

stimulate ketogenesis⁶, but the formation of acetoacetate is favored over that of β -hydroxybutyrate. The decrease of the β -hydroxybutyrate: acetoacetate ratio in the blood might be explained on the basis of the low levels of hepatic glycogen found in our hypoxic rats⁷.

There is a significant increase in β -hydroxybutyrate blood levels in hypoxic rats when returned for several hours at sea level before being killed. This increase could be due to the sudden removal of the depressant effect of hypoxia on lipid oxidation. The rapid increase in total

oxygen consumption found in hypoxic baby rats when switched from a low to a normal oxygen environment¹ could be due to the sudden increase in the oxidation rate.

Zusammenfassung. Versuche über die Anreicherung von Lipiden in der Leber und im Serum hypoxisch gehaltener Ratten, die zeigen, dass auch bei Sauerstoff-Mangelzuständen des Menschen die Lipidanreicherung zur Verschlechterung der Situation beitragen könnte.

H. CHIODI⁸ and S. WHITMORE⁹

⁶ A. WHITE, P. HANLDER and E. L. SMITH, *Principles of Biochemistry* (McGraw-Hill Book Co., New York, 1968).

⁷ H. CHIODI and Z. V. BACA, *Revta Soc. Argent. Biol.* 39, 69 (1963).

⁸ Present address: Saint Joseph Medical Center, Pulmonary Function Department, 501 South Buena Vista, Burbank (California 91505, USA).

⁹ Program Project Grant No. H. E. 06285.

Department of Ergonomics, University of California, Santa Barbara (California 93106, USA) and Cardiovascular Research Institute, University of California, San Francisco (California 94122, USA), 2 October 1973.

H₂S als Schwefelquelle bei *Lemna minor* L.: Einfluss auf das Wachstum, den Schwefelgehalt und die Sulfataufnahme

Höhere Pflanzen sind in der Lage, neben Sulfat eine ganze Reihe von Verbindungen zur Deckung ihres Schwefelbedarfs heranzuziehen^{1,2}. In diesem Zusammenhang fehlen im Gegensatz zu Schwefeldioxid eingehende Untersuchungen über Schwefelwasserstoff, obwohl grüne Pflanzen ganz allgemein an Standorten wie z.B. sulfid-haltigen Böden³, flachen Seen und Teichen⁴, vulkanischen Gebieten⁵, Umgebungen von Schwefelquellen⁶ und Gebieten in der Nähe von emittierenden Industrie- und Gewerbebetrieben⁷ damit in Berührung kommen. Lemnaceen im speziellen wachsen oft auf Teichen, wo sich Schwefelwasserstoff nachweisen lässt⁸. Es stellt sich hier natürlich in erster Linie die Frage nach der Resistenz gegen die als Zellgift allgemein bekannte Verbindung und deren Einfluss auf das Wachstum. Daneben interessiert vor allem die Beeinflussung des Schwefelhaushalts.

Material und Methoden. *Lemna minor* L., Stamm Nr. 6580 der Lemnaceensammlung von LANDOLT⁹, wird auf 30 ml Nährlösung (H8¹⁰) in 150 ml Erlenmeyerkolben mit Wattestopfen auf weißer Unterlage bei 3000 Lux (Dauerbeleuchtung mit Fluoreszenzröhren Philips TL 33), einer Temperatur von $25 \pm 1^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65–80% aseptisch kultiviert. Zur Ermittlung der CO₂-Fixierungsrate diente das von ERISMANN¹¹ entwickelte System für Gaswechselmessungen, in welchem die CO₂-Konzentration mit einem Uras gemessen wird. Für die vorliegende Arbeit wurde es mit einem H₂S-Analysator (Jonoflux, Hartmann und Braun, Frankfurt), ergänzt.

Die Wachstumsversuche wurden auf einer speziell für Lemnaceen gebauten Wachstumsanlage¹² durchgeführt. Die spezifische Wachstumsrate μm wurde durch Auszählen der Glieder auf vergrößerten photographischen Negativen ermittelt:

$$\mu\text{m} = \frac{\ln \text{Gliederzahl } t_2 - \ln \text{Gliederzahl } t_1}{t_2 - t_1}$$

(t in Tagen).

Zur Dosierung des H₂S diente ein Diffusionsverfahren durch einen Gummischlauch¹². Die Sulfat- und Gesamt-

¹ M. D. THOMAS in *Encyclopedia of Plant Physiology* (Ed. W. RÜHLAND; Springer, Berlin 1958), vol. 9, p. 37.

² R. J. ELLIS, *Planta* 88, 34 (1969).

³ H. WALTER, *Vegetation der Erde* (Fischer, Jena 1968), vol. 3.

⁴ V. CZURDA, *Zbl. Bakt.* 103, 285 (1941).

⁵ K. GARBER, *Luftverunreinigungen und ihre Wirkungen* (Bornträger, Berlin-Nikolassee 1967).

⁶ A. SCHATZ, *Bryologist* 58, 113 (1955).

⁷ H. C. MÜLLER, *Arb. Landw. K. Sachsen* 13, 93 (1913).

⁸ K. W. KUCHAR, *Arch. Hydrobiol.* 49, 329 (1954).

⁹ E. LANDOLT, *Ber. Schweiz. bot. Ges.* 67, 271 (1957).

¹⁰ K. H. ERISMANN und A. FINGER, *Ber. Schweiz. bot. Ges.* 78, 5 (1968).

¹¹ K. H. ERISMANN, *Habilitation Universität Bern* (1969).

¹² K. H. ERISMANN und CHR. BRUNOLD, *Ber. Schweiz. bot. Ges.*, im Druck.

Spezifische Wachstumsrate, mittleres Trockengewicht pro Glied und Schwefelgehalt von *Lemna minor* bei Kultivierung mit verschiedenen Schwefelquellen

Schwefelquelle	Spezifische Wachstumsrate ^a (μm)	Mittleres Trockengewicht pro Glied ^b (mg)	Totalschwefel ^b (mg/g Trockengewicht)	Sulfatschwefel ^b (mg/g Trockengewicht)	Sulfidschwefel ^b (mg/g Trockengewicht)
$4 \times 10^{-4} M \text{ SO}_4^{2-}$	$0,457 \pm 0,011$	$0,091 \pm 0,004$	$2,42 \pm 0,12$	$0,50 \pm 0,02$	—
6 ppm H ₂ S	$0,379 \pm 0,014$	$0,081 \pm 0,004$	$6,54 \pm 0,43$	$4,50 \pm 0,17$	$0,032 \pm 0,002$
$4 \times 10^{-4} M \text{ SO}_4^{2-}$ –6 ppm H ₂ S	$0,392 \pm 0,010$	$0,084 \pm 0,003$	$6,7 \pm 0,41$	$4,58 \pm 0,19$	$0,029 \pm 0,002$

^a 5 Bestimmungen vom 7.–13., 13.–17., 17.–24., 24.–30. und 30.–36. Kultivierungstag. ^b 4 Bestimmungen am 10., 18., 25. und 36. Kultivierungstag.

schwefelbestimmung erfolgte nach der Methode von JOHNSON und NISHITA¹³. Die Sulfidbestimmung wurde nach der gleichen Methode durchgeführt, nachdem die flüchtigen Verbindungen mit 5 N H₃PO₄ aus dem getrockneten, vermörsernen Pflanzenmaterial freigesetzt und durch sauerstofffreien Stickstoff in eine Vorlage mit Zinkacetat getrieben worden waren.

Cystein wurde nach dünnenschichtchromatographischer Trennung als Addukt von ¹⁴C-N-Äthylmaleimid bestimmt¹⁴.

Zur Trockengewichtsbestimmung wurde das Pflanzenmaterial während 1 min mit destilliertem Wasser gewaschen, auf tarierte Schälchen aus Aluminiumfolie übertragen, 24 h bei 80 °C getrocknet und bis zur Temperaturangleichung im Exsikkator über CaCl₂ aufbewahrt.

Die Sulfat-Aufnahmeuntersuchungen wurden auf einem Gilson-Respirometer durchgeführt. Nach 15minütiger Fütterung mit radioaktiven Tracern wurde das Pflanzenmaterial (50 mg Frischgewicht) zweimal 15 min lang mit 100 ml inaktiver Nährlösung von 0 °C gewaschen, in Reagenzgläser (16 × 160) übertragen, zweimal kurz mit Nährlösung gespült und mit 5 ml 30% H₂O₂ versetzt. Bei 120 °C wurde über Nacht zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde in 0,1 N HCl aufgenommen. Ein Aliquot davon diente zur Bestimmung der Radioaktivität auf einem Szintillationszähler (Liquimat 220, Picker Nuclear).

Resultate und Diskussion. Gaswechseluntersuchungen lieferten einen ersten Anhaltspunkt dafür, dass *Lemna*

minor wenigstens kurzfristig in Gegenwart von gasförmigem Schwefelwasserstoff nicht irreversible Schädigungen erleidet. Figur 1 zeigt die Abhängigkeit der Hemmung der apparenten Photosynthese von der H₂S-Konzentration in der Begasungsluft. Die Hemmung beträgt 10% bei der niedrigsten gemessenen Konzentration von 6 ppm. Durch eine 10fache Erhöhung der H₂S-Konzentration steigt sie auf nur 14%, nimmt dann aber rasch zu und beträgt bei 120 ppm bereits 88%. Die Hemmung tritt nach Zugabe von H₂S rasch ein, bleibt bei den gemessenen Konzentrationen bis zum Versuchsabbruch nach 5 h konstant und erweist sich im untersuchten Bereich als reversibel.

Für Wachstumsuntersuchungen erschien auf Grund der Gaswechselmessungen vor allem der Konzentrationsbereich zwischen 0 und 60 ppm günstig. Auf den 4 Einheiten der Wachstumsanlage¹² wurden Kulturen so angesetzt, dass den Organismen als Schwefelquelle entweder Sulfat oder Schwefelwasserstoff oder Schwefelwasserstoff und Sulfat zur Verfügung stand.

In der Tabelle sind die spezifischen Wachstumsraten, das mittlere Trockengewicht pro Glied und der Schwefelgehalt aus einem 36 Tage dauernden Kultivierungsversuch mit den verschiedenen Schwefelquellen aufgeführt.

Es zeigt sich, dass *Lemna minor* auch bei langdauerner H₂S-Begasung kultiviert werden kann. Die kleinen spezifischen Wachstumsraten bei H₂S-Begasung bestätigen die bei den Gaswechselmessungen beobachtete Photosyntheshemmung. Diese kommt zusätzlich in einem kleineren mittleren Trockengewicht pro Glied zum Ausdruck. Einen ganz ausgeprägten Effekt hat die Begasung mit H₂S auf den Sulfatschwefel. Die starke Zunahme erinnert an ähnliche Veränderungen bei SO₂-Begasung¹⁵. Offenbar wird in beiden Fällen die in grösserer Masse zu Verfügung stehende reduzierte Form wenigstens teilweise oxidiert. Die Menge des gebundenen Schwefels, die aus der Differenz zwischen Total- und Sulfatschwefel berechnet werden kann, ändert sich dabei nur geringfügig. Sulfidschwefel kann nur bei Organismen nachgewiesen werden, welche mit H₂S begast wurden.

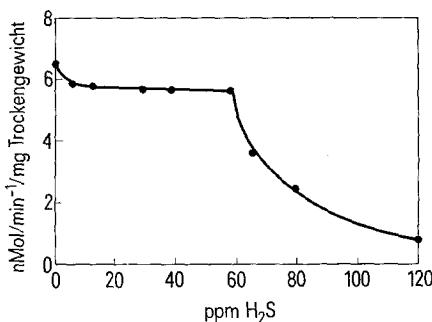


Fig. 1. Hemmung der apparenten Photosyntheserate bei *Lemna minor* durch Begasung mit verschiedenen H₂S-Konzentrationen (Nährlösung H8 mit einer Sulfatkonzentration von 4×10^{-4} M, pH 5, 5000 Lux, 25 °C, 0,03% CO₂).

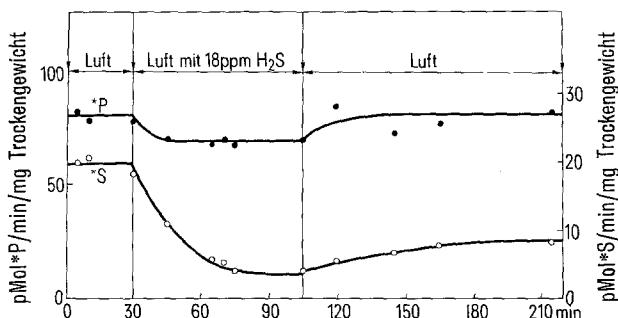


Fig. 2. Beeinflussung der Aufnahmerate von Sulfat und Phosphat bei *Lemna minor* durch Begasung und 18 ppm H₂S im Licht. *P, Phosphataufnahmerate; *S, Sulfataufnahmerate. Bedingungen wie Figur 1, aber 15000 Lux Beleuchtungsstärke. Spezifische Aktivitäten: Phosphat: 2,17 µCi/µMol; Sulfat: 6,25 µCi/µMol.

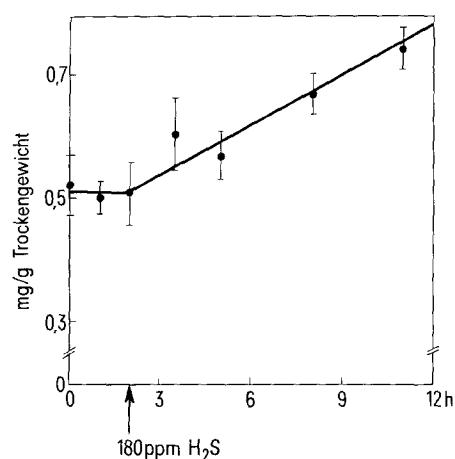


Fig. 3. Zunahme des Gehalts an Sulfatschwefel von *Lemna minor* bei der Begasung mit 180 ppm H₂S (Mittelwerte und mittlerer Fehler von 6 Parallelen).

¹³ C. M. JOHNSON und H. NISHITA, Analyt. Chem. 24, 736 (1952).

¹⁴ R. J. ELLIS, Nature 211, 1266 (1966).

¹⁵ R. GUDELIAN, Z. Pfl. Krankh. 77, 289 (1970).

Auffällig bei allen bestimmten Grössen ist die weitgehende Übereinstimmung der Werte der mit H_2S begasten Organismen, d.h. die An- oder Abwesenheit von Sulfat in der Nährösung vermag keine signifikanten Veränderungen zu erzeugen.

Dieser Befund führte dazu, zu prüfen, wie weit mit H_2S begaste Organismen noch Sulfat aufnehmen. Dabei musste neben spezifisch auf die Sulfataufnahme gerichteten Wirkungen auch mit unspezifischen Hemmwirkungen auf die Stoffaufnahme im allgemeinen gerechnet werden. Um beide Wirkungen unterscheiden zu können, untersuchten wir den Einfluss von H_2S auf die Sulfataufnahme in Doppelmarkierungsexperimenten mit $^{35}SO_4^{2-}$ und $H_2^{32}PO_4^{2-}$. Dieses Ion verhält sich in vielen Aufnahmeeexperimenten völlig gleich wie Sulfat¹⁶.

Die Wirkung der Begasung mit Luft und 18 ppm H_2S auf die Phosphat- und die Sulfataufnahmerate von *Lemna minor* geht aus Figur 2 hervor.

Bei der Hemmung der Sulfataufnahme durch H_2S dürften sich eine ganze Reihe von regulierenden Prozessen überlagern. Ein sehr rascher Prozess scheint dabei nicht spezifisch auf die Sulfataufnahme gerichtet zu sein, so dass er seine Wirkung in einem gewissen Masse auch auf Phosphat zu erstrecken vermag. Allgemein wird aus schnellen Abnahmen der Aufnahmeraten auf ATP-Mangel geschlossen¹⁶. Die Untersuchungen von ERISMANN¹⁷ weisen darauf hin, dass in *Lemna minor* bei Begasung mit H_2S ein ATP-Mangel auftritt, welcher im vorliegenden Fall für die erste rasche Abnahme der Aufnahmeraten von Phosphat und Sulfat verantwortlich sein könnte. Daneben aber müssen Regulationsmechanismen wirksam werden, welche sich ausschliesslich auf die Sulfataufnahme erstrecken.

Bei anderen Organismen scheint der intrazelluläre Cystein^{18, 19} oder Sulfatgehalt¹⁹ die Sulfataufnahme zu regulieren. In *Lemna minor* steigen bei H_2S -Begasung

Sulfat- (Tabelle und Figur 3) und Cysteingehalt (Figur 4). Dabei steigt der Sulfatgehalt auch bei Einsatz von hohen H_2S -Konzentrationen nur langsam, während Cystein bereits bei mässigen H_2S -Konzentrationen rasch annähernd die doppelte Konzentration erreicht. Deshalb könnte zuerst Cystein, später zusätzlich Sulfat, entstanden durch Oxidation von H_2S , hemmend auf die Sulfataufnahme wirken.

Bei der Umstellung auf die Begasung mit Luft allein nimmt die Phosphataufnahmerate sehr rasch wieder ihren ursprünglichen Wert an, weil offenbar der ATP-Mangel behoben wird. Die Sulfataufnahmerate steigt nach Aufhebung der H_2S -Begasung nur langsam an. Offenbar sind die Verbindungen, welche die Aufnahme hemmen, noch in zu hoher Konzentration vorhanden, und die Enthemmung erfolgt nur allmählich im Masse der Normalisierung der Poolgrössen.

Die dargestellte Hemmung der Sulfataufnahme durch H_2S erinnert stark an das gut untersuchte System NO_3^-/NH_4^+ . Hier kann die reduzierte Form die Aufnahme und die Assimilation der oxidierten Form weitgehend hemmen²⁰⁻²⁴. In Anbetracht der Ähnlichkeit von Schwefel und Stickstoff in biologischen Systemen²⁵ könnten weitere Untersuchungen der Kompetition zwischen H_2S und SO_4^{2-} zeigen, dass hier ähnliche Regulationsmechanismen wirksam sind, wie im System NH_4^+/NO_3^- .

Summary. *Lemna minor* L. was cultivated with 6 ppm H_2S in atmospheric air. Compared to organisms in H_2S -free air, it had a smaller but constant specific growth rate for 36 days. It showed a pronounced increase in sulfate concentration. H_2S quickly reduced the sulfate uptake. The mechanism of regulation of sulfate uptake is discussed.

CHR. BRUNOLD und K. H. ERISMANN

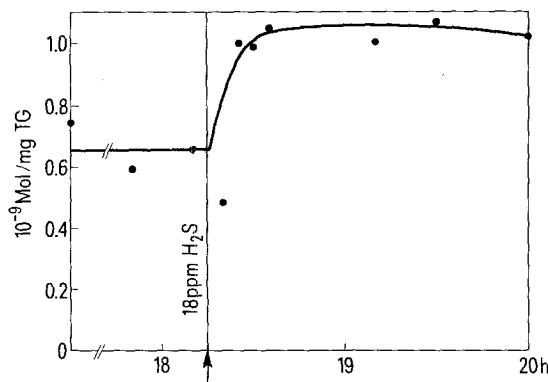


Fig. 4. Veränderung des Cysteingehalts von *Lemna minor* beim Übergang von der Begasung mit Luft zur Begasung mit Luft und 18 ppm H_2S .

Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Bern,
Altenbergrain 21, CH-3013 Bern (Schweiz),
24. September 1973.

- ¹⁶ J. WEIGL, Planta 75, 327 (1967).
- ¹⁷ K. H. ERISMANN, Referat am Int. Meeting Soc. exp. Biol. (Göteborg 1971).
- ¹⁸ J. W. HART und P. FILNER, Plant Physiol. 44, 1253 (1969).
- ¹⁹ G. BRADFIELD, P. SOMERFIELD, T. MEYN, M. HOLBY, D. BABCOCK, D. BRADLEY und I. H. SEGEI, Plant Physiol. 46, 720 (1970).
- ²⁰ J. MORRIS und P. J. SYRETT, Arch. Mikrobiol. 47, 32 (1963).
- ²¹ L. BEEVERS, L. E. SCHRADER, D. FLESHER und R. H. HAGEMAN, Plant Physiol. 40, 691 (1965).
- ²² A. R. FERGUSON, Planta 88, 344 (1969).
- ²³ K. W. JOY, Plant Physiol. 44, 845 (1969).
- ²⁴ L. K. SMITH und J. F. THOMPSON, Biochem. biophys. Res. Commun. 35, 939 (1969).
- ²⁵ R. S. BANDURSKI in *Plant Biochemistry* (Eds. BONNER und VARNER; Academic Press, New York 1965), p. 467.

In vitro Effects of Lead on Enzymatic Activities of Rabbit Kidney Mitochondria

Early signs of the kidney damage which is known to occur in lead intoxication may be found in the mitochondria of the renal tubular lining cells. Ultramicroscopic studies of these mitochondria in experimental lead poisoning have revealed structural abnormalities, including ruptured outer membranes, vacuolated inner compartments, and a distorted arrangement of cristae^{1, 2}. Furthermore, renal mitochondria isolated from lead-

intoxicated rats show reduced respiration and uncoupled oxidative phosphorylation^{2, 3}, impairment of electron-transport mechanism⁴, inhibition of pyruvate and succinate exchange diffusion rates³, and decrease in cytochrome and protein content⁵.

Since the changes in enzyme activities responsible for these structural and biochemical alterations have not yet been well defined, it seemed to us of interest to study the