



## Arsenspezies und Pflanzentransfer

### Arsenit Austausch durch Pflanzenwurzeln: Vergleich von in Hydrokultur und im Boden gewachsenen Pflanzen

Doris Vetterlein<sup>1</sup> ([doris.vetterlein@ufz.de](mailto:doris.vetterlein@ufz.de)), Jürgen Mattusch<sup>1</sup> ([juergen.mattusch@ufz.de](mailto:juergen.mattusch@ufz.de)), Reinhold Jahn<sup>2</sup> ([reinhold.jahn@landw.uni-halle.de](mailto:reinhold.jahn@landw.uni-halle.de))

<sup>1</sup>UFZ – Helmholtz - Zentrum für Umweltforschung GmbH, Departments Bodenphysik (D. Vetterlein) und Analytische Chemie (J. Mattusch), Theodor – Lieser - Str. 4, 06120 Halle (DV) bzw. Permoserstr. 15, 04318 Leipzig (JM)

<sup>2</sup>Martin- Luther-Universität Halle, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Professur Bodenwissenschaften und Bodenschutz, Weidenplan 14, 06108 Halle

#### Zusammenfassung

Der Efflux von Arsenit aus Pflanzenwurzeln wurde untersucht, wobei das Verhalten eines Bodensystems mit einer Hydrokultur verglichen wurde. In beiden Systemen steigt die Konzentration von Arsenit in Abhängigkeit von der Zeit an und korreliert mit der Arsen-Konzentration im Wurzelgewebe. Während bei Verwendung der Hydrokultur eine komplette Reduktion von Arsenat zu Arsenit im Medium innerhalb von 1–3 Tagen durch den As(III) – Wurzelaustausch stattfindet, wird bei Anwendung des Bodensystems nur ein kleiner Teil des Gesamtarsens in As(III) umgewandelt. Dieser Anteil befindet sich dann auch nur in der unmittelbaren Nähe der Wurzeln.

Die Unterschiede zwischen Hydrokultur und bodenbasiertem System können durch die Entstehung eines steilen As(III) – Konzentrationsgradienten mit abnehmender Distanz zur Wurzeloberfläche erklärt werden, die durch die geringen Diffusionskoeffizienten im Boden zustande kommen. Die hohen As(III) – Konzentrationen an der Wurzeloberfläche begrenzen den durch chemische Gradienten getriebenen diffusiven Austausch von As(III) durch unlängst identifizierte bidirektionale Aquaporine. Die steilen Gradienten um die Wurzel im Bodensystem, gemessen durch Bodenlösungsentnahme im Kompartimentsystem mit hoher räumlicher Auflösung, können auch durch die Verwendung von Bioreporter - Bakterien veranschaulicht werden.

#### Einleitung

Arsenige Säure (Arsenit) und Dihydrogenarsenat (Arsenat) sind die dominierenden As-Spezies in Böden. Es ist bekannt, dass Arsenat in Analogie zu Phosphat durch „high affinity“ P-Transporter von Pflanzen aufgenommen wird. Dagegen wurde die Aufnahme von Arsenit erst vor kurzem beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die neutrale arsenige Säure durch Aquaporine, von denen einige als Silizium – Transporter bekannt sind, transportiert wird. Diese wurden in den distalen Plasmamembranen von Endo- und Exodermis lokalisiert /1, 2/. Diese Transporter wirken normalerweise bidirektional, haben aber durchaus auch bevorzugte Transportrichtungen. Bei Pflanzen, die mit As(V) versorgt werden, wird i.d.R. in den vitalen Pflanzengeweben

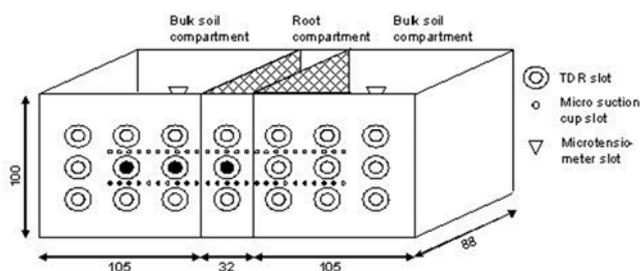
Arsenit gefunden, das durch die Wirkung der Arsenat - Reduktase gebildet wird. Höhere Pflanzen können das Arsenit mittels Phytochelatinen komplexieren und in Vakuolen ablagern. Damit wird die Komplexbildung von As(III) mit den SH-Gruppen von Enzymen minimiert /3/. Algen dagegen reduzieren und methylieren das aufgenommene Arsenat und speichern es als Dimethylarsinoyl- bzw. Trimethylarsonioriboside (Arsenzucker) /4-6/.

Xu et al. /7/ haben eine massive und schnelle Umwandlung von As(V) zu As(III) im Medium bei Tomaten- und Reis-pflanzen beobachten können, die in Hydrokultur gezogen worden waren. Sie führten diese Reduktion auf den Wurzeinfluss und nicht auf eine mikrobielle Aktivität bzw. die Veränderungen des Redoxpotentials zurück. Für bodenbasierte Systeme ist die Arsenspeziation in der Rhizosphäre, d.h. in dem von der Pflanze beeinflussten Bereich des Bodens, noch weitgehend unbekannt. Vetterlein et al. /8/ haben in Kompartimentsystemen mit Quarz als Substrat und Arsenat als Arsenquelle ansteigende Konzentrationen an Arsenit mit der Zeit in der Rhizosphärenbodenlösung beobachten können. Im Vergleich zur eingesetzten Arsenatkonzentration konnten nur relativ geringe Arsenitkonzentration und auch nur in der Nähe der Wurzelmatte analysiert werden. Um den scheinbaren Widerspruch zwischen Hydrokultur und Bodensystem bezüglich des Austausches an Arsen aufzuklären, wurden die Randbedingungen für einen diffusionsgetriebenen As(III) - Austausch verglichen: Dabei wurden die in Hydrokultur gewonnenen Ergebnisse von Xu et al. /7/ mit denen aus zwei bodenbasierten Kompartimentversuchen verglichen. Zum einen ein As-kontaminierter Auenlehm (342 mg As kg<sup>-1</sup>), zum anderen ein Quarzsubstrat (5 mg As kg<sup>-1</sup>) dem steigende Mengen an Goethit als Sorbens für As zugesetzt worden waren. Zur selektiven und empfindlichen Bestimmung der Arsenspezies wurde eine online - Kopplung zwischen Ionenchromatograph und induktiv gekoppeltem Massenspektrometer (IC-ICPMS) eingesetzt /9-11/.

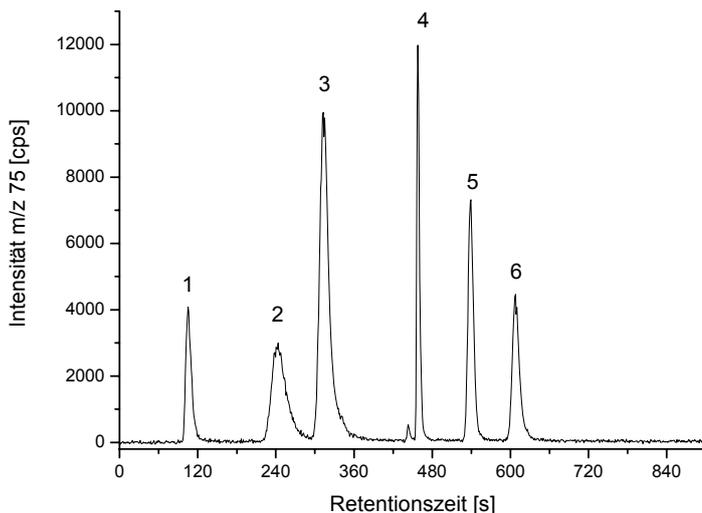
## Instrumentelles

### Pflanzenexperimente

Im Gegensatz zu den bodenbasierten Experimenten wurden bei den Hydrokultur – Experimenten von Xu et al. /7/ die Pflanzen (Tomate, *Lycopersicon esculentum*) 15 Tage vorkultiviert, bevor sie mit As(V) Lösung (belüftet, 1 L) versetzt wurden. Für den Vergleich wird der berechnete Mittelwert für die verschiedenen Behandlungen und für eine 1-Tages-Exposition herangezogen. Die experimentellen Details der Versuche basierend auf Quarz als Substrat mit Maispflanzen (*Zea mays*) werden in /8/ ausführlich beschrieben. Die Experimente mit As-kontaminiertem Auenboden erfolgten unter den gleichen Bedingungen, wobei hier Deutsches Weidegras (*Lolium perenne*) eingesetzt wurde. Das Kompartimentsystem besitzt ein Gesamtvolumen von 1954 cm<sup>3</sup> (Abb. 1). Die Bodenlösungen wurden in Abhängigkeit von der Entfernung zur Wurzelmatte, die sich entlang eines Nylonnetzes bildet, mit Hilfe von Mikroaugkerzen entnommen. Die geernteten Wurzeln wurden ebenfalls auf As-Spezies untersucht.



**Abb. 1.** Kompartimentsystem zur Untersuchung von chemischen Gradienten im Rhizosphärenraum (Angaben in mm)



**Abb. 2.** IC-ICPMS Chromatogramm eines Standardgemisches aus 6 As-Spezies.

1: Arsenit, 2: Dimethylarsinsäure (DMA), 3: Monomethylarsonsäure (MMA), 4: Arsenat, 5: Arsenobetain (AsB), 6: Trimethylarsinoxid (TMAO)

### Elementspeziesanalytik

Mit Hilfe einer Anionenaustauschsäule (Ion Pac AS7 /AG7, Dionex) kombiniert mit einer Gradientenelution (A: 0.4 mM HNO<sub>3</sub>; B: 50 mM HNO<sub>3</sub>) können die anorganischen [As(III); As(V)] und die methylierten As-Spezies (Methylarsonsäure, Dimethylarsinsäure, Arsenobetain und Trimethylarsinoxid) chromatographisch getrennt werden (Abb.2). Die selektive Detektion erfolgte mit einem ICPMS – Detektor auf der Massenspur 75 (As). Die Nachweisgrenze für Arsen liegt bei < 1 µg L<sup>-1</sup>.

### Resultate und Diskussion

Um abzuschätzen, ob der As(III)-Austausch diffusionskontrolliert abläuft, sind sowohl die As(III) – Konzentrationen an der Wurzeloberfläche als auch im Zytoplasma erforderlich. Bei belüfteten hydroponischen Systemen kann davon ausgegangen werden, dass identische Konzentrationen in der Lösung und in unmittelbarer Nähe der Wurzeln vorliegen. Für bodenbasierte Systeme ist dies keineswegs der Fall, da der Diffusionskoeffizient im Boden eine Größenordnung kleiner ist, als der im Wasser. Darüber hinaus spielen Faktoren wie Bodenwassergehalt, Tortuosität und Sorptionskapazität eine entscheidende Rolle. Ein steiler As(III) – Konzentrationsgradient wurde in den bodenbasierten Systemen beobachtet, wie aus Abb. 9 in /8/ hervorgeht. Unter Verwendung des Quarzsubstrates wird As(III) nur bis zu einem Abstand von der Wurzelmatte von 36 mm detektiert. Zwischen der Wurzelmatte und dem 36 mm-Abstand wurden As(III) – Konzentrationen analysiert, die um den Faktor 10 bis 100 differierten. Die direkte Analyse des As(III) – Gehaltes im Zytoplasma ist z. Z. noch nicht möglich und muss daher aus dem gemessenen Arsengehalt im Wurzelgewebe abgeschätzt werden. Wie auch die Untersuchungen von Xu et al. /7/ ergaben, konnten auch in dem hier getesteten bodenbasierten System 93 -99 % des Gesamtarsens als Arsenit bestimmt werden. Ausgehend von einem Phytochelantin-SH zu Arsenit Verhältnis  $\geq 3:1$ , wie von Sneller et al. /3/ im Wurzelgewebe gefunden, und einer Koordination von 3 SH-Gruppen pro As(III), nehmen wir an, dass 99% des As(III) komplexiert in der Vakuole vorliegt. Diese Hypothese wird unterstützt durch röntgenabsorptionsspektroskopische Analysen (XAS), die belegen, dass ein Großteil des Arsens im Pflanzengewebe an Thiolen gebunden vorliegt /12/. Des Weiteren wurde angenommen, dass sich die Volumina von Vakuole und Zytoplasma im Verhältnis von 1:1 verhalten. Basierend darauf kann die As(III) – Konzentration im Zytoplasma berechnet werden. Wenn sich dieses Verhältnis zugunsten der Vakuolen verschiebt, würde daraus eine höhere Zytoplasmakonzentration resultieren. Das wahre Verhältnis wird abhängen vom Anteil an meristematischem Gewebe in Relation zum ausdifferenzierten Wurzelgewebe.

Tabelle 1 zeigt für das hydroponische System (Hydrokultur), dass die Diffusion bei einer As(III) – Konzentration in der Bodenlösung von 8  $\mu\text{M}$  aufhören sollte, da dann der chemische Gradient ausgeglichen wäre. Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem von Xu et al. /7/ gemessenen überein. Gleichermaßen sollte sich für das Quarzsubstrat die Diffusion bei Rhizosphärenkonzentrationen, die nahe der in Rhizosphärenbodenlösung gemessenen liegen, verringern. Der größte Unterschied zwischen Zytoplasmakonzentration und der Konzentration in der Rhizosphäre wurde für den Auenlehm gefunden. Im Gegensatz zum Quarzsubstrat hat der Auenboden eine hohe Sorptionskapazität für As aufgrund der hohen Konzentration an schwach - kristallinen Metalloxiden (Fe 7550  $\text{mg kg}^{-1}$ , Mn 672  $\text{mg kg}^{-1}$ ), was dazu führt, dass ein Teil des abgegebenen As(III) wahrscheinlich adsorbiert wird und nicht in der Lösung verbleibt. Darüber hinaus unterliegt der Auenboden wechselnden Redoxpotentialen und besitzt aktive Mikrobengemeinschaften, die gut an die verschiedenen As-Spezies angepasst sind. Abiotische und biotische Prozesse können somit unter aeroben Bedingungen zur Oxidation von As(III) führen. Letztere sind im Quarzsubstratsystem weniger wahrscheinlich, da keine Mikroben inokuliert wurden.

Die As(III) Konzentrationsgradienten, die sich um die Wurzel bilden, sind steil genug, die beobachteten Differenzen im As(III) Austausch zwischen hydroponischem und bodenbasiertem System zu erklären. Um detailliertere Informationen über Gradienten um eine Einzelwurzel zu erhalten im Gegensatz zur Wurzelmatte (veränderte Geometrie), können bildverarbeitende Techniken (Imaging) basierend auf Bioreportern angewendet werden /12,13/. Auch die Nutzung von Rhizosphären – Modellen (RhizoMath) /14/ unter Einbeziehung der chemischen Speziation kann helfen, das Verständnis von As – Aufnahme und - abgabe zu verbessern. Wie aus Abb. 3 ersichtlich, treten neben den anorganischen Arsenspezies in den untersuchten Pflanzen noch weitere Arsenverbindungen auf, die auf Grund ihrer geringen Konzentrationen noch nicht massenspektroskopisch identifiziert werden konnten. Bezüglich der instrumentellen Analytik kann die weitere Miniaturisierung der Probenahme und –verarbeitung dazu beitragen, die Rhizosphärenprozesse in – vivo und hochaufgelöst verfolgen zu können sowie zu einer detaillierteren Aufklärung der Kompartimentierung innerhalb der Pflanze zu kommen. Mit der Verbesserung der Identifizierung von intermediär - auftretenden Elementspezies wären exaktere Aussagen über die Prozessführung denkbar.

	Lösung As <sup>V</sup> am Tag 0	Lösung As <sup>V</sup> zur Ernte	Rhizosphäre-Boden-Lsg. As <sup>III</sup> zur Ernte	As <sup>III</sup> in Wurzelzytoplasma <sup>4</sup>	As in Wurzeln zur Ernte	Variante
			$\mu\text{M}$		$\text{nM g}^{-1} \text{FG}$	
<sup>1</sup> Hydrokultur	10.0	0.23	6.75	8.23	433	
<sup>2</sup> Boden basiertes System Quartz substrate	156 43.0 11.0	50.0 30.0 10.0	9.48 10.3 0.15	11.0 5.76 0.95	580 303 50	G-0 G-1 G-4
<sup>3</sup> Boden basiertes System Auenboden	0.36 0.80 1.75	0.35 0.24 0.56	0.04 0.20 0.20	0.87 1.16 1.37	46 61 72	P 0 P 100 P 200

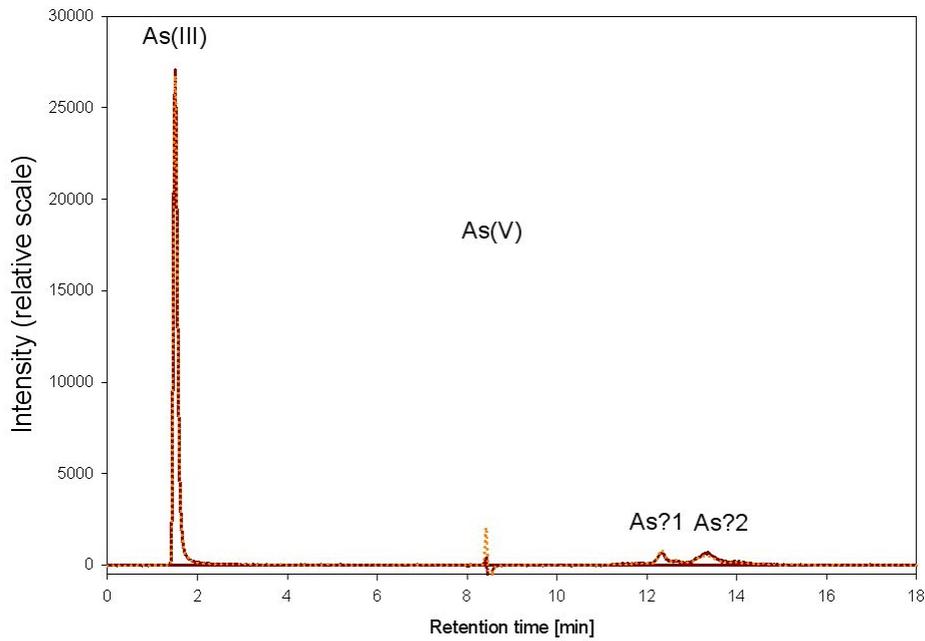
**Tab. 1** Konzentrationen von As(V) und As(III) in der Lösung, in der Rhizosphärenbodenlösung, in Wurzeln und im Wurzelzytoplasma zu Beginn und nach der Ernte für das hydroponische und zwei bodenbasierte Systeme

<sup>1</sup> Daten abgeleitet aus Xu et al./7/, Experiment 1, 1 Tag Exposition von *Lycopersicon esculentum* mit 10 $\mu\text{M}$  As(V)

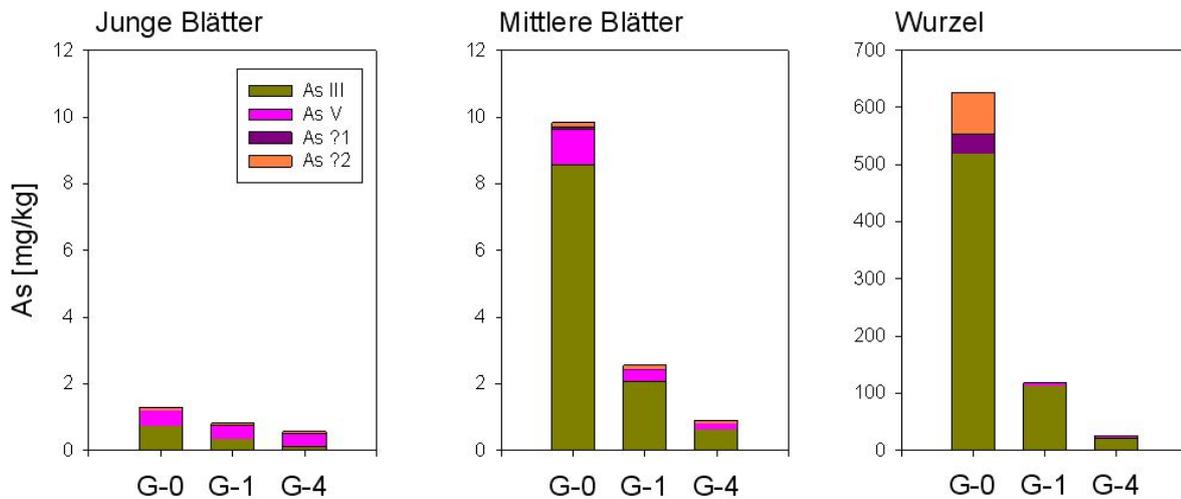
<sup>2</sup> Daten abgeleitet aus Vetterlein et al. 2007, Kompartimentsystem, Experiment Quartz-Substrat mit ansteigender Goethit-Menge (G-0, G-1, G-4) als Sorbens für As(V), Experiment mit *Zea mays* durchgeführt (31 Tage)

<sup>3</sup> Daten vom Kompartimentsystem, Experiment mit kontaminiertem Aueboden (Mulde), ansteigende As-Konzentrationen der Bodenlösungen wurden durch ansteigende Mengen an P-Dünger induziert (P 0, P 100, P 200), Experiment wurde mit *Lolium perenne* durchgeführt (63 Tage)

<sup>4</sup> Berechnungen siehe Text



(A)



(B)

**Abb. 3.** IC-ICPMS Chromatogramm eines Wurzelextraktes (G-0) (A) und Arsenspeziesverteilung in jungen Blättern, mittleren Blättern und in der Wurzel (B)

### Danksagung

Diese Forschungsarbeit wurde von der Helmholtz – Gemeinschaft Deutscher Forschungszentren unterstützt.

## Literatur

- [1] G. P. Bienert, M. Thorsen, M. D. Schüssler, H. R. Nilsson, A. Wagner, M. J. Tamás, and Th. P. Jahn. A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of  $\text{As}(\text{OH})_3$  and  $\text{Sb}(\text{OH})_3$  across membranes. *BMC Biology* 2008, 6, 26
- [2] J. F. Ma, N. Yamaji, N. Mitani, X.-Y. Xu, Y.-H. Su, St. P. McGrath, and F.-J. Zhao. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *PNAS* 2008, 105, 9931-9935
- [3] F. E. Sneller, L. M. van Heerwaarden, F. J. L. Kraaijeveld-Smit, W. M. Ten Bookum, P. L. M. Koevoets, H. Schat, and J. A. C. Verkleij. Toxicity of arsenate in *Silene vulgaris*, accumulation and degradation of arsenate-induced phytochelatins. *New Phytologist* 1999, 144, 223-232
- [4] L. Leemakers, W. Baeyens, M. De Gieter, B. Smedts, C. Meert, H.C. De Bisschop, R. Morabito, and Ph. Quevauviller. Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation. *TRAC* 2006, 25, 1-10
- [5] M. Miguens-Rodriguez, R. Pickford, J. E. Thomas-Oates, and S. A. Pergantis. Arsenosugar identification in seaweed extracts using high-performance liquid chromatography/electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002, 16, 323-331
- [6] V.K. Sharma and M. Sohn. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformation, and remediation. *Environment International* 2009, 35, 743-759
- [7] X. Y. Xu, S. P. McGrath, and F. J. Zhao. Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plants roots. *New Phytologist* 2007, 176, 590-599
- [8] D. Vetterlein, K. Szegedi, J. Ackermann, J. Mattusch, and H.-U. Neue. Competitive mobilisation of phosphate and arsenate associated with goethite by root activity. *J. Environ. Qual.* 2007, 36, 1811-1820
- [9] S. Londesborough, J. Mattusch, and R. Wennrich. Separation of organic and inorganic arsenic species by HPLC-ICP-MS. *Fresen. J. Anal. Chem.* 1999, 363, 577-581
- [10] J. Mattusch, R. Wennrich, A. C. Schmidt, and W. Reißer. Determination of arsenic species in water, soils and plants. *Fresen. J. Anal. Chem.* 2000, 366, 200-203
- [11] A. C. Schmidt, W. Reißer, J. Mattusch, P. Popp, and R. Wennrich. Evaluation of extraction procedures for the ion chromatographic determination of arsenic species in plant materials. *J. Chromatogr. A* 2000, 889, 83-91
- [12] A. Kuppardt, D. Vetterlein, H. Harms, and A. Chatzinotas. Bioreporter detection of As gradients in the rhizosphere. *New Phytologist*, eingereicht
- [13] I. J. Pickering, R. C. Prince, M. J. George, R. D. Smith, G. N. George, and D. E. Salt. Reduction and Coordination of Arsenic in Indian Mustard. *Plant Physiology* 2000, 122, 1171-1177
- [14] K. Szegedi, D. Vetterlein, H. Nietfeld, R. Jahn, and H.-U. Neue. New tool Rhizomath for modeling coupled transport and speciation in the rhizosphere. *Vadose Zone J.* 2008, 7, 712-720

## Korrespondenzadresse

Dr. habil. Jürgen Mattusch  
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ  
Department Analytik  
Permoserstr. 15  
D-04318 Leipzig  
Tel.: 0341 235 1432  
Fax: 0341 235 1443