

Aerober Abbau von Endosulfan durch Bodenmikroorganismen

Aerobic Degradation of Endosulfan by Microorganisms

Michael Perscheid, Horst Schlüter und Karlheinz Ballschmiter

Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

(Z. Naturforsch. **28 c**, 761–763 [1973]; eingegangen am 25. Juli 1973)

Endosulfan, biodegradation, microorganisms, *Pseudomonas*, cyclodien-insecticides

Microbial degradation of both the isomers of the cyclodiene insecticide endosulfan (hexachlorobicyclo[2,2,1]hept-5-en-2,3-bis-hydroxymethylene-cyclic sulfit) by Pseudomonadaceae in water has been investigated. Strong resorption of the applied insecticide (90%) by the bacteria has been observed. The main metabolite of both the isomers was identified by EC-gaschromatography as the endosulfan-alcohol. Additionally the β -isomere yielded small amounts of the cyclic endosulfan-ether and isomerisation to the more stable α -endosulfan.

Allgemeine Abbaumöglichkeiten von Insektiziden der Hexachlornorbornen-Reihe sind bereits seit längerem untersucht und bekannt geworden^{1–6}. Von immer größerem Interesse jedoch erscheint der mikrobiologische Abbau dieser Insektizide, da ihm in der Umwelt die größte Bedeutung beizumessen ist⁷.

Zahlreiche Bakterien sind sowohl unter aeroben^{8–13} als auch anaeroben^{8, 14} Bedingungen in der Lage, die als sehr persistent geltenden Cyclodien-Insektizide teilweise oder sogar völlig abzubauen. Auch eine Reihe anderer Mikroorganismen wie Pilze^{12, 13, 15–17} und Algen¹⁸ sind zum Metabolismus einiger Cyclodien-Insektizide befähigt.

Über den mikrobiellen Abbau des Cyclodien-Insektizides Endosulfan (Thiodan®) ist bisher wenig bekannt geworden¹⁹, obgleich der Abbau durch Insekten^{20–22}, Warmblüter^{22–24} und Pflanzen²² intensiv untersucht worden ist.

Wir haben begonnen, im Rahmen allgemeiner Untersuchungen zum mikrobiologischen Abbau von Umweltchemikalien den Abbau des Endosulfans durch Anreicherungskulturen verschiedener Mikroorganismen zu untersuchen. Die Isomeren α - und β -Endosulfan wurden getrennt auf ihre mikrobielle Abbaubarkeit getestet.

Material und Methoden

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind von Firma E. Merck, Darmstadt. Lösungsmittel wurden zweimal über eine Dreihandkolonne und einmal über eine

Silbermantelkolonne destilliert. Einmal ionenausgetauschtes Wasser wurde in einer Quarzglasapparatur bidestilliert.

Geräte und Arbeitsbedingungen

Es wurde ein Zweisäulen-Gaschromatograph F & M, Modell 700 mit ³H-Elektroneneinfangdetektor benutzt. Trägergas: Argon (mit 10% Methan), 35 ml/min. Duran-Glassäulen, Länge 100 cm, Innendurchmesser 2,5 mm. Stationäre Phasen: XE-60 und OV-225, jeweils 2% auf Gaschrom Q, 100–120 mesh. Temperatur: Ofen 190 °C, Einspritzblock 200 °C, Detektor 190 °C.

Tabelle. Retentionszeiten verschiedener Endosulfan-Derivate (Säulentemperatur 190 °C).

Verbindung	Stationäre Phase (2%)	
	XE-60	OV-225
α -Endosulfan (1)	0,48	0,45
β -Endosulfan (2)	1,22	1,21
Endosulfanalkohol (3)	0,34	0,24
Endosulfanäther (4)	0,22	0,19
Endosulfanhydroxyäther (5)	0,68	0,59
Endosulfansulfat (6)	2,59	2,57
Endosulfanlaktone (7)	1,00	1,00

Nährlösung

Die Bakteriennährlösung hatte folgende Zusammensetzung: NH₄Cl 10 g; K₂HPO₄ 0,5 g; KH₂PO₄ 0,5 g; MgSO₄·7 H₂O 0,2 g; FeSO₄·7 H₂O 0,01 g; CaCl₂ 0,01 g; NaCl 5,0 g; mit bidest. H₂O auf 1000 ml aufgefüllt. Diese Nährlösung ist für Pseudomonadenanreicherungskulturen erprobt.

Endosulfan

Gaschromatographisch reine Isomeren wurden aus Endosulfan (Isomerengemisch α : β = 70:30) der Farbwerke Hoechst²⁵ säulenchromatographisch ge-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. K. Ballschmiter, Abteilung Analytische Chemie, Universität Ulm, D-7900 Ulm, Oberer Eselsberg 0–26.

wonnen. Die Methode von W. D. Weinmann²⁶ wurde wie folgt geändert: Eine 160 cm lange Glas-säule von 2 cm Innendurchmesser wurde bis zu einer Höhe von 130 cm mit saurem Al_2O_3 , Aktivitätsstufe III, gefüllt. Das zu trennende Isomerengemisch wurde fest auf die Säule gegeben und mit Tetra-chlorkohlenstoff eluiert. Es ließen sich 10 g Endo-sulfan ohne Zwischenfraktion trennen²⁷.

Je 400 mg der beiden Isomeren wurden in 50 ml Aceton gelöst (Stammlösung).

Kultivierung

Eine mit Bioziden nicht vorbehandelte Bodenprobe (20 g Gartenerde) wurde mit etwas bidest. H_2O digeriert, abfiltriert und mit Nährlösung auf 300 ml aufgefüllt. Je 100 ml dieser geimpften Nährlösung wurden 400 μg α - bzw. β -Endosulfan (50 μl der Stammlösung) zugesetzt, so daß die Endkonzentration an Insektizid 4 ppm betrug. Einer dritten Probe, die als Blindwert diente, wurde kein Endosulfan zugesetzt. Von allen drei Proben wurde zu Beginn der Inkubation ein Toluolextrakt (das Toluol enthielt 15% Methanol) gaschromatographisch untersucht und keine Störung (durch Nährmedium, Bodenextrakt usw.) gefunden.

Die Kulturen wurden in verschlossenen Glasgefäßen unter intensiver Durchlüftung (mit einer Glasfritte) 14 Tage bei 30 °C inkubiert. Zwanzig Stunden nach Beginn der Inkubation wurden den Kulturen jeweils 1 g α -D(+) Glucose zugesetzt, um das Wachstum der bis dahin noch lebenden (resistenten) Bakterien zu beschleunigen.

Auf eine Identifizierung der in den Anreicherungen vorhandenen Bakterien wurde verzichtet. Unter den verwendeten Kulturbedingungen sollten sich je-

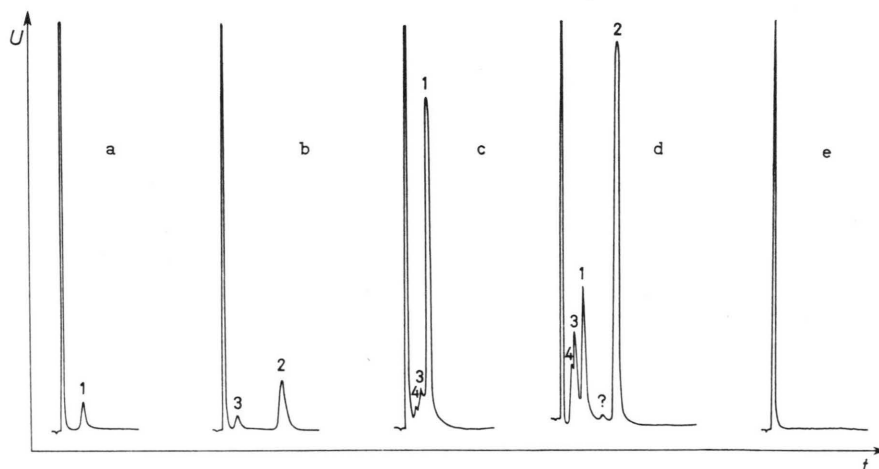
doch wahrscheinlich Arten der Familie Pseudomonadaceae angereichert haben. Diese Familie zeichnet sich hinsichtlich der verwertbaren Substrate durch hohe Flexibilität aus.

Aufarbeitung

Aufgearbeitet wurden die Proben wie folgt: Die Bakteriensuspensionen wurden 15 min bei 3400 U/min zentrifugiert; der wäßrige Überstand und die abzentrifugierten Bakterien wurden dann mit Toluol extrahiert und getrennt untersucht. Eine Behandlung der in Wasser/Toluol suspendierten Bakterien mit Ultraschall (30 min) verstärkte die Extraktion deutlich. Ebenso konnte durch Zusatz von 15% Methanol zum Toluol die Extraktion verbessert werden, ohne daß dabei die qualitative Zusammensetzung der Endosulfan-Metabolite verändert wurde. Die Extraktion mit Toluol/Acetonitril (1:1) mit und ohne vorherigem Aussalzen (NaCl) brachte dagegen keinerlei Verbesserung mehr.

Ergebnisse und Diskussion

Die unbehandelte Probe (Blindwert) enthielt keinerlei im Gaschromatogramm störenden Substanzen (Chromatogramm e). Es zeigte sich, daß sowohl das α - als auch das β -Endosulfan sehr stark von den Bakterien resorbiert wurde. Das Verhältnis Bakterien/Wasser für Endosulfan lag bei etwa 10:1. Das stabilere α -Isomere wird durch die Bakterienanreicherungskultur deutlich langsamer abgebaut als das β -Endosulfan. Als Umwandlungsprodukte konnten Endosulfanalkohol (3) und -äther (4) identifiziert



Gaschromatogramme der Abbauprodukte des α - und β -Endosulfans (Extraktion: Toluol + 15% Methanol, 30 min Ultraschall). Metabolite im wäßrigen Überstand a. beim α -, b. beim β -Endosulfanabbau; Metabolite in den Bakterien, c. beim α -, d. beim β -Endosulfanabbau; e. Blindwert. Trennphase: 2% XE-60 auf Gaschrom Q, 100–120 mesh; Temperatur: 190 °C.

werden. Spuren des β -Endosulfans (2) wurden zu dem stabileren α -Isomeren (1) umgewandelt. Als Umwandlungsprodukt des β -Endosulfans traten ferner Spuren einer nicht identifizierten Substanz auf (vgl. Gaschromatogramm d). Wäßrige Vergleichslösungen der beiden Isomeren blieben während der Versuchsdauer stabil, so daß sämtliche Umwandlungen, auch die Isomerisierung des β -Endosulfans zum α -Isomeren, auf mikrobielle Aktivität zurückzuführen sind.

Die Nachweisempfindlichkeit ist für das Diol (3) auf polaren Trennphasen wesentlich geringer als für den Äther (etwa um den Faktor 80–100). Insofern verschleiert das Gaschromatogramm die Tatsache, daß für beide Isomere das Diol das Hauptabbauprodukt ist. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit der Tatsache, daß Endosulfan auch durch die Grünalgen *Chlorella* und *Scenedesmus*¹⁹ sowie durch eine nicht näher beschriebene Bakterienmischkultur¹⁹ zu Endosulfanalkohol abgebaut

wird. Auch nach UV-Bestrahlung in dünnen Schichten wird der Alkohol als Hauptabbauprodukt gefunden²⁸.

Der hohe Anteil an Diol deutet darauf hin, daß eine Oxydation zum cyclischen Sulfat nicht erfolgt, denn im Zuge der schrittweisen Hydrolyse des Endosulfans bilden sich Schwefligsäurehalbesten, die wenig stabil sind. Die Hydrolyse des cyclischen Sulfatesters führt dagegen zum stabileren Schwefelsäurehalbesten, der bei Ratten nachgewiesen werden konnte²⁴. Der Abbaumechanismus wurde jedoch nicht näher untersucht.

Inwieweit auch unter anaeroben Bedingungen das Endosulfan zu dem verhältnismäßig wasserlöslichen und nicht toxischen Dialkohol (3) abgebaut wird und ob unter mikrobiellen Voraussetzungen ein Sekundärmetabolismus des stabilen Hexachlornorbornen-Gerüsts möglich ist, wird zur Zeit untersucht.

- ¹ G. T. Brooks, Res. Rev. **27**, 81 [1969].
- ² I. Schuphan, B. Sajko u. K. Ballschmiter, Z. Naturforsch. **27b**, 147 [1972].
- ³ I. Schuphan u. K. Ballschmiter, Z. analyt. Chem. **259**, 25 [1972].
- ⁴ M. Perscheid u. K. Ballschmiter, Z. Naturforsch. **28b**, im Druck.
- ⁵ W. Klein, J. Kohli, I. Weisgerber u. F. Korte, J. agric. Food Chem. **21**, 152 [1973].
- ⁶ W. Thornburg, Analyt. Chem. **45**, 151 [1973].
- ⁷ F. Matsumura, Environ. Qualit. Safety **1**, 96 [1972].
- ⁸ D. W. Hill u. P. L. McCarty, J. Water Pollut. Control Federat. **39**, 1259 [1967].
- ⁹ G. Jagnow u. K. Haider, Soil Biol. Biochem. **4**, 43 [1972].
- ¹⁰ F. Matsumura, V. G. Khanvilkar, K. C. Patil u. G. M. Boush, J. agric. Food Chem. **19**, 27 [1971].
- ¹¹ F. Matsumura, G. M. Boush u. A. Tai, Nature [London] **219**, 965 [1968].
- ¹² J. R. W. Miles, C. M. Tu u. C. R. Harris, J. econ. Entomol. **62**, 1334 [1969].
- ¹³ K. C. Patil, F. Matsumura u. G. M. Boush, Appl. Microbiol. **19**, 879 [1970].
- ¹⁴ I. Schuphan u. K. Ballschmiter, Nature [London] **237**, 100 [1972].
- ¹⁵ M. W. Bixby, G. M. Boush u. F. Matsumura, Bull. Environ. Contamin. Toxicol. **6**, 491 [1971].
- ¹⁶ F. Matsumura u. G. M. Boush, J. econ. Entomol. **61**, 610 [1968].
- ¹⁷ G. Baluja u. M. A. Murado, Proceedings of the Second International IUPAC Congress of Pesticide Chemistry, vol. **6**, p. 273, Gordon & Breach, New York 1972.
- ¹⁸ E. Elsner, D. Bieniek, W. Klein u. F. Korte, Chemosphere **6**, 247 [1972].
- ¹⁹ S. Gorbach u. W. Knauf, Environ. Qualit. Safety **1**, 250 [1972].
- ²⁰ K. Ballschmiter u. G. Tölg, Angew. Chem. **78**, 775 [1966]; Angew. Chem. internat. Edit. **5**, 730 [1966].
- ²¹ W. Rückert u. K. Ballschmiter, Z. analyt. Chem. **259**, 188 [1972].
- ²² H. Maier-Bode, Res. Rev. **22**, 1 [1968].
- ²³ I. Schuphan, K. Ballschmiter u. G. Tölg, Z. Naturforsch. **23b**, 701 [1968].
- ²⁴ J. Elzner, Dissertation Mainz 1973.
- ²⁵ Den Farbwerken Hoechst danken wir für die Überlassung einer Probe Endosulfan sowie weiterer Endosulfan-Derivate.
- ²⁶ W. D. Weinmann, Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd. **22**, 24 [1970].
- ²⁷ H. Schlüter u. K. Ballschmiter, Z. Naturforsch., im Druck.
- ²⁸ T. E. Archer, I. K. Nazer u. D. G. Crosby, J. agric. Food Chem. **20**, 954 [1972].