

Vergleich der Kupfer-, Zink- und Cadmiumaufnahme durch Spinatwurzeln nach Applikation von Cu-, Zn- und Cd-Nitrat bzw. -Citrat in der Nährlösung

Holger KELLER und Wilhelm RÖMER

Institut für Agrikulturchemie der Georg-August-Universität Göttingen, von-Siebold-Straße 6, D-37075 Göttingen

Abstract

The influence of citrate complexation on the Cu, Zn, and Cd uptake in spinach was investigated by growing spinach plants (cv. 'Monnopa') in nutrient solution, containing 0.5 μM Cu, 1 μM Zn and 0 μM Cd, for 20 days after pregermination and, were transferred to Cu, Zn or Cd nitrate solutions (0.5 μM Cu, 2.0 μM Zn, 0.5 μM Cd) at pH 5 ... 6 with or without addition of 10^{-4} M citrate to test. The change of element concentration in solutions within 24h was measured and the metal uptake rates per unit root length were calculated. It was observed that the depletion of Cu, Zn and Cd in the solutions without citrate during the first hour resulted in C_{Lmin} for Cu and Cd within four hours, and nine hours for Zn. Thus, only for Zn uptake rates of $7.2 \dots 4.8 \times 10^{-15}$ mol/(cm · s) could be calculated for the period between the first and sixth hours. In solutions with citrate, the depletion of Cu and Zn started after nine hours and the Zn uptake rate was similar to the uptake rate from Zn nitrate. No difference was observed in the Cd depletion in solutions with and without citrate.

The main reason for the differences in uptake of the these three elements may be the presence of varying parts of free and complexed metal species in the solutions. According to the complex stability constants by MARTELL and SMITH (1977), in the metal citrate solutions 99 % of the Cu, 90 % of the Zn and only 36 % of the Cd ions were complexed with citrate. That means, a possible exudation of organic acids (e. g. citrate) has a large influence on metal distribution in the soil solution and consequences for their uptake.

Einleitung

Bei Weißlupine, aber auch Gelb- und Blauer Lupine erfolgt bei nicht ausreichender P-Ernährung eine gesteigerte Exsudation von Citrat, aber auch Malat in die Rhizosphäre (NEUMANN *et al.* 1999, EGGLE *et al.* 1999). Die Folge ist eine Phosphatmobi-

lisierung und damit eine erhöhte P-Aufnahme dieser Pflanzen (GERKE *et al.* 1994, GEELHOED *et al.* 1999). Auch für Zuckerrübe und Spinat wurde eine zum Teil erhöhte Exsudation von Oxalat, Malat, Ketoglutarat, Succinat, Fumarat und der Monocarbonsäureanionen Lactat, Formiat und Acetat festgestellt (BEISSNER und RÖMER 1998, KELLER und RÖMER 1998). Durch Gemische dieser organischen Säuren wurde neben der Löslichkeit des Phosphates auch die Löslichkeit von Fe, Cu, Zn und Cd im Boden erhöht (KELLER und RÖMER 1998). Während für die erhöhte Löslichkeit von Fe und Cu die komplexierende Wirkung vor allem der Di- bzw. Tricarbonsäureanionen verantwortlich ist, haben bei Zn und Cd sowohl die organischen Anionen als auch die Protonen der applizierten Säuren eine beträchtliche Wirkung auf deren Löslichkeit gezeigt. Da jedoch unklar ist, ob die erhöhte Löslichkeit der Kationen auch zu einer erhöhten Aufnahme in die Pflanze führt, sollten Spinatpflanzen in Nährlösung angezogen werden und diesen dann Schwermetall-Lösungen in Form freier bzw. an Citrat komplexierter Kationen angeboten werden. Aus der zeitlichen Abnahme der Elementkonzentrationen in den Lösungen sollte auf die Aufnahmerate der Wurzeln für diese Metalle geschlossen werden.

Material und Methoden

Zunächst wurden Spinatpflanzen der Sorte 'Monnopa' in Quarzsand für 14 Tage vorgekeimt und danach vier Pflanzen je Dreilitergefäß in Nährlösung unter Klimakammerbedingungen 20 Tage angezogen (Tag-Nacht-Rhythmus 12/12 h, Temperatur 20/15 °C, relative Luftfeuchtigkeit 70 %, PAR 240 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$). Die Nährlösung (ständig mit einem Luftstrom durchmischt) hatte folgende Zusammensetzung und wurde jeden zweiten Tag gewechselt: N als 2,5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, P als 6,5 μM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, K als 1,5 mM KCl, Mg als 0,75 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, Fe als 80 μM $\text{FeNaEDTA}/\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, Mn als 5 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, Cu als 0,5 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, Zn als 1 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, Mo als 0,28 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und B als 30 μM H_3BO_3 . Die P-Konzentration wurde bewußt relativ niedrig gehalten. Vier Tage vor Versuchsbeginn wurde in der Nährlösungszusammensetzung das FeNaEDTA-Salz durch FeSO_4 ersetzt, damit EDTA als Komplexbildner die Versuchsdurchführung nicht stört. In den Verarmungsversuchen wurden die Nährlösungen durch Schwermetalllösungen (Cd 0,5 μM , Cu 0,5 μM oder Zn 2,0 μM als Nitratsalze bei pH von 5 ... 6) ersetzt. Für die Citratkomplex-Variante wurden den Lösungen 10^{-4} M Citronensäure zugesetzt, wobei die Ergebnisse von GERKE (1995) berücksichtigt wurden, der in der Bodenlösung von Lupine 0,2 ... $7,5 \times 10^{-4}$ M Citrat gefunden hatte. Neben den genannten Verarmungslösungen wurden auch Citratlösungen ohne Metallzusatz verwendet,

um die Elementdynamik an den Wurzeln nur durch Citrat verfolgen zu können. Nach dem Überführen der Wurzeln in die jeweiligen Metall-Nitrat- bzw. -Citratlösungen wurden nach 1, 2, 4, 6, 9, 12, 18 und 24 Stunden jeweils 10 ml aus den Lösungen entnommen und die Elementkonzentration mittels AAS bestimmt. Anschließend wurden die Pflanzen geerntet und die Wurzellängen mit der Schnittpunktmethode nach TENNANT (1975) bestimmt. Die Aufnahme- bzw. Abgaberate der Wurzeln ergibt sich aus der Änderung der Elementkonzentration und dem Volumen der Verarmungslösungen bezogen auf die Zeit und die Wurzellänge.

Ergebnisse und Diskussion

Die Abb. 1A, B und C zeigen die Veränderungen der in den Verarmungslösungen gemessenen Cu-, Zn- bzw. Cd-Konzentrationen über den Zeitraum von 24 Stunden. In den Varianten ohne Citrat nahmen die Elementkonzentrationen bei allen drei Elementen in der ersten Stunde sehr stark, dann etwas langsamer ab, so daß in der Folge bei Cu und Cd schon nach vier Stunden, bei Zn aber erst nach etwa 24 Stunden die C_{Lmin} -Werte (Nettoaufnahmerate = 0) erreicht wurden. Die rasche Entleerung deutet darauf hin, daß es in den ersten Stunden zwischen AFS (Zellwände) und Verarmungslösung zu einer Gleichgewichtseinstellung kam, wobei vermutlich ein größerer Teil der unkomplexierten Kationen an den Zellwänden adsorbiert wurde. Nach Erreichen dieses Gleichgewichtszustandes lassen sich aus der zeitlichen Abnahme der Elementkonzentrationen in den Lösung Aufnahmeraten der Wurzeln ermitteln. Wenn diese pro Zeiteinheit auf ähnlich hohem Niveau liegen, ist davon auszugehen, daß eine Aufnahme in den Symplasten erfolgt. Beim Element Zn war diese Bedingung erfüllt, denn es zeigte sich, daß die Aufnahmeraten zwischen der ersten und sechsten Stunde relativ konstant zwischen $7,2$ und $4,8 \times 10^{-15}$ mol/(cm · s) lagen. Danach sanken die Aufnahmeraten ab, da sich die Konzentration in der Verarmungslösung C_{Lmin} annäherten. Für die Cu- und Cd-Nitratvarianten lassen sich keine Aussagen über stabile Aufnahmeraten machen, da nach Gleichgewichtseinstellung die Konzentration der Verarmungslösung schon nahe C_{Lmin} lag. In weiteren Versuchen müßten höhere Konzentrationen angeboten werden.

Die Anwesenheit von 10^{-4} M Citrat veränderte die Entleerung der Verarmungslösungen bei Cu und Zn eindeutig (Abb. 1A, B) während beim Cd der Effekt sehr gering war (Abb. 1C). Beim Cu nahm die Konzentration nicht ab, sondern stieg bis zur sechsten Stunde sogar um ca. 20 ppb an, blieb bis zur neunten Stunde etwa konstant und sank dann erst ab. Auch beim Zn erfolgte die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Apoplasten und Lösung deutlich langsamer.

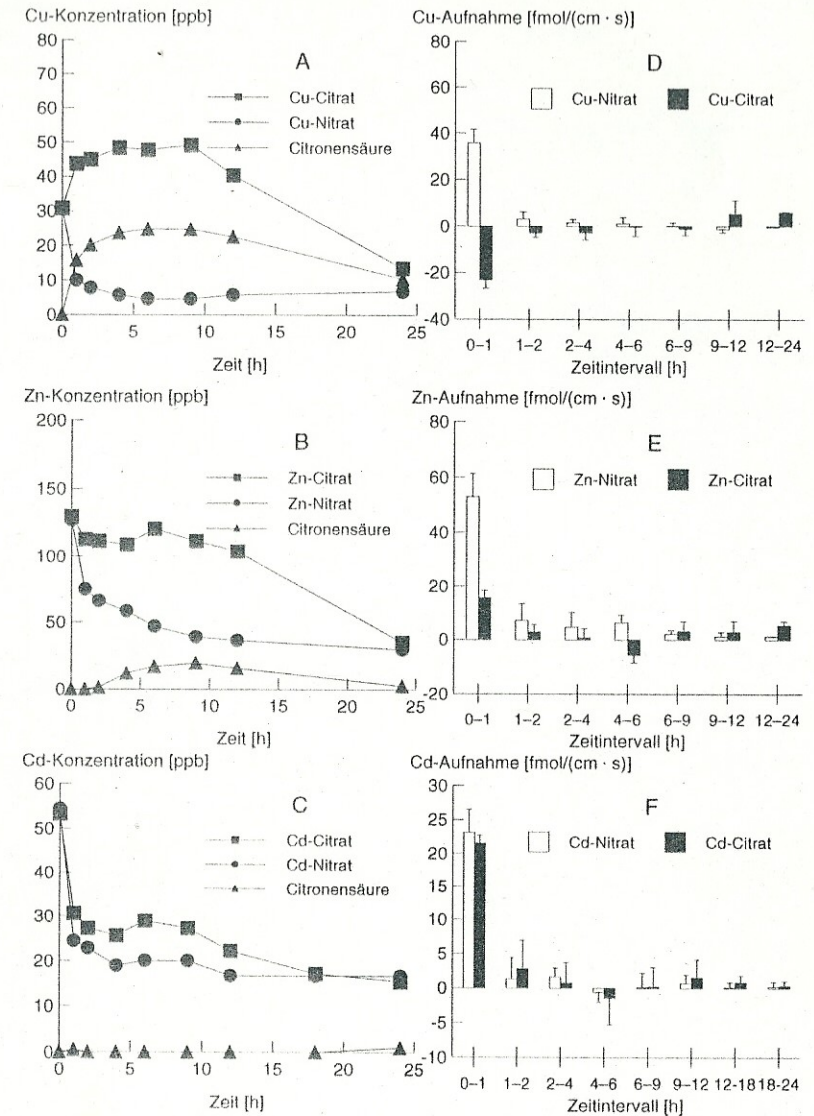


Abb. 1. Änderungen der Kupfer- (A), Zink- (B) und Cadmiumkonzentration (C) in der verwendeten Schwermetallnitrat-Verarmungslösung mit oder ohne 10^{-4} M Citratzusatz innerhalb von 24 Stunden sowie die Kupfer- (D), Zink- (E) und Cadmium- (F) -aufnahme- bzw. -abgaberraten im gleichen Zeitraum bei Spinatwurzeln; $n = 4$, Linien geben Standardabweichung an; fmol $\Delta 10^{-15}$ mol.

Zunächst war eine geringe Abnahme der Konzentration um ca. 20 ppb erkennbar, die dann aber zwischen der ersten und neunten Stunde etwa konstant blieb, um später wie beim Cu abzusinken. Beim Cd verlief die Verarmungskurve mit Citrat sehr ähnlich wie die ohne Citrat, aber C_{Lmin} wurde ohne Citrat schon nach vier Stunden, mit Citrat erst nach 18 Stunden erreicht. Nach Einstellung des Gleichgewichtszustandes (9 – 24 h) lassen sich bei der Cu-Citratvariante Aufnahmeraten von $4,9 \dots 4,0 \times 10^{-15} \text{ mol}/(\text{cm} \cdot \text{s})$ ermitteln. Bei Zn-Citrat erreichte die Aufnahme Raten von $2,5 \dots 5,0 \times 10^{-15} \text{ mol}/(\text{cm} \cdot \text{s})$, die sich nicht signifikant von denen der Zn-Nitratvariante (zweite bis sechste Stunde) unterschieden. Für Cd ließen sich auch in der Citratvariante keine Aufnahmeraten bestimmen.

Als wesentliche Ursache für das unterschiedliche Verhalten der drei Elemente bei der Entleerung der Verarmungslösung ist im Komplexierungsgrad der drei Elemente mit den Citrationen zu sehen. Die Stabilitätskonstanten der Komplexe ML/M.L lauten für Cu^{2+} 5,90, Zn^{2+} 4,98 und Cd^{2+} 3,75 (MARTELL und SMITH 1977). Bei einer Citratkonzentration von 10^{-4} M ergibt sich daraus, daß 99 % der Cu-, 90 % der Zn- und 36 % der Cd-Ionen als Citratkomplexe vorlagen. Dieser unterschiedliche Komplexierungsgrad erklärt auch die Effekte, die bei der Gleichgewichtseinstellung der Citratvarianten mit dem Apoplasten auftraten. Aufgrund der hohen Stabilität der Cu-Citratkomplexe und der hohen Citratkonzentration werden offenbar Cu-Ionen aus dem Apoplasten herausgelöst, wie auch bei der reinen Citratvariante zu erkennen ist. Die Stabilitätskonstante für Zn-Citrat war kleiner. Deshalb war auch der Effekt der Zn-Freisetzung aus den Wurzeln geringer, aber noch gut meßbar. Offenbar brauchten die Wurzeln (AFS) etwa neun Stunden, um mit der Citratkonzentration der Außenlösung ins Gleichgewicht zu kommen, denn danach sank bei allen drei Elementen die Konzentration in den Verarmungslösungen ab. Dies bedeutet, daß die Pflanzen nach einer Adaptionszeit von ca. neun Stunden in der Lage waren, Elemente auch aus Citratkomplexen aufzunehmen. Es muß allerdings geprüft werden, ob nach neun Stunden ein Citratabbau eingesetzt hat, der zur Freisetzung unkomplexierter Ionen führt, die offenbar von den Wurzeln rasch aus der Lösung entnommen werden können. Dies scheint aber bei den hohen Komplexierungsgraden und den geringen C_{Lmin} -Werten für Cu und Zn unwahrscheinlich. Weiterhin stellt sich die Frage, ob die Citratkomplexe im Apoplasten oder an der Membran aufgespalten werden und ob das freie Ion aufgenommen wird, oder sich Transportmechanismen ausbilden, die den Metall-Citratkomplex durch die Membran schleusen. Für EDTA-Komplexe scheint das nicht der Fall zu sein (BARBER und LEE 1974, zitiert aus MARSCHNER 1995, S. 10).

Schlußfolgerung

Zusammenfassend ergibt sich, daß sich der Komplexierungsgrad der Metallionen bei Anwesenheit von 10^{-4} M Citrat auf den ersten Schritt der Aufnahme (Gleichgewichtsprozesse im AFS) auswirkt. Nach Einstellung eines Gleichgewichtes ist es den Pflanzen möglich, Cu und Zn aus $0,5 \mu\text{M}$ Cu- bzw. $2,0 \mu\text{M}$ Zn-Citratlösungen aufzunehmen. Beim Zn wurden dabei Aufnahmeraten erreicht (9 – 24 h) wie bei Zn-Nitrat-Applikation zwei bis sechs Stunden nach Applikationsbeginn. Infolge der relativ niedrigen Komplexierung des Cd durch Citrat (10^{-4} M) gab es keinen signifikanten Einfluß von Citrat auf die Cd-Aufnahme.

Nach entsprechenden Adaptionszeiten an eine bestimmte Citratkonzentration, die durchaus in Rhizosphärenbodenlösungen 10^{-3} M erreichen kann (GERKE *et al.* 1999), ist somit mit einer hohen Schwermetallkomplexierung, aber auch einer Metallionenaufnahme aus Citratkomplexen zu rechnen. Ob sie niedriger als bei freien Ionen ist, kann noch nicht eindeutig gesagt werden. Die Stabilität der Citratkonzentration (Abbau?) muß mit verfolgt werden.

Danksagung

Wir danken der DFG für ihre Förderung.

Literaturverzeichnis

- BEISSNER, L.; RÖMER, W., 1998: Mobilization of phosphorus by root exudates of sugar beet. *16th World Congress of Soil Science, Montpellier, France; CD-ROM.*
- EGLER, K.; RÖMER, W.; GERKE, J.; KELLER, H., 1999: The influence of phosphorus nutrition on the organic acid exudation of the roots of three lupin species. *Proceedings of the 9th International Lupin Conference in Klink/Müritz, Germany.* [im Druck].
- GERKE, J.; RÖMER, W.; JUNGK, A., 1994: The excretion of citric and malic acid by proteoid roots of *Lupinus albus* L. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **157**, 289–294.
- GERKE, J., 1995: Chemische Prozesse der Nährstoffmobilisierung in der Rhizosphäre und ihre Bedeutung für den Übergang vom Boden in die Pflanze. Göttingen: Cuvillier-Verlag.
- GERKE, J.; WESSEL, E.; EGLER, K.; RÖMER, W., 1999: Heavy metal acquisition by white lupin and yellow lupin. *Proceedings of the 9th International Lupin Conference in Klink/Müritz, Germany.* [im Druck].
- GEELHOED, J. S.; VAN RIEMSDIJK, W. H.; FINDENEGG, G. R., 1999: Simulation of the effect of citrate exudation from roots on the plant availability of phosphate adsorbed on goethite. *European Journal of Soil Science* **50**, 379–390.

- KELLER, H.; RÖMER, W., 1998: Ausscheidung organischer Säuren bei Spinat in Abhängigkeit von der P-Ernährung und deren Einfluß auf die Löslichkeit von Cu, Zn und Cd im Boden. *Pflanzenernährung, Wurzeleistung und Exsudation. 8. Borkheider Seminar zur Ökophysiologie des Wurzelraumes*. W. Merbach (Hrsg.) — Stuttgart, Leipzig: B. G. Teubner Verlagsgesellschaft, 187-195.
- MARTELL, A. E.; SMITH, R. M., 1977: *Critical Stability Constants. 3* — New York: Plenum Press, 163 S.
- MARSCHNER, H., 1995: *Mineral Nutrition of Higher Plants*. — 2. Auflage. London: Academic Press.
- NEUMANN, G.; MASSONNEAU, A.; MARTINOIA, E.; RÖMHELD, V., 1999: Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* **208**, 373-382.
- TENNANT, D., 1975: A test of a modified line intersect method of estimating root length. *Journal of Ecology* **63**, 995-1001.