

DISS. ETH NO. 17751

Environmental Exposure to Estrogenic Mycotoxins

A dissertation submitted to
ETH Zurich

for the degree of
Doctoral of Sciences

presented by
NICCOLO HARTMANN
Dipl. Umwelt-Natw. ETH

born on October 30, 1975
citizen of Luzern (GR), Switzerland

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. René P. Schwarzenbach, examiner
Prof. Dr. Konrad Hungerbühler, co-examiner
Dr. Thomas Ternes, co-examiner
Dr. Hans-Rudolf Forrer, co-examiner
Dr. Thomas D. Bucheli, co-examiner

Zurich 2008

Summary

Endocrine disrupting compounds (EDC's) are a serious problem in the environment due to their interferences with animal and human hormone systems, as described for many cases in the past. Most of these cases were caused by industrial chemicals, which were introduced to the environment by human activities. Aside from these synthetic EDC's, also naturally occurring compounds, such as the resorcylic acid lactones (RALs) are known having endocrine disrupting potential. The most prevalent compound out of the RALs is zearalenone (ZON), which is orders of magnitudes more potent than notorious synthetic EDC's such as DDT, bisphenol A or atrazine. ZON is produced by a variety of *Fusarium* species, in particular *Fusarium graminearum*, which grows on crops such as maize and wheat. To this point, ZON has only been recognized as a problem in the feed context which manifested itself for instance in infertility problems in husbandry animals, in particular in swine. In this thesis the distribution of ZON and its fate with respect to environmental exposure was studied for the first time. As crop fields are the primary source of *Fusarium* toxins we conducted a field study where we cultivated wheat and maize. The crop rotation wheat after maize is known to be favourable for *Fusarium graminearum* infection and therewith ZON contaminated crops were expected. In particular, ZON levels were measured in the wheat- and maize plants, the field soil and the drainage water. In addition, other possible sources such as waste water treatment plant effluents and manure application were investigated. ZON was also quantified in several large rivers throughout the Swiss midlands, with respect to the overall exposure of surface waters.

Very sensitive analytical methods were required for quantification of ZON in various agro-environmental matrices, due to expected concentrations at the trace level. The use of deuterated analogues (D_6 -ZON) as internal standard and conventional analytical techniques such as solid phase extraction for concentration, Soxhlet extraction and high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry allowed ZON quantification in the very low ng/L and the low ng/g range in aqueous and solid matrices, respectively. Method detection limits (MDL's) in aqueous samples were 0.5, 0.7 and 0.8 ng/L for drainage, surface and waste water. For solid matrices MDL's were 1.0-8.5, 0.2, 3.7 and 2.0 ng/g_{dry weight (dw)} for plant material, soil, manure and sewage sludge, respectively. Absolute and relative

recoveries were mostly around 100%, and precision ranged from 3 to 16% for both, aqueous and solid matrices.

ZON concentrations in the wheat- and maize plant organs varied between 100 ng/g and 17 µg/g dry weight. Resulting total ZON amounts in the plants at the time of harvest were 7 and 32 g/ha, depending on the crop and influenced by climatic conditions. After kernels were removed by harvest, ZON amounts associated with plant debris which remained on the field were between 6 and 25 g/ha. Besides ZON contaminated plant debris, manure/dung was another ZON source investigated, because straw material is one of its constituents and ZON can pass the gastrointestinal tract of husbandry animals. Concentrations of ZON in manure and dung ranged from 7 up to 330 µg/kg dry weight. Considering an average manure application practice, between 50 and 150 mg/ha/year would reach agricultural soil. These amounts were in a similar range as the ZON amounts directly washed off from contaminated plants. However ZON amounts present in plant debris on the field after harvest were one to two orders of magnitudes higher than the ones in manure.

Concentrations of ZON in the topsoil layer of our field were between not detectable and 3.8 ng/g dry weight, resulting in total ZON mass of 0 to 5.6 g/ha. These levels were influenced by several overlaid processes such as climatic conditions, crop variety, continuous ZON emission from the plants and their debris, possible degradation processes (not investigated in this study), ZON leaching into the drainage water and sorption processes. Sorption of ZON on the field soil was found to take place mainly on the organic carbon (OC), which is apparent from a fitted water to OC distribution coefficient of 3318 L/kg_{oc}. The predominant sorptivity of OC compared to other soil constituents such as sand, clay minerals or iron oxides was confirmed by the results obtained with ZON sorption experiments to humic acid, goethite and montmorillonite.

The considerable sorption of ZON on soil together with the correlation of the drainage water discharge with the ZON concentrations in the drainage water ("first flush" effect), lead to the conclusion that ZON emission from the field site was mainly driven by preferential flow via macropores. ZON concentrations in the drainage water were in the very low ng/L range with a maximum peak concentration of 35 ng/L. Cumulative ZON amounts emitted from the field via drainage water were between 0.1 and 4.3 mg/ha, depending on the crop cultivated in the respective period. These

amounts correspond to fractions between 0.001 to 0.070% of the initially present ZON amount in the plants.

Our data clearly show that soil is the primary recipient of ZON emitted from *Fusarium graminearum* infested wheat and maize fields. Due to the large dilution of drainage water in surface waters, ZON concentrations will usually drop below detection limit and probably environmentally critical levels, although little is known about ecotoxicological consequences of pulsed exposures. In several hundred investigated surface water samples taken throughout the midlands of Switzerland, ZON was detected in three cases only. Still, in small creeks mainly fed by agricultural runoff, ZON might contribute substantially to the total estrogenicity of such water in case of *Fusarium graminearum* occurrence. In a two month period, besides ZON also another mycotoxin (Deoxynivalenol, DON) was quantified in the drainage water emitted from the field site. Concentrations were between 23 ng/L and 4.9 µg/L. DON levels in Swiss rivers were up to 22 ng/L.

Other mycotoxins might be emitted from *Fusarium*-infested fields as well, as some of them are produced in similar amounts as DON and ZON. In the future, we suggest extending the search for such mycotoxins acting as aquatic micropollutants.

Zusammenfassung

Das Vorkommen von hormonaktiven Chemikalien (endocrine disrupting compounds, EDC's) in der Umwelt stellt für diese ein ernstes Problem dar. In der Vergangenheit hat es viele Ereignisse gegeben, bei welchen industrielle Chemikalien Abnormalitäten bei Tieren verursacht haben. Neben synthetisch hergestellten EDC's gibt es aber auch Pflanzen und Schimmelpilze, die Gifte mit hormonaktiver Wirkung produzieren. Ein dafür bekannter Schimmelpilz ist *Fusarium graminearum*. Dieser wächst auf verschiedenen Getreidearten, wie beispielsweise Weizen, und Mais. Als Stoffwechselnebenprodukt produziert *Fusarium graminearum* resorzyklische saure Laktone (resorcylic acid lactones, RALs). Der am meisten vorkommende Vertreter der RALs ist das Zearalenone (ZON). Seine Östrogenizität liegt mehrere Größenordnungen über denjenigen von bekannten synthetischen EDC's wie DDT, Bisphenol A oder Atrazin. In der Vergangenheit hat man die Problematik des hormonaktiven ZON hauptsächlich in der Futtermittelindustrie wahrgenommen und untersucht. Diese zeigt sich zum Beispiel in der Schweinehaltung, wo Fertilitätsprobleme durch ZON kontaminiertes Futter oder Stroh hervorgerufen werden. In dieser Arbeit haben wir das erste Mal die Verteilung und das Verhalten von ZON in der Umwelt untersucht. *Fusarium* infizierte Mais- und Weizenfelder sind primäre Quellen, aus denen ZON in die Umwelt gelangen kann. Deshalb haben wir eine Feldstudie mit der Fruchtfolge Weizen nach Mais durchgeführt. Diese Fruchtfolge ist bekannt für ihre Anfälligkeit für *Fusarium* Infektion, weil *Fusarium* infiziertes Pflanzenmaterial, welches nach der Maisernte auf dem Feld zurückbleibt, den nachfolgenden Weizen infizieren kann. Um den Eintrag von ZON über *Fusarium* infizierte Mais- und Weizenfelder zu untersuchen, haben wir Pflanzen, Boden und Drainagewasser auf deren ZON Gehalte analysiert. Zusätzlich haben wir Gülle- und Klärwasserproben als mögliche Quellen auf ZON untersucht. Des Weiteren haben wir in mehreren grossen Flüssen im Schweizer Mittelland die ZON Gehalte gemessen, um ein Bild der schweizweiten Belastung zu erhalten.

Um ZON in den erwähnten Proben im Spurenbereich nachweisen zu können, waren wir auf sehr empfindliche Messmethoden angewiesen. Deuteriertes ZON (D₆-ZON) und der Einsatz von modernen chemisch analytischen Methoden und Geräten haben dies ermöglicht. Die flüssigen Proben wurden mittels Festphasen Extraktion angereichert und die festen Proben mit Soxhlet extrahiert. Die Extrakte wurden dann mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) getrennt und mit Tandem-

Massenspektrometrie detektiert. Die Nachweisgrenzen für ZON waren 0.5 ng/L in Drainagewasser, 0.7 ng/L in Flusswasser und 0.8 ng/L in Klärwasser. In den festen Matrices lagen diese bei 1-8.5 ng/g_{Trockensubstanz (TS)} in Pflanzenmaterial, 0.2 ng/g_{TS} in Boden, 3.7 ng/g_{TS} in Gülle und 2.0 ng/g_{TS} in Klärschlamm. Absolute und relative Wiederfindungen lagen für die meisten flüssigen und festen Matrices im Bereich von 100% und die Präzision zwischen 3 bis 16%. ZON Konzentrationen variierten je nach Getreideorgan zwischen 100 ng/g und 17 µg/g Trockengewicht. Die daraus resultierenden totalen ZON Mengen lagen zwischen 7 und 32 g/ha und waren abhängig von der Getreideart und den klimatischen Bedingungen. Durch die Ernte wurden die Körner jeweils vom Feld entfernt. Die zurückgebliebenen Pflanzenreste auf dem Feld beinhalteten totale ZON Mengen zwischen 6 und 25 g/ha. Weil Stroh ein Bestandteil von Gülle und Mist ist, können diese als zusätzliche ZON Quellen für die Umwelt nicht ausgeschlossen werden. Die Konzentrationen lagen zwischen 7 und 330 ng/g_{TS}. Aufgrund einer durchschnittlichen Düngepraxis gelangen dadurch in einem Jahr zwischen 50 und 150 mg/ha auf landwirtschaftliche. Diese ZON Menge ist vergleichbar mit der Menge, die von *Fusarium* befallenen Mais- und Weizenpflanzen durch den Regen abgewaschen wurde. Die nach der Ernte in Pflanzenresten auf dem Feld verbleibende ZON-Menge war um eine bis zwei Größenordnungen höher.

Im Oberboden des Feldes lagen die ZON Konzentrationen zwischen der Nachweisgrenze und 3.8 ng/g. Die daraus resultierenden totalen ZON Mengen betragen bis zu und 5.6 g/ha. Diese Werte wurden durch die klimatischen Verhältnisse, das kontinuierliche Abwaschen von den Pflanzen und Pflanzenresten, den möglichen Abbau (in dieser Arbeit nicht untersucht) und Sorptionsprozesse beeinflusst. Der organische Kohlenstoff (OC) im Boden war der wichtigste Bodenbestandteil in Bezug auf die Sorption von ZON. Dies zeigte der hohe OC zu Wasser Verteilungs-Koeffizient von 3318 L/kg_{OC}. Dieser Befund wurde durch die Resultate aus weiteren Sorptionsexperimenten mit ZON an Repräsentanten von Bodenbestandteilen wie Huminsäure, Goethit und Montmorillonit gestützt.

Die Tatsache, dass ZON relativ stark am Boden sorbierte und dass die ZON Konzentration im Drainagewasser mit dessen Abfluss korrelierte („first flush“ effect), deutet darauf hin, dass ZON vom Feld hauptsächlich durch „preferential flow“ via Makroporen ausgetragen wird. Die ZON Konzentrationen im Drainagewasser lagen während der meisten Zeit im sehr tiefen ng/L Bereich. Die höchste gemessene

Konzentration betrug 35 ng/L. Die kumulativen ZON Mengen, welche übers Drainagewasser vom Feld ausgetragen wurden, bewegten sich während der Wachstumsphase der jeweiligen Kultur zwischen 0.1 und 4.3 mg/ha. Dies entspricht einem Anteil von 0.001 bis 0.070% der anfänglich vorhandenen ZON Menge auf dem Feld.

Unsere Daten zeigen deutlich, dass die Hauptmenge des produzierten ZON in den Boden gelangt. Aufgrund der Verdünnung des Drainagewassers in grösseren Flüssen werden die ohnehin bereits tiefen ZON Konzentrationen unter einen für die Umwelt kritischen Bereich fallen. Allerdings ist wenig bekannt über die ökotoxikologischen Auswirkungen von kurzfristigen Stossbelastungen. In mehreren hundert untersuchten Wasserproben aus verschiedenen Flüssen konnte ZON nur dreimal nachgewiesen werden. In kleineren Flüssen, deren Einzugsgebiet landwirtschaftlich dominiert ist, ist es jedoch denkbar, dass in einem *Fusarium* Jahr ZON zur Gesamtöstrogenizität wesentlich beiträgt.

Während 2 Monaten haben wir neben ZON auch noch das Pilzgift Deoxynivalenol (DON) im Drainagewasser gemessen. Die DON Konzentrationen lagen zwischen 23 ng/L und 4.9 µg/L und waren somit deutlich über den ZON Werten. Ähnlich sah das Bild auch in den grösseren Schweizer Flüssen aus, wo die DON Konzentrationen bis zu 22 ng/L erreichten.

Es ist davon auszugehen, dass von *Fusarium* infizierten Feldern noch weitere Pilzgifte in unsere Oberflächengewässer gelangen können. Einige davon werden in ähnlichen oder grösseren Mengen wie ZON und DON produziert. Daher schlagen wir vor, dass Pilzgifte in Zukunft entsprechend anderen organischen Mikroverunreinigungen in Gewässern untersucht und beurteilt werden sollten.