

Abteilung Mikrogen-Pflanzen-Interaktionen
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

Phytoremediation organischer Schadstoffe mit Hilfe von
Phragmites australis

Juliane Erika Neustifter

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. Wilfried Huber

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Peter Schröder

2. Univ.-Prof. Dr. Arnulf Melzer

Die Dissertation wurde am 06.02.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 30.03.2007 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
	Abwasserteichanlage und Pflanzenfilter Mörlbach.....	2
	Phytoremediation organischer Schadstoffe	6
	Entgiftungsstoffwechsel der Pflanze	10
	Schadstoffaufnahme in die Pflanze	10
	Entgiftung von Xenobiotika	11
	Glutathion und Glutathion S-Transferasen	13
	Zielsetzung der Arbeit.....	18
II	Material und Methoden	20
	<i>Phragmites australis</i> – das Schilfrohr.....	20
	Verwendetes Pflanzenmaterial	23
	Gewächshaus- und Klimakammerbedingungen	23
	Abwasserparameter Mörlbach	25
	Probenahmestellen	25
	Untersuchungszeiträume	26
	Wasserparameter.....	26
	Endokrin wirksame Substanzen im Abwasser der Kläranlage Mörlbach	28
	17 β -Estradiol.....	28
	Weitere endokrin wirksame Stoffe	29
	Entgiftungsenzyme in <i>Phragmites australis</i>	30
	Aufschluss des Pflanzenmaterials.....	30
	Aktivitätsbestimmungen Glutathion S-Transferasen (GSTs)	32
	Aktivitätsbestimmungen Glutathion-Reduktasen (GRs)	34
	Aktivitätsbestimmungen Peroxidasen (POX).....	34
	Auswertungen Aktivitätsbestimmung	35
	Temperaturoptima - Bestimmung der Aktivierungsenergie	36
	Analgetika und <i>Phragmites australis</i>	38
	Abbaustudien Ibuprofen Diclofenac und Paracetamol	38
	Ibuprofen.....	38
	Diclofenac	40
	Paracetamol	41
	Spezifische Aktivitäten bei Ibuprofen- und Diclofenac-Proben.....	42
	Untersuchungen zur Aufnahme u. Metabolisierung von Paracetamol in <i>P. australis</i> ...	43
	Ibuprofen- und Safener-Experimente im Hinblick auf GSTs	43
	Ibuprofen-Experiment	43
	Blatt-Induktionsversuch.....	44
	Safener-Induktionsversuch 1	44
	Safener-Induktionsversuch 2	45
	Affinitätschromatographie	45

2D-Gelelektrophorese	46
Erste Dimension - Auftrennen nach dem Isoelektrischen Punkt	47
Zweite Dimension - Auftrennen nach Molekulargewicht	47
Western Blots	50
Gelherstellung	50
Blotting	50
Hybridisierung	51
Färbung	52
RNA Isolierung.....	52
mRNA Isolierung.....	53
cDNA-Herstellung.....	54
Klonierung von GST Sequenzen	57
Isolierung von DNA	57
Ligation und Transformation	57
Isolierung der geklonten Sequenz.....	59
cDNA-Bank aus <i>Phragmites australis</i>	60
cDNA-Synthese.....	61
cDNA-Amplifikation durch LD-PCR	62
Proteinase K-Verdau	62
Sfi I-Verdau.....	63
cDNA-Größenfraktionierung	64
Vektor Ligation	65
Amplifizierung der cDNA-Bank.....	67
Bestimmung des Titers der amplifizierten cDNA-Bank.....	67
III Ergebnisse	69
Abwasserparameter Mörlbach	69
pH-Wert.....	69
Biochemischer Sauerstoffbedarf - BSB ₅	70
Gesamtorganischer Kohlenstoff – TOC.....	72
Endokrin wirksame Substanzen im Abwasser der Kläranlage Mörlbach	74
17β-Estradiol.....	74
Weitere endokrine Wirkstoffe.....	77
Entgiftungsenzyme in <i>Phragmites australis</i>	79
Glutathion S-Transferasen - GSTs.....	79
Temperaturoptima - Bestimmung der Aktivierungsenergie	81
Glutathion-Reduktasen (GRs).....	83
Peroxisomen (POX).....	84
Analgetika und <i>Phragmites australis</i>	86
Abbaustudien mit Ibuprofen, Diclofenac und Paracetamol	86
Ibuprofen.....	86
Diclofenac	87
Paracetamol	88
Spezifische Aktivitäten der Ibuprofen- und Diclofenac-Proben	89

	Untersuchungen zur Aufnahme u. Metabolisierung von Paracetamol in <i>P. australis</i> ...	90
	Ibuprofen- und Safener-Experimente im Hinblick auf GSTs	91
	Ibuprofen-Experimente im Hinblick auf GSTs.....	91
	Safenerexperimente	95
	Blatt-Induktionsversuch.....	95
	Safener-Induktionsversuch 1	96
	Safener-Induktionsversuch 2	97
	2D-Gelelektrophorese	98
	Western Blots	99
	Western Blots Benoxacor	99
	Western Blots verschiedener Safener und Ibuprofen	100
	RNA- und mRNA-Isolierung, cDNA Herstellung u. Klonierung von GST-Sequenzen	103
	cDNA-Bank aus <i>Phragmites australis</i>	106
IV	Diskussion	108
	Feldstudie Mörlbach	108
	Entgiftungsenzyme in <i>Phragmites australis</i>	111
	Analgetika und <i>Phragmites australis</i>	113
	Induktions-Experimente im Hinblick auf GSTs	114
	Molekulare Ansätze	115
	Ausblick	117
V	Zusammenfassung	119
VI	Summary	121
VII	Literaturverzeichnis	122
	Links zu zitierten Internet-Beiträgen	142

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über die Kläranlage Mörlbach.....	3
Abb. 2: Zustand des Pflanzenfilters am Ablauf der Kläranlage Mörlbach.	5
Abb. 3: γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin	13
Abb. 4: Glutathion S-Transferase.....	14
Abb. 5: <i>Phragmites australis</i> auf dem Filter der KA Mörlbach.	21
Abb. 6: <i>Phragmites australis</i> -Pflanzen im Gewächshaus.....	24
Abb. 7: <i>Phragmites australis</i> -Pflanzen in der Klimakammer	24
Abb. 8: Probenahmestellen am unbelüfteten Abwasserteich der KA Mörlbach.....	25
Abb. 9: Glutathion-Konjugatbildung mit Chlordinitrobenzol	33
Abb. 10: Glutathion-Konjugatbildung mit Dichlornitrobenzol.....	33
Abb. 11: Glutathion-Konjugatbildung mit NBoC.....	34
Abb. 12: Reaktion von H_2O_2 mit dem Substrat Guajacol.....	35
Abb. 13: Strukturformel Ibuprofen.....	39
Abb. 14: Kalibriergerade Ibuprofen.....	39
Abb. 15: Strukturformel Diclofenac-Natrium.	40
Abb. 16: Kalibriergerade Diclofenac-Natrium.	41
Abb. 17: Strukturformel Paracetamol	41
Abb. 18: Kalibriergerade Paracetamol	42
Abb. 19: Schichtung der Komponenten für das Blotting-Verfahren.....	51
Abb. 20: Blau-Weiß-Screening.....	59
Abb. 21: pH-Werte an der KA Mörlbach	69
Abb. 22: Biochemischer Sauerstoffbedarf an der KA Mörlbach.....	71
Abb. 23: Korrelation Werte BSB_5 /pH-Wert.	72
Abb. 24: Gesamtorganischer Kohlenstoff TOC an der KA Mörlbach	73
Abb. 25: Die Estradiolmesswerte an der KA Mörlbach.....	76
Abb. 26: Octylphenol, Nonylphenol, HHCb und DEHP an der KA Mörlbach.....	78
Abb. 27: Spezifische Aktivität GSTs.....	79
Abb. 28: Spezifische Aktivität GSTs.....	81
Abb. 29: Spezifische Aktivität GSTs.....	82
Abb. 30: Grafische Ermittlung der Aktivierungsenergie.	83
Abb. 31: Spezifische Aktivität der Glutathion-Reduktase.	83
Abb. 32: Spezifische Aktivität der Peroxidase.....	84
Abb. 33: Ibuprofenabnahme.	86
Abb. 34: Konzentrationsabnahme Diclofenac.	87
Abb. 35: Konzentrationsabnahme Paracetamol.	88
Abb. 36: Spezifische Aktivität GST und POX.....	89
Abb. 37: Chromatogramm Paracetamolmetaboliten.....	90
Abb. 38: Spezifische Aktivität der GSTs (Substrat CDNB).	92

Abb. 39: Spezifische Aktivität GSTs (Substrat DCNB).....	93
Abb. 40: Spezifische Aktivität GSTs (Substrat NBoC).	94
Abb. 41: Spezifische Aktivität GSTs (Substrat CDNB), Blatt-Induktionsversuch.....	95
Abb. 42: Spezifische Aktivität der GSTs (Substrat CDNB), Safener-Induktionsversuch 1.	96
Abb. 43: Spezifische Aktivität der GSTs (Substrat CDNB), Safener-Induktionsversuch 2.....	97
Abb. 44: 2D-SDS-PAGE.....	98
Abb. 45: Western Blots Rhizomproben 1	99
Abb. 46: Western Blots Blattproben.....	100
Abb. 47: Western Blots Rhizomproben 2.	101
Abb. 48: cDNA-Schmier; Primerproben nach PCR.....	103
Abb. 49: Auftrennung der PCR-Proben; Ansätze der isolierten DNA nach PCR.....	104
Abb. 50: Ergebnis der Sequenzanalyse.	105
Abb. 51: Größenfraktionierung der DNA-Proben.....	106
Abb. 52: Bepflanzter Bodenfilter an der KA Mörlbach.	108

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Drei-Phasen-Modell der pflanzlichen Entgiftung	12
Tab. 2: Übersicht der Pflanzen-GST-Klassen	16
Tab. 3: Systematik <i>Phragmites australis</i>	20
Tab. 4: Probenahmetermine an der Kläranlage Mörlbach.....	26
Tab. 5: Liste der untersuchten Stoffe am LfU	29
Tab. 6: Aufarbeitungspuffer	31
Tab. 7: Ansatz für alle photometrischen GST-Tests	33
Tab. 8: Substrat-Ansatz zur GR-Messung	34
Tab. 9: Substrat-Ansatz zur POX-Messung.....	35
Tab. 10: Ansätze für Ibuprofen	39
Tab. 11: Ansätze für Diclofenac.....	40
Tab. 12: Ansätze für Paracetamol.....	41
Tab. 13: Gradient Elution Affinitätschromatographie	46
Tab. 14: Rehydratisierungspuffer	47
Tab. 15: Programm IPGphor	47
Tab. 16: Ansatz Acrylamidgel.....	48
Tab. 17: Stammlösung A	48
Tab. 18: Inkubationslösungen B1+2.....	48
Tab. 19: SDS-Laufpuffer	48
Tab. 20: Fixierlösungen	49
Tab. 21: Sensitizer und Silbernitratlösung	49
Tab. 22: Entwickler und Stopplösung.....	49
Tab. 23: Ansatz SDS-PAGE	50
Tab. 24: Puffer Western Blots	51
Tab. 25: Puffer Western Blots	52
Tab. 26: Puffer zur mRNA-Isolierung	54
Tab. 27: Mastermix PCR	55
Tab. 28: PCR-Ansatz	56
Tab. 29: Zyklusprogramm PCR.....	56
Tab. 30: Ansatz Ligation.....	58
Tab. 31: LB-Medium und LB-Agar.....	58
Tab. 32: Ansatz 1 cDNA	61
Tab. 33: Ansatz 2 cDNA	61
Tab. 34: Ansatz PCR	62
Tab. 35: Zyklusprogramm PCR.....	62
Tab. 36: Zugabe Proteinase K-Verdau.....	63
Tab. 37: Zugabe Sfi I-Verdau.....	63
Tab. 38: Zugabe Fraktionierung	64

Tab. 39: Ansätze Ligation	65
Tab. 40: SMBuffer	66
Tab. 41: LBAgar und LBTopAgar	66
Tab. 42: Ansätze für die Amplifizierung.....	68
Tab. 43: Estradiolmessungen.	74
Tab. 44: Messungen von Octylphenol, Nonylphenol, HHCB und DEHP.....	77
Tab. 45: Ergebnisse HPLC-Lauf Paracetamol-Metaboliten	90
Tab. 46: Sequenzhomologien zu gefundenen Klonen.....	105

Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
Abs.	Absorbance
ACN	Acetonitril
Ag	Antigen
AgNO ₃	Silbernitrat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pairs - Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSB ₅	Biologischer Sauerstoffbedarf nach 5 Tagen
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
cDNA	Copy DNA
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan sulfonat
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
d	Tag
DCNB	3,4-Dichlor-2-nitrobenzol
DEHP	Di(ethylhexyl)phthalat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHA	Dehydroascorbat
DHAR	Dehydroascorbat Reduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid - Desoxyribonukleinsäure
ds-cDNA	Double strand cDNA
DTE	Dithioerythritol

DTT	Dithiothreitol
E-Ag	Enzymmarkiertes Antigen
E.C.	Enzyme Commission
EDTA	Ethylenediaminetetraaceticacid
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EST	Expressed sequence tags
EtOH	Ethanol
EW	Einwohnerwert
F&E	Forschung und Entwicklung
FG	Frischgewicht
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m} * \text{ s}^2$)
g	Gramm
GC-MS	Gaschromatograph-Massenspektrometer
GPOX	Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG	Glutathion (oxidierte Form)
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HCO_3^-	Hydrogencarbonat
HHCB	Hexahydro-hexamethyl-cyclopenta-gamma-2-benzopyran
H_2O	Wasser
HPLC	High performance liquid chromatography – Hochleistungsflüssigchromatographie
H_2SO_4	Schwefelsäure
IEP	Isoelektrischer Punkt
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
K	Kelvin
KA	Kläranlage
kat	Katal – katalytische Aktivität in Mol pro Sekunde
kb	Kilobasen
K_D	Sorptionskoeffizient
kDa	Kilodalton
L	Liter

LB	Luria-Bertani (flüssiges Nährmedium und Agar)
LfU	Landesamt für Umwelt
LfW	Landesamt für Wasserwirtschaft
Log K_{ow}	Verteilungskoeffizient in der Oktanol-Wasser-Phase
M	Molar
m	Meter
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mRNA	Messenger RNA
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid
N	Stickstoff
NAA	Naphthylelessigsäure
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium Chloride
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH ₃	Ammoniak
NH ₄	Ammonium
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
nm	Nanometer
NP	Nonylphenol
OD	Optische Dichte
OP	Octylphenol
P	Phosphor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerase chain reaction – Polymerase Kettenreaktion

pfu	Plaque forming units
pg	Pikogramm
pNBoC	p-Nitrobenzoylchlorid
POX	Peroxidase
PVP	Polyphenylpyrrolidon
R ²	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonucleic acid - Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute - Umdrehung pro Minute
s	Sekunde
S	Steigung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SpA	Spezifische Aktivität
ss-cDNA	Single strand cDNA
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline + TritonX
TCE	Trichlorethylen
TCHQD	Tetrachlorhydrochinon Dehalogenasen
TEMED	Tetramethyl-ethylendiamin
TNT	Trinitrotoluol
TOC	Total organic carbon – Gesamtorganischer Kohlenstoff
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
UV/Vis	Spektroskopie mit ultraviolettem und sichtbarem Licht
V	Volt
VA	Volumenaktivität
v/v	Volumenprozent
v/w	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-D-galaktopyranosid

I Einleitung

Wasser ist die Grundlage allen Lebens. Gesunde Böden sind die Grundlage für die Erzeugung gesunder Lebensmittel. Der Zugang zu reinem Trinkwasser, die Reinigung von verschmutztem Wasser und die Gesunderhaltung der Böden sind wichtige Herausforderungen unserer Zeit. Steigende Bevölkerungszahlen und die damit verbundene steigende Produktion von Lebensmitteln und kontaminierten Abwässern führen zur Anreicherung von Schadstoffen aller Art in der Umwelt (vgl. COLEMAN ET AL., 2002). Unser Trinkwasser wird zunehmend mit Pharmazeutika (JONES ET AL., 2005), Pestiziden (HOCK ET AL., 1995; KARG&KÖSTER, 2002) und hormonell wirksamen Substanzen (KLOAS 2000; ENGELMANN&ROHDE, 2005) verunreinigt. Um gesundes Leben auf der Erde zu gewährleisten, bedarf es deshalb vielfältiger Anstrengungen zur Reinhaltung und zur Gesunderhaltung der Umwelt.

Einen möglichen Ansatz zur Reinigung von belastetem Wasser, Böden und Luft mit Hilfe von Pflanzen bietet die Phytoremediation. Die Phytoremediation nutzt das natürliche Potential von Pflanzen, Schadstoffe zu entfernen und ist vor allem bei geringen Belastungen oder bei langfristig angesetzten Dekontaminationsaufgaben eine Methode mit gutem Kosten- und Nutzenverhältnis (SCHRÖDER ET AL., 2007; MCCUTCHEON&SCHNOOR, 2003).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Phytoremediation organischer Schadstoffe durch *Phragmites australis*, dem Schilfrohr, mit Schwerpunkten in der Entgiftungsphysiologie dieser Pflanze.

Die Grundlage für diese Arbeit bilden Untersuchungen an *Phragmites australis* und Abwasserparametern aus den Forschungs- und Entwicklungsvorhaben (F&E) an der Kläranlage (KA) Mörlbach im Auftrag des Freistaat Bayern, vertreten durch das Landesamt für Umwelt (ehemals Landesamt für Wasserwirtschaft), sowie die darauf aufbauenden, weiterführenden Experimente am GSF-Forschungszentrum in Neuherberg und an der Universität Durham (UK).

Damit war es möglich, einen Bogen vom praxisnahen Einsatz von *Phragmites australis*-Pflanzen an der KA Mörlbach bis hin zu einer physiologischen Untersuchung der Pflanze hinsichtlich ihres Entgiftungspotentials zu spannen.

Abwasserteichanlage und Pflanzenfilter Mörlbach

Die Nutzung von dezentralen Teichanlagen ist eines der ältesten Verfahren der Abwasserreinigung. Es werden dabei natürliche Selbstreinigungsprozesse genutzt, wie die Sedimentation, die Umwälzung des Wasserkörpers und der Abbau von Abwasserinhaltsstoffen durch Mikroorganismen oder Wasserpflanzen (SCHLEYPEN, 1996). Abwasserteichanlagen haben einen sehr hohen Flächenbedarf und können in ihren Nährstofffrachten sehr stark schwanken (MUDRACK&KUNST, 2003). Durch ihren naturnahen, technikextensiven Betrieb mit sehr gutem Kosten- und Nutzenverhältnis sind sie für kommunale Anlagen, die oft weitab von zentralen Großkläranlagen liegen, geeignet (SCHLEYPEN, 1996; MARMIROLI ET AL., 2003). In Bayern gibt es etwa 1500 kommunale Kläranlagen mit einer Ausbaugröße bis 1000 Einwohnerwerte (EW), von denen ca. 900 als Teichanlage bestehen (vgl. SCHLEYPEN, 1996; HOLLEIS ET AL., 2002).

Zur Nachreinigung und zum Rückhalt von Sekundärbelastungen, z.B. Algen, kommen immer häufiger Helophyten (Sumpfpflanzen) zum Einsatz, die gezielt am Ablauf der Anlage in einen Bodenfilter gepflanzt werden. Damit kann die Fähigkeit von Kläranlagen, organische Kohlenstoffverbindungen, eutrophierende (N, P), toxische (z.B. Schwermetalle) und endokrin wirksame Stoffe (z.B. Östrogene) weitestgehend abzubauen bzw. zu akkumulieren (MUDRACK&KUNST, 2003), zusätzlich unterstützt werden.

Die Idee für einen Pflanzenfilter an der KA Mörlbach hatte sich aus der Beobachtung ergeben, dass die oben genannten Belastungen durch das vorhandene Teichsystem oft nur unzureichend entfernt werden. So führen die im Teich während der Sommersaison stark auftretende Algenblüten zu pH-Wert-Schwankungen infolge von Alkalisierung. Diese Sekundärverschmutzung belastet den Ablauf und verschlechtert die Ablaufqualität (vgl. F&E-Vorhaben Mörlbach I; MELZER&STEINMANN, 1997). Da Pflanzenfilter kostengünstige Lösungen sind, die schnell Abhilfe schaffen können, sowie durch zusätzlichen Sauerstoffeintrag, Aufnahme von Schadstoffen, erhöhte Aktivität von Mikroorganismen und verbesserten Nährstoffabbau eine zusätzliche Reinigungsleistung erbringen (SCHLEYPEN, 1996), entschied man sich in Mörlbach für den Bau eines bepflanzten Bodenfilters (MELZER&STEINMANN, 1997).

Mörlbach ist ein Ortsteil der Gemeinde Berg im Landkreis Starnberg. Der Ort hat heute ca. 200 Einwohner und besitzt seit 1973 eine eigene Kläranlage. Die unbelüftete

Abwasserteichanlage, der das Abwasser aus einer Mischkanalisation zufließt, hat eine Ausbaugröße von 300EW. Das Rohabwasser wird in zwei hintereinander geschalteten Absetzbecken (Erdbecken, ca. 270 m²) mechanisch vorbehandelt und gelangt anschließend zur biologischen Reinigung über eine unterirdische Rohrleitung in den unbelüfteten Abwasserteich mit einer Tiefe von 70-90cm (vgl. Abb. 1). Am östlichen Ende des Teiches, vor dem Ablauf, befindet sich der etwa 4m breite Bodenfilter, der im Rahmen eines Forschungsvorhabens im Auftrag des Bayerischen Landesamt für Umwelt, von der Limnologischen Station der TUMünchen und der Gemeinde Berg 1995-96 geplant und gebaut wurde (F&E-Vorhaben Mörlbach I; vgl. MELZER&STEINMANN, 1997). Der Filter, der ursprünglich mit *Phragmites australis* (Schilfrohr), *Phalaris arundinacea* (Rohrglanzgras) und *Typha spec.* (Rohrkolben) in Segmenten bepflanzt war, sollte im Wesentlichen Sekundärbelastungen zurückhalten, eine zusätzliche Reinigungsleistung erbringen und zur Verbesserung der Ablaufwerte beitragen (vgl. MELZER&STEINMANN, 1997). Hinter dem Filter sammelt sich das gereinigte Abwasser aus den drei Abläufen in einer Ablaufrinne und versickert schließlich nach ca. 800m in den Untergrund.

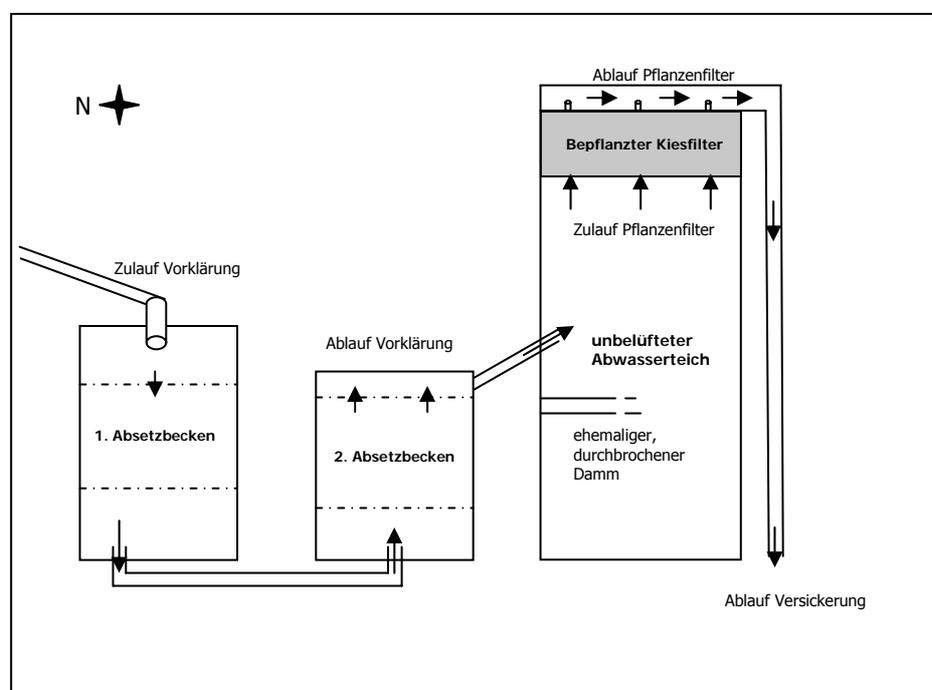


Abb. 1: Übersicht über die Kläranlage Mörlbach: der Weg des Abwassers von Zulauf Vorklärung, über Absetzbecken 1+2 zum Ablauf der Vorklärung in den unbelüfteten Abwasserteich und durch den bepflanzten Bodenfilter in der Ablauf (Skizze nicht maßstabsgetreu).

Bereits im Jahr der Fertigstellung wurde eine wesentliche Verbesserung der Ablaufwerte, v.a. hinsichtlich der pH-Wert-Schwankungen und der Reduzierung der Sekundärverschmutzung durch Algen, erzielt (MELZER&STEINMANN, 1997; GSCHLÖSSL ET AL., 1998).

In den Jahren 1997-99 wurde vom Bayerischen Landesamt für Umwelt und der Limnologischen Station der TU München ein Folgeprojekt durchgeführt (F&E-Vorhaben Mörlbach II: 1997-1999; vgl. MELZER&STEINMANN, 1999). Das Ziel hierbei war, den Langzeitbetrieb zu erfassen, Wartungsvorschläge zu erarbeiten und die Bemessung des Filters zu optimieren, da sich gezeigt hatte, dass sich der Filter in Bezug auf Bewuchs und Leistungsfähigkeit mit zunehmender Betriebsdauer verändert. Einige Helophyten setzten sich gegenüber anderen durch und erwiesen sich als geeigneter für die Erbringung einer dauerhaft guten Reinigungsleistung im Filter (vgl. MELZER&STEINMANN, 1999; STEINMANN ET AL., 2003).

Sieben Jahre nach der Entstehung und vier Jahre nach den ersten beiden Projekten in Mörlbach wurde erneut eine Reihe von Untersuchungen am Filter in Mörlbach durchgeführt, diesmal vom Bayerischen Landesamt für Umwelt in Zusammenarbeit mit dem GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit. Diese drei Projekte, die auch als Grundlage für die vorliegende Arbeit dienen, waren:

2003/2004: Leistungsfähigkeit des bepflanzten Bodenfilters am Ablauf der Kläranlage Mörlbach (F&E-Vorhaben Mörlbach III: 2003-2004; NEUSTIFTER&SCHRÖDER, 2003, 2004).

In dieser Studie stand der Aspekt der Phytoremediation durch den Pflanzenfilter und die Prüfung der Effizienz und Praxistauglichkeit nach mehreren Betriebsjahren im Vordergrund. Es wurden auch die Restreinigungsleistung und die Rückhaltekapazität des Filters und seiner Bepflanzung untersucht.

2004: Leistungsfähigkeit des bepflanzten Bodenfilters am Ablauf der Kläranlage Mörlbach und Untersuchungen zum Rückhalt und Abbau von Arzneimittelstoffen in naturnahen Systemen der Abwasserreinigung (F&E-Vorhaben Mörlbach III/2: 2004; NEUSTIFTER&SCHRÖDER, 2004).

Hier wurde neben der Restreinigungsleistung, der Entgiftungskapazität der Helophyten auch der Abbau von Pharmazeutika betrachtet.

2005: Untersuchungen zum Rückhalt und Abbau von endokrin wirksamen Stoffen und ausgewählten Arzneimitteln in der Abwasserteichanlage und im bepflanzten

Bodenfilter am Ablauf der Kläranlage Mörlbach (F&E-Vorhaben Mörlbach IV: 2005; NEUSTIFTER&SCHRÖDER, 2005).

Dieses Projekt widmete sich neben der Quantifizierung der Restreinigung vor allem dem Abbau von endokrin wirksamen Substanzen.

Der bepflanzte Bodenfilter stellte sich nach sieben Jahren des Betriebs stark verändert dar (Abb. 2). Die Segmente hatten sich aufgelöst und *Phragmites australis* war die am Bodenfilter vorherrschende Pflanze, die sich gegenüber den anderen Helophyten durchsetzte. Während *Typha spec.* zwar noch auf Teilen des Filters vertreten war, ist *Phalaris arundinacea* komplett verdrängt worden (vgl. NEUSTIFTER&SCHRÖDER, 2004). Die Rampe vor dem Filter und Teile des Filtermaterials waren in den Teich abgerutscht. Der von der Gemeinde daraufhin ausgebrachte Kies hatte zu einem stärkeren Absetzen und Abrutschen des gesamten Filters in den Teich hinein geführt. Die Projekte in Mörlbach zeigten, dass der Filter zwar weiterhin gut funktionierte, jedoch deutliche Alterungsprozesse aufwies. Vermehrtes Zusetzen (Kolmation) und immer häufigere Überflutungen, die den Nutzen deutlich minderten, waren neben schlechten Ablaufwerten weitere Indizien dafür.



Abb. 2: Zustand Pflanzenfilter am Ablauf der Kläranlage Mörlbach im Jahr 2003: die Segmente mit unterschiedlicher Bepflanzung sind verschwunden und es kommen hauptsächlich Schilf (*Phragmites australis*) und am Filterrand Rohrkolben (*Typha spec.*) vor.

Die Ergebnisse aus dem Projekt Mörlbach IV bewogen die Gemeinde Berg für die Jahre 2006/2007 umfangreiche Sanierungsmaßnahmen zu planen und den Filter weiter zu betreiben.

Alle Ergebnisse und die genaue Beschreibung der Projekte Mörlbach III-IV sind in den jeweiligen Endberichten zu finden (vgl. NEUSTIFTER & SCHRÖDER, 2004, 2005).

Phytoremediation organischer Schadstoffe

Pflanzen leisten durch die Aufnahme, der Transformation, der Konjugation und des Abbaus bzw. der Einlagerung von Schadstoffen wichtige Beiträge zur Entgiftung und zur Behandlung von kontaminierten Arealen und zur Abwasserreinigung. So können organische und anorganische Schadstoffe effektiv und kostengünstig beseitigt werden (PILON-SMITS, 2005).

Obwohl Pflanzen bei der Phytoremediation die Hauptrolle spielen, darf man nicht außer Acht lassen, dass die Rhizosphäre nicht nur aus Boden, Wasser und Pflanzenwurzeln besteht, sondern auch aus einer Vielzahl von assoziierten Mikroorganismen, die einen erheblichen Anteil an der Aufnahme, der Translokation und auch dem Abbau von organischen Xenobiotika haben können (SCHRÖDER ET AL., 2005). Die Pflanzen unterstützen eine Anreicherung der Mikroorganismen in der Rhizosphäre durch die Schaffung von Oberflächen für Biofilme, den Sauerstoffeintrag und das Ausscheiden von Exsudaten (SCHNOOR ET AL., 1995). Manche Bakterienspezies nutzen die Schadstoffe als Kohlenstoffquelle oder als Co-Metabolite (SCHRÖDER ET AL., 2005). So können viele Xenobiotika, wie 2,4-D, Naphthalin oder Dioxin, bereits in der Rhizosphäre durch Bakterien verändert oder degradiert werden (ZHANG & BENNETT, 2005). Je nach Betrachtungsweise des Systems Phytoremediation kann man das Hauptaugenmerk dabei entweder auf die Pflanze oder auf die Mikroorganismen legen, ohne die beiden Komponenten ganz trennen zu können (ANDERSON ET AL., 1993; ZABLOTOWICZ ET AL., 1995; TRAPP & KARLSON, 2001; MCCUTCHEON & SCHNOOR, 2003; SINGH & WARD, 2004; CHAUDHRY ET AL., 2005). Außer Frage steht allerdings die wichtige Funktion, die die Mikroorganismen in Filterdämmen bei der Mineralisierung von organischem Material erfüllen (MOORMANN, 2001; DAVIS ET AL., 2002; WISSING & HOFMANN, 2002).

Die meisten organischen Schadstoffe, mit denen Pflanzen in Berührung kommen, sind entweder anthropogenen Ursprungs, d.h. menschliche Ausscheidungen, oder vom Menschen in Umlauf gebracht, wie z.B. Tenside, Lösungsmittel oder Pestizide. Viele dieser Stoffe können neben den umweltschädlichen Wirkungen auch direkt toxisch oder kanzerogen sein (DAVIS ET AL., 2002; PILON-SMITS, 2005; SCHRÖDER, 2006). Bei denjenigen organischen Verbindungen, die in aquatischen und terrestrischen Systemen vorkommen und die für den Menschen und seine Umwelt schädlich sein können, handelt es sich hauptsächlich um Öle, Lösungsmittel, explosive Stoffe, Herbizide, Pestizide und Medikamente (KARG&KÖSTER, 2002; RÖNNEFAHRT ET AL., 2002; MAIER, 2004; SCHRÖDER ET AL., 2005). Einige Arbeiten haben sich sehr eingehend mit diesem Gebiet beschäftigt und geben einen umfassenden Überblick (HARVEY ET AL., 2002; SCHRÖDER&COLLINS, 2002; MCCUTCHEON&SCHNOOR, 2003; SCHRÖDER, 2006). Aber auch sehr spezielle Aspekte der Phytoremediation organischer Schadstoffe wurden mittlerweile untersucht, wie beispielsweise Trichlorethylen (TCE), ein sehr häufig im Grundwasser vorkommendes organisches Lösungsmittel (vgl. COLLINS ET AL., 2002; SHANG ET AL., 2003). TCE wurde bereits erfolgreich durch Pappeln (NEWMAN ET AL., 1997; FERRO ET AL., 2001) abgebaut. Die persistenten und gefährlichen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) und polychlorierten Biphenyle (PCB) konnten bereits durch den Einsatz von Pflanzen aus verschiedenen Umweltkompartimenten entfernt werden (OLSON ET AL., 2003; SCHNOOR ET AL., 1995; TASSI ET AL., 2003). Auch über Pestizide im Wasser, wie z.B. Lindan oder Atrazin, und deren Aufnahme und Abbau durch entsprechende Pflanzen ist in den letzten Jahren vermehrt geforscht worden (BURKEN&SCHNOOR, 1997; LI ET AL., 2002). Für Sprengstoffe wie Trinitrotoluol (TNT), das auf militärisch genutzten Gebieten Probleme bereitet, wurden Untersuchungen von HUGHES ET AL. (1997) mit verschiedenen Makrophyten sowie von NEPOVIM ET AL. (2005) mit Helophyten angestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Konzentration von TNT in Anwesenheit der jeweiligen Pflanzen stets verringert hat. Einen breiten Überblick über die Möglichkeiten der Phytoremediation von explosiven Stoffen gibt die Arbeit von HANNINK ET AL. (2002).

Während sich einzelne Wissenschaftler schon früh dem Thema der Phytoremediation gewidmet und die Umweltproblematik erkannt haben (SEIDEL, 1959, 1966 und 1969; KICKUTH, 1969), wird die Phytoremediation in Deutschland erst seit einigen Jahren für einen größeren Einsatz genutzt und als Methode der Schadstoffreinigung anerkannt (WISSING&HOFMANN, 2002). In den USA ist die Methode, Pflanzen zur Reinigung

kontaminierter Gebiete einzusetzen, bereits weiter verbreitet als in Europa (WOLFE & BJORNSTAD, 2002; PILON-SMITS, 2005). Die Idee, mit relativ einfachen Mitteln und vor allem sehr kostengünstig, kontaminierte Gebiete zu sanieren oder Abwässer zu reinigen (MCCUTCHEON & SCHNOOR, 2003), erscheint für viele kommerzielle Unternehmen attraktiv. So werden in den USA jährlich 100-150 Mio. US\$ (Zahlen aus PILON-SMITS, 2005) für Phytoremediation ausgegeben, während es in Europa noch keinen signifikanten kommerziellen Markt gibt (PILON-SMITS, 2005).

Die Phytoremediation kann jedoch nicht uneingeschränkt eingesetzt werden (WISSING & HOFMANN, 2002). Da die verwendeten Pflanzen dem jeweiligen Standort und der Schadstoffkonzentration angepasst sein müssen, kann die Effektivität bei ungünstigen Bedingungen schnell ihre Grenzen erreichen. Sehr langsame Aufnahmezeiten, hohe Toxizität mancher Stoffe und saisonale Schwankungen können stark limitierend wirken (MCCUTCHEON & SCHNOOR, 2003). Auch die heterogene Verteilung mancher Stoffe im Boden oder im Wasser und deren Verfügbarkeit für die Pflanze sind erfolgshemmend (MCCUTCHEON & SCHNOOR, 2003; PILON-SMITS, 2005).

In der aktuellen Literatur wird Phytoremediation in verschiedene Sparten unterteilt, denen, je nach Schwerpunkt und Betrachtungsweise, unterschiedliche Bedeutung hinsichtlich der Einsetzbarkeit beigemessen wird. Im Allgemeinen werden folgende Vorgänge unterschieden:

Phytoextraktion: Einsatz von schadstoffakkumulierenden Pflanzen zum Entfernen von Metallen und Organika aus dem Boden durch Konzentrierung in der aberntbaren Pflanze (MCCUTCHEON & SCHNOOR, 2003; PILON-SMITS, 2005; SCHRÖDER, 2006).

Phyto- und Rhizodegradation: Abbau und Degradierung von Schadstoffen durch die Pflanze und ihre assoziierten Mikroorganismen (MCCUTCHEON & SCHNOOR, 2003; PILON-SMITS, 2005).

Phytovolatilisation: Einsatz von Pflanzen zur Verflüchtigung von Schadstoffen oder ihrer Metabolite aus Boden oder Wasser (NEWMAN & REYNOLDS, 2004).

Rhizofiltration: Einsatz von Pflanzen, um Schadstoffe an ihren Wurzeln zu absorbieren und anzureichern (PILON-SMITS, 2005; SCHRÖDER, 2006).

Phytostabilisation: Einsatz von bestimmten Pflanzen zur Reduzierung der Bioverfügbarkeit von Schadstoffen (NEWMAN & REYNOLDS, 2004; PILON-SMITS, 2005).

Organische Pumpen: Einsatz von Bäumen zur Verdunstung von Wasser und damit zur Extraktion von Schadstoffen aus dem Boden (TRAPP&KARLSON, 2001; SCHRÖDER, 2006).

Hydraulische Kontrolle: Kontrolle des Wasserspiegels und der Feldkapazität durch Pflanzenbedeckung, um unkontrollierte Bewegungen von Schadstoffen zu verhindern (TRAPP&KARLSON, 2001; SCHRÖDER, 2006).

Diese Methoden der Phytoremediation zeigen unterschiedliche Herangehensweisen in der Anwendung, zielen aber immer darauf ab, abhängig von Grad und Art der Kontamination, geeignete Pflanzenspezies vor Ort einzusetzen, um die genannten Vorgänge zu stimulieren und die Schadstoffe mit höchstmöglicher Effizienz daran zu hindern, Einfluss auf die Umwelt zu nehmen (SCHRÖDER, 2006).

Grundsätzlich ist es vorteilhaft, lokale und einheimische Pflanzenspezies für die Phytoremediation zu nutzen, da diese natürlicherweise am Einsatzort vorkommen. Sie sind resistenter und angepasster an die dort vorhandene Umgebung und bringen auch keine ökologischen Probleme mit sich (MCCUTCHEON&SCHNOOR, 2003).

In den letzten Jahren wird allerdings vermehrt auf dem Gebiet der transgenen Pflanzen zum Einsatz in der Phytoremediation geforscht (MCCUTCHEON&SCHNOOR, 2003). Durch Selektion, aber auch durch Transformation, werden Pflanzen gewonnen, die ein höheres Remediationspotential bei der Hyperakkumulation von Anorganika zeigen (BENNETT ET AL., 2003; VANHUYSSEN ET AL., 2004; CHERIAN&OLIVEIRA, 2005). Pflanzen, die als Akkumulatoren von sehr giftigen Schadstoffen dienen, werden nach einer gewissen Verweil- und Aufnahmezeit abgeerntet und meist deponiert (HANNINK ET AL., 2002; MCCUTCHEON&SCHNOOR, 2003). Pflanzen, die weniger giftige Stoffe aufnehmen, oder Pflanzen, die auf Filtern zur Abwasserreinigung eingesetzt werden, bleiben meist über längere Zeit am Einsatzort und werden nicht aus dem ökologischen Kreislauf entnommen (MCCUTCHEON&SCHNOOR, 2003; NEUSTIFTER&SCHRÖDER, 2005).

Entgiftungsstoffwechsel der Pflanze

Schadstoffaufnahme in die Pflanze

Wie die Pflanze organische Schadstoffe genau aufnimmt, welche Rolle dabei die assoziierten Mikroorganismen spielen, wann die Pflanze gebundene Rückstände einlagert oder die Schadstoffe wieder ausscheidet, konnte bis heute noch nicht hinreichend erklärt werden, obwohl es vielfältige Untersuchungen dazu gibt (LANGEBARTELS&HARMS, 1985; MARRS ET AL., 1995; SCHRÖDER&COLLINS, 2002). Ebenso ist die Rolle der verschiedenen Enzyme bei diesen Prozessen noch nicht ausreichend untersucht und erklärt (SCHRÖDER, 2006).

Für die Bioverfügbarkeit organischer Schadstoffe sind die Bodeneigenschaften und die Umweltbedingungen ebenso entscheidend wie die chemischen Eigenschaften und die biologische Aktivität des jeweiligen Stoffes (BRIGGS ET AL., 1987; TAI&ZEIGER, 2002). Verantwortlich für die Mobilität der Stoffe im Boden ist die Hydrophobizität, die durch den Koeffizienten $\log K_{ow}$ beschrieben wird (BRIGGS ET AL., 1982; TRAPP&KARLSON, 2001; SCHRÖDER ET AL., 2005). Der $\log K_{ow}$ gibt den Verteilungskoeffizient einer Substanz in der Octanol-Wasser-Phase an. Ein hoher $\log K_{ow}$ weist auf eine hohe Hydrophobizität hin. Moleküle mit sehr hoher Hydrophobizität ($\log K_{ow} > 3$) sind so fest an die organische Substanz des Bodens gebunden, dass sie so gut wie gar nicht in Lösung gehen (TAI&ZEIGER, 2002) und somit auch die Phytoremediation limitieren können. Organische Stoffe mit mäßiger bis hoher Wasserlöslichkeit jedoch ($\log K_{ow} < 3$) können ins Porenwasser gelangen und somit in die Pflanze aufgenommen werden (SCHRÖDER&COLLINS, 2002).

Durch Kenntnis der Schadstoffe und ihrer Bioverfügbarkeit kann man die Aufnahme in die Pflanze und somit die Phytoremediation verbessern. So kann durch Änderung des pH-Wertes oder durch Zugabe von Hilfsmitteln in den Boden oder ins Wasser (Humus, Chelate, Seifen) die Pflanzenverfügbarkeit gesteigert werden (SCHRÖDER&COLLINS, 2002; SURESH&RAVISHANKAR, 2004).

Die Aufnahme von organischen und anorganischen Stoffen in die Pflanze erfolgt in unterschiedlicher Weise über die Pflanzenwurzel. Anorganika liegen normalerweise als Ionen vor und werden über Membrantransporterproteine aufgenommen (PILON-SMITS, 2005). Demgegenüber kommen organische Schadstoffe natürlicherweise nicht in der

Rhizosphäre vor, weshalb auch keine natürlichen Transporter für diese Stoffe zur Aufnahme in die Membranen existieren (SCHRÖDER&COLLINS, 2002; PILON-SMITS, 2005). Deshalb werden sie, je nach ihren chemischen Eigenschaften, meist durch einfache Diffusion aufgenommen. Die Moleküle mit niedriger Hydrophobizität können dabei leichter in den Apoplasten gelangen (BRIGGS ET AL., 1982; TRAPP&MCFARLANE, 1995; SCHRÖDER&COLLINS, 2002). Die Translokation der aufgenommenen Stoffe von der Wurzel zum Spross macht zunächst einen Membrantransportschritt vom Symplasten der Wurzel in den Apoplast des Xylems notwendig, denn die impermeable Suberinschicht in der Zellwand der Wurzelendodermis (Casparistreifen) hindert gelöste Stoffe daran, direkt in das Xylem aufgenommen zu werden. Die organischen Stoffe passieren diese Barriere wiederum durch Diffusion (TAIZ&ZEIGER, 2002). Verbindungen mit einem $\log K_{ow}$ zwischen 0,5 und 3,0 können verhältnismäßig einfach im Xylem transportiert werden und in den Spross gelangen (SCHRÖDER&COLLINS, 2002). Wenn die Schadstoffe im Symplasten des Blattes angekommen sind, können sie zu unterschiedlichen Geweben transportiert werden (COLEMAN ET AL., 1997).

Entgiftung von Xenobiotika

Giftige Stoffe werden entweder in der Vakuole oder in der Zellwand gelagert (BURKEN, 2003), durch Chelate gebunden (BARCELO&POSCHENRIEDER, 2003) oder formen Konjugate mit Glutathion (GSH) (SCHRÖDER, 2006). Nach der Bindung des Fremdstoffs an GSH verbleiben die gebildeten Konjugate nicht im Cytosol der Zelle, sondern werden aktiv durch ATP-abhängige Membranpumpen, so genannte ABC-Transporter, in die Vakuole oder den Apoplasten transportiert, wo sie metabolisiert und weiter komplexiert werden können (MARTINOIA ET AL., 1993; MARRS ET AL., 1995; COLEMAN ET AL., 1997). Um die pflanzlichen Entgiftungsmechanismen besser verstehen zu können, wird häufig ein Reaktionsschema herangezogen, das die Entgiftung in drei Phasen untergliedert und erstmals von SHIMABUKURO (1976) beschrieben wurde (vgl. Tab. 1).

In Phase I werden die Xenobiotika, die in das Cytosol eingedrungen sind, durch Reduktion, Oxidation oder Hydrolyse für die weitere Metabolisierung polarisiert und aktiviert (SCHEER, 2003). Dieses Einbringen von reaktiven Gruppen in das

Fremdmolekül wird meist von Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen (P450), Oxigenasen und Peroxidasen katalysiert (DURST ET AL., 1997).

Tab. 1: Drei-Phasen-Modell der pflanzlichen Entgiftung, leicht verändert nach SHIMABUKURO, 1976

Drei-Phasen Modell der Entgiftung organischer Schadstoffe		
Phase I	Aktivierung	Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse der Verbindung
Phase II	Entgiftung	Konjugation mit Glutathion, Zucker oder Aminosäuren
Phase III	Metabolisierung Ausscheidung	Spaltung, Transport oder Rückstandbildung des entgifteten Stoffes

In Phase II werden die in Phase I gebildeten Primärmetaboliten des Cytosol und der Mikrosomen mit zelleigenen niedermolekularen Verbindungen entweder glycosyliert oder an die reduzierte Form des Tripeptides Glutathion (GSH) gebunden. Die Glycosylierung wird durch UDP-Glycosyltransferasen katalysiert, wobei eine Vielzahl von zuckerhaltigen Verbindungen entstehen kann (SANDERMANN ET AL., 1997; JONES & VOGT, 2001; SCHÄFFNER ET AL., 2002). Die Konjugation des Xenobiotikums an Glutathion wird von Glutathion S-Transferasen katalysiert (SCHRÖDER, 2006). In Phase III schließlich werden die entstandenen Konjugate abgebaut und durch interne Kompartimentierungsvorgänge oder sekundäre Konjugationen an Makromoleküle aus dem Stoffwechselgeschehen entfernt (SCHRÖDER, 1996). Da Pflanzen jedoch nicht wie Tiere über ein exkretorisches System verfügen, werden die Fremdstoffkonjugate entweder in den Apoplasten oder die Vakuole deportiert (COUPLAND, 1991; DAVIN & LEWIS, 1992; MARRS ET AL., 1995; WOLF ET AL., 1996) oder als gebundene Rückstände, so genannte „bound residues“ in der Zellwand eingelagert (LANGEBARTELS & HARMS, 1985). Endprodukte der Phase III sind also entweder lösliche Intermediate mit hoher Bioverfügbarkeit, mehr oder weniger stark gebundene Rückstände in der Zellwand, oder auch zu einem geringen Anteil Wurzelexudate und flüchtige Stoffe (SCHRÖDER ET AL., 2001; SCHRÖDER & COLLINS, 2002).

Wegen der Ähnlichkeit dieser Vorgänge, die zu großen Teilen dem tierischen Metabolismus entsprechen (vgl. LAMOUREUX & RUSNESS, 1989), wurde der Begriff der „grünen Leber“ für pflanzliche Entgiftungsvorgänge eingeführt (SANDERMANN, 1994).

Glutathion und Glutathion S-Transferasen

Das Tripeptid Glutathion, eigentlich γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin, setzt sich aus den drei Aminosäuren γ -Glutaminsäure, L-Cystein und Glycin zusammen (vgl. Abb. 3). Es liegt hauptsächlich in seiner reduzierten Form (GSH) und seltener in oxidierten Form (GSSG) vor (DIXON ET AL., 1998).

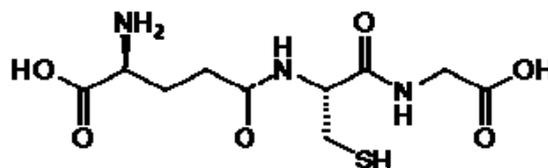


Abb. 3: γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin

Zusätzlich zu seiner Funktion als transportfähige organische Schwefelquelle (HELL, 1997) kann es Aufgaben im Zellmetabolismus bei der Primärassimilation (NOCTOR ET AL., 1998), als Radikalfänger (FOYER ET AL., 1997) und als reaktives Nukleophil in der Entgiftung von elektrophilen Toxinen (SCHRÖDER, 1996) erfüllen. Außerdem ist beobachtet worden, dass Glutathion als intrazelluläres Signalmolekül für extrazelluläre Veränderungen agieren kann (SANCHEZ-FERNANDEZ ET AL., 1997).

Die Konjugation von Glutathion mit dem Xenobiotikum spielt eine herausragende Rolle bei der Sequestrierung und Toleranz gegenüber organischer Schadstoffe in der Pflanze. Sie wird von der Enzymgruppe der Glutathion S-Transferasen (GSTs, E.C. 2.5.1.18) katalysiert (MARRS, 1996; SCHRÖDER, 2006). Viele Xenobiotika besitzen ein elektrophiles Zentrum mit geringer Elektronendichte und der Möglichkeit ein Elektron von einem nukleophilen Donor, z.B. GSH, aufzunehmen und damit eine kovalente Bindung einzugehen (SCHRÖDER, 2006). Diese Tatsache macht diese elektrophilen Fremdstoffe so gefährlich, da sie spontan mit dem nukleophilen Rest von Proteinen und genetischem Material interagieren können. Die elektrophilen Zentren sind Voraussetzung für die Konjugation mit GSH und kommen bei vielen verschiedenen Stoffklassen vor, die nicht von Glycosyltransferasen konjugiert werden können (SCHRÖDER, 2006). Diese Konjugation wird als die eigentliche Entgiftung bezeichnet, da die elektrophilen Stellen des Xenobiotikums entfernt und von Glutathion substituiert werden (EDWARDS&DIXON, 2004). Die GSTs katalysieren diesen Transfer von Aliphaten und Aromaten, heterozyklischen Radikalen, Epoxiden und Arenoxiden mit

Glutathion, die am Schwefelatom des Glutathions stattfindet (SCHRÖDER, 2006). Prinzipiell werden drei Mechanismen der Konjugation unterschieden. Die wichtigste ist die nukleophile Substitution, wobei reaktive Substituenten vom Substrat abgespalten werden und durch Glutathion ersetzt werden. Der zweite Mechanismus ist die nukleophile Addition (Michael-Addition) als Anlagerung von Glutathion an Epoxide oder Doppelbindungen, gefolgt von der Konjugation an Nicht-Kohlenstoff-Atome. Alle Mechanismen haben zur Folge, dass die Toxizität des Ausgangsstoffs erheblich gemindert und die Hydrophobizität für einen besseren Transport erniedrigt wird (SCHRÖDER, 2006).

Glutathion S-Transferasen sind meist dimere multifunktionale Proteine, die in allen aeroben Organismen vorkommen (FROVA, 2003). GST-Monomere haben ein natives Molekulargewicht von etwa 25kDa (DIXON ET AL., 1998). Generell kommen sie im Cytosol als Dimere vor, wobei sowohl Homodimere als auch Heterodimere möglich sind, die differentielle Unterschiede aufweisen und deren Kopplung zu einer Vielzahl an Isoenzymen führt (CUMMINS ET AL., 1997). Jede dieser Untereinheiten beinhaltet eine unabhängige Bindungsdomäne für Glutathion und das Co-Substrat (MARRS, 1996). Warum Dimere überhaupt gebildet werden ist unklar, vor allem da man davon ausgehen kann, dass jedes Monomer ein eigenes reaktives Zentrum besitzt, das nur selten mit dem anderen interagiert (EDWARDS&DIXON, 2004). GSTs besitzen also zwei Bindungsdomänen, die durch die Verbindungsregion zwischen den Untereinheiten voneinander getrennt sind (vgl. Abb. 4).

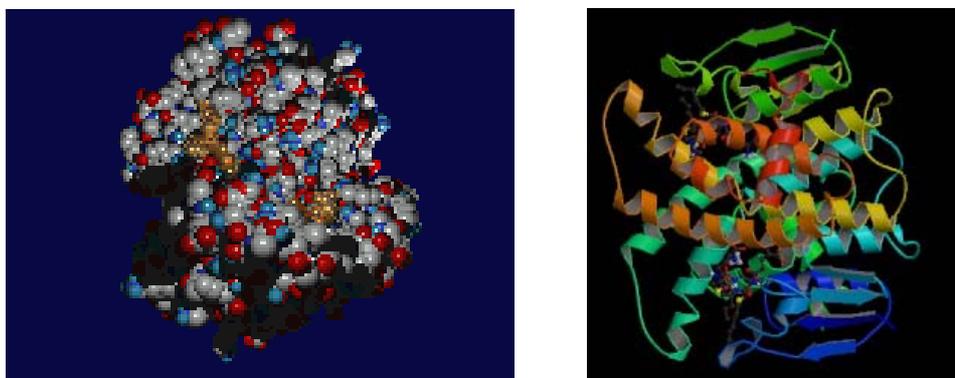


Abb. 4: Links: Glutathion S-Transferase, Modell eines Homodimers aus *Arabidopsis thaliana* mit Bindungstaschen (gelb); nach EDWARDS&DIXON (2005); Bild: http://www.dur.ac.uk/d.p.dixon/at_gst2.gif; Rechts: Dreidimensionale Struktur einer Glutathion S-Transferase aus *Arabidopsis thaliana*; aus REINEMER ET. AL (1996); Bild: http://www.rcsb.org/pdb/images/1gnw_asym_r_250.jpg.

Die N-terminale Domäne ist kleiner und beherbergt die Glutathion-Bindungsstelle. Sie wird G-Region genannt, ist in allen GSTs ähnlich und bindet sehr spezifisch nur Glutathion oder Homoglutathion, aber keine anderen Thiole. Die C-terminale Domäne ist wesentlich größer und enthält diejenigen Aminosäurereste, die das Xenobiotikum binden. Sie bildet die hydrophobe H-Region (EDWARDS&DIXON, 2004). Diese C-terminalen Regionen können sehr unterschiedlich sein und bedingen die verschiedenen Substratspezifitäten der GSTs (SCHRÖDER, 2001).

GSTs wurden erstmals in den 1960er Jahren bei Tieren beschrieben (BOOTH ET AL., 1961). Bald darauf folgte auch die Entdeckung und Charakterisierung der ersten Pflanzen-GSTs durch die Identifizierung eines Glutathion-Atrazin-Metaboliten in Mais (SHIMABUKURO&SWANSON, 1969; FREAR&SWANSON, 1970). In den darauf folgenden 30 Jahren wurden deshalb hauptsächlich die Rolle der GSTs in der Herbizidselektivität und die Rolle der Herbizid-Safener untersucht. Erst später wurde entdeckt, dass GSTs auch ubiquitär in der Pflanze zur Detoxifizierung von Xenobiotika vorkommen (PFLUGMACHER ET AL., 1999). Der Umsatz des Modellsubstrats Chlordinitrobenzol (CDNB) durch GSTs wurde in vielen Pflanzen untersucht, wie z.B. in Fichten (SCHRÖDER ET AL., 1990; SCHRÖDER&BERKAU, 1993), Erbsen (EDWARDS, 1996) und Salat (PARK ET AL., 2005). Im Lauf der Zeit wurde eine Vielzahl von GSTs mit unterschiedlichen Substratspezifitäten beschrieben (HATTON ET AL., 1996; KREUZ ET AL., 1996; NEUEFEIND ET AL., 1997). Man erkannte dadurch auch den direkten Zusammenhang der Induzierbarkeit dieser Enzyme bei Stress und die Bedeutung im endogenen Stoffwechsel der Pflanzen, ohne sich gänzlich über die Rolle der GSTs dabei im Klaren zu sein (EDWARDS, 2004). Viel versprechend sind dabei auch zahlreiche Versuche in den letzten Jahren mit Herbizid-Safenern, wie Untersuchungen an Weizen (PASCAL&SCALLA, 1999), Reis (DENG&HATZIOS, 2002), Gerste (SCALLA&ROULET, 2002), *Arabidopsis thaliana* (DERIDDER ET AL., 2002; DERIDDER&GOLDSBROUGH, 2006; NUTRICATI ET AL., 2006) und bei Gräsern (SCARPONI&DEL BUONO, 2005) zeigen. Safener sind Verbindungen, die nicht nur die Herbizidtoleranz in Getreidepflanzen erhöhen können, sondern auch zu einem starken Ansteigen der Aktivitäten der Entgiftungsenzyme, des Glutathions und des ABC-Transporterproteins führen können (EDWARDS&DIXON, 2004). Durch die Safener-Forschung ist bereits viel über die Charakteristik und Reaktionsweisen von GSTs in Nutzpflanzen beschrieben worden, ohne bisher erklären zu können, wie die Pflanze die Safener erkennt und wie die komplexe Signalwirkung aussieht (EDWARDS&DIXON, 2005).

Zur besseren Charakterisierung und Übersicht wurde in den letzten Jahren eine Nomenklatur für Pflanzen-GSTs eingeführt (DROOG, 1997; MCGONIGLE ET AL., 2000; DIXON ET AL., 2002; FROVA, 2003), die in ihrer Untergliederung analog zu derjenigen für Säuger-GSTs ist. Dabei werden GSTs anhand ihrer Sequenzhomologien in verschiedene Klassen eingeteilt (Tab. 2):

Tab. 2: Übersicht der Pflanzen-GST-Klassen (nach EDWARDS&DIXON, 2005)

Klasse	Gen. Diversität (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Aminosäuren im katalytischen Zentrum	Aktivität	Struktur
Phi	13	Serin	Entgiftung	Dimer
Tau	28	Serin	Entgiftung	Dimer
Theta	2	Serin	GPOX	Dimer
Zeta	2	Serin	Entgiftung	Dimer
Lambda	3	Cystein	Oxidoreduktase?	Monomer
DHAR	4	Cystein	DHAR	Monomer
TCHQD	1	Serin?	?	?
Mikrosomal	1	?	GPOX, Entgiftung	Trimer

Bei Pflanzen-GSTs werden die Klassen Phi (F), Lambda (L), Tau (U), Theta (T) und Zeta (Z) und eine Klasse für Dehydroascorbat-Reduktase (DHAR) unterschieden, für die auch funktionale Eigenschaften nachgewiesen wurden (EDWARDS&DIXON, 2005). Dabei wurden bisher 52 Pflanzen-GSTs in *Arabidopsis thaliana* identifiziert und den oben genannten Klassen zugeordnet (WAGNER ET AL., 2002; EDWARDS&DIXON, 2005). Die beiden den neuen Klassen (Tetrachlorohydrochinon-Dehalogenasen [TCHQD] und mikrosomale GSTs) zugeordneten GSTs können noch nicht funktional beschrieben werden und zählen deshalb noch nicht zu den bestimmten GSTs in Pflanzen (EDWARDS & DIXON, 2005). Dadurch können in der aktuellen Literatur unterschiedliche Angaben über die aktuelle Zahl der Pflanzen-GSTs auftauchen (vgl. SAPPL ET AL., 2004; EDWARDS&DIXON, 2005; SCHRÖDER, 2006). Phi und Tau sind die beiden häufigsten und ausschließlich den Pflanzen-GSTs vorbehaltenen Klassen (vgl. Tab. 2). Beide haben eine starke Bindungsaktivität an Xenobiotika und viele Gemeinsamkeiten mit den klassischen metabolisierenden GSTs bei Säugern. Die GSTs dieser Klassen scheinen auch für die Entgiftung für diverse Herbizid-Selektivitäten verantwortlich zu sein (EDWARDS&DIXON, 2005). GSTs der Theta- und Zeta-Klassen kommen in Tieren

und Pflanzen gleichermaßen vor und haben nur eine begrenzte Aktivität gegenüber Fremdstoffen. GSTs der Theta-Klasse wirken als Glutathion Peroxidasen (GPOX), die organische Hydroperoxide reduzieren, die bei oxidativem Stress entstehen. Die Klasse der Lambda-GSTs und die DHARs unterscheidet sich von den vorherigen Klassen dahingehend, dass sie eher monomer als dimer vorkommt und meist Cystein als aktive Bindungsstelle besitzt. Beide können auch als Thioltransferasen aktiv werden (EDWARDS&DIXON, 2005).

Ziel der GST-Forschung in den nächsten Jahrzehnten wird es sein, die genauen Wirkmechanismen der Enzyme zu studieren, Safener-Wirkungen aufzuklären und GSTs aus Pflanzen, die für die Ernährung und Phytoremediation relevant sind, hinreichend zu untersuchen, um dadurch neue Erkenntnisse und Einsatzmöglichkeiten für Umwelt und Gesundheit zu gewinnen.

Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein Bild vom Phytoremediationspotential von *Phragmites australis* im Hinblick auf die Entgiftung organischer Schadstoffe zu erhalten.

- Die Abwasserparameter pH-Wert, BSB₅ und TOC sollten im Jahresgang ausführlich untersucht und dargestellt werden, um Rückschlüsse auf die Rückhaltekapazität und die Restreinigungsleistung der Schilfpflanzen am Filter der KA Mörlbach ziehen zu können.
- Das Abwasser sollte in der KA Mörlbach zudem auf 17 β -Estradiol und andere endokrin wirksame Substanzen untersucht werden, um das Potential des bepflanzten Bodenfilters für den Abbau dieser Substanzen abschätzen zu können.
- Während des Projektes sollten Entgiftungsenzyme wie Glutathion-Reduktasen (Schwefelstoffwechsel), Peroxidasen (Stress) und Glutathion S-Transferasen (Entgiftung) am Filter in Mörlbach bestimmt werden, um deren Nutzen als Biomarker feststellen zu können.
- Weiters sollten *Phragmites australis*-Pflanzen vom Filter in Mörlbach herangezogen werden, um Abbau- und Aufnahmestudien von verschiedenen Schmerzmitteln durchzuführen und das Potential der Phytoremediation im Hinblick auf Abbau und Metabolisierung genauer zu beschreiben.

Aus diesen eher anwendungsbezogenen Untersuchungen ergab sich die Fragestellung, wie und warum die Schilfpflanze auf die vielfältig beobachteten organischen Schadstoffe reagiert. Dazu wurden verschiedene Laboruntersuchungen durchgeführt.

- Durch Inkubation mit dem Medikament Ibuprofen sollten Entgiftungsenzyme in verschiedenen *Phragmites australis*-Pflanzen induziert werden.
- Ebenso sollten Untersuchungen mit dem Herbizid Metolachlor und den Safenern Benoxacor, Cloquintocet-mexyl und Naphthyllessigsäure angestellt, um dabei Aufschluss auf deren Wirkung auf die Blätter der Schilfpflanzen zu erhalten.

- In weiteren Untersuchungen an der ganzen Schilfpflanze sollte daraufhin die Wirkung der Safener Benoxacor, Fenclorim und Fenchlorazol-ethyl auf Blatt und das Rhizom quantifiziert und Transportsignale identifiziert werden.

Die in der Enzymologie gewonnen Erkenntnisse sollten schließlich durch genauere molekularbiologische Untersuchungen, die sowohl am GSF-Forschungszentrum, als auch an der Universität Durham durchgeführt wurden, zur besseren Charakterisierung von GSTs in *Phragmites australis* beitragen und komplettiert werden.

- Dazu sollten GSTs aus schadstoffinduzierten Rhizomproben von *Phragmites australis* aufgereinigt und isoliert werden.
- Mit Hilfe von Antikörpern sollte geprüft werden, ob nach Safener- und Schmerzmittelbehandlung GSTs in Schilfpflanzen exprimiert werden.
- Aus den stark induzierten Proben sollte die RNA isoliert werden und durch die daraus generierte cDNA mit Hilfe von PCR und distinkten Primern auf GSTs geprüft werden.
- Eine cDNA-Bank aus GST-induziertem Probenmaterial sollte als Grundlage für weiterführende Untersuchungen etabliert werden.

II Material und Methoden

Phragmites australis – das Schilfrohr

Phragmites australis (CAVANILLES) TRINIUS ex STEUDEL, das Schilfrohr, gehört zu den Poaceae, der Familie der Süßgräser (vgl. Tab. 3) (SCHMEIL&FITSCHEN, 1996; DÜLL&KUTZELNIGG, 2005).

Tab. 3: Systematik *Phragmites australis* (vgl. SCHMEIL&FITSCHEN, 1996)

Systematik		
Reich	Regnum vegetabile	Pflanzenreich
Abteilung	Angiospermae	Bedecktsamer
Klasse	Monokotyledonae	Einkeimblättrige
Ordnung	Poales	Gräser
Familie	Poaceae	Süßgräser
Gattung	Phragmites	Schilfrohr
Art	australis	südlich

Der veraltete Name *Phragmites communis*, Gewöhnliches Schilfrohr, wird zum Teil noch synonym verwendet.

Die Schilfpflanze erreicht eine Höhe von durchschnittlich 2-4m (vgl. Abb. 5), manche Unterarten können auch wesentlich größer werden. So kann *Phragmites australis* ssp. *altissimus* eine Höhe von bis zu 10m erreichen (SCHMEIL&FITSCHEN, 1996).

An der Blattscheide befindet sich bei *Phragmites australis* statt der üblichen Ligula (Blattscheide) der Süßgräser ein Haarkranz, durch den es sich auch gut von der nah verwandten *Phalaris arundinacea*, dem Rohrglanzgras, unterscheiden lässt (WISSING&HOFMANN, 2002). Das Schilfrohr blüht von Juli bis September, wobei die Rispe eine Länge von 40 bis 50cm erreichen kann (SCHMEIL&FITSCHEN, 1996). Die windblütigen Ähren sind am Grund männlich, während sie darüber zwittrig sind. Die Früchte, die erst im Spätherbst ausreifen, sind an einer Ährenachse angeordnet und stark behaart. Diese so genannten Schirmchenflieger können gut durch den Wind verbreitet werden, aber auch eine schwimmende Ausbreitung über das Wasser ist möglich (DÜLL&KUTZELNIGG, 2005).

Das Schilfrohr ist ein Rhizomgeophyt mit einem ausgedehnten Rhizomgeflecht, das es zu starker vegetativer Vermehrung befähigt. Diese Rhizome besitzen nur kurze Seiten-

und Haarwurzeln und können in der Hauptwachstumszeit einen Zuwachs von 3 cm/d erreichen. Die Schilfpflanze durchwurzelt den Untergrund bis zu etwa 3 m Tiefe und bildet dichte Rhizommatten aus, vor allem in alten Beständen, aus denen es immer wieder neu austreiben kann (WISSING&HOFMANN, 2002). Die Rhizome haben einen hohen Ligninanteil und besitzen ein Aerenchym (<http://www.repo-pflanzen.de>, 2006), was zu erhöhtem Lufteintrag in die Rhizosphäre führt. So ist die Pflanze auch im Winter zur Wasserreinigung befähigt und die Mikroflora wird begünstigt (WISSING&HOFMANN, 2002).



Abb. 5: Junge *Phragmites australis* auf dem Filter an der KA Mörlbach, Frühjahr 2004. Die Schilfpflanzen können aufgrund des reichlichen Nährstoffangebots während der Vegetationsperiode eine Höhe von bis zu 4 Metern erreichen.

Zusätzlich kann sich die Pflanze, durch das Austreiben so genannter Legehalme an den Nodien, stark ausbreiten und so innerhalb kürzester Zeit ausgedehnte Areale besiedeln, die auf nur einen einzigen Klon zurückgehen können. Es wird vermutet, dass manche Schilfbestände auf Pflanzen zurückgehen, die bereits vor tausenden von Jahren an diesem Standort vorkamen. Im Donaudelta schätzt man das Alter einiger Schilfbestände auf bis zu 8000 Jahre (DÜLL&KUTZELNIGG, 2005).

Der oberirdische Teil des Schilfes, der Halm, ist gekennzeichnet durch schnelles Wachstum und lange Internodien, die durch erhöhten Anteil an Sklerenchymgewebe stabilisiert werden (KLÖTZLI, 1971).

Das Schilfrohr kommt an stehenden oder langsam fließenden Gewässern vor, bis zu einer Wassertiefe von etwa einem Meter, aber auch auf moorigen Wiesen, in Erlenbrüchen oder Weidenauwäldern ist es anzutreffen (DÜLL&KUTZELNIGG, 2005). Im natürlichen Habitat dienen die Schilfgürtel verschiedenen Funktionen, wie einer Minderung von Wellen und somit dem Schutz vor Erosion, einer Filterung des Durchflusswassers und auch einer Anreicherung von Flora und Fauna (<http://www.repo-pflanzen.de>, 2006).

Lockere und nicht zu kalte Schlammböden mit ausgeglichenem hohem Nährstoffangebot werden bevorzugt, aber auch im seichten Wasser ist, bei ausreichender Ernährung, ein gutes Wachstum gewährleistet (ZEMPLIN, 2003). Neben den Eigenschaften, hohe organische Belastungen vertragen zu können, gilt das Schilf als besonders nitrophil (WISSING&HOFMANN, 2002).

Die Verträglichkeit von hohen Stickstoffbelastungen macht es zur meistverwendeten Pflanze in Pflanzenkläranlagen und Pflanzenfiltern (PELLEGRIN&HAUBER, 1999; MCCUTCHEON&SCHNOOR, 2003). Vorgereinigte Abwässer werden von der Schilfpflanze im Allgemeinen recht gut vertragen (WISSING&HOFMANN, 2002). Nährstoffe, wie Stickstoff und Phosphat, werden zum Wachstum benötigt und so bis zu einem gewissen Maß aus dem Abwasser eliminiert (NEUSTIFTER&SCHRÖDER, 2004). Empfindlich ist *Phragmites australis* jedoch gegenüber starker Fließbewegung und permanenter Überschwemmung, besonders in der Wachstumsphase. Dauerhafte Überflutungen, vor allem im Winter, und das Eindringen von Feuchtigkeit von oben führen zum Faulen des Pflanzenmaterials und infolge dessen zu großen Bestandseinbußen. In Monokulturen und bei hoher Stickstoffversorgung zeigt sich das Schilfrohr auch sehr anfällig gegenüber Schädlingsbefall, vor allem durch Blattläuse (WISSING&HOFMANN, 2002). Dauerhaft ungünstige Bedingungen können dabei zu einem Totalausfall des Bestandes führen (vgl. NEUSTIFTER&SCHRÖDER, 2004).

Seit den 1950er Jahren wurde ein Rückgang der natürlich vorkommenden Schilfgürtel beobachtet. Diese Erscheinung wurde erstmals Anfang der 1970er Jahre als Schilfsterben bezeichnet (vgl. KLÖTZLI&ZÜST, 1973). Das Naturverständnis jener Zeit trug dazu bei, dass natürliche Schilfzonen immer mehr verschwanden und Uferäume zunehmend verbaut wurden. Man schätzt, dass bis 1992 an oberbayerischen Seen der Schilfbestand um etwa 90% zurückgegangen ist (GROSSER ET AL., 1997). Erst in den letzten beiden Jahrzehnten wird dem Schutz dieser wichtigen Uferpflanze wieder mehr Beachtung geschenkt und die Ursache für den Rückgang von Schilfbeständen auch

wissenschaftlich genauer untersucht (vgl. GROSSER ET AL., 1997; MELZER ET AL., 2001).

Den gezielten Einsatz und die Verwendung von Schilfpflanzen in der Phytoremediation hat man in Deutschland erst in den vergangenen beiden Jahrzehnten entdeckt. Heute nutzt man vielerorts das natürliche Verhalten und die Kapazität dieser Pflanze, um gezielt Nähr- und Schadstoffe aus dem Wasser zu filtern, Ufer zu renaturieren und Abwässer zusätzlich zu reinigen (WISSING&HOFMANN, 2002).

Verwendetes Pflanzenmaterial

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich mit *Phragmites australis* (CAVANILLES) TRINIUS ex STEUDEL durchgeführt.

Sammelorte im Freiland waren der Pflanzenfilter an der KA Mörlbach (vgl. NEUSTIFTER & SCHRÖDER, 2004, vgl. Abb. 8). Für die Induktionsstudien wurden *Phragmites australis*-Pflanzen vom Filter an der KA Mörlbach und *in vitro* vermehrtes Pflanzenmaterial der Firma BioPlanta (Leipzig) in das Gewächshaus des GSF-Forschungszentrums überführt und dort kultiviert. Für die molekularbiologischen Untersuchungen an der Universität Durham wurde jeweils ein Teil des Bestandes (Rhizome) der *Phragmites australis*-Pflanzen aus Mörlbach und von BioPlanta nach England überführt und dort in Klimakammern unter definierten Bedingungen vorkultiviert.

Gewächshaus- und Klimakammerbedingungen

Die *Phragmites australis*-Pflanzen im Gewächshaus des GSF-Forschungszentrums wurden in 11cm-Töpfe in ein Torfkultursubstrat (55% Torf, 35% Sand, 10% Lehm, pH 6,0) getopft (vgl. Abb. 6). Dabei wurden je nach Größe 1-3 Rhizome in einen Topf gegeben. Die automatische Anstaubewässerung versorgte die Pflanzen 2x täglich mit Wasser und Nährstoffen (N:P:K~10:5:5). Die Tagestemperatur betrug 20°C, mit jahreszeitlichen Schwankungen, die Nachttemperatur ca. 10°C. Die relative Luftfeuchte lag bei ungefähr 60%, die Lichtdauer war jahreszeitenabhängig.

Chemischer Pflanzenschutz wurde nicht eingesetzt. Es kamen lediglich biologische Pflanzenschutzmaßnahmen zum Einsatz, wie Florfliegen gegen Blattläuse, Schlupfwespen gegen Weiße Fliegen und Nematoden gegen Trauermücken, alle Neudorff).



Abb. 6: *Phragmites australis*-Pflanzen von BioPlanta im Gewächshaus des GSF-Forschungszentrums.

Die Klimakammer an der Universität Durham (Abb. 7) wurde auf folgende Parameter eingestellt: Licht 16 h/d, 60% relative Luftfeuchte, Bewässerung 2x täglich, Temperatur Tag und Nacht 20 °C. Zusätzlich wurde ein N-betonter Dünger verabreicht, um ein schnelleres Austreiben für den kurzen Versuchszeitraum voranzutreiben. Pflanzenschutz wurde nicht angewandt.



Abb. 7: *Phragmites australis*-Pflanzen nach einer Safenerbehandlung in der Klimakammer der Universität Durham.

Abwasserparameter Mörlbach

Probenahmestellen

An der KA Mörlbach wurden an fünf unterschiedlichen Stellen der Teichanlagen Wasserproben entnommen: 3x am Ablauf des Filters (1, 2 und 3), 1x am Zulauf des Filters als Mischprobe (4) und 1x am Ablauf der Vorklärung (5), (vgl. Abb. 8).

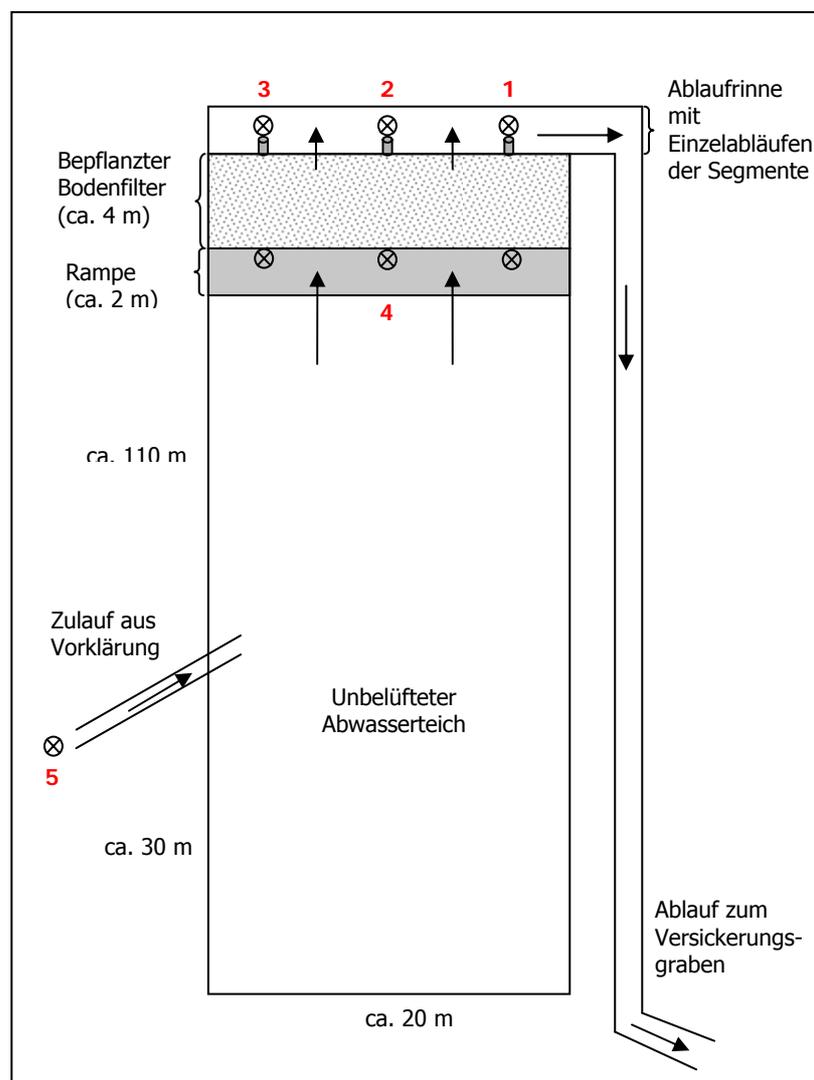


Abb. 8: Probenahmestellen (1-5) am Ablauf der Vorklärung, am unbelüfteten Abwasserteich und am Ablauf des Bodenfilters der KA Mörlbach (Skizze nicht maßstabsgetreu).

Untersuchungszeiträume

Die Probenahmen an der KA Mörlbach wurden an den folgenden Terminen durchgeführt (Tab. 4):

Tab. 4: Probenahmetermine an der KA Mörlbach

2003	2004	2005
21.05.	20.01.	31.01.
04.06.	18.02.	14.02.
16.06.	05.05.	13.07.
02.07.	26.05.	27.07.
15.07.	08.06.	09.08.
29.07.	22.06.	31.08.
20.08.	07.07.	13.09.
03.09.	21.07.	28.09.
24.09.	04.08.	12.10
22.10.	18.08.	
05.11.	01.09.	
18.11.	15.09.	
09.12.	29.09.	
	20.10.	
	24.11.	
	20.12.	

Die Wasserproben wurden direkt aus der KA Mörlbach entnommen und umgehend zur weiteren Untersuchung an das Bayerische Landesamt für Umwelt in München geliefert. Sämtliche Untersuchungen an den Probepflanzen sowie die ELISA-Tests wurden am GSF-Forschungszentrum in Neuherberg durchgeführt.

Wasserparameter

Um einen kurzen, aber aussagekräftigen Überblick über das Phytoremediationspotential des Filters geben zu können, wurden hier drei Parameter aus den Projekten in Mörlbach (vgl. NEUSTIFTER&SCHRÖDER, 2004, 2005) ausgewählt und über alle drei Erhebungsjahre im Zusammenhang dargestellt: pH-Wert, der Biochemische Sauerstoffbedarf (BSB₅) und der Gesamtorganische Kohlenstoffgehalt (TOC).

pH-Wert

Als ein wichtiger Parameter für die Wassergüte gilt der pH-Wert. Er erlaubt Rückschlüsse auf die aktuelle Situation einer Anlage. Schwankungen des pH-Werts, z.B. durch Alkalisierung aufgrund von CO_2 - und HCO_3^- -Entzug, haben ihre Ursache in der Photosynthese des Phytoplanktons. Bei Algenblüten im Sommer kann der pH-Wert stark ansteigen und bei Werten von über 8,5 eine Gefahr für die Biozönose in Gewässern darstellen (WISSING&HOFMANN, 2002). Es ist deshalb wichtig, in kleinen kommunalen Abwasseranlagen pH-Werte im Teich und am Ablauf zu erfassen und die Dynamiken zu kennen. Die Untersuchung der pH-Werte wurde jeweils direkt vor Ort mit einem Multimeter (IKA) durchgeführt (DIN 38404-C5, Methoden-ID: 8, LfU).

Biochemischer Sauerstoffbedarf – BSB₅

Mit dem BSB₅-Wert wird der Sauerstoffbedarf gemessen, der durch mikrobielle Stoffwechselprozesse beim Abbau der Schmutzstoffe im aeroben Milieu bei 20°C in fünf Tagen verbraucht wird (BEVER ET AL., 2002). Der BSB₅ wird über einen Zeitraum von fünf Tagen erhoben, da der Sauerstoffgehalt sehr stark schwanken kann, was vor allem auf die temperaturabhängige Nitrifikation zurückzuführen ist. Um Vergleiche anstellen zu können, hat man sich standardmäßig auf diesen Zeitraum geeinigt, weil die Zehrung dann annähernd linear verläuft (SCHWÖRBEL&BREDELBERGER, 2005). Der BSB₅ ist ein sehr aussagekräftiger Abwasserparameter, der es erlaubt, die Güte des Reinigungsprozesses zu beurteilen. Deshalb wird dieser Wert auch immer an der Vorklärung und am Ablauf bestimmt, um sich ein Bild von der Eliminierung der Sauerstoff zehrenden, leicht abbaubaren Stoffe machen zu können, die ansonsten, bei hoher Belastung, den Sauerstoffhaushalt von Gewässern negativ beeinflussen können (MUDRACK&KUNST, 2002).

Bei der Betrachtung des bepflanzten Bodenfilters in Mörlbach spielen die BSB₅-Werte nur eine untergeordnete Rolle, da die Reinigungsprozesse meist schon im Teich abgeschlossen sind. Wichtig war jedoch zu beobachten, ob zusätzliche Auswirkungen durch den Filter in Bezug auf die Wasserparameter beobachtet werden können.

Der Ablaufgrenzwert von BSB₅ bei kommunalen Kläranlagen der Größenklasse I liegt bei 40 mg/L, wobei der selbst erklärte Ablaufgrenzwert in Mörlbach bei nur 35 mg/L liegt (nach Angabe Bayerisches Landesamt für Umwelt).

Die Messung des BSB₅ erfolgte mit OxiTop-Verfahren (WTW, Weilheim). Die Untersuchungen wurden im Landesamt für Umwelt durchgeführt (DIN EN 1899-1-HA 8.4.2, Methoden-ID: 109, LfU).

Gesamtorganischer Kohlenstoff - TOC

Der TOC (total organic carbon) ist ein Maß für den gesamtverfügbaren organischen Kohlenstoff. Er ist der Kennwert für die organische Belastung des Abwassers und ebenfalls ein Indikator für den Klärprozess (BEVER ET AL., 2002).

Die Untersuchungen zum TOC wurden am Landesamt für Umwelt durchgeführt (DIN EN 1484 (H3)).

Endokrin wirksame Substanzen im Abwasser der Kläranlage Mörlbach

Östrogene und endokrin wirksame Substanzen kommen immer wieder in Abwässern (SPENGLER, 2001; GEHRING, 2004) in hohen Konzentrationen vor und stellen somit eine Gefahr für das Trinkwasser dar (KLOAS, 2000; HEGEMANN&BUSCH, 2000). Um feststellen zu können, ob auch an einer kommunalen Anlage, wie in Mörlbach, Östrogene im Abwasser nachweisbar sind, wurden Experimente zum Nachweis von 17 β -Estradiol und vier weiteren endokrin wirksamen Substanzen im Abwasser der KA Mörlbach durchgeführt (vgl. NEUSTIFTER&SCHRÖDER, 2005).

17 β -Estradiol

17 β -Estradiol wurde mit Hilfe eines 17 β -Estradiol-ELISA Test-Kit (IBL, Hamburg) nachgewiesen. Die Nachweisgrenze lag bei 10pg/mL. Bei diesem ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) handelt sich um einen kompetitiven Enzym-immunoassay zur direkten und quantitativen Bestimmung von 17 β -Estradiol (IBL, 2005). Der Test basiert auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung. In die Vertiefungen (Wells) der Mikrotiterstreifen, die mit Antikörpern beschichtet sind, wurde die Probe und eine definierte Menge enzymmarkiertes Antigen (E-Ag) pipettiert. Während der Inkubation konkurrierte das Antigen aus den Standards bzw. den Proben mit dem E-Ag um die limitierten Bindungsstellen der auf den Wells fixierten Antikörper (IBL, 2005). Nicht gebundene E-Ag wurde durch Waschen entfernt. Anschließend wurde eine

Substratlösung hinzugegeben und die Farbentwicklung (blau) durch Zugabe von H₂SO₄ (Schwefelsäure) nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Reaktionslösung war durch die Einwirkung der Säure nun gelb gefärbt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional zur Antigenkonzentration in den Standards und den Proben (IBL, 2005). Die Extinktion wurde mit dem Mikrotiterplatten-Reader SpectraMaxPlus 384 (MolecularDevices) photometrisch gemessen und die Antigen-Konzentrationen anhand einer Standardkurve direkt mit dem Programm SoftMaxPro4.6 (Molecular Devices) berechnet.

Die Wasserproben für den ELISA-Test wurden einen Tag vor der Testdurchführung an drei verschiedenen Stellen in der Kläranlage genommen: Ablauf der Vorklärung, im Teich und nach dem Filter in Mischproben aus allen drei Abläufen (vgl. Abb. 8). Die Lagerung erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Die vier Probenahmen wurden an der KA Mörlbach an folgenden Probenahmeterminen durchgeführt: 28.09.2005, 05.10.2005, 12.10.2005 und 17.10.2005.

Weitere endokrin wirksame Stoffe

Am 12.10.2005, wurde eine erweiterte Untersuchung auf endokrin wirksame Stoffe zusammen mit dem Bayerischen Landesamt für Umwelt durchgeführt (Tab. 5).

Tab. 5: Liste der untersuchten Stoffe am LfU

OP	Octylphenol
NP	Nonylphenol
HHCB	Hexahydro-hexamethyl-cyclopenta-gamma2-benzopyran
DEHP	Di(ethylhexyl)phthalat

Bei den beiden Stoffen Octylphenol und Nonylphenol handelt es sich um Alkylphenole, die als nichtionische Tenside im Umlauf sind. Hexahydro-hexamethyl-cyclopenta-gamma2-benzopyran (HHCB) ist eine polyzyklische Moschusverbindung und wird als Ersatz für den natürlichen Moschusduft in der Duftstoffindustrie verwendet. Di(ethylhexyl)phthalat (DEHP) ist einer der wichtigsten Weichmacher auf Phthalatbasis, der in polymere Stoffe eingearbeitet wird und diese elastischer und geschmeidiger macht. DEHP geht dabei keine chemische Verbindung ein und kann daher aus Kunststoffen mit der Zeit wieder entweichen. Von diesen Stoffen weiß man, dass sie

endokrin wirksam sein können (vgl. COORS, 2004; GEHRING, 2004; ENGELMANN & RHODE, 2005).

Das Ziel war es zu erfahren, ob diese endokrin wirksamen Stoffe in Mörlbach vorkommen und detektiert werden können, da diese Substanzen in kommunalen Abwasseruntersuchungen nicht standardisiert erfasst werden.

Die mit Salzsäure angesäuerten Proben wurden mit einem internen Standardgemisch (C13-markiert, LfU) versetzt und anschließend mit Toluol geschüttelt. Die Lösungsmittelphase wurde im 1L-Scheidetrichter abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und auf ein Volumen von ca. 5 mL abdestilliert. Die weitere Aufreinigung erfolgte durch Chromatographie an einer mit Kieselgel gefüllten Reinigungssäule. Der gereinigte Extrakt wurde auf ein Endvolumen von ca. 200 µL mit Stickstoff schonend eingengt und anschließend mit Hilfe des Silylierungsmittels N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) derivatisiert. Die Messung erfolgte mit einer Gaschromatograph-Massenspektrometer-Kombination (GC-MS) im „Single Ion Modus“ (Agilant 5973 N, mass selective detector, GC-System 6890).

Entgiftungsenzyme in *Phragmites australis*

Pflanzenproben in Form von Blättern und Rhizomen von *Phragmites australis* wurden direkt aus dem Filter in Mörlbach entnommen. Die Pflanzenproben wurden entweder für die enzymatische Untersuchung sofort weiterverarbeitet oder in Flüssigstickstoff gefroren und für spätere Aufarbeitungen bei -80 °C aufbewahrt.

Aufschluss des Pflanzenmaterials

Der Aufschluss des pflanzlichen Probenmaterials erfolgte nach der Methode von SCHRÖDER ET AL. (2005). Gefrorenes Pflanzenmaterial wurde unter Flüssigstickstoff fein gemörsert, abgewogen und anschließend sofort mit Aufarbeitungspuffer (10 mL/g) versetzt (Tab. 6).

Die Inkubation des Puffers mit dem Pflanzenrohextrakt erfolgte 30 min unter ständigem Rühren auf Eis. Anschließend wurden die ungelösten Bestandteile in einer Kühlzentrifuge (JA21, Beckman/Coulter) 30 min bei 4 °C und 20 000 xg abzentrifugiert.

Das Pellet mit den unerwünschten Zellbestandteilen wurde verworfen und der Überstand nach Filterung durch Miracloth (Calbiochem) weiter verarbeitet.

Tab. 6: Aufarbeitungspuffer

Aufarbeitungspuffer	
25 mM Tris/HCl-Puffer pH7,8	1L
EDTA (5 mM)	1,461 g
Nonidet P 40 (1%)	10 mL
PVP K30 (1%)	10 g

Zur Isolierung der gewünschten Enzyme aus Pflanzenrohextrakt diente die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung. Fremdproteine und Inhibitoren werden hierbei durch Zerstörung ihrer Hydrathülle gefällt. Mit dem ersten Fällungsschritt (0-40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) wurden größere Fremdproteine ausgefällt. Nach 30 min Inkubationszeit wurden die ausgefallenen Bestandteile abzentrifugiert (30 min bei 20 000 xg). Aus dem gefilterten Überstand wurden im zweiten Fällungsschritt (40-80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) die gewünschten Enzyme ausgefällt. Nach erneuter Inkubation von 30 min wurden die ausgefallenen Bestandteile bei 20 000 xg abzentrifugiert.

Die nun als Pellet vorliegenden Enzyme wurden mit 25 mM Tris/HCl-Puffer, pH7,8 resuspendiert.

Die benötigte Menge an Ammoniumsulfat wurde nach JAENICKE (1984) berechnet, der die gewünschte Salzmenge (S) in Abhängigkeit von Volumen (V) und vorgegebener Salzmenge (s) beschreibt:

$$\text{Menge an benötigtem Ammoniumsulfat [g]} = \frac{1,77 * V * (S - s)}{3,54 - S}$$

Die resuspendierte Proteinlösung aus der Ammoniumsulfatfällung hat eine sehr hohe Salzkonzentration, die für Analysen störend sein kann (SCHEER, 2003). Deshalb wurde die gewonnene Proteinlösung für weitere Untersuchungen über PD10-Gelfiltrationssäulen mit Sephadex G-25-Material (GEHealthcare) entsalzt. Die Säulen wurden mit 20 mL 25 mM Tris/HCl-Puffer, pH7,8 equilibriert. Anschließend wurden 2,5 mL des gewonnenen Proteinextrakts auf die Säulenmatrix gegeben und das dabei austropfende Eluat verworfen. Das an die Matrix gebundene Protein wurde schließlich

mit 3,5 mL des 25 mM Tris-Puffers von der Säule eluiert und in 0,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen in Flüssigstickstoff tiefgefroren. Die Proteine können über längere Zeit bei -80°C aufbewahrt werden.

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch nach der Methode von BRADFORD (1976). Definierte Mengen einer Farbstofflösung (Bradfordlösung, Fluka) wurden mit der Enzymlösung gemischt und für 15 min inkubiert. Der Farbstoff lagert sich an die Proteine an und verschiebt deren Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm. Die Extinktionszunahme wurde photometrisch gemessen. Diese Werte wurden mit einer für die jeweilige Farbstofflösung ermittelten Kalibrierkurve verrechnet und die Enzymmenge quantitativ bestimmt.

Für alle hier aufgeführten Enzymkinetiken wurde das Photometer Spectra Max Plus 384 (Molecular Devices) verwendet. Alle anschließenden Proteinkalkulationen und statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm SoftMax Pro 4.6 (Molecular Devices) durchgeführt.

Aktivitätsbestimmungen Glutathion S-Transferasen (GSTs)

Zur Bestimmung der GST-Aktivitäten wurden die Substrate 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (CDNB), 3,4-Dichlor-2-nitrobenzol (DCNB) und p-Nitrobenzoylchlorid (pNBoc, alle Sigma) verwendet (vgl. HABIG ET AL., 1974).

Die Enzymlösung wurde dazu in eine Pufferlösung mit reduziertem Glutathion (GSH) pipettiert und mit dem Substrat versetzt. Zur Messung der Kinetiken wurden die Substrat-Ansätze (Tab. 7) gemischt und davon je 190 µL in die einzelnen Wells von 96 Well-Mikrotiterplatten (Nunc) pipettiert. Kurz vor der Messung im Photometer wurden in jedes Well 10 µL Enzymprobe zugegeben und damit ihr Gesamtansatz auf 200 µL aufgefüllt. Die Kinetik der Konjugation wurde photometrisch über 5 min in Triplikaten bestimmt. Die Aktivitätsmessung der GSTs erfolgte über die Konjugatbildung bei der jeweiligen substratspezifischen Wellenlänge. Teilt man den Wert der berechneten Volumenaktivität durch die Proteinkonzentration (aus Bradford-Test), erhält man die spezifische Aktivität in [µkat/mg].

Tab. 7: Ansatz für alle photometrischen GST-Tests

Ansatz GST-Tests	
0,1M Tris/HCl-Puffer, pH 6,4	27mL
30mM Substrat	1000µL
60mM GSH	500µL

Substrat CDNB

Konjugate von Chlordinitrobenzol absorbieren spezifisch bei 340nm, der Extinktionskoeffizient beträgt $9,6\text{mMol}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$. Als Puffer wurde 0,1M Tris/HCl-Puffer, pH6,4 verwendet. Nachfolgend ist die Konjugatbildung mit CDNB dargestellt (Abb. 9).



Abb. 9: Glutathion-Konjugatbildung mit dem Substrat CDNB, katalysiert durch GSTs.

Substrat DCNB

Konjugate von Dichlornitrobenzol absorbieren spezifisch bei 345nm, der Extinktionskoeffizient beträgt $8,5\text{mMol}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$. Als Puffer wurde 0,1M Tris/HCl-Puffer, pH7,5 verwendet. Die nachfolgende Grafik zeigt ein Schema der Konjugatbildung (Abb. 10).



Abb. 10: Glutathion-Konjugatbildung mit dem Substrat DCNB, katalysiert durch GSTs.

Substrat pNBoC

Konjugate von p-Nitrobenzoylchlorid absorbieren spezifisch bei 480nm, der Extinktionskoeffizient beträgt $1,9\text{mM}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$. Als Puffer wurde 0,1M Tris/HCl-Puffer, pH6,4 verwendet. Nachfolgend ist die Konjugatbildung mit pNBoC dargestellt (Abb. 11).

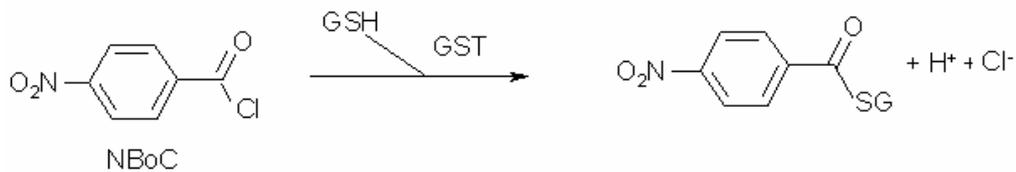


Abb. 11: Glutathion-Konjugatbildung mit NBoC, katalysiert durch GSTs.

Aktivitätsbestimmungen Glutathion-Reduktasen (GRs)

Die Glutathion-Reduktase (GRs, E.C. 1.6.4.2) liefert ständig reduziertes Glutathion für den Entgiftungsprozess und kann so als Indikator für die Entgiftungstätigkeit gelten. Die Bestimmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität erfolgte nach einer modifizierten Methode von VANAKER ET AL. (1998).

Dabei reduziert das Enzym GR die oxidierte Form des Glutathions (GSSG) unter NADPH-Verbrauch zu seiner reduzierten Form (GSH). Es wird hierbei die Konzentrationsabnahme von NADPH gemessen.

Tab. 8: Substrat-Ansatz zur GR-Messung

Ansatz GR-Test	
0,1M Tris/HCl-Puffer, pH7,5	9,3 mL
EDTA	2,92 mg
10mM GSSG	100 μ L
10mM NADPH	100 μ L

Zur Aktivitätsmessung wurden 190 μ L Substrat-Ansatz (Tab. 8) je Well in 96Well-Mikrotiterplatten vorgelegt. Die Zugabe von je 10 μ L Enzymprobe startete die Reaktion. Die Extinktionsabnahme wurde 5 min bei 340 nm, dem Absorptionsmaximum von NADPH, gemessen. Der Extinktionskoeffizient betrug hier $6,22 \text{ m M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Aktivitätsbestimmungen Peroxidasen (POX)

Peroxidasen (POX, E.C. 1.11.1.7) sind an vielen Prozessen im Sekundärstoffwechsel beteiligt und gelten als unspezifische Stressmarker, z.B. nach Pathogeninfektion oder Ozonbehandlung, CASTILLO, 1986; MESSNER & SCHRÖDER, 1999).

Die Messung der Peroxidaseaktivität in den Enzymextrakten folgte der Methode von DROTAR ET AL. (1985). Als Substrat diente Guajacol (vgl. Abb. 12).

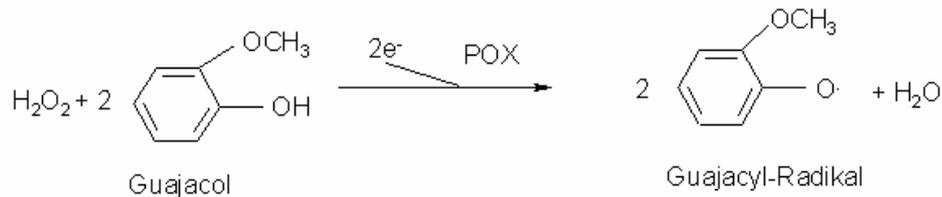


Abb. 12: Reaktion von H_2O_2 mit dem Substrat Guajacol in Anwesenheit von Peroxidase. Gemessen wurde das bräunliche Produkt Tetraguajacol.

Die Messung erfolgte wie bei den GSTs in 96Well-Mikrotiterplatten. Es wurden $190 \mu\text{L}$ des Substrat-Ansatzes (Tab. 9) in die einzelnen Wells vorgelegt, anschließend $10 \mu\text{L}$ der Enzymprobe zupipettiert. Die Extinktionsänderung wurde 5 min bei 420 nm gemessen. Der Extinktionskoeffizient betrug hier $26,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Tab. 9: Substrat-Ansatz zur POX-Messung

Ansatz POX-Test	
0,05 M Tris/HCl, pH 6,0	27,3 mL
0,9 mM H_2O_2	600 μL
3,4 mM Guajacol	600 μL

Auswertungen Aktivitätsbestimmung

Die Aktivitätsmessungen wurden im UV-Vis-Modus am Photometer (Molecular Devices) gemessen und mit dem Programm SoftMaxPro 4.6 (Molecular Devices) bearbeitet. Die Messwerte wurden in „Rates“ in der Einheit [MilliOD] angegeben. Die Umrechnung der Messwerte in Mikrokatal [μkat] erfolgte mittels Gleichung für den spezifischen Faktor (F):

$$F = V * 1000 / v * t * p * \epsilon \quad [\mu\text{kat}]$$

(V = Endvolumen des Tests in μL , v = Probenvolumen im Test in μL , t = Zeit in s (rates/min = 60 s), p = Schichtdicke in cm, ϵ = Extinktionskoeffizient in $\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

Aus den oben erhaltenen Werten (Rates) für die Enzymmenge aus der Messung wird zunächst die Volumenaktivität (VA) berechnet:

$$\mathbf{VA} = \text{Rates} * F \quad [\mu\text{kat/mL}]$$

Die Volumenaktivität gibt die Enzymaktivität in einem bestimmten Volumen an.

Um die Aktivitäten mehrerer Proben miteinander vergleichen zu können, berechnet man aus der Volumenaktivität die spezifische Aktivität (SpA), die sich auf den Proteingehalt der Probe und somit auf die Menge an tatsächlich vorhandenem Enzym bezieht. Die spezifische Aktivität beschreibt die Enzymaktivität in $[\mu\text{kat/mg Protein}]$:

$$\mathbf{SpA} = \text{VA} / \text{Proteinkonzentration der Probe} [\mu\text{kat/mg}]$$

Zusätzlich berechnet man die Frischgewichtaktivität (FgA), die sich auf die eingewogene Menge an Pflanzenmaterial bezieht:

$$\mathbf{FgA} = \text{VA} * (3,5 / \text{Frischgewicht}) \quad [\mu\text{kat/g}]$$

Der Faktor 3,5 ergibt sich aus der Verdünnung der Probe während der Entsalzung im Anschluss an die Ammoniumsulfatfällung (PD10 Säulen). Die Elution des Proteins erfolgte dort mit 3,5 mL Puffer (vgl. Entsalzung).

Temperaturoptima - Bestimmung der Aktivierungsenergie

Verwendet wurden hierzu Blattproben von *Phragmites australis* aus Mörlbach der Monate Juli, August und September 2005. Nach der Extraktion der Enzyme (SCHRÖDER ET AL., 2005) wurde die Proteinkonzentration nach BRADFORD (1976) bestimmt und die spezifische Aktivität der GSTs mit dem Substrat CDNB bei zunehmender Temperatur (von 5-90°C) gemessen. Aus der Temperaturabhängigkeit einer Enzymreaktion kann nach DIXON&WEBB (1964) die Aktivierungsenergie E_A berechnet werden.

Für die Anfangsgeschwindigkeit V einer Enzymreaktion gilt:

$$V = - d[S] * [dt]^{-1} = + d[P] * [dt]^{-1} = k [ES]$$

(V = Anfangsgeschwindigkeit, S = Substrat, P = Produkt, t = Zeit, k = Geschwindigkeitskonstante, ES = Enzym-Substrat-Komplex)

Arbeitet man bei Substratsättigung, kann die Konzentration an Enzym E gleich der Konzentration an Enzym-Substrat-Komplex ES gesetzt werden: $[E] = [ES]$. Unter diesen Voraussetzungen gilt für eine vorgegebene Enzymmenge:

$$V = K = d[P] * [dt]^{-1}$$

Die Geschwindigkeitskonstanten K lassen sich somit für die untersuchten Enzyme in $[nmol \text{ Produkt} * \text{min}^{-1}]$ angeben. Nach Arrhenius besteht zwischen K und der absoluten Temperatur T der folgende Zusammenhang:

$$d[\ln K] * [dt]^{-1} = E_A * (R * T^2)^{-1}$$

(R = allg. Gaskonstante ($8,3143 \text{ Joule} * \text{Grad}^{-1} * \text{Mol}^{-1}$))

Durch Integrieren der Gleichung erhält man dann:

$$\log K = - E_A * (2,303 * R * T)^{-1} + \text{Konstante}$$

Nach der Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten im ansteigenden Bereich des Temperaturverlaufs werden diese als $\log K$ gegen die Reaktionstemperatur in $[^{\circ}K]$ aufgetragen. Die Steigung der Geraden S definiert sich somit folgendermaßen:

$$S = - E_A * (2,303 * R)^{-1} \quad [J * \text{Mol}^{-1}]$$

Zur Berechnung der Aktivierungsenergie (E_A) ergibt sich daraus:

$$- E_A = S * 2,303 * R \quad [J * \text{Mol}^{-1}]$$

Analgetika und *Phragmites australis*

Abbaustudien Ibuprofen Diclofenac und Paracetamol

Die Abbaubarkeit von Pharmazeutika durch *Phragmites australis* wurde im Labor des GSF-Forschungszentrums mit Hilfe der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) untersucht. Es wurden Pflanzenproben, die direkt aus dem Pflanzenfilter aus Mörlbach stammen, verwendet und deren Abbauverhalten von Schmerzmitteln untersucht. Rhizomstücke der Schilfpflanzen wurden in Probelösungen der Medikamente inkubiert und die Wirkstoffkonzentration in den Probelösungen anschließend mit Hilfe der HPLC analysiert. Untersucht wurden die Analgetika Ibuprofen, Paracetamol und Diclofenac, die häufig in häuslichen Abwässern vorkommen (TERNES, 2000; JONES ET AL., 2005).

Aus verschiedenen Konzentrationen der Analgetika wurden Kalibrationsgeraden generiert (vgl. Abb. 14, Abb. 16 und Abb. 18). Zur Inkubation wurde dann jeweils Konzentrationen ausgewählt, die im Bereich der Gerade liegen (MEYER, 2004).

Die Schmerzmittel als Reinstoffe sind schwer in Wasser löslich und wurden deshalb zuvor in jeweils 1 mL 95% Ethanol (Merck) gelöst und erst anschließend mit Leitungswasser in die entsprechende Konzentration gebracht. Davon wurden je 20 mL in zwei Proberöhrchen (Falcon) gegeben. Ein drittes Röhrchen beinhaltete als Nullprobe nur Leitungswasser (vgl. Tab. 10, Tab. 11 und Tab. 12). Daraufhin wurden drei gleichartige, von Biofilmen gereinigte, jeweils 1g schwere, *Phragmites australis*-Rhizomstücke genommen und in die Falconröhrchen mit der Inkubationslösung gelegt. Leitungswasser wurde verwendet, um bei den Pflanzen keinen Stress durch entionisiertes Wasser hervorzurufen und natürliche Bedingungen zu schaffen. Aus den Ansätzen in den Falconröhrchen wurde bei allen Versuchen zu Beginn (0h), nach 1h, 6h, 9h und 24h jeweils eine Probe (500 µL) gezogen. Für die Abbauersuche wurde die HPLC ProStar 215 (Varian) mit dem UV-Detektor SP-4 (Gynkotek) verwendet.

Ibuprofen

Ibuprofen ist ein nichtsteroidales Antirheumatikum, das zur Behandlung von Schmerzen, Entzündungen und Fieber eingesetzt wird. Chemisch gehört es in die Gruppe der Arylpropionsäuren (vgl. Abb. 13). Verwendet wurde Ibuprofen (Sigma) in einer Konzentration von 0,1 mM.

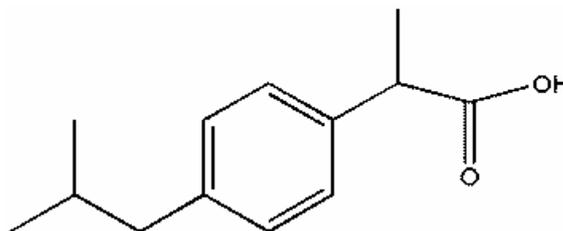


Abb. 13: Strukturformel Ibuprofen (Bild aus: <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Ibuprofen-2D-skeletal.png>).

Tab. 10: Ansätze für Ibuprofen-Abbau-Versuch

Probe	Befüllung jeweils 20 mL
P1	Rhizomstück <i>Phragmites australis</i> in Leitungswasser
P2	0,1 mM Ibuprofen-Lösung ohne Rhizom
P3	0,1 mM Ibuprofen-Lösung mit Rhizom <i>Phragmites australis</i>

Von den Ibuprofen-Ansätzen (Tab. 10) wurden nach den jeweiligen Inkubationszeiten (0-24h) jeweils 500 μ L entnommen und davon 10 μ L in die HPLC-Anlage injiziert. Die Ibuprofen-Konzentration wurde bei 233 nm detektiert. Zum Einsatz kamen eine Hypersil ODS-Säule (C18, 250 mm x 4,6 mm, Supelco) als stationäre Phase und ein Acetonitril/Kaliumhydrogenphosphat-Puffer (60 % Acetonitril, 40 % Kaliumhydrogenphosphat, Sigma-Aldrich, Merck) als mobile Phase. Die Flussrate betrug 1 mL/min, isokratisch.

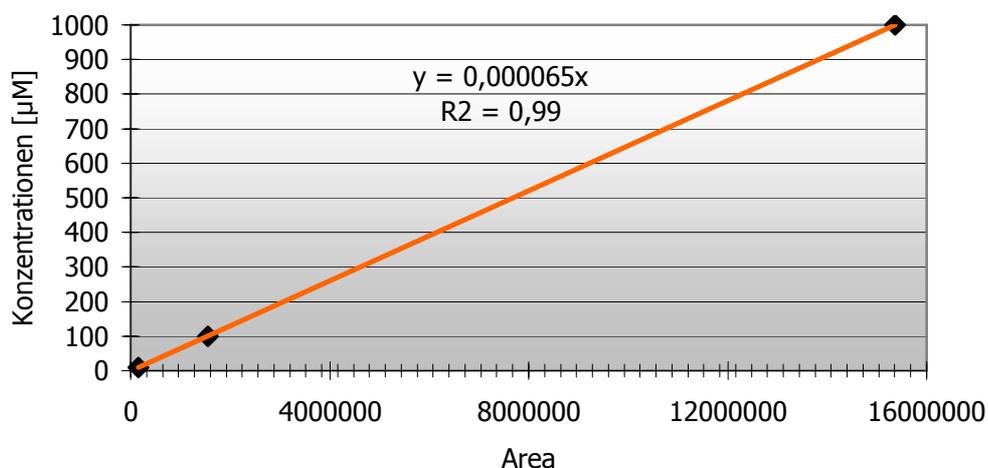


Abb. 14: Kalibriergerade Ibuprofen, erhalten aus den Messungen mit den Konzentrationen 10 μ M, 100 μ M und 1000 μ M.

Diclofenac

Diclofenac ist ein wichtiges nichtsteroidales, schmerzlinderndes (analgetisches) Mittel, das in zahlreichen Handelspräparaten enthalten ist (z.B. in Voltaren, Allvoran, Monoflam) (<http://www.omikron-online.de>, 2006).

Verwendet wurde das Natriumsalz (vgl. Abb. 15) des Analgetikums Diclofenac (Sigma) in einer Konzentration von 0,1 mM.

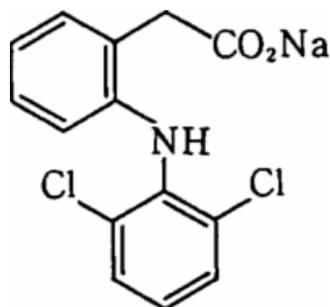


Abb. 15: Strukturformel Diclofenac-Natrium (aus: <http://images.google.de/images?q=tbn:ifjkKu39XOnfxM:http://www.novartis.co.jp/product/vol/img/vsr04.gif>).

Tab. 11: Ansätze für Diclofenac-Abbau-Versuch

Probe	Befüllung jeweils 20 mL
P1	Rhizomstück <i>Phragmites australis</i> in Leitungswasser
P2	0,1 mM Diclofenac-Lösung ohne Rhizom
P3	0,1 mM Diclofenac-Lösung mit Rhizom <i>Phragmites australis</i>

Von den Diclofenac-Proben (Tab. 11) wurden ebenfalls nach den Inkubationszeiten jeweils 500 µL-Proben entnommen und 10 µL in die HPLC-Anlage injiziert. Die Konzentration wurde bei 272 nm gemessen. Verwendet wurde eine Hypersil ODS-Säule (C18, 250 mm x 4,0 mm, Supelco) als stationäre Phase und ein Acetonitril/Natriumacetat-Puffer (60% Acetonitril, 40% Natriumacetat, Sigma-Aldrich) als mobile Phase, mit einer Flussrate von 1 mL/min, isokratisch.

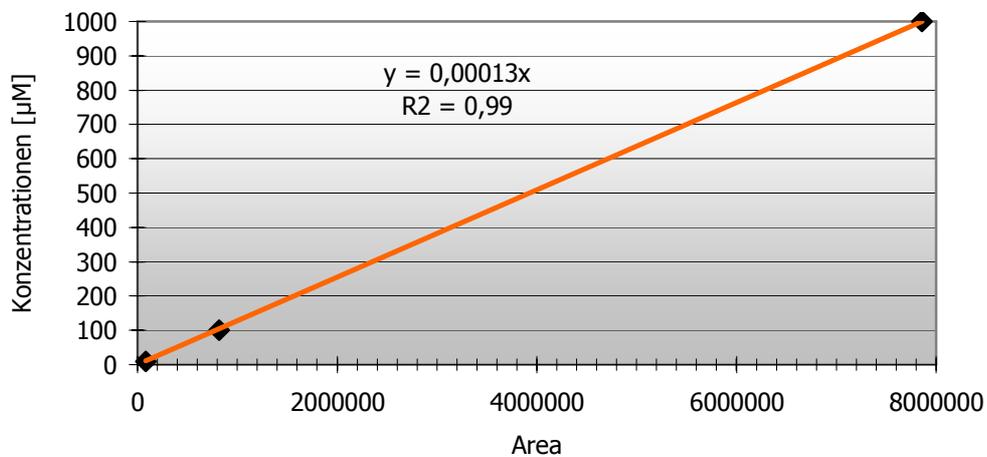


Abb. 16: Kalibriergerade Diclofenac-Natrium, erhalten aus den Messungen mit den Konzentrationen 10 µM, 100 µM und 1000 µM.

Paracetamol

Paracetamol ist ein Acetanilid und gehört in die Gruppe der Nichtopioid-Analgetika (vgl. Abb. 17). Es ist als Schmerzmittel (Analgetikum) in deutschsprachigen Ländern von mehreren Herstellern unter vielen Markennamen erhältlich (z.B. ben-u-ron, Paracetamol-Hexal). Für diesen Versuch wurde das hochreine Medikament (Merck) in der Konzentration 0,01 mM verwendet.

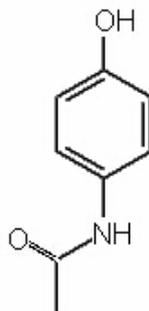


Abb. 17: Strukturformel Paracetamol (aus: <http://www.strukturformeleditor.de/Paracetamol.jpg>).

Tab. 12: Ansätze für Paracetamol

Probe	Befüllung jeweils 20 mL
P1	Rhizomstück <i>Phragmites australis</i> in Leitungswasser
P2	0,01 mM Paracetamol-Lösung ohne Rhizom
P3	0,01 mM Paracetamol-Lösung mit Rhizom <i>Phragmites australis</i>

Nach den Inkubationszeiten (0-24h) wurden von den Paracetamol-Ansätzen (Tab. 12) jeweils ein 500 μ L-Aliquot entnommen und davon je 10 μ L in die HPLC-Anlage injiziert. Die Paracetamol-Konzentrationen wurden bei 250nm detektiert. Verwendet wurde eine Hypersil ODS-Säule (C18, 250 mm x 4,0 mm, Supelco) als stationäre Phase und eine Essigsäure/Methanol-Lösung (85% Essigsäure (1%), 15% Methanol, Sigma-Aldrich, Merck), als mobile Phase. Die Flussrate betrug dabei 1 mL/min, isokratisch.

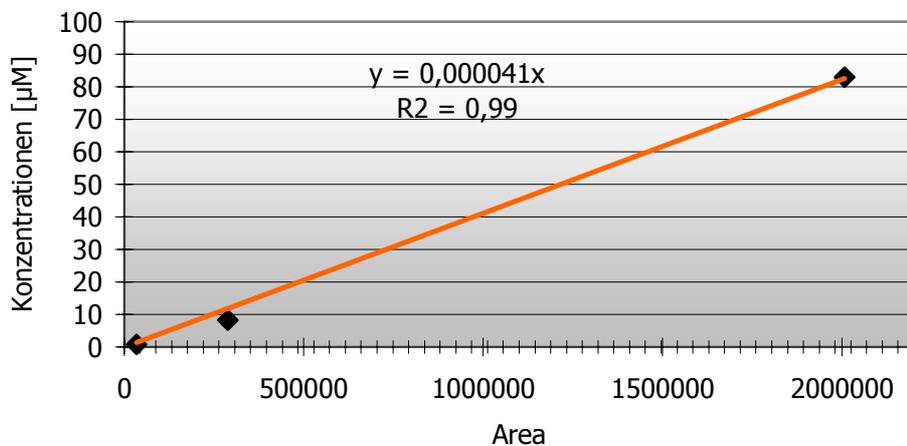


Abb. 18: Kalibriergerade Paracetamol, erhalten aus den Messungen mit den Konzentrationen 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M.

Spezifische Aktivitäten bei Ibuprofen- und Diclofenac-Proben

Bei den beiden Rhizomproben aus dem Abbauersuch von Ibuprofen und Diclofenac, wurden abschließend auch die spezifischen Aktivitäten bei den GSTs und POX bestimmt und im Vergleich zu den Kontrollen dargestellt.

Die Aufarbeitung des pflanzlichen Probenmaterials, die anschließende Enzymaktivitätsbestimmung mit dem Substrat CDNB und die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte wie bereits bei den Entgiftungsenzymen in Material&Methoden beschrieben.

Untersuchungen zur Aufnahme und Metabolisierung von Paracetamol in *Phragmites australis*

Aufgrund der deutlichen Abnahme der Konzentration des Analgetikums Paracetamol in der Inkubationslösung in Anwesenheit von Rhizomstücken der Schilfpflanze, stellte sich die Frage, ob es sich dabei lediglich um einen Abbau im Wasser handelt, oder ob das Medikament in das Rhizom aufgenommen und metabolisiert wird.

Um über diesen Sachverhalt genaueren Aufschluss zu erhalten, wurde das 1g schwere Rhizomstück von *Phragmites australis* aus Mörlbach, das 24h in der 0,01mM Paracetamolösung inkubierte, aufgearbeitet und auf Paracetamol und seine Metaboliten untersucht. Diese Untersuchung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Robert May (Medizinisches Labor Dr.Tiller&Kollegen, München) mittels HPLC durchgeführt.

Zur Aufarbeitung wurde das Rhizom unter Flüssigstickstoff mit Mörser und Pistill pulverisiert (vgl. SCHRÖDER ET AL., 2005). Aufgenommen wurde das Pflanzenmaterial in 10% Ethanol in H₂O (v/v) und gut durchmischt. Mit dem UltraTurrax (IKA) wurde die Probe nochmals zerkleinert. Anschließend wurde 20min bei 20000xg und 4°C zentrifugiert (Kühlzentrifuge JA21, Beckman/Coulter). Der Überstand wurde durch Miracloth (Calbiochem) filtriert und schließlich tiefgefroren.

Im Labor wurde ein 25µL-Aliquot des aufgetauten Rhizom-Extrakts entnommen und in eine HPLC (Dionex) zur Paracetamolanalytik eingespritzt. Detektiert wurde mit UV-Vis (Gynkotek) bei 250nm. Ausgewertet wurde mit dem Programm Chromeleon 6.8 (Dionex).

Ibuprofen-und Safner-Experimente im Hinblick auf GSTs

Ibuprofen-Experiment

In diesem Versuch wurden *Phragmites australis*-Pflanzen aus Mörlbach und von BioPlanta mit einer Lösung des Schmerzmittels Ibuprofen (Sigma) in einer Konzentration von 100mM besprüht. Zur besseren Applikation und Aufnahme in die Pflanze wurde der Lösung eine geringe Menge Detergens (Tween20, 0,1%, Sigma)

zugegeben und die ganze Pflanze tropfnass gesprüht, mit etwa 5 mL Lösung je Pflanze. Die Anwendung wurde nach 1 h wiederholt. Die Experimente wurden mit Nullprobe und in dreifacher Wiederholung durchgeführt.

Die Aufarbeitung des pflanzlichen Probenmaterials und die anschließende Enzymaktivitätsbestimmung mit dem Substrat CDNB aller Safener- und Ibuprofen-Experimente erfolgte wie bereits bei den Entgiftungsenzymen in Material&Methoden beschrieben. Beim Ibuprofen-Experiment wurde die Aktivitätsbestimmung zudem mit den Substraten DCNB und pNBoC durchgeführt.

Blatt-Induktionsversuch

Beim Blatt-Induktionsversuch wurden *Phragmites australis*-Pflanzen aus Mörlbach verwendet, die im Gewächshaus des GSF-Forschungszentrums angezogen wurden.

Es wurden dabei die Safener Benoxacor (Sigma), Cloquintocet-mexyl und Naphthylelessigsäure (NAA, beides Fluka) in der Konzentration von 100 mM verwendet. Benoxacor ist ein Safener bei Mais, Cloquintocet-mexyl wird bei Weizen und NAA wird bei Hirse eingesetzt (HOCK ET AL., 1995). Von den Safenern wurden Lösungen hergestellt (je 100 mM) und davon 20 mL in Falconröhrchen gefüllt. Dort hinein wurden 20 frisch geschnittene Blätter von *Phragmites australis* gegeben. Um Verdunstung der Safener-Lösungen zu vermeiden, wurden die Röhrchen mit Parafilm abgedichtet. Nach 24 h wurden die Blätter entfernt, aufgearbeitet und auf Proteingehalt und spezifischen Aktivität gegenüber GSTs untersucht.

Die Blatt-Induktionsversuche wurden mit Nullprobe und in dreimaliger Wiederholung durchgeführt.

Safener-Induktionsversuch 1

Im Safener-Induktionsversuch 1 wurden ganze *Phragmites australis*-Pflanzen aus Mörlbach verwendet. Die vom Filter entnommenen Pflanzen wurden in 11er Töpfen vorkultiviert und mit dem Herbizid Metolachlor oder dem Safener Benoxacor (beide Sigma) besprüht. Weitere Pflanzen erhielten eine Blockbehandlung aus dem Safener Benoxacor und 72 h später mit dem Herbizid Metolachlor. Die Konzentrationen der applizierten Spritzlösungen betragen 100 mM.

Safener-Induktionsversuch 2

Im Anschluss an den Safener-Induktionsversuch 1 wurden beim Safener-Induktionsversuch 2 mit ganzen *Phragmites australis*-Pflanzen von BioPlanta gearbeitet. Die Pflanzen wurden mit den Safenern Benoxacor (Sigma), Fenclorim (Fluka) und Fenchlorazol-ethyl (Ehrendorfer) in den Konzentrationen 100 mM besprüht. Die Safener Fenclorim und Fenchlorazol-ethyl werden bei Reis bzw. Weizen eingesetzt (HOCK ET AL., 1995).

Bei beiden Safener-Induktionversuchen 1 + 2 wurde ebenfalls zur besseren Applikation und Aufnahme in die Pflanze allen Spritzlösungen eine geringe Menge Detergens (Tween 20, 0,1%, Sigma) zugegeben und die ganze Pflanze und das Substrat tropfnass besprüht, was in etwa einer Lösung von 5 mL je Pflanze entspricht. Die Anwendung wurde nach 1 h wiederholt. Die Safener-Experimente wurden mit Nullprobe und in dreifacher Wiederholung durchgeführt.

Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie diene der weiteren spezifischen Trennung des Enzymgemisches im Rohextrakt. Sie beruht auf der Affinität des zu trennenden Enzyms zur Matrix des Säulenmaterials. Das Säulenmaterial besteht aus Agarose, an die über so genannte Spacermoleküle Glutathion gebunden ist. Glutathionabhängige Enzyme, nach denen im vorliegenden Fall gesucht wird, können so spezifisch an diese Matrix binden. Die Elution der Enzyme erfolgt in mehreren Fraktionen mit steigender GSH-Konzentration im Elutionspuffer (25 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,8). Bei zunehmender Konzentration von GSH kommt es an der Säulenmatrix zu Verdrängungsreaktionen wobei spezifisch gebundenen Enzyme nach und nach eluiert und in einzelnen Fraktionen (1 mL) gesammelt werden.

Für die Affinitätschromatographie wurde das Säulenmaterial GSH-Agarose (Fluka) verwendet, da sich bereits in früheren Arbeiten gezeigt hatte, dass dieses Säulenmaterial bei *Phragmites australis* geeignet ist (MAIER, 2004).

Zum Equilibrieren der Säule wurde die Matrix mit 20 ml 25 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,8 gespült. Daraufhin wurde 1 mL des entsalzten Proteinrohextrakts (Benoxacor-Rhizomprobe und Kontrolle) auf die Säule gegeben und bei geschlossener Säule 15 min

bei Raumtemperatur inkubiert, um eine ausreichende Bindung der Enzyme an die Liganden zu gewährleisten.

Die Elution erfolgte nach folgendem Gradienten (Tab. 13):

Tab. 13: Gradienten für die Elution bei Affinitätschromatographie

Fraktion	Konzentration NaCl [M]	Konzentration GSH [mM]
1-10	0	0
11-12	0,1	1
13-14	0,15	2
15-16	0,2	4
17-18	0,25	8
19-20	0,3	16
21-22	0,3	0
23-27	0,5	0

Die aufgefängenen 1 mL-Fraktionen wurden einzeln gesammelt und bei -80°C gelagert. Zur Beurteilung der Trennleistung wurde in allen Fraktionen der Proteingehalt nach (BRADFORD, 1974) und die spezifische GST-Aktivität für das Substrat CDNB bestimmt. Nach der Affinitätschromatographie sollen die Proben entsalzt werden, bevor sie in der Gelelektrophorese aufgetrennt werden.

Dies erfolgte über PD10-Gelfiltrationssäulen mit Sephadex G-25-Material (GE Healthcare), wie bereits im Kapitel Aufschluss des Pflanzenmaterials in Material& Methoden beschrieben.

2D-Gelelektrophorese

Aufgetragen wurden Proben nach Affinitätschromatographie der *Phragmites australis*-Rhizome aus dem Safener-Induktionversuch 2 (Benoxacor-Behandlung, 72 h).

Erste Dimension - Auftrennen nach dem Isoelektrischen Punkt

Tab. 14: Rehydratisierungspuffer

Rehydratisierungspuffer	
Urea (8M)	9,6g
CHAPS (2%)	0,4g
EDTA-Na ₄ (0,5M)	100µL
EGTA (0,5M)	100µL
H ₂ O dd	ad 20mL
Bromphenolblau (0,5%)	200µL
IPG Buffer	100µL

Die Probe (5µL) wurde mit 120µL Rehydratisierungspuffer (Tab. 14) gemischt, 125µL Gesamtansatz. Der Probenansatz wurde auf den für die erste Dimension benötigten IPGDryStrip pH 3-10 (Amersham) pipettiert. Die Inkubation erfolgte 10h bei Raumtemperatur in einem mit CoverFluid bedeckten Keramikschieffchen (Amersham). Anschließend wurde der IPGDryStrip auf der IPGphor (Amersham) mit folgendem Programm isoelektrisch fokussiert (Tab. 15):

Tab. 15: Programm IPGphor

Programm IPGphor		50µA/Strip bei 20°C	
1	Gradient	500V	30 min
2	Gradient	1000V	30 min
3	Step&Hold	5000V	100 min

Zweite Dimension - Auftrennen nach Molekulargewicht

Zur Herstellung des Acrylamid-Gels wurden Wasser, Lower Gel Buffer und Acrylamid (Tab. 16) nacheinander in ein Becherglas pipettiert und der Ansatz ca. 15min im Exsikkator entgast. Danach wurden Ammoniumpersulfat (APS, Pharmacia) und Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED, Sigma), die die Vernetzung starten, zugeben und sofort mit Hilfe einer Pumpe (Gilson) blasenfrei in die Gelkammer (Hoefer) gepumpt, mit Butanol (Sigma) überschichtet und für mindestens 2h auspolymerisiert.

Tab. 16: Ansatz Acrylamidgel

12 % iges Acrylamidgel		SDS Lower Gel Buffer	
H ₂ O dd	18mL	1,5M Tris pH8,8	480mL
SDS Lower Gel Buffer	10mL	10 % SDS-Stocklösung	20mL
Acrylamid : Bis 40 % (w/v)	12mL		
APS 10 %, (w/v)	400µL		
TEMED	20µL		

Zur Auftrennung nach Molekulargewicht wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer (Hoefer) gestellt. Der IPGDryStrip wurde mit den Equilibrierlösungen B1 und B2 (vgl. Tab. 17) 15 min auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde er kurz in SDS-Laufpuffer (Tab. 19) getaucht und an der oberen Kante des Gels platziert. Auf einer Seite des Gels wurden 5µL Marker (Fermentas) auf einem Stück Filterpapier eingebracht. Das Gel wurde mit flüssiger Agarose (0,5 %, ca. 60 °C) blasenfrei überschichtet, die Kammer mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt, verschlossen und bei 200V, 200mA und 300W ca. 2h getrennt. Nach der Auftrennung wurde das Gel in Fixierlösung 1 (Tab. 20) gegeben.

Tab. 17: Stammlösung A für Inkubationen

Stammlösung A	
1 M Tris pH6,8	2mL
80 % Glycerin	12mL
Harnstoff	14,4g
20 % SDS-Lösung	4mL
H ₂ O dd	ad 40mL

Tab. 18: Inkubationslösungen B1+2 aus Stammlösung A

Lösung B 1		Lösung B 2	
Stammlösung A	20mL	Stammlösung A	20mL
DTE	0,4g	Iodacetamid	0,5g
		Bromphenolblau (0,5 %)	70µL

Tab. 19: SDS-Laufpuffer

10 x SDS-Laufpuffer	
SDS (1 %)	10g
Tris (0,25 M)	30g
Glycin (1,92 M)	144g
H ₂ O dd	ad 1L

Das Gel inkubierte 60 min in Fixierlösung 1 (Tab. 20) auf dem Schüttler. Anschließend wurde es 3x20 min mit Fixierlösung 2 (Tab. 20) gespült, 1 min in die Sensitizerlösung (Tab. 21) gelegt und anschließend 2x mit Wasser gespült. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit Silbernitratlösung (Tab. 21), wobei das Gel im Dunklen 20 min auf dem Schüttler inkubierte und anschließend 2x mit Wasser gespült wurde. Das Gel wurde danach in die Entwicklerlösung (Tab. 22) gelegt und inkubierte so lange bis sich Banden zeigten. Zum Beenden der Entwicklung wurde das Gel in die Stopplösung (Tab. 22) gegeben. Die Lagerung des Gels erfolgte in Wasser mit 10 % Glycerinanteil.

Tab. 20: Fixierlösungen

Fixierlösung 1		Fixierlösung 2	
H ₂ O dd	40 mL	H ₂ O dd	210 mL
100 % EtOH	50 mL	100 % EtOH	90 mL
Eisessig	10 mL		

Tab. 21: Sensitizer und Silbernitratlösung

Sensitizer		Silbernitratlösung	
H ₂ O dd	100 mL	H ₂ O dd	100 mL
200 mM Natriumthiosulfat	400 µL	Silbernitrat	0,2 g
		37 % Formaldehyd	54 µL

Tab. 22: Entwickler und Stopplösung

Entwickler		Stopplösung	
H ₂ O dd	100 mL	H ₂ O dd	95 mL
Natriumcarbonat	6 g	Eisessig	5 mL
200 mM Natriumthiosulfat	10 µL		
37 % Formaldehyd	54 µL		

Western Blots

Für die Western Blots wurden die Proben aus sämtlichen Safener-Versuchen mit *Phragmites australis*, sowohl mit Pflanzen aus Mörlbach als auch von BioPlanta, verwendet.

Proteine wurden aus dem zu untersuchenden Pflanzenmaterial extrahiert (SCHRÖDER ET AL., 2005), der Proteingehalt nach der Methode von BRADFORD (1976) bestimmt, denaturiert und durch SDS-PAGE nach Größe aufgetrennt.

Gelherstellung

Zur Gelherstellung wurde das ReadyGelSystem (BioRad) verwendet. Das Gel besteht aus einer unteren und einer oberen Gelzone (Tab. 23), die übereinander in die Glaskammer (ca. 8,6x6,8cm) eingegossen wurden.

Tab. 23: Ansatz SDS-PAGE

SDS-PAGE, untere Zone		SDS-PAGE, obere Zone	
H ₂ O dd	4,2mL	StackingBuffer (Sigma)	9mL
ResolvingBuffer (Sigma)	2,5mL	Acrylamid : Bis 40% (w/v)	1,0mL
Acrylamid : Bis 40% (w/v)	3,2mL	APS (0,1g/mL)	100µL
APS (0,1g/mL)	100µL		

Die untere Gelzone wurde bis ca. 1cm unter die Glaskante gegossen, mit Butanol überschichtet und zum Auspolymerisieren ca. 1h stehen gelassen. Anschließend wurde die obere auf die untere Zone aufgetragen und ein Kamm, entsprechend der Anzahl der benötigten Slots, eingesetzt. Die aufzutragenden Proben (100µL + 5µL Farbstoff Bromphenolblau, Sigma) wurden in die Slots des Gels pipettiert. Das Gel wurde schließlich in die Gelkammer (BioRad) eingestellt, fixiert und mit gekühltem Transferpuffer (Tab. 24) befüllt. Die Auftrennung erfolgte 50min bei 200V.

Blotting

Das Gel wurde vor dem Blotten 15min in Transferpuffer (Tab. 24) gelegt. Für das Blotting wurde das Gel auf eine PVDF-Membran (ImmobilonP, Problott) gelegt und nach einem Blotting-Schema geschichtet (Tab. 24). Durch die angelegte Spannung

(100-200V, max. 400mA) und den dadurch hervorgerufenen Stromfluss wurden die in dem Gel aufgetrennten Proteine in einer speziellen Kammer (BioRad MiniSystem), gefüllt mit gekühltem TBS-Puffer (Tab. 24) auf die PVDF-Membran gezogen.



Abb. 19: „Blotting sandwich“; Schichtung der Komponenten für das Blotting-Verfahren; +/- Anschlüsse Kathode/Anode.

Hybridisierung

Nach dem Blotten wurde die Membran zunächst in TBS-Puffer (Tab. 24) gewaschen und anschließend 1 h in TBS/Milchpulverlösung (3%) auf dem Schüttler blockiert. Danach wurde die Membran in eine frische TBS/Milchpulverlösung (3%) gegeben, die den primären Antikörper (Anti-GST-Antikörper [Phi und Tau], Konzentrationen etwa 1/5000, Sigma) enthielt. Die Inkubation wurde über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die Membran gewaschen, 2x 20 min in TBST-Puffer (Tab. 25) und 1x 20 min in TBS-Puffer (Tab. 24). Danach wurde der sekundäre Antikörper (Anti-rabbitalkalinephosphataseconjugate, 1/20000, Sigma) in die TBS/Milchpulverlösung (3%) mit der Membran gegeben und auf dem Schüttler bei Raumtemperatur 1 h inkubiert. Anschließend wurde erneut mit TBST-Puffer und TBS Puffer gewaschen.

Tab. 24: Puffer Western Blots

Transferpuffer, pH8,4		TBS-Puffer, pH7,4	
H ₂ O dd	1 L	H ₂ O dd	1 L
Tris	1,93 g	Tris	1,21 g
Glycin	9,0 g	NaCl	8,77 g

Tab. 25: Puffer Western Blots

TBST-Puffer, pH 7,4		100mM Tris-Puffer, pH 9,5	
H ₂ O dd	1L	H ₂ O dd	1L
Tris	1,21 g	Tris	12,1 g
NaCl	8,77 g		
Triton X-100	1 mL		

Färbung

Nach dem Hybridisieren wurde die Membran in 100mM Tris-Puffer (Tab. 25) eingelegt und gespült. Die durch den Antikörper markierten Proteine wurden mit dem NBT/BCIP Colorimetric Substrate (Sigma) angefärbt und sichtbar gemacht. Die getrockneten Membranen wurden anschließend eingescannt und ausgewertet.

RNA Isolierung

Aus den Aktivitätsmessungen und den Western Blots war deutlich die Steigerung der GST-Expression nach Benoxacor-Applikation bei *Phragmites australis*-Pflanzen aus Mörlbach zu erkennen (vgl. Abb. 42 und 45). Deshalb wurde zur molekularbiologischen Untersuchung diese Pflanzenprobe verwendet und daraus die RNA isoliert. Durchgeführt wurde die Isolierung der RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen), das sich bei Pflanzen auf die Methode von HOECKER ET AL. (1999) stützt.

Tiefgefrorenes Pflanzenmaterial wurde in Flüssigstickstoff vorsichtig gemörsert, 100 mg abgewogen und in ein steriles 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden 450 µL RTL Buffer (Qiagen) dazugegeben und die Probe kräftig gevortext. Durch Inkubation des Probenröhrchens in einem Wasserbad bei 56 °C für ca. 3 min wurde der Zellaufschluss zusätzlich unterstützt. Das Lysat wurde anschließend in eine QIAshredder Spinsäule (Qiagen) pipettiert und 2 min bei 12000 xg zentrifugiert. Der Überstand der Durchflussfraktion wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen transferiert. Zum Überstand wurde das 0,5fache des Volumens an 95% Ethanol (Merck) dazugegeben und gemischt. Dieses Lysat wurde auf eine RNeasy Mini-Säule (Qiagen) aufgetragen und bei 8000 xg 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Auf die RNeasy Mini-Säule wurden 700 µL RW1 Buffer (Qiagen) pipettiert und 15 s bei 8000 xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut

verworfen. Anschließend wurde ein neues, RNase-freies Mikrozentrifugenröhrchen unter der RNeasyMini-Säule platziert und 500 µL RPEBuffer (Qiagen) auf die Säule pipettiert. Die Säule wurde zum Waschen für 15s bei 8000xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Der vorangegangene Schritt wurde wiederholt und erneut 500 µL RPEBuffer auf die Säule geben und zum Trocknen nun 2min bei 8000xg zentrifugiert. Das Mikrozentrifugenröhrchen samt Durchfluss wurde verworfen und die Säule zum Eluieren in ein neues, RNase-freies Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Es wurden danach 50 µL RNase-freies Wasser direkt auf die trockene Silicagel-Membran der RNeasyMini-Säule pipettiert und zentrifugiert, 1min bei 8000xg und Raumtemperatur. Die gereinigte RNA befindet sich nun in wässriger Lösung in dem Mikrozentrifugenröhrchen. Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde über eine photometrische Messung der Absorption im Eluat bei 260 nm bestimmt.

Die Reinheit und die Qualität der RNA wurde sowohl über das Verhältnis der Absorptionswerte von 260 nm zu 280 nm, als auch über eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid (Sigma) auf dem UV-Transilluminator überprüft (Gel Doc XR System, BioRad).

mRNA Isolierung

Die mRNA wurde aus der gewonnenen RNA mit Hilfe des Dynabeads mRNA Purification Kit (DynaL Biotech) isoliert nach einer Methode von AASHEIM ET AL. (1994). Bei den Dynabeads handelt es sich um superparamagnetische Perlen aus Polymeren mit einem Eisenoxidkern und kovalent an die Oberfläche gebundenen Oligo(dT)₂₅-Sequenzen (Durchmesser 2,8-5,0 µm). An diese Sequenzen hybridisieren die terminalen Poly(A)Sequenzen der mRNA-Moleküle. Wird ein Magnet angelegt, sammeln sich die beladenen Perlen aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften an der dem Magneten zugewandten Gefäßseite (RICHTER, 2003).

75 µg reine RNA wurden mit 10 mM Tris-Puffer (Tab. 26) auf ein Volumen von 100 µL gebracht. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend für 2 min im Wasserbad bei 65 °C erhitzt, um die RNA zu denaturieren. Die Probe wurde danach auf Eis abgekühlt. Währenddessen wurden von der Dynabeads Oligo(dT)₂₅ Stocklösung (DynaL Biotech) 200 µL entnommen und in ein neues, steriles Mikrozentrifugenröhrchen (1,5 mL) gegeben und in die Magnetvorrichtung Dynal MPC-S (DynaL Biotech) eingestellt. Nach

etwa 30s wurde der Überstand abgenommen, so dass nur noch die magnetisierten Dynabeads im Röhrchen übrig blieben. Diese wurden nach dem Herausnehmen aus dem Magneten 1x mit 100µL BindingBuffer (Tab. 26) gespült und wieder in den Magneten eingestellt. Nach 30s wurde der Überstand abpipettiert und das Röhrchen aus dem Magneten entfernt. Es wurden nochmals 100µL BindingBuffer zu den verbliebenen Dynabeads hinzugegeben und schließlich 100µL der Gesamt-RNA hinzupipettiert, gut gemischt und zur Inkubation 5min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur gegeben. Das Mikrozentrifugenröhrchen wurde erneut in den Magneten eingestellt. Der Überstand wurde abgenommen und die Dynabeads anschließend 2x mit 200µL WashingBuffer (Tab. 26) gespült. Zur abschließenden Elution wurden 10µL Tris-Puffer (Tab. 26) zu den verbleibenden Dynabeads gegeben und auf 65°C im Wasserbad erhitzt. Das Röhrchen wurde wieder im Magneten platziert und der Überstand mit der isolierten mRNA in ein neues RNase-freies Mikrozentrifugenröhrchen überführt und kühl aufbewahrt.

Die Konzentration der mRNA wurde am Photometer (ND-100, Nanodrop) bestimmt.

Tab. 26: Puffer zur mRNA-Isolierung (alle DynalBiotech)

10mM Tris-Puffer, pH 7,5		BindingBuffer		WashingBuffer	
H ₂ O dd	1L	Tris-HCl pH7,5	20mM	Tris-HCl, pH7,5	10mM
Tris	0,12g	LiCl	1,0M	LiCl	0,15mM
		EDTA	2mM	EDTA	1mM

cDNA-Herstellung

In Eukaryontenzellen liegt die gesuchte mRNA oft nur in sehr geringen Mengen vor. Durch Überschreibung der mRNA-Sequenzen, die nicht direkt klonierbar sind, in komplementäre cDNA-Sequenzen wird eine Amplifizierung möglich. Bringt man diese DNA-Sequenz mit Hilfe eines Plasmids als Vektor in ein Bakterium ein und vermehrt dieses zu einer aus dieser Zelle entstandenen Bakterienkolonie, erhält man identische DNA-Klone in großer Menge (RICHTER, 2003).

Aus der gewonnenen mRNA wurde mit Hilfe eines Og2-Primers (Promega) in einer PCR cDNA generiert. Dazu wurden 1µL mRNA mit 1µL Og2-Primer zusammen in ein neues, steriles Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert und 5min bei 60°C erhitzt. Danach

wurde die Probe auf Eis gekühlt, der Mastermix (alles Promega, vgl. Tab. 27) zugegeben und der Ansatz bei 37°C 90 min lang inkubiert. Es folgte eine Erhitzung im Wasserbad, 10 min bei 90°C, mit abschließender Abkühlung auf Eis.

Tab. 27: Mastermix PCR

Mastermix	
5x MMLV-Puffer	4 µL
RNasin	1 µL
dNTP Mix (10 mM)	2 µL
MMLV Transkriptase	1 µL

Damit war die Synthese der cDNA abgeschlossen und der Gesamtansatz von 10 µL konnte für PCRs (Polymerase Kettenreaktionen) verwendet werden.

Für die durchgeführten PCRs wurden Primer gegen Phi-, Tau- und Lambda-GSTs verwendet, um feststellen zu können, ob in dem verarbeiteten Pflanzenmaterial Sequenzen dieser Enzyme vorliegen. Durch PCRs mit distinkten Primern kann man die Regionen und die PCR-Produkte finden und vervielfältigen, die interessant erscheinen. Durch ein Auftragen auf ein Agarose-Gel mit Ethidiumbromid kann man die PCR-Produkte sichtbar machen, ausschneiden und weiter verwenden.

Die Primer wurden durch Vergleich mit anderen, bereits vorliegenden Gen-Sequenzen anderer Monokotyledonen, wie Mais oder Weizen, ausgesucht, die eine nahe Verwandtschaft zum Schilf haben. Hier wurde ausschließlich nach Primern für die Phi-, Tau- und Lambda-GSTs gesucht. Bei MWG Biotech wurden folgende Oligonukleotide bestellt und angefertigt:

Primer 1 für die PCR (vgl. Tab. 28):

F 1 (Phi-GST): 5'-AA (CT) CC5 TT(CT) GG5 (AC)A(AG) GT5 CC-3'
 L 1a (Lambda-GST): 5'-TG(CT) CC5 TT(CT) GC5 CA(AG) CG5 GC5 TGG-3'
 L 1b (Lambda-GST): 5'-TG(CT) CC5 TT(CT) GC5 CA(AG) AG(AG) GC5 TGG-3'
 U 1a (Tau-GST): 5'-AA(CT) CC5 AT(ACT) CA(CT) AA(AG) AA(AG) AT(ACT) CC5 GT-3'
 U 1b (Tau-GST): 5'-AA(CT) CC5 GT5 CA(CT) AA(AG) AA(AG) AT(ACT) CC5 GT-3'

Primer 2 (reverser Primer) für die PCR (vgl. Tab. 28):

F2 (Phi-GST): 5'-CCA CCA 5GC (CT)TT 5AC (AG)TG 5GG-3'

L2 (Lambda-GST): 5'-TA5 GC(CT) TC(AGT) AT(CT) TT(AG) TTC AT(CT) TC-3'

U2 (Tau-GST): 5'-GC5 AC(AG) TC5 AC(AG) AA5 CC-3'

Die Ansätze für die einzelnen PCRs waren immer gleich und variierten bei den wechselnden Primern 1 und 2 (Tab. 28).

Tab. 28: PCR-Ansatz

PCR-Ansatz		11 x PCR Puffer	
H ₂ O dd.	38,5 µL	2M Tris/HCl pH 8,8	200 µL
11x PCR-Puffer	4,5 µL	1 M Ammoniumsulfat	100 µL
Primer 1	2,5 µL	1 M MgCl ₂	20 µL
Primer 2	2,5 µL	67 mM 2-Mercaptoethanol	4 µL
cDNA	1 µL	10 mM EDTA	4 µL
Taq Polymerase	1 µL	100 mM dNTP Mix	72 µL
		BSA (10 mg/mL)	100 µL
		H ₂ O dest.	310 µL

PCR Amplifikation

Mit den unterschiedlichen sechs Ansätzen aus der Primerkombination (siehe oben) wurde jeweils eine PCR mit 30 Zyklen (d.h. die Schritte 2-4 werden dabei 30x wiederholt, vgl. Tab. 29) im Thermocycler (PCR Express, Hybaid) durchgeführt.

Tab. 29: Zyklusprogramm PCR

1	92 °C	2 min	Initiationsdenaturierung
2	92 °C	20 s	Denaturierung
3	50 °C	20 s	Annealing
4	72 °C	40 s	Extension

Zur Überprüfung der PCR wurden die PCR-Produkte in einem Agarose-Gel (1%) mit Ethidiumbromid 30 min bei 100V überprüft und unter UV-Licht fotografiert (GelDocXR System, BioRad).

Aus diesen sechs cDNA-Ansätzen wurden drei nach Bewertung der PCR-Produkte ausgewählt, die als Ausgangsmaterial für die Insertion in den Vektor dienten.

Klonierung von GST Sequenzen

Isolierung von DNA

Die Isolierung der DNA aus der Agarose wurde mit dem Prep-A-Gene DNA Purification Kit (BioRad) durchgeführt, nach einer Methode von WILLIS ET AL. (1990). Aus den Gelen (die Banden für GSTs zeigten) wurden diese Regionen unter dem UV-Transilluminator (BioRad) ausgeschnitten. Die ca. 1 g schweren Agarose-Stücke wurden in ein Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Zu einem Gramm Agarose wurden 1 mL Binding Buffer (BioRad) gegeben und der Ansatz bei 8000xg kurz zentrifugiert. Zur besseren Lösung wurde das Mikrozentrifugenröhrchen für einige Minuten in ein Wasserbad von ca. 40 °C gestellt. Anschließend wurden 20 µL Prep-A-Gene-Matrix (BioRad) dazugegeben, gut gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die an die Prep-A-Gene-Matrix gebundene DNA zu erhalten, wurde das Röhrchen 30 s zentrifugiert. Es bildete sich ein deutliches Matrix-Pellet. Der Überstand wurde abgenommen und die Matrix 2x mit 500 µL Wash Buffer (BioRad) gespült und zentrifugiert. Danach wurde zum Lösen der DNA von der Matrix das Pellet mit einem Pellet-Volumen Elution Buffer (BioRad) resuspendiert und 5 min bei 40 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene DNA wurde schließlich in 30 µL H₂O dest. aufgenommen und in ein sauberes Mikrozentrifugenröhrchen zur Aufbewahrung überführt.

Ligation und Transformation

Die DNA (PCR-Produkte) wurde mit Hilfe des pGEM-T Easy Vector System I (Promega) in den pGEM-T-Vektor (Promega) eingebracht. Zur Aufnahme von Fremd-DNA musste die zirkuläre Plasmid-DNA zunächst linearisiert werden und das Plasmid in kompetente Zellen eingebracht werden. Mit dem Ansatz, mit dem die DNA gemischt und inkubiert wurde (Tab. 30), wurde auch die Ligation vorgenommen. Das Plasmid konnte anschließend transformiert werden.

Tab. 30: Ansatz Ligation

Ansatz Ligation	
Ligationspuffer	5 μ L
pGEM-T Vektor	1 μ L
DNA (PCR Produkt)	1 μ L
T4 DNA Ligase	1 μ L
Steriles DEPC-H ₂ O	2 μ L

Die auf diese Weise entstandenen Plasmid-Vektoren wurden in kompetente Zellen (Top 10, Invitrogen) eingebracht. Dazu wurden je 50 μ L Zellsuspension mit 4 μ L Ligationsprodukt gemischt und 5 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde der Ansatz zur Hitzeschockbehandlung für 35s in ein 42 °C warmes Wasserbad getaucht, anschließend entnommen, für 1,5 min auf Eis gestellt und nach Hinzupipettieren von 450 μ L sterilem LB-Medium (Tab. 31) 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Tab. 31: LB-Medium und LB-Agar

LB-Medium		LB-Agar	
Pepton	10 g	Pepton	10 g
NaCl	10 g	NaCl	10 g
Hefe	5 g	Hefe	5 g
H ₂ O dest	ad 1 L	Agar	15 g
		H ₂ O dest	ad 1 L
		Ampicillin (100 mg/mL)	1 mL
		X-Gal (40 mg/mL)	1 mL
		1 M IPTG	1 mL

Aus den gewonnenen, transformierten Bakteriensuspensionen wurden je zwei Aliquots (50 und 450 μ L) entnommen und mit einem Drygalski-Spatel auf die LB-Agar-Platten (vgl. Tab. 31) ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Die gewachsenen, weißen Kolonien waren Klone der transformierten Zellen im Gegensatz zu den blauen Kolonien (vgl. Abb. 20). Die einzelnen, weißen Kolonien wurden gepickt und zur Vermehrung in LB-Medium (Tab. 31) über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert.

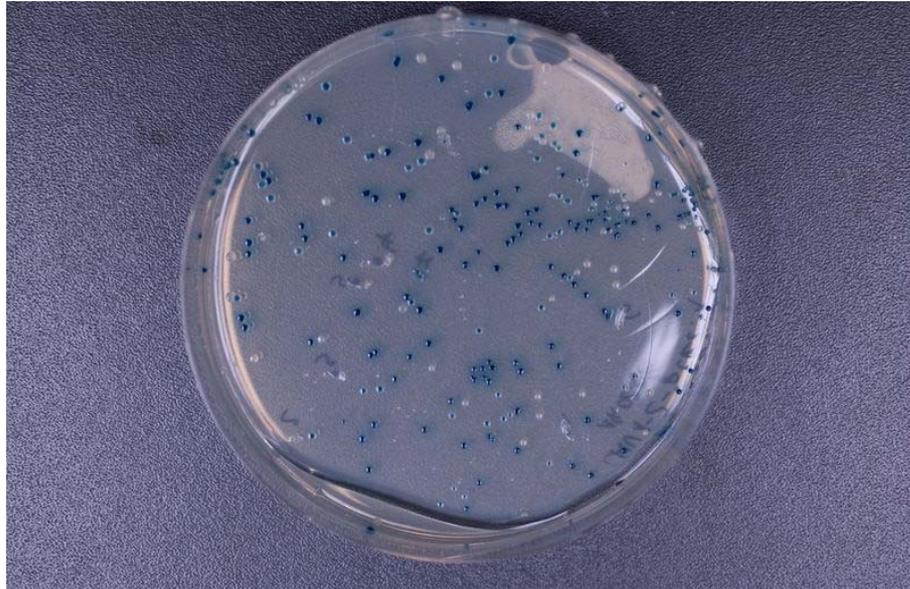


Abb. 20: Blau-Weiß-Screening nach einer Transformation (LB-Agar mit Ampicillin und X-Gal).

Isolierung der geklonten Sequenz

Die DNA wurde aus den Fläschchen mit LB-Medium, die über Nacht inkubierten, mit Hilfe des Wizard Plus SV Minipreps Purification System (Promega) isoliert, das auf eine Methode von AEHLE ET AL. (1993) aufbaut. Dazu wurde die Bakterienkultur aus den Mediumfläschchen abgenommen und 5 min bei 10 000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und das Pellet getrocknet, bevor es in 250 μ L Cell Resuspension Solution (Promega) aufgenommen und resuspendiert wurde. Das Lysat wurde vorsichtig gemischt und einige Minuten inkubiert. Nachdem sich das Lysat geklärt hatte, wurde 10 μ L Alkaline Protease Solution (Promega) zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Lysat wurden 350 μ L Wizard Plus SV Neutralization Solution (Promega) gegeben und gemischt. Das Bakterienlysat wurde anschließend bei 14 000xg 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand (850 μ L) wurde vorsichtig auf eine Spin Column (Promega) dekantiert und bei 14 000xg bei Raumtemperatur 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde aus dem Auffangröhrchen der Säule entnommen und verworfen. Die Säule wurde auf das Röhrchen aufgesetzt, mit 750 μ L Column Wash Solution (Promega) befüllt, bei 14 000xg 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der Waschschrift wurde mit 250 μ L Column Wash Solution wiederholt und 2 min bei 14 000xg zentrifugiert. Die gewaschene Säule wurde schließlich auf ein neues, steriles Mikrozentrifugenröhrchen aufgesetzt.

Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 100 µL nuklease-freiem Wasser auf die Säule durch Zentrifugation eluiert (14 000 xg, RT, 1 min). Die im Durchfluss enthaltene, im Wasser gelöste DNA konnte danach weiter verarbeitet werden.

Aus den 18 Ansätzen, je sechs Kolonien für Phi-, Lambda- und Tau-GSTs, wurden je zwei nach PCR und Bewertung des Laufs im Agarosegel ausgewählt und zur Sequenzierung in das DNA Sequence Service Center der Universität Durham geschickt.

cDNA-Bank aus *Phragmites australis*

Die cDNA und die darauf aufbauende cDNA-Bank wurde im vorliegenden Fall mit dem SMARTcDNA Library Construction Kit (Clontech) erhalten (vgl. GUBLER & HOFFMANN, 1983). SMART ist eine Abkürzung für „switching mechanism at 5'-end of poly(A)-RNA transcript“. Hierbei wird ein Oligonukleotid-Konstrukt (SMART III-Oligo, Clontech) mit hoher Effizienz an das 5'-Ende von Poly(A)-mRNAs gebunden. Dadurch wird als verlängertes Template ihre Übersetzung in voller nativer Länge ermöglicht. Man erhält so eine Population von ds-cDNAs, die zum überwiegenden Teil auf Poly(A)-mRNAs dieser nativen Länge zurückgeht. Im Gegensatz zu anderen Verfahren, die Oligo(dT)-Primer zur Erststrangsynthese verwenden, wird hier ein modifiziertes Primer-Konstrukt verwendet (CDS III), welches sich dort anlagert, wo Poly(A)-Sequenz und kodierende Sequenz verknüpft sind. So vermeidet dieses System die überflüssige reverse Transkription der unterschiedlich langen Poly(A)-Sequenzen (RICHTER, 2003). Ein weiterer Vorteil des SMART-Systems besteht in der Einbringung asymmetrischer Schnittstellen für das Restriktionsenzym Sfi I an den 5'- und 3'-Ende der cDNA, welche in eukaryotischer DNA sehr selten vorkommen. Die Synthese der ss-cDNA wird von Reverser Transkriptase katalysiert. Wenn diese, ausgehend vom Primer CDS III, das 5'-Ende der mRNA erreicht hat, wird ihre Terminal-Transferase aktiv und heftet weitere Nukleotide an das 3'-Ende des entstandenen cDNA-Stranges an. An diesen Überhang heftet sich der Primer SMART III-Oligo an und bildet nach Verknüpfung das Template am 5'-Ende der mRNA. Dieses Template wird nun von der Reversen Transkriptase benutzt, um den cDNA-Erststrang zu komplettieren. Die resultierende ss-cDNA entspricht der mRNA in voller Länge mit komplettem 5'-Ende und dem SMART III-Oligo komplementären Sequenzabschnitt. Dieser Abschnitt wiederum dient als universelle Primer-Bindungsstelle für nachfolgende Amplifizierungen.

Die benötigte cDNA wurde mit dem SMARTcDNA Library Construction Kit (Clontech) hergestellt aus der bereits vorliegenden mRNA (Benoxacor-Proben). Es wurde dabei ausschließlich mit den Reagenzien aus dem Kit (Clontech) gearbeitet. Das gesamte Verfahren zur Herstellung einer cDNA-Bank ist sehr aufwendig und gliedert sich in folgende Schritte: cDNA-Synthese, cDNA-Größenfraktionierung, Ligation cDNA/Vektor, Bestimmung des Titers der unamplifizierten cDNA-Bank, Amplifizieren der cDNA-Bank und Bestimmung des Titers der amplifizierten cDNA-Bank.

cDNA-Synthese

Zur Synthese wurden folgende Reagenzien in ein steriles 0,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen gegeben (Tab. 32):

Tab. 32: Ansatz 1 cDNA

RNA	1 μ L
SMART IV Oligonucleotide	1 μ L
CDSIII/3' PCR Primer	1 μ L
H ₂ O RNase-frei	2 μ L

Der Ansatz wurde gemischt und bei 72 °C für 2 min inkubiert, mit anschließender Kühlung auf Eis für ca. 2 min. Das Mikrozentrifugenröhrchen wurde daraufhin kurz zentrifugiert, um den Ansatz am Boden des Röhrchens zu vereinen. Danach folgte die Zugabe folgender Reagenzien (Tab. 33):

Tab. 33: Ansatz 2 cDNA

5x First-Strand BufferRNA	2 μ L
20 mM DTT	1 μ L
10 mM dNTP Mix	1 μ L
Power Script Reverse Transcriptase	1 μ L

Das Volumen des Gesamtansatzes beträgt 10 μ L (vgl. Tab. 32 und Tab. 33). Die Reagenzien wurden durch Pipettieren und kurzes Zentrifugieren sorgfältig gemischt, gefolgt von einer 1-stündigen Inkubation bei 42 °C im Wasserbad. Danach wurde auf Eis abkühlt. Lagerung des Zwischenprodukts ist bei -20 °C über längere Zeit möglich.

cDNA-Amplifikation durch LD-PCR

Zur Amplifikation der cDNA wurde die „Long distance PCR“ (LD PCR) verwendet. Dazu wurden folgende Komponenten in einem sterilen 0,5mL Mikrozentrifugenröhrchen vereint (Tab. 34):

Tab. 34: Ansatz für die PCR

First-Strand cDNA	2 μ L
H ₂ O RNase-frei	80 μ L
10x Advantage 2 PCR Buffer	10 μ L
50x dNTP Mix	2 μ L
5' PCR Primer	2 μ L
CDS III/3' PCR Primer	2 μ L
50x Advantage 2 Polymerase Mix	2 μ L

Der Ansatz von 100 μ L wurde vorsichtig gemischt und kurz zentrifugiert, um alle Reagenzien am Boden des Mikrozentrifugenröhrchens zu vereinen. Das Mikrozentrifugenröhrchen wurde anschließend in den Thermocycler (PCRExpress, Hybaid) eingestellt und mit folgendem Programm gefahren (Tab. 35):

Tab. 35: Zyklusprogramm der PCR

1	95 °C	1 min	Initiationsdenaturierung
2	95 °C	15 s	Denaturierung
3	68 °C	6 min	Annealing

Die Schritte 2 und 3 (Tab. 35) der PCR wurden dabei 20x wiederholt.

Der Erfolg der PCR wurde mit einer 5 μ L-Probe des entstandenen PCR-Produkts in einem Agarose-Gel überprüft.

Proteinase K-Verdau

Dazu wurden 50 μ L der amplifizierten ds-cDNA mit 2 μ L Proteinase K in ein steriles 0,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen gegeben, gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe bei 45 °C für 20 min inkubiert und erneut kurz zentrifugiert. Danach wurden 50 μ L RNase-freies Wasser und 100 μ L Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Sigma) im Verhältnis 25:24:1 hinzugegeben und 1-2 min gut durchmischt. Zur

Trennung der Phasen wurde 5min bei 14000xg zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde dann in ein neues, steriles 0,5mL Mikrozentrifugenröhrchen überführt, die Grenzschicht und die untere Phase wurden verworfen. Es wurden 100µL Chloroform/Isoamylalkohol (Sigma) im Verhältnis 24:1 zugegeben und für 1-2min gemischt und dann 5min bei 14000xg zentrifugiert. Erneut wurde die obere Phase in ein steriles 0,5mL Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Folgende Reagenzien wurden dann zugegeben (Tab. 36):

Tab. 36: Zugabe Proteinase K-Verdau

3M Natriumacetat	10µL
Glykogen (20µg/µL)	1,3µL
95% Ethanol	260µL

Der Ansatz wurde bei 14000xg und Raumtemperatur zentrifugiert zur Bildung eines Pellets. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 100µL 80% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und schließlich mit 79µL RNase-freiem Wasser resuspendiert (vgl. Tab. 37).

Sfi I-Verdau

Dazu wurden folgende Reagenzien in ein neues, steriles 0,5mL Mikrozentrifugenröhrchen gegeben (Tab. 37):

Tab. 37: Zugabe Sfi I-Verdau

cDNA	79µL
10x Sfi Buffer	10µL
Sfi I Enzym	10µL
100x BSA	1µL

Dieser 100µL-Ansatz wurde gut gemischt und bei 50°C für 2h inkubiert. Abschließend wurden 2µL einer 1% Xylen-Cyanol-Farbstofflösung (Sigma-Aldrich) dazugegeben.

cDNA-Größenfraktionierung

Die Größenfraktionierung der cDNA wurde mit Hilfe CHROMASPIN-400 Säulen (Clontech) durchgeführt. Dazu wurden 16 Mikrozentrifugenröhrchen (1,5 mL) in einem Rack angeordnet und nummeriert. Die CHROMASPIN-400 Säule wurde darüber befestigt und unten geöffnet. Der Fluss betrug ungefähr 1 Tropfen alle 40-60s. Es wurden 700 µL ColumnBuffer (Clontech) auf die Säulenmatrix gegeben und die Säule damit equilibriert. Anschließend wurden 100 µL der Sfi I-verdauten cDNA (mit dem Farbstoff) auf die Säule gegeben. Durch den Farbstoff konnte man den Verlauf der Proben in der Säule verfolgen. Sobald die cDNA-Lösung ganz in die Matrix einzogen war, wurden 100 µL ColumnBuffer auf die Matrix pipettiert. Nachdem der Puffer ganz in die Matrix eingezogen war, wurden die Mikrozentrifugenröhrchen unter der Säule platziert und mit 600 µL ColumnBuffer eluiert. Alle Tropfen (ca. 40 µL/Tropfen) wurden einzeln in den nummerierten Mikrozentrifugenröhrchen aufgefangen.

Etwa 3 µL jeder aufgefangenen Fraktion wurde für eine Elektrophorese in einem Agarose-Gel (1 %) verwendet. Unter UV-Licht (280 nm) konnte man einen Schmier bei denjenigen Fraktionen erkennen, die die cDNA enthielten. Die Fraktionen mit dem Schmier wurden gesammelt und weiterverwendet. Zu den gesammelten, vereinten cDNA-Fraktionen wurden folgende Reagenzien gegeben (Tab. 38):

Tab. 38: Zugabe Fraktionierung

3M Natriumacetat, pH 4,8	1/10 vol.
Glykogen (20 µg/µL)	1,3 µL
95 % Ethanol	2,5x vol.

Der Ansatz wurde durch kräftiges Schütteln gemischt und über Nacht bei -20 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Ansatz bei Raumtemperatur 20 min und 14000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und nochmals kurz zentrifugiert. Alle verbleibende Flüssigkeit wurde vorsichtig abpipettiert, das Pellet luftgetrocknet und die cDNA in 7 µL entionisiertem Wasser resuspendiert.

Vektor Ligation

Die Ligation (Tab. 39) der fertigen cDNA zum Vektor (λ TriplEx2, Clontech) wurde mit zwei unterschiedlichen cDNA-Verhältnissen durchgeführt:

Tab. 39: Ansätze Ligation

Ansätze Ligation	1	2
cDNA	0,5 μ L	1,5 μ L
Vektor (λ TriplEx2)	1,0 μ L	1,0 μ L
10xLigationBuffer	0,5 μ L	0,5 μ L
10 mM ATP	0,5 μ L	0,5 μ L
T4 DNA Ligase	0,5 μ L	0,5 μ L
DEPC-H ₂ O	2,0 μ L	2,0 μ L
Gesamtvolumen	5,0 μ L	6,0 μ L

Die beiden Ansätze mit dem Vektor inkubierten über Nacht bei 18°C. Für jeden Ansatz wurde eine eigene Reaktion zum Packen in die λ -Phagen durchgeführt. Dazu wurden Phagen aus dem GigaPack III Gold Packaging (Stratagene) verwendet, nach einer Methode von KRETZ ET AL. (1989). Aus der Lösung mit den Phagen wurden je 4 μ L abgenommen und zu den Ansätzen aus der Ligation (Tab. 39) gegeben und vorsichtig gemischt. Die Ansätze inkubierten daraufhin 2 h bei Raumtemperatur. Danach wurden je 500 μ L SM Buffer (Tab. 40) und 20 μ L Chloroform (Sigma) hinzugeben und erneut gemischt. Nach anschließender, kurzer Zentrifugation fanden sich die bepackten Phagen im Überstand der Lösung wieder und konnten abgenommen werden.

Um die Inserts zu finden, musste erneut eine Blau/Weiß-Selektion mit Hilfe von Bakterienkultur durchgeführt werden (vgl. Abb. 20). Dazu wurde das Bakterium „XLI Blue“ (Clontech) verwendet. Aus einer bestehenden Kultur wurde eine Kolonie gepickt und in ein SM Buffer-Fläschchen (10 mL, Tab. 40) überführt. Nach Zugabe von 0,2% Maltose und 10 mM MgSO₄ wurde die Kultur über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler (ca. 140 rpm) inkubiert.

Sobald die Kultur eine OD₆₀₀ von 2,0 erreicht hatte, wurde das Lysat 5 min bei 4000 xg zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in 7,5 mL 10 mM MgSO₄ wieder aufgenommen. Das entstandene Phagen-Lysat wurde in verschiedenen Verhältnissen mit der Bakterienkultur (XLI Blue in SM Buffer, Tab. 40) gemischt, in den Verhältnissen:

1:1, 1:10 und 1:100. Diese Ansätze inkubierten 15 min bei 37°C und wurden anschließend in Petrischalen mit LB-Agar (Tab. 41) ausplattiert.

Tab. 40: SMBuffer

SM Buffer	
NaCl	5,8g
MgSO ₄	2,0g
1 M Tris/HCl, pH 7,5	50mL
Gelatine, 2% (w/v)	5,0mL
H ₂ O, entionisiert	ad 1L

Darauf wurde eine warme, noch flüssige Schicht LB-Top-Agar (Tab. 41) ausgegossen und die Platten nach Verfestigung über Kopf eine Nacht bei 37°C inkubiert.

Tab. 41: LBAgar und LBTopAgar

LB-Agar, pH 7,0		LB-Top-Agar, pH 7,0	
Trypton	10g	Trypton	10g
NaCl	10g	NaCl	10g
Hefe	5g	Hefe	5g
Agar	20g	Agarose	7g
Maltose, 0,2% (w/v)	2g	H ₂ O entionisiert	ad 1L
10 mM MgSO ₄	1 mL		
H ₂ O entionisiert	ad 1L		

Am nächsten Tag wurden die gesamten Plaques in den Petrischalen gezählt. Der Titer der unamplifizierten cDNA-Bank lässt sich mit folgender Formel die Anzahl der „plaque forming units“ (pfu) errechnen:

$$\text{pfu/mL} = \frac{\text{Anzahl der Plaques} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^3 \mu\text{L/mL}}{\mu\text{L der verdünnten, ausplattierten Phagen}}$$

Amplifizierung der cDNA-Bank

Von den Kolonien aus dem vorherigen Schritt wurde eine einzelne, isolierte Kolonie gepickt und damit ein 15 mL LB/Maltose/MgSO₄-Medium (vgl. Tab. 31) inokuliert und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (140rpm) inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 2,0 wurden die Zellen bei 4000xg zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet mit 7,5 mL 10 mM MgSO₄ gelöst.

Aus dem Titer der unamplifizierten Bibliothek konnte man errechnen wie viel Lysat man benötigt, um 1×10^5 Plaques pro Petrischale zu bekommen. Daraufhin wurden mehrere Ansätze der Bakterienkultur mit entsprechender Menge an verdünntem Lysat in einem 15 mL-Zentrifugenröhrchen angesetzt. Die Ansätze inkubierten 15 min in einem 37°C warmen Wasserbad. Anschließend wurde 4,5 mL flüssiger, mit 10 mM MgSO₄ angereicherter LB-Top-Agar (Tab. 41) hinzugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und in Petrischalen ausgegossen. Nach dem Abkühlen wurden die Platten bei 37°C über Nacht auf dem Kopf stehend inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 12 mL 1xLambda Dilution Buffer (Clontech) auf die Petrischalen verteilt und bei 4°C einen Tag lang inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation der Platten für 1 h bei Raumtemperatur auf den Schüttler (~50rpm). Das λ-Phagen-Lysat wurde anschließend in sterile Reagenzgläser gegossen und gesammelt. Das Lysat wurde sorgfältig gemischt und in ein steriles 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 10 mL Chloroform (Sigma) wurde 2 min gevortext und bei 4000xg 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und in ein neues steriles 50 mL-Röhrchen überführt.

Bestimmung des Titers der amplifizierten cDNA-Bank

Aus einer bestehenden Bakterienkultur (XLIBLue, Clontech) wurde erneut ein Spot gepickt und in ein SM Buffer-Fläschchen (10 mL, Tab. 40) überführt. Nach Zugabe von Maltose und MgSO₄ wurde die Kultur über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler bei ca. 140rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 2,0 wurde das Lysat 5 min bei 4000xg zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in 7,5 mL 10 mM MgSO₄ wieder aufgenommen. Vom Lysat wurden 10 µL zu 1 mL 1xLambda Dilution Buffer (Clontech) pipettiert (1. Verdünnung 1:100). Aus dieser Verdünnung wurden 10 µL abgenommen und in ein zweites 1 mL 1x Dilution Buffer gegeben (2. Verdünnung 1:10000).

Vier sterile Mikrozentrifugenröhrchen wurden vorbereitet, in die die folgenden Ansätze pipettiert wurden (Tab. 42):

Tab. 42: Ansätze für die Amplifizierung

	1 x Lambda Dilution Buffer	Bakterienkultur	2. Phagen- Vedünnung
1	100 µL	200 µL	5 µL
2	100 µL	200 µL	10 µL
3	100 µL	200 µL	20 µL

Die Mikrozentrifugenröhrchen inkubierten daraufhin 15 min bei 37°C im Wasserbad. Danach wurden je 3 mL flüssiger LB-Top-Agar (45°C) dazugegeben und vier LB-Agar-Platten (vgl. Tab. 41) mit den Ansätzen überschichtet. Sobald die Platten abgekühlt waren inkubierten sie 6-7 h bei 37°C über Kopf. Abschließend wurden die Plaques auf derjenigen Platte ausgezählt, auf der sie deutlich zu unterscheiden waren und über folgende Formel die genaue Anzahl der Plaques (plaque forming units - pfu) in der amplifizierten cDNA-Bank bestimmt:

$$\text{pfu/mL} = \frac{\text{Anzahl der Plaques} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^3 \text{ µL/mL}}{\text{µL der verdünnten, ausplattierten Phagen}}$$

Der Verdünnungsfaktor betrug im vorliegenden Fall 1×10^4 . Eine erfolgreich amplifizierte cDNA-Bank hat einen Titer von $\sim 1 \times 10^{10}$ pfu/mL.

Die Langzeitlagerung der cDNA-Bank erfolgt zusammen mit dem Gefrierschutzmittel DMSO (Dimethylsulfoxid, Endkonzentration 7%) bei -80°C in 1 mL-Aliquots.

III Ergebnisse

Abwasserparameter Mörlbach

An der KA Mörlbach sind im Rahmen der verschiedenen F&E-Projekte in den Jahren 2003-2005 regelmäßig die gesetzlich vorgeschriebenen Abwasserparameter erhoben worden (vgl. NEUSTIFTER&SCHRÖDER, 2003, 2004 und 2005). Hier werden exemplarisch die pH-Werte, der Biologische Sauerstoffbedarf (BSB₅) und der Gesamtkohlenstoffgehalt (TOC) dargestellt, da sie einen guten Einblick in den Verlauf der Belastung im Jahresgang geben und Rückschlüsse auf die wesentliche Funktion des bepflanzten Bodenfilters zulassen.

pH-Wert

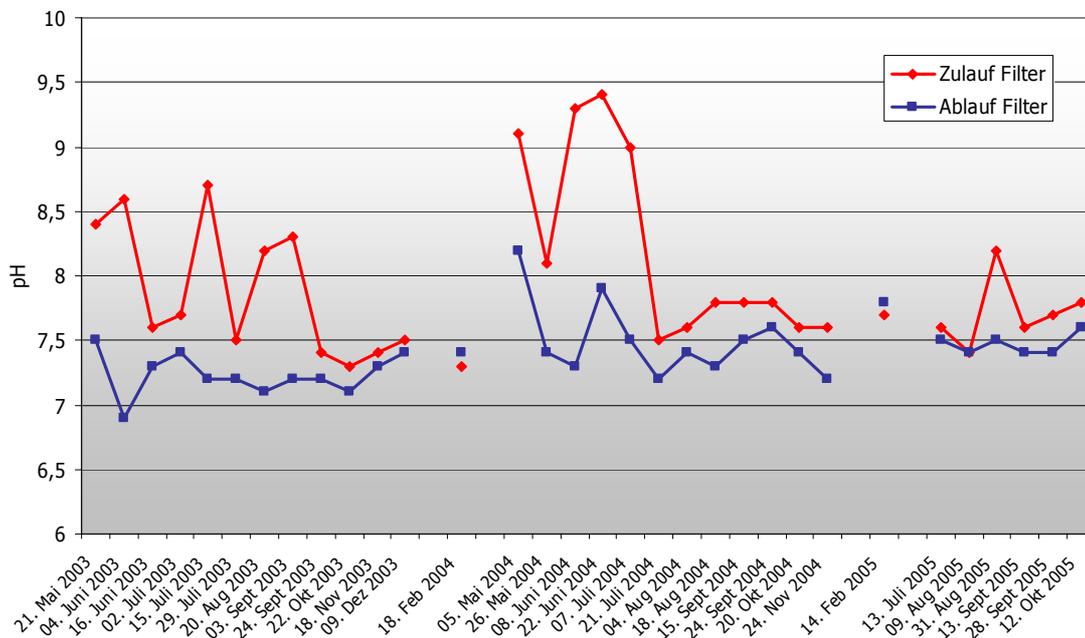


Abb. 21: pH-Werte am Zulauf (Abwasserteich, vor dem Filter) und Ablauf (nach der Filterpassage) des Filters an der KA Mörlbach im Vergleich über die Untersuchungsjahre 2003-2005.

Die pH-Werte im Teich und am Ablauf nach dem Filter der KA Mörlbach bewegen sich in dem Jahresgang in einem Intervall von pH6,8 bis 9,4 (Abb. 21). Während es in den Sommermonaten im Teich vor dem Filter immer wieder zu Spitzenwerten und zu sehr

starken Schwankungen kommt (bis pH9,4), zeigt sich für die Werte hinter dem Filter ein ausgeglichenes Bild mit stets niedrigeren pH-Werten (bis max. pH8,2). Zwar sind auch hier abschnittsweise hohe Werte im Sommer, durch Alkalisierung des Wassers durch Algenwachstum, zu beobachten (um pH8), aber auf einem durchschnittlich niedrigeren Niveau als im Teich (bis um pH9). Die Werte steigen im Ablauf nach dem Filter in keinem der beobachteten Fälle über pH8,5, sondern pendeln sich auf Werte um etwa pH7,5 ein. Die pH-Werte am Ablauf in Mörlbach stellen damit zu keiner Zeit eine Gefahr für die Biozönose im Ablauf und der nach folgenden Gewässer dar.

Besonders auffällig ist der starke Abfall der pH-Werte um fast zwei Punkte von pH9,4 auf 7,5 innerhalb eines Monats im Sommer 2004. Dies zeigt an, dass sich die Bedingungen im Teich vor dem Filter drastisch geändert haben. Zu diesem Zeitpunkt herrschte sehr trockenes und heißes Sommerwetter, währenddessen auch vermehrt Algenwachstum beobachtet werden konnte (Aufzeichnungen Probenahmen, vgl. NEUSTIFTER&SCHRÖDER, 2004). Das Algenwachstum im Teich, mit dem der pH-Wert-Anstieg einhergeht, ist Ende Juli 2004 durch starke Regenfälle eingedämmt worden. Daraufhin konnte bei den folgenden Probenahmen wieder eine Normalisierung der pH-Werte auf ein Niveau um pH7,5 festgestellt werden (vgl. Abb. 21).

Wie man aus der Grafik (Abb. 21) ersehen kann, lässt die Pufferwirkung des Filters über die Jahre nach. Schwankungen der pH-Werte in den Jahren 2003 und 2004 wurden noch gut abgepuffert, um bis zu zwei pH-Einheiten (z.B. Juli 2004). Die pH-Werte im Ablaufwasser wurden dabei durch den Filter wesentlich verbessert. Zwar sind im Jahr 2005 nicht so starke Schwankungen bei den pH-Werten im Teich aufgetreten (zwischen pH7,4 und 8,2), aber die pH-Werte konnten immer noch auf ein für den Ablauf sehr gut verträgliches Maß von pH7,2 bis maximal 7,8 reduziert werden.

Biochemischer Sauerstoffbedarf - BSB₅

Der BSB₅ gilt als Indikator für die erfolgreiche biologische Abwasserreinigung im Teich. Es werden deshalb auch die BSB₅-Werte nach der Vorklärung in der Abbildung mit angegeben, um einen Eindruck über den BSB₅ im Kläranlagenverlauf geben zu können (Abb. 22).

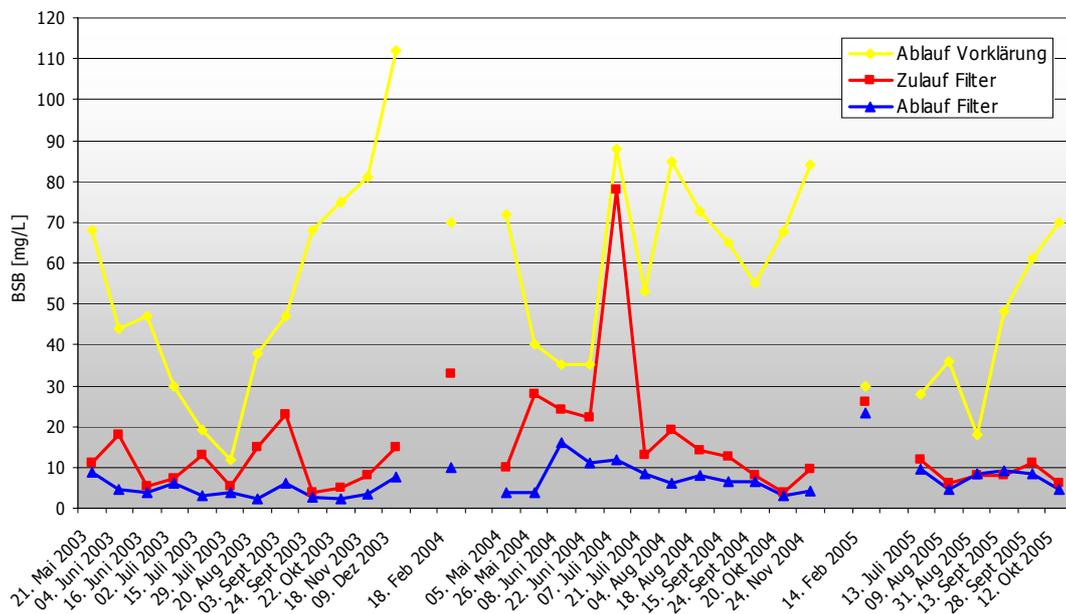


Abb. 22: Biochemischer Sauerstoffbedarf BSB₅ in [mg/L] am Ablauf der Vorklämung, Zulauf und Ablauf des Filters an der KA Mörlbach im Vergleich über die Untersuchungsjahre 2003-2005.

Der Grenzwert für den BSB₅ am Ablauf der KA Mörlbach liegt bei 35 mg/L (vgl. Material & Methoden). Im Ablauf wurde dieser Wert zu keiner Zeit, im Teich nur einmal (Juli 2004), überschritten (vgl. Abb. 22).

Man erkennt, dass die Werte nach der Vorklämung fast immer deutlich höher liegen als im Bereich des Filters und dass die Reinigung meist schon im Teich, bzw. in der Vorklämung abgeschlossen war, was sich dann in geringem Sauerstoffbedarf im Teich widerspiegelt (vgl. Werte Juli 2003 und Februar 2005, Abb. 22). Im Gegensatz dazu kommt es aber auch vor, dass ein hoher BSB₅ nach der Vorklämung im Teich nicht weiter reduziert werden kann (Wert 07. Juli 2004, Abb. 22) und er erst durch den Filter deutlich auf ein Niveau unter dem Grenzwert gesenkt werden kann. Generell zeigen die Werte im Teich vor dem Pflanzenfilter eine stärkere Dynamik als diejenigen nach dem Filter am Ablauf der Kläranlage. Die BSB₅-Werte im Teich, die übermäßig hoch ausfallen (v.a. Juli 2004) und hierdurch die Ablaufgrenzwerte gefährden können, sind nach der Filterpassage im Ablauf deutlich unter den Grenzwert absenkt worden.

Der starke Anstieg des BSB₅-Werts im Teich zwischen Juni und Juli 2004 fällt genau mit dem Zeitpunkt zusammen, an dem auch der pH-Wert des Teichwassers extrem hoch (um pH9, vgl. Abb. 21) ist. Wie bereits erwähnt, war es in den Sommermonaten Juni und Juli sehr heiß und trocken, mit darauf folgenden starken Regenfällen Ende Juli. In diesen Monaten ist es zu vermehrtem Algenwuchs gekommen, der sowohl den pH-Wert

ansteigen ließ, als auch durch eine erhöhte Sauerstoffzehrung im Teich gekennzeichnet ist (BSB₅ von 88 mg/L, 21. Juli 2004). Nach dem starken Regenereignis, bei dem viele Algen abgeschwemmt wurden und das Abwasser stark verdünnte, ist der BSB₅ in den nachfolgenden Messungen wieder auf ein Niveau unter den Grenzwert für den Ablauf von 35 mg/L gesunken.

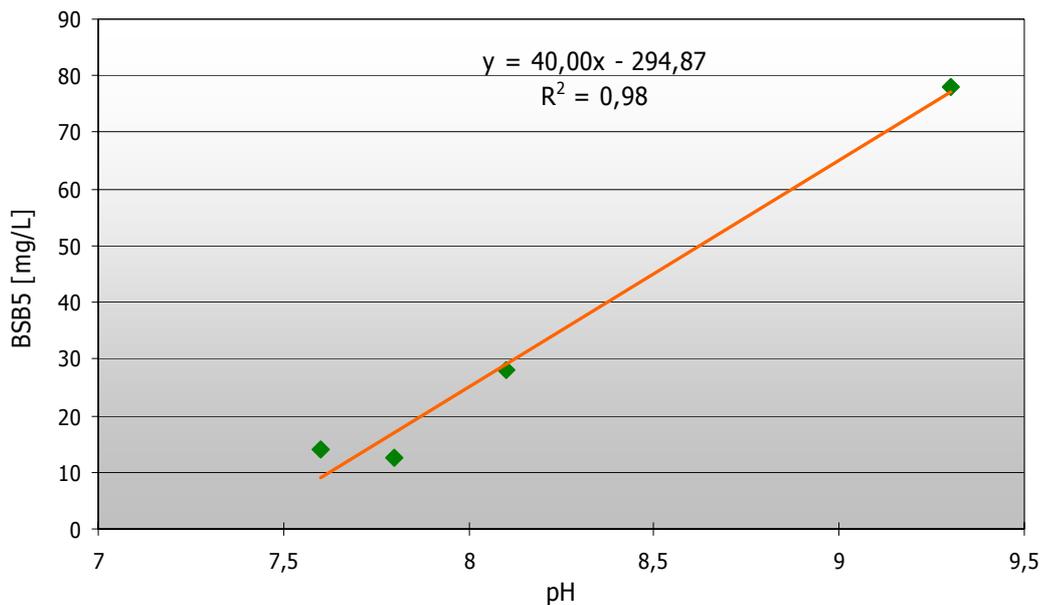


Abb. 23: Korrelation Werte BSB₅ in [mg/L] aufgetragen gegen den pH-Wert für die Monate Mai, Juni, August und September 2004 am Filter der KA Mörlbach.

In Abbildung 24 ist die Korrelation zwischen BSB₅ und pH-Werten im Sommer 2004 am dem Filter in Mörlbach zu sehen. Man erkennt den eindeutigen Zusammenhang der beiden Parameter in diesem Zeitabschnitt. Der BSB₅ steigt mit zunehmenden pH-Werten (etwa 80 mg/L bei pH 9,3) und ist niedriger wenn auch der pH-Wert niedriger ist (um 20 mg/L bei pH 7,6-8,1). Diese gute Korrelation ($R^2 = 0,98$, vgl. Abb. 23) ist aber nur für diesen Zeitabschnitt gegeben und darf nicht als allgemeingültig verstanden werden.

Gesamtorganischer Kohlenstoff – TOC

Der gesamtorganische Kohlenstoffgehalt zeigt eine starke Dynamik sowohl vor als auch nach dem Filter und bewegt sich in einem Intervall von 5-35 mg/L (Abb. 24). Im Ablauf sind die Messwerte für den TOC, verglichen mit den Messwerten im Teich, jedoch zu fast allen Messterminen geringer (Ausnahme Juli 2004 und Sept. 2005, Abb. 24).

Auffällig bei diesen Messungen war, dass trotz starker Schwankungen keine jahreszeitliche Dynamik zu erkennen war. Schwankungen treten hier spontan und in Spitzen auf, die auch immer in geringeren Werten nach dem Filter zu erkennen waren. Im Vergleich zu den pH-Werten (Abb. 21) zeigt der Filter aber auch noch im letzten Erhebungsjahr 2005 eine starke Pufferwirkung für den Gesamtkohlenstoffgehalt. Der Höchstwert wird auch mit zunehmenden Alter und Verschleiß des Filters durch Absenkung und Überflutung immer noch verringert und zwar von 35 mg/L vor dem Filter auf 10 mg/L nach dem Filter (Sept. 2005, Abb. 24).

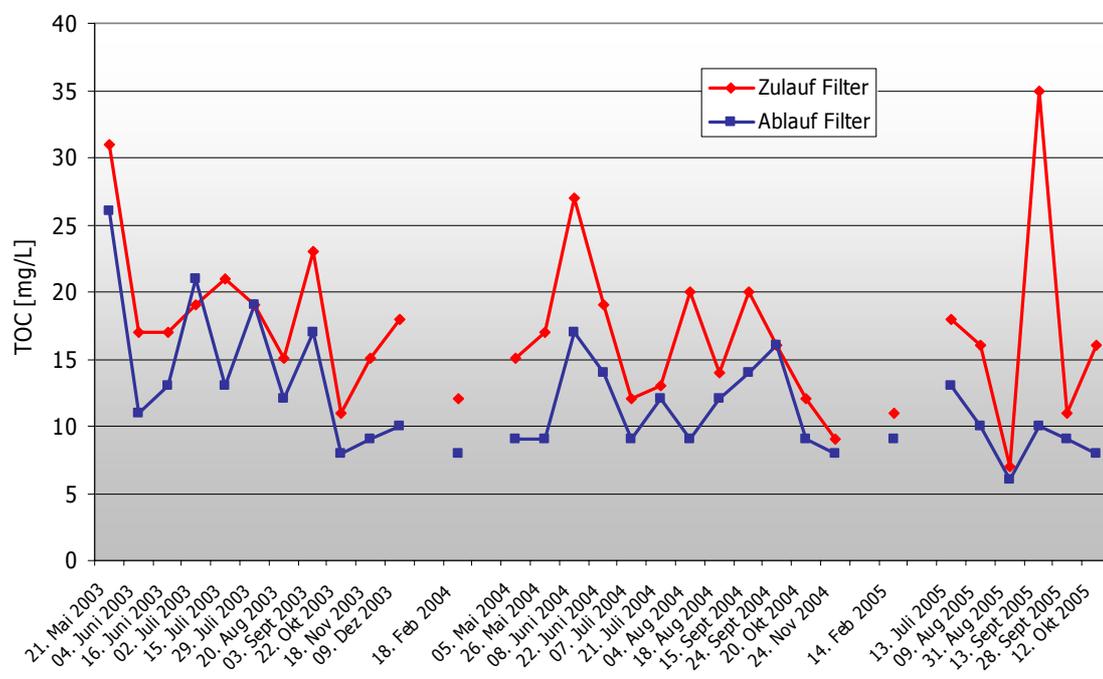


Abb. 24: Gesamtorganischer Kohlenstoff TOC in [mg/L] am Zulauf und Ablauf des Filters an der Mörlbach im Vergleich über die Untersuchungsjahre 2003-2005.

Es treten zwar auch hier in den Sommermonaten 2004, in denen die starken Schwankungen bei pH-Wert und BSB₅ aufgetreten sind, Schwankungen beim TOC auf, jedoch etwas vorgezogen und nicht in einem so außergewöhnlichen Maße (vgl. Abb. 21, Abb. 22 und Abb. 24). Zusammenhänge wie sie für BSB₅ und pH-Werte für diesen Zeitraum gezeigt werden konnten, können für den TOC nicht festgestellt werden.

Endokrin wirksame Substanzen im Abwasser der Kläranlage Mörlbach

Im Projekt MörlbachIV sind im Jahr 2005 Erhebungen über den Östrogengehalt (17 β -Estradiol) und verschiedene endokrin wirksame Substanzen angestellt worden (vg. Tab. 44). Die Messungen verfolgten zwei Ziele. Zum einen sollte die Nachweismethode etabliert werden (vgl. NEUSTIFTER&SCHRÖDER, 2005), zum anderen sollte diese Pilotstudie prüfen, ob der Filter zu einem nennenswerten Abbau der Substanzen beiträgt. Für 17 β -Estradiol, dessen Konzentrationen derzeit nicht standardisiert in kommunalen Kläranlagen erhoben wird, sind bisher keine Ablaufgrenzwerte festgeschrieben.

17 β -Estradiol

Das zur Auswertung der ELISA-Tests verwendete Computerprogramm SoftMaxPro 4.6 (Molecular Devices) generierte aus den gemessenen Standards eine Standardkurve (vgl. Material&Methoden), setzte die gemessenen und gemittelten Messwerte der Proben dort ein und berechnete die Konzentrationen.

Tab. 43: Estradiolmessungen in [pg/mL], absolute und relative Werte im Vergleich, n=3, Messwerte des ELISAs ausgewertet mit dem Statistikprogramm von Soft MaxPro 4.6.

	Ablauf Vorklärung (100%)	Teich Mischprobe	Nach Filter
28.09.2005	67,80	34,28 (51%)	27,73 (41%)
05.10.2005	68,06	59,72 (88%)	50,60 (74%)
12.10.2005	145,09	83,39 (57%)	61,13 (42%)
17.10.2005	90,84	49,48 (54%)	36,31 (40%)

Am ersten Termin (28.09.2005) wurden sehr hohe Östrogengehalte am Ablauf der Vorklärung in Mörlbach gemessen (Tab. 43). Der Wert von 67,8pg/mL entspricht laut Tabelle IBL (2005) einer human wirksamen Dosis. Insgesamt nahmen die Werte über den Anlagenverlauf deutlich ab, am stärksten im Teich. Die Konzentrationen verringerten sich dort um knapp 50% auf 34,3pg/mL. Den niedrigsten Wert fand man in der Probe nach der Pflanzenfilterpassage, die Estradiolkonzentration konnte durch den Filter nochmals um weitere 10% reduziert werden, was einer Ablaufkonzentration

von 27,7 pg/mL entspricht. Man erkennt, dass die Konzentrationen sukzessive in der Anlagenpassage abnehmen, dass aber im Ablauf der Kläranlage immer noch ein sehr hoher Estradiolgehalt nachzuweisen ist.

Am Messtermin 05.10.2005 befanden sich ähnliche Ausgangswerte an Estradiol in der Vorklärung (68,1 pg/mL) wie beim ersten Probennahmetermin (Tab. 43). Diesmal konnte keine so starke Abnahme der Konzentrationen an Estradiol über den Anlagenverlauf festgestellt werden. Im Teich wurde zwar die größte Abnahme festgestellt (12%), die aber deutlich geringer ausfällt als beim ersten Probenahmetermin. Zu dieser Zeit wird in der Vorklärung ein erhöhter BSB₅-Wert festgestellt (vgl. Abb. 22), der über den Werten an den anderen Probenahmeterminen liegt. Es lässt sich dabei beobachten, dass es bei Engpässen in der Reinigung des Abwassers, die durch einen erhöhten Sauerstoffbedarf gekennzeichnet sind, es auch zu verminderten Abbauraten bei den Estradiolkonzentrationen kommt. Durch den Filter wurde eine Abnahme um 8% festgestellt. Deshalb lag der Ablaufwert mit 50,6 pg/mL Estradiol auch wesentlich höher als beim ersten Probennahmetermin. Die hier beobachtete geringere Abnahme der Konzentrationen konnte durch die daraufhin stärker auftretende Abnahme durch die Filterpassage reguliert werden.

Die Messungen vom 12.10.2005 in Mörlbach (Tab. 43) ergaben die höchsten gemessenen Werte in der Vorklärung, 145,1 pg/mL. Die Hauptabnahme fand auch diesmal im Teich statt. Bei einer Konzentration von 83,4 pg/mL im Teich bedeutete das eine Reduzierung der Östrogenwerte um 43%. An diesem Messtermin wurden durch den Filter die Estradiolgehalte deutlich stärker reduziert als an anderen Terminen und zwar um 15% auf 61,1 pg/mL. Insgesamt fand an diesem Tag zwar eine Estradiol-Abnahme über die Anlage von fast 60% statt, aber auch wenn die relative Abnahme sehr hoch war, darf es nicht darüber hinwegtäuschen, dass an diesem Messtermin der höchste Ablaufwert gemessen wurde (61,1 pg/mL).

Am letzten Probenahmetermin an der Kläranlage in Mörlbach am 17.10.2005 betrug der Ausgangswert in der Vorklärung 90,8 pg/mL (Tab. 43). Die Haupteliminierung des Estradiols im Abwasser fand wiederum im Teich statt. Die Werte wurden auf 49,5 pg/mL reduziert, was einer Abnahme von 56% entspricht. Der Filter bewirkte eine zusätzliche Verringerung der Estradiolwerte um 14%. Das bedeutet, dass an diesem Messtag im Ablauf ein Gehalt von 36,3 pg/mL gemessen wurde. An diesem letzten Messtag wurde die höchste prozentuale Gesamtabnahme von 60% festgestellt.

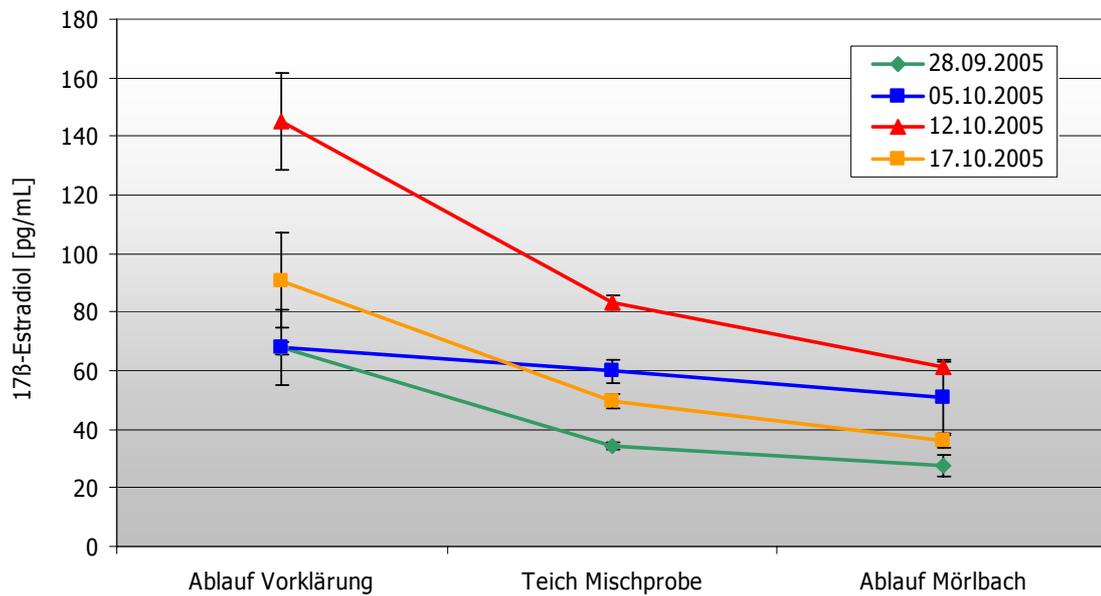


Abb. 25: 17 β -Estradiol-Messwerte vom 28.09., 05.10., 12.10. und 17.10.2005 in [pg/mL] am Ablauf Vorklärung, Teich und am Ablauf Filter der KA Mörlbach im Überblick. n=3, Messwerte des ELISAs ausgewertet mit dem Statistikprogramm von Soft MaxPro 4.6.

In Abbildung 25 sind die gemessenen Estradiolkonzentrationen im Überblick dargestellt. Man kann deutlich erkennen, dass die Werte im Anlagenverlauf kontinuierlich an allen Messterminen abnehmen. Die hohen Werte, die jeweils in der Vorklärung gemessen wurden, wurden stets im Teich am deutlichsten reduziert. Im Ablauf waren die Anfangswerte zwar stark reduziert (vgl. Tab. 43), dennoch wurden stets Restgehalte an Estradiol im Ablauf gemessen (bis zu 61,1 pg/mL 17 β -Estradiol), die das Grundwasser belasten können.

Weitere endokrine Wirkstoffe

Für die endokrin wirksamen Alkylphenole Octylphenol und Nonylphenol wurden folgende Werte ermittelt (Tab. 44):

Tab. 44: Mittelwerte der Messungen von Octylphenol, Nonylphenol, HHCB und DEHP in [pg/mL]. Werte vom LfU gemessen.

	Ablauf Vorklärung (100%)	Teich Mischprobe	Nach Filter
Octylphenol	11	4 (36%)	3 (27%)
Nonylphenol	555	82 (15%)	69 (12%)
HHCB	1515	129 (9%)	87 (6%)
DEHP	7170	1090 (15%)	660 (9%)

Die Konzentrationen dieser Industriechemikalien (Tab. 44) nahmen über den Anlagenverlauf ähnlich wie beim Estradiol ab (Abb. 25). Die verhältnismäßig hohen Werte in der Vorklärung (Octylphenol 11pg/mL, Nonylphenol 555pg/mL) wurden im Teich jeweils reduziert, um 64% bei Octylphenol und um 85% bei Nonylphenol. Der Filter konnte hier eine zusätzliche Verringerung der Konzentrationen erbringen und gab Restwerte von 3 pg/mL beim Octylphenol und 69 pg/mL beim Nonylphenol an den Ablauf ab. Die Gesamtverringerung betrug insgesamt 73% beim Octylphenol und 88% beim Nonylphenol.

Eine noch deutlichere Abnahme der Konzentrationen der endokrin wirksamen Verbindungen ließ sich bei der polyzyklischen Moschusverbindung Hexahydrohexamethyl-cyclopenta-gamma2-benzopyran (HHCB) und beim Diethylhexylphthalat (DEHP) beobachten. Die Anfangswerte von 1515pg/mL und 7170pg/mL im Ablauf der Vorklärung konnten im Anlagenverlauf auf 87pg/mL bzw. 660pg/mL reduziert werden, dies entspricht einer relativen Abnahme von insgesamt 94% beim HHCB und 91% beim DEHP. Die Hauptabnahme der detektierten Konzentration erfolgte in beiden Fällen im Teich. Der Filter erbrachte nochmals eine deutliche Verringerung der Konzentrationen (um 42mg/L beim HHCB und sogar um 430mg/L beim DEHP).

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 26) zeigt die Abnahme der oben beschriebenen endokrin wirksamen Substanzen Octylphenol, Nonylphenol, HHCB und DEHP im Überblick.

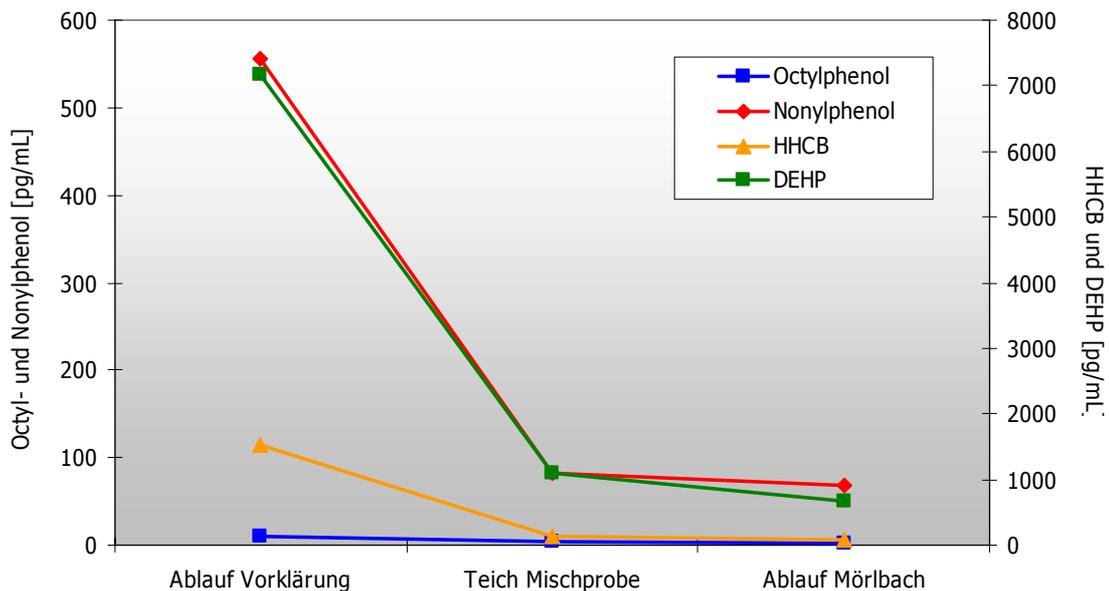


Abb. 26: Octylphenol, Nonylphenol, HHCB und DEHP in [pg/mL] über den Anlagenverlauf der KA Mörlbach, links die Skala für Octyl- und Nonylphenol, rechts die Skala für HHCB und DEHP. Werte vom LfU gemessen, keine Angabe der Standardabweichung möglich.

Deutlich ist in der Abbildung die starke Abnahme der Konzentrationen aller Stoffe vom Ablauf der Vorklärung zum Teich erkennbar (Abb. 26). Schließlich kann festgestellt werden, dass bei den hier gemessenen endokrin wirksamen Stoffen die Haupteliminierung im Teich geschieht. Es ist aber auch stets eine Reduzierung, wenn auch in geringerem Umfang, durch den Filter festzustellen. Dennoch sind aber auch immer noch Restgehalte an den endokrinen Wirkstoffen im Wasser des Ablaufs nachzuweisen, die bis auf DEHP mit einem extrem hohen Ablaufwert von 660 pg/mL, etwa im Bereich der Konzentrationen für Estradiol liegen.

Entgiftungsenzyme in *Phragmites australis*

Glutathion S-Transferasen - GSTs

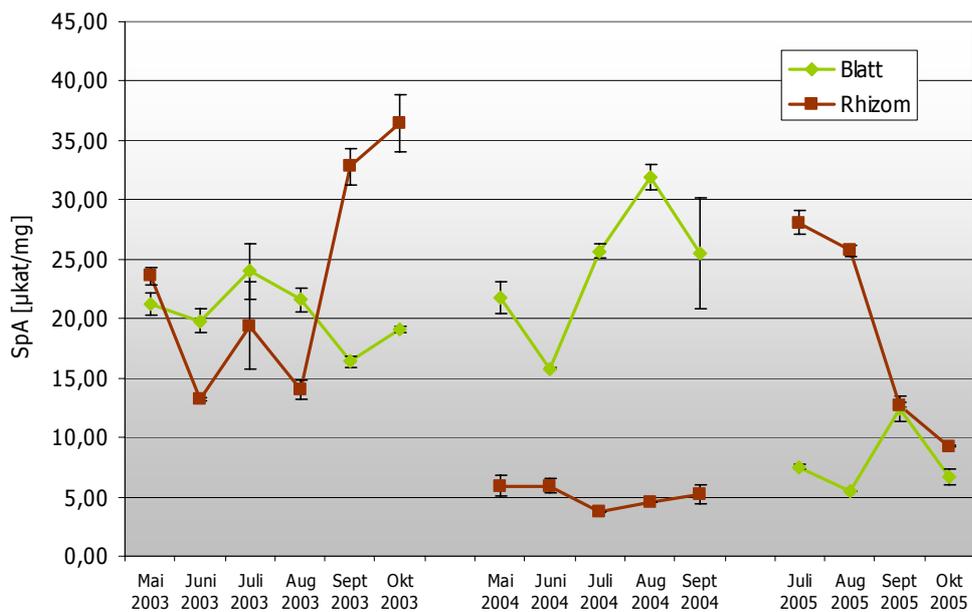


Abb. 27: Spezifische Aktivität GSTs (Substrat CDNB) in *Phragmites australis*-Pflanzen vom Filter an der KA Mörlbach im Vergleich über alle drei Erhebungsjahre, n=3, gemittelt. Auswertung mit dem Statistikprogramm von Soft MaxPro 4.6.

Die Spitzenwerte bei den spezifischen Aktivitäten der GSTs (E.C. 2.5.1.18) für die Konjugation des Substrats CDNB wurden in *Phragmites australis*-Pflanzen aus Mörlbach in den Sommer- oder Herbstmonaten erzielt, wobei die Aktivitäten über die drei dargestellten Jahre stark schwankten. Die GST-Aktivitäten in den Blattproben waren im Sommer, mit Ausnahme des letzten Erhebungsjahres, höher als die in den Rhizomproben (Abb. 27). Die GST-Aktivitäten in den Rhizomproben stiegen im darauf folgenden Jahr wieder über die Werte der Blattproben an. Interessant ist die Beobachtung, dass zu allen Erhebungsdaten GST-Aktivitäten in Blatt und Rhizom von *Phragmites australis* zu beobachten waren.

Bei den Blättern fällt eine konstant hohe Aktivität über drei Monate im Sommer 2004 auf, die gleichzeitig auch die höchsten Aktivitäten bei Blättern auf dem Filter darstellen. Diese Zeit der erhöhten Blattaktivitäten fiel genau mit der Zeit der erhöhten pH- und

BSB₅-Werte zusammen (vgl. Abb. 21 und Abb. 22). Die Monate Juni und Juli 2004 waren am Pflanzenfilter in Mörlbach sehr heiß und trocken, gefolgt von starken Regenfällen Ende Juli. Diese Bedingungen haben nicht nur die Wasserparameter stark schwanken lassen (vgl. Abb. 24 und 25), sondern führten in diesem Sommer aufgrund der wechselhaften und extremen Bedingungen zusätzlich zu einem verstärkten Lausbefall bei den Schilfpflanzen am Filter. Der Befall wurde im Juli 2004 festgestellt und endete mit dem Totalausfall der oberirdischen Biomasse der Filtervegetation bis Oktober des gleichen Jahres (vgl. NEUSTIFTER&SCHRÖDER, 2004). Es konnte beobachtet werden, dass befallene Blätter genau ab diesen Zeitpunkten auch erhöhte GST-Aktivitäten zeigten (vgl. Abb. 27). Aus diesem Grund wurden von den Blattproben dieser Monate (Juli, August, September 2004) auch die Temperaturoptima und die Aktivierungsenergie bestimmt, um feststellen zu können, ob diese Aktivitätssteigerungen auf die verstärkte Expression von GST-Isoenzymen zurückzuführen sind (vgl. Abb. 29).

Auch bei den Rhizomen konnte eine Dynamik über den Zeitraum der Erhebung erkannt werden. Während die GST-Aktivitäten dabei im Frühjahr und Sommer meist geringer waren als die der Blätter, stiegen sie jeweils zum Herbst hin leicht an (vgl. Abb. 27). Da über die Herbst- und Wintermonate keine kontinuierlichen Messungen durchgeführt wurden, konnte nicht festgestellt werden, wie sich die Aktivitätssteigerungen der Blätter im Sommer auf die Rhizome in den nach folgenden Wochen und Monaten ausgewirkt haben. Es konnte aber im ersten Erhebungsjahr festgestellt werden, dass die GST-Aktivitäten der Rhizome im Frühjahr und im Herbst ihre höchsten Werte erreichen und dass die Gewebe somit auch in den Schwellenmonaten vor und nach dem Winter aktiv waren (vgl. Abb. 27).

Da es sich gezeigt hatte, dass der BSB₅ und der pH-Wert eng in dem Zeitraum des Sommers 2004 miteinander korreliert sind (Abb. 23) und die Einflüsse eng miteinander in Verbindung stehen, wurde untersucht, ob dieser Zusammenhang auch bei den GSTs, deren Aktivitäten in diesem Zeitraum ebenfalls stark angestiegen waren, Gültigkeit hat. Aus diesem Grund sind hier die spezifischen Aktivitäten gegen die PH-Werte aus diesem Zeitraum gegeneinander aufgetragen. Man sieht auch hier den engen Zusammenhang und kann feststellen, dass diese spezifische Aktivität der GSTs mit den pH-Werten aus dem Sommer 2004 eng miteinander korreliert sind ($R^2 = 0,90$, Abb. 28).

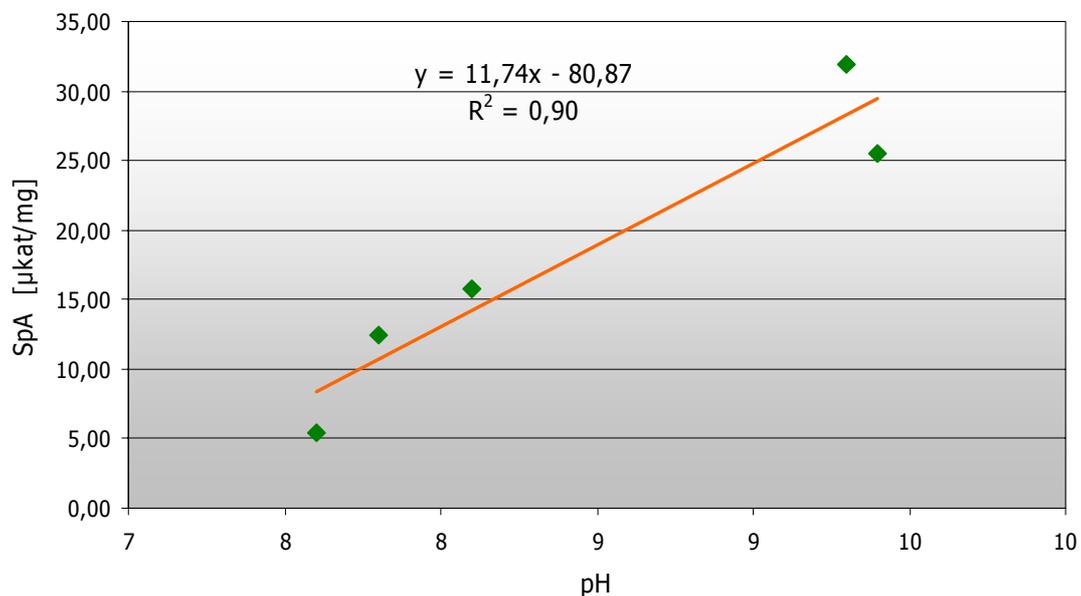


Abb. 28: Spezifische Aktivität GTSs (Substrat CDNB) von *Phragmites australis* vom Filter an der KA Mörlbach aufgetragen gegen die pH-Werte für die Monate Mai, Juni, Juli, August und September 2004.

Wie auch schon bei der Korrelation von BSB_5 und pH-Werten kann dieser Zusammenhang aber nur für diese Werte gesehen werden und kann nicht als allgemein gültig verstanden werden. Es ist aber immerhin ein deutliches Indiz dafür, dass unter bestimmten Bedingungen eine direkte Korrelation zwischen der Wasserqualität und den in der Pflanze exprimierten Entgiftungsenzymen besteht.

Temperaturoptima - Bestimmung der Aktivierungsenergie

Wenn sich die Expressionsmuster einer Enzymgruppe ändern, so verändern sich auch die physiko-chemischen Eigenschaften wie Temperatur- und pH-Optimum. Auf das Temperaturoptimum wurden dazu die drei Blattproben von *Phragmites australis* aus den Monaten Juli, August und September 2004 untersucht, die bei der Erhebung in Mörlbach am Filter eine deutlich erhöhte spezifische Aktivität gezeigt hatten (vgl. Abb. 27) und in die Zeit des starken Lausbefalls fielen. Es erschien deshalb interessant zu untersuchen, wie sich die Temperaturoptima und die Aktivierungsenergie verhalten und ob sich dabei Unterschiede im Enzymmuster zeigen. Es wurde die spezifische Aktivität gegenüber dem Substrat CDNB in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht.

Deutlich ist dabei ein Aktivitätsmaximum aller drei Proben bei 55°C zu erkennen (vgl. Abb. 29). Ein zweites, jedoch wesentlich geringeres Maximum kann bei allen drei Proben auch im Bereich von 25-35°C beobachtet werden, das offenbar eine andere GST-Gruppe charakterisiert. Der Bereich der linearen Zunahme der Enzymaktivität (40-55°C) wurde dazu herangezogen, die Berechnung der Aktivierungsenergie vorzunehmen. Die Berechnung der Aktivierungsenergie der GSTs in *Phragmites australis*-Pflanzen aus Mörlbach erfolgt, wie in Material&Methoden beschrieben.

Zur Berechnung der Aktivierungsenergie benötigt man die Steigung derjenigen Geraden, die sich ergibt wenn man die Reaktionstemperaturen aus dem ansteigenden Bereich der Temperaturabhängigkeitskurve (hier: 40–55°C, entspricht 313-328°K) in °K als Kehrwert gegen den dekadischen Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten bei diesem Temperaturbereich aufträgt (Abb. 30).

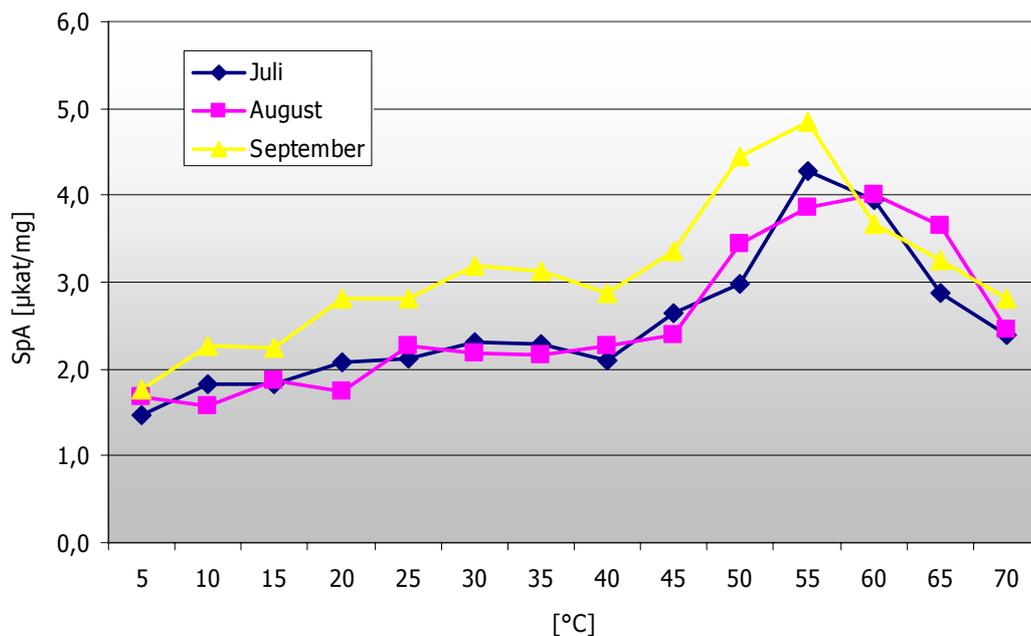


Abb. 29: Spezifische Aktivität GSTs (Substrat CDNB) bei *Phragmites australis*-Pflanzen vom Filter an der KA Mörlbach, Temperaturverlauf der Proben von Juli, August & September 2004.

Die Temperaturoptima, die bei der Messung der spezifischen Aktivität gemessen wurden, liegen bei den Proben aller drei Monate nahe beieinander (Abb. 29). Das Temperaturoptimum liegt mit 55°C verhältnismäßig hoch. Zwar wesentlich schwächer ausgeprägt, aber dennoch gut zu erkennen, ist ein zweites Temperaturoptimum bei etwa 30°C (Abb. 29).

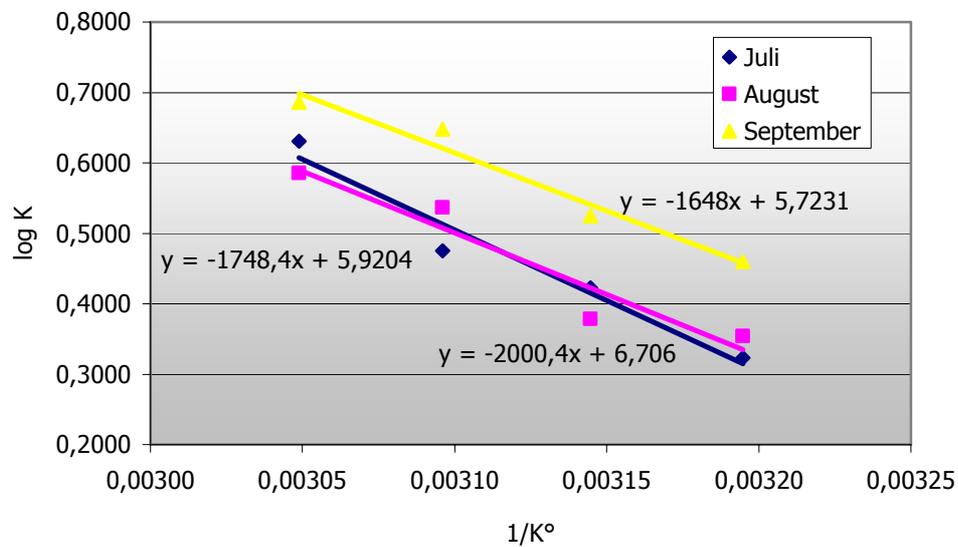


Abb. 30: Grafische Ermittlung der Aktivierungsenergie der *Phragmites australis*-GSTs für die Monate Juli, August und September 2004.

Durch Einsetzen der Steigung der Geraden (Abb. 30), ergibt sich für die Aktivierungsenergie im Juli ein Wert von $38,30 \text{ kJ} \cdot \text{Mol}^{-1}$, für August von $33,42 \text{ kJ} \cdot \text{Mol}^{-1}$ und für September von $33,56 \text{ kJ} \cdot \text{Mol}^{-1}$.

Glutathion-Reduktasen (GRs)

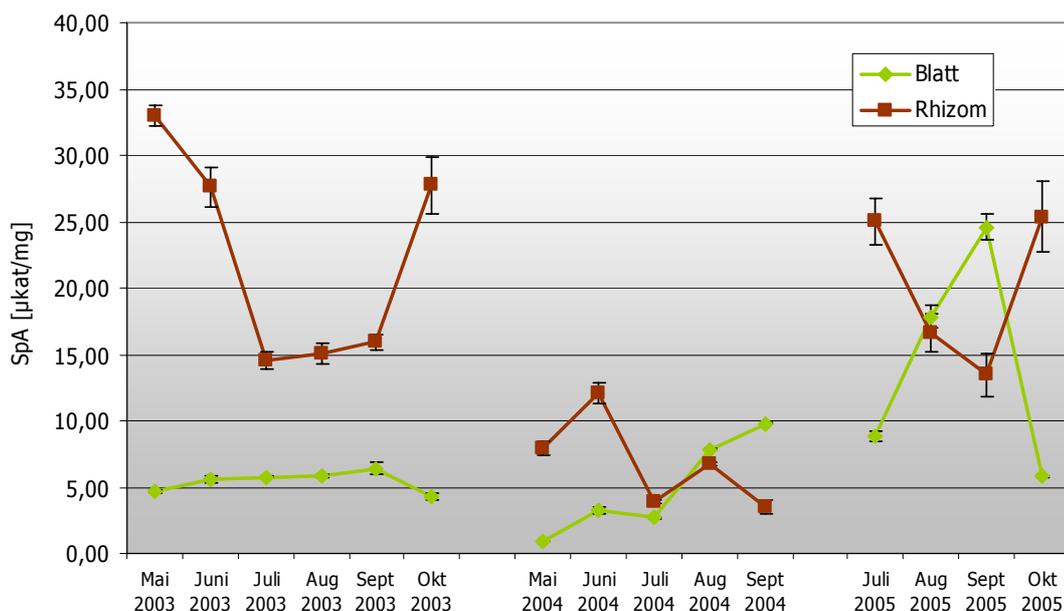


Abb. 31: Spezifische Aktivität der GR bei *Phragmites australis*-Pflanzen am Filter an der KA Mörlbach im Vergleich über alle drei Erhebungsjahre, $n=3$, gemittelt. Auswertung mit dem Statistikprogramm von Soft MaxPro 4.6.

Die Aktivität der Glutathion-Reduktasen (GRs, E.C. 1.6.4.2) wird als Indikator für den Entgiftungsprozess bestimmt, da sie notwendig ist, um das bei antioxidativen Reaktionen gebildete GSSG zu GSH zu reduzieren. Bei einer hohen Aktivität der Expression der GR kann davon ausgegangen werden, dass sich die Pflanze in einem Zustand der aktiven Entgiftung befindet, da offenbar reichlich GSSG entsteht.

Die Darstellung über die drei Erhebungsjahre (Abb. 31) zeigt die GR-Aktivitätsverläufe der Blätter und Rhizome der Schilfpflanzen in Mörlbach. Man kann Dynamiken im Jahresverlauf, vor allem bei den Rhizomen, erkennen. Bei den Blättern traten die Maxima in allen Jahren im Spätsommer auf, wenngleich die gemessenen Werte von Jahr zu Jahr sehr unterschiedlich waren. Bei den Rhizomen war eine Erhöhung der Aktivitäten zum Herbst zu erkennen, ebenfalls mit starken Schwankungen, aber meist wesentlich deutlicher als bei den Blättern ausgeprägt. Interessant ist zudem, dass die beobachtete, sehr hohe Aktivität bei den GSTs im Sommer 2004 (Juli, August, September) bei den GR-Aktivitäten im Blatt nicht zu erkennen ist. Dagegen findet man im Rhizom annähernd identische Verläufe zu Rhizom-GSTs (vgl. Abb. 27).

Peroxidasen (POX)

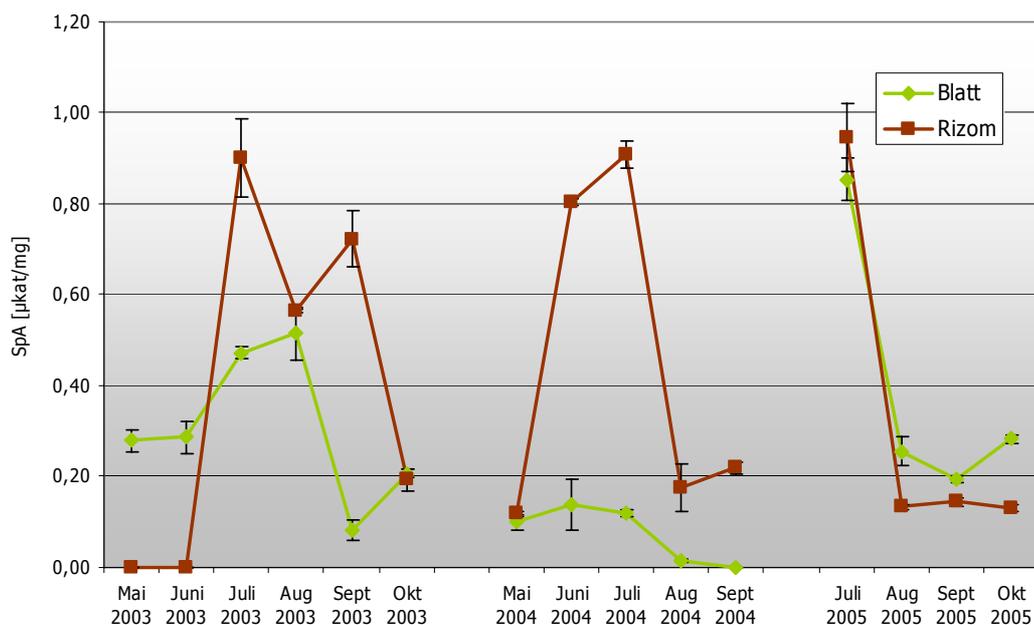


Abb. 32: Spezifische Aktivität der Peroxidase (Substrat Guajacol) bei *Phragmites australis*-Pflanzen vom Filter an der KA Mörlbach im Vergleich über alle drei Erhebungsjahre, n=3, gemittelt. Auswertung mit dem Statistikprogramm von Soft MaxPro 4.6.

Die Peroxidaseaktivität gilt als genereller und unspezifischer Stressmarker in Pflanzen. POX (E.C. 1.11.1.7) sind im pflanzlichen Stoffwechsel an der Entstehung stressbedingter Reaktionen beteiligt. Die spezifische Aktivität der POX lag meist weit unter den Werten, die für andere Entgiftungsenzyme gemessen wurden (Abb. 32). Auffällig bei den vorliegenden Werten für die Pflanzen aus Mörlbach ist deshalb, dass die POX-Aktivitäten der Rhizomproben hier meist über denen der Blätter liegen und der Stress, dem die Blätter im Sommer 2004 ausgesetzt waren, sich nicht in der POX-Aktivität niederschlägt. Aufgrund der generell niedrigen Werte treten hier auch kleine Schwankungen deutlich hervor. Es konnten aufgrund der langen Intervalle zwischen den Probenahmen allerdings nicht alle Reaktionen aufgezeichnet werden. Man kann zwar jahreszeitliche Verläufe erkennen, die sowohl bei Blättern, als auch bei Rhizomen im Sommer (Juni/Juli 2004, Abb. 32) ihr Maximum erreichten, man muss sich aber im Klaren sein, dass aufgrund der schnellen Regulierung der Peroxidasen und der niedrigen gemessenen Werte hier nur ein ungefährender Überblick über die Dynamik der Aktivitäten gegeben werden kann.

Analgetika und *Phragmites australis*

In Laborstudien unabhängig vom Projekt Mörlbach wurden die Abbau- und Aufnahmefähigkeit von Analgetika durch *Phragmites australis*-Rhizome untersucht.

Abbaustudien mit Ibuprofen, Diclofenac und Paracetamol

Ibuprofen

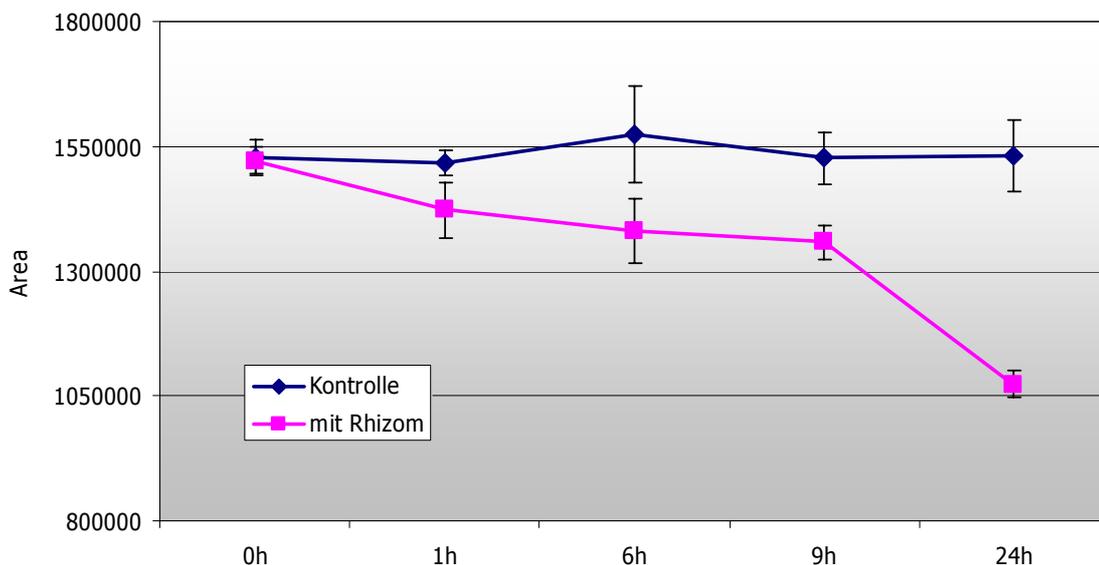


Abb. 33: Konzentrationsabnahme bei Ibuprofen (Konz. 0,1mM) in Anwesenheit eines Rhizoms von *Phragmites australis*; bestimmt via HPLC über 24h.

Die Ibuprofenabnahme über die Zeit (0-24h) wurde via HPLC bestimmt (Abb. 33). Aus der Kalibrationsgeraden für Ibuprofen ($y = 0,000065x$, vgl. Abb. 14) lässt sich daraus über die Erhebungszeit die entsprechende Konzentrationsabnahme von $29\mu\text{M}$ berechnen. In den ersten acht Stunden war eine Abnahme zu erkennen, jedoch in wesentlich geringerem Umfang als in den Stunden zwischen 9 und 24h der Inkubation des Rhizoms.

Bei der Kontrolle ohne Rhizom ist zwar auch eine leichte Schwankung der Messwerte festzustellen, die jedoch über die gesamte Dauer des Versuches nicht signifikant ist

(Abb. 33). Die Beschleunigung der Aufnahme mit der Zeit deutet auf die Beteiligung eines biologischen induzierten Vorgangs hin.

Diclofenac

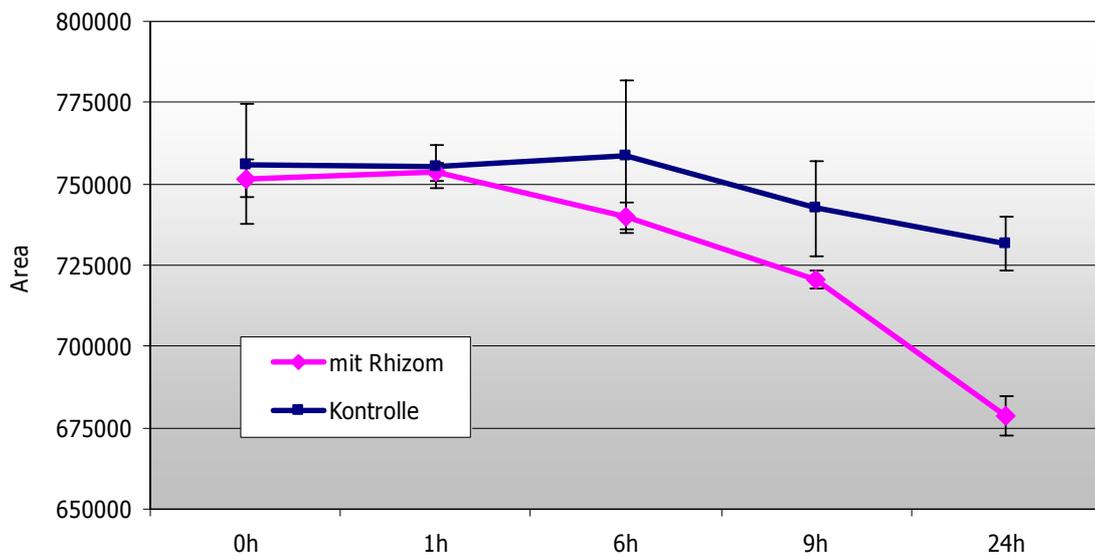


Abb. 34: Konzentrationsabnahme bei Diclofenac (Konz. 0,1mM) in Anwesenheit eines Rhizoms von *Phragmites australis*; bestimmt via HPLC über 24h.

Auch für Diclofenac konnte eine deutliche Abnahme über die Inkubationszeit von 24h gegenüber der Kontrolle beobachtet werden (Abb. 34). Aus der Kalibrationsgerade ($y = 0,00013x$, vgl. Abb. 16) konnte eine Konzentrationsabnahme von $9,4\mu\text{M}$ berechnet werden. Die Abnahme verlief kontinuierlich, sie setzte jedoch, im Gegensatz zu der bereits beschriebenen Abnahme von Ibuprofen erkennbar erst nach einer Stunde ein. Nach 9h ist etwa die Hälfte der Abnahme erreicht. Die restliche Abnahme erfolgt dann in den verbleibenden 15 Stunden. Bei der Kontrolle ohne Rhizom ist im vorliegenden Fall ebenfalls ein Verlust zwischen 6-24h zu erkennen, jedoch in geringerem Umfang.

Paracetamol

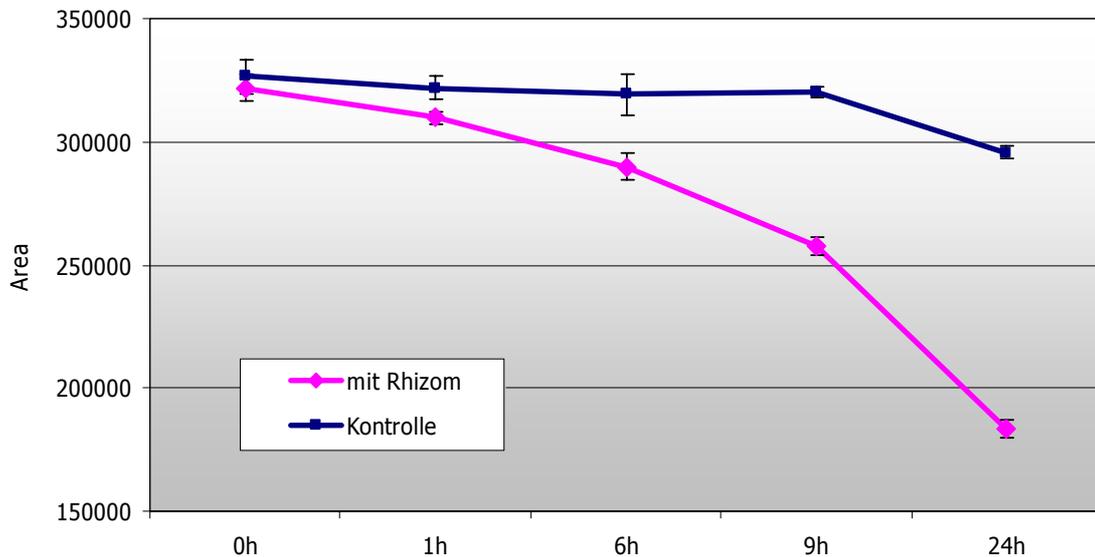


Abb. 35: Konzentrationsabnahme bei Paracetamol (Konz. 0,01mM) in Anwesenheit eines Rhizoms von *Phragmites australis*, bestimmt via HPLC über 24h.

Dargestellt ist die Paracetamolabnahme über 24h an der HPLC (Abb. 35). Aus der Kalibrationsgerade ($y = 0,000041x$, vgl. Abb. 18) lässt sich daraus die entsprechende Konzentrationsabnahme von $5,7\mu\text{M}$ berechnen.

Auch bei Paracetamol ist eine Reduktion über die Zeit in Anwesenheit des Rhizoms von *Phragmites australis* zu beobachten. Die Abnahme über die 24 Stunden verläuft kontinuierlich und deutlich. In der Zeitspanne von 9-24h ist zwar auch bei der Kontrolle ohne Rhizom eine Abnahme festzustellen, jedoch wesentlich geringer als mit Rhizom. Während in Anwesenheit des Rhizoms sofort nach einer Stunde eine Abnahme zu erkennen ist, ist bei der Kontrolle in den ersten Stunden keine weitere Abnahme festzustellen.

Bei Ibuprofen wurde insgesamt eine Konzentrationsabnahme von $29\mu\text{M}$ und bei Diclofenac von $9,4\mu\text{M}$ festgestellt. Bei Paracetamol lag die Konzentrationsabnahme bei $5,4\mu\text{M}$, wobei hier die Ausgangskonzentration $10\mu\text{M}$ betrug, bei Ibuprofen und Diclofenac $100\mu\text{M}$. Im direkten Vergleich wurde Ibuprofen bei gleicher Ausgangskonzentration wesentlich stärker aufgenommen als Diclofenac.

Spezifische Aktivitäten der Ibuprofen- und Diclofenac-Proben

Aus dem Rhizommaterial der Abbaustudien von Ibuprofen und Diclofenac wurde anschließend die spezifische Aktivität der GSTs und der POX bestimmt (vgl. Abb. 36). Die Rhizomprobe aus dem Paracetamol-Abbauversuch wurde zur Metabolitenbestimmung verwendet (vgl. Abb. 37).

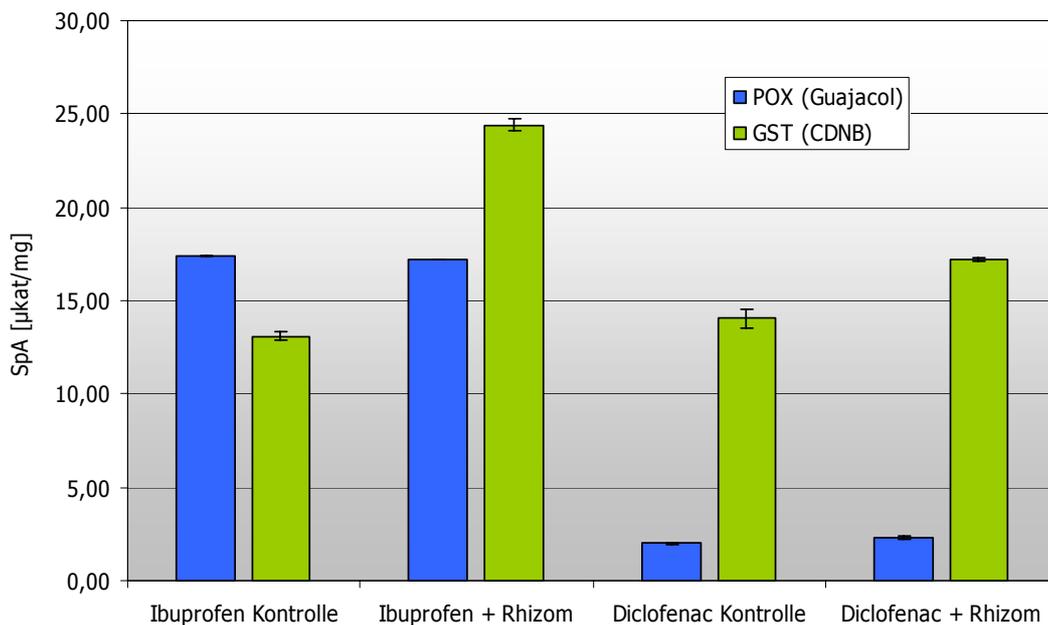


Abb. 36: Spezifische Aktivität GST (Substrat CDNB) und POX (Substrat Guajacol) in $[\mu\text{kat}/\text{mg}]$ bei den *Phragmites australis*-Rhizomen vom Filter an der KA Mörlbach, mit denen die Aufnahme von Ibuprofen und Diclofenac untersucht wurde. $n=3$, gemittelt. Auswertung mit dem Statistikprogramm von Soft MaxPro 4.6.

Man findet in beiden Rhizomen Aktivitäten für GSTs als auch Peroxidasen (vgl. Abb. 36). Beim Ibuprofen-Versuch wurde bei gleicher Ausgangskonzentration mehr Aufnahme verzeichnet ($29\mu\text{M}$) als im Vergleich zum Diclofenac-Versuch ($9,4\mu\text{M}$), was sich auch bei den spezifischen Aktivitäten der jeweiligen inkubierten Rhizome widerspiegelt. Nach Ibuprofen-Inkubation ist im Vergleich zur Kontrolle eine knappe Verdopplung der GST-Aktivitäten festzustellen, während Diclofenac-Gabe lediglich zu 20% höheren GST-Aktivitäten führt. Die POX-Aktivität ist zwar in beiden Rhizomproben unterschiedlich, es gibt aber keine signifikante Veränderung infolge der Aufnahme des jeweiligen Analgetikums.

Untersuchungen zur Aufnahme und Metabolisierung von Paracetamol in *Phragmites australis*

Nachdem die Abnahme von Paracetamol in Anwesenheit von Rhizomstücken von *Phragmites australis* gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 35), stellte sich die Frage nach dem Verbleib des Schmerzmittels im Gewebe. Deshalb wurde das Rhizom auf Rückstände des Analgetikums untersucht. Es sollte dabei nicht nur bestätigt werden, dass das Medikament in die Pflanze aufgenommen wird, sondern auch mögliche Metaboliten des Schmerzmittels, wie sie bei der Entgiftung im tierischen Metabolismus entstehen, nachgewiesen werden.

Nach Aufschluss des Pflanzenmaterials und HPLC-Analyse durch das medizinische Labor Dr. Tiller & Kollegen in München wurde folgendes Chromatogramm erhalten:

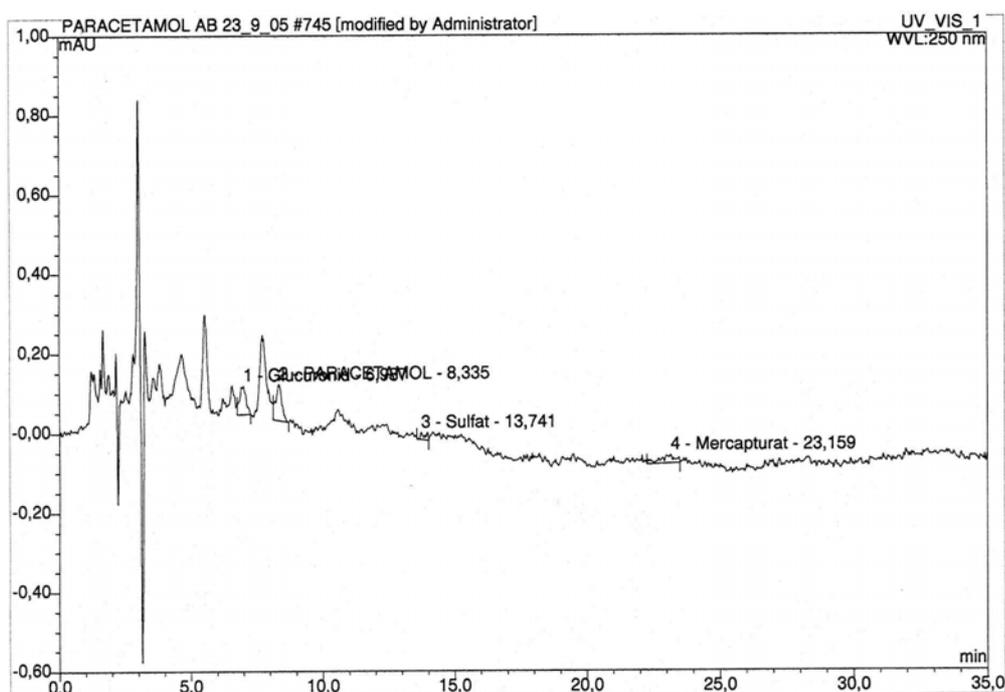


Abb. 37: Chromatogramm der Paracetamolmetaboliten, ermittelt via HPLC (Dionex), in Zusammenarbeit mit dem Labor Dr. Tiller & Kollegen, München.

Tab. 45: Ergebnisse HPLC-Lauf Paracetamol-Metaboliten

Peak Nr.	Name	Zeit [min]	Rel. Area [%]	Menge [mg/L]
1	Glucuronid	6,99	32,91	1,118
2	Paracetamol	8,33	40,60	1,083
3	Sulfat	13,74	6,51	0,100
4	Mercapturat	23,16	19,97	0,182

Detektiert wurden vier Peaks des Paracetamol-Metabolismus: Glucuronid bei 6,99 min, Paracetamol bei 8,33 min, Sulfat bei 13,74 min und Mercapturat bei 23,16 min. Das Glucuronid ist mengenmäßig der Hauptmetabolit (1,083 mg/L), während Sulfat und Mercapturat nur etwa ein Zehntel der Menge dazu ausmachten (0,100 und 0,182 mg/L, vgl. Tab. 45). Die letztgenannten Metaboliten entstammen eindeutig dem GSH-Metabolismus und legen eine Beteiligung von GSTs am Umsatz nahe. Die Pflanze nimmt also aktiv einen Abbau des Medikaments vor, wobei die Produkte bereits nach kurzer Zeit nachweisbar sind (Inkubationszeit gesamt: 24 h).

Ibuprofen- und Safener-Experimente im Hinblick auf GSTs

Ibuprofen-Experimente im Hinblick auf GSTs

Nach den Erfolg versprechenden Experimenten mit induzierten Rhizomstücken wurde durch Inkubationsversuche mit dem Schmerzmittel Ibuprofen versucht, eindeutige Reaktionsmuster der GST-Aktivität durch Besprühung der Schilfpflanzen mit dieser Substanz festzustellen. Aktivitätsbestimmungen von GSTs mit den Substraten CDNB, DCNB und NBoC nach Ibuprofen-Behandlung bei *Phragmites australis*-Pflanzen aus der KA Mörlbach und von Klonmaterial vom Pflanzenvermehrer BioPlanta sind nachfolgend im Vergleich dargestellt (Abb. 38, Abb. 39 und Abb. 40).

Kontrolle und Behandlung der verschiedenen Schilfpflanzen stehen jeweils nebeneinander zum Vergleich (Abb. 38). Dabei fällt auf, dass sowohl die Pflanzen von BioPlanta als auch aus Mörlbach 24 h nach der Behandlung eine erhöhte spezifische GST-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen aufweisen. Während die GSTs bei Blättern von BioPlanta-Pflanzen etwa verdoppelt wird (30 zu 60 $\mu\text{kat}/\text{mg}$), wird sie bei den Blättern der Mörlbach-Pflanzen sogar mehr als versechsfacht (20 zu 129 $\mu\text{kat}/\text{mg}$). Nach 72 h ist die Aktivität bei den Blättern zwar immer noch gegenüber der Kontrollen erhöht, die Werte liegen aber unter den bei 24 h gemessenen Werten, sowohl bei BioPlanta-Pflanzen (15 zu 55 $\mu\text{kat}/\text{mg}$), als auch bei Mörlbach-Pflanzen (5 zu 70 $\mu\text{kat}/\text{mg}$).

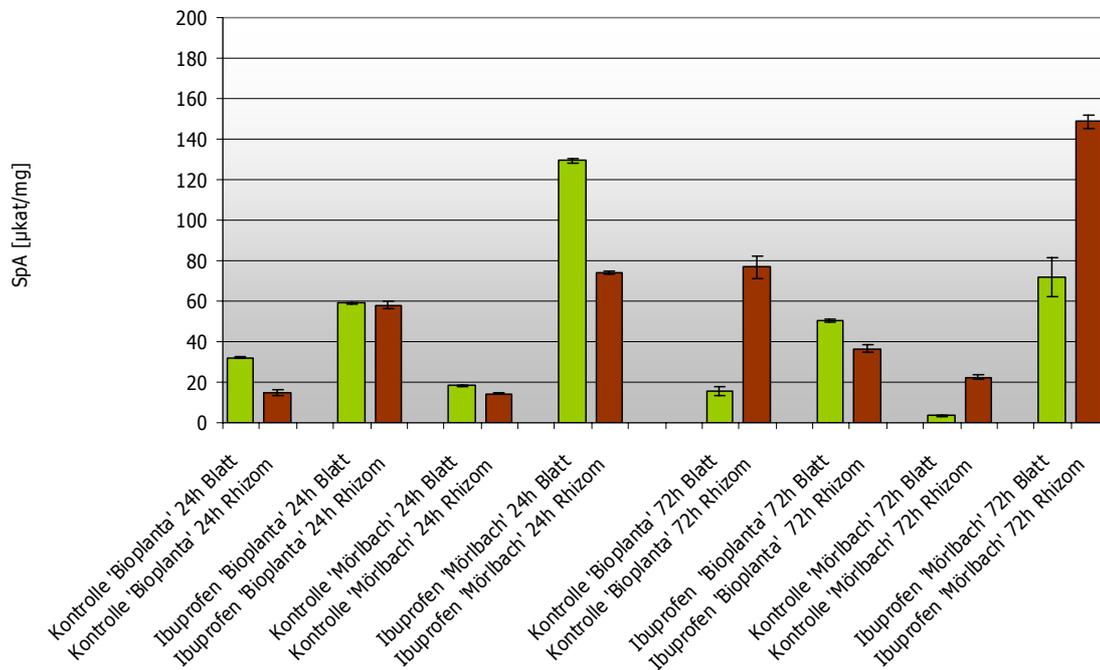


Abb. 38: Spezifische Aktivität GSTs (Substrat CDNB) in [µkat/mg], Kontrolle und Ibuprofen-Behandlung (100 mM). n=3, gemittelt. Auswertung mit dem Statistikprogramm von Soft MaxPro 4.6.

Bei den Rhizomproben aus Mörlbach kann sowohl nach 24h, als auch nach 72h eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität festgestellt werden, während bei den BioPlanta-Proben zwar nach 24h eine transiente Steigerung der GSTs ersichtlich wird, die aber nach 72h nur noch im Blattmaterial zu erkennen ist, während die GSTs im Rhizom zu 50 % gehemmt ist (Abb. 38). Bei den Geweben der Mörlbach-Pflanzen sind eine Steigerung nach 24h und eine weitere Steigerung nach 72h, v.a. bei den Rhizomen zu erkennen. Die GST-Aktivitäten in den durch Vorbelastung an der Kläranlage beeinflussten Pflanzen reagieren also erheblich stärker und stabiler als die Pflanzen aus dem unbeeinflussten Klonmaterial von BioPlanta.

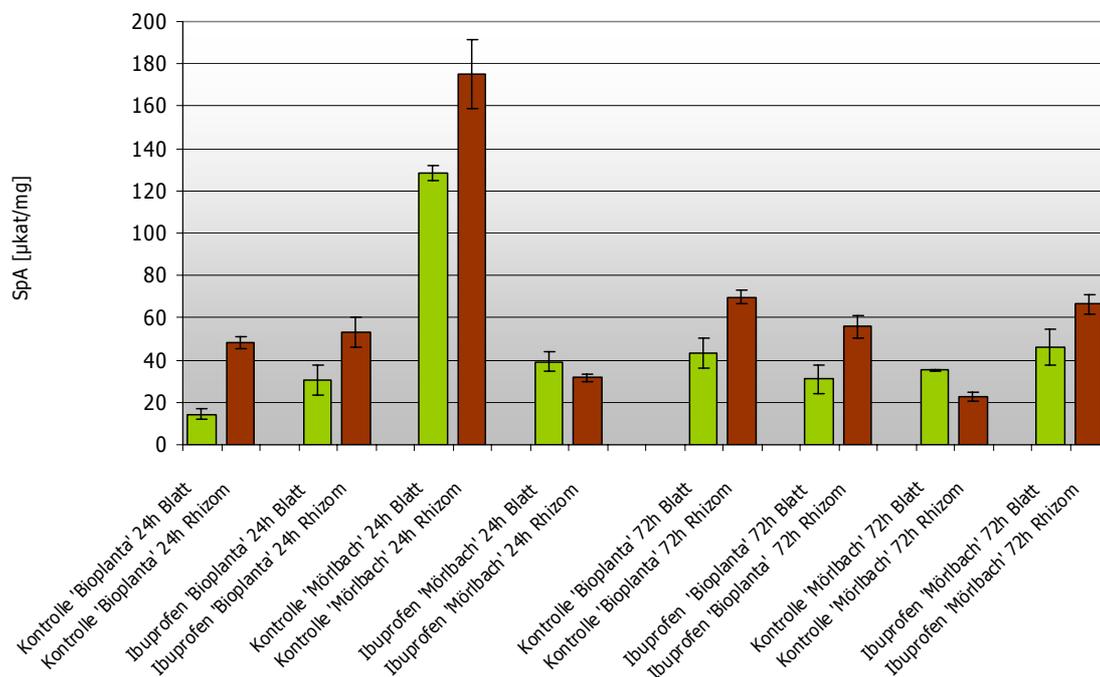


Abb. 39: Spezifische Aktivität GSTs (Substrat DCNB) in [µkat/mg], Kontrolle und Ibuprofen-Behandlung (100 mM). n=3, gemittelt. Auswertung mit dem Statistikprogramm von Soft MaxPro 4.6.

Bei Messungen mit dem Substrat DCNB (Abb. 39) ist zu erkennen, dass sich die GST-Aktivitäten beim Blatt der BioPlanta-Pflanzen 24h nach Ibuprofen-Applikation verdoppeln. Bei den Rhizom-Aktivitäten ist keine signifikante Erhöhung zu beobachten. Der Effekt in den Blättern ist nach 72h nicht mehr zu erkennen. Bei den Mörlbach-Proben ist nach 24h eine Hemmung der GST-Aktivitäten bei Blatt und Rhizom im Vergleich zu den Kontrollen gegeben. Die Aktivitäten steigen hier so hoch an, dass sie durch anderweitig induzierte Stressreaktionen überlagert scheinen. 72h nach der Ibuprofen-Applikation konnte jedoch eine Steigerung der GST-Aktivitäten zu den Werten nach 24h (Erhöhung um etwa 30%) und den Kontrollen (Verdopplung) festgestellt werden.

In Abbildung 40 ist abschließend die GST-Aktivitätsbestimmung nach Ibuprofen-Behandlung mit dem Substrat pNBoC dargestellt. Hier kann, anders als bei DCNB, eine Verdopplung der Aktivitäten bei beiden Geweben (Blatt und Rhizom) in den BioPlanta-Proben beobachtet werden. Bei den Mörlbach-Pflanzen ist dahingegen keine Veränderung im Vergleich zu den Kontrollen festzustellen. Nach 72h nach der Ibuprofen-Applikation kann dann aber bei beiden Geweben der BioPlanta-Pflanzen eine sehr starke

Steigerung der GST-Aktivitäten, etwa um ein Fünffaches, festgestellt werden. Bei den Mörlbach Proben kommt es zu diesem Zeitpunkt zu einer Steigerung der Aktivitäten der Rhizome um ein Drittel.

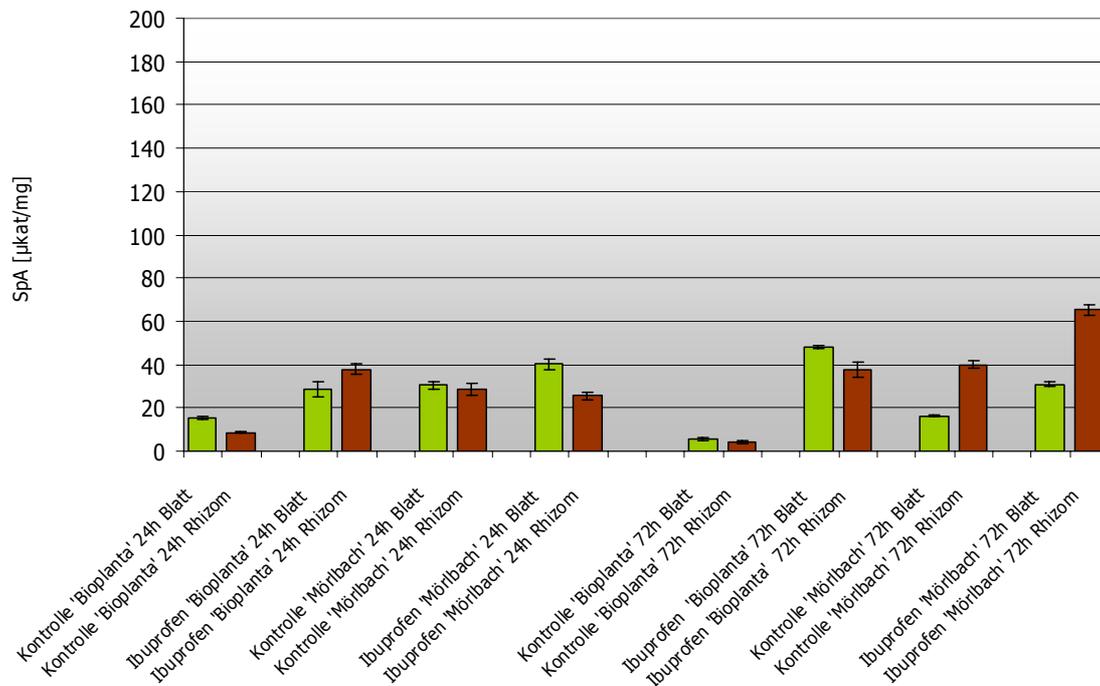


Abb. 40: Spezifische Aktivität GSTs (Substrat NBoC) in [µkat/mg], Kontrolle und Ibuprofen-Behandlung (100 mM). n=3, gemittelt. Auswertung mit dem Statistikprogramm von Soft MaxPro 4.6.

Abgebildet wurden die GST-Substrate CDNB, DCNB und pNBoC im Vergleich (Abb. 38, Abb. 39 und Abb. 40). Interessant ist zu beobachten, dass die spezifischen Aktivitäten nicht eindeutig und unterschiedlich durch die verwendeten Substrate abbilden werden konnten, obwohl es sich um identisches Probenmaterial handelte. Jedes Substrat zeigt andere Aktivitäten und kann nicht ersatzweise ohne Verluste bei der GST-Beschreibung verwendet werden. Die Substrate bewirken auch in den absoluten Aktivitäten starke Unterschiede, wobei durch das Substrat CDNB immer wesentlich höhere Aktivitäten detektiert werden. Es kann aber festgestellt werden, vor allem bei den BioPlanta-Proben nach 24h und den Mörlbach-Proben nach 72h, dass bei den Substraten CDNB und NBoC tendenziell ähnliche Ergebnisse in der Reaktion der GSTs detektiert werden können.

Safenerexperimente

Um die Ergebnisse vorgenannter Experimente zu bestätigen, wurden Versuche mit Safenern unternommen, da diese in der Literatur als gute Induktoren für pflanzliche Entgiftungsenzyme gelten (vgl. SCALLA&ROULET, 2002; SCARPONI&DELBUONO, 2005). Dazu wurden zunächst Vorversuche mit abgeschnittenen Blättern und schließlich mit ganzen Pflanzen vorgenommen. Verwendet wurden je nach Versuch sowohl *Phragmites australis*-Pflanzen aus Mörlbach als auch Klone von BioPlanta.

Blatt-Induktionsversuch

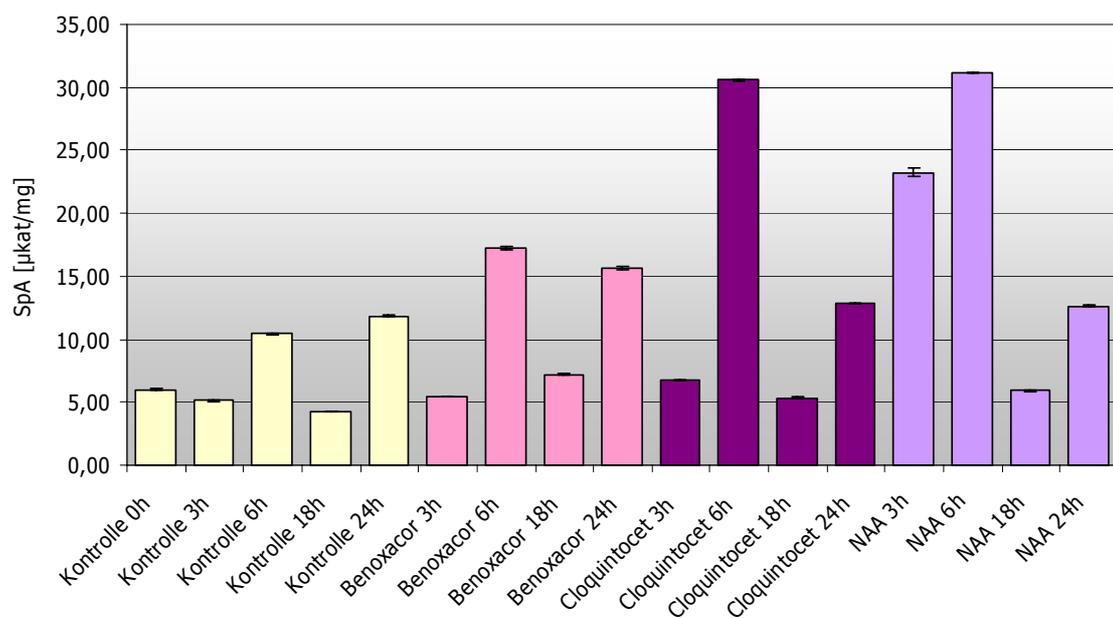


Abb. 41: Spezifische Aktivität GSTs (Substrat CDNB) in [µkat/mg], Behandlung mit den Safener Benoxacor Cloquintocet-mexyl und NAA, Blatt-Induktionsversuch mit *Phragmites australis* vom Filter an der KA Mörlbach. n=3, gemittelt. Auswertung mit dem Statistikprogramm von Soft MaxPro 4.6.

In Abbildung 41 sind die Ergebnisse der Bestimmung der spezifischen Aktivität von GSTs für das Substrat CDNB bei Kontrollen und Behandlungen der Blätter von *Phragmites australis* aus Mörlbach dargestellt. Im Vergleich zur Kontrolle kann man nach Behandlung mit Naphthyllessigsäure (NAA) nach 3h einen signifikanten Anstieg der Aktivität des Entgiftungsenzyms GST erkennen. Eine sichere Induktion der GST-Aktivität erhält man nach 6h mit allen getesteten Safenern, wobei Cloquintocet-mexyl und NAA die höchsten Aktivitätssteigerungen bewirken. Diese Reaktion ist bei allen Behandlungen

nach 18h komplett verschwunden und tritt nach 24h nur bei Benoxacor erneut auf. Die Aktivitätssteigerungen bleiben also transient und sind nach 6h maximal ausgeprägt.

Safener-Induktionsversuch 1

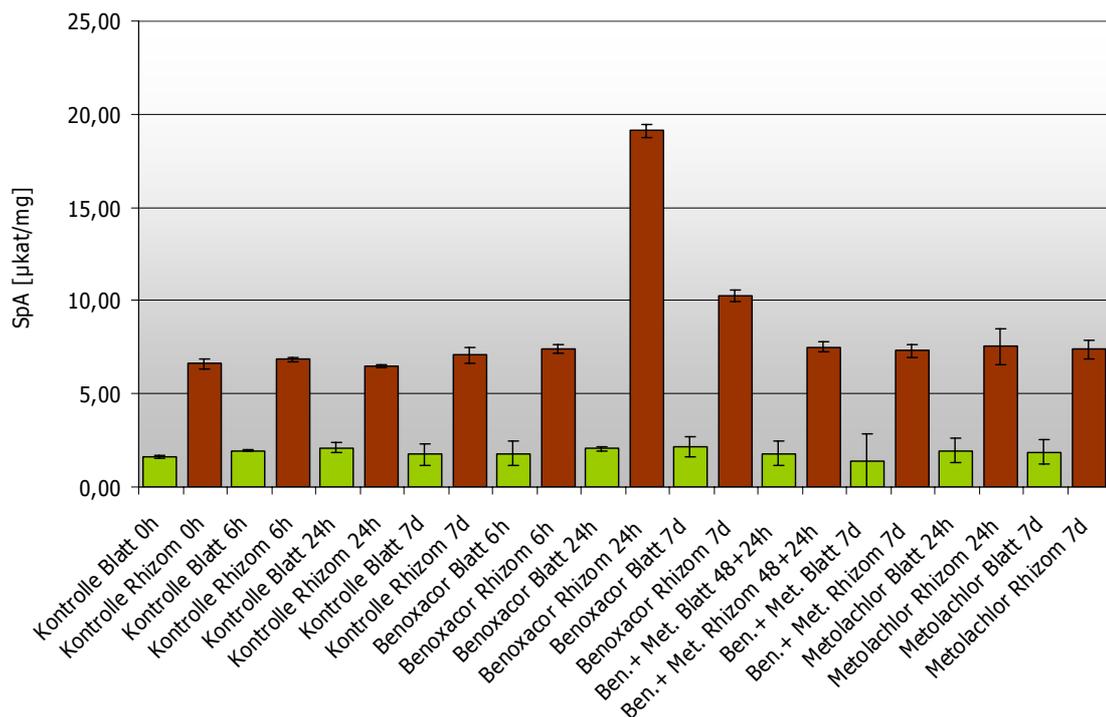


Abb. 42: Spezifische Aktivität GSTs (Substrat CDNB) in [µkat/mg] bei *Phragmites australis* vom Filter an der KA Mörlbach, Safener-Induktionsversuch1 (Ben. = Benoxacor, Met. = Metolachlor) mit ganzen Pflanzen. n=3, gemittelt. Auswertung mit dem Statistikprogramm von Soft MaxPro 4.6.

Beim Induktionsversuch 1, der im Gegensatz zum vorherigen Versuch bereits an ganzen Pflanzen mit dem Safener Benoxacor und dem Herbizid Metolachlor durchgeführt wurde, kann einzig eine Reaktion bei den Rhizomen auf den Safener Benoxacor nach 24h beobachtet werden (Abb. 42). Die Reaktion führt zu einer etwa dreifach höheren spezifischen Aktivität der GSTs als die der Kontrollen. Sie ist auch noch nach 7 Tagen sichtbar, wenn auch nicht mehr ganz so ausgeprägt, aber immer noch höher als bei den Kontrollpflanzen. Bei den Blättern kann zu keinem Zeitpunkt eine Reaktion auf die Behandlungen erkannt werden, obwohl die Applikation der Spritzlösungen direkt auf die Blätter ausgebracht worden ist.

Safener-Induktionsversuch 2

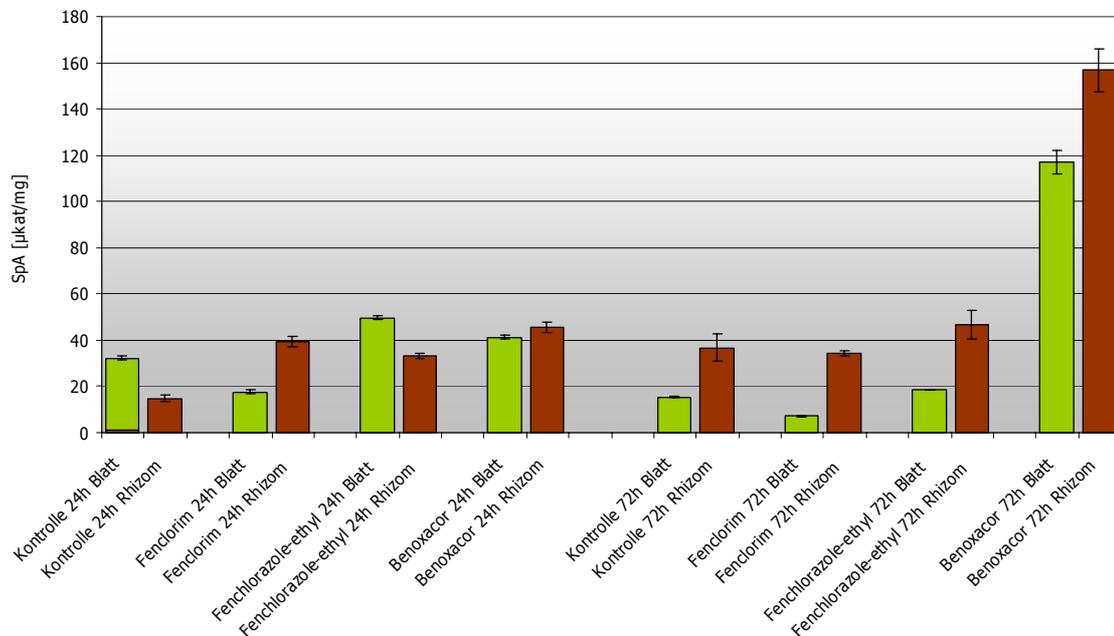


Abb. 43: Spezifische Aktivität GSTs (Substrat CDNB) in [µkat/mg] bei Blatt und Rhizom von *Phragmites australis* (BioPlanta), verschiedene Safener, Safener-Induktionsversuch 2. n=3, gemittelt. Auswertung mit dem Statistikprogramm von Soft MaxPro 4.6.

Nun wurde ein weiterer Induktionsversuch mit Safenern durchgeführt, bei dem ganze Pflanzen von BioPlanta mit verschiedenen Safenern behandelt wurden (Abb. 43). Hier werden im Vergleich zum Safener-Induktionsversuch 1 wesentlich höhere Aktivitäten gemessen (bis zu 160 µkat/mg beim Rhizom der Benoxacor-Behandlung, vgl. Abb. 42). Bei den Blättern und den Rhizomen kann nur bei der Benoxacor-Behandlung nach 72 h ein signifikanter Anstieg der Aktivitäten, sowohl bei den Blättern, als auch bei den Rhizomen beobachtet werden. Dieser Anstieg der Aktivitäten war nach 24 h noch nicht zu beobachten. Die Behandlungen mit Fenclorim zeigte eine Verdopplung der GST-Aktivität und bei den Rhizomen nach 24 h, eine Hemmung bei den Blättern. Nach 72 h zeigt sich im Vergleich zu den Kontrollen beim Safener Fenclorim keine weitere Aktivitätssteigerung. Bei Behandlung mit dem Safener Fenclorazole-ethyl wurde eine Verdopplung der GST-Aktivitäten in beiden Geweben nach 24 h festgestellt, die aber nach 72 h wieder verschwunden war (Abb. 43). Aufgrund der starken Aktivitätserhöhung in dem Gewebe wurde diese Rhizomprobe (Benoxacor-Behandlung, 72 h) für weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der Entgiftungsenzyme und zur Isolierung der RNA herangezogen.

2D-Gelelektrophorese

Es stellte sich die Frage, ob die deutlichen Veränderungen der GST-Aktivität bei der Safenerbehandlung mit Benoxacor auf Änderungen der Isoenzyme zurückzuführen sind. Verwendet wurden Rhizomproben aus der Benoxacor-Behandlung und deren Kontrolle nach Affinitätschromatographie, bei der die Rhizome eine besonders hohe spezifische Aktivität im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle zeigten (vgl. Abb. 43). Diese Proben wurden verwendet, da man bereits bei der Enzymmessung gesehen hatte, dass sich hier der Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlung im Hinblick auf den Status der GSTs besonders gut beobachten lässt.

Nachfolgend sind beide Proben im direkten Vergleich dargestellt (Abb. 44):

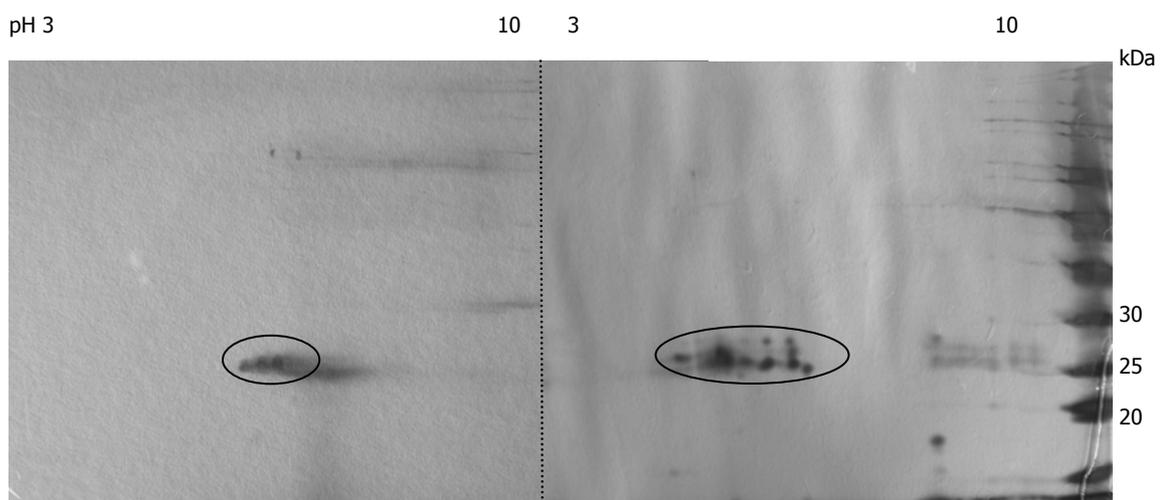


Abb. 44: Vergleich von *Phragmites australis* Rhizomproben Kontrolle (links) und nach Benoxacor-Behandlung (100 mM, nach 72 h, rechts). n=3, gemittelt. Auswertung mit dem Statistikprogramm von Soft MaxPro 4.6., molekularer Marker rechts.

Tatsächlich lässt sich der Unterschied, der bei der Messung der spezifischen Aktivität gemessen wurde (vgl. Abb. 43), in der 2D-Gelelektrophorese sichtbar machen. GST-Monomere, wie sie bei der Auftrennung entstehen, haben ein natives Molekulargewicht von ca. 25 kDa. Man kann hier anhand des Markers genau erkennen, dass es sich bei den silbergefärbten Spots um Proteine dieser Größe handelt, die bei einem pH von etwa 5-7 auftreten (Abb. 44). Links im Bild zeigt sich der Status der GSTs vor der Behandlung, die deutlich drei prominente und wenige undeutliche Spots mit einer Größe von etwa 25 kDa aufweisen. Beim Gel mit den Benoxacor behandelten Rhizomen und Auftragung der gleichen Proteinkonzentrationen erkennt man die dazu weit höhere Anzahl an GST-Spots.

Western Blots

Western Blots Benoxacor

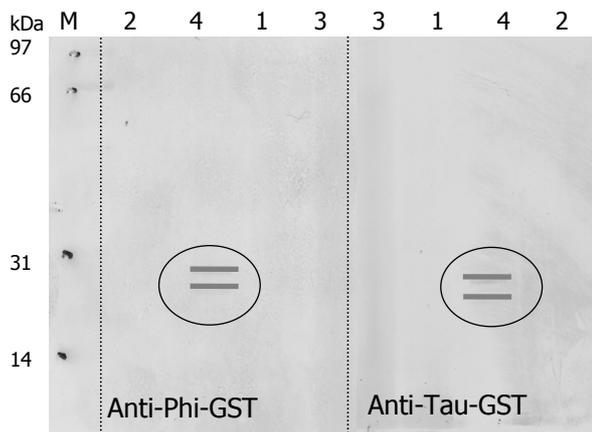


Abb. 45: Western Blots Rhizomproben (*Phragmites australis*, Mörlbach) aus dem Safener-Induktionsversuch 1 (Benoxacorbehandlungen), 1 = Blatt unbehandelt, 2 = Rhizom unbehandelt, 3 = Blatt behandelt, 4 = Rhizom behandelt. Zur Verdeutlichung wurden die beiden Banden in den Blots leicht nachgefärbt.

Dieser Western Blot wurde mit *Phragmites australis*-Proben aus dem Safener-Induktionsversuch 1 durchgeführt (Abb. 45). Dazu wurden die Proben (Blatt und Rhizom, behandelt mit Benoxacor und unbehandelte Kontrollen) zuerst auf ein Gel aufgetragen, nach Größe (Molekulargewicht) getrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran gezogen, die dann mit Anti-Phi- und Anti-Tau-GSTs inkubiert wurde (vgl. Material&Methoden). Bei den Blattproben sind keine Banden für Phi- oder Tau-GSTs zu erkennen, ganz gleich ob sie behandelt waren oder nicht. Einzig bei den mit Benoxacor behandelten Rhizomproben, die auch die stark erhöhte spezifische Aktivität bei der GST-Messung gezeigt hatte (vg. Abb. 43), sind zwei Banden in der Größe von ca. 20-30 kDa zu erkennen, sowohl für Phi-, als auch für Tau-GSTs (Abb. 45).

Western Blots verschiedener Safener und Ibuprofen

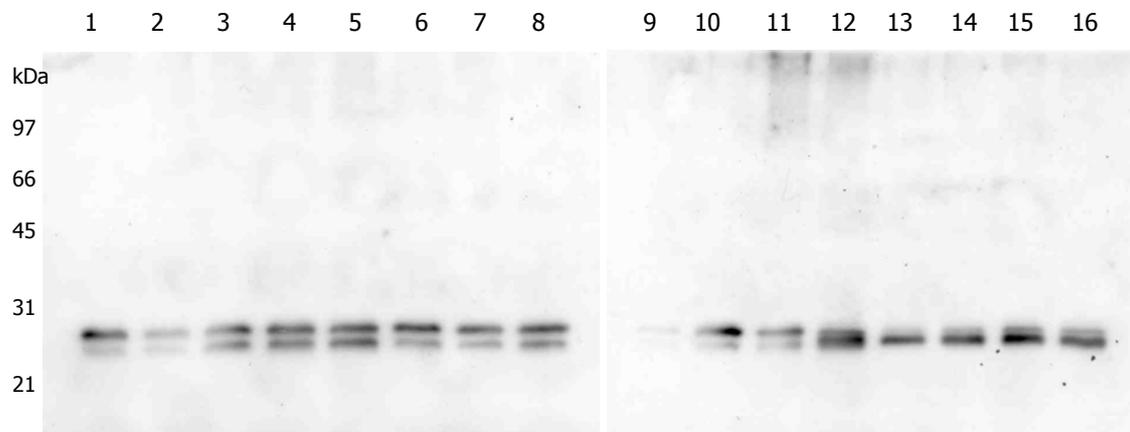


Abb. 46: Western Blots Blattproben (*Phragmites australis*) aus dem Safener-Induktionsversuch 2 und dem Ibuprofen-Experiment (Kontrollen und Behandlungen), verwendetet wurde der Anti-Phi GST Antikörper; 1 = Kontrolle 'Mörlbach' 0h, 2 = Kontrolle 'Mörlbach' 24h, 3 = Kontrolle 'Mörlbach' 72h, 4 = Ibuprofen 'Mörlbach' 24h, 5 = Ibuprofen 'Mörlbach' 72h, 6 = Ibuprofen 'BioPlanta' 24h, 7 = Ibuprofen 'BioPlanta' 72h, 8 = Fenchlorazol-ethyl 'BioPlanta' 24h, 9 = Fenchlorazol-ethyl 'BioPlanta' 72h, 10 = Metolachlor 'BioPlanta' 24h, 11 = Metolachlor 'BioPlanta' 72h, 12 = Fenclorim 'BioPlanta' 24h, 13 = Fenclorim 'BioPlanta' 72h, 14 = Kontrolle 'BioPlanta' 0h, 15 = Kontrolle 'BioPlanta' 24h, 16 = Kontrolle 'BioPlanta' 72h.

Wenn Blattproben aus dem Safener-Induktionsversuch 2 und dem Ibuprofen-Experiment (Abb. 46) nach Auftrennung im Gel und Blotten auf Membranen mit Anti-Phi-GST-Antikörpern inkubiert wurden, waren zwei deutliche Banden in der Größe von etwa 25-27kDa zu erkennen. Nachdem der Antikörper spezifisch nur an GSTs der Phi-Klasse bindet, handelt es sich dabei um monomere Untereinheiten von GSTs. Die Spuren 1, 2 und 3 (Abb. 46) sind Kontrollen der Blattproben aus dem Ibuprofen-Experiment mit Pflanzen aus Mörlbach nach 0, 24 und 72h. Ähnlich wie in den Aktivitäten ist auch hier ein Grundlevel an Phi-GSTs zu beobachten. Spur 4 und 5 (Abb. 46) zeigen dann die Ibuprofen-Behandlung der Blätter nach 24 und 72h im Vergleich. Die beiden GST-Banden sind auch hier sichtbar, sogar in deutlich dunklerer Färbung. Rechts daneben (Spur 6 und 7, Abb. 46) zeigt die Ibuprofen-Behandlung an BioPlanta-Pflanzen nach 24 und 72h. Dabei sind zwei Banden zu erkennen, bei denen die kleinere Untereinheit als Bande etwas schwächer ausgeprägt ist. Die Kontrollen dazu nach 0, 24 und 72h der BioPlanta-Pflanzen sind am Ende des Blots in den Spuren 14, 15 und 16 (Abb. 46) dargestellt. Im Vergleich zu den Behandlungen mit Ibuprofen ist dabei erkennbar, dass die kleinere Untereinheit deutlicher ausgeprägt ist während die obere wesentlich schwächer ausgeprägt ist als bei den Behandlungen. Die unterschiedliche Ausprägung

der Banden bei Kontrolle und Behandlung, die auch schon bei den Aktivitätsmessungen zu beobachten war, wird somit sichtbar. Die Spuren 8 bis 14 (Abb. 46) zeigen Behandlungen der Blätter aus dem Safener-Induktionsversuch 2 mit Fenchlorazol-ethyl (8, 9, Abb. 46), Fenclorim (12, 13, Abb. 46) und auch eine Behandlung mit dem Herbizid Metolachlor (10, 11, Abb. 46) jeweils nach 24 und 72 h. Nach 24 h sind bei Fenchlorazol-ethyl starke Banden zu sehen, die aber nach 72 h deutlich schwächer ausfallen und mit den Aktivitätsmessungen bei den Blättern der Behandlungen übereinstimmen (vgl. Abb. 43). Auch bei der Behandlung mit dem Herbizid sind zwei Banden zu sehen, bei der die obere Bande stärker ausgeprägt ist. Bei den Behandlungen mit dem Safener Fenclorim ist dahingegen nach 24 und 72 h (13, 14, Abb. 46) vor allem die untere Bande gut ausgeprägt, nach 24 h deutlicher als nach 72 h.

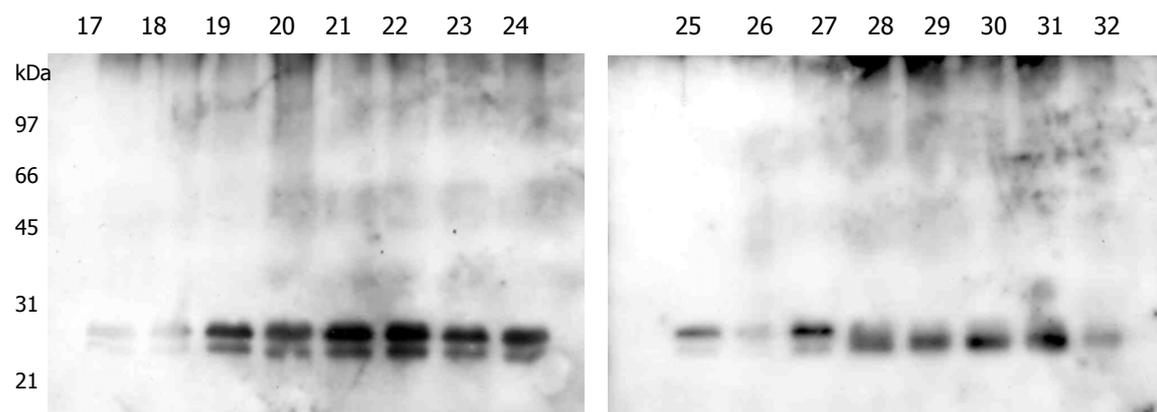


Abb. 47: Western Blots Rhizomproben (*Phragmites australis*) aus dem Safener-Induktionsversuch 2 und dem Ibuprofen-Experiment (Kontrollen und Behandlungen), verwendetet wurde der Anti-Phi GST Antikörper; 17 = Kontrolle 'Mörlbach' 0h, 18 = Kontrolle 'Mörlbach' 24h, 19 = Kontrolle 'Mörlbach' 72h, 20 = Ibuprofen 'Mörlbach' 24h, 21 = Ibuprofen 'Mörlbach' 72h, 22 = Ibuprofen 'BioPlanta' 24h, 23 = Ibuprofen 'BioPlanta' 72h, 24 = Fenchlorazol-ethyl 'BioPlanta' 24h, 25 = Fenchlorazol-ethyl 'BioPlanta' 72h, 26 = Metolachlor 'BioPlanta' 24h, 27 = Metolachlor 'BioPlanta' 72h, 28 = Fenclorim 'BioPlanta' 24h, 29 = Fenclorim 'BioPlanta' 72h, 30 = Kontrolle 'BioPlanta' 0h, 31 = Kontrolle 'BioPlanta' 24h, 32 = Kontrolle 'BioPlanta' 72h.

Die Western Blots der Rhizomproben aus dem Safener-Induktionsversuch 2 und dem Ibuprofen-Experiment (Abb. 47), ebenfalls mit einem Anti-Phi-GST-Antikörper, zeigen Banden in der Größe von etwa 25-27 kDa, zumeist sogar zwei deutliche Banden. In den ersten drei Spuren des Blots (17, 18 und 19, Abb. 47) sind die Kontrollen der Pflanzen aus Mörlbach aus dem Safener-Induktionsversuch 2, bei 0, 24 und 72 h abgebildet. Deutlich zu erkennen ist, dass nach 0 und 24 h nur sehr schwache Banden vorhanden sind, die nach 72 h vor allem bei der oberen Bande stärker ausgeprägt sind. Dieses Ergebnis geht konform mit den Ergebnissen aus der Aktivitätsmessung (vgl. Abb. 43),

bei der bei den Kontrollen in den Rhizomen ebenfalls eine Steigerung der GST-Aktivität von 24 nach 72h festgestellt wurde. Sehr ausgeprägte Banden zeigen sich bei allen Ibuprofen-Behandlungen bei den Rhizomen nach 24 und 72h, sowohl bei den *Phragmites australis*-Pflanzen aus Mörlbach (Spur 20, 21, Abb. 47) als auch von BioPlanta (Spur 22 und 23, Abb. 47). Bei diesen Behandlungen scheinen die Phi-GSTs deutlicher anzusteigen als die Enzyme in den Kontrollen (vgl. Abb. 38). Bei allen Aktivitätsmessungen mit den verschiedenen Substraten (CDNB, DCNB und NBoC) konnte diese Steigerung beobachtet werden, sowohl bei Pflanzen aus Mörlbach als auch von BioPlanta (vgl. Abb. 39 und Abb. 40). Die Kontrollen der BioPlanta-Rhizome sind wie bei den Blattproben nach 0, 24 und 72h am Ende der Blots in den Spuren 30, 31 und 32 (Abb. 47) abgebildet. Sie zeigen im Vergleich zu den Behandlungen ebenfalls schwächer ausgeprägte Phi-GST-Banden. Die Spuren 24 und 25 (Abb. 47) zeigen die Rhizomproben des Safener-Induktionsversuches² mit Fenchlorazol-ethyl nach 24 und 72h. Genau wie bei der GST-Aktivitätsbestimmung (vgl. Abb. 43), sind die Banden bei 24h stärker ausgeprägt als nach 72h. Die Spuren 28 und 29 (Abb. 47) zeigen die Fenclozim-Behandlungen nach 24 und 72h. Hier sind ebenfalls Banden bei etwa 25kDa zu erkennen, jedoch nicht so gut unterscheidbar in Untereinheiten, ähnlich den Kontrollen. Wie auch bei der Aktivitätsbestimmung sind hier in der Dauer der Behandlung eine Veränderung nur nach 24h zu beobachten (vgl. Abb. 43). Für die Metolachlor-Behandlungen liegen keine Aktivitätsmessungen vor, man erkennt aber auch hier anhand der Färbung von einer Bande nach 72h (Spur 27, Abb. 47), dass hier Phi-GSTs nachgewiesen wurden.

Gut zu erkennen sind die beiden Banden in fast allen Blots. Da die Blots mit Antikörper gegen Phi-GSTs durchgeführt wurden, wird hier ersichtlich, dass die Phi-GSTs aus zwei Untereinheiten von etwa 25kDa besteht, wobei jeweils eine Bande etwas unterhalb, die andere etwas oberhalb dieser Größe liegt (vgl. Abb. 46 und Abb. 47).

RNA Isolierung, mRNA Isolierung, cDNA Herstellung und Klonierung von GST-Sequenzen

Die RNA aus den Benoxacor behandelten Rhizomproben (72 h, vgl. Abb. 43) wurde mit Hilfe des RNeasyMiniKits (Qiagen) isoliert. Dazu wurden mehrere Proben aus der Probepflanze verwendet, die nach der RNA-Gewinnung vereint wurden. Es wurden damit 265 μ L RNA in wässriger Lösung erhalten. Durch Messungen am Photometer (260 nm: Abs. 0,097, 280 nm: Abs. 0,067) wurde eine Konzentration von 155,2 μ g/mL RNA in der vereinten Probe festgestellt. In den 256 μ L RNA-Lösung befanden sich somit 41,1 μ g reine RNA. Aus diesen 256 μ L wurde anschließend die mRNA mit Hilfe des Dynabeads mRNA Purification Kit (DynaBeads) isoliert. Die Ausbeute dabei betrug 10 μ L mRNA, deren Konzentration mit dem Nanodrop-Photometer auf 39,6 μ g/mL bestimmt wurde.

Zur Generierung der cDNA wurde 1 μ L der hergestellten mRNA verwendet. Zur Herstellung diente der Og2-Primer (Promega) mit Hilfe der PCR. Dabei wurde nach 18 Zyklen ein guter cDNA-Schmier als Basis gewonnen (vgl. Abb. 48).

Die DNA wurde durch PCR mit distinkten Primern vervielfältigt, um die Regionen zu finden an die die Primer bevorzugt (Phi-, Tau- und Lambda-GSTs) binden. Abbildung 48 zeigt die PCR-Läufe mit den unterschiedlichen Primerkombinationen.

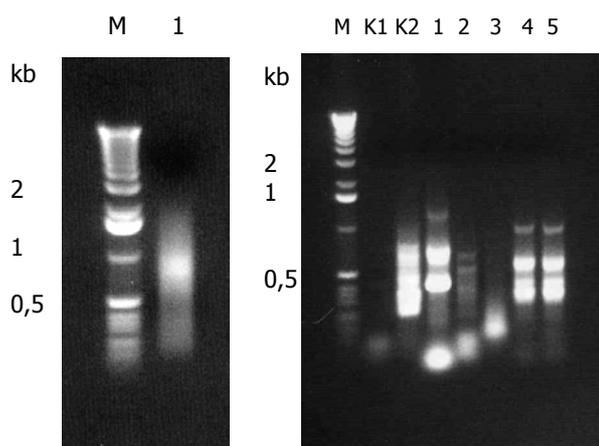


Abb. 48: Links: 1 = Deutlicher cDNA-Schmier; Rechts: Primerproben nach PCR: K1 = Negativkontrolle ohne Template; K2 = Positivkontrolle PaSUS (Sucrose); 1 = F1 + F2 (Phi-GSTs); 2 = L1a + L2 (Lambda-GSTs); 3 = L1b + L2 (Lambda GSTs); 4 = U1a + U2 (Tau-GSTs); 5= U1a + U2 (Tau -GSTs), M = molekularer Marker.

Es folgte eine nochmalige Auftrennung der Proben, um DNA-Banden sichtbar zu machen, die dann unter dem Transilluminator ausgeschnitten und mit dem Prep-A-Gene DNA Purification Kit (BioRad) aus dem Agarosegel wieder isoliert wurden. Vor allem die Phi-GSTs wurden deutlich amplifiziert (Abb. 48), weniger stark aber auch Tau- und Lambda-GSTs. Die Größe entspricht der Primerkonstruktgröße mal der Amplifikation. Die isolierte DNA aus den PCR-Produkten wurde mit Hilfe des pGEM-TEasyVectorSystem I (Promega) in den pGEM-T-Vektor (Promega) eingebracht. Zur Aufnahme von Fremd-DNA musste die zirkuläre Plasmid-DNA zunächst linearisiert werden und das Plasmid dann in kompetente Zellen (Top10, Invitrogen) erfolgreich eingebracht werden (vgl. Blau-Weiß-Screening, Abb. 24). Sequenzierfähige DNA wurde schließlich aus drei Proben, 1x Phi- und 2x Tau-GSTs gewonnen (Abb. 49). Davon wurden je sechs Kolonien gepickt (18 Ansätze insgesamt, vgl. Abb. 49).

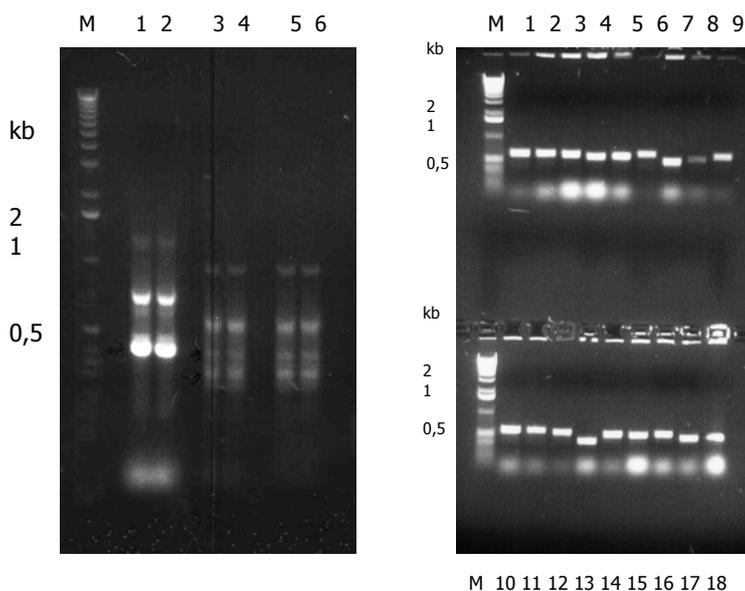


Abb. 49: Links: Auftrennung der PCR-Proben von Phi-GSTs (1+2) und Tau-GSTs (3-6) nach Größe in einem Agarose-Gel zum Ausschneiden der Banden zur DNA-Extraktion. Rechts: 18 Ansätze der isolierten DNA nach PCR. Je sechs Kolonien waren Phi-GSTs (1-6), 12 für Tau-GSTs (7-12 Tau1, 13-18 Tau2).

Aus den Läufen wurden je zwei DNA-Proben für Phi-GSTs (2 und 6), für Lambda-GSTs (7 und 10) und Tau-GSTs (12 und 15) ausgewählt und sequenziert. Einzig eine Probe aus der Gruppe der Phi GSTs I (Probe 2) lieferte ein Ergebnis (Abb. 50).

pGEMT-PaGST I:

CGNGNGCAGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATT AATCCGTTTGGGCAGGTGCCTGCTTTG
CAAGATGGTGATTTGTACCTCTGGGAATCACGTGCAATTTGCAAGTATGTAAGCCGCAAAAACAAACCAGAA
TTGTTGAAGCAGGGCGACCTCAAGGAGTCAACAATGGTGGATGTGTGGATGGAAGTGGAGGCCAATCAGT
ACACTTCTGCAATGGATCCCATTTCTTTGAGTGCCTTATCCGTCCGATGCTTGGGGGAACCACTGACCAGA
AAGCTGTCGAGGGGAACCTCGAGAAGCTGAAGAAGGTGCTCGAGGTGTACGAGGCGCGTCTAACCAAGTG
CAAGTACCTGGCTGGAGACTTCATCAGTCTAGCTGATCTTAACCATGTATCTGTCAACCTTTGCTTGTTTGC
GACGCCCCATGCATCTGTGTTGGACGCGTATCCCCATGTCAAGGCCTGGTGAATCACTAGTGAATTCGCG
GCCGCTGCAGGTTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGT
CACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCA
CACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAAT
TGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAAC
GCGCGGGGAGAGCGGTTTTCGATTGGGGCGCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCNCTGCGCTCGGT
CGTTCNGCTGCGGCNAGCGGTATCANCTCAAGGCGGTAATACGGTTATCCACANAATCANGGGATA
ACCCAGGAAANAACATGNNAANCAAAAANGNCNNNCAAAAAGGCCNGNAACCCNNAAAAAGGCCCCNTN

Abb. 50: Ergebnis der Sequenzanalyse aus den Proben von *Phragmites australis*. Die schwarzen Buchstaben kennzeichnen die Aminosäure-Sequenzen des Vektors, die roten Buchstaben stellen die gesuchte Insert-Sequenz dar.

Die erhaltene Sequenz wurde mit der BLAST Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) abgeglichen und lieferte 115 Treffer, alle für GSTs in nah verwandten Pflanzen (Monokotyledonen, vgl. Tab. 46). Die isolierte Sequenz kann aufgrund von Sequenzhomologien mit GSTs aus nah verwandten Monokotyledonen, wahrscheinlich einer GSTF1, also einer Phi-GST, zugeordnet werden. Es wurden dabei keine Homologien zu Dikotyledonen gefunden. Nachfolgend sind einige Pflanzen, mit denen GST-Sequenzhomologien gefunden wurden, aufgelistet:

Tab. 46: Sequenzhomologien zu gefundenen Klonen (aus: Tax BLAST Report)

Pflanze	Homologie	Alignment
<i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-group)	cDNA clone:OSIGCEA041B23	355 (85%)
<i>Hordeum vulgare</i>	mRNA for glutathione-S-transferase I subunit (gstI gene)	281 (83%)
<i>Zea mais</i>	mRNA for glutathione S-transferase I (GST;EC 2.5.1.18)	266 (83%)
<i>Triticum aestivum</i>	mRNA for glutathione transferase F1 (gstf1 gene)	270 (83%)
<i>Triticum aestivum</i>	glutathione S-transferase mRNA	258 (82%)
<i>Pennisetum glaucum</i>	glutathione S-transferase mRNA	244 (82%)

cDNA-Bank aus *Phragmites australis*

Die Proben, die den vielfältigen Untersuchungen zu Anfang zufolge eine erhöhte Aktivität (vgl. Abb. 43) und vermehrt Banden und Spots an GSTs gezeigt haben, wurden als Grundlage zu Anfertigung einer cDNA-Bank verwendet. Zur Herstellung der Bank diente das SMARTcDNA Library Construction Kit (Clontech). Zunächst wurde aus der mRNA der Benoxacor-Proben cDNA hergestellt und durch PCR vervielfältigt.

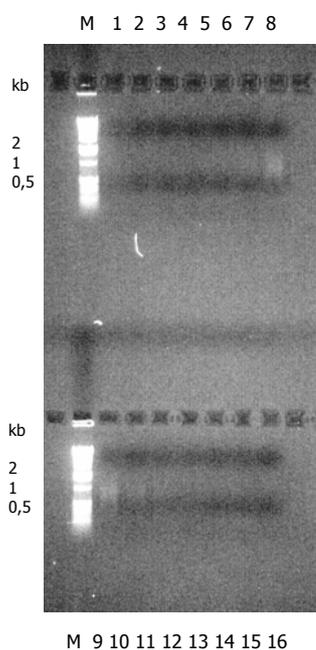


Abb. 51: Größenfraktionierung der DNA-Proben, M = molekularer Marker

Anschließend wurde ein Proteinase K- und Sfi I-Verdau der ds-cDNA durchgeführt und die cDNA dann mit Hilfe der CHROMASPIN-400-Säulen (Clontech) in ihrer Größe fraktioniert. Von den erhaltenen 16 Fraktionen wurde je 1 μ L in ein Gel aufgetrennt, um erkennen zu können, wo cDNA in den einzelnen Fraktionen enthalten ist. Die Fraktionen 7, 8, 9 und 10 zeigten einen cDNA-Schmier (vgl. Abb. 51) und wurden für die Ligation an den Vektor gesammelt (λ TriplEx2, Clontech). Es wurden zwei Ligationsansätze gemacht, mit 0,5 und 1,5 μ L cDNA (vgl. Tab. 39). Das Packen erfolgte über Phagen aus dem Giga Pack III Gold Packaging (Stratagene). Um anschließend die λ -Phagen mit der eingeschleusten Information zu finden, wurde erneut ein Weiß-Blau-Screening vorgenommen. Bei Verdünnung 1:100 wurden 17 Plaques gezählt. Daraus ließ sich der Wert von $1,7 \times 10^6$ pfu/mL für die unamplifizierte cDNA-Bank (vgl. Material & Methoden)

berechnen, durch den wiederum die benötigte Menge Lysat der Bakterienkultur ermittelt werden konnte, um 1×10^5 Plaques pro Petrischale zu bekommen. In der Petrischale der $10\,000\times$ Verdünnung wurden dabei 200 Plaques gezählt, durch die nun der exakte Titer der amplifizierten cDNA-Bank von 1×10^8 pfu/mL ermittelt werden konnte (vgl. Material & Methoden). Der Titer liegt zwar etwas unter dem angestrebten Wert von 1×10^{10} pfu/mL, stellt aber immer noch einen ausreichend guten Titer dar, der als Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen dienen kann (RICHTER, 2003).

IV Diskussion



Abb. 52: Bepflanzter Bodenfilter an der KA Mörlbach im Juli 2005, Ansicht vom unbelüfteten Abwasserteich.

Feldstudie Mörlbach

Die sich im Teich abspielenden, sehr komplexen Vorgänge, die auch pH-Wert-Schwankungen verursachen, wie z.B. die Umwandlung von Ammoniak aus Ammonium oder Algenwachstum, konnten durch den Filter (Abb. 52) verringert und vor allem zu Zeiten hoher Belastung deutlich abpuffert werden. Starke Schwankungen bei den pH-Werten konnten so zu jeder Zeit ausgeglichen werden und auch sehr hohe Werte, von bis zu pH9,5, wurden durch den Filter reduziert und stellten für den Ablauf keine Gefahr mehr dar.

Auch beim BSB₅ konnte für den Filter eine gute Regulierung festgestellt werden. Der Ablaufgrenzwert von 35mg/L war nie in Gefahr und auch hier konnten die starken Schwankungen und extremen Messwerte, die von Fall zu Fall auftraten, gut abgepuffert werden. Es zeigt sich ein typisches Bild einer gut funktionierenden Abwasserreinigung. Der Sauerstoffbedarf wird im Anlagenverlauf kontinuierlich reduziert, das Wasser erfährt eine erkennbare Qualitätssteigerung.

Die gesamtorganische Belastung (TOC), die in der Vorklärung erwartungsgemäß am höchsten ist, nimmt im Teich durch Sedimentation und Aktivität von Mikroorganismen ab. Durch die Filterpassage erfährt das Wasser eine weitere Reinigung in Bezug auf den Kohlenstoff, durch Festlegung im Filter oder durch Aufnahme in die Pflanzen. Es kann also auch hier eine Verbesserung der Ablaufwerte durch den Filter festgestellt werden.

Ausgehend von den Wasserparametern konnte beobachtet werden, dass der Filter auch noch nach mehreren Betriebsjahren eine generell gute Pufferwirkung besitzt (vgl. NEUSTIFTER&SCHRÖDER, 2005). Die Ablaufwerte werden durch den Bodenfilter niemals verschlechtert. Die dynamischen Vorgänge, die in Abwasserteichen herrschen können, wie z.B. Algenwachstum oder Fremdwassereintrag, werden stets ausgeglichen. Die Ergebnisse zeigten auch, dass der Pflanzenfilter vor dem Ablauf der KA Mörlbach in Bezug auf Reinigungsleistung, Bewuchs und Pflege starken saisonalen Schwankungen unterworfen ist. Die Ablaufverbesserung ist aber auch nach mehrjährigem Betrieb noch immer gegeben (vgl. MELZER&STEINMANN, 1997, 1999; JABLONOWSKI, 2004; NEUSTIFTER&SCHRÖDER, 2005).

Bei der Auswertung der Parameter im Jahresverlauf über die drei Erhebungsjahre 2003-2005 ist aufgefallen, wie komplex und umfangreich Reaktionen im Filterbereich sind. Es hat sich gezeigt, dass Schwankungen im Wasser und im Filter Auswirkung auf das Abwasser haben und sich in den meisten Erhebungen wieder finden lassen. So wurden im Sommer 2004 die Pflanzen auf dem Filter durch anhaltende Hitze und Trockenheit sehr geschwächt, was zu einem starken Lausbefall der Kultur ab Juni und weiterer Schwächung in den folgenden Wochen geführt hat (vg. WISSING&HOFMANN, 2002). Auch zunehmendes Algenwachstum und die damit verbundene pH-Wert-Steigerung wurden detektiert, sowie die Veränderungen des Teichwassers durch Regenereignisse konnten genau nachvollzogen werden. Diese Dynamik ließ sich auch beim BSB₅ feststellen, dessen Werte sich ebenfalls nach diesen Ereignissen verändern. Ein Auftrag der BSB₅-Werte gegen die pH-Werte ergibt eine enge Korrelation ($R^2 = 0,98$), die auf Zusammenhänge zwischen diesen Parametern hindeutet, die aber nur mit besagten Belastungssituationen einhergehen.

Bepflanzte Bodenfilter, die vielfältigen Einflüssen unterliegen und durch viele Parameter in ihrer Funktion bestimmt werden, erscheinen im Licht der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sehr nützlich für die Abwasserreinigung. Sie leisten damit einen wichtigen Beitrag zum Schutz unserer lebensnotwendigen Ressourcen. Die

dynamischen Prozesse an Kläranlagen und Pflanzenfiltern verlangen aber eine regelmäßige Kontrolle, die jedoch durch ihre Langlebigkeit und die geringen Bau- und Betriebskosten aufgewogen wird.

Die KA Mörlbach, obwohl für einen kleinen Ort konzipiert, wird mit vergleichsweise hohen Konzentrationen an endokrin wirksamen Substanzen befrachtet (vgl. TERNES, 2001; COORS, 2004). Unter ihnen sind künstliche Hormone und Industriechemikalien, die in anderen Kläranlagen bereits Probleme bereiteten (SCHRÖDER ET AL., 2007). Wie die Untersuchungen zum Estradiol und den endokrin wirksamen Substanzen in Mörlbach zeigten, können auch mit für Wasseranalysen nicht standardisierten Tests Estradiol (ELISA) und hormonell wirksame Stoffe (GC-MS) mit hinreichender Sicherheit nachgewiesen werden.

Es konnte festgestellt werden, dass die Estradiolkonzentrationen im Anlagenverlauf der KA Mörlbach an allen Messterminen kontinuierlich abgenommen haben und die verhältnismäßig hohen Werte in der Vorklärung an allen Tagen jeweils deutlich reduziert werden konnten. Die Haupteliminierung des Estradiols wurde dabei im unbelüfteten Abwasserteich festgestellt. Dies kann mit dem relativ hohen Sorptionskoeffizienten ($K_D = 1468$, aus BEAUSSE, 2004) des Estradiols zusammenhängen. Eine weitere Reduzierung konnte durch die Passage des Bodenfilters beobachtet werden. Dennoch wurden stets Restgehalte an Estradiol im Ablauf gemessen. Obwohl zu allen Zeiten eine deutliche Reduzierung der Gehalte aus der Vorklärung der kommunalen Kläranlage festgestellt wird, ist die Erkenntnis, dass das Ablaufwasser nicht ganz frei von Estradiol ist, sehr bedenklich. Vor allem, da es sich bei den gemessenen Konzentrationen im Abwasser um human wirksame Dosen handelt (vgl. KLOAS, 2000). Ähnliches ergaben auch die Erfassungen der weiteren gemessenen endokrin wirksamen Stoffe (Octylphenol, Nonylphenol, Hexahydrohexamethyl-cyclopenta-gamma2-benzopyran und Diethylhexylphthalat) in der KA Mörlbach. Die Haupteliminierung ist dabei noch deutlicher als beim Estradiol im Teich lokalisiert. Der Filter reduziert deren Konzentration nur in geringerem Umfang und Restgehalte dieser endokrinen Wirkstoffe werden im Wasser des Ablaufs nachgewiesen.

Die Haupteliminierung des Estradiols und der endokrin wirksamen Stoffe im Teich wurde wahrscheinlich durch Absetzen in den Klärschlamm bedingt, der häufig sehr stark mit endokrin wirksamen Substanzen angereichert ist (ENGELMANN & ROHDE, 2005). Durch verhältnismäßig lange Verweilzeiten bei niedrigem Wasserpegel kann sich

dort der abgesetzte Schlamm stark anreichern. Interessant und wichtig wäre deshalb ein genaues Screening möglichst vieler Hormone und endokrin wirksamer Stoffe, wie z.B. verschiedener Östrogene oder Bisphenol, und ihre Dynamik, vor allem auch in kleinen kommunalen Kläranlagen mit mehr oder weniger kontrolliertem Ablauf, zu verfolgen (vgl. KLOAS, 2000; COORS, 2004). Nur durch genaue Charakterisierung dieser latenten Gefahr für das Trinkwasser kann hier Klarheit geschaffen und genaue Lösungsvorschläge erarbeitet werden.

Gerade wenn man die Gefahr der hormonellen Belastung des aus einer Kläranlage auch ins Grundwasser gelangenden Ablaufwassers nicht kennt, erscheint der Einsatz solcher bepflanzter Bodenfilter zur zusätzlichen Absenkung der Konzentration äußerst sinnvoll (vgl. DAVIES, 2005).

Entgiftungsenzyme in *Phragmites australis*

Die Pflanzen auf dem Bodenfilter sind der Belastung durch zahlreiche Xenobiotika ausgesetzt und nutzen ihre Entgiftungsenzyme, um diese unschädlich zu machen. In der vorliegenden Arbeit zu den Entgiftungsenzymen bei *Phragmites australis* aus Mörlbach konnte gezeigt werden, dass GSTs, POX und GRs in allen Pflanzenteilen nachweisbar sind und starke Dynamiken im Jahresverlauf aufweisen. Bisher liegen nur wenige Arbeiten zum Xenobiotika-Metabolismus dieser Pflanze vor (z.B. IANELLI ET AL., 2002; EDERLI ET AL., 2004). Bei manchen außerordentlichen Bedingungen, wie sie für den Sommer 2004 am Filter beschrieben wurden, konnte ein direkter Einfluss der Wasserparameter und der Bedingungen am Filter auf diese Entgiftungsenzyme protokolliert werden (vgl. Abb. 27, Abb. 31 und Abb. 32). In den Monaten Juli, August und September des Jahres 2004 fielen hohe GST-Level in den Blättern der Schilfpflanzen auf, die zum Teil auf die Schadstoffsituation, aber auch auf Insektenfraß, zurückzuführen sind. Dies ist in der Literatur für andere Pflanzen beschrieben (SCHNUG & SATOR, 2002). Um erste Hinweise zu sammeln, ob diese stressbedingte Erhöhung der GSTs alle vorhandenen Isoformen beteiligt, oder ob zudem neue Isoenzyme exprimiert werden, wurden die Temperaturoptima dieser Enzyme näher untersucht. Die Temperaturoptima von Isoenzymen liegen in der Regel eng beieinander, sind aber durchaus unterscheidbar (BELFORD, 2004). Bei den hier gemessenen Proben liegt das Temperaturoptimum für die Konjugation von CDNB bei 55 °C verhältnismäßig hoch. Zur

Aktivierung der Enzyme muss deshalb eine hohe Energie aufgebracht werden. Interessanterweise kann bei allen Proben, bei etwa 30 °C, ein zweites Optimum, das jedoch deutlich geringer ausgeprägt ist, erkannt werden. Dies deutet auf eine weitere, in der Messung überlagerte, Isoenzymgruppe hin. Die Bestimmung der Aktivierungsenergie bestätigt die oben genannte Annahme: in den Pflanzen liegt vor und nach der Stressphase (August bis September 2004) dieselbe dominante Isoenzymgruppe mit gleicher (in den Monaten August und September) beziehungsweise annähernd gleicher (für den Monat Juli) Aktivierungsenergie vor.

Bereits in anderen Arbeiten über *Phragmites australis* konnte festgestellt werden, dass diese Pflanzen ein außerordentlich gutes Potential zur Entgiftung von organischen Schadstoffen haben (SCHRÖDER ET AL., 2007). Hohe GST-Aktivitäten wurden bei Pflanzen an Kläranlagen in ganz Europa beobachtet, die sich ausgezeichnet mit dem Substrat CDNB detektieren lassen (DAUBNER, 2001). In weiteren Untersuchungen wurde versucht, dieses Entgiftungspotential genauer zu betrachten und es durch gezielte Induktion mit Chemikalien, unter anderem auch mit verschiedenen Herbiziden anzuregen (KREUZ ET AL., 1996; SCHRÖDER ET AL., 2005). Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die GST-Aktivitäten mit einigen Herbiziden deutlich steigern und durch Auftrennung mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese Unterschiede bei den Isoenzymen der GST sichtbar machen ließen (MAIER, 2004). Bei Arbeiten über *Phragmites australis* und *Typha latifolia* am Filter der KA Mörlbach wurde festgestellt, dass Schilf im Vergleich zum Rohrkolben das höhere Entgiftungspotential bezüglich GSTs, POX und GRs aufweist (JABLONOWSKI, 2004). Dies korreliert mit Ergebnissen aus den Projekten Mörlbach III und III/2 (NEUSTIFTER & SCHRÖDER, 2004). Eine Induktion der GSTs in *Phragmites australis* konnte auch unter der Einwirkung von Schwermetallen gezeigt werden (IANELLI ET AL., 2002; EDERLI ET AL., 2004; HUBER, 2006). Man darf aber auch nie ganz außer Betracht lassen, dass das Glutathion-Entgiftungssystem noch nicht ausreichend bekannt ist und nicht als alleiniges Entgiftungssystem der Pflanze betrachtet werden darf (vgl. TAUSZ ET AL., 2004; SCHRÖDER, 2006).

Wenn man all diese Komponenten des bepflanzten Bodenfilters und des Abwassers im Überblick betrachtet, kann ein sehr komplexes Wirksystem erkannt werden, das nicht nur limnologisch, sondern auch pflanzenphysiologisch interessant und noch nicht ausreichend beschrieben erscheint. Nur wenn viele ökologische Aspekte an Pflanzenfiltern und Klärteichen gemeinsam betrachtet werden können, sind diese

Zusammenhänge erkennbar und können zu Lösungs- und Verbesserungsvorschlägen führen.

Analgetika und *Phragmites australis*

Obwohl sie ein zunehmendes Problem für die Abwasserreinigung darstellen, befassen sich nur wenige Arbeiten mit dem Verbleib von Pharmaka in Kläranlagen. Es wurden hier Schmerzmittel als Vertreter einer prominenten Klasse von Medikamenten gewählt. Alle Konzentrationen der drei untersuchten Analgetika (Ibuprofen, Paracetamol und Diclofenac) wurden während 24 Stunden von Rhizomstücken von *Phragmites australis* stark abgebaut. Eine solche „Verschwindens-Analytik“ liefert jedoch keine eindeutige Aussage über die tatsächliche Aufnahme und noch weniger über den Metabolismus der Schadstoffe im Gewebe.

Die Rhizome aus den Studien mit Ibuprofen und Diclofenac dienten deshalb weiteren Untersuchungen im Hinblick auf spezifische Aktivitäten von GSTs und POX. Es konnte dabei beobachtet werden, dass dabei Diclofenac keine signifikanten Unterschiede der POX-Aktivitäten im Gegensatz zur Kontrolle verursachte. Auch die GST-Aktivitäten wurden nur um etwa 25% gesteigert. Bei Ibuprofen hingegen, dessen Konzentration auch in Anwesenheit des Rhizoms stärker abgenommen hatte, konnte eine Verdopplung der GST-Aktivitäten von der Kontrolle zum Rhizom beobachtet werden. Dennoch blieb auch in diesem Experiment POX auf dem Kontrolllevel. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass Ibuprofen direkt mit der Expression von GSTs interagiert. Da Daten aus tierphysiologischen Experimenten einen GSH-abhängigen Metabolismus von Paracetamol andeuten (vgl. SANDERMANN, 2004), wurde die Rhizomprobe des Paracetamol-Versuchs zur Metabolitenbestimmung in das medizinische Labor Dr. Tiller & Kollegen (München) gegeben. Dort war es möglich, eine Bestimmung der aufgenommenen Menge von Paracetamol und dessen Metaboliten im Gewebe unter klinisch standardisierten Methoden durchzuführen. Trotz der geringen Ausgangskonzentrationen konnten deutliche Spuren von Paracetamol und verschiedener Metaboliten im Gewebe nachgewiesen werden. Das identifizierte Glucuronid ist ein Metabolit der Glucosylierung von Xenobiotika in Tieren und wurde bisher noch nicht in Pflanzen nachgewiesen (SANDERMANN, 2004). Sulfat und Mercapturat sind eindeutig Metaboliten der Entgiftung durch Glutathion (SCHRÖDER,

1996 und 1997) und deuten somit auf eine aktive Entgiftung über Glutathion-Konjugate hin.

Damit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals für Schilfpflanzen sowohl die Aufnahme als auch der Abbau von Schmerzmitteln gezeigt werden. Dieses Ergebnis belegt, dass die Pflanze Medikamente nicht nur aktiv aufnimmt und somit für die Phytoremediation äußerst interessant macht, sondern auch aktiv an deren Entgiftung durch Metabolisierung arbeitet und sogar zu einem Abbau fähig ist. Dies könnte für die Phytoremediation, gerade an Anlagen, bei denen lange Verweildauern der Filterpflanzen möglich sind, ein interessanter Aspekt sein und die Wasserqualität deutlich erhöhen. Schilf scheint für diese Zwecke außerordentlich geeignet.

Induktions-Experimente im Hinblick auf GSTs

Aufgrund der vielen Ergebnisse, die aus den Mörlbach-Projekten über *Phragmites australis* als Phytoremediationspflanze gewonnen wurden, hat sich die Fragestellung auf die Entgiftungsenzymatik der Pflanze an sich konzentriert.

Durch die Inkubation verschiedener Gewebe und ganzer Pflanzen von *Phragmites australis* mit organischen Schadstoffen konnten nähere Erkenntnisse über die Reaktionen der Entgiftungsenzyme auf Stressoren gewonnen werden. So konnten bei Besprühung der ganzen Pflanzen der BioPlanta-Klone mit Ibuprofen nach 24h Steigerungen in beiden Geweben (Blätter und Rhizome) festgestellt werden, die dann nach 72h nur noch für die Blätter gesteigert werden konnten. Wesentlich deutlicher zeigten hier die Mörlbach-Pflanzen eine GST-Aktivitätssteigerung. Die Blätter erreichten ein Maximum nach 24h, wobei sich die Werte sogar mehr als versechsfachen. Bei den Rhizomen ist das Maximum erst nach 72h erreicht, aber ähnlich stark ausgeprägt wie bei den Blättern nach 24h. Die Pflanzen aus Mörlbach zeigten, wie schon bei den Abbauversuchen mit Ibuprofen festgestellt, eine sehr starke Induzierbarkeit durch dieses Schmerzmittel.

Die Versuche mit den Safenern belegen vor allem mit dem Safener Benoxacor sehr gute Induzierbarkeit. Bei einer Behandlung mit den Safenern Cloquintocet-mexyl, Naphthylessigsäure (NAA), Fenclorim und Fenchlorazol-ethyl, bei denen zwar auch wechselnde, aber durchaus signifikante Steigerungen beobachtet werden konnten, konnte man aber auch sehr schnelle Reaktionen der GST-Aktivität beobachten. Bei NAA

treten diese bereits nach 3h auf, was nicht durch die Genexpression erklärt werden kann, bei der man mit einer sichtbaren Antwort bei den Entgiftungsenzymen frühestens nach 6h rechnet (vgl. LEVINE, 1994), sondern auf posttranslationale Veränderungen schließen lässt.

Mit Benoxacor konnte vor allem in den Rhizomen mehrmals eine starke Steigerung der spezifischen GST-Aktivität im Gegensatz zu den Kontrollen beobachtet werden, wie sie bereits auch für andere Gräser und *Arabidopsis thaliana* beschrieben wurde (SCARPONI&DEL BUONO, 2005; DERIDDER&GOLDSBROUGH, 2006).

Das Screening verschiedener Substrate für GSTs lieferte für die Konjugation von CDNB die höchsten Werte. Es scheint tatsächlich so, als ob dieses Substrat die größte Bandbreite der *Phragmites australis*-GST-Isoenzyme abdeckte. Die beiden anderen verwendeten Substrate wurden wesentlich schlechter konjugiert. Nicht alle Substrate sind demnach zur Charakterisierung der GSTs geeignet. Da man jedoch noch keine natürlichen Substrate (EDWARDS&DIXON, 2004) für GSTs kennt und man ein möglichst breites Band darstellen möchte, ist man gezwungen, trotz dieses Mankos die Chlorbenzole zu verwenden.

Man kann also aufgrund der bekannten Beschränkungen nicht genau feststellen, welche GST genau welches Substrat abgebildet und ob alle GSTs erfasst werden können (LAMOUREUX&RUSSNESS, 1993). Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll und notwendig, auf diesem Gebiet auch molekulare Ansätze zu verfolgen.

Molekulare Ansätze

Angeregt durch die Aktivitätssteigerung in der GSH-Konjugation durch Benoxacor, vor allem bei den Rhizomen der BioPlanta-Pflanzen, wurde dieses Pflanzenmaterial herangezogen, um weiterführende molekularbiologische Untersuchungen anzustellen. In dieser Beziehung wurde mit dieser Arbeit Neuland betreten, denn bisherige Projekte bei *Phragmites spec.* beziehen sich eher auf die generelle Charakterisierung von Schilf-Ökotypen als auf die Phytoremediation (ZEMPLIN, 2003).

Proteinextrakte mit Benoxacor behandelten Rhizomen wurden über Affinitätschromatographie an spezieller Glutathion-Agarose auf GSTs gereinigt und dann herangezogen, um im 2D-Gel die Unterschiede im exprimierten Enzymmuster zwischen Behandlung und Kontrolle sichtbar zu machen. Deutlich zu erkennen ist dabei in den Kontrollen ein

Cluster mit drei erkennbaren Spots, wohingegen die behandelten Pflanzen ein GST-Muster aufwiesen, bei dem mindestens 12 Spots unterscheidbar sind. Da auch in den vorherigen GST-Aktivitätsbestimmungen eine deutliche Steigerung von Kontrolle zu Benoxacor-Behandlung im Rhizom gemessen wurde, kann hier davon ausgegangen werden, dass die bei der Behandlung zusätzlich auftretenden GST-Isoenzyme für diese GST-Aktivitätssteigerung verantwortlich sind. Leider war es in diesem Fall nicht möglich, die Aktivierungsenergie zu bestimmen.

Bereits in anderen Arbeiten zur Induzierung von GST-Isoenzymen in *Phragmites australis* konnte mit Hilfe der SDS-PAGE gezeigt werden, dass sowohl manche Herbizide (MAIER, 2004), als auch Cadmiumgaben die Anzahl der GST-Isoenzyme im Gewebe steigern können (IANELLI ET AL., 2002; EDERLI ET AL., 2004).

Western Blots können verwendet werden, um Verwandtschaftsbeziehungen unter GST-Clustern aufzudecken. Die Proteinextrakte der Ibuprofen- und Safener-Behandlungen wurden dabei auf eine Membran geplottet, die dann mit spezifischen Antikörpern behandelt wurden und somit die spezifischen GSTs einwandfrei identifizierten. Es konnten damit bei allen Behandlungen deutlich die GSTs aus der Phi-Klasse sichtbar gemacht werden, bei der Benoxacor-Behandlung zusätzlich auch Tau-GSTs.

Phi-GSTs werden auch in der Literatur als diejenigen GSTs beschrieben, die im Rahmen der Stressantwort und nach Safener-Behandlung induziert werden (DIXON ET AL., 2002; EDWARDS&DIXON, 2005). Phi-GSTs können also in *Phragmites australis* sehr gut durch Safener-Behandlung induziert werden. Sie sind in unbehandelten Proben nur schwach exprimiert. Da die Western Blots meist zwei deutliche Banden aufweisen, liegt der Schluss nahe, dass mindestens zwei Gruppen von Phi-GSTs mit je annähernd identischen Untereinheiten vorliegen. Die bei einigen Behandlungen schwächer exprimierte, leichtere Untereinheit weist auf ein stärker reguliertes GST-Gen hin. Die Möglichkeit der Bildung von heterodimeren GSTs, wie sie bereits in anderen Pflanzen unter Stress gezeigt wurde (SCHRÖDER&WOLF, 1996; SCHRÖDER&GÖTZBERGER, 1997), kann allerdings auch hier nicht ausgeschlossen werden.

Nachdem das Rhizommaterial nach Benoxacor-Behandlung von *Phragmites australis* viel versprechende GST-Aktivitätssteigerungen im Vergleich zur Kontrolle aufwies und auch im 2D-Gel deutliche GST-Muster gefunden wurden, entschied man sich, aus diesem Gewebe RNA zu isolieren, um darin Sequenzen von GSTs zu finden. Aus vielen Ansätzen und Versuchen wurde schließlich mit dem RNeasyMiniKit eine gut funktionierende Methode zur Isolierung der RNA für *Phragmites australis* gefunden.

Damit konnte im weiteren Verlauf mRNA und cDNA gewonnen wurde, die nach PCR zur Klonierung von GST-Sequenzen verwendet wurde. Mit Hilfe von speziellen Primern wurde schließlich eine Sequenz für *Phragmites australis*-GSTs erhalten, die nach Abgleich mit der NCBI-Datenbank große Homologien mit Phi-GSTs nah verwandter Gräsern und Monokotyledonen zeigte (vgl. CUMMINS ET AL., 2003). So konnte erstmals aus einer Schilfpflanze eine partielle Sequenz einer GST beschrieben werden.

Das Rhizommaterial aus der Benoxacor-Behandlung von *Phragmites australis* wurde weiterhin dafür verwendet, eine cDNA-Bank als Grundlage für weiterführende Untersuchungen zu etablieren. Aufgrund der starken Aktivitätssteigerungen bei den GSTs, wie sie durch den Safener Benoxacor mehrmals in den Rhizomen der Schilfpflanze im Laufe der durchgeführten Untersuchungen beobachtet wurden (vgl. Ergebnisse Safener-Induktionsversuche, 2D-SDS-PAGE, Western Blots), erschien es sinnvoll, diese gesteigerte Ausprägung der GST-Muster in einer gut lagerfähigen und für viele Untersuchungen nutzbaren cDNA-Bank festzuhalten. Die Nutzungsmöglichkeit solcher Klonbanken ist sehr umfangreich und wird in Zukunft die genaue Analyse und Identifizierung der geklonten Fragmente ermöglichen.

Ausblick

Phragmites australis bietet als Pflanze zur Phytoremediation organischer Schadstoffe viele Einsatzmöglichkeiten. Wie hier beschrieben, eignet sie sich hervorragend zum Einsatz auf bepflanzten Bodenfiltern. Durch ihr Vermögen hohe organische Belastungen zu verkraften, Schadstoffe gut abzubauen oder zu metabolisieren und durch ihre hohe Adaptionsfähigkeit an die Umwelt, eignet sie sich aber auch zum Einsatz in Pflanzenkläranlagen (vgl. MCCUTCHEON&SCHNOOR, 2003). Die Schilfpflanze ist bereits eine der meist eingesetzten Pflanzen auf diesem Gebiet. Es werden aber dahingehend verhältnismäßig wenig Untersuchungen und Projekte durchgeführt. Internationale Projekte beziehen sich eher auf die Ökologie des Schilfs und auf das Schilfsterven (vgl. MELZER, 2001; EUREED-Homepage, 2007), doch können weitere Untersuchungen vor allem aus pflanzenphysiologischer Sicht zukünftig noch mehr dazu beitragen, das Phytoremediationspotential der Schilfpflanze genauer zu erkunden und den Einsatz effizienter zu gestalten. Wenn beide Seiten, Praktiker und Wissenschaftler, mehr Informationen über die Entgiftungsenzyme und ihre Induktion, beziehungsweise

ihre natürlichen Substrate kompilieren, wird es möglich sein, ganz gezielt Klone dieser Pflanzen zu selektieren, die genau auf das Belastungsgebiet zugeschnitten sind und einen verbesserten Schadstoffabbau erreichen.

Durch die bereits in dieser Arbeit begonnenen molekularen Ansätze, Entgiftungsenzyme in *Phragmites australis* zu beschreiben und zu isolieren, sollte ein Grundstein für weiterführende ausgedehnte Untersuchungen gelegt werden. Hierbei sollten weitere Gene in Betracht gezogen werden, die für das exzellente Phytoremediationsverhalten in der Schilfpflanze verantwortlich sind. Aus cDNA-Banken können z.B. durch Hybridisierung aus der Vielzahl der Klone diejenigen ermittelt werden, die ein bestimmtes Fragment einer eingebrachten Fremd-DNA enthalten. Aber auch PCR-Screenings der cDNA-Bank sind möglich (RICHTER, 2005). Interessant für zukünftige Arbeiten ist wohl auch die Etablierung von Microarrays, bei denen die gesuchten Gensequenzen mit bereits bekannten DNA-Fragmenten, die auf einem Chip gespottet sind, abgeglichen werden können und so Schritt für Schritt die Genom- und Proteomebene erschließen. *Phragmites australis*, eine in der Praxis sehr vielseitig eingesetzte Pflanze, bietet auf diesem Gebiet der molekularen Analysen noch viele Anwendungsmöglichkeiten. Auf diesem Gebiet sind Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* bereits umfassend untersucht und beschrieben, ebenso wie eine Vielzahl von Nutzpflanzen, wie Weizen, Gerste, Reis und Mais. Bei der Schilfpflanze besteht dahingehend noch großer Forschungsbedarf. Gerade über die Entgiftungsenzyme, die in Bezug auf gesunde Böden und Trinkwasserqualität relevant sind, ist auf der Proteomebene wenig bekannt.

So soll diese Arbeit einen Beitrag der Erforschung des vielfältig ausgeprägten und nutzbaren Entgiftungspotentials der wichtigen Phytoremediationspflanze *Phragmites australis* leisten und Anstöße zu weiteren Projekten geben, um die wichtigen Herausforderungen um reines Trinkwasser und gesunde Böden für die Zukunft bewältigen zu können.

V Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein genaues Bild vom Phytoremediationspotential von *Phragmites australis* im Hinblick auf die Entgiftung organischer Schadstoffe zu erhalten.

- Die praxisorientierten Projekte an der KA Mörlbach lieferten umfassende Einblicke in einen funktionierenden bepflanzten Bodenfilter und seine jahreszeitlichen Rhythmen. Dabei konnte festgestellt werden, dass der mit *Phragmites australis* bewachsene Filter in Mörlbach in Bezug auf die Abwasserparameter eine ausgezeichnete Restreinigung und zusätzliche Pufferwirkung besitzt und die Ablaufwerte dieser Kleinkläranlage maßgeblich verbessert. Die Pilotstudie zur Bestimmung der Konzentrationen von 17 β -Estradiol und verschiedene endokrin wirksame Substanzen belegt ebenfalls die zusätzliche Reinigungsleistung des Filters.
- Die auf dem Filter wachsenden *Phragmites australis*-Pflanzen nehmen organische Schadstoffe auf und besitzen zahlreiche wichtige Entgiftungsenzyme für den Abbau dieser Xenobiotika. Dazu gehören GSTs, POX und GRs. Aus diesen anwendungsbezogenen Untersuchungen resultierten Studien zur Charakterisierung dieser Entgiftungsenzyme.
- Die Entgiftungsenzyme, insbesondere die GSTs in *Phragmites australis* sind induzierbar. Sowohl Safener als auch Pharmaka erhöhen die GST-Aktivität stark und transient. Stabile Induktion wurde nach Gabe des Safeners Benoxacor beobachtet.
- Die Erkenntnisse aus der Enzymologie führten schließlich zu molekularen Studien bei *Phragmites australis*, in deren Verlauf die GST-Isoenzyme genauer charakterisiert wurden. Dabei wurde erstmals eine partielle Sequenz einer Phi-GST bei *Phragmites australis* identifiziert und als Grundlage für weitere molekularbiologische Untersuchungen der wichtigen Phytoremediationspflanze *Phragmites australis* eine cDNA-Bank aus behandeltem und induziertem Pflanzenmaterial etabliert.
- Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *Phragmites australis* ein ausgezeichnetes Phytoremediationspotential besitzt, das durch die Induzierbarkeit

der Entgiftungsvorgänge und Metabolisierung organischer Schadstoffe noch gesteigert werden kann. Die Pflanze ist aufgrund ihrer extrem hohen Adaptionsfähigkeit zudem sehr vielfältig in Phytoremediationsanlagen und bepflanzten Bodenfiltern einsetzbar und kann deshalb als eine der wichtigsten Pflanzen für die Phytoremediation organischer Schadstoffe angesehen werden.

- Der hier geleistete wissenschaftliche Beitrag zur Phytoremediation organischer Schadstoffe mit *Phragmites australis* soll zu weiteren, intensiven Forschungen auf diesem Gebiet ermutigen und die damit verbundene Möglichkeit zur Verbesserung der Trinkwasserqualität und zur Gesunderhaltung unserer Böden und Grundwasserreserven für die Zukunft unterstreichen.

VI Summary

The aim of the present dissertation was to take a closer look at the phytoremediation potential of *Phragmites australis*, common reed, with special emphasis on organic xenobiotics.

Three years of investigation at the municipal waste water treatment plant in Mörlbach (Upper Bavaria) showed that the reed bed filter at the effluent has an excellent phytoremediation capacity. All water parameters were reduced through the filter passage, as well as the concentration of estrogen and several endocrine disruptors. Investigating the reed's detoxification potential elucidated the plant's outstanding potential. Especially GSTs are highly active and several pharmaceuticals can be absorbed, detoxified and metabolized.

Incubation studies with xenobiotics were performed to induce and enhance the detoxification enzymes to get a better understanding of how the plant reacts to organic stress. By incubation of the plant with the painkiller Ibuprofen and the safener Benoxacor a very high induction of GSTs could be shown. Phi-GSTs seem to be responsible for this enhancement.

In order to complete the studies, molecular approaches with the induced plant material were performed. Sequencing DNA of induced *Phragmites australis* rhizome plant material led to the first partial sequence of a phi class GST. As basis for further investigation a cDNA library of induced *Phragmites australis* rhizome plant material was established.

Phragmites australis, common reed, is a highly attractive plant for phytoremediation of organic substances. It has a high detoxification potential and can be used in waste water treatment to ameliorate the water quality of the effluent.

VII Literaturverzeichnis

- AASHEIM H.C., DEGGERDAL A., SMELAND E.B. & HORNES E. (1994): A simple subtraction method for the isolation of cell-specific genes using magnetic monodisperse polymer particles. *BioTechniques* 16 (4): 716-721.
- AEHLE W., SOBEK H., AMORY A., VETTER R., WILKE D. & SCHOMBURG D. (1993): Rational protein engineering and industrial application: structure prediction by homology and rational design of protein-variants with improved 'washing performance' — the alkaline protease from *Bacillus alcalophilus*. *Journal of Biotechnology* 28 (1): 31-40.
- ANDERSON T.A., GUTHRIE E.A. & WATON B.T. (1993): Bioremediation. *Environmental Science and Technology* 27 (13): 2630-2636.
- BARCELO J. & POSCHENRIEDER C. (2003): Phytoremediation: principles and perspectives. *Contributions to Science* 2 (3): 333-344.
- BEAUSSE J. (2004): Selected drugs in soil matrices: A review of environmental occurrence, determination and properties of principal substances. *HORIZONTAL DS 26 Pharmaceuticals*: 1-36.
- BELFORD E.J.D. (2004): Purification and characterization of xenobiotic detoxification enzymes in *Pachyrhizus* "yam bean" and their role in agrochemical metabolism. Dissertation an der TU München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt.
- BENNETT L.E., BURKHEAD J.H., HALE K.L., TERRY N., PILON M. & PILON-SMITS E.A.H. (2003): Analysis of transgenic Indian mustard plants for phytoremediation of metal-contaminated mine tailings. *Journal of Environment Quality* 32: 432-440.

- BEVER J., STEIN A. & TEICHMANN H. (2002): Weitergehende Abwasserreinigung. Stickstoff- und Phosphorelimination, Sedimentation und Filtration. Lehrbriefsammlung. 4. Auflage, Oldenbourg Wissenschaftsverlag, München.
- BOOTH J., BOYLAND E. & SIMS P. (1961): An enzyme from rat liver catalyzing conjugations with glutathione. *Biochemical Journal* 79: 516-524.
- BRADFORD M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-255.
- BRIGGS G.G., BROMILOW R.H. & EVANS A.A. (1982): Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionized chemicals by barley. *Pesticide Science* 13: 495-504.
- BRIGGS G.G., RIGITANO R. & BROMILOW R.H. (1987): Physico-chemical factors affecting uptake by roots and translocation of non-ionised chemicals by barley. *Pesticide Science* 19: 101-112.
- BURKEN J.G. (2003): Uptake and metabolism of organic compounds: green-liver model. In: MCCUTCHEON, S.C. & SCHNOOR, J.L. (Eds.): *Phytoremediation – Transformation and control of contaminants*. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey, pp. 59-84.
- BURKEN J.G. & SCHNOOR J.L. (1997): Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. *Environmental Science and Technology* 31: 1399-1406.
- CASTILLO F. (1986): Extracellular peroxidases as marker of stress? In: GREPPIN H., PENEL C. & GASPAR T. (Eds.): *Molecules and physiological aspects of plant peroxidases*. University of Geneva, Switzerland, pp. 419-428.
- CHAUDHRY Q., BLOM-ZANSTRA M. GUPTA S. & JONER E.J. (2005): Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of

- organic pollutants in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 12 (1): 34-48.
- CHERIAN S. & OLIVEIRA M.M. (2005): Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environmental Science and Technology* 39 (24): 9377-9390.
- COLEMAN J.O.D., BLAKE-KALFF M.M.A. & DAVIES T.G.E. (1997): Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science* 2 (4): 144-151.
- COLEMAN J.O.D., FROVA C., SCHRÖDER P. & TISSUT M. (2002): Exploiting plant metabolism for the phytoremediation of persistent herbicides. *Environmental Science and Pollution Research* 9 (1): 18-28.
- COLLINS C., LATURNUS F. & NEPOVIM A. (2002): Remediation of BTEX and Trichlorethene - Current knowledge with special emphasis on phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research* 9 (1): 86-94.
- COORS A. (2004): Estrogene Aktivität im Abwasser – Nachweis mit Hilfe eines biologischen Wirktests zur Erfassung der Elimination bei weitergehender Abwasserreinigung. In: RATTE H. (Ed.): Publikationsreihe des interdisziplinären Umwelt-Forums der RWTH Aachen. Akademische Edition Umweltforschung, Lehrstuhl für Ökologie, Ökotoxikologie, Ökochemie.
- COUPLAND D. (1991): The role of compartmentation of herbicides and their metabolites in resistance mechanisms. In: CASELEY J.C., CUSSANS G.W. & ATKIN R.K. (Eds): *Herbicide resistance in weeds and crops*. Butterworth-Heinemann. Oxford, pp. 263-278.
- CUMMINS I., COLE D.J. & EDWARDS R. (1997): Purification of multiple glutathione transferases involved in herbicide detoxification from wheat (*Triticum aestivum* L.) treated with the safener Fenchlorazole-ethyl. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 59: 35-49.

- CUMMINS I., O'HAGAN D., JABLONKAI I., COLE D.J., HEHN A., WERCK-REICHHART D. & EDWARDS R. (2003): Cloning, characterization and regulation of a family of phi class glutathione transferases from wheat. *Plant Molecular Biology* 52: 591-603.
- DAUBNER D. (2001): Evaluierung des Entgiftungspotentials für organische Schadstoffe von *Phragmites* ssp. in Pflanzenkläranlagen Europas. Diplomarbeit an der Fachhochschule Wiesbaden.
- DAVIES L.C., CARIAS C.C., NOVAIS J.M. & MARTINS-DIAS S. (2005): Phytoremediation of textile effluents containing azo dye using *Phragmites australis* in a vertical flow intermittent feeding constructed wetland. *Ecological Engineering* 25: 594-605.
- DAVIN L.B. & LEWIS N.G. (1992): Phenylpropanoid metabolism: Biosynthesis of monolignols, lignans and neolignans, lignins and suberins. In: STAFFORD I. (Ed.): Phenolic metabolism in plants. Plenum. New York, pp. 325-375.
- DAVIS L.C., CASTRO-DIAZ S., ZHANG Q. & ERIKSON L.E. (2002): Benefits of vegetation for soils with organic contaminants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21 (5): 457-491.
- DENG F. & HATZIOS K.K. (2002): Characterization and safener induction of multiple glutathione S-transferases in three genetic lines of rice. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 72: 24-39.
- DERIDDER B.P., DIXON D.P., BEUSSMAN D.J., EDWARDS R. & GOLDSBROUGH P.B. (2002): Induction of glutathione S-transferases in *Arabidopsis* by herbicide safeners. *Plant Physiology* 130: 1497-1505.
- DERIDDER B.P. & GOLDSBROUGH P.B. (2006): Organ-specific expression of glutathione S-transferases and the efficacy of herbicide safeners in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 140: 167-175.
- DIXON D.P., CUMMINS I., COLE D.J. & EDWARDS R. (1998): Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 258-266.

- DIXON D.P., LAPHORN A. & EDWARDS R. (2002): Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 3: reviews 3004.1-reviews 3004.10.
- DIXON M. & WEBB E.C. (1964): *Enzymes*. Academic Press, New York.
- DROOG F. (1997): Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. *Journal of Plant Growth Regulation* 16: 95-107.
- DROTAR A., PHELPS P. & FALL R. (1985): Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Science* 42: 35-40.
- DÜLL R. & KUTZELNIGG H. (2005): *Taschenlexikon der Pflanzen Deutschlands. Ein botanisch-ökologischer Exkursionsbegleiter zu den wichtigsten Arten. 6. Auflage.* Quelle & Meyer Verlag, Wiebelsheim.
- DURST F., BENVENISTE I., LESOT A., SALAÜN J.P. & WERCK-REICHART D. (1997): Induction of plant Cytochrome P450. In: HATZIOS K.K. (Ed.): *Regulation of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in plants*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht, pp. 19-34.
- EDERLI L., REALE L., FERRANTI F., PASQUALINI S. (2004) Responses induced by high concentrations of cadmium in *Phragmites australis* roots. *Physiologia Plantarum* 121: 66.
- EDWARDS R. (1996): Characterization of glutathione transferases and glutathione peroxidases in pea (*Pisum sativum*). *Physiologia Plantarum* 98: 594-604.
- EDWARDS R. & DIXON D.P. (2004): Metabolism of natural and xenobiotic substrates by the plant glutathione S-transferase superfamily. In: SANDERMANN H. (Ed.): *Molecular ecotoxicology of plants. Ecological Studies* 170. Springer Verlag, Hamburg, pp. 17-50.
- EDWARDS R. & DIXON D.P. (2005): Plant glutathione transferases. *Methods in Enzymology* 401: 169-186.

- ENGELMANN U. & ROHDE, S. (2005): Endokrine Stoffe in Abwassereinleitungen und Gewässern in Sachsen; Sächsisches Landesamt für Umwelt und Geologie. LfUG Sachsen, Dresden.
- FERRO A., CHARD J. KJELGREN R., CHARD B., TURNER D. & MONTAGUE T. (2001): Groundwater capture using hybrid poplar trees: evaluation of a system in Ogden, Utah. *International Journal of Phytoremediation* 3: 87-104.
- FOYER C.H., LOPEZ-DELGADO H., DAT J.F. & SCOTT I.M. (1997): Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* 100: 241-254.
- FREAR D.S. & SWANSON H.R. (1970): Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazino) glutathione: partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn. *Phytochemistry* 9: 2123-2132.
- FROVA C. (2003): The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiologia Plantarum* 119: 469-479.
- GEHRING, M. (2004): Verhalten der endokrin wirksamen Substanz Bisphenol A bei der kommunalen Abwasserentsorgung. Dissertation an der Technischen Universität Dresden, Fakultät Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften.
- GSCHLÖSSL, T., STEINMANN, C., SCHLEYPEN, P. & MELZER, A. (1998): Constructed wetlands for effluent polishing of lagoons. – *Water Research* 32 (9): 2639-2645.
- GROSSER S., POHL W. & MELZER A. (1997): Untersuchungen des Schilfrückgangs an bayerischen Seen. – Bayerisches Landesamt für Umweltschutz (Hg.), Forschungsprojekt des bayerischen Staatsministeriums für Landesentwicklung und Umweltfragen, Schriftenreihe Heft 141.
- GUBLER U. & HOFFMANN B.J. (1983): A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25 (2-3): 263-269.

- HABIG W. H., PABST M. J., JAKOBY W. B. (1974): Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249 (22): 7130-7139.
- HANNINK N.K., ROSSER S.J. & BRUCE N.C. (2002): Phytoremediation of explosives. *Critical reviews in plant sciences* 21 (5): 511-538.
- HARVEY P.J., CAMPANELLA B.F., CASTRO P.M.L., HARMS H., LICHTFOUSE E., SCHÄFFNER A.R., SMRCEK S. & WERCK-REICHHART D. (2002): Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environmental Science and Pollution Research* 9 (1): 29-47.
- HATTON P.J., DIXON D.P., COLE D.J. & EDWARDS R. (1996): Glutathione transferase activities and herbicide selectivity in maize and associated weed species. *Pesticide Science*. 46: 267-275.
- HEGEMANN W. & BUSCH K. (2000): Untersuchungen zum Abbau endokrin wirksamer Substanzen in Kläranlagen. Aus: *Chemische Stressfaktoren in aquatischen Systemen*, Schriftenreihe Wasserforschung 6: 199-208.
- HELL R. (1997): Molecular physiology of plant sulfur metabolism. *Planta* 202: 138-148.
- HOCK B., FEDTKE C. & SCHMIDT R.R. (1995): *Herbizide – Entwicklung, Anwendung, Wirkungen, Nebenwirkungen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- HOECKER U., TEPPERMAN J.M., QUAIL P.H. (1999): SPA1, a WD-Repeat protein specific to Phytochrome A signal transduction. *Science* 284 (5413): 496 – 499.
- HOLLEIS W., KÖLLNER B, PFLUGER F. & WIRLER H: (2002): *Gewässerschutz in Bayern; Kommunale Abwasseranlagen. Lagebericht 2002*. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft.

- HUBER C. (2006): Einfluss von Cadmium auf die Entgiftungskapazität für organische Substrate und den antioxidativen Stoffwechsel von *Phragmites australis*. Diplomarbeit an der TU München.
- HUGHES J.B., SHANKS J., VANDERFORD M., LAURITZEN J. & BHADRA R. (1997): Transformation of TNT by aquatic plants and plant tissue cultures. *Environmental Science and Technology* 31: 266-271.
- IANELLI M. A., PIETRINI F., FIORE L., PETRILLI L., MASSACCI A. (2002) Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 977-982.
- IBL (2005): Arbeitsanleitung 17 β -Estradiol ELISA, IBL Gesellschaft für Immunochemie und Immunobiologie mbH, Hamburg.
- JABLONOWSKI N.D. (2004): Untersuchungen zur Reduzierung von Sekundärbelastungen mittels eines bepflanzten Bodenfilters am Ablauf einer Abwasserteichanlage. Diplomarbeit an der Ruhr-Universität Bochum.
- JAENICKE L. (1984): Einführung in die Praxis des Biochemikers. Institut für Biochemie an der Universität Köln.
- JONES O.A., LESTER J.N. & VOULVOULIS N. (2005): Pharmaceuticals: a threat to drinking water? *Trends in Biotechnology* 23 (4): 163-167.
- JONES P. & VOGT T. (2001): Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controls. *Planta* 213: 164-174.
- KARG F. & KÖSTER M. (2002): Umweltchemie und Erkundungsbedarf bei Belastung durch Pestizide und deren Metaboliten. IS Pestizide V01: 1-19.
- KICKUTH R. (1969): Höhere Pflanzen und Gewässerreinigung. Schriftenreihe der Vereinigung Deutscher Gewässerschutz EV-VDG, Nr. 19.

- KLOAS W. (2000): Endokrin wirksame Substanzen: Eine Gefahr für aquatische Systeme? In: Chemische Stressfaktoren in aquatischen Systemen, Schriftenreihe Wasserforschung 6: 35-45.
- KLÖTZLI F. (1971): Biogeneous influence on aquatic macrophytes, especially *Phragmites communis*. Hydrobiologie 12: 107-112.
- KLÖTZLI F. & ZÜST S. (1973): Conservation of reed-beds in Switzerland. Archive für Hydrobiologie 20: 229-235.
- KRETZ P.L., REID C.H., GREENER A. & SHORT J.M. (1989): Effect of lambda packaging extract mcr restriction activity on DNA cloning. Nucleic Acids Research 17 (13): 5409.
- KREUZ K., TOMMASINI R. & MARTINOIA E. (1996): Old enzymes for a new job: herbicide detoxification in plants. Plant Physiology 111: 349-353.
- LAMOUREUX G.L. & RUSNESS D.G (1989): The role of glutathione and glutathione S-transferase in pesticide metabolism, selectivity and mode of action in plants and insects. In: DOLPHIN D., POULSON R. & AVRAMOVIC O. (Eds.): Glutathione: Chemical, biochemical and medical aspects, Vol. IIIB, Series: Enzyme and Cofactors. John Wiley and Sons, New York, pp. 153-196.
- LAMOUREUX G.L. & RUSNESS D.G (1993) Glutathione in the metabolism and detoxification of the xenobiotics in plants. In: DE KOK L.J., STULEN I., RENNENBERG H., BRUNOLD C. & RAUSE W. (Eds.). Sulfur nutrition and assimilation in higher plants. SPB Academic, The Hague, pp. 221-237.
- LANGEBARTELS C. & HARMS H. (1985): Analysis for non extractable bound residues of pentachlorophenole in plant cells using a cell wall fractionation procedure. Ecotoxicology and Environmental Safety 10: 268-279.

- LEVINE A., TENHAKEN R., DIXON R. & LAMB C. (1994): H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- LI H., SHENG G., SHENG W. & WU O. (2002): Uptake of trifluralin and lindane from water by ryegrass. *Chemosphere* 48: 335-341.
- MAIER H. (2004): Entgiftungskapazität von *Phragmites australis* für Herbizide. Diplomarbeit an der Fachhochschule Wiesbaden.
- MARMIROLI N., MARMIROLI M., MAESTRI E., MANTOVI P. & PICCININI S. (2003): Constructed wetland treatment of diary wastes. In: VANEK T. & SCHWITZGUEBEL J.-P. (Eds.): *Phytoremediation Inventory COST Action 837 View*. UOCHB AVCR, Czech Republic, p. 48.
- MARRS K.A. (1996): The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 127-158.
- MARRS K.A., ALFENITO M.R., LLOYD A.M. & WALBOT V. (1995): A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. *Nature* 375: 397-400.
- MARTINOIA E., GRILL E., TOMMASINI R., KREUZ K. & AMRHEIN N. (1993): ATP-dependent glutathione S-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364: 247-249.
- MCCUTCHEON S.C. & SCHNOOR J.L. (2003): *Phytoremediation – Transformation and control of contaminants*. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey.
- MCGONIGLE B., KEELER S.J., LAU S.M.C., KOEPPE M.K. & O'KEEFE D.P. (2000): A genomic approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiology* 124: 1105-1120.

- MELZER A. & STEINMANN C. (1997): Entwicklung von Lösungsvorschlägen für Betriebsprobleme bei unbelüfteten Abwasserteichen und Verbesserung der Ablaufqualität durch Pflanzenzonen. Mörlbach I, Endbericht.
- MELZER A. & STEINMANN C. (1999): Entwicklung von Lösungsvorschlägen für Betriebsprobleme bei unbelüfteten Abwasserteichen und Verbesserung der Ablaufqualität durch Pflanzenzonen. Teilprojekt Mörlbach II, Zwischenbericht.
- MELZER A. & STEINMANN C. (1999): Entwicklung von Lösungsvorschlägen für Betriebsprobleme bei unbelüfteten Abwasserteichen und Verbesserung der Ablaufqualität durch Pflanzenzonen, Teilprojekt Mörlbach II, Endbericht.
- MELZER A., ZIMMERMANN S. & WISSEN U. (2001): Maßnahmen zur Entwicklung der aquatischen Röhrichte am Starnberger See. Endbericht Wasserwirtschaftsamt München.
- MESSNER & SCHRÖDER (1999): Burst amplifying system in cell suspension cultures of spruce (*Picea abies*): Modulation of elicitor-induced release of hydrogen peroxide (oxidative burst) by ionophores and salicylic acid. *Journal of Applied Botany* 73, 6-10.
- MEYER V.R. (2004): Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. 9. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- MOORMANN H. (2001): Einfluss der Rhizodeposition von Helophyten auf mikrobiellen Schadstoffabbau. Dissertation an der Universität Bremen.
- MUDRACK K. & KUNST S. (2003): Biologie der Abwasserreinigung. 5. Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg.
- NEPOVIM A., HEBNER A., SOUDEK P., GERTH A., THOMAS H., SMRCEK S. & VANEK T. (2005): Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by selected helophytes. *Chemosphere* 60: 1454-1461.

- NEUSTIFTER J. & SCHRÖDER P. (2003): Leistungsfähigkeit des bepflanzten Bodenfilters am Ablauf der Kläranlage Mörlbach, Gemeinde Berg, F&E-Vorhaben Mörlbach III, Zwischenbericht.
- NEUSTIFTER J. & SCHRÖDER P. (2004): Leistungsfähigkeit des bepflanzten Bodenfilters am Ablauf der Kläranlage Mörlbach, Gemeinde Berg, F&E-Vorhaben Mörlbach III, Endbericht.
- NEUSTIFTER J. & SCHRÖDER P. (2004): Leistungsfähigkeit des bepflanzten Bodenfilters am Ablauf der Kläranlage Mörlbach, Gemeinde Berg, F&E-Vorhaben Mörlbach III/2, Endbericht.
- NEUSTIFTER J. & SCHRÖDER P. (2005): Untersuchungen zum Rückhalt/Abbau von endokrin wirksamen Stoffen und ausgewählter Arzneimittel in der Abwasserteichanlage und im bepflanzten Bodenfilter am Ablauf der Kläranlage Mörlbach, Gemeinde Berg, F&E Vorhaben Mörlbach IV, Endbericht.
- NEWMAN L.A. & REYNOLDS C.M. (2004): Phytodegradation of organic compounds. *Current opinion in Biotechnology* 15: 225-230.
- NEWMAN L.A., STRAND S.E., CHOE N., DUFFY J., EKUAN G., RUSZAJ M., SHURTLEFF B.B., WILMOTH J., HEILMAN P. & GORDON M.P. (1997): Uptake and biotransformation of trichloroethylene by hybrid poplars. *Environmental Science and Technology* 31 (4): 1062-1067.
- NOCTOR G., ARISI A.C.M., JOUANIN L., KUNERT K.J., RENNENBERG H. & FOYER C.H. (1998): Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* 49 (321): 623-647.
- NUTRICATI E., MICELI A., BLANDO F. & DEBELLIS L. (2006): Characterization of two *Arabidopsis thaliana* glutathione S-transferases. *Plant Cell Reports* 25: 997-1005.

- OLSON P.E., REARDON K.F. & PILON-SMITS E.A.H. (2003): Ecology of rhizosphere bioremediation. In: MCCUTCHEON, S.C. & SCHNOOR, J.L. (Eds.): Phytoremediation – Transformation and control of contaminants. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey, pp. 317-354.
- PARK H.J., CHO H.Y. & KONG K.H. (2005): Purification and biochemical properties of glutathione S-transferase from *Lactuca sativa*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 38 (2): 232-237.
- PASCAL S. & SCALLA R. (1999): Purification and characterization of safener-induced glutathione S-transferase from wheat (*Triticum aestivum*). Physiologia Plantarum 106: 17-27.
- PELLEGRIN D. & HAUBER D.P. (1999): Isoenzyme variation among populations of the clonal species, *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. Aquatic Botany 63: 241-259.
- PILON-SMITS E. (2005): Phytoremediation. Annual Review of Plant Biology 56: 15-39.
- PFLUGMACHER S., GEISSLER K. & STEINBERG C. (1999): Activity of phase I and phase II detoxification enzymes in different cormus parts of *Phragmites australis*. Ecotoxicology and Environmental Safety 42: 62-66.
- REINEMER P., PRADE L., HOF P., NEUEFEIND T., HUBER R., ZETTL R., PALME K., SCHELL J., KOELLN I., BARTUNIK H.D., BIESELER B. (1996): Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. Journal of Molecular Biology 255: 289-309.
- RICHTER G. (2003): Praktische Biochemie – Grundlagen und Techniken. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

- RÖNNEFAHRT I., KOSCHORRECK J. & KOLOSSA-GEHRING M. (2002): Arzneimittel in der Umwelt – Teil 2: Rechtliche Aspekte und Bewertungskonzepte. – Mitteilungen der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie 04: 6-9.
- SANCHEZ-FERNANDEZ R., FRICKER M., CORBEN L.B., WHITE N.S., SHEARD N., LEAVER C.J., VANMONTEGUE M., INZE D. & MAY M.J. (1997): Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 94: 843-854.
- SANDERMANN H. (1994): Higher plant metabolism of xenobiotics: the "green liver" concept. Pharmacogenetics 4: 225-241.
- SANDERMANN H. (2004): Bound and unextractable pesticidal plant residues: chemical characterization and consumer exposure. Pest Management Science 60: 613-623.
- SANDERMANN H., HAAS M., MESSNER B., PFLUGMACHER S.; SCHRÖDER P. & WETZEL A. (1997): The role of glucosyl and malonyl conjugation in herbicide selectivity. In: HATZIOS K.K. (Ed.): Regulation of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 211-231.
- SAPPL P.G., ONATE-SANCHEZ L., SINGH K.B. & MILLAR A.H. (2004): Proteomic analysis of glutathione S-transferases of *Arabidopsis thaliana* reveals differential salicylic acid-induced expression of the plant-specific phi and tau classes. Plant Molecular Biology 54: 205-219.
- SCALLA R. & ROULET A. (2002): Cloning and characterization of a glutathione S-transferase induced by a herbicide safener in barley (*Hordeum vulgare*). Physiologia Plantarum 116: 336-344.
- SCARPONI L. & DELBUONO D. (2005): Benoxacor induction of terbuthylazine detoxification in *Zea mays* and *Festuca arundinacea*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 2483-2488.

- SCHÄFFNER A., MESSNER B. LANGEBARTELS C. & SANDERMANN H. (2002): Genes and enzymes for in-planta phytoremediation of air, water and soil. *Acta Biotechnologica* 22 (1-2): 141-152.
- SCHEER C.E. (2003) Transport, Kompartimentierung und Abbau von glutathionhaltigen Fremdstoffmetaboliten in Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Dissertation an der TU München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt.
- SCHLEYPEN P. (1996): Praxiserfahrung mit Abwasserteichanlagen. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München.
- SCHLEYPEN P. (1996): Abwasserteichanlagen – eine moderne Lösung zum Schutz kleiner Gewässer im ländlichen Raum. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München.
- SCHMEIL O. & FITSCHEN J. (1996): FLORA von Deutschland und angrenzender Länder. Quelle & Meyer Bestimmungsbücher. 90.Auflage, Quelle & Meyer Verlag, Wiesbaden.
- SCHNOOR J.L., LICHT L.A., MCCUTCHEON S.C., WOLFE N.L. & CARREIRA L.H. (1995): Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science and Technology* 29 (7): 318A-323A.
- SCHNUG E. & SATOR C. (2002): Aspects of glutathione in the interaction between plants and animals. In: GRILL D., TAUSZ M & DEKOK L.J. (Eds.): Significance of glutathione to plant adaption to the environment. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 241-248.
- SCHRÖDER P. (1996): Entgiftung elektrophiler Xenobiotika in Koniferen durch Konjugation mit Glutathion und Metabolismus der Glutathion-Konjugate. Habilitationsschrift TU München, Fakultät Landwirtschaft und Gartenbau.

- SCHRÖDER P. (1997): Fate of glutathione S-conjugates in plants. In: HATZIOS K.K. (Ed.): Regulation of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 245-259.
- SCHRÖDER P. (2001): The role of glutathione S-transferases in plant reaction and adaption to xenobiotics. In: GRILL D., TAUSZ M. & DEKOK L.J. (Eds.): Significance of glutathione to plant adaption to the environment. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 155-183.
- SCHRÖDER P. (2006): Enzymes transferring biomolecules to organic foreign compounds: a role for glucosyltransferase and glutathione S-transferase in phytoremediation. In: MACKOVA M., DOWLING D.N. & MACEK T. (Eds.): Phytoremediation and rhizoremediation – theoretical background. Springer Verlag, Hamburg, pp. 137-142.
- SCHRÖDER P. & BERKAU C. (1993): Characterization of cytosolic glutathione S-transferase in spruce needles. *Botanica Acta* 106: 301-306.
- SCHRÖDER P. & COLLINS C. (2002): Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. *International Journal of Phytoremediation* 4 (4): 247-265.
- SCHRÖDER P., GÖTZ C., LJUBENOVA L. & NEUSTIFTER J. (2005): Exploiting plant metabolism for phytoremediation of organic xenobiotics. In: HARTMANN A., SCHMID M., WENZEL W. & HINSINGER P. (Eds.): Rhizosphere 2004 - Perspectives and Challenges – A tribute to Lorenz Hiltner. GSF-Bericht 05/05, pp. 275-282.
- SCHRÖDER P. & GÖTZBERGER C., 1997: Partial purification and characterization of glutathione S-transferase isozymes from the leaves of *Juniperus communis*, *Larix decidua* and *Taxus baccata*. *Journal of Applied Botany* 71, 31-37.
- SCHRÖDER P., LAMOUREUX G.L., RUSNESS D.G., RENNENBERG H. (1990): Glutathione S-transferase activity in spruce needles. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 37: 211-218.

- SCHRÖDER P., MAIER H., DEBUS R. (2005) Detoxification of herbicides in *Phragmites australis*. Zeitung für Naturforschung 60 c: 317-324.
- SCHRÖDER P., NAVARRO-AVINO J., AZAIZEH H., GOLAN-GOLDHIRSCH A., DIGREGORIO S., KOMIVES T., LANGERGRABER G, LENZ A., MAESTRI E., MEMON A.R., RANALLI A., SEBASTIANI L., SMRCEK S. VANEK T., VUILLEUMIER S & WISSING F. (2007): Using phytoremediation technologies to upgrade waste water treatment in Europe. Environmental Science and Pollution Research. Commentaries (Online first): 1-8, DOI: <http://dx.doi.org/10.1065/espr2006.12.373>.
- SCHRÖDER P., SCHEER C. & BELFORD E.J.D. (2001): Metabolism of organic xenobiotics in plants: conjugation enzymes and metabolic end points. Minerva Biotechnologica 13 (2): 85-91.
- SCHRÖDER P. & WOLF A.E. (1996). Characterization of glutathione S-transferase from needles of spruce trees from a forest decline stand. Tree Physiology 16 (5): 503-508.
- SCHWÖRBEL J. & BRENDELBERGER H. (2005): Einführung in die Limnologie. 9.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, München.
- SEIDEL K. (1959): *Scirpus* Kulturen. Archiv für Hydrobiologie 56: 58-92.
- SEIDEL K. (1966): Reinigung von Gewässern durch höhere Pflanzen. Naturwissenschaften 53 (12): 289-297.
- SEIDEL K. (1969): Wirkung höherer Pflanzen auf pathogene Keime in Gewässern. Naturwissenschaften 58 (3): 150-151.
- SHANG T.Q., NEWMAN L.A. & GORDON M.P. (2003): Fate of trichloroethylene in terrestrial plants. In: MCCUTCHEON, S.C. & SCHNOOR, J.L. (Eds.): Phytoremediation – Transformation and control of contaminants. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey; pp. 529-560.

- SHIMABUKURO R.H. (1976): Glutathione conjugation of herbicides in plants and animals and its role in herbicidal selectivity. Asian-Pacific Weed Science Society: 183-186.
- SHIMABUKURO R.H. & SWANSON H.R. (1969): Atrazine metabolism, selectivity and mode of action. Journal of Agric Food Chemistry 17 (2): 199-205.
- SINGH A. & WARD O.P. (2004): Biodegradation and bioremediation. Soil Biology, Volume 2. Springer Verlag, Hamburg.
- SPENGLER, P. (2001): Identifizierung und Quantifizierung von Verbindungen mit östrogenen Wirkung im Abwasser. Dissertation am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart.
- STEINMANN C., WEINHART S. & MELZER A. (2003): A combined system of lagoon and constructed wetland for an effective wastewater treatment. Water Research 37: 2035-2042.
- SURESH B. & RAVISHANKAR G.A. (2004): Phytoremediation – A novel and promising approach for environmental clean-up. Critical Reviews in Biotechnology 24: 97-124.
- TAIZ L. & ZEIGER E. (2002): Plant Physiology. Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- TASSI E., BARBAFIERI M., CERVELLI S. & PETRUZZELLI G. (2003): Phytoremediation test in PAH contaminated soil by *Medicago sativa*. In: VANEK T. & SCHWITZGUEBEL J.-P. (Eds.): Phytoremediation Inventory COST Action 837 View. UOCHB AVCR, Czech Republic, p. 15.
- TAUSZ M., SIRCELJ H. & GRILL D. (2004): The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? Journal of Experimental Botany 55 (404): 1955-1962.

- TERNES T. (2001): Abbau und Verhalten von Pharmaka in aquatischen Systemen. Aus: Chemische Stressfaktoren in aquatischen Systemen, Schriftenreihe Wasserforschung 6: 23-33.
- TRAPP S. & MCFARLANE J.C. (1995): Plant Contamination: Modelling and simulation of organic processes. CRC Lewis Publishers, Boca Raton.
- TRAPP S. & KARLSON U. (2001): Aspects of phytoremediation of organic pollutants. Journal of Soil and Sediments 1 (1): 37-43.
- VANHUYSSEN T., TERRY N. & PILON-SMITS E.A.H. (2004): Exploring the selenium phytoremediation potential of transgenic *Brassica juncea* overexpressing ATP sulfurylase or cystathione- γ -synthase. International Journal of Phytoremediation 6: 111-118.
- VANACKER H., CARVER T. L. W. & FOYER C. H. (1998): Pathogen induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. Plant Physiology 117: 103-114.
- WAGNER U., EDWARDS R., DIXON D.P. & MAUCH F. (2002): Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. Plant Molecular Biology 49: 515-532.
- WILLIS E.H., MARDIS E.R., JONES W.L. & LITTLE M.C. (1990): Prep-A-Gene: a superior matrix for the purification of DNA and DNA fragments. Biotechniques 9 (1): 92-99.
- WISSING F. & HOFMANN K. (2002): Wasserreinigung mit Pflanzen. 2.erweiterte Auflage, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- WOLF A.E., DIETZ K.-J. & SCHRÖDER P. (1996): Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. FEBS Letters 384: 31-34.

- WOLFE A.K. & BJORNSTAD D.J. (2002): Why would anyone object? An exploration of social aspects of phytoremediation acceptability. *Critical Reviews in Plant Science* 21 (5): 429-438.
- ZABLOTOWICZ R.M., HOAGLAND R.E., LOCKE M.A. & HICKEY W.J. (1995): Glutathione S-transferase activity and metabolism of glutathione conjugates by rhizosphere bacteria. *Journal of Environmental Microbiology* 61 (3): 1054-1060.
- ZEMLIN, R. (2003): Untersuchung zur genotypischen und phänotypischen Variabilität verschiedener Schilfklone (*Phragmites australis*). Dissertation an der Humboldt-Universität zu Berlin.
- ZHANG C. & BENNETT G.N. (2005): Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. Mini-Review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 600-618.

Links zu zitierten Internet-Beiträgen

http://www.repo-pflanzen.de/sortiment/Sortiment_2/Phragmites_australis/phragmites_australis.html

http://www.dur.ac.uk/d.p.dixon/at_gst2.gif

http://www.rcsb.org/pdb/images/1gnw_asym_r_250.jpg

<http://de.wikipedia.org/wiki/Diethylhexylphthalat>

<http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Ibuprofen-2D-skeletal.png>

<http://www.omikron-online.de/cyberchem/cheminfo/diclolex.html>

<http://images.google.de/images?q=tbn:ifjkKu39XOnfxM:http://www.novartis.co.jp/product/vol/img/vsr04.gif>

<http://www.strukturformeeditor.de/Paracetamol.jpg>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

<http://medias.obs-mip.fr/ricamare/interface/projet/eureed2.html>

Ein besonderer Dank geht an...

...meinen Arbeitsgruppenleiter Prof. Dr. Peter Schröder von der Abteilung Mikroben-Pflanzen-Interaktionen am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, für die Überlassung des Themas, für sein Interesse und Engagement in allen Bereichen der Arbeit.

...Prof. Dr. Arnulf Melzer von der Limnologischen Station der TU München in Iffeldorf für die Bereitschaft sich als Betreuer und Prüfer zur Verfügung zu stellen.

...Prof. Dr. Wilfried Huber von der TU München für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

...Prof. Dr. Jean-Charles Munch und Prof. Dr. Anton Hartmann für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Bodenökologie und der Abteilung Mikroben-Pflanzen-Interaktionen am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit.

...alle Kollegen aus der Arbeitsgruppe Schröder, die stets mit Rat und Tat zur Stelle waren. Dabei möchte ich mich besonders bei Dr. Beate Huber, Dr. Christian Scheer, Dr. Ebenezer Belford, Andrea Ziegltrum, Ljudmila Ljubenova, Christine Götz, Dr. Ursula Bausenwein und Christian Huber bedanken.

...die Abteilung für Experimentelle Umweltsimulation am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit für die Bereitstellung des Gewächshausplatzes.

...die COST Action 859, die mir den dreimonatigen Studienaufenthalt an der Universität Durham ermöglicht hat.

...Prof. Robert Edwards von der Universität Durham, sowie an Dr. David Dixon, Dr. Ian Cummins, Dr. Melissa Brazier-Hicks und Edward Tapp aus der Arbeitsgruppe in Durham.

...Dr. Robert May vom Labor Dr. Tiller & Kollegen in München für die Messung der Paracetamol-Metaboliten.

...Dr. Uta Räder von der Limnologischen Station der TU München in Iffeldorf, die mit ihrem Interesse für alle Belange rund um die Doktorarbeit stets eine große Hilfe war.

...PDDr. Tanja Gschlöbl für die Betreuung der Projekte in Mörlbach seitens des Bayerischen Landesamtes für Umwelt und die stete Hilfsbereitschaft und Interesse an meiner Arbeit, sowie Anja Rüdiger und Gundula Hübner vom Landesamt für Umwelt für die Unterstützung bei den Mörlbach-Projekten.

...die Gemeinde Berg für die Hilfsbereitschaft und das Interesse an der Arbeit über die KA Mörlbach.

...alle Freunde und Helfer, die mich beim Entstehen dieser Arbeit unterstützt haben. Besonders erwähnt seien hierbei Peter, Uta, Tanja, Beate, Ljudmila, Christine, Ursula, Florian, Christian, Gerd und Sebastian.

...Gerd für seine Freundschaft und Hilfsbereitschaft in den letzten Jahren.

...Barbara, die trotz Entfernung und Familiengründung immer noch Zeit für Aufmunterungen und die kleinen Freuden im Leben gefunden hat.

...Sebastian für seine Liebe und Unterstützung in den letzten Wochen und für seine Geduld.

...meine Familie, besonders an meine Eltern, für ihre Liebe, Verständnis und Unterstützung in allen Lebensabschnitten.