



Doctoral Thesis

Organophosphorus pesticides in the freshwater mollusc *Dreissena polymorpha*

Author(s):

Dauberschmidt, Carole

Publication Date:

1995

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001529961> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss ETH No. 11330

Organophosphorus pesticides in the freshwater mollusc
Dreissena polymorpha

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Carole Dauberschmidt
Dipl. Zool. University of Zurich
born December 29, 1963
citizen of Romainmôtier (VD),
Switzerland

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Ch. Schlatter, examiner
PD Dr. D. Dietrich, co-examiner

1995

ZUSAMMENFASSUNG

Organophosphate (Phosphorsäureester) werden weltweit als Insektenbekämpfungsmittel eingesetzt. Nach dem Brand einer Lagerhalle in Basel 1986 gelangten einige Tonnen dieser Organophosphate, hauptsächlich Thiometon und Disulfoton, in den Rhein. Infolge dieses Brandes wurden hohe Konzentrationen von Thiometon und Disulfoton im Rheinwasser flußabwärts festgestellt. Die Rheinflauna wurde davon stark in Mitleidenschaft gezogen. Aufgrund von chemisch-physikalischen Daten dieser Verbindungen ging man davon aus, daß keine Anreicherung in Sediment und exponierten Tieren stattfinden würde. 3 1/2 Monate nach dem Brand wurden jedoch unerwartet hohe Konzentrationen von Thiometon und Disulfoton in der Süßwassermuschel *Dreissena polymorpha* (Zebra- oder Wandermuschel) gemessen. Diese Muscheln schienen in keiner Weise beeinträchtigt. Eine erhöhte Anzahl Tauchenten, welche sich hauptsächlich von diesen Muscheln ernähren, wurde tot aufgefunden. Es ist davon auszugehen, daß die unerwartet anhaltende Verschmutzung des Flußbettsedimentes für die hohe Belastung der am Grund lebenden Muscheln verantwortlich war.

Die notwendigen Kenntnisse über Toxizität und Abbau von Fremdstoffen wie Organophosphate in niedrigen Invertebraten wie der Zebra- oder Wandermuschel fehlen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, die geringere Empfindlichkeit von *Dreissena* gegenüber Organophosphaten zu untersuchen und somit ein besseres Verständnis für Toxizitätsmechanismen in Wirbellosen zu erhalten. Dieses würde eine ökotoxikologisch umfassendere Beurteilung der Effekte von Schadstoffen auf Invertebraten erlauben.

Als erstes wurden Akutversuche im Labor durchgeführt. *Dreissena* wurde hohen Thiometon und Disulfoton Konzentrationen ausgesetzt. Die in der Feldsituation beobachtete Unempfindlichkeit von *Dreissena* gegenüber Organophosphaten konnte mit diesen Experimenten bestätigt werden. Auch Konzentrationen, die 10 mal höher waren als die höchste gemessene Rheinkonzentration, hatten keine Effekte auf die Muscheln innerhalb 96 Stunden. Mortalität trat erst bei Konzentrationen von mehr als der 20-fachen maximal gemessenen Rheinkonzentration auf. Ferner zeigten sich die Wandermuscheln auch sehr resistent gegenüber Demeton-S-Methyl, der aktivierten Oxoform von Thiometon.

Die höchsten Gewebelastungen wurden ausschließlich in überlebenden Muscheln gefunden. Bei länger als 96 Stunden anhaltender Exposition wurde

Zusammenfassung

keine weitere Erhöhung der Gewebebelastungen gemessen. Dies bedeutet, daß die Anreicherung der Organophosphate bereits nach den Akutversuchen sozusagen beendet war und die Gewebekonzentration sich nahe dem Gleichgewichtszustand befand. Organophosphate wurden in allen Geweben von *Dreissena* angereichert, am meisten jedoch in der vorderen Hälfte des Eingeweidessackes. Die größte Anreicherung fand demnach entweder in der Mitteldarmdrüse und/oder in den Keimdrüsen statt. Zu der passiven lipophilen Permeation müssen zusätzliche Mechanismen für die Erklärung der Anreicherung herangezogen werden.

Obwohl die aufgenommenen Organophosphate nur sehr langsam wieder ausgeschieden wurden, konnte mit weiteren Experimenten gezeigt werden, daß *Dreissena polymorpha* zumindest *in vitro* die Organophosphate Thiometon und Disulfoton metabolisieren kann. Die niedrigere Metabolisierungsrate im Vergleich zur derjenigen der Ratte kann hinreichend mit dem tieferen Cytochrom P₄₅₀ Gehalt der Muschel erklärt werden. Die meßbare Ethoxycoumarin Deethylase (ECOD) Aktivität ist ein Indiz für ein vorhandenes Cytochrom P₄₅₀ abhängiges Oxygenase System. Die ECOD Aktivität wie auch die Fähigkeit Organophosphate abzubauen war bei 10°C höher als bei 22° oder 37°C. Oxidative Enzyme von *Dreissena* zeigen neben unterschiedlichen Temperaturoptima auch andere Reduktionsmittelabhängigkeiten.

Schließlich wurde auch die Esteraseaktivität untersucht. Obschon Esteraseaktivitäten in Muschelhomogenaten gemessen wurden, wurde diese durch Zugabe von Organophosphaten nicht inhibiert. Dies zeigt, daß das klassische Modell für den Wirkungsmechanismus der Organophosphate, die Hemmung der Acetylcholinesterase, nicht auf *Dreissena* übertragbar ist. Zudem wurden native Proteine nicht mit ³H-Diisopropylfluorophosphat markiert, was auf sterisch geschützte aktive Stellen der Esterasen hinweist.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, daß Organophosphate sich sehr wahrscheinlich in *Dreissena* wegen ihrer im Flußbett sessilen Lebensweise, einer tiefen Metabolisierungsrate und einer möglichen Fetteinlagerung anreichern konnten. Die fehlende Muschelesterasehemmung durch Organophosphate kann die Unempfindlichkeit erklären. Im Vergleich zu Wirbeltieren können aber auch andere neuronale Überträger und eine vom cholinergen Nervensystem nicht direkt abhängige Sauerstoffzufuhr in Betracht gezogen werden.

SUMMARY

Organophosphates are used worldwide as insecticides. After an incident at storing facilities in Basel (Switzerland) in 1986, several tons of organophosphates, mainly thiometon and disulfoton, were swept accidentally into the river Rhine. Following this event high water concentrations of thiometon and disulfoton were measured close to the source of contamination. The Rhine fauna was severely affected. Based on physico-chemical properties of these compounds, it was assumed that only small amounts of active thiometon and disulfoton would remain in the Rhine sediment and that these substances would not accumulate in exposed animals. 3¹/₂ months after the incident however, unexpectedly high concentrations of thiometon and disulfoton were measured in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. Although no health effects seemed to occur in the mussels, mortality of diving ducks feeding on the molluscs was observed. It is likely that the still high pollution of the Rhine sediment was responsible for the elevated tissue concentrations in the benthic living mussels.

A detailed understanding of the toxicity and fate of xenobiotics such as organophosphates in lower invertebrates such as *Dreissena* are to date non-existent. The aim of this study was therefore to investigate the sensitivity of *Dreissena* towards organophosphates in order to understand more about the mechanisms of toxicity in invertebrates. This will allow a more detailed ecotoxicological assessment of the impacts of xenobiotics in invertebrate species.

In a first series of experiments, *Dreissena* were exposed to high thiometon and disulfoton concentrations in the laboratory. The low sensitivity of zebra mussels observed in the field situation towards organophosphates could be confirmed with these tests. Exposure to concentrations 10-fold the one in the Rhine water immediately after the spill had no effects on the mussels within 96 hours. Mortality occurred only at more than 20-fold the measured Rhinewater concentrations. Additionally, *Dreissena* proved to be also highly resistant towards the activated oxygen analogue demeton-S-methyl.

The highest body burdens were always measured in surviving mussels. With exposure times longer than 96 hours, the body burdens did not increase significantly. That means that the upconcentration measured after the acute exposures were close to the one of the steady state. Organophosphates were accumulated in all organs of *Dreissena*, but mainly in the anterior part of the

Summary

viscera, i.e. either in the digestive gland and/or in the gonadal tissue. Mechanisms other than passive lipophilic permeation alone must be involved in this bioconcentration.

Even though elimination of accumulated organophosphates occurred very slowly, it was shown, in a second series of tests, that *Dreissena polymorpha* was able to biotransform the organophosphates thiometon and disulfoton *in vitro*. The lower metabolisation of *Dreissena* in comparison to that in rat could be explained by the lower cytochrome P₄₅₀ content of the mollusc. The measurable ethoxycoumarin deethylase (ECOD) activity was an indication for a cytochrome P₄₅₀-containing oxygenase system. ECOD activity as well as the biotransformation capacity was much higher at 10°C than at 22° or at 37°C, respectively. Oxidative enzymes of *Dreissena* show not only differences in optimal reaction temperature but also in their requirements of reduction equivalents.

Finally, esteratic activity was analysed. Although esteratic activity was found in the mussel homogenates, it was not inhibited upon addition of organophosphates. This demonstrates that the classical model of the toxicity mechanism of organophosphates, the acetylcholinesterase inhibition, is not applicable to *Dreissena*. Additionally, the native esteratic enzymes were not labelled by tritiated organophosphates (³H-diisopropylfluorophosphate), suggesting sterically protected active sites.

From the results of this study it can be concluded that the accumulation of organophosphorus insecticides in *Dreissena* observed in the field was very likely to be due to its benthic lifestyle, the low metabolisation rate of the compounds and a possible storage of the organophosphates in lipids.

The resistance is probably due to the fact that esterases are not inhibited by organophosphates. In comparison to vertebrates, other neurotransmission pathways and an oxygen uptake not directly dependent from cholinergic neurotransmission may explain the resistance as well.