



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### Photoenhanced toxicity of azaarenes to marine phytoplankton.

Wiegman, S.

**Publication date**  
2002

[Link to publication](#)

#### **Citation for published version (APA):**

Wiegman, S. (2002). *Photoenhanced toxicity of azaarenes to marine phytoplankton*. UvA, FNWI.

#### **General rights**

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

#### **Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

# Summary

## Summary – Samenvatting

### Summary

Phytoplankton development and light-dependent transformation of compounds can both be considered as photochemical processes in water. The similarity of both processes and their concurrence in surface water triggered this study on the interaction of the biological and chemical processes involved. The aim of this thesis was, therefore, to analyse the influence of light, especially ultraviolet (UV) radiation, on the interaction between phototoxic compounds and phototrophic organisms, using marine microalgae as test organisms.

Many studies have shown that narcosis or baseline toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) is strongly related to their lipophilicity. For azaarenes, such relationships have also been demonstrated, but for some compounds, deviations from these relationships have been observed, even for closely related compounds such as isomers. Therefore, the present project started with the determination of the toxicity of four azaarene isomer pairs to the marine flagellate *Dunaliella tertiolecta* (chapter 2). For the five-ringed isomers, dibenz[*a,i*]acridine and dibenz[*c,h*]acridine no inhibition of growth of *D. tertiolecta* was observed at the highest tested concentration that was limited by their solubilities. Growth inhibition by the two-, three-, and four-ringed isomers; quinoline, isoquinoline, acridine, phenanthridine, benz[*a*]acridine and benz[*c*]acridine, respectively, was well described by molecular volume and log  $K_{ow}$ , indicating a narcotic mode of action. However, the toxicity of acridine and benz[*c*]acridine was much higher than that

of their respective isomers, phenanthridine and benz[*a*]acridine, suggesting an additional, specific mode of action. On the basis of HOMO-LUMO gaps, it was argued that the toxicity of acridine and benz[*c*]acridine was photo-enhanced.

UV radiation is absorbed by PAHs, leading to a variety of oxygenated products. In chapter 3 the photochemical reactivity and effects of azaarenes together with their photoproducts in marine environments was, therefore, determined. Photoreaction kinetics of the eight selected azaarenes were examined, using two different light sources: one with an emission peak at 300 nm (UV-B) and the other with an emission peak at 350 nm (UV-A). In contrast to most homocyclic PAHs, the efficiency of photochemical reactions ( $\phi$ ) of azaarenes was wavelength dependent, resulting in different photochemical reactions and, consequently, products formed.

Effects of azaarenes together with their photoproducts were studied by determining the toxicity of azaarenes pre-exposed to UV-A or UV-B. Especially pre-exposure of azaarenes to UV-A radiation led to products toxic to the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. Within the non-visible UV radiation, UV-A can be addressed as the region determining photolysis reactions of the selected azaarenes in surface waters, resulting in an increased potential risk due to formed photolysis products.

The next step of the present project was to seek quantitative measures for photoenhanced toxicity under natural light regimes, by comparing the effects of one of the phototoxic azaarenes under natural and laboratory light (chapter 4). To this purpose, the influence of light irradiance and spectral composition on the extent of photoenhanced toxicity of acridine to *P. tricorutum* was analyzed. Under low UV laboratory light a higher acridine concentration was needed to inhibit growth of *P. tricorutum* than under (UV rich) natural light. Under both laboratory and natural light, no enhancement of toxicity of acridine was observed in the absence of UV, whereas total UV- (UV-A and UV-B) and UV-A-radiation equally enhanced the toxicity. Hence, the UV-A region of (day) light was dominant in the photoenhanced toxicity of acridine to *P. tricorutum*, in accordance with its absorption spectrum in the UV-A region. Next the UV irradiance absorbed

The amount of UV absorbed by acridine effectively described the effect of acridine on the growth of *P. tricorutum* in a dose-response dependent manner. It is concluded that photoenhanced toxicity of aromatic compounds expressed as a function of the actually absorbed amount of UV may circumvent some of the variability between studies using different concentrations of the phototoxic compounds and light sources.

In the last set of experiments, the potential role of photoadaptation of the algae to UV radiation in determining their sensitivity to photoenhanced toxicity of acridine was studied (chapter 5). To this purpose cultures of *P. tricorutum* were grown under laboratory light with a different fraction of ultraviolet radiation (UV). In short-term toxicity experiments a higher acridine concentration was needed to inhibit the photosynthetic electron flux, monitored with chlorophyll *a* fluorescence, in algae exposed to fluorescent light (low UV) than to mercury light (high UV), consistent with the expected role of UV. The two types of light in long-term exposures led to changes in the pigment composition and PS I to PS II stoichiometry to optimise the utilization of fluorescent and mercury light. Despite the adaptation of the photosynthetic apparatus to a small fraction of UV, long-term exposure to mercury light did show a constant sensitivity of the photosynthetic efficiency of *P. tricorutum* to the phototoxic acridine. It is concluded that the prime receptor of photoenhanced toxicity may be unrelated to the photosynthetic machinery.

In the concluding remarks some of the main findings on the influence of UV on the interaction between phototoxic PAHs and phototrophic organisms are discussed. For quantifying the effects of photoenhanced toxicity of aromatic compounds, either by photolysis (photomodification) or photosensitization reactions, this specific mode of action has to be distinguished from narcosis. Deviations from the conventional relationship between narcosis and  $\log K_{ow}$  are indicative for additional specific modes of action. However, unambiguous proof for photoenhanced toxicity was provided in this thesis by filtering out fractions of UV radiation. The traditional model using HOMO-LUMO gap energies as a key for photoenhanced toxicity can be used to predict photosensitization as pathway of toxic action, but is unsuitable to quantify the extent of photoenhanced toxicity. For azaarenes, photomodification was distinguished from photosensitization and narcosis, leading to the conclusion that photomodification of azaarenes increases the environmental

risk due to formation of stable new toxic products. A quantitative measure for photoenhanced toxicity of acridine has been developed that is applicable to daylight.

The implications for the risk assessment of aromatic hydrocarbons were discussed. At present, monitoring of aromatic compounds in the environment has focussed on especially homocyclic PAHs. For ten of these compounds quality criteria, such as maximal acceptable risk concentrations (MPC) for surface waters, are defined. However, these quality criteria are based mostly on narcotic effects. Supported by the present findings I argue that the current set of quality criteria should be expanded with heterocyclic aromatic compounds and that specific toxic action should be incorporated. Photoenhanced toxicity among these can now be quantified for PAHs and azaarenes and obstacles for inclusion in the environmental standards are solved. For that purpose the toxic action has to be subdivided into a log  $K_{ow}$  based component and a component for specific action based on light conditions.

## Samenvatting

Zowel de ontwikkeling van fytoplankton als de omzettingen van stoffen in water worden door licht gestuurd. De overeenkomsten in deze processen, die tegelijkertijd optreden in de waterkolom, gaf aanleiding tot deze studie waarin de interactie van biologische en chemische processen werd bestudeerd. De doelstelling van dit proefschrift was dan ook om de invloed van kortgolvig licht op de interactie tussen stoffen die door licht giftiger worden, en organismen die licht als energie bron nodig hebben, nader te bestuderen. In deze studie zijn twee soorten mariene micro-algen, *Dunaliella tertiolecta*, een groenalg, en *Phaeodactylum tricornutum*, een kiezelwier, als testorganismen gebruikt.

Verschillende studies toonden aan dat de toxiciteit van polycyclische aromatische koolwater stoffen (PAK), die met name door het gebruik van fossiele energiebronnen in ons milieu terecht komen, sterk gerelateerd is aan het aantal aromatische ringen in een molecuul. De mate van toxiciteit van een PAK neemt toe met het aantal ringen en kan gerelateerd worden aan de octanol-water partitie coëfficiënt (log  $K_{ow}$ ). Voor azaarenen, PAK waarin één koolstof-atoom vervangen is door één stikstof-atoom, is deze relatie

tussen toxiciteit en log  $K_{ow}$  ook aangetoond. Maar gelijktijdig werden er ook uitzonderingen op deze regel gevonden. Sommige azaarenen waren giftiger dan verwacht op grond van het aantal ringen en hun log  $K_{ow}$  en er werden verschillen gevonden in toxiciteit tussen azaarenen met eenzelfde structuurformule (isomeren). In dit proefschrift werd daarom allereerst voor een serie van vier azaareen-isomeren de toxiciteit voor de mariene flagellaat *Dunaliella tertiolecta* vastgesteld (hoofdstuk 2). De hoogste concentraties van de azaareen-isomeren met vijf ringen, dibenz[*a,i*]acridine en dibenz-*c,h*]acridine, remden de groei van *D. tertiolecta* niet, doordat deze stoffen nauwelijks oplostten in water. De remming van de groei door azaarenen met twee tot vier ringen was sterk gerelateerd aan het moleculaire volume en aan log  $K_{ow}$ , wat veronderstelt dat het werkingsmechanisme van deze azaarenen niet specifiek is. De toxiciteit van acridine en benz[*c*]acridine was echter hoger dan die van hun respectievelijke isomeren, phenanthridine en benz[*a*]acridine, wat juist op een specifieke werking duidde. Op basis van energiever verschillen tussen de HOMO- en LUMO-toestand van moleculen kon de verhoogde toxiciteit van acridine en benz[*c*]acridine verklaard worden. Deze moleculaire eigenschap, de "HOMO-LUMO gap", is gerelateerd aan de mogelijkheid van stoffen aan om fotonen (lichtdeeltjes) op te nemen. Stoffen die makkelijk fotonen opnemen kunnen "fototoxisch" zijn. Fototoxiciteit is in dit proefschrift gedefinieerd als een toename van toxiciteit onder invloed van licht.

Aromatische koolwaterstoffen zijn, op het moment dat ze ultraviolette straling (UV) absorberen, in staat te reageren met andere moleculen, waardoor geoxideerde producten (fotolyseproducten) kunnen ontstaan. Daarom werd in hoofdstuk 3, naast de omzetting ook de toxiciteit van fotolyseproducten van azaarenen vastgesteld. De kinetiek van fotochemische reacties werd onderzocht voor de eerder geselecteerde acht azaarenen onder twee verschillende lichtbronnen: één met een emissie-optimum rond de 300 nm (UV-B) en één met een emissie-optimum rond de 350 nm (UV-A). In dit proefschrift werd vastgesteld dat, in tegenstelling tot de meeste homocyclische PAK, de efficiëntie van fotochemische reacties van azaarenen, golf lengte (en dus lichtbron) afhankelijk was. De blootstelling van de in water opgeloste azaarenen aan verschillende lichtbronnen kan daardoor in verschillende typen reacties met uiteenlopende fotolyseproducten resulteren. De toxiciteit van de azaarenen tezamen met de fotolyseproducten werd onderzocht door algen bloot te stellen aan oplossingen met azaarenen die

vantevoren waren bestraald met respectievelijk UV-B- of UV-A-straling. Vooral bestraling met UV-A resulteerde in producten die giftig waren voor de mariene diatomee *Phaeodactylum tricornutum*. Daarom kan het ook in daglicht veel voorkomende UV-A verantwoordelijk zijn voor de fotochemische reacties van deze azaarenen in oppervlaktewateren, en de risico's voor aquatische organismen doen toenemen.

Een volgende stap in deze studie was om een kwantitatieve maat te vinden voor de fototoxiciteit van PAK onder natuurlijk licht. Hiertoe werden in hoofdstuk 4 van één van de fototoxische azaarenen, acridine, de effecten onder natuurlijk licht vergeleken met die onder laboratorium licht, door de invloed van de sterkte en de spectrale verdeling van licht op de fototoxiciteit te analyseren. Onder (matig sterk) laboratorium licht was een hogere acridineconcentratie nodig om de groei van *P. tricornutum* te remmen dan onder natuurlijk licht (licht met een uitgebreider UV-spectrum). Voor zowel laboratorium licht als natuurlijk licht werd waargenomen dat in de afwezigheid van UV er geen fototoxiciteit van acridine optrad. Daarentegen werd in de aanwezigheid van UV-B (290–320 nm) en UV-A (320–400 nm) samen en in de aanwezigheid van UV-A alleen, de toxiciteit van acridine in gelijke mate verhoogd. Hieruit volgde dat juist UV-A de toxiciteit van acridine verhoogt, wat ook verwacht kon worden op basis van het absorptiespectrum van acridine. Op grond van deze resultaten werd met behulp van UV-metingen, de verzwakking van UV in het oppervlaktewater door de micro-algen en het UV-absorptiespectrum van acridine, voor iedere afzonderlijke behandeling de door acridine geabsorbeerde hoeveelheid UV berekend. Deze door acridine geabsorbeerde UV dosis bleek een effectieve maat om de effecten van acridine op de groei van *P. tricornutum* te beschrijven. Dit leidde tot de conclusie dat onder uiteenlopende lichtomstandigheden de werkelijke geabsorbeerde hoeveelheid UV (energie) een sleutelparameter is voor het kwalificeren van fototoxische effecten. Het gebruik van deze parameter vermijdt veel van de variabiliteit tussen studies die gebruik maken van verschillende concentraties van fototoxische stoffen en verschillende soorten licht.

In de laatste set experimenten werd het vermogen van micro-algen om zich aan te passen aan UV straling bestudeerd in relatie tot hun gevoeligheid voor de fototoxiciteit van acridine (hoofdstuk 5). Hiertoe werden cultures van *P. tricornutum* gekweekt onder laboratorium licht met verschillende

fracties van UV en werd na blootstelling aan acridine het elektrontransport in fotosysteem II (PS II) gemeten door middel van chlorofyl *a* fluorescentie (een maat voor fotosynthese). In kortlopende experimenten waren hogere acridineconcentraties nodig om het elektrontransport in PS II van algen blootgesteld aan TL licht (geen of nauwelijks UV) te remmen dan van algen blootgesteld aan kwiklicht (matig UV). Deze resultaten waren in overeenstemming met de verwachte rol van UV in fototoxiciteit. Tijdens langdurige blootstelling leidden de twee soorten lichtbronnen tot verschillende pigmentsamenstelling en verschillende PS I/PS II stoichiometrie, wat op een optimalisatie in het gebruik van de twee lichtsoorten door *P. tricornerutum* duidde. Alhoewel het fotosynthese-apparaat van *P. tricornerutum* aan een kleine fractie UV was aangepast, bleek onder kwiklicht de gevoeligheid van de fotosynthese-efficiëntie onveranderd tijdens langdurige blootstelling aan de fototoxische PAK, acridine. Daarom werd geconcludeerd dat de primaire receptor voor fototoxiciteit niet gelegen is in het fotosynthese-apparaat van algen.

In het hoofdstuk 6 (concluding remarks) zijn een aantal van de belangrijkste bevindingen over de invloed van UV op de interactie tussen fototoxische PAK en fototrofe organismen bediscussieerd. Om de verhoogde toxiciteit van PAK door UV te kunnen kwantificeren was het nodig de effecten door fotochemische processen zoals fotolyse (fotomodificatie) en fotosensitizatie te onderscheiden van niet specifieke effecten (narcose). Juist afwijkingen van de conventionele relatie tussen narcose en  $\log K_{ow}$  zijn een indicatie voor een bijkomend specifiek werkingsmechanisme. Zonneklaar bewijs voor fototoxiciteit werd in dit proefschrift geleverd door experimenten waarbij met behulp van filters de toxiciteit onder verschillende lichtspectra te kwantificeren. Het traditionele model dat HOMO-LUMO energie verschillen als een essentiële parameter in fototoxiciteit aanduidt, kan nu nog alleen gebruikt worden om fotosensitizatie als werkingsmechanisme te voorspellen, maar is ongeschikt om de mate van fototoxiciteit te kwantificeren. In deze studie was het echter mogelijk voor de azaarenen om fotomodificatie te onderscheiden van fotosensitizatie en narcose.

In dit hoofdstuk zijn verder de implicaties voor de huidige risico beoordeling van PAK bediscussieerd. Op dit moment is monitoring van aromatische stoffen in het milieu voornamelijk gericht op homocyclische PAK. Voor tien van deze stoffen zijn normen, zoals het maximaal



toelaatbare risico niveau (MTR), vastgesteld. Deze normen zijn echter voornamelijk gebaseerd op narcose. Op basis van de hier gepresenteerde resultaten, zou de geldende serie normen voor PAK uitgebreid moeten worden met normen voor heterocyclische verbindingen. Tevens moet in de normering de werkingsmechanismen opgenomen worden. Fototoxiciteit is één van de specifieke reacties die nu voor PAK gekwantificeerd kunnen worden. Dit kan namelijk bewerkstelligd worden door de toxische werking van PAK onder te verdelen in een op  $\log K_{ow}$  gebaseerde component en een specifieke component, fototoxiciteit, waarmee een bestaande beperking in de normstelling opgeheven kan worden.