

Originalarbeiten

Wirkungsorientierte Umweltanalytik

Kombination des pH_{stat} -Verfahrens mit dem Biolumineszenz-Hemmtest

Mobilisationsverhalten von Schwermetallen aus Feststoffen

Frank Sommerfeld, Georg Schwedt

Institut für Anorganische und Analytische Chemie der TU Clausthal, Paul-Ernst-Straße 4, D-38678 Clausthal-Zellerfeld

Zusammenfassung

Das pH_{stat} -Verfahren ist eine Methode zur Untersuchung des Mobilisationsverhaltens von Schwermetallen und anderen Schadstoffen in Abhängigkeit zum pH-Wert. Die freigesetzten Schwermetalle werden normalerweise mit der Atomabsorptions- (AAS) oder der Emissions-Spektrometrie (ICP-OES) bestimmt. Diese Werte können als Gesamtgehalt an mobilisiertem Metall betrachtet werden und geben keine Aussagen über die wirkungsbezogene reale Toxizität des Eluats bzw. des untersuchten Feststoffes.

Eine Kombination mit einem wirkungsbezogenen Verfahren wie dem Biolumineszenz-Hemmtest mit Leuchtbakterien ermöglicht eine differenzierte Aussage über die Ökotoxizität eines Feststoffes. Durch eine Variation des Hemmtests (Zusatz von EDTA) ist es sogar möglich, Hinweise auf die Hauptbindungsform der Schwermetalle und den Anteil der organischen Substanzen an der Hemmwirkung abzuschätzen.

Schlagwörter: pH_{stat} -Verfahren; Biolumineszenz-Hemmtest; Leuchtbakterien-Test (LBT); Verfahrenskombination, pH_{stat} -Verfahren und Biolumineszenz-Hemmtest; Komplexbildner EDTA, Variation Biolumineszenz-Hemmtest; Mobilisationsverhalten; Schwermetalle, von; Atomabsorptions-Spektrometrie; AAS; Emissionsspektrometrie, optische; ICP-OES; Umweltanalytik; Ökotoxizität, Feststoffe, von

Abstract

Effect-Oriented Environmental Analysis by Combination of: pH_{stat} -Procedure and Bioluminescence-Inhibition Test: Mobilisation of Heavy Metals from Solids

The pH_{stat} -procedure is a method to examine the pH-dependent mobilisation of heavy metals and other pollutants from solids. The metals in such extracts are usually determined by atomic absorption (AAS) or by emission spectrometry (ICP-OES). The obtained values present the total amount of mobilized metals. A statement concerning the effect-oriented true toxicity of the extract, respective of the examined solid, is not possible.

A combined effect-oriented procedure, such as a the bioaluminescence-inhibition test with luminescence bacteria enables a precise

statement about the ecotoxicity of solids. A variation of the inhibition test (addition of EDTA) indicates the main binding forms of heavy metals and the part of inhibition caused by organic material.

Keywords: pH_{stat} -procedure; bioluminescence-inhibition test; luminescence bacteria test; procedure-combination, pH_{stat} -procedure and bioluminescence inhibition test; mobilisation, heavy metals of; atomic absorption spectrometry; AAS; emission spectrometry, optical; ICP-OES; environmental analysis; ecotoxicity, solids of

1 Einleitung

Zur Untersuchung des pH-Einflusses auf die Mobilisierbarkeit von Schwermetallen aus Böden, Schlämmen und Sedimenten wurde von OBERMANN und CREMER [1] das sogenannte pH_{stat} -Verfahren entwickelt. Für die maximale Mobilisierbarkeit der Schadstoffe, als „worst case“ bezeichnet, sind die pH-Werte 4 und 11 gewählt worden. Die Elution bei pH 4 simuliert den Einfluß des sauren Regens; bei pH 11 werden vornehmlich die Metallanteile freigesetzt, die an Huminsäuren gebunden vorliegen. Eine Elution bei pH 4 ist zur Feststellung der Umweltverträglichkeit und zur Untersuchung von Langzeiteffekten in natürlichen Umgebungen zu empfehlen.

Die Gesamtkonzentrationen der Schwermetalle in Eluaten werden in der Regel mit den Methoden Atomabsorptions-Spektrometrie (AAS) oder ICP-OES (optischer Emissions-Spektrometrie) bestimmt. Die so ermittelten Daten liefern nur unzureichende Informationen über die zu erwartende Ökotoxizität, da verschiedene chemische und physikalische Zustandsformen – als Elementspezies definiert – nicht berücksichtigt sind. Der Biolumineszenz-Hemmtest mit Leuchtbakterien dagegen stellt ein Verfahren dar, das zur Bestimmung der möglichen Toxizität von Metallen und organischen Substanzen in Wasser [2] und auch Eluaten [3] eingesetzt werden kann.

Wenn die Meßbedingungen des Biolumineszenz-Tests geändert werden, zum Beispiel durch Zugabe des Komplexbildners EDTA, kann auch zwischen freien, verfügbaren und gebundenen Schwermetall-Ionen unterschieden werden. Ein Vergleich der Hemmwirkungen auf Leuchtbakterien zwischen freien Metallionen und mit EDTA komplex gebundenen Metallen zeigt, daß EDTA die toxische Wirkung der Schwermetalle erheblich verringert bzw. weitgehend unterdrückt [3, 4].

Die Kombination des pH_{stat} -Verfahrens mit dem Biolumineszenz-Hemmtest sollte eine differenzierte Aussage sowohl über die Mobilisierbarkeit als auch die Toxizität der mobilisierten Schwermetallanteile in den Eluaten ermöglichen. Mit den veränderten Hemmtestbedingungen können somit Effekte beobachtet werden, die einen Hinweis auf die reale Toxizität – hier die Wirkung auf Leuchtbakterien – und die Hauptbindungsform im Sinne der Elementspeziesanalytik der Schwermetalle ergeben sollte.

2 Experimentelles

2.1 Probenmaterialien

Es handelt sich bei allen untersuchten Proben um Material aus der Region des Oberharzes.

Für die Gewinnung der Haldenmaterialien wurden verschiedene Abraumhalden an unterschiedlichen Stellen (Haldentop, Haldenflanke, Haldenfuß) in 0,5 m Tiefe beprobt. Das gewonnene Material wurde luftgetrocknet, grob gebrochen und der Anteil mit einer Korngröße über 1 cm abgesiebt und verworfen.

Die Sedimente stammen aus verschiedenen Bach- bzw. Flußläufen. Nach Lufttrocknung und Brechen wurden bei den Sedimenten 1 und 2 die Anteile über 2 mm abgesiebt und verworfen. Das Sediment 3 wurde nur luftgetrocknet.

Die pH-Werte der Bodenlösungen in Tabelle 1 wurden nach DIN S4 bestimmt. Die Metallgehalte der Feststoffproben wurden durch Druckaufschluß nach TÖLG mit 2 mL HNO_3 und 2 mL HF sowie 5 Stunden bei 165 °C und Messung mittels ICP-OES bestimmt.

Tabelle 2 gibt die Kohlenstoffgehalte der Festproben sowie der Eluate wider. Die CSB-Werte wurden mit dem Küvettest LCK 414 (Dr. Bruno Lange, GmbH, Düsseldorf) bestimmt.

2.2 Verwendete Geräte

Die Kohlenstoffgehalte wurden mit dem LiquiTOC (Heraeus, Hanau) bestimmt. Die Druckaufschlüsse erfolgten mit dem BTU 842 (Berghof Labortechnik, Eningen). Für die Elution nach den pH_{stat} -Verfahren ist das Gerät behrotest, pH_{stat} 4+4 (behr Labor-Technik GmbH, Düsseldorf) verwendet worden. Der Biolumineszenz-Hemmtest wurde mit dem LUMISTox (Dr. Bruno Lange GmbH, Düsseldorf) durchgeführt. Die Bestimmung der Gesamtmetallgehalte erfolgte mittels einer ICP-OES (SPECTRO Analytical Instruments, Kleve).

Tabelle 1: pH-Werte und Metallgesamtgehalte der eingesetzten Probenmaterialien

Probe	pH Bodenlösung a	Metallgesamtgehalte [mg/kg]			
		Cd	Pb	Cu	Zn
Halde 1	6,6	44	14300	9770	26700
Halde 2	6,5	60	1820	306	7820
Halde 3	6,6	86	30900	3010	28500
Halde 4	8,4	65	5970	453	9060
Sediment 1	7,3	36	19200	307	3910
Sediment 2	7,4	22	16100	404	4250
Sediment 3	7,0	15	6750	452	3180

a Die pH-Messung erfolgte im Eluat einer 24-stündigen Elution mit destilliertem Wasser nach DIN S4

Tabelle 2: Kohlenstoffgehalte der Proben und der untersuchten Eluate

Probe	TC [g/kg]	TOC [mg/L]	TIC [mg/L]	CSB [mg/L]
Halde 1	42,9	22	14	33,0
Halde 2	> 100	280	16	15,5
Halde 3	36,0	168	20	3,51
Halde 4	16,5	85	27	29,3
Sediment 1	14,5	45	54	46,6
Sediment 2	2,8	36	61	56,0
Sediment 3	5,6	36	69	18,7

TC: Gesamtkohlenstoffgehalt der Probe, TOC: Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff in den pH_{stat} -Eluaten bei pH 4, TIC: Gesamtgehalt an anorganischem Kohlenstoff in den pH_{stat} -Eluaten bei pH 4, CSB: chemischer Sauerstoffbedarf in den pH_{stat} -Eluaten bei pH 4

2.3 Reagenzien

Alle benutzten Reagenzien sind mindestens vom Reinheitsgrad p.a. oder suprapur. Die benutzten Kalibrationsstandards für die ICP-OES werden aus dem Multielementstandard IV (Merck, Darmstadt) mit bidestilliertem Wasser und HNO_3 suprapur hergestellt.

2.4 Durchführung der Elution

Es werden 100 g getrocknete Probe in 2-L-Glasflaschen eingewogen, mit einem Liter destillierten Wassers versetzt und 24 h bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 200 U/min auf einem Horizontalschüttler bewegt. Der pH-Wert wird während der Elution mit einer 2,5 mol/L Salpetersäure bzw. einer 1 mol/L Natronlauge auf einen Wert von $4 \pm 0,2$ konstant gehalten. Nach der Elution wird ein Aliquot abdekantiert, zentrifugiert und schließlich über einen 0,45 µm Membranfilter (Celluloseacetat, Sartorius, Göttingen) filtriert.

2.5 Durchführung des Biolumineszenz-Hemmtests

Der Test ist analog der DIN-Vorschrift Nr. 38412 L 34 [5] ausgeführt worden. Dazu wird jede Probe zunächst auf 2 % NaCl aufgesalzen. Die Verdünnungsreihe wird mit einer 2 %igen Natriumchloridlösung angesetzt. Dann werden jeweils 0,5 mL Probenlösung 0,5 mL reaktiverer Leuchtbakterienlösung zugesetzt und die Hemmung nach 30 min bestimmt.

Für die Variation des Testes werden 10 µL einer 5g/L EDTA-Lösung (Titriplex, III, Merck, Darmstadt) zu jeder Verdünnungsstufe hinzugefügt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Ergebnisse

In den Eluaten der Proben sind mehrere Metalle mittels des ICP-OES bestimmt worden. Es zeigte sich, daß die vier in **Tabelle 3** aufgeführten Metalle für diese Proben signifikant und auch teilweise in umweltproblematischen Konzentrationen mobil sind. Alle Elutionen wurden bei einem pH von 4 ausgeführt, da die Mobilisation von Schwermetallen unter sauren Bedingungen im beprobten Gebiet des Harzes zu erwarten ist.

Der erste Teil der **Tabelle 3** zeigt die Hemmung der Leucht-bakterien durch die Metalle Cd, Cu, Pb und Zn, welche anhand von Standardsalzlösungen als Nitrate in [3] aufgenommen worden sind. Die Hemmungen sind als EC(effective concentration)₅₀- bzw. EC₂₀-Werte dargestellt. Der EC50-(EC20-) Wert gibt die Konzentration an, bei ein

50 %iger (20 %iger) Effekt an einem lebenden Organismen festgestellt werden kann (in diesem Fall: Hemmung der Lumineszenz bei den Leucht-bakterien). Da sich diese Werte in der Regel auf reine Substanzen oder deren Lösungen beziehen, muß im Fall der Eluate eine andere Meßgröße eingeführt werden, der G-Wert. Er stellt die Verdünnung eines Eluats dar, bei dem 50 % bzw. 20 % Hemmung analog den EC-Werten festgestellt werden.

Tabelle 3 zeigt die experimentell bestimmten (mit und ohne EDTA-Zusatz) und die aus den Metallgesamtgehalten berechneten G-Werte. Diese letzteren werden als theoretische G-Werte bezeichnet und werden berechnet, indem die bestimmten Metallkonzentrationen durch die angegebenen EC-Werte geteilt werden (z.B. bei Halde 1, 108 mg/L Pb/2,5 = 43). Der erhaltene Wert stellt den Verdünnungsfaktor dar, um den das Eluat theoretisch n-mal verdünnt werden müßte, damit der gewünschte Effekt (EC₅₀ bzw. EC₂₀) eintritt. Zur Berechnung der theoretischen G-Werte trifft man die Annahme, daß die hemmenden Metalle in den Eluaten in der gleichen ionogenen Form wie in den Standardsalzlösungen vorliegen. In den Eluaten ist in der Regel ein Metall vorhanden, daß mit Abstand den größten theoretischen G-Wert erreicht, der in **Tabelle 3** fett hervor-

Tabelle 3: Wirkungsbezogener Vergleich von Schwermetallkonzentrationen in pH_{star}-Eluaten bei pH 4 anhand berechneter und experimentell bestimmter Verdünnungsfaktoren mittels des Leucht-bakterientests

Hemmung von Leucht-bakterien in Standardsalzlösung als Nitrate in [mg/L], entnommen aus [3].

EC₅₀: Cd 16, Cu 63; Pb 2,5; Zn 38
EC₂₀: Cd 7,2; Cu 31; Pb 0,37; Zn 5,7

Probe	Element	Konz. [mg/L] im Eluat	G bei H ₃₀ (50 %)		G bei H ₃₀ (50 %)	
			berechn. ^a	Σ gef. ^b /+EDTA ^c	berechn. ^a	Σ gef. ^b /+EDTA ^c
Halde 1	Cd	0,07	0,0		0,0	
	Pb	108	43	13 / 5,5	116	(43) / 9,2
	Cu	62	1,0		0,0	
	Zn	40	1,1		7,0	
Halde 2	Cd	1,0	0,1		0,1	
	Pb	6,7	2,7		18	
	Cu	1,6	0,0		0,1	
	Zn	241	6,3	4,0 / 3,8	42	6,3 / 5,4
Halde 3	Cd	2	0,1		0,3	
	Pb	105	42	13 / 10	283	27 / 14
	Cu	10	0,2		0,3	
	Zn	286	7,0		18	
Halde 4	Cd	1,5	0,1		0,2	
	Pb	196	78	9,0 / 6,3	530	14 / 30
	Cu	5,2	0,1		0,2	
	Zn	383	10		67	
Sediment 1	Cd	0,5	0,0		0,0	
	Pb	71	28	4,1 / 3,1	192	(11) / 4,4
	Cu	0,5	0,0		0,0	
	Zn	32	0,8		5,6	
Sediment 2	Cd	0,7	0,0		0,1	
	Pb	122	49	13 / 9,2	330	(28) / 15
	Cu	2,5	0,0		0,1	
	Zn	318	8,4		56	
Sediment 3	Cd	0,2	0,0		0,0	
	Pb	7,9	3,2	3,4 / 0,5	21	(15) / 2,1
	Cu	1,2	0,0		0,0	
	Zn	2,3	0,1		0,4	

G bei H₃₀ (50 %), G bei H₃₀ (20 %): Verdünnungsfaktor bei dem 50 oder 20 % Hemmwirkung auftritt; a berechnete, b nach dem DIN-Verfahren [5] gemessene und c gemessene G-Werte mit EDTA-Zusatz

gehoben ist. Beim Vergleich dieses Wertes mit den experimentell ermittelten G-Werten werden die hemmenden Einflüsse der übrigen Metalle diesem signifikanten Metall gegenüber vernachlässigt.

3.2 Diskussion

Ein Vergleich zwischen den theoretischen und den experimentell bestimmten G-Werten zeigt, daß die theoretischen Werte in keinem Fall erreicht werden. Bei den Eluaten von Halde 1 und 3 ist der experimentell bestimmte Wert für G bei H_{30} (50 %) nur 1/3 so hoch wie der erwartete (berechnete) Wert.

Da die berechneten Werte aus den Gesamtmetallgehalten und den EC-Werten ermittelt werden, kann aus den Ergebnissen gefolgert werden, daß die Metalle im wesentlichen nicht ionogen sondern als nichttoxische (bzw. bioverfügbare) eher komplex gebundene Metallspezies vorliegen.

Durch den Zusatz von EDTA zum Hemmtest können verfügbare freie Metallionen gebunden und dadurch ihre toxische Wirkung unterbunden bzw. verringert werden. Der danach gemessene Hemmwert gibt einen Hinweis auf die toxische Wirkung allein der organischen Inhaltsstoffe. Die Konzentration des EDTA (0,015 mmol/L) ist im Vergleich zum benötigten stöchiometrischen Verhältnis sehr gering. Die maximale nichthemmende Konzentration von EDTA ist mit 0,048 mmol/L bestimmt worden [6]. Höhere Konzentrationen von EDTA können unkontrollierbare Effekte auf die Leuchtbakterien hervorrufen.

Der toxische Einfluß der organischen Substanzen ist bei den Probenmaterialien sehr unterschiedlich. So konnte bei Sediment 3 wenig bzw. kein Einfluß festgestellt werden, wobei bei Halde 2 und 3 der Großteil der Hemmung wohl durch die organischen Komponenten hervorgerufen wird.

Genauere Aussagen sind aber erst durch das Heranziehen der Werte für G bei H_{30} (20 %) möglich, da deren Bestimmung mit geringeren Fehlern behaftet ist. Die graphische Bestimmung erfolgt in einem Teil der Hemmkurve, welcher eine geringe Steigung aufweist. Der Unterschied zwischen den berechneten und den aus Messungen ermittelten Werten ist noch größer als bei den Werten für G bei H_{30} (50 %). Der Vergleich der Werte für G bei H_{30} (20 %) mit und ohne EDTA stützt die Vermutung, daß die organischen Substanzen im Eluat von Halde 2 allein die Toxizität desselben verursachen. Allerdings zeigt der Wert für G bei H_{30} (20 %) von Halde 3 einen geringeren Einfluß der organischen Substanzen als anhand des G bei H_{30} (50 %) vermutet wurde.

Bei Halde 4 ist der Wert für G bei H_{30} (20 %) mit EDTA doppelt so hoch wie ohne EDTA, was wohl auf die Freisetzung von organischen Komplexbildnern zurückzuführen ist (s. u.).

Die Hemmung der Leuchtbakterien wurde nach 15, 30 und 45 min. mit und ohne Zusatz von EDTA gemessen. Die bestimmten Werte für G bei H_{Zeit} (50 %) sind in Tabelle 4 dargestellt. Es wird festgestellt, daß sich der G-Wert beim normalen Biolumineszenz-Hemmtest nach 30 min. nur noch unwesentlich ändert. Durch den EDTA-Zusatz setzt eine

kinetisch kontrollierte Reaktion ein. Das EDTA kann an Metalle gebundene Komplexbildner infolge einer Umkomplexierungsreaktion freisetzen. Die freigesetzten Komplexbildner wiederum können eine höhere Toxizität besitzen. Andererseits ist es aber auch möglich, daß durch den Zusatz von EDTA die Hemmung an sich kinetisch kontrolliert ist und der eigentliche Effekt nur zeitverzögert erfolgt.

Tabelle 4: Mit dem Biolumineszenz-Hemmtest bestimmte Verdünnungsfaktoren in Abhängigkeit von der Zeit; Vergleich der Hemmungen vor und nach EDTA-Zusatz

Probe	G bei H_{Zeit} (50 %)		
	15 min	30 min	45 min
Halde 1	10	13	12
+EDTA	3,9	5,5	6,6
Sediment 1	11	12	13
+EDTA	7,6	9,2	12
Sediment 3	1,6	3,4	3,3
+EDTA	0,1	0,5	1,1

G bei H_{30} (50 %): Verdünnungsfaktor, bei dem 50 % Hemmwirkung auftritt

Durch die Kombination des pH_{stat} -Verfahrens mit dem Biolumineszenz-Hemmtest können differenzierte Aussagen sowohl über die Mobilisierbarkeit als auch zur realen Ökotoxizität gemacht und Hinweise auf die Bindungsformen von Metallen in Eluaten gewonnen werden. Aussagen über den Anteil der organischen Substanzen an der Ökotoxizität sind über die beobachteten Effekte möglich. Es ist darüber hinaus anzunehmen, daß mit der kinetischen Betrachtung auch die toxische Wirkung von freigesetzten Komplexbildnern festgestellt werden kann, wozu jedoch noch weiterer Untersuchungen erforderlich sind. Die Kombination des pH_{stat} -Verfahrens mit weiteren Bio- oder Enzymtests ist ebenfalls vorstellbar.

4 Literatur

- [1] OBERMANN, P., CREMER, S.: Materialien zu Ermittlung und Sanierung von Altlasten (1991), Bd. 6, Nordrhein-Westfalen
- [2] KANNE, R.: Analytiker Taschenbuch, Bd. 8., Springer, Berlin Heidelberg New York (1989) 265–279
- [3] LÄTSCH, A., REINECKE, H., SCHWEDT, G.: Leuchtbakterientest zur Beurteilung der Toxizität von Extrakten aus Erzabraumhalden, *Erzmetall* **44** (1991) 188–191
- [4] MAZIDJI, C. N., KOOPMAN, B., BITTON, G., NEITA, D.: Distinction between heavy metal and organic toxicity using EDTA chelation and microbial assays, *Environ. Toxicol. Water Qual.* **7** (1992) 339–353
- [5] DIN 38414 Teil 34: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L), Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum*-Leuchtbakterien-Abwassertest mit konservierten Bakterien (L34) Beuth Verlag, Berlin (März 1991)
- [6] REITER, C.: Entwicklung eines automatisierten Leuchtbakterientests zur kontinuierlichen Abwasserüberwachung, Dissertation TU Clausthal 1995, ISBN 3-930697-49-1

Eingegangen: 03. 09. 1996
Akzeptiert: 26. 09. 1996