



GOTTFRIED WILHELM LEIBNIZ UNIVERSITÄT HANNOVER

Institut für Radioökologie und Strahlenschutz

Bestimmung endlagerrelevanter Radionuklide in Pflanzenteilen mittels orts aufgelöster Massenspektrometrie

Masterarbeit von
Linus Holtmann

Erstprüfer: Prof. Dr. Clemens Walther
Zweitprüfer: Prof. Dr. Georg Steinhauser
Betreuer: Marcus Mandel

1. März 2021

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, dass alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht und dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt worden ist.

Hannover, den 1. März 2021

Linus Holtmann

Inhaltsverzeichnis

1	Einbettung der Arbeit	1
2	Grundlagen	3
2.1	Verwendete Radionuklide	3
2.1.1	Technetium	3
2.1.2	Rhenium	5
2.1.3	Iod	5
2.2	Pflanzen	6
2.2.1	Aufbau	6
2.2.2	Daucus carota	10
2.2.3	Pisum sativum	11
2.3	Kryokonservierung	12
2.4	Massenspektrometrische Methoden	13
2.4.1	TOF-SIMS	13
2.4.2	ICP-MS	17
3	Vorbereitung der Pflanzenexperimente	21
3.1	Böden	21
3.2	Pflanzenaufzucht	22
3.2.1	Daucus carota	22
3.2.2	Pisum sativum	23
3.2.3	Tracerapplikation	24
4	Methodik	27
4.1	Probenvorbereitung zur orts aufgelösten Massenspektrometrie	27
4.1.1	Gefrierschutz von Pflanzengewebe	27
4.1.2	Herstellung von Gewebeschnitten	28

Inhaltsverzeichnis

4.2	Kinetik der Technetiumaufnahme	30
4.3	Sequentielle Extraktion von Technetium	30
4.4	Rhenium in Hydrokultur	32
4.5	Ortsaufgelöste Massenspektrometrie	32
4.5.1	LA-ICP-MS	32
4.5.2	TOF-SIMS	32
4.5.3	rL-SNMS	33
4.5.4	Darstellung von Messdaten	33
4.6	Messunsicherheiten	34
4.6.1	ICP-MS	34
4.6.2	TOF-SIMS	35
5	Ergebnisse und Diskussion	37
5.1	Versuchsreihen zur Kryokonservierung	37
5.2	Kinetik der Technetiumaufnahme	41
5.3	Sequentielle Extraktion von Technetium	44
5.4	Rhenium in Hydrokultur	46
5.5	Ortsaufgelöste Massenspektrometrie an Pflanzenproben	47
5.5.1	Anionische Pflanzennährstoffe	47
5.5.2	Iod	50
5.5.3	Rhenium	54
5.5.4	Technetium	60
5.5.5	TOF-SIMS und rL-SNMS an Pflanzenproben	67
6	Zusammenfassung und Interpretation	71
7	Ausblick	75

1 Einbettung der Arbeit

Für die Endlagersicherheit sind Modelle zur Abschätzung der Strahlendosen bei langanhaltender Exposition von großer Bedeutung. Grundlegende Richtlinien zur Erstellung von Referenzbiosphärenmodellen wurden dazu im Projekt BIOMASS [1] erarbeitet. Für die Risikoabschätzung müssen Migration und Akkumulation von Radionukliden im Fernfeld um das Endlager betrachtet werden. Das Transport- und Transferverhalten von Radionukliden wird dabei von vielen Faktoren bestimmt. Von Relevanz sind sowohl die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Radionuklide als auch Beschaffenheit, Zusammensetzung und Struktur des Bodens. Auch der Bewuchs mit Pflanzen kann einen wesentlichen Einfluss auf das Verhalten der Radionuklide haben. Eine qualitative Beschreibung des Radionuklidtransports aus Böden in Pflanzen liefern sogenannte Transferfaktoren. Einige solcher Transferfaktoren sind in einem Bericht der IAEA [2] zusammengefasst, allerdings variieren die darin aufgeführten Transferfaktoren bei denselben Radionukliden teilweise um einige Größenordnungen. Ortsaufgelöste Methoden liefern Hinweise auf das Verhalten von Radionukliden in Pflanzen auf mikroskopischer Ebene. Ein Beispiel hierfür stellt die Untersuchung der Uranverteilung in der Wurzel der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) durch Mission et al. [3] dar.

Ziel des Verbundprojektes TRANS-LARA (Transport- und Transferverhalten langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen) ist daher der Informationsgewinn über den Radionuklidtransport bei Störfallszenarien potenzieller Endlager aus der Grundwasserzone, durch den Boden und in die Pflanzen. Mit den gewonnenen Erkenntnissen soll eine verbesserte Risikoabschätzung für die Strahlenexposition der Bevölkerung durch Migration der Radionuklide ^{129}I , ^{99}Tc , Plutonium und Americium im Fernfeld um Endlager ermöglicht werden. Experimentelle Untersuchungen der Migration und Akkumulation von Radionukliden in

1 Einbettung der Arbeit

oberflächennahen Schichten des Bodens und Pflanzen sollen dabei durch Modellierungen ergänzt werden. Änderungen der klimatischen Bedingungen sollen ebenfalls in die Betrachtung einbezogen werden. Dazu wurden die hypothetischen Entwicklungszustände derzeitiger Böden anhand der im internationalen Projekt BIOCLIM [4] entwickelten Klimaszenarien recherchiert. Ziel ist zudem ein tiefergehendes Verständnis der Aufnahmeprozesse in Pflanzen, um eine über Transferfaktoren hinausgehende Modellierung zu ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde primär eine qualitative Analyse des Radionuklidtransfers durch Pflanzen auf zellulärer Ebene mittels orts aufgelöster Massenspektrometrie durchgeführt. Weitere Versuche dienten der optimierten Probenvorbereitung für die orts aufgelöste Massenspektrometrie, insbesondere der Kryokonservierung, wobei Gefrierschäden vermindert werden mussten und so möglichst intaktes Pflanzengewebe für die Versuche ermöglicht wurde. Ergänzend fand eine Speziation von Technetium in *Daucus carota* mittels sequentieller Extraktion statt.

2 Grundlagen

2.1 Verwendete Radionuklide

2.1.1 Technetium

Technetium (Tc) hat die Ordnungszahl 43 und gehört zu den Übergangsmetallen. Es existieren 37 bekannte Isotope des Technetiums [5], von denen keines stabil ist. Auf natürliche Weise entsteht Technetium in Pechblende bei der Spontanspaltung von Uran. Der Gehalt an Technetium in Pechblende liegt bei einem Anteil von circa 0,3 ppt (1 ppt $\hat{=}$ 10^{-9} g/kg) [6]. Neben der Entstehung durch Pechblende entsteht Technetium als Sekundärprodukt der Interaktion kosmischer Strahlung mit Molybdän, Ruthenium und Niob. Der größte Teil des auf der Erde vorkommenden Technetiums stammt jedoch aus der neutroneninduzierten Spaltung des ^{235}U und des ^{239}Pu , das heißt aus dem Fallout der Kernwaffentests und aus der Emission durch Kernreaktoren und Wiederaufbereitungsanlagen, sowie der Produktion von ^{99m}Tc als Radiopharmakon. Von den bei der Spaltung von Uran in Reaktoren entstehenden Technetiumisotopen hat lediglich das ^{99}Tc mit $2,1 \cdot 10^5$ Jahren eine längere Halbwertszeit und ist damit von Bedeutung für die Risikoabschätzung [7]. Dieses zerfällt unter Emission von β^- -Strahlung ($n \rightarrow p + e + \bar{\nu}_e$) zu ^{99}Ru . Das Zerfallsschema des ^{99}Tc findet sich in Abbildung 2.1. Der durch die kerntechnische Nutzung verursachte Ausstoß von ^{99}Tc lag 1986 bei 1 PBq, wobei der Hauptteil aus Wiederaufbereitungsanlagen stammte. Im Zeitraum von 1995 bis 1999 wurden von der Wiederaufbereitungsanlage Sellafield 500 TBq ^{99}Tc in die Irische See eingeleitet, 2019 lag dieser Wert bei 940 GBq [8, 9]. Mit seiner relativ kurzen biologischen Halbwertszeit von wenigen Stunden bis Tagen [10] und seiner geringen Strahlenwirkung findet insbesondere ^{99m}Tc große Anwendung in der Nuklearmedizin [11]. Geschätzt werden jährlich über 25 Millionen medizinische Untersuchungen allein mit diesem Isotop durchgeführt [12].

2 Grundlagen

Die möglichen Oxidationsstufen des Technetiums sind $-III$ sowie $-I$ bis $+VII$ [13], wobei in wässrigen Lösungen unter oxidierenden Bedingungen das heptavalente Pertechnetat-Ion TcO_4^- den stabilsten Zustand darstellt [7]. Pertechnetat stellt damit auch die wichtigste Technetiumverbindung für die Aufnahme und den Transport durch Pflanzen dar, wobei Technetium anschließend teilweise von den Pflanzen reduziert werden kann [14, 15].

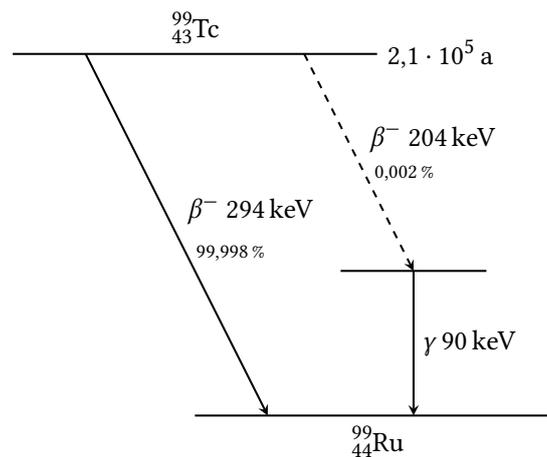


Abbildung 2.1: Zerfallsschema des ^{99}Tc . Nach [16].

Aufnahme von Technetium durch Pflanzen

Die Transferfaktoren von Boden zu Pflanzen sind für Technetium im Allgemeinen sehr groß, wobei sich besonders in den Blättern hohe Technetiumkonzentrationen finden [17, 18]. Die für diese hohe Akkumulation verantwortlichen Mechanismen sind unbekannt. Neben der passiven Aufnahme über den Transpirationsstrom ist auch eine aktive Aufnahme über Transporter möglich. Insbesondere ist die Aufnahme von Anionen durch Zellen dem elektrochemischen Gradienten entgegengerichtet [19], was auf eine aktive Aufnahme hindeutet. Normalerweise können Pflanzen daher Anionen, die Nährstoffen in Größe und Ladung nicht ähneln, von der Aufnahme ausschließen. Als mögliche Kandidaten für die aktive Aufnahme von Technetium gelten Phosphat-, Sulfat-, Nitrat- und Chloridtransporter. Chemisch sind die Mikronährstoffe Mangan und Molybdän dem Technetium am ähnlichsten, wobei Mangan von der Pflanze als

2.1 Verwendete Radionuklide

Kation (Mn^{2+}) aufgenommen wird. Die Transportwege des Mangans sind deshalb nur von geringer Relevanz für Technetium. Ähnlich wie Chlorid könnte Per Technetat auch von der Pflanze als Gegenionen des Kaliums für das Ruhemembranpotential der Zelle verwendet werden [20, 21].

2.1.2 Rhenium

Rhenium (Re) hat die Ordnungszahl 75 und gehört ebenfalls zu den Übergangsmetallen. Von 41 bekannten Isotopen des Rheniums kommen zwei natürlicherweise vor, ^{185}Re (37,4 %) und ^{187}Re (62,6 %) [5]. In der Erdkruste kommt Rhenium mit einem Anteil von circa 1 ppb ($1 \text{ ppb} \hat{=} 10^{-6} \text{ g/kg}$) sehr selten vor [22].

Rhenium kann die Oxidationsstufen $-III$ und $-I$ bis VII einnehmen [13], aufgrund der ähnlichen chemischen Eigenschaften kann es dabei als Homolog zu Technetium eingesetzt werden [22]. Insbesondere die Aufnahme und makroskopische Verteilung des Perrhenats durch Pflanzen ist der von Per Technetat sehr ähnlich [23, 21].

2.1.3 Iod

Iod (I) hat die Ordnungszahl 53 und gehört zu den Halogenen. Es existieren 38 bekannte Isotope von Iod, von denen lediglich ^{127}I stabil ist [5]. In deutschen Böden kommt Iod in Konzentrationen von ungefähr 3 ppm ($1 \text{ ppm} \hat{=} 10^{-3} \text{ g/kg}$) vor [24].

Das in Boden natürlich vorkommende Iod, wobei es sich meist um das langlebige ^{129}I und zu größten Teilen um das stabile ^{127}I handelt, stammt primär aus dem Tiefenwasser und aus der Atmosphäre. Kosmogenes Iod entsteht bei der Interaktion von energiereichen Teilchen der kosmischen Strahlung mit Xenon in der oberen Atmosphäre. Geogenes Iod, das bei der Spontanspaltung des ^{238}U entsteht, und der menschliche Einfluss durch landwirtschaftliche Düngung liefern bei der Verwitterung von Gestein weitere Anteile zum Iodinventar von Böden [25]. Vor allem die Emission durch Wiederaufbereitungsanlagen oder Reaktorunfälle sind anthropogene Quellen von radioaktivem Iod in der Umwelt. ^{129}I stellt dabei mit einer Halbwertszeit von circa 15,7 Millionen Jahren ein Langzeitrisiko dar, während ^{131}I wegen seiner kurzen Halbwertszeit von acht Tagen eine hohe spezifische Aktivität aufweist. Beide sind daher von besonderer Relevanz [26]. Im menschlichen Körper wird Iod größtenteils

2 Grundlagen

in der Schilddrüse eingelagert, weshalb von radioaktiven Iodisotopen ein erhöhtes Risiko für Schilddrüsenkrebs ausgeht [26].

Die Oxidationszustände $-I$, $+V$ und das molekulare I_2 sind in Umweltumgebungen am relevantesten. In flüssigen Umgebungen ist Iodid (I^-) die häufigste Iodspezies, wobei es in stark oxidierenden Umgebungen auch als Iodat (IO_3^-) vorliegen kann [27].

Aufnahme von Iod durch Pflanzen

Pflanzenphysiologisch wird Iod klassischerweise nicht den Makro- beziehungsweise Mikronährstoffen zugeordnet [19], dennoch scheint Iod in gewissem Maße Einfluss auf pflanzliche Funktionen zu nehmen. So wurde eine verstärkte Biomasseproduktion bei geringer Zugabe von Iod im Vergleich zu Pflanzen, die nahezu ohne Iod aufgezogen worden waren, festgestellt. Zudem scheint Iod einen Einfluss auf die Antioxidantienreaktion und generelle Abwehrreaktion gegenüber biotischem und abiotischem Stress zu haben [28, 29, 30]. Der Transport von Iod innerhalb der Pflanze scheint dabei teilweise über die gleichen Anionentransportkanäle wie die von Chlorid möglich zu sein [31].

2.2 Pflanzen

2.2.1 Aufbau

Die Grundorgane Sprossachse, Wurzel und Blatt charakterisieren den als Kormus bezeichneten Vegetationskörper der Farn- und Samenpflanzen. Diesem nicht zuordenbare Vegetationskörper verschiedener anderer Pflanzen werden zusammenfassend als Thalli bezeichnet. Nach der Keimung beginnt die Pflanze mit der Entwicklung des Spross- und Wurzelsystems. Entlang der wachsenden Sprossachse bilden sich die verschiedenen Blätter der Blattfolge aus. Auf die anfänglichen Keimblätter folgen Übergangsblätter und zuletzt die Laubblätter der Pflanze, die als Assimilatoren und Transpiratoren dienen. Den Abschluss der Sprossachse bilden die Blüten, bei denen es zu starken Veränderungen der Blattfunktionen kommt, wie der Bildung von Staub- und Blütenblättern [19].

Die Sprossachse kann in unterschiedliche Gewebetypen unterteilt werden. Im primären Zustand bildet das Markparenchym, das aus Speichergewebe oder abge-

storbenen, gasgefüllten Zellen besteht, das Zentrum der Sprossachse. Die einzelnen Leitbündel sind durch Markstrahlen getrennt und bestehen aus Xylem, welches sich radial innen befindet, und Phloem, das radial außen positioniert ist. Leitbündel von Sprossachsen und Wurzeln bilden ein zusammenhängendes System, die Stele. Häufig wird das Leitbündel noch vom Sklerenchym umgeben, das als Festigungsgewebe dient. Der gesamte Leitbündelkranz wird zudem oftmals von der Sprossendodermis, einem einschichtigen Abschlussgewebe, umschlossen. Zwischen Leitbündelkranz und Epidermis, die den Abschluss nach außen bildet und zusammen mit der Rinde als Cortex bezeichnet wird, befindet sich das Rindenparenchym [19, 32]. Dieser hier beschriebene grobe Querschnitt kann dabei erheblich variieren und ist schematisch an einem eigens präparierten Schnitt in Abbildung 2.2 dargestellt.

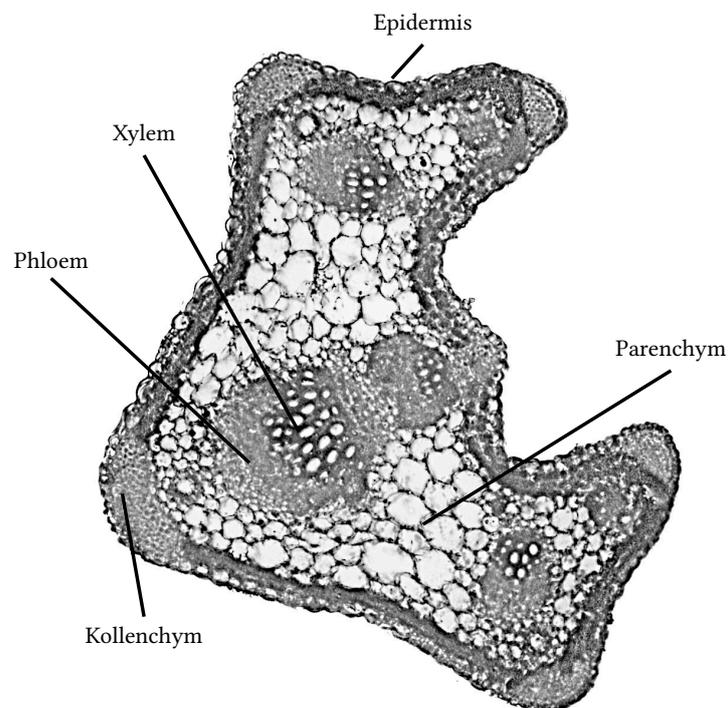


Abbildung 2.2: Querschnitt durch den Blattstiel von *Daucus carota*. Die verschiedenen Gewebetypen und die für Dikotylen typische radiale Anordnung der Leitbündel sind sichtbar.

2 Grundlagen

Leitgewebe

Bei größeren Vielzellern reicht Diffusion nicht aus, um gelöste Stoffe im Organismus zu verteilen. Daher bilden Pflanzen spezielle Leitsysteme aus. Dabei existieren zwei unterschiedliche Gewebearten in allen Pflanzen: das Phloem, das für den Transport organischer Stoffe verantwortlich ist und aus dünnwandigen, unverholzten, kernlosen Zellen (Siebzellen) aufgebaut ist, und das Xylem, durch das Wasser mit den darin gelösten anorganischen Ionen strömt und das aus abgestorbenen Zellröhren mit verholzten Wänden besteht. Der Transport des Wassers findet dabei über den sogenannten Transpirationsstrom und den Wurzeldruck statt. Wasser verdunstet an der vergleichsweise großen Blattoberfläche und erzeugt so einen Unterdruck beziehungsweise einen osmotischen Druck, die zu einem Sog und somit zum Wassertransport führen [19, 32].

Das Leitgewebe ist in Leitbündeln konzentriert, welche in Sprossachsen und Blättern ein Netzwerk bilden. In den Wurzeln ist jedoch nur ein einzelnes radiales Leitbündel vorhanden. Es existieren verschiedene Bündeltypen mit unterschiedlichen Anordnungen. Bei geschlossenen Leitbündeln grenzen Xylem und Phloem unmittelbar aneinander, bei offenen Leitbündeln ist zwischen Xylem und Phloem ein faszikuläres Kambium eingeschoben, das für das sekundäre Dickenwachstum entscheidend ist [19, 32]. Der Querschnitt eines Leitbündels ist in Abbildung 2.3 zu sehen.

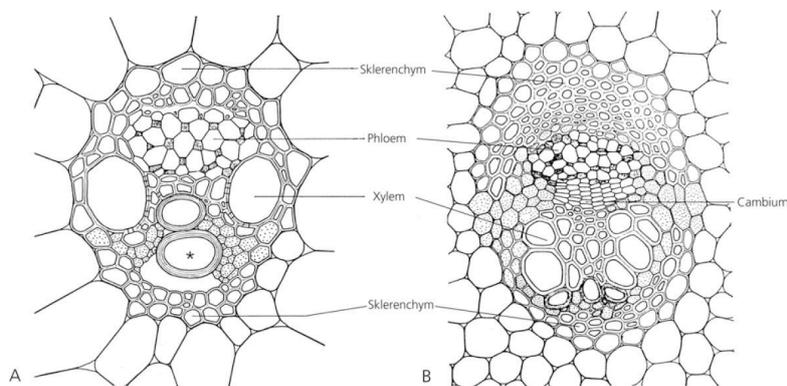


Abbildung 2.3: Querschnitt durch geschlossenes Leitbündel von *Zea mays* (A) und offenes Leitbündel von *Ranunculus repens* (B). Aus [19].

Parenchym

Das Parenchym stellt als Grundgewebe das am geringsten spezialisierte Gewebe der Pflanze dar. Die Hauptmasse des Gewebes krautiger Pflanzen besteht aus dem Parenchym. Mit seiner fehlenden Spezialisierung kann es bei Bedarf eine Vielzahl von Funktionen erfüllen. So können Parenchyme als Speichergewebe organischer Stoffe oder des Wassers, als Durchlüftungsgewebe für den Gasaustausch oder der Photosynthese dienen [19, 32].

Endodermis

An Endodermen unterscheiden sich außen und innen angrenzende Gewebe stark. Sie werden immer in der Wurzel und teilweise in Sprossachse oder Blatt ausgebildet und liegen zwischen Rinde und Zentralzylinder. Im primären Zustand werden die radialen Zellwände als Casparischer Streifen bezeichnet, der die Wasserleitfähigkeit der Zellwand in radialer Richtung deutlich reduziert und damit den apoplastischen Diffusionsweg verhindert. Wasser und darin gelöste Stoffe, die durch das Parenchym bis zur Endodermis diffundieren, können daher nur symplastisch, das heißt durch die Zellen, durch den Casparischen Streifen gelangen, was zu einer selektiven Aufnahme führt [19, 32].

Festigungsgewebe

Größere Gewächse sind Zug- und Druckbelastungen ausgesetzt, die die Ausbildung zusätzlicher Festigungsgewebe notwendig machen. Durch cellulosereiche Zellwände, die zu besonders dichtem Gewebe angeordnet sind, kann eine hohe Festigkeit erreicht werden. Das Kollenchym ist das Festigungsgewebe krautiger oder wachsender Pflanzen. Es besteht aus lebenden sowie wachstums- und teilungsfähigen Zellen. Eine Lignifizierung dieser Zellen, das heißt eine Einlagerung von Lignin in den Zellwänden, findet nicht statt. In ausgewachsenen Pflanzenteilen tritt zudem das Sklerenchym auf. Es existiert in der Form sogenannter Steinzellen und Sklerenchymfasern. Sklerenchymfasern können dabei, je nach Art der Beanspruchung, unverholzt bleiben oder lignifizieren [19, 32].

2 Grundlagen

2.2.2 *Daucus carota*

Die Möhre (*Daucus carota*) ist eine zweijährige, krautige Pflanzenart der Familie der Doldenblütler (*Apiaceae*). Die Fortpflanzung findet über Samen, die Überwinterung entweder über Samen oder als Pfahlwurzel statt. Eine Überwinterung blühender Pflanzen wurde bisher nicht beobachtet. *Daucus carota* bildet eine schlanke Pfahlwurzel aus, die einen Radius von mehreren Zentimetern erreichen kann. Die Blätter der basalen Blattrosette erreichen eine Länge von 5 - 40 cm, sind dreifach gefiedert und regelmäßig unterteilt. Der Blütenstängel erreicht eine Höhe von bis zu 1,2 m und bildet Blätter an Blattscheiden aus. Die Doppeldolden bestehen zumeist aus über 1000 weißen Blüten und wandeln sich in ihrer Form von konvex zu einem flachen Kreis nach der Bestäubung und schließlich konkav während der Reifung der Frucht. *Daucus carota* kann bis zu 100 Dolden während der Blütezeit produzieren [33].



Abbildung 2.4: *Daucus carota*, Illustration. Aus [34].

2.2.3 *Pisum sativum*

Bei der Erbse (*Pisum sativum*) aus der Familie der Hülsenfrüchtler (*Fabaceae*) handelt es sich um eine einjährige, krautige Pflanze. Sie bildet eine dünne Hauptwurzel mit wenigen, sich zur Seite ausbreitenden Nebenwurzeln aus. An den Seitenwurzeln bilden sich wegen der Symbiose mit dem Bakterium *Rhizobium leguminosarum* zahlreiche Knöllchen, die bei der Bindung von Stickstoff helfen. Der Stängel kann über 2 m lang werden und dabei entweder niederliegend kriechen oder klettern. Die Pflanze bildet ein bis drei Paar Laubblätter an einer Blattspindel, die in einer drei- bis fünfästigen Ranke ausläuft. Die Form der Blätter reicht dabei von keilförmig bis breitoval, von abgerundet bis wenig gezahnt. *Pisum sativum* besitzt herzförmige Nebenblätter, die bis zu 10 cm lang und 4 cm breit werden können. An den Blattachseln stehen die traubigen Blütenstände, die aus jeweils ein bis drei Blüten bestehen, an abstehenden Stielen. Es finden sich Kelchzähne an den glockigen Blütenkelchen. Nach der Befruchtung bilden sich 3 - 12 cm lange Hülsen, die vier bis zehn Samen enthalten [35].



Abbildung 2.5: *Pisum sativum*, Illustration. Aus [34].

2.3 Kryokonservierung

Neben den bisher beschriebenen Grundlagen der betrachteten Radionuklide, Morphologie und Pflanzenanatomie ist ebenso der theoretische Hintergrund einiger in dieser Arbeit verwendeten Techniken von Relevanz.

Das Einfrieren von Gewebe und Zellen ist normalerweise tödlich für diese. Sowohl physische Beschädigungen durch sich bildende Eiskristalle als auch sekundäre Effekte, die aus der veränderten Zusammensetzung der flüssigen Phase während des Einfriervorgangs resultieren, können für die Gefrierschädigungen verantwortlich sein [36]. Neben dem für die Zelle gefährlichen intrazellulären Eis ist für vielzellige Strukturen wie Gewebe auch das strukturfährdende extrazelluläre Eis schädigend. Um Schäden zu verringern, kann auf Gefrierschutzmittel zurückgegriffen werden. Dabei wird zwischen penetrierenden Gefrierschutzmitteln, die in die Zelle eindringen können, und nicht-penetrierenden Gefrierschutzmitteln, die durch osmotische Dehydratation den Wassergehalt in der Zelle senken, unterschieden. Oftmals werden dabei beide Arten von Gefrierschutzmitteln kombiniert [37].

Neben den verwendeten Gefrierschutzmitteln hat ebenso die Einfriergeschwindigkeit einen Einfluss auf die Eiskristallbildung und Dehydratation der Zelle. In Kombination mit der osmotischen Konzentration der die Zelle umgebenden Flüssigkeit kontrolliert die Gefriergeschwindigkeit die Dehydratation der Zelle während des Einfriervorgangs und damit die Konzentration des potenziell schädlichen intrazellulären Salzes. Zu schnelles Einfrieren hingegen verhindert, dass Wasser die Zelle verlassen kann, und erhöht damit die Menge an zellschädigendem Eis [36].

Vitrifikation

Die Vitrifikation (lat. *vitrum* Glas) von Zellen ist eine weitere Möglichkeit des Gefrierschutzes. Dabei bezeichnet Vitrifikation das Festwerden einer Flüssigkeit ohne Kristallbildung, wobei ein amorpher Zustand erreicht wird. Dies kann durch den Einsatz hochkonzentrierter Gefrierschutzmittel und osmotischer Dehydratation erreicht werden. Die nötige Temperatur, unterhalb der keine Kristallbildung mehr stattfindet, wird als Glasübergangstemperatur T_g bezeichnet und liegt üblicherweise bei unter -90 °C für typische Vitrifikationslösungen [38]. Eine hohe Abkühl- und Auftaurate

ist daher nötig, um Eiskristallbildung bei zwischenzeitig höheren Temperaturen zu verringern [39].

2.4 Massenspektrometrische Methoden

2.4.1 TOF-SIMS

Bei der „Sekundärionenflugzeitmassenspektrometrie“ (engl. *time-of-flight secondary ion mass spectrometry*, TOF-SIMS) handelt es sich um eine orts aufgelöste Analyse-methode, bei der die durch den Beschuss der Probenoberfläche mit Primärionen entstehenden Sekundärionen anhand des Masse/Ladung-Verhältnisses mittels eines Flugzeitmassenspektrometers identifiziert werden können.

Sekundärionenmassenspektrometrie

Die Sekundärionenmassenspektrometrie verwendet einen fokussierten Primärionenstrahl, der zur Analyse auf die Probenoberfläche gerichtet wird. Die Primärionen treten in Wechselwirkung mit der Probe, es entstehen Sekundärteilchen, die zum Teil ionisieren. Der Prozess des Bestäubens einer Oberfläche mit Atomen, wie es bei der TOF-SIMS durch den Primärionenstrahl geschieht, wird auch als Sputtern (engl. *to sputter* zerstäuben) bezeichnet [40].

Der Betrieb des Primärionenstrahls kann sowohl gepulst als auch kontinuierlich erfolgen, wobei die Verwendung eines Flugzeitmassenspektrometers einen gepulsten Betrieb voraussetzt. Andernfalls variiert die Flugstrecke der Sekundärionen aufgrund ihrer mit der Zeit anwachsenden räumlichen Verteilung stark und reduziert so das Auflösungsvermögen des Massenspektrometers deutlich. Das Auflösungsvermögen $m/\Delta m$, wobei m die Masse des Ions und Δm den minimalen auflösbaren Massenunterschied zweier Ionen bezeichnet, ist dabei Maß für die Güte des Massenspektrometers, da es bestimmt, ob zwei benachbarte Massepeaks noch getrennt werden können. Die Massenauflösung ist bei der TOF-SIMS negativ korreliert mit der Pulslänge des Primärionenpulses, während die laterale Auflösung mit der Pulslänge steigt. Wird die Extraktion der Sekundärionen jedoch verzögert (delayed extraction), kann die Massenauflösung von der Primärionenpulslänge entkoppelt und damit eine zeitgleich hohe laterale und Massenauflösung erreicht werden. Zudem wird, abhängig vom

2 Grundlagen

Primärionenstrom, zwischen dynamischer (Tiefenprofilierung durch Abtragen von Oberflächenschichten) und statischer (Oberflächenanalyse) SIMS unterschieden [40, 41].

Flugzeitmassenspektrometrie

Die massenbedingten Flugzeiten der Sekundärionen können zur Separation dieser verwendet werden. Dazu werden die Sekundärionen durch ein elektrisches Feld extrahiert. Da sie aufgrund ihres gleichen Entstehungsortes dieselbe Flugstrecke zurücklegen müssen, erhalten sie bis zum Ende des Extraktionsprozesses die folgende kinetische Energie:

$$E_{kin} = \frac{1}{2}m \cdot v^2 = q \cdot U,$$

wobei U die Extraktionsspannung, m die Masse, v die Geschwindigkeit und q die Ladung des Sekundärions bezeichnet.

Nach der Extraktion werden die Teilchen auf eine feldfreie Strecke gelenkt, auf der sich die Ionen während ihres Drifts aufgrund der unterschiedlichen Flugzeiten in ihre Masse/Ladung-Verhältnisse trennen. Die Geschwindigkeit der Sekundärionen ist dann:

$$v = \frac{d}{t_{Flugzeit}},$$

mit der Flugstrecke d und der Flugzeit $t_{Flugzeit}$. Die Flugzeit der Teilchen ergibt sich damit zu:

$$t_{Flugzeit} \propto \sqrt{\frac{m}{q}}.$$

Da die Ionen nach dem Sputterprozess keine scharf definierte Energie haben, sondern einer Energieverteilung gehorchen, ist die mögliche Auflösung reduziert. Um diesem entgegenzuwirken, kann ein Reflektron benutzt werden, das die Ionen mittels eines elektrischen Feldes abbremst und in die Gegenrichtung beschleunigt. Teilchen gleicher Masse, aber höherer kinetischer Energie dringen tiefer in das Feld ein und legen damit einen längeren Weg zurück. Auf diese Weise kann der Einfluss der Energieverteilung minimiert werden, da Teilchen mit gleicher Masse wieder zur gleichen Zeit detektiert werden [40]. Zuletzt treffen die Sekundärionen auf eine Mikrokanalplatte, wo sie Sekundärelektronen erzeugen, die anschließend vervielfacht und über eine

2.4 Massenspektrometrische Methoden

Strommessung an einer Anode detektiert werden. Die möglichen Nachweisgrenzen, die mit einer TOF-SIMS erreicht werden können, liegen im ppm- bis ppb-Bereich [42]. Der schematische Aufbau einer TOF-SIMS ist in Abbildung 2.6 gezeigt.

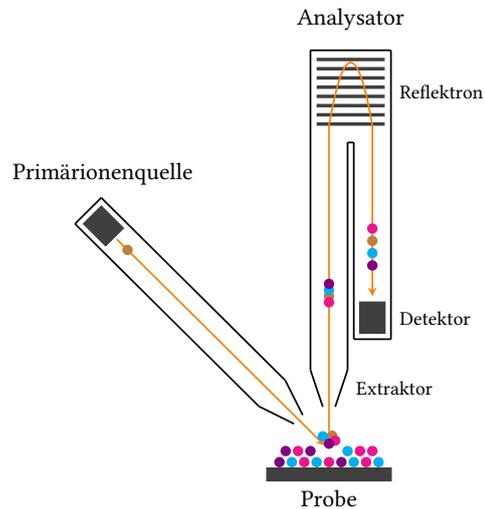


Abbildung 2.6: Schematischer Aufbau der TOF-SIMS. Die auf der Probe durch den Primärionenstrom erzeugten Sekundärionen werden im TOF-Analysator bezüglich ihres Masse/Ladung-Verhältnisses getrennt, bevor sie an den Detektor gelangen.

rL-SNMS

Im Fall der „Laserresonanz-Sekundärneutralteilchenmassenspektrometrie“ (engl. *resonant laser secondary neutral mass spectrometry*, rL-SNMS) werden die erzeugten Sekundärionen durch Anlegen eines elektrischen Feldes am Extraktor zunächst unterdrückt. Um die verbleibende Wolke aus Neutralteilchen extrahieren zu können, müssen die darin enthaltenen Teilchen nachionisiert werden. Dazu werden auf elementspezifische Anregungsschemata abgestimmte Laser verwendet. Auf diese Weise wird eine Unterdrückung des Untergrunds und isobarer Interferenzen um mehrere Größenordnungen ermöglicht [43].

Zum Erreichen der spezifischen Nachionisation gibt es prinzipiell verschiedene Möglichkeiten. Ein Hüllenelektron kann beispielsweise in einen sogenannten Rydberg-

2 Grundlagen

Zustand angeregt werden, in dem das angeregte Elektron eine sehr große Hauptquantenzahl hat. Da ein solcher Zustand nah an dem Ionisationspotential liegt, reichen schon geringe Energien, wie beispielsweise durch elektromagnetische Felder oder Stöße mit anderen Teilchen, um das Atom zu ionisieren. Eine weitere Möglichkeit ist die Nutzung von Autoionisationszuständen, bei denen mehrere angeregte Hüllenelektronen, die in Summe eine größere Energie als das Ionisationspotential besitzen, ihre Energie auf ein einzelnes Valenzelektron übertragen und dieses damit in das Kontinuum anregen [44]. Ein Anregungsschema, das solche Autoionisationszustände nutzt, ist in Abbildung 2.7 dargestellt.

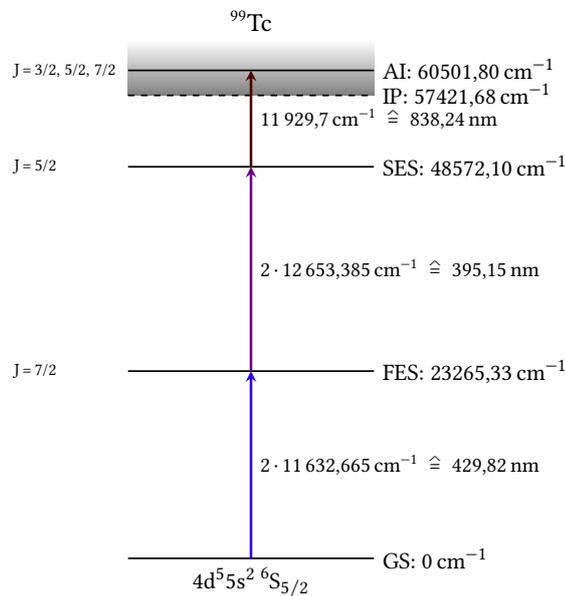


Abbildung 2.7: Anregungsschema des ^{99}Tc . Dargestellt sind Wellenzahl beziehungsweise die Wellenlänge der genutzten Laser für die Anregung eines Atoms aus dem Grundzustand (engl. *ground state*, GS) über den ersten Anregungsschritt (engl. *first excitation step*, FES), den zweiten Anregungsschritt (engl. *second excitation step*, SES) und schließlich den Autoionisationsschritt (engl. *autoionizing step*, AI) in das über dem Ionisationspotential (engl. *ionization potential*, IP) gelegene Kontinuum. Nach [45, 46].

Aufgrund der Selektivität der Resonanzionisation für die Atome eines Elements werden keine zusätzlichen Oxidationsstufen oder Moleküle resonant ionisiert. Trotzdem können diese durch Fragmentation beim Sputterprozess Beiträge zur atomaren Form des anzuregenden Elements liefern. Rückschlüsse auf in der Probe enthaltene Spezies lassen sich daher mit rL-SNMS nicht ziehen.

2.4.2 ICP-MS

Eine Methode, bei der ein in einer Probe enthaltenes Element anhand des Masse/Ladung-Verhältnisses identifiziert wird, ist die „Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma“ (engl. *inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS). Die Proben gelangen dabei als Aerosol in ein Argon-Plasma, das die in der Probe enthaltenen Teilchen atomisiert und teilweise ionisiert. Wie von Wolfgang Paul 1953 beschrieben, wird dann für die Separation von Teilchen bezüglich ihres Verhältnisses von Masse/Ladung mittels elektromagnetischer Felder beispielsweise ein Quadrupolfeld verwendet. Zwischen benachbarten Elektroden wird dabei eine Gleichspannung und eine Wechselspannung angelegt, sich gegenüberliegende Elektroden sind dabei stets auf dem gleichen Potential. In z-Richtung hat das Feld dann das Potential

$$\phi(x, y, t) = \frac{U + V \cdot \cos(\omega t)}{r^2} \cdot \frac{x^2 - y^2}{2},$$

wobei ω die Frequenz des Wechselfeldes und r den Abstand der Elektroden von der z-Achse bezeichnet. Mit der Ladung q und Masse m der Ionen und der elektrischen Feldstärke $\vec{E} = -\vec{\nabla}\phi$ ergeben sich die Bewegungsgleichungen für die Ionen im Feld der Elektroden (exemplarisch in einer Dimension für die x-Achse):

$$\begin{aligned} F &= m \cdot \ddot{x} = q \cdot E = -q \cdot \partial_x \phi \\ \Rightarrow \ddot{x} + \frac{q}{mr^2} [U + V \cdot \cos(\omega t)] \cdot x &= 0. \end{aligned}$$

Werden die Substitutionen $2\zeta = \omega t$, $\lambda = \frac{4qU}{mr^2\omega^2}$ und $\sigma = \frac{4qV}{mr^2\omega^2}$ [47] auf die Bewegungsgleichungen angewandt, so erhält die Bewegungsgleichung die Form einer Mathieuschen Differentialgleichung:

$$\frac{d^2x}{d\zeta^2} + (\lambda + \sigma \cdot \cos(2\zeta)) \cdot x = 0.$$

2 Grundlagen

Von Interesse sind die Stabilitätsbereiche dieser Lösung, das heißt bei solchen Parametern, bei denen die Ionen eine für die Messung ausreichend lange Zeit im Massenspektrometer verbleiben. Werden die Abzissen der Schnittpunkte der Geraden

$$\lambda = \pm(U/V) \cdot \sigma$$

mit dem Stabilitätsbereich als $\sigma_{1,2}$ bezeichnet, so muss $\sigma_1 \geq \sigma \geq \sigma_2$ sein, was dem durchgelassenen Massenbereich $m_1 \leq m \leq m_2$ entspricht. Als Grenzfälle werden dann entweder für $\sigma_2 = 0$ alle Massen $m > m_1$ oder für $\sigma_1 = \sigma_2$ nur genau eine Masse m durchgelassen. Die jeweilige Massenselektivität des Quadrupols wird also neben dem Anodenabstand und Frequenz der Wechsellspannung insbesondere über das Verhältnis U/V festgelegt [47]. In Abbildung 2.8 ist der erste Stabilitätsbereich der Mathieschen Differentialgleichung grafisch dargestellt.

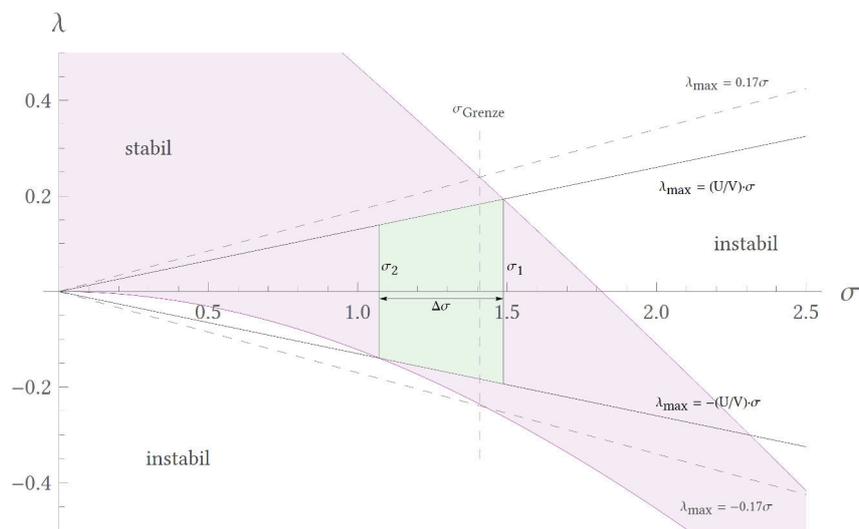


Abbildung 2.8: Erster Stabilitätsbereich der Mathieschen Differentialgleichung. Aus Symmetriegründen muss $\pm\lambda$ im Stabilitätsbereich liegen, weshalb die Wahl von λ durch λ_{\max} beschränkt ist. Für λ_{\max} liegt dann nur noch ein möglicher Wert für σ vor, σ_{Grenze} , was nur einer durchgelassenen Masse entspricht. Der Bereich durchgelassener Massen wird im Allgemeinen durch den Bereich $\Delta\sigma$ bestimmt. Nach [47].

2.4 Massenspektrometrische Methoden

Nachdem die Probe als Aerosol in das Argon-Plasma gelangt ist und anschließend wie beschrieben durch das Quadrupolfeld bezüglich des Masse/Ladung-Verhältnisses separiert wurde, muss zuletzt noch eine Detektion der transmittierten Ionen stattfinden. Dazu findet eine Signalverstärkung der transmittierten Ionen über einen Sekundärelektronenvervielfacher statt. Der dabei entstehende Strom wird gemessen und intern in eine Anzahl gemessener Ereignisse umgerechnet, die anschließend ausgegeben wird. Der schematische Aufbau einer Quadrupol-ICP-MS ist in Abbildung 2.9 dargestellt.

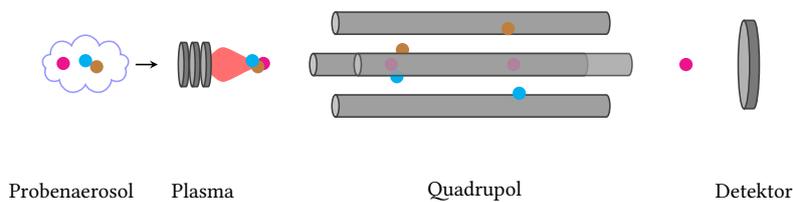


Abbildung 2.9: Schematischer Aufbau der ICP-MS. Die durch das Plasma erzeugten Ionen werden im Quadrupol-Analysator nach ihrem Masse/Ladung-Verhältnis getrennt, bevor sie an den Detektor gelangen.

Für eine Quadrupol-ICP-MS beträgt das Auflösungsvermögen $m/\Delta m \sim 300$ [48]. Isobare Interferenzen, das heißt verschiedenartige Ionen, die ein nahezu gleiches Masse/Ladung-Verhältnis aufweisen, können daher durch den Quadrupol nicht voneinander separiert werden und beeinträchtigen damit die Nachweisgrenze. Die möglichen Nachweisgrenzen, die mit der ICP-MS erreicht werden können, liegen im ppt-Bereich [49].

LA-ICP-MS

Bei der „Laserablationsmassenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma“ (engl. *laser-ablation inductively coupled plasma mass spectrometry*, LA-ICP-MS) handelt es sich um eine orts aufgelöste Analysemethode, bei der mittels eines Lasers Material von einer Probe abgetragen und in ein Massenspektrometer geleitet wird.

Bei Pulslängen im Bereich von Nanosekunden wird die Probenoberfläche durch einen Laser für die Dauer des Pulses aufgeheizt. Da die Wärmeleitung die Energie des Laserpulses nur langsam in das gesamte Volumen transportieren kann, konzentriert sich diese auf eine dünne Schicht und führt zu hohen Temperaturen an der Oberfläche,

2 Grundlagen

weshalb es zum schlagartigen Verdampfen des Materials kommt. Bei Pulslängen im Bereich von Femtosekunden ist die Abkühldauer des Elektronensubsystems länger als die Pulsdauer des Lasers. Die Elektron-Gitter-Kopplung kann daher für die Dauer des Pulses vernachlässigt werden, was zu einer nicht-thermischen Ablation des Materials führt [50].

Das abgetragene Probenmaterial wird durch Argon oder Helium als Hilfsgas anschließend in ein Massenspektrometer, zum Beispiel wie im Fall dieser Arbeit in eine Triple-Quadrupol-ICP-MS, geleitet. Da die vorliegende Matrix von Bedeutung beim Abtragen der Probe ist, müssen Kalibrierstandards derselben Matrix vorliegen. Aufgrund dieser Problematik ist die Laserablation oftmals nur semiquantitativ nutzbar [49].

3 Vorbereitung der Pflanzenexperimente

3.1 Böden

Für die innerhalb des Projektes TRANS-LARA durchgeführten Versuche wurden vier verschiedene Referenzböden (RefeSol 01-A, 02-A, 03-G, 04-A) des Fraunhofer-Instituts für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (IME) genutzt. Zusammen mit acht weiteren wurden diese durch das Fraunhofer-Institut aus einem deutschlandweiten Satz von Flächen mit typischen Böden als Referenzen ausgewählt. Das verwendete Material stammte aus dem Oberboden (0 - 30 cm) landwirtschaftlich genutzter Böden: Die zusätzliche Bezeichnung A und G im Namen der jeweiligen Referenzböden bezeichnet dabei die Nutzung als Acker (A) beziehungsweise Grünland (G) [51].

RefeSol 01-A und 03-G repräsentieren im Projekt TRANS-LARA zwei Böden im derzeitigen Zustand, während hypothetische Entwicklungszustände unter veränderten klimatischen Bedingungen (warm-feucht beziehungsweise kalt-feucht) von RefeSol 02-A und 04-A abgebildet werden.

Für die Pflanzenexperimente innerhalb dieser Arbeit wurde primär RefeSol 03-G aufgrund seiner hohen Wasserhaltekapazität und Strukturstabilität sowie der damit einhergehenden vereinfachten, schnelleren und zuverlässigeren Pflanzenaufzucht verwendet. Zudem wurde eine Reihe von Möhren in RefeSol 01-A aufgezogen, um einen Einfluss des Bodens auf die laterale Verteilung der Radionuklide innerhalb der Pflanze zu untersuchen. Die Parameter der verwendeten Böden sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

3 Vorbereitung der Pflanzenexperimente

Tabelle 3.1: Bodenparameter der zwei Referenzböden RefeSol 01-A und 03-G. Analyse durch IRS (Korngrößenverteilung, pH, C_{org} und KAK_{eff}) und Fraunhofer-Institut (WHK und N); Textur nach DIN ISO 11277, C_{org} nach Din ISO 10694.

RefeSol	01-A	03-G
Bodentyp	Braunerde	Braunerde
Sand [%]	74,8	26,8
Schluff [%]	20,7	52,6
Ton [%]	4,5	20,5
C _{org}	0,98	4,22
pH _{CaCl₂}	5,8	5,9
KAK _{eff} [mmol/kg]	39,1	132,3
WHK [g/kg]	293	734
N [g/kg]	0,79	3,65

3.2 Pflanzenaufzucht

3.2.1 *Daucus carota*

Samen von *Daucus Carota* subsp. *sativus* „Adelaide“ wurden in Polypropylentöpfen eines Durchmessers von 18 cm ausgesät, die jeweils mit ungefähr 1,5 kg RefeSol 01-A oder RefeSol 03-G befüllt worden waren. Die Töpfe befanden sich für die Dauer der Versuche innerhalb einer Phytokammer (ThermoTEC, Parameter siehe Tabelle 3.2), in der Luftfeuchtigkeit, Temperatur und Belichtung kontrolliert werden konnten. Nach der Aussaat wurde die Erde feucht gehalten, indem alle zwei Tage mit circa 30 mL Wasser vorsichtig gegossen wurde. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde zudem über das Wochenende eine Plastikfolie über die mit RefeSol 01-A gefüllten Töpfe gezogen. Die ersten Keimlinge waren nach neun Tagen zu beobachten. Nach einem Monat wurde die Gießmenge auf circa 250 mL alle zwei Tage erhöht und die Anzahl der Pflanzen pro Topf auf zehn bis zwölf reduziert, um einen ausreichenden Platz für das Wachstum zu ermöglichen.

3.2.2 *Pisum sativum*

Für die Anzucht von *Pisum sativum* subsp. *sativum* „Boogie“ wurden Samen in mit feuchtem Sand gefüllte Torftöpfe gesetzt. Nach etwa zehn Tagen waren fast alle Pflanzen gekeimt. Eine Woche später wurden alle gekeimten Pflanzen aus den Torftöpfen geholt, anhaftender Sand abgewaschen und die Wurzeln abgetrocknet. Anschließend wurden die Pflanzen in mit 250 g feuchten Boden gefüllten Polypropylentöpfen (Durchmesser: 8 cm) gepflanzt. Diese befanden sich für die Dauer der Experimente innerhalb einer Phytokammer (ThermoTEC, Parameter siehe Tabelle 3.2). Wurden die Erbsen so groß, dass diese sich nicht mehr selbstständig aufrecht halten konnten, so wurden sie an Plastikstäben aufgebunden.

Tabelle 3.2: Parameter der Pflanzenaufzucht.

Parameter Tag/Nacht		
Dauer	Temperatur	relative Luftfeuchtigkeit
16 h/8 h	20 °C/15 °C	55-60 %

Hydrokultur

Um Pflanzen in Hydrokultur zu kultivieren, wurden Samen von *Pisum sativum* subsp. *sativum* „Boogie“ für 24 Stunden abgedunkelt in Wasser eingeweicht. Anschließend wurden sie für weitere 48 Stunden unter Ausschluss von Licht in ein feuchtes Tuch eingewickelt. Daraufhin wurden die Keimlinge für zwei Wochen in mit circa 1,5 L „high-phosphate“ Hoagland-Lösung gefüllte Plastikgefäße gesetzt, sodass die Wurzeln stets Kontakt mit der Flüssigkeit hatten. Durch Schläuche wurde zudem Sauerstoff in die Lösung geleitet. Nach zwei Wochen wurde das Hoagland-Medium durch eine „low-phosphate“ Hoagland-Lösung ersetzt. Die Zusammensetzung der verwendeten Aufzuchtmedien ist in Tabelle 3.3 zu sehen.

3 Vorbereitung der Pflanzenexperimente

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien. Modifiziert nach [52].

Substanz Hoagland	Konzentration in $\mu\text{mol/L}$	
	„high-phosphate“	„low-phosphate“
KNO_3	1000	1000
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	300	300
$\text{MgSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	200	200
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	100	25
H_3BO_3	4,6	4,6
MnCl_2	0,65	0,65
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,032	0,032
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,028	0,028
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,077	0,077

3.2.3 Tracerapplikation

Zum Zeitpunkt der Tracerzugabe befanden sich die Pflanzentöpfe auf einem Sandbett in Glasschalen. Um eine möglichst homogene Verteilung innerhalb des Topfes und zwischen den Pflanzen zu realisieren und eine Aufnahme von unten, ähnlich wie bei einem Störfallszenario, nachzustellen, wurde der Tracer zusammen mit circa 100 mL Wasser in das Sandbett gegeben. Die Zugabe erfolgte in Form von Kaliumiodid, Ammoniumperrenat und Ammoniumpertechnetat. Rhenium und Iod wurden stets in der Menge von 1 mmol zugegeben, die zugegebene Aktivität an ^{99}Tc variierte zwischen den verschiedenen Experimenten zwischen circa 290 nmol und 8 μmol . Die für die rL-SNMS bestimmten Pflanzen wurden dabei sowohl mit Technetium als auch mit Rhenium getracert, um einen Vergleich zwischen beiden Nukliden an exakt denselben Schnitten zu ermöglichen. Eine Auflistung der verschiedenen Kombinationen aus Tracern, Pflanzen, Anbaumethoden und Messmethoden ist in Tabelle 3.4 zu sehen. Die Ernte erfolgte jeweils sieben Tage nach der Tracerapplikation, falls nicht anders beschrieben.

3.2 Pflanzenaufzucht

Tabelle 3.4: Übersicht der getracerten Pflanzen und zugehörigen Messmethoden. Die Zugabe erfolgte jeweils in Form von KI, NH_4TcO_4 und NH_4ReO_4 in 100 mL Wasser.

Versuchsreihe	Tracer	Art	Anbaumedium	Messmethode
Tc-Kinetik	287 nmol ^{99}Tc	<i>Daucus carota</i>	RefeSol 03-G	ICP-MS, LA-ICP-MS
seq. Extraktion	287 nmol ^{99}Tc	<i>Daucus carota</i>	RefeSol 03-G	ICP-MS
I-ortsaufgelöst	1 mmol I	<i>Daucus carota</i>	RefeSol 03-G	TOF-SIMS
	1 mmol I	<i>Pisum sativum</i>	RefeSol 03-G	
Re-ortsaufgelöst	1 mmol Re	<i>Daucus carota</i>	RefeSol 01-A	TOF-SIMS
Re-Hydrokultur	1 mmol Re	<i>Pisum sativum</i>	Hoagland Solution	TOF-SIMS, ICP-MS
Tc/Re-ortsaufgelöst	7,97 μmol ^{99}Tc /1 mmol Re	<i>Daucus carota</i>	RefeSol 03-G	rL-SNMS/TOF-SIMS, ICP-MS, LA-ICP-MS
	2,87 μmol ^{99}Tc /1 mmol Re	<i>Pisum sativum</i>	RefeSol 03-G	

4 Methodik

4.1 Probenvorbereitung zur orts aufgelösten Massenspektrometrie

Für die Herstellung dünner Gewebeschnitte wurde ein Kryomikrotom verwendet. Neben der tatsächlichen Herstellung der Schnitte musste das Gewebe vorher für das für die Herstellung notwendige Einfrieren vorbereitet und vor auftretenden Schäden geschützt werden.

4.1.1 Gefrierschutz von Pflanzengewebe

Um die beim Einfrieren von Gewebe entstehenden Gefrierartefakte zu verringern, wurden verschiedene Gefrierschutzmethoden getestet. Neben der Nutzung der *Cryobar* (-57 °C) des Kryomikrotoms (Cryostar NX50, Thermo Fisher Scientific) wurden Proben mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren und das Gewebe auf strukturelle Schäden überprüft.

Oftmals findet Aceton Verwendung bei der Fixierung von Gewebe [53]. Getestet wurde Aceton zur Dehydrierung des Gewebes vor dem Einfrieren [54] beziehungsweise die Dehydrierung der auf den Objektträgern befindlichen Schnitte während des Auftauvorgangs [55]. Bei Ersterem wurde das einzufrierende Gewebestück für circa 20 min in ein mit Aceton gefülltes Becherglas gegeben, bevor es von außen abgetrocknet und eingefroren wurde. Bei der zweiten Methode wurde der fertige Gewebeschnitt auf einen Objektträger aufgebracht, der anschließend für 10 min in ein mit Aceton gefülltes Becherglas gestellt wurde. Dieses war zuvor im Kryomikrotom auf -20 °C vorgekühlt worden. Die getesteten Protokolle sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Neben Aceton wurden Lösungen auf Basis von Saccharose und Glycerin als mögliche Gefrierschutzmittel getestet. Für die erste Methode wurde pflanzliches Gewebe

4 Methodik

Tabelle 4.1: Parameter der getesteten Fixierungsmethoden mit Aceton.

Protokoll	Fixierungsmittel	Temperatur	Dauer
vor Einfrieren (modif. nach [53])	Aceton (>99 %)	20 °C	20 min
nach Schneiden (modif. nach [54])	Aceton (>99 %)	-20 °C	10 min

für circa 30 min in einer wässrigen Lösung, bestehend aus 71,9 %_{w/v} Saccharose, eingelegt [56]. Zudem wurde eine weitere Gefrierschutzlösung, bestehend aus 4,6 %_{w/v} Glycerin und 13,7 %_{w/v} Saccharose in Wasser, getestet [57]. Zuletzt wurde eine Methode zur Vitrifikation getestet, bei der eine erste Lösung das Gewebe vor osmotischem Stress und vor Gefrierschäden schützt, während eine zweite hoch konzentrierte Lösung die Zellen anschließend dehydriert und die kritische Temperatur herabsetzt. Das nach Nishizawa et al. [39] modifizierte Protokoll bestand aus einer *loading solution*, die für 10 min angewandt wurde, und der sogenannten *Plant Vitrification Solution 3* (PVS3) für 30 min. PVS3 bestand dabei aus 50 %_{w/v} Saccharose und 50 %_{w/v} Glycerin in Wasser, als *loading solution* wurde wieder eine wässrige Lösung aus 4,6 %_{w/v} Glycerin und 13,7 %_{w/v} Saccharose verwendet. Alle Versuche fanden bei Raumtemperatur statt. Ein Überblick über die verwendeten Protokolle ist in Tabelle 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.2: Parameter der getesteten Gefrierschutzmethoden mit wässrigen Lösungen von Saccharose und Glycerin. Alle Protokolle wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Protokoll	Gefrierschutzmittel	Dauer
Griffiths et al. [56]	71,9 % _{w/v} Saccharose	30 min
Fatima et al. [57]	13,7 % _{w/v} Saccharose, 4,6 % _{w/v} Glycerin	30 min
modif. nach Nishizawa et al. [39]	13,7 % _{w/v} Saccharose, 4,6 % _{w/v} Glycerin + 50 % _{w/v} Saccharose, 50 % _{w/v} Glycerin	10 min 30 min

4.1.2 Herstellung von Gewebeschnitten

Die zu untersuchende Pflanze wurde nach der Ernte gesäubert und in circa 1 cm große Stücke unterteilt. Diese wurden anschließend nach den in Abschnitt 4.1.1 vor-

4.1 Probenvorbereitung zur orts aufgelösten Massenspektrometrie

gestellten Gefrierschutzprotokollen behandelt, um Gefrierschäden vorzubeugen. Nach der Gefrierschutzbehandlung wurden von außen anhaftende Reste der verwendeten Lösungen entfernt. In eine auf den Probenträger montierte Halterung wurde ein Gefrierschnittmedium (Richard-Allan Scientific™ Neg-50™) gefüllt und die Probe hineingegeben. Anschließend wurde der Probenträger mit der Halterung so in flüssigen Stickstoff getaucht, dass dieser keinen direkten Kontakt zum Gefrierschnittmedium hatte. Nachdem die Probe auf diese Weise eingefroren worden war, konnte die Halterung entfernt werden und der Probenträger in dem Kryomikrotom für ungefähr eine halbe Stunde akklimatisieren, bevor die Probe geschnitten und auf die Probenträger für die orts aufgelöste Massenspektrometrie aufgebracht wurde. Um die bei der Vitrifikation wichtige hohe Auftauration der Gewebeschnitte zu gewährleisten, wurden zudem die verwendeten Probenträger zuvor an ihrer Oberfläche erwärmt. Die Herstellung eines Gewebeschnittes wird in Abbildung 4.1 gezeigt.

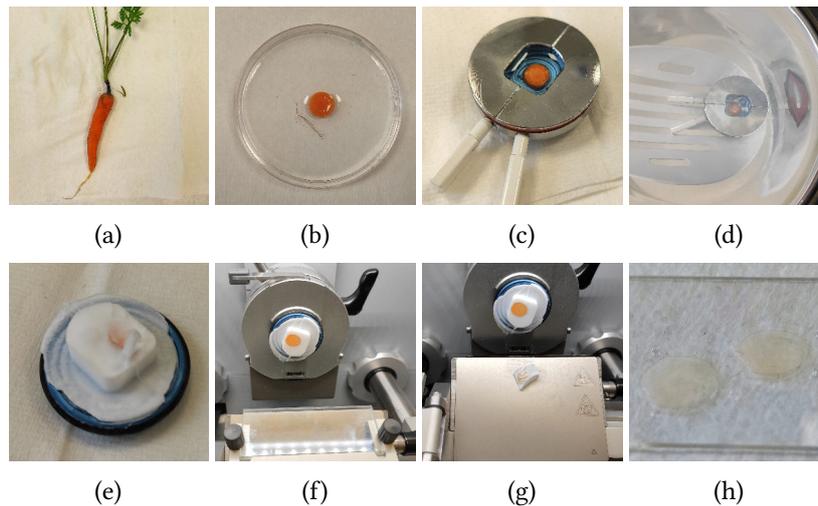


Abbildung 4.1: Herstellung von dünnen Pflanzenschnitten: Nach der Ernte (a) wird ein Teil der Probe gefriereschützt (b) und mittels einer Halterung in die Gefriermatrix gegeben (c). Die Halterung wird anschließend in flüssigen Stickstoff getaucht (d), bevor die Klammern wieder gelöst werden und eine fertig eingefrorene Probe vorliegt (e). Diese wird im Kryotom grob vorgeschnitten, bis keine Gefriermatrix mehr die tatsächliche Probe bedeckt (f) und ein dünner Schnitt gemacht werden kann (g), der auf einen Objektträger aufgebracht wird (h).

4.2 Kinetik der Technetiumaufnahme

Für die Kinetik der Technetiumaufnahme durch die Möhre wurden die verwendeten Pflanzen mit 290 nmol ^{99}Tc getracert. Anschließend wurden nach 2 h, 4 h, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 8 d, 10 d und 14 d Pflanzen geerntet. Von den geernteten Pflanzen wurde ein Stück der Pfahlwurzel sowie ein Stück des Blattstiels entnommen und gemäß des modifizierten Gefrierprotokolls nach Nishizawa et al. (siehe Tabelle 4.2) eingefroren. Das übrige pflanzliche Material wurde getrocknet und mit konzentrierter Salpetersäure für 30 min bei 160 °C zusammen mit 1 mL Re-Ausbeutetracer (1 ppm) in der Mikrowelle aufgeschlossen und im Anschluss unter der Heizlampe eingedampft. Daraufhin wurde die Probe in 0,1 mol/L HNO_3 aufgenommen und eine TEVA-Trennung durchgeführt. Dazu wurden „TEVA RESIN“-Kartuschen (Volumen: 2 mL, Partikelgröße: 50 - 100 μm) mit 10 mL 0,1 mol/L HNO_3 vorkonditioniert, die Probe anschließend auf die TEVA-Kartusche gegeben, zweimal mit 10 mL 0,1 mol/L HNO_3 gespült und zuletzt mit 20 mL 8 mol/L HNO_3 eluiert. Schließlich wurden die Proben erneut eingedampft, in 2 % HNO_3 aufgenommen, verdünnt und in der ICP-MS gemessen.

4.3 Sequentielle Extraktion von Technetium

Für die sequentielle Extraktion von Technetium aus der Möhre wurde ein nach Shi et al. [58] modifiziertes Extraktionsverfahren angewandt. Dazu wurden mit 290 nmol ^{99}Tc getracerte Pflanzen nach einem Monat geerntet, in Pfahlwurzel und Blatt unterteilt, gewaschen und zerkleinert. Das auf das Probenmaterial angewandte Extraktionsverfahren ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

Für den ersten Extraktionsschritt wurden die Proben mit Aceton ausgelaugt und anschließend zentrifugiert. Auf diese Weise sollten in der Pflanze enthaltene Pigmente extrahiert werden. Der Rückstand wurde nacheinander mit einer 0,05 mol/L tris-HCl Pufferlösung, die ebenso 1 %_{w/w} CaCl_2 enthielt, 0,2 mol/L HCl (60 °C), 0,3 mol/L Na_2CO_3 (60 °C) und 0,2 mol/L NaOH (60 °C) ausgelaugt. Nach jedem Extraktionsschritt wurde die Probe zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Dem Überstand nach der Extraktion mit 0,05 mol/L tris-HCl wurde zudem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis circa 95 % Sättigung hinzugegeben und so das enthaltene Protein ausgefällt. Dieses wurde durch Zentrifugieren vom restlichen Überstand getrennt, welcher anschließend abdekantiert

4.3 Sequentielle Extraktion von Technetium

wurde. Der nach der Extraktion mit Na_2CO_3 vorhandene Überstand wurde mit dem Überstand der NaOH-Extraktion zur alkalilöslichen Fraktion vereinigt. Alle Extraktionen wurden für vier Stunden mit 30 mL durchgeführt. Das Schema der sequentiellen Extraktion ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

Alle Proben wurden einem Mikrowellenaufschluss und einer darauf folgenden TEVA-Trennung unterzogen (siehe Abschnitt 4.2). Schließlich wurden sie erneut eingedampft, in 2 % HNO_3 aufgenommen, verdünnt und in der ICP-MS gemessen.

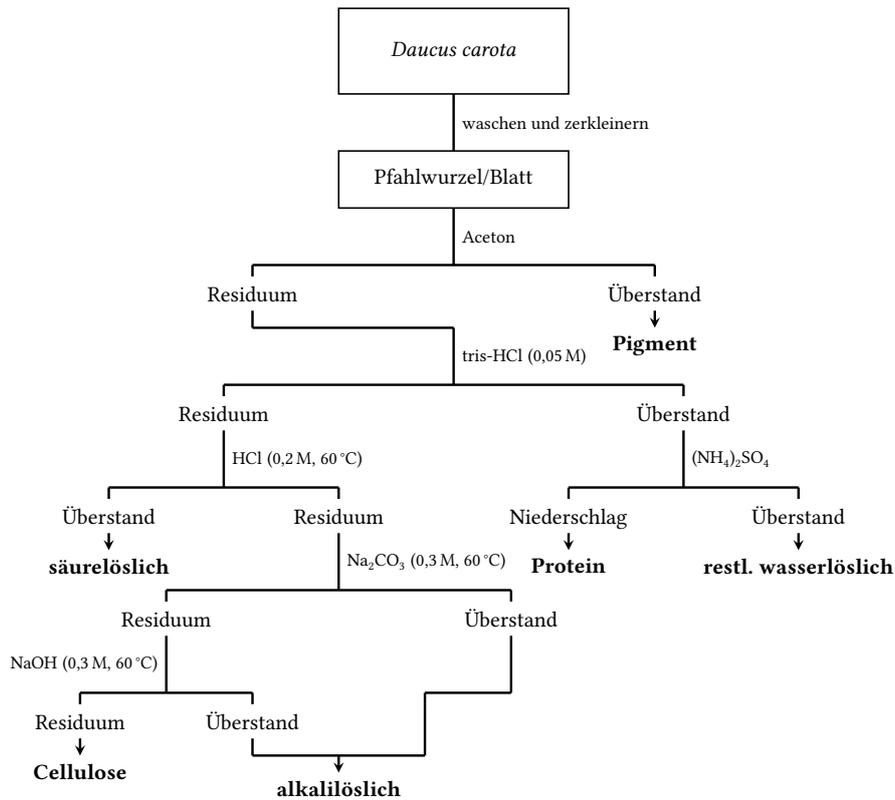


Abbildung 4.2: Schema der sequentiellen Extraktion von Technetium aus *Daucus carota*. Alle Extraktionen für vier Stunden mit 30 mL. Nach [58].

4.4 Rhenium in Hydrokultur

Sechs in Hydrokultur aufgezogene Erbsen wurden in mit 1 mmol Perrhenat getracerte „low-phosphate“ Hoagland gesetzt. Nach 48 h wurde die Hälfte der Pflanzen in ungetracerte „low-phosphate“ Hoagland-Lösung gesetzt und fünf Tage später geerntet. Das Probenmaterial wurde in der Mikrowelle aufgeschlossen und in 2 % HNO₃ mit der ICP-MS gemessen.

4.5 Ortsaufgelöste Massenspektrometrie

4.5.1 LA-ICP-MS

Für LA-ICP-MS-Messungen wurden Pflanzenschnitte einer Dicke von 30 µm auf Adhäsionsobjektträger (Superfrost Plus, Thermo Fisher Scientific) aufgebracht. Verwendet wurden dabei Proben aus der Versuchsreihe *Kinetik der Technetiumaufnahme* (siehe Abschnitt 4.2) und zwei Proben, die auch mittels rL-SNMS gemessen worden waren. Anschließend wurden die Objektträger auf den Probenhalter des Laserablationssystems (LSX-213 G2+, Teledyne) montiert, das an eine ICP-MS (8900 Triple Quadrupole ICP-MS, Agilent) gekoppelt wurde. Die Fluenz des Lasers betrug für die durchgeführten Messungen 2,04 J/cm², die Spotgröße 30 µm für Schnitte des Blattstiels und 200 µm für Schnitte der Pfahlwurzel der Möhre. Eine Auswertung der Messergebnisse fand mittels der Software HDIP (Teledyne) statt.

4.5.2 TOF-SIMS

Für TOF-SIMS-Messungen wurden Pflanzenschnitte einer Dicke von 10 µm auf Aluminiumblöcken aufgebracht. Die Messungen wurden an einer TOF.SIMS 5 (IONTOF GmbH) im negativen Extraktionsmodus mit einem 30 keV Bi₃⁺ Primärionenstrahl durchgeführt. Alle Messungen fanden mit einer Extraktionsverzögerung von 360 ns im „Fast Imaging“-Modus statt. Hierbei wurde üblicherweise eine laterale Auflösung von bis zu 300 nm (Definition Strahlradius: 16/84 % Transmission) bei einer Massenauflösung $m/\Delta m$ von ungefähr 5700 erreicht. Eine Verifikation der Messergebnisse fand im Fall von Iod über die Kalibration und eine Kontrollmessung eines ungetracerten

4.5 Ortsaufgelöste Massenspektrometrie

Pflanzenschnittes statt. Bei Rhenium konnte zudem das gemessene Isotopenverhältnis mit dem tatsächlichen Isotopenverhältnis abgeglichen werden.

4.5.3 rL-SNMS

Pflanzenschnitte einer Dicke von 10 μm wurden für rL-SNMS-Messungen auf Aluminiumblöcken aufgebracht. Durchgeführt wurden die Messungen an einer TOF.SIMS 5 (IONTOF GmbH) im positiven Extraktionsmodus mit einem 30 keV Bi_3^+ Primärionenstrahl, zudem wurde das Licht eines auf das Anregungsschema von ^{99}Tc abgestimmten Lasersystems des IRS Hannover [46] eingekoppelt. Alle Messungen fanden mit einer Extraktionsverzögerung von 600 ns und einer Extraktionsvorspannung („extraction bias“) von 500 V im „Fast Imaging“-Modus statt. Zu jeder resonanten Messung wurde eine Messung mit verstimmtem Lasersystem zur Verifikation der Ergebnisse vorgenommen. Die Parameter des Lasersystems sind in Tabelle 4.3 zu sehen.

Tabelle 4.3: Wellenzahl des ersten Anregungsschrittes (engl. *first excitation step*, FES), des zweiten Anregungsschrittes (engl. *second excitation step*, SES) und des Autoionisationsschrittes (engl. *autoionizing step*, AI) des resonanten und verstimmtens Lasersystems. Nach [46].

Laser	FES	SES	AI
resonant	12 033,285 cm^{-1}	13 029,97 cm^{-1}	13 346,86 cm^{-1}
verstimmt	12 035,285 cm^{-1}	13 029,97 cm^{-1}	13 346,86 cm^{-1}

4.5.4 Darstellung von Messdaten

Die Wahrnehmung von Daten bei der Darstellung mittels Bildern ist von den verwendeten Farbkarten abhängig. Unter Umständen kann sich die Interpretation der Daten mit den Farbkarten ändern. Daher wurden für alle Bilder der ortsaufgelösten Massenspektrometrie die Farbkarte *Magma* verwendet, die eine möglichst gleichmäßige Wahrnehmung über das gesamte Spektrum erzeugen soll. Die entsprechende Farbkarte ist in Abbildung 4.3 zu sehen.

4 Methodik

Die Darstellung der Messdaten von TOF-SIMS und rL-SNMS fand in *Python 3.8.5* mit dem Paket *Matplotlib 3.3.2* [59] statt. Dazu wurde jeweils eine Überlagerung aus Totalionenbild, dargestellt als Graustufenbild, und dem Sekundärionenbild des zu untersuchenden Masse/Ladung-Verhältnisses erzeugt.



Abbildung 4.3: Die für die Darstellung der orts aufgelösten Massenspektrometrie verwendete Farbkarte *Magma*.

4.6 Messunsicherheiten

4.6.1 ICP-MS

Die Nachweisgrenze des Analyten bei Messungen mit der ICP-MS wurde nach DIN 32645 [60] über die sogenannte „Leerwertmethode“ bestimmt. Berechnet wird diese über die Formel:

$$x_{\text{NG}} = \frac{s_{\text{L}}}{b} t_{n-1;\alpha} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}}.$$

Dabei bezeichnet x_{NG} die Nachweisgrenze, s_{L} die Standardabweichung der Messwerte der Leerprobe, b die Steigung der Kalibrationsgeraden, $t_{n-1;\alpha}$ einen Quantil der Studentischen t-Verteilung, n die Anzahl der Messungen bei der Bestimmung des Leerwerts und m die Anzahl der Messungen an der Analyseprobe. Die Erfassungsgrenze ergibt sich dann zu $x_{\text{EG}} = 2 x_{\text{NG}}$, die Bestimmungsgrenze zu $x_{\text{BG}} = 3 x_{\text{NG}}$. Hierbei wurde eine relative Ergebnisunsicherheit von $1/k = 1/3$ und als Signifikanzniveaus für den Fehler 1. und 2. Art $\alpha = \beta = 0,05$ gewählt.

Die Unsicherheit Δx_{M} des gemittelten Messwertes x_{M} mit der Standardabweichung s_{M} kann über die folgende Formel berechnet werden:

$$\Delta x_{\text{M}} = \frac{s_{\text{M}} \cdot t_{m-1;\alpha}}{\sqrt{m}}.$$

4.6.2 TOF-SIMS

Für die Verifikation der Rheniummessung in der TOF-SIMS anhand der Isotopenverhältnisse wurde neben den Peakflächen $I_{249,251}$ auf dem Masse/Ladung-Verhältnis von 249 und 251 ebenso der Maschinenuntergrund U_M auf 250,5, sowie das arithmetische Mittel \bar{U} und die Standardabweichung s_U der Peakflächen bei m/z 248, 250 und 252 bestimmt. Die Peakflächen $I_{249,251}$ wurden von dem gemittelten Untergrund \bar{U} bereinigt und anschließend das Isotopenverhältnis berechnet:

$$\hat{I}_{249,251}[\%] \Big|_{\text{bereinigt}} = 100 \cdot \frac{I_{249,251} - \bar{U}}{I_{249} + I_{251} - 2\bar{U}}.$$

Für die maximalen Fehlergrenzen wurde angenommen, dass tatsächlich auf einem Peak jeweils nur der Maschinenuntergrund vorhanden war, während auf dem anderen der Untergrund $\bar{U} + s_U$ betrug. Damit ergab sich ein Bereich möglicher Isotopenverhältnisse von

$$[I_{249,251}^{min}, I_{249,251}^{max}][\%] = 100 \cdot \left[\frac{I_{249,251} - \bar{U} - s_U}{I_{249} + I_{251} - \bar{U} - U_M - s_U}, \frac{I_{249,251} - U_M}{I_{249} + I_{251} - \bar{U} - U_M - s_U} \right],$$

der anschließend mit den bekannten Isotopenverhältnissen des Rheniums verglichen werden konnte.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Versuchsreihen zur Kryokonservierung

Um die beim Einfrieren von Gewebe auftretenden Schäden zu verringern, wurden daher verschiedenen Gefrierschutzprotokolle an dem Blattstiel der Möhre getestet. Auf diese Weise sollte eine möglichst genaue Lokalisation von Radionukliden in dem Gewebe ermöglicht werden.

Bei den Versuchen zum Einfluss des Einfriervorgangs auf die Gewebemorphologie ist ein deutlicher Unterschied zwischen Flüssigstickstoff und der im Kryomikrotom eingebauten *Cryobar* feststellbar. Zwei solcher Schnitte sind zum Vergleich in Abbildung 5.1 dargestellt. Während der Cortex in beiden Fällen erhalten bleibt, ist eine hohe Schädigung des Parenchyms beim Einfrieren mit der *Cryobar* sichtbar. Bis auf wenige Überreste dieses Gewebetyps ist bei solchen Schnitten keine Struktur mehr erkennbar. Das Einfrieren mit Flüssigstickstoff hingegen konserviert die Gestalt des Parenchyms besser. Zwar sind einige Zellwände eingerissen, im Allgemeinen ist die Form der Zellen jedoch noch erkennbar. Auch die Leitbündel sind deutlich geringer differenziert bei mit der *Cryobar* gefrorenen Proben. Teilweise können noch die Tracheen des Xylems identifiziert werden, bei der Nutzung von Flüssigstickstoff sind diese stets sichtbar. Die Leitbündel sind größtenteils intakt, bis auf eine Ruptur am faszikulären Kambium. Wegen dieser Eigenschaften wurde Flüssigstickstoff zum Einfrieren der Pflanzenproben gegenüber der *Cryobar* bei den weiteren Versuchen bevorzugt.

5 Ergebnisse und Diskussion

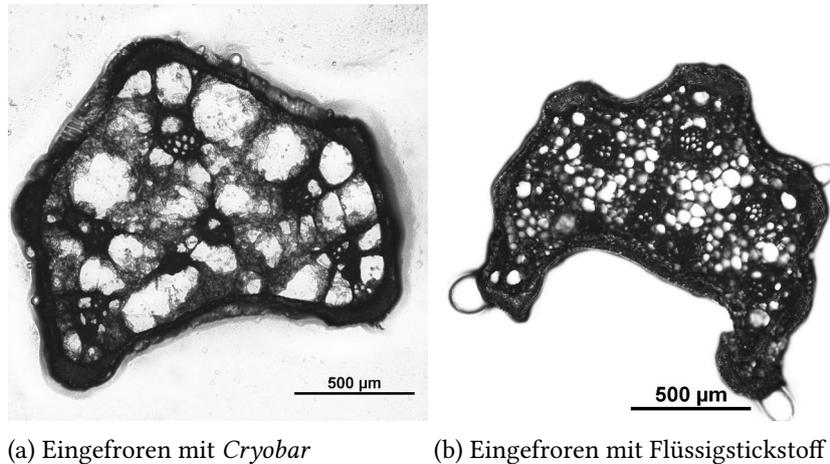


Abbildung 5.1: Querschnitt des Blattstiels von *Daucus carota*, der zuvor (a) mit der *Cryobar* des Kryomikrotoms oder (b) mit Flüssigstickstoff eingefroren worden war. Bei beiden Schnitten sind Schäden zu erkennen, die Morphologie des Gewebes ist beim Einfrieren mit Flüssigstickstoff jedoch deutlich besser erhalten. Beide Schnitte waren zuvor nach Griffiths et al. [56] gefriereschützt worden.

In den Versuchsreihen zur Nutzung von verschiedenen Gefrierschutzlösungen kann ein starker Unterschied zwischen dem Protokoll nach Griffiths et al. [56] und solchen, die Glycerin enthalten, beobachtet werden. Trotz kleinerer Rupturen an Zellwänden sind bei den glycerinhaltigen Gefrierschutzlösungen weitaus feinere Strukturen auflösbar. Besonders kleine Zellen wie in der Epidermis oder dem Kollenchym sind noch gut erkennbar. Zudem ist die vorherige Struktur des Parenchyms zum Großteil erhalten. Bei dem rein auf Saccharose beruhenden Protokoll ist die Gewebestruktur zwar noch vorhanden, kleine Details aber nicht mehr differenzierbar. Dies könnte auf ein Schrumpfen des Gewebes hindeuten. Werden die glycerinhaltigen Protokolle untereinander verglichen, so scheinen diese einen relativ ähnlichen Grad an Gewebeerhalt zu ermöglichen. Der Übergang von Leitbündel zu Parenchym ist allerdings bei dem nach Nishizawa et al. [39] modifizierten Protokoll intakter, weshalb dieses für die Schnitte der orts aufgelösten Massenspektrometrie verwendet wurde. Die Vergleichsschnitte der drei Protokolle sind in Abbildung 5.2 zu sehen.

5.1 Versuchsreihen zur Kryokonservierung

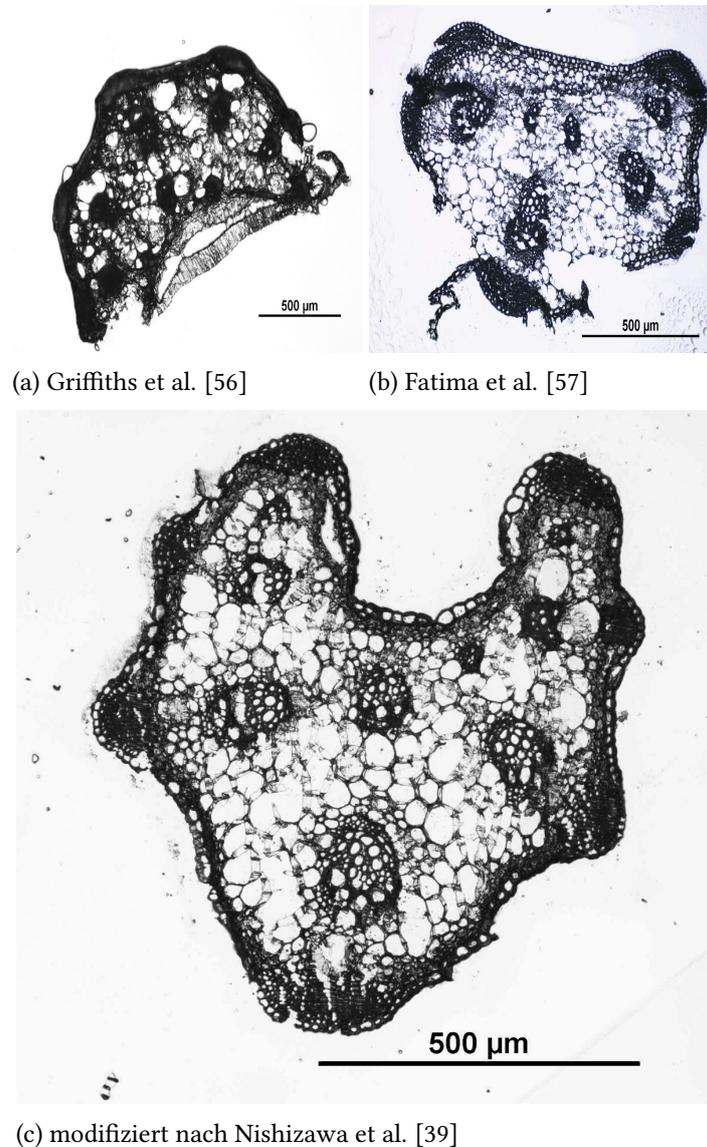
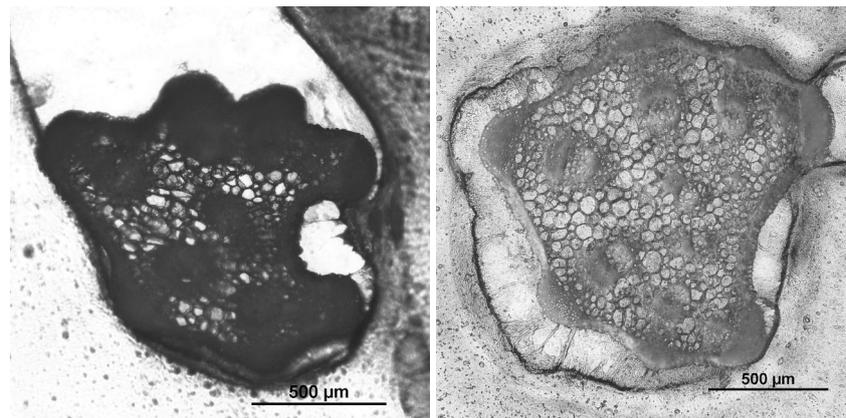


Abbildung 5.2: Vergleichsschnitte der drei getesteten Protokolle auf Basis von Saccharose und Glycerin. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen solchen Lösungen erkennbar, die (a) kein Glycerin enthalten und (b, c) Glycerin enthalten. Der Riss in der Epidermis in (b) stammt aus dem Schneideprozess.

5 Ergebnisse und Diskussion

Zuletzt wurde noch der Einfluss von Aceton auf die Schnittqualität getestet. Dazu wurde ein Stück des Blattstiels von *Daucus carota* entweder vor dem Gefrierschutz- und Einfriervorgang in Aceton eingelegt oder der fertig auf dem Objektträger aufgebrauchte Schnitt in kaltem Aceton fixiert. Querschnitte beider Varianten sind in Abbildung 5.3 zu finden. Wurde das Aceton vor dem Einfriervorgang eingesetzt, so kann ein Zusammenschrumpfen des Gewebes festgestellt werden. Dies lässt auf eine zu stark dehydrierende Wirkung des Acetons auf das unfixierte Gewebe schließen. Die Anwendung von Aceton bei frischen Gewebeschnitten hingegen stellt eine weitere Verbesserung gegenüber rein gefriergeschütztem Gewebe dar. Es finden sich weniger rupturierte Zellwände im Parenchym und das Phloem ist ebenfalls besser erhalten. Auf solche Weise präparierte Schnitte sind insgesamt von nur kleinen Schäden betroffen. Trotz dieses morphologischen Vorteils wurde auf die Anwendung von Aceton für die orts aufgelöste Massenspektrometrie verzichtet, da die Permeabilisierung der Membranen [53] und ein mögliches Auswaschen von Radionukliden unerwünscht waren (siehe Abschnitt 5.3).



(a) Aceton vor dem Gefrierschutz (b) Aceton nach dem Anfertigen des Schnittes

Abbildung 5.3: Blattstiel von *Daucus carota*, behandelt mit Aceton (a) vor Gefrierschutz und Schneiden und (b) danach. Die Behandlung nach dem Schneiden erhält die Gewebestruktur sehr gut, während Aceton vor dem Einfrieren das Gewebe deutlich schrumpfen lässt. Beide Schnitte wurden mit dem nach Nishizawa et al. [39] modifizierten Protokoll behandelt.

5.2 Kinetik der Technetiumaufnahme

Um die Aufnahmekinetik von Technetium durch die Möhre zu untersuchen, wurden an verschiedenen Zeitpunkten Pflanzen geerntet. Neben der Bestimmung der lateralen Technetiumverteilung mittels LA-ICP-MS wurde die Technetiumkonzentration der Proben mit der ICP-MS bestimmt.

Die Konzentration an Technetium in *Daucus carota* steigt in den ersten drei Tagen nach Tracerzugabe stark an. Bereits nach zwei Stunden kann Technetium in Pfahlwurzel und Blatt bestimmt werden. Nach acht Tagen wird ein Plateau erreicht, bei dem die Technetiumkonzentration relativ konstant bleibt. Bei der nach 4 d geernteten Probe ist sowohl in Blatt als auch in der Pfahlwurzel ein Ausreißer nach unten festzustellen, was vermutlich mit Schwankungen in der Technetiumaufnahme zwischen den Pflanzen zu begründen ist. Zudem ist von einer nicht idealen Ausbreitung des Tracers im Boden auszugehen, bei der präferierte Wege im Boden existieren und so gewisse Pflanzen bevorzugt werden. Die Kinetik der Technetiumaufnahme ist in Abbildung 5.4 dargestellt.

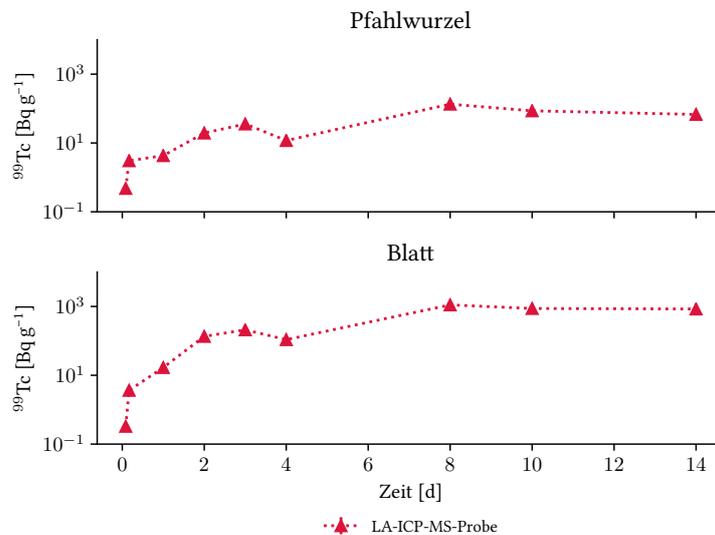


Abbildung 5.4: Technetiumaufnahme durch *Daucus carota* über einen Zeitraum von 14 d. Messdaten, Kalibrationsgerade, Nachweis- und Bestimmungsgrenze sind in Tabelle 8.1 und Abbildung 8.2 im Anhang zu finden.

5 Ergebnisse und Diskussion

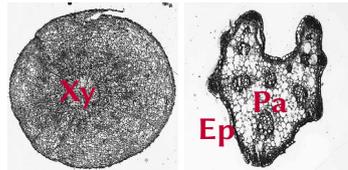
Die Technetiumkonzentration in den Pflanzen steigt also in den ersten Tagen stark an und endet in einem Plateau. Des Weiteren kann keine größere Rückhaltung von Technetium in der Wurzel beobachtet werden, da bereits nach zwei Stunden im Blatt der LA-ICP-MS-Probe Technetium gefunden werden kann. Auch scheint kein signifikanter Transport aus dem Blatt in die Wurzel (vgl. Transport aus dem Stängel in das Blatt in Abschnitt 5.4) innerhalb der 14 d stattzufinden.

LA-ICP-MS Die Laserablationsmessungen an Schnitten der Pfahlwurzel und des Blattstiels von *Daucus carota* ergeben, dass sich das aufgenommene Technetium in den ersten Tagen vornehmlich im zentralen Bereich der Pfahlwurzel befindet, in welchem das Xylem lokalisiert ist. Dieses ist für die Leitung von Wasser und anorganischen Ionen verantwortlich. Wie auch bei den Konzentrationsmessungen ist bei der nach vier Tagen geernteten Probe ein Ausreißer festzustellen. Vermutlich war die entsprechende Pflanze bei der Aufnahme durch ihr Wurzelsystem benachteiligt. Nach 8 d, also zu dem Zeitpunkt, zu dem die Technetiumkonzentration in der Pflanze ein Plateau erreicht hat, ist Technetium in der Pfahlwurzel relativ homogen verteilt. Lediglich ein Ring um das Xylem zeigt eine erhöhte Akkumulation. In dem Blattstiel kann erst nach einem Tag eine Verteilung von ^{99}Tc bestimmt werden. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich Technetium in der Epidermis sowie im Parenchym. Zudem ist die Verteilung inhomogen, was möglicherweise auf eine geringe Zählstatistik zurückzuführen ist. Nach zwei Tagen ist Technetium im Blattstiel homogen verteilt, wobei die Epidermis generell etwas mehr Technetium zu enthalten scheint. Die Messung des Blattstiels nach 14 d zeigen einen weiteren Ausreißer mit einer sehr geringen Technetiumkonzentration, was sich nicht mit der Konzentrationsmessung deckt. Dies könnte auf eine Verlagerung vom Blattstiel in Blattspitze hindeuten. Die mit der LA-ICP-MS gemessenen Technetiumverteilungen sind in Abbildung 5.5 dargestellt.

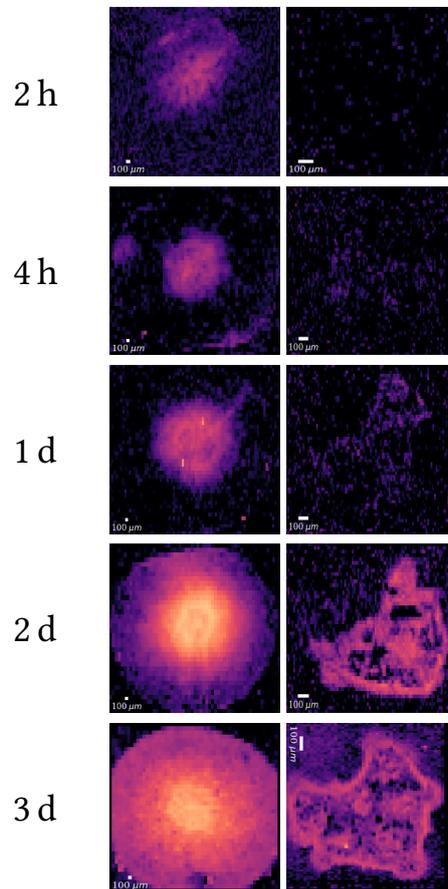
Diese orts aufgelöste Kinetik lässt darauf schließen, dass das aufgenommene Technetium zuerst durch das Xylem der Pfahlwurzel weitertransportiert und kaum zurückgehalten wird. Die nach wenigen Tagen einsetzende homogenere Verteilung innerhalb der Pfahlwurzel und des Blattstiels deutet anschließend auf entweder den Transport von möglicherweise in den Blattspitzen reduzierten Technetiumspezies oder eine Verteilung innerhalb der Pflanze mit dem Transpirationsstrom hin. Da

5.2 Kinetik der Technetiumaufnahme

der Wasserfluss durch die Tracheen zeitlich eng mit der Verteilung im umliegenden Gewebe zusammenliegt [61], könnte dies die homogene Verteilung innerhalb des Blattstiels erklären, sobald die Nachweisgrenze überschritten ist. In der Pfahlwurzel wäre dies auch plausibel, der Größenunterschied wäre eine mögliche Erklärung für die längere Dauer, bis eine homogene Verteilung eintritt.



(a) Pfahlwurzel (b) Blattstiel



5 Ergebnisse und Diskussion

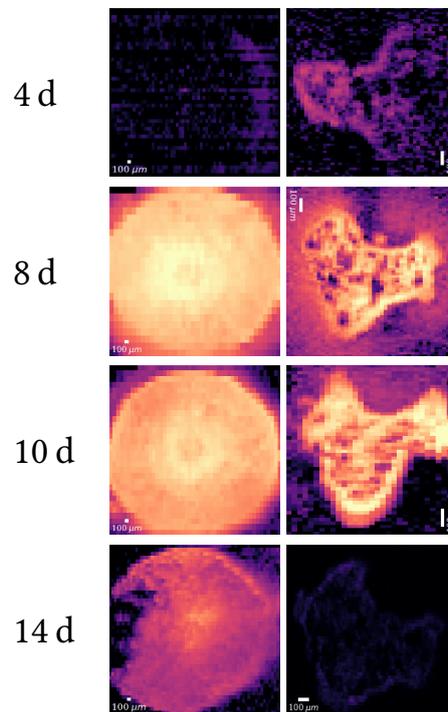


Abbildung 5.5: Mit LA-ICP-MS aufgenommene Verteilung von ^{99}Tc in (a) Pfahlwurzel und (b) Blattstiel der Möhre über einen Zeitraum von 14 d. Ausreißer bei 4 d und 14 d sichtbar. Darstellung normiert auf maximale Intensität aller Datenpunkte mit logarithmischer Skalierung. Kürzel: **Xy** Xylem, **Ep** Epidermis und **Pa** Parenchym.

5.3 Sequentielle Extraktion von Technetium

Bei der sequentiellen Extraktion an der Möhre nach Shi et al. [58] wurden Pfahlwurzel und Blatt untersucht (siehe Abbildung 4.2). Auffällig bei den Ergebnissen ist ein relativ geringer Anteil der wasserlöslichen Fraktion mit knapp 10 % in der Pfahlwurzel und circa 15 % im Blatt. Auch die säurelösliche Fraktion und das an Cellulose anhaftende Technetium zeigen nur geringe Unterschiede zwischen Blatt und Pfahlwurzel bezüglich ihrer prozentualen Anteile. Beide Fraktionen liegen zwischen 8 % und 17 %. Die alkalilösliche Fraktion liegt in der Pfahlwurzel jedoch bei nur 18,4 %, während sie im Blatt 58,4 % ausmacht. Ein gegenteiliges Bild zeigt das an Pigmente gebundene Technetium, das nur circa 2 % des Technetiums im Blatt ausmacht, aber 51 % des

5.3 Sequentielle Extraktion von Technetium

Technetiums in der Pfahlwurzel. Die Ergebnisse der sequentiellen Extraktion sind in Abbildung 5.6 dargestellt.

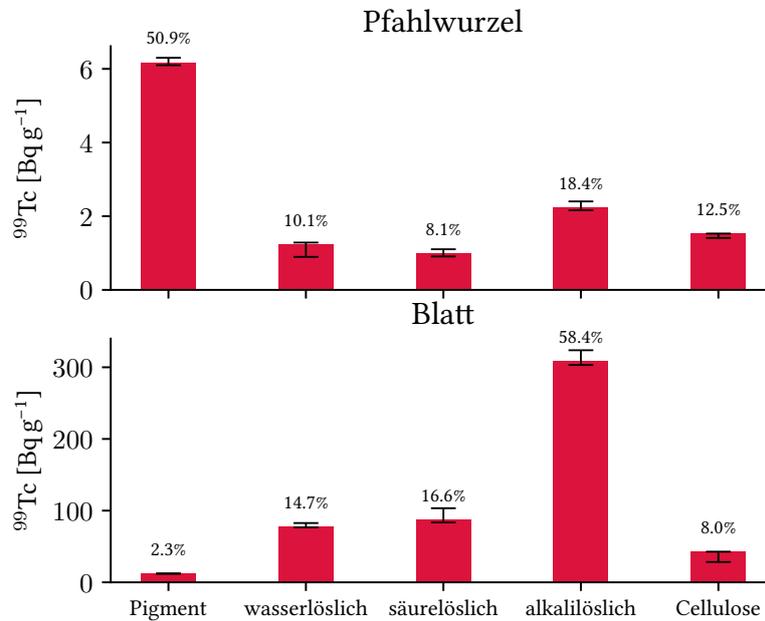


Abbildung 5.6: Verschiedene Fraktionen von ^{99}Tc in *Daucus carota*. Extraktionsschema modifiziert nach Shi et al. [58]. Messdaten, Kalibrationsgerade, Nachweis und Bestimmungsgrenze sind in Tabelle 8.2 und Abbildung 8.3 im Anhang zu finden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Großteil des aufgenommenen Pertechne-
tats, welches sich in der wasserlöslichen Fraktion befinden sollte, von der Pflanze
umgewandelt oder immobilisiert wird. Dies deckt sich mit der Literatur, wonach
Pertechne-
tats von Pflanzen reduziert werden kann [14, 15]. Der von Shi et al. [58]
untersuchte Seetang, bei dem die wasserlösliche Fraktion mit 44 % und die alkalilösi-
che Fraktion mit 36 % den Hauptanteil ausmachten sowie eine säurelösliche Fraktion
von circa 14 % vorlag, kann morphologisch am ehesten mit dem Blatt von *Daucus
carota* verglichen werden. Unterschiede zwischen den wasserlöslichen Fraktionen
lassen sich möglicherweise damit erklären, dass einen Monat nach Tracerzugabe
nahezu kein Pertechne-
tats mehr zur Aufnahme zur Verfügung stand und das in der

5 Ergebnisse und Diskussion

Pflanze befindliche bereits reduziert worden war, während der Seetang einen deutlich geringeren, aber konstanteren Technetiumzufluss hatte, da dieser eine Umweltprobe aus dem Meer darstellte. Der signifikante Unterschied zwischen Pfahlwurzel und Blatt, der sich besonders im Pigmentanteil zeigt, deutet allerdings auf einen grundlegenden Unterschied zwischen verschiedenen Pflanzenteilen bezüglich der Einlagerung von Technetium hin. Da die pflanzlichen Grundgewebe sowohl im Blatt als auch in der Wurzel ähnliche physiologische Funktionen erfüllen, könnte dies entweder auf den Einfluss externer Faktoren wie Licht, das für die Reduktion verwendet werden könnte, oder den Transport einer spezifischen Fraktion in die Wurzel hindeuten.

5.4 Rhenium in Hydrokultur

Aufgrund der Mobilität des Perotechnetats in Pflanzen und der hohen Konzentration an Technetium in den Blättern sollte untersucht werden, ob initial von der Pflanze deponiertes Technetium später noch weiter aus anderen Pflanzenteilen in das Blatt transportiert wird. Um eine zusätzliche Aufnahme ab einem festgelegten Zeitpunkt an zu unterbinden, wurden Erbsen statt in Boden in einer Hydrokultur aufgezogen. Als Homolog zum Perotechnetat wurde Perrhenat verwendet. Die Verhältnisse der gemessenen Rheniumkonzentrationen sind in Tabelle 5.1 aufgeführt. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollpflanzen, die lediglich in mit Rhenium versetzter Hoagland-Lösung wuchsen, und solchen, die danach noch in ungetracerte Hoagland umgesetzt worden waren. Unter der Bedingung, dass die Pflanzen nicht wenige Stunden vor der Ernte überproportional viel Rhenium aufgenommen hatten, lässt dies daraus schließen, dass Rhenium von der Pflanze auch nach einer initialen Deposition im Stängel später noch in das Blatt transportiert werden kann. Der Transport in der Pflanze wäre demnach nicht allein dem Volumenstrom unterworfen, sondern von der Pflanze gesteuert. Eine Verwendung als Gegenion [62], wie zum Beispiel für Chlor, scheint damit zumindest langfristig unwahrscheinlich. Andernfalls würde die Pflanze entweder Gegenionen aus dem Stängel statt dem Nährmedium beziehen oder zusammen mit den Gegenionen Stoffwechselprodukte transportieren. Allerdings stellen Blätter selber „Spenderorgane“ dar [19] und sind daher nicht auf Stoffwechselprodukte aus dem Stängel angewiesen.

5.5 Ortsaufgelöste Massenspektrometrie an Pflanzenproben

Tabelle 5.1: Verhältnisse der Rheniumkonzentrationen in Blatt und Stängel von *Pisum sativum* mit und ohne zusätzlicher Zeit in ungetracerter „low-phosphate“ Hoagland-Lösung. Kalibrationsgerade, Nachweis und Bestimmungsgrenze sind in Abbildung 8.1 im Anhang zu finden.

	„ausgewaschen“	Kontrolle
$\text{Re}_{\text{Stängel}}/\text{Re}_{\text{Blatt}}$	0,99 (5)	2,38 (8)

5.5 Ortsaufgelöste Massenspektrometrie an Pflanzenproben

Verschiedene massenspektrometrische Methoden wurden an Proben von *Daucus carota* und *Pisum sativum* angewandt, um die laterale Verteilung von Pflanzennährstoffen und Radionukliden in Gewebe und Zellen zu bestimmen.

5.5.1 Anionische Pflanzennährstoffe

Um einen Vergleich mit den zu untersuchenden von Pflanzen als Anionen aufgenommenen Radionukliden zu ermöglichen, wurden weitere typische Makro- und Mikronährstoffe untersucht. Dabei handelt es sich klassischerweise um Nitrat, Dihydrogenphosphat, Sulfat und Chlorid. Die Messungen wurden mittels TOF-SIMS durchgeführt (siehe Abschnitt 4.5.2). Die Messung von Molekülen ist mit der SIMS prinzipiell möglich. Bei größeren Molekülen kommt es jedoch zu einer starken Fragmentierung in Folge des Sputterprozesses.

Daucus carota Bei der Möhre ist eine relativ homogene Verteilung aller vier untersuchten Nährstoffe im Parenchym erkennbar, jedoch zeigen bei Nitrat und Chlorid einige Zellen erhöhte Konzentrationen. Diese könnten daher als Nährstoffspeicher dienen. Während Chlorid in der Epidermis nicht oberhalb des Untergrundes vorhanden ist, werden von der Pflanze dort auch Nitrat, Sulfat und Dihydrogenphosphat akkumuliert, wobei diese an unterschiedlichen Orten der Epidermis konzentriert sind. Die Verteilung der Nährstoffe ist in Abbildung 5.7 dargestellt.

5 Ergebnisse und Diskussion

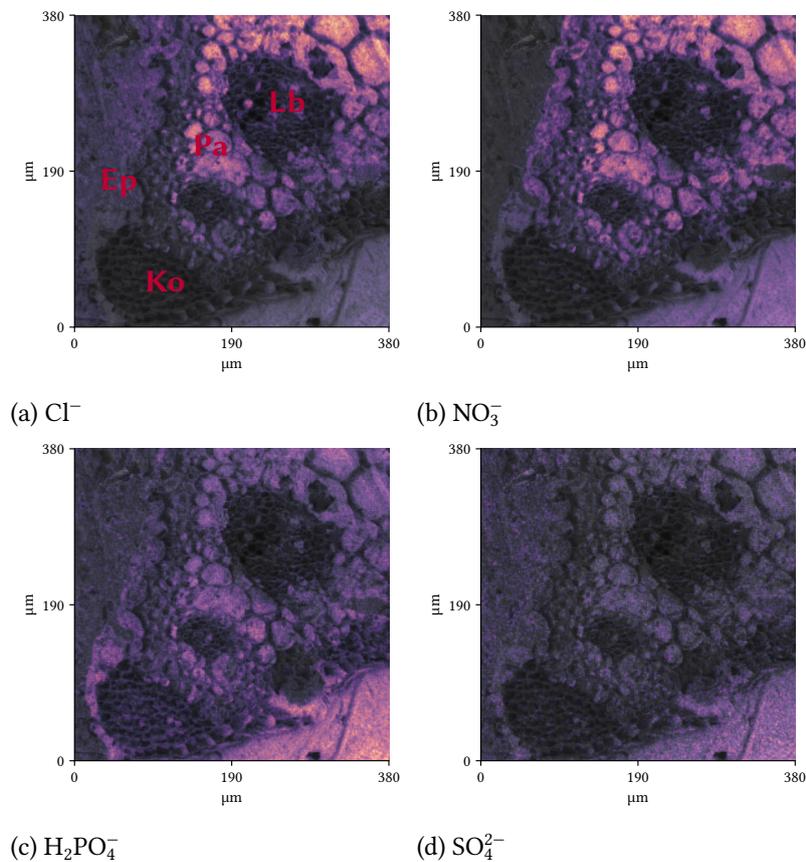


Abbildung 5.7: Verteilung anionischer Nährstoffe in dem Blattstiel von *Daucus carota*. Kürzel: **Lb** Leitbündel, **Ep** Epidermis, **Ko** Kollenchym und **Pa** Parenchym. SO_4^{2-} in der TOF-SIMS gemessen über den SO_4^- -Peak.

Pisum sativum Anders als bei der Möhre ist die Nährstoffverteilung bei der Erbse auf kleinere Bereiche konzentriert. Im Parenchym scheinen wenige Zellen einen Großteil der Nährstoffe einzulagern. Diese Speicherzellen scheinen nicht auf einen gewissen Nährstoff spezialisiert, sondern dienen als generelle Speicher. Während bei Nitrat und Sulfat, außer in einer Epidermiszelle, wegen eines geringen Signals keine weitergehende Verteilung in den Schnitten zu beobachten ist, sind Chlorid und Dihydrogenphosphat auch im restlichen Parenchym und besonders im Sklerenchym verteilt. Dort ist die Konzentration aber deutlich geringer als in den Speicherzellen und die Verteilung relativ homogen. Auch finden sich beide Nährstoffe in derselben

5.5 Ortsaufgelöste Massenspektrometrie an Pflanzenproben

Epidermiszelle, welche auch Nitrat und Sulfat enthält. Während Chlorid im Apoplast des Cortex diffus verteilt ist, finden sich bei H_2PO_4^- dort auch kleine Stellen erhöhter Konzentration. Die Nährstoffverteilungen sind in Abbildung 5.8 dargestellt.

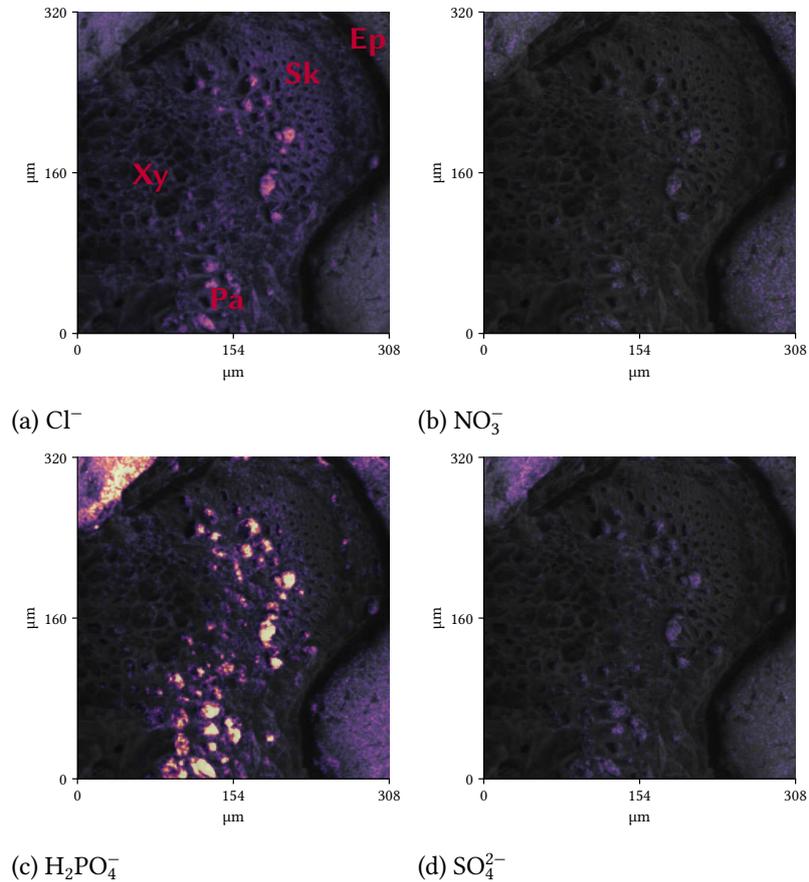


Abbildung 5.8: Verteilung anionischer Nährstoffe im Stängel von *Pisum sativum*. Kürzel: **Xy** Xylem, **Ep** Epidermis, **Sk** Sklerenchym und **Pa** Parenchym. SO_4^{2-} in der TOF-SIMS gemessen über den SO_4^- -Peak.

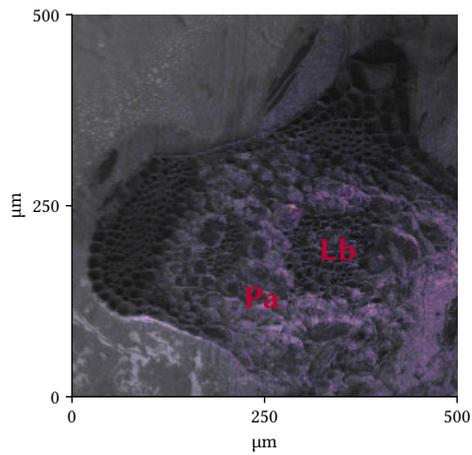
5 Ergebnisse und Diskussion

5.5.2 Iod

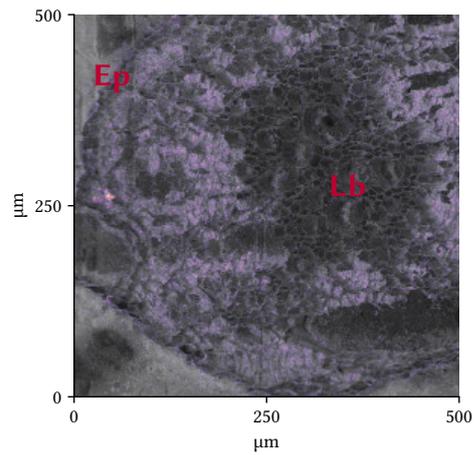
Iod wird nicht den Pflanzennährstoffen zugeordnet, kann aber aktiv über Transporter aufgenommen werden [31]. Auch ist Iod im Gegensatz zu Technetium und seinem Homolog Rhenium kein Schwermetall. Zusammen mit seiner Bedeutung für die Endlagerung macht dieser Faktor Iod zu einem interessanten Kandidaten zur Betrachtung der lateralen Verteilung innerhalb der Pflanze. Gemessen wurde das in der Pflanze befindliche Iodid mittels TOF-SIMS (siehe Abschnitt 4.5.2).

Daucus carota In dem Blattstiel der Möhre lagert sich Iodid relativ konzentriert in einem Ring um das Leitbündel an. Ein Großteil des innerhalb der Zellen befindlichen Iodids befindet sich dort. In den Zellwänden kann ebenfalls Iodid beobachtet werden, jedoch scheint die Möhre Iodid generell stärker in den Zellen des Parenchyms anzulagern. In der Wurzel ist eine homogene Verteilung außerhalb des Leitbündels zu erkennen, jedoch ist an einer Stelle nahe der Epidermis ein Punkt erhöhter Konzentration zu finden. Auch findet sich Iodid sowohl in Zellwänden als auch im Zellinneren der Wurzel. In Abbildung 5.9 sind die Verteilungen von Iodid mit den Spektren der TOF-SIMS zu sehen. In den abgebildeten Spektren ist die Messung der mit Kaliumiodid getracerten Pflanze in Lila und die Messung der Kontrolle in Grau dargestellt. Bei m/z 126,9 ist ein deutlicher Peak zu erkennen, der nur bei getracerten Pflanzen vorhanden ist und I^- zugeordnet werden kann. Sowohl bei m/z 127 als auch bei m/z 128 sind weitere Peaks vorhanden, die auch im Spektrum der Kontrollmessung vorkommen. Diese Peaks stammen vermutlich von Molekülen beziehungsweise Molekülfragmenten aus den Pflanzen und dem Gefrierschnittmedium. Intensitätsunterschiede zwischen den Peaks der getracerten Pflanzen und Kontrollmessungen sind auf variierende Verhältnisse von Pflanze zu Gefrierschnittmedium im Messfenster zurückzuführen.

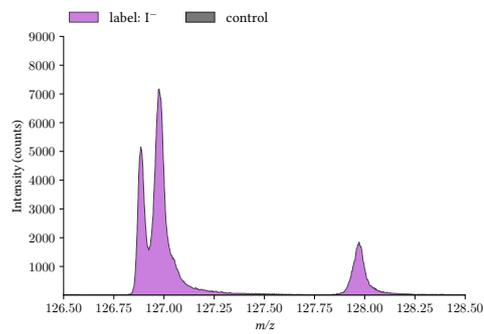
5.5 Ortsaufgelöste Massenspektrometrie an Pflanzenproben



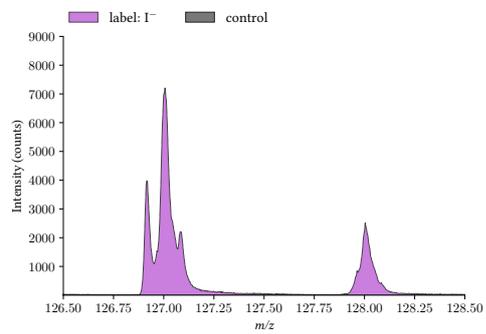
(a) I^- im Blattstiel von *Daucus carota*.



(b) I^- in der Wurzel von *Daucus carota*.



(c) Spektrum des Blattstiels

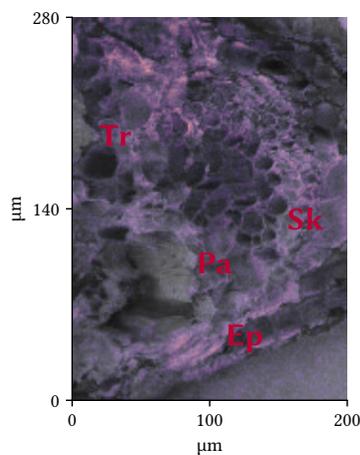


(d) Spektrum der Wurzel

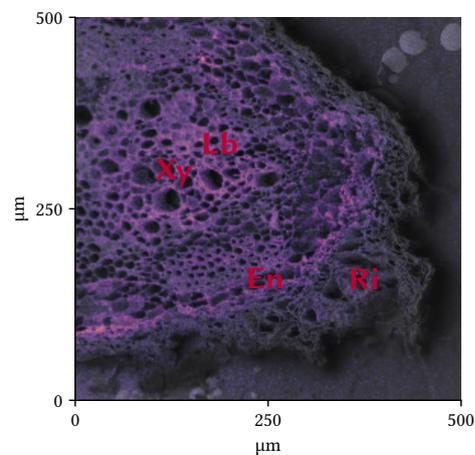
Abbildung 5.9: Verteilung von Iod in *Daucus carota*. Kürzel: **Lb** Leitbündel, **Pa** Parenchym und **Ep** Epidermis.

5 Ergebnisse und Diskussion

Pisum sativum Bei der Erbse lagert sich Iodid in verschiedenen Zelltypen ein. So findet es sich im Parenchym, in der Epidermis und im Sklerenchym. Außerdem ist Iodid stellenweise um die Tracheen angelagert. In Parenchym und Epidermis des Stängels ist Iodid primär innerhalb der Zelle eingelagert, während es sich im Sklerenchym und um die Tracheen in den Zellwänden befindet. In der Wurzel der Erbse findet sich I^- fast ausschließlich in den Zellwänden. Außerhalb der Endodermis, in der Wurzelrinde, befindet sich nahezu kein Iodid, während es im Zentralzylinder und der Endodermis überall vorzufinden ist. Auffällig sind stark erhöhte Konzentrationen in Xylem und Endodermis. Die Verteilung von Iodid in der Erbse und die dazugehörigen Spektren der TOF-SIMS sind in Abbildung 5.10 dargestellt. In den abgebildeten Spektren ist die Messung der mit Kaliumiodid getracerten Pflanze in Lila und die Kontrollmessung in Grau dargestellt. Ebenso wie bei der Möhre ist bei m/z 126,9 ist ein deutlicher Peak zu erkennen, der nur bei getracerten Pflanzen vorhanden ist und I^- zugeordnet werden kann.



(a) I^- im Stängel von *Pisum sativum*.



(b) I^- in der Wurzel von *Pisum sativum*.

5.5 Ortsaufgelöste Massenspektrometrie an Pflanzenproben

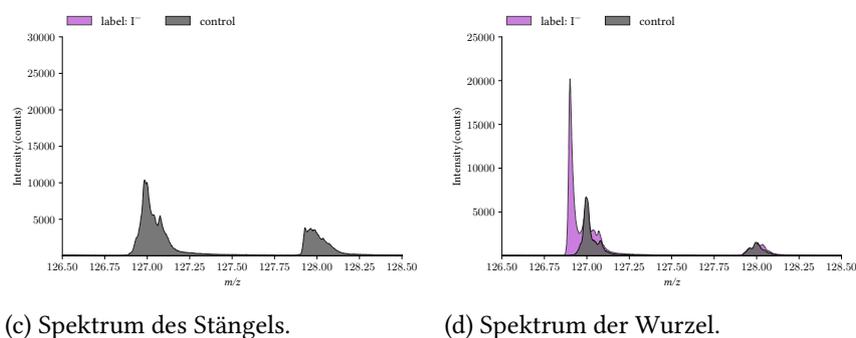


Abbildung 5.10: Verteilung von Iod in *Pisum sativum*. Kürzel: **Tr** Trachee, **Ep** Epidermis, **Sk** Sklerenchym, **Pa** Parenchym, **Lb** Leitbündel, **Xy** Xylem, **Ri** Rinde und **En** Endodermis.

Diskussion Zwischen Möhre und Erbse bestehen deutliche Unterschiede in der lateralen Verteilung von Iodid. Während eine breite Verteilung im Stängel der Erbse vorzufinden ist, wird Iodid in der Wurzel verstärkt in den Zellwänden eingelagert. Von einer Einlagerung kann dort ausgegangen werden, da kaum Iod im Symplasten vorhanden ist. Wäre das gemessene Iodid zu diesem Zeitpunkt aktiv transportiert worden, so müsste es sich auch im symplastischen Raum und der Rinde befinden. Bei der Möhre hingegen kann eine breite Verteilung sowohl im apoplastischen als auch im symplastischen Raum der Wurzel festgestellt werden. In dem Blattstiel hingegen findet es sich primär in den Parenchymzellen um das Leitbündel. Von einer einheitlichen Vorgehensweise von höheren Pflanzen bei der Speicherung von Iod kann daher nicht ausgegangen werden. So wurde in der Literatur circa 60 % des Iods in Pak Choi (*Brassica rapa* subsp. *chinensis*) der löslichen Fraktion und nur 20 % den Zellwänden zugeordnet [63], während bei der Braunalge *Laminaria digitata*, obgleich keine Pflanze, 60 % des Iods im apoplastischen Raum vorgefunden wurde [64].

Werden die Nährstoffverteilungen aus Abschnitt 5.5.1 in Blattstiel beziehungsweise Stängel mit den bestimmten Iodidverteilungen verglichen, so fällt ein entgegengesetzter Trend auf. In dem Blattstiel der Möhre findet eine Ablagerung von Iodid um das Leitbündel herum statt. Die anionischen Nährstoffe hingegen sind homogen im Parenchym verteilt. Im Stängel der Erbse findet sich Iodid, anders als die gemessenen Pflanzennährstoffe, nicht größtenteils in den Speicherzellen des Parenchyms. Die Pflanzen behandeln das aufgenommene Iodid demnach anders als für sie nützliche

5 Ergebnisse und Diskussion

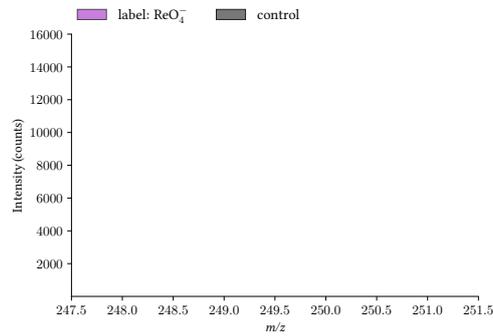
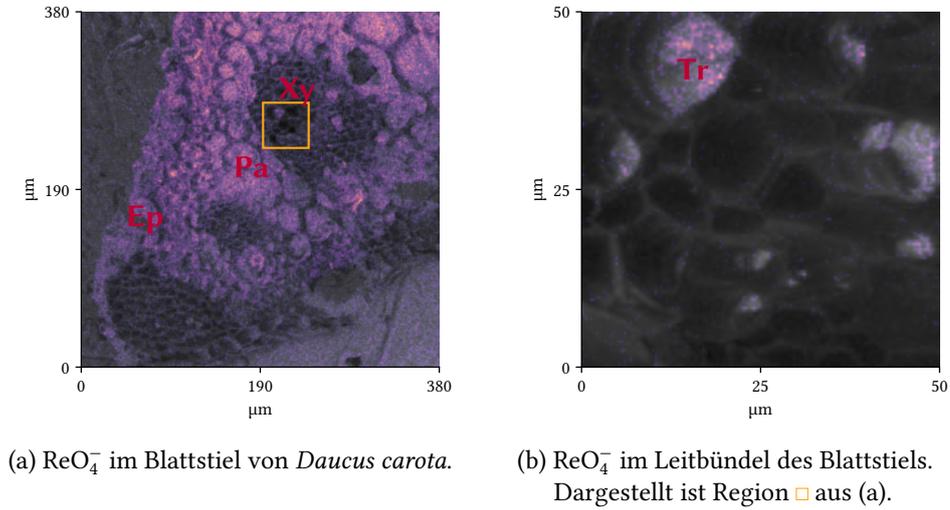
anionische Nährstoffe, obwohl die Aufnahme potenziell über Chloridtransporter funktionieren kann [31]. Dies könnte entweder mit einer für die Pflanze toxischen Tracerkonzentration (1 mmol KI) oder Abwehrmechanismen, wie sie auch bei Schwermetallen vorkommen, zusammenhängen. Sowohl die Einlagerung in Zellwänden der Wurzel als auch in der Vakuole stellen solche Prozesse dar [65, 66]. Eine Ablagerung in den Zellwänden um die Tracheen, wie sie in der Erbse zu sehen sind, wurden auch schon im Xylem des Kleinbütigen Ahorns (*Acer micranthum*) bei Aluminium beobachtet [67].

5.5.3 Rhenium

Perrhenat wurde als Homolog zum Pertechetat eingesetzt. Neben zwei natürlich vorkommenden Isotopen, die die Identifikation im Massenspektrum der TOF-SIMS (siehe Abschnitt 4.5.2) erleichtern, können wegen der Radioaktivität des Technetiums Pflanzen mit deutlich höheren Rheniumkonzentrationen getracert werden, als dies bei Technetium der Fall ist. Die eingesetzten Rheniumkonzentrationen sind bei TOF-SIMS-Messungen an Pflanzenproben wegen des hohen Untergrundes, der vermutlich aus einer Vielzahl von Molekülfragmenten besteht, notwendig.

Daucus carota Die Verteilung des Perrhenats in dem Blattstiel der in RefeSol 03-G aufgezogenen Möhre ist sehr homogen in Parenchym und Epidermis. Auch in den Tracheen des Xylems kann ReO_4^- identifiziert werden. In den vergrößerten Ausschnitten des Leitbündels wird dies besonders deutlich. Eine hohe Perrhenatkonzentration findet sich dort in den Tracheen, den Gefäßen, durch die der meiste Transport von Wasser und anorganischen Ionen stattfindet. Die Verteilung innerhalb des Blattstiels und des Leitbündels ist in Abbildung 5.11 gezeigt. Perrhenat findet sich im gesamten Blattstiel vornehmlich im symplastischen Raum, in den Zellwänden ist nahezu kein ReO_4^- nachweisbar. In dem abgebildeten Spektrum ist die Messung der mit NH_4ReO_4 getracerten Pflanze in Lila und die Messung der Kontrolle in Grau dargestellt. Bei m/z 249 und 251 ist jeweils ein deutlicher Peak zu erkennen, der Perrhenat zugeordnet werden kann.

5.5 Ortsaufgelöste Massenspektrometrie an Pflanzenproben



(c) Spektrum des Blattstiels. Gemessene Isotopenverhältnisse: ^{185}Re $39,4^{+5,4}_{-3,6}$ %, ^{187}Re $60,6^{+3,6}_{-5,4}$ %.

Abbildung 5.11: Verteilung von Perrhenat in *Daucus carota*. Kürzel: **Ep** Epidermis, **Pa** Parenchym, **Xy** Xylem und **Tr** Trachee.

5 Ergebnisse und Diskussion

In der Wurzel der Möhre kann mittels TOF-SIMS kein Perrhenat gefunden werden. Spektren von getracerten Pflanzen und Kontrollen zeigen keine signifikanten Unterschiede. Das Spektrum der Wurzel ist in Abbildung 5.12 dargestellt.

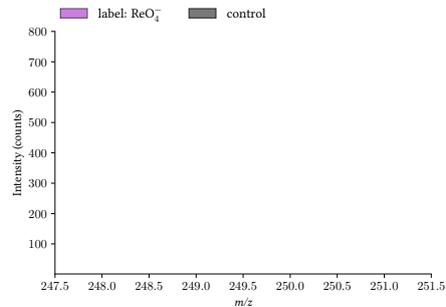


Abbildung 5.12: Spektrum der Wurzel von *Daucus carota*. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen mit NH_4ReO_4 getracerten Pflanzen und der Kontrolle zu erkennen.

Zu den Messungen an in RefeSol 03-G aufgezogenen Möhren wurde zudem die Verteilung von Perrhenat in der Möhre bei Aufzucht in RefeSol 01-A untersucht. Die laterale Verteilung zeigt dabei keine Unterschiede zwischen beiden Böden. Wie in Abbildung 5.13 zu sehen ist, ist ReO_4^- ebenso wie bei RefeSol 03-G sehr homogen im Symplasten des Parenchyms verteilt.

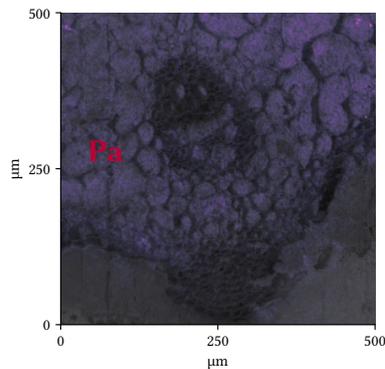
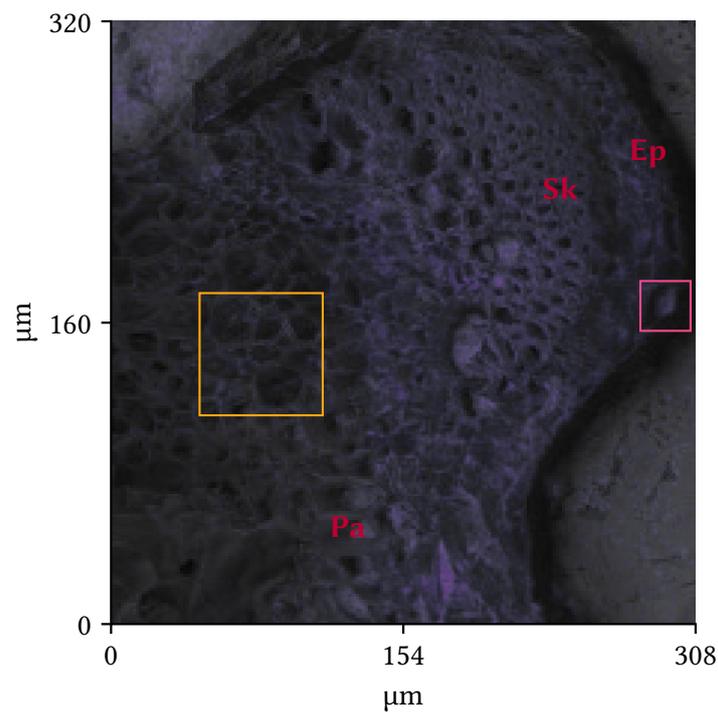


Abbildung 5.13: ReO_4^- im Blattstiel von *Daucus carota* bei Anzucht in RefeSol 01-A. Kürzel: **Pa** Parenchym.

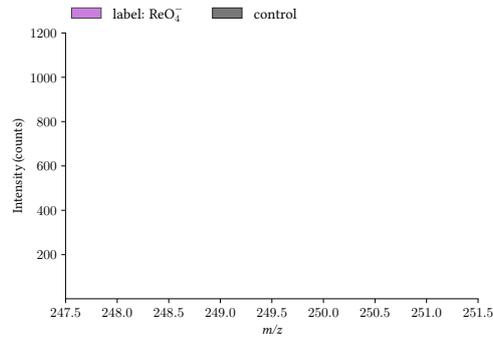
5.5 Ortsaufgelöste Massenspektrometrie an Pflanzenproben

Pisum sativum Bei der Erbse zeigt sich ebenfalls eine relativ homogene Verteilung von Perrhenat im Stängel. Hierbei ist allerdings eine starke Akkumulation in Epidermis, Sklerenchym und nur Teilen des Parenchyms zu beobachten. In Parenchym und Epidermis liegt ReO_4^- sowohl apoplastisch als auch symplastisch vor, im Sklerenchym kann es in den Zellwänden gefunden werden. Neben dem Querschnitt des Stängels wurden zusätzlich noch Teile des Leitbündels und der Epidermis genauer untersucht. Dabei zeigt sich eine hohe symplastische Konzentration in der Epidermiszelle. Im Leitbündel zeigen sich einzelne Punkte hoher Perrhenatkonzentration. Diese befinden sich im symplastischen Raum, allerdings auch an den Zellwänden. Ob Perrhenat zum Zeitpunkt der Messung in oder an den Zellwänden war, kann nicht eindeutig festgestellt werden. Die Sekundärionenbilder und das Spektrum des Stängels sind in Abbildung 5.14 dargestellt. In dem abgebildeten Spektrum ist die Messung der mit NH_4ReO_4 getracerten Pflanze in Lila und die Kontrollmessung in Grau dargestellt. Die Peaks bei m/z 249 und 251 können Perrhenat zugeordnet werden.

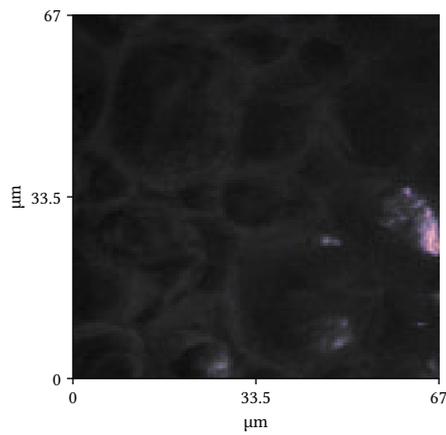


(a) ReO_4^- im Stängel von *Pisum sativum*.

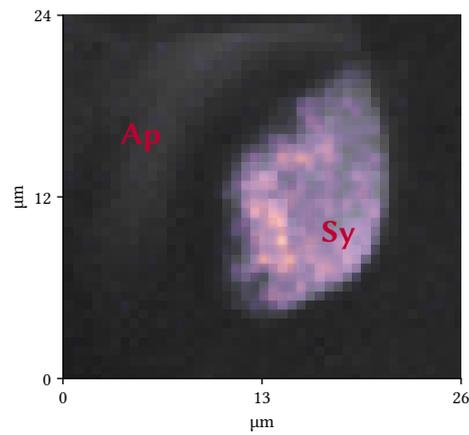
5 Ergebnisse und Diskussion



(b) Spektrum des Stängels. Gemessene Isotopenverhältnisse: ^{185}Re $39,8^{+6,3}_{-4,3}$ %, ^{187}Re $60,2^{+4,3}_{-6,3}$ %



(c) ReO_4^- im Leitbündel des Stängels.
Dargestellt ist Region \square aus (a).



(d) ReO_4^- in der Epidermis des Stängels.
Dargestellt ist Region \square aus (a).

Abbildung 5.14: Verteilung von Perrhenat in *Pisum sativum*. Kürzel: **Ep** Epidermis, **Sk** Sklerenchym, **Pa** Parenchym, **Ap** Apoplast und **Sy** Symplast.

5.5 Ortsaufgelöste Massenspektrometrie an Pflanzenproben

Ebenso wie in der Möhre zeigt sich auch bei der Erbse innerhalb der Unsicherheit kein ReO_4^- in Schnitten der Wurzel. Das Spektrum ist in Abbildung 5.15 zu finden.

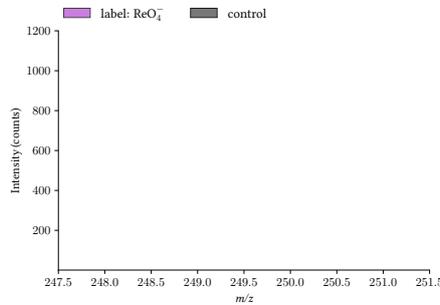


Abbildung 5.15: Spektrum der Wurzel von *Pisum sativum*. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen mit NH_4ReO_4 getracerten Pflanzen und der Kontrolle zu erkennen.

Diskussion Wie auch schon bei den anionischen Nährstoffen und Iod (vergleiche Abschnitt 5.5.1 und 5.5.2) unterscheiden sich die Verteilung des Perrhenats in Möhre und Erbse. Obwohl Rhenium keine bekannte biologische Funktion in Pflanzen erfüllt, ähnelt die laterale Verteilung eher der anionischer Nährstoffe als der von Iod. So ist ReO_4^- im Parenchym des Blattstiels der Möhre homogen verteilt und nicht ringförmig um das Leitbündel konzentriert. Ebenso ist Perrhenat in der Erbse, wenn auch nicht so stark in den Speicherzellen eingelagert, ähnlich verteilt wie die Nährstoffe. Da die Bilder der Nährstoffverteilung von den gleichen Schnitten wie die der Perrhenatverteilung stammen, kann sogar bestimmt werden, dass Perrhenat in dieselben Zellen wie die Pflanzennährstoffe eingelagert wird. Die Pflanze scheidet Perrhenat daher nicht in gesonderte Zellen ab. Eine eindeutige Übereinstimmung der Verteilung des Perrhenats mit einem bestimmten Nährstoff kann allerdings auch nicht festgestellt werden. Am ähnlichsten ist im Fall der Möhre eine Anlagerung analog zu Dihydrogenphosphat.

In der TOF-SIMS wurde in allen Proben Rhenium nur in Form von ReO_4^- und ReO_3^- vorgefunden, wobei letzteres vermutlich ein Sputterfragment des Perrhenats darstellt. Ob das ReO_4^- lediglich das von der Pflanze aufgenommene mobile Perrhenat oder ein Sputterfragment eines größeren Moleküls darstellt, lässt sich nicht abschließend beantworten.

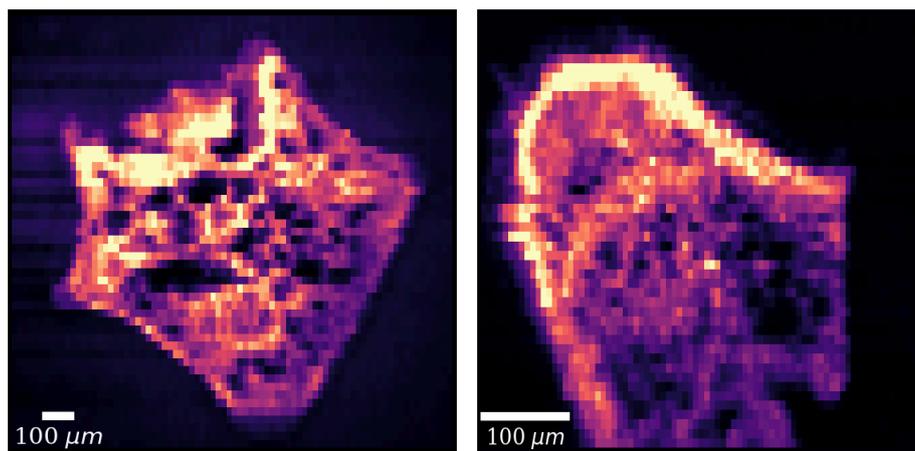
5 Ergebnisse und Diskussion

5.5.4 Technetium

Aufgrund seiner hohen Transferfaktoren ist ^{99}Tc von Bedeutung für die Risikoabschätzung bei Störfallszenarien. Die laterale Verteilung von ^{99}Tc innerhalb der Pflanzen wurde mittels rL-SNMS und LA-ICP-MS bestimmt.

LA-ICP-MS

Wegen des im Vergleich mit den Querschnitten relativ kleinen Messfensters der rL-SNMS von maximal $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$ wurden Schnitte der gleichen Proben ebenfalls mittels LA-ICP-MS gemessen, um einen Gesamtüberblick über die Verteilung von Technetium in dem Pflanzengewebe zu erhalten. Während die rL-SNMS deutlich höhere Auflösungen $<300\ \text{nm}$ ermöglicht, können auch die Verteilungen innerhalb größere Gewebeschnitte wie solche der Pfahlwurzel (siehe Abschnitt 5.2) mit LA-ICP-MS bestimmt werden. Allerdings ist hierbei die laterale Auflösung deutlich geringer. Die entsprechenden Bilder sind Abbildung 5.16 dargestellt.



(a) Blattstiel von *Daucus carota*. Spotsize: $30\ \mu\text{m}$. (b) Stängel von *Pisum sativum*. Spotsize: $10\ \mu\text{m}$.

Abbildung 5.16: Bilder von ^{99}Tc in Pflanzenschnitten, gemessen mittels LA-ICP-MS.

Bei der Möhre ist eine Heterogenität der Technetiumverteilung über den gesamten Blattstiel feststellbar. Dabei variiert die Konzentration an Technetium eher weniger zwischen den verschiedenen Gewebetypen, sondern mehr zwischen verschiedenen

5.5 Ortsaufgelöste Massenspektrometrie an Pflanzenproben

Bereichen des Blattstiels. Im Stängel der Erbse zeigt sich eine starke Akkumulation in der Epidermis, auch im Leitbündel beziehungsweise dem dazugehörigen Sklerenchym ist Technetium in erhöhter Konzentration messbar. Im Parenchym hingegen ist nur wenig Technetium vorhanden.

rL-SNMS

Da nur ein Isotop des Technetiums in den Pflanzen enthalten ist, konnte keine Verifikation über Isotopenverhältnisse in der TOF-SIMS durchgeführt werden. Demnach wäre keine sichere Aussage außerhalb von Kontrollmessungen möglich, ob der gemessene Peak tatsächlich Technetium zuzuordnen wäre. Zudem kann Technetium wegen seiner Radioaktivität nicht in denselben Mengen den Pflanzen zugegeben werden wie Rhenium oder Iod. Die zugegebene Stoffmenge unterschied sich zwischen Technetium ($<8 \mu\text{mol}$) und Rhenium (1 mmol) um knapp drei Größenordnungen. Die für die Messungen von Perrhenat aufgenommenen Spektren (siehe Abschnitt 5.5.3) zeigen, dass isobare Interferenzen circa eine Größenordnung unter dem Perrhenat-Signal liegen. Unter der Annahme eines ähnlichen Untergrunds bei Pertechnetat wäre demnach kein Technetium oberhalb des Untergrundes messbar. Daher wurde Technetium mittels rL-SNMS gemessen. Der Signalgewinn bei m/z 99 zwischen nicht resonanter und resonanter rL-SNMS Messung ist eindeutig ^{99}Tc zuzuordnen und ermöglicht daher eine eindeutige Verifikation des ^{99}Tc im Massenspektrum. Zudem werden isobare Interferenzen um mehrere Größenordnungen unterdrückt [43].

Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, wurden rL-SNMS-Messungen an denselben Pflanzenschnitten durchgeführt, an denen auch ReO_4^- und anionische Nährstoffe gemessen worden waren.

Daucus carota Im Blattstiel der Möhre kann in allen Gewebetypen Technetium in unterschiedlicher Verteilung gefunden werden. So ist an einzelnen Stellen des Kollenchyms und des Leitbündels Technetium in den Zellwänden angelagert. In Epidermis und Parenchym befindet sich ^{99}Tc weit verteilt im symplastischen Raum. Eine Abscheidung in gesonderte Bereiche kann nicht beobachtet werden. Bei einer weiteren Messung des Leitbündels des Blattstiels konnte genauer gezeigt werden, dass neben wenig in den Tracheen befindlichem Technetium sich der Großteil im apoplas-

5 Ergebnisse und Diskussion

tischen Raum befindet. Die Bilder der Technetiumverteilung und die aufgenommenen Massenspektren sind in Abbildung 5.17 gezeigt. In den abgebildeten Spektren ist die resonante Messung in Lila und die Messung mit verstimmttem Lasersystem in Grau dargestellt. Der Signalgewinn bei m/z 99 kann ^{99}Tc zugeordnet werden und das Signal bei der Messung mit verstimmttem Lasersystem ist auf nicht resonant angeregte Teilchen zurückzuführen.

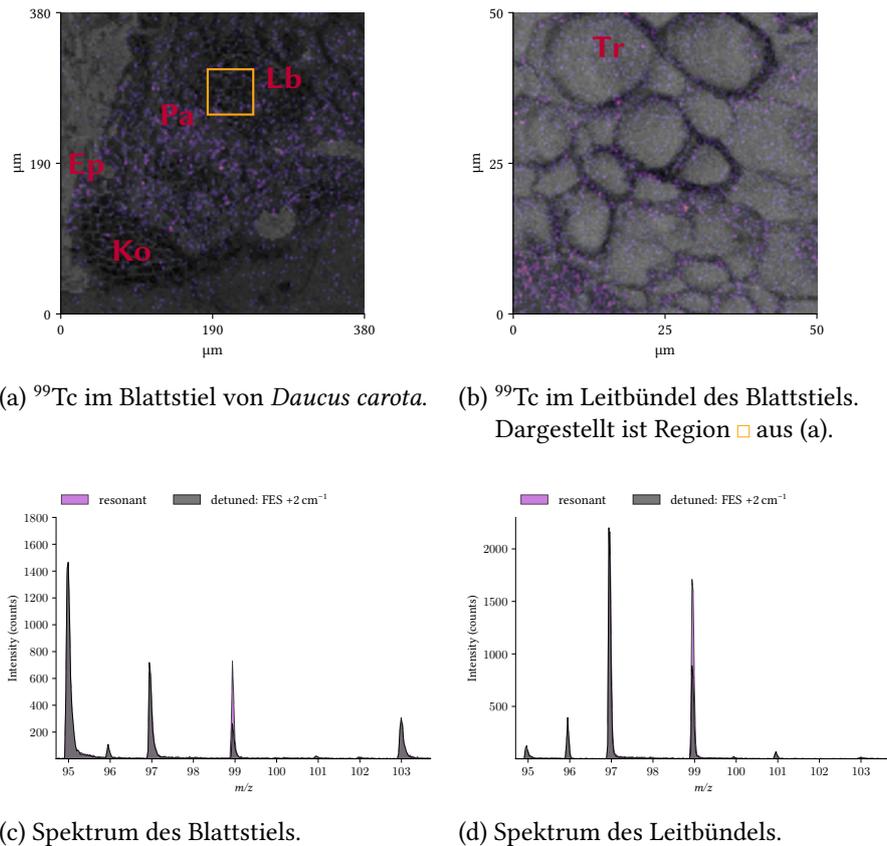
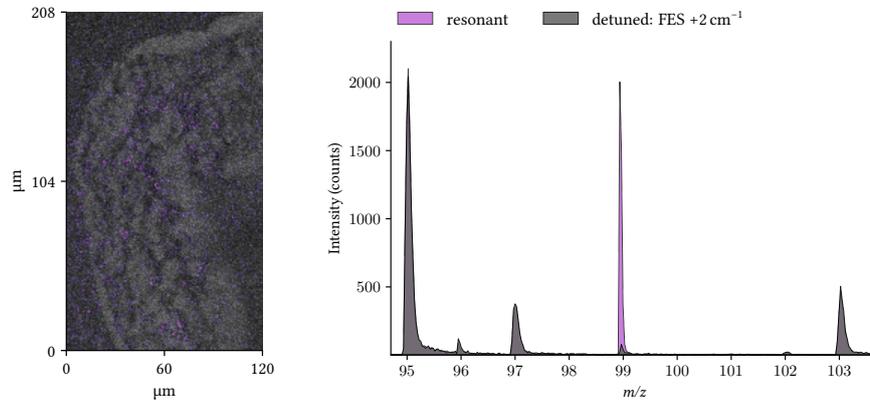


Abbildung 5.17: Verteilung von ^{99}Tc in dem Blattstiel von *Daucus carota*. Kürzel: **Ep** Epidermis, **Ko** Kollenchym, **Pa** Parenchym, **Lb** Leitbündel und **Tr** Trachee.

Blätter sind wegen ihrer feinen Struktur schwer mit dem Kryomikrotom zu schneiden. Genauere Gewebestrukturen sind daher nicht mehr erkennbar. Messungen von Technetium an Möhrenblättern zeigen keine besondere Ablagerung oder Verteilung,

5.5 Ortsaufgelöste Massenspektrometrie an Pflanzenproben

Technetium ist keinem spezifischen Bereich zuzuordnen. Die Messung von Technetium im Blatt der Möhre ist in Abbildung 5.18 zu sehen.

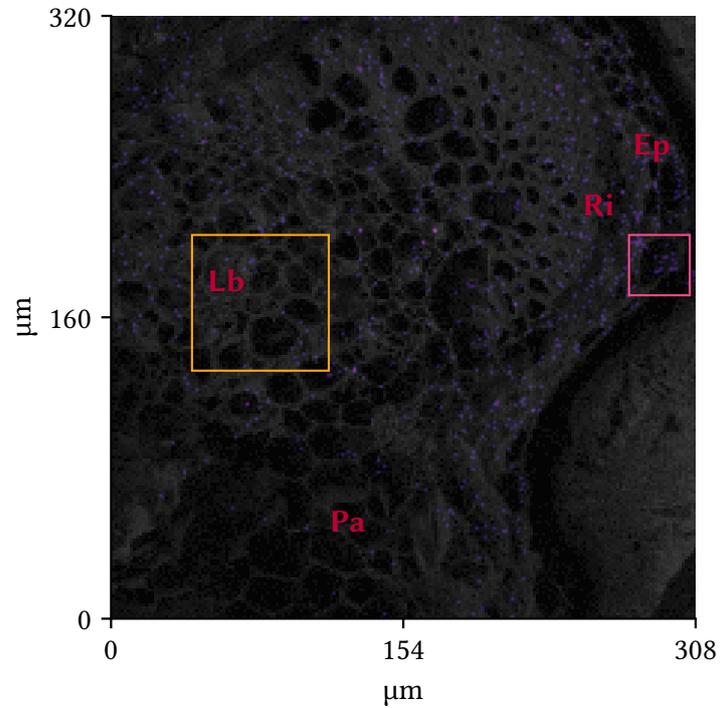


(a) ^{99}Tc im Blatt von *Daucus carota*. (b) Spektrum des Blattes.

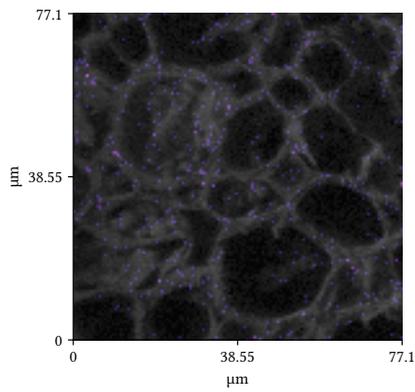
Abbildung 5.18: Verteilung von ^{99}Tc im Blatt von in *Daucus carota*.

Pisum sativum Bei Messungen des Stängels der Erbse zeigt sich Technetium primär in der Epidermis und der Rinde. Technetium ist nur vereinzelt in Parenchym und Leitbündel messbar. In Parenchym und Epidermis kann Technetium sowohl im apoplastischen als auch im symplastischen Raum nachgewiesen werden. In der Leitbündelregion liegt ^{99}Tc vereinzelt innerhalb der Zellen vor, das meiste Technetium ist aber in den Zellwänden vorhanden. In einer gesondert gemessenen Epidermiszelle zeigt sich neben dem Vorkommen in der Zellwand auch deutlich, dass Technetium im Symplasten konzentriert ist. Die entsprechenden Messdaten sind in Abbildung 5.19 abgebildet. In dem abgebildeten Spektrum ist die resonante Messung in Lila und die Messung mit verstimmttem ersten Anregungsschritt in Grau dargestellt. Es ist ein deutlicher Unterschied im Spektrum zwischen den Messungen mit verstimmttem und resonantem Lasersystem bei m/z 99 zu erkennen, der ^{99}Tc zugeordnet werden kann.

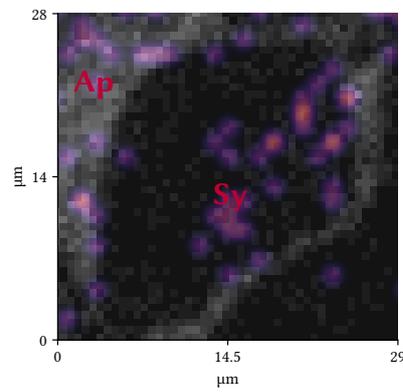
5 Ergebnisse und Diskussion



(a) ^{99}Tc im Stängel von *Pisum sativum*.

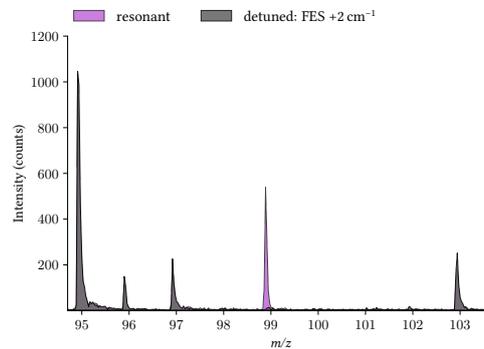


(b) ^{99}Tc im Leitbündel des Stängels.
Dargestellt ist Region \square aus (a).



(c) ^{99}Tc in der Epidermis des Stängels.
Dargestellt ist Region \square aus (a).

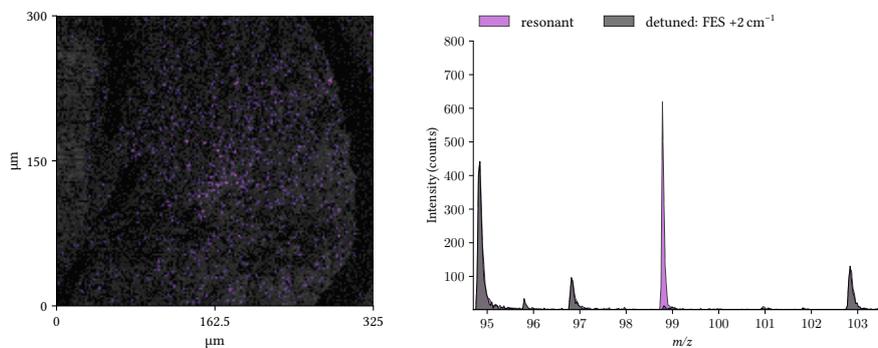
5.5 Ortsaufgelöste Massenspektrometrie an Pflanzenproben



(d) Spektrum des Stängels.

Abbildung 5.19: Verteilung von ^{99}Tc im Stängel von *Pisum sativum*. Kürzel: **Ep** Epidermis, **Ri** Rinde, **Pa** Parenchym, **Lb** Leitbündel, **Sy** Symplast und **Ap** Apoplast.

Im Blatt der Erbse ist ^{99}Tc im gesamten Querschnitt messbar. Im Zentrum des Blattes scheint eine leicht erhöhte Konzentration vorzuliegen, dies könnte aber im Zusammenhang mit dem Fokus der verwendeten Laser stehen. Aufgrund der schlecht erhaltenden Gewebemorphologie lässt sich keine weitergehende Aussage über die Verteilung im Blatt treffen. Dargestellt sind Spektrum und Querschnitt des Blattes in Abbildung 5.20.



(a) ^{99}Tc im Blatt von *Pisum sativum*. (b) Spektrum des Blattes.

Abbildung 5.20: Verteilung von ^{99}Tc im Blatt von in *Pisum sativum*.

5 Ergebnisse und Diskussion

Diskussion Während die Verteilung von ^{99}Tc in dem Blattstiel von *Daucus carota* und dem Stängel von *Pisum sativum* mit der homogenen Verteilung im Parenchym beziehungsweise der Anreicherung in Sklerenchym und Rinde makroskopisch relativ ähnlich zum Perrhenat ist, finden sich bei den genauer betrachteten Ausschnitten einige Unterschiede. In der Leitbündelregion der Möhre findet sich Technetium primär in den Zellwänden, während Perrhenat vornehmlich in den Tracheen vorliegt. Auch bei der Erbse ist Technetium in der Leitbündelregion stärker apoplastisch vorhanden als Perrhenat. Bei der Betrachtung derselben Epidermiszelle kann beobachtet werden, dass innerhalb der Zelle sowohl Perrhenat als auch Technetium gefunden werden kann. Anders als bei ReO_4^- ist ^{99}Tc aber auch in ähnlichen Mengen in den Zellwänden vorhanden.

Unter der Annahme, dass pflanzenphysiologisch Perrhenat tatsächlich als Homolog zu Pertechnetat eingesetzt werden kann [23, 21], könnten diese Unterschiede damit begründet werden, dass bei Messungen mittels TOF-SIMS lediglich Perrhenat gemessen wird. Bei Messungen mit der rL-SNMS wird hingegen ^{99}Tc resonant ionisiert, weshalb Fragmente zusätzlicher reduzierter oder immobilisierter Spezies im Spektrum bei m/z 99 enthalten sein könnten. Dies wird durch die Daten der sequentiellen Extraktion untermauert (siehe Abschnitt 5.3), wonach sich in der wasserlöslichen Fraktion des Blattes, welcher Pertechnetat und Perrhenat angehören, nach einem Monat nur noch etwa 15 % des Technetiums befindet. Die Messung von Perrhenat wäre demnach zu sehr eingeschränkt auf eine Spezies.

Da für den Vergleich der Aufnahme von Technetium mit den Pflanzennährstoffen jeweils die mobile Fraktion verwendet werden sollte, eignet sich hierfür die gemessene Verteilung des Perrhenats besser als die Technetiumverteilung, dessen genaue Zusammensetzung unbekannt ist. Demnach wäre eine Aufnahme von Technetium ähnlich wie Chlorid [62] unwahrscheinlich. In der Möhre wären H_2PO_4^- und SO_4^{2-} dem Perrhenat am ähnlichsten, in der Erbse in Hinblick auf die relative Konzentration in den Speicherorten SO_4^{2-} oder NO_3^- . Sulfat und Nitrat werden anders als Phosphat von der Pflanze reduziert. Überwiegt die Aufnahme den Bedarf an reduziertem Schwefel, so kann auch freies Sulfat in der Pflanze vorliegen. Freies Nitrat macht weniger als 10 bis 20 % des Stickstoffs in Pflanzen aus [19]. Dies wäre ähnlich der Reduktion von Technetium in Pflanzen [14, 15], falls Technetium und Rhenium in der Pflanze mit einem Nährstoff interferierten. Von den Ionenradien in wässriger Lösung her

5.5 Ortsaufgelöste Massenspektrometrie an Pflanzenproben

ist das Sulfat dem Pertechetat und Perrhenat am ähnlichsten (siehe Tabelle 5.2), allerdings stimmt die Ladung des Sulfations nicht mit der des Pertechnetats überein. Bei Nitrat hingegen stimmen die Ladungen überein, die Ionenradien sind aber relativ unterschiedlich. Eine eindeutige Aussage zur Aufnahme des Technetiums über die Transportwege eines Pflanzennährstoffs lässt sich daher nicht treffen.

Da Technetium im Symplasten gefunden werden kann, muss jedoch definitiv mindestens ein Transporter in die Aufnahme involviert sein. Ob es sich hierbei um einen nährstoffspezifischen Transporter oder einen unspezifischen Anionentransporter handelt, ist unbekannt.

Tabelle 5.2: Ionenradien in wässriger Lösung einiger von Pflanzen als Anionen aufgenommener Spezies. Aus *a* [68], *b* [69].

Spezies	Radius in Å
Cl^-	1,81 ^a
NO_3^-	1,79 ^a
H_2PO_4^-	2,00 ^a
SO_4^{2-}	2,30 ^a
I^-	2,20 ^a
ReO_4^-	2,60 ^a
TcO_4^-	2,40 ^b

5.5.5 TOF-SIMS und rL-SNMS an Pflanzenproben

Der limitierende Faktor bei Messungen an Pflanzenproben in der TOF-SIMS ist die Tatsache, dass ein vergleichsweise hoher Untergrund bei nahezu allen Masse/Ladungsverhältnissen vorliegt. Dies ist vermutlich auf eine Vielzahl organischer und anorganischer Verbindungen in Pflanze, Gefrierschnittmedium und auf der Oberfläche des Aluminiumblocks zurückzuführen, die wiederum bei dem Sputterprozess weiter fragmentieren. Die daher zur Detektion nötige Tracermenge an KI und NH_4ReO_4 von circa 1 mmol liegt von der Größenordnung in einem ähnlichen Bereich wie Mengen, die in der Literatur bei SIMS-Messungen an Pflanzen verwendet wurden. Die Tracerzugabe variierte dort zwischen 30 $\mu\text{mol/L}$ bei Gadolinium und 10 mmol/L bei

5 Ergebnisse und Diskussion

Rubidium [70, 3, 71], wobei alle Versuche in Nährlösung und nicht wie in dieser Arbeit in Boden stattfanden.

Bei der rL-SNMS macht sich die Heterogenität der Pflanzenproben ebenfalls bemerkbar. So konnte bei Messungen an dem Blattstiel von *Daucus carota* lediglich eine *Signal-to-noise ratio* von 2,6 erreicht werden, während diese bei den anderen Messungen stets über 10 war. Dies liegt an einem hohen Untergrund auf dem Masse/Ladung-Verhältnis von 99. Des Weiteren ergibt sich kein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl an Technetiumatomen in den Schnitten und dem Signal bei m/z 99, wie in Tabelle 5.3 zu sehen ist. Grund hierfür ist vermutlich die Stabilität von Frequenz und Leistung der drei genutzten Laser sowie die Fokussierung auf die einzelnen Proben. Auch die zwischen den Proben schwankenden Verhältnisse von Pflanze zu Gefrierschnittmedium und die unterschiedliche chemische Zusammensetzung der Pflanzen haben hierauf einen Einfluss.

Tabelle 5.3: Vergleich der Technetiumkonzentration, der Anzahl an Technetiumatomen der jeweiligen Schnitte, gemessenen counts/s und *Signal-to-noise ratio* (SNR) von Proben in der rL-SNMS. Die Atomanzahl wurde abgeschätzt über *Schnittdicke* · *Probenquerschnitt* · *Dichte* · *Technetiumkonzentration*. Dichte von Stängel beziehungsweise Blatt genähert aus a [72], b [73]. Kalibrationsgerade, Nachweis und Bestimmungsgrenze der Konzentrationsmessung sind in Abbildung 8.4 im Anhang zu finden.

Messung	^{99}Tc [kBq/g]	Atome ^{99}Tc in Schnitt	counts/s	SNR
Möhre Blattstiel	4,459(71)	$3,8(10) \cdot 10^{10} a$	0,53	2,6
Möhre Blatt	32,496(527)	$4,7(8) \cdot 10^{10} b$	2,36	13,5
Erbse Stängel	14,623(90)	$11,3(28) \cdot 10^{10} a$	0,22	21,8
Erbse Blatt	38,975(502)	$23,9(40) \cdot 10^{10} b$	1,05	15,2

Das von Wendt et al. [45] entwickelte Anregungsschema (siehe Tabelle 4.3) ionisiert ^{99}Tc resonant. Eine Verstimmung des ersten Anregungsschrittes um $+2 \text{ cm}^{-1}$ weg von der Resonanz führt zu einem Verlust des resonanten Technetiumsignals. Die Änderung der Energie ist gleichzeitig hinreichend klein, um auch nicht resonant angeregte Teilchen weiterhin zu ionisieren. Werden die aufgenommenen Spektren der Messungen mit resonantem und verstimmtem Lasersystem daher verglichen, so

5.5 Ortsaufgelöste Massenspektrometrie an Pflanzenproben

sollte bei m/z 99 ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Messungen festzustellen sein, falls Technetium gemessen wird. Trotz der schwankenden *Signal-to-noise ratio* bei Messungen mittels rL-SNMS konnte daher bei allen durchgeführten Technetium eindeutig nachgewiesen werden (siehe Spektren in Abschnitt 5.5.4). Werden die Verhältnisse des vermeintlichen Technetiumpeaks im Massenspektrum mit den Nachbarpeaks bei m/z 95 und 97 für das resonante und verstimmte Lasersetting sowie die Verhältnisse für die resonante Messung des anhaftenden Gefrierschnittmediums (siehe Tabelle 5.4) verglichen, so fällt auf, dass dieses Verhältnis für das Gefrierschnittmedium und das verstimmte Lasersetting einbricht. Dies zeigt, dass Technetium bei den Messungen primär im pflanzlichen Teil der Schnitte vorlag. Signal bei m/z 99 im Gefrierschnittmedium könnte dabei durch ein Verschmieren beim Schneideprozess zustande gekommen sein.

Tabelle 5.4: Verhältnis von Peaks bei m/z 99 zu m/z 95 {97} für resonantes und verstimmtes Lasersetting sowie das Gefrierschnittmedium.

Messung	Möhre Blattstiel	Möhre Blatt	Erbse Stängel	Erbse Blatt
Laser resonant	0,29 {0,75}	0,42 {2,34}	0,43 {2,21}	0,71 {3,40}
Laser detuned FES +2 cm ⁻¹	0,10 {0,28}	0,02 {0,09}	0,14 {0,03}	0,04 {0,23}
Gefrierschnittmedium resonant	0,02 {0,11}	0,16 {0,83}	0,033 {0,20}	0,04 {0,21}

Anhand der Messdaten aus rL-SNMS und ICP-MS kann zudem ein Vergleich beider Methoden vollzogen werden. Die Nachweisgrenze für ⁹⁹Tc betrug in der ICP-MS circa $6 \cdot 10^8$ Atome/mL bei Berechnung über die Leerwertmethode [60]. Üblicherweise werden circa 1 mL Probenvolumen zur Messung verwendet. Der mittels rL-SNMS gemessene Blattstiel der Möhre enthielt ungefähr $4 \cdot 10^{10}$ Atome bei einer *Signal-to-noise ratio* von 2,6. Demnach wäre die Nachweisgrenze der ICP-MS zwei Größenordnungen niedriger als die der rL-SNMS. Allerdings wurde nur ein kleiner Teil des Pflanzenschnitts abgetragen (1 - 2 nm der Probenoberfläche bei statischer SIMS [42]), eine Aussage über die tatsächliche Anzahl an Technetiumatomen in dem abgetragenen Teil des Schnittes ist schwierig. Eine Nachweisgrenze von $5 \cdot 10^9$ Atomen wäre unter optimalen Bedingungen (wenig isobare Interferenzen) denkbar, wenn von einem annähernd linearen Zusammenhang zwischen Atomanzahl und Zählrate bei einer

5 Ergebnisse und Diskussion

gleichen Probe ausgegangen wird und die Nachweisgrenze über das Blatt von *Daucus carota* abgeschätzt wird. Damit wäre die für einen Nachweis nötige Anzahl an Atomen bei der orts aufgelösten rL-SNMS mit Proben, an denen keine chemische Aufbereitung stattfand, nur eine Größenordnung höher als bei der ICP-MS, bei der aufbereitete Proben gemessen werden und die keine Ortsauflösung erlaubt.

6 Zusammenfassung und Interpretation

Mit dieser Arbeit sollten Erkenntnisse zum Radionuklidtransport durch Pflanzen gewonnen werden. Dazu wurde die laterale Verteilung von Iod, Rhenium und Technetium in *Daucus carota* und *Pisum sativum* qualitativ bestimmt. Zudem wurde in Kinetikversuchen die zeitliche Aufnahme von Technetium in Pfahlwurzel und Blatt der Möhre untersucht. Mit einer sequentiellen Extraktion von Technetium an *Daucus carota* sollten Erkenntnisse über die in der Pflanze vorliegenden Technetiumfraktionen gewonnen werden. Außerdem wurden die Probenvorbereitung und Gefrierschutzprotokolle für die Herstellung dünner Gewebeschnitte, wie sie für Messungen mittels TOF-SIMS und LA-ICP-MS nötig sind, getestet und optimiert.

Die Versuche zur Kinetik der Technetiumaufnahme zeigten einen raschen Anstieg der Technetiumkonzentration in den ersten Tagen, wobei sich nach circa einer Woche ein Plateau einstellte. Bereits nach zwei Stunden war die Technetiumkonzentration in der Möhre signifikant messbar. Laserablationsmessungen dieser Proben zeigten, dass das Technetium in den ersten Tagen primär im Xylem der Pfahlwurzel transportiert wurde und sich erst später im restlichen Gewebe ausbreitete. In dem Blattstiel war das Technetium relativ homogen verteilt, sobald die Nachweisgrenze überschritten war. Dies deutet auf einen primären Transport des Technetiums mit dem Wasserstrom hin. Experimente mit Rhenium in Hydrokultur lieferten zudem Hinweise, dass in der Erbse das im Stängel enthaltene Rhenium teilweise durch ungetracertes Wasser „ausgewaschen“ und in das Blatt weitergeleitet werden konnte. Bei der sequentiellen Extraktion von Technetium zeigte sich, dass die wasserlösliche Fraktion nach einem Monat sowohl in Pfahlwurzel als auch in Blatt nur noch circa 10 bis 15 % ausmachte. Stattdessen dominierte im Blatt die alkalilösliche Fraktion und in der Wurzel die Pigmentfraktion. Dies könnte entweder auf den Transport einer spezifischen Pig-

6 Zusammenfassung und Interpretation

mentfraktion in die Wurzel oder den Einfluss externer Faktoren wie Licht auf die Umwandlung des Per technetats hindeuten.

Bei der orts aufgelösten Massenspektrometrie konnte ein deutlicher Unterschied in der Verteilung von Iod und anionischen Nährstoffen in den Pflanzen festgestellt werden. Stattdessen ähnelte die Verteilung des Perrhenats eher den anionischen Nährstoffen, obwohl keine biologische Funktion bekannt ist. Auf makroskopischer Ebene war die Verteilung von Perrhenat und Technetium ähnlich, bei Betrachtung von Leitbündel und Epidermis fielen aber deutliche Unterschiede auf, was auf zusätzliche, im Technetiumsignal enthaltene Spezies hindeutet. Technetium war sowohl im Apoplasten als auch im Symplasten messbar, was eine Beteiligung von Transportern bei Aufnahme und Transport durch die Pflanze beweist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte Technetium in einzelnen Zellen mittels rL-SNMS gemessen werden. Die Probe mit der niedrigsten Technetiumkonzentration enthielt dabei im gesamten 10 µm dünnen Schnitt nur circa $4 \cdot 10^{10}$ Atome ^{99}Tc . Da aber nur ein Bruchteil des Probenmaterials abgetragen wurde, liegt der tatsächlich gemessene Wert weitaus niedriger. Dabei wurde eine maximale Ortsauflösung von ungefähr 300 nm erreicht. Die Methode liefert daher hervorragende Ergebnisse für *in-situ*-Untersuchungen von Radionukliden in Pflanzen. Da rL-SNMS nicht für die Messung größerer Querschnitte geeignet ist, wurde die Methode durch LA-ICP-MS ergänzt.

Interpretation

Die in dieser Arbeit gesammelten Daten lassen daher den Schluss zu, dass den untersuchten Pflanzen möglicherweise Rezeptoren für die Detektion von Technetium als Schwermetall fehlen. Dies könnte die fehlende Retention in der Wurzel und den in der *Kinetik der Technetiumaufnahme* (siehe Abschnitt 5.2) beobachteten schnellen Transport in das Blatt erklären. Sowohl in den Transport in die Leitungsbahnen als auch für die Aufnahme in den Symplasten im oberirdischen Teil der Pflanze sind Transporter involviert. Eine spezifische Übereinstimmung mit einem Nährstoff konnte nicht gezeigt werden, daher sind möglicherweise eher unspezifische Anionentransporter verantwortlich. Unter der Annahme, dass pflanzenphysiologische Prozesse der Schwermetallbindung wie zum Beispiel an Phytochelatinen in der gesamten Pflanze ähnlich ablaufen, müssten zusätzliche Faktoren die Unterschiede in den Technetium-

fraktionen von Wurzel und Blatt erzeugen. Daher wäre eine Interferenz des mobilen Pertechnetats mit der Reduktion von Nährstoffen wie Sulfat oder Nitrat denkbar. Sulfat ist allerdings aufgrund seiner zweifachen Ladung eher auszuschließen [14]. Wahrscheinlicher ist eine Interferenz mit der Elektronentransportkette der Photosynthese. Diese könnte die Fraktionsunterschiede zwischen Blatt und Wurzel bei der *sequentiellen Extraktion* (siehe Abschnitt 5.3) erklären. Zudem zeigten Lembrecht et al. [74], dass eine lichtabhängige Reduktion von Tc(VII) in Tc(V)-Komplexe in der Elektronentransportkette stattfand. Solche Prozesse könnten daher für einen Großteil der Reduktion des Pertechnetats verantwortlich sein. Diese These erklärt zudem, warum Technetium und Rhenium, anders als beispielsweise Iod, bei der *ortsaufgelösten Massenspektrometrie an Pflanzenproben* (siehe Abschnitt 5.5) homogen und stark symplastisch verteilt waren. Während Iod durch Rezeptoren erkannt wird und die entsprechenden Bindungsmechanismen auslöst, wäre dies für Pertechnetat nicht der Fall. Dieses würde demnach relativ ungehindert in der Pflanze weitertransportiert, bis schließlich sekundäre Effekte wie die Reduktion durch Licht oder Interferenzen mit Reduktionsmechanismen zu einer Komplexierung und Immobilisierung in den Vakuolen des Parenchyms und der Epidermis führen, wo Perrehan und Technetium mittels TOF-SIMS und rL-SNMS gemessen wurden.

7 Ausblick

In zukünftigen Arbeiten könnten in Kinetikversuchen neben den zu untersuchenden Radionukliden Deuterium zugegeben werden (vgl. [61]), um mittels TOF-SIMS die Verteilung des gleichzeitig zugegebenen Wassers mit der Verteilung des zu untersuchenden Nuklids vergleichen zu können. Auch die zusätzliche Zugabe von weiteren Pflanzennährstoffen wie Molybdän oder Mangan könnte für den Vergleich mit anderen Elementen von Interesse sein. Zudem könnte die Argon-GCIB („gas cluster ion beam“) der TOF-SIMS genutzt werden, um weitere Spezies und größere Moleküle messen zu können. Reduzierte Komplexe des Technetiums könnten so möglicherweise gefunden werden. Alternativ könnten über die räumliche Korrelation Erkenntnisse über mögliche Abwehrmechanismen der Pflanze gewonnen werden. Auch könnten Tiefenprofilierungen von Zellen in der TOF-SIMS durchgeführt werden. Auf diese Weise könnten dreidimensionale Modelle von der Radionuklidanlagerung in Zellen gewonnen werden. Um die Unterschiede in der Aufnahme zwischen verschiedenen Pflanzen zu untersuchen, könnten weitere Pflanzen aus verschiedenen Familien betrachtet werden. Von Interesse wäre zudem der Übergangsbereich zwischen Boden und Wurzel in der Rhizosphäre. TOF-SIMS-Messungen von Wurzeln mit anhaftendem Boden könnten *in-situ*-Informationen über die Aufnahme von Radionukliden liefern. Schließlich könnte die rL-SNMS auch auf andere Radionuklide als ^{99}Tc in Pflanzen angewandt werden, wobei die hohen Transferfaktoren des Technetiums die Messung erleichtern und für andere Nuklide die Nachweisgrenze womöglich unter Sicherheitsaspekten nicht erreicht werden kann. Messungen von Rhenium mittels rL-SNMS könnten durchgeführt werden, um die Ergebnisse mit Technetium zu vergleichen. Auf diese Weise könnten instrumentelle Einflüsse untersucht werden.

Für die Untersuchung feinerer Strukturen, wie sie in Blättern vorliegen, könnten die Gefrierschnittprotokolle weiter optimiert werden. Hierbei stellen neben weite-

7 Ausblick

ren Gefrierschutzmitteln auch andere Gefrierschnittmedien wie Gelatine oder neue Einfrier- und Schneideprozesse mögliche Optimierungsparameter dar.

Um die in Abschnitt 6 aufgestellte Hypothese zu den fehlenden Rezeptoren für Pertechentat in Pflanzen zu untersuchen, könnte dieses zusammen mit einem weiteren Schwermetall zugegeben werden. Die anschließende Bildung von verschiedenen Stoffen zur Bindung und Komplexierung durch die Pflanze könnten möglicherweise auch die Aufnahme des Pertechentats beeinflussen. Eine sequenzielle Extraktion an Pflanzen, die verschieden langen Tag- und Nachtlängen nach der Tracerzugabe ausgesetzt werden, könnte außerdem den Einfluss der Photosynthese bestätigen.

Literatur

- [1] 'Reference Biospheres' for solid radioactive waste disposal. Report of BIOMASS Theme 1 of the BIOSphere Modelling and ASSESSment (BIOMASS) Programme. Part of the IAEA Co-ordinated Research Project on Biosphere Modelling and Assessment (BIOMASS). Techn. Ber. Vienna, 2003. URL: http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/Biomass6%7B%5C_%7Dweb.pdf.
- [2] Quantification of Radionuclide Transfer in Terrestrial and Freshwater Environments for Radiological Assessments. TECDOC Series 1616. Vienna: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2009. ISBN: 978-92-0-104509-6. URL: <https://www.iaea.org/publications/8103/quantification-of-radionuclide-transfer-in-terrestrial-and-freshwater-environments-for-radiological-assessments>.
- [3] Julie Misson u. a. „Use of phosphate to avoid uranium toxicity in Arabidopsis thaliana leads to alterations of morphological and physiological responses regulated by phosphate availability“. In: *Environmental and Experimental Botany* 67.2 (2009), S. 353–362. ISSN: 00988472. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2009.09.001.
- [4] D. Texier u. a. *Modelling sequential Biosphere systems under Climate change for radioactive waste disposal. Project BIOCLIM*. URL: http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig%7B%5C_%7Dq=RN:41021927.
- [5] *Karlsruhe Nuclide Chart Online (KNCO++)*. URL: <https://nucleonica.com/Application/KNCOPlus.aspx> (besucht am 17.12.2020).
- [6] B. T. Kenna und P. K. Kuroda. „Technetium in nature“. In: *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* 26.4 (Apr. 1964), S. 493–499. ISSN: 00221902. DOI: 10.1016/0022-1902(64)80280-3.

Literatur

- [7] Y. Onishi u. a. *Critical review: Radionuclide transport, sediment transport, and water quality mathematical modeling; and radionuclide adsorption/desorption mechanisms*. Techn. Ber. Richland, WA: Pacific Northwest National Laboratory (PNNL), Jan. 1981. DOI: 10.2172/10125120. URL: <http://www.osti.gov/servlets/purl/10125120-3ntYhD/native/>.
- [8] Keiko Tagami. „Technetium-99 Behavior in the Terrestrial Environment“. In: *Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences* 4.1 (2003), A1–A8. ISSN: 1345-4749. DOI: 10.14494/jnrs2000.4.a1.
- [9] *Discharges and Environmental Monitoring Annual Report 2019 - GOV.UK*. URL: <https://www.gov.uk/government/publications/discharges-and-environmental-monitoring-annual-report-2019> (besucht am 28.11.2020).
- [10] „Radiation Dose to Patients from Radiopharmaceuticals“. In: *ICRP 18* (1988). URL: <https://www.icrp.org/publication.asp?id=ICRP%20Publication%2053>.
- [11] S. K. Shukla, G. B. Manni und C. Cipriani. „Technetium in biology and medicine“. In: *Inorganica Chimica Acta* 92.1 (1984), S. 83–88. ISSN: 00201693. DOI: 10.1016/S0020-1693(00)80071-7.
- [12] *Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Status and Trends | IAEA*. URL: <https://www.iaea.org/publications/8110/technetium-99m-radiopharmaceuticals-status-and-trends> (besucht am 24.09.2020).
- [13] *Periodic Table of Elements: Los Alamos National Laboratory*. URL: <https://periodic.lanl.gov/75.shtml> (besucht am 24.09.2020).
- [14] G. C. Krijger u. a. „Chemical forms of technetium in tomato plants; TcO₄⁻, Tc-cysteine, Tc-glutathione and Tc-proteins“. In: *Environmental and Experimental Botany* 42.1 (1999), S. 69–81. ISSN: 00988472. DOI: 10.1016/S0098-8472(99)00019-2.
- [15] G. C. Krijger, P. M. Van Vliet und H. T. Wolterbeek. „Metal speciation in xylem exudate of *Lycopersicon esculentum* Mill - technetium“. In: *Plant and Soil* 212.2 (1999), S. 165–173. ISSN: 0032079X. DOI: 10.1023/A:1004607813710.

- [16] *Reduced Decay Schemes*. URL: <https://nucleonica.com/Application/ReducedDecaySchemes.aspx> (besucht am 16. 12. 2020).
- [17] *Handbook of Parameter Values for the Prediction of Radionuclide Transfer in Terrestrial and Freshwater Environments*. Technical Reports Series 472. Vienna: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2010. ISBN: 978-92-0-113009-9. URL: <https://www.iaea.org/publications/8201/handbook-of-parameter-values-for-the-prediction-of-radionuclide-transfer-in-terrestrial-and-freshwater-environments>.
- [18] J. M. Mousny, P. Roucoux und C. Myttenaere. „Absorption and translocation of technetium in pea plant“. In: *Environmental and Experimental Botany* 19.4 (1979), S. 263–268. ISSN: 00988472. DOI: 10.1016/0098-8472(79)90028-5.
- [19] Joachim W. Kadereit u. a. *Strasburger – Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften*. Springer Berlin Heidelberg, 2014. DOI: 10.1007/978-3-642-54435-4.
- [20] Roy Bennett und Neil Willey. „Soil availability, plant uptake and soil to plant transfer of ⁹⁹Tc - A review“. In: *Journal of Environmental Radioactivity* 65.2 (2003), S. 215–231. ISSN: 0265931X. DOI: 10.1016/S0265-931X(02)00098-X.
- [21] Keiko Tagami und Shigeo Uchida. „A comparison of concentration ratios for technetium and nutrient uptake by three plant species“. In: *Chemosphere* 60.5 (Juli 2005), S. 714–717. ISSN: 00456535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.03.087.
- [22] A. A. Woolf. „An outline of rhenium chemistry“. In: *Quarterly Reviews, Chemical Society* 15.3 (Jan. 1961), S. 372–391. ISSN: 00092681. DOI: 10.1039/qr9611500372. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/1961/qr/qr9611500372>.
- [23] Keiko Tagami und Shigeo Uchida. „Comparison of transfer and distribution of technetium and rhenium in radish plants from nutrient solution“. In: *Applied Radiation and Isotopes* 61.6 (Dez. 2004), S. 1203–1210. ISSN: 09698043. DOI: 10.1016/j.apradiso.2004.05.074.

Literatur

- [24] A. Daraoui u. a. „Iodine-129, Iodine-127 and Caesium-137 in the environment: Soils from Germany and Chile“. In: *Journal of Environmental Radioactivity* 112 (Okt. 2012), S. 8–22. ISSN: 0265931X. DOI: 10.1016/j.jenvrad.2012.02.011.
- [25] D. C. Whitehead. „The distribution and transformations of iodine in the environment“. In: *Environment International* 10.4 (Jan. 1984), S. 321–339. ISSN: 01604120. DOI: 10.1016/0160-4120(84)90139-9.
- [26] D. I. Kaplan u. a. „Radioiodine biogeochemistry and prevalence in groundwater“. In: *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 44.20 (Okt. 2014), S. 2287–2335. ISSN: 15476537. DOI: 10.1080/10643389.2013.828273. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4160254/>.
- [27] U.S. Environmental Protection Agency. *UNDERSTANDING VARIATION IN PARTITION COEFFICIENT KD, VALUES, VOLUME III: AMERICIUM, ARSENIC, CURIUM, IODINE, NEPTUNIUM, RADIUM, AND TECHNETIUM*. Techn. Ber. Washington, D.C., 1997.
- [28] Claudia Kiferle u. a. „Evidences for a nutritional role of iodine in plants“. In: *bioRxiv* (Sep. 2020), S. 2020.09.16.300079. DOI: 10.1101/2020.09.16.300079. URL: <https://doi.org/10.1101/2020.09.16.300079>.
- [29] G. W.F.H. Borst Pauwels. „Iodine as a micronutrient for plants“. In: *Plant and Soil* 14.4 (Juli 1961), S. 377–392. ISSN: 0032079X. DOI: 10.1007/BF01666295. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01666295>.
- [30] B. Blasco u. a. „Iodine biofortification and antioxidant capacity of lettuce: potential benefits for cultivation and human health“. In: *Annals of Applied Biology* 152.3 (Juni 2008), S. 289–299. ISSN: 0003-4746. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2008.00217.x. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1744-7348.2008.00217.x>.
- [31] Stephen K. Roberts. *Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots*. Feb. 2006. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01639.x. URL: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1469-8137.2006.01639.x>.

- [32] Ulrich Kück und Gabriele Wolff. *Botanisches Grundpraktikum*. Springer Berlin Heidelberg, 2014. DOI: 10.1007/978-3-642-53705-9.
- [33] HUGH M. DALE. „THE BIOLOGY OF CANADIAN WEEDS: 5. *Daucus carota*“. In: *Canadian Journal of Plant Science* 54.4 (Okt. 1974), S. 673–685. ISSN: 0008-4220. DOI: 10.4141/cjps74-117. URL: <https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.4141/cjps74-117>.
- [34] Otto Wilhelm Thomé. *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. 1885. URL: <http://www.biolib.de/thome/>.
- [35] Walter H Schuster u. a. *Leguminosen zur Kornnutzung : Kornleguminosen der Welt*. Justus-Liebig-Universität Gießen, 1998. URL: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2000/320/>.
- [36] John G. Day und Glyn N. Stacey, Hrsg. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Bd. 368. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2007. ISBN: 978-1-58829-377-0. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2. URL: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-362-2>.
- [37] Barbara M. Reed. *Plant cryopreservation: A practical guide*. Springer New York, 2008, S. 1–513. ISBN: 9780387722764. DOI: 10.1007/978-0-387-72276-4.
- [38] Aline S. Teixeira u. a. „Glass transition and heat capacity behaviors of plant vitrification solutions“. In: *Thermochimica Acta* 593 (Okt. 2014), S. 43–49. ISSN: 00406031. DOI: 10.1016/j.tca.2014.08.015.
- [39] Shuji Nishizawa u. a. „Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification“. In: *Plant Science* 91.1 (1993), S. 67–73. ISSN: 01689452. DOI: 10.1016/0168-9452(93)90189-7.
- [40] Sarah Fearn. *An introduction to time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) and its application to materials science*. IOP Publishing Ltd, Jan. 2015, S. 1–67. ISBN: 9781681740881. DOI: 10.1088/978-1-6817-4088-1.
- [41] Quentin P. Vanbellinghen u. a. „Time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging of biological samples with delayed extraction for high mass and high spatial resolutions“. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 29.13

Literatur

- (Juli 2015), S. 1187–1195. ISSN: 0951-4198. DOI: 10.1002/rcm.7210. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rcm.7210>.
- [42] Anna M. Belu, Daniel J. Graham und David G. Castner. *Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: Techniques and applications for the characterization of biomaterial surfaces*. Sep. 2003. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00159-5.
- [43] Michael Franzmann u. a. „Resonant laser-SNMS for spatially resolved and element selective ultra-trace analysis of radionuclides“. In: *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 33.5 (Mai 2018), S. 730–737. ISSN: 13645544. DOI: 10.1039/c7ja00423k. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/ja/c7ja00423k>.
- [44] Boris M. Smirnov. *Physics of Atoms and Ions*. Springer-Verlag, 2003. DOI: 10.1007/b97560.
- [45] K. Wendt u. a. „Progress of ultra trace determination of technetium using laser resonance ionization mass spectrometry“. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404.8 (Nov. 2012), S. 2173–2176. ISSN: 16182642. DOI: 10.1007/s00216-012-6309-8. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-012-6309-8>.
- [46] Michael Franzmann. „A new tool for ultra-trace analysis of radionuclides : setup, optimization and characterization of the resonant laser-SNMS system for IRS Hannover“. Diss. Hannover: Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, 2018. DOI: 10.15488/3260. URL: <https://www.repo.uni-hannover.de/handle/123456789/3290>.
- [47] Wolfgang Paul und Helmut Steinwedel. *Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld*. Juli 1953. DOI: 10.1515/zna-1953-0710. URL: <https://www.degruyter.com/view/journals/zna/8/7/article-p448.xml>.
- [48] Maria Schönbacher. „Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)“. In: *Encyclopedia of Geochemistry. Encyclopedia of Earth Sciences Series*. Hrsg. von William M. White. Springer International Publishing, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-39193-9_111-1. URL: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-39193-9_111-1.

- [49] Daniel C. Harris. *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*. Springer Berlin Heidelberg, 2014. DOI: 10.1007/978-3-642-37788-4.
- [50] B. N. Chichkov u. a. „Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids“. In: *Applied Physics A: Materials Science and Processing* 63.2 (1996), S. 109–115. ISSN: 09478396. DOI: 10.1007/BF01567637. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01567637>.
- [51] *Informationen zur Charakterisierung von Referenzböden - Speziierung und Beschreibung des Verhaltens von Schadstoffen in Referenzböden*. Techn. Ber. Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie, 2005.
- [52] D. K. Gupta u. a. „Oxidative stress and arsenic toxicity: Role of NADPH oxidases“. In: *Chemosphere* 90.6 (Feb. 2013), S. 1987–1996. ISSN: 18791298. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.10.066.
- [53] Constance Oliver und Maria Célia Jamur, Hrsg. *Immunocytochemical Methods and Protocols*. Bd. 588. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. ISBN: 978-1-58829-463-0. DOI: 10.1007/978-1-59745-324-0. URL: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-324-0>.
- [54] Tohnyui Ndinyanka Fabrice u. a. „Efficient preparation of Arabidopsis pollen tubes for ultrastructural analysis using chemical and cryo-fixation“. In: *BMC Plant Biology* 17.1 (Okt. 2017), S. 1–13. ISSN: 14712229. DOI: 10.1186/s12870-017-1136-x. URL: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12870-017-1136-x>.
- [55] Shan Rong Shi u. a. „Evaluation of the value of frozen tissue section used as "gold standard" for immunohistochemistry“. In: *American Journal of Clinical Pathology* 129.3 (2008), S. 358–366. ISSN: 00029173. DOI: 10.1309/7CXUYXT23E5AL8KQ.
- [56] Gareth Griffiths u. a. „On the preparation of cryosections for immunocytochemistry“. In: *Journal of Ultrastructure Research* 89.1 (Okt. 1984), S. 65–78. ISSN: 00225320. DOI: 10.1016/S0022-5320(84)80024-6.
- [57] Samar Fatima u. a. „Cryopreservation of embryogenic cell suspensions of *Catharanthus roseus* L. (G) Don.“ In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 98.1 (Juli 2009), S. 1–9. ISSN: 01676857. DOI: 10.1007/s11240-009-9532-z.

Literatur

URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-009-9532-z>.

- [58] Keliang Shi u. a. „Analysis of technetium species and fractions in natural seaweed using biochemical separation and ICP-MS measurement“. In: *Analytical Chemistry* 88.23 (Dez. 2016), S. 11931–11937. ISSN: 15206882. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b03837. URL: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.6b03837>.
- [59] John D. Hunter. „Matplotlib: A 2D graphics environment“. In: *Computing in Science and Engineering* 9.3 (2007), S. 90–95. ISSN: 15219615. DOI: 10.1109/MCSE.2007.55.
- [60] DIN 32645. „Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung“. In: (2008). DOI: <https://dx.doi.org/10.31030/1465413>.
- [61] Morio Iijima u. a. „Visualization of lateral water transport pathways in soybean by a time of flight-secondary ion mass spectrometry cryo-system“. In: *Journal of Experimental Botany* 62.6 (März 2011), S. 2179–2188. ISSN: 00220957. DOI: 10.1093/jxb/erq418. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3060697/>.
- [62] K Tagami und S Uchida. „A Comparison of Technetium and Rhenium Uptake by Plants“. In: (2004), S. 113–116.
- [63] Huan Xin Weng u. a. „Mechanism of iodine uptake by cabbage: Effects of iodine species and where it is stored“. In: *Biological Trace Element Research* 125.1 (Okt. 2008), S. 59–71. ISSN: 01634984. DOI: 10.1007/s12011-008-8155-2. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12011-008-8155-2>.
- [64] Elodie Françoise Verhaeghe u. a. „Microchemical imaging of iodine distribution in the brown alga *Laminaria digitata* suggests a new mechanism for its accumulation“. In: *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 13.2 (Nov. 2008), S. 257–269. ISSN: 09498257. DOI: 10.1007/s00775-007-0319-6. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00775-007-0319-6>.

- [65] H. Nishizono u. a. „The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense*“. In: *Plant and Soil* 101.1 (März 1987), S. 15–20. ISSN: 0032079X. DOI: 10.1007/BF02371025. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02371025>.
- [66] Regina Vögeli-Lange und George J. Wagner. „Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves: Implication of a transport function for cadmium-binding peptides“. In: *Plant Physiology* 92.4 (1990), S. 1086–1093. ISSN: 00320889. DOI: 10.1104/pp.92.4.1086. URL: [/pmc/articles/PMC1062420/?report=abstract](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1062420/?report=abstract) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1062420/>.
- [67] Kaori Saito u. a. „Aluminum localization in the cell walls of the mature xylem of maple tree detected by elemental imaging using time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS)“. In: *Holzforschung* 68.1 (2014), S. 85–92. ISSN: 00183830. DOI: 10.1515/hf-2012-0215.
- [68] Yizhak Marcus. „Thermodynamics of solvation of ions. Part 5. - Gibbs free energy of hydration at 298.15 K“. In: *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 87.18 (Jan. 1991), S. 2995–2999. ISSN: 09565000. DOI: 10.1039/FT9918702995. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/1991/ft/ft9918702995>.
- [69] Volker Neck und Basil Kanellakopoulos. „Partial Molar Volume and Effective Ionic Radius of the TcO_4^- Ion in Aqueous Solution“. In: *Radiochimica Acta* 42.3 (Juni 1987), S. 135–138. ISSN: 21933405. DOI: 10.1524/ract.1987.42.3.135. URL: <https://www.degruyter.com/view/journals/ract/42/3/article-p135.xml>.
- [70] Jessica Saatz u. a. „Location and speciation of gadolinium and yttrium in roots of *Zea mays* by LA-ICP-MS and ToF-SIMS“. In: *Environmental Pollution* 216 (2016), S. 245–252. ISSN: 18736424. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.05.069. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.069>.
- [71] Ralf Metzner u. a. „Imaging nutrient distributions in plant tissue using time-of-flight secondary ion mass spectrometry and scanning electron microscopy“. In:

Literatur

- Plant Physiology* 147.4 (2008), S. 1774–1787. ISSN: 00320889. DOI: 10.1104/pp.107.109215.
- [72] Karl J Niklas. *Plant Height and the Properties of Some Herbaceous Stems*. Techn. Ber. 2. 1995, S. 133–142.
- [73] Byron B. Lamont u. a. „LMA, density and thickness: recognizing different leaf shapes and correcting for their nonlaminarity“. In: *New Phytologist* 207.4 (Sep. 2015), S. 942–947. ISSN: 0028646X. DOI: 10.1111/nph.13465. URL: <http://doi.wiley.com/10.1111/nph.13465>.
- [74] Johan F. Lembrechts und Gilbert M. Desmet. „Light Dependent Reduction of Pertechnetate ($^{99}\text{TcO}_4^-$) by Broken Chloroplasts“. In: *Plant Physiology* 81.4 (Aug. 1986), S. 1003–1007. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.81.4.1003.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Zerfallschema des ^{99}Tc	4
2.2	Querschnitt eines Blattstiels	7
2.3	Querschnitt von offenem und geschlossenem Leitbündel	8
2.4	<i>Daucus carota</i> , Illustration	10
2.5	<i>Pisum sativum</i> , Illustration	11
2.6	Schematischer Aufbau der TOF-SIMS	15
2.7	Anregungsschema von ^{99}Tc	16
2.8	Erster Stabilitätsbereich der Mathieschen Differentialgleichung . . .	18
2.9	Schematischer Aufbau der ICP-MS	19
4.1	Darstellung des Gefrierprotokolls	29
4.2	Schema der sequentiellen Extraktion	31
4.3	Farbkarte <i>Magma</i>	34
5.1	Vergleichsschnitte <i>Cryobar</i> und Flüssigstickstoff	38
5.2	Vergleichsschnitte Gefrierschutzlösungen	39
5.3	Vergleichsschnitte Aceton-Fixierung	40
5.4	Kinetik der Technetiumaufnahme, Konzentrationen	41
5.5	Kinetik der Technetiumaufnahme, LA-ICP-MS-Messungen	44
5.6	sequentielle Extraktion an <i>Daucus carota</i>	45
5.7	Anionische Nährstoffe in <i>Daucus carota</i>	48
5.8	Anionische Nährstoffe in <i>Pisum sativum</i>	49
5.9	Verteilung von Iod in <i>Daucus carota</i>	51
5.10	Verteilung von Iod in <i>Pisum sativum</i>	53
5.11	Verteilung von Perrhenat in <i>Daucus carota</i>	55
5.12	Spektrum der Wurzel einer mit NH_4ReO_4 getracerten Möhre	56
5.13	Verteilung von ReO_4^- bei Anzucht in RefeSol 01-A	56

Abbildungsverzeichnis

5.14	Verteilung von Perrhenat in <i>Pisum sativum</i>	58
5.15	Spektrum der Wurzel einer mit NH_4ReO_4 getracerten Erbse	59
5.16	Bilder von ^{99}Tc in Pflanzenschnitten, gemessen mittels LA-ICP-MS	60
5.17	Verteilung von ^{99}Tc in dem Blattstiel von <i>Daucus carota</i>	62
5.18	Verteilung von ^{99}Tc im Blatt von in <i>Daucus carota</i>	63
5.19	Verteilung von ^{99}Tc im Stängel von <i>Pisum sativum</i>	65
5.20	Verteilung von ^{99}Tc im Blatt von in <i>Pisum sativum</i>	65
8.1	Kalibrationsgeraden von ^{187}Re für die Hydrokulturversuche	92
8.2	Kalibrationsgeraden von ^{187}Re und ^{99}Tc für die Kinetik der Technetiumaufnahme	93
8.3	Kalibrationsgeraden von ^{187}Re und ^{99}Tc für die sequentielle Extraktion von Technetium	94
8.4	Kalibrationsgeraden von ^{99}Tc für die Konzentrationsbestimmung an rL-SNMS-Proben	95
8.5	Technetium im Blattstiel der Möhre	96
8.6	Technetium in den Leitungsbahnen des Blattstiels der Möhre	97
8.7	Technetium im Blatt der Möhre	98
8.8	Technetium im Stängel der Erbse	99
8.9	Technetium in den Leitungsbahnen des Stängels der Erbse	100
8.10	Technetium in der Epidermis des Stängels der Erbse	101
8.11	Technetium im Blatt der Erbse	102

Tabellenverzeichnis

3.1	Bodenparameter der Referenzböden	22
3.2	Parameter der Pflanzenaufzucht	23
3.3	Zusammensetzung der Hoagland-Lösung	24
3.4	Übersicht über Tracermengen und Messmethoden	25
4.1	Fixierungsmethoden mit Aceton	28
4.2	Gefrierschutzmethoden mit Saccharose und Glycerin	28
4.3	Wellenzahl der verwendeten Laser für rL-SNMS	33
5.1	Rhenium in Hydrokultur	47
5.2	Ionenradien einer Anionen	67
5.3	Eigenschaften der rL-SNMS-Messungen	68
5.4	Validierung des Technetiumpeaks für rL-SNMS	69
8.1	Kinetik der Technetiumaufnahme	91
8.2	Sequentielle Extraktion an <i>Daucus carota</i>	92

Anhang

Tabelle 8.1: Technetiumkonzentration in LA-ICP-MS-Proben von *Daucus carota*.

Zeitpunkt	Konzentration in Bq/g	
	Pfahlwurzel	Blatt
2 h	0,55 (3)	0,38 (2)
4 h	3,50 (6)	4,19 (4)
1 d	4,93 (11)	19,24 (25)
2 d	22,31 (13)	154,69 (51)
3 d	40,96 (26)	239,81 (179)
4 d	13,53 (18)	124,32 (134)
8 d	154,19 (115)	1272,57 (1336)
10 d	98,70 (89)	1000,21 (1306)
14 d	67,63 (670)	843,31 (1131)

Tabelle 8.2: Fraktionen der sequentiellen Extraktion von Technetium aus *Daucus carota*.

Fraktion	Konzentration in Bq/g	
	Pfahlwurzel	Blatt
Pigment	6,169 ^{+0.130} _{-0.070}	11,948 ^{+0.504} _{-0.116}
wasserlösliches Protein	0.017 ^{+0.002} _{-0.001}	0.264 ^{+0.022} _{-0.088}
restl. wasserlöslich	1,202 ^{+0.057} _{-0.324}	77,488 ^{+4.921} _{-1.225}
säurelöslich	0,977 ^{+0.124} _{-0.072}	87,720 ^{+15.670} _{-4.158}
alkalilöslich	2,226 ^{+0.172} _{-0.069}	308,578 ^{+15.157} _{-5.375}
Cellulose	1,523 ^{+0.010} _{-0.110}	42,506 ^{+0.260} _{-14.160}

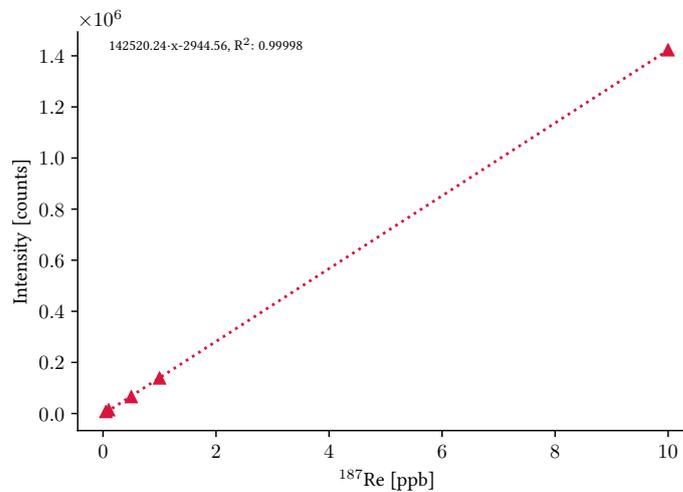
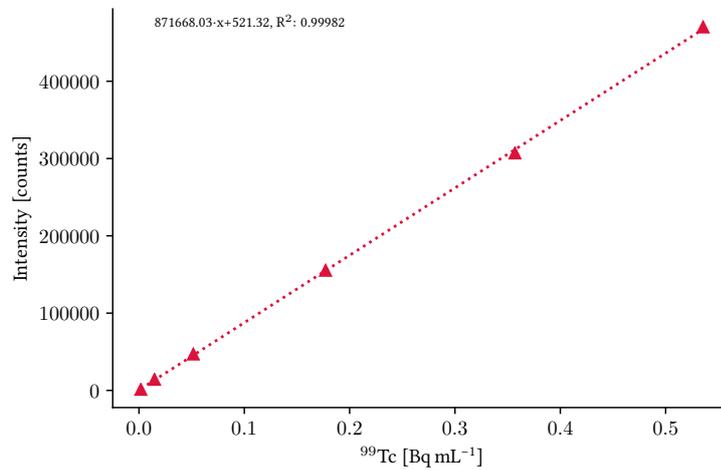
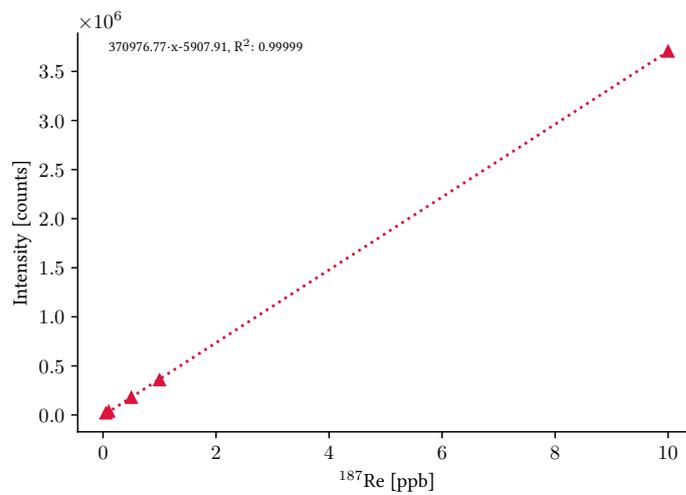


Abbildung 8.1: Kalibrationsgeraden von ^{187}Re für die Hydrokulturversuche. Nachweisgrenze 0,25 ppt, Bestimmungsgrenze 0,75 ppt.

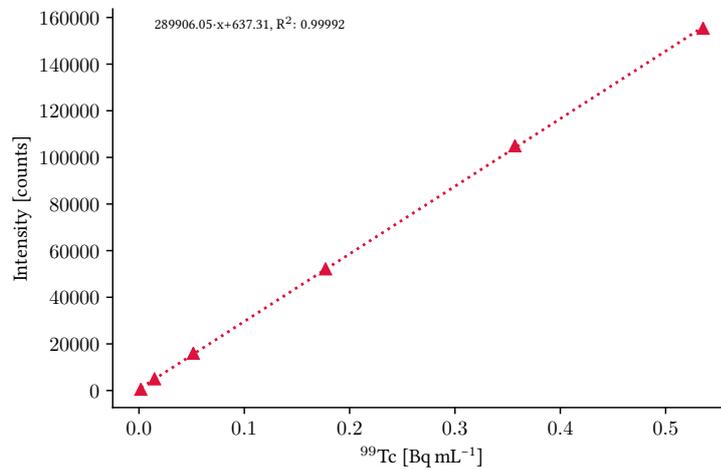


(a) Kalibrationsgerade ⁹⁹Tc

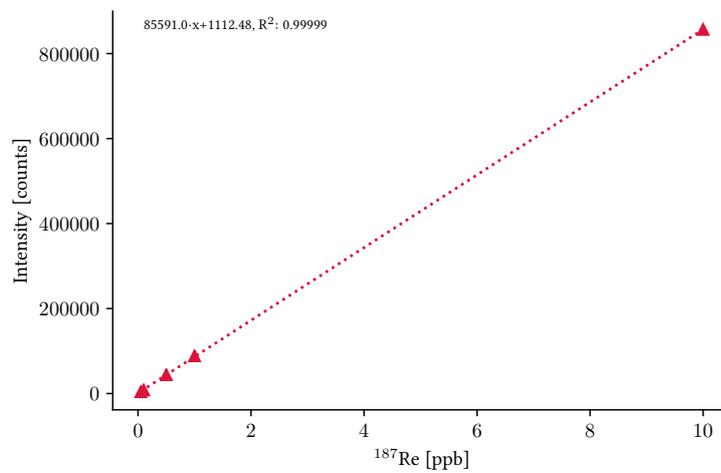


(b) Kalibrationsgerade ¹⁸⁷Re

Abbildung 8.2: Kalibrationsgeraden von ¹⁸⁷Re und ⁹⁹Tc für die Kinetik der Technetiumaufnahme. Nachweisgrenze ⁹⁹Tc 132 µBq/mL, Bestimmungsgrenze ⁹⁹Tc 397 µBq/mL.



(a) Kalibrationsgerade ⁹⁹Tc



(b) Kalibrationsgerade ¹⁸⁷Re

Abbildung 8.3: Kalibrationsgeraden von ¹⁸⁷Re und ⁹⁹Tc für die sequentielle Extraktion von Technetium. Nachweisgrenze ⁹⁹Tc 75 µBq/mL, Bestimmungsgrenze ⁹⁹Tc 226 µBq/mL.

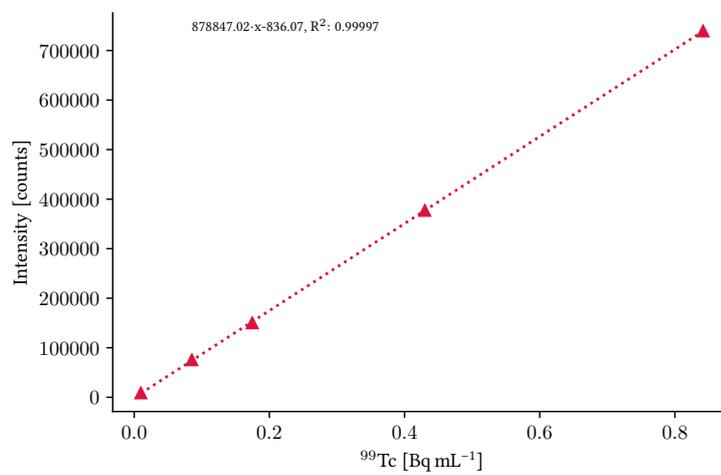


Abbildung 8.4: Kalibrationsgeraden von ^{99}Tc für die Konzentrationsbestimmung an rL-SNMS-Proben. Nachweisgrenze ^{99}Tc 66 $\mu\text{Bq/mL}$, Bestimmungsgrenze ^{99}Tc 197 $\mu\text{Bq/mL}$. Dies entspricht einer Nachweisgrenze von $6,3 \cdot 10^8$ Atomen/mL.

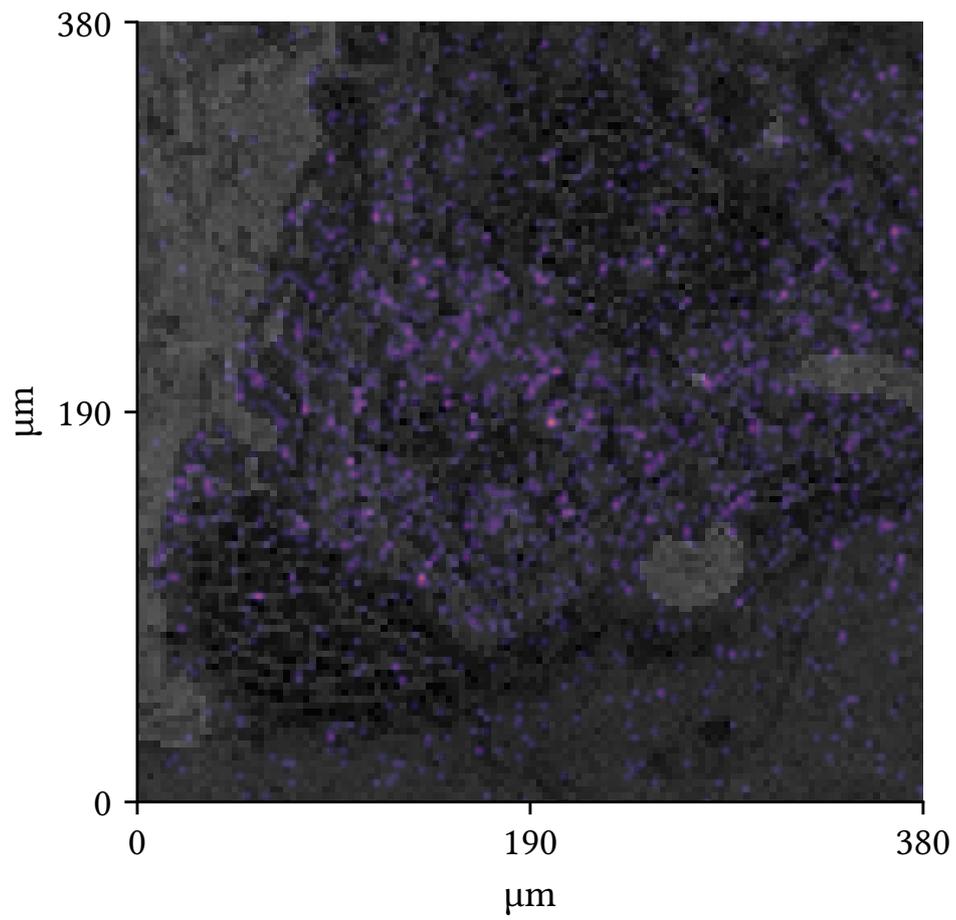


Abbildung 8.5: Technetium im Blattstiel der Möhre.

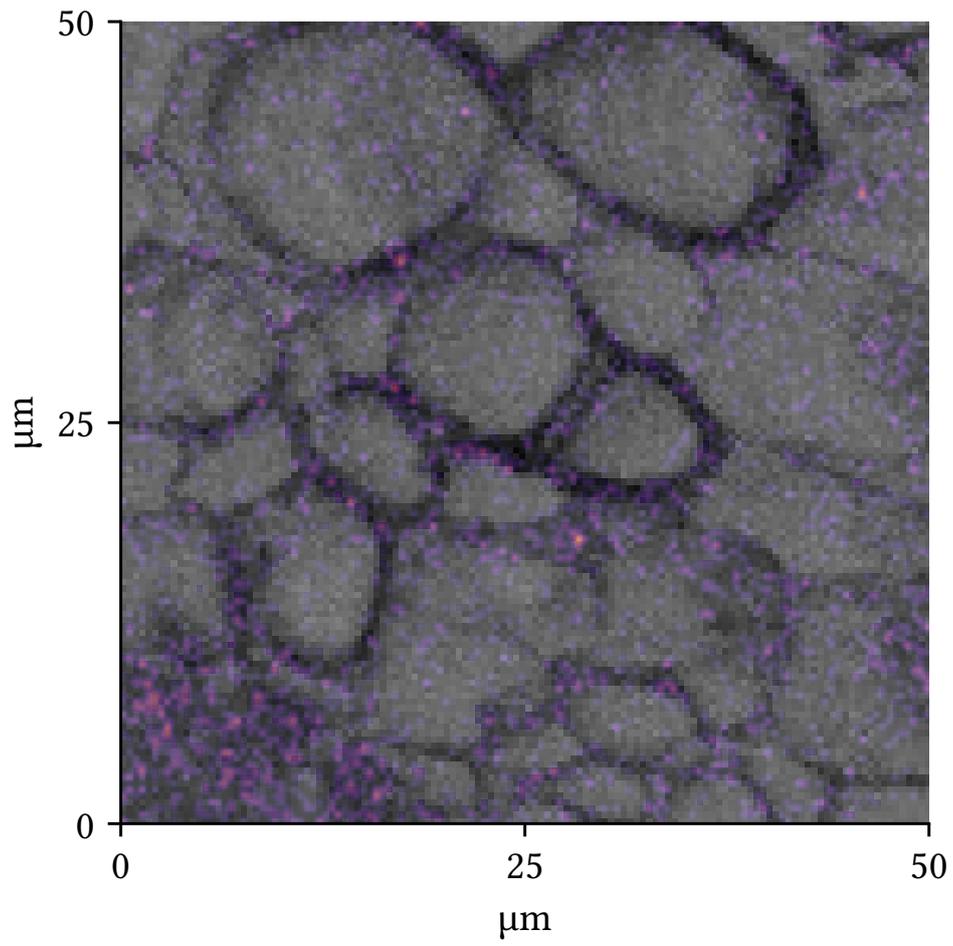


Abbildung 8.6: Technetium in den Leitungsbahnen des Blattstiels der Möhre.

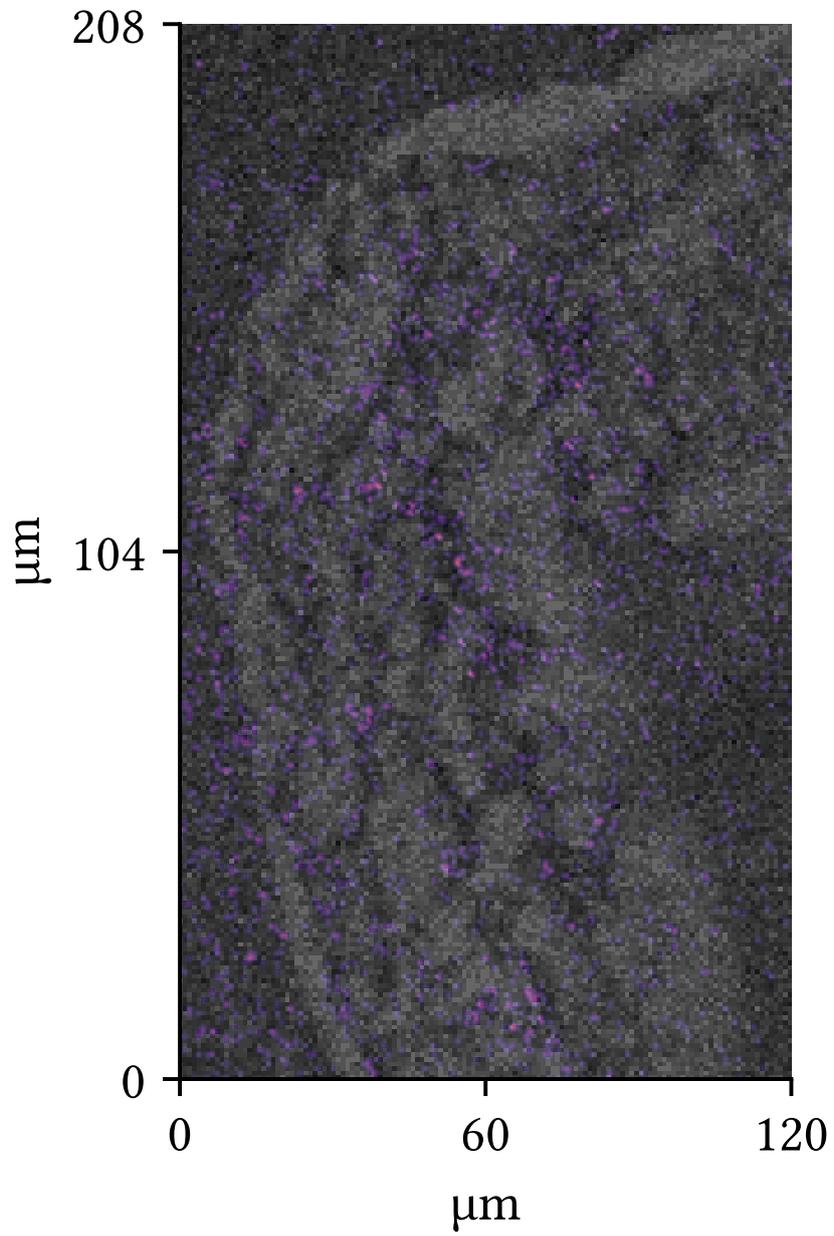


Abbildung 8.7: Technetium im Blatt der Möhre.

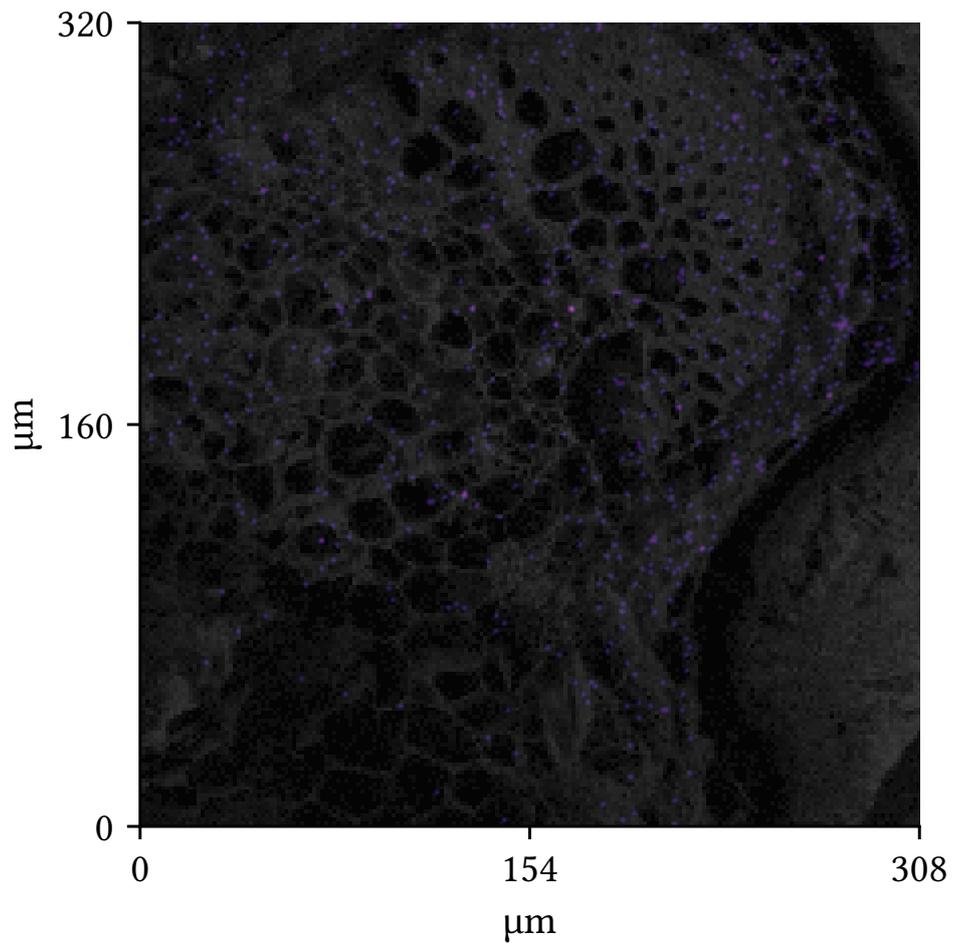


Abbildung 8.8: Technetium im Stängel der Erbse.

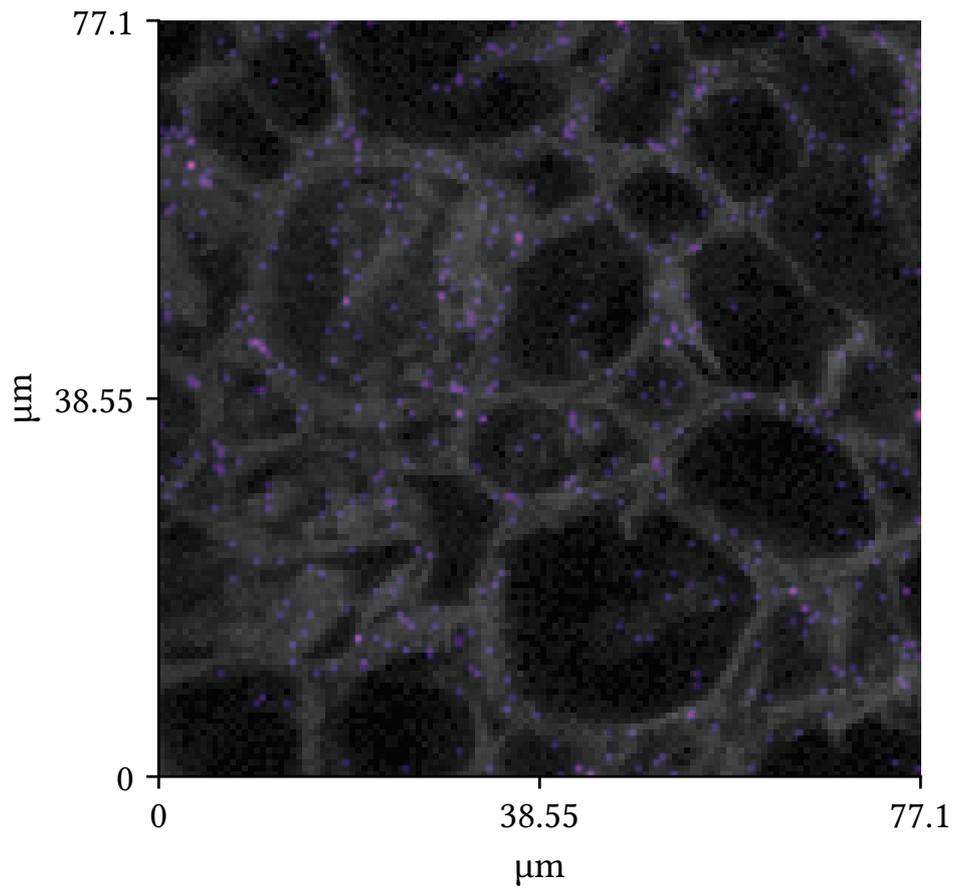


Abbildung 8.9: Technetium in den Leitungsbahnen des Stängels der Erbse.

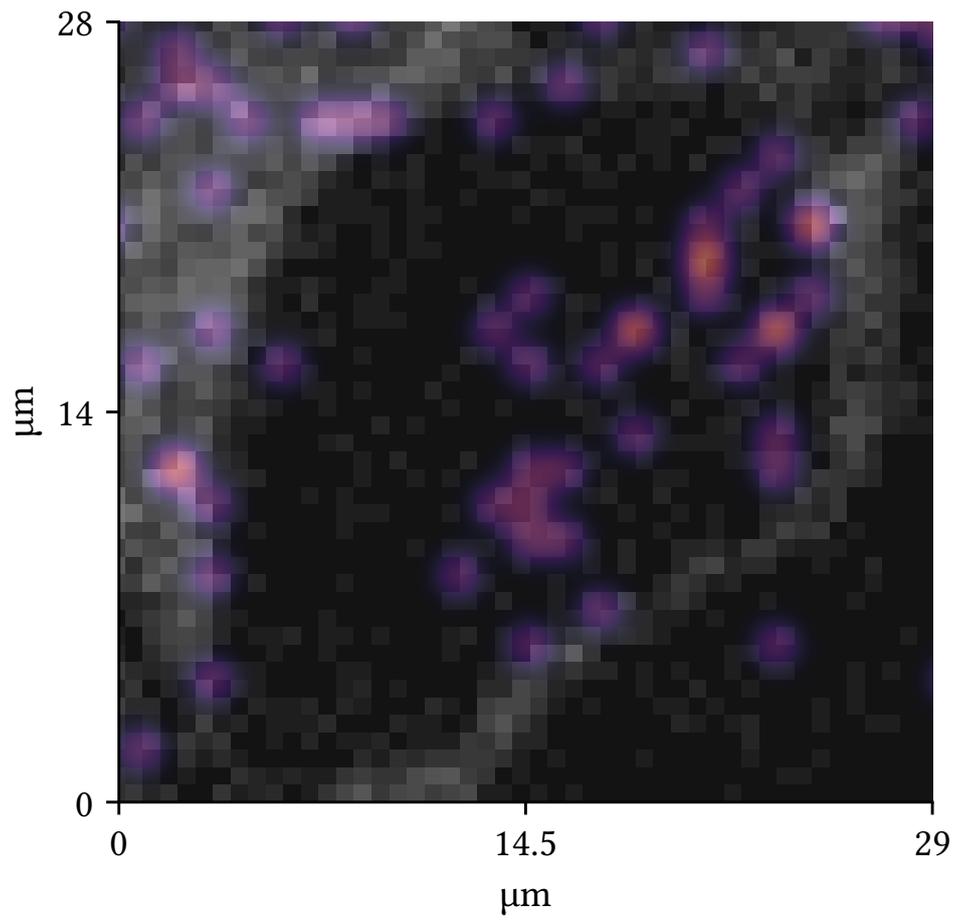


Abbildung 8.10: Technetium in der Epidermis des Stängels der Erbse.

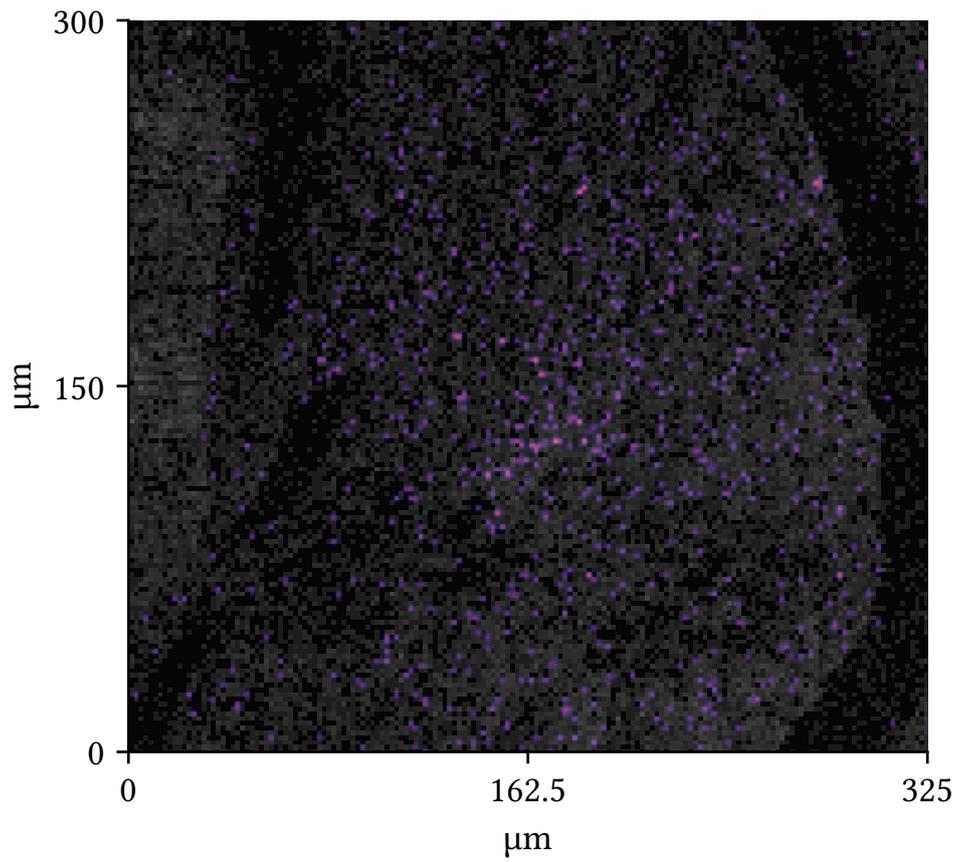


Abbildung 8.11: Technetium im Blatt der Erbse.

Danksagung

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. Clemens Walther, der mir die Arbeit an diesem äußerst interessanten Thema ermöglicht hat. Außerdem danke ich Prof. Dr. Georg Steinhauser für die Bereitschaft, die Zweitprüferschaft für meine Arbeit zu übernehmen.

Marcus, dir danke ich für die Betreuung bei diesem spannenden Thema, die hilfreichen Anmerkungen und dein offenes Ohr bei meinen wildesten Theorien zum Verhalten der Pflanzen. Die Arbeit hat mir wirklich sehr viel Spaß gemacht, auch wenn es manchmal nur um die äußerst durchwachsenen Ergebnisse von 96 ging.

Ein riesiges Dankeschön an Manuel, der nicht nur die SNMS-Messungen erst ermöglicht hat, sondern mir bei allen Problemen und Fragen zur TOF-SIMS geholfen hat.

Beate, dir danke ich für die Unterstützung mit den zahllosen Pflanzen und dein offenes Ohr bei allen Fragen.

Dorian und Anica danke ich für die Einarbeitung in die Laserablation und die Hilfe bei jedweder Art von Problemen. Genauso gilt mein Dank Julia für die Einführung in die Hydrokultur.

Den restlichen TRANS-LARAs danke ich für die tolle Zeit im Labor, es hat mir stets viel Freude bereitet. Vielen Dank auch an alle anderen Mitarbeiter des IRS für die tolle Arbeitsatmosphäre!

Insbesondere danke ich euch, Katrin und Alwin, ihr habt diese Arbeit erst möglich gemacht. Und schließlich dir Momme, der sich für die Korrektur der Arbeit noch einmal aus der Welt der Linguistik in die der Physik begeben hat.