

15. 11. 1978

SGAE BER. No. 3018

BL-254/78

DEZEMBER 1978

**Berichte der
Österreichischen Studiengesellschaft
für Atomenergie Ges. m. b. H.**

Forschungszentrum Seibersdorf

AUFNAHME VON DREI MARKIERTEN POLYCHLORIERTEN AROMATEN
DURCH CHLORELLA FUSCA

HEINZ WIHLIDAL
GERHARD STEHLIK
WALTRAUD GRÜN
FRANZ WIESINGER

eingelangt HZ
05. 12. 1978

AUFNAHME VON DREI MARKIERTEN POLYCHLORIERTEN AROMATEN
DURCH CHLORELLA FUSCA

Heinz Wihlidal
Gerhard Stehlik
Waltraud Grün⁺
Franz Wiesinger⁺

Arbeitsbericht
Proj. 6202

Österreichische
Studiengesellschaft für Atomenergie
Ges.m.b.H.
Lenaugasse 10 A-1082 Wien

INSTITUT FÜR BIOLOGIE
Forschungszentrum Seibersdorf

⁺ Institut für Chemie, Forschungszentrum Seibersdorf

AUFNAHME VON DREI MARKIERTEN POLYCHLORIIERTEN AROMATEN DURCH CHLORELLA FUSCA

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Aufnahme von markiertem 2,4,5-Trichlorphenoxyäthanol (2,4,5-TE), 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und 2,4,5,2',4',5'-Hexachlorobiphenyl ("PCB") durch *Chlorella fusca* untersucht. Während 2,4,5-TE als ³H-ringmarkierte Verbindung eingesetzt wurde, lagen 2,4-D und "PCB" als ¹⁴C-seitenketten- bzw. ringmarkierte Verbindungen vor. Unter den gewählten Versuchsbedingungen erreichte die Konzentration von 2,4,5-TE in den Algen innerhalb von (längstens) 8 Stunden ein Maximum; die folgende (beträchtliche) Abgabe von markierter Verbindung aus den Algen ist auf Metabolisierung zu 2,4,5-T zurückzuführen. Nach 72 Stunden betrug die Aufnahme für 50 mg (Feuchtwicht) Algen /ml aus 10⁻⁶M 2,4,5-TE-Lösung 1,8%, ein Wert, der mit der innerhalb der gleichen Zeit aufgenommenen Menge von 2,4-D übereinstimmte. Während 2,4-D zu einem geringen Prozentsatz aufgenommen wurde, war die Aufnahme für "PCB" groß, doch in beiden Fällen stellte sich schon nach wenigen Stunden der Aufnahme ein Gleichgewicht zwischen der Konzentration dieser Verbindungen im Aufnahmemedium und in den Algenzellen ein.

SCHLÜSSELWÖRTER

Chlorella fusca/2,4,5-Trichlorphenoxyäthanol/2,4-Dichlorphenoxyessigsäure/2,4,5,2',4',5'-Hexachlorobiphenyl/Aufnahme/Metabolisierung.

Uptake of three labelled polychlorinated aromatics by *Chlorella fusca*.

SUMMARY

The uptake of labelled 2,4,5-Trichlorphenoxyethanol (2,4,5-TE), 2,4-Dichlorphenoxy acetic acid (2,4-D) and 2,4,5,2',4',5'-Hexachlorobiphenyl ("PCB") by *Chlorella fusca* was tested. Whereas 2,4,5-TE was labelled with ³H in the ring system, 2,4-D and "PCB" were labelled with ¹⁴C in the sidechain or ring system, respectively. Under the chosen experimental conditions the concentration of 2,4,5-TE in the algae reached a maximum after 8 hours at least; the following (considerable) release of labelled compound is ascribed to metabolism to 2,4,5-T. After 72 hours the total uptake by 50 mg (moist weight)

Chlorella fusca /ml came to an amount of 1,3 % which was in good accordance with the amount of 2,4-D taken up during the same period. Whereas the uptake was low for 2,4-D it was high for 2,4,5,2',4',5' - Hexachlorobiphenyl ("PCB"); in both cases the uptake led to an equilibrium between the concentration of these compounds in the uptake medium and the cells after a few hours.

KEYWORDS

Chlorella fusca/2,4,5-Trichlorphenoxyethanol/2,4-Dichlorophenoxy acetic acid/ 2,4,5,2',4',5'-Hexachlorobiphenyl/uptake/metabolisation.

AUFNAHME VON DREI MARKIERTEN POLYCHLORIERTEN
AROMATEN DURCH CHLORELLA FUSCA

1. Einleitung

In zunehmendem Maße belasten chemische Rückstände aus Industrie und Landwirtschaft die Gewässer und zeigen dort unerwünschte biologische Wirkungen. Besondere Beachtung verdienen in diesem Zusammenhang halogenhaltige Verbindungen: viele Pflanzenschutzmittel fallen in diese Stoffgruppe, ebenso die in der Industrie häufig verwendeten polychlorierten Biphenyle (PCB's). Aufgrund ihrer (meist) hohen Persistenz werden solche Verbindungen beim Durchlaufen der Nahrungskette erheblich angereichert. Besonderes Augenmerk wurde und wird daher auf Untersuchungen und Rückstandsanalysen dieser Substanzen gelegt (1-5).

Polychlorierte Biphenyle mit niedrigem Chlorierungsgrad werden von einigen Tierarten metabolisiert (4), doch erhöht sich mit dem Chlorierungsgrad die Persistenz und somit die Anreicherung bei Durchlaufen der Nahrungskette (6-8). Tausch et al. (9) konnten zeigen, daß Fische aus oberösterreichischen Gewässern z.T. hohen PCB-Gehalt aufweisen; selbst in Fischen aus "sauberen" Gewässern des Alpenvorlandes war der Gehalt an hexachlorierten Biphenylen verhältnismäßig hoch.

2,4-Dichlorophenoxyessigsäure (2,4-D) gilt als eines der bestuntersuchten Herbizide, besonders in Hinblick auf Aufnahme und Metabolisierung durch höhere Pflanzen (10,11).

Das Herbizid 2,4,5-Trichlorophenoxyäthanol (2,4,5-TE) wurde in Ungarn entwickelt (12), wird dort produziert und in der Landwirtschaft, hauptsächlich im Weinbau, eingesetzt; evtl. Belastungen von Flora und Fauna durch diese Verbindung bzw. deren Metaboliten sind (daher) vor allem in Ostösterreich zu erwarten. Altmann et al. (13) untersuchten Aufnahme und Metabolisierung von 2,4,5-TE durch Weinblätter und *Chlamydomonas reinhardi*, wobei keine Metabolisierung durch diese Grünalge festgestellt werden konnte.

In der folgenden Arbeit sollte die Aufnahmekinetik bzw. Anreicherung der drei genannten Verbindungen durch einen Mikroorganismus im aquatischen System studiert werden. Da Algen in heimischen Gewässern z.T. sehr stark vertreten sind, und ein Glied der Nahrungskette darstellen, bot sich die einzellige Süßwasseralge *Chlorella fusca* (früher *Chlorella pyrenoidosa*) als Studienobjekt an. In einer früheren Arbeit an unserem Institut konnte bereits gezeigt werden, daß Quecksilber, ein hoch toxischer Umweltschadstoff, in Chlorellazellen stark angereichert wird (14).

2. Material

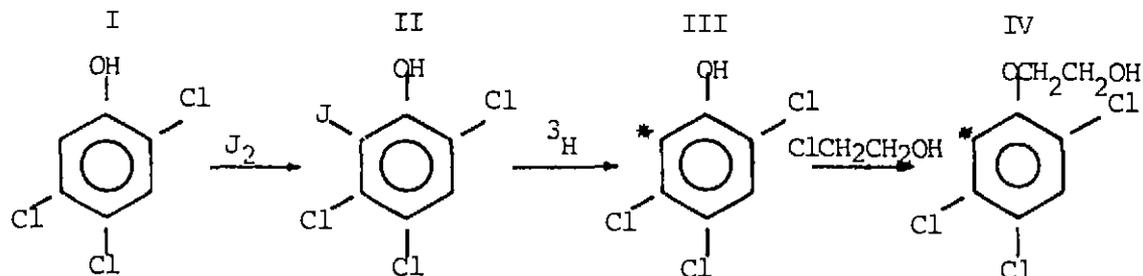
2.1. Alge

Chlorella fusca, Stamm Emerson 211-8b, der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen, wurde in einem von LORENZEN (15) angegebenen Nährmedium bei 30° C autotroph und asynchron, d.h. unter Begasung mit einem Luft-CO₂-Gemisch (2-3 % CO₂) und bei Dauerlicht, gezüchtet.

2.2. Radiochemikalien

2.2.1. 2,4,5-Trichlorphenoxyäthanol (2,4,5-TE)

2,4,5-TE wurde als ³H-ringmarkierte Verbindung eingesetzt und im Institut für Chemie des Forschungszentrums Seibersdorf nach folgendem Schema synthetisiert:



Diese Methode der Ringmarkierung führte zu einem Produkt hoher radiochemischer Reinheit (> 99 %). Die in der Literatur (16,17) angegebenen Verfahren zur Gewinnung tritierter Halogenbenzole bzw. Halogenphenole aus den entsprechenden Bromderivaten brachten hingegen keine befriedigenden Ergebnisse, da über die Substitution des Bromatoms hinaus weiterhin Tritium aufgenommen wurde; als Folge traten chlorärmere Phenolderivate als Nebenprodukte auf. Die spezifische Aktivität betrug 100 µCi/mg; es wurden Standardlösungen in abs. Äthanol zu 24, 240 und 2400 µCi/ml bereitet.

2.2.2. 2,4-Dichlorphenoxy-(2-¹⁴C)-essigsäure (2,4-D)

2,4-D wurde als benzolische Lösung von "The Radiochemical Centre Amersham", England, bezogen und hatte bei einer radiochemischen Reinheit von 99 % eine spezifische Aktivität von 144 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$. Nach Abblasen des Benzols unter Stickstoffatmosphäre wurde 2,4-D in abs. Äthanol aufgenommen, so daß die Standardlösungen Aktivitäten von 33 bzw. 167 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ aufwiesen.

2.2.3. 2,4,5,2',4',5'-[¹⁴C(U)]-Hexachlorobiphenyl ('PCB')

Diese Verbindung lieferte "New England Nuclear" mit einer spezifischen Aktivität von 25 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ und einer radiochemischen Reinheit von 99 %. Die spezifische Aktivität des eingesetzten Standards (gelöst in Dimethylsulfoxid) betrug 19 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$.

3. Experimentelles

Die Aufnahme der markierten Verbindungen wurde an Algenzellen studiert, wobei sowohl Algenkonzentration als auch die Konzentration der zu untersuchenden Substanzen variiert wurden. Zur Feststellung der rein adsorptiv gebundenen Mengen der eingesetzten markierten Verbindungen wurden hitzgetötete Zellen verwendet; das Abtöten erfolgte durch kurzzeitiges Erhitzen auf ca. 80° C. Für die Aufnahmeversuche wurde die den Zuchtgefäßen entnommene Algensuspension ca. 2 Minuten bei 1.100 x g zentrifugiert und 2 x durch Zugabe von Puffer I ($5 \cdot 10^{-3}$ M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + 10^{-2} M KNO_3 , pH 6) und Abzentrifugieren (wie vor) gewaschen. Nach Bestimmung des Feuchtgewichtes (FG) sowie der Zellzahl wurden die Algen in Puffer I aufgenommen. Vor Zusatz der zu untersuchenden markierten Verbindungen wurden die Algensuspensionen 1 Stunde "vorkonditioniert" (18), d.h. unter den Bedingungen des nachfolgenden Versuches gehalten. Die Aufnahme erfolgte unter Licht-Luftbedingungen bei 30° C, wobei der Luftstrom - im Gegensatz zu den Zuchtbedingungen - über Gaswaschflaschen mit 40 %-iger KOH geleitet wurde, um CO_2 zu absorbieren; unter dieser Voraussetzung leben die Algenzellen weiter, doch wird Zellteilung vermieden, wie durch Anfärben mit Berberinsulfat (1:5000) bzw. Zellzahlbestimmung festgestellt werden konnte. Nach dem Zusetzen der markierten Substanzen wurden zu bestimmten Zeiten aliquote Proben (1 ml) gezogen, unter vermindertem Druck über Selectron-Membranfilter AE-99 der Fa. Schleicher & Schüll filtriert und mit inaktiver Trägerlösung gewaschen. Dabei handelte es sich bei 2,4,5-TE und 2,4-D um 5 %-ige alkoholische Lösungen in Puffer I mit einer Konzentration von jeweils 10^{-3} M; das PCB war zu 10^{-5} M entsprechend in DMSO und Puffer I gelöst. Die gewaschenen Filter und Algen wurden luftgetrocknet und anschließend in Verbrennungshütchen (Combusto Cones) übergeführt. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität in der Algensuspension wurde je-

weils 1 ml derselben entnommen und direkt in Combusto Cones pipettiert. Die Verbrennungshütchen wurden im Sample Oxidizer, Modell 306 der Fa. Packard, verbrannt und die Aktivität wurde im Liquid Scintillation Spectrometer, Modell 3375 der Fa. Packard, gemessen.

In Vorversuchen wurde festgestellt, inwieweit die verwendeten markierten Verbindungen durch die Membranfilter absorbiert werden; dazu wurden diese mit Lösungen von 2,4,5-TE, 2,4-D und "PCB" der zu untersuchenden Konzentration - jedoch ohne Algen - wie im Aufnahmeversuch behandelt. Die gemessenen (stets niedrigen) Werte wurden bei Auswertung der Aufnahmeergebnisse berücksichtigt.

4. Ergebnisse und Diskussion

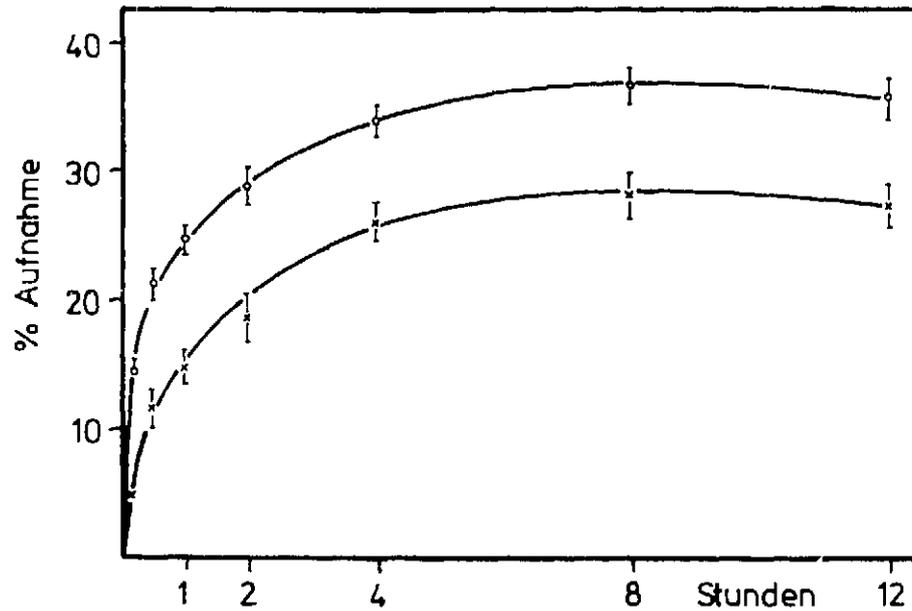


Abb.1: Aufnahme von 2,4,5-TE durch (lebende) *Chlorella fusca* (10mg FG/ml)
○—○ 10⁻⁴ M ×—× 10⁻³ M

Abb. 1,2 zeigen die Aufnahme von 2,4,5-TE im Konzentrationsbereich von 10⁻³ M bis 10⁻⁷ M durch *Chlorella fusca*, d.h. den prozentuellen, durch Trägerlösung nicht abwaschbaren Anteil der markierten Verbindung in den Algenzellen. Die Algensuspension enthielt jeweils 10 mg Zellen (FG) pro ml, entsprechend einer Zellzahl von 4,6 · 10⁶. Es zeigt sich, daß die Aufnahme nach 2 Stunden (für 10⁻⁵ M bis 10⁻⁷ M) bzw. 8 Stunden (für 10⁻³ M und 10⁻⁴ M 2,4,5-TE) ihre höchsten Werte erreicht;

anschließend wird markierte Verbindung in das Außenmedium abgegeben. Für 10^{-5} bis 10^{-7} M 2,4,5-TE sind die prozentuellen Aufnahmen annähernd gleich, die Anreicherung von 2,4,5-TE in den Algen beträgt nach 2 Stunden 1:280, entsprechend einer aufgenommenen Menge von 0,8, 0,08 und 0,008 μg , bezogen auf 10 mg Algen (FG).

Aufgrund der zunächst unerklärlichen Abgabe der markierten Verbindung - speziell bei 10^{-7} M 2,4,5-TE deutlich zu sehen (siehe Abb.2) - wurden 1. die Aufnahme über einen größeren Zeitraum als 12 Stunden und 2. eine eventuelle Abhängigkeit der Aufnahme (bei gleichbleibender 2,4,5-TE Konzentration) von der Algenkonzentration untersucht.

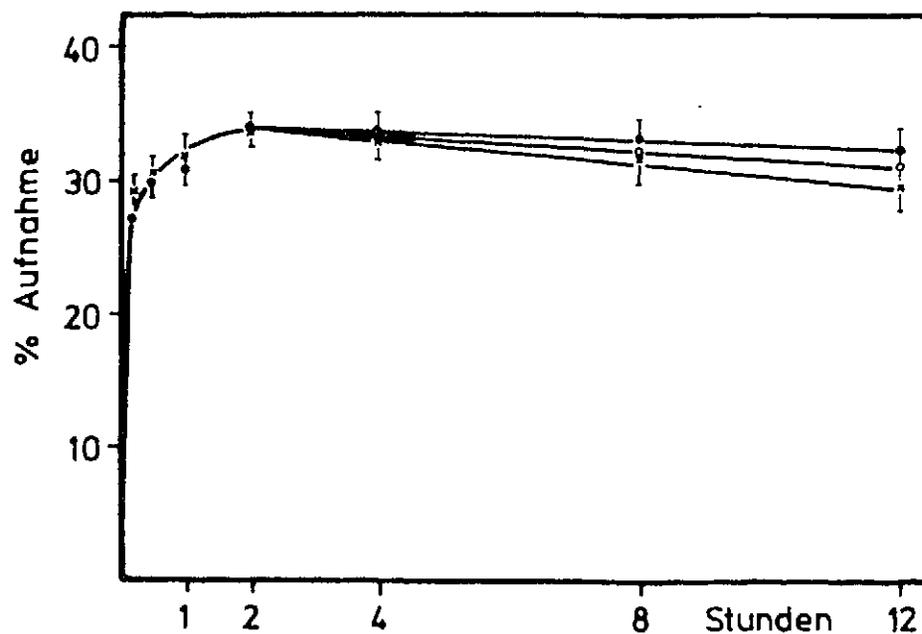


Abb. 2: Aufnahme von 2,4,5-TE durch (lebende) Chlorella fusca (10 mg FG/ml)
—•— 10^{-5} M —○— 10^{-6} M —■— 10^{-7} M

In Abb. 3 sind die Aufnahmekurven für 50 mg Algen ($23 \cdot 10^6$ Zellen/ml)

pro ml Algensuspension und 10^{-6} M 2,4,5-TE dargestellt. Man sieht, daß sowohl die Aufnahme als auch die anschließende Abgabe der markierten Verbindung stark zellzahlabhängig sind. Bei 50 mg Zellen/ml wird bereits nach ca. 16 Stunden mit 1,8 % ein Wert erreicht, der sich bis Versuchsende kaum ändert. Da eine Abgabe von bereits aufgenommenem 2,4,5-TE aus der Zelle eher unwahrscheinlich ist, wurde dieser Effekt auf Metabolisierung zurückgeführt. Tatsächlich konnte in einer weiteren Arbeit (19) gezeigt werden, daß *Chlorella fusca* 2,4,5-TE zu 2,4,5-T metabolisiert und an das Außenmedium abgibt. Der (dafür gefundene) Endwert von 1,8 % stimmt mit dem Aufnahmewert für 2,4-D annähernd überein (vgl. die für 50 mg FG/ml gefundenen Werte in Abb. 3 und 4).

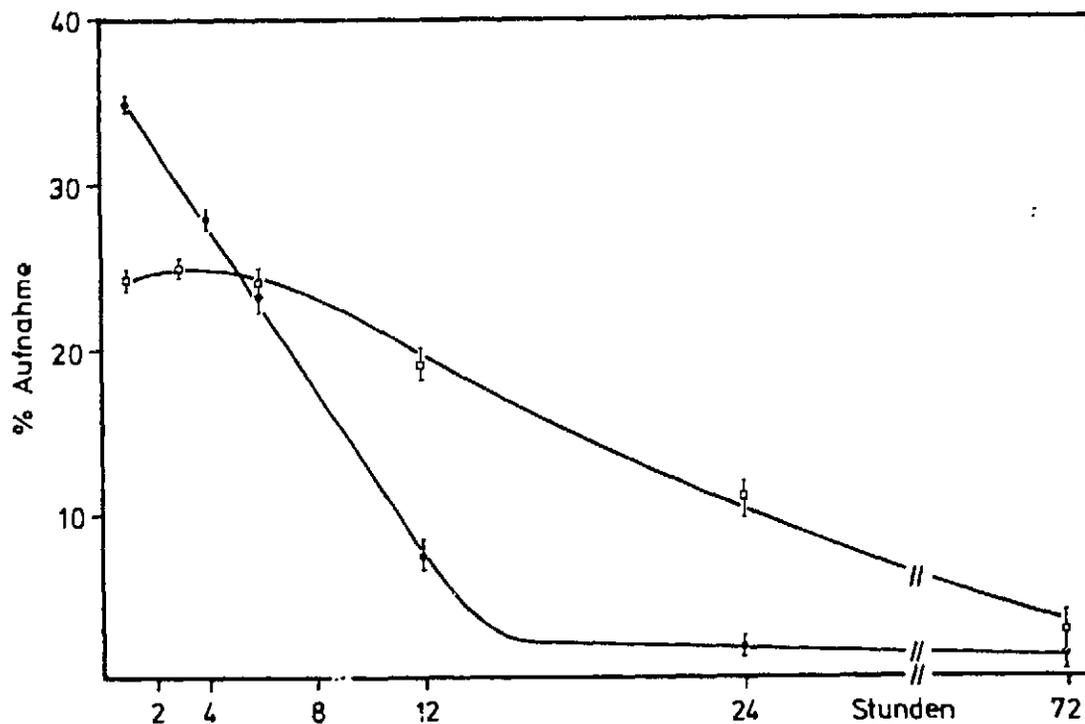


Abb. 3: Aufnahme von 2,4,5-TE durch (lebende) *Chlorella fusca*
○—○ 10⁻⁶ M (5mg FG/ml) ●—● 10⁻⁶ M (50 mg FG/ml)

In Abb. 4 ist die Aufnahme von 2,4-D (10^{-6} und 10^{-7} M) durch Chlorellazellen (10 und 50 mg FG/ml) dargestellt. In allen untersuchten Fällen stellt sich

schon nach ca. 2 bis maximal 12 Stunden ein Gleichgewicht zwischen der 2,4-D Konzentration im Außenmedium und in den Algenzellen ein, das bis Versuchsende (72 Stunden) erhalten bleibt. Der Anreicherungsfaktor von 10^{-6} M 2,4-D liegt für 50 mg FG/ml ($23 \cdot 10^6$ Zellen/ml) bei 3,5. Da diese Aufnahmewerte für das in der Seitenkette markierte 2,4-D mit denen des ringmarkierten 2,4,5-T (durch Metabolisierung aus 2,4,5-TE) gut übereinstimmen, kann man schließen, daß es sich bei der aufgenommenen Verbindung um das intakte Molekül handelt, d.h. daß die Ätherbindung nicht aufgespalten wurde, ohne eine eventuelle andere Metabolisierung ausschließen zu können. Weiters scheint, daß das eine zusätzliche Cl-Atom (in der Stellung 5) keinen wesentlichen Einfluß auf die Aufnahme durch Algen bzw. weitere Metabolisierungsabläufe der geprüften Verbindung hat.

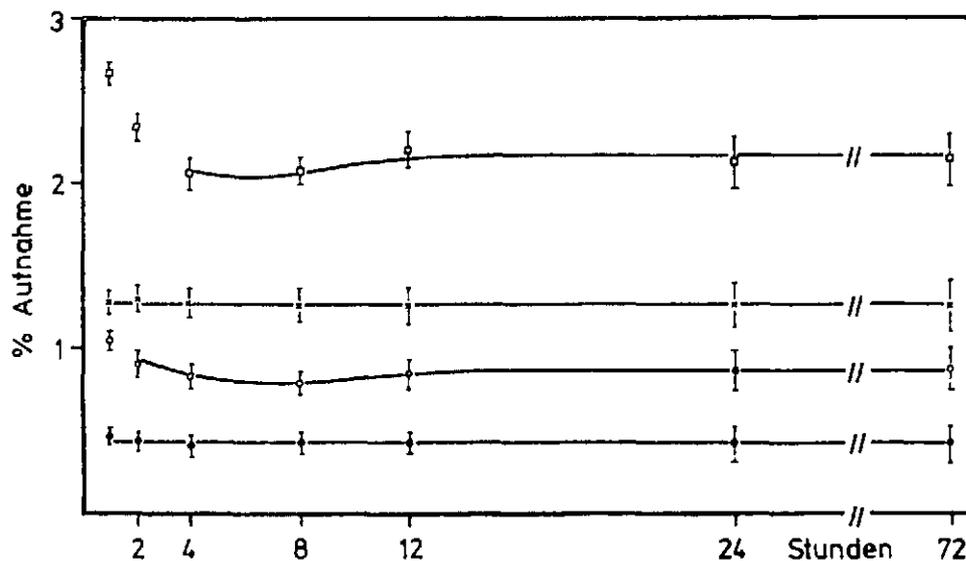


Abb.4: Aufnahme von 2,4-D durch *Chlorella fusca*

- 10^{-6} M, lebend (50 mg FG/ml)
- 10^{-7} M, lebend (10 mg FG/ml)
- 10^{-6} M, lebend (10 mg FG/ml)
- 10^{-6} M, tot (50 mg FG/ml)

In Abb. 5 ist die Aufnahme von 2,4,5,2',4',5'-Hexachlorobiphenyl (10^{-6} M und 10^{-7} M) durch Chlorellazellen (50 mg FG/ml) wiedergegeben. Während es an toten Zellen nur in geringem Ausmaß gebunden wird, nehmen lebende Zellen dieses PCB prozentuell sehr stark und rasch auf, die Gleichgewichtseinstellung erfolgt in diesem Fall bereits nach 2 bis 4 Stunden; der Anreicherungsfaktor liegt mit 130 sehr hoch, d.h. in der Nahrungskette erfolgt für PCB's bereits auf der Stufe Wasser-Alge eine starke Anreicherung.

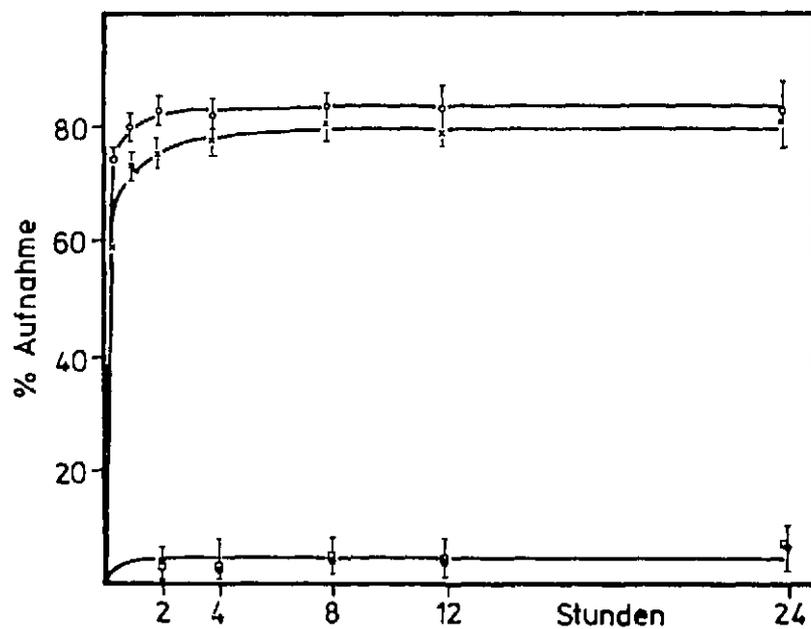


Abb.5: "PCB"-Aufnahme durch *Chlorella fusca* (50 mg FG/ml)

○ 10^{-7} M, lebend □ 10^{-6} M, lebend
● 10^{-6} M, tot ■ 10^{-7} M, tot

LITERATUR

1. BEVENUE A., ZWEIG G., NASH N.L.: J. Assoc. off. agric. Chemists 45, 990 (1962)
2. CLARK D.E., WRIGHT F.C., HUNT L.M.: J. agric. Food Chem. 15, 171 (1967)
3. ZWEIG, G.: Analytical Methods for Pesticides, Plant Growth Regulators and Food Additives 4, 247 (1964), Academic Press New York and London
4. HUTZINGER O., NASH D.M., SAFE S., DE FREITAS A.S.W., NORSTROM R.J., WILDISH D.J., ZITKO V.: Science 178, 312 (1972)
5. FISHEIN L.: J. Chromatogr. 68, 345 (1972)
6. BURSE V.W., KOMBROUGH R.D., VILLANUEVA E.C., JENNINGS R.W., LINDER R.E., SCVOOOL G.W.: Arch. Environ. Health 29, 301 (1974)
7. BAGLEY G.E., REICHEL W.L., CROMARTIE E.: J. Assoc. off. Anal. Chem. 53, 251 (1970)
8. ZITKO V., HUTZINGER O., CHOI P.M.K.: Environ. Health Perspectives 1, 47 (1972)
9. TAUSCH H., WIHLIDAL H., STEHLIK G.: SGAE-Bericht 2808 (1977)
10. CASIDA J.E., LYKKEN L.: Ann.Rev. Plant Physiol. 20, 607 (1969)
11. MORELAND D.E.: Ann.Rev. Plant Physiol. 18, 365 (1967)
12. Development of a Pesticide as a Complex Scientific Task (Research Related to the Herbicide Buvinol produced by Budapest Chemical Works) in: Banki, L., ed., Medicina (1976)
13. ALTMANN H., VINCE T., BALO J.M., HAROUN I., KOVACS J., ANTONI F.: unveröffentlicht
14. WIHLIDAL H., STEHLIK G., EISENREICH W., BIEBL R.: Die Bodenkultur 27, 7 (1976)
15. LORENZEN H.: in Zeuthen, E., ed., Synchrony in cell division and growth, New York: Interscience Publ., p. 571 (1964)
16. OTTO P.: J. Labelled Comp. 1, 115 (1965)

17. HESSELBO T.: Int. J. Appl. Rad. & Isot. 16, 329 (1964)
18. WIHLIDAL H.: Disseratation Universität Wien (1972)
19. STEHLIK G., TAUSCH H., BARON M., WIHLIDAL H., GRÜN W.: SGAE-Bericht
November 1978 (in Druck)

SGAE-Berichte: Eigentümer, Herausgeber, Verleger und Druck:
Österreichische Studiengesellschaft für Atomenergie Ges.m.b.H.
Nach dem Pressegesetz verantwortlich:
a.o. Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. Franz JEGLITSCH,
alle Lenaugasse 10, 1082 Wien, Tel. (0222) 42 75 11, Telex 7-5400

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor.