

Methylering van anorganisch kwik; een milieuprobleem

DR. A. KAARS SIJPESTEIJN EN DRS. J. W. VONK

Kwik is zoals bekend een gevaarlijke bron van besmetting van ons milieu. Dat gevaar is in feite groter dan aanvankelijk werd aangenomen. Aangetoond is namelijk dat door een biologisch proces het kwik kan worden omgezet in het veel giftiger derivaat methylkwik. Er is in het algemeen verondersteld dat bij deze omzetting anaerobe bacteriën een grote rol spelen. Het hier beschreven onderzoek van het Organisch Chemisch Instituut TNO heeft echter sterke aanwijzingen opgeleverd dat methylering van kwik in het natuurlijke milieu vooral onder aerobe omstandigheden plaats vindt.

Inleiding

Ongeveer tien jaar geleden kwamen uit Japan en Zweden de eerste aanwijzingen van de verontreiniging van ons milieu met kwik. Pas de laatste jaren is men dit probleem ook in andere landen van West-Europa en Noord-Amerika gaan onderkennen. Inmiddels is vastgesteld, dat al dan niet opzettelijke lozing van industriële afval de voornaamste bron van besmetting met kwik is. Zo brengt de Rijn jaarlijks 70-100 ton kwik ons land binnen. Ook de in de landbouw gebruikte bestrijdingsmiddelen (fungiciden) hebben geleid tot besmetting met kwik, hun aandeel is thans echter klein.

Besmetting van kwik

Het probleem van de verontreiniging van water en grond met kwik kwam in 1966 nog in een ander licht te staan, toen bleek dat anorganisch kwik in de natuur in een veel giftiger derivaat kan worden omgezet, het methylkwik (MeHg^+). Er werden toen namelijk in Japan en Zweden vissen aangetroffen met een hoog kwikgehalte en dit kwik bleek vrijwel geheel als methylkwik aanwezig te zijn. Dit was verrassend omdat men, althans in Zweden, zeker was dat dit derivaat niet was geloosd in het water waarin de vissen waren gevangen. De verontreiniging had plaatsgevonden met andere organische kwikverbindingen en met anorganisch kwik. En zo ontstond de verdenking dat methylering van

kwik wel eens een biologisch proces zou kunnen zijn.

Methylkwik

Methylkwik is veel toxischer dan andere organische kwikverbindingen of anorganisch kwik. Het is niet alleen de meest stabiele vorm van organisch kwik, maar het is ook lipofiel (in vet oplosbaar) en hoopt zich op in hersen- en zenuwweefsel; bovendien heeft het een mutageen effect en veroorzaakt chromosoombreuken. Deze feiten gaven aanleiding tot uitvoerig onderzoek naar het voorkomen van methylkwik, speciaal in waterdieren en in voedsel voor mens en dier. Het bleek dat hoge methylkwik-gehalten vooral voorkwamen in dieren die aan het eind van een voedselketen staan zoals vissen en vogels die zich met vis voeden. Zo werden in bepaalde vissen en zeevogels gehalten van meer dan 1 ppm gevonden. In het algemeen bleek er in dieren die zich ten koste van andere dieren voeden een tendens te bestaan het methylkwik tot hogere concentraties op te hopen.

Modelproeven

De veronderstelling dat kwik door levende organismen in methylkwik zou kunnen worden omgezet werd enkele jaren geleden door modelproeven van Jensen en Jernelöv bevestigd. Zij toonden aan dat in suspensies van uit meren afkomstig slib waaraan een oplossing van kwikchloride was toegevoegd 7 dagen later kleine hoeveelheden methylkwik aanwezig waren. In gesteriliseerde controleproeven werd geen methylering gevonden. De resultaten van hun nu klassieke proeven wekten wel sterk de indruk dat micro-organismen voor deze methylering verant-

woordelijk zijn. Maar het directe bewijs ontbrak.

In hetzelfde jaar brachten Wood en medewerkers de mening naar voren dat methaanbacteriën voor de methylering van kwik aansprakelijk zouden zijn. Zij veronderstelden dat dit proces analoog aan de methaanvorming zou verlopen en evenzo door vitamine B_{12} zou worden versneld. Het is waarschijnlijk te wijten aan deze veronderstelde rol van de anaerobe methaanbacteriën dat men sinds die tijd vrij algemeen aannam dat de methylering van kwik door bacteriën zou geschieden, en wel onder anaerobe omstandigheden (omstandigheden dus zonder zuurstof).

Onderzoek van het proces

Toen enkele jaren geleden door het Organisch Chemisch Instituut werd begonnen met het onderzoek naar het vermogen van micro-organismen om kwik te methyleren was er nog niets met zekerheid over dit proces bekend. Nu hadden wij uit ons werk over microbiële omzettingen van bestrijdingsmiddelen ervaring met de biologische omzetting van lichaamsvreemde stoffen. Daarom hoopten we aan dit verwante probleem een bijdrage te kunnen leveren; en wel vooral omdat het in die tijd duidelijk werd dat ook in Nederland de kwikverontreiniging aanzienlijke vormen had aangenomen. Zo vond Fonds in Rijnwater concentraties kwik van omstreeks $1 \mu\text{g}$ per liter en De Goeij en medewerkers rapporteerden kwik-gehalten tot 18 ppm in slib van de Rijn. Bovendien bleken vissen en andere waterdieren in ons land aanzienlijke hoeveelheden methylkwik te bevatten. De onderzoeken naar de verontreiniging van ons land worden gecoördineerd door de 'Commissie Nevenwerkingen van Bestrijdingsmiddelen en aanverwante stoffen TNO'. Wij voerden ons onderzoek ook binnen dit kader uit.

Proeven met reincultures

Het was onze overtuiging dat werk met reincultures van primair belang was om uit te maken of micro-organismen voor de methylering van kwik verantwoordelijk kunnen worden gesteld. Indien we methylering van kwik zouden vinden, wilden we ook nagaan hoe algemeen deze eigenschap onder microben is en welke omstandigheden er toe leiden. Methylering is tenslotte een heel algemeen biochemisch proces. Bovendien hadden meer dan 30 jaar geleden Challenger en medewerkers reeds gevonden dat anorganisch arsenicum door bepaalde schimmels snel wordt gemethyleerd en we veronderstelden dat de methylering van kwik wel eens volgens dezelfde weg zou kunnen plaats vinden. Mede om deze reden gebruikten we zowel

Hg^{++}

CH_3Hg^+

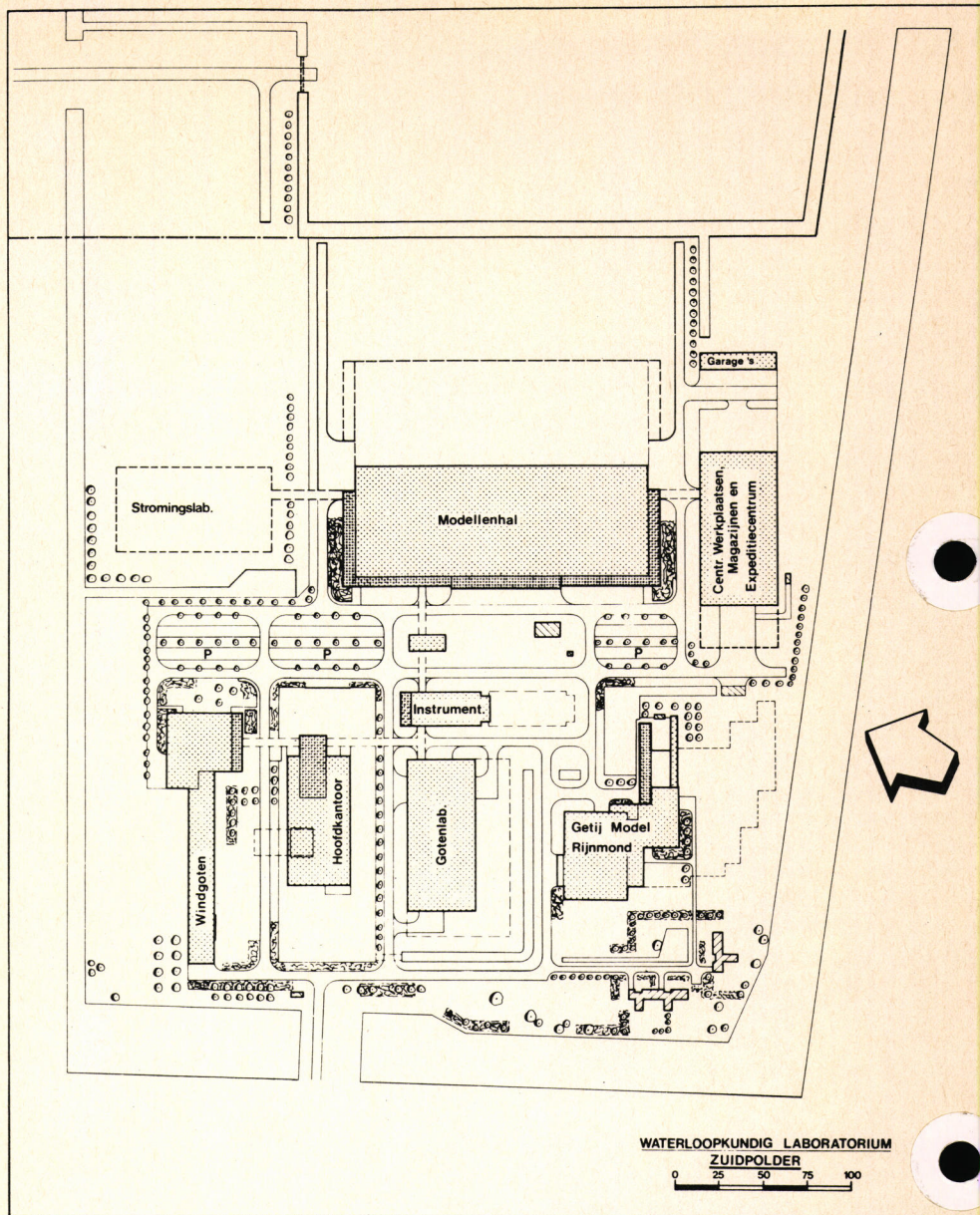
Anorganisch
kwik

methylkwik

Nieuw Laboratoriumcomplex voor het Waterloopkundig Laboratorium

Op 22 mei j.l. heeft H.M. de Koningin het nieuwe laboratoriumcomplex van de Stichting Waterloopkundig Laboratorium te Delft officieel in gebruik gesteld. Dit geschiedde door het in werking stellen van een bijzonder onderzoekmodel, dat werd ontworpen voor het nagaan van de mogelijkheden, het binnendringen van zout water bij schutsluizen te verhinderen of althans zo veel mogelijk te beperken. Het in gebruik nemen van dit nieuwe complex markeert een nieuwe fase in de geschiedenis van het Waterloopkundig Laboratorium. Deze begint in 1927 in Delft in een kelderruimte van het gebouw voor wegen- en waterbouw van de T.H. te Delft. Reeds in 1933 kon een eigen gebouw aan de Raam in Delft in gebruik worden genomen. In 1938 werd dit uitgebreid met een 60 m lange windgolfgoot en in 1948 vond verdere uitbreiding plaats ten behoeve van het grote getijmodel van Zuid-West Nederland.

De toenemende behoefte aan modelonderzoek en aan steeds grotere modellen leidde in 1951 tot de installatie van een (deels openlucht-) laboratorium in Voorst (NOP). Daarnaast bleef de behoefte bestaan aan een goed geoutilleerd laboratorium in het wetenschappelijk geïoriënteerde Delftse milieu, mede met het oog op de van oudsher bestaande banden met de Technische Hogeschool en verschillende TNO-Instituten. In 1967 werd met de bouw van het complex te Delft begonnen. Achtereenvolgens verrezen het getijmodel Rijnmond (1967), het windgolfgotengebouw (1969), de Zout-Zoethal (1970), de werkplaats en magazijnen (1971) en het hoofdkantoor (1973). Het complex zal nog worden uitgebreid met een gotenhal (1974), een gebouw voor instrumentatie (1974) en een stromingslaboratorium (1976). Totaal zal dan f 55.000.000,- in het nieuwbouwcomplex zijn geïnvesteerd. Ter gelegenheid van de ingebruikneming organiseerde het laboratorium op 23 en 24 mei een symposium over het thema 'Waterloopkunde in dienst van industrie en milieu'. Hierbij sprak de directeur van het laboratorium, Ir. J. E. Prins over 'Het Waterloopkundig Laboratorium en de Milieubeheersing'. Hij stelde daarbij, dat over de positie van zijn laboratorium nogal wat misverstanden bestaan. Velen denken, dat het een onderdeel is van het TH, van TNO of van Rijkswaterstaat. Het laboratorium is echter een overheidsstichting en heeft als zodanig een privaatrechtelijke status. Daardoor draagt het meer het karakter van een particulier adviesbureau. Voor het ad-



vieswerk wordt een exploitatie op bedrijfseconomische grondslag vereist met als consequentie, dat ook de overheid, net als particulieren, voor de uitgebrachte adviezen betaalt. Hierdoor heeft het laboratorium een waardevolle onafhankelijke positie die ook in het samenspel tussen overheid en maatschappij veel waard is wanneer een ongebonden oordeel wordt gewenst.

Het Laboratorium heeft blijkens de stichtingsbrief een drievoudige taak:

- het in opdracht uitbrengen van adviezen waar specifieke waterloopkundige, hydrodynamische en hydrologische deskundigheid wordt vereist;
- het onder eigen verantwoordelijkheid uitvoeren van fundamenteel technisch-wetenschappelijk onderzoek;
- het geven van gelegenheid tot het dienstbaar maken van de verworven wetenschap-

pelijke inzichten en faciliteiten aan het hoger wetenschappelijk onderwijs.

Het laboratorium is op grond van zijn specifieke kennis en ervaring in staat doelmatige structuren te scheppen waarin een waterloopkundige problematiek kan worden gevangen en zo mogelijk opgelost. Literatuurkennis is daartoe meestal niet voldoende. Onmisbaar zijn ook wiskundige modellen met vergaande kennis van de verschijnselen in de hydrodynamica of fysische analogen-modellen met het gebruik van speciaal daartoe gecreëerde faciliteiten en ontwikkelde meet- en regeltechnieken of gecoördineerde waarnemingen in de natuur zelf. Steeds is echter het streven de opdrachtgever in te schakelen in de koersbepaling naar het einddoel opdat deze voor zijn beslissing over de toepassing van het advies over zoveel mogelijk achtergrondinformatie beschikt.

Mej. Dr. A. Kaars Sijpesteijn studeerde in Leiden biologie en specialiseerde zich bij de TH Delft in microbiologie. Zij is sedert 1951 met enkele korte onderbrekingen werkzaam bij het Organisch Chemisch Instituut TNO te Utrecht waar zij thans hoofd is van de biochemische en microbiologische afdeling.

Dr. J. W. Vonk studeerde organische chemie in Utrecht. Hij is sinds 1967 werkzaam bij het Organisch Chemisch Instituut TNO te Utrecht bij de Biochemische en Microbiologische Afdeling.

schimmels als bacteriën voor onze proeven. Het lag voor de hand om met gemakkelijk te kweken organismen te beginnen, en wel bij voorkeur normale bewoners van grond en water.

Zo zetten we allereerst aerobe culturen in van verschillende organismen in vloeibaar medium waaraan kwikchloride als anorganische kwikbron was toegevoegd. Aangezien deze stof de groei remt bepaalden we eerst voor ieder organisme de concentratie die nog juist goede groei toelaat en de concentratie die de groei volkomen remt. De tabel laat de resultaten van deze proeven zien. Ook voor deze organismen is methylkwik veel giftiger dan anorganisch kwik: *A.niger* 0.02 ppm en *Ps. fluorescens* 0.5 ppm.

Tabel 3 toont de resultaten van onze methyleeringsproeven met 5 verschillende bacteriën, waarvan de meeste geregeld in water en grond voorkomen. Zij werden aeroob gedurende 7 dagen in schudcultuur gekweekt in aanwezigheid van 5-20 ppm kwikchloride. Daarna werd de gehele cultuur op methylkwik geanalyseerd. De resultaten tonen, dat zij inderdaad alle in staat zijn methylkwik te vormen. De hoeveelheid is echter zeer gering en om deze hoeveelheid met zekerheid aan te tonen moesten minstens enkele liters van de cultuur worden opgewerkt. In ongeënte controleproeven werd geen methylkwik gevonden.

tabel 2
Giftigheid van kwikchloride voor micro-organismen

	HgCl ₂ max. conc. die groei nog toelaat	HgCl ₂ min. conc. die groei volkomen remt
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5	20
<i>Mycobacterium phlei</i>	20	100
<i>Bac. megaterium</i>	20	50
<i>Escherichia coli</i>	20	50
<i>Aerobacter aerogenes</i>	20	100
<i>Aspergillus niger</i>	40	100
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	40	100

De bepaling van methylkwik werd verricht volgens een methode die door Westoö is uitgewerkt voor het aantonen van methylkwik in voedsel en in dieren. Hiertoe moesten onze culturen in hoge mate worden geconcentreerd; daarna werden ze geëxtraheerd en vervolgens werd methylkwik bepaald met gaschromatografie en een electron-capture detector. De kleinste hoeveelheid die in een liter kan worden aangetoond is 350 ng. Dit is een zeer tijdrovend werk dat met grote nauwkeurigheid moet worden gedaan.

Bij *Aerobacter* kon de vorming van methylkwik alleen worden aangetoond indien vitamine B₁₂ aan het medium was toegevoegd; bij *E.coli* had deze factor geen invloed. De mogelijke rol van vitamine B₁₂ in het methyleeringsproces komt later nog ter sprake. Met *E.coli* en *Aer-aerogenes* werd onderzocht of ook onder anaerobe omstandigheden methylering plaats vindt. Hiertoe werden deze gekweekt in geheel gevulde stopflessen, of in flessen waarin de lucht was vervangen door stikstof. Ook in dit geval werd methylkwik gevormd, hoewel de hoeveelheid iets minder was dan in de aerobe proeven.

Deze resultaten lieten voor het eerst zien dat bacteriën inderdaad in staat zijn kwik te methyleren en ook dat dit aeroob (bij aanwezigheid van zuurstof) kan gebeuren en niet, zoals veelal wordt verondersteld, alleen anaeroob.

Om verschillende redenen leek het van belang na te gaan of het gevormde methylkwik zich in of op de cellen bevond, dan wel in de cultuurvloeistof. Dit werd nagegaan door het bacteriesediment en de bovenstaande vloeistof na centrifugeren apart te analyseren. Een proef met *Ps. fluorescens* liet zien dat meer dan 90 % van het methylkwik in de vloeistof was afgescheiden. Soortgelijke proeven werden met schimmels verricht. Tabel 4 toont de resultaten met *Aspergillus niger* en *Scopulariopsis brevicaulis*. Grote hoeveelheden werden gedurende 2 of 4 weken gekweekt als huiden of als bolletjes in schudcultuur. Vervolgens werd het mycelium geanalyseerd op

tabel 3
Vorming van MeHg⁺ uit HgCl₂ door bacteriën

	Conc. HgCl ₂ (ppm)	MeHg ⁺ gevormd (ng/l) in 7 dagen
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5	340
<i>Mycobacterium phlei</i>	20	345
<i>Bac. megaterium</i>	20	830
<i>Escherichia coli</i>	20	865
<i>Escherichia coli</i> , vit. B ₁₂ toegevoegd	20	690
<i>Aerobacter aerogenes</i>	20	290
<i>Aerobacter aerogenes</i> , vit. B ₁₂ toegevoegd	20	1180

methylkwik. Ook hier werden in beide gevallen kleine hoeveelheden methylkwik gevonden. De tabel geeft de totale hoeveelheid in het mycelium en ook de concentratie in het droge mycelium. Gezien het feit dat bacteriën het gevormde methylkwik in het medium afscheiden, kan men zich afvragen waarom de cultuurvloeistof niet ook op dit derivaat werd onderzocht. Een proef met *A. niger* had ons echter al geleerd dat 70 % van het methylkwik in of op het mycelium aanwezig was en slechts 30 % werd uitgescheiden. Omdat een analyse van de cultuurvloeistof veel tijdrovender is dan een bepaling in mycelium, werd hier verder van afgezien. De schimmel *Scopulariopsis* werd in deze proeven betrokken omdat hiervoor vroeger door Challenger was gevonden dat hij in staat is anorganisch arsenicum te methyleren.

Als derde schimmel onderzochten we bakkersgist. Ook dit organisme is in staat kleine hoeveelheden methylkwik te produceren.

Zo bleken dus de drie door ons onderzochte schimmelsoorten en vijf bacteriesoorten allen in staat te zijn, kwik te methyleren. Nu is dit aantal natuurlijk klein en bovendien komen niet al deze organismen normaal in water en grond voor; wel blijkt echter uit ons onderzoek dat het vermogen om kwik te methyleren een vrij algemene eigenschap van micro-organismen zou kunnen zijn. In de loop van ons onderzoek verschenen er twee publikaties over de vorming van methylkwik. Zo vermeldde Landner twee jaar geleden dat de schimmel *Neurospora crassa* hiertoe in staat is, en Yamada en Tonomura berichtten dat de anaerobe bacterie *Clostridium cochlearium* grote hoeveelheden maakt en wel vooral indien extra vitamine B₁₂ werd toegevoegd. Aan de andere kant verkregen deze laatste onderzoekers negatieve resultaten met *Pseudomonas stutzeri*. Het is echter niet onmogelijk dat hun detectiegrens te hoog was.

Mogelijk mechanisme

Vaak wordt aangenomen dat de biologische methylering van kwik plaats vindt door

tabel 4

Vorming van MeHg⁺ uit 40 ppm HgCl₂ door schimmels

		Totaal MeHg ⁺ (ng) in mycelium (250 ml medium)		MeHg ⁺ concentratie (ng/g droge cellen)	
		14 dg.	28 dg.	14 dg.	28 dg.
Aspergillusniger	matten	455	690	145	310
	balletjes	490	400	130	195
Scopulariopsis brevicaulis	matten	310	-	120	-

middel van methylcobalamine, het methylde-
rivaat van vitamine B₁₂. Voor dit vermoeden
bestaat een aantal aanwijzingen:

1. in veel bacteriën wordt vitamine B₁₂ gemethyleerd tot methylcobalamine met behulp van methyltetrahydrofolinezuur. Dit methylcobalamine doet op zijn beurt dienst als methyl donor voor verschillende reacties, b.v. bij de methylering van homocysteïne tot methionine of bij de methaanvorming;
2. door Wood en medewerkers en ook door anderen werd gevonden dat methylcobalamine onder zuiver chemische omstandigheden anorganisch kwik kan methyleren;
3. toevoeging van vitamine B₁₂ stimuleerde in bepaalde gevallen de vorming van methylkwik door bacteriën (*Clostridium*, *Aerobacter*).

Zo is het dus heel goed mogelijk dat methylcobalamine bij de biologische methylering van kwik als methyl donor optreedt. Nu komt echter niet in alle micro-organismen vitamine B₁₂ voor. In *E. coli* *Neurospora crassa* en bakkersgist b.v. ontbreekt het. In dergelijke organismen wordt homocysteïne gemethyleerd door een systeem dat niet van vitamine B₁₂ afhankelijk is. In sommige organismen zijn beide methylerende systemen aanwezig. Onze kennis van deze processen is nog zeer gering maar men zal wel moeten aannemen dat de methylering van kwik ook zonder vitamine B₁₂ kan plaats vinden.

Methylering in natuurlijk milieu

Het was onze overtuiging dat we alleen met

behulp van onderzoek met reïnculturen een inzicht zouden kunnen krijgen in hoeverre micro-organismen in staat zijn kwik te methyleren. Het is nu gebleken dat deze reactie plaats vindt. Men moet echter voorzichtig zijn met de extrapolatie van resultaten met reïnculturen naar processen die onder natuurlijke omstandigheden plaats vinden. Daarom is een vergelijking van onze resultaten met die van Jensen en Jernelöv van belang. Deze onderzoekers toonden methylering van kwik aan in modelproeven waarbij 0,1 tot 100 ppm kwikchloride was toegevoegd aan een suspensie van een bodemsediment uit een meer. Onder deze omstandigheden bleek de snelheid van methylering afhankelijk te zijn van de concentratie kwikchloride; de grootteorde bleek geheel dezelfde als in onze proeven met reïnculturen.

Onze gegevens doen veronderstellen dat heel algemeen daar waar microbiële activiteit heerst, aeroob dan wel anaeroob, methylering van kwik kan worden verwacht. Wij moeten hierbij echter bedenken dat in het anaerobe natuurlijke milieu vermoedelijk altijd zwavelwaterstof wordt gevormd en dat dit zal leiden tot het neerslaan van anorganisch kwik tot het uiterst onoplosbare kwik-sulfide. In aerobe modelproeven van Fagerström en Jernelöv met bodemsedimenten werd deze stof dan ook heel veel langzamer gemethyleerd dan kwikchloride.

En zo mag men verwachten dat, in tegenpraak met vele veronderstellingen uit de literatuur, methylering van kwik in het natuurlijk milieu vooral onder aerobe omstandigheden plaats vindt.

Door bacteriën gevormd methylkwik wordt grotendeels in het water afgescheiden. Vissen hebben steeds een hoger methylkwikgehalte

dan het water waarin ze leven. Maar dit methylkwik wordt vermoedelijk niet door de vissen zelf gevormd. Men veronderstelt dat het door bacteriën is gevormd en met het voedsel of met het water dat de kieuwen doorspoelt in de vissen binnenkomt. Evenzo kunnen zeevogels een hoog methylkwikgehalte hebben en dit wordt op zijn beurt toegeschreven aan het feit dat zij vis eten.

Tenslotte wil ik nog vermelden dat er nog geen aanwijzingen zijn dat andere organismen dan microben in staat zijn om kwik te methyleren. Daarom moeten we op het ogenblik de herkomst van deze gevaarlijke contaminant van ons milieu inderdaad aan microbiële activiteit toeschrijven.

Het is ongetwijfeld nuttig dat deze herkomst thans bekend is. De oplossing van het milieu-probleem is daarmee echter nog niet verregen. Deze kan voorshands slechts liggen in een drastische beperking van het gebruik van kwik. De onderzoeker kan dit slechts bepleiten, niet voorschrijven.

