

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
Institut für Pflanzenernährung  
Herrenhäuser Str. 2  
D-30149 Hannover



# **Faktoren der Arsenaufnahme bei Reis (*Oryza sativa*)**

Arbeit zur Erlangung des Abschlusses  
„Bachelor of Science in Gartenbauwissenschaften“

von

Holger Hoffmann  
Stud. B. Sc. Gartenbauwissenschaften  
Matrikelnummer: 2311180

2007

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Manfred Schenk danke ich herzlich für die Anregung dieser Arbeit und für die hilfreiche Betreuung, insbesondere für die vielen fachlichen Diskussionen.

Ein großer Dank gilt Frau Dipl. Ing. agr. Katja Bogdan, die sich stets die Zeit nahm, mich bei Fragen in der Entwicklung der Versuchsmethode und zur Versuchsdurchführung zu beraten.

Weiter danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Pflanzenernährung der Leibniz Universität Hannover für ihre Unterstützung beim Versuchsaufbau und der Versuchsbetreuung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wären nicht zustanden gekommen ohne die As-Messungen am UFZ-Leipzig und der LUFA in Hameln. Hier geht mein Dank an die Herren Dr. Jürgen Mattusch und Friedhelm Cipra.

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	II
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht.....</b>	<b>3</b>
2.1 As-Formen.....	3
2.2 As-Dynamik.....	4
2.3 As und Reis.....	6
2.3.1 Wirkung von As auf das Wachstum von Reis.....	6
2.3.2 As(V) und As(V)-Reduktion.....	6
2.3.3 As(III).....	8
2.3.4 Wirkung der As(V)-Reduktion.....	9
2.3.5 Glutathion als Toleranzindikator?.....	9
2.4 As-Aufnahme.....	10
2.5 Struktur, Funktionsweise, Selektivität und Regulierung der Aqua(glycero)porine.....	11
2.6 As(III)-Aufnahme.....	15
2.7 Hypothese.....	16
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
3.1 Ziel der Methodik und Randbedingungen.....	17
3.2 Systembeschreibung.....	17
3.3 Pflanzenmaterial.....	19
3.3.1 Anzucht .....	19
3.3.2 Nährlösungen.....	19
3.3.3 Kulturbedingungen.....	19
3.3.4 Ernte.....	20
3.4 Differenzbehandlung.....	20
3.5 Analytische Verfahren.....	21
3.5.1 Wurzellänge.....	21
3.5.2 Arsen im Pflanzenmaterial.....	21
3.5.3 Bestimmung der As-Form und -Konzentration.....	21

3.5.4 O <sub>2</sub> .....	22
3.5.5 pH.....	22
3.5.6 Nährstoffgehalt der Nährlösung.....	22
3.6 Ermittlung der As(III)-Kinetik.....	22
3.7 Statistische Verfahren.....	23
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>24</b>
4.1 Überprüfung der Versuchsbedingungen.....	24
4.2 Pflanzenanalyse.....	26
4.2.1 As in der Pflanze und im „Lagerwasser“ .....	26
4.2.2 Einfluss von As(III) auf das Wachstum.....	29
4.2.3 Ermittlung der As(III)-Aufnahme .....	31
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>33</b>
5.1 Versuchsmethodik.....	33
5.2 As(III)-Toxizität.....	34
5.3 As(III)-Aufnahmecharakteristika .....	35
5.4 Aufnahmesystem.....	37
5.5 Ausblick.....	39
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>40</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>41</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>42</b>
<b>9. Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>57</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Struktur- und Summenformeln der As-Formen.....	3
Abb. 2.2:	As-Form in Abhängigkeit von Redoxpotential und pH.....	4
Abb. 2.3:	Glutathion in der reduzierten (GSH) und oxidierten Form (GSSG).....	7
Abb. 2.4:	Schematische Darstellung eines Aquaporins.....	12
Abb. 2.5:	Van der Waals Radii und Solvent excluded surface (Connolly-Oberflächenmodell) von As(III) und Glycerol.....	16
Abb. 3.1:	Versuchsaufbau zur Bestimmung der Aufnahme­rate von As(III) durch Reis.....	18
Abb. 3.2:	Nährfilmverfahren zur Bestimmung der Aufnahme­rate von As(III) durch Reis, unterer Bereich eines Rohres (Foto).....	18
Abb. 4.1:	Anteil von As-Formen am Gesamtarsen in der Lösung.....	25
Abb. 4.2:	Konzentration nicht bestimmbarer As-Formen in der Lösung.....	25
Abb. 4.3:	As-Konzentration in der Trockensubstanz.....	27
Abb. 4.4:	As-Menge in der Pflanze und im Wasser, in dem die Wurzeln gelagert wurden.....	28
Abb. 4.5:	Von den Wurzeln in das Lagerwasser abgegebene As-Menge.....	28
Abb. 4.6:	FM-Wachstum in Abhängigkeit der As(III)-Behandlung..	30
Abb. 4.7:	Wurzellängenwachstum in Abhängigkeit der As(III)-Behandlung.....	30
Abb. 4.8:	As(III)-Aufnahmerate bezogen auf die Wurzellänge.....	31
Abb. 4.9:	Einfluss der As(III)-Konzentration auf die As(III)-Aufnahmerate. Regression mit einer Geraden und einer Michaelis-Menten-Funktion..	32
Abb. 7.1:	Einfluss der As(III)-Konzentration auf die As(III)-Aufnahmerate (bezogen auf die Frischmasse der Wurzel).....	41
Abb. 7.2:	Abb. 7.2: Einfluss der As(III)-Konzentration auf die As(III)-Aufnahmerate (bezogen auf die TS).....	41

## Abkürzungsverzeichnis

As = Arsen

As(III) = Arsenit

As(V) = Arsenat

BVL = Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit

DMAA = Dimethylarsensäure

FAO = Welternährungsorganisation (Food and Agriculture Organization)

FM = Frischmasse [g]

Gl. = Gleichung

(GS)<sub>3</sub> = Triglutathion

GSH = Glutathion

GSSG = Disulfidglutathion

i.d.R. = in der Regel

IRRI = International Rice Research Institute

JECFA = FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

LGL = Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

MES = 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure

MMAA = Monomethylarsensäure

PMTDI = Provisional Maximum Tolerable Daily Intake

ROS = reaktive Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species)

s.a. = siehe auch

Sb = Antimon

TS = Trockensubstanz [g]

WHO = Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)

# 1. Einleitung

Reis (*Oryza sativa*) ist ein Grundnahrungsmittel. Er stellt für die Hälfte der Erdbevölkerung das Hauptnahrungsmittel dar und ist, gemessen am weltweiten Ertrag, die dritt wichtigste Kulturpflanze (FAOSTAT 2005). Hierbei wird 80% des Ertrages im Nassanbau erzeugt (IRRI 2001). Bei dieser Anbauform kann es zur Akkumulation von Arsen im Reis kommen. Arsen (As) ist für seine bereits in geringen Mengen toxische Wirkung auf Menschen bekannt, wobei sich As-Formen und – Verbindungen in ihrer Toxizität unterscheiden. So galt z.B. anorganisches As als toxischer als organisches As.

Pflanzen können As aufnehmen und über die Nahrungskette an den Menschen weitergeben. In der EU gibt es derzeit noch keine EG-Grenzwerte für As in Lebensmitteln wie z.B. für Schwermetalle, da As-Fractionen wie anorganisches As, bisher nur ungenügend bestimmt werden konnten. Dies ist seit kurzem möglich (LGL 2005, Van der Meer 2007) und mit der Weiterentwicklung exakter Bestimmungsmethoden ist auch mit der Einführung von Grenzwerten zu rechnen (BVL 2005). Im Moment bestehen folgende Richtlinien für As:

- 1.) Die Weltgesundheitsorganisation hat einen Grenzwert von  $10 \mu\text{g As l}^{-1}$  Trinkwasser festgelegt (WHO Guidelines for Drinking-Water Quality 1993). Dieser Wert wurde allerdings aufgrund der damaligen Nachweisgrenze gewählt und sollte niedriger liegen.
- 2.) Die Welternährungsorganisation (FAO) und die WHO (JECFA) nennen als tolerierbare Aufnahmemenge (PMTDI)  $1,5 \mu\text{g As kg}^{-1}$  Körpergewicht  $\text{d}^{-1}$ .
- 3.) Für Reis haben einige Länder einen Höchstgehalt von  $1 \text{ mg As kg}^{-1}$  Korn-TS festgelegt (National Food Authority 1993). Dieser Wert wurde an Standorten mit gleichzeitig hohem As-Gehalt und hoher As-Verfügbarkeit andererseits erreicht (Meharg & Rahman 2003). Durch den Verzehr von Reis können also gesundheitsbedenkliche Mengen As aufgenommen werden.

Des Weiteren kann es durch As-Toxizität zu Ertragsminderungen kommen. Standorte mit hohem As-Gehalt können natürlichen (Deposition im Ganges-Delta, Vulkanismus in Argentinien) und menschlichen Ursprungs sein (Bewässerung mit belastetem Grundwasser im Ganges-Delta; Einsatz As-haltiger Pestizide in Baumwollplantagen in den USA oder von Kampfstoffen im Vietnamkrieg; Bergbau in China). Die Pflanzen-Verfügbarkeit von As andererseits ist in durchlüfteten Böden

gering. Erst durch den Anbau von Nassreis werden reduzierende Bedingungen geschaffen und es kann, wie im Fall des Ganges-Deltas oder ehemaligen Baumwollplantagen, wo belastetes Grundwasser zur Bewässerung verwendet wird, zu einer verstärkten As-Aufnahme kommen (Abedin 2002b, Meharg & Rahman 2003). Die Aufnahme von As durch Reis wiederum ist selbst nur teilweise erforscht. Dabei ist sie ein wichtiges Glied in der Kette: As im Boden  $\rightleftharpoons$  Verfügbarkeit  $\rightleftharpoons$  Aufnahme  $\rightleftharpoons$  Verlagerung  $\rightleftharpoons$  As im Korn. Ziel der folgenden Arbeit ist, die Aufnahme von Arsenit [As(III)] durch Reis zu untersuchen. As(III) gilt als die mobilere, phytotoxischere anorganische As-Form (Meharg & Abedin 2002), die unter reduzierenden Bedingungen vorherrscht (Abedin et al. 2002).

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 As-Formen

As ist ein Halbmetall aus der 5. Hauptgruppe des Periodensystems und nimmt Oxidationsstufen von  $-3$  bis  $+5$  an (Latscha & Klein 2002). Es gibt eine Vielfalt an As-Formen, wobei in terrestrischer Umgebung die anorganischen überwiegen (Subramanian 2002). Die wichtigsten anorganischen Formen sind hierbei das 5-wertige (oxidierte) Arsenat [As(V)] und das 3-wertige (reduzierte) As(III) (Abb. 2.1). So liegt im Grundwasser ca. 50% des Gesamtarsens als As(V) vor (Samantha 1999). Organische Formen wie methylierte As-Säuren (MMAA, DMAA) (Abb. 2.1) kommen i.d.R. nur in geringer Menge vor (Rengel & Quaghebeur 2005). In der Bodenlösung dominiert As(V) unter oxidierenden Bedingungen, während unter reduzierenden Bedingungen hauptsächlich As(III) vorliegt (Masscheleyn et al. 1991, 1993). Abedin et al. (2002c) fanden bei Nassreis folgende As-Formen in der Bodenlösung: 36-63% As(III), 11-44% DMAA, 1-39% As(V) und 0-14% MMAA.

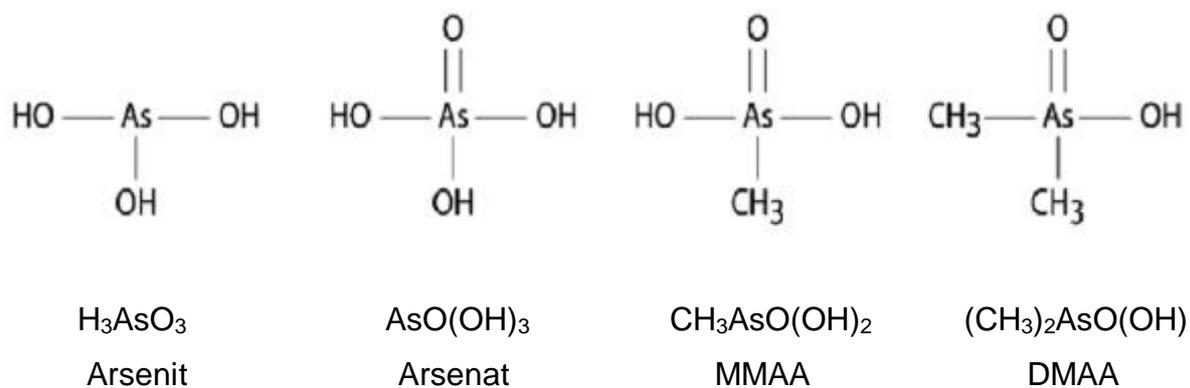


Abb. 2.1: Struktur- und Summenformeln der As-Formen (Rengel & Quaghebeur 2005).

As(III) besitzt außerdem eine hohe Affinität gegenüber Schwefel. Es bilden sich Thioarsenite bzw. As(III)-Sulfide, wobei die exakte Stöchiometrie der Thioarsenit-Komplexe nicht genau bekannt ist (Wood et al. 2002). Faktoren, die die As-Form beeinflussen, werden im Folgenden beschrieben.

## 2.2 As-Dynamik

Die As-Formen unterliegen Umwandlungsprozessen. Dies wiederum beeinflusst Verfügbarkeit und Toxizität des As. Welche As-Form vorliegt, hängt davon ab, wie pH, Redoxpotential, andere Stoffe, Druck, UV-Licht, Temperatur und Mikroorganismen zusammenwirken. Man kann grob zwischen anorganischen und durch Mikroorganismen beeinflussten Prozessen unterscheiden, wobei manche anorganisch und / oder mikrobiell ablaufen. Erstere können Oxidations-/ Reduktions-, Ligandentausch-, Ausfällungs- oder Adsorptionsreaktionen sein (Subramanian et al. 2002). Abb. 2.2 zeigt den Zusammenhang von pH und Redoxpotential in einem System mit 10  $\mu\text{M}$  As, 10  $\mu\text{M}$  S sowie  $\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$ .

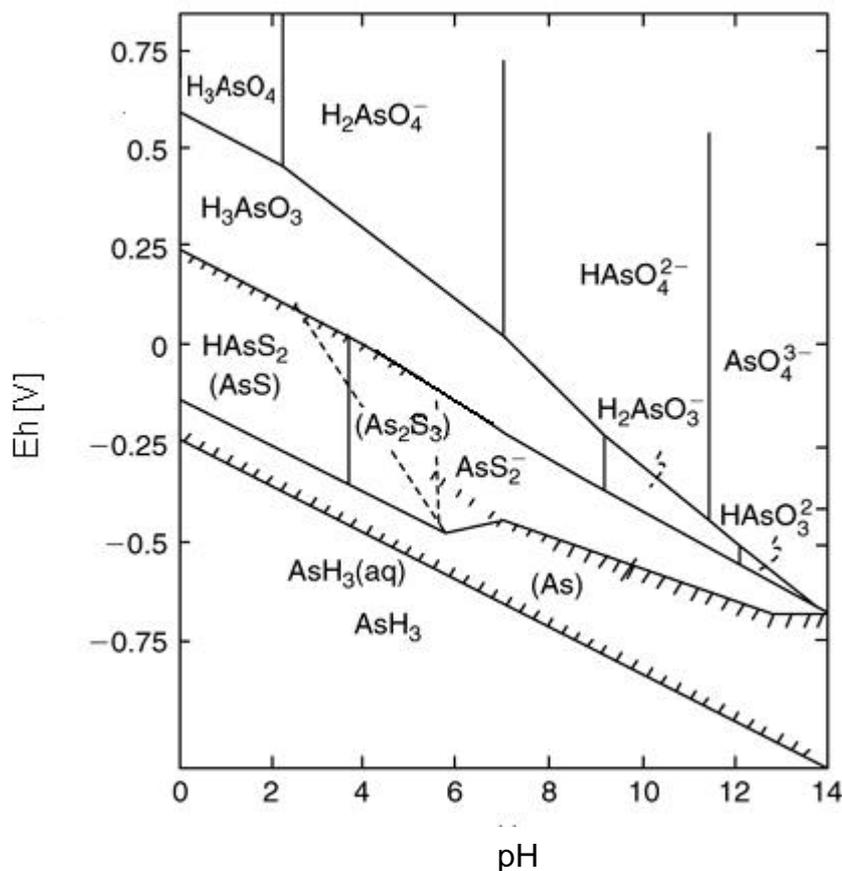


Abb. 2.2: As-Form in Abhängigkeit von Redoxpotential und pH bei 25 °C und 1 atm mit 10  $\mu\text{M}$  As, 10  $\mu\text{M}$  S (Ferguson & Gavis 1972).

Unter aeroben Bedingungen und bei neutralem bis schwach saurem pH liegt As(V) in den Dissoziationsstufen  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  und  $\text{HAsO}_4^{2-}$  vor. Es hat ähnliche chemische Eigenschaften wie Phosphat (Hingston et al. 1972) und wird wie dieses stark an Tonminerale oder Fe-, Mn- oder Al-Oxide sorbiert (Grafe et al. 2001, Goldberg 2002, Kinniburgh & Cooper 2004). Aufgrund der hohen Affinität zu FeOH kann As(V) als

Fe(III)AsO<sub>4</sub> ausfallen (Pierce & Moore 1982, Takamatsu et al. 1985, Agget & Kriegman 1988). Wäre in dem System in Abb. 2.2 Fe enthalten, müsste dieses eine Fläche < pH 2,3 und Eh > 0,74 V enthalten. Unter leicht reduzierenden Bedingungen hingegen ist As(III) als ungeladenes H<sub>3</sub>AsO<sub>3</sub> stabil. Sinkt das Redoxpotential weiter, können sich As-S-Komplexe bilden. Bei sehr niedrigem Redoxpotential kann außerdem flüchtiges AsH<sub>3</sub> entstehen (Subramanian et al. 2002).

Eine anorganische Oxidation von As(III) kann unterschiedliche Ursachen haben. So ist die Oxidation von As(III) durch O<sub>2</sub> bei neutralem pH langsam, kann aber von Fe (Spliethoff et al. 1995, Smedley et al 2002, Samanta & Clifford 2005), Mn (Hammer et al. 1982) oder Al zusammen mit O<sub>2</sub> katalysiert werden. Es wird von einer raschen Oxidation von As(III) in Gegenwart von Al-, Fe- oder Mn-Hydroxiden berichtet (Raven et al. 1998, Matera et al. 2003). Eine Oxidation durch NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ist verhältnismäßig langsam (Hammer et al. 1982). Außerdem kann es zur Oxidation an Tonmineralen kommen, an die As(III) schwach und pH-abhängig sorbiert ist (Subramanian et al. 2002). UV-Strahlung und damit verbundene O<sub>2</sub>-Radikalbildung kann die Oxidation von As(III) in wässrigen Lösungen verstärken (Hug et al. 2001). Organische Säuren wiederum können durch Komplexierung mit z.B. Fe eine Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) verhindern und dadurch die As(III)-Oxidation vermindern (Neal et al. 2006).

Mikroorganismen - aerobe und anaerobe Bakterien - beeinflussen ebenfalls Redoxreaktionen zwischen As(III) und As(V) (McCleskey 2004), wobei sie sowohl Reduktion als auch Oxidation katalysieren (Oremland & Stolz 2003, Silver & Phung 2005). So gibt es einen über viele prokaryotische Taxa konservierten *ars* operon, welcher für eine Arsenat-Reduktase kodiert (ArsC) (Jackson & Dugas 2003). Die Reduktion kann der Detoxifizierung von aufgenommenem As(V) dienen. Zwar gilt As(III) als toxischer, doch kann dieses nun komplexiert, zu weniger toxischem organischem As methyliert (Turpeinen et al. 1999) oder mittels einer As(III)-Efflux-Pumpe (ArsB) oder einem Carrier aus der Zelle exportiert werden (Rosen 2002).

Eine Oxidation von As(III) hingegen kann als Energiequelle dienen (Santini et al. 2007, Oremland et al. 2002, Rhine et al. 2006), welche entweder an O<sub>2</sub> oder NO<sub>3</sub><sup>-</sup> gekoppelt ist (Harvey et al. 2002). So berichten Ahmann et al. (1997) und Turpeinen et al. (1999) von einer raschen As(III)-Oxidation in Gegenwart von Mikroorganismen. Allerdings kann in *Agrobacterium tumefaciens* Oxidation als auch Reduktion ablaufen, wobei die Oxidation nicht mit einer Energiegewinnung für den Organismus gekoppelt ist (McDermott et al. 2006).

### 2.3 As und Reis

#### 2.3.1 Wirkung von As auf das Wachstum von Reis

As beeinflusst das Wachstum von Reis meist negativ und kann zu Ertragsminderungen führen. Anorganisches As verursacht Symptome, die von geringerem Wurzelwachstum bis hin zum Pflanzentod reichen (Macnair & Cumbes 1987). So wird das als „Straighthead“ bekannte Symptom auf As zurückgeführt. Es kommt zu kleinwüchsigen Pflanzen, einer geringeren Bestockung, Sterilität der Blüten, verzögerter Ernte, geringerem Tausendkorngewicht und geringerem Ertrag (Tsutsumi 1980, Rutger 2005). Allerdings gibt es auch Berichte, dass z.B. DMAA Trockenmasse und Anzahl der Bestockungstriebe (Marin et al. 1992) fördert. Die möglichen Ursachen einer Ertragsdepression werden im Folgenden genauer betrachtet.

Im Zytoplasma finden sich die 4 As-Formen As(V), As(III), MMAA und DMAA wieder (Meharg & Hartley-Whitaker 2002). Diese unterscheiden sich deutlich in ihrer Toxizität gegenüber Pflanzen, wobei anorganisches As toxischer als organisches und 3-wertiges toxischer als 5-wertiges gilt (Tamaki & Frankenberger 1992). Im Wesentlichen zeigt die Pflanze 3 Reaktionen auf anorganisches As im Zytoplasma:

- 1.) Reduktion des As(V),
- 2.) Komplexierung des As(III) durch Glutathion (GSH) und / oder Phytochelatine,
- 3.) Produktion von Antioxidationsmitteln und Radikalfängern im Zusammenhang mit oxidativem Stress.

#### 2.3.2 As(V) und As(V)-Reduktion

As(V) hat ähnliche chemische Eigenschaften wie Phosphat und kann den Energiehaushalt der Zelle stören. Es konkurriert mit Phosphat um ADP und bildet instabiles ADP-As(V), wodurch es die oxidative Phosphorylierung beeinträchtigt. (Kenney & Kaplan 1988, Ullrich-Eberius et al. 1989, Hartley-Whitaker et al. 2001, Meharg & Hartley-Whitaker 2002).

Bertolero et al. (1987) nehmen an, dass die As(V)-Konzentration im Zytoplasma nicht ausreicht um den Stoffwechsel maßgeblich zu hemmen, da As(V) i.d.R. rasch reduziert wird. Eine Reduktion des As(V) in das zunächst toxischere As(III) ist erforderlich, da der Pflanze keine Detoxifizierungsmechanismen gegen As(V), wohl aber gegen As(III) zur Verfügung stehen.

## 2. Literaturübersicht

Die Reduktion selbst kann nicht-enzymatisch und möglicherweise auch enzymatisch ablaufen. Nicht-enzymatisch reduziert das in hohen Konzentrationen in der Zelle vorkommende Glutathion As(V) (Delnomdedieu et al. 1993). Hierbei reduzieren 2 Moleküle Glutathion 1 Molekül As(V) zu As(III), wobei das Glutathion unter Bildung von Disulfidbrücken oxidiert wird (GSSG) (Delnomdedieu et al. 1994) (Gl.1, Carter 1995):



Das GSSG wird wiederum zu 2 Molekülen Glutathion regeneriert (Cobett 2000). Glutathion und GSSG sind in Abb. 2.3 dargestellt:

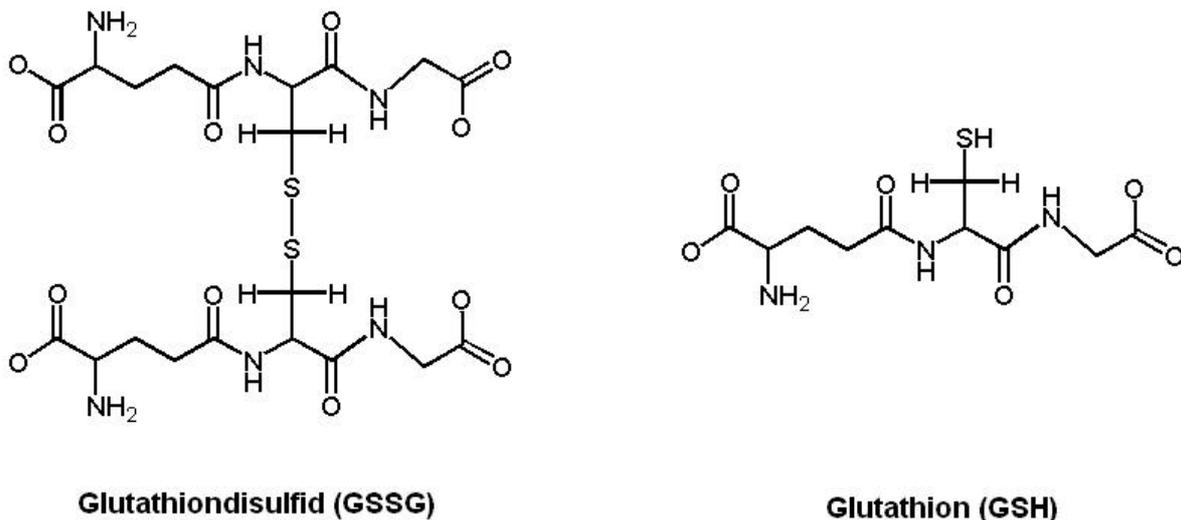
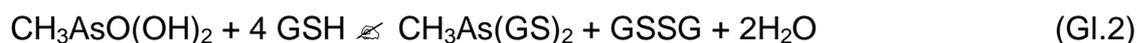


Abb. 2.3: Glutathion in der reduzierten (GSH) und oxidierten Form (GSSG).

[<http://www.med.unibs.it/~marchesi/ppp.html> 10.09.2003]

Denkbar ist auch eine Reduktion mit anschließender Komplexbildung der 5-wertigen MMAA und DMAA (Gl. 2 u. 3, Carter 1995):



Eine enzymatische Reduktion hingegen kann möglicherweise mittels einer Reduktase geschehen. So wurden im Reis homologe Gene des As(V)-Reduktase-Gens AtACR2 aus *Arabidopsis thaliana* gefunden (Zhu et al. 2007). In *Arabidopsis*

*thaliana* bewirkte ein silencing dieses Gens Hypersensitivität (Dhankher et al. 2006), da sich nun As(V) zu toxischen Konzentrationen akkumulieren konnte.

### 2.3.3 As(III)

As(III) reagiert leicht mit Thiolgruppen (-SH-Gruppen) von Proteinen und verursacht dadurch Funktionsstörungen von Enzymen und Gewebeproteinen mit folgendem Zelltod (Delnomdedieu et al. 1993, Ullrich-Eberius et al. 1989). So können u.a. Nitrat- und Nitritreduktase als auch Glutaminsynthetase beeinträchtigt sein (Dubey & Jha 2004). Als Folge der Enzymhemmungen können sich z.B. niedermolekulare Zucker anhäufen (Jha & Dubey 2004).

Das bei der Reduktion entstandene, toxischere (s.o.) As(III) muss sofort sequestriert bzw. komplexiert werden (Ghosh et al. 1999), wobei dies wiederum durch Glutathion selbst oder mittels Phytochelatin geschehen kann. Ersteres geschieht durch Komplexierung des As(III) durch 3 Moleküle Glutathion (Gl.4, Carter 1995):



Phytochelatine hingegen sind aus Glutathion synthetisierte Polypeptide, reich an Thiol- bzw. SH-gruppen und dienen der Komplexierung von Metallen und Halbmetallen. Sie werden von vielen Elementen induziert wie Ag, Cd, Cu, Zn, Hg, Pb und ihre Produktion als Antwort auf As wurde in mehreren Pflanzenarten gezeigt (Hartley-Whitaker et al. 2001, Raab et al. 2004, Schmöger et al. 2000, Sneller et al. 1999). Erstellt werden sie durch eine Phytochelatin-Synthase (Grill 1987, Schmöger et al. 2000), welche die Glutathion-Moleküle verknüpft. Die Struktur der Phytochelatine ist (?-Glutamin-Cystein)<sub>n</sub>Glycin mit n = 2-11. Allerdings sind (?-Glutamin-Cystein)<sub>2</sub>Glycin und (?-Glutamin-Cystein)<sub>3</sub>Glycin bzw. Phytochelatin<sub>2</sub> und Phytochelatin<sub>3</sub> die am häufigsten anzutreffenden Formen (Cobbett & Goldsbrough 2002).

Bei der Detoxifizierung von As durch Glutathion oder Phytochelatine komplexieren immer drei Thiolgruppen der Cysteine aus Glutathion bzw. Phytochelatinen ein As(III)-Molekül (Pickering et al. 2000, Schmöger et al. 2000). As(V) induziert zwar auch die Phytochelatin-Synthese, hat allerdings keine Affinität zu den Thiolgruppen und wird nicht komplexiert (Schmöger et al. 2000). Es muss erst zu As(III) reduziert werden.

Da As-Thiol-Komplexe nur bei niedrigem pH stabil sind (Schmöger et al. 2000, Sneller et al. 2000) werden sie möglicherweise in der Vakuole gespeichert. So kann der Transporter *ycf1p* in *Saccharomyces cerevisiae* As-Thiol-Komplexe aktiv in die Vakuole transportieren (Ghosh et al. 1999, Rosen 1999) und es wird angenommen, dass höhere Pflanzen dies auch können (Tong et al. 2004).

### 2.3.4 Wirkung der As(V)-Reduktion

Man nimmt an, dass bei der Reduktion von As(V) (Gl.1) entstehende reaktive Sauerstoffverbindungen (u.a.  $O_2^{\cdot -}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $LOO^{\cdot}$ ,  $LO^{\cdot}$ ,  $H_2O_2$ ,  $LOOH$ ,  $O_3$ ,  $OCI^{\cdot}$ , und angeregte [Singulett-] Sauerstoffmoleküle  $^1O_2$ ) zur Lipidoxidation und somit zu Membranschäden führen (Hartley-Whitaker et al. 2001). Als Reaktion auf anorganisches As und Zeichen von oxidativem Stress werden Antioxidationsmittel und Radikalfänger („Scavenger“) produziert (Hartley-Whitaker et al. 2001, Liu et al. 2001). Sie können enzymatisch oder nicht-enzymatisch sein. So haben Mylona et al. (1998) an *Zea mays* gezeigt, dass As(V) und As(III) zu höheren Gehalten an Katalase, Glutathion-S-Transferase und Superoxiddismutase führen. Meharg et al. (2006) konnten auch bei Reis mit P-Mangel und As(V)-Applikation eine erhöhte Produktion der Guaiacol Peroxidase, Superoxiddismutase und Katalase feststellen. Nicht-enzymatische Antioxidationsmittel im Reis sind Glutathion und Ascorbat (Hartley-Whitaker et al. 2001, Meharg & Hartley-Whitaker 2002).

### 2.3.5 Glutathion als Toleranzindikator?

Obwohl Glutathion eine überragende Rolle bei der Detoxifizierung von As in der Zelle zu haben scheint, ist es kein guter Indikator für die Sensitivität oder Toleranz eines Genotypen. Für eine hohe As-Toleranz muss die Pflanze zwar das As reduzieren und komplexieren, aber gleichzeitig auch auf oxidativen Stress reagieren (s.o.). Glutathion wird für jeden dieser Schritte benötigt, ist aber gleichzeitig der Baustein der Phytochelatine. Bildet die Pflanze vermehrt Phytochelatine, kann es zu einem Mangel an Glutathion kommen. Ein geringer Glutathion-Gehalt kann also auf geringer Glutathion-Synthese oder erhöhter Phytochelatin-Synthese beruhen. Sensitive Genotypen können z.B. vermehrt oxidativen Stress aufweisen, da eine hohe Produktion von Phytochelatinen zu einem Glutathion-Mangel bei der Bekämpfung von reaktiven Sauerstoffverbindungen führt (Sneller et al. 1999, Hartley-Whitaker 2001). So wiesen sensitive Reis-Genotypen hohe  $H_2O_2$ -Konzentrationen

(Meharg et al. 2006) und sensitive Genotypen von *Holcus lanatus* erhöhten Ionenaustritt (Exosmosis) von K, P und As auf (Hartley-Whitaker et al. 2001). Letzteres deutet auf beeinträchtigte Membranfunktionen hin. Andererseits zeigten As(V)-tolerante Genotypen von *Holcus lanatus* weniger Lipidoxidation (Hartley-Whitaker et al. 2001). So können sensitive Genotypen auch eine hohe Konzentration an Guaiacol Peroxidase, Superoxiddismutase, Ascorbat-Peroxidase und Katalase sowie Glutathion und Ascorbat zeigen (Hartley-Whitaker et al. 2001). Toleranz oder Sensitivität scheinen also auf verschiedenen Ursachen im Stoffwechsel und einem Zusammenspiel aus Glutathion- und Phytochelatin-Synthese zu beruhen.

### 2.4 As-Aufnahme

Reis nimmt Arsen als anorganisches As(V) und As(III) oder organisches MMAA, DMAA (Masscheleyn 1992, 1993, Meharg et al. 2002) auf.

As(V) wird aktiv durch das Phosphat Kotransport-System aufgenommen (Ullrich-Eberius et al. 1989, Meharg & Macnair 1992). Es verhält sich wie im Boden und im Zytoplasma (s.o.) auch bei der Aufnahme analog Phosphat und beide konkurrieren um die gleichen Absorptionsstellen im Apoplasten und den gleichen Carrier in der Wurzelmembran (Meharg & Macnair 1992, 1994, Abedin et al. 2002a, b, Wang et al. 2002). So kann Phosphat in der Lösung die As(V)-Aufnahme senken (Tsutsumi 1980).

Die As(III)-Aufnahme von Reis hingegen ist wenig erforscht. So gibt es nur 3 Veröffentlichungen, die eine Aufnahme von As(III) durch Reis direkt behandeln (Abedin et al. 2002c, Meharg & Jardine 2003, Meharg et al. 2005c). In Kurzzeitversuchen (<30 min.) wurde mit abgeschnittenen Wurzeln eine Aufnahmekinetik erstellt. Hierbei schien die As(III)-Aufnahme:

a) nicht durch einen Phosphattransporter zu erfolgen, da As(III) und Phosphat in ihren chemischen Eigenschaften deutlich verschieden sind (Rengel & Quaghebeur 2004) und Phosphat selbst bei hohen Konzentrationen die As(III)-Aufnahme nicht beeinflusste (Abedin et al. 2002c).

b) im niedermolaren Bereich (0 - 0,0532 mM As) einer Michaelis-Menten-Funktion zu folgen, wobei sich verschiedene Sorten in der maximalen Aufnahmerate ( $I_{max}$ ), nicht aber in der Affinität des Aufnahmesystems ( $K_m$ ) unterschieden (Abedin et al. 2002c).

c) bei höheren Konzentrationen (>0,0532 mM As) linear abhängig von der angebotenen Konzentration zu sein (Abedin et al. 2002c).

d) durch Glycerol und Sb kompetitiv hemmbar zu sein. (Meharg & Jardine 2003).

Die Autoren schließen daraus, dass Reis As(III) aktiv bzw. gegen den Konzentrationsgradienten durch einen Kanal aus der Familie der Aquaglyceroporine aufnimmt. Hierbei stützen sie sich darauf, dass Aquaglyceroporine Wasser und teilweise gelöste Stoffe transportieren (s.u.), in allen Bakterien, Pilzen, Tieren und Pflanzen vertreten sind (Maurel 1997) und in hoher Konzentration in der Reisswurzel exprimiert werden (Li et al. 2000). Da es in Hefe und Säugetieren Aquaglyceroporine gibt, die As(III) aufnehmen (*Saccharomyces cerevisiae*: Fps1pm, Wysocki et al. 2001; Säugetiere: AQP9, Rosen et al. 2002b), scheint eine Aufnahme von As(III) durch Aquaglyceroporine bei Reis möglich. Im Folgenden wird daher näher auf die Eigenschaften von Aqua(glycero)porinen eingegangen.

### **2.5 Struktur, Funktionsweise, Selektivität und Regulierung der Aqua(glycero)porine**

Aquaporine sind Wassertransportproteine und gehören zur Familie der Major Intrinsic Proteins (MIPs) der transmembranen Kanäle (Maurel 1997). Sie kommen in der Plasmamembran (PIP) sowohl als auch im Tonoplasten vor (TIP), sind 26 – 30 kDa groß und bestehen aus 6 membrandurchspannenden  $\alpha$  Helices, wobei N- und C-termini beide auf der zytosolischen Seite lokalisiert sind (Maurel 1999). Angeordnet sind Aquaporine als Tetramere, wobei jedes Monomer als Kanal fungiert, nicht aber der Raum in der Mitte der vier Monomere. 2 kleinere Schleifen falten sich aus entgegengesetzten Richtungen kommend symmetrisch zur Aquaporinmitte hin und geben dem Kanal die typische „Sanduhr“-Form (Abb. 2.4). Durch das Aufeinandertreffen dieser beiden Schleifen entsteht das so genannte NPA-Motiv, das aus einer hochgradig konservierten Asparagin-Prolin-Alanin-Sequenz in jeder der beiden Schleifen besteht. Asparagin 68 und Asparagin 203 sind nebeneinander so angeordnet, dass ihre Amidgruppe jeweils mit dem positiv geladenen Wasserstoffatom in den Kanal hineinragt (Tajkhorshid et al. 2001). Diese Stelle bestimmt zusammen mit der engsten Stelle des Kanals die Selektivität des Aquaporins. Letztere ist der so genannte Selektivitätsfilter (SF) und hat im Aquaglyceroporin GlpF (*E.Coli*) einen Durchmesser von = 35 nm (Fu et al. 2000, Nollert et al. 2001).

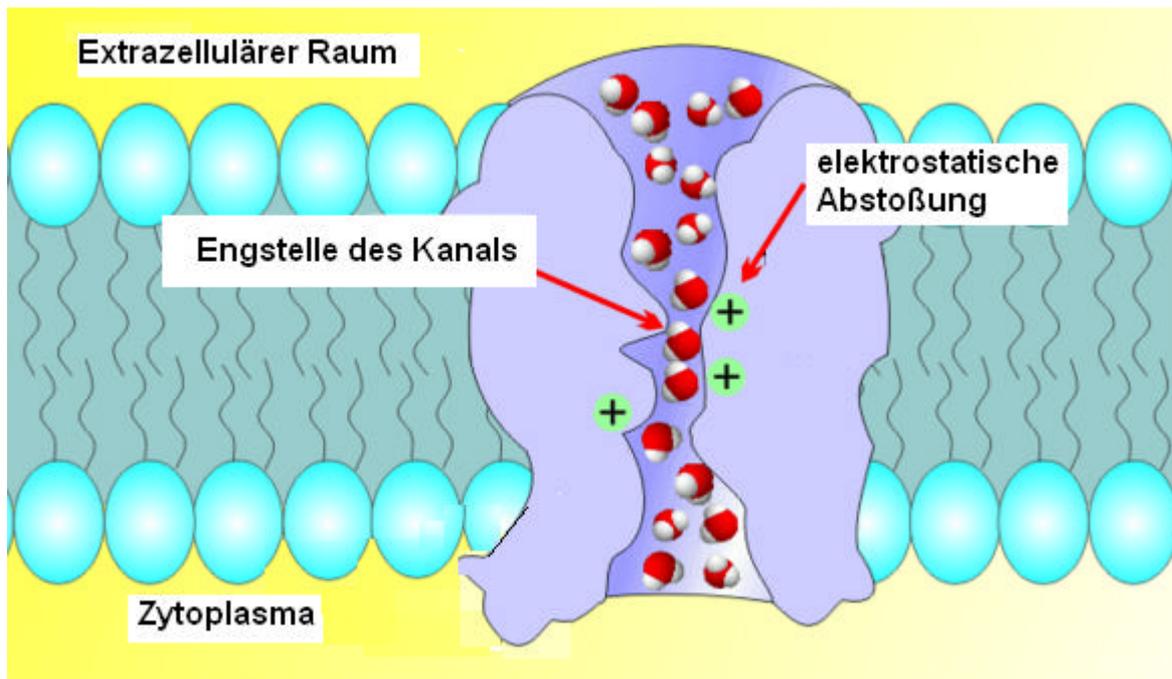


Abb. 2.4: Schematische Darstellung eines Aquaporinkanals.

[<http://de.wikipedia.org/wiki/Aquaporin>]

Die Selektivität des Aquaporins beruht auf folgenden Substrat- bzw. Moleküleigenschaften: Durchmesser, sterische Anordnung, Ladung, die Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen und möglicherweise die Affinität zu –SH-Gruppen.

Aquaporine sind mit nur wenigen Ausnahmen hochselektiv gegenüber Ionen, insbesondere  $H^+$ . Diese werden aufgrund der positiv geladenen Amidgruppen am Asparagin 68 und 203 zurückgehalten (de Groot et al. 2003). Außerdem wird an dieser Stelle wahrscheinlich der Grothuss-Mechanismus, das Weiterreichen der  $H^+$  von Wassermolekül zu Wassermolekül, unterbrochen (s.u.).

Der Weg eines ungeladenen Moleküls von der periplasmatischen zur zytosolischen Seite der Membran wird am Beispiel des Glycerol durch GlpF, einem bakteriellen Aquaglyceroporin, beschrieben:

Durch den Kanaldurchmesser und Wasserstoffbrückenbindungen bedingt, können Moleküle ab einer bestimmten Stelle im Kanal nur einzeln hintereinander wandern (Fu et al. 2000). Der aliphatische / hydrophobe „Rücken“ des Glycerol ist apolaren Aminosäuren auf der einen Kanalinnenseite zugewandt, während die OH-Gruppen des Glycerol Wasserstoffbrückenbindungen mit polaren Gruppen (Carbonylgruppen  $C=O$ ) von Aminosäuren auf der gegenüberliegenden Kanalinnenseite sowie mit

Wassermolekülen eingehen (Fu et al. 2000). Das Molekül wird nun über die Wasserstoffbrückenbindungen von Aminosäure zu Aminosäure weitergereicht, wobei es als H-Atom-Spender fungiert. Die engste Stelle des Kanals ändert nichts an der Transportweise und kann aufgrund des Moleküldurchmessers passiert werden. Das Glycerol liegt hier aufgrund seiner Struktur so, dass es die Transportbedingung der Wasserstoffbrückenbindungen erfüllt und diese Stelle gleichzeitig mit seinem kleinsten Durchmesser passiert. Auf halbem Weg zum Zytosol wird das Molekül durch die positiv geladenen Wasserstoffatome der Amidgruppen von Asparagin 68 und 203 gezwungen, Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen, wobei es nun zweimal das H-Atom vom Asparagin erhält (Tajkhorshid et al. 2001) und zu einer Rotation gezwungen wird (Tajkhorshid et al. 2002). Hierdurch wird vermutlich auch der Grotthuss-Mechanismus (s.o.) unterbrochen (Tajkhorshid et al. 2002).

Die Polarität der Aminosäuren entlang der Kanalinnenwand bestimmt neben dem Kanalinnendurchmesser also die Selektivität (Tajkhorshid et al. 2001) und damit, ob es sich um ein reines Aquaporin oder ein Aquaglyceroporin handelt. So haben Aquaporine, die nur Wasser durchlassen, mehr Stellen mit hydrophilen Gruppen (statt Tryptophan 48 und Phenylalanin 200 nämlich Phenylalanin und Histidin). Diese würden ungünstig mit dem aliphatischen Teil des Glycerol reagieren (Tajkhorshid et al. 2001). Der Kanaldurchmesser von AqpZ, einem reinen Aquaporin, ist mit 24 nm deutlich kleiner als im Fall des Aquaglyceroporins GlpF (= 35 nm) (Tajkhorshid et al. 2005). Je Aminosäure und Kanalinnendurchmesser gibt es Aqua(glycero)porine, die nur für Wasser (Maurel et al. 1993), für Wasser und ungeladene Teilchen wie Harnstoff (AQP3, Echevarria et al. 1994, Ishibashi et al. 1997) oder sogar für Ionen durchlässig sind (AQP6, Agre et al. 2002). In Pflanzen transportieren Aquaporine u.a. Ammoniak und Ammonium (Jahn et al. 2004), Bor (Dordas et al. 2000) und Wasserstoffperoxid (Henzler & Steudle 2000). Diese Stoffe und Wasser können im Kanal in beide Richtungen fließen – allerdings passiv, entlang des osmotischen oder hydraulischen Gradienten (Maurel 1997). Z.B. ist die Geschwindigkeit, mit der Teilchen den Kanal passieren, bei Aquaglyceroporin in beide Richtungen gleich (Tajkhorshid et al. 2002b). Auch deuteten Simulationen mit unterschiedlichem hydrostatischem Druck eine lineare Abhängigkeit des Wassereinstroms von diesem an (Tajkhorshid et al. 2002c, 2004).

Reguliert werden Proteine und damit Aqua(glycero)porine auf 2 Ebenen. Erstens durch Kontrolle der Expression und damit der Häufigkeit des Proteins und zweitens über eine Kontrolle der Aktivität des einzelnen Proteins (Maurel & Chrispeels 2001). Der Kanal selbst kann geöffnet und geschlossen werden und unter Umständen auch kollabieren, wobei jegliche Regulierung auf der zytosolischen Seite der Membran erfolgt. Eine Phosphorylierung von Serin versetzt den Kanal in einen geöffneten Zustand, und er wird durch Dephosphorylierung, z.B. bei Trockenheit, geschlossen (SoPIP2 in Spinat, Johansson et al. 1998). Ebenso kann bei einem Absinken des zytosolischen pH von 7 auf 6 eine Protonierung von Histidin, z.B. unter anoxischen Bedingungen, den Kanal schließen (Tournaire-Roux et al. 2003). Auch freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen verursachen ein Schließen den Kanals (Németh-Cahalan & Hall 2000). „Geschlossen“ wird der Kanal, indem sich eine Schleife (loop D) des Proteins, welche ins Zytosol ragt, über die Kanalöffnung legt, eine hydrophobe Barriere an dieser Stelle bildet und den Kanal z.B. bei Spinat (SoPIP2) von >40 nm auf 8 nm verengt (die engste Stelle in SoPIP2 ist sonst 21 nm) (Tajkhorshid et al. 2006). Des Weiteren vermutet man, dass Öffnen und Schließen von dem osmotischen Druck bzw. der Osmolarität (Ye et al. 2004) und der Heteromerisation des Aqua(glycero)porins (Fetter et al. 2004) abhängig sind. Außerdem können die Verteilungswege vom Synthesort zur Membran („membrane trafficking“) über den Golgi-Apparat (Chaumont et al. 2005) und durch die Anzahl der Kanäle je Membran reguliert werden.

Bestimmte Stoffe können Aqua(glycero)porine blockieren. So können Quecksilber-Verbindungen an SH-Gruppen binden oder Cystein-Reste im Eingangsbereich des Kanals oxidieren. Letzteres kann durch SH-reduzierende Stoffe wie 2-Mercaptoethanol rückgängig gemacht werden. Allerdings gibt es hierbei deutliche Ausnahmen mit Hg-insensitiven Aquaporinen. So wirken verschiedene Hg-Verbindungen unterschiedlich je nach Temperatur und pH (Naccache & Sha'afi 1974). In Versuchen mit intakten Pflanzen ist Hg problematisch, da einige Hg-Formen auch starke Stoffwechselgifte sind (Maurel 1999). Spezifische Hemmstoffe oder Blocker für Aquaporine sind derzeit nicht bekannt.

### 2.6 As(III)-Aufnahme

Es stellt sich die Frage, wie und durch welches Transportsystem As(III) durch Reis aufgenommen wird.

As(III) liegt bei leicht reduzierenden Bedingungen bei neutralem bis saurem pH als ungeladenes  $\text{H}_3\text{AsO}_3$  vor (s.o.). Dieses Molekül ist symmetrisch (in Form einer Pyramide) mit einem O-O-Abstand von ca. 30 nm (Abb. 2.5). Mit dieser Größe würde es durch kein reines Aquaporin, aber durch ein Aquaglyceroporin mit ähnlichem Durchmesser wie GlpF passen. Die drei OH-Gruppen könnten die Wasserstoffbrücken eingehen und hierbei H-Atome spenden oder empfangen. Weiter wird As(III) in *E.Coli*-Bakterien durch den Glycerolkanal GlpF (Tajkhorshid 2002b) und in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) durch Aquaglyceroporin Fps1pm (Wysocki et al. 2001) aufgenommen und bei Säugetieren durch AQP9 (Rosen 2002b) transportiert. AQP9 transportiert As(III) als  $\text{As}(\text{OH})_3$  und  $\text{CH}_3\text{As}(\text{OH})_2$ , Fps1pm letzteres nicht. (Rosen 2006). Interessanterweise sind beim Menschen die Organe mit der höchsten Aquaporindichte (Niere, Herz und Lunge) am stärksten von As betroffen (Borgnia et al. 1999). Da die Funktionsweise aller Aquaglyceroporine ähnlich ist und in Reiszurzel 33 AQP-Gene, 11 davon für die Plasmamembran (Sakurai et al. 2005), vorhanden sind, ist eine Aufnahme durch möglicherweise vorhandene Aquaglyceroporine zu vermuten.

Allerdings fungieren Aquaglyceroporine als passive Transporter (s.o.). Die Aufnahmefunktion eines einzelnen Kanals müsste eine lineare Korrelation zwischen Substratkonzentration und Aufnahmerate über einen bestimmten Konzentrationsbereich zeigen. Eine lineare Funktion kann allerdings bei Absättigung des Kanals in einem Plateau münden („linear response model“). Betrachtet man eine bestimmte Fläche der Membran, so bestimmt dort die vertretene Anzahl an Aquaglyceroporinen die maximal aufnehmbare As(III)-Menge pro Zeiteinheit bzw. die Plateauhöhe.

Bei höheren Konzentrationen ist auch nicht auszuschließen, dass As(III) das Schließen des Kanals durch Stoffwechselwege im Zellinneren oder durch Binden an SH-Gruppen verursacht. Dies würde die Aufnahmefunktion ebenso beeinflussen.

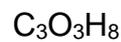
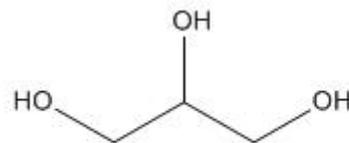
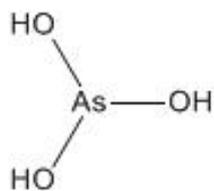
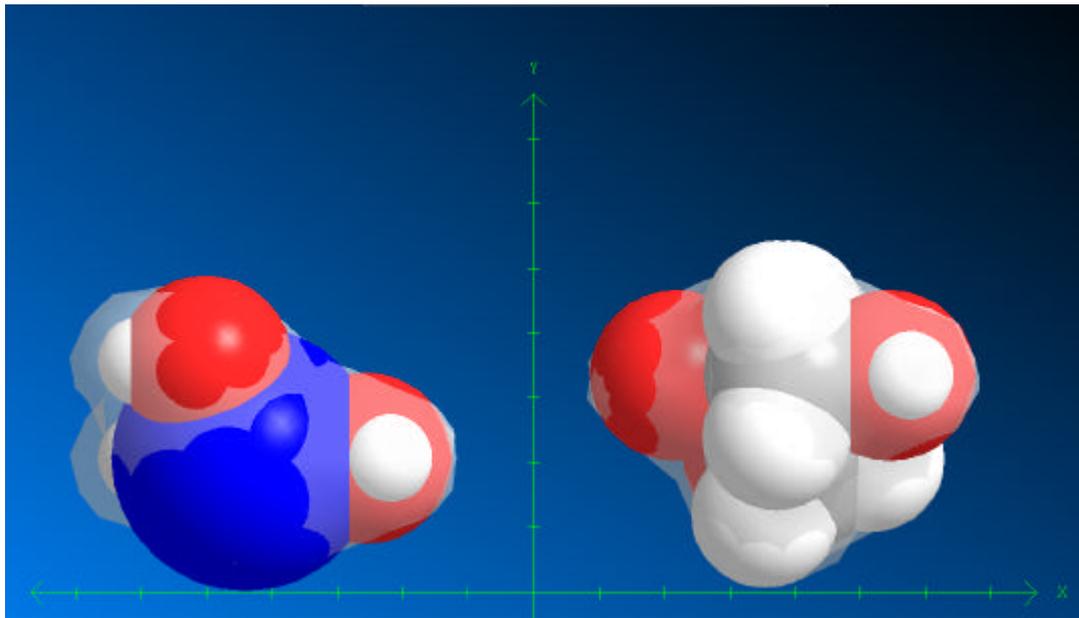


Abb. 2.5) Van der Waals Radii und Solvent excluded surface (Connolly-Oberflächenmodell) von As(III) und Glycerol, gezeichnet mit Chem3D Ultra. Relative Darstellung mit Frontalsicht des geringsten Durchmessers. Maßstab. Atome: Rot = O, Weiß = H, Blau = As, Grau = C.

### 2.7 Hypothese

Die As(III)-Aufnahme intakter Reispflanzen ist passiv und zeigt einen linearen Verlauf in Abhängigkeit der Konzentration, kann aber in einem Plateau münden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Ziel der Methodik und Randbedingungen

Ziel des Verfahrens war, Arsen intakten Pflanzen nur in der dritten Oxidationsstufe anzubieten. Das für das Nährfilmverfahren entwickelte System musste folgende Eigenschaften aufweisen, um ein Angebot von reinem As(III) zu gewährleisten:

- a) Geringer  $O_2$ -Gehalt in Gas und Flüssigkeit, um eine Oxidation von As(III) zu verhindern sowie Abtransport des durch die Wurzel abgegebenen Sauerstoffs
- b) Überprüfbarkeit der As-Oxidationsstufe
- c) Abtransport von oxidiertem As

### 3.2 Systembeschreibung

Es wurde folgender Versuchsaufbau gewählt (Abb. 3.1 und 3.2): Die Wurzel wurde in einem leicht geneigt aufrecht stehenden Plexiglasrohr (Wanddicke = 2 mm, Innendurchmesser = 16 mm, Innenvolumen = 50 cm<sup>3</sup>) ständig mit sauerstoffarmer Lösung betropft, so dass sich ein durchgehender Film bildete. Dieser umspülte die Wurzel und staute sich am unteren Rohrende an, um dann über einen Überlauf das Rohr zu verlassen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Wurzel nicht in die sich anstauende Lösung ragte. Der Durchfluss wurde auf 4 l d<sup>-1</sup> bzw. 167 ml h<sup>-1</sup> eingestellt. Bei dieser Durchflussrate war die As-Konzentration in der Lösung vor und nach Passieren der Wurzel gleich. Die Rohre wurden 3- bis 4-mal am Tag mit dem 5 bis 10-fachen Rohrvolumen mit N<sub>2</sub> gespült, welcher über den Schaumstoffstopfen entwich.

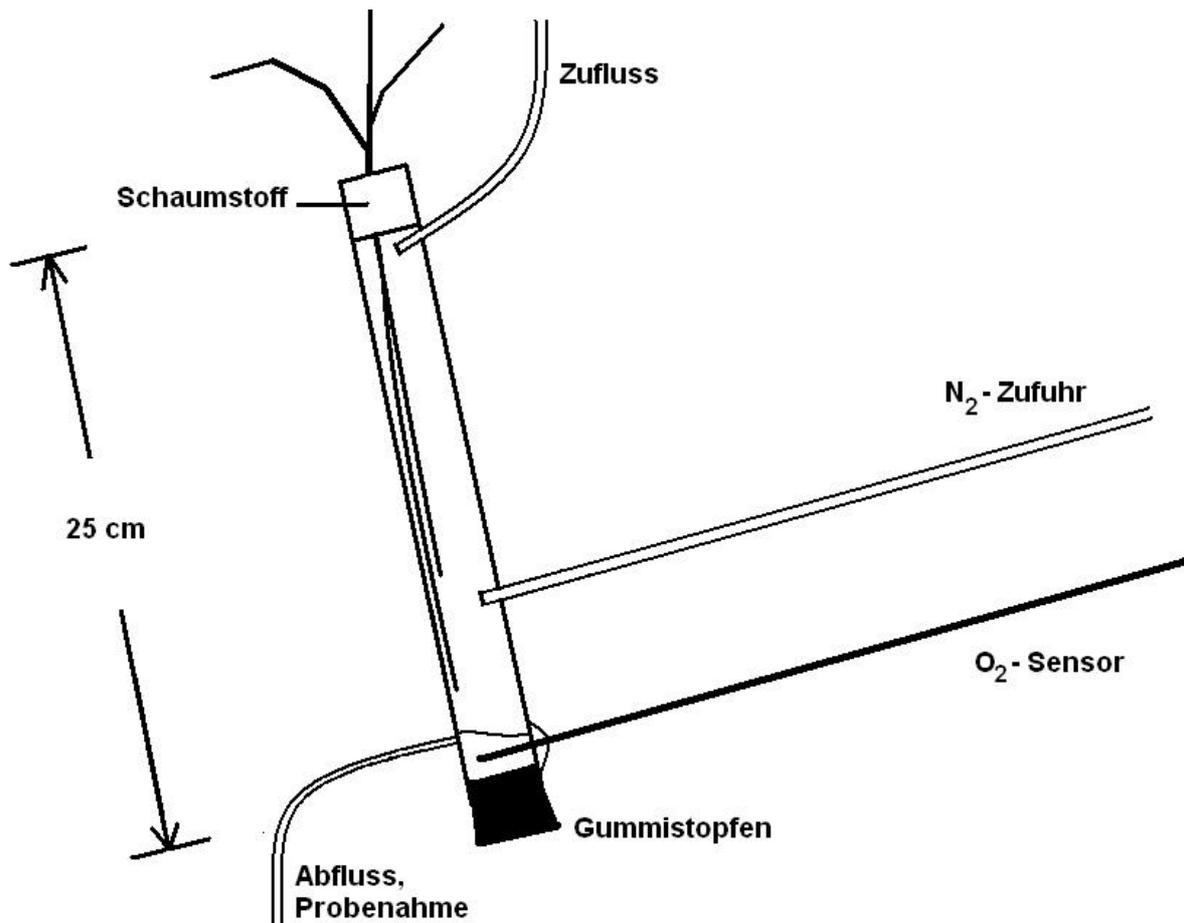


Abb. 3.1: Versuchsaufbau zur Bestimmung der Aufnahmerate von As(III) durch Reis.

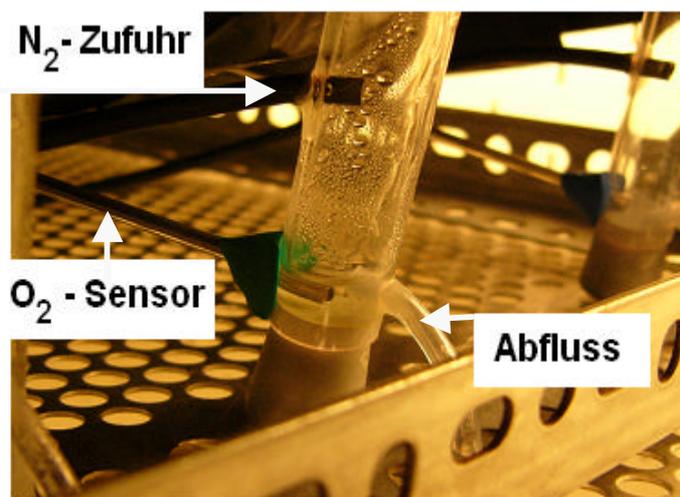


Abb. 3.2: Nährfilmverfahren zur Bestimmung der Aufnahmerate von As(III) durch Reis, unterer Bereich eines Rohres (Foto).

### 3.3 Pflanzenmaterial

#### 3.3.1 Anzucht

Samen der Reissorte 'Selenio' wurden 4-6 Tage bei Raumtemperatur in Leitungswasser zum Keimen gebracht. Die Keimlinge wurden anschließend in Filterpapier gerollt und die Rollen hochkant 6 Tage in Leitungswasser gestellt.

Sämlinge gleicher Spross- und Wurzellänge wurden 8 Tage zu je 12 Pflanzen in schwarze 5l Kunststoff-Töpfe mit unbelüfteter Nährlösung überführt. Hierzu wurden die Pflanzen auf Höhe des Samens in Schaumstoff geklemmt und so auf Kunststoffplatten gelegt, dass die Wurzel vollständig in Nährlösung getaucht war. Pflanzen gleicher Sprosslänge, deren längste Wurzel zwischen 10 und 20 cm lang war, wurden für den Versuch ausgewählt.

#### 3.3.2 Nährlösungen

Die Nährlösungen hatten folgende Zusammensetzung, während der:

- Pflanzenanzucht (Lösung 1), in [mM]:  $\text{KSO}_4$  1,02;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,07;  $\text{NaNO}_3$  2,71;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,097;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,65;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,00 und in [ $\mu\text{M}$ ]:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  35,81;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,82;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,50;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,08;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2,00;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,76.

Die Lösung wurde jeden zweiten Tag gewechselt und mit 0,5 M KOH auf pH 5,8 eingestellt.

- Differenzbehandlung (Lösungen 3): 1 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  und 2  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; pH = 5,6.

Die Lösung wurde zunächst ohne Arsen hergestellt und durch Kochen sauerstoffarm gemacht. Die noch kochende Lösung wurde zusammen mit einem Rührfisch in 5l-Kunststoff-Kanister gefüllt und diese sogleich mit einem Stopfen verschlossen. Die abgekühlte Lösung wies bis zu 2 Tage einen Sauerstoffgehalt um 0 ppm auf.

#### 3.3.3 Kulturbedingungen

Anzucht der Pflanzen in Filterpapier und Nährlösung sowie die Bestimmung der Aufnahmerate von Arsenit erfolgten in derselben Klimakammer (Vötsch Industrietechnik GmbH) bei 25 / 20 °C Tag- / Nachtlufttemperatur (je 12 Stunden) und 70 % relativer Luftfeuchtigkeit. In Bestandeshöhe betrug die PAR-Strahlung in

Pflanzenhöhe während der Anzucht  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) und während der Differenzbehandlung  $170 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ .

#### 3.3.4 Ernte

Die Pflanzen wurden mit destilliertem Wasser gespült, Spross- und Wurzel getrennt und separat bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Wurzeln wurden in geschlossenen Plastikschaalen mit destilliertem Wasser gelagert, um später Wurzelparameter zu bestimmen. Spross und Wurzel wurden hinsichtlich ihrer Frisch- und Trockenmasse untersucht sowie die Gesamtarsengehalte der Pflanzen bestimmt.

Um die Ausgangssituation des Pflanzenwachstums zu charakterisieren, wurden Pflanzen, die nicht dem Nährfilmverfahren zugeführt wurden (Parallelpflanzen) und deren längste Wurzel 10 - 20 cm lang war, geerntet.

#### 3.4 Differenzbehandlung

Die Pflanzen wurden mit destilliertem Wasser abgespült, auf Höhe des Samens mit Schaumstoff umrollt und die Wurzeln in die Rohre gesetzt. Im Nährfilmverfahren wurden die Pflanzen 4 +/- 6 h Tage (exakte Dauer erfasst) mit As(III) in den Konzentrationen 0; 0,334; 0,667; 1,335; 2,669; 5,339; 10,678; 21,356; 32,033 und 42,711  $\mu\text{M}$  versorgt.

Die Konzentrationen wurden aus 3 „Stamm“-Lösungen (Lösungen 2) hergestellt (0,334; 0,667 und 1,335  $\mu\text{M}$  As aus 0,357 mM; 2,669; 5,339 und 10,678  $\mu\text{M}$  As aus 2,856 mM; 21,356; 32,033 und 42,711  $\mu\text{M}$  As aus 11,425 mM). Diese Stammlösungen bestanden nur aus  $\text{NaAsO}_2$ , welches in destilliertem Wasser gelöst und verrührt wurde. Sie wurden für jede Wiederholung neu angesetzt, kühl in gläsernen Erlenmeyerkolben gelagert und der Gasraum im Kolben nach jeder Verwendung mit  $\text{N}_2$  gespült.

Über einen Dreiweghahn wurde dem Kanister (mit auf Raumtemperatur abgekühlter Lösung) mittels einer Spritze Lösung entnommen und verworfen. Eine Spritze wurde dann mit arsenhaltigem Wasser aus einer Stammlösung befüllt, die Luft aus der Spritze gedrückt und die Flüssigkeit über den Dreiweghahn in den Kanister gegeben. Danach wurden 5ml destilliertes Wasser zugegeben, um das Arsen aus Dreiweghahn und Schlauch in den Kanister zu drücken. Das insgesamt zugeführte Volumen entsprach dem zuvor abgenommenen. Mit einem Rührfisch wurde die Lösung im Kanister auf einem Magnetrührer homogenisiert.

#### **3.5 Analytische Verfahren**

##### **3.5.1 Wurzellänge**

Die Wurzeln wurden in destilliertem Wasser bei 800 dpi gescannt (Expression 1600, EPSON) und per Bildanalyseverfahren (WhinRhizo, Régent Instruments Inc.) auf Gesamtwurzellänge RL [cm], Wurzeloberfläche SA [cm<sup>2</sup>], -durchmesser AD [cm] und -volumen V [cm<sup>3</sup>] sowie Anzahl der Wurzelspitzen untersucht. Anschließend wurden die Wurzeln kurz zwischen zwei Lagen Papier getrocknet, gewogen und anschließend bei 70°C getrocknet.

##### **3.5.2 Arsen im Pflanzenmaterial**

Getrocknete ungemahlene Pflanzen wurden mittels Mikrowelle (MLS-ETHOSplus, Mirkowellen Laborsystem MLS-GmbH) aufgeschlossen. Spross und Wurzel jeder Pflanze wurden gemeinsam auf Alufolie eingewogen und in Teflongefäßen mit 2,5 ml H<sub>2</sub>O bidest., 2ml 65%-HNO<sub>3</sub>, und 0,75 ml 30%-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versehen. Die verschlossenen Gefäße wurden in der Mikrowelle 3 min auf 85 °C, 7 min auf 130°C und 25 min auf 190°C erhitzt. Nach Filtern durch Blaubandfilter (Machery-Nagel, MN 640d – Ø 90 mm) wurde der Arsengehalt an der LUFA Nord-West (Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt), Standort Hameln, per ICP-MS gemessen.

##### **3.5.3 Bestimmung der As-Form und -Konzentration**

>20 ml „verbrauchte“ Minimallösung (diejenige Lösung, die die Wurzel passiert und das System über den Abfluss verlassen hat) und Stammlösung je Probe wurde in Falcongefäßen mit 400 µL 80%-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> unter ständiger N<sub>2</sub>-Durchspülung des gasgefüllten Raumes aufgefangen und die Gefäße verschlossen. Die Proben wurden innerhalb eines Tages am Umweltforschungszentrum in Leipzig an einer ELAN 5000 ICP-MS (Perkin Elmer) nach Londesborough et al. (1999) auf ihre As-Form und Konzentration untersucht.

Die As-Konzentration wurde zusätzlich an der LUFA Nord-West in Hameln untersucht. Hierzu wurden 20 ml Probe mit 0,1 ml 80% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> angesäuert, durch Blaubandfilter filtriert und bei 4 °C bis zur Messung (ICP-MS) gelagert.

#### 3.5.4 O<sub>2</sub>

Der O<sub>2</sub>-Gehalt der Nährlösung wurde im Versuch sporadisch in der sich im Rohr anstauenden Lösung über einen POF-Sensor (Polymer Optical Fiber) mit Fibox3 (Fiber-Optic Oxygen Meter) nach Huber und Krause (2004) mit dem Programm Oxyview PST3-V5.32 gemessen.

#### 3.5.5 pH

Der pH-Wert wurde mit einem Potentiometer (Microprocessor pH-Meter, WTW pH 196) gemessen.

#### 3.5.6 Nährstoffgehalt der Nährlösung

Die Zusammensetzung der Nährlösung wurde am ICP (Spectroflame EOP, Spectroflame Analytical Instr., Kleve) überprüft.

#### 3.6 Ermittlung der As(III)-Kinetik

Aus der Differenz der As-Gehalte vor (U<sub>1</sub>) und nach (U<sub>2</sub>) der Arsenbehandlung, der Zeitspanne und dem Wachstum kann die Aufnahmerate berechnet werden (Williams 1946):

$$I_n = (U_2 - U_1) (\ln L_2 - \ln L_1) / [(RL_2 - RL_1) * t] \quad (1)$$

$I_n$  = As-Aufnahmerate [pmol cm<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>]

$U_{1,2}$  = As-Gehalt [pmol Pflanze<sup>-1</sup>] in Ernte 1 und 2

$L_{1,2}$  = Wurzellänge [cm Pflanze<sup>-1</sup>] in Ernte 1 und 2

$t$  = Dauer der As-Behandlung [h]

Es zeigte sich, dass die Pflanzen nach 4 Tagen nicht messbar gewachsen waren, so dass  $L_2$  nicht verschieden von  $L_1$  war. Deshalb wurde Gleichung 1 vereinfacht:

$$I_n = (U_2 - U_1) / (RL_2 * t) \quad (2)$$

Die Aufnahmerate wurde durch Regression mit einer Geraden und einer Michaelis-Menten-Funktion verglichen

Mit der Michaelis-Menten-Funktion wurden die Parameter  $I_{\max}$  und  $K_m$  geschätzt.  $C_{\min}$  entspricht dem Schnittpunkt mit der x-Achse, in dem Influx-Efflux = 0 ist.

#### **3.7 Statistische Verfahren**

Arsenit wurde 10 Pflanzen in 10 unterschiedlichen Konzentrationen angeboten (=10 Varianten). Dies wurde zeitlich versetzt 6 mal wiederholt (=6 Wiederholungen).

Die Verteilung der Messergebnisse wurde mittels Boxplot erfasst und Ausreißer aus der Berechnung für die Aufnahme rate entfernt. Regressionen zur As(III)-Aufnahme rate wurden mit SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc.) erstellt und das Pflanzenwachstum mit R 2.2.1 mittels einseitigem Welch-Test ( $\alpha = 0,05$ , p-Werte nach Hochberg adjustiert) auf signifikante Unterschiede zur Kontrolle getestet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Überprüfung der Versuchsbedingungen

Um ein As-Angebot in Form von As(III) zu gewährleisten, musste eine Oxidation desselben ausgeschlossen werden. Daher wurden As-Form und Sauerstoffgehalt der Lösung bestimmt.

As(III) war in den Lösungen stabil, denn das zugegebene As wurde größtenteils als As(III) wiedergefunden und eine Oxidation zu As(V) kann man vernachlässigen. So wurde in destilliertem Wasser gelöstes NaAsO<sub>2</sub> (Lösungen 2) nach 4 Tagen zu 96,1 ± 2,8 % als As(III) und 0% als As(V) wiedergefunden. Auch aus dieser Lösung (Lösungen 2) hergestellte und am 4. Tag der Wiederholung applizierte Lösung mit CaCl<sub>2</sub> und H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Lösungen 3) bestanden nach Passieren der Wurzel größtenteils aus As(III). Der As(V)-Anteil am Gesamtarsen war auch hier sehr gering. Der Anteil der jeweiligen As-Form am Gesamtarsen ist beispielhaft in Abb. 4.1 dargestellt.

Ein Teil des As wurde weder als As(III) noch As(V), sondern in nicht eindeutig identifizierbaren As-Formen wiedergefunden (Abb. 4.1). Diese As-Formen könnten organisches As oder As-S-Komplexe sein und sind auf die Analyse zurückzuführen. Ihre Konzentration war nämlich über alle Behandlungen mit Ausnahme der drei höchsten Behandlungsstufen in etwa gleich und unterschied sich nicht von der Konzentration, welche auch in der 0 µM As-Behandlung gefunden wurde (Abb. 4.2). Ihr Anteil am Gesamtarsen ist daher bei geringen Konzentrationen des As-Angebotes hoch und bei hohen Konzentrationen niedrig (Abb. 4.1).

Eine Oxidation von As(III) zu As(V) an der Wurzeloberfläche ist auch deshalb auszuschließen, weil die Konzentration der jeweiligen As-Form in der Lösung vor und nach Passieren der Wurzel gleich war.

Die Sauerstoffkonzentration hingegen stieg in der Lösung von 0 ppm (nach Kochen und Abkühlen der Lösung) auf maximal 3 ppm (einen Tag später und nach Passieren der Wurzel) an (Wassertemperatur = 20 - 24 °C). Allerdings ist wiederum aufgrund der hohen Durchflussrate eine Oxidation an der Wurzeloberfläche durch O<sub>2</sub>-Abgabe von der Wurzel unwahrscheinlich. Dies stimmt auch mit Folgendem überein:

Die im Versuch verwendete Lösung (Lösungen 3) enthielt weder Fe noch Mn, da vermutet wurde, dass es durch diese zu einer Oxidation von As(III) kommt. Dies wurde durch zusätzliche Versuche bestätigt. In einer Fe- und Mn-haltigen,

#### 4. Ergebnisse

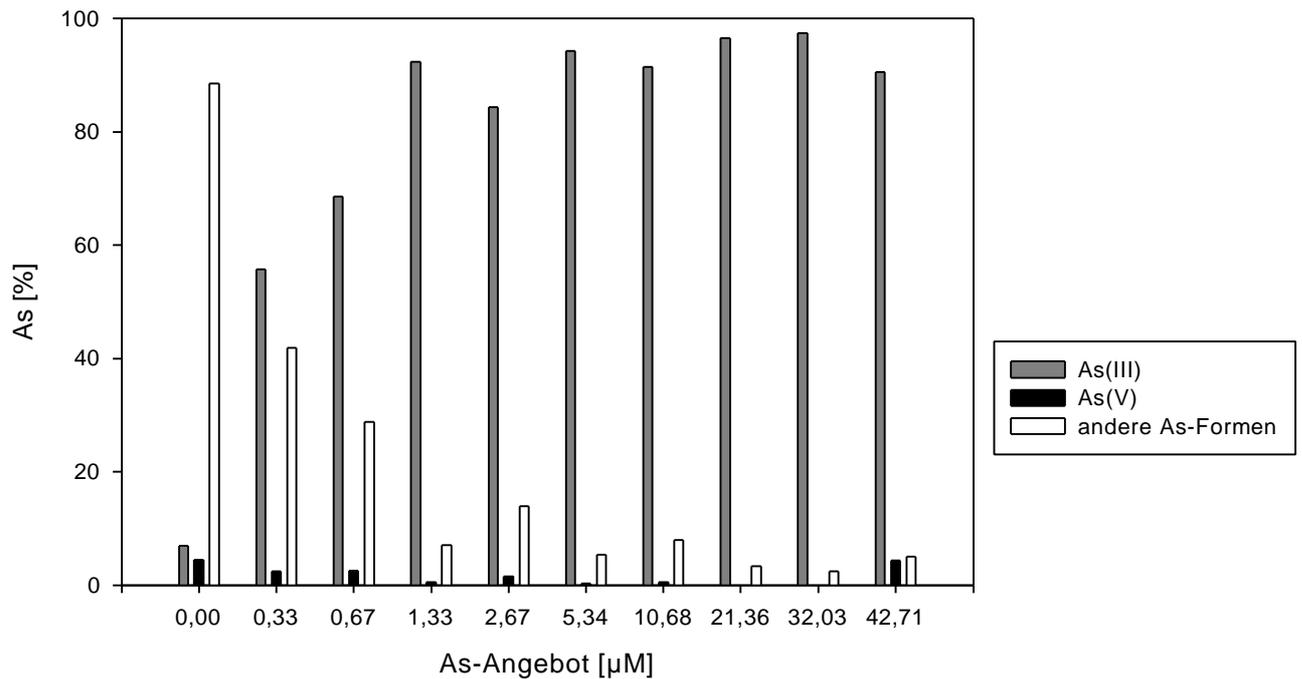


Abb. 4.1: Anteil von As-Formen am Gesamtarsen in der Lösung nach Passieren der Wurzel; As-Applikation am 4. Tag der Wiederholung.

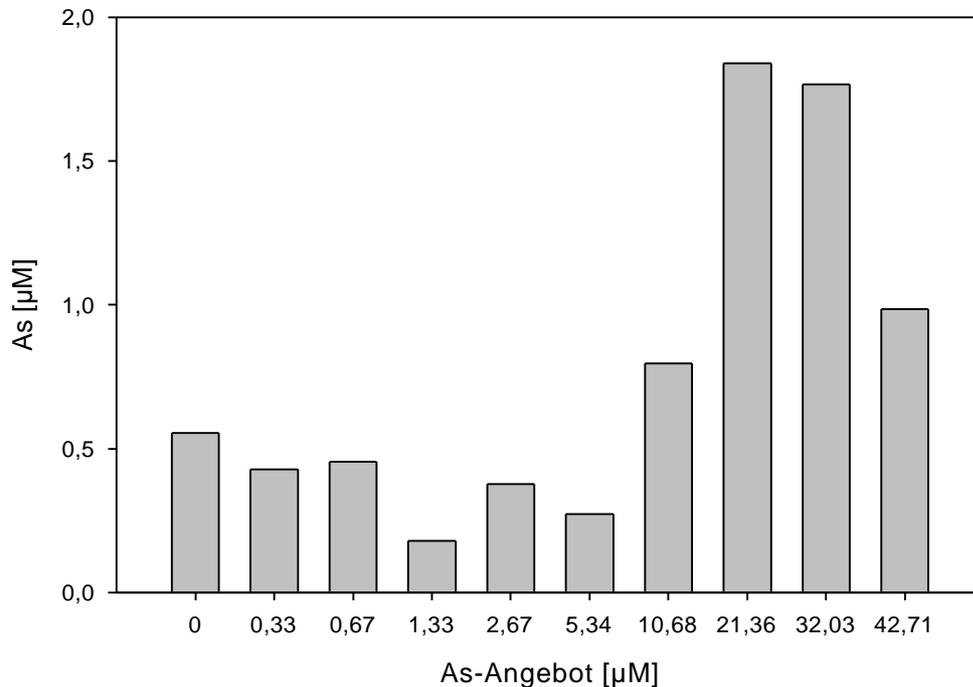


Abb. 4.2: Konzentration nicht bestimmbarer As-Formen in der Lösung nach Passieren der Wurzel; As-Applikation am 4. Tag der Wiederholung.

sauerstofffreien und 1:3 verdünnten Lösung gleicher Zusammensetzung der Nährstoffe wie in der Pflanzenanzucht (Lösung 1; 3.1.1) wiesen Proben, die 5 Minuten nach Einstellen einer Konzentration von 6,7  $\mu\text{M}$  As genommen wurden, As-Anteile von 55,7 % As(III) und 21 % As(V) am Gesamtarsen auf. Ein Vergleich mit der im Versuch verwendeten Lösung [Lösungen 3, < 3% As(V) nach 24 h] lässt darauf schließen, dass eine anorganische Oxidation vorwiegend durch Fe oder Mn abläuft und nur langsam durch  $\text{O}_2$ .

Es ist also möglich, durch eine sauerstoffarme „Minimal“-Lösung (Lösungen 3) eine As(III)-Applikation durchzuführen.

### 4.2 Pflanzenanalyse

#### 4.2.1 As in der Pflanze und im „Lagerwasser“

Die Pflanzen-TS enthielt zu Versuchsbeginn, als die Pflanzen aus der As-freien Anzucht kamen, kein Arsen. Auch nach 4 Tagen war der Wert in der Variante ohne As-Applikation unverändert, wie es zu erwarten war. Die As-Konzentration in der Pflanzen-TS stieg mit dem As(III)-Angebot und lag bei allen Behandlungsstufen deutlich über der Nachweisgrenze von  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  (Abb. 4.3.).

Eine As-Aufnahme lässt sich also durch Differenzbehandlung nachweisen, um später aus der aufgenommenen As-Menge je Angebotskonzentration die Aufnahmerate zu berechnen.

Nach der 4-tägigen As-Applikation wurden die Wurzeln in destilliertem Wasser gelagert. Da die Möglichkeit bestand, dass in die Wurzel aufgenommenes (symplastisches) As ausgeschwemmt werden könnte, wurde dieses „Lagerwasser“ auf As untersucht.

Tatsächlich wurde As in diesem Wasser gefunden, wobei dieses aber wie folgt aus dem Apoplasten stammt. Die As-Menge im Lagerwasser stieg, wie in der TS (s.o.), ebenfalls mit dem As(III)-Angebot (Abb. 4.4). Allerdings war der relative Anteil im Lagerwasser bei niedrigem As-Angebot deutlich geringer als bei den höheren As-Stufen. Bis zu der höchsten As-Stufe nahm der relative Anteil mit dem As-Angebot zu. Die im Lagerwasser gemessene As-Menge ist daher auf den Apoplasten zurückzuführen, weil die Pflanzen As nur bis zu einer bestimmten Menge aufnahmen, die Konzentration im Apoplasten aber weiter mit der Außenkonzentration stieg. Dieses apoplastische As wurde bei der Lagerung in das Wasser abgegeben.

## 4. Ergebnisse

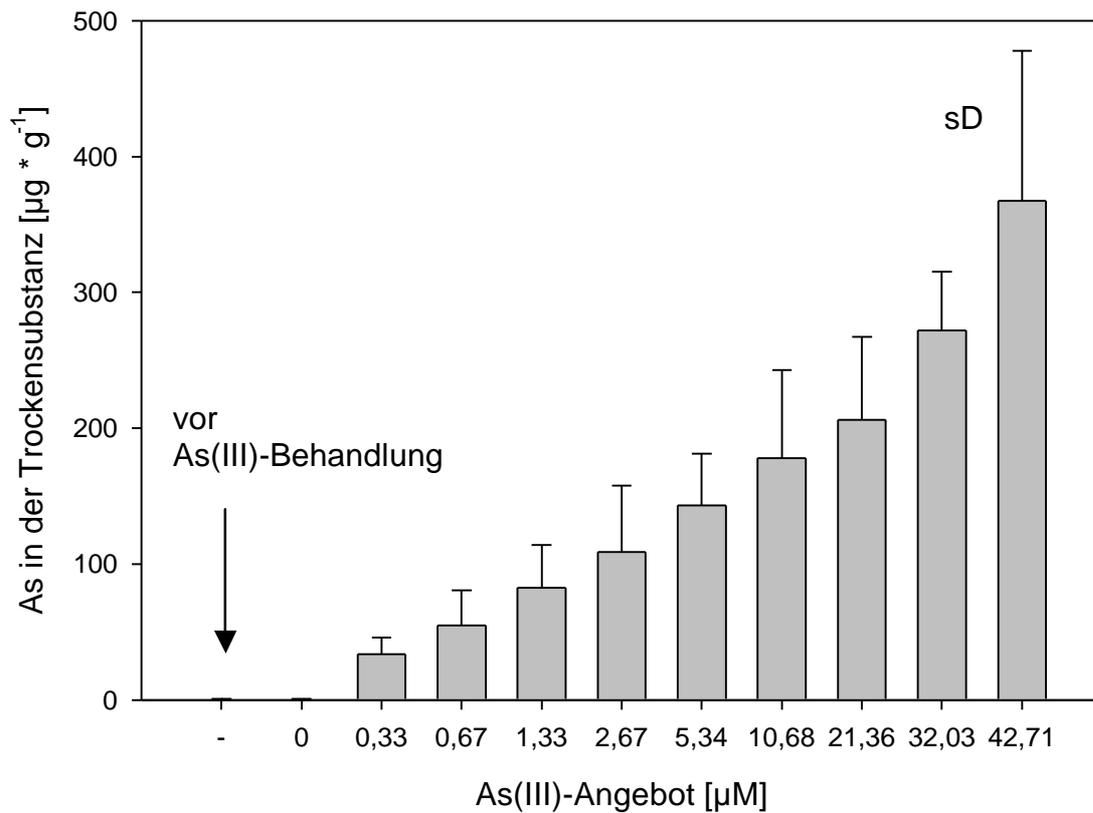


Abb. 4.3: As-Konzentration in der Trockensubstanz bei variiertem As(III)-Angebot vor (-) und nach 4-tägiger As(III)-Behandlung.

Die As-Menge im Lagerwasser war dabei unabhängig von der Lagerdauer, wie aus Abb. 4.5 hervorgeht. Über den gesamten Konzentrationsbereich wurde bei einer Lagerung über 3 h nicht mehr As abgegeben als bei einer Lagerung unter 3 h.

#### 4. Ergebnisse

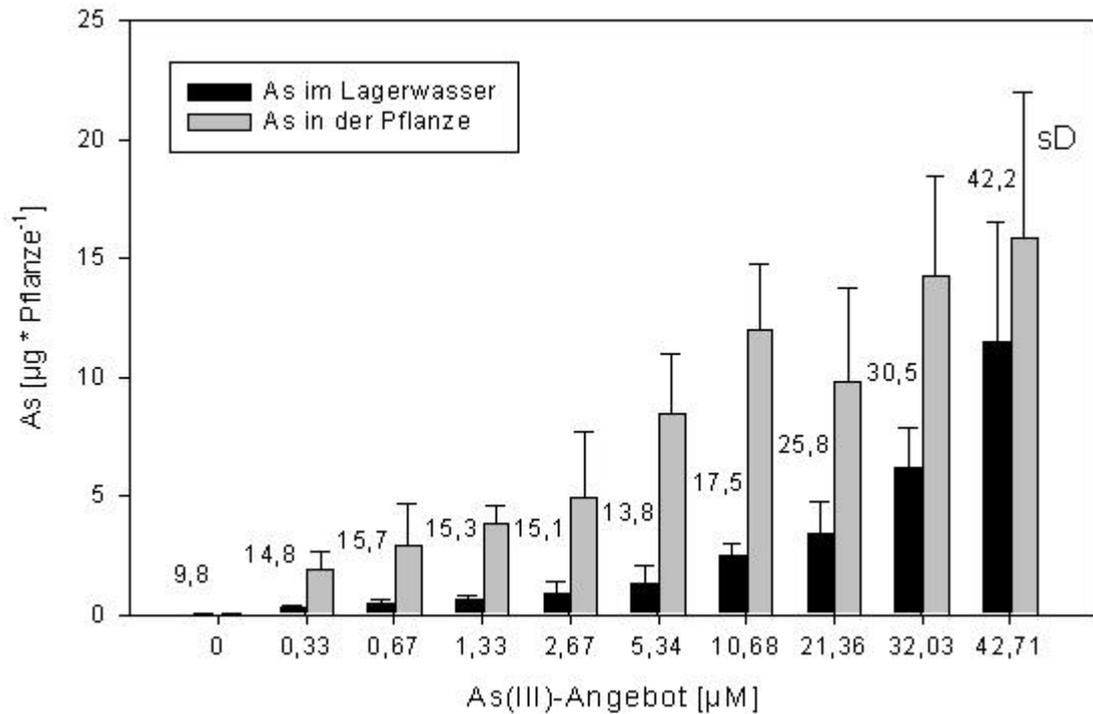


Abb. 4.4: As-Menge in der Pflanze und im Wasser, in dem die Wurzeln gelagert wurden. Zahlen über den schwarzen Säulen bezeichnen den prozentualen Anteil des As im Lagerwasser am Gesamtarsen aus Lagerwasser und Pflanzen-TS.

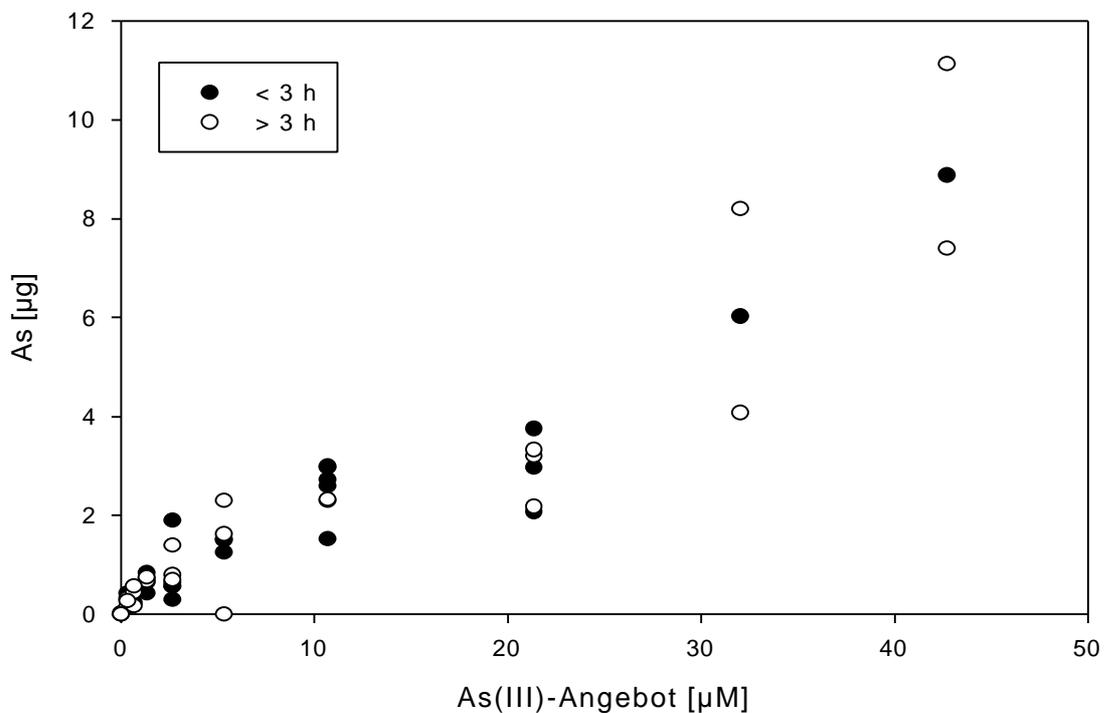


Abb. 4.5: Von den Wurzeln in das Lagerwasser abgegebene As-Menge bei unterschiedlicher Dauer der Lagerung.

### 4.2.2 Einfluss von As(III) auf das Wachstum

Das Wachstum war bei höheren Konzentrationen beeinträchtigt. Zu Versuchsbeginn hatten die Pflanzen eine FM von ca. 200 mg. In 4 Tagen As(III)-Behandlung nahm die FM im Mittel zu, wobei mit steigendem As-Angebot eine Tendenz zu geringerer Frischmassebildung bestand (Abb. 4.6). So zeigten Pflanzen der Behandlungsstufen = 21,36  $\mu\text{M}$  As(III) deutliche Welkesymptome und wuchsen im Vergleich zur Kontrolle signifikant weniger. Während es bei 21,36  $\mu\text{M}$  As(III) nur zu einem leichten Einrollen der Blätter kam, war dies bei 32,03  $\mu\text{M}$  As(III) stärker ausgeprägt. Bei den mit 42,71  $\mu\text{M}$  As(III) behandelten Pflanzen rollten sich die Blätter innerhalb von 3h nach Versuchsbeginn vollständig zusammen. Pflanzen dieser Behandlungsstufe starben in 50% der Wiederholungen ab.

Weiter war das Wachstum nur bedingt messbar. Da der Ausgangswert des Wachstums (vor As-Behandlung) anhand von parallel geernteten Pflanzen bestimmt wurde, lagen einzelne Pflanzen - bedingt durch natürliche Streuung - noch nach 4 Tagen As(III)-Behandlung im Bereich des Ausgangswertes. So konnte z.B. ein Wachstum in der Gesamtwurzellänge nicht genau bestimmt werden (Abb. 4.7). Daher bezieht sich die Aufnahmerate im Folgenden nur auf die Gesamtwurzellänge gegen Versuchsende.

#### 4. Ergebnisse

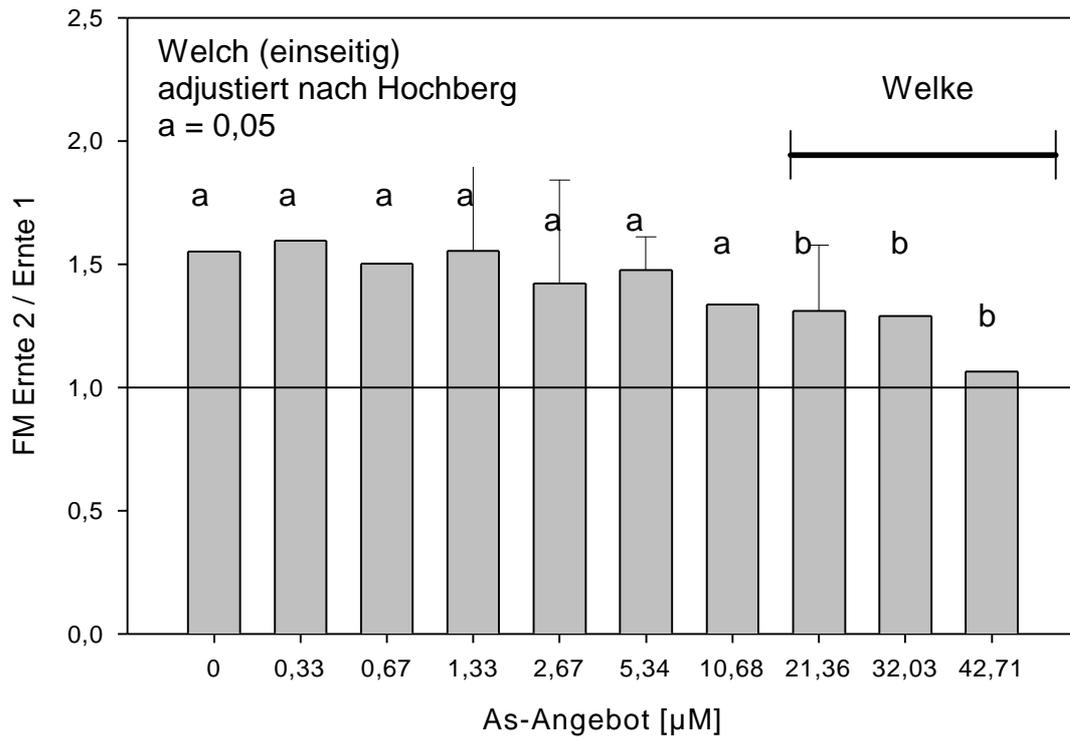


Abb.4.6: FM-Wachstum in 4 Tagen in Abhängigkeit der As(III)-Behandlung. Statistische Auswertung aller Behandlungsstufen gegen die Kontrolle. (Unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle).

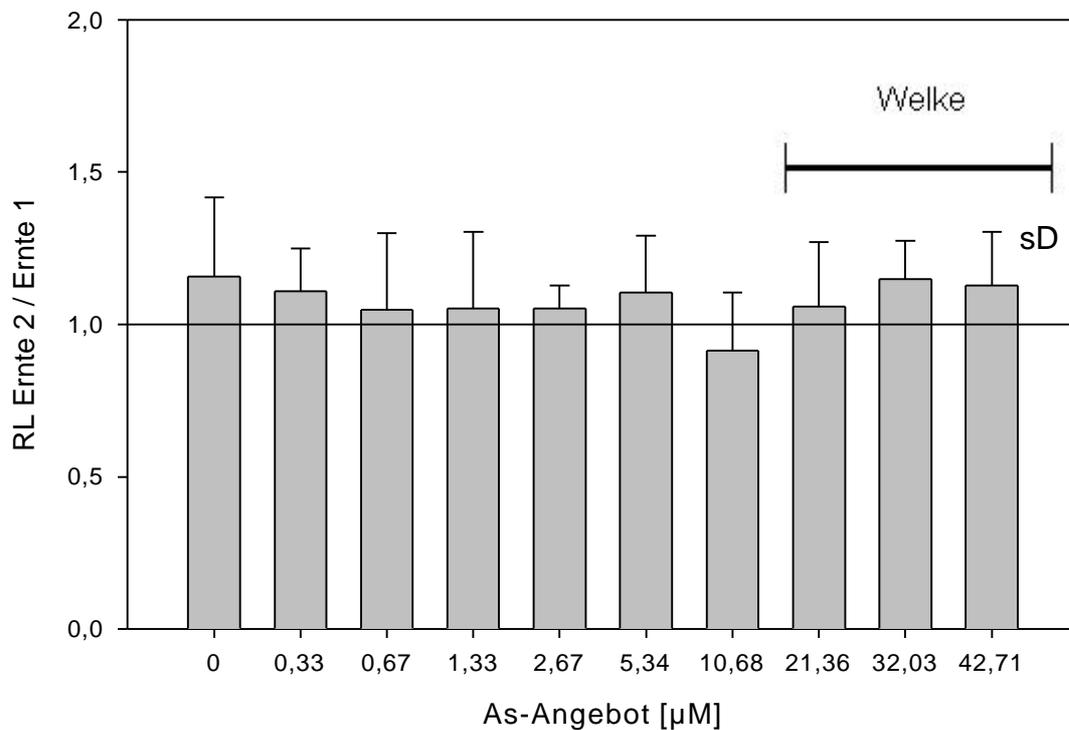


Abb.4.7: Wurzellängenwachstum in 4 Tagen in Abhängigkeit der As(III)-Behandlung.

### 4.2.3 Ermittlung der As(III)-Aufnahme

Die As(III)-Aufnahme steigt mit dem As(III)-Angebot und zeigt hierbei deutlich den Verlauf einer Sättigungsfunktion. So ist bei niedrigen Konzentrationen eine lineare Steigerung in der Aufnahme rate  $[\text{pmol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$  zu verzeichnen, wohingegen diese mit höheren Konzentrationen vergleichsweise weniger zunimmt und als Kurve abflacht (Abb. 4.8). Ein gleiches Bild zeichnet sich auch bezüglich der Aufnahme rate bezogen auf die FM ab (Abb. 7.1).

Allerdings wird über den ganzen Konzentrationsbereich gesehen nicht ersichtlich, ob sich die Aufnahme asymptotisch einem maximalen Wert nähert oder wieder linear ansteigt. Da aber ab  $21,36 \mu\text{M}$  As(III) Anzeichen von Toxizität auftraten (s.o.), wurde ein Vergleich der Messwerte durch Regression über die Behandlungsstufen 0 bis  $10,68 \mu\text{M}$  As(III) vorgenommen. In diesem Bereich beschreibt eine Michaelis-Menten-Funktion die Aufnahme besser als eine lineare Funktion (Abb. 4.9). Die Parameter  $K_m$  und  $I_{\max}$  einer Michaelis-Menten-Kinetik lagen bei  $3,2 \mu\text{M}$  und  $4,3 \text{ pmol cm}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Abb. 4.8, 4.9).

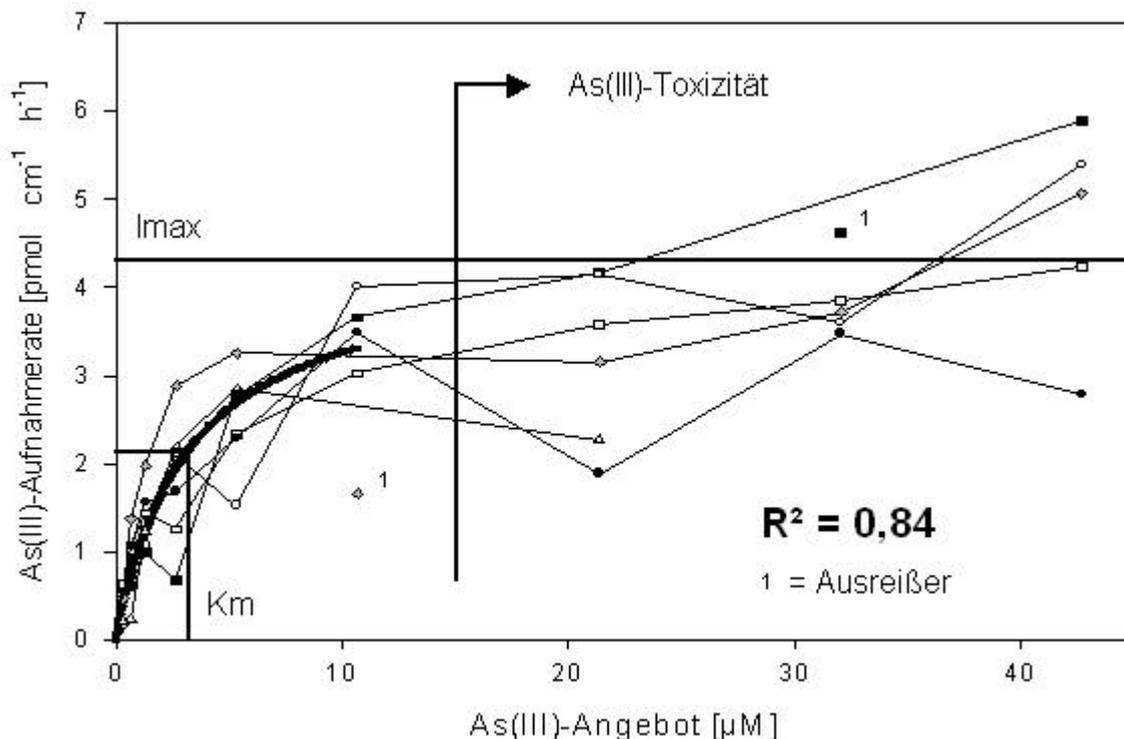


Abb. 4.8: As(III)-Aufnahmerate bezogen auf die Wurzellänge, Regression mit einer Michaelis-Menten-Funktion.

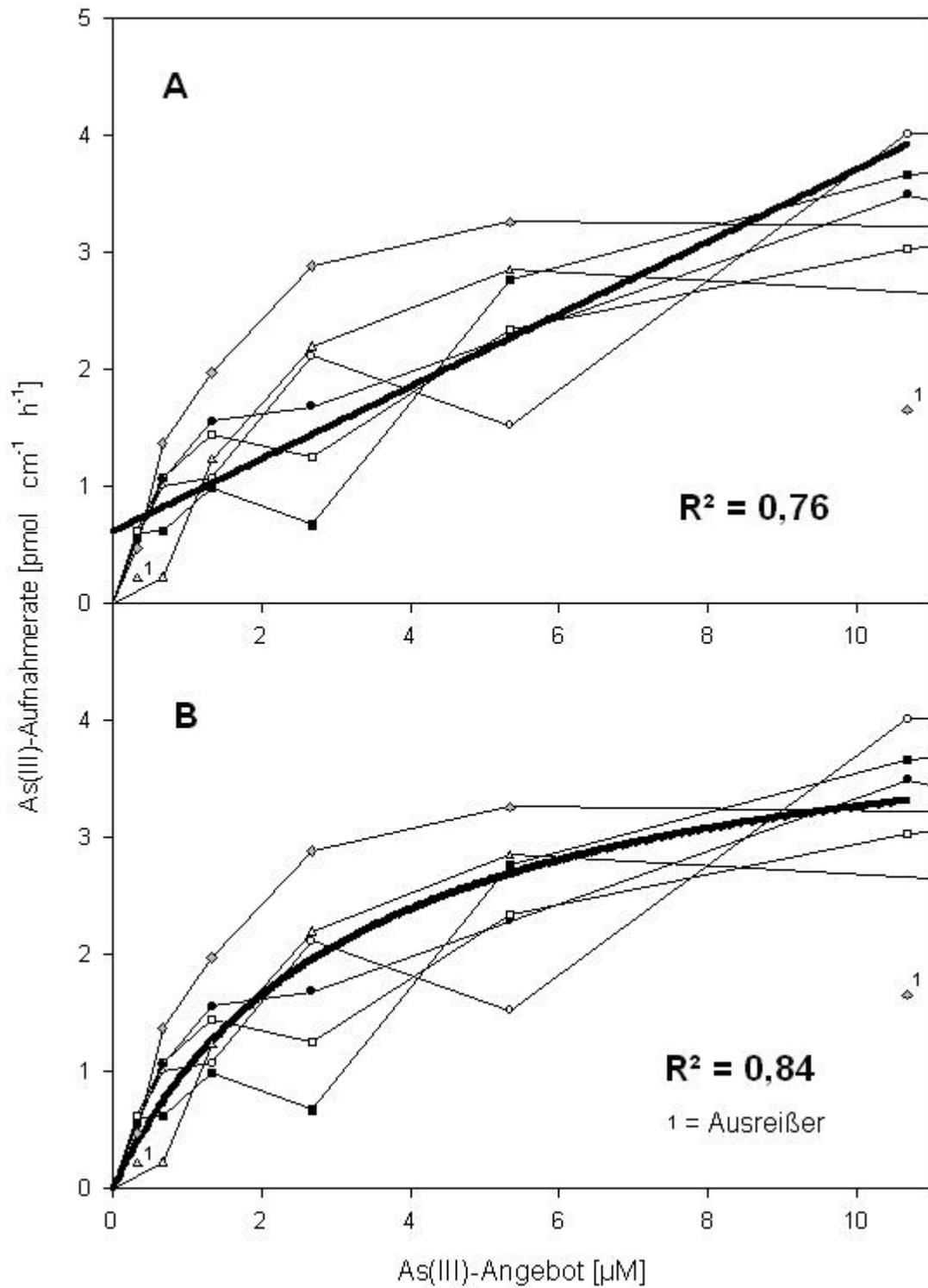


Abb. 4.9: Einfluss der As(III)-Konzentration auf die As(III)-Aufnahmerate. Regression mit einer Geraden (A) und einer Michaelis-Menten-Funktion (B).

## 5. Diskussion

### 5.1 Versuchsmethodik

Um die As(III)-Aufnahmerate zu untersuchen wurde ein Nährfilmverfahren entworfen, durch das intakten Pflanzen über mehrere Tage ein stabiles As(III)-Angebot bei niedriger O<sub>2</sub>-Konzentration in der Lösung angeboten werden sollte. Dies implizierte auch den Abtransport von durch die Wurzel abgegebenem O<sub>2</sub> sowie eventuell oxidierten As-Formen. Diese Ziele wurden erreicht wie z.B. der hohe Anteil As(III) (Abb. 4.1) am Gesamtarsen sowie niedrige As(V)- und O<sub>2</sub>-Konzentration in der Lösung zeigten. Eine Unterbindung der As(III)-Oxidation ist neben der geringen O<sub>2</sub>-Konzentration in der Lösung (vor Passieren der Wurzel) vor allem auf die hohe Durchflussrate und die Abwesenheit von Fe und Mn in der Lösung zurückzuführen. Die verwendete Methode zur Untersuchung der Aufnahmekinetik weicht hierbei von anderen bekannten Verfahren ab. Vor- und Nachteile des gewählten Verfahrens sowie Unterschiede zu anderen Methoden, die unter Umständen die Vergleichbarkeit der Ergebnisse betreffen, werden im Folgenden besprochen. As(III)-Aufnahmekinetiken wurden bei Reis bisher nur an abgeschnittenen Wurzeln im Kurzzeitversuch untersucht. Fehlt aber der Spross, so sind Transport- und Signalwege zwischen diesem und der Wurzel unterbunden. So kann weder As verlagert noch die Wurzel mit Assimilaten versorgt werden. Ebenso wenig lässt sich eine Toxizität bezüglich des Wachstums feststellen. Da im vorliegenden Versuch intakte Pflanzen über 4 Tage untersucht wurden, unterscheiden sich beide Verfahren im physiologischen Ausgangs- und Endzustand der Pflanze. Dies kann sich auf die Aufnahmeparameter  $I_{\max}$  und  $K_m$  auswirken. Denn behandelt man Pflanzen über längere Zeit mit einem Nährstoff, so stellt sich ein physiologisches Gleichgewicht („steady-state“) ein und die Aufnahmeparameter  $I_{\max}$  und  $K_m$  können deutlich niedriger liegen als im Kurzzeitversuch (Mullins & Edwards 1989), da sich die Pflanze an die Extreme des Konzentrationsbereiches anpassen konnte (Nye & Tinker 2000). Zwar ist As kein Nährstoff, doch auch hier kann sich ein physiologisches Gleichgewicht einstellen, weil die Pflanze ihren Stoffwechsel auf das As einstellt und möglicherweise die Aufnahme reguliert. Die Unterschiede in  $I_{\max}$  sind dann auf eine unterschiedliche Anzahl von Transportern in der Membran, aber in  $K_m$  auf strukturelle Unterschiede der Transporter oder der Transporterart zurückzuführen (Nye & Tinker 2000). Außerdem können Unterschiede in den Aufnahmeparametern zwischen Kurz-

und Langzeitversuchen dadurch entstehen, dass As toxisch ist und die Toxizität auch von der aufgenommenen Menge und diese von der Applikationszeit abhängt. Die in beiden Verfahren gewonnenen Aufnahmeparameter sind also nur bedingt vergleichbar.

Weiter entstanden durch den gewählten Versuchsansatz folgende Vorteile:

- Die Aufnahme ist bei sehr niedrigen Konzentrationen messbar (As tritt meist nur in  $\mu$ -molaren Konzentrationen auf).
- Die Lösung ist nahezu frei von Mikroorganismen (abgekocht) und Mikroorganismen an der Wurzeloberfläche erhalten außer  $\text{NaAsO}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{H}_3\text{BO}_3$  keine Nährstoffe.

Die Nachteile der Methode liegen in dem hohen technischen Aufwand bei geringerer Fallzahl. Anzumerken ist, dass die erstellte Aufnahmekinetik keine Michaelis-Menten-Kinetik ist, sondern nur durch diese beschrieben wird, da alle Pflanzen nach der As-Applikation physiologisch verschieden sind.

Weiter ist unklar, an welcher Stelle der Wurzel die Aufnahme vorwiegend stattfindet. Daher ist bei einer Übertragung der Aufnahmeparameter auf das ganze Wurzelsystem zu beachten, dass diese in einzelnen Wurzelsegmenten verschieden sein können.

### 5.2 As(III)-Toxizität

Toxizität wurde in den Behandlungsstufen = 21,36  $\mu\text{M}$  As(III) sichtbar, da die Pflanzen ab dieser Konzentration welkten und deshalb eine geringere FM aufwiesen. Die Ausprägung der Symptome stieg mit der As(III)-Konzentration an und trat bei 42,71  $\mu\text{M}$  As(III) bereits innerhalb von 3 Stunden ein. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Dubey und Jha (2004), die nach 5 Tagen As(III)-Applikation ein gehemmtes Wachstum ab 25  $\mu\text{M}$  As(III) feststellten. In ihrem Versuch konnte allerdings eine Oxidation nicht ausgeschlossen werden, da eine Hoagland-Nährlösung bei Pflanzen in offenen Töpfen verwendet und die As(III)-Form nicht bestimmt wurde. Eine Oxidation zu As(V) kann aber die Aufnahme vermindern, da As(V) an der Wurzeloberfläche an Fe-Oxide sorbiert (Grafe et al. 2001, Goldberg 2002, Kinniburgh & Cooper 2004) und/oder mit diesen ausfällt (Pierce & Moore 1982, Takamatsu et al. 1985, Agget & Kriegman 1988). Tatsächlich war bei Dubey & Jha (2004) der As-Gehalt in der Pflanze deutlich niedriger (0,2  $\mu\text{mol g}^{-1}$  TS nach 20 Tagen bei 25  $\mu\text{M}$  As(III)-Angebot) als im vorliegenden Versuch (2,5  $\mu\text{mol g}^{-1}$  TS nach

4 Tagen bei 21,26  $\mu\text{M}$  As(III)-Angebot). Dies zeigt, dass die Toxizitätsschwelle niedriger liegen könnte. In der Tat fanden Masscheleyn et al. (1992) nach 4 Wochen in Nährlösung, die jeden zweiten Tag gewechselt und die auf As-Formen überprüft und für stabil befunden wurde, dass das Wachstum bereits bei 10,68  $\mu\text{M}$  As(III) deutlich beeinträchtigt war. Im vorliegenden Versuch konnten äußere Symptome zwar erst ab 21,26  $\mu\text{M}$  As(III) festgestellt werden, aus dem Verlauf der Kurve (Abb. 4.6) wurde aber erkennbar, dass das Wachstum bereits bei 10,68  $\mu\text{M}$  As(III) eingeschränkt ist - ähnlich dem bei 21,26  $\mu\text{M}$  As(III). Somit ist eine Toxizitätsgrenze eher im Bereich um 10,68  $\mu\text{M}$  As(III) zu erwarten.

### 5.3 As(III)-Aufnahmecharakteristika

Die As(III)-Aufnahmerate folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 4.8, 4.9, 7.1, 7.2). Hierbei ist die maximale Aufnahmerate  $I_{\text{max}}$  abhängig von der Bezugsgröße und variiert mit dieser, während der  $K_m$ -Wert bezogen auf unterschiedliche Bezugsgrößen in etwa gleich bleiben sollte, da er die Affinität des Aufnahmesystems beschreibt. Im Versuch ergaben sich  $I_{\text{max}}$ -Werte von 4,3  $\text{pmol cm}^{-1} \text{h}^{-1}$  bzw. 20,8  $\text{nmol g}^{-1} \text{FM h}^{-1}$  und  $K_m$ -Werte von 3,2 (bezogen auf die Wurzellänge) und 3,8  $\mu\text{M}$  (bezogen auf die Frischmasse der Wurzel). Diese Werte unterscheiden sich zum Teil deutlich von Literaturwerten. So geben Abedin et al. (2002c) aus einem Kurzzeitversuch (20min) über den Konzentrationsbereich 0 - 53,2  $\mu\text{M}$  As(III)  $I_{\text{max}}$  für die Sorten Aman und Boro mit 175,0 und 120,3  $\text{nmol g}^{-1} \text{FM h}^{-1}$  und  $K_m$  mit 22,9 (Aman) und 15,5 (Boro)  $\mu\text{M}$  As(III) an. Nach der gleichen Methode erhielten Meharg & Jardine (2003) noch höhere Werte mit  $I_{\text{max}} = 399 \text{ nmol g}^{-1} \text{FM Wurzel h}^{-1}$  und  $K_m = 180 \mu\text{M}$  As(III). Diese Werte liegen um den Faktor 6 und mehr höher als im vorliegenden Versuch. In einem weiteren Versuch aber fanden Abedin et al. (2002c)  $I_{\text{max}} = 88,8 \text{ nmol g}^{-1} \text{FM h}^{-1}$  und  $K_m = 3,9 \mu\text{M}$  As(III). Hier unterscheiden sich die  $I_{\text{max}}$ -Werte deutlich vom vorliegenden Versuch, während die  $K_m$ -Werte fast identisch sind. Diese Unterschiede bleiben auch bei Betrachtung einer anderen Bezugsgröße bestehen. So wurde in Bezug auf die TS im vorliegenden Versuch  $I_{\text{max}} = 31,8 \text{ nmol g}^{-1} \text{TS h}^{-1}$  und  $K_m = 2,5 \mu\text{M}$  As(III) ermittelt (Abb. 7.2), während Meharg et al. (2005c)  $I_{\text{max}}$  mit 2322  $\text{nmol g}^{-1} \text{TS h}^{-1}$ , und  $K_m = 3,7 \mu\text{M}$  As(III) angeben. Wiederum liegt  $I_{\text{max}}$  im Kurzzeitversuch deutlich höher, während die  $K_m$ -Werte sich ähneln. Letzteres stimmt damit überein, dass  $K_m$ -Werte sich unabhängig von  $I_{\text{max}}$  und Bezugsgröße gleichen müssten. Hingegen können Unterschiede in  $K_m$ -Werten zum Teil auch darauf beruhen, dass Meharg et al.

(2005c)  $K_m$  für einen Konzentrationsbereich schätzten, in dem sie keine Messungen vornahmen.

Unterschiede in  $I_{max}$  sind hauptsächlich auf die verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Aufnahmekinetik zurückzuführen. Abedin, Jardine, Meharg et al. führten Kurzzeitversuche mit abgeschnittenen Wurzeln durch. Hierbei erstellten sie As(III)-Aufnahmekinetiken im Konzentrationsbereich bis  $> 50 \mu\text{M As(III)}$  (s.o.). Dies bedeutet erstens, dass die angegebenen Aufnahmeparameter aus Messungen im sichtbar toxischen Bereich [ $>21,36 \mu\text{M As(III)}$ ] stammen. Hier aber können Aufnahmekanäle und / oder Plasmamembran beschädigt sein und die Aufnahme nicht mehr reguliert bzw. verhindert werden, wodurch  $I_{max}$  höher ausfallen kann. Zweitens kann As aus dem Apoplasten die Versuchsergebnisse verfälschen. Bei der Ernte der Pflanzen liegt As sowohl im Symplasten als auch im Apoplasten vor, aber nur das symplastische As gilt als aufgenommen. Wird As bei der Ernte nicht vollständig aus dem Apoplasten entfernt, kommt es zu einer Überschätzung von  $I_{max}$ . In ihren Versuchen haben Meharg & Jardine (2003) die Wurzeln mit destilliertem Wasser oder mit einer Lösung aus  $1 \text{ mM K}_2\text{HPO}_4$ ,  $0,5 \text{ mM Ca(NO}_3)_2$  und  $5 \text{ mM MES}$  (Abedin et al. 2002) kurz abgespült. Es ist allerdings fraglich, ob kurzes Abspülen alles As aus dem sog. Outer oder Water Free Space entfernt. Im vorliegenden Versuch wurden die Wurzeln ebenfalls mit destilliertem Wasser gespült und es konnte gezeigt werden, dass später dennoch As aus dem Apoplasten abgegeben wurde (Abb. 4.4 und 4.5). Die abgegebene As-Menge war hierbei von der Angebotskonzentration abhängig, denn As aus der Lösung konnte zuvor frei in den sog. Outer oder Water Free Space diffundieren (s.a. Epstein 1960). Hieraus ergeben sich 2 Schlüsse:

a) Die aufgenommene As-Menge hängt von der As-Applikationszeit ab. Der absolute Fehler durch As im Apoplasten ist immer gleich, da diese vom Wurzelvolumen und der As-Konzentration in der Lösung abhängt. Bei Kurzzeitversuchen führt dies dazu, dass die aufgenommene As-Menge überschätzt wird, da vergleichsweise viel As aus dem Apoplasten als aufgenommen betrachtet wird.

b) Bei hohen As-Konzentrationen in der Lösung ist der Fehler größer, da wiederum vergleichsweise mehr apoplastisches As als aufgenommen betrachtet wird als bei niedrigen Konzentrationen. Dies führt dazu, dass gerade  $I_{max}$ , welcher nur durch höhere Konzentrationen bestimmt wird, überschätzt wird.

Daher ist anzunehmen, dass  $I_{\max}$ -Werte aus den erwähnten Versuchen deutlich überschätzt werden.

Im Bereich der Toxizität (Abb. 4.8) deutete sich ein linearer Anstieg des As in der Pflanzensubstanz in Abhängigkeit der Angebots-Konzentration an. Abedin et al. (2002) konnten einen linearen Anstieg bei einem Angebot von 50 bis 2500  $\mu\text{M}$  im Kurzzeitversuch (20 min.) zeigen. Dies kann wiederum an Messungen im toxischen Bereich mit beschädigter Plasmamembran oder am hohen Anteil apoplastischen As liegen. Im vorliegenden Versuch wurde bei 42,71  $\mu\text{M}$  As(III)-Angebot fast soviel As aus dem Apoplasten gespült, wie die Pflanze im Symplasten enthielt. Bei 2500  $\mu\text{M}$  As(III)-Angebot dürfte der in den Symplasten aufgenommene As-Anteil gänzlich vom apoplastischen As überdeckt werden.

### 5.4 Aufnahmesystem

Es konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme im Bereich bis 21,36  $\mu\text{M}$  As(III) einer Michaelis-Menten-Funktion folgt, möglicherweise aber bereits ab 10,68  $\mu\text{M}$  As(III) durch Toxizität bestimmt wird. Abedin et al. (2002c) schlossen auf zwei Aufnahmesysteme, wobei eines hoch affin ist und im Bereich 0-50  $\mu\text{M}$  tätig ist, während bei höheren Konzentrationen die Aufnahme linear ist. Bei Konzentrationen < 50  $\mu\text{M}$  As(III) tritt aber bereits deutlich Toxizität auf, weswegen hier eine geregelte Aufnahme zweifelhaft ist.

Im untersuchten Konzentrationsbereich ist fraglich, ob die durch Parameter einer Michaelis-Menten-Funktion beschriebene Aufnahme tatsächlich aktiv ist. Wird As(III) wie postuliert (Abedin et al. 2002c, Meharg & Jardine 2003, Meharg et al. 2005c) durch Kanäle der Aquaglyceroporinfamilie aufgenommen, so kann die Aufnahme nicht wirklich aktiv sein. Aquaglyceroporine sind passiv, ein Transport erfolgt entlang des Konzentrationsgradienten (Maurel 1997). Ein Verbrauch von Energie (Abedin et al. 2002c) und ein Transport gegen den Gradienten (Dubey & Jha 2004) fänden also nicht statt. Zwar werden Aquaglyceroporine durch Phosphorylierung geöffnet, der energetische Aufwand ist aber gering, da der Kanal nun für eine Vielzahl von Molekülen passierbar ist.

Eine Sättigungsfunktion kann vielmehr durch Absättigung aller Transportkanäle stattfinden. Hierzu müssten relativ wenige Kanäle vorhanden sein bzw. die Außenkonzentration so hoch sein, dass die einzelnen Transporter an ihrer Kapazitätsgrenze arbeiten. Es ist fraglich, ob dies möglich ist. Zwar gibt es

Aquaporine in der Reiswurzel in hoher Konzentration (Li et al. 2000), aber es ist unklar, wie viele Aquaglyceroporine darunter sind, die eine Kanalweite von >30 nm haben können. Eine andere Möglichkeit ist, dass mit zunehmendem As(III)-Angebot die Aufnahme herabreguliert wird. Hierbei sind 4 Wege denkbar: mit steigendem As(III)-Angebot werden

- a) weniger Aquaglyceroporine exprimiert,
- b) Aquaglyceroporine durch As(III) „verstopft“,
- c) Aquaglyceroporine aufgrund von Toxizität geschlossen,
- d) Aquaglyceroporine aktiv geschlossen.

Eine Herabregulierung der Genexpression von Aquaglyceroporinen aufgrund von As(III) ist nicht bekannt und kann im Kurzzeitversuch nicht die Ursache für eine relativ abnehmende Aufnahme bei hohen Konzentrationen sein. Ein „Verstopfen“ des Kanals durch As(III) für weitere As(III)-Moleküle könnte durch Binden des As(III) an mögliche SH-Gruppen im Kanaleingangsbereich geschehen, da As(III) eine hohe Affinität zu diesen besitzt (Delnomdedieu et al. 1993, Ullrich-Eberius et al. 1989). Allerdings würde die Aufnahme dann aber ab einer bestimmten Konzentration drastisch abnehmen, was nicht der Fall ist.

Ein Schließen der Aquaglyceroporine aufgrund von Toxizität bedarf eines direkten Eingriffes des As(III) in die Funktionalität des Aquaglyceroporins. Dies würde das rasche Welken bei 42,71  $\mu\text{M}$  As(III)-Angebot erklären, da die Wasserleitfähigkeit der Wurzel herabgesetzt wird. Durch das Schließen der Kanäle wäre somit der symplastische Transportweg stark betroffen. Ein Schließen aufgrund einer Stoffwechselreaktionskette ist ebenso möglich, da As(III) Reaktionen im Stoffwechsel hervorruft wie die Produktion von Phytochelatinen (Schmöger et al. 2000) und Aquaglyceroporine durch eine Vielzahl von Mechanismen wie z.B. Phosphorylierung (Johansson et al. 1998), Protonierung (Tournaire-Roux et al. 2003), pH und Ca-Konzentration (Németh-Cahalan & Hall 2000) reguliert werden.

Man kann nicht ausschließen, dass As(III) durch einen anderen Carrier aktiv aufgenommen wird. Allerdings sind Aquaglyceroporine in Pro- und Eukaryonten, in Säugetieren wie auch höheren Pflanzen vertreten und dabei hochgradig konserviert (s.o.). Da eine Reihe von Aquaglyceroporinen in anderen Organismen As(III) transportiert (Wysocki et al. 2001, Tajkhorshid 2002b, Rosen 2002b, 2006), ist dies für Reis ebenfalls zu vermuten.

Daher ist anzunehmen, dass As(III) mittels Kanälen aus der Familie der Aquaglyceroporine aufgenommen wird. Die Aufnahme erfolgt hierbei passiv, hat aber Sättigungs-Charakter, wobei dieser auf den zuvor beschriebenen Wegen zustande kommt.

### 5.5 Ausblick

Für eine Untersuchung der As(III)-Aufnahmekinetik muss sichergestellt werden, dass As(III) angeboten und auch aufgenommen wird. Ersteres bedarf einer Untersuchung der As-Form und der Vermeidung von Oxidation und mikrobieller Aktivität im System. Um aber die Aufnahme zu ermitteln, muss vermieden werden, dass im Apoplasten enthaltenes As bei den Messungen dem Symplasten zugeschlagen wird und so die aufgenommene As-Menge verfälscht. Im Versuch zeigte sich, dass die Wurzel noch nach der Ernte As im Apoplasten enthielt. Eine hieraus möglicherweise überschätzte Aufnahmerate ließe sich beseitigen, indem das apoplastische As definiert und durch geeignete Methoden extrahiert wird. Dies könnte über Zentrifugieren geschehen.

Nachdem nun eine Aufnahmekinetik erstellt wurde, stellt sich die Frage, inwiefern die As(III)-Aufnahme durch As(III)-Toxizität beeinflusst wird. Hierzu bedarf es eines tieferen Verständnisses der As-Wege im Stoffwechsel. So sind die Grenzen und Wirkungen der Toxizität mit ihren Reaktionen im Zytoplasma und der Membran genauer zu charakterisieren. Hierzu wiederum braucht man einen Indikator für die Toxizität. Möglicherweise eignen sich hierfür das Wurzelwachstum und die Wasserleitfähigkeit der Wurzel.

Ferner ist der As(III)-Transporter bei Reis nicht identifiziert. Hierzu können z.B. bekannte Aqua(glycero)porine aus der Reisswurzel in anderen Organismen verwendet werden, um dort eine As(III)-Aufnahme nachzuweisen.

Außerdem ist nicht bekannt, an welchen Wurzelsegmenten die Aufnahme hauptsächlich stattfindet. Dies könnte durch As(III)-Angebot an definierten Segmenten untersucht werden.

## 6. Zusammenfassung

In einem Nährfilmverfahren wurde intakten Reispflanzen As(III) 4 Tage lang stabil angeboten und die Aufnahme im Bereich von 0 bis 42,71  $\mu\text{M}$  As(III) untersucht. Die Aufnahmerate folgte zwischen 0 und 10,68  $\mu\text{M}$  As(III) einer Sättigungsfunktion mit  $I_{\text{max}} = 4,3 \text{ pmol cm}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $K_m = 3,2 \text{ }\mu\text{M}$ . Dennoch erfolgte die Aufnahme wahrscheinlich passiv über Aquaglyceroporine. Hierbei wurde die Aufnahme vermutlich mit zunehmender As(III)-Toxizität eingeschränkt.

As(III)-Toxizität in Form von Welke und geringerer Frischmassebildung trat deutlich bei Konzentrationen ab 21,36  $\mu\text{M}$  As(III) auf. Trotzdem ist anzunehmen, dass As(III) schon bei geringerer Konzentration toxisch wirkt.

## 7. Anhang

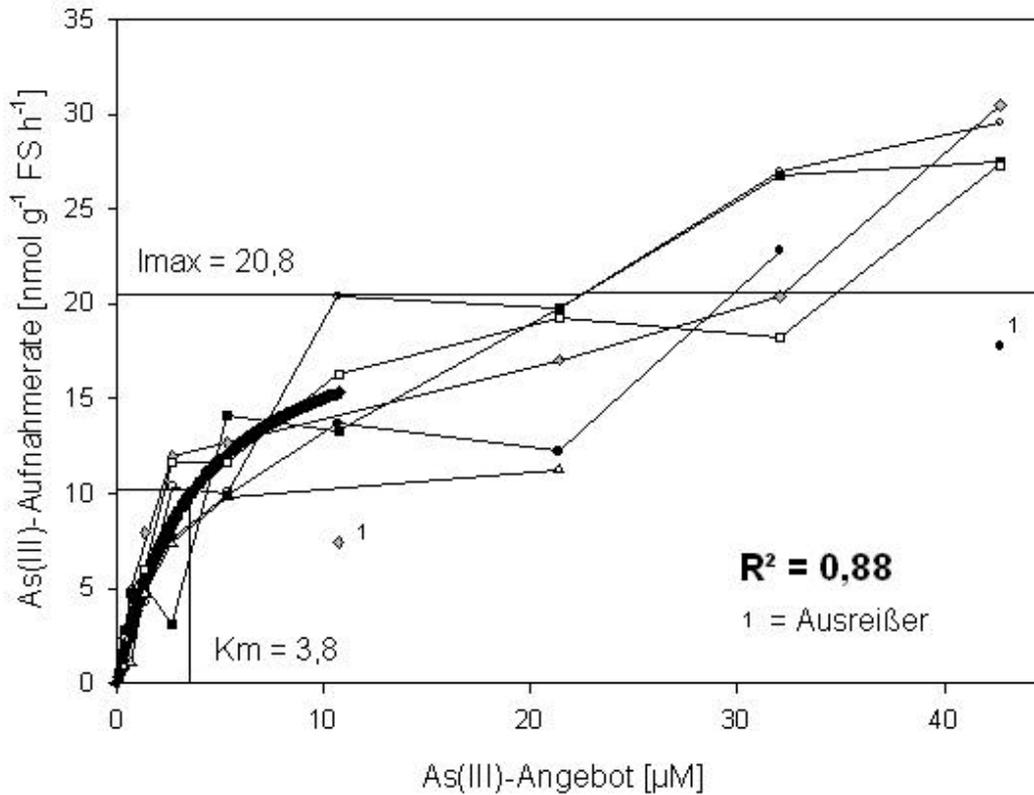


Abb. 7.1: Einfluss der As(III)-Konzentration auf die As(III)-Aufnahmerate (bezogen auf die Frischmasse der Wurzel), Regression mit einer Michaelis-Menten-Funktion.

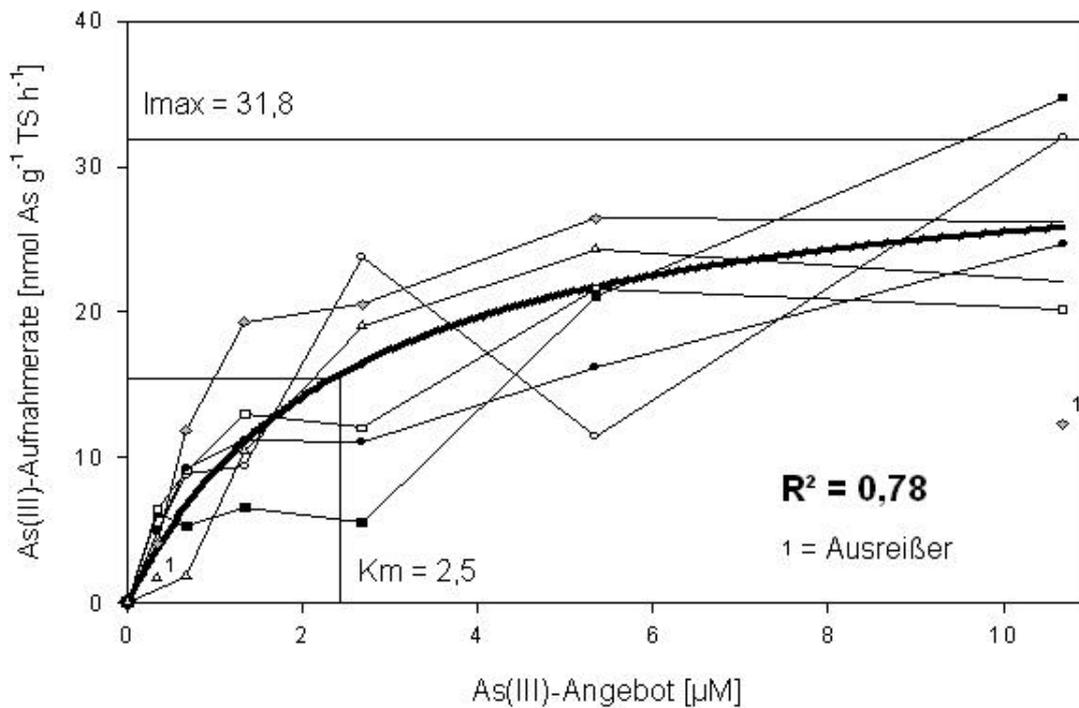


Abb. 7.2: Einfluss der As(III)-Konzentration auf die As(III)-Aufnahmerate (bezogen auf die TS), Regression mit einer Michaelis-Menten-Funktion.

## 8. Literaturverzeichnis

Abedin M. J., Cotter-Howells J., Meharg A. A. (2002): Arsenic uptake and accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) irrigated with contaminated water. *Plant and Soil*: 240, 311-319.

Abedin M. J., Cresser M. S., Meharg A. A., Feldmann J., Cotter-Howells (2002b): Arsenic accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Science and Technology*: 36 (5), 962-968.

Abedin M. J., Feldmann J., Meharg A. A. (2002c): Uptake kinetics of arsenic species in rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Plant Physiology*: 128, 1120-1128.

Agget J., Kriegman M. R. (1988): The extent of formation of arsenic (III) in sediment interstitial waters and its release to hypolimnetic waters in lake Ohakuri. *Water Research*: 22, 407-411.

Agre P., Hazama A., Kozono D., Guggino W. B., Yasui M. (2002): Ion permeation of AQP6 water channel protein. *The Journal of Biological Chemistry*: 277 (32), 29224-29230.

Ahmann D., Krumholz L. R., Hemond H. F., Lovly D. R., Morel F. M. M (1997): Microbial mobilization of arsenic from sediments of Aberjona Watershed. *Environmental Science and Technology*: 31, 2923-2930.

Barber S.A., Claassen N. (1974): A method for characterizing the relation between nutrient concentration and flux into roots of intact plants. *Plant Physiology*: 54, 564-568.

Bertolero F., Pozzi G., Sabbioni E., Saffiotti U. (1987): Cellular uptake and metabolic reduction of pentavalent to trivalent arsenic as determinants of cytotoxicity and morphological transformation. *Carcinogenesis*: 8, 803-808.

Borgnia M., Nielsen S., Engel A., Agre P. (1999): Cellular and molecular biology of aquaporin water channel. *Annual Review of Biochemistry*: 68, 425-458.

BVL 2005:

([http://www.bvl.bund.de/nn\\_781904/DE/01\\_\\_Lebensmittel/03\\_\\_UnerwStoffeUndOrganismen/05\\_\\_Schwermetalle/schwermetalle\\_\\_node.html\\_\\_nnn=true](http://www.bvl.bund.de/nn_781904/DE/01__Lebensmittel/03__UnerwStoffeUndOrganismen/05__Schwermetalle/schwermetalle__node.html__nnn=true)), [31/8/2005].

Carbonell-Barrachina A. A., Aarabi M. A., DeLaune R. D., Gambrell R. P., Patrick Jr. W. H. (1998): The influence of arsenic chemical form and concentration on *Spartina patens* and *Spartina alterniflora* growth and tissue arsenic concentration. *Plant and Soil*: 198, 33-43.

Carter E. D. (1995): Oxidation – Reduction reactions of metal ions. *Environmental Health Perspectives*: 103 (1), 17-19.

Chaumont F., Moshelion M., Daniels M. J. (2005): Regulation of plant aquaporin activity. *Biology of the Cell*: 97(10), 749-764.

Cobbett C. S. (2000): Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology*: 3, 211.

Cobbett C. S. & Goldsbrough P. (2002): Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*: 53, 159-182.

De Groot B. L., Frigato T., Helms V., Grubmüller H. (2003): The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel. *Journal of Molecular Biology*: 333, 279-293.

Delnomdedieu M., Basti M. M., Otvos J. D., Thomas D. J. (1993): Transfer of arsenite from glutathione to dithiols: A model of interaction. *Chemical Research in Toxicology*: 6, 598-602.

Dhanker O. P., Rosen B. P., McKinney E. C., Meagher R. B. (2006): Hyperaccumulation of arsenic in the shoot of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase, ACR2. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA: 103, 5413-5418.

Dordas C., Chrispeels M. J., Brown P. H. (2000): Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. Plant Physiology: 124, 1349-1362.

Dubey R. S., Jha A. B. (2004): Arsenic exposure alters activity behaviour of key nitrogen assimilatory enzymes in growing rice plants. Plant Growth Regulation: 43, 259-268.

Echevarria M., Windhager E. E., Tate S. S., Frindt G. (1994): Cloning and expression of AQP3, A water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. Proceedings of the National Academy of Science, USA: 91, 10997-11001.

Epstein E. (1960): Spaces, Barriers, and Ion Carriers: Ion Absorption by Plants. American Journal of Botany: 47 (5), 393-399.

FAOSTAT 2005: (<http://faostat.fao.org/>), [Letzte Einsicht am 15/09/2007].

Ferguson J. F., Gavis J. (1972): A review of the arsenic cycle in natural waters. Water Research: 6, 1259-1274.

Fetter K., Van Wilder V., Moshelion M., Chaumont F. (2004): Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. Plant Cell: 16, 215-228.

Fu D., Libson A., Miercke L. J. W., Weitzman C., Nollert P., Krucinski J., Stroud R. M. (2000): Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. Science: 290, 481-486.

Ghosh M., Shen J., Rosen B. P. (1999): Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Science: 96, 5001-5006.

Goldberg S. (2002): Competitive adsorption of arsenate and arsenite on oxides and clay minerals. Soil Science Society of America Journal: 66, 413-421.

Grafe M., Eick M. J., Grossl P. R. (2001): Adsorption of arsenate (V) and arsenite (III) on goethite in the presence and absence of dissolved organic matter. Soil Science Society of America Journal: 65, 1680-1687.

Grill E., Winnacker E-L, Zenk, M. H. (1987): Phytochelatins, a class of metal-binding peptides from plants, are functionally analogues to metallothioneins. Proceedings of the National Academy of Science: 84, 439-443.

Hammer U. T., Huang P. M., Oscarson D. W., Liaw W. K. (1982): Dynamics and mechanisms of arsenite oxidation by freshwater lake sediments. Hydrobiologia: 91, 315-322.

Hartley-Whitaker J., Ainsworth G., Meharg A. A. (2001): Copper- and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L., clones with differential sensitivity. Plant Cell & Environment: 24, 713-722.

Harvey C. F., Swartz C. H., Badruzzman A. B. M., Keon-Blute N., Yu W., Ali M. A. (2002): Arsenic mobility and groundwater extraction in Bangladesh. Science 298: 1602.

Henzler T., Steudle E. (2000): Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels. Journal of Experimental Botany: 51, 2053-2066.

Hingston F. J., Posner A. M., Quirk J. P. (1972): Competitive adsorption of negatively charged ligands on oxide surfaces. *Faraday Discussions of the Chemical Society*: 52, 334-342.

Hug S. J., Canonica L., Wegelin M., Gechter D., Gunten U. V. (2001): Solar oxidation and removal of arsenic at circumneutral pH in iron containing waters. *Environmental Science and Technology*: 35, 2114-2121.

Ishibashi K., Kuwaharat M., Gu Y., Kageyama Y., Tohsaka A., Suzuki F., Marumo F., Sasaki S. (1997): Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol and urea. *Journal of Biological Chemistry*: 272, 20782-20786.

IRRI 2001: ([www.irri.org](http://www.irri.org)), [Letzte Einsicht am 15/09/2007].

Jackson C. R., Dugas S. L. (2003): Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal *arsC* gene sequences suggests an ancient, common origin for arsenate reductase. *BMC Evolutionary Biology*: 3, 18-27.

Jahn TP, Moellert A. L., Zeuthen T., Holm L. M., Klaerke D. A., Mohsin B., Kühlbrandt W., Schjoerrig J. K. (2004): Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS letters*: 574, 31-36.

Jha A. B., Dubey R. S. (2004): Carbohydrate metabolism in growing rice seedlings under arsenic toxicity. *Journal of Plant Physiology*: 161, 867-872.

Johansson I., Karlsson M., Shukla V. K., Chrispeels M. J., Larsson C., Kjellborn P. (1998): Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell*: 10, 451-459.

Kenney L. J., Kaplan J. H. (1988): Arsenate substitutes for phosphate in the human red cell sodium pump and anion exchanger. *Journal of Biological Chemistry*: 15, 7954-7960.

Kinniburgh D. G., Cooper D. M. (2004): Predominance and stability diagrams revisited. *Environmental Science and Technology*: 38, 3641-3648

Latscha H. P., Klein H. A. (2002): Periodensystem der Elemente in „Anorganische Chemie“, 8. Auflage, S. 39, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

LGL 2005: ([http://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/arsen\\_in\\_algen.htm](http://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/arsen_in_algen.htm)), [25/1/2006].

Li L. G., Li S. F., Tao Y., Kitagawa Y. (2000): Molecular cloning of a novel water channel from rice: Its products expression in *Xenopus* oocytes and involvement in chilling tolerance. *Plant Science*: 154, 43-51.

Liu S. X., Athar M., Lippai I., Waldren C., Hei T. K. (2001): Induction of oxyradicals by arsenic: Implication for mechanism of genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*: 98, 1643-1648.

Londesborough S., Mattusch J., Wennrich R. (1998): Separation of organic and inorganic arsenic species by HPLC-ICP-MS. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*: 363, 577-581.

Macnair M. R., Cumbes Q. (1987): Evidence that arsenic tolerance in *H. lanatus* L. is caused by an altered phosphate uptake system. *New Phytologist*: 107, 387-394.

Maier T., Yu C., Küllertz G., Clemens S. (2003): Localization and functional characterization of metal-binding sites in phytochelatase synthases. *Planta*: 218, 300-308.

Marin A. R., Pezeshki S. R., Masscheleyn P. H., Choi H. S. (1992): Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic, and photosynthesis of rice plants. *Journal of Plant Nutrition*: 16, 865-880.

Masscheleyn P. H., DeLaune R. D., Patrick W. H. (1991): Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in contaminated soil. *Environmental Science and Technology*: 25, 1414-1419.

Masscheleyn P. H., Marin A. R., Patrick W. H. (1992): The influence of chemical form on concentration of arsenic on rice growth and tissue arsenic concentration. *Plant and Soil*: 139, 175-183.

Masscheleyn P. H., Marin A. R., Patrick W. H. (1993): Soil redox-pH stability of arsenic species and its on arsenic uptake by rice. *Plant and Soil*: 152, 245-253.

Matera V., Hecho I. L., Laboudigue A., Thomas P., Tellier S., Astruc M. (2003): A methodological approach for the identification of arsenic bearing phases in polluted soils. *Environmental Pollution*: 126, 51-64.

Maurel C., Reizer J., Julian I. S., Chrispeels M. (1993): The vacuolar membrane protein  $\gamma$ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal*: 12, 2241-2247.

Maurel C. (1997): Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*: 48, 399-429.

Maurel C., Tyerman S. D., Bohnert H. J., Steudle E., Smith J. A. C. (1999): Plant aquaporins: Their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *Journal of Experimental Botany*: 50, 1055-1071.

Maurel C., Chrispeels M. J. (2001): Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology*: 125, 135-138.

McCleskey R. B., Nordstrom D. K., Maest A. S. (2004): Preservation of water samples for arsenic (III/V) determinations: An evaluation of the literature and new analytical results. *Applied Geochemistry*: 19, 995-1009.

McDermott T. R., Kashyap D. R., Botero L. M., Franck W. L., Hassett D. J. (2006): Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*: 188 (3), 1081-1088.

Meharg A. A., Macnair R. M. (1992): Suppression of the high affinity phosphate uptake system: A mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *Journal of Experimental Botany*: 43 (249), 519-524.

Meharg A. A., Macnair R. M. (1994): Relationship between plant phosphorus status and the kinetics of arsenate influx in clones of *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. that differ in their tolerance to arsenate. *Plant and Soil*: 162 (1), 99-106.

Meharg A. A., Hartley-Whitaker J. (2002): Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist*: 154, 29-43.

Meharg A. A., Abedin M. J. (2002): Relative toxicity of arsenite and arsenate on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil*: 243, 57-66.

Meharg A. A., Rahman M. D. M. (2003): Arsenic contamination of Bangladeshy paddy field soils: implications for rice contribution to arsenic consumption. *Environmental Science and Technology*: 37, 229-234.

Meharg A. A., Jardine L. (2003): Arsenite transport into paddy rice (*Oryza sativa*) roots. *New Phytologist*: 157, 39-44.

Meharg A. A., P. N. Williams, A. H. Price, A. Raab, S. A. Hossain, J. Feldman (2005): Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure. *Environmental Science and Technology*: 39, 5531-5540.

Meharg A. A., Raab A., Schat H., Feldmann J. (2005b): Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): Formation of arsenic-phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations. *New Phytologist*: 168, 551-558.

Meharg A. A., Chen Z., Zhu Y-G, Liu W-J (2005c): Direct evidence showing the effect of root surface iron plaque on arsenite and arsenate uptake into rice (*Oryza sativa*) roots. *New Phytologist*: 165, 91-97.

## 8. Literaturverzeichnis

---

Meharg A. A., Geng C. N., Zhu Y. G., Hu Y., Williams P. (2006): Arsenate causes differential acute toxicity to two P-deprived genotypes of rice seedlings (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil*: 279, 297-306.

Mullins G. L., Edwards J. H. (1989): A comparison of two methods for measuring potassium influx kinetics by intact corn seedlings. *Journal of Plant Nutrition*: 12 (4), 485-496.

Mylona P. V., Polidoros A. N., Scandalios J. G. (1998): Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize . *Free Radical Biology and Medicine*: 25, 576-585.

Naccache P., Sha'afi R. I. (1974): Effect of PCMBs on water transfer across biological membranes. *Journal of cellular Physiology*: 83, 449-456.

National Food Authority (1993): Australian Food Standard Code: March, 1993. Australian Govt. Pub. Service, Canberra.

Neal C. R., Liu, G. J., Zhang X. R., Jain J., Talley J. W. (2006): Stability of inorganic arsenic species in simulated raw waters with the presence of NOM. *Water Science & Technology: Water Supply*: 6, 175-182.

Németh-Cahalan K. L., Hall J. E. (2000): pH and Ca<sup>2+</sup> regulate the water permeability of aquaporin 0. *Journal of Biological Chemistry*: 275, 6777-6782.

Nollert P., Harries W. E. C., Fu D., Miercke L. J. W., Stroud R. M. (2001): Atomic structure of a glycerol channel and implications for substrate permeation in aqua(glycero)porins. *FEBS letters*: 504, 112-117.

Nye P. H., Tinker P. B. (2000): Ion uptake kinetics and plant demand, in: *Solute movement in the Rhizosphere*. Oxford University Press, Oxford. S. 112-126.

Oremland R. S., Stolz J. F. (2003): The ecology of arsenic. *Science*: 300, 939-944.

Oremland R. S., Hoefft R. S., Santini J. M., Bano N., Hollibaugh R. A., Hollibaugh J. T. (2002): Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. *Applied and Environmental Microbiology*: 68, 4795-4802.

Pickering I. J., Prince R. C., George M. J., Smith R. D., George G. N., Salt D. E. (2000): Reduction and coordination of arsenic in indian mustard. *Plant Physiology*: 122, 1171-1177.

Pierce M. L., Moore C. B. (1982): Adsorption of arsenite and arsenate on amorphous iron hydroxide. *Water Research*: 16, 1247-1253.

Raab A., Feldman J., Meharg A. A. (2004): The Nature of Arsenic-Phytochelatin Complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*. *Plant Physiology*: 134, 1113-1122.

Raven K. P., Jain A., Loeppert R. H. (1999). Arsenite and arsenate adsorption on ferrihydrite: Surface charge reduction and net OH<sup>-</sup> release stoichiometry. *Environmental Science and Technology*: 33(8), 1179-1184.

Rengel Z. und Quaghebeur M. (2004): Arsenic uptake, translocation and speciation in *pho1* and *pho2* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*: 120, 280-286.

Rengel Z. und Quaghebeur M. (2005): Arsenic speciation governs arsenic uptake transport in terrestrial plants. *Microchimica Acta*: 151, 141-152.

Rhine E. D., Phelps C. D., Kung L. Y. (2006): Anaerobic arsenite oxidation by novel denitrifying isolates. *Environmental Microbiology*: 8, 899-908.

Rosen B. P. (1999): Families of arsenic transporters. *Trends in Microbiology*: 7, 207-212.

Rosen B. P. (2002): Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Letters*: 529, 86-92.

Rosen B. P., Liu Z., Shen J., Carbrey J. M., Mukhopadhyay R., Agre P. (2002b): Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proceedings of the National Academy of Science*: 99 (9), 6053-6058.

Rosen B. P., Liu Z., Styblo M. (2006): Methylarsonous acid transport by aquaglyceroporins. *Environmental Health Perspectives*: 114(4), 527-531.

Rutger J. N., Wengui Y., Dilday R. H., Tai T. H., Gibbons J. W., McNew R. W. (2005): Differential response of rice germplasm to straighthead induced by arsenic. *Crop Science*: 45, 1223-1228.

Sakurai J., Ishikawa F., Yamaguchi T., Uemura M., Maeshima M. (2005): Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiology*: 46(9), 1568-1577.

Samantha G., Chowdhury T. R., Mandal B. K., Biswas B. K., Chowdhury U. K., Basu G. K., Chanda C. R., Lodh D., Chakraborti D. (1999): Flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry for determination of arsenic in water and biological samples from arsenic-affected districts of West Bengal, India and Bangladesh. *Microchemical Journal*: 62, 174-191.

Samanta G., Clifford D. A. (2005): Preservation of inorganic arsenic species in groundwater. *Environmental Science and Technology*: 39, 8877-8882.

Santini J. M., Sly L. I., Wen. A. M., Comrie D., Wulf-Dur P. de, Macy J. M. (2002): New arsenite-oxidizing bacteria isolated from Australian gold mining environments - phylogenetic relationships. *Geomicrobiology-Journal*. 2002: 19(1): 67-76.

Santini J. M., Inskeep W. P., Macur R. E., Hamamura N., Warelow T. P., Ward S. A. (2007): Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes. *Environmental Microbiology*: 9(4), 934-943.

Schmöger M. E. V., Oven M., Grill E. (2000): Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiology*: 122, 793-802.

Scott N., Hatlelid K. M., MacKenzie N. E., Carter D. E. (1993): Reactions of arsenic (III) and arsenic (V) species with glutathione. *Chemical Research in Toxicology*: 6, 102-106.

Silver S., Phung L. T. (2005): Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology*: 71, 599-608.

Smedley P., Nicolli H. B., Macdonald D. M. J., Barros A. J., Tullio J. O. (2002): Hydrogeochemistry of arsenic and other inorganic constituents in groundwater from La Pampa, Argentina. *Applied Geochemistry*: 17, 259-284.

Smith S. E., Read D. J. (1997): *Mycorrhizal symbiosis*, 2<sup>nd</sup> edn. London UK, Academic Press Ltd.

Sneller F. E. C., Van H. L. M., Kraaijeveld-Smit F. J. L., Ten B. W. M., Koevoets P. L. M., Schat H., Verkleij J. A. C. (1999): Toxicity of arsenate in *Silene vulgaris*, accumulation and degradation of arsenate-induced phytochelatins. *New Phytologist*: 144, 223-232.

Spliethoff H. M., Mason R. P., Hemond H. F. (1995): Interannual variability in the speciation and mobility of arsenic in a dimictic lake. *Environmental Science and Technology*: 29, 2157-2161.

Subramanian V., Madhavan N., Naqvi S. A. S. (2002): Arsenic in our environment - A critical review. *Environmental hazards in South Asia*, edited by V. Subramanian. Capital Publishing Company, New Delhi (ISBN 81-85589-05-4). S.189-214.  
([http://eprints.ictp.it/351/01/Arsenic\\_in\\_Our\\_Environment.pdf](http://eprints.ictp.it/351/01/Arsenic_in_Our_Environment.pdf))

Tajkhorshid E., Jensen M., Schulten K. (2001): The mechanism of glycerol conduction in aquaglyceroporins. *Structure*: 9, 1083-1093.

Tajkhorshid E., Nollert P., Jensen M., Miercke L. J. W., O'Connell J., Stroud R. M., Schulten K. (2002): Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science*: 296, 525-530.

Tajkhorshid E., Jensen M., Park S., Schulten K. (2002b): Energetics of glycerol conduction through aquaglyceroporin GlpF. *Proceedings of the National Academy of Science*: 99, 6731-6736.

Tajkhorshid E., Zhu F., Schulten K. (2002c): Pressure-induced water transport in membrane channels studied by molecular dynamics. *Biophysical Journal*: 83, 154-160.

Tajkhorshid E., Zhu F., Schulten K. (2004): Theory and simulation of water permeation in aquaporin-1. *Biophysical Journal*: 86, 50-57.

Tajkhorshid E., Wang Y., Schulten K. (2005): What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF. *Structure*: 13, 1107-1118.

Tajkhorshid E., Törnroth-Horsefield S., Wang Y., Hedfalk K., Johanson U., Karlsson M., Neutze R., Kjellborn P. (2006): Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*: 439 (9), 688-694.

Takamatsu T., Kawashima M., Koyama M. (1985): The role of Mn<sup>2+</sup>-rich hydrous manganese oxide in the accumulation of arsenic in lake sediments. *Water Research*: 19, 1029-1032.

Tamaki S., Frankenberger W. T. (1992): Environmental biochemistry of arsenic. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*: 124, 79-110.

Tong Y. P., Kneer R., Zhu Y. G. (2004): Vacuolar compartmentalization: A second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends in Plant Science*: 9, 7-9.

Tournaire-Roux C., Sutka M., Javot H., Gout E., Gerbeau P., Luu D-T, Bligny R., Maurel C. (2003): Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature*: 425, 393-397.

Tsutsumi M. (1980): Intensification of arsenic toxicity to paddy rice by hydrogen sulphide and ferrous iron I. Induction of bronzing and iron accumulation in rice by arsenic. *Soil Science and Plant Nutrition*: 26, 561-569.

Turpeinen R., Pansar-Kallio M., Haggblom M., Kairesalo T. (1999): Influence of microbes on the mobilization toxicity and biomethylation of arsenic in soil. *Science of the Total Environment*: 236, 173-180.

Ullrich-Eberius C., Sanz A., Novacky A. J. (1989): Evaluation of arsenate- and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1. *Journal of Experimental Botany*: 40, 119-128.

Van der Meer J. R., Baumann B. (2007): Analysis of Bioavailable Arsenic in Rice with Whole Cell Living Bioreporter Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 55, 2115-2120.

Wang J., Zhao F-J, Meharg A. A., Raab A., Feldman J., Mcgrath S. P. (2002): Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiology* 130: 1552-1561.

Wells B. R., Gilmour JT (1977): Sterility in rice cultivars as influenced by MSMA rate and water management. *Agronomy Journal*: 69, 451-454.

WHO Guidelines for Drinking-Water Quality, 2nd ed.; Geneva 1993: (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs210/en/index.html>), ([http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/arsenicun5.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/arsenicun5.pdf)).

Williams, R.F. (1946): The physiology of plant growth with special reference to the concept of net assimilation rate. *Annals of Botany*: 10, 41-72.

Wood A. S., Tait C. D., Janecky D. R. (2002): A Raman spectroscopic study of arsenite and thioarsenite species in aqueous solution at 25 °C. *Geochemical Transactions*: 3(4) 31-39.

Wysocki R., Chery C. C., Wawrzycka D., Van Hulle M., Cornelis R., Thevelein J., Tamas M. J. (2001): The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*: 40, 1391-1401.

Ye Q., Wiere B., Steudle E. (2004): A cohesion/tension mechanism explains the gating of water channels (aquaporins) in *Chara* internodes by high concentration. *Journal of Experimental Botany*: 55, 449-461.

Zhu Y-G, Duan G-L, Zhou Y., Tong Y-P, Mukhopadhyay R., Rosen B. P. (2007): A CDC25 homologue from rice functions as an arsenate reductase. *New Phytologist*: 174, 311-321.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hannover, September 2007