



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Schwermetalltoxizität und Schwermetalltoleranz der drei
Moosarten *Physcomitrium patens*, *Pohlia drummondii*
und *Hypnum cupressiforme*“

verfasst von / submitted by

Nevena Djakovic

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2021 / Vienna, 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Ingeborg Lang, Privatdoz.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich jederzeit und in all meinen Lebenslagen unterstützen.

Ein großer Dank geht an die beste Diplomarbeits-Betreuerin die man sich wünschen kann, Univ.-Prof. Mag. Dr. Ingeborg Lang. Durch ihre positive und immer gut gelaunte Art war es immer möglich anfallende Probleme zu besprechen, schnell zu lösen und Spaß an der Arbeit zu haben. Außerdem möchte ich mich bei ihr für die tolle Zeit als Studienassistentin bedanken, in der wir vor allem viel Freude bei der Organisation und auch Teilnahme an der ATSPB-Tagung 2021 hatten.

Ich möchte mich auch bei Mag. Daniela Gruber für ihre Hilfe beim Bedienen des Elektronenmikroskops herzlich bedanken.

Und auch an meine Mitstudenten, vor allem Maryam Zekri, geht ein großes Dankeschön für ihre Hilfe rund um meine Fragen zu diversen Computerprogrammen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Abstract	2
1. Einleitung.....	3
1.1 Moose	3
1.1.1 Allgemeine Aspekte	3
1.1.2 Verwendete Moosarten.....	4
1.2 Schwermetalle	7
1.2.1 Definition.....	7
1.2.2 Verwendete Metalle	8
1.3 Biomonitoring	12
2. Ziel der Arbeit.....	14
3. Material und Methoden	15
3.1 Vorbereitung des Probenmaterials	15
3.2 Toleranztests.....	15
3.3 Ermittlung der Toleranzgrenzen	15
3.4 Kombinationslösungen	16
3.5 Wachstum der Moose	17
3.6 Probenvorbereitung EDX	19
3.7 EDX Messung und Auswertung	21
4. Ergebnisse.....	23
4.1 Toleranzgrenzen	23
<i>Pohlia drummondii</i>	23
<i>Physcomitrium patens</i>	24
<i>Hypnum cupressiforme</i>	24
4.2 Kombinationen	25
<i>Pohlia drummondii</i>	25
<i>Physcomitrium patens</i>	30
<i>Hypnum cupressiforme</i>	34
4.3 10 ⁻⁴ -Kombinationen	38
<i>Pohlia drummondii</i>	38
<i>Physcomitrium patens</i>	41
4.4 Wachstum.....	44

<i>Pohlia drummondii</i>	44
<i>Physcomitrium patens</i>	52
4.5 EDX.....	60
<i>Physcomitrium patens</i>	61
<i>Pohlia drummondii</i>	75
<i>Hypnum cupressiforme</i>	80
5. Diskussion.....	87
5.1. Mikroskopie-Toleranztests	87
5.1.1. Reaktive Sauerstoffspezies	87
5.1.2. Eigenschaften der Zellen.....	88
5.2. Wachstums - und EDX - Versuche	90
5.2.1. Metallverteilung im Moos	90
5.2.2. Verfügbarkeit der Metallionen	91
5.2.3. Mangan und Antimon	91
5.3. Synergetische und Antagonistische Wechselwirkungen.....	93
6.Literaturverzeichnis.....	94

Zusammenfassung

Moose werden aufgrund ihrer vorteilhaften Eigenschaften schon seit vielen Jahren als Bioindikatoren verwendet (Dolegowska et al. 2014). Dabei sind das Fehlen einer echten Kutikula, der gute Ionen-Austausch, ihre weite Verbreitung in der Natur sowie in industriellen Standorten, nur einige Aspekte, weshalb sie für die Bestimmung der Luftqualität, sowie Schwermetallbelastung in der Atmosphäre eingesetzt werden (Markert 2003; Dolegowska et al. 2014). Schwermetalle in der Umwelt spielen dabei eine immer größere Rolle, nicht zuletzt da durch den menschlichen Einfluss das Vorkommen an Metallen in unserer Umwelt zugenommen hat (Stanković et al. 2018). Einige Schwermetalle gelten als essentielle Spurenelemente (Nagajyoti et al. 2010). In zu hohen Dosen jedoch können sie toxisch wirken (Nagajyoti et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der Schwermetalle *Kupfer*, *Mangan*, *Eisen* und *Antimon*- als Einzelmetalle und in Kombinationen an drei verschiedenen Moosarten *Pohlia drummondii*, *Physcomitrium patens* und *Hypnum cupressiforme* getestet.

Das Ziel der Arbeit war es, herauszufinden, ob Schwermetalle in Kombination und verschiedener Konzentration schädlicher auf die Moose einwirken als ein Metall alleine. Die Moose wurden dafür unter kontrollierten Bedingungen kultiviert. Das Überleben und das Wachstum der Moose unter Einfluss der Metalle und Metallkombinationen wurde mit Hilfe der Lichtmikroskopie und Kultivierung der Moose auf Agarmedium, dem Metalle bzw. Metallkombinationen zugesetzt wurden, bewertet. Die Aufnahme und die Verteilung der Metalle wurde mit Energiedisperser Röntgenspektroskopie (EDX) analysiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Toxizität der Metalle von der Konzentration, sowie von der Moosart abhängig ist. *Pohlia drummondii* und *Hypnum cupressiforme* gelten als metalltolerante Moose, da sie auch an Standorten wachsen und überleben können, an denen die Schwermetallbelastung hoch ist (Adlassnig et al. 2016; Antreich et al. 2016). *Physcomitrium patens* hingegen ist eine Moosart, die normalerweise nicht an solchen Standorten vorkommt (Adlassnig et al. 2016; Antreich et al. 2016). Diese Eigenschaften spiegelten sich auch in den Ergebnissen wider. *Pohlia drummondii* zeigte eine bessere Toleranz gegenüber Schwermetallen als *Physcomitrium patens*. Allgemein waren *Kupfer* und *Antimon* für die Moose schädlicher als *Mangan* und *Eisen*. *Pohlia drummondii* und *Physcomitrium patens* reagierten beide bei Kombinationen mit *Kupfer* und einer Konzentration von 1mM mit Wachstumseinschränkungen sowie Veränderungen im Zellinneren. *Physcomitrium patens* war allerdings sensitiver und weniger tolerant als *Pohlia drummondii*.

Abstract

Bryophytes have been used as bioindicators for many years due to their beneficial characteristics (Dolegowska et al. 2014). The lack of a real cuticle, the good ion exchange over the cell wall, their widespread distribution in nature as well as in industrial sites are only some of the aspects why they are used for determination of air quality and heavy metal pollution in the atmosphere (Dolegowska et al. 2014; Markert 2003). Heavy metals in the environment are playing an important role, not at least because human activity has increased the amount of heavy metals in our environment (Stanković et al. 2018). Some heavy metals are essential micronutrients, but in high concentrations they can cause toxic effects (Nagajyoti et al. 2010). In the present study the effect of *copper*, *manganese*, *iron* and *antimony*, alone and in combinations, have been tested on three different moss species *Pohlia drummondii*, *Physcomitrium patens* and *Hypnum cupressiforme*.

The aim of the work was to find out whether heavy metals, when they occur in combinations and different concentrations, are more harmful to mosses than one metal alone. To prove this hypothesis, the mosses were cultivated under controlled conditions. Their survival and growth under the impact of heavy metal combinations was examined by light microscopy and by cultivating the mosses on agar spiked with heavy metals. To analyze the uptake and the distribution of the metals Energy dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) was used.

The results showed that the toxicity of the metal combinations depends on the moss species and the metal concentration. *Pohlia drummondii* and *Hypnum cupressiforme* are considered as metal-tolerant mosses, as they can grow and survive at sites where heavy metal pollution is high (Adlassnig et al. 2016; Antreich et al. 2016). *Physcomitrium patens*, on the other hand, is a moss species that does not normally occur at such sites (Adlassnig et al. 2016; Antreich et al. 2016). These characteristics were also found in the results. *Pohlia drummondii* showed a better tolerance towards the heavy metal combinations than *Physcomitrium patens*. In both cases, especially copper and antimony were more harmful than manganese and iron. Both *Pohlia drummondii* and *Physcomitrium patens* showed growth restriction and changes in the cell structure in combinations with copper at a concentration of 1mM. *Physcomitrium patens*, however, was more sensitive and less tolerant than *Pohlia drummondii*.

1. Einleitung

1.1 Moose

1.1.1 Allgemeine Aspekte

Laubmoose, Lebermoose und Hornmoose sind heute die drei Gruppen, in die Bryophyten eingeteilt werden können. (Urry et al. 2019). Mit etwa 15 000 bis 25 000 Arten weltweit gehören sie zu der zweitgrößten Gruppe der Landpflanzen (Vujičić et al. 2010). Weiters gelten Moose als die ältesten Pflanzen unter den Landpflanzen, wobei man davon ausgeht, dass die Lebermoose unter den drei Bryophyten-Gruppen, mit 470 bis 450 Millionen Jahren die ältesten sind. Das haben fossile Sporen gezeigt, die den Sporen der Lebermoose am ähnlichsten sind (Urry et al. 2019).

Bryophyten unterscheiden sich von anderen Landpflanzen durch verschiedene Aspekte. Einer davon ist, dass bei Moosen der Gametophyt dominant und größer ist und länger lebt als der Sporophyt (Vanderpoorten und Goffinet 2009; Urry et al. 2019). Die Gametophyten entwickeln sich aus Sporen, die an für sie geeigneten Standorten auskeimen (Urry et al. 2019). Bevor es zur vollständigen Ausbildung des Gametophyten kommt, bilden sich die haploiden Protonemata aus (Urry et al. 2019; Vanderpoorten und Goffinet 2009) (Abb. 1). Dabei handelt es sich um grüne, verzweigte Zellfäden, mit großer Oberfläche, wodurch die Wasser- und Nährstoffaufnahme möglich wird. Die aus den Protonemata herangewachsenen weiblichen oder männlichen Gametophyten, entwickeln entweder Archegonien, in denen die Eizellen entstehen oder Antheridien, in denen sich die Spermatozoide befinden (Urry et al. 2019). Die Spermatozoide benötigen einen Wasserfilm um zur Eizelle „schwimmen“ zu können, (Urry et al. 2019; Vanderpoorten und Goffinet 2009), wobei sie chemischen Lockstoffen folgen und letztendlich zu der Eizelle gelangen, wo die Befruchtung stattfindet (Urry et al. 2019). Der sich entwickelnde Embryo bleibt im unteren Teil des Archegoniums, bis sich daraus der reife Sporophyt bildet (Urry et al. 2019). Der Sporophyt der Moose hat einen sehr einfachen Bau: einen Fuß, die Seta (=Stiel) und das Sporangium (=Sporenkapsel). Der Sporophyt betreibt selbst Photosynthese, trennt sich allerdings sein ganzes Leben nicht vom mütterlichen Gametophyten (Urry et al. 2019; Vanderpoorten und Goffinet 2009). Über diesen wird er mit Wasser und Nährstoffen versorgt. Über die Seta gelangen diese Nährstoffe in das Sporangium, wo die Ausbildung der Sporen stattfindet, die freigesetzt werden (Urry et al. 2019).



Abb. 1. *Physcomitrium patens*: Protonemata und Gametophyt

Weitere Eigenschaften, die Moose mit sich bringen und sie von Gefäßpflanzen unterscheiden sind, dass sie Wasser und darin gelöste Mineralien über ihre gesamte Oberfläche aufnehmen (Sabovljević et al. 2020). Bei den meisten Arten sind die Blättchen einschichtig (Vitt et al. 2014), ohne Kutikula oder schützende Oberflächenschicht (Sabovljević et al. 2020). Moose verlieren außerdem schnell Wasser und trocknen aus. Sie sind dementsprechend stark von Regenfällen und Ablagerungen abhängig, um sich ausreichend mit Nährstoffen und Wasser zu versorgen (Sabovljević et al. 2020). Viele Moosarten schaffen es aber dennoch, längere Trockenperioden zu überleben und unter Zugabe von Wasser wieder zu regenerieren (Vitt et al. 2014). Dafür reicht oft schon ein dünner Wasserfilm, durch den gelöste Substanzen von den Moosen aufgenommen werden können (Sabovljević et al. 2020). Aufgrund dieser Eigenschaften wurden Moose über Jahrzehnte eingesetzt, um die Umweltsituation, in Bezug auf Schadstoffe oder Metallverschmutzung in der Luft, zu beobachten (Stanković et al. 2018). Sie wurden über viele Jahre für sogenannte Biomonitoring-Untersuchungen verwendet (Dolegowska et al. 2014), da sie beispielsweise Metalle sehr gut aufnehmen. Durch das Fehlen eines echten Wurzelsystems und der Absorption über die gesamte Oberfläche, sowie das Fehlen einer Kutikula können Metallionen die Zellwände leicht passieren. Die hohe Kationenaustauschkapazität einiger Moosarten erleichtert die Aufnahme (Stanković et al. 2018). Auch chemische Analysen können einfach angewendet werden, womit man wichtige Daten über den Zustand der Umwelt erhalten kann (Stanković et al. 2018). Im nachfolgenden Abschnitt werden die Moosarten *Hypnum cupressiforme*, *Physcomitrium patens* und *Pohlia drummondii*, die in dieser Arbeit für die experimentellen Untersuchungen verwendet wurden, beschrieben.

1.1.2 Verwendete Moosarten

Hypnum cupressiforme

Hypnum cupressiforme gehört zu der Gattung *Hypnum* und ist eine weit verbreitete Moosart die nahezu auf der ganzen Welt zu finden ist (Vujičić et al. 2010). Mit Ausnahme der Antarktis kommt das Moos in verschiedenen Klimazonen und auch Lebensräumen vor. Es wächst auf diversen Oberflächen wie beispielsweise auf Steinen, Baumstämmen und Wänden (Vujičić et al. 2010). Die Art bevorzugt eine eher saure Umgebung (Vujičić et al. 2010), trockene und schattige Plätze und meidet kalkhaltige Substrate (Wirth und Düll 2000). *Hypnum cupressiforme* kann 2 bis 10 cm groß werden und ist somit ein kleines bis mittelgroßes Moos (Vujičić et al. 2010). *Hypnum cupressiforme* hat kriechende Stämme (Vujičić et al. 2010) die unregelmäßig verzweigt sind (Frahm et al. 1983), wodurch sie dichte und glatte Matten bilden. (Vujičić et al. 2010). Die Blätter sind lang, lanzettlich bis oval und bilden eine lange schmale Spitze (Abb. 2). An der Blattspitze ist der Blattrand mehr oder weniger gezähnt (Frahm et al. 1983). Die Moose bilden rötlich-braune Stiele aus, auf denen sich die Kapsel befindet, die die Sporen trägt. Die Kapsel ist kurz und hat eine leicht gebogene Form (Vujičić et al. 2010).

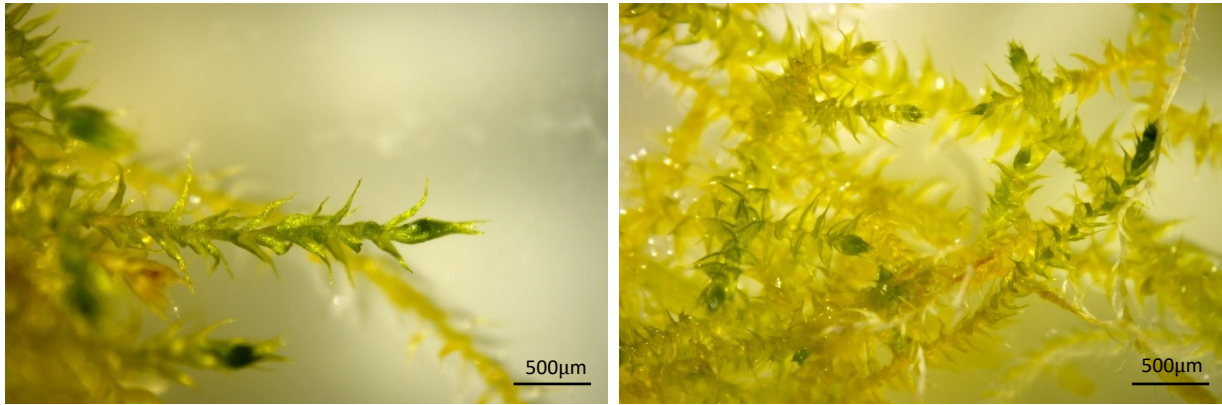


Abb. 2. *Hypnum cupressiforme*

Weltweit zählen mehr als 200 Arten zu der Gattung Hypnum, wovon 18 in Europa beheimatet sind (Vujičić et al. 2010). Der ursprüngliche Name Hypnum leitet sich von der früheren Anwendung des Moores ab. Es wurde nämlich als Füllung für Matratzen und Kissen genutzt, wodurch es zur Namensgebung des Moores kam (Vujičić et al. 2010). Aufgrund seiner Eigenschaften wird das Moos bis heute für diverse Biomonitoring-Untersuchungen eingesetzt (Stankovic et al. 2021; Dolegowska et al. 2014). Außerdem werden Studien über das biologische Potential und die Wirkung der Inhaltsstoffe des Moores durchgeführt (Lunić et al. 2020). Studien und Informationen zu diesem Thema sind zwar noch wenig vorhanden, aber es hat sich bereits gezeigt, dass *Hypnum cupressiforme* antimikrobielle und antiproliferative Wirkungen hat (Lunić et al. 2020). Lunić et al. (2020) untersuchten beispielsweise auch weitere mögliche gesundheitsfördernde Wirkungen des Moores, in dem sie biologisch aktive Komponenten wie Flavonoide oder phenolische Säuren aus dem Moos extrahiert haben. In den Ergebnissen hat sich gezeigt, dass bestimmte Inhaltsstoffe positive Zusatzeffekte bei der Behandlung von Diabetes mellitus, Alzheimer oder auch bestimmten Tumorzelllinien haben können (Lunić et al. 2020).

Physcomitrium patens

Physcomitrium patens gehört zu den *Funariaceae* und ist in Europa, Nordamerika und Ostasien beheimatet (Rensing et al. 2020). Das Moos wächst meistens in lockeren Herden und kann bis zu 5mm groß werden (Frahm et al. 1983). Bevorzugte Habitate sind trockene Flussufer oder abgelassene Teiche, wo tonige und verschlammte Böden vorkommen. In höheren Lagen kommt *Physcomitrium patens* nicht vor (Frahm et al. 1983). Die Blätter sind breit, vergrößert, lanzettlich und der Blattrand ist meist stumpf gezähnt (Frahm et al. 1983) (Abb.3). Die Kapsel die vom Moos gebildet wird ist kugelig (Frahm et al. 1983), in die Blätter eingesenkt (Frahm 2011) – <http://www.archive-for-bryology.com/>) und hat ein kurzes Spitzchen. Außerdem hat die Kapsel keinen Deckel (=kleistokarp)(Frahm et al. 1983).

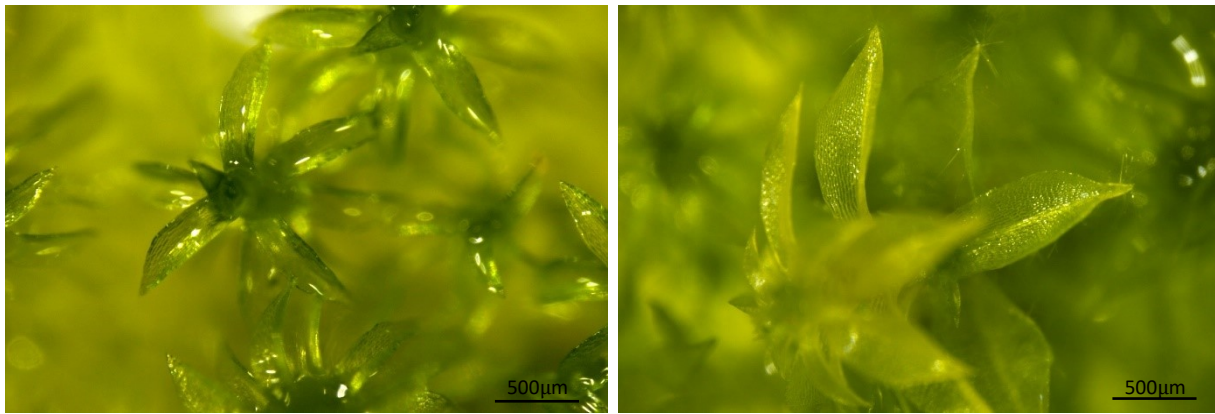


Abb. 3. *Physcomitrium patens*

Physcomitrium patens hat sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen Modellorganismus in der Grundlagenforschung und Biotechnologie entwickelt (Reski et al. 2015). Es ist die erste „Nicht-Samenpflanze“, deren Genom vollständig sequenziert wurde (Rensing et al. 2020). Da die haploide Form dominiert, wurde das Moos schon seit den 1960er Jahren als genetisches System für Untersuchungen und Isolierungen genutzt (Rensing et al. 2020). *Physcomitrium patens* gilt somit als ein erstklassiges Modellsystem um entwicklungsbiologische Fragen, Stammzellen-Reprogrammierung und die Biologie Nicht-vaskulärer Pflanzen zu untersuchen (Rensing et al. 2020). Doch der Anwendungsbereich des Moores ist nicht nur auf evolutionäre und zellbiologische Studien begrenzt, sondern wird auch im Bereich der Biotechnologie zur Herstellung neuer Biopharmazeutika verwendet (Krumm 2020). Biopharmazeutika sind beispielsweise Gerinnungsfaktoren oder Antikörper, für deren Herstellung man vorrangig spezielle Organismen wie Bakterien (*E. coli*) oder CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary-Zellen) benötigt (Krumm 2020). Durch jahrelange Forschung und Entwicklung hat sich gezeigt, dass *Physcomitrium patens* als eine Alternative zu diesen Produktionsorganismen angewendet werden kann (Krumm 2020) und auch mit Erfolg. Das erste, in diesem Moossystem produzierte humane Protein war der Vaskuläre epidermale Wachstumsfaktor (VEGF) (Reski et al. 2015; Campos et al. 2020). Vorteilhaft ist hier vor allem, dass dieses Moos sehr schnell und einfach kultiviert werden kann (Knight et al. 2009) und seinen Lebenszyklus auch unter kontrollierten oder veränderten Bedingungen vollständig durchleben kann (Reski et al. 2015). Was ebenfalls für die Herstellung von rekombinanten Proteinen wichtig ist und mit *Physcomitrium patens* möglich ist, ist dass sich posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierungen an die humanen Proteine anpassen lassen können (Krumm 2020). Weiters ist eine Sezernierung der Produkte in das Medium möglich, was eine Erleichterung der Aufarbeitung bedeutet (Krumm 2020).

Pohlia drummondii

Von den etwa 150 Arten die zur Moosgattung *Pohlia* (Hedw.) gehören, kommen circa 25 Arten in Europa vor (Lang und Wernitznig 2011). Die Art *Pohlia drummondii* ist in Nord- und Mitteleuropa, Nordamerika und Asien vertreten (Frahm et al. 1983). Sie kommt sowohl im Tiefland wie auch in höheren Lagen der Alpen und an Gletscherufern vor (Lang und Wernitznig 2011). Dabei bevorzugt diese Art nasse und feuchte Böden (Akiyama et al. 2009). Die Blätter sind linear und lanzettlich (Akiyama et al. 2009) (Abb.4). Pro Blattachsel bildet sie meist eine Bulbille aus, die rundlich und rot-braun ist (Frahm et al. 1983). *Pohlia drummondii* gehört zu

jenen Moosarten, die an metallreichen Standorten wachsen und überleben können. So gehören solche *Pohlia*-Arten zu den metalltoleranten Moosarten. (Adlassnig et al. 2016).

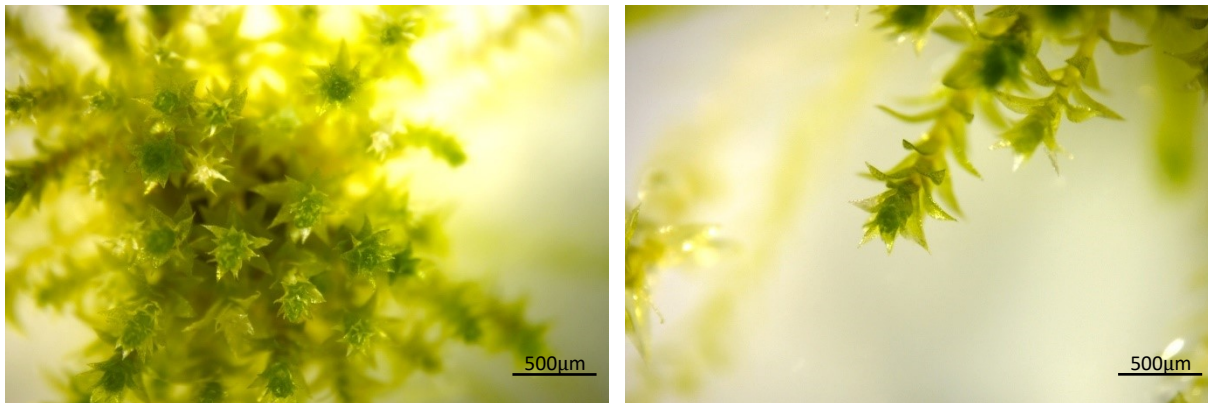


Abb. 4. *Pohlia drummondii*

1.2 Schwermetalle

1.2.1 Definition

Schwermetalle sind Elemente, die natürlicherweise in der Erdkruste vorkommen und über verschiedene Wege an die Umwelt abgegeben werden (Stanković et al. 2018). Den Begriff „Schwermetalle“ genau zu beschreiben ist nicht einfach, da es wissenschaftlich viele Definitionen gibt, die nicht einheitlich sind und demnach auch nicht immer die gleichen Metalle in den Definitionen miteingeschlossen werden (Reineke und Schlömann 2020). Eine der gängigsten Methoden ist, die Schwermetalle über ihre Dichte zu definieren (Stanković et al. 2018). Dabei gelten jene Elemente mit einer Dichte von mehr als 5g/m^3 als Schwermetalle (Stanković et al. 2018; Reineke und Schlömann 2020).

Einige dieser Schwermetalle, wie Cu, Fe, Mn, Zn, Ni oder Mo gelten als essentielle Mikronährstoffe für Pflanzen (Vatansever et al. 2017), Tiere und Menschen (Ebermann und Elmadfa 2011). Als essentiell werden sie bezeichnet, weil sie entweder an Redox-Reaktionen teilnehmen, Co-Faktoren oder Aktivierungen von Enzymen sind oder im Nukleinsäurestoffwechsel strukturelle Funktionen haben (Stanković et al. 2018; Nagajyoti et al. 2010). So wichtig eine ausreichende Zufuhr an diesen lebensnotwendigen Spurenelementen ist, so gefährlich kann ein Überschuss an diesen Metallen für lebende Organismen sein (Nagajyoti et al. 2010). Manche Schwermetalle, die nicht als essentiell gelten, wie zum Beispiel Hg, Pb oder Cd, haben in allen Konzentrationen toxische Wirkungen. (Stanković et al. 2018). Ob ein Schwermetall toxisch wirkt, hängt nicht nur von der Konzentration ab, sondern auch von den jeweiligen Wirkungen und Mechanismen, die in den lebenden Organismen stattfinden (Reineke und Schlömann 2020). Die Toxizität wird somit von folgenden vier Faktoren bestimmt: (a) wenn es zu Enzyminaktivierungen kommt, (b) wenn Wechselwirkung der Metallkationen mit den physiologischen Kationen stattfinden und dadurch die Funktionen von Metallo-Enzyme beeinträchtigen, (c) wenn Eigenschaften der Zellmembran in Bezug auf die Durchlässigkeit verändert werden und somit der Stofftransport beeinflusst wird und (d) wenn es zu Kanzerogenität und Veränderung des Erbgutes kommt (Reineke und Schlömann 2020).

Damit die Metalle überhaupt ihre essentiellen Aufgaben übernehmen können beziehungsweise toxisch wirken können, müssen sie für die Pflanzen verfügbar sein. Die freien Metallionen spielen für die Bioverfügbarkeit die wichtigste Rolle (Reineke und Schlömann 2020). In welcher chemischen Form die Schwermetalle vorliegen und wie ihre Mobilität ist wird von mehreren Faktoren, wie dem pH-Wert, dem Redox-Potential oder auch der Wasserhärte beeinflusst (Reineke und Schlömann 2020). In komplexierter Form wird die Bioverfügbarkeit und somit auch die (toxische) Wirkung der Ionen erniedrigt. Ein Beispiel ist die Sulfidbindung im Sediment (Reineke und Schlömann 2020).

Es gibt zwei hauptsächliche Quellen woher die Schwermetalle stammen können, nämlich natürlichen oder anthropologischen Ursprung (Reineke und Schlömann 2020). Natürlichen Ursprungs bedeutet, dass Schwermetalle natürlicherweise in der Erdkruste (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984), in Mineralien, Erzen und Gesteinen vorkommen (Reineke und Schlömann 2020). Verwitterungen führen dazu, dass die Schwermetalle schließlich in die Luft oder den Boden gelangen. (Reineke und Schlömann 2020). Weiters kann Wind Schwermetalle aus anderen natürlichen Quellen in die Umwelt verbreiten. So kommt es zur Verbreitung der Metalle, die im Staub von Vulkanausbrüchen vorkommen, im Wüstensand aus der Sahara zu finden sind oder in marinen Aerosolen enthalten sind (Nagajyoti et al. 2010). Anthropogene Quellen hingegen führen zu einer deutlich höheren Schwermetallbelastung in der Umwelt (Reineke und Schlömann 2020). Landwirtschaft, Industrie und Kläranlagen sind Schwermetallquellen (Nagajyoti et al. 2010), die durch den menschlichen Einfluss entstanden sind. In der Landwirtschaft genutzte Pestizide, Fungizide und auch Düngemittel sind Beispiele für Schwermetallvorkommen in landwirtschaftlich genutzten Böden (Nagajyoti et al. 2010). Auch wenn die Konzentrationen nicht sehr hoch sind, besteht die Gefahr, dass einige Metalle in hohen Mengen akkumulieren können (Nagajyoti et al. 2010).

Schwermetallquellen in der Industrie entstehen vor allem beim Bergbau, aber auch bei der Verarbeitung von Metallen und dem Transport von Erzen (Nagajyoti et al. 2010). Beim Schmelzen oder Gießen von Metallen werden Schwermetalle in Form von Partikeln und Dämpfen emittiert und durch den Wind oder den Regen gelangen sie in die Umwelt, den Boden und ins Wasser (Nagajyoti et al. 2010). Auch Kohleverbrennung oder Entsorgung von Abfällen führt zu Umweltbelastungen, da Schwermetalle in Form von Flugasche freigesetzt werden. (Nagajyoti et al. 2010).

Schwermetalle sind in ihren Eigenschaften, Vorkommen und Wirkungen auf lebende Organismen also sehr verschieden. Als Mikronährstoffe sind einige von ihnen einerseits lebensnotwendig, können aber andererseits in der falschen Konzentration letal sein. Da in dieser Arbeit die Wirkung von vier Schwermetallen, *Kupfer*, *Eisen*, *Mangan* und *Antimon* auf verschiedene Moosarten untersucht wurde, werden diese Metalle im nächsten Abschnitt genauer beschrieben.

1.2.2 Verwendete Metalle

Antimon

Antimon kann man in der Umwelt und Natur vorfinden, nicht zuletzt auch aufgrund des menschlichen Einflusses (Babula et al. 2008). In vielen Mineralien kann man Antimon finden, hauptsächlich in Verbindung mit Schwefel (Babula et al. 2008), aber auch in Kombination mit

Sauerstoff oder in Mischmineralien mit Kupfer, Blei oder Quecksilbersulfid (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984).

Das Vorkommen von Antimon ist in unserem Lebensraum weit verbreitet. Erklären lässt sich dies durch den Einfluss des Menschen. Beim Verbrennen von Kohle, Schmelzen von antimonhaltigen Erzen, sowie durch den Abrieb von Reifen, Bremsen und Asphalt wird Antimon freigesetzt (Babula et al. 2008).

Es hat sich gezeigt, dass in Proben aus der Umwelt zwischen Sb(III) und Sb(V) unterschieden werden kann (Babula et al. 2008). Obwohl die tatsächliche Toxizität von Antimon noch nicht vollständig geklärt ist, geht man davon aus, dass Sb(III) toxischer auf die Organismen wirkt als Sb(V) (Babula et al. 2008). Das biochemische Verhalten von Sb(III) lässt sich mit Arsen und Bismut vergleichen, da diese drei Elemente im Periodensystem aus der gleichen Gruppe stammen (Babula et al. 2008).

Obwohl man noch nicht ausreichend weiß, wie genau Antimon in die Pflanzen aufgenommen und transportiert wird und wie hoch die Toxizität ist, geht man davon aus, dass die Mechanismen ähnlich wie bei anderen Schwermetallen sind (Babula et al. 2008). Möglich ist, dass das schädlichere Sb(III) aufgenommen wird, in das weniger toxische Sb(V) umgewandelt wird und anschließend mit Proteinen komplexiert in der Vakuole gespeichert wird (Babula et al. 2008).

Antimon gehört nicht zu den essentiellen Elementen, hat aber aufgrund der Tatsache, dass es mit Biomolekülen wechselwirken kann, eine wichtige Bedeutung in der Medizin und Gesundheitspflege (Sun et al. 2009). Antimonverbindungen können mit Proteinen, Enzymen oder Aminosäuren Verbindungen eingehen und eine antivirale oder antiparasitäre Wirkung haben (Sun et al. 2009). Beachten muss man aber, dass Antimon in höheren Konzentrationen toxisch und sogar tödlich sein kann, da die letale Dosis bei 100mg/kg liegt (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984).

Eisen

Eisen gehört zu den essentiellen Spurenelementen (Ebermann und Elmadfa 2011). Für Menschen, Tiere und Pflanzen ist es ein lebensnotwendiges Element, das an vielen wichtigen Stoffwechselvorgängen beteiligt ist (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984). Als Zentralatom in Eisenproteinen ist es beim Menschen für den Sauerstofftransport und Stoffwechsel des Sauerstoffs unabdingbar (Ebermann und Elmadfa 2011). In nicht gebundenem Zustand wird es für Eisentransport- und Speicherproteine genutzt (Ebermann und Elmadfa 2011). Bei Pflanzen wird Eisen bis zu 80% in Chloroplasten gespeichert, da es eine wesentliche Rolle in der Photosynthese einnimmt (Hänsch und Mendel 2009). Neben der wichtigen Funktion bei der Photosynthese ist Eisen außerdem an der mitochondrialen Atmung, der Hormonbiosynthese oder auch an der Produktion und am Abfangen von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt (Hänsch und Mendel 2009).

Ein Mangel an Eisen wird bei Menschen als Eisenmangelanämie bezeichnet. Hauptgrund für einen Mangel ist oft eine unzureichende Zufuhr aus der Nahrung. Andere Gründe können auch eine Schwangerschaft sein, bei der der Bedarf an Eisen höher wird, oder Eisenmangel zeigt sich als ein Symptom einer anderen Erkrankung, die mit Blutverlust einhergeht (Aktories et al. 2017). Ein Überangebot an Eisen kann hingegen infolge einer akuten Vergiftung mit Eisen

auftreten oder aufgrund von Eisenüberladungserkrankungen wie zum Beispiel bei genetisch bedingter Hämochromatose oder Häm siderose (Aktories et al. 2017).

Ein geringer Eisengehalt bei Pflanzen zeigt sich in Form von Chlorosen, welche man an der Gelbverfärbung oder dem Blasswerden der grünen Pflanzenteile bemerkt (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984). Die Eisenaufnahme und Verfügbarkeit ist von mehreren Faktoren abhängig, einerseits vom pH-Wert und andererseits vom Phosphatgehalt und der Eisenkonzentration im Boden. Außerdem können andere Schwermetalle im Boden die Eisenaufnahme in die Pflanzen hemmen (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984).

Eisen kann in wässrigen Lösungen als Eisen (II) oder als Eisen (III) vorliegen. Wenn Sauerstoff dazukommt und bei annähernd neutralem pH-Wert, geht Eisen (II) in Eisen (III) über, welches energetisch stabiler ist. Beide Oxidationszustände können Chelatbindungen mit organischen und anorganischen Verbindungen eingehen, die meistens gut löslich sind. (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984). Generell wird Fe (II) bevorzugter von Pflanzen aufgenommen als Fe (III), allerdings ist dies auch von der Spezies abhängig (Marschner und Marschner 2012).

Kupfer

Kupfer gehört zu jenen Schwermetallen, die weit verbreitet vorkommen (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984), für lebende Organismen essentiell sind, aber nicht in hohen Mengen benötigt werden (Ebermann und Elmadfa 2011). Kupfer kann als Cu (I) oder Cu (II) vorliegen, sowie in Form von Komplexen, die alle verschiedene Eigenschaften besitzen (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984).

Die Biosynthese von essentiellen, kupferhaltigen Enzymen und Proteinen, ist durch die Fähigkeit des Kupfers, Komplexe bilden zu können, möglich (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984). Deshalb ist eine ausreichende Versorgung mit diesem Spurenelement für Pflanzen, Tiere und Menschen wichtig. Mangelerscheinungen beim Menschen treten bei einer normalen ausgewogenen Ernährung selten auf. Bei Pflanzen hingegen ist die Kupferversorgung vom Angebot im Boden abhängig (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984). Wie viel Kupfer beispielsweise aus der Erdkruste in den Boden abgegeben wird, hängt am meisten vom pH-Wert ab. Sowohl bei sehr saurem pH-Wert, als auch bei alkalischen Boden-pH kann es zu Kupfermangel kommen, da in sehr sauren Böden Kupfersalze gelöst und ausgewaschen werden können und bei basischem pH-Wert Kupfer ausfallen kann und somit für die Pflanzen nicht mehr verfügbar ist (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984).

Doch nicht nur ein Mangel an Kupfer kann problematisch sein, sondern auch ein Überangebot. Durch menschliche Einflüsse wie Hüttenbetriebe, Abfälle, Dünger, Pestizide kommt es zu einem Anstieg der Kupferkonzentrationen an der Oberfläche des Bodens (Alloway 1999). Der Transport des Kupfers in Pflanzen ist unterschiedlich. Es kann beispielsweise in den Zellwänden oder der Wurzelhaut angereichert und dann weiter transportiert werden. Manche Pflanzen können es wieder ausscheiden und andere Pflanzenarten und einige Moosarten können Kupfer akkumulieren (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984). Kupfertoxizität beim Menschen ist eher selten, außer es wurde absichtlich eine größere Menge aufgenommen oder es handelt sich um eine genetisch bedingte Erkrankung (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984). Hauptsächlicher Grund für die Toxizität ist, dass

freie Kupferionen an Proteine binden, die normalerweise keine Kupferproteine sind, wodurch ihre Funktionen beeinträchtigt werden können (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984).

Mangan

Mangan ist ein Element, das zur 7. Nebengruppe im Periodensystem gehört und ein hartes und sprödes Schwermetall ist (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984). Es kommt natürlicherweise in der Natur vor, allerdings nicht als elementares Mangan, sondern in Form von Manganmineralien, wovon, unter den mehr als 100 verschiedenen Mineralien, Bernstein eines der häufigsten ist (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984). Allgemein kann Mangan in Oxidationsstufen von +2 bis +7 vorkommen. Im Boden vorrangig sind aber die Oxidationsstufen +2, +3 und +4, wobei nur Mangan (II) von Pflanzen aus dem Boden aufgenommen werden kann. Mangan (III) ist eher instabil und Mangan (IV) bildet unlösliche Oxidverbindungen. (Schmidt und Husted 2019).

Es hat sich gezeigt, dass das breite Vorkommen von Mangan in der Natur weitgehend unabhängig vom menschlichen Einfluss ist. Es kommt im Meerwasser, Grund- und Quellwasser, in fast allen Böden, Pflanzen, Tieren und Menschen vor (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984). Dabei scheint es so, dass die Umgebungskonzentration nicht der Hauptfaktor für den Mangangehalt in lebenden Organismen ist, sondern die jeweilige Spezies (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984). Im tierischen und menschlichen Organismus findet keine Akkumulation des Metalls statt. Anders ist das jedoch bei Pflanzen, wobei dies auch von der Spezies abhängig ist. Da Mangan für alle Lebewesen ein essentielles Spurenelement ist, kann ein Mangel aber auch ein Überangebot negative Auswirkungen auf lebende Organismen haben (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984). Generell ist Mangan aber ein Metall, dass weder für die Umwelt noch für Lebewesen toxisch ist, wenn es nicht in unnatürlich hohen Konzentrationen vorkommt (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984).

Die Resorption des Mangans in Pflanzen findet über den Boden statt, wo sich Mangan aus Niederschlägen in den obersten Erdschichten sammelt. Der pH-Wert des Bodens ist dabei maßgeblich für die Verfügbarkeit des Mangans verantwortlich, da aus alkalischen Böden keine Aufnahme in die Pflanze möglich ist (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984). Bei hohem pH-Wert wird nämlich die Verfügbarkeit von Mn_2 durch Bildung von MnO_2 verringert (Schmidt und Husted 2019). Generell sind Pflanzen Mangan gegenüber relativ tolerant, auch wenn ein Überschuss des Metalls vorliegt. Bei einem Mangel an Mangan hingegen kann es zu Wachstumsstörungen kommen (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984). Vor allem in kalkhaltigen, trockenen und sandigen Böden kommt es häufig zu Manganmangel (Schmidt und Husted 2019). Aufgrund seiner Funktion als Co-Faktor und als unspezifischer Aktivator mehrerer Enzyme, ist Mangan vor allem in Mitochondrien von pflanzlichen und tierischen Zellen zu finden (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984).

Menschen und Tiere hingegen reagieren deutlich intensiver auf zu hohe oder zu niedrige Mangankonzentrationen als Pflanzen. Beim Menschen zeigt sich ein Manganmangel mit Veränderungen an Haut und Haaren (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984). Bei einem Überangebot, dass aber hauptsächlich bei Personen auftritt die beispielsweise in Manganerzmühlen, Batteriefabriken oder Bergwerken arbeiten, sind vor allem zwei

Krankheiten besonders häufig: Manganpneumonie ist das Ergebnis von starker inhalativer Aufnahme von sehr hohen Mangankonzentrationen; Manganismus hingegen ist eine Erkrankung, die durch Langzeitexposition von hohen Konzentrationen an Mangan in der Luft hervorgerufen wird und mit psychischen und parkinsonähnlichen Symptomen einhergeht (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984)

1.3 Biomonitoring

Biomonitoring hat das Ziel, Veränderungen in der Umwelt zu erkennen und zu bewerten. Möglich wird das durch die Durchführung von biologischen Studien an lebenden Organismen und Anwendung verschiedener Analysetechniken, um die Ergebnisse auszuwerten (Dolegowska et al. 2014). Mit Hilfe des Biomonitoring werden unter anderem Elementbestimmungen in verschmutzten und unverschmutzten Umgebungen gemacht, Schadstoffe und deren Konzentrationen in der Umwelt bestimmt oder auch der Gehalt an Spurenelementen und organischen Verbindungen in der Umwelt vorhergesagt und analysiert (Dolegowska et al. 2014). Bei der Art der Durchführung gibt es zwei Möglichkeiten des Monitoring: aktives und passives Biomonitoring (Dolegowska et al. 2014; Fernández et al. 2000). Bei der aktiven Methode werden die ausgewählten Organismen von ihrem Standort in eine andere Umgebung gebracht (Dolegowska et al. 2014). Meistens wird dafür die Moss-Bag Methode angewendet (Fernández et al. 2000), bei der ausgewählte Moosarten in sogenannten „moss-bags“ an stark schadstoffbelasteten Standorten exponiert werden können (Dolegowska et al. 2014). Beim passiven Biomonitoring hingegen untersucht man die ausgewählten Organismen an ihren natürlichen Standorten (Dolegowska et al. 2014; Fernández et al. 2000).

Viele Pflanzen haben die Fähigkeit, Metalle, insbesondere Schwermetalle, aufzunehmen (Aceto et al. 2002). Dabei können die angewendeten Organismen je nach Art ihrer Reaktionen verschieden definiert werden. Es gibt zunächst Bioindikatoren, die Informationen über den aktuellen Zustand der Umwelt liefern. Biomonitoren sind hingegen Organismen oder Teile davon, die die quantitativen Informationen bezüglich der Schadstoffbelastung zeigen. (Dolegowska et al. 2014; Markert 2007). Weiters gibt es noch die Bioakkumulatoren, die Elemente aus der Umwelt akkumulieren können und beispielsweise höhere Konzentrationen dieser Elemente aufweisen als andere Spezies, die am selben Standort leben (Markert 2007, 2003).

Moose gelten als sehr gute Bioindikatoren für Schwermetalle sowie für Xenobiotika, die manche Arten in hohen Mengen akkumulieren können (Markert 2003). Moose werden mittlerweile seit vielen Jahren zur Bestimmung der Luftqualität sowie der Schwermetallbelastung in der Atmosphäre angewendet (Dolegowska et al. 2014). Gründe, warum gerade Moose besonders gut geeignet sind, sind vielfältig. Vorteilhaft ist zunächst, dass sie an den verschiedensten Standorten, unter anderem auch in städtischen und industriellen Gebieten zu finden sind (Markert 2003). Weiters können sie Metall-Ionen über ihre Zellwand aufgrund ihrer fehlenden Kutikula sehr gut aufnehmen (Markert 2003; Dolegowska et al. 2014) und über Ionenaustausch akkumulieren (Markert 2003). Die Aufnahme von Mineralien erfolgt hauptsächlich durch Niederschläge und über die gesamte Zelloberfläche (Boquete et al. 2021), da Moose aufgrund fehlender Wurzeln keine Möglichkeit

haben, diese aus dem Boden aufzunehmen (Markert 2003; Dolegowska et al. 2014). Außerdem können Moose längere Trockenperioden überleben, haben ein ganzjähriges Wachstum und die Probennahme sowie Analyse von Moosen ist kostengünstig (Aceto et al. 2002).

Moose können Schwermetall über verschiedene Mechanismen aufnehmen und akkumulieren (Stanković et al. 2018). Nach der Aufnahme können die Metalle entweder an der Zellwand und äußeren Oberfläche der Plasmamembran, in austauschbarer Form an Austausch – oder Chelatbindungsstellen gebunden werden, sich als feste Partikel in der Oberflächenschicht anlagern oder ins Zellinnere gelangen und dort gelöst oder ungelöst vorliegen (Stanković et al. 2018). Die hauptsächliche Aufnahme erfolgt über Ionenaustauschprozesse und Bildung von Chelatkomplexen an der Zellwand (Stanković et al. 2018; Onianwa 2000). Möglich wird dies durch organische, funktionelle Gruppen in der Zellwand, die mit Ionen in Wechselwirkungen treten können und es dabei zum Ionentausch oder einer Chelatbindung kommt. Beispiele von funktionellen Gruppen, die beteiligt sein können, sind unter anderem Carboxyl- und Phosphorylgruppen, Polyphenole oder- Aminogruppen (Stanković et al. 2018; Onianwa 2000). Da es sich beim Ionenaustausch um einen physiologisch-chemischen Prozess handelt, spielen bei der Aufnahme mehrere Faktoren eine wichtige Rolle. Die klimatischen Bedingungen, der pH-Wert und der Austrocknungsprozess sind genauso wichtig wie das Zellalter, die Art der freien Kationen sowie die Art des Schadstoffes (Dolegowska et al. 2014).

Aufgenommene Schwermetalle können aber auch das Zellinnere erreichen und zwar über spezifische Membrantransportproteine oder über Kanäle in der Zellmembran (Stanković et al. 2018). Die Metalle im Zellinneren können Aufschluss über die Umweltsituation über einen längeren Zeitraum liefern, da die Aufnahme der Schwermetalle ins Zellinnere ein zeitlich längerer Prozess ist. Im Gegensatz dazu können jene Metalle, die an der Zellwand gebunden werden und auch ausgetauscht werden, den momentanen Umweltzustand beschreiben (Stanković et al. 2018).

2. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit wurden die Moosarten *Pohlia drummondii*, *Physcomitrium patens* und *Hypnum cupressiforme* auf ihre Überlebensfähigkeit in Gegenwart von Schwermetalllösungen getestet. *Kupferchlorid*, *Eisenchlorid*, *Manganchlorid* und *Antimon-Acetat* wurden als Lösungen hergestellt und einzeln sowie in Kombinationen an den Moosarten getestet. Ziel war es herauszufinden, ob die Kombinationslösungen für die Moose schädlicher sind, als die Einzelmetalle. Die Verteilung der Metalle an der Blättchenoberfläche und damit das Adsorptionsverhalten wurde mittels Elementanalyse (EDX) untersucht.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- 1) Wie wirken sich die Schwermetalllösungen einzeln und in Kombination auf die Plasmolysefähigkeit und somit das Überleben der Moose aus?
- 2) Schränken die kombinierten Metalllösungen das Wachstum der Moose mehr ein im Vergleich zu den einzeln applizierten Metalllösungen?
- 3) Wie ist die Verteilung der Metalle nach Aufnahme in die Moose, wenn sie in kombinierten Metalllösungen vorliegen?

3. Material und Methoden

3.1 Vorbereitung des Probenmaterials

Die ausgewählten Moose *Pohlia drummondii*, *Physcomitrium patens* und *Hypnum cupressiforme* wurden vom Department of Functional and Evolutionary Ecology der Universität Wien zur Verfügung gestellt. Die Moose wurden vor Beginn der Experimente auf frische Agarplatten mit Nährmedium überimpft. Über einen Zeitraum von circa vier Wochen wurden sie unter kontrollierten Bedingungen bei 20 Grad Celsius und unter Lichteinwirkungen wachsen gelassen. Dabei hatten die Moose 14 Stunden Licht und 10 Stunden Nacht. Diese Moose wurden für alle nachfolgenden Experimente genutzt.

3.2 Toleranztests

Die Ermittlung der Toleranzgrenzen der Moose gegenüber den Schwermetallen CuCl_2 , FeCl_2 , MnCl_2 und *Sb-(III)-Acetat* stellte die Basis für die weiteren Untersuchungen dar. Um die maximalen Metallkonzentrationen zu ermitteln, bei der die jeweiligen Moose noch überleben, wurden Plasmolyseuntersuchungen durchgeführt. Da nur in lebenden Zellen eine Plasmolyse stattfinden kann (Sassmann et al. 2010), kann mit Hilfe dieser Methode eine Aussage darüber getroffen werden, ab welchen Metallkonzentrationen die schädliche Wirkung so hoch ist, dass die Moose nicht mehr überlebensfähig sind.

Für die ausgewählten Metalle CuCl_2 , MnCl_2 , FeCl_2 und *Antimon-(III)-acetat* wurden Stammlösungen in einer Konzentration von 100mM zu je 100ml hergestellt. Die Toleranztests wurden in einer 96-Mikrotiter-Wellplatte durchgeführt. Die Metalllösungen wurden in die Wellplatte pipettiert und eine Verdünnungsreihe gemacht, sodass Konzentrationen von 100mM bis 1nM (10^{-1}M bis 10^{-8}M) getestet werden konnten. Anschließend wurden Moosproben, hauptsächlich ganze Gametophyten, für 48 Stunden in die Lösungen eingelegt. Um die Verdunstung so gering wie möglich zu halten, wurden die Wellplatten mit einer Klarsichtfolie verschlossen und in eine Glaskammer gelegt. Alle Versuche wurden zwei Mal wiederholt.

3.3 Ermittlung der Toleranzgrenzen

Nach 48 Stunden fand die Ermittlung der Toleranzgrenzen mit Hilfe von Plasmolysetests statt. Hierfür wurde als Plasmolytikum eine 0,8M Manitolösung für *Physcomitrium patens* und *Pohlia drummondii* und eine 1M Manitolösung für *Hypnum cupressiforme* verwendet. Die unterschiedlichen Konzentrationen wurden aufgrund der verschiedenen Zellwanddicken der Moose verwendet. (Petschinger et al. 2021b). *Hypnum cupressiforme* hat eine dickere Zellwand verglichen mit *Physcomitrium patens*. Mit einer durchschnittlichen Dicke von etwa 0,9 μm (Petschinger et al. 2021a) war die Beurteilung der Plasmolyse bei *Hypnum cupressiforme* mit der 0,8M Manitolösung sehr schwierig und nicht eindeutig. Deshalb wurde für die Auswertung der Toleranzreihen und der weiteren Versuche für *Hypnum cupressiforme* eine Zuckerlösung in höherer Konzentration von 1M gewählt. Es wurden 200 μl der Manitolösung jeweils in die 96-Mikrotiter-Wellplatte pipettiert. Die Moose wurden aus den Metalllösungen herausgenommen, leicht abgetupft und sofort in die Manitolösung eingetaucht. Dort blieben sie für 30 Minuten.

Da es sich hierbei um eine hypertone Zuckerlösung handelt, findet ein osmotischer Wasserentzug (Plasmolyse) statt und der Protoplast löst sich langsam von der Zellwand ab (Matyssek und Herppich 2019). Wenn es zu einer Plasmolyse kommt, verliert die Vakuole Wasser. Normalerweise besitzt die Vakuole ein bestimmtes osmotisches Potential. Dadurch wird es möglich, dass Wasser in die Vakuole gesaugt werden kann. Durch dieses Prinzip wächst die Vakuole und drückt von innen gegen die Zellwand, was man auch als Turgordruck bezeichnet. Dieser Innendruck ist für die Stabilität der Zelle wichtig (Reißer et al. 2019). Wenn allerdings eine hypertone Lösung mit einem negativen osmotischen Potential in die Umgebung der Zelle kommt, verliert diese sehr schnell Wasser an die Umgebungslösung. Der Grund dafür ist, dass Wassermoleküle über semipermeable Membranen dort hinwandern, wo das negativere Wasserpotential ist, da es ein spontaner Reaktionsverlauf ist (Exergon) (Weiler et al. 2008). Dieser Prozess findet so lange statt bis im Inneren der Zelle das gleiche osmotische Potenzial vorliegt wie in der Umgebung. Durch diesen schnellen und starken Wasserverlust schrumpft der Protoplast und löst sich schließlich von der Zellwand ab (Weiler et al. 2008) (Abb. 5 und 6). Da dieser Vorgang nur bei lebenden Zellen und intakten Membranen erfolgt (Sassmann et al. 2010), ermöglicht er die Beurteilung, ob eine Zelle noch lebt (Plasmolyse) oder tot ist (keine Plasmolyse).

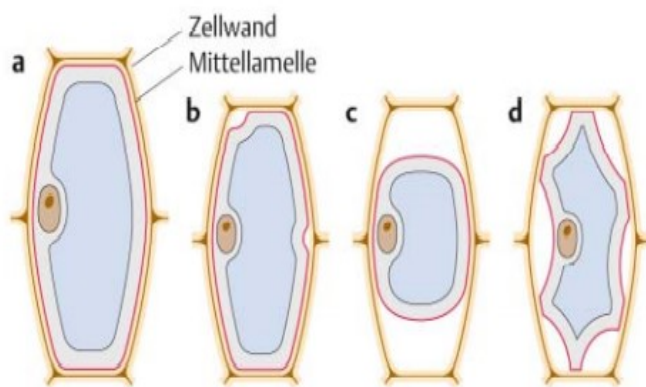


Abb. 5. a) Turgeszenz b) beginnende Plasmolyse
c) Konvexpasmolyse d) Konkavpasmolyse
(Weiler et al. 2008)



Abb. 6. *Physcomitrium patens*
 $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$: Konvex- und
Konkavpasmolyse

Die Beurteilung der Plasmolyse und somit das Überleben der Moose erfolgte mit einem Mikroskop der Marke Olympus (BX41), bei dem die Objektive 4x, 10x, 20x und 40x angewendet wurden. Das Mikroskop war zusätzlich mit einer Mikroskop-Kamera Nikon (DS-Fi3) und dem Programm Nikon NIS-Elements verknüpft, wodurch es möglich war Fotos aufzunehmen.

3.4 Kombinationslösungen

Um die Frage beantworten zu können, ob Metalle in Kombination schädlicher für die Moose sind als eines alleine, wurden Kombinationslösungen der Metalle hergestellt. Insgesamt ergaben sich sechs Kombinationen mit zwei Metallen, vier Kombinationen mit drei Metallen

und eine Kombination, bei der alle vier Metalle vorkommen (*Tabellen 1-3*). Dafür wurden zunächst 10ml Lösungen für jedes Metall hergestellt und zwar in der Konzentration, bei der die Toleranzgrenze für das jeweilige Moos lag.

Wie auch schon bei den Toleranztests war das Ziel dieses Experiments, das Überleben der Moose zu beurteilen, indem man das Ausmaß der Plasmolyse unter dem Mikroskop beobachtet. Auch in diesen Versuchen wurde mit einer 96-Mikrotiter-Wellplatte gearbeitet. Für jedes Metall wurde eine neue Lösung in der maximal tolerierbaren Konzentration für das jeweilige Moos hergestellt und anschließend direkt in der Wellplatte kombiniert. Da das Fassungsvermögen eines Wells bei ca. 200µl liegt, wurden bei den Kombinationen aus zwei Metallen jeweils 100µl pipettiert (*Tabelle 1*), bei den Kombinationen aus drei Metallen jeweils ca. 67µl (*Tabelle 2*) und bei der Kombination aller vier Metalle jeweils 50µl (*Tabelle 3*). Zusätzlich wurde zu jeder Kombination parallel eine Verdünnung gemacht. Das weitere Vorgehen war ident zu den Schritten bei den Toleranztests. Die Moose wurden für 48 Stunden in die Lösungen eingelegt. Danach wurden sie für 30 Minuten in eine 0,8M beziehungsweise 1M Manitlösung für *Hypnum cupressiforme* eingelegt und anschließend unter dem Mikroskop die Plasmolysefähigkeit der Zellen und somit die Toxizität der Metallkombinationen untersucht.

	Kombinationen	µl
1	CuCl ₂ +FeCl ₂	100 µl +100 µl
2	CuCl ₂ +MnCl ₂	100 µl +100 µl
3	CuCl ₂ +Sb-Acet.	100 µl +100 µl
4	MnCl ₂ +FeCl ₂	100 µl +100 µl
5	MnCl ₂ + Sb-Acet.	100 µl +100 µl
6	Sb-Acet. +FeCl ₂	100 µl +100 µl

Tabelle 1: Kombinationen aus zwei Metallen

	Kombinationen	µl
1	CuCl ₂ +MnCl ₂ +FeCl ₂	67 µl +67 µl +67 µl
2	CuCl ₂ +MnCl ₂ + Sb-Acet.	67 µl +67 µl +67 µl
3	CuCl ₂ +FeCl ₂ +Sb-Acet.	67 µl +67 µl +67 µl
4	MnCl ₂ +FeCl ₂ +Sb-Acet.	67 µl +67 µl +67 µl

Tabelle 2: Kombinationen aus drei Metallen

	Kombinationen	MI
1	CuCl ₂ +MnCl ₂ +FeCl ₂ + Sb-Acet.	50 µl+50 µl+50 µl+50 µl

Tabelle 3: Kombinationen aus vier Metallen

3.5 Wachstum der Moose

Nachdem mikroskopisch untersucht wurde wie sich die Metalle, einzeln und in Kombination, auf die Moose auswirken und die Toleranzgrenzen festgelegt wurden, stellte sich die Frage

nach dem Einfluss der Schwermetalle auf das Wachstum der Moose. Hierfür wurde Agar vorbereitet, in den sowohl die einzelnen Metalle als auch die Kombinationslösungen mitverarbeitet wurden. Um eine Vergleichbarkeit zu den mikroskopischen Versuchen zu erzielen, wurden die Konzentrationen aus den Ergebnissen der Toleranztests gewählt. Der Agar wurde nach Bezanilla (2012) hergestellt. (Bezanilla)-
<https://sites.dartmouth.edu/bezanillalab/moss-methods/>)

Bestandteile	Menge
<i>MgSO₄·7H₂O (500X)</i>	2 ml
<i>KH₂PO₄ (500X)</i>	2 ml
<i>CaNO₃·4H₂O (500X)</i>	2 ml
<i>FeSO₄·7H₂O (Amresco 0387-500G)</i>	12,5 mg
<i>Micro Elements (1000X)</i>	1 ml
<i>Di-ammonium tartrat (500X)</i>	2 ml
<i>Agar</i>	7 g

Tabelle 4: Bestandteile für die Herstellung von 1L Medium

Für die Herstellung von 1L Medium wurde in ein 1L Becherglas ca. 500 ml destilliertes Wasser eingefüllt und auf dem Magnetrührer nach und nach die restlichen Bestandteile dazu pipettiert (Tabelle 4). Die 7g Agar wurden auf 8 100ml Erlenmeyerkolben aufgeteilt (in jedes ca. 0,7g) und anschließend auf 100ml mit dem vorbereiteten Medium aufgefüllt. Zum Schluss wurden die Metalllösungen in die Erlenmeyerkolben hinzugefügt, sodass man auf die gleichen Konzentrationen wie in den Plasmolyseversuchen kommt. Das fertig vorbereitete Agar-Medium wurde mit Watte und Alufolie gut verschlossen und mit einem Indikator-Klebestreifen versehen. Das Medium wurde autoklaviert und für die weitere Verwendung im Kühlschrank gelagert. Um die Moose auf dieses Medium zu überimpfen, wurde der Agar in der Mikrowelle erwärmt, bis er wieder flüssig wurde und anschließend unter sterilen Bedingungen (Laminar air flow) in Petrischalen mit einem Durchmesser von ca. 5cm gegossen und bei Raumtemperatur aushärten gelassen. Nachdem der Agar in den Petrischalen fest geworden war, konnten sie mit Moosen bepflanzt werden oder gut verschlossen bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert werden.

In diesem ersten Versuch wurden zunächst nur acht Metalle und Metallkombinationen zufällig ausgewählt und in das Medium hinzugefügt. Das waren *CuCl₂*, *MnCl₂*, *FeCl₂*, *Sb-Acetat*, *CuCl₂ + MnCl₂ + FeCl₂*, *CuCl₂ + MnCl₂ + Sb-Acetat*, *MnCl₂ + FeCl₂ + Sb-Acetat* und *CuCl₂ + FeCl₂ + Sb-Acetat*. Es zeigte sich, dass nach dem Autoklavieren der Agar in den Kolben nicht fest geworden ist. Ausnahmen waren nur die Medien, in denen die Metalle einzeln und in einer Konzentration von 1mM verarbeitet wurden. Alle anderen waren noch flüssig, weshalb der Versuch gestartet wurde die gleiche Menge an Agar wie bei der Herstellung in die noch flüssigen Medien hinzuzufügen. Da dies nur einen mäßigen Erfolg brachte wurde neues Medium für alle einzelnen Metalle und alle Kombinationen hergestellt. Die Konzentrationen, die in den Toleranztests ermittelt wurden, waren nicht für alle Metalle einheitlich. Es bestand daher die Annahme, dass die unterschiedlichen und hohen Konzentrationen der Grund für das flüssige Medium waren. Deshalb wurden für alle Metalle und Metallkombinationen Lösungen

in einer Konzentration von 100µM hergestellt. Lösungen mit einer Konzentration von 1mM wurden nur für die Einarbeitung der einzelnen Metalle in das Medium hergestellt. Zusätzlich wurde bei der Herstellung die doppelte Menge an Agar verwendet. Durch die Vereinheitlichung der Metallkonzentrationen und der doppelten Menge an Agar sind die Medien fest geworden und konnten für die Kultivierung der Moose eingesetzt werden (Abb. 7). Die Plasmolyseversuche wurden mit den neuen angepassten Konzentrationen wiederholt, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen.

In zwei Durchgängen wurden nun die Moose *Physcomitrium patens* und *Pohlia drummondii* auf die vorbereiteten Metallplatten unter sterilen Bedingungen überimpft. Gleichzeitig wurden die Moose auch auf Kontrollagar ohne Metallzugabe überimpft, um eine Vergleichbarkeit im Wachstum sehen zu können. Es wurde jeweils eine Moosart pro Platte in neun Spots überimpft, sodass auf einem Medium neun neue Gametophyten wachsen konnten (Abb. 8). Nach dem Bepflanzen der Platten wurden die Petrischalen gut mit Parafilm® verschlossen und in einem Inkubationsschrank unter kontrollierter Temperatur- und Lichteinwirkung wachsen gelassen. Das Wachstum der Moose wurde mit Hilfe von Fotos dokumentiert. Über einen Zeitraum von 4 Wochen, wurde am Ende jeder Woche eine Aufnahme der Platten gemacht und somit der Fortschritt des Wachstums untersucht. Für die bildliche Darstellung wurde eine Digitalcamera (Canon EOS 2000D) verwendet. Um den Wachstumsfortschritt grafisch darstellen zu können wurde das Programm Image J verwendet.

Die Kultivierung von *Hypnum cupressiforme* auf den Metallplatten war nicht möglich, da es in den ursprünglichen Moosplatten zu Kontaminationen gekommen ist. Es wurde versucht diese Kontamination zu vermindern beziehungsweise zu beseitigen, in dem kleine noch grüne Spitzen des Mooses auf frisches Kontrollmedium überimpft wurden. Da dies aber keinen Erfolg brachte, gibt es für *Hypnum cupressiforme* für diesen Versuch keine Ergebnisse.



Abb. 7. Autoklavierte Metallmedien

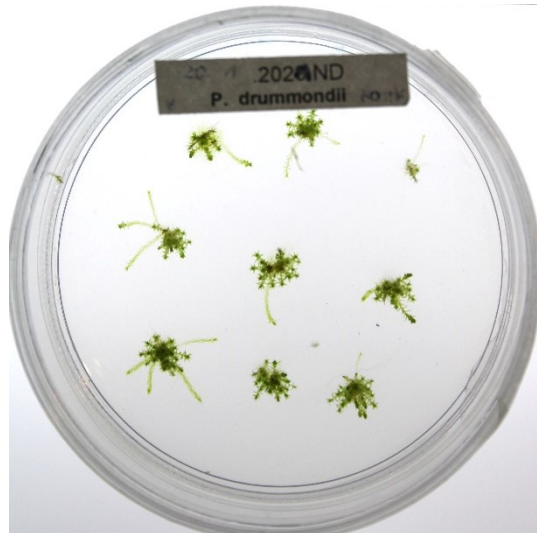


Abb. 8. *Pohlia drummondii* auf Kontrollplatte

3.6 Probenvorbereitung EDX

EDX steht für Energiedisperse Röntgenspektroskopie (energy dispersive x-ray spectroscopy). Mit diesem Verfahren wurde untersucht, ob und auch vor allem wo in der Probe die

Schwermetalle aufgenommen wurden. Es handelt sich dabei um ein spektroskopisches Verfahren, das sowohl qualitativ als auch quantitativ verwendet werden kann (Sigee 1993), Microscopy Australia: <https://micro.org.au/>. In der vorliegenden Arbeit wurde eine qualitative Untersuchung gemacht, um zu erfahren, ob und welche Schwermetalle von den Moosen adsorbiert wurden. Das Funktionsprinzip des EDX basiert auf einem Elektronenstrahl der auf die Probe trifft, diese durchdringt und mit den Atomen, aus denen die Probe aufgebaut ist, wechselwirkt (Microscopy Australia: <https://micro.org.au/>). Bei dieser Wechselwirkung entstehen die Bremsstrahlung und die charakteristische Röntgenstrahlung aufgrund der Elektronenübergänge zwischen den Elektronenschalen. Das passiert dadurch, dass der eintreffende Elektronenstrahl ein Elektron aus einer inneren Schale des Atoms entfernt und anschließend aus einer äußeren Schale ein Elektron in die entstandene Lücke aufgenommen wird (Haschke und Flock 2017), Microscopy Australia: <https://micro.org.au/>. Bei diesem Prozess wird ein Röntgenphoton emittiert. Diese emittierte Röntgenstrahlung entspricht der Differenz zwischen den Ionisierungsenergien der Elektronen, die an diesem Übergang beteiligt sind. In jeder Schale haben die Elektronen spezifische Ionisierungsenergien und die sind für jedes Element verschieden. Aus diesem Grund kann durch die Energie der Röntgenstrahlen, die am Detektor ankommen, unterschieden werden, um welches Element es sich handelt (Microscopy Australia: <https://micro.org.au/>).

Damit diese Untersuchungen gemacht werden können, mussten die Proben zunächst vorbereitet werden. Der erste Durchgang der Messungen wurde mit *Physcomitrium patens* gemacht. In diesem ersten Durchgang wurden zufällig sechs Metalllösungen ausgesucht, in die die Moose eingelegt wurden. Das waren: CuCl_2 , FeCl_2 , *Sb-Acetat*, $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$, $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$, $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat} + \text{MnCl}_2$. Die Konzentrationen aller Lösungen betrug $100\mu\text{M}$, wie in den Versuchen vorher. Da das Interesse bei diesen Messungen nicht nur darin lag zu untersuchen, ob und wo sich die Metalle im Moospflänzchen befinden, sondern auch, ob es einen Unterschied macht wie lange die Metallwirkung ist, wurden zwei Probensets vorbereitet. Im ersten Probenset wurde *Physcomitrium patens* für 20 Stunden in die Metalllösungen eingelegt und im zweiten Probenset für 2 Stunden. Um die eingelegten Moose weiter für die Messung vorzubereiten, wurden sie nach 20 bzw. 2 Stunden aus den Lösungen herausgenommen, kurz in destilliertes Wasser gelegt, abgetupft und in 1ml Eppendorfgefäße übergeführt. Anschließend wurde Parafilm® über die offenen Eppis gespannt, kleine Löcher hineingestochen und die Proben in den Gefriertrockner gelegt. Der Parafilm® wurde eingesetzt um zu verhindern, dass nach der Gefriertrocknung das Vakuum die Moospflänzchen aus den Eppis hebt, da es sich um sehr geringes Pflanzenmaterial handelt. Nach 2 Tagen wurden die Moose aus dem Gefriertrockner herausgenommen. Die getrockneten Moospflänzchen konnten nun auf Aluminiumstubs, die mit einer doppelseitig klebenden Kohlefolie bedeckt wurden, aufgebracht werden (Abb. 9). Da bei den Moosen nicht nur die kleinen Blättchen für die Messungen verwendet wurden, sondern hauptsächlich ganze Stämmchen, wurde das Pflanzenmaterial unter dem Stereomikroskop mit Hilfe einer Pinzette auf die klebende Kohlefolie möglichst flach gedrückt. Dieser Vorgang war wichtig um eine gute und ungehinderte Detektion der Röntgenstrahlen zu ermöglichen (Sigee 1993).

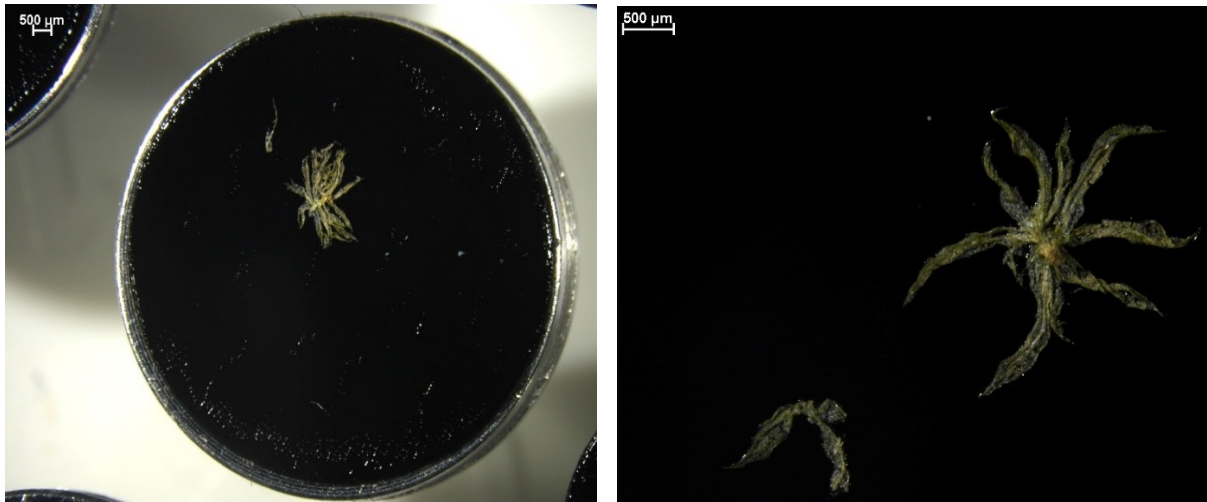


Abb. 9. *Physcomitrium patens* auf Stubs für die EDX-Messung

Nachdem sich gezeigt hat, dass die Messungen erfolgreich waren, wurden auch die restlichen Metallkombinationen an *Physcomitrium patens* getestet. *Pohlia drummondii* und *Hypnum cupressiforme* wurden ebenfalls für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. Die Probenvorbereitung war sehr ähnlich zum ersten Durchgang mit *Physcomitrium patens*. Abwandlungen zur ersten Probenvorbereitung gab es in der Art der Trocknung. Da die Gefriertrocknung keinen vorteilhaften Unterschied zur Lufttrocknung zeigte, wurde bei allen drei Moosarten auf die Gefriertrocknung verzichtet. Stattdessen erfolgte die Trocknung der Moospflänzchen direkt in offenen Eppendorfgläsern für 2 Tage an der Luft (Raumtemperatur). Die Wahl der Metalllösungen, sowie die Zeitspanne von 20 Stunden in denen die Moose den Metallen ausgesetzt waren, bleiben gleich.

3.7 EDX Messung und Auswertung

Mit dem Einsatz der EDX-Messungen sollte gezeigt werden, ob und vor allem in welchen Teilen der Moose die einzelnen Metalle adsorbiert wurden. Es wurden Übersichtsbilder erfasst, die einen Überblick über die Metallverteilung im gesamten Präparat liefern.

Die Erstellung dieser Maps ist eine relativ schnelle Methode, bei der mehrere Bilder gleichzeitig generiert werden können (Sigee 1993) und somit alle Elemente, die man vorher im Programm ausgewählt hat und in der Probe enthalten sind, sichtbar machen kann. Jedes Element kann in einer anderen Farbe angezeigt werden, wodurch eine Überlagerung zweier oder mehrerer Bilder der Elemente über das Elektronenmikroskopiebild möglich ist (Sigee 1993). Dabei zeigt jeder bunte Pixel an, ob und wo sich das Metall in der Probe befindet. Um die Bilder möglichst gut zu interpretieren, war es erforderlich, die Moose möglichst flach auf die doppelseitig klebende Kohlefolie aufzubringen. Der Grund dafür ist, dass abstehende Teile der Probe einen „Schatten“ bilden könnten und somit das Signal nicht bei dem Detektor ankommt (Sigee 1993). Da es nicht immer möglich war die Moose gleichmäßig flach zu positionieren, konnte die Interpretation durch die sogenannten CPS Bilder erleichtert werden. CPS steht für Counts per second und ist Bestandteil der Software TEAM (=Texture and Elemental Analytik Microscopy), die für EDAX-Ametek angewendet wurde. Mit Hilfe dieser CPS Darstellung erhält

man Informationen zu den jeweiligen Pixeln in den Ergebnisbildern. Je heller die Pixel sind, desto mehr Röntgenzählungen wurden gemessen. Dunkle Stellen an der Probe, die man auf der CPS Map gut sehen kann, lassen vermuten, dass hier keine oder kaum Röntgenstrahlsignale vorkommen (EDAX: Smart CPS Mapping Technical Note). Dadurch kann man darauf schließen, dass entweder in diesen Bereichen keine Metalle vorkommen oder eine Absorption der Strahlen stattgefunden hat, weil die Probe nicht ebenmäßig war (Vermutung der Autorin). In der Abbildung 10 ist so ein Fall dargestellt. Im CPS Bild (Abb. 10) ist im eingezeichneten Rechteck ein dunkles Moosblättchen zu erkennen. Abbildung 11 ist das unbearbeitete Originalbild, in dem man schon sehen kann, dass in diesem Bereich weniger Kupfersignale vorkommen als in den helleren Bereichen der Probe. Noch deutlicher wird dies in Abbildung 12 die eine Überlagerung der Abbildungen 10 und 11 ist.

Die Bearbeitung der EDX-Bilder und die Bildüberlagerungen wurden mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes GIMP 2.10.24 durchgeführt.



Abb. 10. CPS-Bild von *Physcomitrium patens*

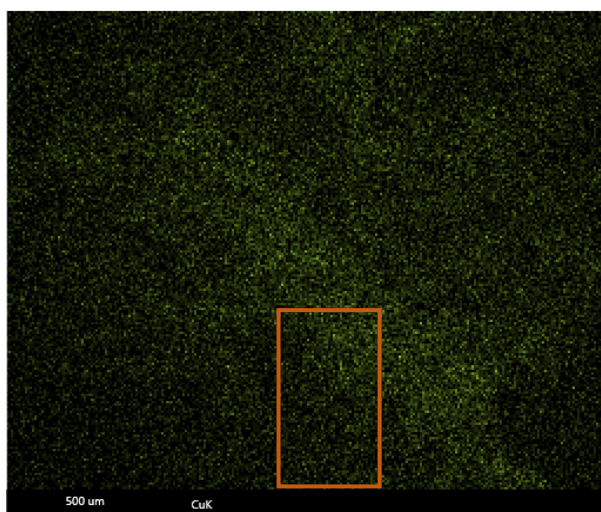


Abb. 11. CPS-Bild von *Physcomitrium patens*-Kupferverteilung: unbearbeitetes Originalbild mit weniger Signalen an der markierten Stelle



Abb. 12. CPS-Bild von *Physcomitrium patens*-Kupferverteilung: Überlagerung der Abb. 10 und 11

4. Ergebnisse

4.1 Toleranzgrenzen

Jede Moosart wurde einzeln mit den vorbereiteten Metalllösungen getestet und durch Beurteilung der Plasmolyse konnten die jeweiligen Toleranzgrenzen ermittelt werden.

Pohlia drummondii

Metalle	Konzentrationen							
	100mM	10mM	1mM	100µM	10µM	1µM	100mM	10nM
<i>CuCl₂</i>	–	–	+/-	+	+	+	+	+
<i>FeCl₂</i>	–	–	+/-	+	+	+	+	+
<i>MnCl₂</i>	–	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sb-Acetat</i>	–	–	+/-	+	+	+	+	+

Tabelle 5: Ergebnisse der Toleranztests für *Pohlia drummondii*: - keine Plasmolyse, + Plasmolyse, +/- Toleranzgrenze

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Toleranztests für *Pohlia drummondii* zusammengefasst. Die Festlegung der Toleranzgrenze erfolgte durch Beurteilung der Plasmolysefähigkeit des Mooses. Ausgehend von der höchsten Metallkonzentration von 100mM wurde eine Verdünnungsreihe bis 10 nM durchgeführt und als Toleranzgrenze wurde jene Konzentration gewählt, bei der etwa mehr als 50% der Zellen plasmolysiert sind. In Tabelle 5 wurde dies durch das Zeichen +/- gekennzeichnet.

Es zeigte sich, dass *Pohlia drummondii* gegenüber den Metallen *Kupfer*, *Eisen* und *Antimon* ab einer Konzentration von 1mM tolerant ist. Das Ablösen des Protoplasten von der Zellwand war ab dieser Konzentration gut erkennbar. Die Chloroplasten zeigten ab 100µM kaum Veränderungen in ihrer Form und ihre grüne Farbe blieb bestehen. Bei der festgelegten Toleranzgrenze von 1mM für diese drei Metalle war die Plasmolyse zwar bei mehr als der Hälfte der Zellen erkennbar, allerdings wirkte die Farbe und die Form der Chloroplasten in vereinzelt Zellen von den Schwermetallen geschädigt. Dennoch wurde diese Konzentration für *Kupfer*, *Eisen* und *Antimon* gewählt, weil der Großteil der Zellen Plasmolyse zeigte und somit als lebende Zellen galten (Petschinger et al. 2021b).

Bei *Mangan* hingegen zeigte sich bereits bei einer Konzentration von 10mM, dass *Pohlia drummondii* dieses Schwermetall gut toleriert. Bereits bei 100mM konnte man in vereinzelt Zellen eine Plasmolyse beobachten. Ab 10mM war die Ablösung des Protoplasten von der Zellwand deutlich zu erkennen. Diese Ergebnisse sind mit den Ergebnissen von Adlassnig et. al (2016) für das Moos *Pohlia drummondii* vergleichbar.

Physcomitrium patens

Metalle	Konzentrationen							
	100mM	10mM	1mM	100µM	10µM	1µM	100mM	10nM
<i>CuCl₂</i>	–	–	+/-	+	+	+	+	+
<i>FeCl₂</i>	–	–	+/-	+	+	+	+	+
<i>MnCl₂</i>	–	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sb-Acetat</i>	–	–	+/-	+	+	+	+	+

Tabelle 6: Ergebnisse der Toleranztests für *Physcomitrium patens* : - keine Plasmolyse, + Plasmolyse, +/- Toleranzgrenze

Die Ergebnisse aus den Versuchen zur Ermittlung der Toleranzgrenzen von *Physcomitrium patens* sind vergleichbar mit den Resultaten von *Pohlia drummondii*. Obwohl *Physcomitrium patens* normalerweise nicht an schwermetallbelastenden Standorten vorkommt (Sassmann et al. 2015a), zeigt das Moos eine gleich gute Toleranz gegenüber den Schwermetallen wie *Pohlia drummondii*, das eigentlich eine metalltolerante Spezies ist (Adlassnig et al. 2016). Kupfer, Eisen und Antimon wirken in höheren Konzentrationen als 1mM schädlich auf das Moos. Die Zellen zeigen keine Plasmolyse und vor allem bei Kupfer und Antimon sind die Chloroplasten bei 100mM und 10mM nicht mehr erkennbar und die Farbe des Mooses ist grau und nicht mehr grün. Gegenüber Mangan zeigt auch *Physcomitrium patens* eine bessere Toleranz als gegenüber den anderen Schwermetallen. Wie bei *Pohlia drummondii* liegt auch hier die Toleranzgrenze bei 10mM. Die Zellen sind plasmolysiert und die Chloroplasten sind intakt.

Hypnum cupressiforme

Metalle	Konzentrationen							
	100mM	10mM	1mM	100µM	10µM	1µM	100mM	10nM
<i>CuCl₂</i>	–	–	+/-	+	+	+	+	+
<i>FeCl₂</i>	–	–	–	+/-	+	+	+	+
<i>MnCl₂</i>	–	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sb-Acetat</i>	–	–	–	+/-	+	+	+	+

Tabelle 7: Ergebnisse der Toleranztests für *Hypnum cupressiforme* : - keine Plasmolyse, + Plasmolyse, +/- Toleranzgrenze

Im Gegensatz zu *Pohlia drummondii* und *Physcomitrium patens* liegen die Toleranzgrenzen von Eisen und Antimon bei *Hypnum cupressiforme* bei 100µM. In den höheren Konzentrationen ist einerseits die Plasmolyse nicht erkennbar und andererseits sind die Proben eher bräunlich. Da die Proben noch kontaminiert waren und diese Kontamination nicht vollständig entfernt werden konnte, besteht die Annahme, dass es dadurch zu der bräunlichen Farbe sowie zum geringen Toleranzniveau kam. Basierend auf den Daten von Adlassnig et al. (2016) müssten die Ergebnisse von *Hypnum cupressiforme* mit den Ergebnissen von *Pohlia drummondii* vergleichbar sein. Gegenüber Kupfer und vor allem Mangan zeigte das Moos eine gute Toleranz. Mangan in höheren Konzentrationen scheint dem Moos nicht viel zu schaden, da auch hier bereits bei 10mM mehr als die Hälfte der Zellen Plasmolyse zeigen. Auch gegenüber Kupfer ist *Hypnum cupressiforme* ab einer Konzentration von 1mM tolerant.

4.2 Kombinationen

Aus den vier ausgewählten Schwermetallen *CuCl₂*, *MnCl₂*, *FeCl₂*, *Sb-Acetat* wurden insgesamt zehn Kombinationen getestet. Sechs Lösungen waren Kombinationen aus jeweils zwei Metallen und vier Lösungen ergaben sich bei denen jeweils drei Metalle miteinander kombiniert wurden. Durch Ermittlung der Toleranzgrenzen waren die Konzentrationen der jeweiligen Metalle vorgegeben. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 8 noch einmal zusammengefasst. Mit Hilfe dieser Angaben konnten somit Kombinationslösungen in genau definierten Konzentrationen hergestellt werden. Alle Versuche wurden zweimal durchgeführt. Wie bereits im Material- und Methodenteil in dieser Arbeit erwähnt, war es bei der Beurteilung des Wachstums der Moose auf metallhaltigen Agarplatte notwendig die Konzentrationen der Schwermetalle zu ändern, da der Agar mit den Metall-Konzentrationen aus den Ergebnissen der Toleranztests nicht fest geworden ist. Um eine Vergleichbarkeit in Bezug auf alle Ergebnisse zu erzielen, wurden auch die Ergebnisse aus den mikroskopischen Untersuchungen der angepassten Konzentrationen unter einem eigenen Punkt besprochen. Zunächst wurden nur *Pohlia drummondii* und *Physcomitrium patens* getestet, da *Hypnum cupressiforme* kontaminiert war. Die Versuche mit *Hypnum cupressiforme* wurden zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt.

In den folgenden Ergebnissen wird nun in Form von Tabellen und mikroskopischen Bildern die Überlebensfähigkeit und die Toxizität der Metallkombinationen auf die drei Moosarten *Pohlia drummondii*, *Physcomitrium patens* und *Hypnum cupressiforme* beschrieben.

Moose	Metalle			
	CuCl ₂	MnCl ₂	FeCl ₂	Sb-Acetat
P. drummondii	1mM	10mM	1mM	1mM
P. patens	1mM	10mM	1mM	1mM
H. cupressiforme	1mM	10mM	100µM	100µM

Tabelle 8: Toleranzgrenzen für *Pohlia drummondii*, *Physcomitrium patens*, *Hypnum cupressiforme*

Pohlia drummondii

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse aus zwei Versuchen beschrieben. In beiden Fällen lagen die Konzentrationen von *CuCl₂*, *FeCl₂* und *Sb-Acetat* bei 1mM und von *MnCl₂* bei 10mM. Es wurde in beiden Versuchen zusätzlich eine Verdünnung gemacht, bei der 20µl der kombinierten Metalllösungen zu 180µl destilliertem Wasser hinzupipettiert wurden. Daraus ergaben sich bei der Verdünnung folgende Konzentrationen:

- CuCl₂ 100µM (10⁻⁴M)
- MnCl₂ 1mM (10⁻³M)
- FeCl₂ 100µM (10⁻⁴M)
- Sb-Acetat 100µM (10⁻⁴M)

Kombinationen	Probe 1		Probe 2	
	1mM	100µM	1mM	100µM
<i>CuCl₂ + FeCl₂</i>	+	+	+	+
<i>CuCl₂ + MnCl₂</i>	+/-	+	+/-	+
<i>CuCl₂ + Sb-Acetat</i>	+/-	+	-	+
<i>MnCl₂ + FeCl₂</i>	+/-	+	+/-	+
<i>MnCl₂ + Sb-Acetat</i>	+	+	+	+
<i>FeCl₂ + Sb-Acetat</i>	+/-	+	+/-	+

Tabelle 9: Ergebnisse der Plasmolyseuntersuchungen aus dem ersten und zweiten Durchgang (Probe 1/ Probe2) für *Pohlia drummondii*: + Plasmolyse, - keine Plasmolyse, +/- keine eindeutige Plasmolyse / weniger als 50% plasmolysiert

Kombinationen aus zwei Metallen:

Pohlia drummondii gilt als tolerante Spezies die auch an metallbelasteten Standorten wächst (Antreich et al. 2016). Diese Eigenschaften konnten sowohl bei den Kombinationen aus zwei Metallen als auch bei den Kombinationen aus drei Metallen beobachtet werden. Das Moos zeigte bei diesen Versuchen eine gute Toleranz und Überlebensfähigkeit gegenüber den Metallkombinationen und fast immer eine vollständige Plasmolyse in den Proben die in die verdünnten Lösungen eingelegt wurden.

Die Ergebnisse aus zwei Versuchen sind bis auf eine Kombination, nämlich *CuCl₂ + Sb-Acetat* sehr ähnlich. Der in den Tabellen angegebene Ausdruck +/- wurde zur Beurteilung gewählt, wenn das Ergebnis der Plasmolyse nicht absolut eindeutig war. Es zeigt an, dass Plasmolyse zwar größtenteils in der Probe stattgefunden hat, aber zum Teil auch einige Veränderungen in Bezug auf die Chloroplasten oder der gesamten Probe beobachtet werden konnten oder nur in etwa der Hälfte der Probe Plasmolyse zu sehen war. Dieser Ausdruck wird in der Beschreibung der restlichen Ergebnisse immer mit der gleichen Bedeutung verwendet. Auf diese Veränderungen wird im Folgenden näher eingegangen.

Bei der Kombination *CuCl₂ + MnCl₂* konnte in beiden Versuchen größtenteils Plasmolyse beobachtet werden, allerdings waren vor allem die Spitzen der Blätter meist grau und Chloroplasten waren an diesen Stellen nicht mehr erkennbar (Abb. 13a). Außerdem war die Farbe der Chloroplasten im ersten Versuch etwas dunkler/gräulicher. In den verdünnten Lösungen hingegen war die Farbe der Chloroplasten und die Plasmolyse deutlich zu erkennen. Ähnlich war es bei den Versuchen mit *CuCl₂ + Sb-Acetat*. Vor allem im zweiten Durchgang konnten kaum Zellen identifiziert werden, die noch plasmolysefähig waren (Abb. 13b). Außerdem verloren die Chloroplasten ihre grüne Farbe und die Blätter des Mooses erschienen unter dem Mikroskop grau beziehungsweise farblos. Im ersten Versuch hingegen war die Toleranz gegenüber dieser Kombination etwas besser.

Gegenüber den Kombinationen *MnCl₂ + Sb-Acetat*, *MnCl₂ + FeCl₂* sowie *Sb-Acetat + FeCl₂* zeigte *Pohlia drummondii* eine gute Überlebensfähigkeit. Plasmolyse war bei allen drei Kombinationen und in beiden Versuchen zu einem großen Teil zu beobachten (Abb. 13c-e). Bei allen drei Kombinationen waren keine Farbveränderungen oder Verformungen der Chloroplasten zu beobachten und in allen sechs Fällen war die Überlebensfähigkeit des Mooses in den verdünnten Lösungen deutlich besser (Abb. 13f).

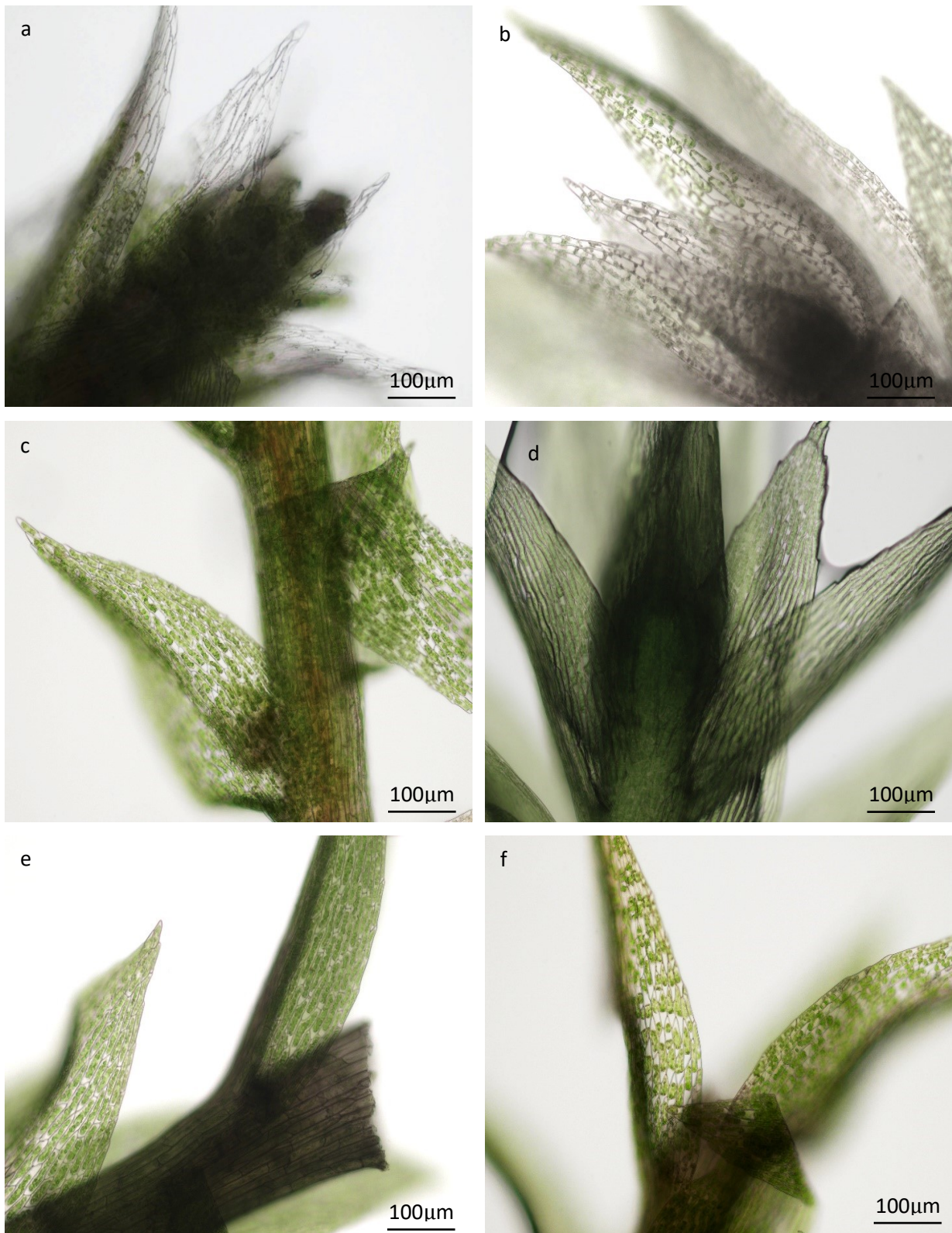


Abb. 13. *Pohlia drummondii*: Ergebnisse der Plasmolyseversuche: (a) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2$ 1mM, (b) $\text{CuCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ 1mM Probe 2, (c) $\text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ 1mM, (d) $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ 1mM, (e) $\text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ 1mM, (f) $\text{CuCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ 100µM

Kombinationen aus drei Metallen

Die Toleranz gegenüber den Kombinationslösungen aus drei Metallen war nahezu genauso hoch wie bei den vorangegangenen Versuchen mit nur zwei Metallen in Kombination. Das Vorgehen der Beurteilung und Beschreibung der Ergebnisse erfolgt wie in den bereits vorher beschriebenen Ergebnissen.

Kombinationen	Probe 1		Probe 2	
	1mM	100µM	1mM	100µM
$CuCl_2 + MnCl_2 + FeCl_2$	+/-	+	+/-	+
$CuCl_2 + MnCl_2 + Sb\text{-}Acetat$	+/-	+	+/-	+
$CuCl_2 + FeCl_2 + Sb\text{-}Acetat$	+/-	+	+	+
$MnCl_2 + FeCl_2 + Sb\text{-}Acetat$	+/-	+	+	+

Tabelle 10: Ergebnisse der Plasmolyseuntersuchungen aus dem ersten und zweiten Durchgang (Probe 1/ Probe2) für *Pohlia drummondii*

Wie aus der Tabelle 10 ersichtlich ist, zeigte *Pohlia drummondii* eine gute Überlebensfähigkeit gegenüber den Metallkombinationen. Allerdings waren bei nahezu allen Kombinationen, bis auf zwei, entweder physiologische Veränderungen zu beobachten oder die Plasmolyse fand nur in circa 50% der Zellen statt.

In der ersten Versuchsreihe reagierte *Pohlia drummondii* auf $CuCl_2 + MnCl_2 + Sb\text{-}Acetat$ und $CuCl_2 + FeCl_2 + Sb\text{-}Acetat$ ähnlich. Plasmolyse war in beiden Fällen zwar vorhanden, aber es waren dazwischen Zellen zu sehen, die nicht plasmolysiert waren oder die Chloroplasten keine grüne Farbe mehr hatten (Abb. 14a,c). Bei beiden Kombinationslösungen konnte man allgemein in der gesamten Probe sehen, dass die Farbe der Chloroplasten etwas dunkler war. Im zweiten Versuch und vor allem auch in den Verdünnungen der Lösungen reagierte das Moos viel besser auf die Metallkombinationen (Abb. 14b,d).

Die Proben die in die Kombinationen $CuCl_2 + MnCl_2 + FeCl_2$ und $MnCl_2 + FeCl_2 + Sb\text{-}Acetat$ eingelegt wurden zeigten ebenfalls ähnliche Reaktionen. Plasmolyse war bei beiden Metallkombinationen vorhanden. In der ersten Versuchsreihe mit $MnCl_2 + FeCl_2 + Sb\text{-}Acetat$ war die Plasmolyse als beginnendes Ablösen des Protoplasten zu sehen, während beim zweiten Versuch dann eindeutig die Zellen größtenteils plasmolysiert sind. Ähnlich war es bei $CuCl_2 + MnCl_2 + FeCl_2$ (Abb. 14e-h).

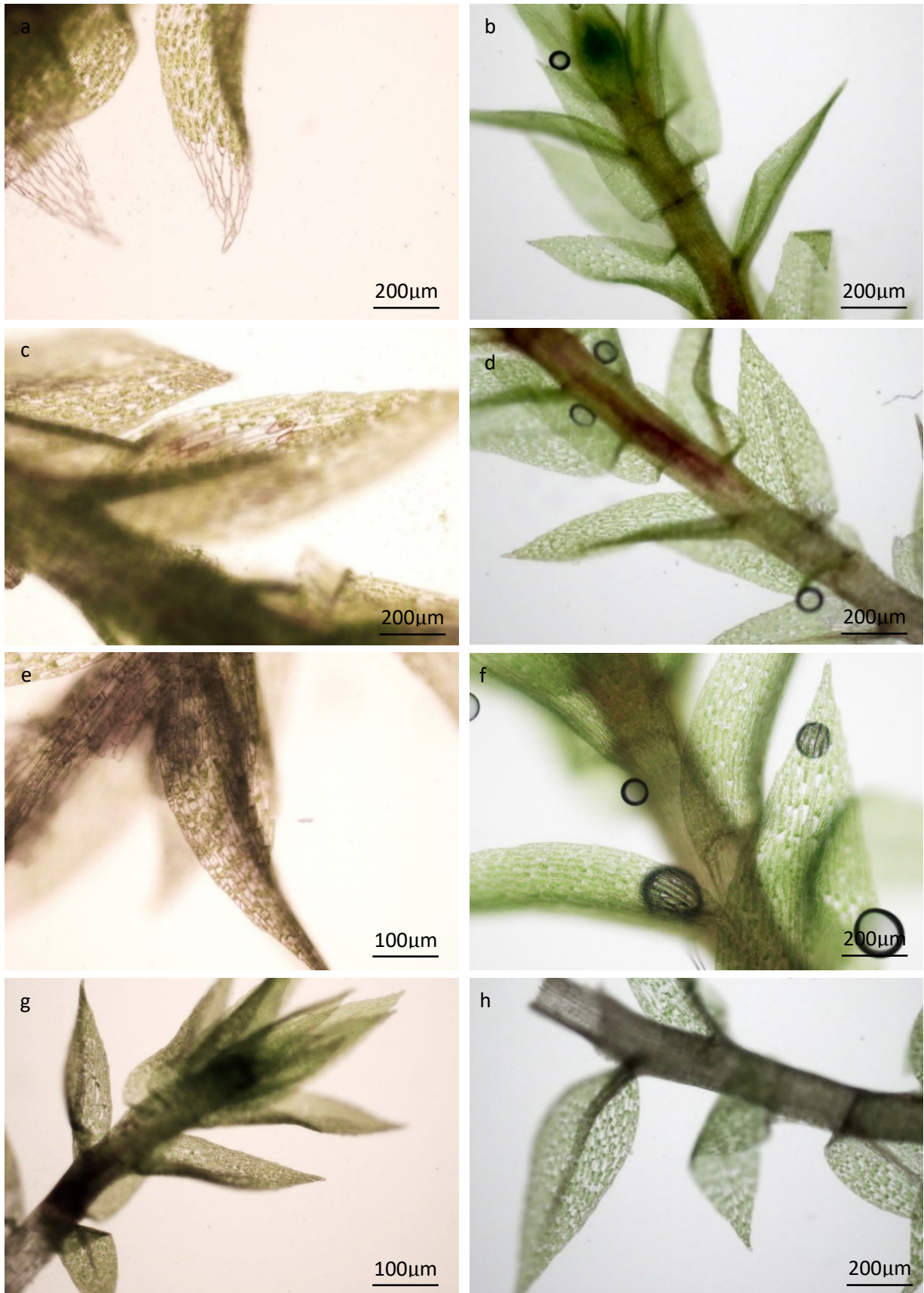


Abb. 14. *Pohlia drummondii*: Ergebnisse der Plasmolyseversuche : (a) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ Probe 1, (b) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ Probe 2, (c) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ Probe 1, (d) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ Probe 2, (e) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ Probe 1, (f) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ Probe 2, (g) $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ Probe 1, (h) $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ Probe 2

Physcomitrium patens
Kombinationen aus zwei Metallen

Kombinationen	Probe 1		Probe 2	
	1mM	100µM	1mM	100µM
<i>CuCl₂ + FeCl₂</i>	–	+	–	+
<i>CuCl₂ + MnCl₂</i>	+/-	+	+/-	+
<i>CuCl₂ + Sb-Acetat</i>	–	+	–	+
<i>MnCl₂ + FeCl₂</i>	–	+	+	+
<i>MnCl₂ + Sb-Acetat</i>	+/-	+/-	+/-	+/-
<i>FeCl₂ + Sb-Acetat</i>	+/-	+	+/-	+

Tabelle 11: Ergebnisse der Plasmolyseuntersuchungen aus dem ersten und zweiten Durchgang (Probe 1/ Probe2) für *Physcomitrium patens*: + Plasmolyse, - keine Plasmolyse, +/- keine eindeutige Plasmolyse/ weniger als 50% plasmolysiert (Mn 10⁻²M)

Vergleicht man die Ergebnisse für *Physcomitrium patens* aus zwei Versuchen, ist in Bezug auf die Kombinationen aus zwei Schwermetallen nur bei *MnCl₂ + FeCl₂* ein Unterschied zu erkennen.

Die Kombinationen *CuCl₂ + FeCl₂*, *CuCl₂ + Sb-Acetat* und im ersten Versuch auch *MnCl₂ + FeCl₂* zeigten bei den Versuchen in den Konzentrationen aus den Toleranztests schädliche Wirkungen auf das Moos. Vor allem bei *CuCl₂ + FeCl₂* sowie *CuCl₂ + Sb-Acetat* hat sich eindeutig gezeigt, dass keine Plasmolyse stattgefunden hat (Abb. 15a,b). In beiden Fällen sind die überwiegenden Anteile der Blättchen grau, die Chloroplasten haben ihre Farbe verloren. Bei *CuCl₂ + Sb-Acetat* liegen die dunklen Chloroplasten vermehrt dicht an den Zellwänden. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Bildern der verdünnten Lösungen erkennt man deutliche Unterschiede. Die geringen Konzentrationen wirken weniger toxisch auf *Physcomitrium patens*. Plasmolyse ist weitgehend sichtbar, die Farbe der Chloroplasten ist grün und sie zeigen eine normale Form.

CuCl₂ + MnCl₂, *MnCl₂ + Sb-Acetat*, und *FeCl₂ + Sb-Acetat* sind in der Tabelle 11 mit +/- gekennzeichnet. Das bedeutet, dass Plasmolyse in einigen Teilen der Probe stattgefunden hat, aber die Chloroplasten ihre Farbe oder ihre Form verloren beziehungsweise verändert haben. *CuCl₂ + MnCl₂* beispielweise bewirkte beim Moos eine Plasmolyse, die aber auf die Blattspitzen beschränkt ist (Abb. 15d). Bei *MnCl₂ + Sb-Acetat* hingegen zeigte sich eine Mischung aus plasmolysierten Zellen und Zellen, in denen teilweise Chloroplasten keine grüne Farbe mehr haben (Abb. 15e). Geringere Konzentrationen der Schwermetalle führen demnach zu einer besseren Toleranz. Plasmolyse sowie die grüne Farbe der Chloroplasten ist im Großteil der Proben klar erkennbar.

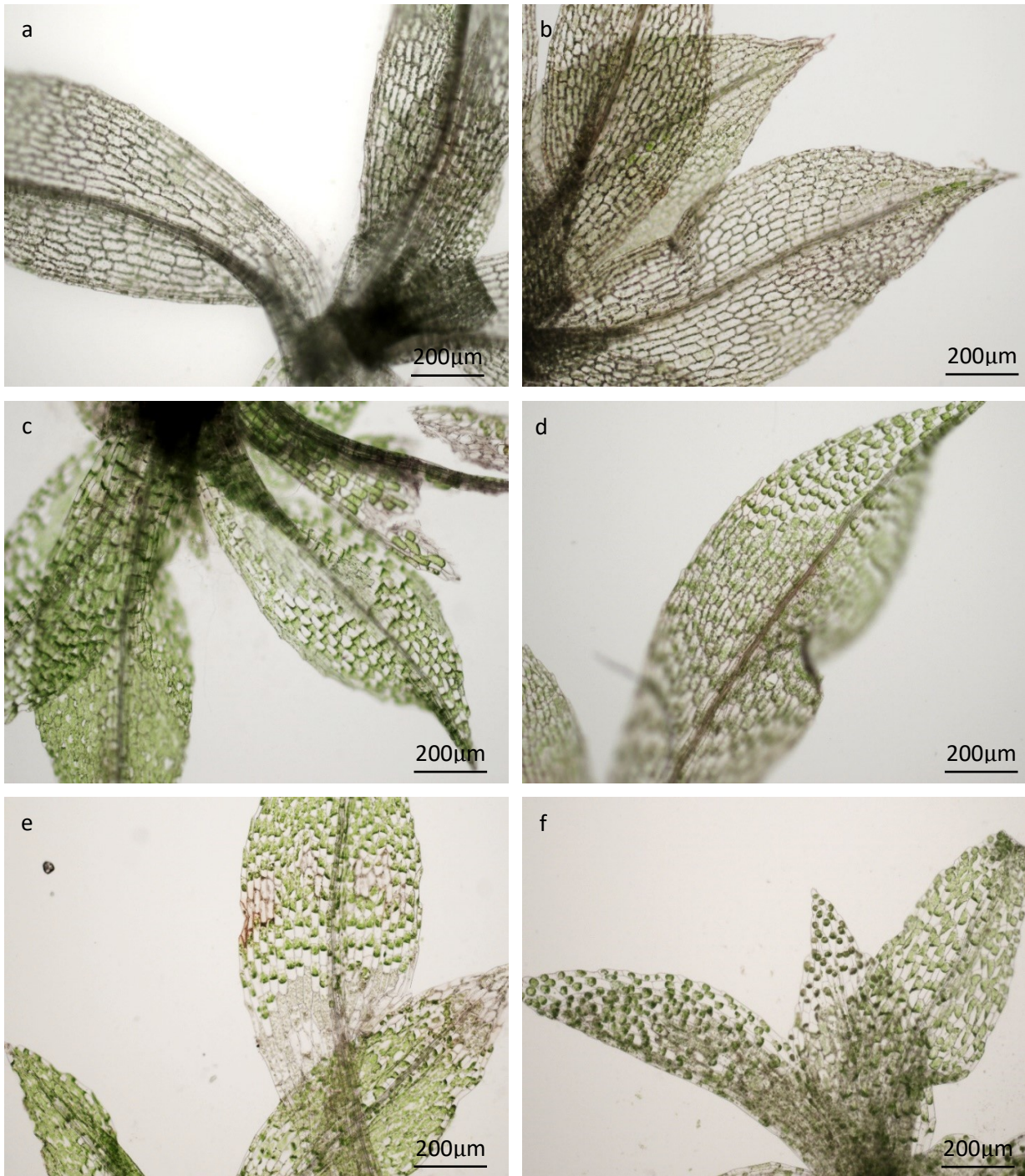


Abb. 15. *Physcomitrium patens*: Ergebnisse der Plasmolyseversuche: (a) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$, (b) $\text{CuCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$, (c) $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$, (d) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2$, (e) $\text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$, (f) $\text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

Kombinationen aus drei Metallen

Kombinationen	Probe 1		Probe 2	
	1mM	100µM	1mM	100µM
<i>CuCl₂+MnCl₂+FeCl₂</i>	–	+	+/-	+
<i>CuCl₂+MnCl₂+Sb-Acetat</i>	+/-	+	+/-	+
<i>CuCl₂+FeCl₂+Sb-Acetat</i>	–	+	–	+
<i>MnCl₂+FeCl₂+Sb-Acetat</i>	+/-	+	+/-	+

Tabelle 12: Ergebnisse der Plasmolyseuntersuchungen aus dem ersten und zweiten Durchgang (Probe 1/ Probe2) für *Physcomitrium patens*

Die Kombination *CuCl₂ + FeCl₂ + Sb-Acetat* scheint für *Physcomitrium patens* am schädlichsten zu sein. Da sich auch schon bei den Kombinationen *CuCl₂ + FeCl₂* und *CuCl₂ + Sb-Acetat* eine toxische Wirkung gezeigt hat, ist die zusätzliche Kombination mit Eisen noch schädlicher für das Moos. Sowohl in der ersten als auch in der zweiten Versuchsreihe zeigten die Proben ein ähnliches Verhalten. Es plasmolysierten nur vereinzelte Zellen, oft nur die Blattspitzen. In den meisten Zellen verloren die Chloroplasten ihre grüne Farbe und somit erschienen große Teile der Pflanze grau und farblos (Abb. 16a,b). Die Moosproben, die in den verdünnten Lösungen eingelegt wurden zeigten hingegen deutlich bessere Toleranz gegenüber den Metallen.

Plasmolyse, die gut zu erkennen war, aber nicht in der gesamten Probe vorkam, konnte bei *CuCl₂ + MnCl₂ + Sb-Acetat*, *CuCl₂ + MnCl₂ + FeCl₂* und *MnCl₂ + FeCl₂ + Sb-Acetat* beobachtet werden. Die Farbe und Form der Chloroplasten sieht normal aus, nur bestimmte Teile der Probe, wie beispielsweise die Spitzen der Blätter sind nicht plasmolysiert (Abb. 16c-h).

CuCl₂ + MnCl₂ + FeCl₂ lieferte in beiden Versuchen sehr unterschiedliche Ergebnisse (Abb. 16e, f). In der ersten Versuchsreihe waren weniger als 50% der Zellen plasmolysiert, während beim zweiten Versuch zwischen Blattspitze und Blattmitte ein Unterschied beobachtet werden konnte. Die Zellen in den Blattspitzen zeigten keine Plasmolyse. Insgesamt hat sich gezeigt, dass die Moose in den Verdünnungen der Metalllösungen eine bessere Überlebensfähigkeit haben.

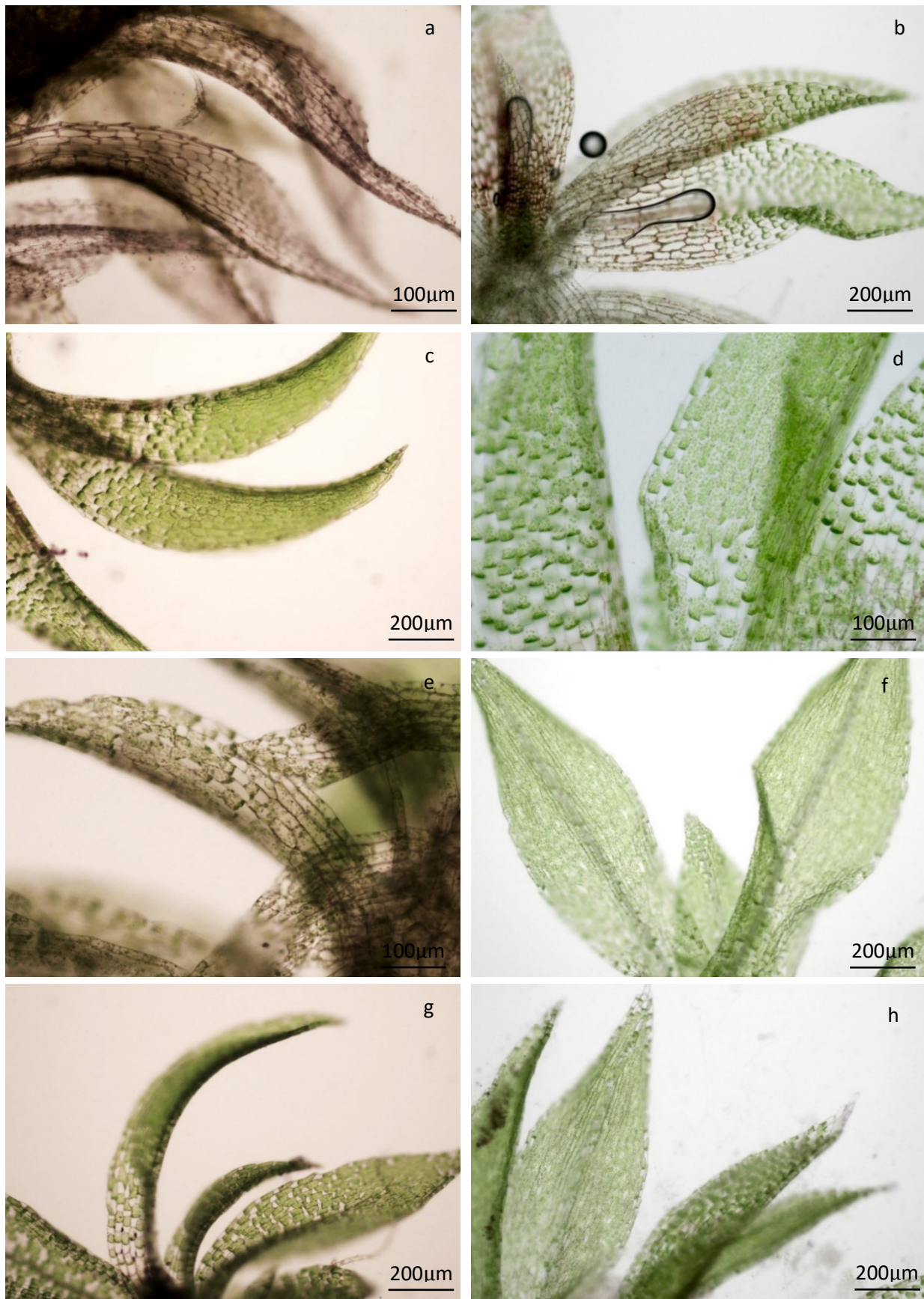


Abb. 16. *Physcomitrium patens*: Ergebnisse der Plasmolyseversuche: (a) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ Probe 1, (b) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ Probe 2, (c) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ Probe 1, (d) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ Probe 2, (e) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ Probe 1, (f) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ Probe 2, (g) $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ Probe 1, (h) $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ Probe 2

Hypnum cupressiforme

Kombination aus zwei Metallen

Kombinationen	Probe 1	
	1mM	100µM
<i>CuCl₂ + FeCl₂</i>	–	–
<i>CuCl₂ + MnCl₂</i>	–	–
<i>CuCl₂ + Sb-Acetat</i>	–	–
<i>MnCl₂ + FeCl₂</i>	–	+/-
<i>MnCl₂ + Sb-Acetat</i>	+/-	+/-
<i>FeCl₂ + Sb-Acetat</i>	–	+/-

Tabelle 13: Ergebnisse der Plasmolyseuntersuchungen aus dem ersten und zweiten Durchgang (Probe 1/ Probe2) für *Hypnum cupressiforme* : + Plasmolyse, - keine Plasmolyse, +/- keine eindeutige Plasmolyse/ weniger als 50% plasmolysiert (Mn 10⁻² M)

Gegenüber *FeCl₂* und *Sb-Acetat* hatte *Hypnum cupressiforme* andere Toleranzgrenzen als *Pohlia drummondii* und *Physcomitrium patens*. Die Toleranzgrenze lag bei beiden Schwermetallen bei 100µM. In diesem Fall waren die Überlebensarten aus den Toleranzversuchen insgesamt schlechter als bei *Pohlia drummondii* und *Physcomitrium patens*. Auch in den Versuchen mit den kombinierten Metalllösungen erzielte *Hypnum cupressiforme* schlechtere Werte als die anderen beiden Moosarten, wie man in Tabelle 13 sehen kann. Hier sollte allerdings angemerkt werden, dass die verwendeten Proben aus Kulturen stammten, die durch eine Pilzinfektion kontaminiert waren. Es war nicht möglich, diese Kontaminationen vollständig zu entfernen, weshalb in diesem Fall nur eine Versuchsreihe durchgeführt wurde. Diese Tatsache wurde bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt.

Bis auf die Kombination *MnCl₂ + Sb-Acetat* führten alle anderen Kombinationen in der Konzentration von 1mM zu Schäden. Es kam zu Form- und Farbveränderungen der Chloroplasten. Die Proben waren alle sehr bräunlich und die Chloroplasten waren nur teilweise grün. Sie veränderten ihre Form, entweder waren sie vergrößert, verformt oder zu Agglomeraten geformt (Abb. 17a-d, f). Plasmolyse fand man in dieser Konzentration nur in den Proben die mit *MnCl₂ + Sb-Acetat* behandelt wurden, wobei sich die Plasmolyse auch hier nur auf einige Teile der Probe beschränkte und auch nicht mehr als 50% ausmachte (Abb. 17e). Die Kombinationen *MnCl₂ + FeCl₂*, *MnCl₂ + Sb-Acetat* und *FeCl₂ + Sb-Acetat* hatten ähnliche Einflüsse wie die Kombinationen aus drei Metallen. Das Gesamterscheinungsbild der Proben war bei diesen Kombinationen in einer Konzentration von 100µM besser als in der Konzentration von 1mM. Plasmolyse konnte in einigen Teilen der Probe beobachtet werden, während das bei der höheren Konzentration von 1mM nicht der Fall war.

Am schädlichsten jedoch wirkten die Kombinationen *CuCl₂ + FeCl₂* und *CuCl₂ + FeCl₂ + Sb-Acetat* auf *Hypnum cupressiforme* ein. Sowohl 1mM als auch 100µm führten in den Proben zu Schädigungen der Zellen und Chloroplasten. Die Proben waren bräunlich, die Chloroplasten verformt und Plasmolyse war überhaupt nicht oder nur in wenigen einzelnen Zellen zu sehen.

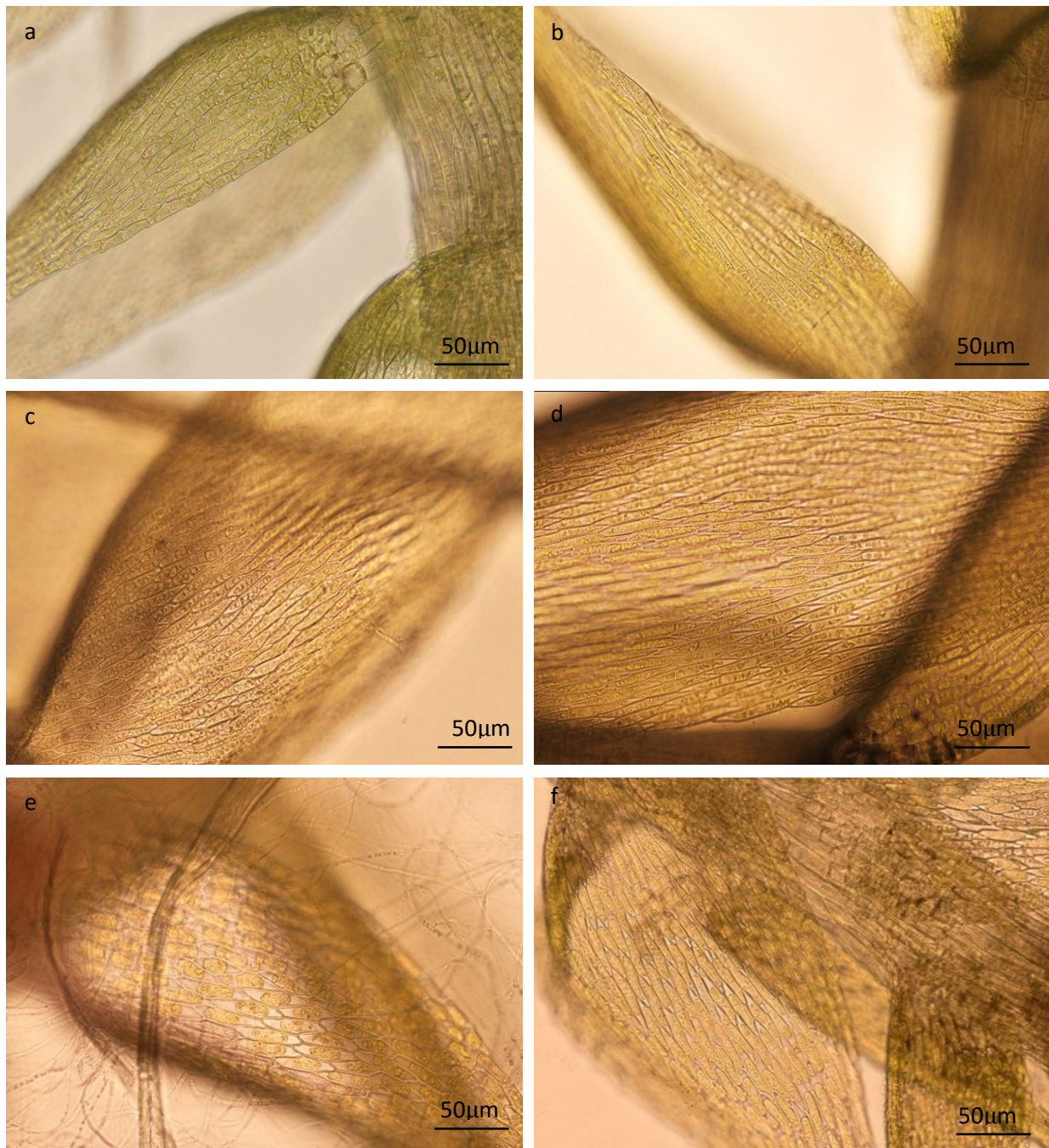


Abb. 17. *Hypnum cupressiforme*: Ergebnisse der Plasmolyseversuche: (a) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$, (b) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2$, (c) $\text{CuCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$, (d) $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$, (e) $\text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$, (f) $\text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

Kombination aus drei Metallen

Kombinationen	Probe 1	
	1mM	100µM
$\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$	–	+/-
$\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$	–	+/-
$\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$	–	–
$\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$	–	+/-

Tabelle 14: Ergebnisse der Plasmolyseuntersuchungen aus einem Durchgang für *Hypnum cupressiforme*

Hypnum cupressiforme zeigte bei Konzentrationen von 100µM bessere Ergebnisse als unter dem Einfluss der höheren Konzentration von 1mM. Wie in Tabelle 14 ersichtlich, hatten die Kombinationen aus drei Metallen $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$, $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ und $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ bei einer geringeren Konzentration von 100µM zwar auch eine schädliche Wirkung auf das Moos, allerdings waren die negativen Auswirkungen geringer als bei 1mM (Abb. 18c-h). Die Proben, die diesen drei Kombinationen ausgesetzt waren, zeigten sehr ähnliche Reaktionen. Plasmolyse war in diesen Proben an mehreren Stellen zu sehen. Die Plasmolyse war allerdings, in den meisten Fällen, nur als beginnendes Ablösen des Protoplasten an den Spitzen der Zellen zu beobachten. Dennoch sahen die Proben vergleichsweise besser aus, da auch die Chloroplasten größtenteils eine normale Form hatten und teilweise auch ihre grüne Farbe beibehalten haben.

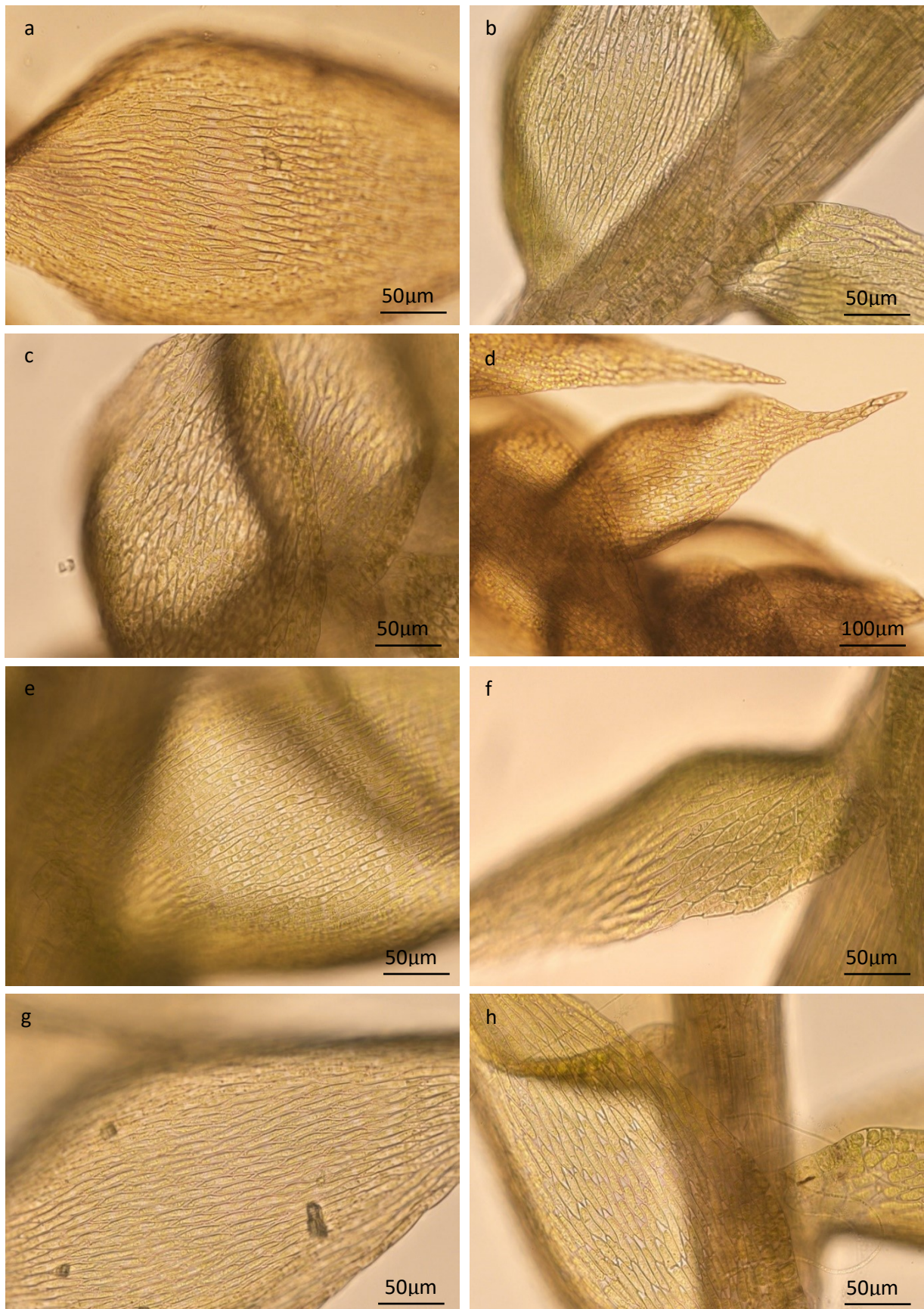


Abb. 18. *Hypnum cupressiforme*: Ergebnisse der Plasmolyseversuche: (a) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetate}$ 1mM, (b) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetate}$ 100µM, (c) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ 1mM, (d) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ 100µM, (e) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetate}$ 1mM, (f) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetate}$ 100µM, (g) $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetate}$ 1mM, (h) $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetate}$ 100µM

4.3 10⁻⁴-Kombinationen

Im Zuge dieser Arbeit gab es bei den weiteren Experimenten Probleme mit der Verarbeitung der Metalllösungen, vor allem der Kombinationen in den ermittelten Konzentrationen aus den Toleranztests. Die Konzentrationen mussten entsprechend adaptiert werden und aus diesem Grund wurden neue Plasmolyseversuche mit den neu angepassten Konzentrationen durchgeführt. Es wurden alle Metalllösungen in einer einheitlichen Konzentration von 100µM hergestellt und an allen drei Moosarten nochmals getestet, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen allen Experimenten zu erzielen. Im Folgenden werden für *Pohlia drummondii* und *Physcomitrium patens* die Ergebnisse aus diesen Versuchen in Form von Bildern dargestellt und beschrieben.

Pohlia drummondii

Kombinationen aus zwei Metallen:

CuCl₂ + FeCl₂, CuCl₂ + MnCl₂, CuCl₂ + Sb-Acetat, MnCl₂ + FeCl₂, MnCl₂ + Sb-Acetat, FeCl₂ + Sb-Acetat

Wie man in den Abbildungen 19 a-f erkennen kann, ist bei allen sechs Metallkombinationen eine deutliche Plasmolyse in mehr als 50% der Proben erkennbar. Die Chloroplasten haben ihre Farbe beibehalten und sie zeigen auch kaum Verformungen. Nur bei *CuCl₂ + FeCl₂* und *CuCl₂ + Sb-Acetat* ist bemerkbar, dass nicht in allen Blättchen des Mooses eine eindeutige Plasmolyse stattgefunden hat. In einigen Zellen kommt es zu keiner Ablösung des Protoplasten von der Zellwand. Das zeigt, dass auch geringere Konzentrationen von 100µM dieser Kombinationen immer noch schädliche Wirkungen auf das Moos haben. Bei den restlichen Proben und Metallkombinationen kann hingegen klar gesagt werden, dass 100µM vom Moos deutlich besser toleriert werden als 1mM.

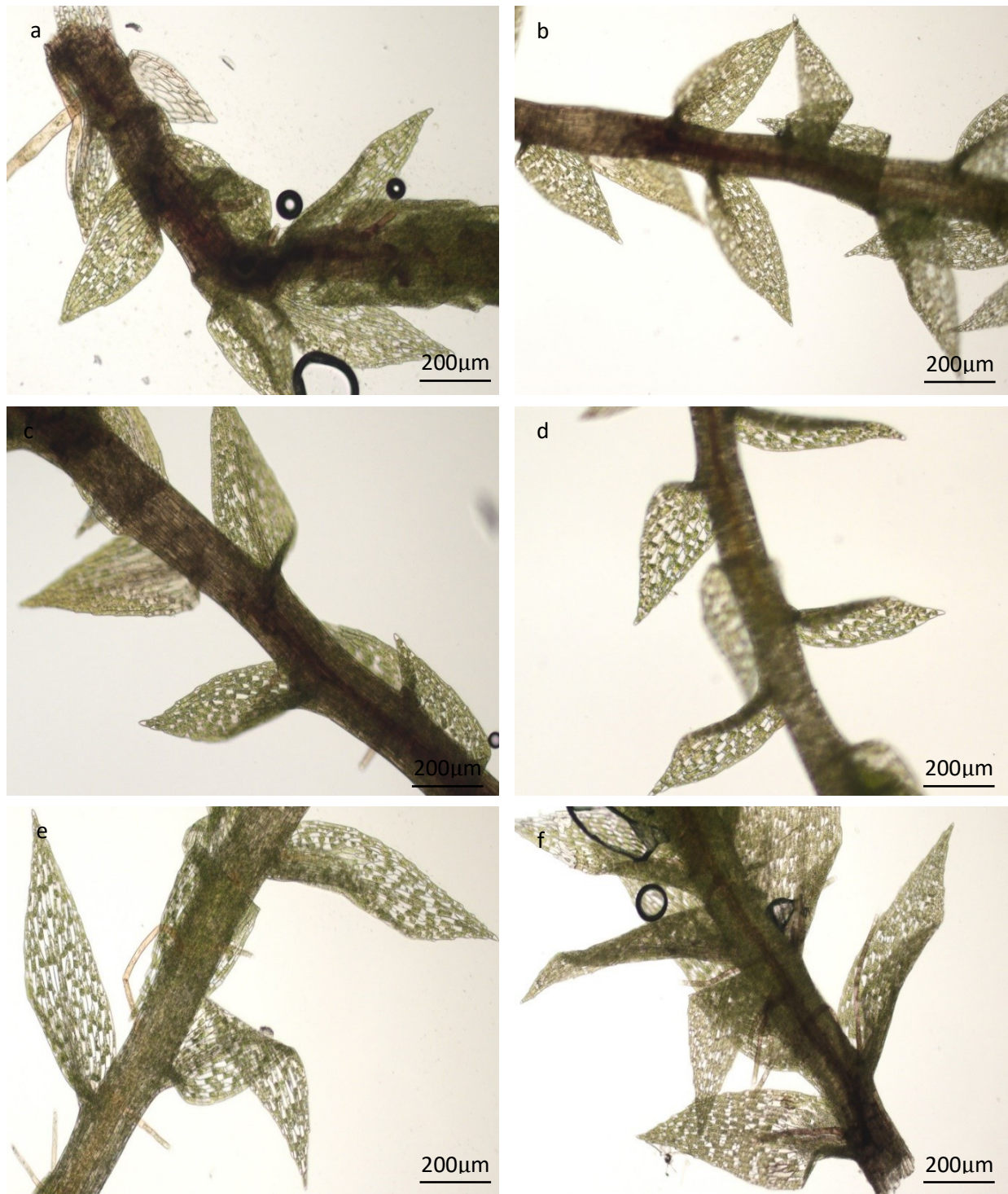


Abb. 19. *Pohlia drummondii*: Ergebnisse der Plasmolyseversuche bei einheitlicher Konzentration von 100 µM für alle Metalle: (a) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$ 100µM, (b) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2$ 100µM, (c) $\text{CuCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ 100µM, (d) $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ 100µM, (e) $\text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ 100µM, (f) $\text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ 100µM

Kombinationen aus drei Metallen:

$\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$, $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$, $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$, $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

Vergleicht man diese Ergebnisse mit jenen weiter oben, wo höhere Konzentrationen von 1mM angewendet wurden, dann kann man gut erkennen, dass die unterschiedlichen Konzentrationen auch unterschiedliche Effekte auf das Moos haben. Zwar hat *Pohlia drummondii* auch schon bei 1mM gute Toleranz gegenüber den Metallkombinationen gezeigt, dennoch gab es teilweise Zellen die nicht vollständig plasmolysiert sind und Chloroplasten, die ihre Form verändert haben. Bei 100µM hingegen ist einerseits Plasmolyse in nahezu der gesamten Probe erkennbar und andererseits zeigt das Moos keinerlei physiologische Veränderungen (Abb. 20a-d).

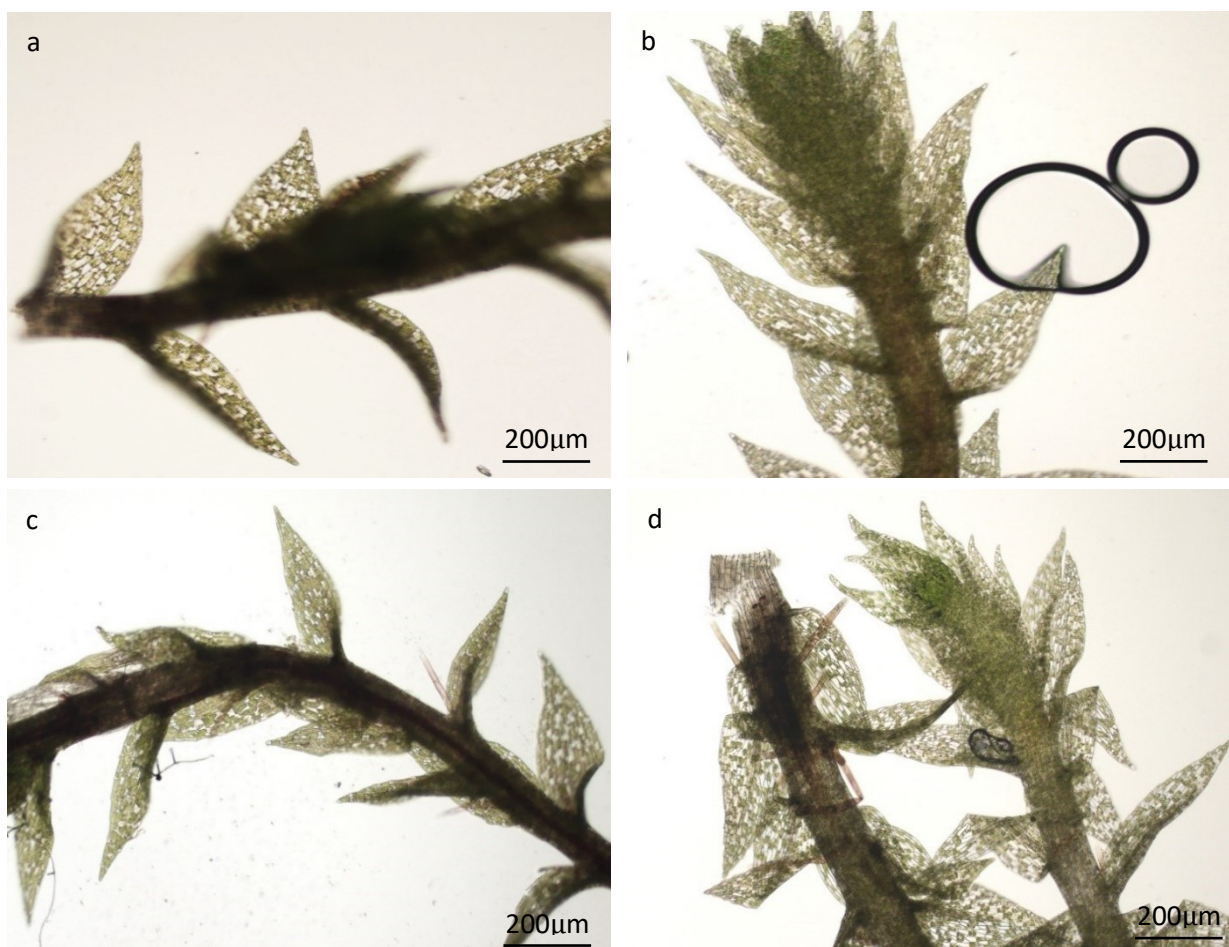


Abb. 20. *Pohlia drummondii*: Ergebnisse der Plasmolyseversuche bei einheitlicher Konzentration von 100 µM für alle Metalle: (a) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ 100µM, (b) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ 100µM, (c) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ 100µM, (d) $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ 100µM

Physcomitrium patens

Kombinationen aus zwei Metallen

$\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$, $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2$, $\text{CuCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$, $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$, $\text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$, $\text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

Physcomitrium patens reagierte bei diesen Metallkombinationen schon auf die höhere Konzentration von 1mM sehr empfindlich. Bei 100µM sind die Ergebnisse etwas besser. Plasmolyse ist zwar deutlicher und gleichmäßiger in den Proben zu erkennen, aber dennoch scheinen die Metalle auch noch in dieser Konzentration schädlich für das Moos zu sein. Man kann bei allen sechs Kombinationen Zellen oder auch ganze Blättchen identifizieren, die keine Plasmolyse aufweisen, Verformungen der Chloroplasten zeigen oder teilweise auch keine grüne Farbe haben. Dennoch weisen die Proben bei einheitlicher Konzentration von 100µM bessere Toleranz auf, als bei höheren Konzentrationen der Metallkombinationen (Abb. 21a-f).

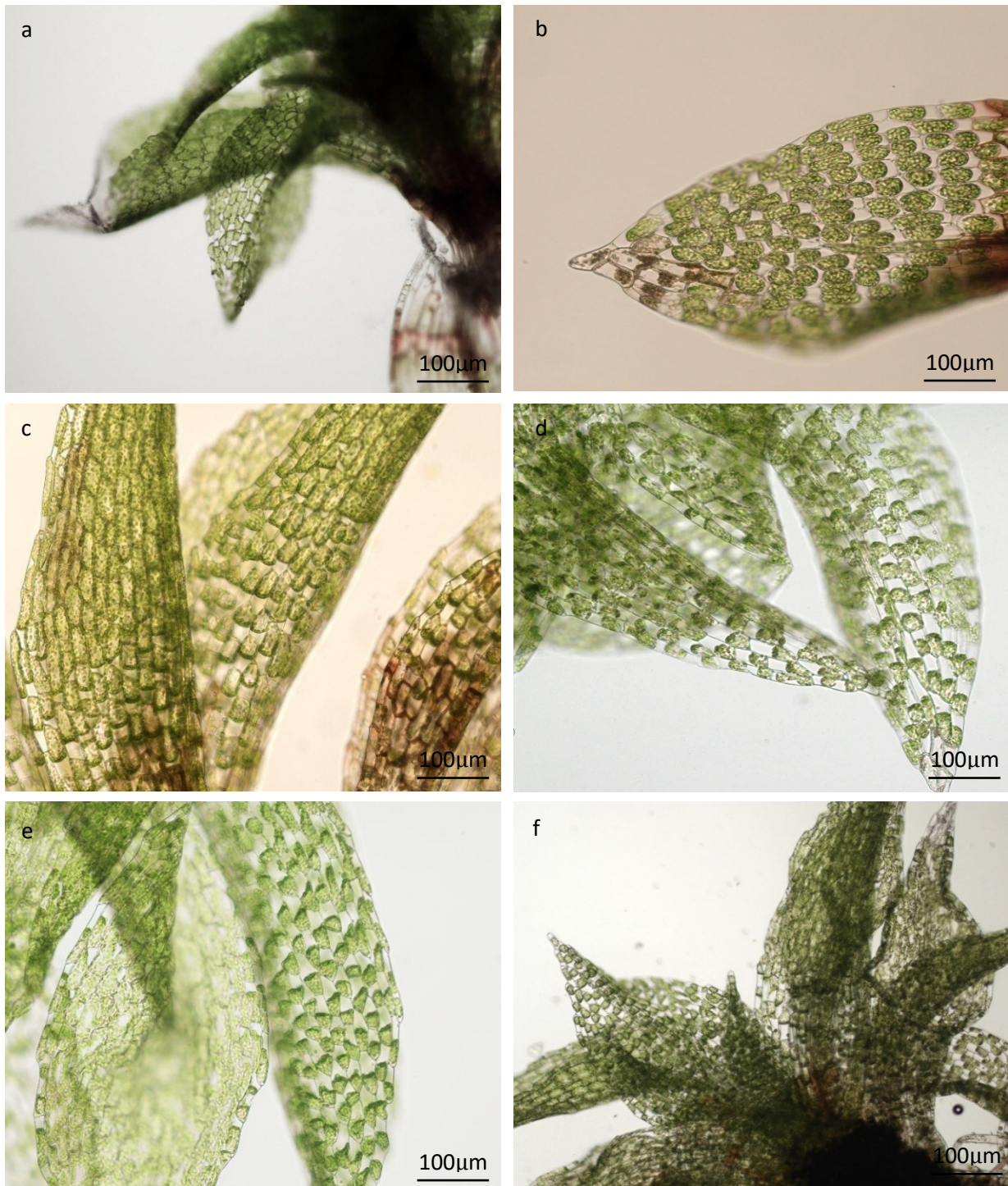


Abb. 21: *Physcomitrium patens*: Ergebnisse der Plasmolyseversuche bei einheitlicher Konzentration von 100 µM für alle Metalle: (a) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$ 100µM, (b) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2$ 100µM, (c) $\text{CuCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ 100µM, (d) $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ 100µM, (e) $\text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ 100µM, (f) $\text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ 100µM

Kombinationen aus drei Metallen

$\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$, $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$, $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$, $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

Wie man in den Abbildungen 22 a-d erkennen kann, findet bei allen vier Kombinationen größtenteils Plasmolyse statt. Trotz der hohen Plasmolyseraten zeigt sich auch bei diesen Kombinationen, wie auch schon bei den Kombinationen aus zwei Metallen, dass die einheitliche Konzentration von $100\mu\text{M}$ auch noch in gewisser Weise Schäden bei dem Moos hervorruft. Deutlich zu erkennen ist, dass bei allen vier Kombinationen stellenweise Zellen zu sehen sind, in denen Verfärbungen stattgefunden haben oder in denen keine Chloroplasten mehr zu erkennen sind. Außerdem sind auch hier teilweise Stellen erkennbar, wo keine Plasmolyse stattgefunden hat, wie beispielsweise an den Blattspitzen.

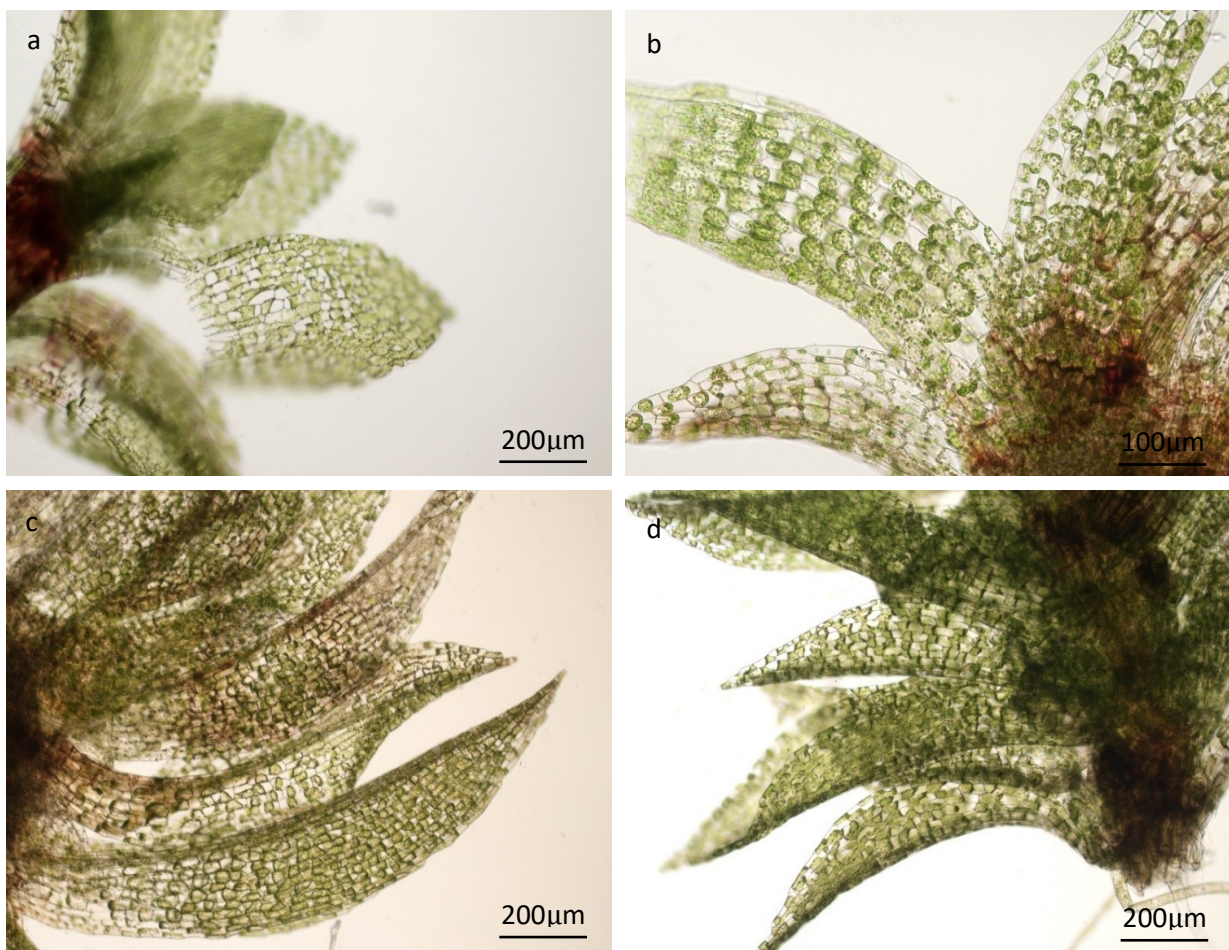


Abb. 22. *Physcomitrium patens*: Ergebnisse der Plasmolyseversuche bei einheitlicher Konzentration von $100\mu\text{M}$ für alle Metalle: (a) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ $100\mu\text{M}$, (b) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ $100\mu\text{M}$, (c) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ $100\mu\text{M}$, (d) $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ $100\mu\text{M}$

4.4 Wachstum

Um zu untersuchen, ob und welchen Einfluss die ausgewählten Metalle CuCl_2 , FeCl_2 , MnCl_2 und Sb-Acetat auf das Wachstum der Moose haben, wurden Agarplatten vorbereitet, in die die Metalle eingearbeitet wurden. Wie erwähnt wurde eine einheitliche Konzentration von $100\mu\text{M}$ für alle vier Metalle hergestellt. Nur die Schwermetalle alleine, nicht kombiniert, konnten in zwei Konzentrationen getestet werden, in 1mM und $100\mu\text{M}$.

Im Folgenden werden für die Moose *Pohlia drummondii* und *Physcomitrium patens* die Ergebnisse aus diesen Versuchen in Form von Bildern und statistischen Auswertungen, die mit dem Programm Image J generiert wurden, vorgestellt. Für *Hypnum cupressiforme* gibt es bei diesem Versuch keine Ergebnisse, da es aufgrund der Kontaminationen, die schon zu Beginn der Arbeit aufgetreten sind nicht möglich war, das Wachstum zu beurteilen.

Pohlia drummondii

Die Agarplatten, die mit jeweils nur einem Metall einzeln versetzt wurden, konnten in zwei Konzentrationen getestet werden. Einerseits konnten die Konzentrationen aus den Ergebnissen der Toleranztests eingearbeitet werden, andererseits wurden auch Platten mit Metallkonzentrationen von $100\mu\text{M}$ hergestellt.

Einzelmetalle

CuCl_2

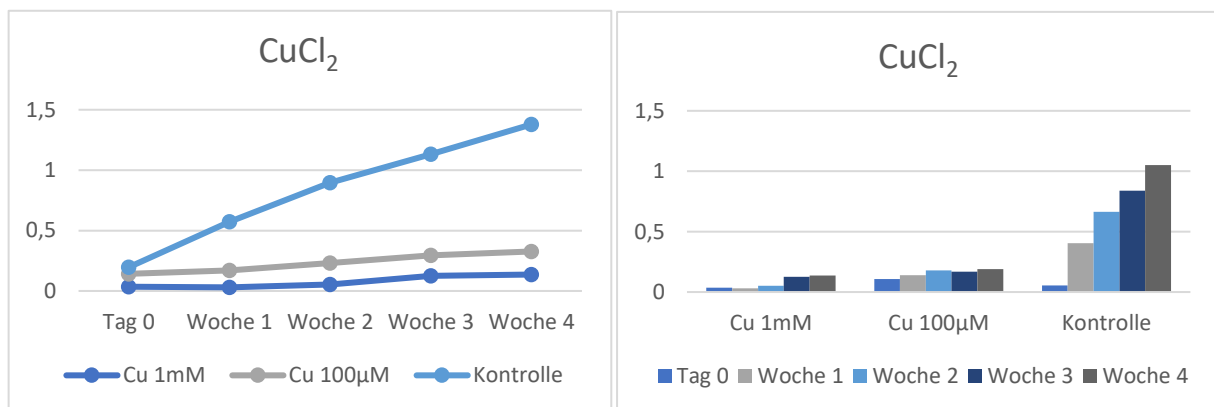


Abb. 23. Wachstumsverlauf von *Pohlia drummondii* unter Einfluss von CuCl_2

Die Abbildung 23 zeigt den Wachstumsverlauf von *Pohlia drummondii* unter dem Einfluss von CuCl_2 in den Konzentrationen 1mM und $100\mu\text{M}$. Verglichen werden diese Ergebnisse mit einer Kontrollplatte, bei der keine Metalle zugesetzt wurden. Wie man erkennen kann, gibt es einen deutlichen Unterschied zwischen dem Wachstum des Mooses auf Agarplatten, die mit CuCl_2 versetzt wurden und Agarplatten in denen keine Metalle enthalten sind (Kontrolle). Unter dem Einfluss von CuCl_2 ist das Wachstum von *Pohlia drummondii* wesentlich eingeschränkt. Auch zwischen den verschiedenen Konzentrationen von CuCl_2 kann man einen Unterschied erkennen. Zwar liegen die einzelnen Werte nicht so weit auseinander, aber dennoch ist das Wachstum des Mooses bei einer CuCl_2 Konzentration von $100\mu\text{M}$ geringfügig besser.

FeCl₂

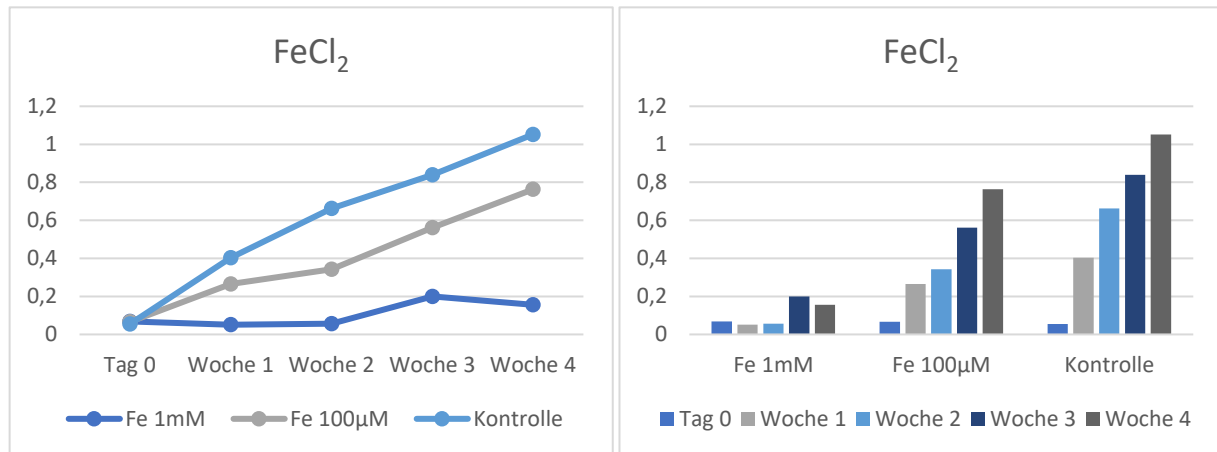


Abb. 24. Wachstumsverlauf von *Pohlia drummondii* unter Einfluss von FeCl₂

Unter FeCl₂ Einfluss lässt sich ein deutlicher Unterschied im Wachstum der Moose zwischen den verschiedenen Konzentrationen beobachten. *Pohlia drummondii* zeigt ein viel geringeres Wachstum unter der Einwirkung der höheren Konzentration von 1mM FeCl₂. Ab der zweiten Woche zeigt sich ein Wachstumsschub; die Biomassezunahme, bleibt dann aber bis zur vierten Woche in etwa gleich und ist sogar leicht fallend. Bei 100µM FeCl₂ hingegen ist bereits nach einer Woche ein erkennbares Wachstum zu sehen, dass in den nächsten Wochen nicht stagniert, sondern vergleichbar mit der Kontrollgruppe, linear weiter ansteigt (Abb. 24).

MnCl₂

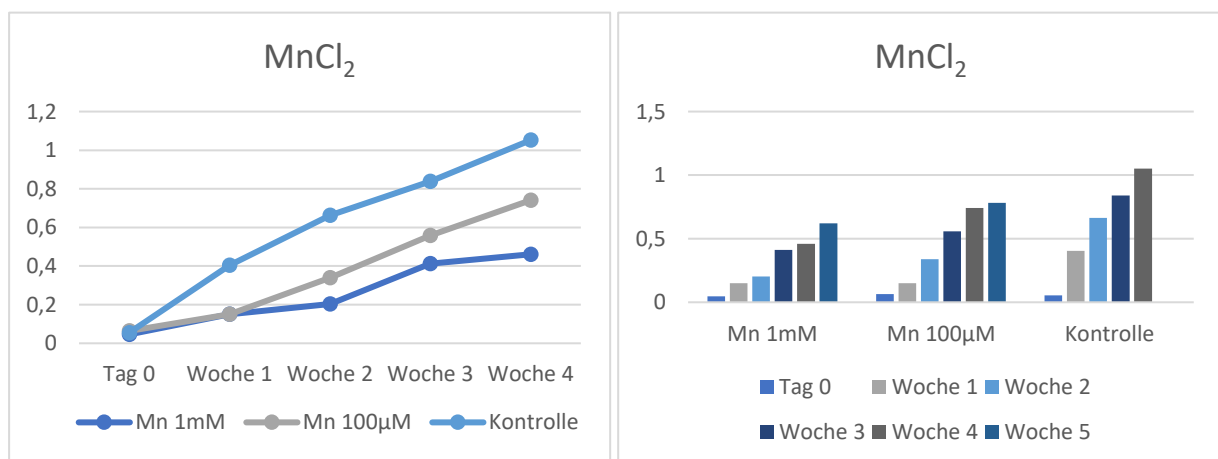


Abb. 25. Wachstumsverlauf von *Pohlia drummondii* unter Einfluss von MnCl₂

Wie auch schon in den mikroskopischen Versuchen, ist MnCl₂ auch in Bezug auf das Wachstum nicht besonders schädlich. Zwar zeigt sich auch in diesem Fall erneut, dass die höhere Konzentration von 1mM das Wachstum etwas mehr einschränkt, aber die Unterschiede dennoch nicht so groß sind. Unter MnCl₂ 100µM Einfluss wächst die Probe jede Woche stetig weiter. In der Konzentration von 10mM hingegen ist das Wachstum nicht so konstant. Verglichen mit der Kontrolle, sind die Ergebnisse beider Konzentrationen jedenfalls besser als bei den schon beschriebenen Schwermetallen CuCl₂ und FeCl₂.

Sb-Acetat

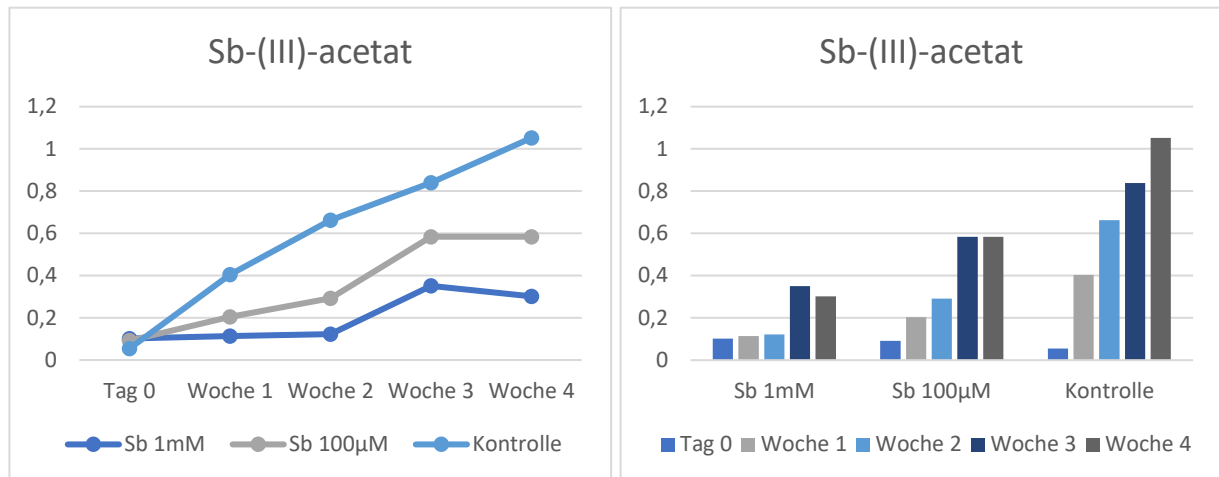


Abb. 26. Wachstumsverlauf von *Pohlia drummondii* unter Einfluss von Sb-Acetat

Pohlia drummondii hat unter dem Einfluss von Sb-Acetat 1mM und 100 µM einen identen Wachstumsverlauf. Beide Proben bleiben zunächst annähernd gleich, doch nach der zweiten Woche kommt es zu einem starken Wachstumsschub. Bis in die vierte Woche bleibt das Wachstum in etwa auf dem gleichen Stand oder fällt leicht ab (1mM Sb-Acetat). Der Unterschied liegt nur im Ausmaß des Wachstums. In niedrigerer Konzentration von 100µM ist das Wachstum des Mooses deutlich besser als bei der höheren Konzentration.

Kombinationen

Kombinationen aus zwei Metallen

CuCl₂ + FeCl₂

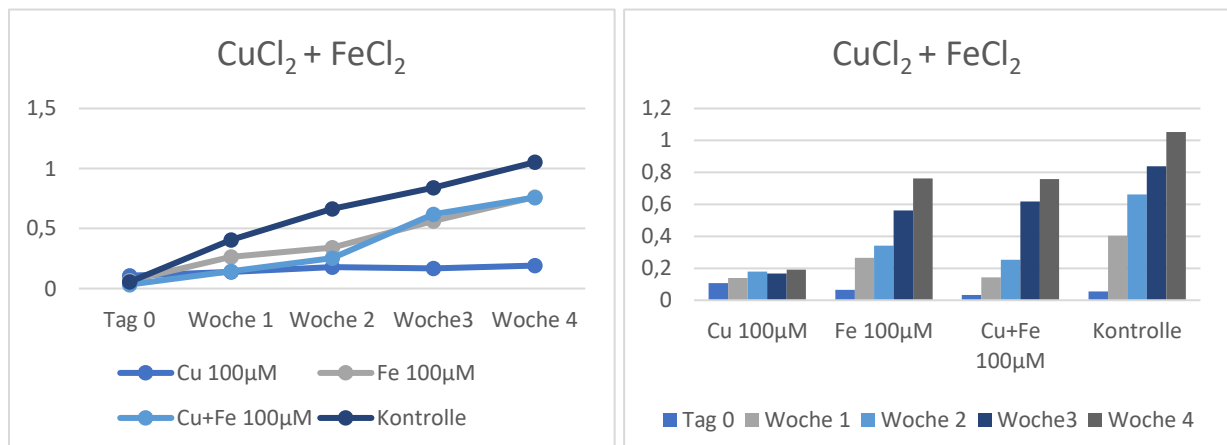


Abb. 27. Wachstumsverlauf von *Pohlia drummondii* unter Einfluss von CuCl₂ + FeCl₂

In Abbildung 27 wurde das Wachstum unter Einfluss von CuCl₂ + FeCl₂ mit dem Wachstum beim Vorliegen der beiden Metalle einzeln verglichen. Wie man erkennen kann, ist das Wachstum unter FeCl₂ 100µM Einfluss etwas besser als bei Anwesenheit von CuCl₂ 100µM. Kombiniert man diese beiden Schwermetalle in gleicher Konzentration miteinander, dann zeigt sich, dass in den ersten zwei Wochen der Wachstumsverlauf dem CuCl₂ sehr ähnlich ist. Ab der zweiten Woche jedoch, setzt ein erhöhter Wachstumsschub ein und bleibt dann bis zur vierten Woche etwa auf dem gleichen Niveau wie FeCl₂.

CuCl₂ + MnCl₂

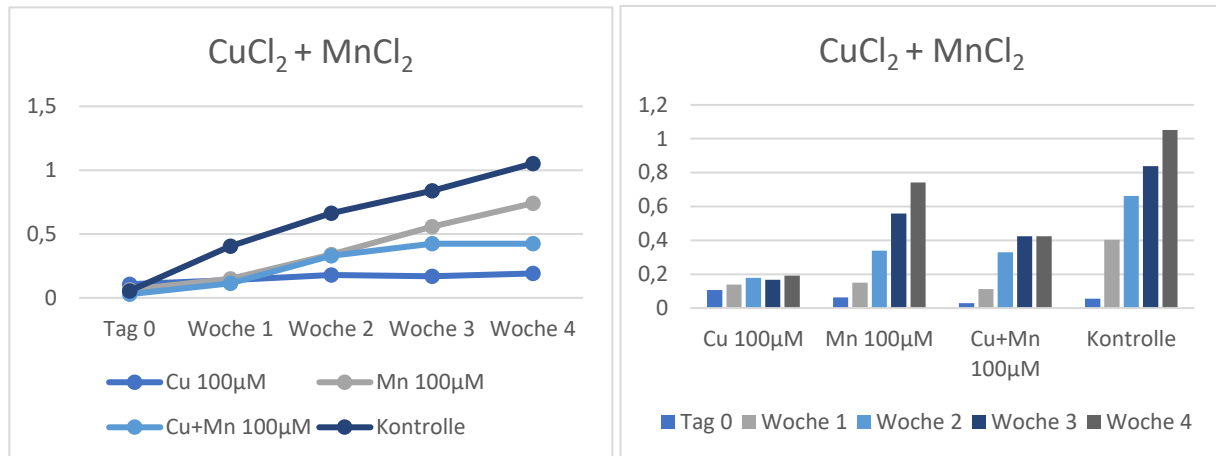


Abb. 28. Wachstumsverlauf von *Pohlia drummondii* unter Einfluss von CuCl₂ + MnCl₂

Das Wachstum von *Pohlia drummondii* bei Anwesenheit der Kombination CuCl₂ + MnCl₂ liegt zwischen den Wachstumskurven von CuCl₂ und MnCl₂ 100µM. MnCl₂ als Einzelmetall hat auf das Wachstum einen besseren Einfluss als CuCl₂. Nach der ersten Woche ist das Wachstum der Moose unter dem Einfluss von CuCl₂, MnCl₂ und CuCl₂ + MnCl₂ relativ gleich. Danach bleibt aber das Wachstum bei den CuCl₂ Proben annähernd auf gleichem Wachstumsniveau, während die Moose auf den MnCl₂ und CuCl₂ + MnCl₂ Platten mehr und stärker wachsen. Ab der zweiten Woche bleibt dann aber auch das Wachstum der CuCl₂ + MnCl₂ Proben in etwa konstant auf einem Niveau, während die MnCl₂ Moosplatten noch weiter wachsen.

CuCl₂ + Sb-Acetat

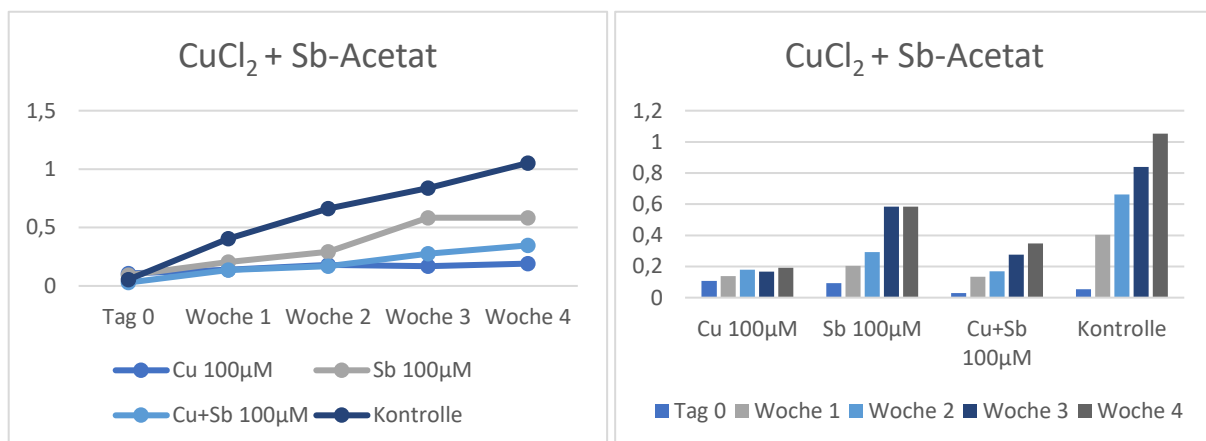


Abb. 29. Wachstumsverlauf von *Pohlia drummondii* unter Einfluss von CuCl₂ + Sb-Acetat

Die Kombination CuCl₂ + Sb-Acetat schränkt das Wachstum von *Pohlia drummondii* wesentlich ein. Vergleicht man dieses Ergebnis mit Sb-Acetat, dann zeigt sich, dass das Schwermetall alleine zwar auch nicht eine besonders gute Wirkung auf das Wachstum hat, aber dennoch deutlich besser ist als CuCl₂, vor allem ab der zweiten Woche. Kombiniert man diese beiden Schwermetalle miteinander, ergibt sich eine Wachstumskurve die zwischen den Ergebnissen von CuCl₂ und Sb-Acetat liegt, wobei das Wachstum mehr dem Verlauf von CuCl₂ entspricht. Bis zu der zweiten Woche sind die Wachstumsverläufe unter Einfluss von CuCl₂ und CuCl₂ + Sb-

Acetat nahezu ident. Erst nach der zweiten Woche nimmt das Wachstum unter $\text{CuCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ etwas zu.

$\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$

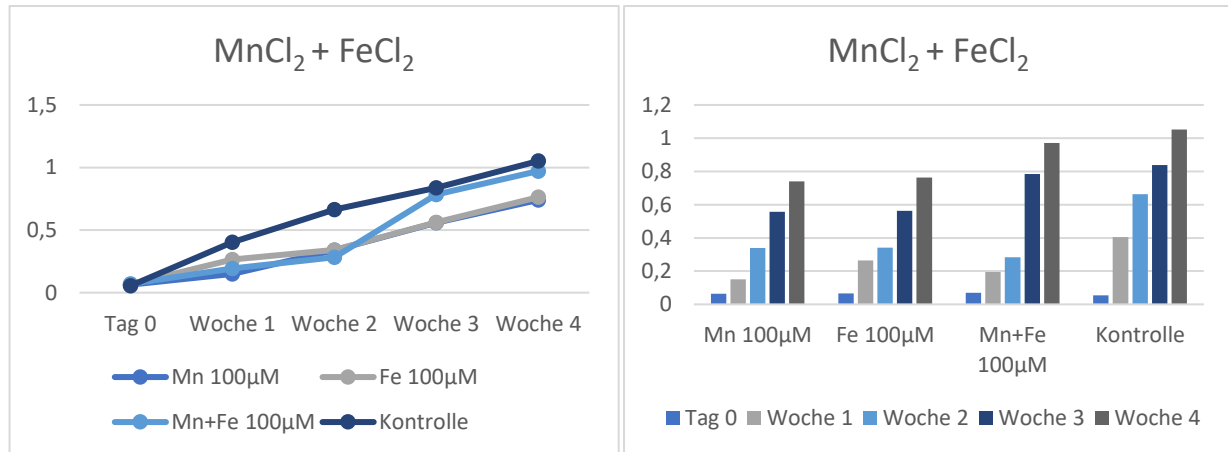


Abb. 30. Wachstumsverlauf von *Pohlia drummondii* unter Einfluss von $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$

In Abbildung 30 kann man gut erkennen, dass der Einfluss von MnCl_2 und FeCl_2 als Einzelmetalle auf das Wachstum von *Pohlia drummondii* annähernd gleich ist. Ab der zweiten Woche sind die Werte und Wachstumsverläufe nahezu ident. Was an diesem Ergebnis auffällig ist, ist dass die Kombination $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ das Wachstum zusätzlich fördert. In den ersten beiden Wochen kann das Wachstum mit dem aus den Ergebnissen mit MnCl_2 und FeCl_2 verglichen werden. Ab der zweiten Woche jedoch, setzt ein besonders starker Wachstumsschub ein, sodass das Wachstum sogar auf dem Niveau der Kontrollgruppe liegt und bis zur vierten Woche auch so bleibt.

$\text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

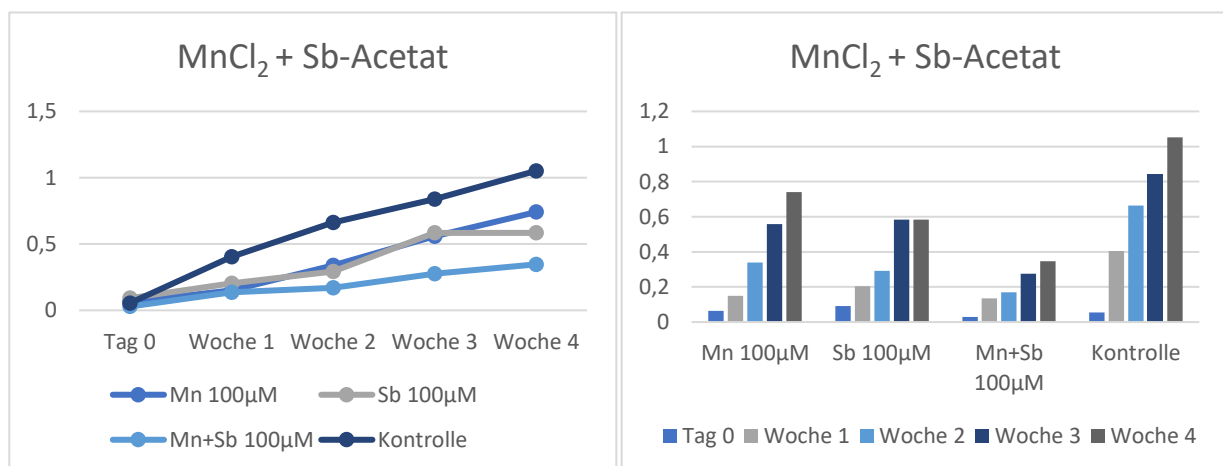


Abb. 31. Wachstumsverlauf von *Pohlia drummondii* unter Einfluss von $\text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

Anders als bei $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ scheint es, dass die Kombination $\text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ den gegenteiligen Effekt auf das Wachstum von *Pohlia drummondii* hat. In dieser Zusammensetzung ist das Wachstum deutlich weniger oder langsamer verglichen mit den

Schwermetallen $MnCl_2$ und Sb -Acetat, wenn sie alleine im Agar vorliegen. Der Einfluss von $MnCl_2$ und Sb -Acetat auf das Mooswachstum ist vor allem in den ersten drei Wochen ähnlich. Ab der dritten Woche bleibt das Wachstum der Antimon Proben auf einem Niveau, während die Moose auf den Manganplatten weiter wachsen. Kombiniert man allerdings diese Metalle, zeigt sich, dass das Wachstum nach der ersten Woche deutlich weniger beziehungsweise langsamer verläuft.

FeCl₂ + Sb-Acetat

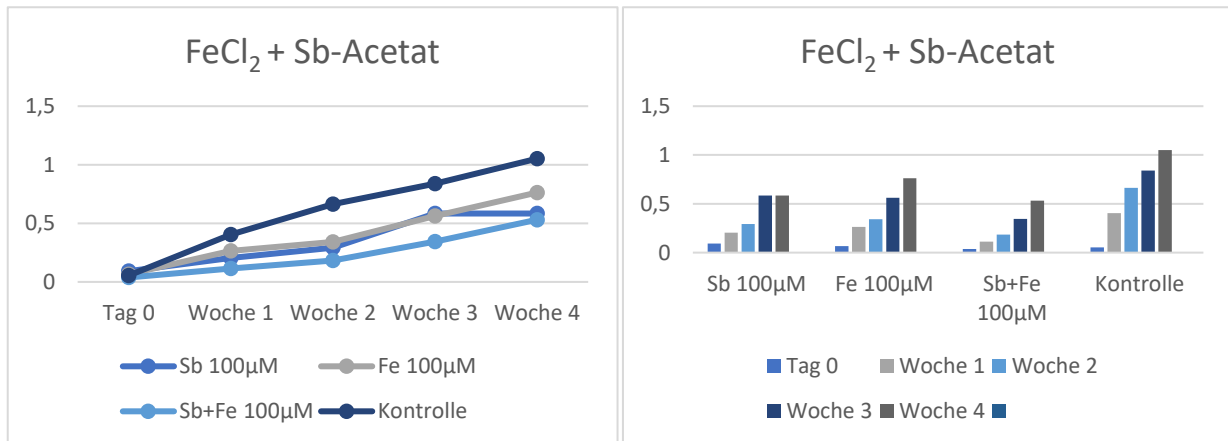


Abb. 32. Wachstumsverlauf von *Pohlia drummondii* unter Einfluss von FeCl₂ + Sb-Acetat

Diese Ergebnisse sind mit den Ergebnissen von $MnCl_2$ + Sb -Acetat vergleichbar. Sb -Acetat und $FeCl_2$ haben einen sehr ähnlichen Einfluss auf den Wachstumsverlauf des Moores. Und auch hier wird das Wachstum von *Pohlia drummondii* eingeschränkt, wenn diese beiden Metalle kombiniert werden. Es zeigt sich zwar jede Woche ein Anstieg des Wachstums, aber verglichen mit den Wachstumsverläufen unter Einwirkung der einzelnen Schwermetalle, ist es doch etwas geringer beziehungsweise langsamer.

Kombinationen aus drei Metallen

$\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$

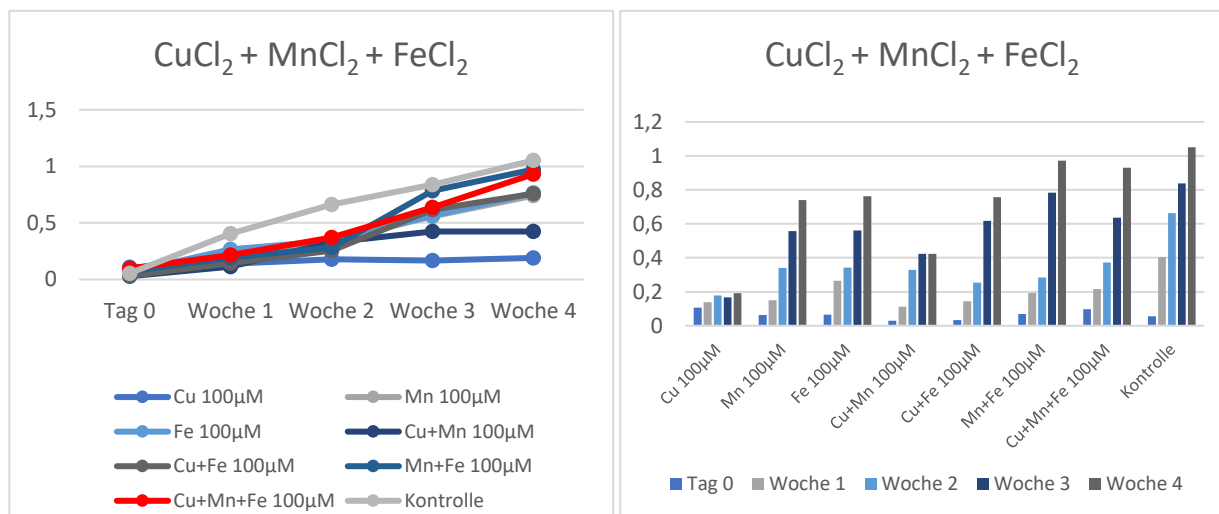


Abb. 33. Wachstumsverlauf von *Pohlia drummondii* unter Einfluss von $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$

In der Abbildung 33 wurde das Ergebnis von $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ mit den einzelnen Metallen CuCl_2 , FeCl_2 und MnCl_2 sowie mit den Kombinationen $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2$, $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$ und $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ miteinander verglichen. Wie bereits beschrieben haben MnCl_2 und FeCl_2 als Einzelmetalle einen relativ guten und ähnlichen Einfluss auf das Wachstum von *Pohlia drummondii*. Die Kupferproben zeigten hingegen die schlechtesten Werte und Wachstumsverläufe. Bei den Kombinationen stechen vor allem $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ sowie die dreier Kombination $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ hervor. Die Moosproben unter $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ Einfluss zeigten ab der zweiten Woche einen starken Wachstumsschub, während das Moos unter dem Einfluss von $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ jede Woche um circa den gleichen Wert weiter wächst. Der Wachstumsverlauf liegt zwischen den Ergebnissen von $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$ und $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$.

$\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

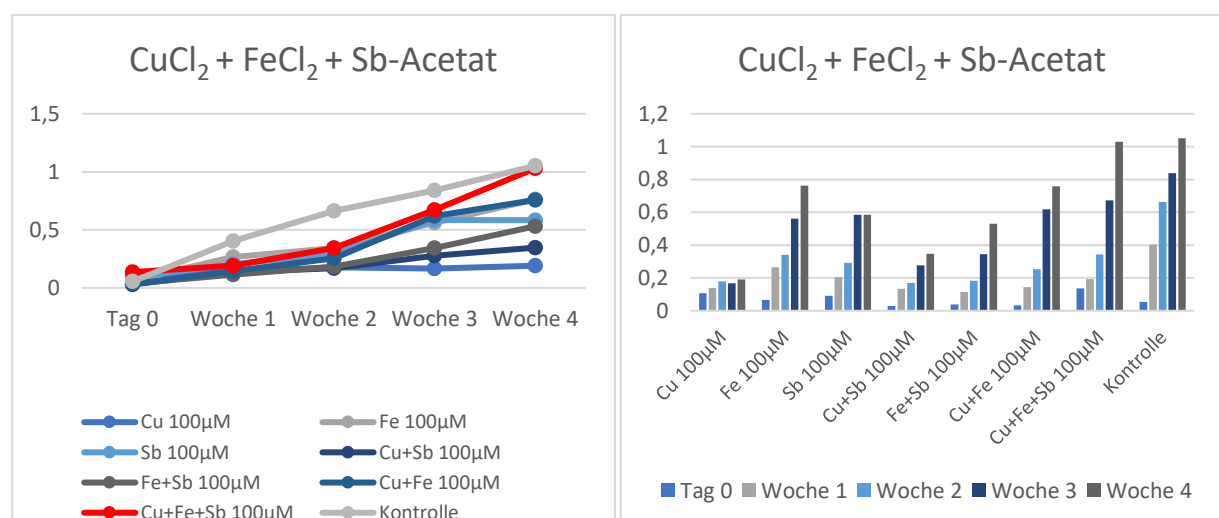


Abb. 34. Wachstumsverlauf von *Pohlia drummondii* unter Einfluss von $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

Der Wachstumsverlauf der Moose die auf Agarplatten gewachsen sind, in die $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ hinzugesetzt wurde, liegt in einem ähnlichen Bereich wie der Wachstumsverlauf

unter Einfluss von *Sb-Acetat*, $FeCl_2$ und $CuCl_2 + FeCl_2$. Bis zur dritten Woche ist das Wachstumsverhalten von *Pohlia drummondii* bei Anwesenheit von $CuCl_2 + FeCl_2 + Sb-Acetat$ vergleichbar mit *Sb-Acetat*, $FeCl_2$ und $CuCl_2 + FeCl_2$. Ab der dritten Woche setzt dann ein Wachstumsschub ein, bei dem in Woche vier das Moos in etwa so viel gewachsen ist wie die Kontrollgruppe, während die anderen Moosproben weniger oder kaum weiter wachsen.

$CuCl_2 + MnCl_2 + Sb-Acetat$

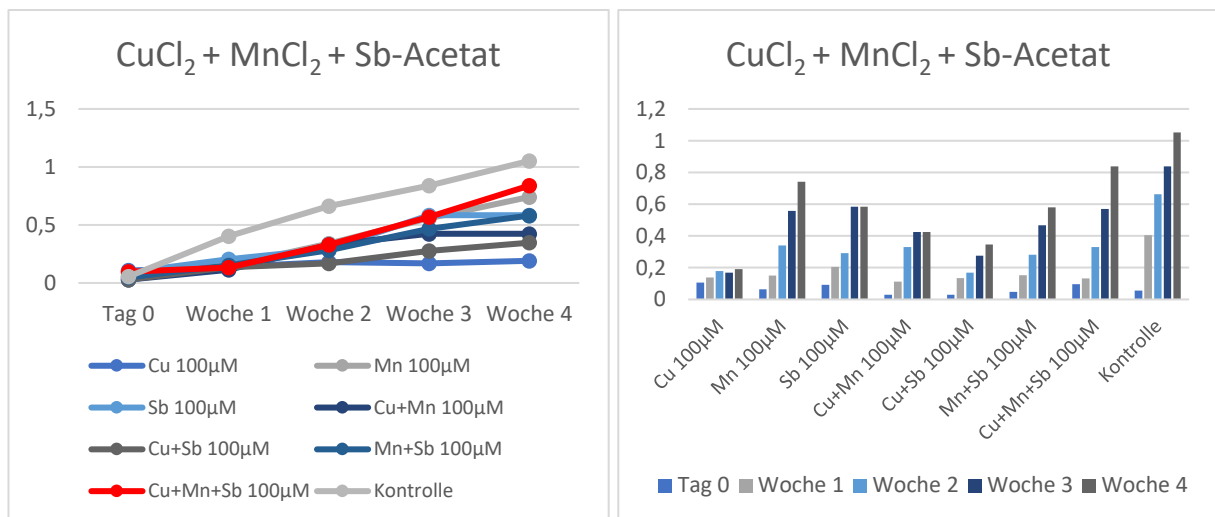


Abb. 35. Wachstumsverlauf von *Pohlia drummondii* unter Einfluss von $CuCl_2 + MnCl_2 + Sb-Acetat$

Der Einfluss von $CuCl_2 + MnCl_2 + Sb-Acetat$ auf das Moos ist vergleichbar mit dem Einfluss von $MnCl_2$, *Sb-Acetat* und $MnCl_2 + Sb-Acetat$. Anfangs ist nur ein geringfügiges Wachstum zu beobachten, vergleichbar mit dem Verlauf bei $CuCl_2$ Einfluss. Ab der zweiten Woche zeigt sich dann jede Woche ein stetiges Wachstum. Die Kombinationen aus zwei Metallen in denen auch $CuCl_2$ enthalten ist haben einen anderen, schlechteren Einfluss auf das Moos, sodass der Wachstumsverlauf bei diesen Zusammensetzungen unter dem Niveau von $CuCl_2 + MnCl_2 + Sb-Acetat$ liegt, vor allem ab der zweiten Woche.

MnCl₂ + FeCl₂ + Sb-Acetat

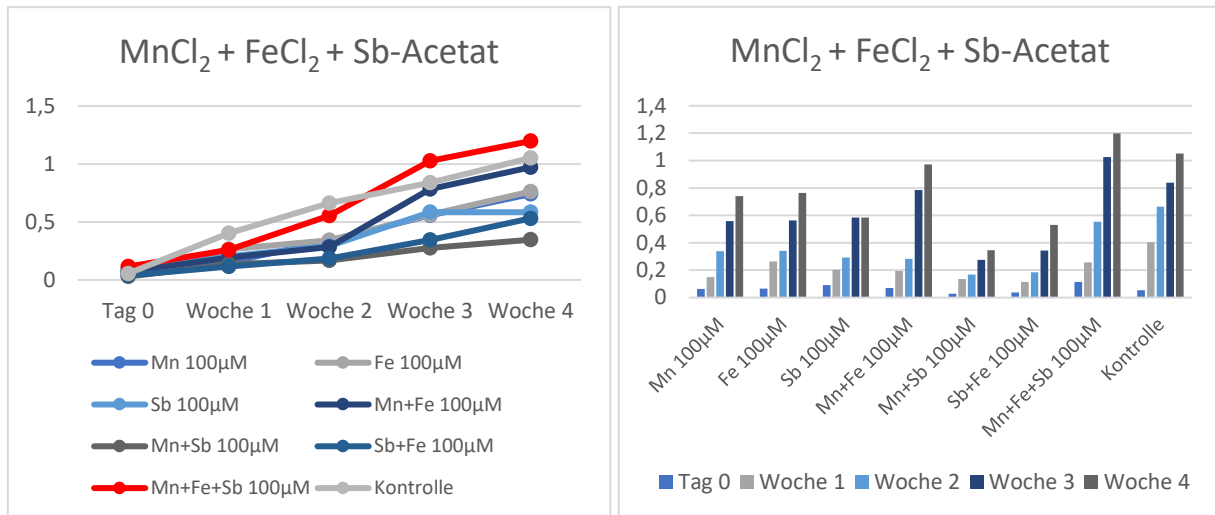


Abb. 36. Wachstumsverlauf von *Pohlia drummondii* unter Einfluss von MnCl₂ + FeCl₂ + Sb-Acetat

In der Abbildung 36 fällt sofort auf, dass das Mooswachstum bei Vorliegen der Kombination MnCl₂ + FeCl₂ + Sb-Acetat ab der zweiten Woche einen sehr großen Sprung nach oben macht und sogar die Kontrollgruppe übersteigt. Vergleicht man die Ergebnisse genauer, erkennt man, dass vor allem MnCl₂, FeCl₂ und die Kombination MnCl₂ + FeCl₂ einen besonders positiven Effekt auf das Wachstum von *Pohlia drummondii* haben, während Sb-Acetat und die Kombinationen MnCl₂ + Sb-Acetat und Sb-Acetat + FeCl₂ eher das Wachstum einschränken.

Physcomitrium patens

Wie für *Pohlia drummondii* war es auch für *Physcomitrium patens* möglich die einzelnen Schwermetalle in ihren jeweiligen Konzentrationen aus den Toleranztests in das Nährmedium einzuarbeiten. Da dies bei den Metallkombinationen nicht möglich war, wurde auch hier der Einfluss der Schwermetalle auf das Wachstum in verschiedenen Durchgängen mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Die einzelnen Schwermetalle in Konzentrationen von 1mM und 100µM und die Metallkombinationen in einheitlicher Konzentration von 100µM.

Einzelmetalle

CuCl_2

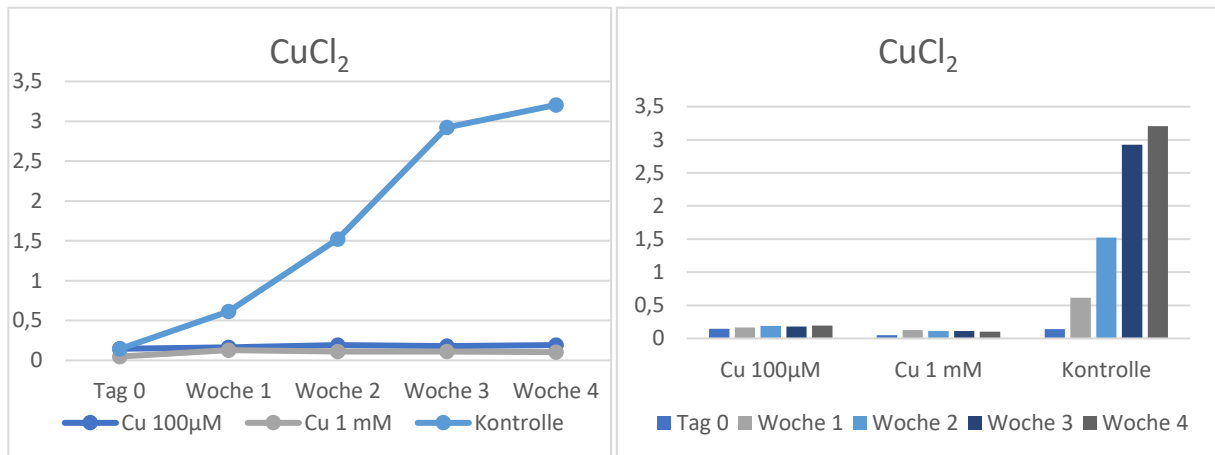


Abb. 37. Wachstumsverlauf von *Physcomitrium patens* unter Einfluss von CuCl_2

CuCl_2 1mM und CuCl_2 100µM haben eine sehr ähnliche Wirkung auf das Wachstum von *Physcomitrium patens*. Beide Konzentrationen schränken das Wachstum des Mooses im Vergleich zur Kontrollgruppe stark ein, wie in Abbildung 37 ersichtlich ist. Auf CuCl_2 100µM Platten zeigt sich ein minimal besseres Wachstum als auf CuCl_2 1mM.

FeCl_2

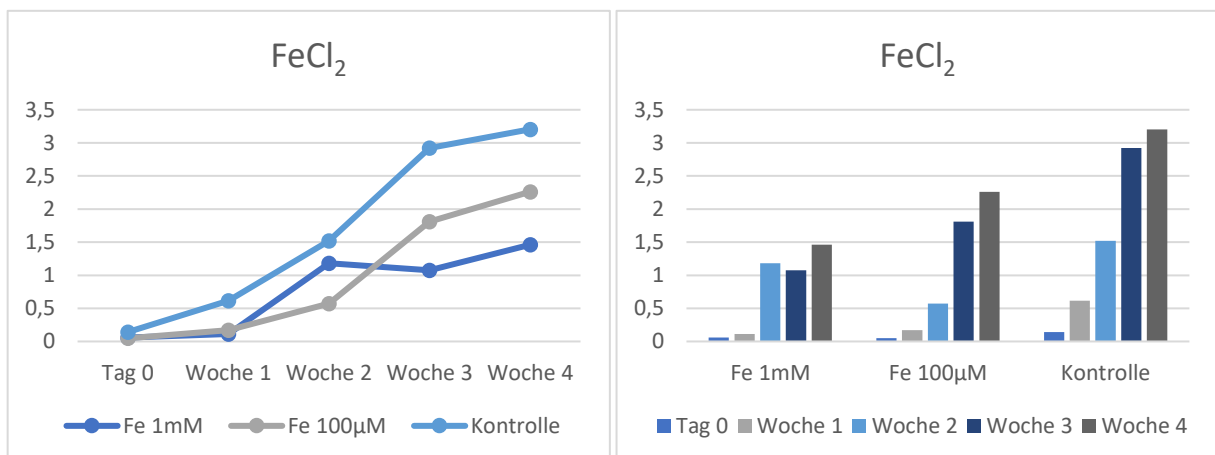


Abb. 38. Wachstumsverlauf von *Physcomitrium patens* unter Einfluss von FeCl_2

Der Wachstumsverlauf des Mooses unter dem Einfluss von FeCl_2 ist deutlich besser als bei CuCl_2 . Unterschiede zwischen den Konzentrationen sind auch hier gut ersichtlich (Abb. 38). Bei Anwesenheit von FeCl_2 100µM zeigt sich über vier Wochen ein konstantes Wachstum. Vor allem ab der zweiten Woche kommt es zu einem Wachstumsschub. Der Wachstumsverlauf und die Wachstumsschübe sind mit der Kontrollgruppe vergleichbar, mit dem Unterschied, dass bei der Kontrolle ein besseres Wachstum ohne Einschränkungen zu beobachten ist. FeCl_2 1mM hingegen bewirkt bereits nach der ersten Woche einen großen Wachstumsfortschritt. Dieser bleibt dann aber ab der zweiten Woche mehr oder weniger auf dem gleichen Niveau.

MnCl₂

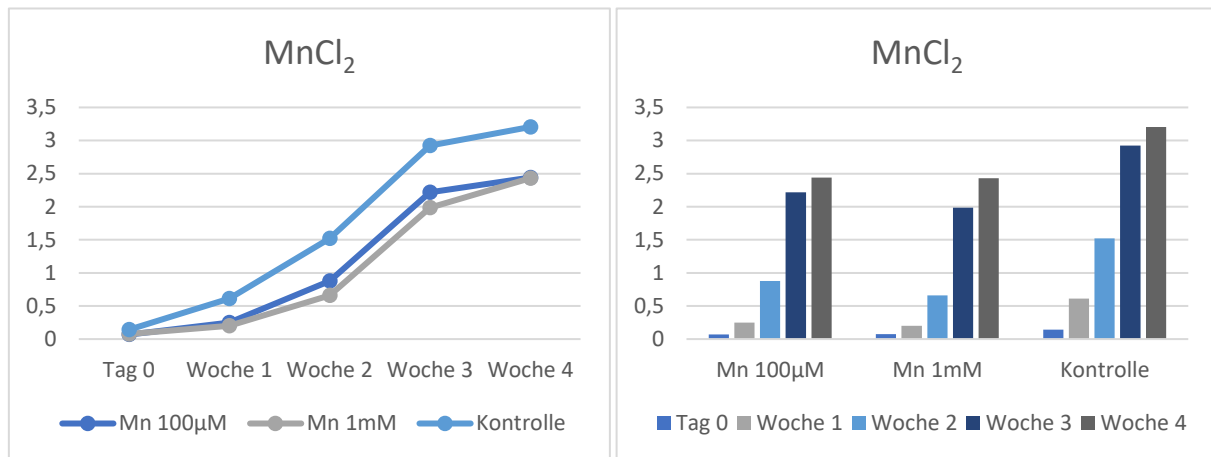


Abb. 39. Wachstumsverlauf von *Physcomitrium patens* unter Einfluss von MnCl₂

Moosproben unter Einfluss von *MnCl₂* 1mM, *MnCl₂* 100µM und Moosproben der Kontrollgruppe haben alle einen identen Wachstumsverlauf. Jede Woche wachsen die Moose konstant weiter. Der Unterschied zwischen diesen drei beobachteten Gruppen ist das Ausmaß des Wachstums. Durch die Anwesenheit des Metalls ist das Wachstum des Moores zwar nicht in einem großen Umfang eingeschränkt, dennoch zeigt sich auch hier, dass die höhere Konzentration von 1mM im Medium einen stärkeren Einfluss hat. Zu Beginn zeigen beide Proben auf den MnCl₂ - Platten ein ähnlich gutes Wachstum, nach der ersten Woche jedoch entwickeln sich die Proben unter Einfluss der geringeren Konzentration von *MnCl₂* 100µM etwas besser.

Sb-Acetat

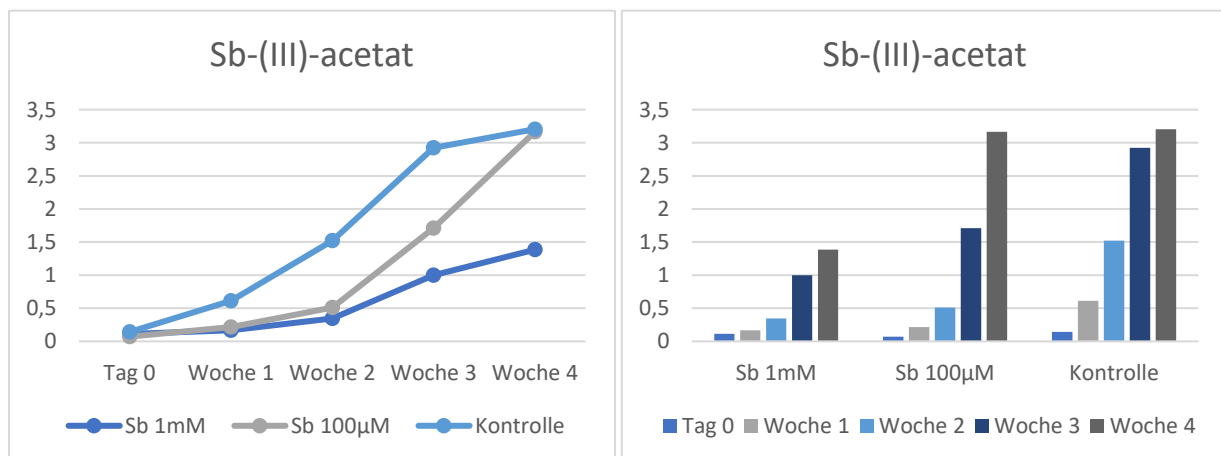


Abb. 40. Wachstumsverlauf von *Physcomitrium patens* unter Einfluss von Sb-Acetat

Der Wachstumsverlauf von *Physcomitrium patens* unter Einfluss von *Sb-Acetat* ist je nach vorhandener Konzentration verschieden. In den ersten zwei Wochen sind die Wachstumsverläufe der Moosproben bei beiden Konzentrationen, 1mM und 100µM, annähernd gleich. Am Ende der zweiten Woche kommt es jedoch unter Einfluss von *Sb-Acetat* 100µM zu einem sehr starken Wachstumsschub, der am Ende der vierten Woche auf gleichem Niveau mit der Kontrolle endet. Unter Einwirkung von 1mM *Sb-Acetat* wachsen nach der

zweiten Woche die Proben ebenfalls sehr gut weiter, wobei man den Wachstumsverlauf aber nicht mit dem unter Einfluss von 100µM *Sb-Acetat* vergleichen kann.

Kombinationen

Kombinationen aus zwei Metallen

$\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$

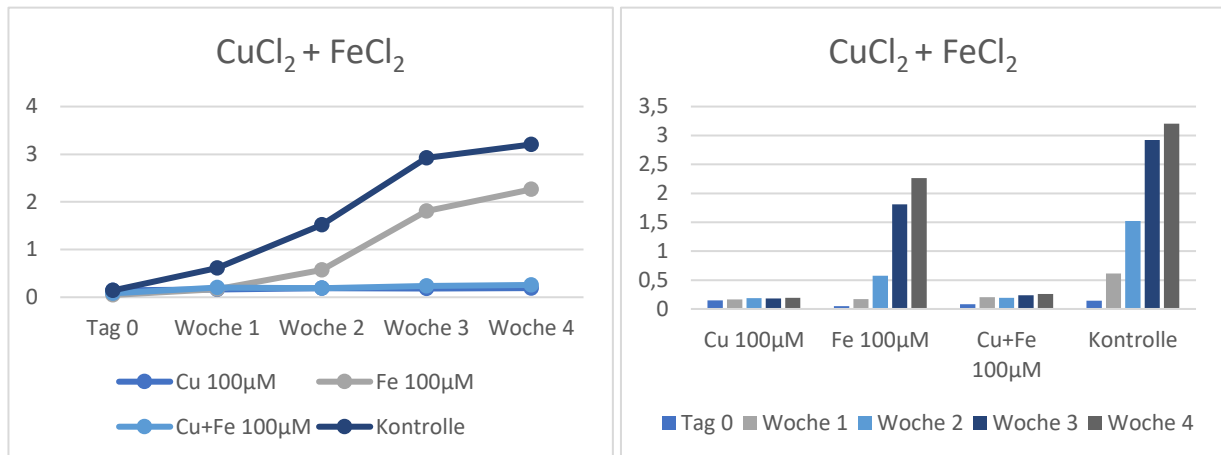


Abb. 41. Wachstumsverlauf von *Physcomitrium patens* unter Einfluss von $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$

Vergleicht man das Wachstum von *Physcomitrium patens* unter Einfluss von CuCl_2 mit dem Wachstumsverlauf der Proben, die auf FeCl_2 -Platten wachsen, so kann man einen deutlichen Unterschied feststellen. Wie bereits erwähnt, schränkt CuCl_2 das Wachstum des Mooses stark ein, während FeCl_2 einen deutlich förderlicheren Einfluss hat. Bei der Kombination dieser beiden Schwermetalle zeigt sich ein identisches Wachstumsverhalten wie bei den Moosproben, die auf Agarplatten gewachsen sind in die nur CuCl_2 eingearbeitet wurde.

$\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2$

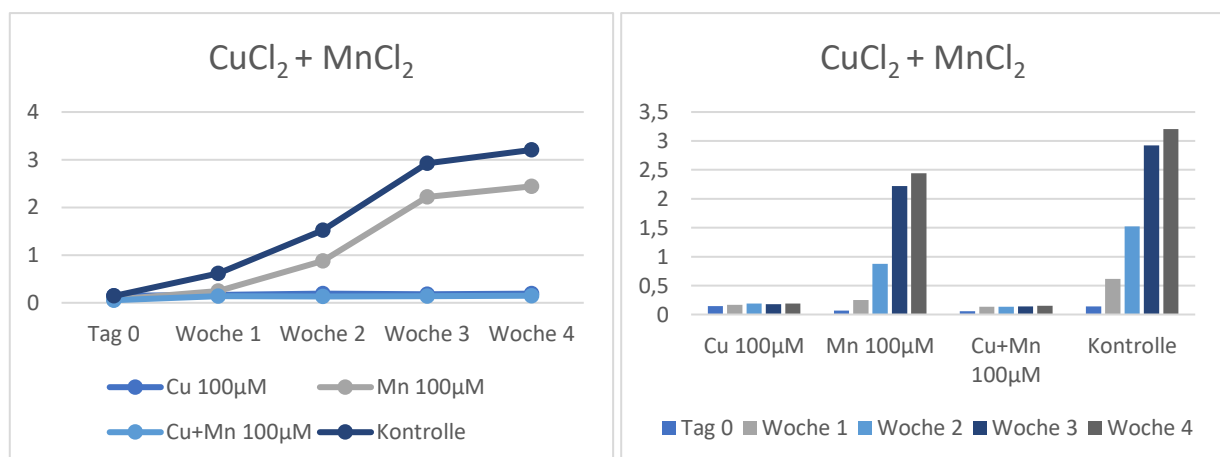


Abb. 42. Wachstumsverlauf von *Physcomitrium patens* unter Einfluss von $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2$

Die Auswirkung der Kombination $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2$ auf *Physcomitrium patens* ist vergleichbar mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$. Ein erkennbares Wachstum findet über vier Wochen kaum statt; es bleibt konstant auf einem Niveau und ist fast deckungsgleich mit

der Linie des Wachstums unter Einfluss von CuCl_2 (Abb. 42). MnCl_2 als Schwermetall alleine schränkt das Wachstum hingegen nicht so stark ein.

CuCl_2 + Sb-Acetat

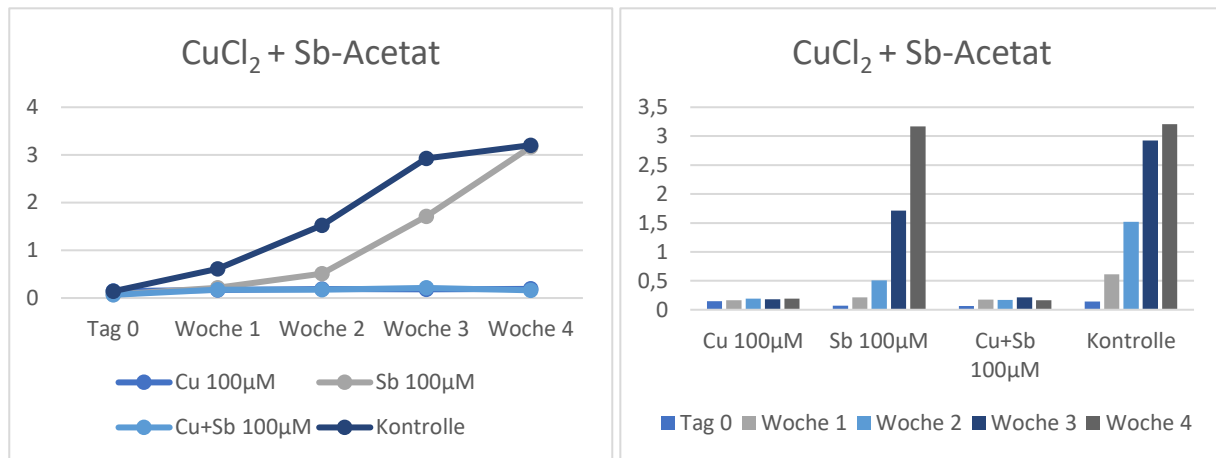


Abb. 43. Wachstumsverlauf von *Physcomitrium patens* unter Einfluss von CuCl_2 + Sb-Acetat

Sb-Acetat bewirkt ab Woche zwei einen starken Wachstumsschub mit dem Ergebnis, dass in der vierten Woche das Wachstumsergebnis gleich dem Wachstum der Kontrollgruppe ist. In Kombination mit CuCl_2 ist von dem Einfluss von *Sb-Acetat* nicht mehr viel zu sehen. Wie auch schon bei CuCl_2 + FeCl_2 und CuCl_2 + MnCl_2 beschrieben, ist es in diesem Fall auch so, dass die Kombination CuCl_2 + *Sb-Acetat* nur ein minimales Wachstum ermöglicht und dieses daher auf dem Wirkungsniveau des CuCl_2 liegt.

MnCl_2 + FeCl_2

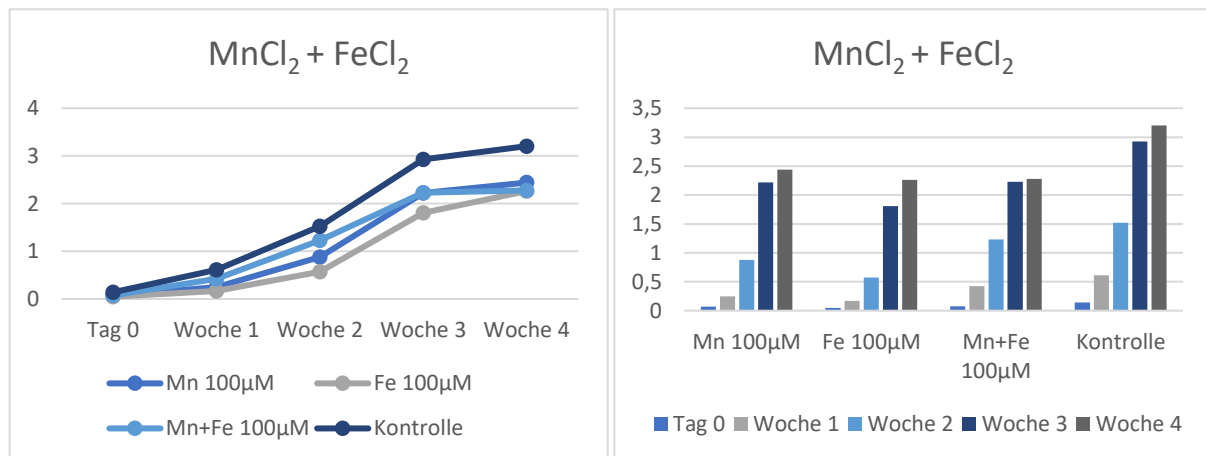


Abb. 44. Wachstumsverlauf von *Physcomitrium patens* unter Einfluss von MnCl_2 + FeCl_2

Vergleicht man den Wachstumsverlauf des Mooses bei Anwesenheit von MnCl_2 und FeCl_2 als einzelne Metalle dann ist der Verlauf relativ gleich, mit dem Unterschied, dass *Physcomitrium patens* unter Einfluss von MnCl_2 etwas besser beziehungsweise schneller wächst. Kombiniert man diese beiden Metalle, zeigt sich, dass das Wachstum des Mooses zwischen jenem der Kontrollgruppe und MnCl_2 liegt. In der dritten und vierten Woche ist das Ausmaß des Wachstums vergleichbar mit den Endergebnissen für MnCl_2 und FeCl_2 .

MnCl₂ + Sb-Acetat

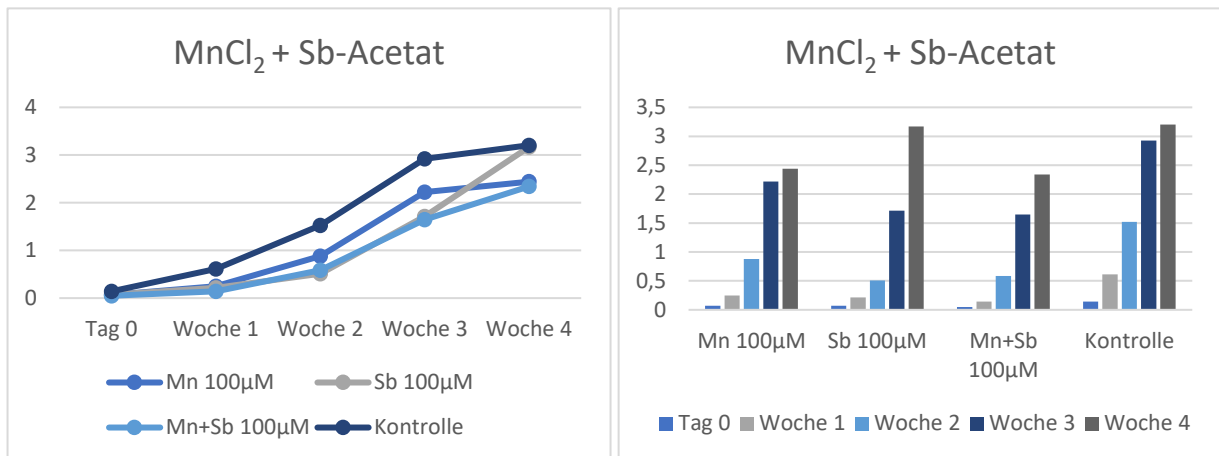


Abb. 45. Wachstumsverlauf von *Physcomitrium patens* unter Einfluss von MnCl₂ + Sb-Acetat

Die Kombination MnCl₂ + Sb-Acetat wirkt sich innerhalb von drei Wochen nahezu gleich auf das Wachstum aus wie Sb-Acetat. Nach der vierten Woche ist das Ergebnis des Wachstums aber vergleichbar mit jenem auf MnCl₂ - Platten.

FeCl₂ + Sb-Acetat

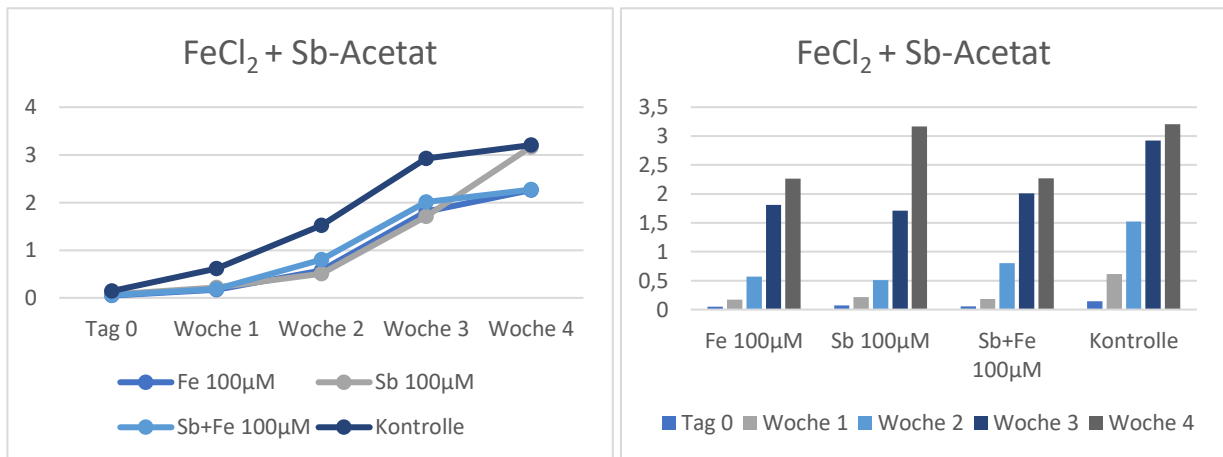


Abb. 46. Wachstumsverlauf von *Physcomitrium patens* unter Einfluss von FeCl₂ + Sb-Acetat

Die Kombination aus Eisen und Antimon bewirkt einen Wachstumsverlauf, der sehr ähnlich zu den Ergebnissen von FeCl₂ und Sb-Acetat ist, wenn sie alleine vorkommen. Es zeigt sich bei der Kombination sogar ein minimal besseres Wachstum bis zur dritten Woche. Am Ende der vierten Woche ist der Umfang des Wachstums ident zum Endergebnis auf FeCl₂.

Kombinationen aus drei Metallen

$\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$

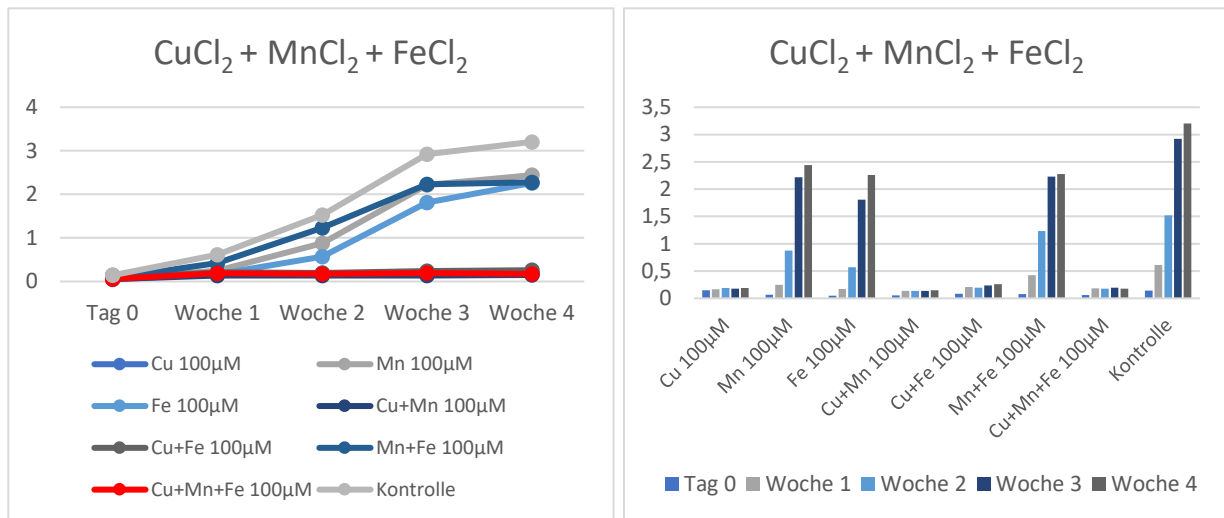


Abb. 47. Wachstumsverlauf von *Physcomitrium patens* unter Einfluss von $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$

Der Einfluss von $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ auf das Mooswachstum wird in Abbildung 47 mit dem Einfluss der einzelnen Metalle CuCl_2 , MnCl_2 , FeCl_2 und den Kombinationen $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2$, $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$ und $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ verglichen. Sofort ersichtlich ist, dass obwohl MnCl_2 , FeCl_2 , und $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ das Wachstum geringer einschränken, die Kombination $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ deutlich unter diesen Werten liegt und vergleichbar ist mit CuCl_2 , $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2$ und $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$.

$\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

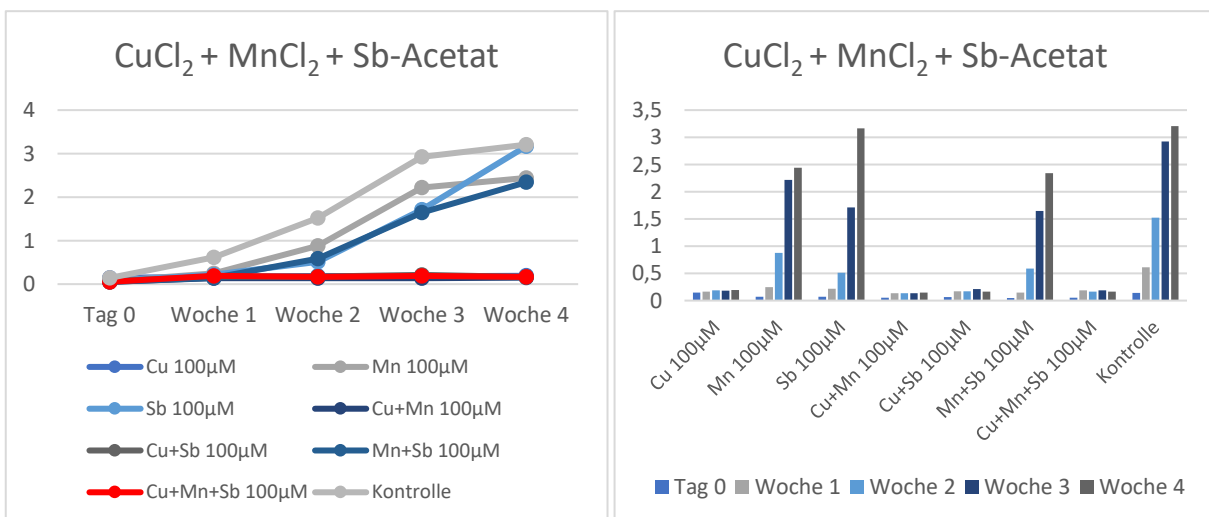


Abb. 48. Wachstumsverlauf von *Physcomitrium patens* unter Einfluss von $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

Ähnlich wie bei $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ ist auch die Kombination $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ schädlich für das Moos, da das Wachstum stark eingeschränkt wird. Die vorher beschriebenen Effekte von MnCl_2 und Sb-Acetat sowie die Kombination dieser beiden Metalle sind auch bei dieser Kombination nicht zu erkennen. Der Wachstumsverlauf ist auch hier vergleichbar mit CuCl_2 .

CuCl₂ + FeCl₂ + Sb-Acetat

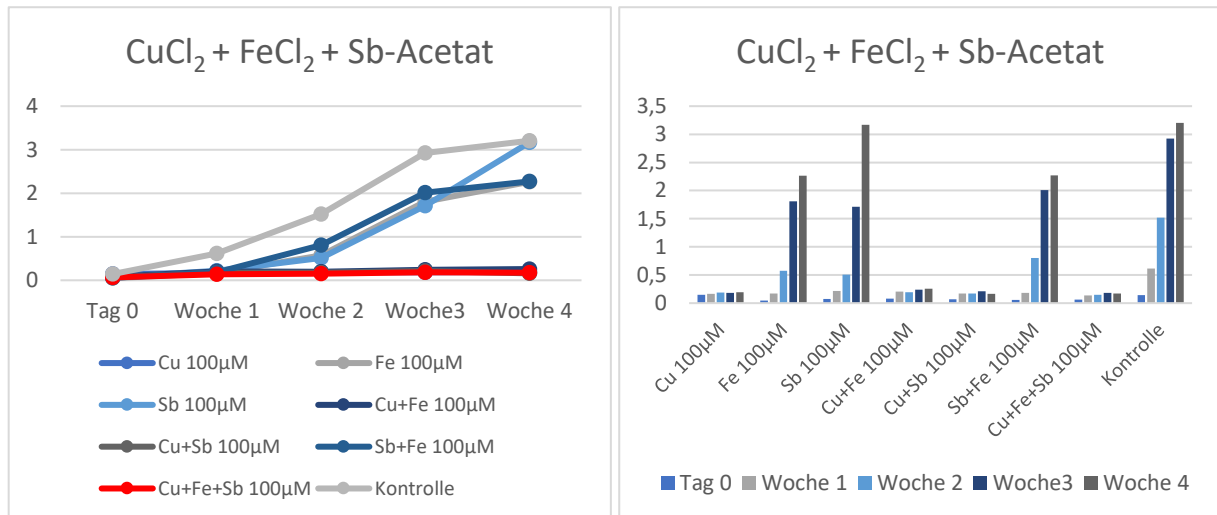


Abb. 49. Wachstumsverlauf von *Physcomitrium patens* unter Einfluss von CuCl₂ + FeCl₂ + Sb-Acetat

Auch in dieser Kombination lässt sich der gleiche Effekt wie schon bei *CuCl₂ + MnCl₂ + FeCl₂* und *CuCl₂ + MnCl₂ + Sb-Acetat* erkennen. Erneut ist das Wachstum mit dem Verlauf von *CuCl₂* alleine vergleichbar, während die Kombinationen ohne Kupfer deutlich weniger negative Einflüsse auf das Wachstum zeigen.

MnCl₂ + FeCl₂ + Sb-Acetat

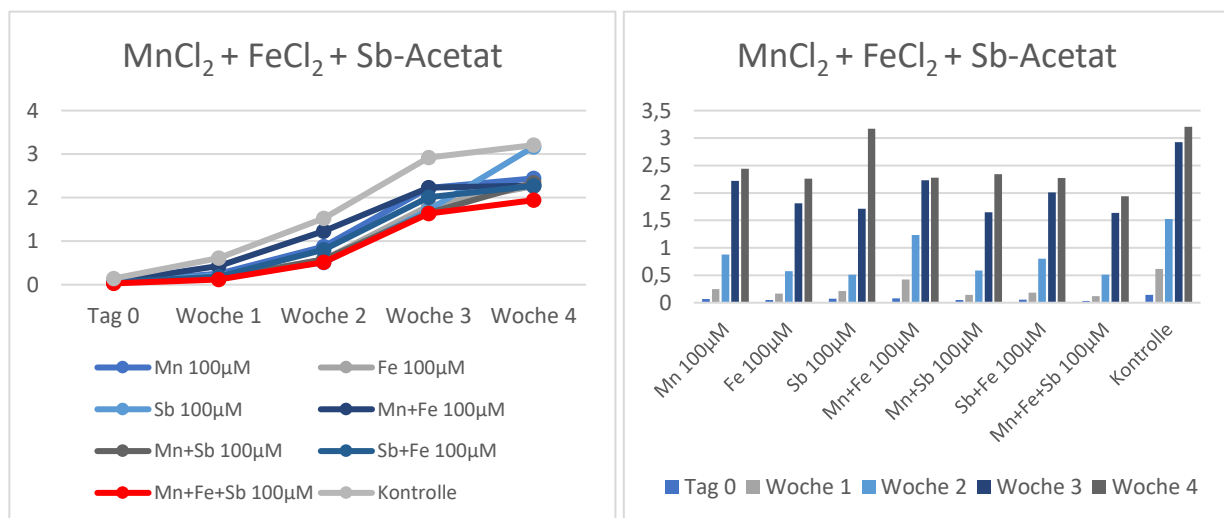


Abb. 50. Wachstumsverlauf von *Physcomitrium patens* unter Einfluss von MnCl₂ + FeCl₂ + Sb-Acetat

In der Abbildung 50 ist ersichtlich, dass das Wachstum der Moose unter Einfluss aller Metalle und Metallkombinationen in etwa auf dem gleichen Niveau liegen. Die Kombination *MnCl₂ + FeCl₂* schränkt das Wachstum am wenigsten ein, während die Kombination *MnCl₂ + FeCl₂ + Sb-Acetat* im Vergleich zu den anderen bewirkt, dass das Wachstum am schlechtesten ist beziehungsweise mit *MnCl₂ + Sb-Acetat*, bis auf die vierte Woche, gleich ist.

4.5 EDX

Die elektronenmikroskopischen Versuche dienten dem Zweck, einen Überblick über die Adsorption der Schwermetalle zu bekommen. Ziel war es einerseits, herauszufinden, ob die Schwermetalle von den Moosen aufgenommen werden und andererseits, in welchen Teilen der Moose - Stämmchen oder Blättchen - die Metalle wie verteilt sind. In diesen Versuchen wurde das Moos *Physcomitrium patens* mit allen einzelnen Schwermetallen und allen oben beschriebenen Metallkombinationen behandelt und untersucht. Dabei wurden sechs zufällig ausgewählte Metalle und Metallkombinationen während zwei Zeitspannen, in denen das Moos in die Lösungen eingelegt, wurde miteinander verglichen. Einmal wurde *Physcomitrium patens* für 20 Stunden mit den Metalllösungen behandelt und einmal für 2 Stunden. Danach wurden die Proben aus den Metalllösungen herausgenommen, getrocknet und analysiert. Für die Untersuchung der Moose *Pohlia drummondii* und *Hypnum cupressiforme* wurden die gleichen sechs einzelnen Metalle und Metallkombinationen gewählt. Für diese beiden Moosarten wurde nur die Zeitspanne von 20 Stunden getestet, da sich bei den Versuchen mit *Physcomitrium patens* gezeigt hat, dass innerhalb von 2 Stunden kaum Schwermetalle in den Proben detektierbar waren.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse von *Physcomitrium patens* vorgestellt. In Form von Bildern wird gezeigt, wie die Verteilung der Schwermetalle in den Proben ist und wie sie sich unterscheidet, wenn die Metalle für 2 Stunden und 20 Stunden auf das Moos einwirken. Die Ergebnisse für *Pohlia drummondii* und *Hypnum cupressiforme* werden auf die gleiche Art und Weise beschrieben.

Physcomitrium patens

Einzelmetalle

CuCl_2

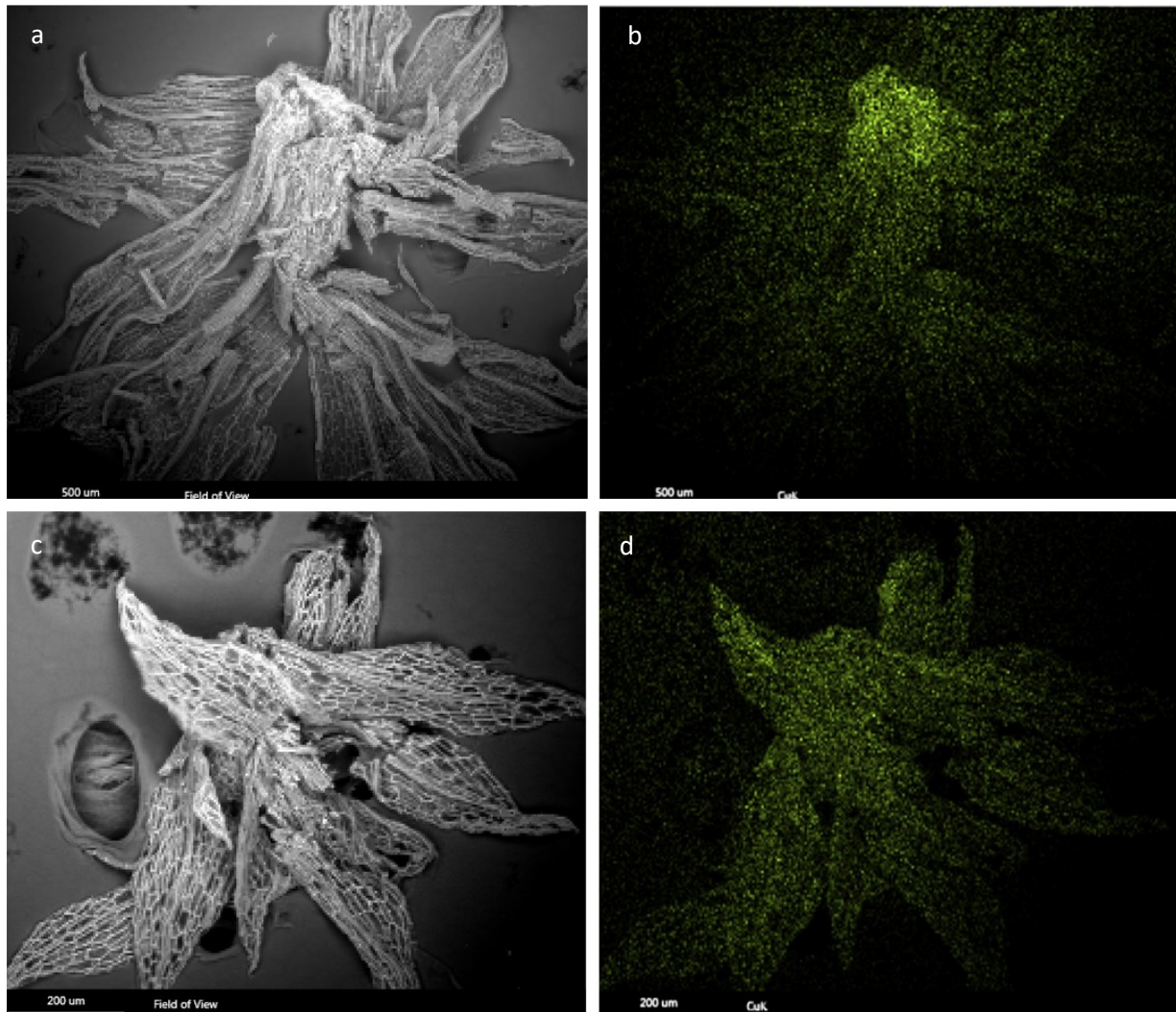


Abb. 51. EDX von *Physcomitrium patens*: Habitus und CuCl_2 -Verteilung nach 2 Stunden (a,b) und nach 20 Stunden (c,d)

100µM CuCl_2 wurde an *Physcomitrium patens* in zwei Varianten getestet. Die Aufnahme des Schwermetalls wurde nach 2 Stunden und nach 20 Stunden untersucht. Wie man in der Abbildung 51 erkennen kann, zeigt die Probe nach 2 Stunden Einwirkzeit, dass CuCl_2 vor allem am Stämmchen des Mooses vorkommt und sehr starke Signale hat (Abb. 51a,b). Auch in den Blättchen zeigen sich Signale, aber nicht so deutlich wie im Stämmchen. Nach 20 Stunden sind die Signale in der Probe gleichmäßiger verteilt. Man kann gut erkennen, dass die Verteilung bis in die Blättchen hinein reicht (Abb. 51c,d).

FeCl_2

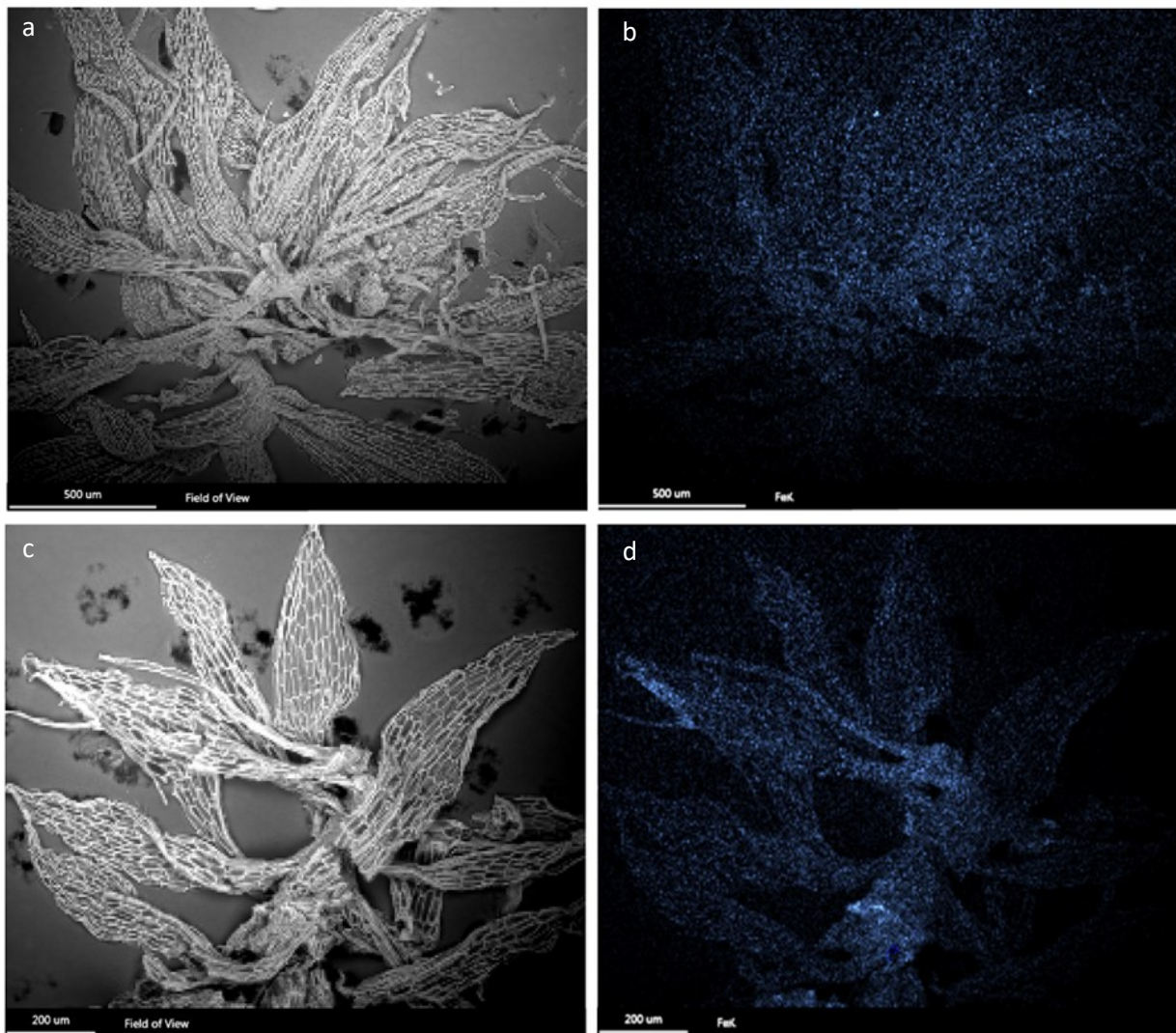


Abb. 52. EDX von *Physcomitrium patens*: Habitus und FeCl_2 -Verteilung nach 2 Stunden (a,b) und nach 20 Stunden (c,d)

Auch bei FeCl_2 lassen sich Unterschiede in Abhängigkeit der Zeit feststellen. Nach 2 Stunden ist die Adsorption zwar in den Blättern und hauptsächlich am Stämmchen zu sehen (Abb. 52a,b), aber nach 20 Stunden sind die Signale deutlich stärker und definierter. Man kann die Anlagerung und Verteilung in den Blättchen deutlicher erkennen (Abb. 52d).

MnCl₂

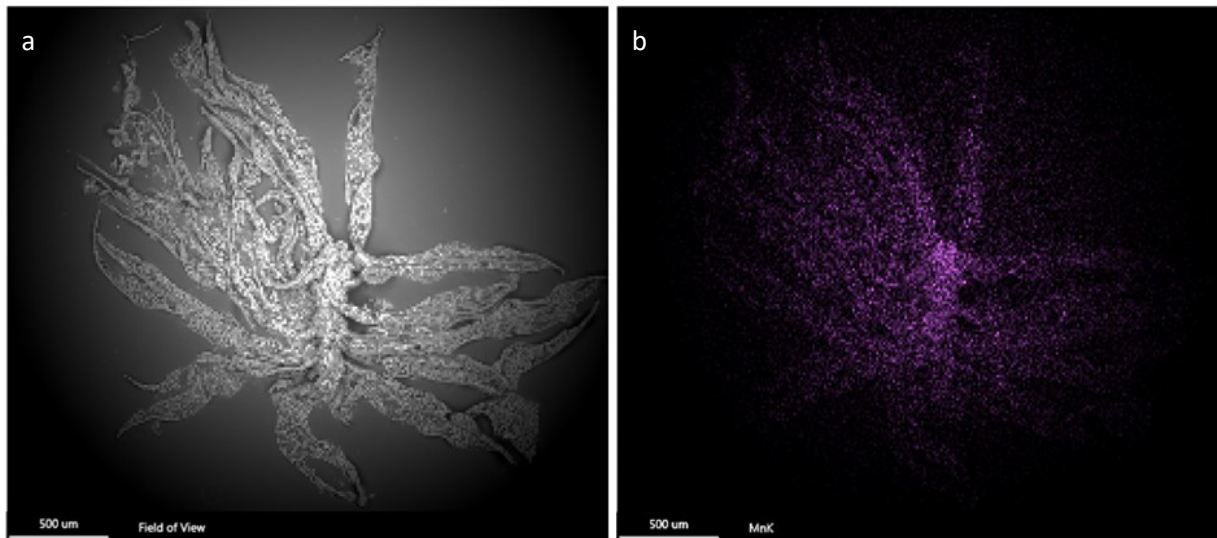


Abb. 53. EDX von *Physcomitrium patens*: Habitus und MnCl₂-Verteilung nach 20 Stunden (a,b)

MnCl₂ zeigte nach 20 Stunden starke Signale entlang des gesamten Stämmchens. Allerdings lässt sich auf Abbildung 53b auch sehr gut erkennen, dass die Verteilung von MnCl₂ bis in die Blättchen reicht und teilweise auch bis in die Blattspitzen.

Sb-Acetat

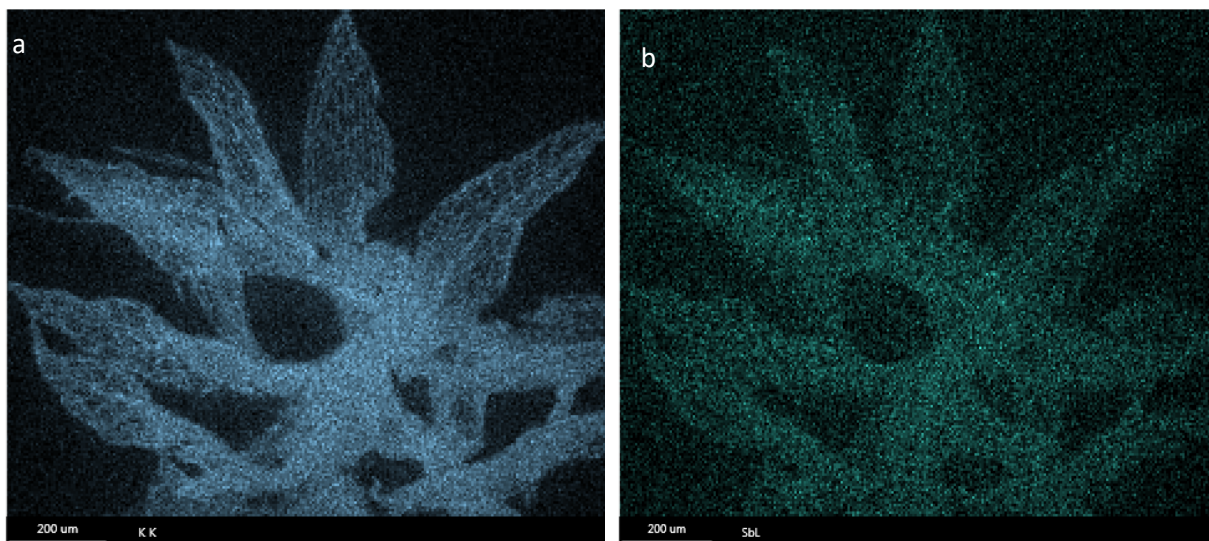


Abb. 54. EDX von *Physcomitrium patens*: Habitus und Sb-Acetat -Verteilung: (a) Kalium, (b) Sb-Acetat

Die Ergebnisse von Sb-Acetat konnten in diesen Versuchen nicht ausgewertet werden, weil sich gezeigt hat, dass dieses Schwermetall an der gleichen Stelle detektiert wird wie Kalium, das in allen Proben enthalten ist und auf den EDX-Bildern ganz klare Signale gibt. Da sich Sb-Acetat mit Kalium überlagert, haben alle Proben, auch jene in denen kein Sb-Acetat enthalten war (Kontrolle), klare und starke Signale gezeigt wie in Abbildung 54 ersichtlich. Aus diesem Grund gibt es für dieses Schwermetall keine Interpretation der Ergebnisse.

Kombinationen

Kombinationen aus zwei Metallen

$\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$ nach 20 Stunden

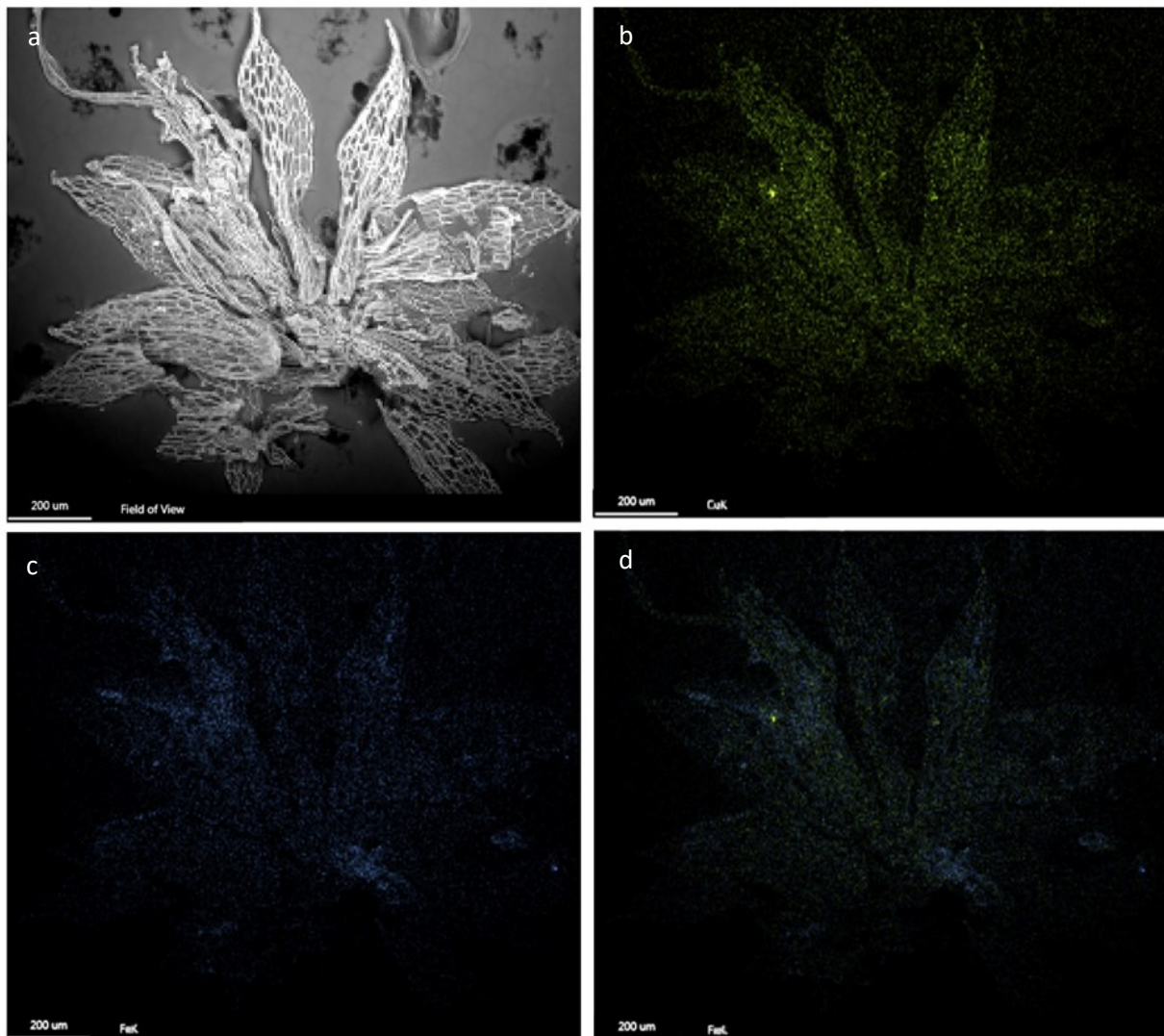


Abb. 55. EDX von *Physcomitrium patens*: Habitus und $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$ -Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) CuCl_2 , (c) FeCl_2 , (d) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$

$\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$ zeigen beide nach einer Einwirkzeit von 20 Stunden eine gute Verteilung auch bis in die Blattspitzen. CuCl_2 ist aber in diesem Fall das dominantere Schwermetall. Die Signale sind in der gesamten Probe stärker. FeCl_2 wurde vom Moos auch relativ gut aufgenommen, es zeigt aber nur an ein paar einzelnen Stellen sehr starke Signale. Diese sind aber teilweise auch stärker als bei CuCl_2 , wie man in Abbildung 55c erkennen kann.

$\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$ nach 2 Stunden

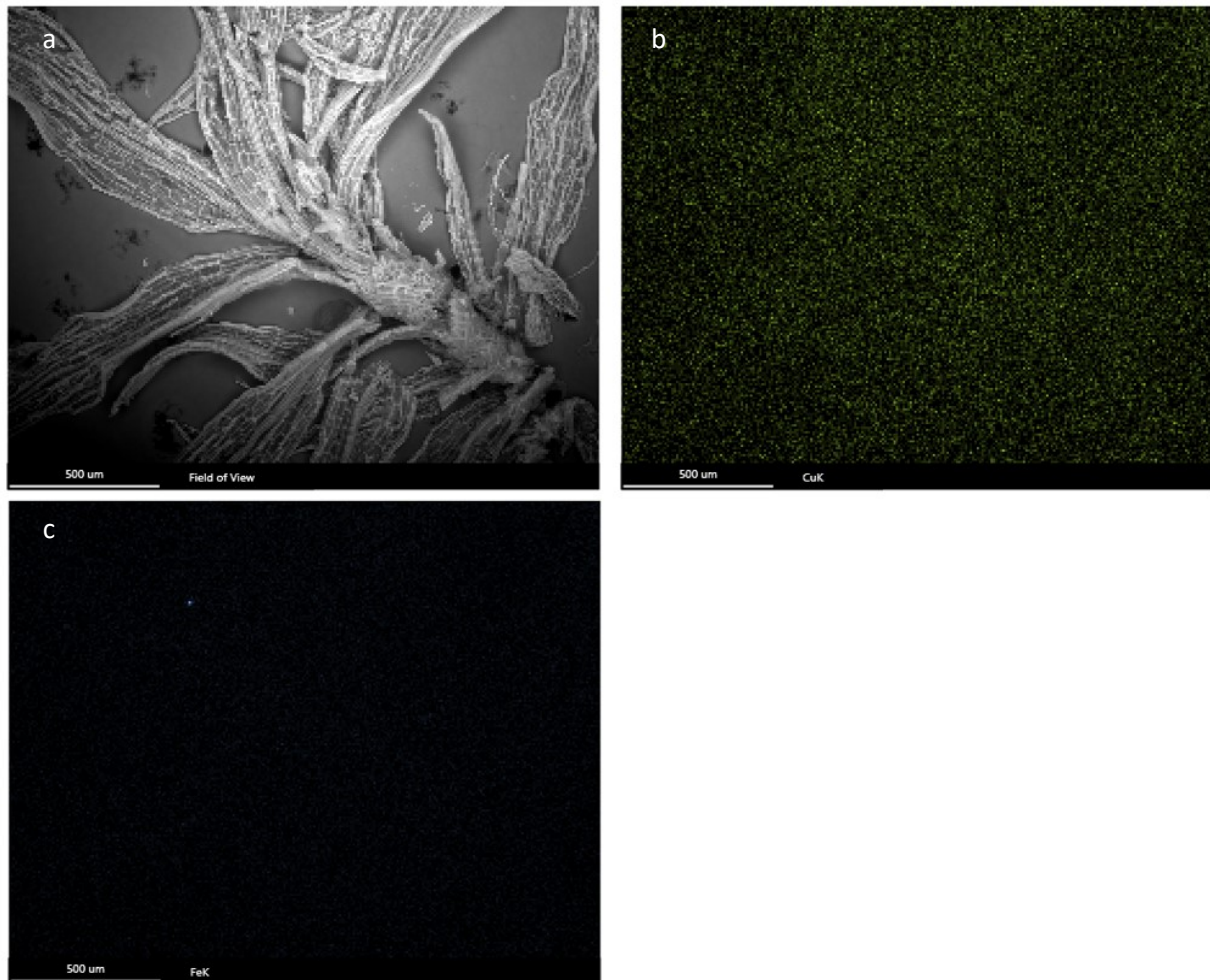


Abb. 56. EDX von *Physcomitrium patens*: Habitus und $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$ -Verteilung nach 2 Stunden: (a) Habitus, (b) CuCl_2 , (c) FeCl_2

Wie man auf diesen Bildern erkennen kann, gab es nach einer Behandlung mit dieser Metallkombination für 2 Stunden keine oder kaum klar erkennbare Adsorption der Schwermetalle. Man erkennt weder bei Kupfer noch bei Eisen, ob eine Anlagerung am Stämmchen oder den Blättchen stattgefunden hat. Man sieht in diesem Fall nur das Hintergrundrauschen.

CuCl_2 + Sb-Acetat

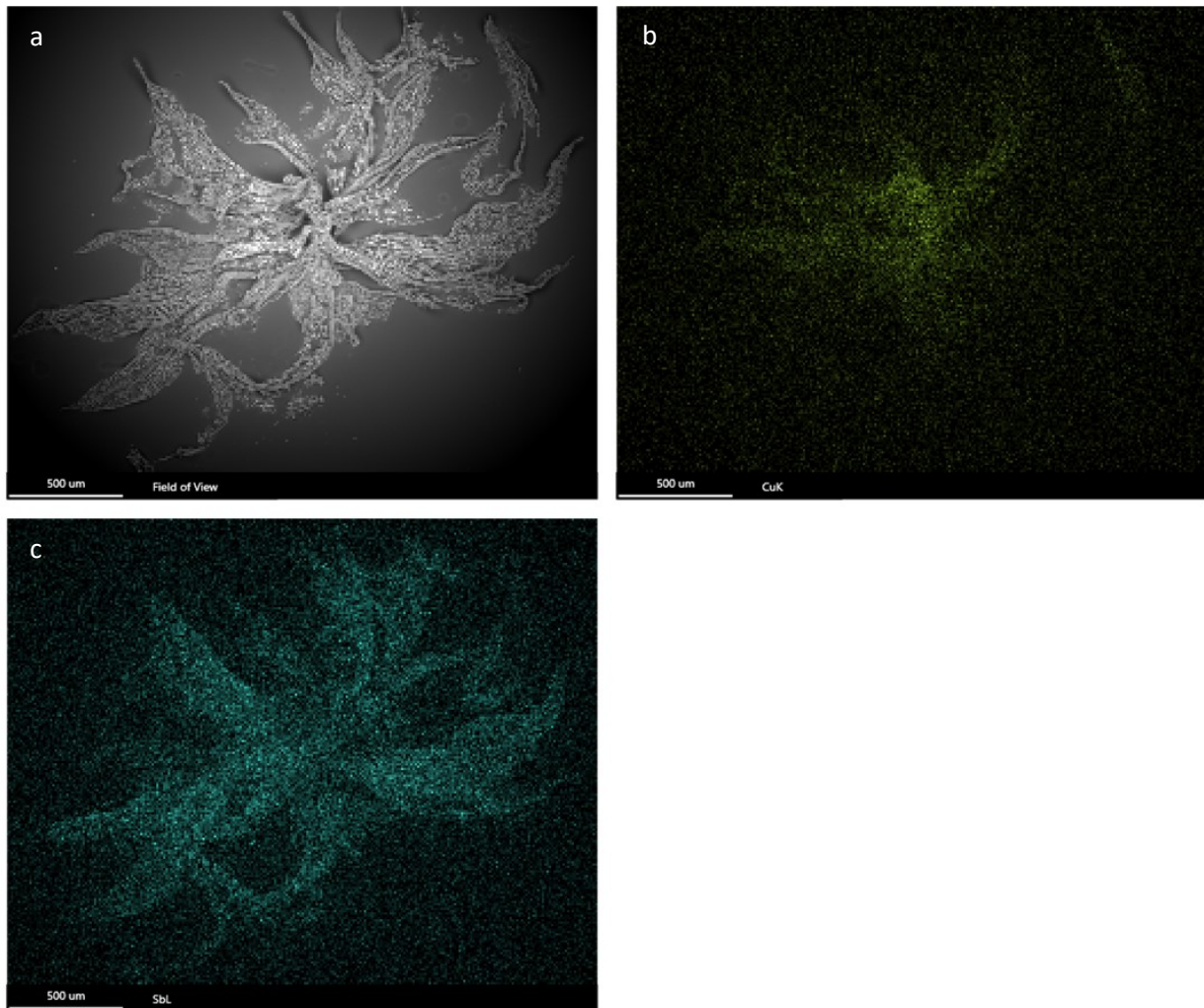


Abb. 57. EDX von *Physcomitrium patens*: Habitus und CuCl_2 + Sb-Acetat -Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) CuCl_2 , (c) Sb-acetat

In der Kombination CuCl_2 + Sb-Acetat ist die CuCl_2 Anlagerung eher auf das Zentrum, das vom Stämmchen gebildet wird, beschränkt. Die Signale sind an der Spitze des Stämmchens und den unteren Teilen der Blättchen, die von dem Stämmchen wegführen, am stärksten. Die Verteilung reicht aber nicht bis in die Blattspitzen. Sb-Acetat kann, wie schon erwähnt nicht beurteilt werden, da es möglicherweise durch Kalium überlagert wird.

$\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$

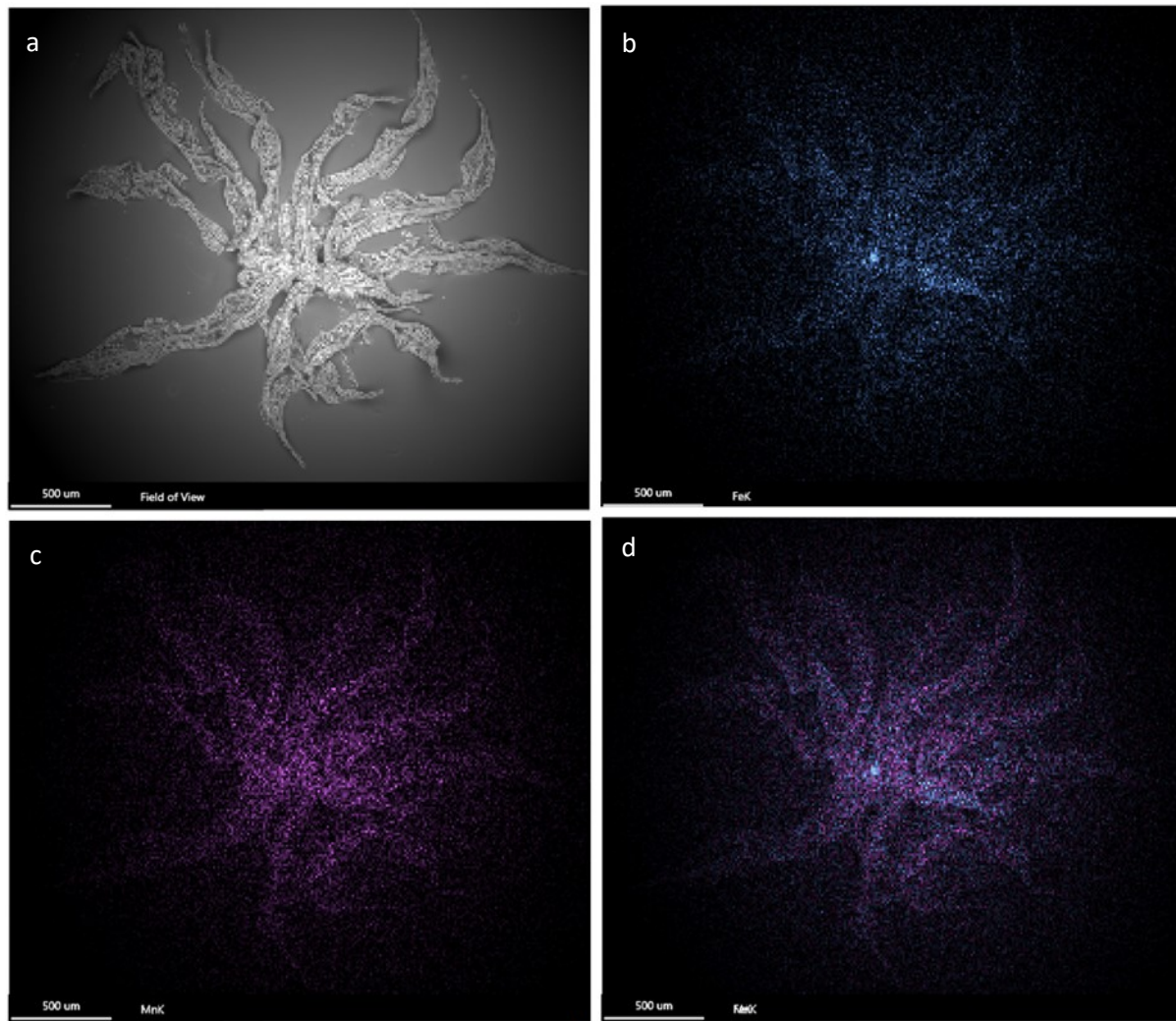


Abb. 58. EDX von *Physcomitrium patens*: Habitus und $\text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ -Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) FeCl_2 , (c) MnCl_2 , (d) $\text{FeCl}_2 + \text{MnCl}_2$

MnCl_2 und FeCl_2 kombiniert zeigen nach 20 Stunden eine relativ ähnliche Verteilung innerhalb der Probe. FeCl_2 gibt entlang des Stämmchens teilweise sehr starke Signale, die bis in die Blattspitzen reichen. Auch MnCl_2 zeigt ein ähnliches Verhalten. Auch hier sind die Signale zentral entlang des Stämmchens am besten. Die Signale in den Blättchen werden zur Blattspitze hin etwas schwächer.

MnCl₂ + Sb-Acetat

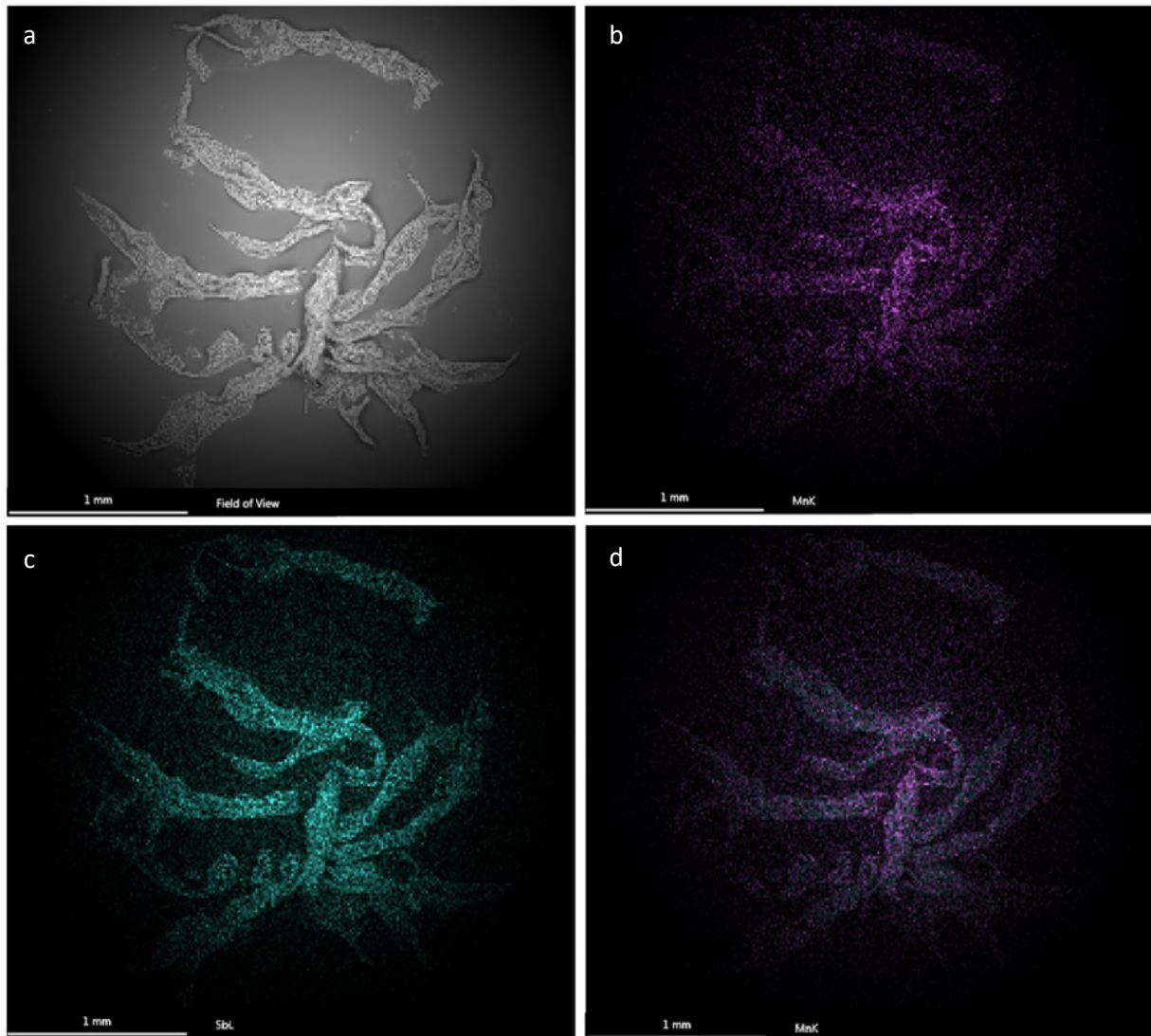


Abb. 59. EDX von *Physcomitrium patens*: Habitus und MnCl₂ + Sb-Acetat - Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) MnCl₂, (c) Sb-Acetat, (d) MnCl₂ + Sb-Acetat

Die Aufnahme von MnCl₂ in Kombination mit Sb-Acetat ist vergleichbar mit den Ergebnissen aus MnCl₂ + FeCl₂. Auch hier sind die Signale entlang des Stämmchens und der unteren Teile der Blättchen am besten zu sehen.

FeCl₂ + Sb-Acetat

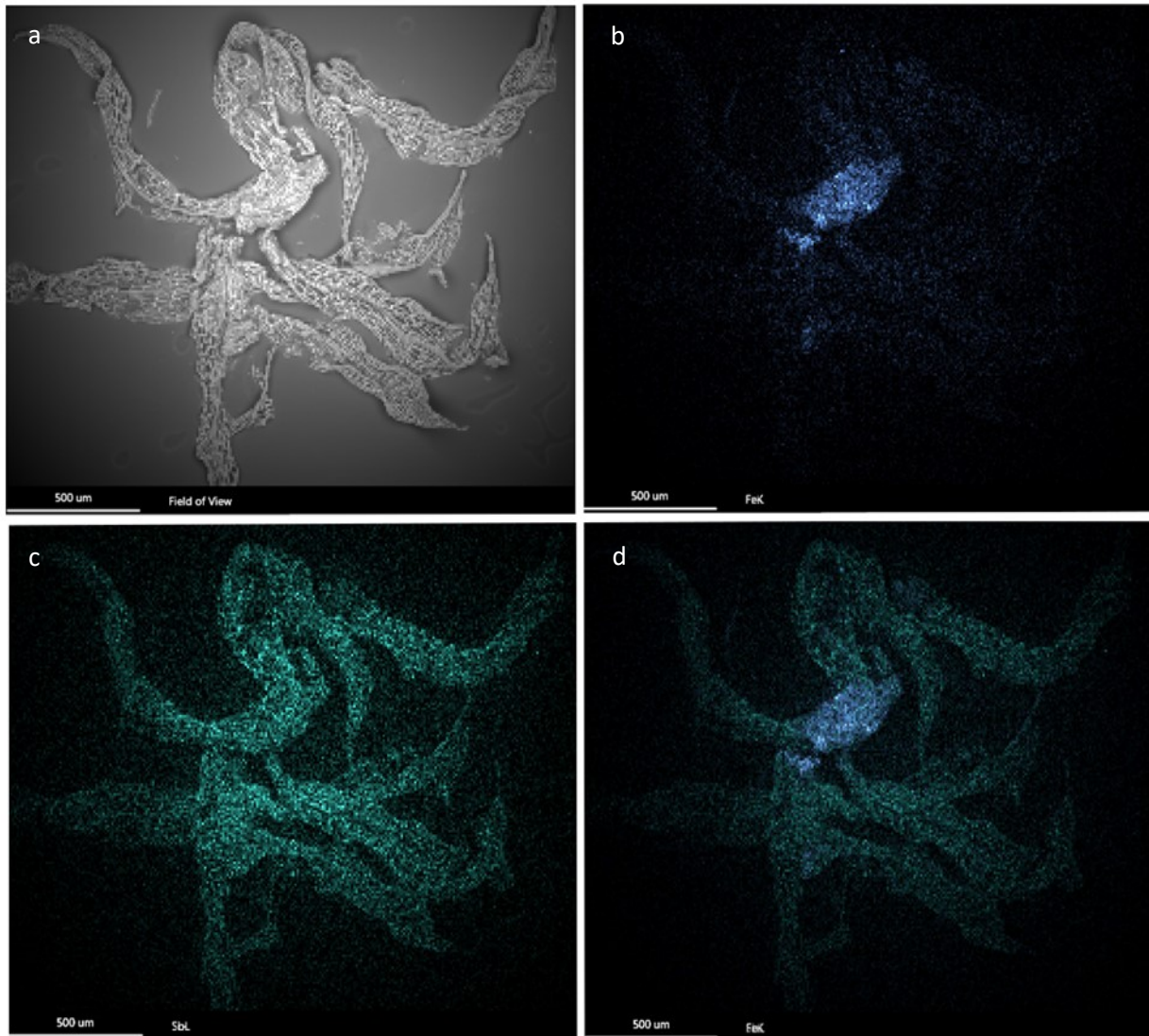


Abb. 60. EDX von *Physcomitrium patens*: Habitus und FeCl₂ + Sb-Acetat - Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) FeCl₂, (c) Sb-Acetat, (d) FeCl₂ + Sb-Acetat

Die Kombination *FeCl₂* + *Sb-Acetat* zeigt eine interessante Anlagerung und Verteilung von *FeCl₂*. Während es beispielsweise bei der Kombination *MnCl₂* + *FeCl₂* relativ ausgeglichen war, zeigt *FeCl₂* in dieser Kombination kaum Signale in den Blättern. Die stärksten Signale, die sofort zu sehen sind, befinden sich hauptsächlich am Stämmchen. Wie man auf Abbildung 60a erkennen kann, ist es zu einem Bruch des Stämmchens gekommen und an der unteren Hälfte der Bruchstelle sieht man ebenfalls noch sehr starke Signale.

Kombinationen aus drei Metallen

$\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$

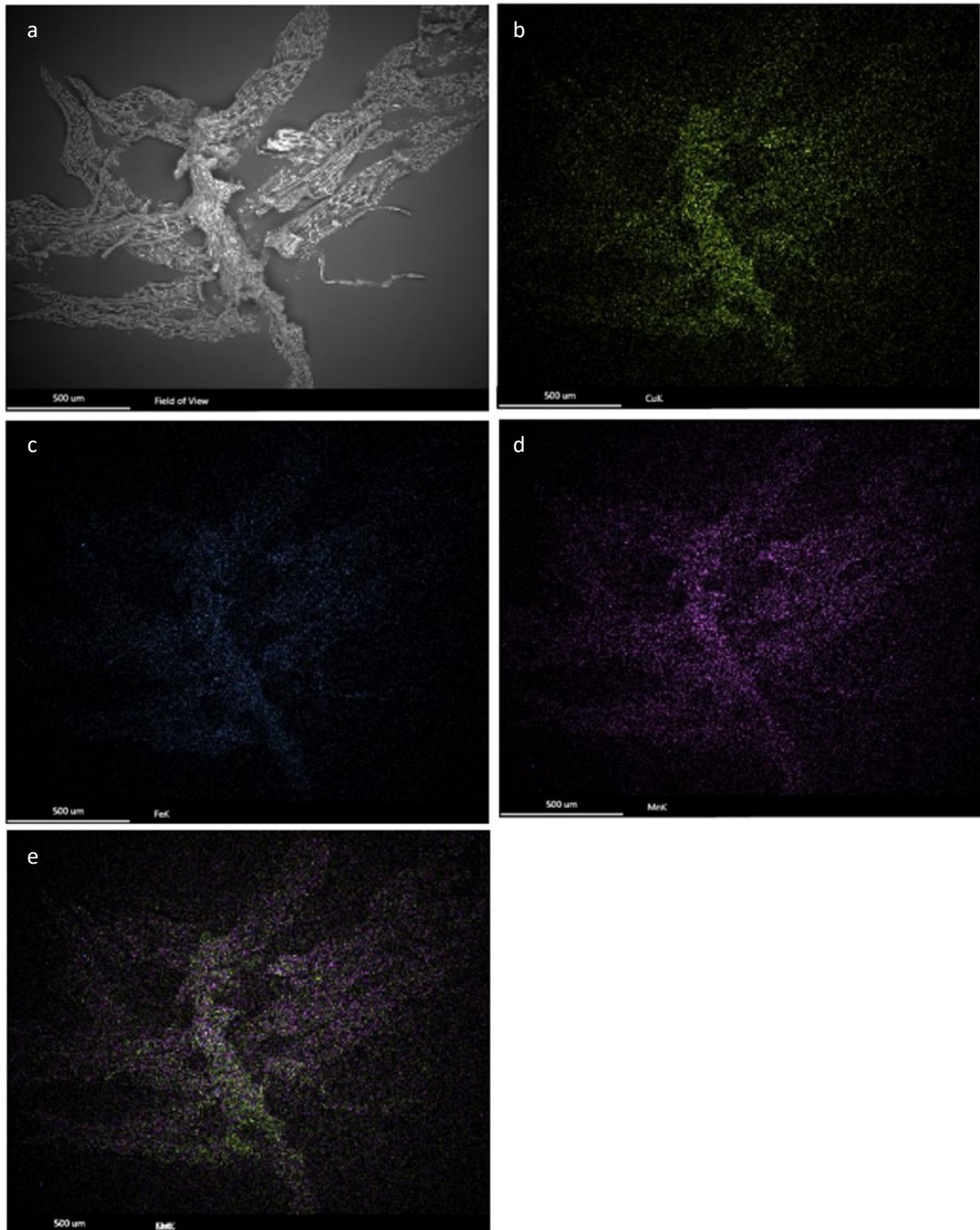


Abb. 61. EDX von *Physcomitrium patens*: Habitus und $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ - Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) CuCl_2 , (c) FeCl_2 , (d) MnCl_2 , (e) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$

In der Kombination $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2$ zeigt FeCl_2 die schwächsten Signale. Die Verteilung ist zwar gleichmäßig in der ganzen Probe, aber nicht so dominant wie bei CuCl_2 und MnCl_2 . Diese beiden Schwermetalle haben ihre stärksten Konzentrationen wieder entlang des Stämmchens. Die Verteilung in den Blättchen ist bei beiden gut zu sehen. Der Unterschied

liegt hauptsächlich darin, dass bei $MnCl_2$ die Signale gleichmäßiger über die gesamten Blättchen zu sehen sind, während bei $CuCl_2$ die Signale zur Blattspitze hin schwächer werden.

$CuCl_2$ + $MnCl_2$ + Sb-Acetat

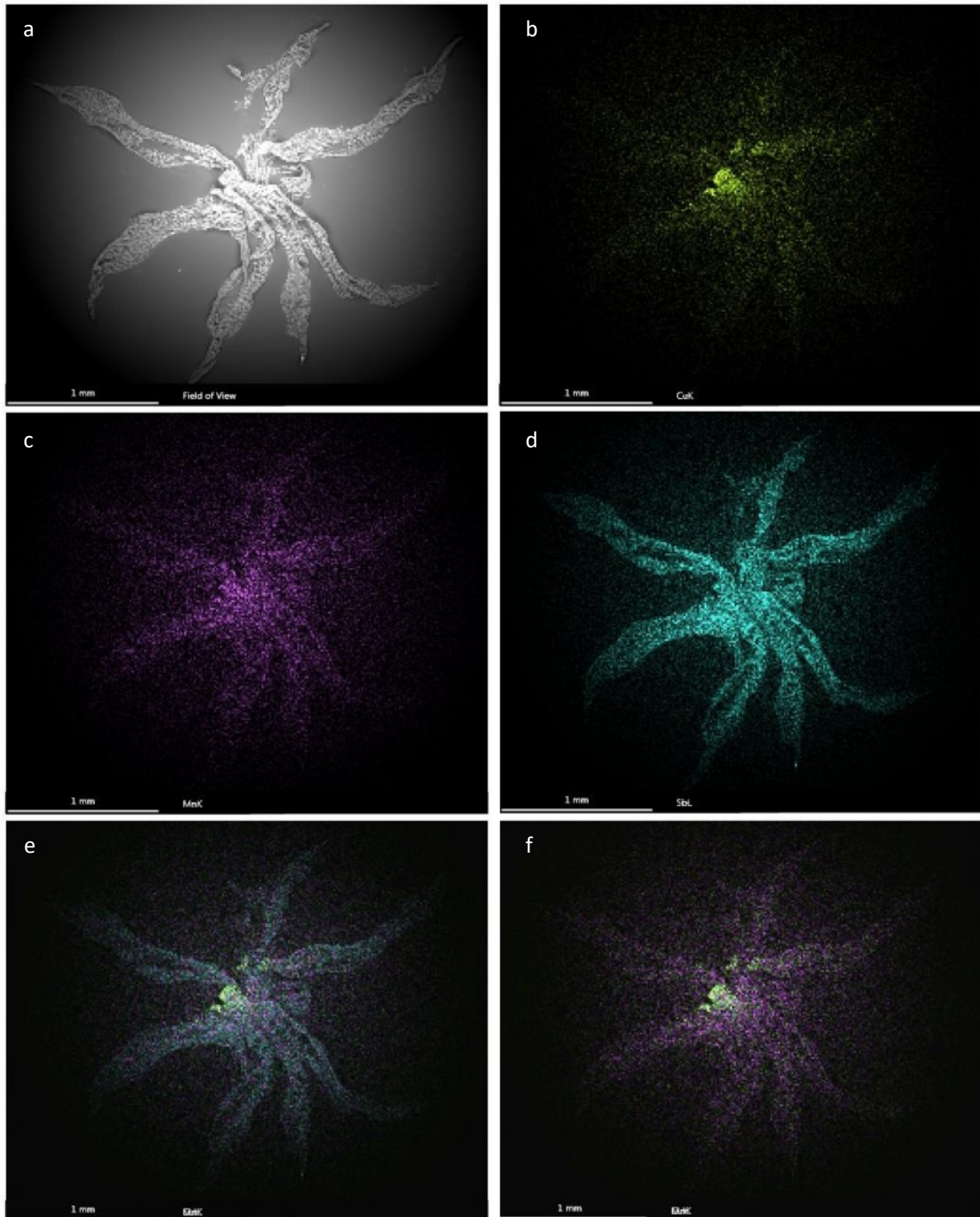


Abb. 62. EDX von *Physcomitrium patens*: Habitus und $CuCl_2$ + $MnCl_2$ + Sb-Acetat - Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) $CuCl_2$, (c) $MnCl_2$, (d) Sb-Acetat, (e) $CuCl_2$ + $MnCl_2$ + Sb-Acetat, (f) $CuCl_2$ + $MnCl_2$

CuCl_2 zeigt auch in dieser Kombination vor allem am Ende des Stämmchens ein sehr starkes Signal. Die Verteilung in den Blättern ist im Vergleich zum Stämmchen geringer. MnCl_2 hingegen verteilt sich in der Probe gleichmäßiger und hat nicht an einer bestimmten Stelle ein besonders starkes Signal wie CuCl_2 .

$\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

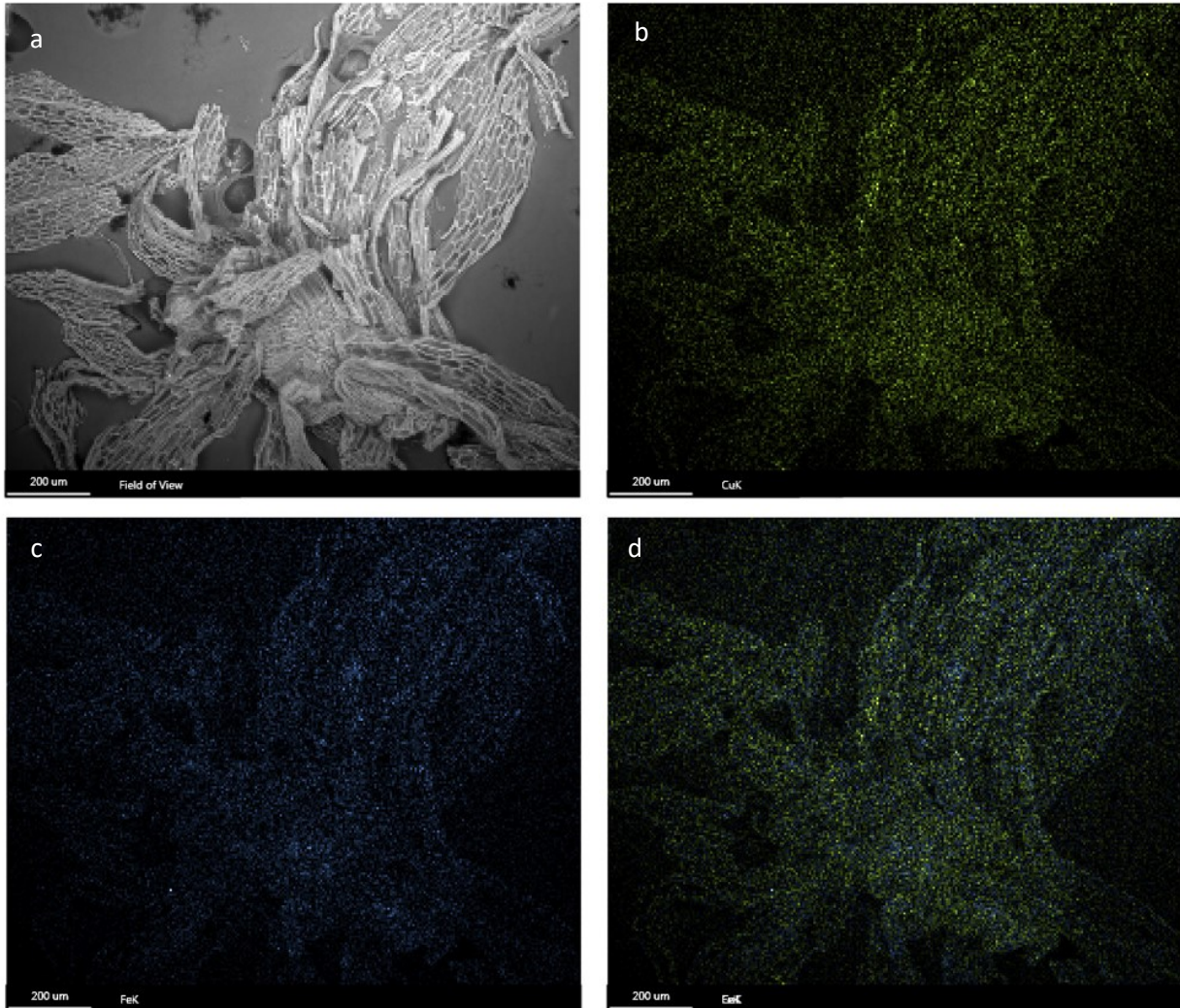


Abb. 63. EDX von *Physcomitrium patens*: Habitus und $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ - Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) CuCl_2 , (c) FeCl_2 , (d) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$

Die Kombination $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ nach 20 Stunden Einwirkzeit zeigt eine flächige Anlagerung der beiden Metalle Kupfer und Eisen. Auch in dieser Probe ist Kupfer etwas dominanter als Eisen. Die Signale sind bei beiden Metallen an ähnlichen Stellen in der Probe stärker, was bedeutet, dass an diesen Punkten viele Röntgenstrahlen detektiert wurden. Die Verteilung ist auch recht ähnlich, nur bei Kupfer etwas umfangreicher.

MnCl₂ + FeCl₂ + Sb-Acetat

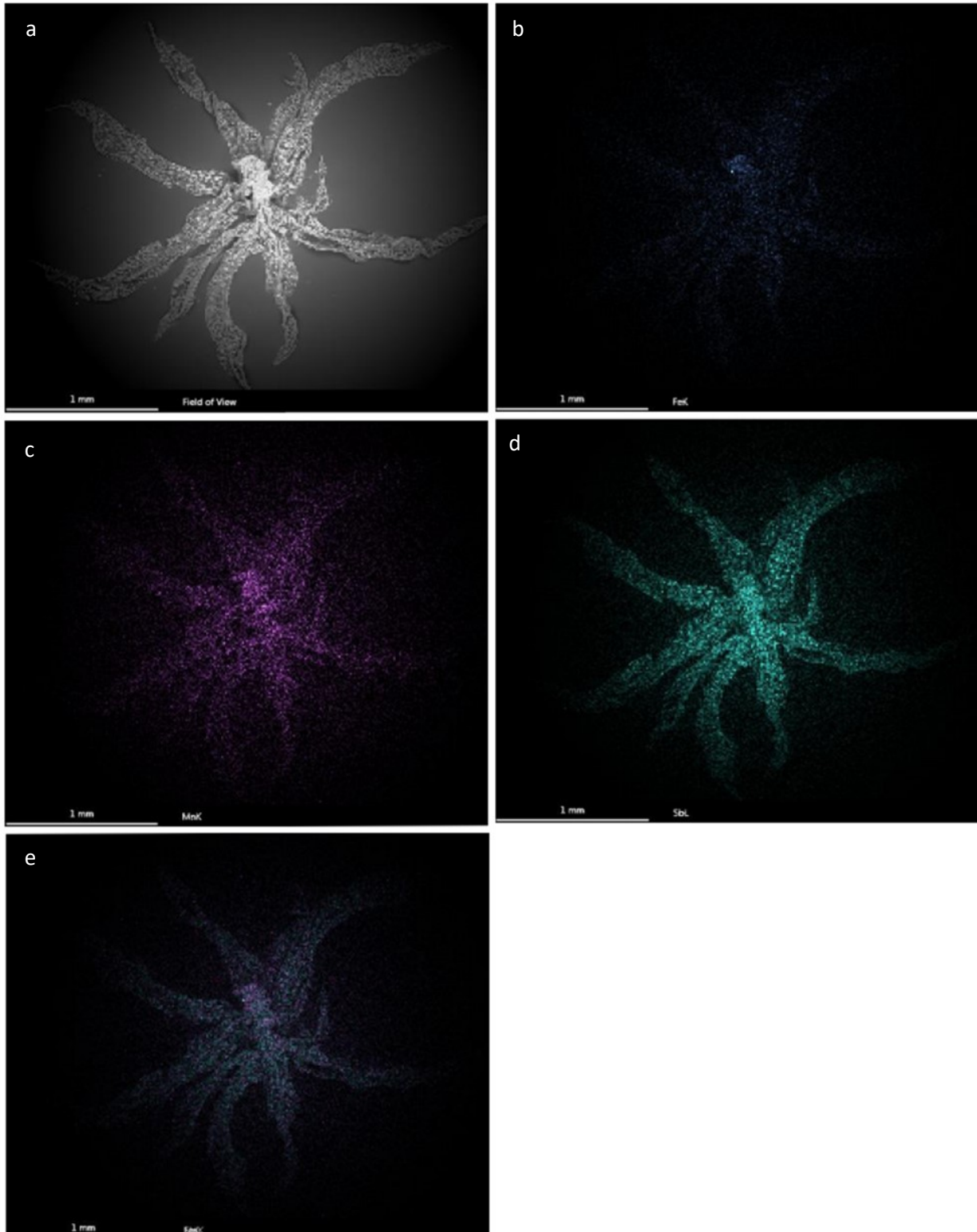


Abb. 64. EDX von *Physcomitrium patens*: Habitus und MnCl₂ + FeCl₂ + Sb-Acetat - Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) FeCl₂, (c) MnCl₂, (d) Sb-Acetat, (e) MnCl₂ + FeCl₂ + Sb-Acetat

In dieser Kombination ist *MnCl₂* das dominierende Schwermetall. Die Verteilung ist wieder ziemlich gleichmäßig, sowohl in den Blättchen als auch im Stämmchen. Wobei die Signale im Stämmchen etwas stärker sind als im Rest der Probe. *FeCl₂* hingegen hat ein verstärktes Signal am unteren Ende des Stämmchens. In den Blättchen sind die Signale deutlich schwächer.

$\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

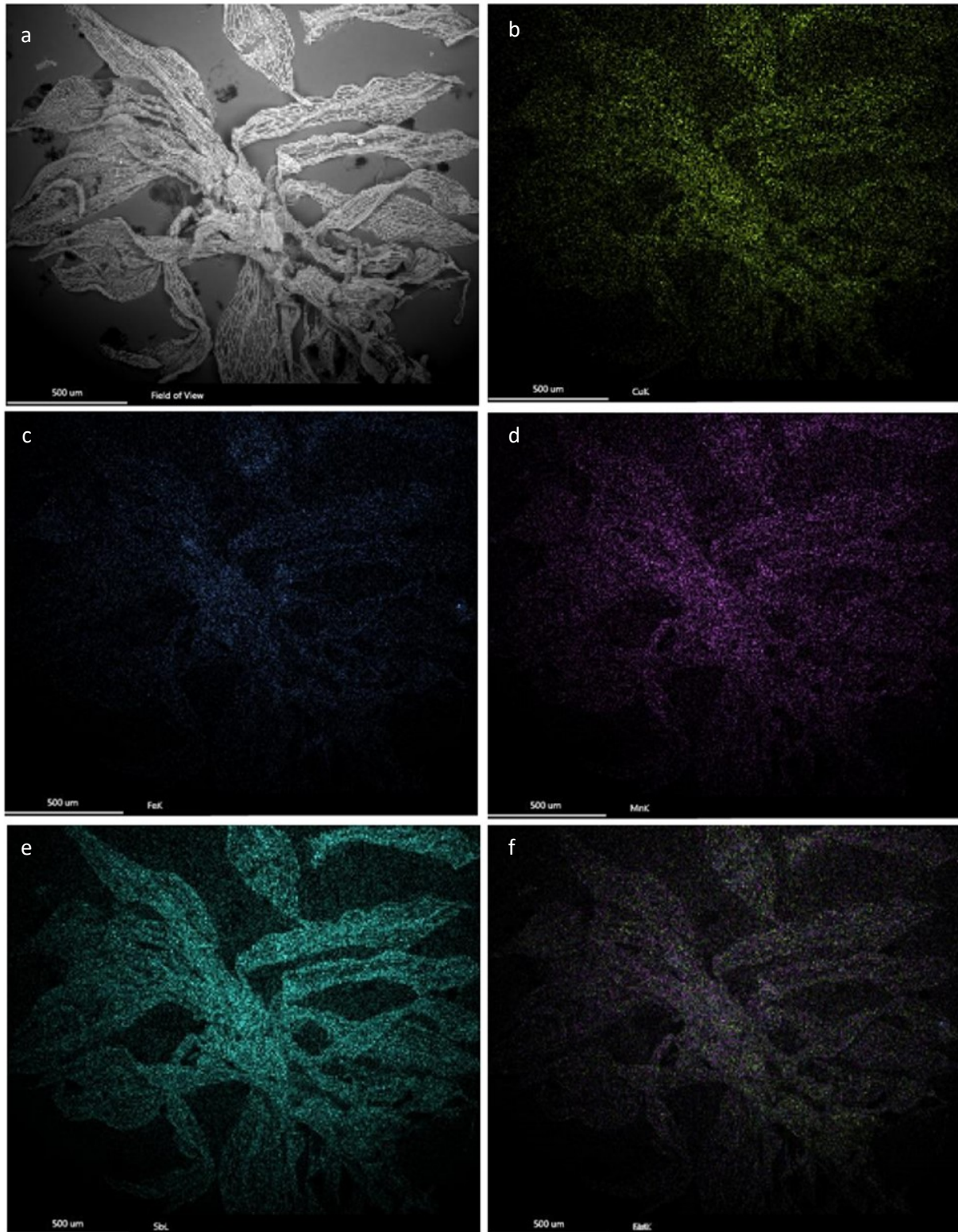


Abb. 65. EDX von *Physcomitrium patens*: Habitus und $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ - Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) CuCl_2 , (c) FeCl_2 , (d) MnCl_2 , (e) Sb-acetat, (f) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

Die Kombination aus allen vier Schwermetallen wurde nach 2 und nach 20 Stunden getestet. In der Probe, die den Metallen 20 Stunden ausgesetzt war, hat CuCl_2 die stärksten Signale. Zentral, wo viele Blättchen zusammenkommen und sich das Stämmchen befindet, sind die

Signale am stärksten. Auch in den Blättern wurde CuCl_2 detektiert, aber etwas geringer und nicht bis in die Blattspitzen. MnCl_2 zeigt eine ähnliche Verteilung. Auch hier sind die Signale in der Mitte stärker als in den Blättchen rundherum. Verglichen mit CuCl_2 ist das Signal von MnCl_2 in den Blättchen allerdings höher. FeCl_2 hingegen hat die schwächsten Signale. Auch hier ist die Aufnahme in Stämmchen-Nähe am stärksten, aber verglichen mit CuCl_2 und MnCl_2 deutlich geringer. Das Gleiche gilt auch für die Blättchen.

Die Aufnahme der Schwermetalle nach 2 Stunden Einwirkzeit war wesentlich geringer. Es zeigte sich, dass weder CuCl_2 noch MnCl_2 verstärkt adsorbiert wurden. Auch FeCl_2 zeigte keine eindeutigen Signale.

Pohlia drummondii

Pohlia drummondii wurde auf die Metalle CuCl_2 , FeCl_2 , Sb-Acetat und Metallkombinationen $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$, $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ und $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ getestet. Diese Metalllösungen wurden zufällig ausgewählt und die Ergebnisse werden im Folgenden näher beschrieben.

Einzelmetalle

CuCl_2

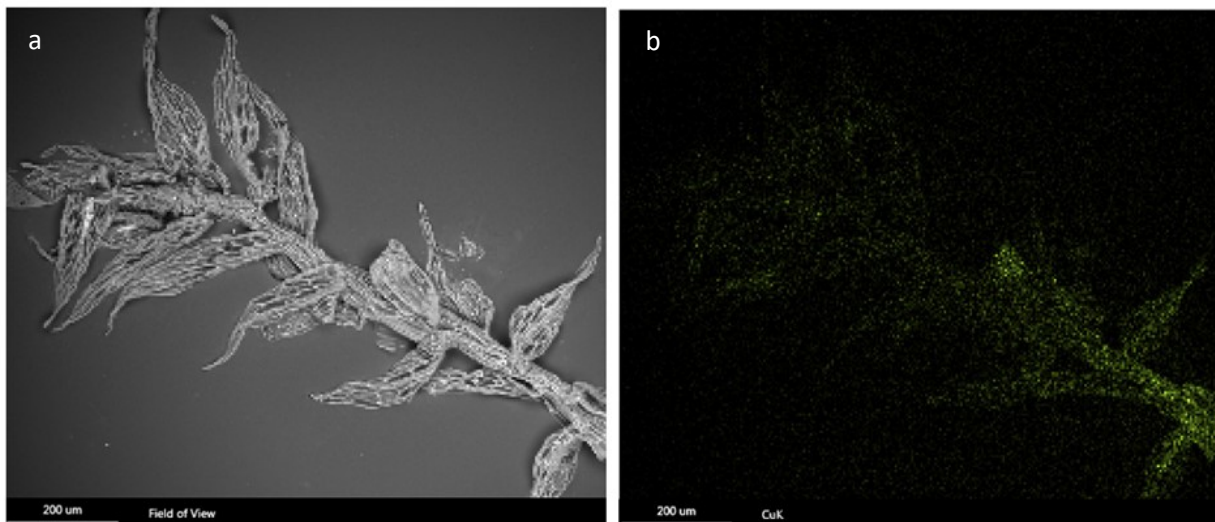


Abb. 66. EDX von *Pohlia drummondii*: Habitus und CuCl_2 - Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) CuCl_2

In dieser Probe, die für 20 Stunden in einer CuCl_2 -Lösung mit einer Konzentration von $100\mu\text{M}$ eingelegt war, zeigt sich, dass vor allem am unteren Teil des Mooses die größte Anlagerung stattgefunden hat. Im Stämmchen sind die stärksten Signale lokalisiert, aber anders als bei *Physcomitrium patens* nicht über das gesamte Stämmchen verteilt, sondern nur am unteren Ende. Die Anlagerung in die Blättchen beschränkt sich ebenfalls eher auf die untere Hälfte, während die Spitze sehr schwache Signale zeigt.

FeCl₂

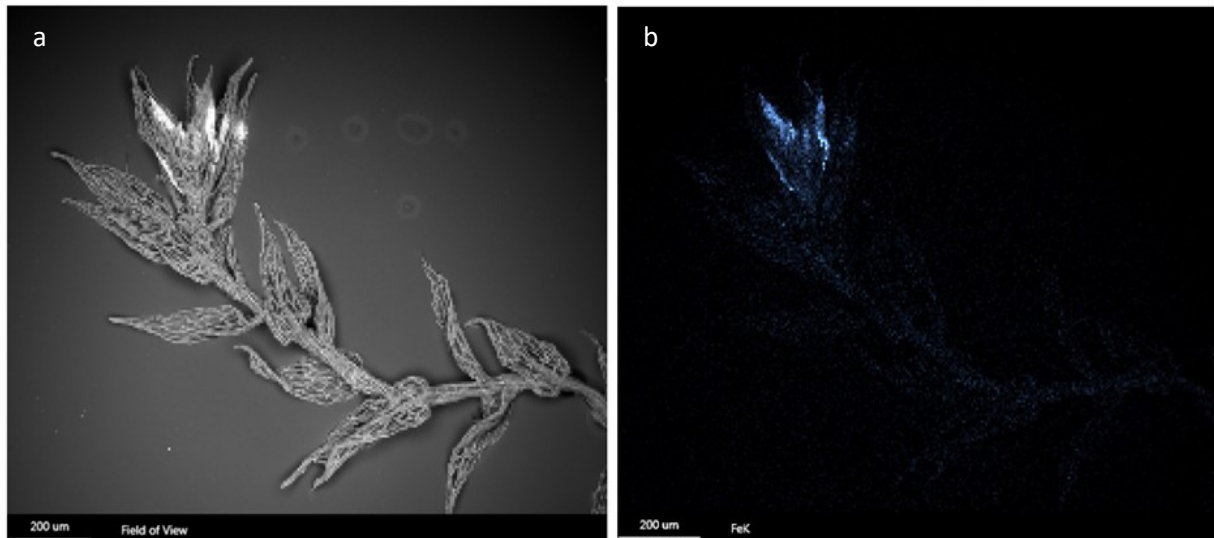


Abb. 67. EDX von *Pohlia drummondii*: Habitus und FeCl₂ - Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) FeCl₂

Die Aufnahme von FeCl₂ ist im Vergleich zu CuCl₂ noch geringer. Bei einer Konzentration von 100 µM sind die detektierten Signale sehr schwach. Die Blättchen an der Spitze des Mooses sind dabei die Ausnahme. An dieser Stelle sind die Signale besonders stark.

Sb- Acetat

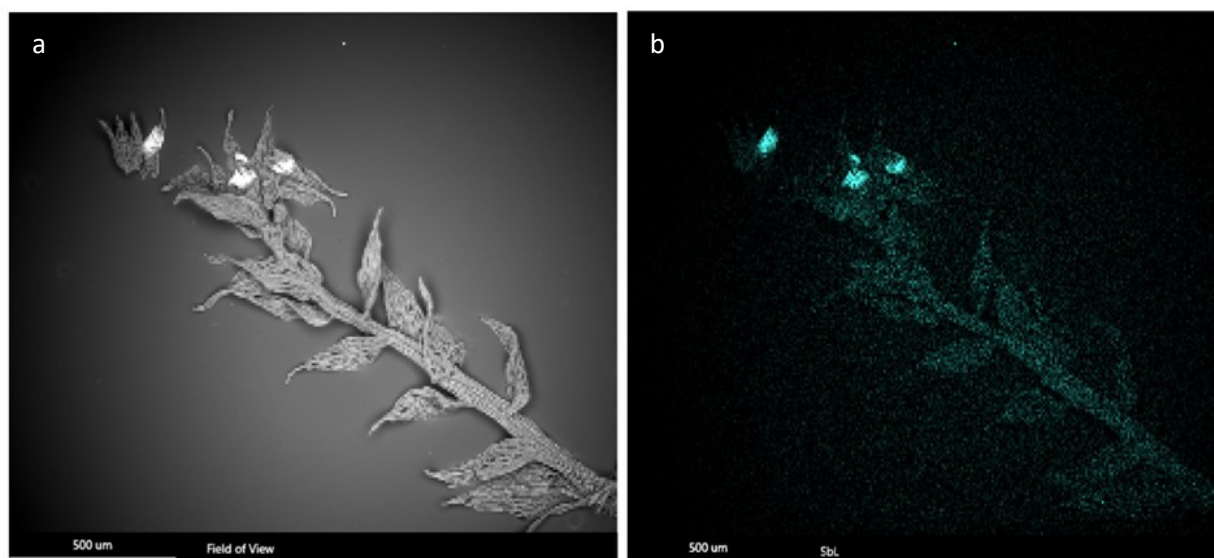


Abb. 68. EDX von *Pohlia drummondii*: Habitus und Sb-Acetat - Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) Sb-Acetat (bzw. Kalium)

Wie es auch bei *Physcomitrium patens* der Fall war, sind auch bei *Pohlia drummondii* die Ergebnisse von Sb-Acetat nicht auswertbar. Das Schwermetall wird nämlich an der gleichen Stelle detektiert wie Kalium und deshalb ist eine Interpretation der Ergebnisse nicht möglich.

Kombinationen

Kombinationen aus zwei Metallen

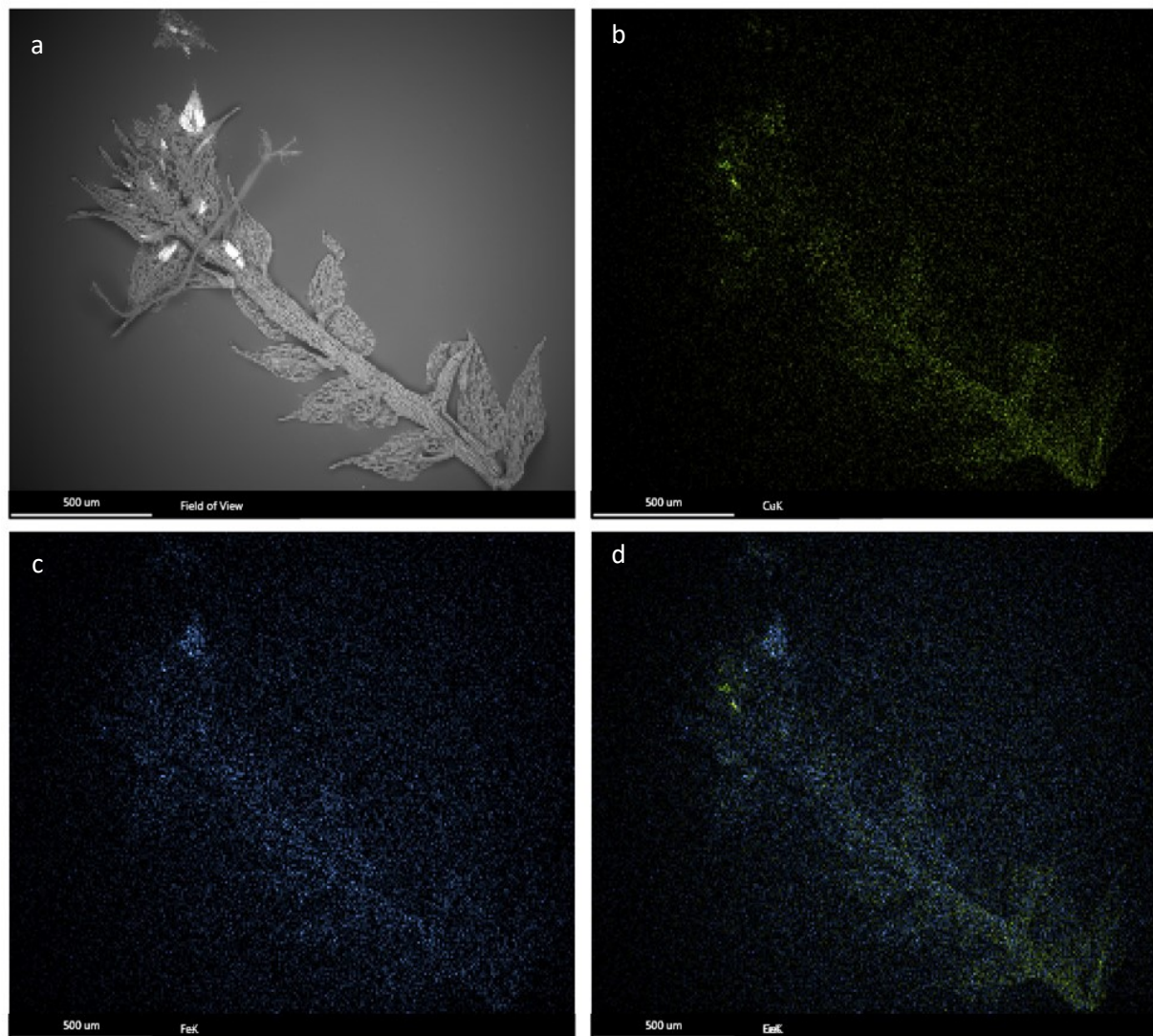
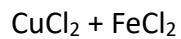


Abb. 69. EDX von *Pohlia drummondii*: Habitus und $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$ - Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) CuCl_2 , (c) FeCl_2 , (d) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$

Kombiniert man CuCl_2 und FeCl_2 in gleicher Konzentration, dann sieht man bezüglich der Anlagerung deutliche Unterschiede. FeCl_2 zeigt vereinzelt stärkere Signale, aber man erkennt nicht ganz genau an welchen Stellen im Moos die Verteilung stattgefunden hat. Man erkennt, dass vermehrt eine Detektion entlang des Stämmchens stattfindet und vereinzelt auch in den Blättchen, aber insgesamt liegen sehr viele Signale außerhalb der Probe. Bei CuCl_2 hingegen erkennt man eindeutig viele Signale entlang des gesamten Stämmchens und in der unteren Probenhälfte auch Signale in den Blättchen. Erst im oberen Teil der Probe nehmen die Signale etwas ab. Überlagert man die Bilder a, b und c von Abbildung 69 erhält man das Bild 69d, in dem man genauer erkennen kann, in welcher Verteilung CuCl_2 beziehungsweise FeCl_2 in der Probe vorliegt.

Kombinationen aus drei Metallen

$\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

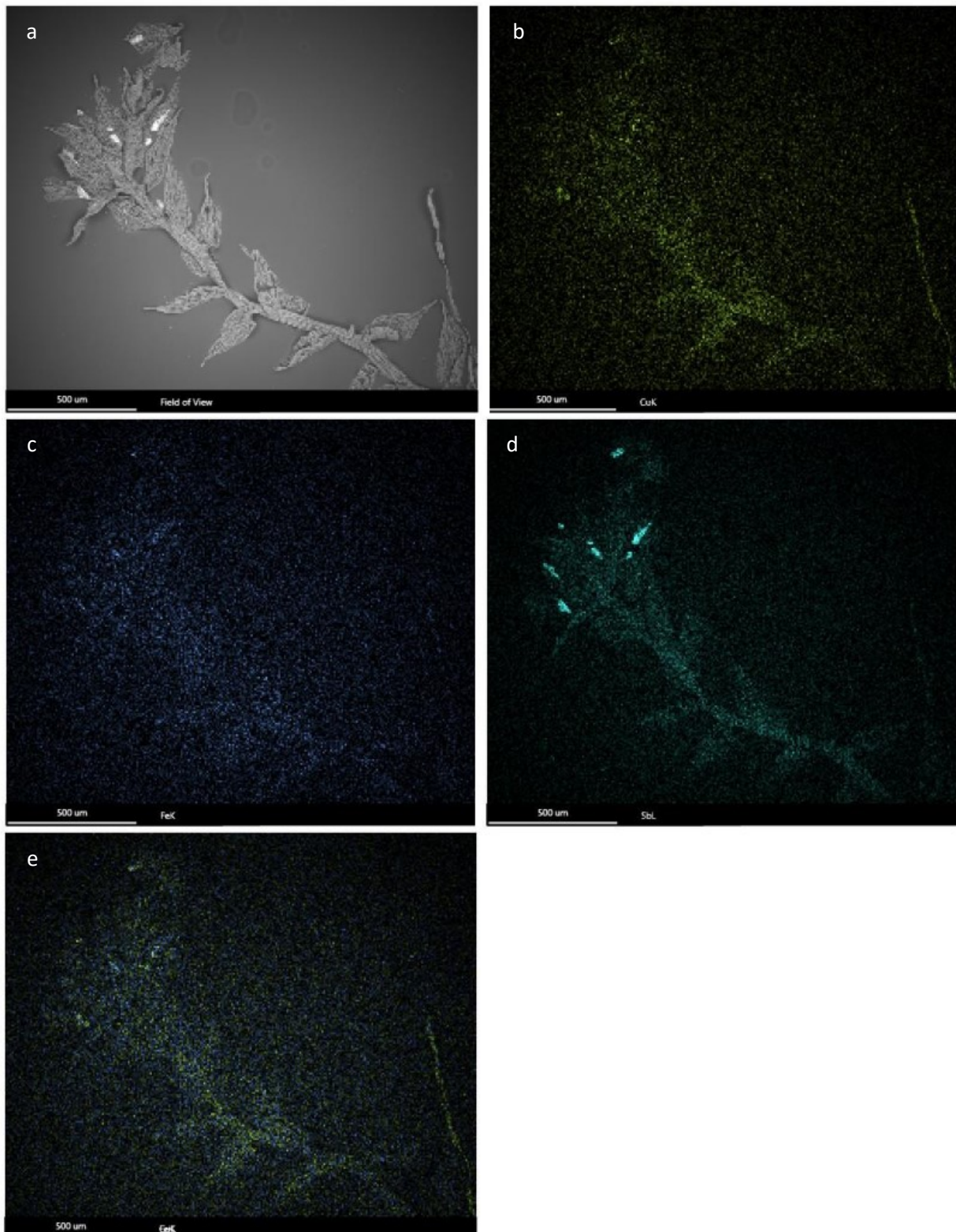


Abb. 70. EDX von *Pohlia drummondii*: Habitus und $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ - Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) CuCl_2 , (c) FeCl_2 , (d) Sb-Acetat , (e) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

In dieser Kombination mit *Sb-Acetat* scheint es, dass FeCl_2 noch weniger angelagert wird als in der Kombination $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$. Die stärksten Signale findet man im unteren Bereich des Stämmchens und den dort ansetzenden Blättchen. Verglichen mit CuCl_2 sind die Signale von

$FeCl_2$ sehr schwach. $CuCl_2$ zeigt sich an den gleichen Stellen wie $FeCl_2$, aber mit viel stärkeren und deutlicheren Signalen.

$CuCl_2$ + $FeCl_2$ + $MnCl_2$ + Sb-Acetat

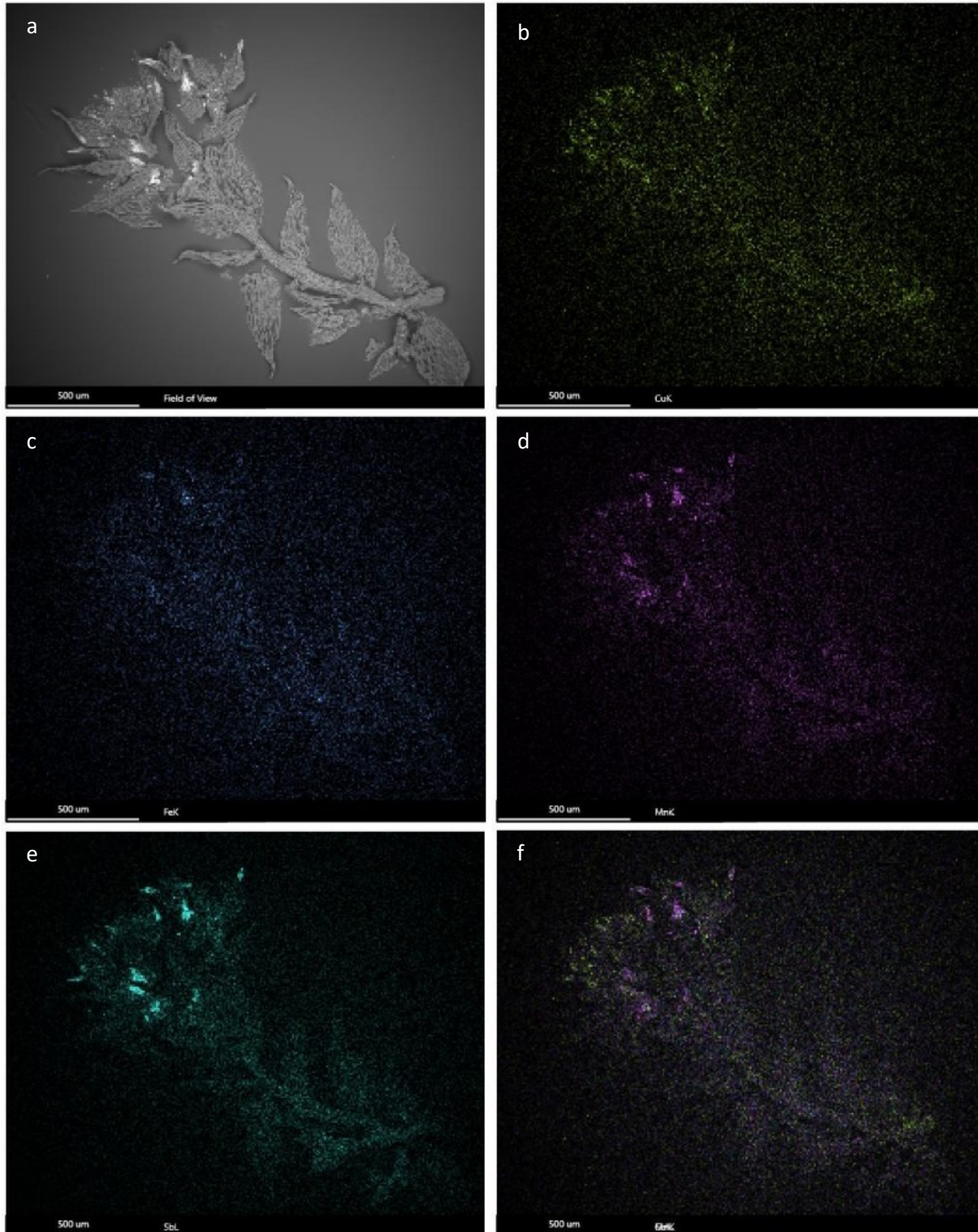


Abb. 71. EDX von *Pohlia drummondii*: Habitus und $CuCl_2$ + $FeCl_2$ + $MnCl_2$ + Sb-Acetat - Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) $CuCl_2$, (c) $FeCl_2$, (d) $MnCl_2$, (e) Sb-Acetat, (f) $CuCl_2$ + $FeCl_2$ + $MnCl_2$ + Sb-Acetat

In dieser Kombination dominiert das Schwermetall $MnCl_2$. Man kann gut erkennen, dass die Aufnahme entlang des Stämmchens und auch in den Blättchen stattgefunden hat. Bei $CuCl_2$ hingegen sind die Signale bei dieser Kombination nicht so eindeutig und stark wie in den Kombinationen vorher. Man erkennt zwar auch hier, dass die Metalle entlang des Stämmchens detektiert wurden, allerdings ist die Anlagerung in die Blättchen schwierig zu sehen. $FeCl_2$ zeigt nur stellenweise und vereinzelt ein paar stärkere Signale, aber verglichen mit $CuCl_2$ und $MnCl_2$ sind die Signale deutlich ungenauer und nicht klar erkennbar. Überlagert man in Abbildung 71 die Bilder b, c und d, dann ergibt sich das Bild 71f. Und auch hier wird deutlich, dass $CuCl_2$ und $MnCl_2$ dominieren, während $FeCl_2$ kaum zu erkennen ist.

Hypnum cupressiforme

An *Hypnum cupressiforme* wurden dieselben sechs Metalllösungen, nämlich $CuCl_2$, $FeCl_2$, Sb -Acetat, $CuCl_2+FeCl_2$, $CuCl_2+FeCl_2+Sb$ -Acetat und die Kombinationen $CuCl_2 + FeCl_2 + MnCl_2 + Sb$ -Acetat, getestet wie an *Pohlia drummondii*.

Einzelmetalle

$CuCl_2$

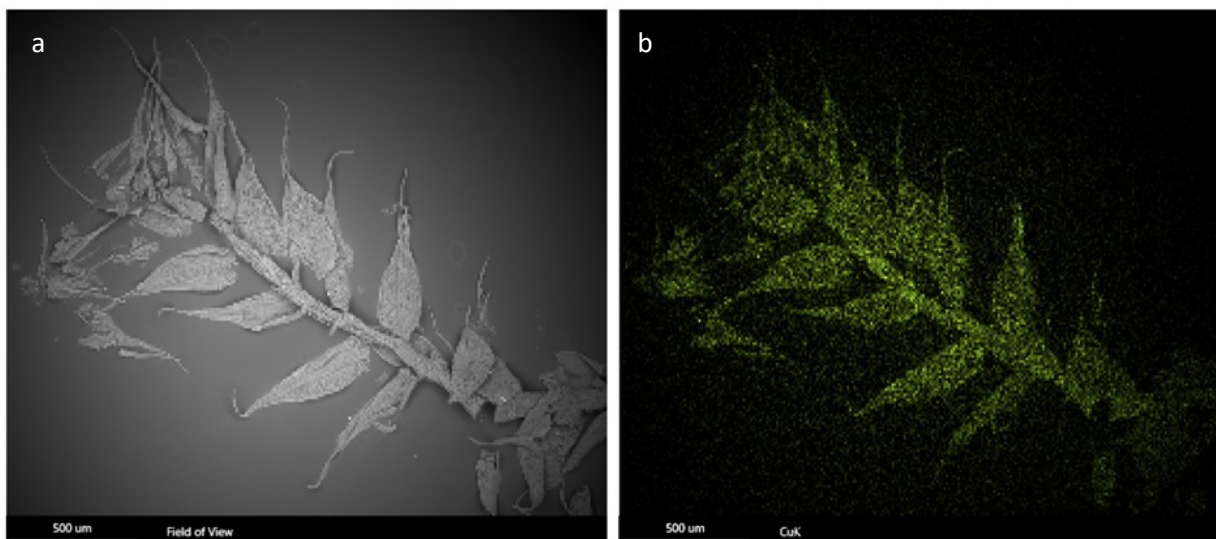


Abb. 72 EDX von *Hypnum cupressiforme*: Habitus und $CuCl_2$ – Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) $CuCl_2$

Innerhalb von 20 Stunden wurde $CuCl_2$ 100µM von *Hypnum cupressiforme* besonders gut aufgenommen. Wie man klar in Abbildung 72b erkennen kann, ist die Verteilung des Schwermetalls nahezu in der gesamten Probe gleichmäßig und die Signalstärke ist sowohl am Stämmchen als auch in den Blättern sehr hoch. Sogar in den Blattspitzen sind die Signale sehr gut erkennbar.

FeCl_2

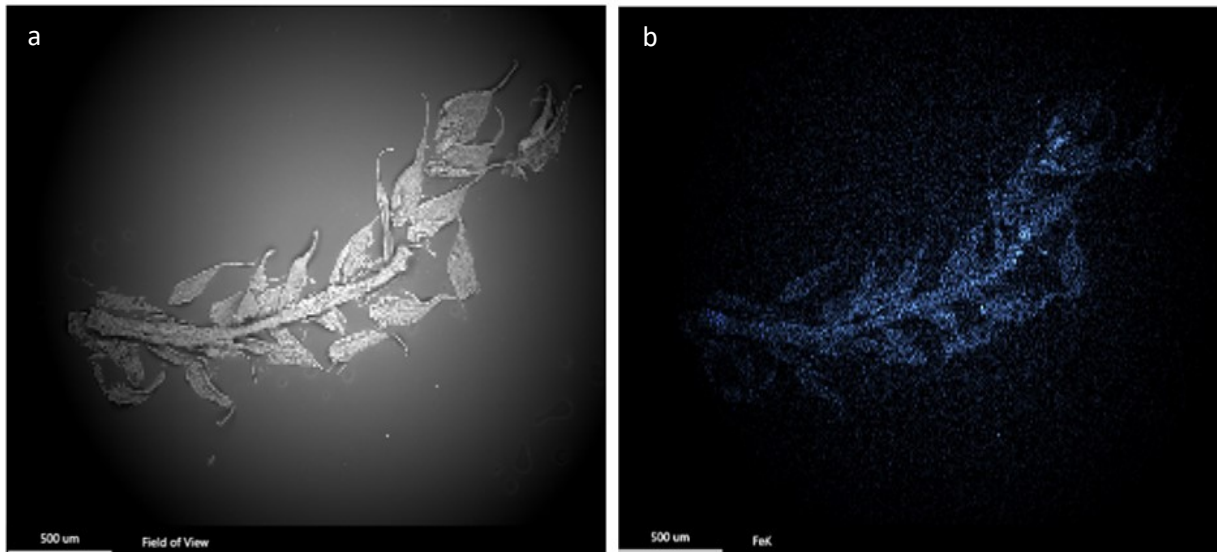


Abb. 73. EDX von *Hypnum cupressiforme*: Habitus und FeCl_2 –Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) FeCl_2

Auch bei FeCl_2 ist die Verteilung innerhalb des Moores sehr gut zu sehen. Die Signale entlang des Stämmchens sind etwas stärker als in den Blättchen. Besonders deutlich sind die Signale an den Bruchstücken, wie im oberen Teil der Probe am Stämmchen oder des Blättchens zu sehen ist.

Sb-Acetat

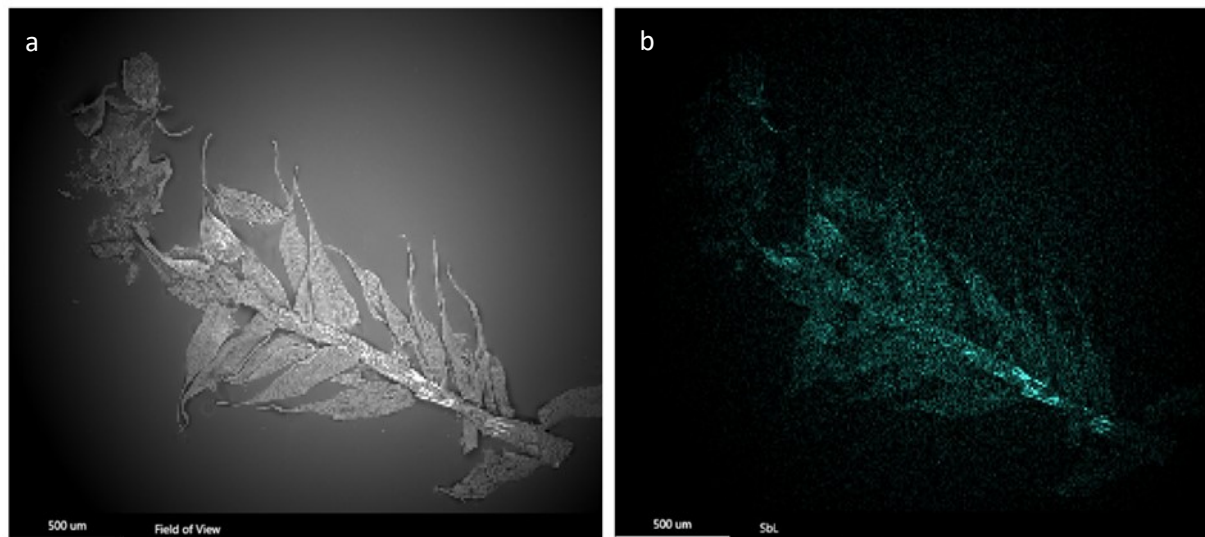


Abb. 74. EDX von *Hypnum cupressiforme*: Habitus und Sb-Acetat –Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) Sb-Acetat

Die Ergebnisse von Sb-Acetat konnten auch bei *Hypnum cupressiforme*, aus den oben schon erwähnten Gründen, nicht ausgewertet werden.

Kombinationen

Kombinationen aus zwei Metallen

$\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$

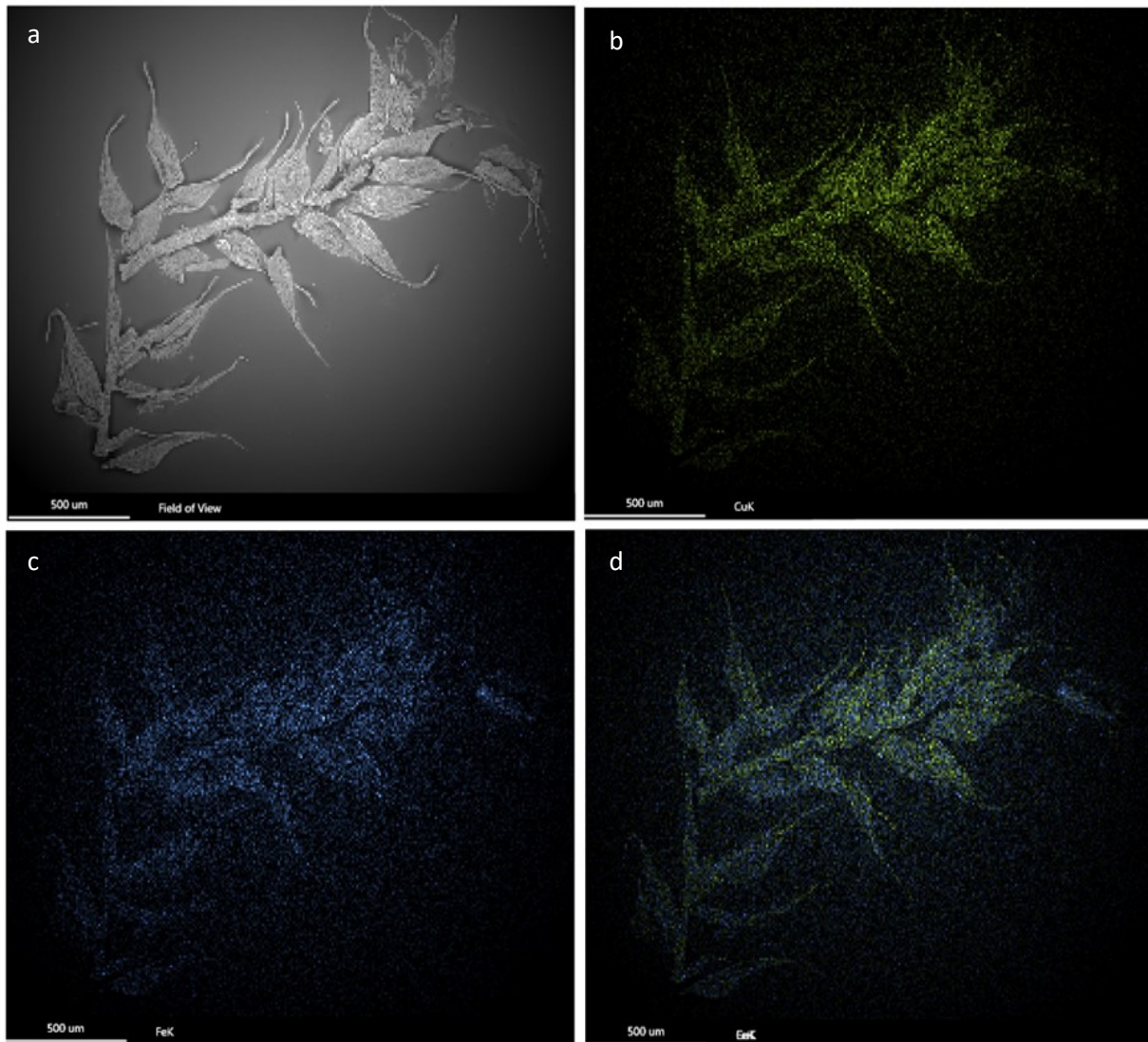


Abb. 75. EDX von *Hypnum cupressiforme*: Habitus und $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$ – Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) CuCl_2 , (c) FeCl_2 , (d) $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$

Werden CuCl_2 und FeCl_2 in gleicher Konzentration kombiniert, dann kann man an den Abbildungen 75b und c gut erkennen, dass beide Schwermetalle relativ leicht angelagert werden. Vergleicht man diese beiden Ergebnisse, dann sind die Signale von CuCl_2 stärker und definierter. Man erkennt, dass die Detektion im Stämmchen, in den Blättchen und den Blattspitzen sehr deutlich ist. FeCl_2 zeigt zwar auch viele starke Signale im oberen Teil des Stämmchens und der Blättchen, allerdings sind diese nicht so genau definiert wie bei CuCl_2 .

Kombinationen aus drei Metallen

CuCl_2 + FeCl_2 + Sb-Acetat

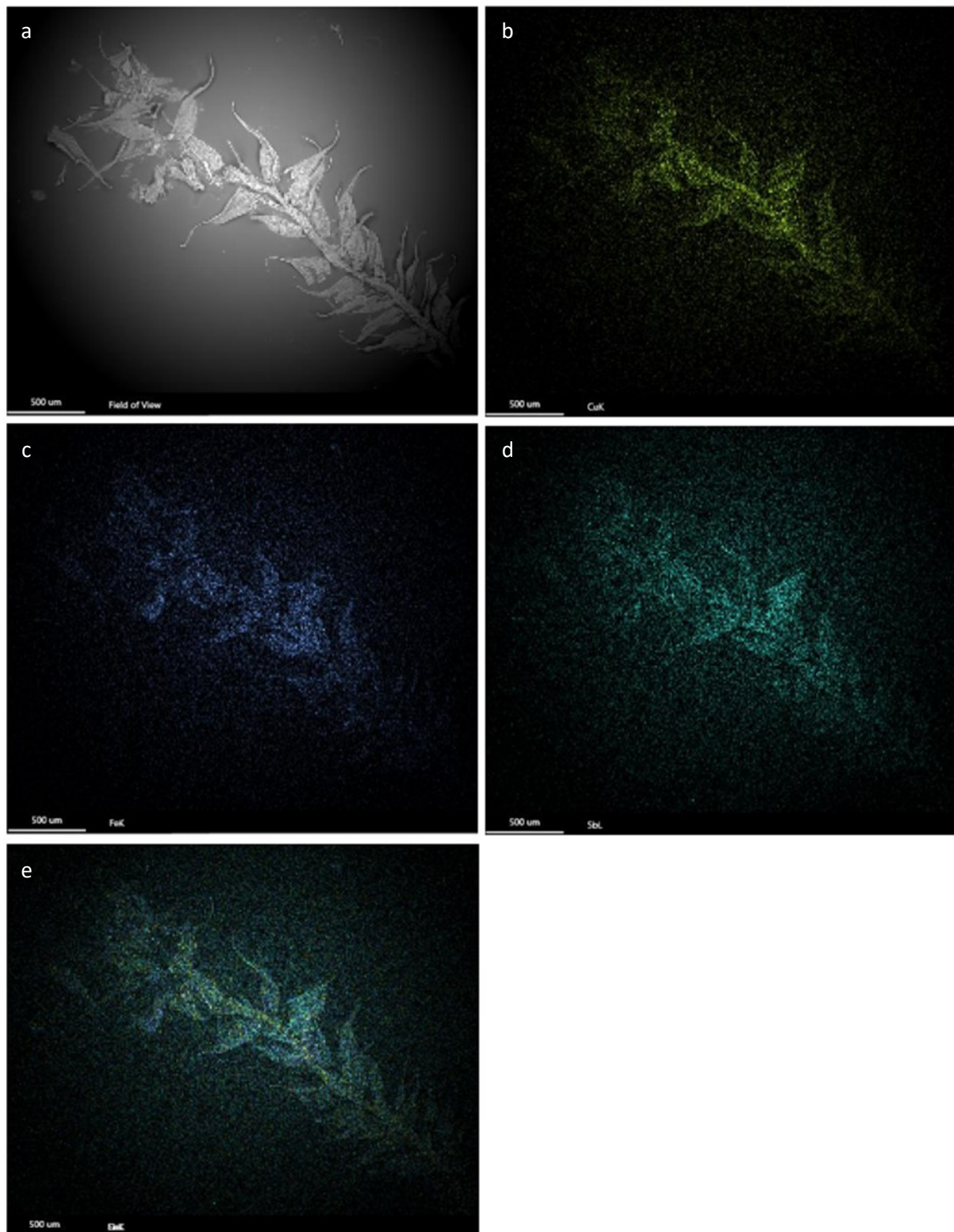


Abb. 76. EDX von *Hypnum cupressiforme*: Habitus und CuCl_2 + FeCl_2 + Sb-Acetat – Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) CuCl_2 , (c) FeCl_2 , (d) Sb-Acetat, (e) CuCl_2 + FeCl_2 + Sb-Acetat

CuCl_2 und FeCl_2 zeigen in dieser Kombination in etwa an den gleichen Stellen starke Signale. Beide Metalle werden aufgenommen, aber verglichen mit den Proben vorher (Abb. 75), sind die Signale vor allem bei CuCl_2 schwächer. CuCl_2 hat entlang des Stämmchens und in den

Blättchen, die von dem Stämmchen ausgehen die stärksten Signale. Im oberen Bereich der Probe nehmen die Signale ab und auch die Blattspitzen zeigen kaum starke Signale. Bei $FeCl_2$ ist es ähnlich. Die meisten Signale sind in den Blättchen lokalisiert und weniger im Stämmchen.

$\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

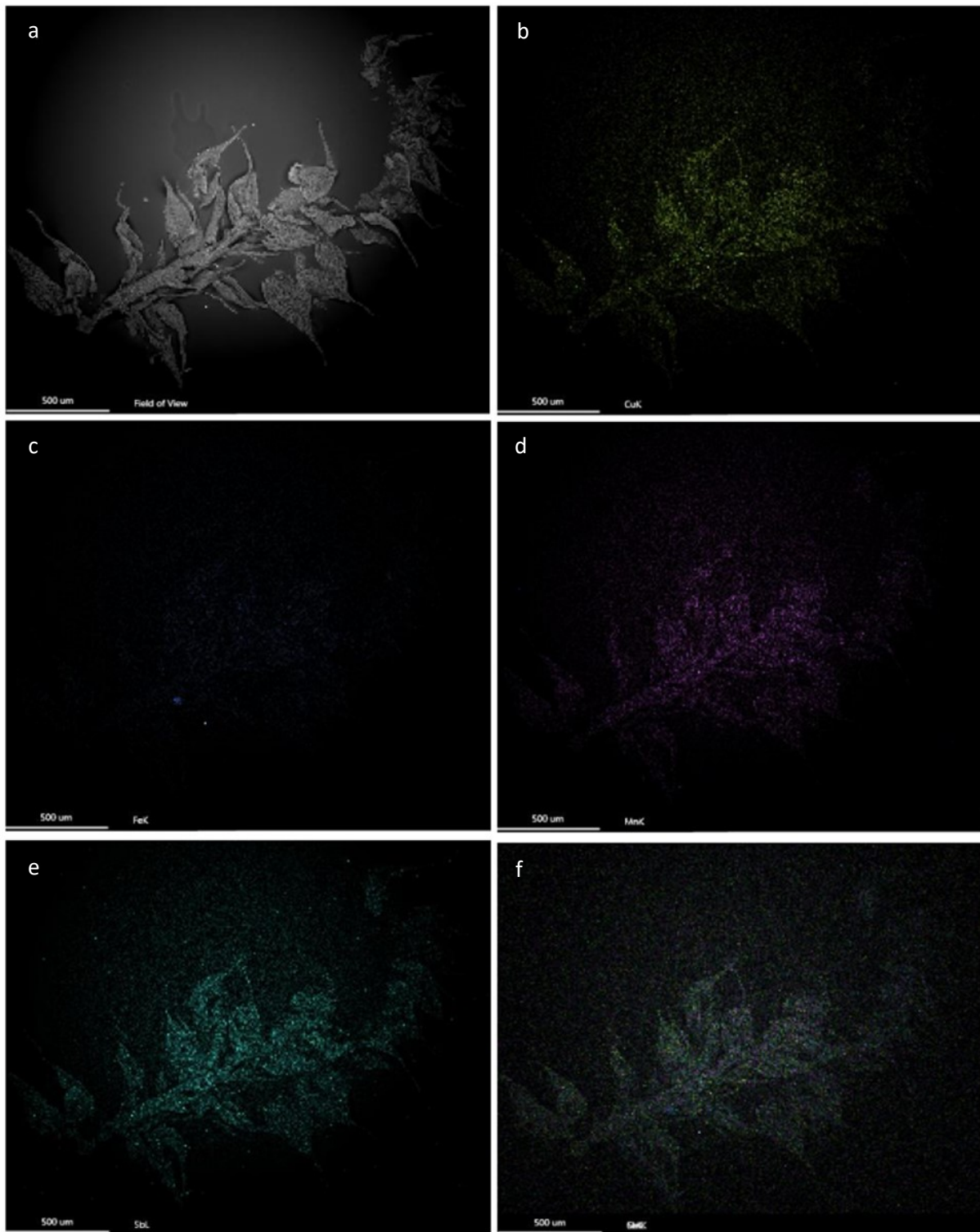


Abb. 77. EDX von *Hypnum cupressiforme*: Habitus und $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ – Verteilung nach 20 Stunden: (a) Habitus, (b) CuCl_2 , (c) FeCl_2 , (d) MnCl_2 , (e) Sb-Acetat, (f) $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$

In der Kombination $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ ist die Anlagerung von CuCl_2 , FeCl_2 und MnCl_2 schlechter, als wenn sie als einzelne Metalle angeboten werden. FeCl_2 ist praktisch nicht detektierbar, was auf sehr geringe Anlagerung hindeutet. CuCl_2 und MnCl_2 wurden hingegen etwas besser aufgenommen. Die Signale sind von beiden Schwermetallen CuCl_2 und MnCl_2 gut

zu erkennen. Vor allem entlang des Stämmchens und im oberen Teil der Probe sind die Signale sehr deutlich.

5. Diskussion

5.1. Mikroskopie-Toleranztests

Die Überlebensfähigkeit der drei Moosarten *Pohlia drummondii*, *Physcomitrium patens* und *Hypnum cupressiforme* unter Schwermetalleinfluss wurde mit Hilfe der Toleranztests und Plasmolyseuntersuchungen getestet. Alle drei Moosarten reagierten auf die applizierten Schwermetalle, egal ob alleine oder als Kombination, anders. Was allerdings in allen drei Fällen beobachtet werden konnte, war, dass Veränderungen innerhalb der Zellen aufgetreten sind. Einerseits ist in manchen Fällen keine Plasmolyse aufgetreten oder war nur auf bestimmte Teile der Probe begrenzt. Andererseits kam es zu Veränderungen der Chloroplasten, sowohl in ihrer Form als auch in ihrer Farbe. Beispielsweise zeigte sich, dass die Kombinationen $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2$, $\text{CuCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$, $\text{CuCl}_2 + \text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ in einer Konzentration von 1mM für *Physcomitrium patens* am schädlichsten waren. Die Zellen waren nicht mehr plasmolysefähig und die Chloroplasten verloren ihre grüne Farbe nahezu vollständig.

5.1.1. Reaktive Sauerstoffspezies

Stehen Pflanzen unter Stress werden toxische, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in den Zellen produziert. Durch Reduktion von Wasser (H_2O) können aus Sauerstoff ROS wie beispielsweise H_2O_2 (Wasserstoffperoxid), O_2^- (Superoxid-Radikale) oder OH^- (Hydroxylradikal) gebildet werden, die diverse Schäden in den Pflanzenzellen hervorrufen können (Choudhury und Panda 2005). H_2O_2 gemeinsam mit O_2^- kann beispielsweise unter Anwesenheit von Schwermetallen wie Eisen OH^- bilden, das zu den schädlichsten ROS zählt. O_2^- kann weiters durch Protonierung zu einem Hydroperoxyradikal werden, das ebenfalls sehr toxisch ist, da es Fettsäuren in toxische Lipidperoxide umwandeln kann und somit zur Schädigung von Biomembranen führt. Schwermetalle erhöhen dabei die Produktion dieser ROS in den Zellen (Choudhury und Panda 2005). Vor allem Kombinationen mit Kupfer haben den Moosarten geschadet, allen voran *Physcomitrium patens*. Die Veränderungen in der Plasmolysefähigkeit und Veränderung der Chloroplasten könnte somit durch die Auswirkungen der ROS erklärt werden. Wu et al. (2009) haben an dem Moos *Plagiomnium cuspidatum*, das wie *Physcomitrium patens* eine Laubmoos-Art ist, untersucht wo sich ROS wie H_2O_2 und O_2^- nach CuCl_2 Einfluss befinden. Sie haben herausgefunden, dass das Kupfer induzierte H_2O_2 in der Plasmamembran und Zellwand lokalisiert war und O_2^- sich hauptsächlich auf der inneren Seite der Plasmamembran und im Zytoplasma um die Chloroplasten befunden hat. Durch die Reaktionen der ROS mit Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren kommt es in weiterer Folge zu Schäden an den Membranen oder auch zu Inaktivierung von Enzymen (Wu et al. 2009). Durch geschädigte Membranen, die möglicherweise ihre Permeabilität verändern, können mehr Metalle aufgenommen werden und im inneren der Zelle an neue Kationenaustauscherstellen binden, die vorher an diesen Stellen nicht lokalisiert waren (Ares et al. 2018). Durch diese möglichen Veränderungen könnte somit die teilweise eingeschränkte Plasmolysefähigkeit der Moose aber auch die Veränderungen der Chloroplasten erklärt werden. Da auch im Zytosol befindliche reaktive Sauerstoffspezies Veränderung an den Membranen der Chloroplasten hervorrufen können, kann es zu Form -und Funktionsänderungen kommen, wie in der Studie von Esposito et al. (2012) beschrieben. In deren Versuchen wurden Schwermetalle wie Cadmium, Kupfer und Nickel an dem aquatischen Moos *Leptodictyum riparium* getestet. Die

Autoren fanden unter Cadmiumstress deutliche Veränderungen an den Chloroplasten, die unförmig waren und deren innere Organisation der Membranen beeinträchtigt war. Unter Kupfereinfluss kam es außerdem zu Verformungen der Chloroplasten (Esposito et al. 2012). In dieser vorliegenden Arbeit wurden in den mikroskopischen Untersuchungen sehr oft Chloroplasten beobachtet, die ihre grüne Farbe entweder ganz oder teilweise verloren haben. Die Senkung des Gehalts der photosynthetischen Pigmente Chlorophyll a und b sowie von Carotinoiden unter dem Einfluss von Schwermetallen wurde bereits in mehreren Studien berichtet (Shakya et al. 2008). Eine der häufigsten Veränderungen war die Verringerung des Chlorophyll a - Gehalts, da es durch den Metalleinfluss zum Chlorophyll b umgewandelt wird: Durch die Schwermetalle erfolgt eine Oxidation der Methylgruppe am Ring II von Chlorophyll a zu einem Aldehyd, wodurch Chlorophyll b entsteht (Shakya et al. 2008). Vor allem Kupfer scheint bei höherer Konzentration und Akkumulation für eine Vielzahl an Schäden verantwortlich zu sein. Durch eine hohe Kupferakkumulation, so wurde beschrieben, kann Kupfer als Cofaktor enzymatische Aktivitäten verändern (Shakya et al. 2008), die Funktion von Membranen durch Phospholipidabbau schädigen (Quartacci 2001) oder auch die Elektronentransportkette der Photosynthese blockieren und somit den Chlorophyllgehalt senken. (Shakya et al. 2008; Quartacci 2001). In dieser Arbeit zeigten sich bei den verwendeten Moosarten vor allem Farbveränderungen, wenn Kupfer alleine aber auch in Kombination mit anderen Metallen angeboten wurde. In einer Studie von Shakaya et al. (2008) wurden an zwei Moosarten drei verschiedene Metalle ebenfalls alleine und in Kombination getestet. Kupfer war ebenfalls dabei. In deren Ergebnissen zeigte sich mit steigender Kupferakkumulation eine starke Senkung von Chlorophyll a und b in beiden Moosen und in kombinierter Lösung mit Zink und Blei kam es zu einer noch viel schnelleren Umwandlung von Chlorophyll a zu b, vor allem bei steigender Konzentration (Shakya et al. 2008). Auch in einer anderen Studie von Sun et al. (2009), in der Blei und Nickel alleine und kombiniert getestet wurden, kam es bei hohen Konzentrationen zu einer Reduktion des Chlorophylls (Sun et al. 2009). Außerdem führte eine Kombination der beiden Metalle zu Erhöhung der ROS wie H_2O_2 und Beeinflussung des antioxidativen Abwehrsystems (Sun et al. 2009). Diese Ergebnisse sind mit jenen aus der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Die Kombinationen $CuCl_2 + Sb\text{-Acetat}$, $CuCl_2 + FeCl_2$ und $CuCl_2 + MnCl_2$ führten bei *Pohlia drummondii* und *Physcomitrium patens* zum Verlust der grünen Farbe der Chloroplasten, welches sich vor allem durch die Einwirkung von Kupfer erklären lässt. Bei *Physcomitrium patens* waren diese Effekte viel stärker ausgeprägt als bei *Pohlia drummondii*. Dies lässt sich einerseits dadurch erklären, dass *Pohlia drummondii* zu den metalltoleranten Moosen gehört, während *Physcomitrium patens* natürlicherweise an nicht-metallischen Standorten zu finden ist (Adlassnig et al. 2016; Sassmann et al. 2015b). Auch die Unterschiede in den Zellwänden könnten die unterschiedliche Aufnahme der Ionen erklären sowie die kumulative Effekte wenn mehrere Metalle gleichzeitig vorhanden sind (Shakya et al. 2008).

5.1.2. Eigenschaften der Zellen

In diesen Versuchen war deutlich ersichtlich, dass es zwischen den Moosarten Unterschiede in Bezug auf die Toleranz gegenüber den Schwermetallen gibt. Zwar ist dies auch von der Art des Metalls abhängig, aber vor allem das Moos *Pohlia drummondii* zeigte eine bessere Toleranz als *Physcomitrium patens*, welches sensibler auf die Metalle einzeln und in Kombinationen reagiert hat. Somit ist erkennbar, dass die Metalltoleranzen unter den

Moosarten variieren können. Zu den metalltoleranten Moosen gehören beispielsweise *Pohlia drummondii* und *Hypnum cupressiforme*, während *Physcomitrium patens* als nicht-metalltolerante Moosart gilt (Antreich et al. 2016; Adlassnig et al. 2016). Was aber die Gründe für die verschiedenen Toleranzniveaus sind oder wie genau die Resistenz und Toleranz gegenüber Schadstoffen funktioniert, ist noch nicht vollständig geklärt (Petschinger et al. 2021b). Die Art der Aufnahme und die Mechanismen der Akkumulation der Schwermetalle kann verschieden sein, wobei die häufigste Form die Adsorption und dann Aufnahme über die Zelloberfläche ist (Stanković et al. 2018). Die aufgenommenen Stoffe, sei es Nährstoffe oder Schadstoffe, können dann entweder innerhalb der Oberflächenschicht eingeschlossen werden, löslich oder unlöslich innerhalb der Zelle vorliegen, oder in austauschbarer Form an Austauschstellen an der Zellwand gebunden sein (Stanković et al. 2018). Die extrazelluläre Anreicherung der Metalle erfolgt durch den Ionenaustauschprozess. Dabei kommt es neben dem Ionenaustausch auch zur Komplexbildung mit organischen funktionellen Gruppen, vor allem Carboxyl- und Phosphorylgruppen. Diese beiden sind wahrscheinlich die dominanten Gruppen, wenn es um die Metallbindung und Komplexbildung an der Oberfläche der Mooszellen geht (Stanković et al. 2018). Die Unterschiede in den Moosarten können somit die Reaktionen gegenüber Schadstoffen wie Schwermetallen stark beeinflussen. Eine mögliche Begründung für diese unterschiedlichen Reaktionen und Toleranzen könnte in der Zellform und Zellgröße liegen (Petschinger et al. 2021b). Petschinger et al. (2021) haben an verschiedenen Moosarten, darunter auch *Hypnum cupressiforme* und *Physcomitrium patens*, getestet, ob die Zellgröße und/oder Zellform die Toleranz gegenüber bestimmten Schwermetallen begünstigt. Die Zellform, die Zellgröße und auch die Zellwanddicke wurden dabei berücksichtigt. Die größten Unterschiede zwischen *Hypnum cupressiforme* und *Physcomitrium patens* lagen in der Zellwanddicke. Von den fünf getesteten Moosarten fand man bei *Physcomitrium patens* die dünnste Zellwand (0,26 µm) und bei *Hypnum cupressiforme* die dickste (0,9 µm). Die Metallaufnahme über die Kationenaustauscherstellen an der Zellwand der Moose führt dazu, dass die Metalle in den Apoplast abgelagert werden. Dort haben sie wenig Einfluss auf das lebende Cytoplasma. In Zellen mit dickeren Zellwänden ist der Anteil des Apoplasten in der Gesamtoberfläche des Blattes größer als bei Zellen mit dünnerer Zellwand. Aus diesem Grund sind Moosarten mit dickeren Zellwänden auch toleranter gegenüber Schwermetallen als Arten mit dünner Zellwand, wie es bei *Physcomitrium patens* der Fall ist (Petschinger et al. 2021b). Dieses Erkenntnis lässt sich teilweise auf die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit übertragen. *Physcomitrium patens* reagierte deutlich sensibler auf die Schwermetalle als *Pohlia drummondii*, was sich mit der dünneren Zellwanddicke erklären lässt. *Hypnum cupressiforme* hingegen hätte, nach den Ergebnissen von Petschinger et al. (2021), aufgrund der dicken Zellwände deutlich höhere Toleranz gegenüber den Schwermetallen zeigen müssen als *Physcomitrium patens*. Dies war in dieser Arbeit aber nicht der Fall. Da die Proben von *Hypnum cupressiforme* kontaminiert waren, ist es aber möglich, dass dies der Grund für die schlechtere Toleranz war. Es wäre somit notwendig, die Versuche mit *Hypnum cupressiforme* zu wiederholen, um herauszufinden, ob ein Unterschied in den Toleranzgrenzen vorliegt.

5.2. Wachstums - und EDX - Versuche

In den Wachstumsversuchen zeigten sich Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede zwischen den Moosarten *Pohlia drummondii* und *Physcomitrium patens*. Die Moose wuchsen über 4 Wochen auf Agarplatten, die Schwermetalle in einheitlichen Konzentrationen enthielten. Gemeinsamkeiten waren, dass bei beiden Arten eine Wachstumseinschränkung beobachtet werden konnte, wenn die Konzentration der einzelnen Schwermetalle bei 1mM lag und wenn CuCl_2 als Einzelmetall im Agar vorkam. Gutes Wachstum hingegen konnte vor allem unter Einfluss von MnCl_2 und FeCl_2 beobachtet werden.

Unterschiedliches Verhalten zeigten die Moose bei den Metallkombinationen. Das Wachstum von *Pohlia drummondii* unter dem Einfluss der Metallkombinationen war insgesamt besser als bei *Physcomitrium patens*. Kupferkombinationen vor allem $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2$ und $\text{CuCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ führten bei *Pohlia drummondii* zu schlechterem Wachstum. Aber auch die Kombination $\text{FeCl}_2 + \text{Sb-Acetat}$ bewirkte ein deutlich schlechteres Wachstum im Vergleich zu den Ergebnissen, wenn diese Metalle nicht kombiniert vorkamen. Überraschenderweise reagierte *Pohlia drummondii* auf die Kombinationen mit drei Schwermetallen mit einem guten Wachstum, auch in den Kombinationen mit Kupfer.

Wachstumseinschränkungen konnten bei *Physcomitrium patens* am stärksten bei den Kombinationen mit Kupfer festgestellt werden, sowohl bei den Kombinationen aus zwei als auch bei den Kombinationen aus drei Schwermetallen. MnCl_2 und FeCl_2 hatten zwar positive Effekte auf das Wachstum, doch kombiniert mit Kupfer war dieser positive Einfluss nicht mehr gegeben. Ähnlich wie in den Toleranzversuchen zeigt sich auch hier, dass das metalltolerante Moos *Pohlia drummondii* besser gegen Einflüsse der Schwermetalle gerüstet ist als *Physcomitrium patens*.

5.2.1. Metallverteilung im Moos

In den Toleranztests und auch bei den Wachstumsversuchen hat sich gezeigt, dass vor allem CuCl_2 , sowohl als einzelnes Schwermetall als auch in Kombination mit anderen Metallen einen großen Einfluss auf die Moosarten hat. *Pohlia drummondii* hat in den Versuchen bessere Ergebnisse erzielt als *Physcomitrium patens*, welches normalerweise nicht auf metallreichen Umgebungen vorkommt. (Antreich et al. 2016)

Die in dieser Arbeit durchgeführten EDX-Untersuchungen haben gezeigt, dass die Schwermetallverteilung in den drei Moosarten verschieden ist. Im Fall CuCl_2 sind bei *Physcomitrium patens* die Signale am gesamten Stämmchen und den unteren Teilen der Blättchen am meisten detektiert worden. Bei *Pohlia drummondii* hingegen war die stärkste Verteilung eher am unteren Ende des Stämmchens lokalisiert. Obwohl die EDX-Versuche in dieser Arbeit mit flüssigen Metalllösungen durchgeführt wurden, in die die Moosproben für 2 oder 20 Stunden eingelegt wurden, können diese Ergebnisse mit denen von Antreich et al. (2016) verglichen werden. Diese Studie zeigte in EDX-Versuchen die gleiche Verteilung des Kupfers in *Pohlia drummondii* und *Physcomitrium patens*, die auf festen, mit CuCl_2 versetzten, Agarplatten gewachsen waren. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass bei *Pohlia drummondii* die Kationenaustauschkapazität (CEC) reduziert ist (Antreich et al. 2016). Oft ist die CEC auch vom pH - Wert abhängig. Bei niedrigem pH - Wert kann die CEC reduziert sein und somit stehen weniger Bindungsstellen für Ionen zur Verfügung. Dadurch gelangen auch weniger schädliche Metallionen in die Zellen und in die oberen Teile des Stämmchens

(Antreich et al. 2016). Bei *Physcomitrium patens* hingegen scheint es, dass solch eine Anpassung fehlt und sich das Metall somit im gesamten Stämmchen und dann auch weiter in die Blättchen verteilen kann (Antreich et al. 2016). Eine gesenkte Kationenaustauschkapazität schützt die metalltoleranten Moose allerdings nicht vollständig vor toxischen Elementen (Antreich et al. 2016) und so kann es auch bei metalltoleranten Moosen zu Schäden oder auch zu Wachstumseinschränkungen kommen. Da die Moose an der Spitze wachsen ist der untere Teil des Mooses der älteste und dem Kupfer am längsten ausgesetzt, wodurch das weitere Wachstum erschwert wird (Antreich et al. 2016). Da es bei *Physcomitrium patens* möglich ist, dass die Metallaufnahme uneingeschränkt stattfindet, könnte dies mit ein Grund für das schlechte Wachstum in Anwesenheit des Kupfers sein.

5.2.2. Verfügbarkeit der Metallionen

Ein weiterer Punkt, der erklären könnte, warum *Physcomitrium patens* ein schlechtes Wachstum bei Anwesenheit von Kupfer zeigt, ist, dass die Verfügbarkeit der Metalle und das vorkommende Anion eine große Rolle spielen. Damit Nährstoffe, aber auch Schadstoffe wie Schwermetalle, von Moosen aufgenommen werden können, müssen sie für die Pflanzen in verfügbarer Form als freie Kationen vorkommen (Sassmann et al. 2015a; Sassmann et al. 2015b). In diesen Studien wurden Versuche mit *Physcomitrium patens* durchgeführt, wobei gezeigt wurde, dass die Metalltoxizität nicht nur vom Metall alleine bestimmt wird, sondern auch von dem Anion. Kupfer wurde als Chlorid, Sulfat und EDTA angeboten und gezeigt, dass Kupfer als EDTA im Vergleich zu Chlorid und Sulfat die geringste Toxizität aufweist. Die Anionen selbst sind nicht toxisch, tragen aber zu der schädlichen Wirkung der Metalle bei, indem sie die Fähigkeit besitzen, Chelate zu bilden und dadurch die Verfügbarkeit der Metalle verändern (Sassmann et al. 2015a). Da sich in deren Studien gezeigt hat, dass die Konzentration der freien Metallkationen in Verbindung mit EDTA viel geringer ist als in Verbindung mit Chlorid oder Sulfat, konnte somit gezeigt werden, warum Chlorid so viel schädlicher für das Moos ist als EDTA. Die Anzahl der frei verfügbaren Metallkationen ist in Verbindung mit Chlorid höher und somit wird die Metallaufnahme begünstigt. Das ist ein großer Unterschied zu höheren Pflanzen, da bei diesen die Metallaufnahme durch EDTA gefördert wird, indem wasserlösliche Metallchelate gebildet werden, die für die Pflanzen verfügbar sind (Sassmann et al. 2015a; Sassmann et al. 2015b). Da in der vorliegenden Arbeit alle Schwermetalle, bis auf Antimon, Chlorid als Anion hatten, könnten die schädlichen Wirkungen auf die verwendeten Moosarten auch darauf zurückgeführt werden. Durch Chlorid sind die Metalle besser in freier Form für die Moose verfügbar und können somit auch besser aufgenommen werden, was zu den schädlichen Effekten führt.

5.2.3. Mangan und Antimon

Eine andere Auffälligkeit ist, dass Mangan sowohl bei *Pohlia drummondii*, als auch bei *Physcomitrium patens* scheinbar einen positiven Effekt auf das Wachstum hat und die schädliche Wirkung im Vergleich zu Kupfer deutlich geringer ist. Als essentielles Spurenelement kann Mangan bei einem Mangel aber auch bei einem Überangebot Schäden hervorrufen (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984). Im Verlauf der Studie von Boquet et al. (2011), die untersuchten, ob eine bestimmte Moosart als Biomonitor für Mangan aus der Atmosphäre geeignet ist, ergaben sich interessante Hypothesen über die Aufnahme von Mangan, die die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit erklären könnten. Bei der

Bestimmung der Konzentration von Mangan in Moosproben die sich nahe einer Aluminiumschmelzerei befanden, fanden Boquet et al. (2011) nur sehr geringe Konzentrationen des Schwermetalls im Moosgewebe. Weiters stellten sie fest, dass es einen Unterschied zwischen der Exposition und der Konzentration im Gewebe gibt. Die Autoren führten diese Tatsache darauf zurück, dass Mangan ein essentielles Spurenelement ist und das Moos eine gute Rebulationsfähigkeit für die Aufnahme und Konzentration dieses Metalls besitzt (Boquete et al. 2011). Durch Natrium- und Magnesiumionen kann Mangan außerdem sehr leicht von den Kationenaustauschstellen verdrängt werden, was ebenfalls eine Erklärung für die geringen Mangankonzentrationen sein könnte (Boquete et al. 2011). Da in dieser Arbeit in den Medien, Magnesium in Form von $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ enthalten war, könnte es sein, dass es zur Verdrängung von Mangan gekommen ist und dadurch das gute Wachstum möglich war. Somit ließe sich auch erklären, warum die Kombination $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2$ bei einem an sich toleranten Moos wie *Pohlia drummondii* Wachstumseinschränkungen hervorrief. Die schädliche Wirkung von Kupfer, welches aufgrund der Verbindung mit Chlorid besser verfügbar ist, könnte überwiegen und der Einfluss von Mangan auf das Wachstums bleibt aus, da es entweder durch Verdrängung aus den Kationenaustauschstellen oder guter Regulierung der Aufnahme durch das Moos nicht aufgenommen wird. Noch deutlicher wurden diese Effekte bei den Versuchen mit *Physcomitrium patens*, wo es zu einer eindeutigen Wachstumseinschränkung gekommen ist, wenn Kupfer in einer der Kombinationen enthalten war. Wenn man allerdings die Ergebnisse aus den EDX-Versuchen dazu vergleicht, zeigten sich bei den Proben relativ viele und starke Signale des Mangans fast in den gesamten Proben, was auf eine gute Adsorption des Metalls hindeutet. Im vorliegenden Fall wurden die Proben aber in flüssige Metalllösungen eingelegt, in denen die Metalle in destilliertem Wasser gelöst wurden. Da im destillierten Wasser möglicherweise weniger Magnesiumionen enthalten sind, als im Beispiel weiter oben beschrieben, kann es sein, dass Mangan in diesem Fall nicht oder weniger von Magnesiumionen aus den Kationenaustauschstellen verdrängt wird. Somit wäre eine bessere Adsorption möglich. Andererseits könnte die gute Verträglichkeit dieses Schwermetalls auch durch die Tatsache erklärt werden, dass Mangan allgemein als Metall für Lebewesen und die Umwelt nicht besonders schädlich ist, wenn es nicht in ungewöhnlich hohen Konzentrationen vorkommt (Merian und Geldmacher-von Mallinckrodt 1984). In dieser Hinsicht sollten also noch weitere Untersuchungen gemacht werden, um feststellen zu können, wie genau Mangan aufgenommen wird und was im Zellinneren passiert.

Auffällig ist auch, dass Schäden nicht nur auftreten, wenn Kupfer alleine angeboten wird, sondern auch in Kombination mit Antimon oder Eisen. Antimon hat in lebenden Organismen keine bekannten Funktionen, da es auch kein essentielles Spurenelement (Sun 2011) wie Eisen oder Kupfer ist. Auch über die Toxizität und die Aufnahme dieses Schwermetalls ist noch nicht besonders viel bekannt (Babula et al. 2008). Man nimmt aber an, dass Sb (III) toxischer ist als Sb(V). Es könnte ein ähnliches Verhalten wie Arsen und Bismut aufweisen, da diese benachbarte Elemente im Periodensystem sind (Babula et al. 2008). Wie der genaue Aufnahmemechanismus von Antimon stattfindet ist noch nicht vollständig geklärt, aber man geht davon aus, dass Sb (III) nach der Aufnahme in das weniger schädliche Sb (V) umgewandelt und in der Vakuole gespeichert wird oder mit Proteinen Komplexe bildet (Babula et al. 2008). Diese Annahmen decken sich mit den Ergebnissen aus einer Studie von Diaz et al. (2013). Sie stellten bei der Untersuchung des aquatischen Mooses *Fontinalis antipyretica* fest, dass im

Vergleich zu Selen und Quecksilber, Antimon die geringste Toxizität aufweist. Auch sie begründeten diesen Effekt mit der Umwandlung von Sb (III) zu Sb (V). (Díaz et al. 2013). Somit scheint es auch in der vorliegenden Arbeit, dass dieser Effekt aufgetreten ist, da Antimon in Form von Sb-(III)-acetat verwendet wurde. Die Schäden durch die Kombination CuCl_2 + *Sb-acetat* können dementsprechend durch den negativen Einfluss von CuCl_2 erklärt werden.

5.3. Synergetische und Antagonistische Wechselwirkungen

Wie schädlich die Metalle demnach auf die Moose wirken, hängt vom Metall und seiner Toxizität ab, von seiner Verfügbarkeit, seiner Aufnahme und weiteren Wirkung im Zellinneren sowie vom Vorhandensein anderer Elemente oder Metalle. Sind mehrere Elemente gleichzeitig vorhanden, kann es entweder zu synergetischen oder antagonistischen Wechselwirkungen kommen (Fränzle 2009; Alloway 1999). Es gibt zwischen den chemischen Elementen, die in Pflanzen vorkommen oder von ihnen aufgenommen werden, viele Interaktionen die die Absorption oder auch das Wachstum beeinflussen können. So hat sich gezeigt das Kupfer +- Eisen sowie Eisen +- Mangan synergetische Effekte haben können. Auch zwischen Eisen +- Antimon und Mangan +- Antimon haben sich positive Korrelationen gezeigt, während Kupfer +- Mangan beides sein kann: synergetisch oder antagonistisch (Fränzle 2009; Alloway 1999). Je nach Wirkung, Konzentration und eigener Toxizität des Metalls, wirken diese synergetischen oder antagonistischen Effekte positiv oder negativ. So hat sich in dieser Arbeit gezeigt, dass Mangan in Kombination mit Kupfer eine schädlichere Wirkung auf *Physcomitrium patens* hatte als Mangan kombiniert mit Eisen oder Antimon. Kupfer und Mangan könnten in diesem Fall eine antagonistische Wirkung haben, bei der Kupfer aus den oben beschriebenen Gründen dominanter ist und als Hauptverursacher der Schäden auftritt. Dass Kupfer auch in Gegenwart anderer Metalle wie Zink oder Nickel der stärkere Konkurrent ist, hat sich auch in einer Bioadsorptionsstudie gezeigt, die das Adsorptionsverhalten der Metalle untersuchte, wenn sie gemeinsam vorkamen (Zhang und Banks 2005). Die Aufnahmemechanismen sind nicht für alle Metalle gleich und können untereinander um Bindungsstellen konkurrieren (Zhang und Banks 2005). Auch diesen Aspekt könnte man teilweise bei der Interpretation der Ergebnisse aus den EDX Versuchen berücksichtigen. Wenn mehrere Metalle gleichzeitig angeboten wurden, waren die Signale für Eisen geringer, als bei Proben, die mit Lösungen behandelt wurden, die nur Eisen alleine enthielten. Dieser Effekt könnte somit mit dem Konkurrenzverhalten um die Besetzung der Bindungsstellen erklärt werden. Während die Wechselwirkung von Mangan mit Kupfer einen negativen Effekt hat, könnte die verstärkende Wirkung von Mangan mit Eisen oder Antimon das gute Wachstum der Moose erklären, das in dieser Arbeit beobachtet wurde. Ob nun Metallkombinationen schädlicher auf die ausgewählten Moosarten wirken als ein Metall alleine, kann nicht so einfach beantwortet werden. Es hat sich gezeigt, dass dies von mehreren Faktoren abhängig ist. Die Moospezies und ihre Eigenschaften spielen eine genauso große Rolle wie die Eigenschaften und die Konzentration der Schwermetalle.

6.Literaturverzeichnis

- Aceto, Maurizio; Abollino, Ornella; Conca, Raffaele; Malandrino, Mery; Mentasti, Edoardo; Sarzanini, Corrado (2002): The use of mosses as environmental metal pollution indicators. In: *Chemosphere* 50 (2003) 333–342
- Adlassnig, Wolfram; Weiss, Yasmin S.; Sassmann, Stefan; Steinhauser, Georg; Hofhansl, Florian; Baumann, Nils et al. (2016): The copper spoil heap Knappenberg, Austria, as a model for metal habitats - Vegetation, substrate and contamination. In: *The Science of the total environment* 563-564, S. 1037–1049. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.179.
- Akiyama, Hiroyuki; Masuzaki, Hiroaki; Yamaguchi, Tomio (2009): Habitat and morphological differentiation between *Pohlia annotina* and *P. drummondii* (Mniaceae) at higher elevations in Yakushima Island, Japan. In: *The Bryologist*, Vol. 112, No. 4 (Winter, 2009), pp. 749-761
- Aktories, Klaus; Förstermann, Ulrich; Hofmann, Franz; Starke, Klaus (Hg.) (2017): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker. Elsevier Urban & Fischer. 12. Auflage. München: Elsevier. Online verfügbar unter <http://shop.elsevier.de/978-3-437-42525-7>.
- Alloway, Brian J. (Hg.) (1999): Schwermetalle in Böden. Analytik, Konzentration, Wechselwirkungen ; mit 83 Tabellen. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1999.
- Antreich, Sebastian; Sassmann, Stefan; Lang, Ingeborg (2016): Limited accumulation of copper in heavy metal adapted mosses. In: *Plant physiology and biochemistry : PPB* 101, S. 141–148. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.02.005.
- Ares, Ángela; Itouga, Misao; Kato, Yukari; Sakakibara, Hitoshi (2018): Differential Metal Tolerance and Accumulation Patterns of Cd, Cu, Pb and Zn in the Liverwort *Marchantia polymorpha* L. In: *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 100 (3), S. 444–450. DOI: 10.1007/s00128-017-2241-0.
- Babula, Petr; Adam, Vojtech; Opatrilova, Radka; Zehnalek, Josef; Havel, Ladislav; Kizek, Rene (2008): Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. In: *Environ Chem Lett* 6 (4), S. 189–213. DOI: 10.1007/s10311-008-0159-9.
- Bezanilla, Magdalena: Moss Manualv2_GB062012_MB. (Online Verfügbar unter <https://sites.dartmouth.edu/bezanillalab/moss-methods/>)
- Boquete, M. T.; Fernández, J. A.; Aboal, J. R.; Carballeira, A. (2011): Are terrestrial mosses good biomonitors of atmospheric deposition of Mn? In: *Atmospheric Environment* 45 (16), S. 2704–2710. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2011.02.057.
- Boquete, M. Teresa; Lang, Ingeborg; Weidinger, Marieluise; Richards, Christina L.; Alonso, Conchita (2021): Patterns and mechanisms of heavy metal accumulation and tolerance in two terrestrial moss species with contrasting habitat specialization. In: *Environmental and Experimental Botany* 182, S. 104336. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2020.104336.
- Campos, Marcelo Lattarulo; Prado, Guilherme Souza; Dos Santos, Vanessa Olinto; Nascimento, Lara Camelo; Dohms, Stephan Machado; Da Cunha, Nicolau Brito et al. (2020): Mosses: Versatile plants for biotechnological applications. In: *Biotechnology advances* 41, S. 107533. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107533.

Choudhury, Shuvasish; Panda, Sanjib Kumar (2005): Toxic Effects, Oxidative Stress and Ultrastructural Changes in Moss *Taxithelium Nepalense* (Schwaegr.) Broth. Under Chromium and Lead Phytotoxicity. In: *Water Air Soil Pollut* 167 (1-4), S. 73–90. DOI: 10.1007/s11270-005-8682-9.

Díaz, Santiago; Villares, Rubén; Vázquez, María D.; Carballeira, Alejo (2013): Physiological Effects of Exposure to Arsenic, Mercury, Antimony and Selenium in the Aquatic Moss *Fontinalis antipyretica* Hedw. In: *Water Air Soil Pollut* 224 (8). DOI: 10.1007/s11270-013-1659-1.

Dolegowska, Sabina; Migaszewski, Zdzislaw M. (2014) Terrestrial Mosses as trace element bioindicators: A Review. In: Mohamed, Jorma (2014): Moss. Classification, development and growth and functional role in ecosystems. Hauppauge, New York: Nova Science Publishers Inc (Botanical Research and Practices). Online verfügbar unter <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=714794>.

Ebermann, Robert; Elmadfa, Ibrahim (2011): Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung. 2., korrigierte und erw. Aufl. Wien: Springer.

EDAX: Smart CPS Mapping Technical Note. Online Verfügbar unter https://www.edax.com/-/media/ametekedax/files/eds/technical_notes/smart-cps-mapping.pdf?dmc=1&la=en

Esposito, S.; Sorbo, S.; Conte, B.; Basile, A. (2012): Effects of heavy metals on ultrastructure and HSP70s induction in the aquatic moss *Leptodictyum riparium* Hedw. In: *International journal of phytoremediation* 14 (4), S. 443–455. DOI: 10.1080/15226514.2011.620904.

Fernández, J.A.; Aboal, J.R.; Carballeira, A. (2000): Use of native and transplanted mosses as complementary techniques for biomonitoring mercury around an industrial facility. In: *Science of The Total Environment* 256 (2-3), S. 151–161. DOI: 10.1016/S0048-9697(00)00478-2.

Frahm, Jan-Peter (2011): Kommentierte Liste der Laubmoose Deutschlands. Online Verfügbar unter <http://www.archive-for-bryology.com/>

Frahm, Jan-Peter; Frey, Wolfgang; Döring, J.; Frahm-Frey (1983): Moosflora. Stuttgart: Ulmer (UTB für Wissenschaft Uni-Taschenbücher Botanik, Systematik, Pflanzengeographie, 1250).

Fränzle, Stefan (2009): Chemical Elements in Plant and Soil: Parameters Controlling Essentiality. Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V (Tasks for Vegetation Science, 45). Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=510703>.

Hänsch, Robert; Mendel, Ralf R. (2009): Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). In: *Current opinion in plant biology* 12 (3), S. 259–266. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.05.006.

Haschke, Michael; Flock, Jörg (2017): Röntgenfluoreszenzanalyse in der Laborpraxis. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Online verfügbar unter <http://www.wiley-vch.de/publish/dt/books/ISBN978-3-527-34292-1/>.

Knight, Celia D.; Perroud, Pierre-François; Cove, D. J. (2009): The moss *Physcomitrella patens*. Chichester U.K., Ames Iowa: Wiley-Blackwell (Annual plant reviews, 36).

Krumm, Andrea (2020): Entwicklung eines Produktionsorganismus — das Moos *Physcomitrella patens*. In: *Biospektrum* 26 (2), S. 187–188. DOI: 10.1007/s12268-020-1350-1.

Lang, Ingeborg; Wernitznig, Stefan (2011): Sequestration at the cell wall and plasma membrane facilitates zinc tolerance in the moss *Pohlia drummondii*. In: *Environmental and Experimental Botany* 74, S. 186–193. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2011.05.018.

Lunić, Tanja M.; Oalđe, Mariana M.; Mandić, Marija R.; Sabovljević, Aneta D.; Sabovljević, Marko S.; Gašić, Uroš M. et al. (2020): Extracts Characterization and In Vitro Evaluation of Potential

- Immunomodulatory Activities of the Moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (15). DOI: 10.3390/molecules25153343.
- Markert, Bernd (Hg.) (2003): Bioindicators & biomonitors. Principles, concepts and applications. Amsterdam: Elsevier (Trace metals and other contaminants in the environment, 6). Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0614/2003041753-d.html>.
- Markert, Bernd (2007): Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment. In: *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* 21 Suppl 1, S. 77–82. DOI: 10.1016/j.jtemb.2007.09.015.
- Marschner, Horst; Marschner, Petra (Hg.) (2012): Marschner's Mineral nutrition of higher plants. 3. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Matyssek, Rainer; Herppich, Werner B. (2019): Experimentelle Pflanzenökologie. Grundlagen und Anwendungen. 2nd ed. 2019. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint: Springer Spektrum (Springer Reference Naturwissenschaften).
- Merian, Ernest; Geldmacher-von Mallinckrodt, Marlies (Hg.) (1984): Metalle in der Umwelt. Verteilung, Analytik und biologische Relevanz. Weinheim: Verl. Chemie.
- Microscopy Australia: <https://micro.org.au/>
- Nagajyoti, P. C.; Lee, K. D.; Sreekanth, T. V. M. (2010): Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. In: *Environ Chem Lett* 8 (3), S. 199–216. DOI: 10.1007/s10311-010-0297-8.
- Onianwa, P. C. (2000): Monitoring Atmospheric Metal Pollution: A Review of the Use of Mosses as Indicators. In: *Environmental Monitoring and Assessment* 71: 13–50, 2001.
- Petschinger, Katharina; Adlassnig, Wolfram; Sabovljevic, Marko S.; Lang, Ingeborg (2021a): Lamina Cell Shape and Cell Wall Thickness Are Useful Indicators for Metal Tolerance-An Example in Bryophytes. In: *Plants (Basel, Switzerland)* 10 (2). DOI: 10.3390/plants10020274.
- Petschinger, Katharina; Adlassnig, Wolfram; Sabovljevic, Marko S.; Lang, Ingeborg (2021b): Lamina Cell Shape and Cell Wall Thickness Are Useful Indicators for Metal Tolerance-An Example in Bryophytes. In: *Plants (Basel, Switzerland)* 10 (2). DOI: 10.3390/plants10020274.
- Quartacci, M. F. (2001): Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. In: *Journal of Experimental Botany* 52 (354), S. 77–84. DOI: 10.1093/jexbot/52.354.77.
- Vitt, Dale H.; Crandall-Stotler, Barbara; Wood, Andrew (2014): Bryophytes: Survival in a dry world through tolerance and avoidance. In: Rajakaruna, Nishanta; Boyd, Robert S.; Harris, Tanner B. (Hg.) (2014): Plant ecology and evolution in harsh environments. New York: Nova Publishers (Environmental Research Advances). Online verfügbar unter <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=863029>.
- Reineke, Walter; Schlömann, Michael (2020): Umweltmikrobiologie. 3. Auflage. Berlin Germany: Springer Spektrum (Lehrbuch).
- ReiBer, Werner; Dux, Franz-Martin; Möschke, Monika; Hofmeister, Martin (2019): Pflanzenanatomischer Grundkurs. Module für die differenzierte Gestaltung. 2nd ed. 2019. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint: Springer Spektrum.
- Rensing, Stefan A.; Goffinet, Bernard; Meyberg, Rabea; Wu, Shu-Zon; Bezanilla, Magdalena (2020): The Moss *Physcomitrium* (*Physcomitrella*) *patens*: A Model Organism for Non-Seed Plants. In: *The Plant cell* 32 (5), S. 1361–1376. DOI: 10.1105/tpc.19.00828.

- Reski, Ralf; Parsons, Juliana; Decker, Eva L. (2015): Moss-made pharmaceuticals: from bench to bedside. In: *Plant biotechnology journal* 13 (8), S. 1191–1198. DOI: 10.1111/pbi.12401.
- Sabovljević, Marko S.; Weidinger, Marieluise; Sabovljević, Aneta D.; Stanković, Jelena; Adlassnig, Wolfram; Lang, Ingeborg (2020): Metal accumulation in the acrocarp moss *Atrichum undulatum* under controlled conditions. In: *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 256, S. 113397. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.113397.
- Sassmann, Stefan; Adlassnig, Wolfram; Puschenreiter, Markus; Cadenas, Edwin Julio Palomino; Leyvas, Mario; Lichtscheidl, Irene K.; Lang, Ingeborg (2015a): Free metal ion availability is a major factor for tolerance and growth in *Physcomitrella patens*. In: *Environmental and Experimental Botany* 110, S. 1–10. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2014.08.010.
- Sassmann, Stefan; Weidinger, Marieluise; Adlassnig, Wolfram; Hofhansl, Florian; Bock, Barbara; Lang, Ingeborg (2015b): Zinc and copper uptake in *Physcomitrella patens*: Limitations and effects on growth and morphology. In: *Environmental and Experimental Botany* 118, S. 12–20. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2015.05.003.
- Sassmann, Stefan; Wernitznig, Stefan; Lichtscheidl, Irene K.; Lang, Ingeborg (2010): Comparing copper resistance in two bryophytes: *Mielichhoferia elongata* Hornsch. versus *Physcomitrella patens* Hedw. In: *Protoplasma* 246 (1-4), S. 119–123. DOI: 10.1007/s00709-010-0106-z.
- Schmidt, Sidsel Birkelund; Husted, Søren (2019): The Biochemical Properties of Manganese in Plants. In: *Plants (Basel, Switzerland)* 8 (10). DOI: 10.3390/plants8100381.
- Shakya, K.; Chettri, M. K.; Sawidis, T. (2008): Impact of heavy metals (copper, zinc, and lead) on the chlorophyll content of some mosses. In: *Archives of environmental contamination and toxicology* 54 (3), S. 412–421. DOI: 10.1007/s00244-007-9060-y.
- Sigee, David C. (Hg.) (1993): X-ray microanalysis in biology. Experimental techniques and applications. Cambridge: Cambridge University Press.
- Stankovic, Jelena; Jankovic, Sladjana; Lang, Ingeborg; Vujicic, Milorad; Sabovljevic, Marko; Sabovljevic, Aneta (2021): The toxic metal stress in two mosses of different growth forms under axenic and controlled conditions. In: *Bot Serb* 45 (1), S. 31–47. DOI: 10.2298/BOTSERB2101031S.
- Stanković, Jelena D.; Sabovljević, Aneta D.; Sabovljević, Marko S. (2018): Bryophytes and heavy metals: a review. In: *Acta Botanica Croatica* 77 (2), S. 109–118. DOI: 10.2478/botcro-2018-0014.
- Sun, Hongzhe (Hg.) (2011): Biological chemistry of arsenic, antimony and bismuth. Chichester: Wiley. 2011 John Wiley & Sons Ltd
- Sun, Shou-Qin; He, Ming; Cao, Tong; Zhang, You-Chi; Han, Wei (2009): Response mechanisms of antioxidants in bryophyte (*Hypnum plumaeforme*) under the stress of single or combined Pb and/or Ni. In: *Environmental monitoring and assessment* 149 (1-4), S. 291–302. DOI: 10.1007/s10661-008-0203-z.
- Urry, Lisa A.; Cain, Michael L.; Wasserman, Steven A.; Minorsky, Peter V.; Reece, Jane B.; Paululat, Achim (2019): Campbell Biologie. 11., aktualisierte Auflage. Hallbergmoos: Pearson (Pearson Studium).
- Vanderpoorten, Alain; Goffinet, Bernard (Hg.) (2009): Introduction to bryophytes. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Vatansever, Recep; Ozyigit, Ibrahim Ilker; Filiz, Ertugrul (2017): Essential and Beneficial Trace Elements in Plants, and Their Transport in Roots: a Review. In: *Applied biochemistry and biotechnology* 181 (1), S. 464–482. DOI: 10.1007/s12010-016-2224-3.

- Vitt, Dale H.; Crandall-Stotler, Barbara; Wood, Andrew (2014): Bryophytes: Survival in a dry world through tolerance and avoidance. In: Rajakaruna, Nishanta; Boyd, Robert S.; Harris, Tanner B. (Hg.) (2014): Plant ecology and evolution in harsh environments. New York: Nova Publishers (Environmental Research Advances). Online verfügbar unter <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=863029>.
- Vitt, Dale H.; Crandall-Stotler, Barbara; Wood, Andrew (2014): Bryophytes: Survival in a dry world through tolerance and avoidance. In: Rajakaruna, Nishanta; Boyd, Robert S.; Harris, Tanner B. (Hg.) (2014): Plant ecology and evolution in harsh environments. New York: Nova Publishers (Environmental Research Advances). Online verfügbar unter <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=863029>.
- Vujičić, Milorad; Sabovljević, Aneta; Sabovljevic, Marko (2010): Axenically culturing the bryophytes: establishment and propagation of the moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. (Bryophyta, Hypnaceae) in vitro conditions. In: *Botanica Serbica* 35 (1): (2011) 71-77
- Weiler, Elmar W.; Nover, Lutz; Nultsch, Wilhelm (2008): Allgemeine und molekulare Botanik. 30 Tabellen. Stuttgart: Thieme.
- Wirth, Volkmar; Düll, Ruprecht (2000): Farbatlas Flechten und Moose. Stuttgart (Hohenheim): Ulmer.
- Wu, Yanfang; Chen, Yahua; Yi, Yanjun; Shen, Zhenguo (2009): Responses to copper by the moss *Plagiomnium cuspidatum*: hydrogen peroxide accumulation and the antioxidant defense system. In: *Chemosphere* 74 (9), S. 1260–1265. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.10.059.
- Zhang, Yue; Banks, Charles (2005): The interaction between Cu, Pb, Zn and Ni in their biosorption onto polyurethane-immobilised *Sphagnum* moss. In: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80 (11), S. 1297–1305. DOI: 10.1002/jctb.1329.