n.	n.n.-0.4	0.1-0.3
<b>Calcium [mM]</b>	2.0-4.3	22-28.5	16-20.7
<b>Chrom [µM]</b>	n.n.	4.2-9.0	0.3-0.6
<b>Eisen [µM]</b>	0.7-2.1	n.n.-0.5	n.n.-0.5
<b>Kalium [mM]</b>	5.5-8.2	33.3-54.3	4.1-7.7
<b>Kupfer [µM]</b>	0.6-1.7	5.7-7.7	1.1-1.4
<b>Magnesium [mM]</b>	0.7-1.4	0.7-0.9	3.1-4.0
<b>Mangan [µM]</b>	0.05-0.4	0.2-0.7	0.9
<b>Natrium [mM]</b>	1.1-3.3	161-275	29.6-50
<b>Nickel [µM]</b>	n.n.	n.n.	n.n.
<b>Zink [µM]</b>	1.1-12.2	0.04-0.6	0.5-1.5
<b>Sulfat [mM]</b>	5.4-6.5	26-38	19.5-23
<b>Chlorid [mM]</b>	2.6-6.1	82-204	9.7-55
<b>Nitrat [mM]</b>	4.8-11	n.n.	0.4-0.5
<b>Phosphat [mM]</b>	0.3-1.6	n.n.-0.04	n.n.-0.4
<b>Ammonium [µM]</b>	16.5-34	21.5-130	14-25

**Tab. 3-5** Bodenlösungen (Saugkerzen) der verwendeten Bodensubstrate. Die Daten stammen vom Beginn der Versuche. Angaben in mM bzw. µM; n.n.: nicht nachweisbar.

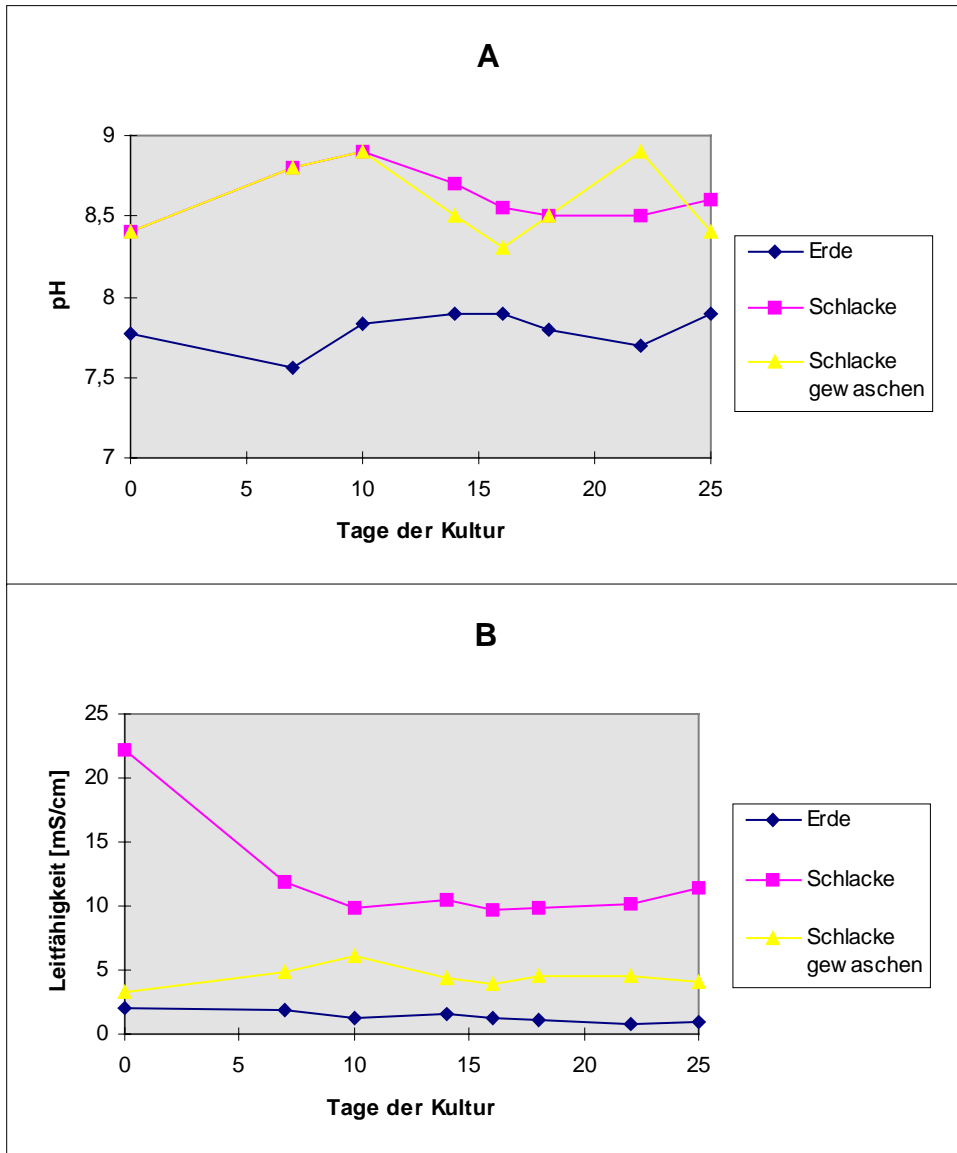
Ein Vergleich der positiven und negativen Ionenäquivalente in den Bodenlösungen (Tab. 3-6) zeigt, daß sich in Schlacke ein erheblicher Überschuß an positiven Ladungen ergibt. Die fehlenden negativen Ladungen können auf Carbonat zurückgeführt werden, welches bei der Anionenbestimmung nicht erfaßt wird. Die

Differenz von 100 positiven Ionenäquivalenten entspricht einer Bicarbonat-Konzentration von 50 mM, was auch den stark alkalischen pH-Wert der Schlacke-Bodenlösung von 9 erklärt. In gewaschener Schlacke ist die Differenz aus positiven und negativen Ionenäquivalenten geringer. Folglich ist auch die Bicarbonat-Konzentration geringer als in Schlacke. Dieses Ergebnis geht mit dem weniger alkalischen pH-Wert konform.

	Gartenerde	Schlacke	Schlacke gewaschen
$\Sigma$ positiver Ionenäquivalente	11 - 21.5	239 - 387	69 - 103
$\Sigma$ negativer Ionenäquivalente	18.2 - 30	134 - 280	49 - 102
Überschußladung	- 7 - 8.5	+ 105 - 107	+ 20

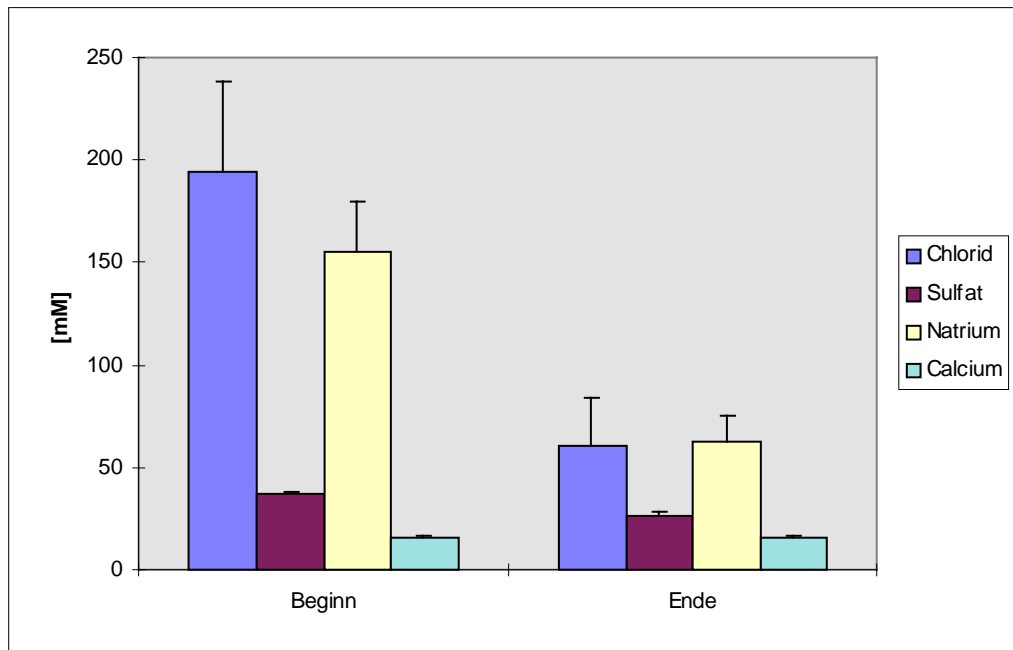
**Tab. 3-6** Ionenbalance der Bodenlösungen von Gartenerde, Schlacke und gewaschener Schlacke; bei der Berechnung der positiven Ionenäquivalente wurden die Konzentrationen von Ca, K, Mg und Na aus Tab. 3-6 zugrunde gelegt, bei den negativen die Konzentrationen von Sulfat, Chlorid, Nitrat und Phosphat.

Wenn Pflanzen in Schlacke kultiviert werden und somit kontinuierlich bewässert werden, verändert sich im Verlauf der Versuche die Zusammensetzung der Bodenlösung. Während der pH-Wert bei allen drei Ansätzen (Erde, Schlacke, gewaschener Schlacke) über den gesamten Versuchsverlauf annähernd konstant bleibt (Abb. 3-1 A), nimmt die Leitfähigkeit und somit der Anteil gelöster Salze in der Schlacke-Bodenlösung stark ab (Abb. 3-1 B). Betrachtet man die chemische Zusammensetzung der Bodenlösung, fällt auf, daß vor allem die Konzentration an Chlorid und Natrium stark abnimmt (Abb. 3-2). Die Konzentrationen an Sulfat und Calcium bleiben dagegen annähernd konstant.



**Abb. 3-1** Zeitliche Veränderung des pH-Wertes (A) und der Leitfähigkeit (B) von Bodenlösungen im Verlauf eines Kulturversuches mit *Zea mays*.





**Abb. 3-2** Konzentrationen an Natrium, Calcium, Chlorid und Sulfat in der Schlacke-Bodenlösung zu Beginn und am Ende eines Kulturversuches mit *Zea mays* (Dauer 20 Tage);  $n = 5$ .

### 3.1.3 Bodenphysikalische Parameter

Neben der chemischen Zusammensetzung sind einige bodenphysikalische Parameter wie die Bodenverdichtung wichtig zur Beschreibung der Eigenschaften von Bodensubstraten. Die Bodenverdichtung kann abgeschätzt werden durch Messen der Lagerungsdichte und des mechanischen Widerstandes (Tab. 3-7). Die Lagerungsdichte oder „scheinbare Dichte“ ist das Verhältnis zwischen Trockenmasse und Lagerungsvolumen eines Bodens und variiert zwischen  $0.5$  und  $1.8 \text{ g cm}^{-3}$  (Gisi, 1990).

	Gartenerde	Schlacke
Wasseraufnahmekapazität ( %, w/w)	66	34
Gesättigte Wasserleitfähigkeit ( $\text{m s}^{-1}$ )	0.02	0.01
Lagerungsdichte [ $\text{g cm}^{-3}$ ]	0.92	1.14
Mechanischer Widerstand [MPa]	0.07	0.2

**Tab. 3-7** Bodenphysikalische Parameter von Gartenerde und Schlacke.

Die Speicherkapazität für Wasser (Wasseraufnahmekapazität) und die gesättigte Wasserleitfähigkeit sind in Schlacke um die Hälfte geringer als in Gartenerde. Dagegen sind sowohl die Lagerungsdichte als auch der mechanische Widerstand in Schlacke im Vergleich zu Gartenerde erhöht, was auf eine höhere Bodenverdichtung hinweist. Das bedeutet eine größere Kraftaufwendung für die Wurzeln bei der Erschließung des Bodensubstrates Schlacke und eine relativ geringere Verfügbarkeit von Wasser.

Für die nachfolgenden Untersuchungen, vor allem die Morphologie und Anatomie des Wurzelsystems, ist es ebenfalls wichtig zu erwähnen, daß MHKW-Schlacke ein inhomogenes Substrat ist, dessen Bodenpartikel stark in der Größe variieren. 40% der Schlacke-Partikel sind größer als 7 mm im Vergleich zu nur 15% in Gartenerde.

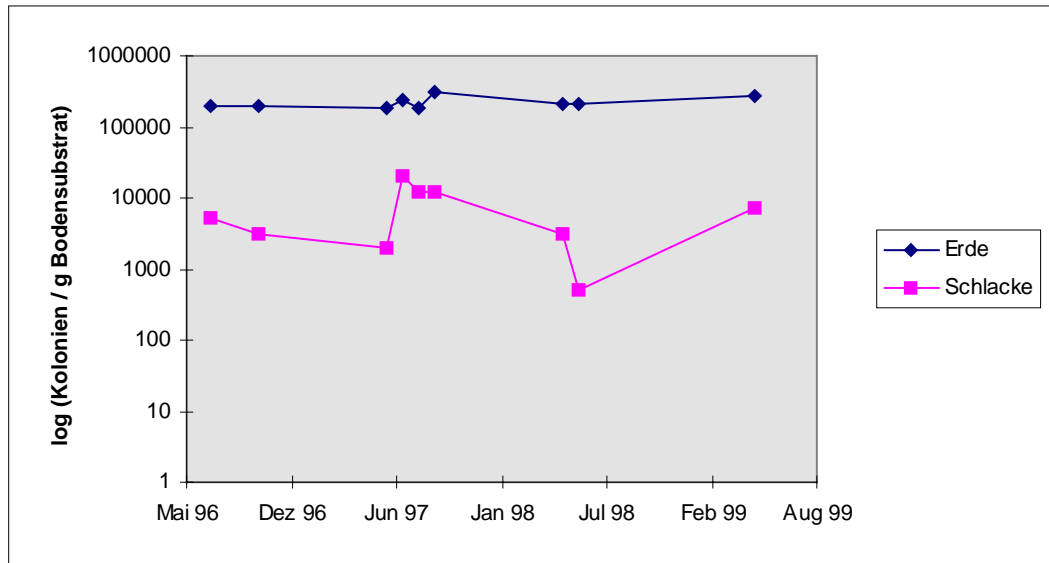
### 3.1.4 Bodenbiologische Faktoren

Die Keimzahl in einem Boden ist ein biologischer Indikator für die Menge an organischen Substraten und die Lebensqualität des Substrats für Mikroben. In einem Freilandversuch wurde in zwei „Sukzessionsbeeten“, eines gefüllt mit Gartenerde, das andere mit Schlacke, die natürliche Wiederbesiedelung von Schlacke mit Mikroben und Pflanzen untersucht (vgl. Methoden 2.2.1.13). In diesem Versuch wurde weder durch künstliche Bewässerung noch durch andere Kultur-fördernde Maßnahmen in das Versuchsgeschehen eingegriffen. Während in Tabelle 3-8 der durchschnittliche Keimgehalt der Bodensubstrate in den Sukzessionsbeeten dargestellt ist, kann man in Abbildung 3-3 Informationen über die zeitliche Entwicklung der Keimzahl erhalten.

	Gartenerde	Schlacke
ohne Pflanzenbewuchs	$2.3 \cdot 10^5 \pm 4 \cdot 10^4$	$7.3 \cdot 10^3 \pm 5.1 \cdot 10^3$
mit Pflanzenbewuchs	$2.45 \cdot 10^5 \pm 4 \cdot 10^4$	$1.2 \cdot 10^4 \pm 8.4 \cdot 10^3$

**Tab. 3-8** *Durchschnittlicher Keimgehalt der Bodensubstrate in den Sukzessionsbeeten; Anzahl der Kolonien pro Gramm Boden.*

Auffallend ist die niedrige Keimzahl der Schlacke im Vergleich zum Kontrollsubstrat Gartenerde (Tab. 3-8, Abb. 3-3).



**Abb. 3-3** Zeitliche Veränderung des Keimgehaltes der Bodensubstrate in den Sukzessionsbeeten.

Wird Schlacke von höheren Pflanzen besiedelt, geben die Wurzeln Exsudate in die Rhizosphäre ab, die dann als Substrat für Bodenmikroben dienen können. Im Vergleich zu Gartenerde bleibt die Keimzahl in Schlacke auch unter diesen Bedingungen sehr niedrig ( $< 5\%$ ). In Abb. 3-4 ist der natürliche Bewuchs der Sukzessionsbeete nach einem 1 Jahr gezeigt. Es wird deutlich, daß im Vergleich zu Gartenerde (Abb. 3-4 A) die Besiedelung des Schlackebeetes (Abb. 3-4 B) mit Pflanzen sehr dünn ist. Auch nach einem Zeitraum von 3 Jahren hat sich an diesem Bild nicht viel verändert. Es konnten hauptsächlich Keimlinge von Rohbodenpionieren oder Pflanzen, die hauptsächlich an trockenen Ruderalstellen (Wegränder, Schuttplätze, Steinbrüche) als Standort anzutreffen sind, gefunden werden (Hanf, 1982):

*Sonchus oleraceus* (Asteraceae)

*Chenopodium album* (Chenopodiaceae)

*Atriplex hortensis* (Chenopodiaceae)

*Tripleurospermum inodorum* (Asteraceae)

*Lactuca serriola* (Asteraceae)

*Oenothera biennis* (Onagraceae)

Zudem erreichten die auf Schlacke gekeimten Arten nur eine geringe Sproßlänge und gelangten meist nicht bis zur Blüte. Im Vergleich zum Schlacke-Sukzessionsbeet war die Artenvielfalt des Erdebeetes wesentlich größer (Abb. 3-4 A). Zusätzlich zu den ebenfalls auf dem Schlackebeet vorkommenden *Sonchus*-, *Chenopodium*- und *Atriplex*-Arten war das Erde-Sukzessionsbeet noch von folgenden Pflanzenarten besiedelt:

*Vicia hirsuta* (Fabaceae)

*Senecio vulgaris* (Asteraceae)

*Lolium perenne* (Poaceae)

*Trifolium pratense* (Fabaceae)

*Sagina procumbens* (Caryophyllaceae)

*Plantago lanceolata* (Plantaginaceae)

*Melilotus spec* (Fabaceae)

Der Versuch bis zum jetzigen Zeitpunkt zeigt, daß für die Wiederbelebung des Bodensubstrates Schlacke ein Zeitraum von drei Jahren zu kurz ist. Schlacke weist selbst nach langer Lagerung im Freiland nur eine äußerst geringe Keimzahl auf, was u. a. durch den alkalischen pH-Wert und den niedrigen Gehalt an organischen Substanzen bedingt ist. Da beim Wachstum von höheren Pflanzen eine Vielzahl von komplexen Interaktionen mit positiver Wirkung zwischen Wurzeln und Mikroorganismen in der Rhizosphäre auftreten (z.B. bei Leguminosen), sollte berücksichtigt werden, daß beim Wachstum von Pflanzen auf Schlacke sich dieser niedrige Keimgehalt negativ auswirken kann.



**Abb. 3-4** *Natürlicher Bewuchs von Gartenerde (A) und Schlacke (B) nach einem Zeitraum von 1 Jahr.*

### 3.1.5 MHKW-Schlacke und Streßfaktoren

Die physiko-chemische und chemische Analyse von MHKW-Schlacke läßt folgende Streßfaktoren beim Wachstum von Pflanzen auf Schlacke erwarten:

	Schlacke	Schlacke-Bodenlösung
Alkalistreß	+	+
Schwermetallstreß	+	-
Stickstoffmangel	+	+
Phosphormangel	-	+
Salzstreß	+	+
Mechanischer Streß	+	-

**Tab. 3-9** *MHKW-Schlacke und Streßfaktoren.*

Der alkalische pH-Wert, die potentiell toxischen Schwermetalle, die schlechte Versorgung mit Phosphor und Stickstoff und die höhere Bodenverdichtung sind während der gesamten Versuchsdauer vorhanden, wohingegen die Salzbelastung im zeitlichen Verlauf der Versuche abnimmt, also nur einen transienten Effekt darstellt. Insgesamt gesehen stellt Schlacke ein Substrat dar, welches eine Vielzahl diverser Streßfaktoren beinhaltet, was die Interpretation eventueller Streßreaktionen erschwert. Dennoch ist eine gewisse Differenzierung dieser multifaktoriellen Streßsituation möglich. Wie bereits erwähnt, kann z.B. die Salzfracht durch mehrmaliges Waschen der Schlacke entfernt werden. Ebenfalls kann die schlechte Nährstoffversorgung der Versuchspflanzen durch entsprechende Düngung (Stickstoff-, Phosphat-Düngung) beseitigt werden.

## 3.2 Allgemeine Charakterisierung der Versuchspflanzen

Als Versuchspflanze für die meisten Experimente wurde *Zea mays* ausgewählt, da Mais eine pflanzenphysiologisch gut untersuchte Spezies ist und somit viele Vergleichsdaten existieren. Zudem ist Mais eine mäßig salztolerante Pflanzenart (Pessaraki, 1994), für die auch Erfahrungen bei der Kultur mit Schlacke als Bodensubstrat existieren (Fuchs, 1995).

### 3.2.1 Äußeres Erscheinungsbild

Prinzipiell kann *Zea mays* auf MHKW-Schlacke bis zur Reife gezogen werden (Fuchs, 1995) (Abb. 3-5 B). Die auf Schlacke gezogenen Pflanzen wachsen deutlich langsamer als die Kontrollpflanzen auf Gartenerde und erreichen im adulten Zustand etwa 65 % der Größe der Kontrolle (Tab. 3-10). Werden die Pflanzen aber regelmäßig mit Poly-Crescal (enthält hauptsächlich Ammonium, Nitrat, Phosphat und Kalium) gedüngt, ist die Größe der Schlacke-Pflanzen kaum noch von der der Kontrolle zu unterscheiden (Abb. 3-5 B), auch wenn der Ertrag (Gewicht Kolben pro Pflanze) bei den Schlacke-Pflanzen deutlich unter dem der Kontrollpflanzen lag (Fuchs, 1995).

Die Ergebnisse zeigen, daß *Zea mays* trotz des vielfachen Stresses, der von MHKW-Schlacke ausgeht, auf dieser dennoch gut wachsen kann. Der hohe Schwermetallgehalt der Schlacke führt nicht zum Tod der Versuchspflanzen, der „Schlacke-Streß“ ist also von den Pflanzen zu bewältigen. Weiterhin wird deutlich, daß die Retardierung des Wachstums auf eine Nährstofflimitierung (vermutlich Phosphat) zurück geht.

Der überwiegende Teil der Versuche dieser Arbeit wurde allerdings nicht mit adulten Mais-Pflanzen durchgeführt, sondern mit 20-25 Tage alten Keimlingen (Abb. 3-5 A).



**Abb. 3-5 A** Topfkultur von *Zea mays*, kultiviert auf Gartenerde (links) und MHKW-Schlacke (rechts). Die Pflanzen sind im Alter von 20 Tagen kurz vor der Ernte aufgenommen.





**Abb. 3-5 B** Einfluß der Düngung auf das Wachstum von *Zea mays*. Reihenfolge von links: Schlacke nicht gedüngt, Schlacke gedüngt, Gartenerde nicht gedüngt, Gartenerde gedüngt.

	Schlacke		Gartenerde	
	nicht gedüngt	gedüngt	nicht gedüngt	gedüngt
Sproßlänge [cm]	65 ± 11	107 ± 11	113 ± 16	111 ± 16
Sproßlänge (Kontrolle = 100%)	59	97	102	100
Chlorophyllgehalt [mg Chl g <sup>-1</sup> FG]	2.7	2.6	1.9	1.8

**Tab. 3-10** Einfluß des Bodensubstrats und der Düngung auf das Wachstum von *Zea mays* (adulter Zustand).

Abbildung 3-5 A: Außer der geringeren Größe der Schlacke-Pflanzen in diesem Entwicklungszustand fällt auf, daß die Blattspreiten ein dunkleres Grün als die Kontrollpflanzen besitzen (vgl. auch Abb. 3-5 B) und rötliche Verfärbung zeigen. Eine Analyse des Chlorophyllgehaltes beweist (Tab. 3-10), daß der Chlorophyllgehalt der Kontrollpflanzen tatsächlich geringer ist als der der Schlacke-Pflanzen. Der höhere Chlorophyllgehalt der Schlacke-Pflanzen deutet ebenso wie die Anreicherung von Anthocyanen auf Phosphatmangel hin (Mengel und Kirkby, 1982).

### 3.2.2 Wachstum

Die 20-tägige Kultur von *Zea mays* auf Schlacke äußert sich zunächst in einem verminderten Längenwachstum sowohl des Sprosses, als auch der Wurzel (Tab. 3-11). Die Sproßlänge von Pflanzen, die in Schlacke gewachsen sind, ist im Vergleich zur Kontrolle um 45 % vermindert, die Wurzellänge ebenso um den Faktor 0.45. Vergleicht man die Biomasse als weiteren Parameter für das Wachstum, so ist das Sproßwachstum stärker eingeschränkt als das Wurzelwachstum. Daraus resultiert ein doppelt so großes Wurzel / Sproß-Verhältnis für Schlacke-Pflanzen als für Erde-Pflanzen.

	Gartenerde	Schlacke
Frischgewicht Sproß [g]	8.38 ± 1.13	2.93 ± 0.92
Sproßlänge [cm]	49.3 ± 9.95	27.5 ± 5.82
Frischgewicht Wurzel [g]	3.70 ± 0.98	2.73 ± 0.91
Wurzellänge [cm]	63.2 ± 5.81	35.2 ± 4.17
Wurzel/Sproß-Verhältnis	0.44	0.93

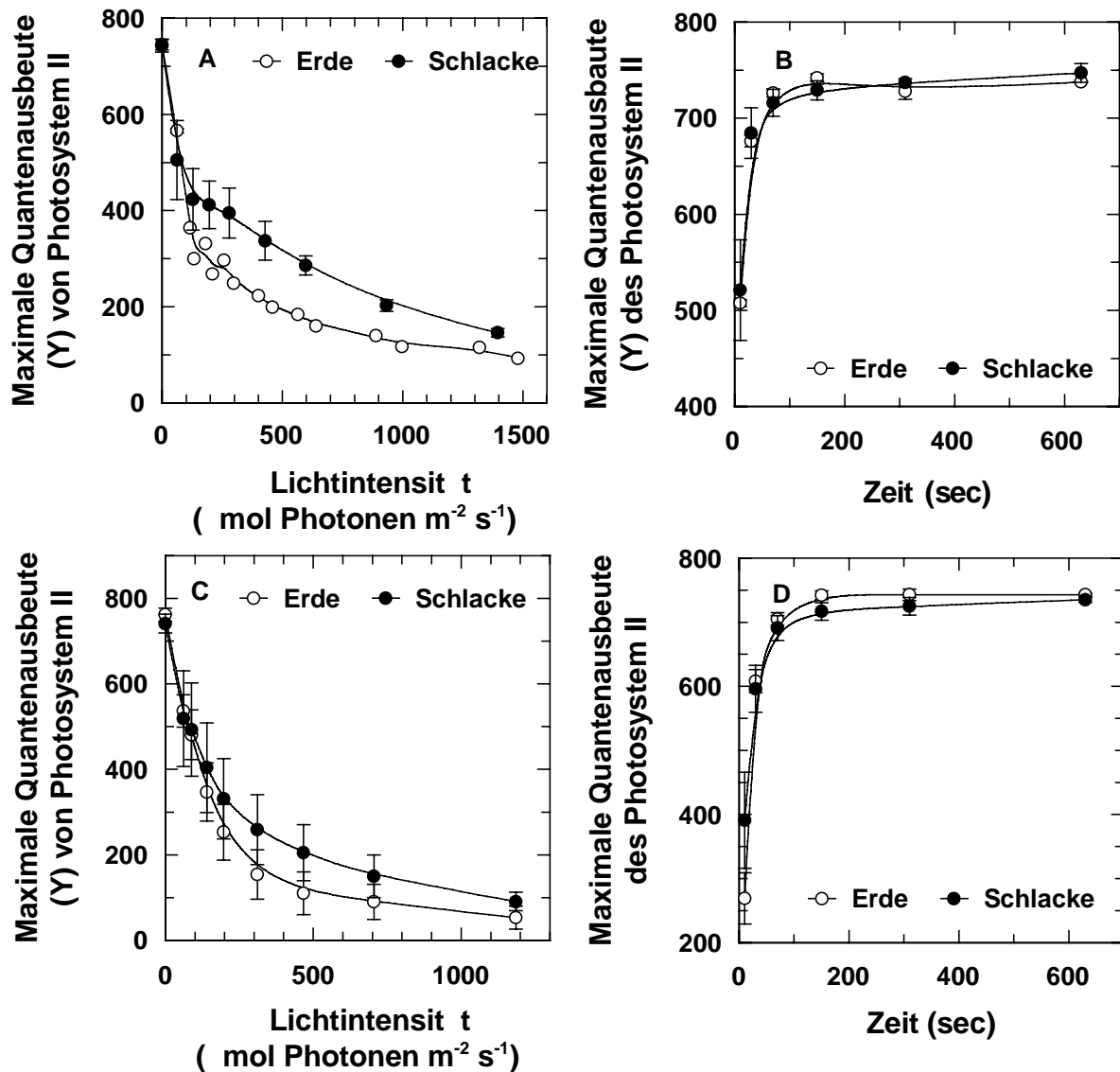
**Tab. 3-11** Wachstumsparameter von Sproß und Wurzel von auf Gartenerde und Schlacke gewachsenem Mais.

### 3.2.2.1 Photosynthese

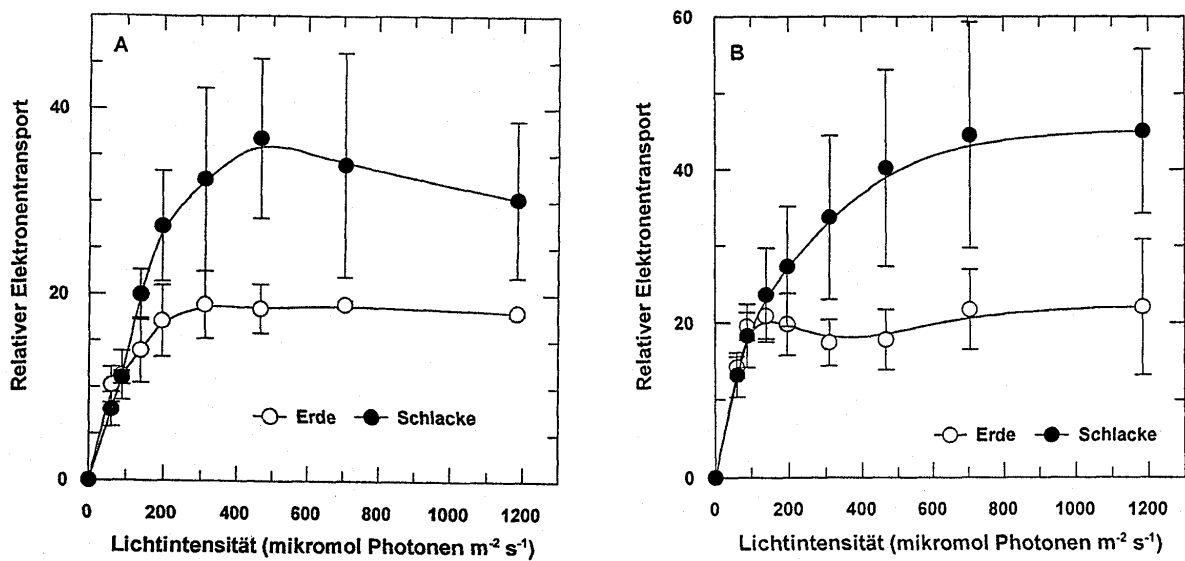
Auch wenn die Wurzel im Zentrum der Untersuchungen über den Einfluß der Streßfaktoren der Schlacke auf Mais-Pflanzen stand, so war es doch von Interesse zu untersuchen, ob der photosynthetische Apparat und damit die Energieversorgung von Mais durch Kultur auf Schlacke negativ beeinflußt wird. Deshalb wurde mit Hilfe der Mini-PAM-Technik die maximale Quantenausbeute des Photosystem II (Yield) und die Lichtabhängigkeit des photosynthetischen Elektronentransportes untersucht. Die Quantenausbeute (Y) des Photosystems II in dunkeladaptierten Mais-Pflanzen ist in Schlacke- und Kontrollpflanzen gleich (Abb. 3-6 B, D). Mit steigender Lichtintensität fällt Y stark ab. Dieser Abfall ist in den Kontrollpflanzen signifikant stärker als in den Schlacke-Pflanzen. Das bedeutet, daß bei Belichtung die primären Elektronenakzeptoren des Photosystems II bei Schlacke-Pflanzen in einem stärkeren Ausmaß in reduziertem Zustand vorliegen als in den Kontrollpflanzen. Kein Unterschied ist für Y zu erkennen, wenn die Pflanzen vor Messung der Lichtintensitätskurve nicht an Dunkolverhältnisse adaptiert wird (nicht gezeigt).

Die Abhängigkeit der photosynthetischen Elektronentransportrate von der Lichtintensität zeigt eine signifikant höhere Lichtsättigung des Elektronentransportes der Schlacke-Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Abb. 3-6 A, C). Bei niedriger Lichtintensität sind die Elektronentransportraten gleich.

Die Ergebnisse beweisen, daß die photosynthetische Maschinerie von *Zea mays* durch Kultur auf Schlacke keinesfalls geschädigt wird. Vielmehr ist sie sogar leistungsfähiger als die der Kontrollpflanzen.



**Abb. 3-6** Maximale Quantenausbeute des Photosystems II als Funktion der Lichtintensität (links) und Erholung dieses Parameters im Dunkeln (rechts) von *Zea mays*, kultiviert auf Gartenerde bzw. Schlacke. Die Datenpunkte sind Mittelwerte aus 4 Meßserien (zwei verschiedene Pflanzen, je zwei Serien). Die obere Reihe der Abbildungen (A, B) stammt aus einem Versuch, bei dem die Quantenausbeute jeweils nach 30 Sekunden Belichtung gemessen wurde, die untere Reihe (C, D) aus einem Versuch, in dem die Quantenausbeute nach 1 Min. Belichtung gemessen wurde.



**Abb. 3-7** Relativer photosynthetischer Elektronentransport von *Zea mays* als Funktion der Lichtintensität (dunkeladaptierte Pflanzen); (A) Pflanzen wurden 30 Sekunden an die jeweilige Lichtintensität adaptiert; (B) die Messung bei neuer Lichtintensität erfolgte nach 1 Min. Adaptation; sonstige Versuchsbedingungen vgl. Abb. 3-6.

### 3.2.3 Ernährungszustand

Die chemische Analyse von pflanzlichem Gewebe kann als Indikator für den Gesundheitszustand und die Mineralstoffversorgung der Versuchspflanzen herangezogen werden. Nährstoffmangel oder toxische Konzentrationen können so erkannt werden. Zur Beurteilung der für Mais ermittelten Werte werden diese im Folgenden mit Literaturdaten verglichen. In Tab. 3-12 sind zunächst die in pflanzlichen Geweben als kritisch, normal und toxisch geltenden Literaturwerte dargestellt.

	Kritische Gehalte <sup>1)</sup> mg kg <sup>-1</sup> TG	Normaler Bereich <sup>2)</sup> mg kg <sup>-1</sup> TG	Toxischer Bereich <sup>3)</sup> mg kg <sup>-1</sup> TG
<b>Makronährstoffe</b>			
Stickstoff		20000-50000	Spez. Überschuß nicht bekannt
Schwefel		1000-5000	Spez. Überschuß nicht bekannt
Phosphor		1300-6500	Spez. Überschuß nicht bekannt
Magnesium		1500-8000	Spez. Überschuß nicht bekannt
Calcium	Ohne Bedeutung	1000-70000	Spez. Überschuß nicht bekannt
Kalium		5000-60000	Spez. Überschuß nicht bekannt
<b>Mikronährstoffe</b>			
Eisen	50-150	150-500	> 500
Mangan	10-20	25-500	200-5300
Kupfer	1-5	4-20	20-30
Zink	15-20	15-100	> 100-200
Nickel		0.1-10	10-200
Molybdän	0.1-1	0.1-2	5-100
Bor	5-100	5-100	100-400
Chlor	1-6	2700-15000	3500-30000
<b>Andere Elemente</b>			
Natrium	Weitgehend unbekannt	200-5300	
Silicium	Weitgehend unbekannt	1800-3400	
Kobalt	Weitgehend unbekannt	0.05-0.5	0.4-20
Selen	Weitgehend unbekannt	0.02-2	> 5-20
Aluminium	Weitgehend unbekannt	200-500	
Jod	Weitgehend unbekannt	0-0.5	> 8
Fluor	Weitgehend unbekannt	2-20	> 50
Brom	Weitgehend unbekannt	15-260	> 2000
Vanadium	Weitgehend unbekannt	0.1-1	10
<b>Toxische Elemente</b>			
Blei	Existiert nicht	0.1-5	> 5
Chrom	Existiert nicht	0.2-1	1-2
Cadmium	Existiert nicht	0.05-1	0.7-40
Arsen	Existiert nicht	0.1-1	10-20
Zinn	Existiert nicht	0.8-6.0	> 60
Thallium	Existiert nicht	<0.5-5	20-30
Quecksilber	Existiert nicht	0.005-0.01	0.5-1

**Tab. 3-12** Normale, kritische und toxische Gehalte von Elementen in Pflanzen. Zusammenstellung nach Mengel und Kirkby (1982), Hock und Elstner (1984) und Marschner (1995).

- 1) „**Kritische**“ **Gehalte** verursachen im suboptimalen Bereich eine maximal 10%ige Wachstumsreduktion.
- 2) „**Normale**“ **Gehalte** gestatten auf Böden durchschnittlicher Zusammensetzung optimales Wachstum.
- 3) „**Toxische**“ **Gehalte** verursachen im superoptimalen Bereich signifikante Hemmungen und signifikante, spezifische Toxizitätssymptome.

Die Literaturdaten müssen als grobe Orientierungswerte aufgefaßt werden, da die Gehalte stark von Pflanzenart zu Pflanzenart variieren.

### 3.2.3.1 Elementgehalte von Blättern und Wurzeln

	Gartenerde		Schlacke		
		Blatt	Wurzel	Blatt	Wurzel
<b>Makronährstoffe</b>	N	41570 ± 980	20300 ± 410	27930 ± 903	18400 ± 220
	S	1142 ± 122	5455 ± 41.9	1539 ± 178	10512 ± 290
	P	3411 ± 387	4245 ± 2656	1952 ± 352	1390 ± 27.9
	Mg	1154 ± 206	1808 ± 168	911 ± 221	1349 ± 266
	Ca	3497 ± 1085	3600 ± 491	3436 ± 774	8350 ± 2181
	K	37216 ± 4664	35435 ± 4962	26918 ± 3666	29218 ± 2592
<b>Mikronährstoffe</b>	Fe	48.5 ± 15.3	911 ± 348	230 ± 106	2265 ± 1170
	Mn	40.7 ± 16.0	71.2 ± 18.9	27.6 ± 23.8	93.3 ± 32.5
	Cu	4.25 ± 1.60	48.7 ± 16.8	10.9 ± 3.08	205 ± 23.6
	Zn	27.9 ± 11.1	157 ± 44.5	41.4 ± 11.4	462 ± 106
	Ni	n.n.	3.85 ± 3.61	n.n.	7.86 ± 2.69
	Mo	n.n.	0.34 ± 0.34	2.80 ± 0.40	7.88 ± 2.10
	B	18.8 ± 8.06	7.63 ± 4.55	118 ± 33.9	38.2 ± 5.53
<b>andere Elemente</b>	Na	103 ± 55.2	4313 ± 3274	3561 ± 953	12575 ± 5328
	Al	18.4 ± 4.72	1177 ± 508	58.4 ± 27.7	4776 ± 1398
<b>toxische Elemente</b>	Pb	n.n.	16.0 ± 12.1	2.58 ± 2.61	88.2 ± 28.4
	Cr	n.n.	2.63 ± 1.08	n.n.	15.8 ± 5.97
	Cd	n.n.	0.41 ± 0.30	n.n.	1.72 ± 0.20

**Tab. 3-13** Elementgehalte von Blättern und Wurzeln von *Zea mays* (25 Tage alt).  
Alle Angaben in  $\text{mg kg}^{-1}$  Trockengewicht; n.n.: nicht nachweisbar;  
Mittelwerte und Standardabweichung aus 6 Versuchsreihen.

In Bezug auf die Makronährstoffe sind Maispflanzen, die auf Schlacke kultiviert wurden, ausreichend versorgt (Tab. 3-13). Mit Schwefel und Calcium sind die Wurzeln der Schlacke-Pflanzen im Vergleich zu den Erde-Wurzeln sogar über versorgt. Nur die Versorgung mit Phosphor und Stickstoff liegt eher an der unteren Grenze des Normalbereiches. Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen ist der Stickstoff- und Phosphor-Gehalt sowohl der Blätter als auch der Wurzeln von Schlacke-Pflanzen deutlich niedriger. Die Versorgung der Schlacke-Pflanzen mit den essentiellen Mikronährstoffen Kupfer, Zink und Nickel ist ebenfalls ausreichend. Die Gehalte an Molybdän und Bor sind erhöht, aber keinesfalls toxisch.

Trotz des alkalischen pH-Wertes der Schlacke-Bodenlösung, bei dem die Löslichkeit von Eisen-Salzen eingeschränkt ist, was sich auch in den kaum nachweisbaren Fe-Gehalten in der Bodenlösung widerspiegelt (Tab. 3-5), liegen die Fe-Gehalte der Schlacke-Pflanzen im „normalen Bereich“ und sogar höher als die der Kontrolle. Es ist bekannt, daß Gramineen ein hohes Aneignungsvermögen für Eisen haben, indem sie bei Eisenmangel mit der Ausscheidung von nicht proteinogenen Aminosäuren (Phytosiderophoren) reagieren (Römheld und Marschner, 1986). Dieser Mobilisierungseffekt für Eisen scheint hier zum Tragen zu kommen.

Der Natrium-Gehalt der Schlacke-Pflanzen ist stark erhöht. Im Blattgewebe von auf Schlacke kultivierten Pflanzen findet sich eine um den Faktor 30 angereicherte Menge an Natrium im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Als Index für die Natrium-Toxizität kann das Kalium / Natrium-Verhältnis im Gewebe herangezogen werden (Jeschke, 1984). Deshalb sollen hier einige Ionenverhältnisse und Summen von Ionen verglichen werden (Tab. 3-14).

Pflanzenorgan		$K^+ / Na^+$	$Na^+ / Ca^{2+}$	$K^+ + Na^+$ [mmol / kg TG]
Blatt	Erde	213	0.05	959
	Schlacke	4.5	1.8	845
Wurzel	Erde	4.8	2.1	1096
	Schlacke	1.4	2.6	1296

**Tab. 3-14** Ionenverhältnisse und Summe von Kalium plus Natrium von Blatt und Wurzel von auf Erde und Schlacke gezogenen Maispflanzen.



Schlacke-Pflanzen haben sowohl im Blatt als auch in der Wurzel ein niedrigeres  $K^+$  /  $Na^+$ -Verhältnis als die Kontrolle. Das  $K^+$  /  $Na^+$ -Verhältnis wird als Index für die Natrium-Toxizität herangezogen, weil Natrium die Aktivität von Kalium-abhängigen Enzymen beeinträchtigt (Jeschke, 1984). Es ist bekannt, daß unter Salzbelastung das  $K^+$  /  $Na^+$ -Verhältnis ansteigt (Rodriguez et al., 1997). Auch das  $Na^+$  /  $Ca^{2+}$ -Verhältnis ist bei Maispflanzen durch Schlacke-Kultur erhöht. Dieses Verhältnis ist wichtig für die Eigenschaften der Membranen. Je höher das Verhältnis ist, d.h. je mehr Natrium im Vergleich zu Calcium vorhanden ist, um so größer ist der schädliche Einfluß von Natrium auf die Plasmamembran und die Veränderung der Permeabilitätseigenschaften (Cramer und Läuchli, 1986). Die Summe an Kalium und Natrium ist dagegen bei beiden Anzuchten annähernd gleich.

Um die Salztoleranz und die Salzaufnahme von Mais von dem multifaktoriellen System der Schlacke zu differenzieren, wurden in einem Versuch Mais-Pflanzen in Sand kultiviert und täglich mit 100 mM NaCl-haltiger Nährlösung bewässert. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Tab. 3-15 dargestellt.

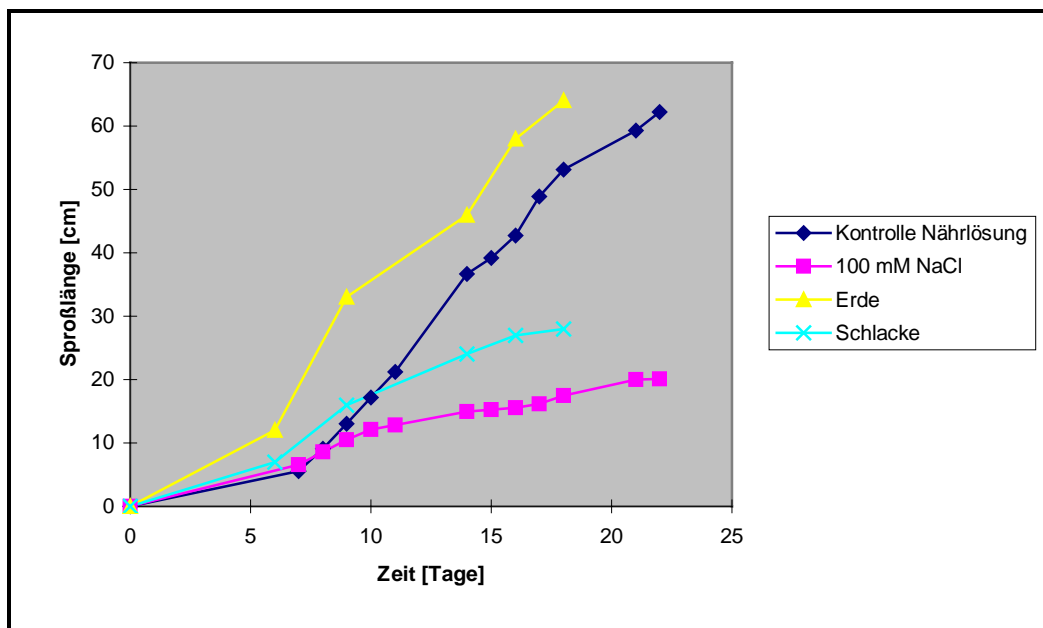
	Calcium	Kalium	Natrium
Kontrolle Nährlösung	3.12 ± 2.62	35.33 ± 4.91	0.21 ± 0.057
100 mM NaCl	1.97 ± 0.28	23.94 ± 2.41	47.29 ± 2.37
Schlacke	3.44 ± 0.77	26.92 ± 3.67	3.56 ± 0.95

**Tab. 3-15** Blattgehalte an Calcium, Kalium und Natrium von auf Nährlösung mit und ohne Salzzusatz und auf Schlacke kultiviertem Mais; Werte in  $g\ kg^{-1}$  TG.

Im Vergleich zu auf Schlacke kultivierten Maispflanzen (3.5 g / kg TG) haben Blätter von Mais, der in Sand mit 100 mM NaCl behandelt wurde, einen Natrium-Gehalt von 47 g pro kg Trockengewicht, wobei ein starker Gradient von den älteren zu den jüngeren Blättern existiert. Dieser Wert ist um den Faktor 13 größer als der Natrium-Gehalt in Schlacke-kultivierten Maisblättern. Trotz des hohen Salzgehaltes in der Bodenlösung von Schlacke (50-250 mM) nehmen die Mais-Pflanzen weitaus weniger Natrium auf, als entsprechende in Sand kultivierte Pflanzen, die mit einer mit 100 mM NaCl angereicherten Nährlösung versorgt wurden.

Vergleicht man das Wachstum von auf Schlacke kultivierten Maispflanzen mit dem von mit 100 mM NaCl- behandelten Sand-Pflanzen, so ist das der Sandkultur stärker

eingeschränkt (Abb. 3-8). Diese Pflanzen erreichten nur eine durchschnittliche Sproßlänge von ca. 20 cm (Schlacke-Pflanzen 28 cm), die Wurzellänge war sogar auf die Hälfte der in Schlacke gewachsenen Pflanzen reduziert (nicht gezeigt). Welche Faktoren zu diesen Unterschieden führen und welche Rolle dabei dem Calcium zukommt, soll später diskutiert werden.



**Abb. 3-8** Vergleich der Wachstumskurven von *Zea mays*, angezogen in verschiedenen Substraten: Sandkultur gegossen mit Nährlösung mit und ohne Salz, Erde und Schlacke.

Von den toxischen Schwermetallen ist nur Blei im Blattgewebe von auf Schlacke kultiviertem Mais signifikant nachweisbar (Tab. 3-13), liegt aber im als „normal“ geltenden Bereich.

Insgesamt zeigt das Wurzelgewebe von Schlacke-Pflanzen eine stärkere Anreicherung an Schwermetallen als die Blätter. Diese Gehalte sind auch deutlich höher als die der Kontrollpflanzen. Da es sich um Gehalte des gesamten Wurzelgewebes handelt, können keine Aussagen über die Lokalisation und somit über die Toxizität gemacht werden, da für die Toxizität von Schwermetallen vor allem der symplastische Anteil ausschlaggebend ist. Die Wurzel enthält aber auch einen nicht zu vernachlässigenden apoplastischen Raum, der mit der Bodenlösung der Rhizosphäre im Gleichgewicht steht.

### 3.2.3.2 Anionenkonzentration

Die Anionenanalyse von Blattmaterial unterstreicht die schlechte Versorgung der Schlacke-kultivierten Pflanzen mit Phosphat (Tab. 3-16). Sie enthalten nur etwa ein Drittel des Phosphatgehaltes wie die Blätter der Erde-Pflanzen. Trotz der hohen NaCl-Konzentration der Schlacke-Bodenlösung ist Chlorid im Vergleich zu Natrium nicht im Blattgewebe angereichert.

	Erde	Schlacke
Chlorid	63.7 ± 3.9	65.7 ± 4.7
Phosphat	8.7 ± 0.12	2.95 ± 0.6
Sulfat	1.7 ± 0.45	5.6 ± 3.5

**Tab. 3-16** Anionenkonzentration in  $\mu\text{mol g}^{-1}$  FG im Blattgewebe von auf Erde und Schlacke kultivierten Maispflanzen.

Ähnliche Verhältnisse zeigt die Anionenbestimmung des Xylemsaftes (Tab. 3-17). Auch hier zeigt sich die schlechtere Phosphatversorgung der auf Schlacke kultivierten Pflanzen. Zudem wird deutlich, daß auch die Nitratkonzentration sehr niedrig ist im Vergleich zu der Kontrolle. Chlorid und Sulfat dagegen sind in beiden Anzuchten in annähernd gleicher Konzentration vorhanden.

	Erde	Schlacke
Chlorid	9.0	11.2
Nitrat	13.9	2.1
Phosphat	3.5	1.5
Sulfat	0.4	0.52

**Tab. 3-17** Anionenkonzentration in mM von Xylemsaft.

### 3.2.4 Morphologie und Anatomie des Wurzelsystems

Da die Wurzel das Pflanzenorgan ist, das in direktem Kontakt mit dem Bodensubstrat steht und somit vorhandenen Streßfaktoren primär ausgesetzt ist, wurde in dieser Arbeit besonderes Augenmerk auf die Wurzel gerichtet. Vergleicht man die Wurzelmorphologie der beiden Anzuchten, so fällt sofort auf, daß die Seitenwurzelbildung und der Feinwurzelanteil der in Schlacke gewachsenen Pflanzen stark eingeschränkt ist. Obroucheva (1992) beobachtete ebenfalls, daß der Verzweigungsgrad sehr empfindlich auf verschiedene Umwelteinflüsse reagiert. Sowohl die chemische Zusammensetzung der Bodenlösung (z.B. Schwermetalle) kann diesen Prozeß beeinflussen (Kahle und Breckle, 1989), als auch Sauerstoffmangel oder mechanische Widerstände (Schack und Hildebrand, 1986). Weiterhin sind die Wurzeln in Schlacke gewachsener Maispflanzen um 10% dicker als die entsprechenden Erde-Wurzeln (Tab. 3-18). Obwohl die Wurzeldicke ein artspezifisches Merkmal ist (Vepraskas, 1994), paßt sie sich den Bedingungen des Bodens an. Hier wird der Einfluß der Bodenstruktur auf das Wachstum und die Morphologie der Wurzel deutlich.

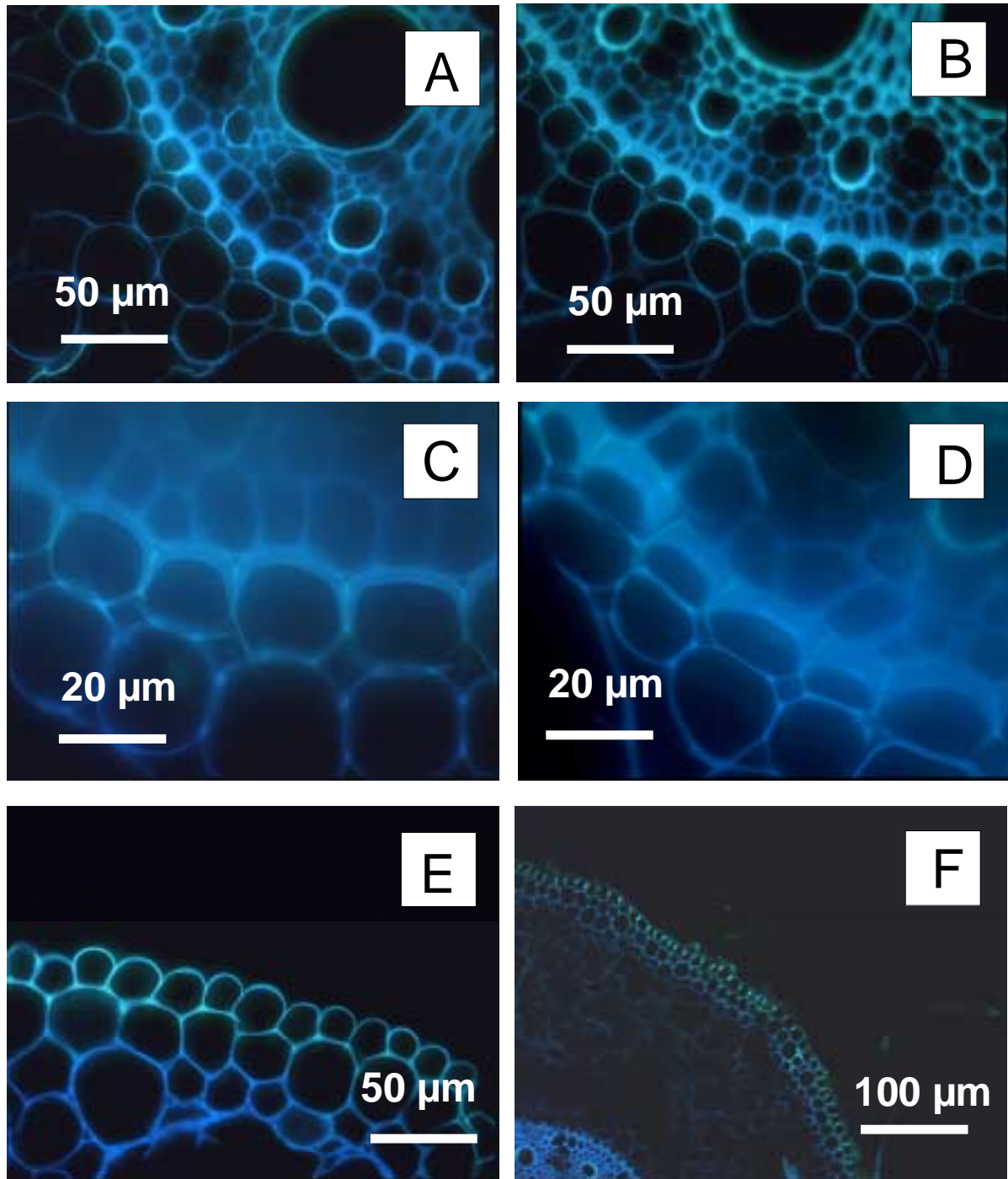
Zur Aufklärung der Anatomie wurden die Wurzeln mikroskopisch untersucht. Hierdurch konnte gezeigt werden, daß die Zunahme des Wurzeldurchmessers bei Schlacke-Kultur auf eine Zunahme der Dicke des Wurzelcortex zurückzuführen ist. Der Durchmesser des Zentralzylinders bleibt gleich.

	Gartenerde	Schlacke
Länge der Seitenwurzeln [cm]	10.2 ± 2.8	1.9 ± 0.7
Wurzeldurchmesser [mm]	1.16 ± 0.11	1.35 ± 0.16
Wurzelcortex [mm]	0.31 ± 0.039	0.44 ± 0.08
Durchmesser des Zentralzylinders [mm]	0.55 ± 0.02	0.55 ± 0.03
Dicke der inneren Tangentialwand der Endodermis [µm]	1.1 ± 0.2	1.9 ± 0.3

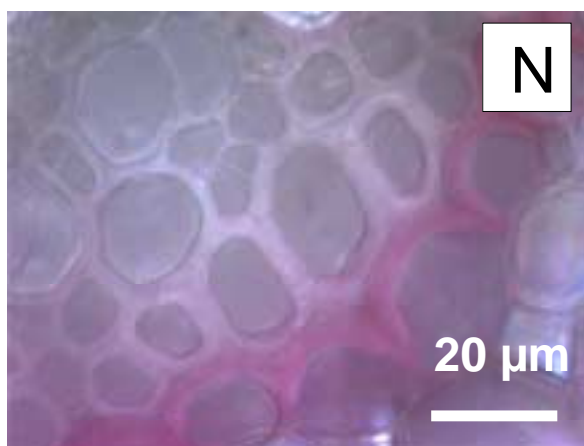
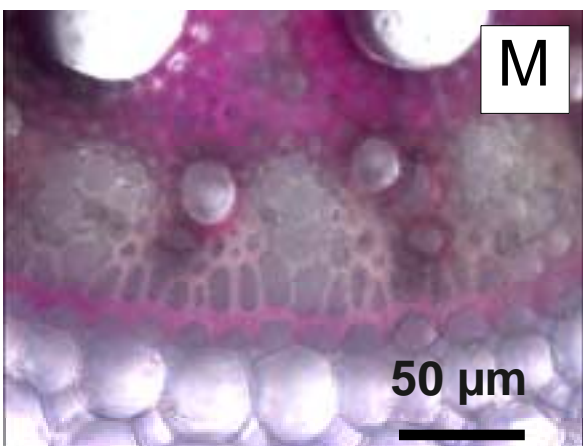
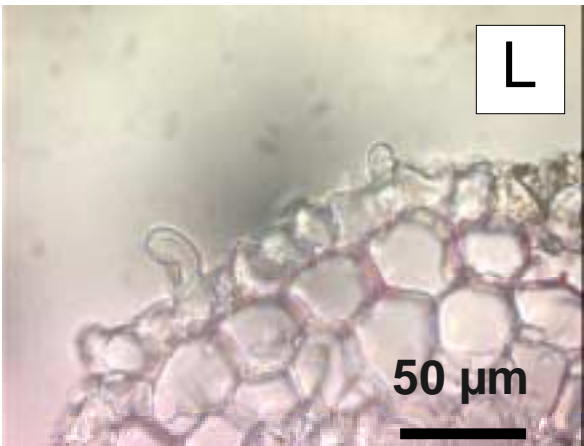
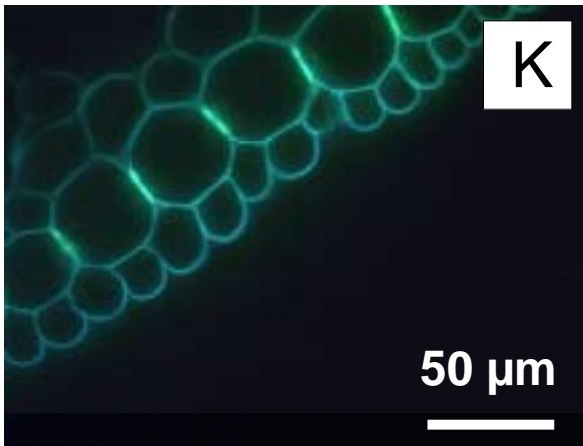
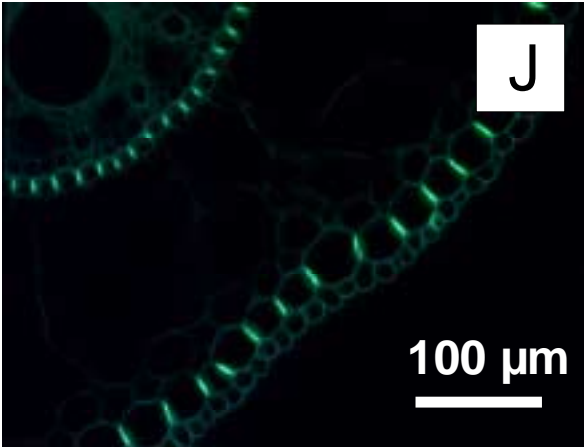
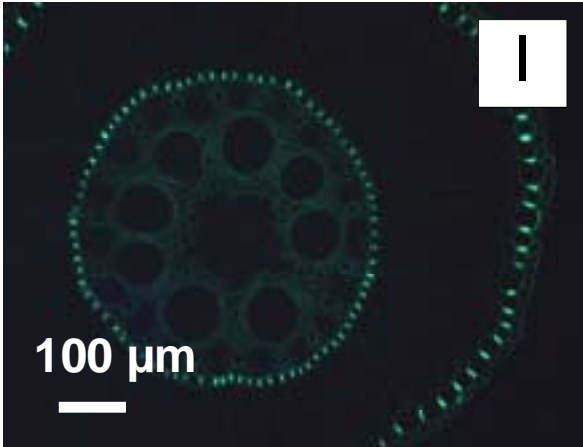
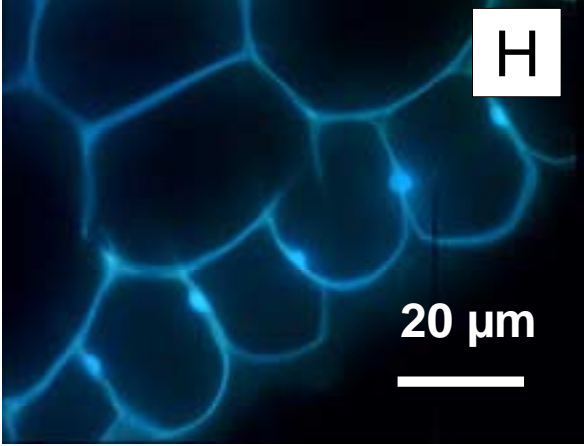
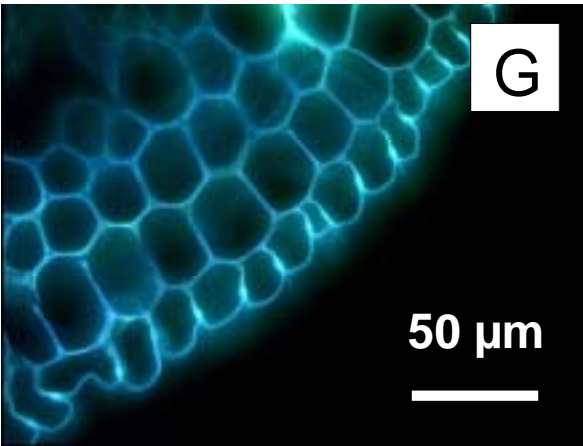
**Tab. 3-18** Parameter zur Wurzelmorphologie und -anatomie.

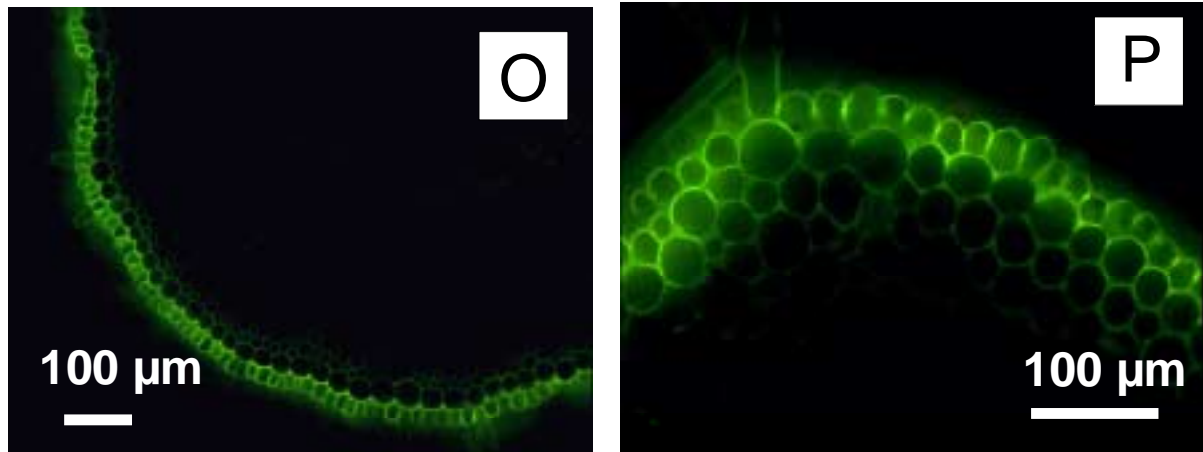
### 3.2.4.1 Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Mikroskopische Untersuchungen von Wurzelabschnitten entsprechenden Alters zeigten, daß durch Wachstum auf Schlacke die U-förmigen Zellwandverdickungen der Endodermis sehr ausgeprägt sind (Abb. 3-9 B, D). Die Endodermis durchläuft im Verlauf der Wurzelentwicklung drei Stadien. Im tertiären Entwicklungszustand lagern Endodermiszellen lignifiziertes Zellwandmaterial auf die Suberinlamelle auf. Diese Auflagerungen sind in Schlacke kultivierten Wurzeln stärker ausgebildet als bei den Kontrollwurzeln (Tab. 3-18). Weiterhin konnten in den radialen Zellwänden der Rhizodermis von Schlacke-Wurzeln Zellwand-Modifikationen ähnlich den Phi-Verdickungen beobachtet werden (Abb. 3-9 F, G, H). Phi-Verdickungen sind Modifikationen der Mittelpartie der radialen Zellwand, die aufgrund ihres Aussehens an den griechischen Buchstaben Phi ( $\phi$ ) erinnern und daher ihren Namen haben.



**Abb. 3-9** Mikroskopische Untersuchungen zur Wurzelanatomie von *Zea mays* gewachsen auf Gartenerde und MHKW-Schlacke, Wurzelquerschnitte; (A) - (H) Eigenfluoreszenz (Anregungswellenlänge 395 nm), Gefriermikrotomschnitte; (I) - (K) Berberin-Toluidinblaufärbung (Fluoreszenzmikroskopie, Anregungswellenlänge 460 nm); (L) Sudan III-Färbung, Durchlichtmikroskopie; (M) - (N) Phloroglucin-Färbung, Durchlichtmikroskopie, Handschnitte; (O) - (P) Berberin/KSCN-Färbung (Fluoreszenzmikroskopie, Anregungswellenlänge 460 nm), Handschnitte;





(A) Querschnitt ca. 5 cm unterhalb der Wurzelbasis; Zentralzylinder mit angrenzender Endodermis im tertiären Zustand, Kontrolle, 400-fache Vergrößerung; (B) entsprechender Wurzelabschnitt wie bei (A) von Schlackewurzeln; U-förmige Verdickungen der tertiären Endodermis sind stärker ausgeprägt als bei der Kontrollwurzel; Quantifizierung siehe Tab. 3-15; (C) wie (A) Kontrolle, Endodermis, 1000-fache Vergrößerung, Ölimmersion; (D) wie (B) Schlackewurzel, Endodermis, 1000-fache Vergrößerung, Ölimmersion; (E) Kontrolle, Rhizodermis ohne Zellwandverdickungen, 400x; (F) Schlacke-Kultur, Rhizodermis mit Phi-Verdickungen, 200x; (G) wie (F), 400x; (H) wie (F), 1000x, Ölimmersion; (I) Schlacke-Kultur, Casparysche Streifen in der Hypodermis (=Exodermis) und Endodermis, 100x; (J) wie (I), 400x; (K) wie (I), Casparystreifen in der Hypodermis, 1000x, Ölimmersion; (L) Rotfärbung der Suberinlamelle in der Hypodermis mit Sudan III; (M) Schlacke-Kultur, lignifizierte U-förmige Verdickungen der tertiären Endodermis sind rot gefärbt, auch verholzte Teile des Xylems, 400x; (N) wie (M), 1000x, Ölimmersion; (O) Schlacke-Kultur, Phi-Verdickungen in der Rhizodermis werden von Berberin-Hemisulfat durchdrungen, Exodermis dagegen nicht, 100x; (P) wie (O), 200x;



Bei den in der Literatur genannten dikotylen Pflanzenarten (z.B. *Pelargonium*, *Malus*, *Pyrus*) stellen die Phi-Verdickungen reguläre Strukturen der Zellwand dar, d.h. es sind keine speziellen Anzuchtbedingungen notwendig, um die Bildung zu induzieren. Praktikakis et al. (1998) beschreibt jedoch Phi-Verdickungen in *Ceratonia siliqua*, die nur beobachtet werden konnten, wenn die Pflanzen direkt in Boden kultiviert wurden, nicht aber in Perlit-Kultur. Im Fall von *Zea mays* konnten die Zellwand-Modifikationen nur bei Anzucht in Schlacke nachgewiesen werden.

Das verwendete Bodensubstrat stellt also einen wichtigen Parameter für das Auftreten der Zellwandverdickungen dar. An dieser Stelle muß ebenfalls erwähnt werden, daß im Gegensatz zu den anderen genannten Beispielen, die Ausbildung der Phi-Verdickungen während den hier herrschenden Versuchsbedingungen nicht durchgängig war, weder longitudinal noch tangential. Das bedeutet, daß diese Zellwandverdickungen nicht kontinuierlich von der Wurzelspitze bis hin zur Wurzelbasis auftraten, sondern nur im oberen Drittel, also im ältesten Wurzelabschnitt gefunden wurden. Auch entlang der Wurzelperipherie waren die Phi-Verdickungen nicht durchgängig zu beobachten. Die Häufigkeit variierte zwischen 5 und 50 benachbarten Rhizodermiszellen. Versuche, die Phi-Verdickungen durch verschiedene Behandlungen zu induzieren, schlugen fehl. Durch Anzucht in Hydrokultur oder in Sand als Trägermaterial mit 100 - 200 mM NaCl in der Nährlösung (Induktion durch Salz) konnten keine Phi-Verdickungen beobachtet werden genauso wenig wie durch Wachstumsversuche in Gefäßen mit Glaskugeln verschiedener Größe (Induktion durch mechanischen Streß). Die genaue Ursache für das Auftreten der Phi-Verdickungen konnte leider nicht geklärt werden.

#### **3.2.4.2 Permeabilitätsstudien**

In weiteren Versuchen wurde getestet, ob die Phi-Verdickungen eine Bedeutung für die Durchlässigkeit der Zellwand gegenüber Substanzen in der Bodenlösung haben. So wurden die Permeabilitätseigenschaften durch Anwendung des apoplastischen Farbstoffes Berberin-Hemisulfat (vgl. 2.2.2.3) geprüft. Berberin permeiert radial in Wurzeln und bildet mit Kalium-thiocyanat fluoreszierende Kristalle. Über die Fluoreszenz kann das Eindringen des Farbstoffes empfindlich verfolgt werden. In Abb. 3-9 (P) wird ersichtlich, daß die Phi-Verdickungen von Berberin-Hemisulfat

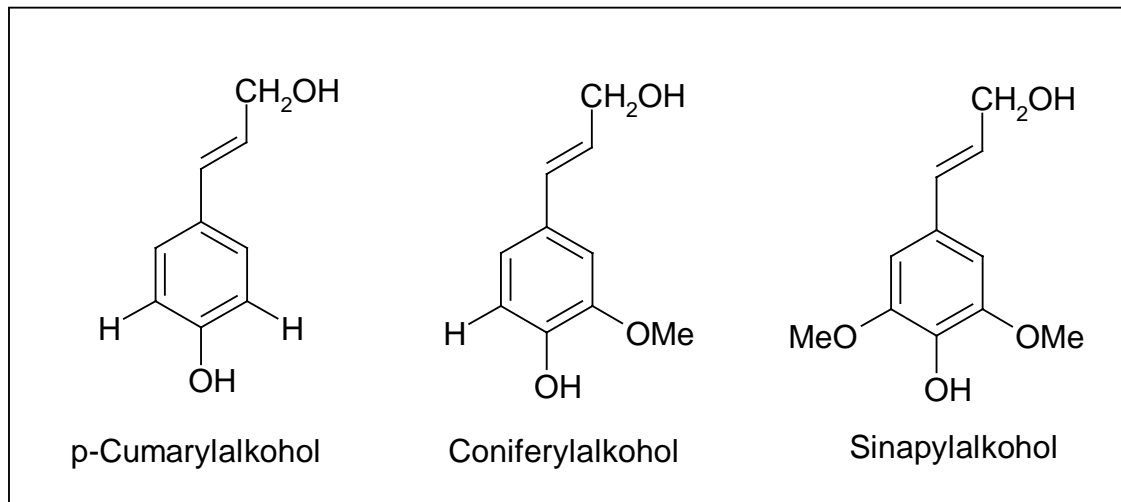
durchdrungen werden, sie also für den Einwärtsstrom keine Barriere darstellen. Dennoch gelangt der Farbstoff nicht bis zur Endodermis, sondern wird bereits in der Hypodermis gestoppt, die bei Mais als eine typische Exodermis ausgeprägt ist. Nach Peterson und Perumalla (1990) ist eine Exodermis eine Hypodermis mit Casparystreifen. Die Existenz der Exodermis in Maiswurzeln wird in Abb. 3-9 (I)-(L) deutlich. Im Gegensatz zu den Casparystreifen der Exodermis sind die Phi-Verdickungen der Rhizodermis also permeabel für den apoplastischen Farbstoff Berberin-Hemisulfat.

### 3.2.5 Chemische Zusammensetzung der Zellwände

Aufgrund der oben beschriebenen Veränderungen der rhizodermalen und endodermalen Zellwände der Wurzeln von Schlacke-kultiviertem Mais, wurden entsprechende Wurzelsegmente der beiden Anzuchten (Gartenerde und Schlacke) von *Zea mays* einem enzymatischen Verdauungsprozeß unterzogen, der es ermöglicht, rhizodermale und endodermale Zellwände von denen des Zentralzylinders zu trennen (Schreiber et al., 1994). Dabei wird der Wurzelcortex von Cellulasen und Pectinasen aufgelöst, lignifizierte und suberinisierte Zellwände bleiben vom Verdauungsprozeß unangetastet. Anschließend wurden die gewonnenen Zellwandisolate chemischen Abbaureaktionen unterworfen, um Aufschluß über die Zusammensetzung des Zellwandmaterials zu erhalten, was für die Interpretation der strukturellen Veränderungen hilfreich sein kann.

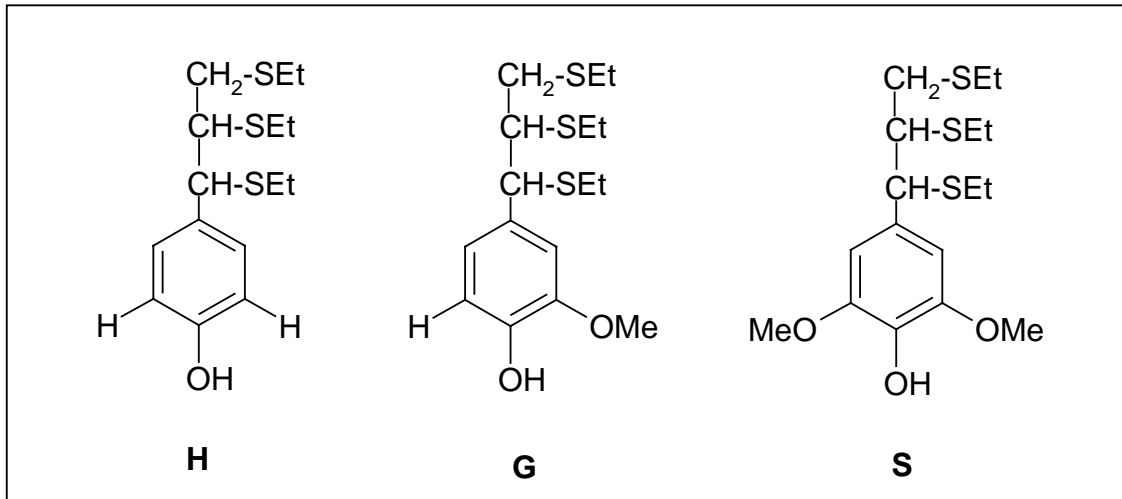
### 3.2.5.1 Lignin

Mit Hilfe der Thioacidolyse (vgl. 2.2.3.2) kann die Menge und Zusammensetzung von Ligninen in den Zellwandfraktionen bestimmt werden (Rolando et al., 1992). Das Ligninmolekül ist ein Mischpolymer, das aus den Zimtsäurederivaten p-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol (Monolignole) aufgebaut ist. Die Monolignole unterscheiden sich durch den Grad der Methoxylierung am Benzolring (Abb. 3-10).



**Abb. 3-10** Monolignole.

Bei der säurekatalysierten Solvolysereaktion werden spezifisch  $\beta$ -O-4-Aryletherbindungen gespalten und es entstehen die trithioethylierten Phenylpropanderivate, die entsprechend ihrem aromatischen Kern als p-Hydroxyphenyl (H), Guaiacyl (G) und Syringyl (S) bezeichnet werden (Abb. 3-11). Die Zusammensetzung des Lignins ist von Pflanzenart zu Pflanzenart unterschiedlich. Die strukturelle Heterogenität verschiedener Lignine kommt durch unterschiedliche Anteile an H-, G- und S-Bausteinen im Polymer zustande. Typisch für Gymnospermenholz ist der hohe Anteil an Coniferylalkoholen (= G-Anteil), während für Lignin von Laubhölzern ein hoher Sinapylanteil (= S-Anteil) charakteristisch ist. Allgemein besteht Dikotyledonenholz aus G- und S-Einheiten, Monokotyledonenholz dagegen aus einem Gemisch von H-, G- und S-Einheiten (Boudet et al., 1995). Typische Funktionen für Lignin in der Pflanze sind die mechanische Stabilisierung (Festigungselemente wie Holzfasern und Verholzung der Fernleitungsbahnen) und die Pathogenabwehr (physikalische Barriere für Mikroorganismen) (Schopfer und Brennicke, 1999).



**Abb. 3-11** Hauptabbauprodukte von Lignin erhalten nach der Thioacidolyse: trithioethylierte Phenylpropanderivate *p*-Hydroxyphenyl (H), Guaiacyl (G), Syringyl (S).

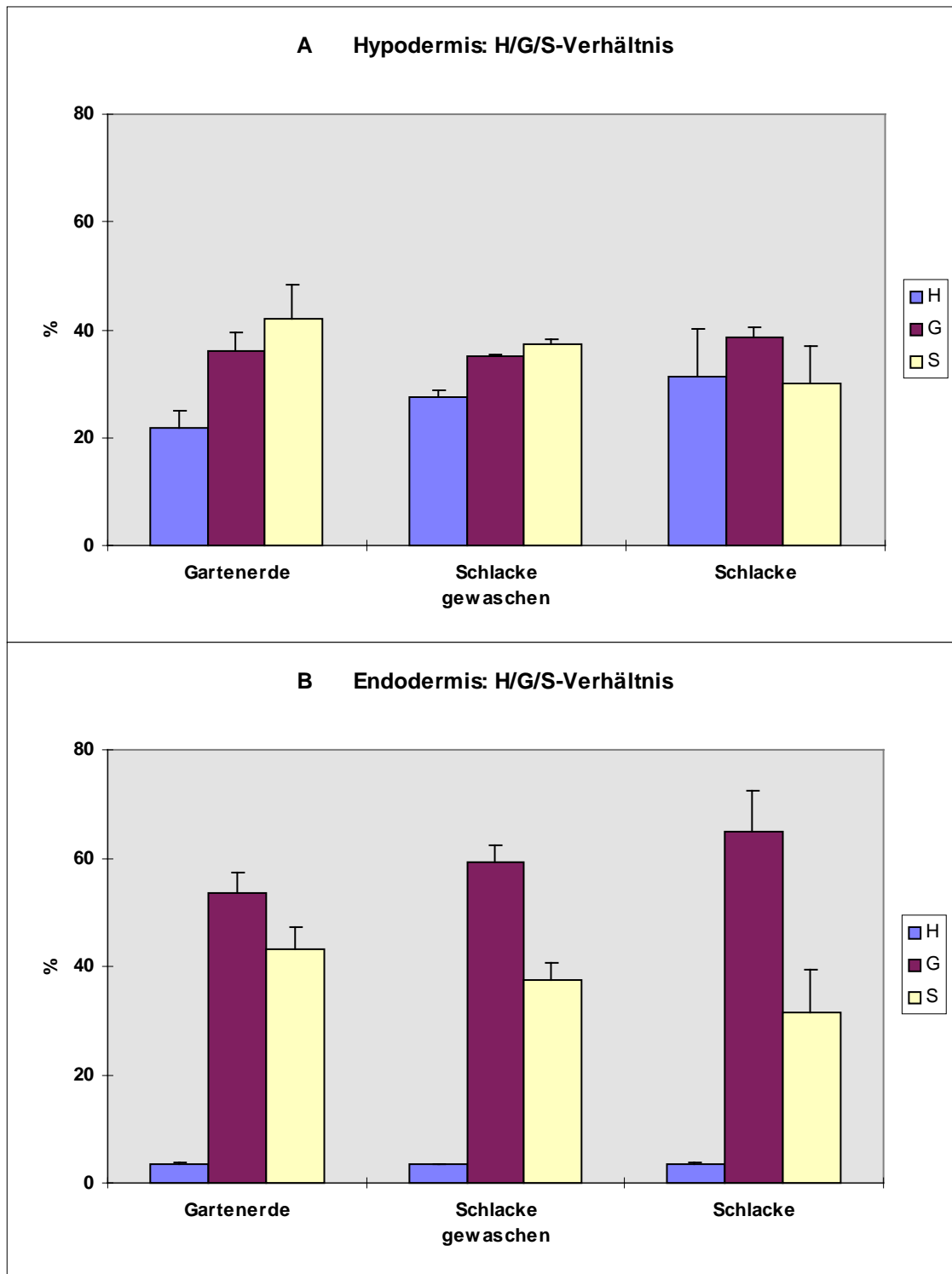
Gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen der Thioacidolyse-Produkte der isolierten Zellwandfraktionen ergaben, daß in der Hypodermis-Zellwandfraktion der verschiedenen Anzuchten keine Unterschiede bezüglich des Gesamtlignin-Gehaltes auftraten, daß aber die endodermalen Zellwände von auf Schlacke kultivierten Pflanzen einen höheren Gehalt an Gesamtlignin aufweisen als die vergleichbaren Zellwände der Kontrollwurzeln (Tab. 3-19). Ein ähnlicher Unterschied ergab sich ebenso zwischen unbehandelter und gewaschener Schlacke. Ein Hauptunterschied zwischen beiden Bodensubstraten ist, wie bereits erwähnt, der Salzgehalt. Wenn Schlacke mit dem dreifachen Volumen an Wasser gewaschen wird, wird ein Großteil der Salzfracht entfernt, da Alkalichloride relativ leicht löslich sind. Die Ergebnisse zeigen also, daß der Salzgehalt des Bodensubstrates einen Einfluß auf den Ligningehalt der Endodermis hat.

Dieses Ergebnis steht mit den mikroskopischen Beobachtungen in Einklang.

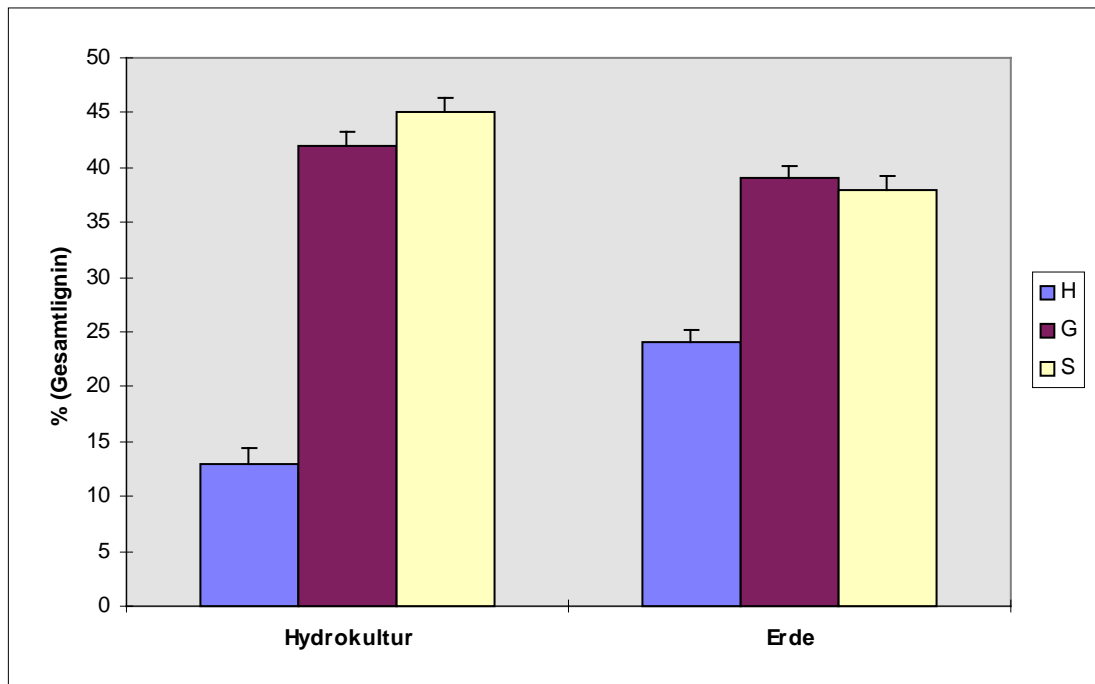
	Gartenerde	Schlacke gewaschen	Schlacke
HCW	26.8 ± 9.0	24.5 ± 0.4	24.4 ± 2.1
ECW	20.0 ± 5.6	21.8 ± 5	27.7 ± 5.3

**Tab. 3-19** Gesamtgehalt an Lignin von hypodermalen (HCW) und endodermalen (ECW) Zellwandisolaten erhalten nach Thioacidolyse. Angaben in  $\mu\text{g}$  Lignin pro mg Trockengewicht. Die Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen dar.

Nicht nur der Gesamtgehalt an Lignin, sondern auch die Veränderung des Verhältnisses der einzelnen Ligninkomponenten kann die strukturellen Eigenschaften der Zellwände beeinflussen. Die chromatographischen Daten zeigen einen erheblichen Unterschied in der Ligninzusammensetzung zwischen Hypodermis und Endodermis (Abb. 3-12). Auffällig ist der erhöhte Gehalt des H-Monomers in den hypodermalen gegenüber den endodermalen Zellwänden. Das H-Monomer ist in den Zellwänden der Hypodermis mit 20-30 % vertreten, wohingegen der Anteil in ECW nur 5 % ausmacht. Der Unterschied zwischen den Zellwänden bei verschiedenen Kulturbedingungen ist dagegen geringer. Obwohl das Kultursubstrat keinen Einfluß auf den Gesamtgehalt von Lignin der hypodermalen Zellwände hatte, zeigte sich dennoch ein Unterschied in dem Verhältnis der monomeren Lignineinheiten. Das Wachstum auf Schlacke bedingte einen höheren Anteil der H-Einheit in der Zellwand der Hypodermis. Vergleicht man diese Ergebnisse mit Daten von in Hydrokultur angezogenem Mais (Zeier, 1998), so stellt man fest, daß der Anteil der H-Komponente in den Zellwänden der Hypodermis von in Gartenerde angezogenen Maispflanzen höher ist als in Hydrokultur (Abb. 3-13). Das läßt vermuten, daß der Anteil des H-Monomers abhängig ist von den Eigenschaften des Kulturmediums im Hinblick auf die Verdichtung und den Eindringwiderstand für die wachsenden Wurzeln. Auch der Anteil des G-Monomers in der Endodermis ist in den Schlacke-Wurzeln gegenüber den Kontroll-Wurzeln leicht erhöht. Dennoch stellt die G-Einheit bei allen drei Anzuchten das vorherrschende Monomer in der Endodermis dar. In der Hypodermis sind die Verhältnisse der drei Monomere gleichmäßiger.



**Abb. 3-12** Monomere Lignin-Einheiten von Zellwänden der Hypodermis (A) und Endodermis (B) erhalten nach Thioacidolyse und chromatographischer Analyse; H (*p*-Hydroxyphenyl), G (Guaiacyl), S (Syringyl). Mittelwerte und Standardabweichung aus 3 Experimenten.



**Abb. 3-13** H/G/S-Verhältnisse der rhizodermalen / hypodermalen Zellwände von in Hydrokultur und Gartenerde gewachsenen Maiswurzeln; Angaben in Prozent des Gesamtlignins. Die Hydrokultur-Ergebnisse stammen aus einer Kooperation mit Jürgen Zeier (Universität Würzburg).

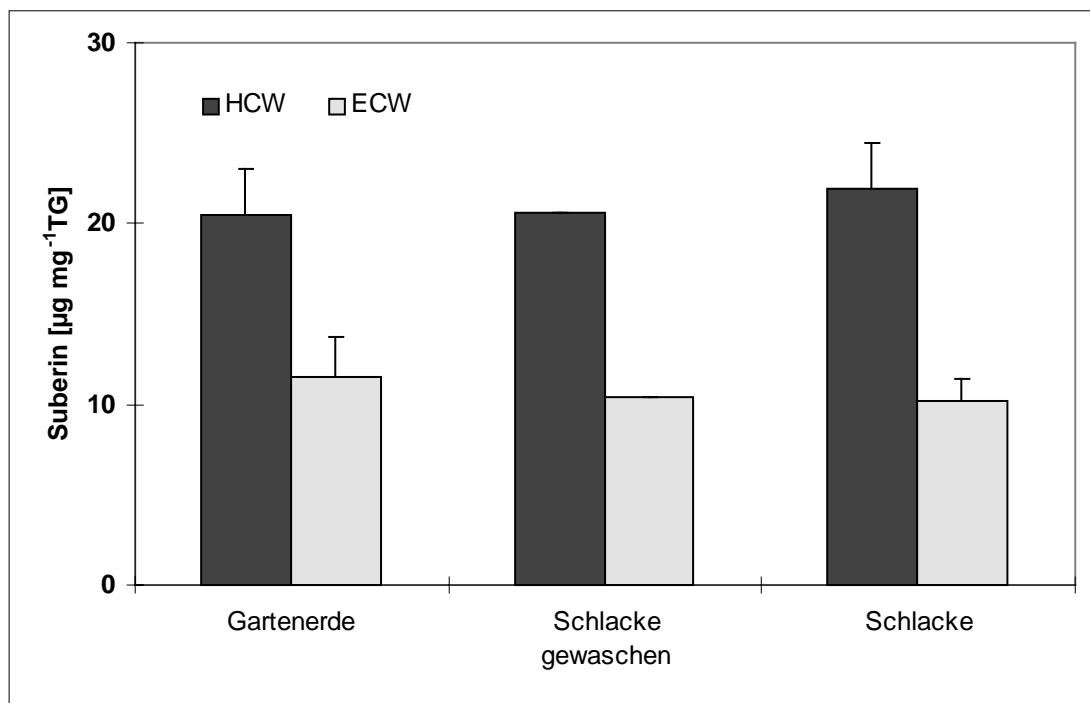
### 3.2.5.2 Suberin

Unter dem Begriff Suberin sind verschiedene Substanzklassen zusammengefaßt. Suberin ist ein unlösliches Polymer, das sich aus aliphatischen und aromatischen (phenolischen) Bereichen zusammensetzt. Das aliphatische Suberin setzt sich hauptsächlich aus langkettigen ( $C_{16}$ - $C_{32}$ ) Fettsäuren,  $\omega$ -Hydroxy-Dicarbonsäuren, Dicarbonsäuren und Alkoholen zusammen (Kolattukudy und Agrawal, 1984). Die aromatische Domäne stellt sowohl bezüglich der monomeren Zusammensetzung, als auch bezüglich des Verknüpfungsmusters der Monomere ein dem Lignin entsprechendes Polymer dar (Lapierre et al., 1996).

Die Gesamtgehalte an Suberin in Hypodermis- und Endodermis-Zellwänden bei den verschiedenen Anzuchten unterscheiden sich im Gegensatz zum Lignin nur geringfügig. Diese Daten stimmen mit Hydrokultur-Anzuchten überein, bei denen der Einfluß verschiedener Faktoren auf die Suberinbildung untersucht ( $NaCl$ ,  $CdCl_2$ , PEG) (Zeier, 1998) und kein Unterschied festgestellt wurde. Ebenso konnte kein Effekt von Schlacke-Kultur auf den hypodermalen Gesamtgehalt an Suberin nachgewiesen werden (Abb. 3-14). Dagegen sind die Unterschiede zwischen hypodermalen und endodermalen Zellwänden enorm. Die Zellwände der Hypodermis

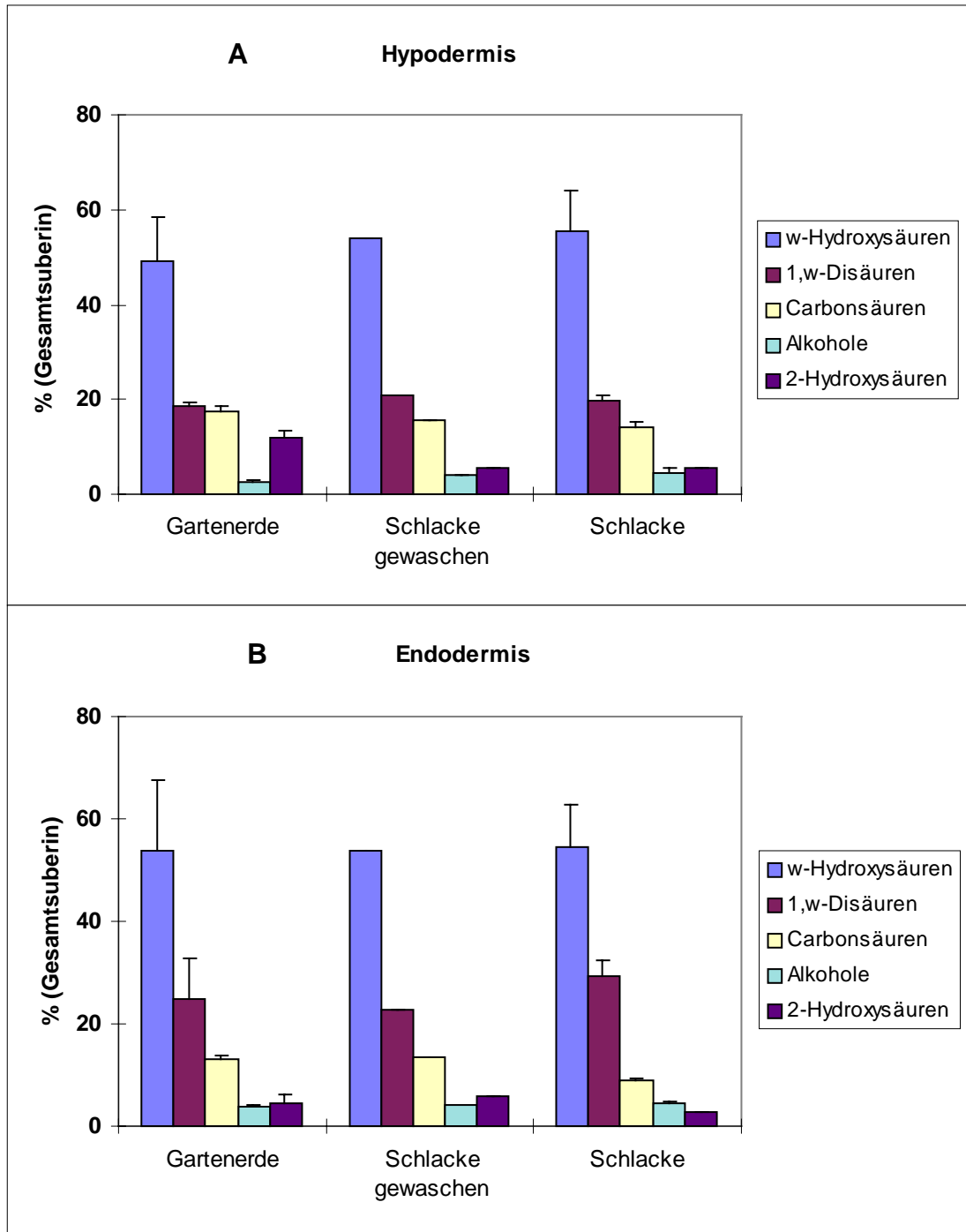
zeigen signifikant höhere Werte an Suberin als die endodermalen Zellwände. Dieses Ergebnis unterstreicht die physiologische Funktion der Hypodermis als Barriere für hydrophile Verbindungen und Mikroorganismen.

Neben dem Gesamtgehalt an Suberin wurde auch untersucht, ob durch die verschiedenen Anzuchtbedingungen die spezifische Zusammensetzung der Suberinfraction geändert wird. Aus Abbildung 3-15 wird deutlich, daß das nicht der Fall ist. Obwohl gewisse Unterschiede in der Suberin-Zusammensetzung zwischen hypodermalen und endodermalen Zellwänden bestehen, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Anzuchten festgestellt werden.



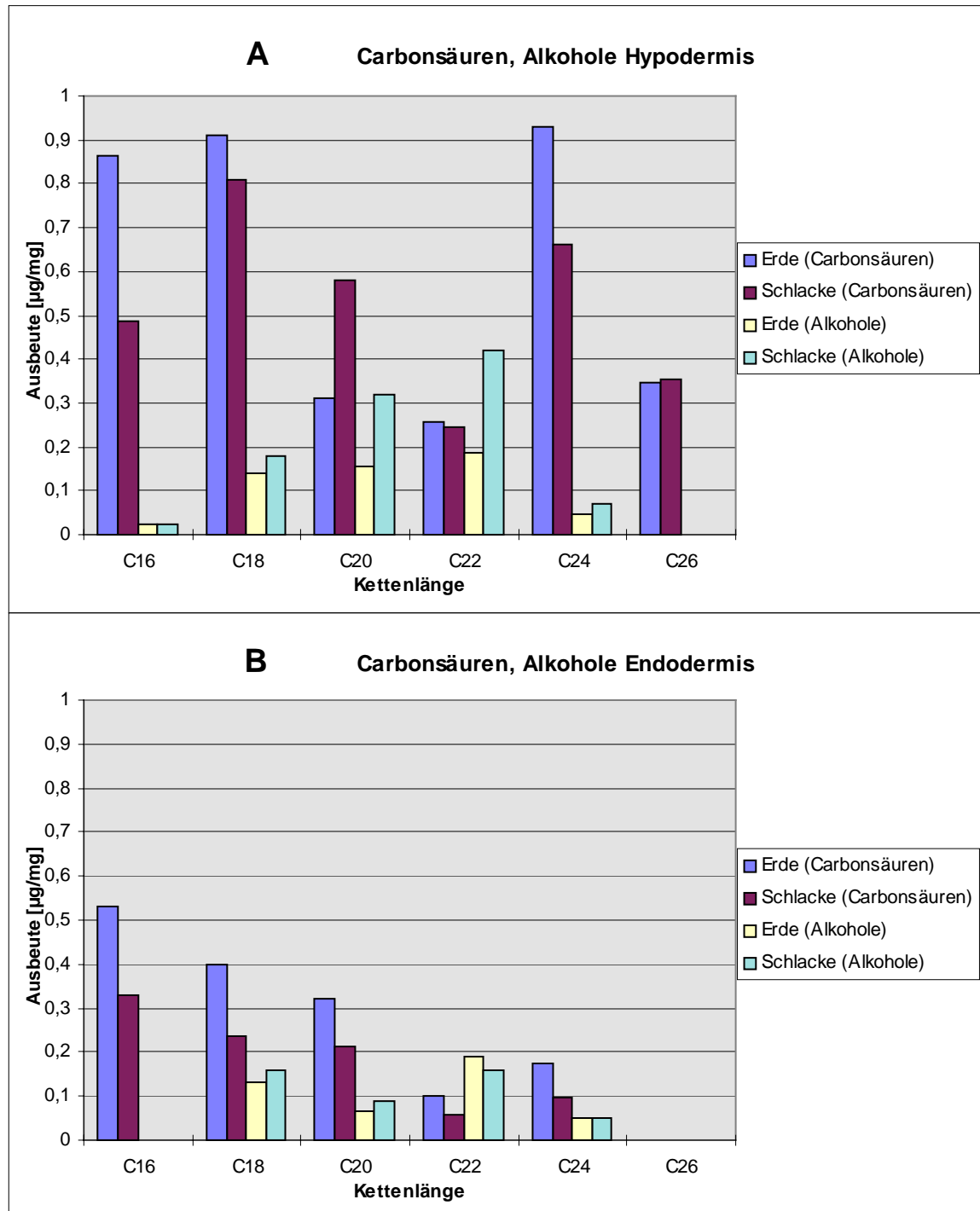
**Abb. 3-14** Summe der aliphatischen Suberinmonomere der hypodermalen (HCW) und endodermalen (ECW) Zellwandisolate erhalten nach Umesterung.





**Abb. 3-15** Relative Anteile einzelner Substanzklassen am Gesamtsuberin von (A) Hypodermis- und (B) Endodermiszellwandisolaten; Summe der aliphatischen Suberinkomponenten = 100%.

Gliedert man die Suberinzusammensetzung noch weiter und analysiert die Kettenlängenverteilung innerhalb der einzelnen Substanzklassen, kann man eine leichte Erhöhung der Alkohol-Komponente in den hypodermalen Zellwänden von Schlacke-Wurzeln bei Kettenlängen von C<sub>18</sub> - C<sub>24</sub> beobachten (Abb. 3-16 A).



**Abb. 3-16** Kettenlängenverteilung einzelner Suberinmonomere von Hypodermis- (A) und Endodermisisolaten (B); Angaben in  $\mu\text{g}$  pro mg Trockengewicht.

### 3.2.5.3 Aminosäuren

Hypodermale Zellwandisolate von Mais enthalten je nach Anzuchtbedingung 1.6 - 1.9 % in Proteinen gebundene Aminosäuren. Dabei ist der Gehalt an Hydroxyprolin bei Kultur auf Schlacke dreimal so groß wie der von Kontrollwurzeln (Tab. 3-20). Auch der Gehalt der Aminosäuren Prolin, Histidin und Threonin ist leicht erhöht.

Aminosäure	hypodermale Zellwandisolate	
	Gartenerde	Schlacke
Hydroxyprolin	0.15 ± 0.04	0.47 ± 0.05
Prolin	0.88 ± 0.15	1.30 ± 0.14
Histidin	0.26 ± 0.035	0.36 ± 0.03
Threonin	0.89 ± 0.10	0.93 ± 0.07
Summe (aller detektierten AS)	15.5 ± 1.9	18.6 ± 1.51

**Tab. 3-20** Aminosäurezusammensetzung nach saurer Hydrolyse von hypodermalen Zellwänden in  $\mu\text{g}$  Aminosäure pro mg Trockengewicht.

### 3.2.5.4 Schwermetalle

Die Wurzeln von auf Schlacke gezogenem Mais zeigten in der ICP-Analyse erhöhte Gehalte an Schwermetallen (Tab. 3-13). Anhand der Gesamtgehalte ließ sich nicht erkennen, wo diese Schwermetalle lokalisiert sind. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, welche Rolle der Zellwand bei der Immobilisierung der Schwermetalle zukommt.

Kationische Schwermetalle haben eine hohe Affinität zu den negativen Oberflächenladungen (v.a. Carboxyl-Gruppen) in der Zellwand und bilden koordinative Bindungen aus (Sieghardt, 1987). Diese Kationen-Bindungen im Apoplasten können erheblich zum Gesamtgehalt eines Schwermetalls in der Wurzel beitragen (Marschner, 1995). Tabelle 3-21 zeigt, daß der Schwermetallgehalt der Zellwandisolate tatsächlich relativ hoch ist. Das ist besonders erstaunlich, weil die Isolierung der Zellwände eine zeitlich sehr aufwendige Prozedur darstellt, die mit vielen Waschvorgängen verbunden ist. Wenn die Zellwände also dennoch hohe

Schwermetallkonzentrationen aufweisen, deutet das auf eine sehr starke Bindung hin. Die Zellwandisolate von auf Schlacke gezogenen Maiswurzeln haben im Vergleich zu den Kontrollwurzeln einen erhöhten Gehalt an verschiedenen Schwermetallen. Unabhängig von den Kulturbedingungen ist auffällig, daß ein Gradient vom äußeren Wurzelgewebe hin zum zentralen Teil der Wurzel besteht: die Schwermetallgehalte der rhizodermalen / hypodermalen Zellwände sind meist höher als die der endodermalen oder der Xylemzellwände. Dies trifft sowohl für Schlacke- als auch für Kontrollpflanzen zu.

Element	Erde			Schlacke		
	Hypo	Endo	Xyl	Hypo	Endo	Xyl
<b>Al</b>	482 ± 108	23.2 ± 15.9	19.7 ± 9.35	786 ± 313	64 ± 43	35 ± 3.4
<b>Ca</b>	484 ± 352	391 ± 178	254 ± 54	3203 ± 985	551 ± 145	361 ± 83
<b>Cd</b>	6.70 ± 0.5	n.n.	n.n.	1.0 ± 0.8	10.2 ± 3.4	2.8 ± 0.9
<b>Cr</b>	2.01 ± 1.47	n.n.	2.15 ± 0.06	9.1 ± 5	2.9 ± 0.8	2.6 ± 0.75
<b>Cu</b>	229 ± 112	98.6 ± 63.2	66.1 ± 30.9	272 ± 125	185 ± 78	79 ± 33
<b>Fe</b>	358 ± 73.8	66.3 ± 23.2	49.9 ± 32.5	1266 ± 530	264 ± 94	57 ± 24
<b>Mn</b>	9.41 ± 0.89	5.21 ± 3.5	1.66 ± 0.68	17.9 ± 5.4	7.9 ± 5.9	1.80 ± 0.7
<b>Mo</b>	n.n.	n.n.	n.n.	1.18 ± 0.73	n.n.	1.95
<b>Ni</b>	7.67 ± 5.52	n.n.	3.14 ± 0.38	13 ± 9.5	8.5 ± 4.2	6.6 ± 2.5
<b>Pb</b>	19.3 ± 8.45	n.n.	12.4 ± 3.13	49.4 ± 25	28.1 ± 3.8	12.3 ± 4.6
<b>Zn</b>	303 ± 233	162 ± 15.4	117 ± 96	270 ± 233	226 ± 124	143 ± 112

**Tab. 3-21** Schwermetallgehalte und Gehalte einiger anderer Elemente der Zellwandisolate von Hypodermis (Hypo), Endodermis (Endo) und Gefäßen (Xyl) des Zentralzylinders in  $\text{mg kg}^{-1}$  Trockengewicht; Mittelwerte und Standardabweichung aus 4 Versuchen; n.n.: nicht nachweisbar.

Um eine Aussage darüber machen zu können, welchen Anteil die Schwermetalle in den Zellwänden zum Gesamtgehalt der Wurzel beitragen, wurde der Gewichtsanteil der Zellwandisolate am Gesamtrockengewicht der Wurzel ermittelt (Tab. 3-22).

Zellwandfraktion	Erde	Schlacke
Hypodermal	22 ± 6	24 ± 3
Endodermal	14 ± 5	10 ± 2
Xylem	47 ± 11	28 ± 9
Summe (HEX)	83 ± 21	62 ± 12

**Tab. 3-22** Durchschnittlicher prozentualer Gewichtsanteil der jeweiligen Zellwandfraktion am Gesamttrockengewicht der Wurzel; die Prozentzahlen wurden aus zwei unabhängigen Experimenten mit je 10 Parallelen ermittelt.

Mit diesen Gewichtsanteilen konnte zusammen mit den ICP-Daten für die Zellwandisolate und der Gesamtwurzel der prozentuale Anteil der Schwermetalle in den Zellwänden errechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-23 dargestellt: In den Kontrollpflanzen sind die in kationischer Form vorliegenden Schwermetalle zu einem erhebliche Teil in der Zellwand lokalisiert. Der Chrom-Anteil beträgt nur 48 %, Molybdän konnte nicht nachgewiesen werden. Insgesamt sind die prozentualen Anteile in den Zellwandisolaten der Kontrollpflanzen meist höher als die entsprechenden Werte für Schlacke-Pflanzen. Die Bindung von Schwermetallen in den Zellwandfraktionen der Schlacke-Pflanzen liegt zwischen 32 und 100 %.

Element	Erde	Schlacke
Blei	100	53
Cadmium	100	72
Chrom	48	43
Kupfer	90	32
Molybdän	n.n.	3
Nickel	89	100
Zink	83	66

**Tab. 3-23** Prozentualer Anteil eines Elementes enthalten in den Zellwandisolaten (HEX) am Gesamtgehalt der Wurzel; n.n.: nicht nachweisbar.

Bei der Interpretation der Daten ist zu berücksichtigen, daß die Bodenlösung, die mit dem Apoplasten der Wurzel im Gleichgewicht steht, in der Kontrolle weniger Schwermetalle enthält als in Schlacke. Die Ergebnisse lassen deshalb keine Aussagen über absolut gebundene Anteile zu. Sie zeigen aber, daß bei niedriger Schwermetallkonzentration (Kontrolle) ein relativ großer Anteil in den Zellwänden gebunden wird. Bei höherer Schwermetallkonzentration (Schlacke) kann die Bindungskapazität der Zellwände überschritten werden und / oder es findet eine vermehrte Aufnahme in den Symplasten statt. Dadurch wird der relative Beitrag der Zellwände zum Gesamtgehalt geringer.

Vergleicht man die Elementgehalte der Zellwände des Abschlußgewebes von auf Schlacke kultivierten Maiswurzeln mit den Gehalten des gesamten Wurzelgewebes, kann man erkennen, daß für einige Schwermetalle eine Anreicherung stattfindet (Tab. 3-24). Vor allem Nickel und Blei sind im Vergleich zu den Gesamtgehalten stark in den Zellwänden akkumuliert. Diese Daten unterstreichen die Rolle der Zellwände für die Pflanze, mit hohen Schwermetallkonzentrationen im Außenmedium fertig zu werden.

Element	Abschlußgewebe	Wurzel gesamt	Anreicherung
Zn	658	468	ja
Al	2018	1784	ja
Cu	380	473	nein
Mo	1.18	8.93	nein
Pb	79.8	49.9	ja
Cd	0.80	2.97	nein
Ni	25.7	5.55	ja
Cr	16.4	9.23	ja

**Tab. 3-24** Schwermetallgehalte der rhizodermalen / hypodermalen Zellwände und Gesamtgehalte von Schlacke-Wurzeln in  $\text{mg kg}^{-1}$  Trockengewicht.

### 3.3 Spezielle physiologische Parameter

Wie im vorigen Kapitel beschrieben, führt die Anzucht von Mais auf MHKW-Schlacke zu einer Beeinträchtigung des Wachstums und zu Veränderungen der Zellwände des Wurzelgewebes. Welche physiologischen Anpassungen Mais-Pflanzen durch Kultivierung auf Schlacke durchlaufen, soll im Folgenden erläutert werden. Dabei wurde versucht, Parameter zu finden, die eine Abschätzung der Phytotoxizität von MHKW-Schlacke ermöglichen.

#### 3.3.1 Energiestatus

Eine Veränderung im Energiestatus kann ein frühes Anzeichen für Streß darstellen (Larcher, 1995). Eine Abnahme in der Energieverfügbarkeit kann entweder auf eine Schwäche im Metabolismus oder eine Zunahme des Energieverbrauchs aufgrund von Reparaturprozessen zurückgeführt werden. Eine Pflanze, die Streßbedingungen ausgesetzt ist, muß zusätzliche Energie aufwenden, um normale Stoffwechselfunktionen aufrechtzuerhalten. Eine einfache Betrachtung der ATP-Gehalte würde den Energiestatus und die Fitneß einer Pflanze nicht ausreichend beschreiben. Der „adenylate energy charge“ (AEC) ist dafür besser geeignet. Darunter versteht man das Verhältnis von energiereichen Phosphatbindungen in Adenylat-Verbindungen (zwei in ATP und eine in ADP) zu dem Gesamtgehalt an Adenylaten (vgl. 2.2.4.14). Dieses Verhältnis wird noch durch zwei dividiert, damit die Werte zwischen null (AMP als einziges Adenylat) und eins (ATP als alleiniges Adenylat) liegen (Bornefeld und Weis, 1981). In Tabelle 3-25 sind die AEC-Werte für Blätter und Wurzeln von Mais dargestellt.

	Erde	Schlacke
Blatt	0.56 ± 0.03	0.58 ± 0.03
Wurzel	0.65 ± 0.24	0.81 ± 0.06

**Tab. 3-25** Adenylate energy charge (AEC)-Werte von Blättern und Wurzeln von Mais kultiviert auf Erde und Schlacke; Mittelwerte und Standardabweichung aus 4 Versuchsreihen.

Die Ergebnisse zeigen, daß Schlacke-Pflanzen einen ähnlichen AEC-Wert besitzen wie die Kontrollpflanzen. Der Wert der Wurzel von auf Schlacke kultivierten Pflanzen ist sogar tendenziell, wenn auch nicht signifikant größer als der der Kontrolle. Vom Energiestatus aus betrachtet ist kein Hinweis auf eine beeinträchtigte Vitalität der Schlacke-Pflanzen gegeben. Diese Versuchsergebnisse stehen in Einklang mit den Ergebnissen über die photosynthetische Leistungsfähigkeit der Schlacke- im Vergleich zu den Kontrollpflanzen.

### 3.3.2 Peroxidase

In dem folgenden Versuch wurden bestimmte Inhaltsstoffe des Apoplastensaftes der Wurzel analysiert. Die Menge an unverdünntem Apoplastensaft ist wegen des geringen Volumenanteils des Apoplasten sehr gering. Der Apoplastensaft kann deshalb nur zusammen mit Infiltrationsmedium in verdünnter Form gewonnen werden und wird folglich als IWF (Interzelluläre Waschflüssigkeit) bezeichnet (vgl. Methoden 2.2.4.6 und 2.2.4.7)

#### 3.3.2.1 Reinheit des Apoplastensaftes aus Wurzeln

Bei der Gewinnung der interzellulären Waschflüssigkeit muß vorsichtig gearbeitet werden, damit die Wurzeln nicht beschädigt werden und keine Kontamination mit cytoplasmatischen Bestandteilen auftritt. Um diese Gefahr mit Sicherheit ausschließen zu können, wurde die Reinheit der IWF durch Bestimmung des ATP-Gehaltes überprüft. ATP kommt nur im lebenden Teil der Zelle vor, also im Cytoplasma, nicht dagegen in der Zellwandphase. Mit Hilfe des Feuerfliegentests läßt sich ATP sehr empfindlich nachweisen. Die Ergebnisse zeigten, daß der



Apoplastensaft keinerlei ATP enthielt und somit nicht mit Cytoplasmateilen geschädigter Zellen kontaminiert war.

Aus diversen physiologischen Gründen war es auch von Interesse, den pH-Wert der IWF zu bestimmen. Obwohl die Angabe des absoluten pH-Wertes der IWF aufgrund der Verdünnung mit Infiltrationsmedium problematisch ist, konnte dennoch festgestellt werden, daß die aus Schlacke-Wurzeln gewonnene IWF einen um bis zu einer halben Einheit erhöhten pH-Wert zeigt (Tab. 3-26).

Ob auch im symplastischen Bereich der Wurzel eine Veränderung des pH-Wertes auftritt oder ob Maispflanzen den pH-Wert konstant halten können, zeigen die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messungen (siehe 3.3.5).

	pH-Wert	$\Delta$ pH
Infiltrationsmedium (10 mM $\text{CaCl}_2$ )	$5.2 \pm 0.02$	—
IWF Erde	$5.5 \pm 0.08$	0.3
IWF Schlacke	$6.0 \pm 0.07$	0.8

**Tab. 3-26** pH-Werte der interzellulären Waschflüssigkeiten (IWF) und des Infiltrationsmediums;  $\Delta$  pH = pH IWF - pH  $\text{CaCl}_2$ .

### 3.3.2.2 Peroxidaseaktivität

Peroxidasen (EC 1.11.1.7) werden häufig als eine Art biochemischer Marker in der Pflanze für verschiedene Arten von Streß angesehen (Castillo, 1992). Durch Streßeffekte wie z.B. Schwermetalle oder Salzstreß kommt es zu einer Anreicherung von reaktiven Sauerstoffspezies. Als Antwort auf diesen oxidativen Streß kommt es zu einer Induktion von Peroxidasen. Peroxidasen sind Enzyme, die den Wasserstoff von einem Donor-Molekül auf Wasserstoffperoxid übertragen und dieses dadurch unschädlich machen. Als Donor-Moleküle können eine Vielzahl von organischen und anorganischen Verbindungen fungieren. Syringaldazin als H-Donor hat z.B. eine besondere Affinität zu Peroxidasen, die mit dem Lignifizierungsprozeß assoziiert sind (Fleuriet und Deloire, 1982). Sowohl im Hinblick auf die veränderte Chemie der Zellwände als auch auf die verschiedenen Streßfaktoren, die von Schlacke als

Kulturmedium ausgehen, wurde die Peroxidaseaktivität mit Guaiacol und Syringaldazin als Substrate im Apoplasten und im Cytoplasma getestet (Tab. 3-27).

	Erde	Schlacke
Zellulär [ $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{g FG}$ ]	$20.3 \pm 4.2$	$20.4 \pm 6.1$
IWF [ $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{ml}$ ]	$9.5 \pm 3.2$	$14.6 \pm 3.8$
Zellwandgebunden [ $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{g FG}$ ]	$4.6 \pm 2.3$	$3.4 \pm 0.7$

**Tab. 3-27** Peroxidaseaktivität mit Guaiacol als H-Donor verschiedener Wurzelkompartimente von *Zea mays*; IWF: interzelluläre Waschflüssigkeit.

Bei der Berechnung der Peroxidaseaktivität der IWF wurde der Verdünnungsgrad mit berücksichtigt und die Werte entsprechend korrigiert. Für die Peroxidaseaktivität des Symplasten der Wurzel wurden keine Unterschiede zwischen den Kontrollpflanzen und den Schlacke-Pflanzen gemessen. Dagegen zeigt die interzelluläre Waschflüssigkeit der Schlacke-Pflanzen eine höhere Peroxidaseaktivität als die der Kontrolle. Diese höhere Aktivität geht auf lösliche, auswaschbare Peroxidasen zurück und nicht auf im Apoplast gebundene Peroxidasen. Führt man den Versuch der Apoplastenfraktion mit Syringaldazin als Wasserstoff-Donor durch, so erhält man insgesamt niedrigere Werte ( $0.19 \pm 0.07 \mu\text{mol} / \text{min} / \text{ml}$  für die Kontrolle und  $0.23 \pm 0.08$  für die Schlacke-Kultur), aber tendenziell ein ähnliches Ergebnis wie für Guaiacol als Substrat.

Da die absoluten Werte der einzelnen Fraktionen in Tabelle 3-27 wegen der unterschiedlichen Bezugsgröße nicht direkt verglichen werden können, werden die Peroxidaseaktivitäten auch auf Protein als Bezug umgerechnet (Tab. 3-29). In Tabelle 3-27 ist zunächst der Proteingehalt wiedergegeben, während in Tabelle 3-28 die Peroxidaseaktivitäten auf Proteinbasis berechnet sind.

Fraktionen	Erde	Schlacke
Zellulär [ $\mu\text{g g}^{-1}$ FG]	$6660 \pm 1245$	$7320 \pm 1509$
IWF [ $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ]	$0.78 \pm 0.08$	$0.73 \pm 0.09$
Zellwandgebunden [ $\mu\text{g g}^{-1}$ FG]	$447 \pm 25$	$413 \pm 28$

**Tab. 3-28** Proteingehalt verschiedener Wurzelfraktionen von *Zea mays*.

Im Proteingehalt sind keine Unterschiede in den einzelnen Fraktionen zwischen den Kontrollpflanzen und den Schlacke-Pflanzen vorhanden. Es ist auch verständlich, daß der Proteingehalt der Zellwandproben nur ca. 6 % des Proteingehaltes des Wurzelsymplasten beträgt. Bezieht man die Peroxidaseaktivität auf den Proteingehalt statt auf das Frischgewicht (Tab. 3-29), zeigen sich nur geringe Unterschiede zwischen beiden Anzuchten. Da die Unterschiede in den Werten nur sehr klein sind, muß geschlußfolgert werden, daß durch Kultur auf Schlacke keine erhöhte Peroxidaseaktivität induziert wird, die Pflanzen also nicht vermehrt an oxidativem Streß leiden.

	Erde	Schlacke
zellulär	$3.1 \pm 1.1$	$2.7 \pm 0.5$
IWF	$12.3 \pm 1.5$	$10.4 \pm 1.2$
Zellwandgebunden	$7.5 \pm 2.8$	$9.7 \pm 3.2$

**Tab. 3-29** Peroxidaseaktivität mit Guaiacol als H-Donor verschiedener Wurzelkompartimente von *Zea mays*; Enzymaktivität in  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  Protein.

### 3.3.3 Abscisinsäure (ABA)

Das Phytohormon Abscisinsäure spielt eine wichtige Rolle als Streßhormon (Hartung und Radin, 1989; Mengel, 1991). ABA wird hauptsächlich in der Wurzel, aber auch in Blättern und Früchten gebildet. Die Konzentration an ABA in der Pflanze wird durch verschiedene Streßfaktoren wie Trockenheit, Salinität oder Hitze beeinflusst und kann so als potentieller Regulator in der Pflanze als Antwort auf veränderte Umweltbedingungen angesehen werden. Im Folgenden sind die ABA-Gehalte von Blättern (Tab. 3-30) und Wurzeln (Tab. 3-31) von *Zea mays* und als Vergleich von *Vicia faba*, einer mäßig alkalitoleranten Pflanzenart, dargestellt. Als Kultursubstrat wurde neben Gartenerde und Schlacke zusätzlich gewaschene Schlacke verwendet. Nicht vorbehandelte Schlacke besitzt einen hohen Salzgehalt und die Bodenlösung einen alkalischen pH-Wert. Wird Schlacke durch intensives Waschen vorbehandelt, kann die Salzfracht entfernt werden, aber die Alkalität der Bodenlösung bleibt (vgl. chemische Charakterisierung der Bodenlösungen Tab. 3-5). Dadurch ist es möglich den Einfluß des alkalischen pH-Wertes auf die ABA-Konzentration zu ermitteln.

	Erde	Schlacke	Schlacke gewaschen
<i>Zea mays</i>	122 ± 49	233 ± 107	170 ± 78
<i>Vicia faba</i>	490 ± 110	870 ± 230	470 ± 20

**Tab. 3-30** ABA-Gehalte [ $\mu\text{mol g}^{-1}$  TG] von Blättern von auf Gartenerde, Schlacke und gewaschener Schlacke kultivierten *Zea mays*- und *Vicia faba*-Pflanzen.

Sowohl die Blätter von auf Schlacke kultiviertem *Zea mays* als auch von *Vicia faba* zeigen deutlich höhere Gehalte an ABA als die entsprechenden Kontrollen (Tab. 3-30). Dieser Anstieg kann hauptsächlich auf die Salzbelastung der Schlacke zurückgeführt werden, da die ABA-Gehalte in Blättern der beiden Arten angezogen auf gewaschener Schlacke wesentlich niedriger liegen und annähernd den Kontrollwerten entsprechen.

	Erde	Schlacke	Schlacke gewaschen
<i>Zea mays</i>	71 ± 48	108 ± 74	85 ± 27
<i>Vicia faba</i>	204 ± 34	192 ± 73	158 ± 55

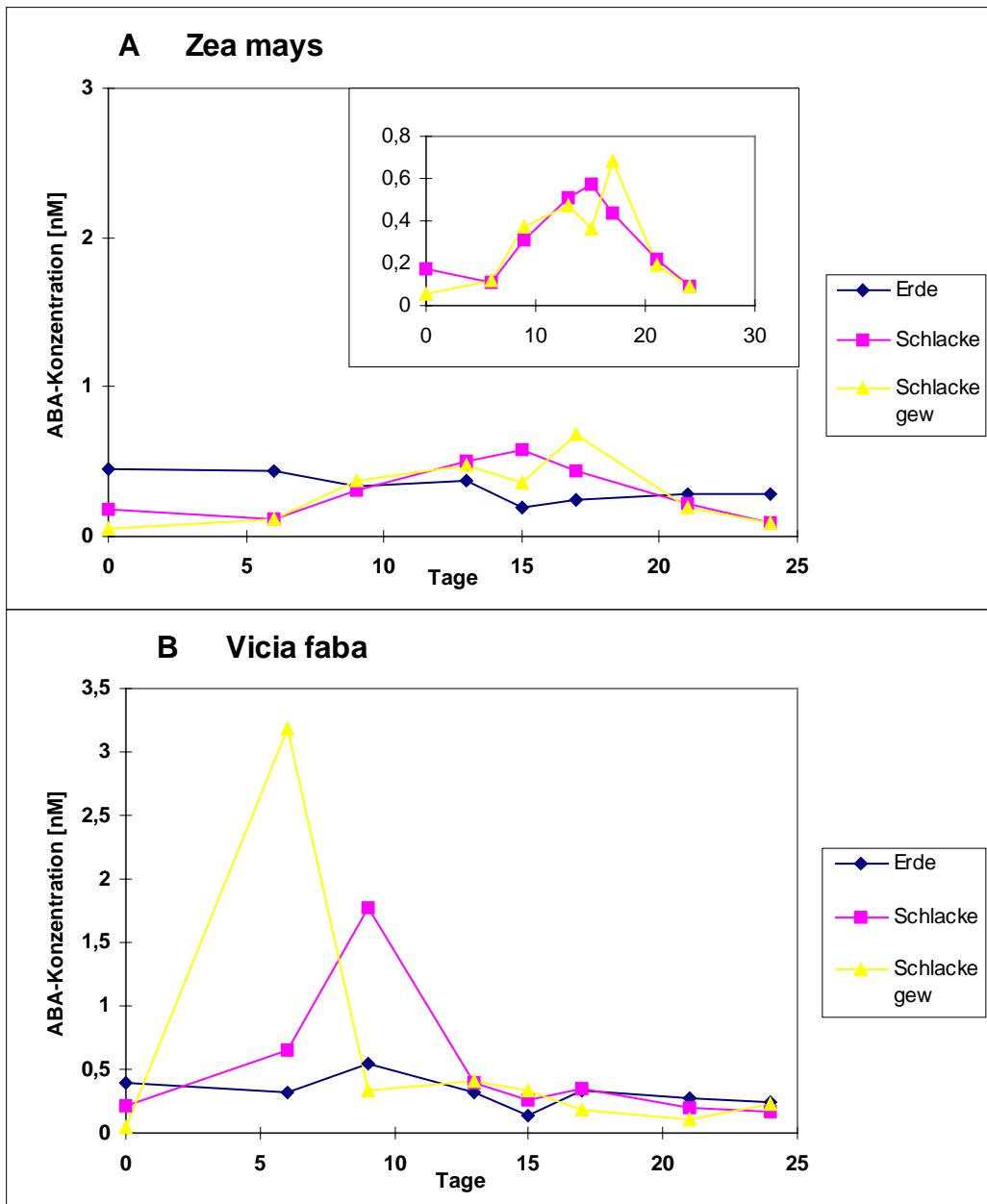
**Tab. 3-31** ABA-Gehalte [ $\text{pmol g}^{-1} \text{TG}$ ] in Wurzeln von auf Gartenerde, Schlacke und gewaschener Schlacke kultivierten Mais- und Saubohnenpflanzen.

Betrachtet man dagegen die Werte in den Wurzeln (Tab. 3-31), so fällt auf, daß die Schlacke-Pflanzen bei *Vicia faba* nicht höhere, sondern eher niedrigere ABA-Gehalte aufzeigen als die Kontrollpflanzen, wobei die Gehalte auf gewaschener Schlacke wieder unter denen von Schlacke liegen. Bei *Zea mays* wiederum stellt sich die Verteilung etwas anders dar: In Schlacke kultivierte Maiswurzeln weisen die höchsten ABA-Gehalte auf, gefolgt von gewaschener Schlacke, die niedrigsten Gehalte zeigen die Kontrollwurzeln.

Da die Wurzeln mit der umliegenden Bodenlösung im Austausch stehen, wurde zusätzlich die ABA-Konzentration in den Bodenlösungen bestimmt (Abb. 3-17). Abscisinsäure wird durch ihre Eigenschaften als schwache Säure ( $\text{pK}_s = 4.85$ ) bestimmt, die in protonierter Form leicht durch Plasmamembranen permeieren kann, aber nicht in der anionischen Form (Baier et al., 1990). Daraus resultiert ihre intra- und interzelluläre Verteilung und ihre Akkumulation in alkalischen Zellkompartimenten oder Zellen. Dieses als Anionenfalle bekannte Prinzip wurde von Slovik et al. (1995) in einem mathematischen Modell ebenso für die Verteilung von ABA zwischen Wurzel und der Bodenlösung der umliegenden Rhizosphäre berechnet. In Abbildung 3-17 ist der zeitliche Verlauf der ABA-Konzentrationen während der Dauer eines Versuches dargestellt. Bei beiden Kulturen ist die Ausgangssituation annähernd gleich. Die ABA-Konzentration der Erde-Bodenlösung liegt bei etwa 0.4 nM, die der Schlacke-Bodenlösung bei 0.2 nM und die Bodenlösung von gewaschener Schlacke hat eine Konzentration von 0.05 nM. Diese Werte liegen im unteren Bereich von den von Hartung et al. (1996) für Böden bestimmte Werte (0.5-10 nM). Der relativ hohe Ausgangswert in der Schlacke-Bodenlösung überrascht etwas, da Schlacke im Vergleich zu Gartenerde ein sehr keimarmes Substrat ist (vgl. 3.1.3. und Gimmler et al., 1998b), und so die ABA-Produktion durch Mikroorganismen stark eingeschränkt sein sollte. Zudem müßte die

Entstehung der Schlacke bei 800 - 1000 °C eine Verbrennung organischer Bestandteile zur Folge haben, ABA inbegriffen. Die vorhandene ABA kann nur von nicht vollständig verbranntem organischen Material herrühren.

Im zeitlichen Verlauf des Versuchs kommt es bei der Anzucht mit *Vicia faba* zu einem drastischen, aber transienten Anstieg der ABA-Konzentration in der Bodenlösung von Schlacke und gewaschener Schlacke. Einen solchen Anstieg kann man bei Kultur mit *Zea mays* nicht in diesem Ausmaß beobachten. Dennoch kommt es auch hier zu einer erhöhten Konzentration zwischen dem 15. und 20. Versuchstag. Es tritt also im Vergleich zu *Vicia faba* eine zeitliche Verzögerung der ABA-Ausschüttung auf. Die ABA-Konzentration der Erde-Bodenlösung bleibt bei beiden Kulturen ähnlich niedrig dem Ausgangsniveau oder nimmt sogar leicht ab, was auf das Auswaschen durch das Gießen und / oder ABA-Metabolismus im Boden zurückzuführen ist. Beide Reaktionen scheinen mit dem ABA-Efflux aus der Wurzel im Gleichgewicht zu stehen, so daß es zu keiner nennenswerten Nettoveränderung kommt.



**Abb. 3-17** ABA-Konzentration [nM] in den Bodenlösungen (Saugkerzen-Methode) von Erde, Schlacke und gewaschener Schlacke bei Kultur mit *Zea mays* (A) und *Vicia faba* (B) im zeitlichen Verlauf eines Versuchs.

### 3.3.4 Gehalt an Sulfhydrylgruppen

Von kationischen Metallen ist bekannt, daß sie eine relativ hohe Affinität zu Sulfhydryl- und Carboxylgruppen haben. Höhere Pflanzen, aber auch Pilze reagieren auf Schwermetallstress mit der Bildung des proteinogenen Thiols poly-( $\gamma$ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycerin), auch als Phytochelatine bezeichnet (Grill et al., 1985; Rauser, 1990). Die Phytochelatine dienen der Pflanze zur Entgiftung von Schwermetallspezies im Cytoplasma, indem diese komplexiert und dadurch unschädlich gemacht werden. Als Baustein zur Synthese dieser Phytochelatine dient das Tripeptid Glutathion. Aufgrund des hohen Gehaltes an Cystein geben Phytochelatine eine positive Reaktion mit Ellmanns Reagenz und können so als Farbkomplex nachgewiesen werden.

Im Wurzelgewebe von auf Schlacke kultivierten Maispflanzen konnte ein im Vergleich zur Kontrolle 15-facher Gehalt an wasserlöslichen, nicht protein-gebundenen Sulfhydryl-Gruppen nachgewiesen werden (Tab. 3-32). Das beweist, daß Schlacke-Pflanzen einem Schwermetallstress ausgesetzt sind, auf den sie mit SH-Gruppen-Bildung reagieren. Die Daten implizieren auch, daß sich die Schwermetalle in der Wurzel nicht nur im Apoplasten befinden, sondern daß diese auch in den Symplasten eindringen.

	SH-Gehalt [nmol/g FG]
Erde	5.7 $\pm$ 2.1
Schlacke	89.2 $\pm$ 10.4

**Tab. 3-32** Gehalt an Sulfhydryl-Gruppen im Wurzelgewebe von *Zea mays* bei Kultur auf Gartenerde und Schlacke.

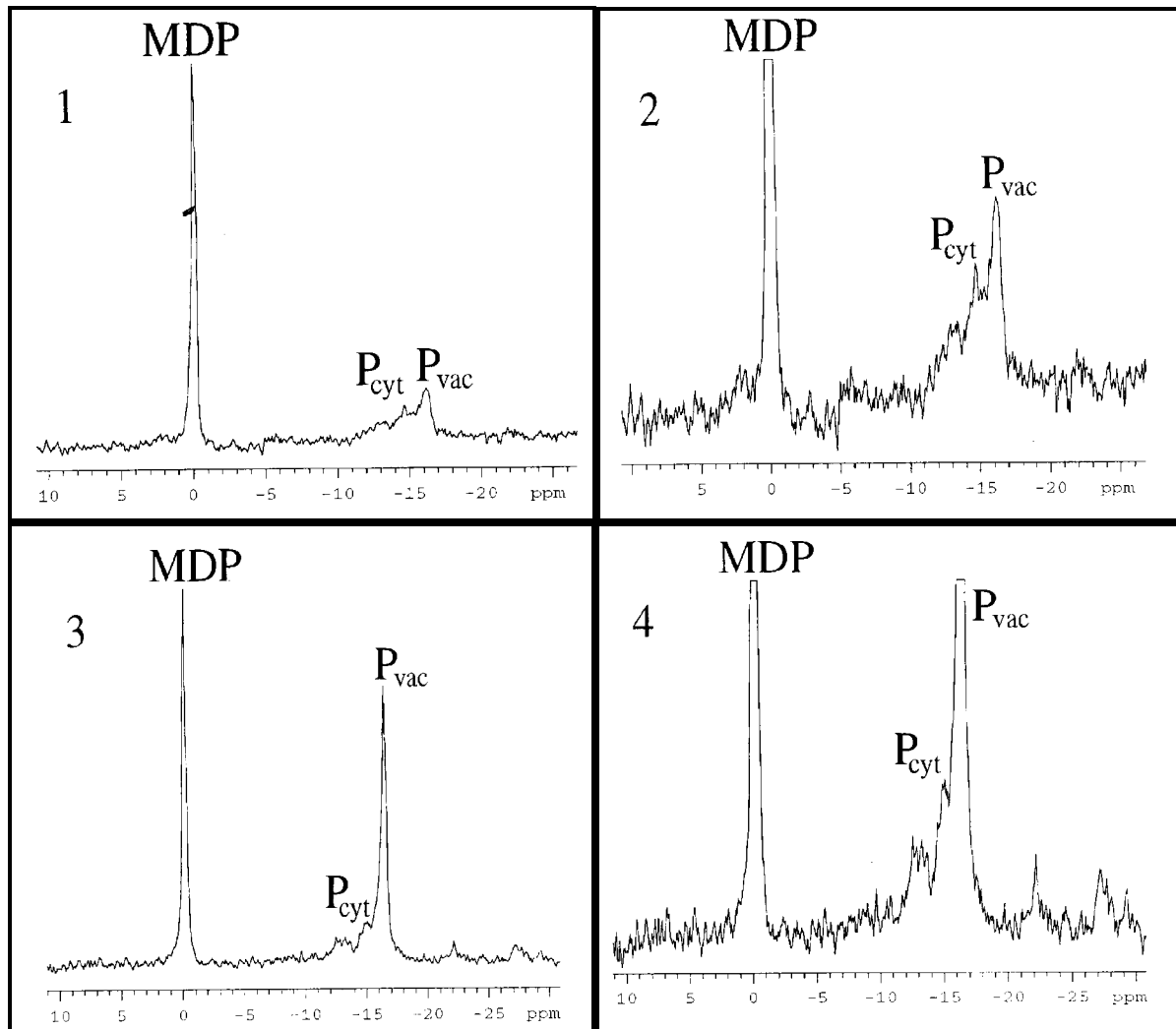


### 3.3.5 $^{31}\text{P}$ -NMR

Da die Schlacke-Bodenlösung einen alkalischen pH-Wert aufweist, wurde untersucht, ob dies einen Einfluß auf den intrazellulären pH-Wert in Wurzelzellen hat. Mittels der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie ist es möglich, non invasiv an intakten Wurzeln den cytoplasmatischen und vakuolären pH-Wert zu ermitteln.

In Abbildung 3-18 sind  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von *Zea mays* Wurzeln dargestellt. Aus den Spektren ist ersichtlich, daß anorganisches Phosphat in zwei Kompartimenten vorhanden ist. Das Kompartiment mit der höheren Phosphatmenge hat eine deutlich saurere Umgebung. Dieses Kompartiment läßt sich der Vakuole zuordnen ( $P_{\text{vac}}$ ). Das Kompartiment mit der deutlich geringeren Phosphatmenge hat eine neutrale Umgebung und kann dem Cytoplasma zugerechnet werden ( $P_{\text{cyt}}$ ). Unter Verwendung einer Kalibriergeraden läßt sich anhand der chemischen Verschiebung des Phosphatsignals mit großer Genauigkeit der pH-Wert in den Vakuolen und im Cytoplasma bestimmen. Die Größe des Phosphatpeaks gibt dagegen Auskunft über die Phosphatkonzentration in dem jeweiligen Kompartiment, eine Quantifizierung ist allerdings nur in voll relaxierten Spektren möglich. Anhand der geringeren Peakgröße von  $P_{\text{vac}}$  von Schlacke-Pflanzen (Abb. 3-18, Spektrum 1) gegenüber dem Kontrollspektrum kann man aber trotzdem erkennen, daß die Phosphatkonzentration in Schlacke-Wurzeln weit geringer ist als in den Kontrollwurzeln. In jedem Fall ist das  $P_{\text{vac}} / P_{\text{cyt}}$ -Verhältnis in den Wurzeln der Schlacke-Pflanzen deutlich kleiner als in den Wurzeln der Kontrolle. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß Mais-Pflanzen auf Schlacke in ihrem Wachstum durch P limitiert werden (vgl. auch Tab. 3-13).

Aufgrund der niedrigen Phosphatkonzentrationen in Schlacke-Pflanzen gestalteten sich die Messungen z.T. schwierig, da die Signalstärken oft sehr gering waren (oder manchmal sogar völlig fehlten) und so lange Meßzeiten erforderten.



**Abb. 3-18**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von *Zea mays* Wurzeln. NS 10000, TR 0.22 sec; (1) Schlacke-Kultur; (3) Kontrolle; (2) und (4) sind die zu (1) und (3) korrespondierenden Spektren, jedoch um den Faktor 4 vergrößert. Da die Skalierung der x-Achsen von 1 und 3 bzw. 2 und 4 unterschiedlich ist, können die Spektren nicht direkt miteinander verglichen werden; MDH (Methyldiphosphonsäure) = Standard.

Aus Tabelle 3-33 ist ersichtlich, daß in Schlacke-Wurzeln eine leichte Alkalisierung stattfindet. Sowohl der cytoplasmatische, als auch der vakuoläre pH-Wert ist in Schlacke- gegenüber den Kontroll-Wurzeln erhöht.

Erde		Schlacke	
cytoplasmatisch	vakuolär	cytoplasmatisch	vakuolär
7.15 ± 0.15	5.7 ± 0.28	7.3	6.03 ± 0.094

**Tab. 3-33** Cytoplasmatischer und vakuolärer pH-Wert von *Zea mays*-Wurzeln (4 Versuche); als Außenmedium wurde 10 mM CaSO<sub>4</sub> verwendet.

### 3.3.6 Lösliche Aminosäuren

Im Folgenden wurde geprüft, ob die Kultur auf Schlacke einen Einfluß auf den Gehalt an freien, löslichen Aminosäuren hat.

In Tabelle 3-34 ist die Zusammensetzung der löslichen Aminosäuren von Wurzelgewebe von auf Gartenerde und Schlacke kultivierten Maispflanzen aufgelistet. Insgesamt fällt der in Schlacke-Wurzeln höhere Gesamtgehalt an löslichen Aminosäuren auf. Vor allem die Aminosäuren Prolin, Asparaginsäure, Phenylalanin und Phosphoserin sind in Schlacke-Wurzeln in höherer Konzentration vorhanden als in der Kontrolle (ca. dreifach), aber auch einige andere Aminosäuregehalte, z.B. von Histidin, Glutamin, Glutaminsäure und Leucin sind leicht erhöht (1.5 - 2-fach).

Von besonderem Interesse ist die hohe Prolin-Konzentration in den Schlacke-Wurzeln. Prolin stellt mit 0.2 µmol pro Gramm Frischgewicht einen relativ hohen Anteil an der Gesamtfraktion dar (ca. 10 %). Prolin wird häufig als Osmotikum bei Salzstreß diskutiert (Lewitt, 1980).

	Aminosäuren [ $\mu\text{mol} / \text{g FG}$ ]	
	Erde	Schlacke
$\gamma$ -Aminobuttersäure	0.033	0.047
Alanin	$0.128 \pm 0.04$	$0.148 \pm 0.04$
Arginin	$0.045 \pm 0.011$	$0.033 \pm 0.01$
Asparaginsäure	$0.123 \pm 0.01$	$0.3 \pm 0.01$
Glutamin	$0.082 \pm 0.05$	$0.123 \pm 0.01$
Glutaminsäure	$0.25 \pm 0.08$	$0.39 \pm 0.08$
Glycin	0.043	$0.018 \pm 0.002$
Histidin	$0.037 \pm 0.017$	$0.063 \pm 0.015$
i-Leucin	$0.05 \pm 0.008$	$0.095 \pm 0.015$
Leucin	$0.072 \pm 0.015$	$0.1 \pm 0.03$
Lysin	$0.03 \pm 0.003$	$0.016 \pm 0.009$
Methionin	$0.03 \pm 0.01$	$0.029 \pm 0.006$
Ornithin	$0.026 \pm 0.003$	$0.052 \pm 0.003$
Phenylalanin	0.01	$0.033 \pm 0.02$
Phosphoserin	$0.036 \pm 0.01$	$0.098 \pm 0.05$
Prolin	n.n.	$0.21 \pm 0.05$
Serin	$0.13 \pm 0.01$	$0.18 \pm 0.04$
Threonin	$0.046 \pm 0.01$	$0.053 \pm 0.01$
Tryptophan	$0.013 \pm 0.001$	$0.013 \pm 0.001$
Tyrosin	$0.017 \pm 0.002$	$0.017 \pm 0.002$
Valin	$0.046 \pm 0.01$	$0.058 \pm 0.02$
Summe	1.35	2.17

**Tab. 3-34** Gehalt an löslichen Aminosäuren von *Zea mays*-Wurzeln; Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

### 3.3.7 Lösliche Zucker

Die Bestimmung des Gesamtzuckergehaltes von Maisblättern ergab eine tendenzielle Erhöhung in den Blättern der Schlacke-Kultur gegenüber der Kontrolle. Die Werte von Maisblättern gewachsen auf gewaschener Schlacke lagen in der Größenordnung der Kontrolle.

	Gesamtzuckergehalt [ $\mu\text{mol} / \text{g FG}$ ]
Erde	$35 \pm 5.2$
Schlacke	$49 \pm 12$
Schlacke gewaschen	$37.5 \pm 5.6$

**Tab. 3–35** Gesamtzuckergehalt in Mais-Blättern der drei verschiedenen Anzuchten; Mittelwerte und Standardabweichung aus 4 Meßreihen mit Doppelproben.



## 4. Diskussion

Wie im Ergebnisteil dargestellt, gehen von Schlacke verschiedene Streßfaktoren aus, die das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen auf unterschiedliche Art und Weise beeinflussen:

1. Der hohe Salzgehalt der Schlacke bedingt nicht nur einen transienten Salzstreß, sondern auch einen transienten osmotischen Streß.
2. Der Mangel der Schlacke an Stickstoff und die geringe Verfügbarkeit von Phosphat in diesem Bodensubstrat induzieren Ernährungsmangel-Streß.
3. Der Schwermetallgehalt der Schlacke ist im Vergleich zum Kontrollsubstrat stark erhöht.
4. Der erhöhte mechanische Widerstand der Schlacke bedingt einen mechanischen Streß beim Eindringen der Wurzel in das Kultursubstrat.
5. Der alkalische pH-Wert der Bodenlösung von Schlacke (Alkalistreß) erfordert Reaktionen der Pflanze in Bezug auf die Mobilisierung von Nährstoffen, den sekundär aktiven Transport am Plasmalemma und die interne pH-Homeostase.

In der folgenden Diskussion sollen nun zunächst die physiko-chemischen und bodenbiologischen Eigenschaften der Schlacke erläutert werden. Anschließend soll anhand der experimentell ermittelten Daten geprüft werden, welche Strategien *Zea mays* einschlägt, um die oben erwähnten Stressoren zu bewältigen.

## 4.1 MHKW-Schlacke als Bodensubstrat

### 4.1.1 Hoher Salzgehalt

Ein Faktor, der sich negativ auf das Wachstum von Mais auswirkt, ist der hohe Gehalt der Schlacke an NaCl. Besonders zu Beginn der Versuche werden die Mais-Keimlinge mit bis zu 200 mM NaCl in der Bodenlösung von Schlacke konfrontiert, das entspricht einer anfänglichen Leitfähigkeit von  $25 \text{ mS cm}^{-1}$ . Bis zum Versuchsende wird die Salz-Konzentration durch Auswaschung beim Bewässern auf ca. 50 mM gemäßigt. Nach Larcher (1995) ist ab einer Leitfähigkeit der Bodenlösung von  $20 \text{ mS cm}^{-1}$  mit einer Beeinträchtigung der Keimung und des Wachstums von Pflanzen zu rechnen. Calcium ist ein weiterer Bestandteil der Schlacke-Bodenlösung, der in hoher Konzentration vorhanden ist. In vielen Studien wurde beobachtet, daß in salzhaltigen Bodensubstraten das Wachstum der Versuchs-pflanzen durch Calcium-Gaben erheblich verbessert werden konnte (Katsuhara und Kawasaki, 1996; Rengel, 1992; Cramer und Läuchli, 1986; Zhong und Läuchli, 1994). Ein hoher Calcium-Gehalt wirkt den negativen Salz-Effekten entgegen. Diese günstige Konstellation ist in Schlacke gegeben.

### 4.1.2 Osmotischer Streß

Bedingt durch den hohen Salzgehalt steigt auch das osmotische Potential der Bodenlösung von Schlacke gegenüber der Kontroll-Bodenlösung an. Das osmotische Potential der Erde-Bodenlösung liegt in der Größenordnung von 0.08 MPa. Die Schlacke-Bodenlösung besitzt dagegen ein osmotisches Potential von 1 MPa, das entspricht einer Erhöhung um den Faktor 12. Der Auswascheffekt bei gewaschener Schlacke spiegelt sich in dem geringeren osmotischen Potential von 0.2 MPa ebenso wider wie in der geringeren Leitfähigkeit. Aufgrund dieses enormen Unterschiedes im osmotischen Potential wird deutlich, daß Mais-Pflanzen, die auf Schlacke kultiviert werden, vor allem zu Beginn der Versuche, einer erheblichen osmotischen Belastung ausgesetzt sind.



### 4.1.3 Nährstoffangebot und Schwermetalle

Böden mit hohem Salzgehalt reagieren häufig alkalisch. Eine analoge Situation liegt bei MHKW-Schlacke vor. Die alkalische Bodenreaktion hat zur Folge, daß die Löslichkeiten von Salzen stark verändert werden. Nährstoffe wie Phosphor (bzw. Phosphat), Eisen oder Mangan sind in ihrer Verfügbarkeit eingeschränkt, da ihre Salze in alkalischem Medium schwerlöslich sind. Trotz des hohen Vorkommens dieser Salze in Schlacke ist die Konzentration in der Bodenlösung niedrig. Vor allem der Mangel an Phosphat stellt einen limitierenden Faktor für das Pflanzenwachstum auf Schlacke dar.

Der alkalische pH-Wert verändert auch die Löslichkeit der Schwermetallverbindungen. Die Löslichkeit vieler Schwermetall-Salze wird bei hohen pH-Werten vermindert. So werden die Anteile z.B. an löslichem Blei durch pH-Werte unter 5 gefördert, während mit steigendem pH-Wert die Löslichkeit der Bleisalze stark abnimmt (Blume, 1990). Auch für Kupfer nimmt mit steigendem pH-Wert die Festlegung im Boden zu (Baumeister und Ernst, 1978). Allerdings ist nicht bei allen Metallen die Löslichkeit und damit die Verfügbarkeit bei alkalischem Boden-pH-Wert herabgesetzt. Da Molybdän hauptsächlich als Anion ( $\text{MoO}_4^-$ ) aufgenommen wird, ist die Aufnahme dieses Elements bei hohem pH-Wert erhöht.

Gerade in einem festen Bodensubstrat, das ein Mehrphasensystem darstellt, sind die Verhältnisse noch komplizierter als in einem rein flüssigen System. MHKW-Schlacke zeigt bei der Elementaranalyse einen hohen Gehalt an Schwermetallen auf. Diese können ein hohes Schadpotential darstellen. Die Toxizität und die Schädwirkungen auf Pflanzen hängen aber in entscheidendem Maß von der Verfügbarkeit dieser Schwermetallionen ab. Die Verfügbarkeit wiederum ist neben dem pH-Wert von der Bindungsform der Schwermetalle und von der Löslichkeit der einzelnen Spezies abhängig. Die Löslichkeit der Schwermetalle wird vor allem durch Ad- und Desorptionsprozesse sowie durch Komplexierungsvorgänge beeinflusst (Herms und Brümmer, 1984). Ionen liegen nicht „nackt“ in der Bodenlösung vor, sondern neigen zur Komplexbildung sowohl mit anorganischen als auch mit organischen Liganden. Mineralische Bodenkomponenten wie z.B. Eisen- und Manganoxide ebenso wie Huminsäuren verfügen über eine hohe Bindungskapazität für Schwermetallionen. Aufgrund von Carboxyl- und Phenolgruppen von organischen Substanzen sind Bodenkolloide negativ geladen (Mengel und Kirkby, 1982). Positive Metallionen und

andere Kationen werden von diesen Ladungen angezogen, abhängig vom pH-Wert der Bodenlösung. Ein niedriger pH-Wert erhöht die Kationenverfügbarkeit, da die Hydroxonium-Ionen eine höhere Affinität zu den negativen Ladungen der Kolloide haben und so mit den Metallionen bzw. Kationen um diese Plätze konkurrieren. Kationen können somit durch Adsorptions- bzw. Desorptionsprozesse dem Lösungsgleichgewicht zugeführt bzw. entzogen werden. Hier wird der Einfluß des pH-Wertes auf die Verfügbarkeit von Schwermetallen und anderen Ionen erneut deutlich. Ebenso wird deutlich, daß zur Beurteilung des Schadpotentials nicht die Gesamtgehalte eines Bodensubstrats allein aussagekräftig sind, sondern immer zusätzliche bodenphysikalische Parameter herangezogen werden müssen. Beispielsweise können niedrige Gesamtgehalte eines Schwermetalls bei einem günstigen pH-Wert zu höheren Lösungskonzentrationen führen als sehr hohe Gesamtgehalte in stark belasteten Böden mit alkalischer Bodenreaktion (Herms und Brümmer, 1984). Da Schlacke-Bodenlösung einen alkalischen pH-Wert besitzt, ist die Verfügbarkeit der Schwermetalle eingeschränkt. Um die Bindungsform der Schwermetalle zu bestimmen, wurde das sequentielle Extraktionsverfahren nach Tessier angewendet (vgl. 2.2.1.4 und 3.1.1.2). Dieses Verfahren gibt Aufschluß über die im Boden existierenden Schwermetall-Spezies. Die ersten vier Gruppen charakterisieren die mobile Schwermetall-Fraktion im Boden. In der Residualfraktion, in der sich 73 - 98% der Schwermetalle der Schlacke wiederfanden, werden dagegen die Schwermetalle erfaßt, die in die Kristallstruktur integriert sind und somit unter „normalen Bedingungen“ nicht in Lösung gehen.

Trotz des in Schlacke hohen Gehaltes an Schwermetallen ist das Schadpotential für die Versuchspflanzen also eher gering, da die Bodenparameter die Verfügbarkeit der Schwermetalle niedrig halten.

#### 4.1.4 Bodenphysikalische und -biologische Eigenschaften

Nicht nur die chemischen, sondern auch physikalische und mikrobiologische Bodeneigenschaften beeinflussen die Funktion der Wurzel und die Nährstoffdynamik im Boden. MHKW-Schlacke zeigt im Vergleich zum Kontrollsubstrat eine größere Lagerungsdichte und eine höhere mechanische Impedanz (s. Kapitel 3.1.3). Mit zunehmender Lagerungsdichte steigt der Verdichtungsgrad des Bodensubstrates (Bennie, 1996). Die Bodenverdichtung wiederum beeinflusst das Pflanzenwachstum, indem sie die Bodenluft, die den Wurzeln zur Verfügung steht, vermindert (Vepraskas, 1994). Bei höherer Bodenverdichtung sind die größeren Poren, die die Sauerstoffversorgung der Wurzel gewährleisten, reduziert. Der Einfluß der mechanischen Bodeneigenschaften muß bei der Diskussion von Wurzelwachstum und -entwicklung ebenso berücksichtigt werden. Goss und Russell (1980) berichten, daß die Streckungsrate von Wurzeln reduziert ist, wenn ein äußerer Druck von 100 kPa angewendet wird. Andere Autoren sprechen dagegen bei Werten von 1.5 MPa noch von einer moderaten Impedanz (Vepraskas, 1994). Vergleicht man diese Daten aus der Literatur mit dem mechanischen Widerstand, den MHKW-Schlacke den Wurzeln entgegensetzt (Tab. 3-7), so kann dieser als eher moderat eingeschätzt werden. Dennoch müssen die Wurzeln einen größeren Kraftaufwand für das Eindringen und Durchdringen des Bodens leisten als in Gartenerde.

Ein weiteres Kriterium ist der niedrige Keimgehalt der Schlacke. Durch die hohen Temperaturen (800-1000°C) bei der Entstehung von Schlacke im Feuerraum des Müllheizkraftwerkes werden zunächst alle Keime abgetötet. Bei der Lagerung im Freien besteht aber Gelegenheit zur Rekontamination mit Sporen, Bakterien oder Pilzen. Schlacke weist aber selbst nach langer Lagerung im Freiland und Besiedelung mit Pflanzen nur eine äußerst geringe Keimzahl auf, die u.a. durch den alkalischen pH-Wert und den niedrigen Gehalt an organischen Substanzen bedingt ist. Letzteres geht ebenfalls auf die hohen Temperaturen bei der Verbrennung zurück (Gimmler et al., 1998b). Da beim Wachstum von höheren Pflanzen eine Vielzahl von komplexen Interaktionen mit positiver Wirkung zwischen Wurzeln und Mikroorganismen in der Rhizosphäre auftreten (z.B. bei Leguminosen), sollte

berücksichtigt werden, daß beim Wachstum von Pflanzen auf Schlacke sich dieser niedrige Keimgehalt negativ auswirken kann.

## **4.2 Entwicklung und Streßreaktionen von Mais**

### **4.2.1 Beeinträchtigttes Wachstum und erhöhtes Wurzel-zu-Sproß-Verhältnis**

Die Entwicklung von Mais auf Schlacke ist zu Beginn im Vergleich zur Kontrolle verlangsamt. Nach einer gewissen Keimungsverzögerung entwickeln sich die Pflanzen normal, bleiben im Untersuchungszeitraum (20-25 Tage) aber kleiner als die Kontrollpflanzen. Bei längerer Kultur gleichen sich die Unterschiede aber immer weiter an (Fuchs, 1995). Für die anfänglichen Unterschiede im Wachstum gibt es mehrere Ursachen. Das äußere Erscheinungsbild läßt eine rötliche Farbe der Blätter erkennen, was auf einen Anstieg in der Anthocyanproduktion hinweist. Diese wird hauptsächlich durch Phosphatmangel verursacht (Wilkinson, 1994). Ein Grund für das geringere Wachstum kann also in Nährstoffmangel, genauer Phosphatmangel, gesehen werden. Dies wird beim Vergleich der Elementgehalte im Blatt- und Wurzelgewebe besonders deutlich (vgl. Kapitel 3.2.3, Tab. 3-13 und 4.2.2).

Ein weiterer ungünstiger Parameter ist der hohe Salzgehalt (s. Kapitel 4.1.1). Die Beeinträchtigung des Wachstums unter salinen Bedingungen ist sowohl auf osmotische als auch auf spezifische Effekte der Salze (Ioneneffekte oder Ionenimbalance) zurückzuführen (Epstein, 1985; Läuchli, 1990). Bei Sulfat-Salinität sind die Pflanzen hauptsächlich osmotischen Belastungen ausgesetzt. Bei Chlorid-Salinität werden die osmotischen zusätzlich von toxischen Effekten begleitet. Ein Übermaß an Chlorid-Ionen beeinträchtigt die Phosphat- und Sulfationen-Aufnahme. Ebenso beeinträchtigt Natrium die Aufnahme von Kalium und anderer essentieller Kationen, indem es mit ihnen um die Aufnahme konkurriert. Ob nun Natrium oder Chlorid schädlicher für die Pflanze und den Stoffwechsel ist, darüber gibt es widersprüchliche Angaben. Levitt (1980) berichtet, daß die toxische Wirkung von NaCl mehr auf das Anion als auf das Kation zurückzuführen ist. Untersuchungen von Gimmler et al. (1984) unterstützen diese Aussage. Die Autoren konnten zeigen, daß Enzyminaktivierung auf Chlorid-Hemmung zurück geht und nicht auf eine Hemmung

durch Natrium. Weiterhin wurde beobachtet, daß eine kompetitive Hemmung des Chlorid-Anions mit meist anionischen Substraten der Enzyme auftrat. Fortmeier und Schubert (1995) dagegen sind der Ansicht, daß vor allem das Kation, also Natrium, das toxische Potential von hohen NaCl-Konzentrationen ausmacht. Die Schädigung von Natrium wird damit erklärt, daß es Calcium an der Plasmamembran ersetzt und so die Eigenschaften und Permeabilitäten verändert (Pessarakli, 1994). Beide Hypothesen schließen sich aber gegenseitig nicht aus. Die eine erklärt Enzyminaktivierungen, die andere Membraneffekte.

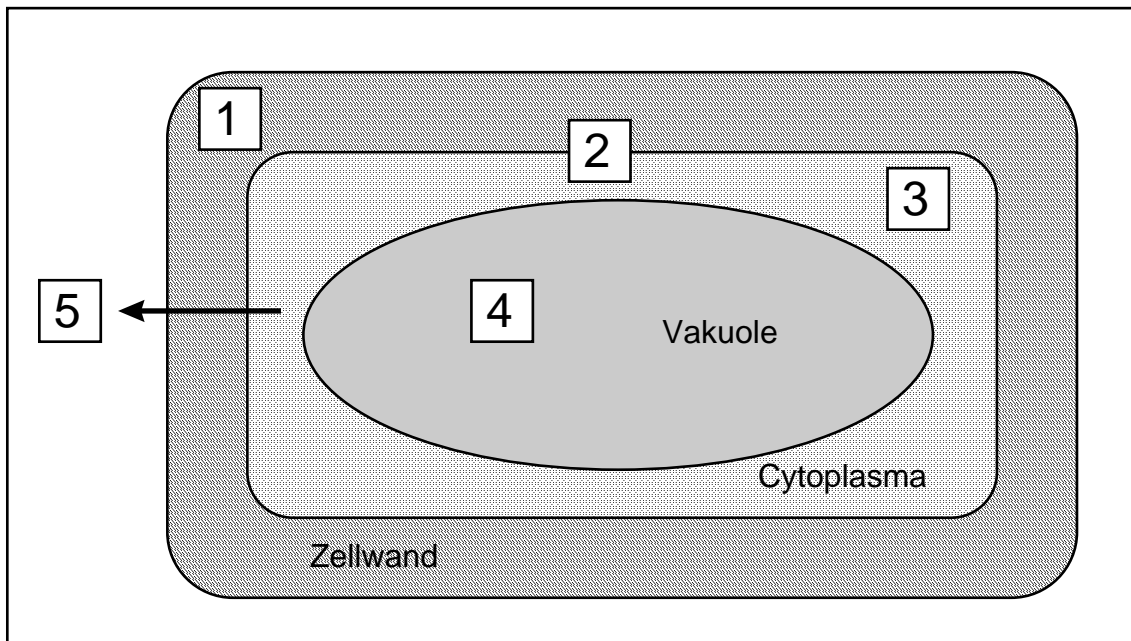
Die Beeinträchtigung des Wurzelwachstums von Schlacke-Pflanzen (Länge, Biomasse) durch Schwermetalle ist dagegen weitgehend zu vernachlässigen, da die Konzentration an gelösten Schwermetallen in der Schlacke-Bodenlösung relativ gering ist. Der toxische Effekt kann zwar durch eine Kombination mehrerer Schwermetalle nebeneinander stärker ausgeprägt sein als bei einem Schwermetall-Ion allein (Hagemeyer und Breckle, 1996). Dennoch wird der Einfluß der Schwermetalle in MHKW-Schlacke als eher gering eingeschätzt.

Einen größeren Einfluß hat neben dem hohen Salzgehalt aber die verdichtete Bodenstruktur der Schlacke. Die Pflanze muß für das Vordringen der Wurzel einen größeren Kraftaufwand leisten, der Energieaufwand ist erhöht und steht damit für andere Stoffwechselprozesse nicht mehr zur Verfügung. Der zusätzliche Energieaufwand wird durch Verlangsamung des Längenwachstums kompensiert (Dexter, 1986). Solche Wurzeln werden kürzer und dicker (Lipiec et al., 1991). Das Wurzelwachstum (Biomasse) ist aber im Vergleich zum Sproßwachstum weniger beeinträchtigt. Daraus resultiert für Schlacke-Pflanzen ein im Vergleich zur Kontrolle verdoppeltes Wurzel-zu-Sproßverhältnis. Cheeseman (1988) und Rawson et al. (1988) berichten über ein erhöhtes Wurzel-zu-Sproßverhältnis, wenn Pflanzen unter Salzbelastung leiden. Auch unter Nährstoffmangel kommt es zu einer Vergrößerung der Wurzel- im Vergleich zur Sproßmasse. Die Pflanze verwendet mehr Energie darauf, die Wasser- und Nährstoff-absorbierende Wurzeloberfläche zu vergrößern, um die Nährstoffversorgung aufrechtzuerhalten. Da die Schlacke-Bodenlösung sowohl arm an Phosphat ist, als auch einen hohen Salzgehalt aufweist (Tab. 3-5), ist die Vergrößerung des Wurzel-zu-Sproß-Verhältnisses vermutlich eine Reaktion auf beide Faktoren.

#### 4.2.2 Aufnahme von Nährstoffen und Schwermetallen

Die im Bodenwasser gelösten Ionen stehen im chemischen Gleichgewicht mit dem Apoplasten der Wurzeln. Die Aufnahme in den Apoplastenraum der Wurzel ist ein nicht energieabhängiger, passiver Prozeß, der durch Diffusion und Massenfluß angetrieben wird (Marschner, 1995). Während ihrer radialen Fortbewegung innerhalb der Wurzel kann ein Teil in die Zellen bzw. den Symplasten oder über das Xylem in Sproß und Blätter transportiert werden. Kationische Schwermetalle können aber zu einem erheblichen Teil auch an Zellwandsubstanzen gebunden werden. Das erklärt, wieso ein Großteil der aufgenommenen Metalle sich im Wurzelgewebe wieder findet (75-90%) (s. Kapitel 3.2.5.4). Die Aufteilung des Gesamtgehaltes der aufgenommenen Schwermetalle zwischen diesen Möglichkeiten hängt von dem jeweiligen Metall und seiner Affinität zu den Polymeren der Zellwand, seiner Konzentration in der Bodenlösung, den Aufnahmemechanismus in die Zelle sowie dem Genotyp der Pflanze ab (Greger, 1999). Malone et al. (1974) untersuchten die Lokalisation von Blei in belasteten Mais-Pflanzen und fanden eine Akkumulation in den Zellwänden der Wurzel. Auch für Cadmium existieren Untersuchungen (Khan et al., 1984), die sich mit der Anreicherung dieses Schwermetalls in Maiswurzeln beschäftigen. Bei hoher Cadmiumbelastung wurde eine Anreicherung in den Zellwänden beobachtet, während bei niedrigen Cd-Konzentrationen eine Akkumulation hauptsächlich in den Vakuolen stattfand. Dieses Ergebnis konnte in den eigenen Experimenten mit *Zea mays* kultiviert auf Schlacke bestätigt werden: Sowohl in den Kontrollpflanzen als auch in Schlacke-Pflanzen findet sich ein erheblicher Anteil der Schwermetalle in den isolierten Zellwandfraktionen der Hypodermis, Endodermis und des Zentralzylinders wieder (Tab. 3-21, 3-23). Auffällig ist, daß der Schwermetallanteil in den Zellwänden von Erde-Wurzeln am Gesamtgehalt der Wurzel höher ist als der entsprechende Anteil in den Schlacke-Wurzeln. Dieses Phänomen wird darauf zurückgeführt, daß bei niedrigerer Schwermetallkonzentration (wie in der Bodenlösung der Gartenerde) ein Großteil der Schwermetalle von der Zellwand adsorbiert werden kann. Steigt die Schwermetallkonzentration jedoch wie in der Bodenlösung der Schlacke an, kommt es zu einer Sättigung der Bindungsstellen in der Zellwand. Die Aufnahmekapazität der Zellwände für die kationischen Metallionen ist begrenzt. Die überschüssigen Metalle werden weiter transportiert und an anderer Stelle deponiert. Die

Immobilisierung toxischer Schwermetallionen in der Zellwand ist ein möglicher Mechanismus der Schwermetallresistenz. Dadurch wird der Kontakt der Schwermetalle mit dem Protoplasten verhindert ebenso wie der Weitertransport im Apoplasten und in den Symplasten (Larcher, 1995).



**Abb. 4-1** Zellschema mit verschiedenen Entgiftungsmöglichkeiten für Schwermetalle: (1) Immobilisierung in der Zellwand, (2) behinderter Transport durch die Plasmamembran, (3) Komplexbildung mit Proteinen (Phytochelatinen), (4) Kompartimentierung in der Vakuole (Bindung an organische Säuren wie Malat, Citrat, Oxalat), (5) aktiver Transport aus der Zelle.

In Abbildung 4-1 ist ein allgemeiner Überblick über verschiedene Entgiftungsmechanismen von Schwermetallen in einer pflanzlichen Zelle gegeben. Neben der bereits erwähnten Festlegung in der Zellwand existieren weitere Möglichkeiten, die Konzentration an Schwermetallen im Cytoplasma niedrig zu halten.

Ein Vergleich des Elementgehaltes der Blätter von auf Schlacke kultivierten Mais - Pflanzen (Tab. 3-13) mit entsprechenden aus der Literatur als toxisch bekannten Gehalten (Tab. 3-12) zeigt, daß das Wachstum von Mais auf Schlacke eher durch kritische Elementgehalte limitiert wird, als daß es durch überhöhte Gehalte potentiell toxischer Elemente gehemmt wird. Die N- und P-Versorgung der Blätter von auf Schlacke gewachsenen Mais-Pflanzen liegen im unteren Bereich der als normal geltenden Werte. Eine Düngung mit diesen Elementen führte zu einer Verbesserung

des Wachstums und der Erträge (Fuchs und Gimmler, 1995). Der Kalium-Gehalt der Schlacke-Pflanzen ist zwar niedriger als der der Kontrolle, liegt aber noch im Normalbereich.

Die Gehalte der Mikronährstoffe Eisen, Kupfer, Zink und Molybdän in den Blättern von auf Schlacke gewachsenen Pflanzen sind zwar deutlich höher als die der Kontrollpflanzen, liegen aber außerhalb toxischer Konzentrationen. Nur für Bor ist eine geringfügige Überschreitung der Normalwerte bei den Blattgehalten der Schlacke-Kultur zu beobachten. Dies stimmt mit entsprechenden Untersuchungen an anderen Pflanzenarten überein (vgl. Fuchs, 1995).

Nicht essentielle, toxische Schwermetalle wie Blei, Cadmium und Chrom werden in beiden Anzuchten in ähnlicher Konzentration gefunden.

Insgesamt weisen auf Schlacke kultivierte *Zea mays*- Pflanzen, obwohl sie einem vielfachen Schwermetall-Streß ausgesetzt sind, keine toxischen Konzentrationen im Blattgewebe auf. Ein wichtiger Grund hierfür ist, wie oben bereits erwähnt, die geringe Löslichkeit und damit die eingeschränkte Verfügbarkeit der Schwermetallverbindungen in der Schlacke. Ein weiterer Grund liegt in der Festlegung der Schwermetall-Ionen in den Zellwänden der Wurzel. Dies verhindert die Aufnahme in den Symplasten und den Weitertransport in die oberirdischen Pflanzenteile.

### 4.2.3 Transferkoeffizienten

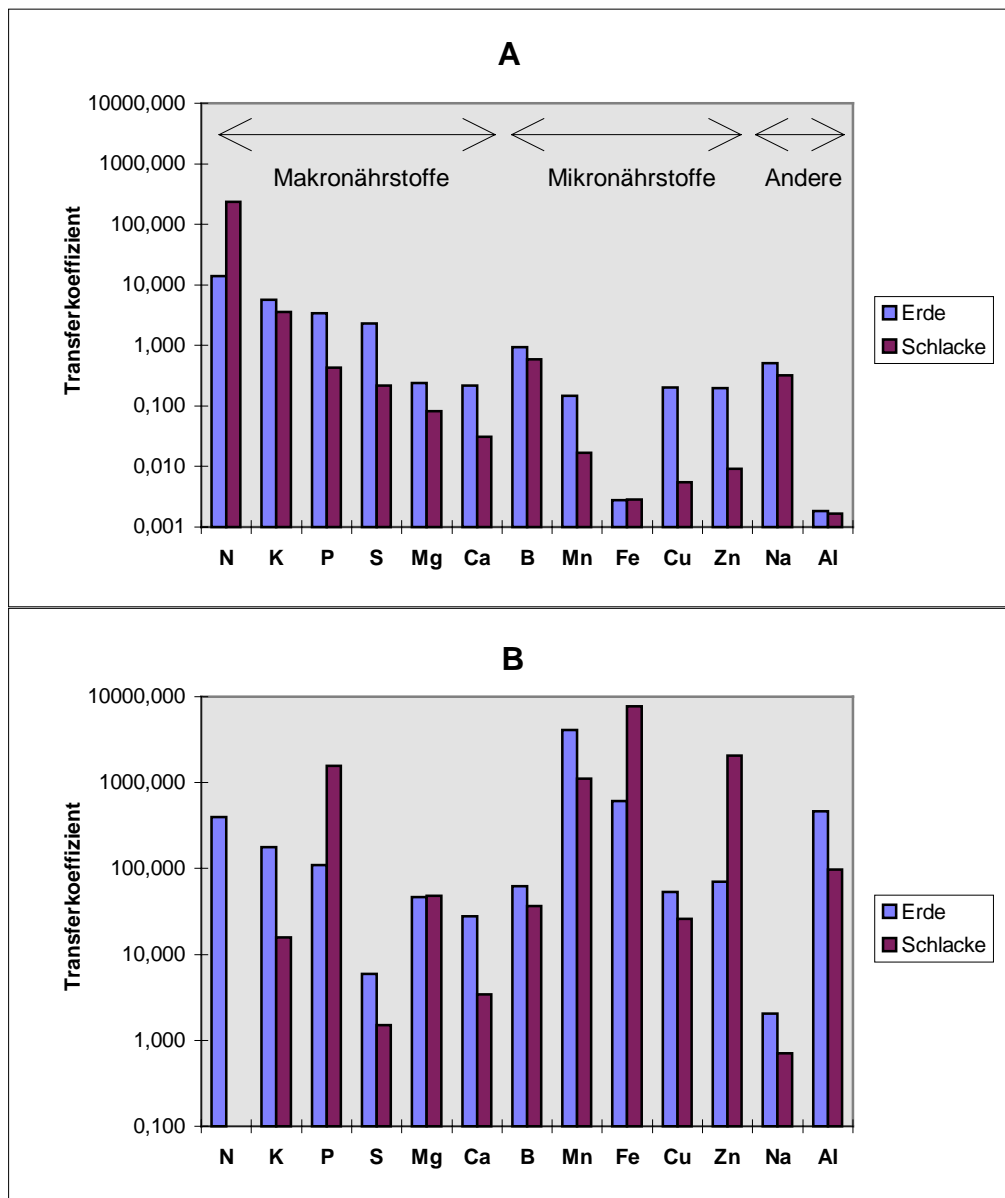
Transferkoeffizienten sind ein grobes Maß für die Effizienz der Aufnahme von Elementen durch die Pflanze aus dem Bodensubstrat (Marschner, 1995). Trotzdem sind sie geeignet, den Transfer von Elementen aus dem Bodensubstrat in die Pflanze zu beurteilen. In Abb. 4-2 (A) sind die Transferkoeffizienten von Makro- und Mikronährelementen von *Zea mays* dargestellt, wie sie sich aus den Blattgehalten (Tab. 3-13) und den entsprechenden Bodengehalten (Tab. 3-1 bzw. Tab. 3-2) errechnen lassen (Transferkoeffizient entspricht dem Quotient aus mg eines Elementes pro kg Trockenmasse der Pflanze und mg des Elementes pro kg Trockengewicht Bodensubstrat). Makronährelemente haben Transferkoeffizienten zwischen 0.2 und 200, die Transferkoeffizienten von Mikronährstoffen liegen dagegen bedeutend niedriger zwischen 0.003 und 0.9. Die höchsten Koeffizienten



weisen die Makronährelemente auf, die das Wachstum der Pflanzen begrenzen und deshalb häufig als Dünger appliziert werden, nämlich Stickstoff, Kalium und Phosphor. Der Transferkoeffizient für Stickstoff ist in Schlacke-Pflanzen deutlich höher als der in den Kontrollpflanzen. Dies resultiert aus dem geringen N-Gehalt der Schlacke (Verbrennung!) und dem gleichzeitig hohen Bedarf der Pflanze. Der Koeffizient für Phosphor ist dagegen in den Blättern der Schlacke-Pflanzen deutlich niedriger als in der Kontrolle. Dies ist darauf zurückzuführen, daß Schlacke zwar einen hohen Gesamtgehalt an Phosphor aufweist (Tab. 3-1), dieser aber zum größten Teil nicht pflanzenverfügbar ist. Auf Schlacke kultivierte Mais-Pflanzen leiden deshalb an Phosphatmangel. Die Transferkoeffizienten der weiteren Makroelemente sinken in der Sequenz  $S > Mg > Ca$  und sind für Schlacke-kultivierte Pflanzen stets niedriger als für die auf Gartenerde gewachsenen Pflanzen. Das liegt an dem erhöhten Gehalt der Schlacke an Schwefel (Sulfat), Magnesium und Calcium.

Die Transferkoeffizienten der Mikronährstoffe weisen die Sequenz  $Mn > Zn > Cu > Fe$  auf. Auch hier liegen die Werte für die auf Schlacke kultivierten Mais-Pflanzen niedriger als die entsprechenden Werte der Kontrollpflanzen. Für die Mikronährelemente Nickel und Molybdän, sowie die toxischen Schwermetalle Blei, Cadmium und Chrom konnten wegen der sehr geringen Gehalte im Blatt keine zuverlässigen Transferkoeffizienten ermittelt werden. Aus früher ermittelten Daten (vgl. Fuchs und Gimmler, 1995) wurden Transferkoeffizienten für Schlacke-Pflanzen zwischen 0.0005 (Blei) und 0.08 (Cadmium) errechnet. Die entsprechenden Werte für die Kontrollpflanzen lagen zwischen 0.002 (Chrom) und 0.1 (Nickel).

Natrium und Aluminium, zwei Elemente, die für das Wachstum der Pflanze nicht lebensnotwendig sind, weisen deutlich unterschiedliche Transferkoeffizienten auf. Für Natrium liegen sie im Bereich von 0.5, für Aluminium im Bereich von 0.02. Die höheren Werte für Natrium lassen sich dadurch erklären, daß dieses Element zwar nicht essentiell ist, aber zur osmotischen Kompensation in der Vakuole eingesetzt werden kann, während Aluminium im pflanzlichen Stoffwechsel keine Bedeutung hat und als mehrwertiges Ion relativ impermeabel für Membranen ist. In beiden Fällen sind die Transferkoeffizienten in Schlacke kultivierten Pflanzen etwas niedriger als in den Kontrollpflanzen.



**Abb. 4-2** Logarithmische Darstellung der Transferkoeffizienten von *Zea mays* errechnet aus den Blattgehalten / festes Bodensubstrat (A) und aus den Blattgehalten / Bodenlösung (B).

Berechnet man die Transferkoeffizienten auf der Basis der Elementkonzentrationen in der Bodenlösung, erhält man ein etwas anderes Bild (Abb. 4-2 B). Hier zeigen die Mikronährelemente die größeren Transferkoeffizienten gegenüber den Makronährelementen. Bedingt durch den niedrigeren Gehalt der Elemente in der Bodenlösung als im festen Bodensubstrat bei gleich bleibendem Gehalt in den Blättern ergibt sich stets ein größerer Transferkoeffizient als bei der Berechnung mit festem Bodensubstrat.

#### 4.2.4 Reaktionen auf Salzbelastung

Die durchschnittliche Konzentration an NaCl in der Schlacke-Bodenlösung beträgt 100 - 200 mM. Sie ist damit um den Faktor 10 höher als in der Bodenlösung von Gartenerde und stellt für einen Glykophyten einen erheblichen Streßfaktor dar. Besonders in den frühen Entwicklungsphasen reagieren die Pflanzen sensibel auf hohe Salzgehalte. Mais ist ein Glykophyt, der nur mäßig salztolerant ist (Cramer, 1994; Larcher, 1995). Es existieren allerdings große Unterschiede zwischen verschiedenen Maishybriden.

Mais kann unter den salinen Bedingungen in der Schlacke dennoch keimen und sich entwickeln, wenn auch mit einer gewissen Verzögerung im Vergleich zu den Kontrollpflanzen.

Zur Einschätzung der Salzbelastung in Schlacke wurde in einem Versuch Mais in Sandkultur mit einer Nährlösung gegossen, der NaCl in einer Konzentration von 100 mM zugesetzt war. Im Vergleich zu in Schlacke kultivierten Maispflanzen war das Wachstum dieser Pflanzen stärker eingeschränkt. Die mit 100 mM NaCl behandelten Pflanzen erreichten eine etwas geringere Sproßlänge als die Schlackepflanzen, die Wurzellänge war sogar auf die Hälfte der in Schlacke gewachsenen Pflanzen reduziert. Dieser Unterschied kann auf den hohen Calcium-Gehalt in der Schlacke zurückgeführt werden. Die hohe Calcium-Konzentration mindert die toxische Wirkung von Natrium und läßt ein verbessertes Wurzelwachstum zu (Cramer et al., 1990).

Auch die Natriumgehalte in den Blättern wiesen signifikante Unterschiede auf. In Blättern von auf Schlacke kultiviertem Mais wurde eine um den Faktor 13 niedrigere Natriumkonzentration gefunden als in denen des Vergleichsversuches mit 100 mM NaCl-Behandlung. Das unterstreicht die schützende Wirkung von Calcium, indem es einem Einstrom von Natrium entgegenwirkt (Cramer et al., 1987) und die Selektivität von Kalium gegen Natrium erhöht (Pessarakli, 1994; Zhong und Läuchli, 1994). In Tab. 4-1 sind die  $K^+ / Na^+$ - Selektivitäten von Mais-Blättern kultiviert in Gartenerde, Schlacke oder mit 100 mM NaCl- angereicherter Nährlösung gelistet. Ein Vergleich zeigt, daß die Selektivität für Kalium durch Kultur auf Schlacke zwar im Vergleich zur Erde-Kultur erniedrigt ist, aber dennoch höher ist als bei der Kultur mit 100 mM NaCl. Dieses Ergebnis bestätigt noch einmal den positiven und schützenden Einfluß von Calcium in der Schlacke, was letztendlich zu einem besseren Wachstum führt, als man es aufgrund der hohen Salzbelastung erwarten würde.

	Erde	Schlacke	100 mM NaCl
$K_i / K_a$	139.3	15.7	175.4
$Na_i / Na_a$	2.25	0.78	20.56
$K^+ / Na^+$ - Selektivität	61.9	20.1	8.5

**Tab. 4-1** *Kalium- und Natrium-Verhältnisse von Innen (Blatt) - und Außenkonzentrationen (Bodenlösung) und  $K^+ / Na^+$ - Selektivität von Mais-Blättern kultiviert auf Gartenerde, Schlacke und Nährlösung mit 100 mM NaCl.*

Weiterhin beeinträchtigt NaCl die Proteinsynthese und erhöht die Hydrolyse von Proteinen (Levitt, 1980). Als Folge kommt es zu einer Anhäufung von freien, löslichen Aminosäuren, was auch in Schlacke kultiviertem Mais beobachtet werden kann (s. Kapitel 3.3.6). Häufig wird als Folge einer hohen Salzbelastung die Akkumulation der Aminosäure Prolin festgestellt. Dem Prolin wird dabei primär nicht eine osmotische Funktion zugeschrieben, sondern die Aminosäure soll die Löslichkeit von Proteinen bei Salzstreß verbessern, indem es sich mit seinen hydrophoben Bereichen an hydrophobe Stellen von Proteinen bindet (Mengel, 1991). Eine veränderte Löslichkeit von Proteinen kann wiederum die Enzymaktivität beeinflussen.

#### 4.2.5 Osmotische Anpassung

In MHKW-Schlacke als salinem Bodensubstrat ist die Ionenkonzentration hoch, was ein niedriges Wasserpotential und ein hohes negatives osmotisches Potential zur Folge hat. Dies erniedrigt wiederum die Wasserverfügbarkeit für die Mais-Pflanzen, die auf diesem Substrat wachsen. Unter Salzstreß stehende Pflanzen gleichen diese ungünstige Potentialdifferenz oft durch vermehrte Ionenaufnahme aus, die sie in ihren Zellen anreichern und damit die Osmolarität ihres Zellsaftes erhöhen (Mengel, 1991). Diese Anpassung bezeichnet man als „osmotic adjustment“ (Rains, 1972). Betrachtet man die Summe der Konzentrationen der prominentesten Kationen (Natrium, Kalium und Calcium) und Anionen (Chlorid, Sulfat, Phosphat) im Blatt als auch in der Wurzel von Maispflanzen, so kann man kaum Unterschiede zwischen der

Erde- und Schlacke-Kultur erkennen (s. Kapitel 3.2.3.1 und 3.2.3.2). Trotz der leichten Erhöhung der löslichen Aminosäuren und Zucker in den Wurzeln der Schlacke-kultivierten Pflanzen kann keine Erhöhung der Osmolarität des Zellsaftes beobachtet werden.

#### **4.2.6 Peroxidaseaktivität und Sulfhydrylkonzentration**

Ein Vergleich der Elementgehalte im Blattgewebe von auf Erde und Schlacke gewachsenen Mais-Pflanzen ergab zwar keinen Hinweis auf toxische Konzentration von Schwermetallen. Dennoch sind die Gehalte in der Wurzel relativ hoch.

Als Diagnosekriterium für die Phytotoxizität von Bodensubstraten können Veränderungen in Enzymaktivitäten dienen. Ein zuverlässiger Marker für Schwermetallstreß, auch bei niedrigen Metallkonzentrationen, ist die Peroxidaseaktivität (Castillo, 1986). Der Vorteil bei der Bestimmung von Enzymaktivitäten liegt darin, daß sie schon bestimmt werden können, bevor andere sichtbare Symptome aufgrund von Schwermetalltoxizität in Erscheinung treten. Unter dem Einfluß eines Umweltstresses (Kälte, Pathogen-Befall, Luftverschmutzung durch SO<sub>2</sub>, Ozon, NO<sub>x</sub>) wird in vielen Pflanzen die Aktivität der Peroxidasen stimuliert (Brundt et al., 1996; Castillo, 1992). Es besteht eine gute Korrelation zwischen dem Schwermetallgehalt des pflanzlichen Gewebes und der Peroxidase-Induktion (Van Assche et al., 1988; Van Assche und Clijsters, 1990). Pandolfini et al. (1992) untersuchten den Einfluß von Nickel-Toxizität auf die Peroxidaseaktivität in Weizen. Sie stellten fest, daß die extrazelluläre Guaiacol-Peroxidaseaktivität nicht von Nickel beeinflusst wird, jedoch die Syringaldazin-Aktivität. Syringaldazin ist ein spezifisches Substrat für die Peroxidasen, die mit der Lignifizierung verbunden sind. Es wird vermutet, daß durch erhöhte Peroxidaseaktivität im interzellulären Raum es zu einer Stimulierung der Zellwandversteifung kommt, was als mechanische Anpassung an Streßbedingungen interpretiert wird. In Schlacke-kultivierten Maiswurzeln ist zwar eine leichte Tendenz zu erhöhter Peroxidaseaktivität im Apoplasten zu erkennen, der Unterschied reicht aber nicht aus, um von einer wirklichen Stimulierung der Enzymaktivität zu sprechen. Aufgrund der chemischen Veränderungen der Zellwände (vgl. Kap. 3.2.5) hätte man ein deutlicheres Ergebnis erwarten können. Gleichzeitig wird aber auch nicht die im

Inneren der Wurzelzellen lokalisierte Peroxidase stimuliert, wie es von Pandolfini et al. (1992) bei Weizen unter Nickelbelastung beobachtet wurde.

Als weiteres Kriterium für Schwermetallstress kann die Sulfhydrylkonzentration dienen. Der drastisch erhöhte Gehalt an SH-Gruppen im Wurzelgewebe von auf Schlacke kultivierten Maispflanzen (s. Kapitel 3.3.4) deutet auf eine vermehrte Bildung von Phytochelatinen hin. Obwohl das Messen des SH-Gehaltes nicht ausschließlich auf Phytochelatine zurückgeführt werden kann, so ist es doch wahrscheinlich, daß der größte Teil des Anstiegs der SH-Konzentration bei Schwermetallbelastung das Ergebnis einer Phytochelatinsynthese ist. Nach Schätzungen (Grill et al., 1985) sind mindestens 90% der nicht proteingebundenen SH-Gruppen den Phytochelatinen zuzurechnen. Den Phytochelatinen und dem Baustein Glutathion werden verschiedene Funktionen zugeschrieben. Sie vermindern zum einen die cytoplasmatische Konzentration und damit die Toxizität einiger Schwermetalle durch Komplexbildung. Phytochelatin-Metall-Komplexe sind weit weniger toxisch für den zellulären Stoffwechsel der Pflanze als die freien Metallionen (Prasad, 1999). Die Phytochelatin-Metall-Komplexe können zum anderen als Shuttle fungieren, um den Metalltransport über den Tonoplasten in die Vakuole zu erleichtern (Steffens, 1990).

Dabei haben die verschiedenen Schwermetalle unterschiedliche Wirkung auf die Induktion der Phytochelatine. Kupfer-Ionen stimulieren die Phytochelatin-Synthese weniger als Cadmium (Grill et al., 1989). Da in MHKW-Schlacke die verschiedenen Schwermetalle nebeneinander vorliegen, ist auf den ersten Blick nicht klar, welche Ionen für die Bildung der Phytochelatine ausschlaggebend sind. Betrachtet man jedoch die Schwermetall-Gehalte des gesamten Wurzelgewebes und der Zellwandisolate, so kann man zumindest Nickel als Induktor weitgehend ausschließen, da es im Wurzelgewebe von Schlacke-Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle kaum angereichert ist und zudem ein sehr großer Teil in der Zellwand gebunden vorliegt. Blei dagegen kommt in einer sechsfachen Konzentration in den Schlacke-Wurzeln vor und ist nur etwa zur Hälfte in der Zellwandphase festgelegt. Ein Teil der Blei-Ionen könnte also in den Symplasten vordringen und dort die vermehrte Synthese von komplexierenden Phytochelatinen zur Folge haben.

In seiner reduzierten Form werden dem Glutathion auch antioxidative Eigenschaften zugeschrieben (Young und Grundy, 1998), wodurch ihm eine weitere Schutzfunktion zukommt.

#### 4.2.7 Energieversorgung

Die Ergebnisse der Mini-PAM-Messungen zeigen, daß der Photosyntheseapparat von *Zea mays* durch Kultur auf Schlacke nicht beeinträchtigt wird. Vielmehr ist er sogar leistungsfähiger als der der Kontrollpflanzen. Die Gründe hierfür wurden nicht weiter untersucht, da wie im Ergebnisteil bereits erwähnt, die Wurzel von Mais-Pflanzen im Mittelpunkt der Untersuchungen stand. Eine naheliegende Erklärung für eine erhöhte energetische Kapazität der Schlacke-Pflanzen gegenüber den Kontrollpflanzen ist aber, daß die Bewältigung der Streßfaktoren der Schlacke höhere Energiereserven bzw. -leistungen erfordert.

Auch die Bestimmung des „adenylate energy charge“ (AEC) zur Beschreibung der Fitneß und Leistungsfähigkeit der Versuchspflanzen ergibt keinen Hinweis auf eine Beeinträchtigung des Energiestatus der Schlacke-Pflanzen. Die Werte liegen bei Schlacke-Pflanzen sowohl im Blatt als auch in der Wurzel sogar höher als die entsprechenden Werte der Kontrollpflanzen (s. Kapitel 3.3.1). Trotz vermehrten Auftretens von verschiedenen Streßfaktoren sind die Mais-Pflanzen, die auf Schlacke kultiviert wurden, also energetisch betrachtet gegenüber den Kontrollpflanzen nicht benachteiligt.

#### 4.2.8 Wurzelarchitektur

Bei der Kultivierung von *Zea mays* auf Schlacke konnten verschiedene strukturelle Veränderungen an der Wurzel beobachtet werden. Die verminderte Wurzellänge und die Zunahme im Wurzeldurchmesser (vgl. Kapitel 3.2.4) sind typische morphologische Veränderungen für mechanisch belastete Wurzeln (Hartung et al., 1994; Bennie, 1996). Auch ein erhöhter Salzgehalt führt zu einer Verdickung der Wurzeln (Zhong und Läuchli, 1993).

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Wurzeln sind weiterhin anatomische Unterschiede zwischen den beiden Anzuchten festzustellen. In den radialen Zellwänden der Rhizodermis von auf Schlacke angezogenen Maiswurzeln wurden Zellwandverdickungen, sogenannte Phi-Verdickungen, beobachtet (Abb. 3-9). Phi-Verdickungen können entweder in einzelliger oder mehrzelliger Schicht ausgebildet

sein (Guttenberg, 1968; Peterson et al., 1981; Eschrich, 1995). Solche Zellwand-Verdickungen wurden bisher in Zellwänden des Wurzelcortex verschiedener gymnospermer Familien (Taxaceae, Podocarpaceae, Cupressaceae) (Guttenberg, 1968; Haas et al., 1976) und einiger Vertreter der Angiospermen gefunden (Rosaceae, Geraniaceae, Berberidaceae, Sapindaceae) (Peterson et al., 1981; Praktikakis et al., 1998). Außerdem können diese Verdickungen in Zellwänden der Hypodermis ausgebildet sein (z.B. *Geranium*, Haas et al., 1976). Die Verdickungen wurden also für verschiedene Gewebe beschrieben, sind für die Rhizodermis aber noch nicht bekannt. Zudem sind alle publizierten Arten mit Phi-Struktur den Dikotyledonen zuzuordnen. Obwohl *Zea mays* eine sehr gut untersuchte Pflanzenart darstellt, wurde in der Literatur bisher noch nichts über das Auftreten solcher Zellwandmodifikationen berichtet. Allgemein wurde über das Vorliegen von Phi-Verdickungen in den Zellwänden von monokotylen Arten bisher nichts veröffentlicht. Im Unterschied zu den in der Literatur beschriebenen Beispielen war die Ausbildung der Phi-Verdickungen in den Wurzeln von auf Schlacke kultivierten Mais-Pflanzen nicht kontinuierlich. Diese Variation in der Häufigkeit der Ausprägung kann mit der Inhomogenität des Substrats zusammenhängen. MHKW-Schlacke ist ein heterogen zusammengesetztes Substrat. Trotz Entfernung größerer Partikel (>2 cm) vor der Verwendung für die Kulturversuche enthielt das Substrat immer noch Fragmente aus Glas oder Metall und die Partikelgröße variierte beträchtlich. Dadurch können lokale Unterschiede in der Wurzelumgebung existieren, die das unregelmäßige Auftreten der Phi-Verdickungen erklären. Die Tatsache, daß die Verdickungen nicht entlang des gesamten Wurzeldurchmessers ausgeprägt sind und daß sie keine Barriere für das apoplastische Eindringen von gelösten Stoffen wie z.B. Berberin-Hemisulfat darstellen, zeigt, daß sie keine Barrierefunktion entsprechend der Exodermis erfüllen. Vielmehr muß entsprechend anderen Einschätzungen aus der Literatur folgend geschlußfolgert werden, daß die Phi-Verdickungen eine mechanisch unterstützende Rolle ausüben, um die Wurzel gegen von außen wirkende Kräfte zu schützen und Deformationen zu verhindern (Haas et al., 1976; Weerdenburg und Peterson, 1983). Ebenso deuten die im Vergleich zu den Kontroll-Wurzeln verstärkt ausgebildeten U-förmigen Einlagerungen in der Endodermis auf eine mechanische Verstärkung der Schlacke-Wurzeln hin.



#### 4.2.9 Veränderte Chemie der Zellwände

In der Arbeit wurde ein Vergleich der chemischen Zusammensetzung der hypodermalen und endodermalen Zellwände in Bezug auf Lignin, Aminosäuren und hydrophoben Verbindungen durchgeführt. Die Kenntnis der chemischen Zusammensetzung kann hilfreich bei der Interpretation struktureller Veränderungen sein. Nimmt man Bezug zu der Aussage, daß Wurzeln von Schlacke-kultiviertem Mais mechanischen Anpassungen unterliegen, so ist der erhöhte Ligningehalt ein weiteres Argument dafür. Die Inkrustierung der Zellwand mit Lignin verleiht der Wurzel mechanische Stabilität, da durch die enge Verknüpfung des Lignins mit den Cellulosefibrillen die statischen Eigenschaften der Zellwand verbessert werden (Richter, 1996). Betrachtet man die Unterschiede in der Ligninzusammensetzung zwischen den verschiedenen Anzuchten, fällt der erhöhte Anteil des H-Monomers (p-Hydroxyphenyl) in der Hypodermis von auf Schlacke kultivierten Pflanzen auf (s. Kapitel 3.2.5.1). H-reiches Lignin wird auch als Streßlignin bezeichnet (Monties und Chalet, 1992). Ein höherer Anteil der H-Einheit führt zu einem höher kondensierten Lignin aufgrund der vermehrten zwischenmolekularen C-C-Bindungen. Diese funktionelle Anpassung der Hypodermis hängt mit der Tatsache zusammen, daß die Hypodermis das äußere Abschlußgewebe der Wurzel ist, welches mit der umliegenden Rhizosphäre und deren Mikroorganismen in direktem Kontakt steht. Campbell und Sederoff (1996) berichten von Lignin aus Gymnospermen-Kompressionsholz, welches reich an H- und G-Einheiten ist. Die mechanische Belastung der Hypodermis während des Eindringens der Wurzel in das feste Bodensubstrat kann die Ursache für den Anstieg des H-Anteils und zu einem geringeren Ausmaß des Gehaltes der G-Einheit sein.

Zellwände enthalten sowohl strukturelle Proteine als auch Enzyme (Gladys et al., 1988; Kolek und Kozinka, 1992). Die Aminosäurezusammensetzung dieser Proteine kann nach saurer Hydrolyse analysiert werden (s. Kapitel 3.2.5.3). Da die isolierten Zellwände bereits einer enzymatischen Verdauung unterzogen und mehrfach gewaschen sind, ist klar, daß lösliche oder nur leicht gebundene Proteine durch die Isolierprozedur entfernt werden. Nur Proteine mit struktureller Funktion verbleiben in den Zellwänden. Das Aminosäuremuster der Strukturproteine variiert von Spezies zu Spezies. Monokotyledonen wie Mais besitzen ein Threonin-Hydroxyprolin-reiches und ein Histidin-Hydroxyprolin-reiches Glykoprotein (Kieliszewski und Lamport, 1987;

Kieliszewski et al., 1990). Der erhöhte Gehalt an Hydroxyprolin kann ein Hinweis für das Vorhandensein von Extensin sein, ein Hydroxyprolin-reiches Glykoprotein, das als Strukturprotein fungiert (Richter, 1996). Extensine kommen in einer Vielzahl von Pflanzen und Algen vor (Catt et al., 1976; Showalter, 1993). Mit Extensin wird häufig eine Verstärkung der Zellwandstruktur verbunden (Gladys et al., 1988). Extensin kommt beispielsweise in Geweben wie Sklerenchym vor, das als Festigungselement in der Pflanze dient. Auf der anderen Seite sind Extensine nicht in Geweben von jungen Wurzeln vorhanden, die noch kein Festigungsgewebe enthalten (Gasparikova, 1992).

Bei der Betrachtung der chromatographischen Ergebnisse der aliphatischen Suberin-Verbindungen in der Zellwand wird deutlich, daß durch Kultur auf Schlacke keine signifikanten Unterschiede im Gesamtgehalt der Hypodermis induziert werden (vgl. Kapitel 3.2.5.2). Der Gehalt an Suberin ist ein Maß für die Permeabilität der Zellwände für Wasser und gelöste Ionen (Kolattukudy, 1974). Die Aufnahme von Wasser, Nährsalzen oder auch Schadstoffen ist bei Wachstum von Mais auf Schlacke also nicht stärker kontrolliert.

#### **4.2.10 Abscisinsäure**

Bei der Betrachtung der ABA-Gehalte sind neben den ABA-Gehalten der Wurzeln die ABA-Konzentrationen in der Bodenlösung zu berücksichtigen, da hier zwei gegenläufige Effekte sichtbar werden: 1. Der hohe Salzgehalt in der Schlacke-Bodenlösung regt die ABA-Synthese in der Wurzel an. Dadurch steigen die ABA-Gehalte in der Wurzel. 2. Der alkalische pH-Wert hingegen führt zu einem ABA-Efflux aus der Wurzel in die Bodenlösung und somit zu einer Erniedrigung der ABA-Konzentration in der Wurzel.

ABA ist eine schwache Säure mit einem  $pK_s$  von 4.8. In der protonierten, ungeladenen Form kann sie Plasmamembranen durchdringen und so die Wurzelzellen verlassen (Baier et al., 1990; Degenhardt et al., 2000). Im alkalischen Milieu der Bodenlösung kommt es zur Deprotonierung. Die anionische Form verliert durch die Ladung ihren lipophilen Charakter und kann so von den Wurzelzellen nicht wieder aufgenommen werden (Heilmann et al., 1980). Dieses Phänomen ist als

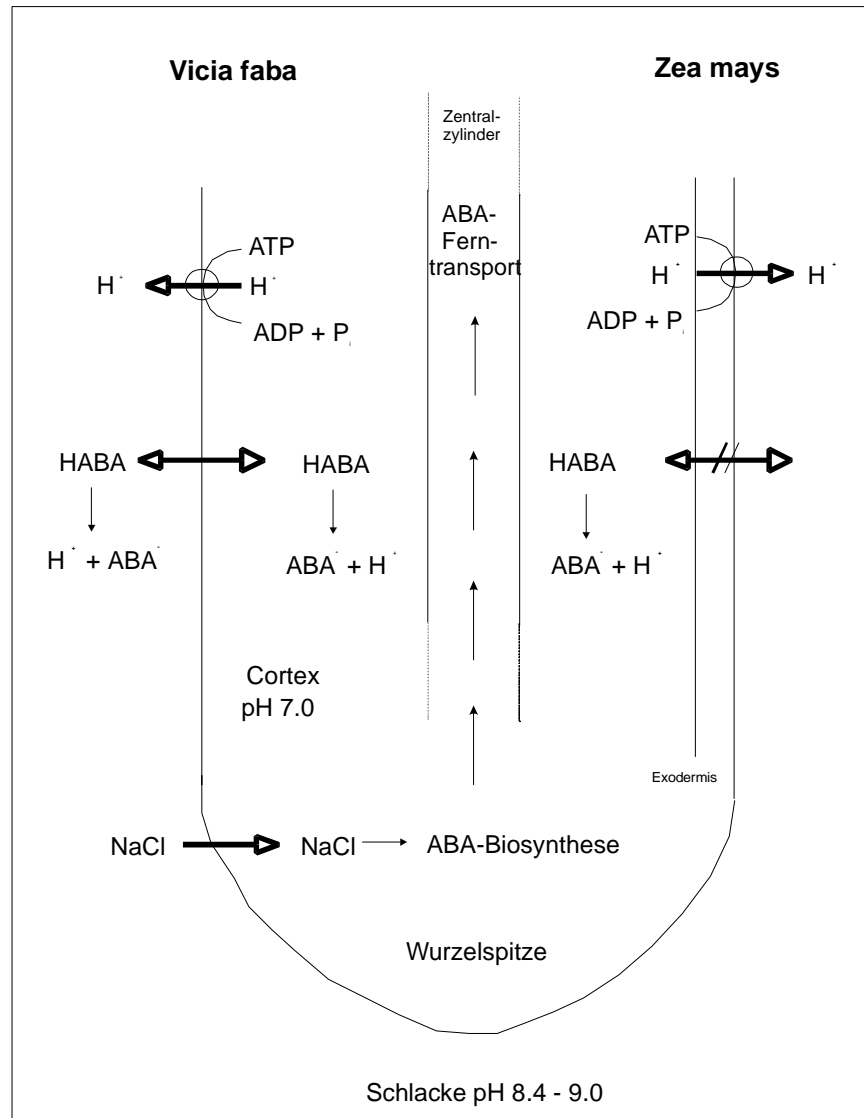
sogenannte Anionenfalle bekannt. Zu diesem Thema existieren mathematische Modelle von Daeter et al. (1993) und Slovik et al. (1995), die sich mit dem Problem des alkalischen pH-Wertes und der Verteilung der Abscisinsäure unter diesen Bedingungen zwischen Wurzel und Rhizosphäre beschäftigten.

Die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung richtet sich nach dem Permeabilitätskoeffizienten der Plasmamembran für die protonierte Abscisinsäure (HABA). Dieser liegt im Bereich zwischen  $0.02$  und  $0.25 \cdot 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$  (Baier et al., 1990). Im steady state, der aber in einem offenen System, wie einer ständig gewässerten Topfkultur, nie erreicht werden dürfte, läßt sich aus dem Protonen-Gradienten  $H^+_{\text{innen}} / H^+_{\text{außen}}$  eine maximale äußere Anreicherung des Anions  $ABA^-$  von ca. 100 errechnen. Hierbei handelt es sich um eine grobe Abschätzung, die unter anderem vernachlässigt, daß durch die Protonen-ATPase des Plasmalemmas und durch andere schwache Säuren eine Ansäuerung in der Nähe der Wurzeloberfläche erfolgen kann. Die Modellrechnung berücksichtigt nur den cytoplasmatischen pH-Wert und den „bulk“-pH-Wert in der Bodenlösung der Schlacke.

Wieso reagieren nun Mais (*Zea mays*) und Puffbohne (*Vicia faba*) so unterschiedlich? Um diese Frage zu beantworten, wurde die Wurzelanatomie der beiden Pflanzenarten verglichen (vgl. Degenhardt et al., 2000). Dabei konnte gezeigt werden, daß *Vicia faba* im Vergleich zu *Zea mays* keine Exodermis besitzt. Wie in Abb. 3-9 (I) - (L) dargestellt, besitzt Mais in der Hypodermis Casparysche Streifen, die in *Vicia faba* fehlen. *Vicia faba* ist also eine non-exodermale Species. Die Exodermis ist für ABA nicht durchlässig, stellt also für den Efflux eine Barriere dar (Freundl et al., 2000). Das erklärt, warum der Gehalt an ABA in der Wurzel von auf Schlacke gezogenem Mais trotz alkalischem pH-Wert der Bodenlösung hoch ist. Die Wurzeln von *Vicia faba* dagegen produzieren zwar aufgrund des hohen Salzgehaltes mehr ABA als die Kontrollwurzeln, diese wird jedoch in Folge des alkalischen pH-Wertes aus der Wurzel herausgezogen und akkumuliert in der Bodenlösung. Dieses „Auslaufen“ von ABA in die Bodenlösung bei alkalischem Boden-pH-Wert wurde von Slovik et al. (1995) in einer Computersimulation vorhergesagt und hier in einem Experiment bestätigt.

Bei der Salzbelastung der Schlacke handelt es sich um einen transienten und nicht um einen permanenten Streßfaktor. Zu Beginn ist die Salzbelastung für die Pflanzen am größten, nimmt aber mit der Zeit infolge des Auswaschens von Salz durch

Bewässerung ab. Daraus resultiert die beobachtete Kinetik der ABA-Konzentration in der Bodenlösung von Schlacke (s. Kapitel 3.3.3, Abb. 3-17), wo zu Beginn ein ABA-Anstieg beobachtet wird. Dies erklärt aber noch nicht den Anstieg der ABA-Konzentration in der Bodenlösung von gewaschener Schlacke. Der ABA-Efflux wird also nicht nur durch eine stimulierte ABA-Synthese in der Wurzel aufgrund der transienten Salzbelastung hervorgerufen, sondern die Zusammenhänge sind hier komplexer. Aufgrund des alkalischen pH-Wertes wird ein Anstieg des ABA-Effluxes aus der Wurzel erwartet. Diese endogene Erniedrigung der ABA-Konzentration kann von der Pflanze durch eine erhöhte Synthese ausgeglichen werden.



**Abb. 4-3** Verteilung von ABA in *Vicia faba* (A) und *Zea mays* (B) zwischen Wurzel und der alkalischen Bodenlösung nach dem Anionenfallenprinzip. Die gesamte Wurzel ist zur Vereinfachung auf ein einziges Kompartiment (pH 7.0) reduziert, das mit der Bodenlösung der Schlacke (pH 8.4 - 9.0) in Austausch steht. Der  $pK_s$  für ABA ist 4.8, der Permeabilitätskoeffizient des Plasmalemmas für die protonierte Form von Abscisinsäure (HABA) liegt in der Größenordnung von  $0.02 - 0.25 \cdot 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$ . Die Verteilung von ABA nach dem Anionenfallenprinzip ist experimentell belegt (Degenhardt et al., 2000).

#### 4.2.11 pH-Regulation

Da viele biochemische Prozesse empfindlich auf Veränderungen des pH-Wertes reagieren, versucht die Pflanze, den intrazellulären pH-Wert mit Hilfe von ATPasen weitgehend konstant zu halten. Dennoch beeinflussen viele Außenfaktoren die pH-Regulation und pH-Homeostase (Gimmler und Degenhardt, 2000). Dazu zählt eine hohe Salzkonzentration (0 - 500 mM NaCl) im Kulturmedium, die den intrazellulären pH-Wert von Maiswurzeln nachweislich beeinflusst (Spickett et al., 1993). Die Alkalisierung des Cytoplasmas fällt mit einer Verschiebung von 0.1 - 0.2 pH-Einheiten geringfügiger aus als die vakuoläre Alkalisierung (0.6 pH-Einheiten). Die Interpretation der zugrunde gelegten  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren wird allerdings dadurch erschwert, daß Veränderungen in der Ionen-Zusammensetzung (Natrium-Aufnahme) ebenfalls die chemische Verschiebung des Phosphatsignals beeinflussen. Da Schlacke neben dem alkalischen pH-Wert ebenfalls hohe Konzentrationen an NaCl enthält, könnte dies zu der beobachteten Alkalisierung beitragen. Die Beteiligung von Ionen-Transport-Mechanismen wie  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ -Antiport ist gleichfalls wahrscheinlich (Gabarino und Dupont, 1988; Katsuhara et al., 1997). In Experimenten mit niedrigeren Salzkonzentrationen (160 mM), wie sie von Gerasimowicz et al. (1986) durchgeführt wurden, konnten dagegen keine pH-Wert-Veränderungen in Maiswurzeln beobachtet werden.

## 5. Zusammenfassung

In der vorgestellten Arbeit wurden das Wachstum und das physiologische Verhalten von *Zea mays* auf Müllheizkraftwerk (MHKW) -Schlacke im Vergleich zu Gartenerde als Kulturmedium untersucht. Dabei stand das Wurzelsystem der Maispflanzen im Mittelpunkt des Interesses. Da feste Bodensubstrate verwendet wurden, mußten diese zu Beginn der Experimente chemisch, physikalisch und bodenbiologisch charakterisiert werden.

Die Analyse der Schlacke zeigte, daß Schlacke ein multifaktorielles Streßsystem darstellt: Sie enthält einen hohen Gehalt an leicht löslichen Salzen, v.a. NaCl (bis zu 220 mM in der Bodenlösung). MHKW-Schlacke ist dagegen arm an Stickstoff und pflanzenverfügbarem Phosphat. Der pH-Wert der Bodenlösung von Schlacke ist stark alkalisch (pH 8.4 - 9.0). Darüber hinaus besitzt Schlacke einen hohen Gehalt an potentiell toxischen Schwermetallen und weist im Vergleich zum Kontrollsubstrat Gartenerde eine verdichtete Bodenstruktur mit erhöhtem mechanischen Widerstand auf.

Im Vergleich zu der Kontroll-Anzucht auf Gartenerde reagierten die auf Schlacke kultivierten Mais-Pflanzen mit vermindertem Wachstum: Sproß und Wurzel erreichten nur die Hälfte der Länge der Kontrollpflanzen. Ein Vergleich der Biomassen von Sproß und Wurzel zeigte, daß das Sproßwachstum der Schlacke-Pflanzen stärker eingeschränkt ist als das Wurzelwachstum, woraus ein vergrößertes Wurzel / Sproß-Verhältnis resultiert.

Das Wachstum von jungen Mais-Pflanzen auf Schlacke ist jedoch nicht in dem Maß eingeschränkt, wie es aufgrund der hohen Salzbelastung zu erwarten wäre. In einem Vergleichsexperiment mit Mais-Pflanzen, die in einer Nährlösung mit Zusatz von 100 mM NaCl kultiviert wurden, war das Wachstum erheblich schlechter und in den Blättern akkumulierte weitaus mehr Natrium als in Schlacke-Pflanzen. Hier wird der positive Einfluß des hohen Calciumgehaltes der Schlacke deutlich.

Die Beeinträchtigung des Wachstums von Mais bei Kultur auf Schlacke wird hauptsächlich auf Phosphatmangel zurückgeführt, da durch Düngung eine beträchtliche Wachstumsverbesserung erzielt werden kann. Zudem wurden keine toxischen Konzentrationen an Schwermetallen im Blattgewebe von auf Schlacke kultivierten Pflanzen gefunden.

Der Photosynthese-Apparat der Schlacke-kultivierten Pflanzen war sehr leistungsfähig: Es bestand keine Beeinträchtigung in der Energieverfügbarkeit (Quantenausbeute des Photosystems II) und die Lichtsättigung der photosynthetischen Elektronentransportrate lag sogar höher als bei den Kontrollpflanzen. Die Bestimmung des „adenylate energy charge“ bestätigte diesen Sachverhalt.

Das Wurzelsystem von *Zea mays* auf Schlacke wies strukturelle Veränderungen auf. Neben der verkürzten Wurzellänge und dem vergrößerten Wurzeldurchmesser der Schlacke-Pflanzen ergaben mikroskopische Untersuchungen, daß die Wurzeln durch Kultur auf Schlacke mit einer mechanischen Verstärkung reagieren: Stärker ausgeprägte tangential Zellwandverdickungen der Endodermis im tertiären Zustand und Zellwandmodifikationen in den radialen Zellwänden der Rhizodermis (Phi-Verdickungen). Für monokotyle Arten, insbesondere für Mais, gibt es bisher keine Beschreibung von Phi-Verdickungen in der Literatur.

Gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen belegen, daß sich die Zellwände von auf Erde und Schlacke kultivierten Maiswurzeln im Hinblick auf den Gesamtgehalt an Lignin (endodermale Zellwandisolate) und in der Ligninzusammensetzung (hypodermale Zellwandisolate) unterscheiden: In Schlacke-kultivierten Maiswurzeln wurde ein höherer Anteil an dem Lignin-Monomer p-Hydroxyphenyl gefunden, was zu einem höher verdichteten Lignin führt (Streßlignin). Die endodermalen Zellwände von auf Schlacke-kultivierten Pflanzen hatten dagegen einen höheren Gesamtignin-Gehalt als die entsprechenden Kontrollen, was ebenfalls eine mechanische Verstärkung der Wurzel bewirkt.



In Bezug auf Suberin konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Anzuchten gefunden werden, weder in den hypodermalen noch in den endodermalen Zellwandisolaten. Die verschiedenen Streßfaktoren führen demnach nicht zu einer verstärkten Imprägnierung der Zellwände mit lipophilem Material.

Die Zellwände von Mais spielen eine wichtige Rolle bei der Immobilisierung von Schwermetallen. Die Zellwandisolate von auf Erde und Schlacke kultivierten Mais-Pflanzen wiesen je nach Schwermetall-Element 43 - 100 % des Gesamtgehaltes auf. Die absoluten Gehalte in den Zellwandisolaten von auf Schlacke angezogenen Pflanzen waren dabei höher als die entsprechenden Werte der Kontrolle. Eine Anreicherung in den Zellwänden wurde hauptsächlich für die Schwermetalle Zink, Blei, Nickel und Chrom beobachtet.

Als unspezifische Streßantwort reagierten Maispflanzen auf die Kultur in Schlacke mit einer erhöhten Peroxidaseaktivität in der interzellulären Waschflüssigkeit. Die Peroxidaseaktivität des Symplastens der Wurzel unterscheidet sich zwischen den beiden Anzuchten dagegen nicht.

Die Konzentration des Phytohormons Abscisinsäure (ABA) war in Blättern von auf Schlacke kultivierten Pflanzen von *Zea mays* und *Vicia faba* im Vergleich zu den Kontrollpflanzen erhöht. Dieser Anstieg ist eine Folge der erhöhten Salzbelastung der Schlacke, da die ABA-Gehalte entsprechender Blätter von auf gewaschener Schlacke kultivierten Pflanzen annähernd den Kontrollwerten entsprachen. Bei der Verteilung von ABA zwischen der Wurzel und der Bodenlösung der umliegenden Rhizosphäre konnte das als Anionenfalle bekannte Prinzip bestätigt werden. Nach diesem Modell reichert sich ABA im alkalischen Kompartiment an (hier: Schlacke-Bodenlösung). In den Wurzeln konnte nur in der Maiskultur auf Schlacke ein erhöhter Gehalt gefunden werden, nicht dagegen in der *Vicia faba*-Kultur. Dieser Unterschied liegt daran, daß Mais im Gegensatz zu *Vicia faba* eine exodermale Spezies ist und die Exodermis für ABA eine Barriere darstellt, was den ABA-Efflux in die Rhizosphäre verhindert.

Im Wurzelgewebe von auf Schlacke kultivierten Maispflanzen wurde ein im Vergleich zur Kontrolle 15-facher Gehalt an wasserlöslichen, nicht proteingebundenen Sulfhydrylgruppen nachgewiesen. Diese auf Schwermetallstreß zurückzuführende Reaktion impliziert, daß die in der Schlacke-Bodenlösung vorhandenen Schwermetalle nicht ausreichend im Apoplasten zurückgehalten werden und bis in den Symplasten vordringen können.

## 6. Summary

In the present thesis the growth and physiological behaviour of *Zea mays* cultivated on municipal solid waste incinerator bottom slag and garden mould were investigated. Thereby the root system of the maize plants was of main interest. Since solid soil substrates were used, experiments started with the chemical, physical and microbiological characterisation.

The analysis represents the bottom incinerator slag as a multifactorial stress system: Slag contains a considerable amount of highly soluble salts, mainly sodium chloride (up to 220 mM in the soil solution). However, slag is poor in nitrogen and plant available phosphate. The pH-value of the slag soil solution is very alkaline (pH 8.4 – 9.0). Furthermore, slag exhibits high levels of potential toxic heavy metals and presents a condensed soil matrix with strong mechanical impedance.

Compared to the control culture on garden mould, maize plants cultivated on slag showed a reduced growth: shoot and root of slag cultivated plants reached only one half of the length of the control plants. On the other hand the comparison of the shoot and root biomass revealed, that the shoot growth of the slag plants was more reduced than the root growth, resulting in an increased root to shoot ratio.

Observing young corn plants on slag, the growth is not decreased as such extensively as it would be expected by this high salt burden. In a comparative experiment maize plants were cultivated in hydroponic culture supplemented by 100 mM NaCl. Here the plant growth was considerable inferior and the maize leaves accumulated sodium in much higher amounts. This emphasises the positive influence of the high calcium content of the slag.

The long lasting impaired growth from corn plants cultivated on slag is mainly due to phosphate deficiency, because a substantial amendment of growth can be obtained by fertilising. Furthermore, no toxic concentration of heavy metals was detected in the leaves of slag grown plants.

The photosynthetic performance of slag cultivated plants is very efficient: the energy availability (quantum yield of the photosystem II) was not reduced and the light saturation of the photosynthetic electron transport rate was even higher than for the control plants. The determination of the adenylate energy charge confirms that fact.

Cultivating corn on slag, structural modifications can be observed in the root system. Besides the reduced root length and the enlargement of the root diameter microscopic examinations revealed, that roots response with a mechanical strengthening. They form more intensive tangential cell wall thickenings of the endodermis in the tertiary state of development and cell wall modifications in the radial cell walls of the rhizodermis (phi thickenings). Phi thickenings in monocotyledons species especially for maize haven't been reported in the literature to date.

Gaschromatographic and mass spectrometric investigations showed, that cell walls of maize roots cultivated on garden mould and slag differ in the total amount of lignin (endodermal cell wall isolates) and in lignin composition (hypodermal cell wall isolates): In slag cultivated corn roots a larger proportion of the lignin monomer p-hydroxyphenyl was detected, which results in higher condensed lignin. The higher amount of total lignin of the endodermal cell walls from slag grown plants also causes a mechanical strengthening of the root.

With regard to suberin no differences were found between the cultures, neither in hypodermal nor in endodermal cell wall isolates. Therefore the various stress factors do not induce a stronger impregnation of the cell walls with lipophilic material.

The cell walls of maize play an important role by immobilisation of heavy metals. Depending on the metal species, 43 - 100 % of the total amount of the metals was recovered in cell wall isolates of garden mould and slag cultivated maize plants. The absolute amounts in the cell wall isolates of slag cultivated plants were higher than the corresponding control values. An accumulation in the cell walls were found for the heavy metals zinc, lead, nickel and chrome.

As a non specific answer to stress, roots of maize plants react on slag cultivation with a rise in activity of peroxidase. This increase was only manifested in the intercellular wash fluid but not in the symplast.

The investigation of the phytohormone abscisic acid (ABA) revealed a higher concentration of ABA in leaves of *Zea mays* and *Vicia faba* plants cultivated on slag than for the control plants. That increase is due to the high salt burden of slag, because the ABA values of leaves of plants cultivated on washed slag correspond approximately to the control values. The distribution of ABA between roots and the soil solution of the rhizosphere match to the anion trap concept. In accordance with that model ABA is enriched in alkaline compartments (here slag-soil solution). However, in roots an increased amount of ABA was only detected for maize cultivated on slag, but not for *Vicia faba*. The reason for that difference between the two plant species is, that *Zea mays* is an exodermal species and its exodermis represents a barrier for ABA, reducing the ABA efflux into the rhizosphere.

In the root tissue of slag cultivated maize plants a 15-fold amount of water soluble, non-proteinogen sulfhydrylgroups was detected. This may be an indication for heavy metal stress and implies, that heavy metal ions in slag soil solution can not be retained sufficiently by the apoplast and enter the symplast.

## 7. Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ABA	Abcisinsäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AEC	Adenylate energy charge
AES	Atomemissionsspektrometrie
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Celsiusgrad
ca.	zirka
CC	Container Company
cm	Zentimeter
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)
dto	dito
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
eV	Elektronenvolt
EV	Extraktionsvolumen
Fa.	Firma
FG	Frischgewicht
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Erdbeschleunigung (9.81 m s <sup>-2</sup> )
g	Gramm
G	Guaiacyl
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
H	p-Hydroxyphenyl

---

HEPES	N-2-Hydroxylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICP	induktiv gekoppeltes Plasma
IWF	interzelluläre Waschflüssigkeit
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Molarität
MHKW	Müllheizkraftwerk
MHz	Megahertz
Min.	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
$\mu$ M	micromolar
MPa	Megapascal
mS	Millisiemens
MS	Massenspektrometrie
N	normal
n.g.	nicht gemessen
n.n.	nicht nachweisbar
NH <sub>4</sub> OAc	Ammoniumacetat
nm	Nanometer
NMR	Nuclear magnetic resonance
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
POD	Peroxidase
rel.	relativ
RFA	Röntgenfluoreszenzanalyse
$\rho$	Dichte
s	siehe
S	Syringyl
sec	Sekunde
SH	Sulfhydryl
Tab.	Tabelle

---

TG	Trockengewicht
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TVO	Trinkwasserverordnung
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	volumenbezogenes Gewichtsprozent

---



## 8. Literaturverzeichnis

- Atkinson D.E. (1968) The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochem.* 7, 4030-4034.
- Bache C.A., Lisk D.J. (1990) Heavy-metal absorptions by perennial ryegrass and swiss chard grown in potted soils amended with ashes from 18 municipal refuse incinerators. *J. Agric. Food Chem.* 38, 190-194.
- Baier M., Gimmler H., Hartung W. (1990) The permeability of the guard cell plasma membrane and tonoplast. *J. Exp. Bot.* 41, 351-358.
- Bano A., Dörffling K., Bettin D., Hahn H. (1993) Abscisic acid and cytokinins as possible root to shoot signals in xylem sap of rice plants in drying soil. *Austr. J. Plant Physiol.* 20, 109-115.
- Baumeister W., Ernst W. (1978) Mineralstoffe und Pflanzenwachstum. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Bennie A.T.P. (1996) Growth and mechanical impedance. In: Waisel Y., Eshel A., Kafafi U. (eds.) *Plant Roots, The Hidden Half*, Dekker, New York, 453-470.
- Blume H.-P. (1990) *Handbuch des Bodenschutzes*. Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg / Lech.
- Bornefeld T., Weis U. (1981) Adenylate energy charge and phosphorylation potential in the blue green bacterium *Anacystis nidulans*. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 176, 71-82.
- Boudet A.M., Lapierre C., Grimapettenati J. (1995) Transley review no 80 - Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytol.* 129, 203-236.
- Brundt Ch., Rüeeggesser A., Brändle R. (1996) *Stress bei Pflanzen*. UTB, Haupt.

- Brundrett M.C., Enstone D.E., Peterson C.A. (1988) A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue. *Protoplasma* 146, 133-142.
- Brune A. (1994) Wirkungen von Schwermetallen und Mechanismen zu ihrer Entgiftung in *Hordeum vulgare*. Dissertation, Universität Würzburg.
- Campbell M.M., Sederoff R.R. (1996) Variation in lignin content and composition - Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiol.* 110, 3-13.
- Castillo F.J. (1986) Extracellular peroxidases as markers of stress? In: Greppin H., Penel C., Gaspar Th. (eds.) Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. University of Geneva.
- Castillo F.J. (1992) Peroxidases and stress. In: Penel C., Gaspar Th., Greppin H. (eds.) Plant Peroxidases 1980-1990, Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical and Physiological Aspects, University of Geneva, 46-60.
- Catt J.W., Hill G.J., Roberts K. (1976) A structural glycoprotein, containing hydroxyproline, isolated from the cell wall of *Clamydomonas reinhardtii*. *Planta* 131, 165-171.
- Chapin F.S. (1990) Effects of nutrient deficiency on plant growth: evidence for a centralized stress response system. In: Davies W.J., Jeffcoat B. (eds.) Importance of Root to Shoot Communication in the Response to Environmental Stress, BSPGR Monograph 21. British Society for Plant Growth Regulation, Bristol, 135-148.
- Cheeseman J.M. (1988) Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol.* 87, 547- 550.

- Cramer G.R., Läuchli A. (1986) Ion activities in solution in relation to Na<sup>+</sup>- Ca<sup>2+</sup> interactions at the plasmalemma. *J. Exp. Bot.* 37, 321-330.
- Cramer G.R., Lynch J., Läuchli A., Epstein E. (1987) Influx of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> into roots of salt-stressed cotton seedlings. Effects of supplemental Ca<sup>2+</sup>. *Plant Physiol.* 83, 510-516.
- Cramer G.R., Addel-Basset R., Seemann J.R. (1990) Salinity-calcium interactions of root growth and osmotic adjustment of two corn cultivars differing in salt tolerance. *J. Plant Nutr.* 13, 1453-1462.
- Cramer G.R. (1994) Response of maize (*Zea mays* L.) to salinity. In: Pessaraki M. (ed.) *Handbook of Plant and Crop Stresses*. Marcel Dekker, New York, 449-459.
- Davies B.E. (1980) *Applied Soil Trace Elements*, Wiley and Sons, Chichester.
- Davies W.J., Zhang J. (1991) Root signals and the development of plants growing in drying soil. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 42, 55-63.
- Davies B.R. (1994) Soil Chemistry and Bioavailability with Special Reference to Trace Elements. In: Farago M.E. (ed.) *Plants and the Chemical Elements, Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity*. VCH, Weinheim, 4-30.
- Daeter W., Slovik S., Hartung W. (1993) The pH gradients in the root system and the abscisic acid concentration in xylem and apoplastic saps. *Phil. Transactions Royal. Soc. London, B. Biol. Sci.* 341, 49-56.
- Dean J.F.D. (1997) Lignin analysis. In: Dashek W.V. (ed.) *Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology*, CRC, New York, 199-215.
- Degenhardt B., Gimmler H., Hose E., Hartung W. (2000) Effect of alkaline and saline substrates on ABA contents, -distribution and -transport in plant roots. *Plant Soil* (im Druck).

- Dexter A.R. (1986) Model experiments of behaviour of roots as the interface between a tilled seed-bed and a compacted sub-soil. I. Effect of seed-bed aggregate size and sub-soil strength on wheat roots. *Plant Soil* 95, 123-133.
- Ellman G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys* 82, 70-77.
- Enstone D.E., Peterson C. (1992) The apoplastic permeability of root apices. *Can. J. Bot.* 70, 1502-1512.
- Epstein E. (1983) Crops tolerant of salinity and other mineral stresses. In: *Ciba Found Symp 97: better crops for food*. Pitman, London, 61-76.
- Epstein E. (1985) Salt tolerant crops: Origin development and prospects of the concept. *Plant and Soil* 89, 183-198.
- Eschrich W. (1995) *Funktionelle Pflanzenanatomie*. Springer, Berlin.
- Fleuret A., Deloire A. (1982) Aspects histochimiques et biochimiques de la cicatrisation des fruits de tomates blesses. *Z. Pflanzenphysiol.* 107, 259-268.
- Fortmeier R., Schubert S. (1995) Salt tolerance of maize (*Zea mays L.*): The role of sodium exclusion. *Plant Cell and Environment* 18 (9), 1041-1047.
- Freundl E., Steudle E., Hartung W. (2000) Apoplastic transport of abscisic acid through roots of maize: effect of the exodermis. *Planta* 210, 222-231.
- Fuchs B. (1995) *Das Gefahrenpotential der Schlacke des MHKW Würzburg aus botanischer Sicht. Zulassungsarbeit für das Lehramt an Gymnasien, Universität Würzburg.*
- Fuchs B., Track C., Lang S., Gimmler H. (1997) Salt effects of processed municipal solid waste incinerator ash on vegetation and ground water. *J. Applied Bot.* 71, 154-163.

- Gabarino J., Dupont F.M. (1988) NaCl induces a Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> antiport in tonoplast vesicles from barley roots. *Plant Physiol.* 86, 231-236.
- Gasparikova O. (1992) Root metabolism. In: Kolek J., Kozinka V. (eds.) *Developments in plant and soil sciences 46: Physiology of the plant root.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 82-128.
- Gerasimowicz W.V., Tu S.-I., Pfeffer P. (1986) Energy facilitated sodium uptake in excised corn roots via <sup>31</sup>P- and <sup>23</sup>Na-NMR. *Plant Physiol* 81, 925-928.
- Gimmler H., Kaader R., Kirchner U., Weyard A. (1984) The chloride sensitivity of *Dunaliella parva* enzymes. *Z. Pflanzenphysiol.* 114, 131-150.
- Gimmler H., Degenhardt B., Lang S., Track C. (1998a) Uptake of sodium, boron and heavy metals from an alkaline top layer and translocation to leaves and lower roots of *Vitis vinifera* during long time duplex study. *J. Appl. Bot.* 72, 191-202.
- Gimmler H., Track C., Dresch H. (1998b) Müllverbrennungs-Schlacke als Baumaterial. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung.* *Z. Umweltchem. Ökotox.* 10 (2), 90-98.
- Gimmler H., Degenhardt B. (2000) Alkaliphilic and alkalitolerant algae. In: Rai L.C., Gaur J.P. (eds.) *Algal adaptation to environmental stresses: Physiological, biochemical and molecular approaches,* Springer, Berlin (im Druck).
- Gisi U. (1990) *Bodenökologie.* Thieme Verlag, Stuttgart.
- Gladys I., Varner C., Varner J.E. (1988) Cell wall proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biol.* 39, 321-353.
- Goss M.J., Russell R.S. (1980) Effects of mechanical impedance on root growth in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* 31, 577-588.

- Greger M. (1999) Metal availability and bioconcentration in plants. In: Prasad M.N.V., Hagemeyer J. (eds.) *Heavy Metal Stress in Plants*, Springer, Berlin.
- Grill E., Winnacker E., Zenk M.H. (1985) Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230, 674-676.
- Grill E., Löffler S., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1989) Phytochelatins, the heavy - metal binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamyl-cysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6838-6842.
- Guttenberg H. (1968) Der primäre Bau der Angiospermenwurzel. *Encyclopedia of Plant Anatomy*. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Haas D.L., Carothers Z.B., Robbins R.R. (1976) Observations on the phi-thickenings and Casparian strips in pelargonium roots. *Am. J. Bot.* 63, 863-867.
- Hagemeyer J., Breckle S.-W. (1996) Growth under Trace Element Stress. In: Waisel Y., Eshel A., Kafkafi U. (eds.) *Plant Roots, The Hidden Half*. Dekker, New York.
- Hanf M. (1982) *Ackerunkräuter Europas mit ihren Keimlingen und Samen*. BLV Verlagsgesellschaft, München.
- Hartung W., Radin J.W. (1989) Abscisic acid in the mesophyll apoplast and in the root xylem sap of stressed plants. *Curr. Topics Plant Biochem. Physiol.* 8, 110-124.
- Hartung W., Davies W.J. (1993) Abscisic acid under drought and salt stress. In: Pessarakli M. (ed.) *Handbook of crop stress*. Marcel Dekker, New York, 401-411.
- Hartung W., Zhang J., Davies W.J. (1994) Does abscisic acid play a stress physiological role in maize plants growing in heavily compacted soil? *J. Exp. Bot.* 45, 221-226.

- Hartung W., Sauter A., Turner N.C., Fillery I., Heilmeyer H. (1996) Abscisic acid in soils: What is its function and which factors and mechanisms influence its concentration? *Plant Soil* 184, 105-110.
- Hartung W., Turner N.C. (1997) Abscisic acid relations in stressed roots. In: Attman A., Waisel Y. (eds.) *Basic Life Sciences- Biology of Root Formation and Development*, Plenum Press, New York.
- Heilmann B., Hartung W., Gimmler H. (1980) The distribution of abscisic acid between chloroplasts and cytoplasm of leaf cells and the permeability of the chloroplast envelope for abscisic acid. *Z. Pflanzenphysiol.* 97, 67-78.
- Hermes U., Brümmer G. (1984) Einflussgrößen der Schwermetalllöslichkeit und -bindung in Böden. *Z. Pflanzenernähr. Bodenkunde* 147, 400-424.
- Hock B., Elstner E.F. (1984) *Pflanzentoxikologie*. Wissenschaftsverlag, Mannheim.
- Jeschke W.D. (1984)  $K^+$ - $Na^+$ -exchange at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations and salt tolerance. In: Staples R.C., Toenniessen G.H. (eds.) *Salinity Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvement*. Wiley & Sons, New York, 37-66.
- Jeschke W.D., Peuke A.D., Pate J.S., Hartung W. (1997) Transport, synthesis and catabolism of abscisic acid (ABA) in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.) under phosphate deficiency and moderate salinity. *J. Exp. Bot.* 48, 1737.
- Kahle H., Breckle W. (1989) Single and combined effects of Pb and Cd on young beech trees (*Fagus sylvatica* L.). In: Bucher J.B., Bucher-Wallin I. (eds.) *Air pollution and forest decline*. Proc. 14<sup>th</sup> Int. IUFRO meeting. Birmsdorf, Eidgenöss. Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft, 442-444.
- Katsuhara M., Kawasaki T. (1996) Salt stress induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of barley roots. *Plant Cell Physiol.* 37, 169-173.

- Katsuhara M., Yazaki Y., Sakano K., Kawasaki T. (1997) Intracellular pH and proton-transport in barley root cells under salt stress: In vivo  $^{31}\text{P}$ -NMR study. *Plant Cell Physiol.* 38, 155-160.
- Khan D.H., Duckett J.G., Frankland B., Kirkham J.B. (1984) An x-ray microanalytical study of the distribution of cadmium in roots of *Zea mays* L. *J. Plant Physiol* 115, 19-28.
- Kieliszewski M., Lamport D.T.A. (1987) Purification and partial characterization of a hydroxyprolin-rich glycoprotein in a graminaceous monocot, *Zea mays*. *Plant Physiol.* 85, 823-827.
- Kieliszewski M., Leykam J., Lamport D.T.A. (1990) Structure of the Threonine-Rich Extensin from *Zea mays*. *Plant Physiol.* 92, 316-326.
- Kolattukudy P.E., Agrawal V.P. (1984) Structure and composition of aliphatic constituents of potato tuber skin (suberin). *Lipids* 9, 682-691.
- Kolek J., Kozinka V. (1992) *Developments in Plant and Soil Sciences* 46, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Kreeb K.H., Richter H., Hinckley T.M. (1989) Structural and functional responses to environmental stresses: Water shortage. SPB Acad Publ, The Hague.
- LAGA (1994) Technische Regeln: Anforderungen an die stoffliche Verwertung von mineralischen Reststoffen, Teil: „Schlacken und Aschen aus thermischen Abfallbehandlungsanlagen“ (Herausgeber Länder-Arbeitsgemeinschaft Abfall (LAGA)).
- Lang B. (1994) Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von Ammonium auf *Hordeum vulgare* und *Fagus silvatica*. Dissertation, Universität Würzburg.



- Lapierre C., Pollet B., Monties B. (1991) Thioacidolysis of spruce lignin: GC - MS analysis of the main dimers recovered after Raney nickel desulphuration. *Holzforschung* 45, 61-68.
- Lapierre C., Pollet B., Negrel J. (1996) The phenolic domain of potato suberin: structural comparison with lignins. *Phytochemistry* 42, 949-953.
- Larcher W. (1995) Plants under stress. In: Larcher W. (ed.) *Physiological Plant Ecology, Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Group*, Third Edition, Springer, Berlin, 321-443.
- Läuchli A. (1990) Calcium, salinity and the plasma membrane. In: Leonard R.T., Hepler P.K. (eds.) *Calcium in Plant Growth and Development*. American Society of Plant Physiologists Symposium Series 4, 26-35.
- Lewitt J. (1980) *Responses of Plants to Environmental Stresses*. Volume II, 2<sup>nd</sup> Edition, Academic Press, New York.
- Lipiec J., Häkansson I., Tarkiewicz S. (1991) Soil physical properties and growth of spring barley as relation to the degree of compaction of two soils. *Soil and Tillage Research* 19, 307-317.
- Macnair M.R., Baker A.J.M. (1994) Metal-Tolerant Plants: An Evolutionary Perspective. In: Farago M.E. (ed.) *Plants and the Chemical Elements, Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity*. VCH, Weinheim.
- Malone C., Koeppel D.E., Miller R.J. (1974) Localization of lead accumulated by corn plants. *Plant Physiol.* 53, 388-394.
- Marschner H. (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. 2<sup>nd</sup> Edition, Academic Press, New York.
- McKinney G. (1941) Absorption of light by chlorophyll. *J. Biol Chem.* 140, 313-322.

- Mengel K. (1991) Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze. 7. Auflage, Fischer Verlag, Jena.
- Mengel K., Kirkby E.A. (1982) Principles of plant nutrition. 3<sup>rd</sup> Edition, International Potash Institute, Bern.
- Monties B., Chalet C. (1992) Variability in lignification and utilization of grasses. In: Proceedings of the 14th General Meeting of the European Grassland Federation, Lahti, Finland , 111-129.
- Mulholland B.J., Black C.R., Taylor O.B., Roberts J.A., Lenton J.R. (1996) Effect of soil compaction on barley (*Hordeum vulgare* L.) growth. I. J. Exp. Bot. 47, 539.
- Neumann P.M., Azaizeh H., Leon D. (1994) Hardening of root cell walls: a growth inhibitory response to salinity stress. Plant, Cell and Environment 16, 303-309.
- Obroucheva N. (1992) Seedling root growth in terms of cell division and cell elongation. In: Kutschera L., Hübl E., Lichtenegger E., Persson H., Sobotik M. (eds.) Root ecology and its practical application. Vol. 2, Klagenfurt, Verein für Wurzelforschung, 13-16.
- Pandolfini T., Gabbrielli R., Comparini C. (1992) Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. Plant Cell and Environment 15, 719-725.
- Pessaraki M. (1994) Handbook of Plant and Crop Stress. Marcel Dekker, New York.
- Peterson C.A., Emanuel M.E., Weerdenburg C.A. (1981) The permeability of phi thickenings in apple (*Pyrus malus*) and geranium (*Pelargonium hortorum*) roots to an apoplastic fluorescent dye tracer. Can. J. Bot. 59, 1107-1110.
- Peterson C.A., Perumalla C.J. (1990) A survey of angiosperm species to detect hypodermal casparian bands. II. Roots with a multiseriate hypodermis or epidermis. Bot. J. Linn. Soc. 103, 113-125.

- Plaut Z., Newman M., Federman E., Grava A. (1997) Response of root growth to a combination of three environmental factors. In: Altman A., Waisel Y. (eds.) *Biology of Root Formation and Development*, New York, Plenum Press, 243-252.
- Praktikakis E., Rhizopoulou S., Psaras G.K. (1998) A phi layer in roots of *Ceratonia siliqua* L. *Bot. Acta* 111, 93-98.
- Prasad M.N.V. (1999) Metallothioneins and Metal Binding Complexes in Plants. In: Prasad M.N.V., Hagemeyer J. (eds.) *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer, Berlin, 51-72.
- Rains D.W. (1972) Salt transport by plants in relation to salinity. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23, 367-388.
- Ratcliffe R.G. (1996) In Vivo NMR Spectroscopy: Biochemical and Physiological Applications to Plants. In: Shachar-Hill Y., Pfeffer P.E. (eds.) *Nuclear Magnetic Resonance in Plant Biology*, American Society of Plant Physiologists, 1-25.
- Rausser W.E. (1990) Phytochelatins. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 61-86.
- Rawson H., Richards R.A., Munns R. (1988) An examination of selection criteria for salt tolerance in wheat, barley and triticale genotypes. *Aust. J. Agric. Res.* 39, 759-772.
- Reinhardt D.H., Rost T.L. (1995) Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. *Environmental and Experimental Botany* 35, 563-574.
- Rengel Z. (1992) The role of calcium in salt toxicity. *Plant Cell Environment* 15, 625-632.
- Richter G. (1996) *Biochemie der Pflanze*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 337-358.

- Rodriguez H.R., Roberts J.K.M., Jordan W.R., Drew M.C. (1997) Growth, water relation and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. *Plant Physiol.* 113, 881-893.
- Rolando C., Monties B., Lapiere C. (1992) Thioacidolyse. In: Lin S.Y., Dence C.W. (eds.) *Methods in lignin chemistry*, Springer, Berlin, 334-349.
- Römheld V., Marschner H. (1986) Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. *Adv. Plant Nutr.* 2, 155-204.
- Schack H., Hildebrand E.E. (1986) Einfluss der mechanischen Beanspruchung eines Sandbodens auf das Wurzelwachstum von Forstpflanzen. *Allg. Forst-Jagdztg.* 159, 27-34.
- Scheffer F., Schachtschabel P. (1992) *Lehrbuch der Bodenkunde*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Schopfer P., Brennicke A. (1999) *Pflanzenphysiologie*, 5. Auflage, Springer, Berlin.
- Schramel P., Wolf A., Seif R., Klose B.J. (1980) Eine neue Apparatur zur Druckveraschung von biologischem Material. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 302, 62-64.
- Schreiber L., Breiner H.-W., Riederer M., Düggelin M., Guggenheim R. (1994) The Casparian strip of *Clivia miniata* Reg. Roots: Isolation, fine structure and chemical nature. *Bot. Acta* 107, 353-361.
- Schreiber U., Neugebauer C., Schliwa U. (1993) PAM fluorometer based on medium-frequency pulsed Xe-flash measuring light. A highly sensitive new tool in basic and applied photosynthetic research. *Photosynt. Res.* 36, 65-72.
- Schwedt G. (1992) *Taschenatlas der Analytik*. Thieme Verlag, Stuttgart, 98-103.

- Shannon M.C., Grieve C.M., Francois L.E. (1994) Whole plant response to salinity. In: Wilkinson R.E.(ed.) Plant-Environment Interactions, New York, Dekker, 199-244.
- Showalter A.M. (1993) Structure and Function of Plant Cell Wall Proteins. The Plant Cell 5, 9-23.
- Sieghardt H. (1987) Heavy metal content and nutrient content of plants and soil samples from metalliferous waste dumps in Bleiberg Carinthia Austria. I. Herbaceous plants.
- Slovik S., Daeter W., Hartung W. (1995) Compartmental redistribution and longdistance transport of abscisic acid (ABA) in plants as influenced by environmental changes in the rhizosphere - a mathematical model. J. Exp. Bot. 46, 881-894.
- Spickett C.M., Smirnoff N., Ratcliffe R.G. (1993) An in vivo nuclear magnetic resonance investigation of ion transport in maize (*Zea mays*) and *Spartina anglica* roots during exposure to high salt concentrations. Plant Physiol. 102, 629-638.
- Steffens J.C. (1990) The heavy metal-binding peptides of plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol 41, 553-575.
- Tardieu F., Katerji N., Bethenod O., Zhang J., Davies W. J. (1991) Maize stomatal conductance in the field: its relationship with soil and plant water potentials, mechanical constraints and root messages. Plant Cell Environ. 14, 121-126.
- Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M. (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulare trace metals. Anal. Chem. 51, 844-851.

- Track C., Fuchs B., Lang S., Gimmler H. (1998) Environmental compatibility of municipal solid waste incinerator bottom slag: Evidence from long time lysimeter experiments. *J. Applied Bot.* 72, 14-24.
- Tsegaye T., Mullins C.E. (1994) Effect of mechanical impedance on root growth and morphology of two varieties of pea (*Pisum sativum L.*). *New Phytologist* 126, 707-713.
- TVO (1990) Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe, BGBl, 66.
- Van Assche F., Cardinaels C., Clijsters H. (1988) Induction of enzyme capacity in plants as a result of heavy metal toxicity: dose-response relations in *Phaseolus vulgaris L.* treated with zinc and cadmium. *Environ. Pollut.* 52, 103-115.
- Van Assche F., Clijsters H. (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13, 195-206.
- Vepraskas M.J. (1994) Plant Response Mechanisms to Soil Compaction. In: Wilkinson R.E. (ed.) *Plant-Environment Interactions*, New York: Dekker, 263-287.
- Weerdenburg C.A., Peterson C.A. (1983) Structural changes in phi thickenings during primary and secondary growth in roots. I. Apple (*Pyrus malus*) Rosaceae. *Can. J. Bot.* 61, 2570-2576.
- Weiler E.W. (1986) Plant hormone immunoassays based on monoclonal and polyclonal antibodies. In: Linskens H.F., Jackson F.F. (eds.) *Modern Methods of plant analysis. New Series*, Springer Verlag, Berlin, 1-17.
- Weisner J. (1878) Über das Verhalten Phloroglucins und einiger verwandten Körper zu verholzten Zellmembranen. *Sitzungsbericht Akad. Wiss. Wein, Math. Naturwiss. Kl.* 77, 60.

Wilkinson R.E. (1994) Plant-Environment Interaction, Marcel Dekker, New York.

Young M.E., Grundy N.M. (1998) Sulphur nutrition and glutathione content of wheat. J. Exp. Bot. 49, Supplement, 26.

Zeier J. (1998) Pflanzliche Abschlussgewebe der Wurzel: Chemische Zusammensetzung und Feinstruktur der Endodermis in Abhängigkeit von Entwicklung und äusseren Einflüssen. Dissertation, Universität Würzburg.

Zhong H., Läuchli A. (1993) Changes in cell wall composition and polymer size in primary roots of cotton seedlings under high salinity. J. Exp. Bot. 44, 773-778.

Zhong H., Läuchli A. (1994) Spatial distribution of solutes, N, Na, Ca and their deposition rates in the growth zone of primary cotton roots: effect of NaCl and CaCl<sub>2</sub>. Planta 194, 34-41.





## Liste der Veröffentlichungen

Fuchs B., Track C., Lang S., Gimmler H. (1997) Salt Effects of processed municipal solid waste incinerator bottom ash on vegetation and underground water. J. of Applied Botany 71, 154-163.

Gimmler H., Degenhardt B., Lang S., Track C. (1998) Uptake of sodium, boron and heavy metals from an alkaline top layer and translocation to leaves and lower roots of *Vitis vinifera* during a long time duplex study. J. of Applied Botany 72, 191-202.

Track C., Fuchs B., Lang S., Gimmler H. (1998) Environmental compatibility of municipal solid waste incinerator bottom slag: Evidence from long time lysimeter experiments with *Vitis vinifera*. J. of Applied Botany 72, 14-24.

Gimmler H., Fuchs B., Track C. (1999) Schädlich oder umweltverträglich: Müllheizkraftwerk-Schlacke- ein Zankapfel zwischen Ökologie und Ökonomie. Biologie in unserer Zeit 29 (2), 79-89.

Degenhardt B., Gimmler H. (2000) Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. J. Exp. Bot. 51, 595-603.

Gimmler H., Degenhardt B. (2000) Alkaliphilic and alkali tolerant algae. In: Rai L.C., Gaur J.P. (eds.) Algal adaptation to environmental stresses: Physiological, biochemical and molecular approaches, Springer, Berlin (im Druck).

Degenhardt B., Gimmler H., Hose E., Hartung W. (2000) Effect of alkaline and saline substrates on ABA contents, -distribution and -transport in plant roots. Plant and Soil (im Druck).



## Lebenslauf

Name	Birgit Kristine Degenhardt, geb. Fuchs
Geburtsdatum	21.12.1969
Geburtsort	Königshofen i. Grabfeld
Familienstand	verheiratet seit 12.6.1998
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulbildung	
1976 - 1980	Grundschule Bad Königshofen
1980 - 1989	Gymnasium Bad Königshofen
24.6.1989	Allgemeine Hochschulreife
Hochschulausbildung	
1989 - 1992	Studium der Chemie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1992 - 1995	Studium der Fächerverbindung Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1995	Zulassungsarbeit am Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg bei Prof. H. Gimmler Thema: Das Gefahrenpotential der Schlacke des MHKW-Würzburg aus botanischer Sicht
1996	Erste Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien
Sept. 1996	Beginn der vorliegenden Dissertation am Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg, Lehrstuhl Botanik I unter Anleitung von Prof. H. Gimmler im Rahmen des Graduiertenkollegs „Pflanze im Spannungsfeld zwischen Nährstoffangebot, Klimastreß und Schadstoffbelastung

## **Erklärung**

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Dissertation wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch zu keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Hiermit bewerbe ich mich erstmals um den Doktorgrad der Naturwissenschaften der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Würzburg, 2000

---

(Birgit Degenhardt)



## Danke

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen recht herzlich bedanken, die mich im Verlauf der Arbeit begleitet und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

....mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. H. Gimmler für die Bereitstellung des interessanten und vielfältigen Themas und für seine freundliche Betreuung.

....Steffi Lang möchte ich Danke sagen für ihre Hilfe bei verschiedenen Problemen, für die vielen schönen Stunden im Labor und ihre nette Gesellschaft.

....vielen Dank der Arbeitsgruppe Hartung für die Unterstützung bei der Durchführung des ELISA-Tests, die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und die netten Stunden auch außerhalb des Instituts.

....Jürgen Zeier möchte ich danken für seine Mithilfe bei den GC/MS-Analysen und die Einweisung in die Fluoreszenzmikroskopie.

....bei Elfriede Reisberg, Astrid Boots und Eva Wirth bedanke ich mich für das sorgfältige Messen der Proben und die Aufheiterung zwischendurch.

....bei Sylvia Albert und Barbara Landeck bedanke ich mich für ihre freundliche Gesellschaft und die Unterstützung bei verschiedenen Versuchen.

....Herrn Erhard und seinen Mitarbeitern danke ich für die Pflege und das Gießen der Pflanzen, auch am Wochenende.

....bei Matthias bedanke ich mich für die Durchsicht und Korrektur des Manuskripts und die Unterstützung bei Computerproblemen.

....allen Mitarbeitern des Botanischen Instituts danke ich für viele kleine und große Hilfen.