

AUFNAHME, METABOLISMUS UND RÜCKSTANDSVERHALTEN ORGANISCHER XENOBIOTIKA IN PFLANZEN

Elke Kottutz und Hans Harms

ABSTRACT

Organic xenobiotica are known to be taken up and metabolized by plants and plant cell suspension cultures. In this investigation several plant cell suspension cultures and one organ-(root)-culture have been used to determine whether polycyclic aromatic hydrocarbons like anthracene or phenanthrene have any influence on growth or on metabolism. Anthracene was taken up by all test systems and metabolized in different ways. In suspension culture, storage of the xenobiotic and its metabolites in the cells could be detected as well as their exudation into the culture medium.

Although the organ-(root)-culture of *Lupinus hartwegii* L. took up anthracene and phenanthrene in the same amount, the distribution of the original and bound compounds was considerably different.

In experiments with tomato plants neither anthracene nor phenanthrene were taken up in large amounts. The plant/soil ratio was lower than 0.025 for both compounds. Microbial degradation in anthracene contaminated soil containing plants (detected as evolved $^{14}\text{CO}_2$) was found to be 5-6 times higher than in containers without plants. These differences did not occur with phenanthrene. When double concentrations of phenanthrene were applied mineralization remained constant in both concentrations.

keywords: *organic xenobiotica, polycyclic aromatic hydrocarbonats, anthracene, phenanthrene, Lupinus hartwegii L.*

1. EINLEITUNG

Zielsetzung des Projektes sind Untersuchungen zur Aufnahme, zum Metabolismus und zum Rückstandsverhalten relevanter organischer Xenobiotika in pflanzlichen Systemen. Pflanzliche Zell- und Organkulturen sowie intakte Pflanzen können organische Xenobiotika aufnehmen und metabolisieren (HARMS 1989). Als Umwandlungsprodukte entstehen überwiegend polare Konjugate mit Kohlenhydraten und Aminosäuren (HARMS und LANGE-BARTELS 1986, LANGE-BARTELS und HARMS 1984, WINKLER und SANDERMANN 1989). Diese werden in der Zelle gespeichert bzw. in nicht-extrahierbare Rückstandsfraktionen eingebaut. Ferner werden sie bei einigen Suspensionskulturen wieder in die Nährlösung ausgeschieden. Die in den persistenten Rückstandsfraktionen an unterschiedliche Zellwandbestandteile assoziierten bzw. festgelegten Verbindungen sind teilweise enzymatisch abbaubar, so daß die gebundenen Stoffe freigesetzt und wieder bioverfügbar werden. Aus den Kenntnissen über die Art der Bindung lassen sich mögliche ökotoxikologische Risiken abschätzen (HARMS und LANGE-BARTELS 1988).

2. MATERIAL UND METHODEN

Zellsuspensions- bzw. Organkulturen

Verschiedene Zellsuspensionskulturen sowie eine Organkultur von *Lupinus hartwegii* L. wurden im Dunkeln bei 27 °C auf einem Horizontalschüttler kultiviert. Nach aseptischer Zugabe des zu untersuchenden ¹⁴C-markierten Xenobiotikums am Ende der linearen Wachstumsphase wurden die Kulturen für weitere 48 h inkubiert.

Die Aufarbeitung erfolgte wie bei HARMS (1989) beschrieben. Ergänzend zu den bisherigen Verfahren wurden die Filtrate der Kulturmedien und der Zellextrakte über Festphasen-Extraktion an einer Reversed-Phase-Säule mit 3 ml Füllvolumen und Octadecylsilan als Trägermaterial aufkonzentriert und vorgetrennt. Zur Aktivierung des Trägermaterials wurden zunächst je 2 Säulenvolumen n-Hexan, Methanol und H₂O unter leichtem Vakuum durch die Säule gesaugt. Die Fraktionierung der Probe erfolgte durch Elution mit je 2 Säulenfüllungen n-Hexan, Dichlormethan, Ether und Methanol. Nach dem Einengen wurden diese Fraktionen über DC bzw. HPLC chromatographisch weiter analysiert, um gebildete Metabolite zu isolieren und zu identifizieren.

Untersuchungen zum Boden/Pflanze Transfer

Für die Untersuchungen zur Aufnahme von Xenobiotika aus kontaminierten Böden durch Tomatenpflanzen wurde eine von HELAL und SAUERBECK (1984) entwickelte, für diesen spezifischen Versuchsansatz aber entsprechend abgeänderte Technik eingesetzt. Mit der modifizierten Versuchsanordnung war es möglich, den Wurzelbereich luftdicht vom Sproßbereich abzutrennen und so die wirkliche Aufnahme und den Transport des applizierten Xenobiotikums in oberirdische Organe zu verfolgen.

Die ¹⁴C-markierten Substanzen wurden in 5 bzw. 10 ppm Konzentrationen dem Boden appliziert. Zur homogenen Verteilung im Boden wurden die Substanzen in Dichlormethan gelöst und auf 100 g Quarzsand geträufelt. Dieser wurde nach Verdunsten des Lösungsmittels unter 1100 g Schwarzerde (Asel, 2 mm gesiebt) gemischt und in die Pflanzcontainer gefüllt. Pro Gefäß wurde eine ca. 35 Tage vorkultivierte Tomatenpflanze eingesetzt.

Der Versuchsansatz umfaßte jeweils 3 Parallelen, dazu 3 Kontrollen mit Bepflanzung, aber ohne Xenobiotikum, bzw. 3 Kontrollen ohne Bepflanzung mit Xenobiotikum.

Um eine mögliche Dunkelfixierung von mikrobiell freigesetztem ¹⁴CO₂ durch die Pflanzen zu bestimmen, wurde den mit Xenobiotika behandelten Containern ein zweiter bepflanzter, aber unbehandelter nachgeschaltet.

Zur Bindung eventuell flüchtiger Verbindungen wurden Polyurethanstopfen in den Versuchsaufbau integriert.

3. ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungen zur Aufnahme und zum Metabolismus von Anthracen in Zellsuspensionskulturen der monokotylen Pflanzen Pennisetum, Gerste, Weizen sowie der dikotylen Pflanzen Sojabohne, Möhre und Chenopodium

Aus vorhergehenden Untersuchungen (HARMS et al. 1986, 1988) war bekannt, daß Zellkulturen chlorierte Xenobiotika in unterschiedlichem Maß aufnehmen, metabolisieren und in gebundene Rückstandsfractionen einbauen. Besonders monokotyle Pflanzenarten zeigten in diesem Zusammenhang extrem hohe Einbauraten in den gebundenen Rückstandsfractionen. Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte untersucht werden, ob polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe in gleichem Umfang aufgenommen und in ähnlicher Weise in den Stoffwechsel einbezogen werden.

Die Ergebnisse mit verschiedenen monokotylen und dikotylen Pflanzenarten sind in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt.

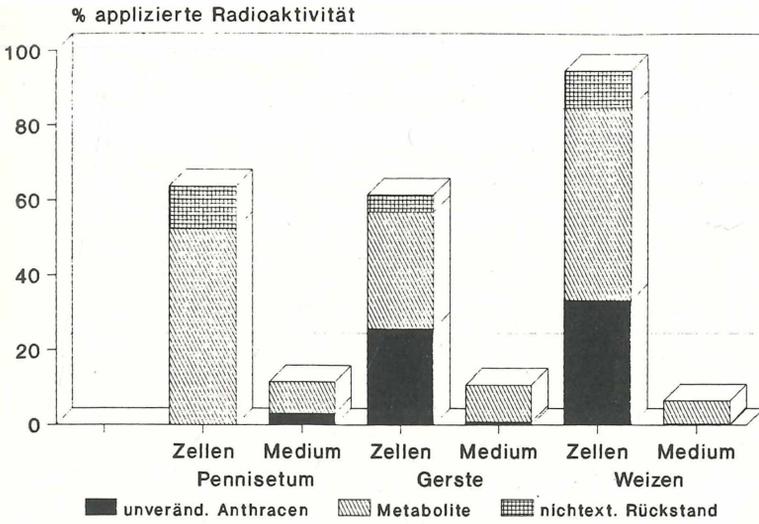


Abb. 1: Metabolismus von Anthracen in Zellkulturen von Pennisetum, Gerste und Weizen.

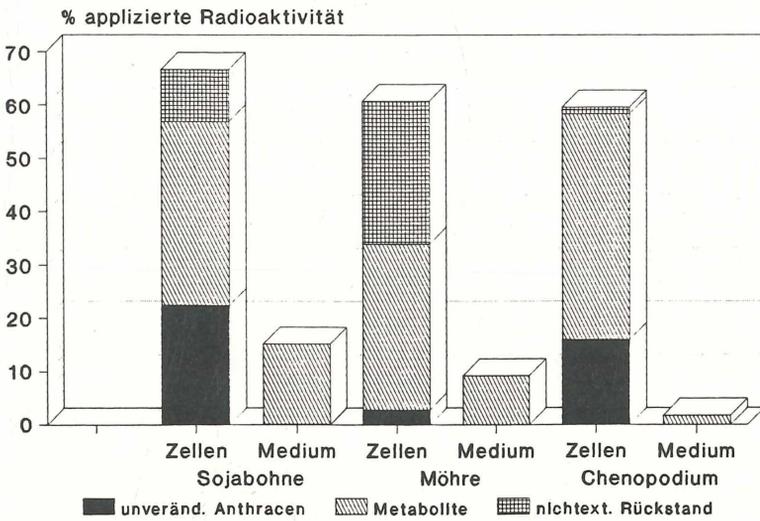


Abb. 2: Metabolismus von Anthracen in Zellkulturen von Sojabohne, Möhre und Chenopodium.

Die eingesetzten Zellkulturen nahmen Anthracen zu ungefähr 60-70 % auf; der Metabolitanteil lag im Durchschnitt bei 30-40 %. Der Anteil von Anthracen bzw. seinen Umwandlungsprodukten in den nicht-extrahierbaren Rückstandsfractionen betrug weniger als 10 %. Bei den dikotylen Pflanzenarten war der überwiegende Anteil mit der Pektinfraktion, bei den monokotylen Arten sowohl mit der Pektin- als auch mit der Ligninfraktion assoziiert. Ein geringer Anteil wurde bei allen Pflanzenarten auch in der Hemicellulosefraktion gefunden. Cellulose-assoziate waren fast nicht nachweisbar.

3.2 Aufnahme und Metabolismus von Anthracen und Phenanthren in Organ-(Wurzel-)kulturen von *Lupinus hartwegii* L.

Für Untersuchungen zur Aufnahme und zum Stoffwechselverhalten von Xenobiotika sind Organ-(Wurzel-)kulturen von besonderem Interesse, da sie ein Bindeglied zwischen pflanzlichen Zellkulturen und intakten Pflanzen darstellen. Sie werden in gleichen Nährmedien wie Zellkulturen kultiviert, weisen aber ein differenziertes Gewebe auf und verfügen über einen Zellaufbau, der dem eines intakten Pflanzenorgans entspricht.

Im vorliegenden Versuch wurde der Einfluß von Anthracen und Phenanthren untersucht. Tabelle 1 faßt die Ergebnisse zusammen.

Tab. 1: Aufnahme und Verteilung der Radioaktivität von ^{14}C -markiertem Anthracen bzw. Phenanthren in aseptisch kultivierten Organkulturen von *Lupinus hartwegii* L.

| | % der applizierten Radioaktivität | |
|-------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| | <u>Anthracen</u> | <u>Phenanthren</u> |
| Nährlösung | | |
| unveränd. Ausgangsstoff | 1.6 | 4.7 |
| Metabolite | 6.8 | 0.1 |
| Zellen | | |
| unveränd. Ausgangsstoff | 6.3 | 42.1 |
| Metabolite | 26.4 | 11.5 |
| Rückstand | 39.7 | 17.5 |

Die Organ-(Wurzel-)kultur von *Lupinus hartwegii* L. nahm zugesetztes Anthracen zu 72 % und Phenanthren zu 70 % auf. Trotz gleicher Aufnahme rate der beiden Drei-Ring-Systeme tritt aufgrund der andersartigen Konfiguration ein sehr erheblicher Unterschied im Stoffwechsel dieser Verbindungen auf. Während das linear konfigurierte Anthracen zu fast 26 % in polare Verbindungen umgesetzt wird, beträgt die Metabolisierung des nicht linearen Phenanthrens nur 11,5 %. Entsprechend wird auch nur etwa die Hälfte des Phenanthrens in den unlöslichen Rückstand eingebaut.

Bei der Fraktionierung des unlöslichen Rückstandes wurden bei Anthracen als Hauptanteile Pektin-, Lignin- und Hemicelluloseassoziate und in geringen Mengen auch solche mit Cellulose gefunden.

3.3 Gefäßversuch mit Anthracen und Phenanthren kontaminiertem Boden und Tomaten als Indikatorpflanze

Zur Bestimmung des Transfers Boden/Pflanze wurden intakte Tomatenpflanzen auf mit Anthracen bzw. Phenanthren kontaminierten Böden kultiviert. Ferner wurde die mikrobielle und pflanzliche Abbaubarkeit dieser Substanzen durch Bestimmung von mineralisiertem $^{14}\text{CO}_2$ ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tab. 2: Aufnahme und Verteilung der Radioaktivität von ^{14}C -markiertem Anthracen bzw. Phenanthren in in steril kultivierten Tomatenpflanzen sowie im Boden und in der Abluft

| | % der applizierten Radioaktivität nach 4-wöchiger Inkubation | | | |
|-----------------------------|---|--------|------------------------|-------|
| | Sproß | Wurzel | freiges. CO_2 | Boden |
| Anthracen | | | | |
| Kontrolle o. Bepflanzung | - | - | 7.7 | 80.2 |
| 5 ppm | 0.9 | 0.5 | 42.4 | 40.8 |
| 10 ppm | 0.8 | 0.6 | 42.4 | 36.8 |
| Phenanthren | | | | |
| Kontrolle o. Bepflanzung | - | - | 36.8 | 32.0 |
| 5 ppm | 1.2 | 0.7 | 39.9 | 35.1 |
| 10 ppm | 1.7 | 0.6 | 15.5 | 50.6 |
| nachges. Pflanze | 1.0 | 0.2 | - | 2.6 |

Bei der Anzucht von Tomatenpflanzen auf kontaminierten Böden kam es bei keinem der applizierten Xenobiotika bzw. ihrer Metaboliten zu einer Anreicherung in der Pflanze gegenüber dem Boden. Der mikrobielle Abbau des Anthracens in den bepflanzten Containern verlief etwa 6 mal schneller als bei den nicht bepflanzten Kontrollen. Möglicherweise bewirken starke Durchwurzelung und Ausscheidung organischer Pflanzenstoffe eine Vermehrung der Bodenmikroorganismen und damit den schnellen Abbau von Anthracen. Trotz unterschiedlicher Konzentrationen im Boden wurden gleiche %-Gehalte bis zu CO_2 mineralisiert.

Der Abbau von Phenanthren verlief in den nicht bepflanzten Containern schneller als beim Anthracen. Auffallend ist, daß - im Gegensatz zum Anthracen - bei doppelter Konzentration die Mineralisation für beide Konzentrationen konstant blieb. Den mit 10 ppm Phenanthren behandelten, bepflanzten Containern wurde ein ebenfalls bepflanzter, aber unbehandelter Container nachgeschaltet, um eine Fixierung des durch mikrobielle Tätigkeit im Boden freigesetzten CO_2 durch die Pflanze zu untersuchen. Wie die Versuchsdaten zeigen, ist in der nachgeschalteten Pflanze Radioaktivität nachweisbar, sodaß eine Dunkelfixierung des CO_2 anzunehmen ist.

In einem Parallelansatz wurden eventuell flüchtige Verbindungen an Polyurethan gebunden und analysiert. Es konnte nur eine sehr geringe Radioaktivität in dieser Fraktion nachgewiesen werden.

Der Transferfaktor Pflanze/Boden betrug bei Anthracen für beide getesteten Konzentrationen 0,014. Für Phenanthren wurden Faktoren von 0,019 (5 ppm) bzw. 0,023 (10 ppm) und für die nachgeschaltete Pflanze von 0,011 ppm bestimmt.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzlichen Zellkulturen appliziertes Anthracen wurde von diesen aufgenommen und zum Teil metabolisiert. Nur ein geringer Anteil an radioaktivem Anthracen bzw. seinen Umwandlungsprodukte ($< 10\%$) wurde in den nicht-extrahierbaren Rückstandsfractionen nachgewiesen. In Abhängigkeit von der Pflanzenspezies wurden unterschiedliche Metabolitkonzentrationen im Kulturmedium gefunden. Ähnliches wurde bereits von LANGEBARTELS und HARMS (1984) für verschiedene Xenobiotika mit Sojabohnen- und Weizenzellkulturen nachgewiesen.

Die Organ-(Wurzel-)kultur von *Lupinus hartwegii* L. nahm Anthracen und Phenanthren zwar in etwa gleichen Mengen auf, setzte die Xenobiotika jedoch in unterschiedlichem Maße um. Intakte Tomatenpflanzen nahmen die applizierten Xenobiotika nur in geringen Mengen auf; zu einer Anreicherung in der Pflanze gegenüber dem Boden kam es nicht. Der Transferfaktor lag sowohl für Anthracen als auch für Phenanthren unter 0,025.

Die vorstehenden Untersuchungen wurden im Rahmen des Umweltforschungsplanes des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) vom Umweltbundesamt unterstützt.

Ferner danken die Autoren Herrn Dr. J. Berlin, Institut für Biochemie, Biologische Bundesanstalt, Braunschweig, für die Überlassung der transformierten Organ-(Wurzel-)kultur von *Lupinus hartwegii* L.

LITERATUR

- HARMS H., 1989: Pflanzliche Zellsuspensionskulturen - ein System zum Studium des Abbauverhaltens von Chemikalien. - Berichte über Landwirtschaft. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin, Sonderheft 201: 284-297.
- HARMS H., LANGEBARTELS C., 1986: Standardized plant cell suspension test systems for an ecotoxicologic evaluation of the metabolic fate of xenobiotics. - Plant Science 45: 157-165.
- HARMS H., LANGEBARTELS C., 1988: Einbau von Umweltchemikalien und deren Umwandlungsprodukten in unlösliche Rückstände höherer Pflanzen. - Jül-Spez-441, Bd 11: 131-146.
- HELAL H. M., SAUERBECK D. R., 1984: Influence of plant roots on C and P metabolism in soil. - Plant and Soil 76: 175-182.
- LANGEBARTELS C., HARMS H., 1984: Metabolism of Pentachlorophenol in cell suspension cultures of soybean and wheat: Pentachlorophenol Glucoside Formation. - Z. für Pflanzenphys. 113: 201-211.
- WINKLER R., SANDERMANN H. JR., 1989: Plant metabolism of chlorinated Anilines: Isolation and identification of N-Glucosyl and N-Malonyl conjugates. - Pesticide Biochemistry and Physiology 33: 239-248

ADRESSE

Dr. Elke Kottutz
Dr. Hans Harms
Institut für Pflanzenernährung
und Bodenkunde der FAL
Bundesallee 50
D-W-3300 Braunschweig

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie](#)

Jahr/Year: 1991

Band/Volume: [19 3 1991](#)

Autor(en)/Author(s): Kottutz Elke, Harms Hans

Artikel/Article: [Aufnahme, Metabolismus und Rückstandsverhalten organischer Xenobiotika in Pflanzen 183-188](#)