

Originalarbeiten

Ökotoxikologische und humantoxikologische Risikobewertung PAK-belasteter Böden vor und nach biologischer Behandlung

¹Peter H. Roos, ²Walter D. Weißenfels, ³Manfred van Afferden, ⁴Frank Pfeifer, ¹Walter G. Hanstein¹Institut für Physiologische Chemie, Ruhr-Universität Bochum, D-44780 Bochum²RAG Umwelt Kommunal GmbH, D-46213 Bottrop³IMTA, Paseo Cuauhnáhuac 8532, 62550 Jiutepec, Mor., Mexico⁴DMT Gesellschaft für Forschung und Prüfung mbH, D-45307 Essen

Korrespondenzautor: PD Dr. Peter H. Roos; e-mail: peter.h.roos@ruhr-uni-bochum.de

DOI: <http://dx.doi.org/10.1065/uwsf199911.002>

Zusammenfassung. Ziel dieser Arbeit ist es, mögliche toxische Wirkungen PAK-belasteter Böden vor und nach biologischer Sanierung zu erfassen. Hierbei liegt der Schwerpunkt auf der Abschätzung des Risikos für Säugetiere nach oraler Aufnahme von Bodenpartikeln. Als Biomarker-Effekt für die PAK-Aufnahme haben wir in Ratten die Induktion des lebermikrosomalen P450-Enzyms CYP1A1 bestimmt, dessen Expression durch PAK moduliert wird. Die Ergebnisse des Biomarker-Tests wurden mit denen des gleichzeitig eingesetzten Biolumineszenz-Hemmtests (*Vibrio fischeri*) verglichen, wobei als Testmaterialien jeweils die Original- und die entsprechenden sanierten Bodenproben eingesetzt wurden. Nach biologischer Sanierung PAK-belasteter Böden finden wir je nach Bodenbeschaffenheit und Schadstoffzusammensetzung quantitativ und qualitativ unterschiedliche PAK-Restgehalte in den entsprechenden Bodenproben. Bevorzugt verbleiben die aufgrund ihrer Hydrophobizität schlechter mobilisierbaren höherkernigen PAK in den Materialien. Zusätzlich kann ein hoher organischer Kohlenstoffgehalt der Böden den Schadstoffaustrag in die Wasserphase vermindern und somit hohe Schadstoffrestgehalte nach Sanierung bedingen. Im verwendeten Biolumineszenz-Hemmtest weisen Eluate aller hier untersuchten Bodenproben eine durch Sanierung stark verminderte oder nicht mehr nachweisbare Hemmwirkung auf. Im Gegensatz hierzu hat aber eine biologische Behandlung der Böden kaum einen Effekt auf das Induktionsvermögen für lebermikrosomales CYP1A1 nach oraler Aufnahme durch Ratten. Es zeigt sich, daß die Höhe des Induktionssignals gut mit den Gehalten der Böden an PAK mit 5 und 6 Ringen korreliert, ungeachtet der Tatsache, ob es sich um Original- oder sanierte Böden handelt. Der im Biolumineszenz-Test beobachtete Sanierungserfolg spiegelt sich also im Säugetier-Biomarkertest nicht wider. Hieraus ergeben sich neue, für den Menschen relevante Bewertungskriterien hinsichtlich einer Risikoabschätzung.

Schlagwörter: Aufnahmepfad, oral; Biomarker, Säugetiere; Bioverfügbarkeit, Schadstoffe, Säugetiere; CYP1A1; Cytochrome P450; Effekt-Biomarker; EROD-Aktivität; Lumineszenz-Hemmtest, *Vibrio fischeri*; orale Schadstoffaufnahme; PAK; polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK); Sanierung, biologisch; Sanierung, Mietenverfahren; Sanierungserfolg; Schadstoffe, organisch, Boden

Abstract

Ecotoxicological and Human Toxicological Risk Assessment of PAH-contaminated Soils Before and After Biological Treatment

The goal of the present work is to assess the adverse effects of soil bound polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) which remain in soils after biological remediation. We focus on risk assessment for mammalian species with respect to the oral uptake of contaminated soil particles and compare the results of a biomarker test with those of an ecotoxicological assay, the bioluminescence inhibition test with *Vibrio fischeri*. As a biomarker effect in mammals, we determined the liver microsomal cytochrome P450 enzyme CYP1A1 which is induced by PAH in exposed rats. After biological soil treatment, different amounts of PAH remain in the soil depending on the soil properties and initial pollutant composition. Particularly, higher condensed PAH resists biological treatment due to its hydrophobicity. In addition, high amounts of organic carbon in the soils affect remediation efficiency. In the bioluminescence inhibition test, eluates of all biologically treated soils studied do not reveal any or only low inhibitory effects. In contrast, the oral uptake of biologically treated contaminated soils leads to induction levels for CYP1A1 similar to those in the untreated samples. A good correlation is obtained between CYP1A1 levels and the amount of 5 and 6-ring PAH in the soil samples. The main result is that the remediation efficiency determined by the luminescence test is not reflected by the biomarker test, a finding which indicates the high bioavailability of residual PAH in soils. Consequently, new criteria for human risk assessment can be delineated.

Keywords: Bioavailability, pollutants, mammals; Biomarker of effect; biomarker, mammalian species; contaminants, organic, soil; CYP1A1; cytochrome P450; EROD activity; luminescence inhibition test, *Vibrio fischeri*; oral contaminant uptake; PAH; polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH); remediation efficiency; remediation, biological; soil, contaminated uptake path, oral

1 Einleitung

Zur Bestimmung der Exposition und zur Bewertung des Risikos schadstoffkontaminierter Böden stehen chemisch-analytische sowie verschiedene ökotoxikologische Methoden zur Verfügung, mit denen entweder die Schadstoffgehalte oder Effekte der Schadstoffe auf physiologische und biochemische Parameter lebender Organismen wie Bakterien, Pflanzen oder Arthropoden bestimmt werden können (SERAT et al., 1965; LÜSSEN & RAHMANN, 1980; SHEPPARD & EVENDEN, 1994). Risiken für den Menschen werden durch Expositionsabschätzungen für unterschiedliche Nutzungsszenarien abgeleitet. Die schädigenden Wirkungen werden prognostiziert und basieren auf den im Kontaktmedium Boden chemisch nachgewiesenen Schadstoffkonzentrationen und auf Ergebnissen epidemiologischer Studien oder toxikologischer Untersuchungen an Reinsubstanzen. Direkte Methoden zur Bestimmung der Exposition und zur Abschätzung der Risiken sind in der Regel sehr aufwendig, kostenintensiv und stehen noch nicht in geeigneter Form für Routineuntersuchungen zur Verfügung. Entsprechende Testsysteme müssen die im Säugetierorganismus ablaufenden Prozesse der Schadstoff-Mobilisierung und -Resorption sowie synergistische Schadstoffwirkungen integrieren können. Solche Summeneffekte lassen sich zunächst nur im Tiermodell mit Hilfe geeigneter Biomarker bestimmen. Für die Diagnostik beim Menschen müssen dann entsprechende Testsysteme adaptiert werden. Eine wünschenswerte *in vitro*-Simulation der Vorgänge kann aufgrund mangelnder Kenntniss der beteiligten Mechanismen derzeit noch nicht realisiert werden. Ein erster Schritt in diese Richtung ist die Entwicklung eines Magen-Darm-Modells, das eine Abschätzung zumindest der Mobilisierbarkeit oral aufgenommener partikelgebundener Schadstoffe im Gastrointestinaltrakt erlaubt (HACK & SELENKA, 1996), alle nachfolgenden Schritte aber naturgemäß nicht berücksichtigen kann. Ebenfalls existiert ein *in vitro*-Test zur Bestimmung des Toxizitätspotentials von Schadstoff-Eluaten, der auf der Induktion des Cytochroms P450-Enzyms CYP1A1 in Leberzellkulturen beruht und somit rezeptorvermittelte synergistische Schadstoffeffekte integriert (HOFMAIER et al., 1999). Zur Abschätzung des realen Risikos bodengebundener Schadstoffe für den Menschen kann auch dieser Test nicht herangezogen werden, da er die Effekte von Prozessen wie der Mobilisierung, der Resorption, der Primärmetabolisierung und des Transports von Schadstoffen nicht einbeziehen kann.

Schadstoffe gelangen über den Gastrointestinaltrakt, die Atemwege oder über die Haut in den Säugetierorganismus, wobei die Aufnahmeraten pfad- und nutzerabhängig sind (STUBENRAUCH et al., 1994). Nach oraler Aufnahme können bodengebundene PAK im Gastrointestinaltrakt von Säugetieren mobilisiert und resorbiert werden. Ihre Verteilung über das Blut in die verschiedenen Gewebe und Organe des Körpers hat kurz- und langfristige biochemische Effekte zur Folge. Schnelle, adaptive Wirkungen lassen sich diagnostisch für Expositionsstudien nutzen. Als frühen Effekt für eine orale PAK-Aufnahme haben wir im Rattenmodell die Induktion des lebermikrosomalen Cytochrom P450-Isoenzym CYP1A1 verwendet. Die Untersuchungen haben gezeigt, daß das Ausmaß der CYP1A1-Induktion gut mit den Ge-

halten der Böden an 5- und 6-Ring PAK korreliert (ROOS et al., 1994a; 1996). Die Eignung von CYP1A1 als Expositions- oder Effekt-Biomarker wurde auch schon in anderem Zusammenhang gezeigt (VANDEN HEUVEL et al., 1993; RUMSBY et al., 1996).

Cytochrome P450 sind in Säugetieren mit einer Vielzahl von Isoenzymen vertreten; so sind für die Ratte bisher mehr als 40 Isoenzyme bekannt (NELSON et al., 1996). Cytochrome P450 spielen eine wesentliche Rolle im Phase I-Metabolismus von Fremdstoffen. Das von uns als Effekt-Biomarker genutzte Isoenzym CYP1A1 wird unter "Normalbedingungen" in der Leber in nur geringem Maße exprimiert. Es wird aber durch die Aufnahme bestimmter Schadstoffe wie PAK induziert und ist dann auch für die PAK-Metabolisierung verantwortlich (THOMAS et al., 1983; GUENGERICH, 1992). In den primären CYP1A1-katalysierten Reaktionen werden PAK in reaktive Metaboliten überführt, die letztendlich die Auslöser für eine chemisch induzierte Carcinogenese sind. CYP1A1 stellt also nicht nur aufgrund seines Expressions-Verhaltens, sondern auch wegen seiner Verknüpfung mit dem Prozeß einer chemisch induzierten Carcinogenese einen geeigneten Effekt-Biomarker für eine Risikobewertung dar (IOANNIDES & PARKE, 1993).

In dieser Studie haben wir verschiedene PAK-kontaminierte Böden vor und nach einer biologischen Sanierung hinsichtlich ihrer Toxizität für Mikroorganismen und ihres Induktionspotentials für lebermikrosomales CYP1A1 als Parameter zur Abschätzung der Humantoxizität vergleichend untersucht. Eine biologische Sanierung PAK-belasteter Böden kann zu einer drastischen Abnahme des Schadstoff-Gehalts führen, die zudem mit einer Verminderung der Toxizität für Mikroorganismen einhergeht (WEISSENFELS, 1994; 1998). Es stellt sich die Frage, ob diese Effekte auch mit dem Risiko-Potential für Säugetiere korrelieren. Dies ist nicht unbedingt zu erwarten, da sich die Mechanismen der Schadstoff-Aufnahme und -Verarbeitung bei niederen und höheren Organismen sehr unterscheiden. Hier ist zum einen zu denken an die für Mikroorganismen relevante Mobilisierung partikelgebundener Schadstoffe im Bodenmilieu im Vergleich zu der im Gastrointestinaltrakt von Säugetieren. Zum anderen ist die unterschiedliche Ausstattung verschiedener Organismen mit fremdstoffmetabolisierenden Enzymen zu berücksichtigen.

2 Material und Methoden

2.1 Aufbereitung, Analyse und Herkunft der Bodenprobe

Luftgetrocknete Bodenproben wurden durch abwechselndes Mahlen und Sieben komplett auf eine Korngröße von < 200 µm gebracht. Zur Bestimmung ihres PAK-Gehalts wurden die Böden mit Toluol extrahiert und die PAK mittels HPLC chromatographisch getrennt (CRÖSSMANN et al., 1992). Die folgenden Komponenten wurden identifiziert und quantifiziert (16-EPA-PAK): Naphthalin, Acenaphthylen, Acenaphthen, Fluoren, Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren, Pyren, Benzo[a]anthracen, Chrysen, Benzo[b]fluoranthren, Benzo[k]fluoranthren, Benzo[a]pyren, Dibenz[ah]anthracen, Benzo[ghi]perylen und Indeno[1.2.3-cd]pyren. Der organische Kohlenstoffgehalt wurde nach Zersetzung des anorganischen Karbonats mit Schwefelsäure als CO₂ durch nicht-dispersive

Infrarot-Spektroskopie (Modell Binos 100, Rosemont, Bochum, BRD) bestimmt. Alle untersuchten Bodenproben stammen aus dem Ruhrgebiet und zwar die Böden FW, LO, SL sowie VI von ehemaligen Kokereigebieten und der Boden BH vom Gelände eines Holzimprägnierwerks.

2.2 Toxizitätsbestimmung wäßriger Bodenextrakte

Die Herstellung der wäßrigen Bodenextrakte folgte den Bestimmungen der Deutschen Industrienorm DIN 38414, Teil 4 (1984). Bodenpartikel wurden durch zweimaliges Zentrifugieren (25.000* g für 30 min) entfernt und die Toxizität der Eluate für Bakterien durch Hemmung der Biolumineszenz von *Vibrio fischeri* nach DIN-Vorschrift 38412, Teil 34 (1991) mit einem Biocounter (Modell M2500, Lumac, Landgraf, NL) bestimmt.

2.3 Bakterieller Abbau bodengebundener PAK

2.3.1 Suspensionsbioreaktor

Die Böden BH, FW, LO und SL wurden im Suspensionsbioreaktor behandelt (WEISSENFELS, 1990).

2.3.2 Respirometer

Der PAK-Abbau von Boden VI wurde in einem Respirometer (Sapromat D12, Voith, Heidenheim, BRD) durchgeführt und die biologische Aktivität mit Hilfe eines Computer-Kalkulationsprogramms (DDES 12-48, Voith, Heidenheim, BRD) quantifiziert. Je 225 ml einer Bodenpartikel-Suspension in Mineralsalz-Medium (WEISSENFELS et al., 1992) wurden mit 25 ml einer 2 Wochen alten Bakterienmischkultur inokuliert, die durch Kultivierung in Medium mit Anthracenöl als einziger Kohlenstoffquelle selektiert wurde (WALTER et al., 1990). Die Suspension wurde solange bei 20°C gerührt, bis der mikrobielle Sauerstoffverbrauch zum Erliegen kam. Kontrollproben wurden mit 0,1 mg $HgCl_2/ml$ vergiftet. Die PAK-Gehalte wurden vor und nach mikrobiellem Abbau mit Hilfe der HPLC qualitativ und quantitativ analysiert.

2.3.3 Mietenverfahren

(Terraferm-Biosystem Erde, ANONYMUS, 1993). 50 kg homogenisierter Boden werden mit einer Nährstofflösung versetzt und in PE-Wannen mit einem Volumen von 90 Liter überführt. Nach 4 Monaten wurden die Böden zur Auflockerung mit 10 Volumenprozent Frischkompost vermengt (WEISSENFELS, 1998).

Die in Suspension oder mittels Mietenverfahren behandelten Böden sind durch die Zusätze "s" beziehungsweise "m" gekennzeichnet.

2.4 Einarbeitung von Bodenproben in Rattenfutter

Die gemahlten Bodenproben wurden nach folgendem Mischungsschema zu 5% in kommerzielles, gemahltes Rattenfutter (Altromin) eingearbeitet (Angaben für 1 kg Mischung):

1. 50 g Boden + 30 g Futter ergibt 80 g Mischung A
2. 5x (16 g Mischung A + 64 g Futter) ergibt 400 g Mischung B
3. 5x (80 g Mischung B + 120 g Futter) ergibt 1 kg Mischung

Die endgültige Mischung wurde mit 5% Pflanzenöl versetzt, mit Wasser zu einem dickflüssigen Brei geknetet, geformt und dann 3 bis 4 Tage bei Raumtemperatur getrocknet.

2.5 Versuchstiere und Behandlung der Tiere

Pro Versuch wurden zwei männliche Sprague Dawley-Ratten (200-250 g, Charles Rivers, Extertal, BRD) 1 Woche lang mit einer kommerziellen Diät gefüttert, in die PAK-kontaminiertes Bodenmaterial und Pflanzenöl zu je 5% (w/w) eingearbeitet waren. Die Behandlung der Ratten mit dem spezifischen CYP1A1-Induktor 3-Methylcholanthren erfolgte nach Guengerich & Martin (1980).

2.6 Präparation von Lebermikrosomen

Lebermikrosomen von Ratten wurden wie beschrieben isoliert (GUENGERICH, 1977) und bei -70°C aufbewahrt.

2.7 Bestimmung der Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität

Die Deethylierung von Ethoxyresorufin durch die Mikrosomenfraktionen wurde fluoreszenzphotometrisch durch kontinuierliche Aufzeichnung der Resorufin-Bildung bestimmt. Der Reaktionsansatz enthielt: 100 mM Tris-HCl, pH 7,8, 2,7 mM Isozitronensäure, 0,3 U/ml Isozitat-Dehydrogenase, 2 mM $MgSO_4$, 50 $\mu g/ml$ Rinderserumalbumin, 76 U/ml Katalase, 170 μM NADP und 2,5 μM Ethoxyresorufin. Die Reaktion wurde mit der Mikrosomenpräparation entsprechend einer Endkonzentration von 1 bis 100 nM P450 gestartet. Anregungs- und Emissionswellenlänge betragen 530 nm bzw. 585 nm (BURKE et al., 1985).

2.8 Quantitative Bestimmung von Protein und Cytochrom P450

Cytochrom P450 wurde nach der Methode von Omura & Sato (1964) als Kohlenmonoxid-Komplex nach Reduktion mit Natriumdithionit quantifiziert (Extinktionskoeffizient bei 450 nm: 91 $mM^{-1} cm^{-1}$). Die Proteinquantifizierung erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951) mit Rinderserumalbumin als Standard.

3 Ergebnisse und Diskussion

Wir haben 5 kontaminierte Böden (BH, FW, LO, SL und VI) hinsichtlich ihres PAK-Gehalts, ihres Gehalts an organischem Kohlenstoff, ihrer Toxizität für Mikroorganismen und ihrer Induktionswirkung auf CYP1A1 nach oraler Aufnahme bei Ratten untersucht. In gleicher Weise sind die entsprechenden Böden nach einer biologischen Sanierung untersucht worden.

Die Daten der Tabelle 1 verdeutlichen die unterschiedlichen PAK-Kontaminationen der verwendeten Bodenproben. Die Gesamtbelastungen der Böden an EPA-PAK liegen zwischen 156 und 2388 mg/kg Boden, wobei die Verhältnisse zwi-

Tabelle 1: PAK-Gehalte der unersuchten Bodenproben (mg PAK/kg Boden)

Parameter	Anzahl Ringe	Bodenproben											
		BH	BHs	BHm	FW	FWs	FWm	LO	LOm	SL	SLm	VI	VIs
TOC (Originalböden)		1.0			13.6			1.7		10.0		0.8	
Naphthalin	2	8	1.1	2.6	9	4.2	7.3	5.8	<0.5	23.7	22.7	192	9.6
Acenaphthylen	3	11	1.3	<0.5	3	0.7	<0.5	1.5	<0.5	157	22.2	48.7	<0.5
Acenaphten	3	33	4.2	2.8	18	21.5	12.4	242	3.3	218	23.0	477	10.9
Fluoren	3	22	0.9	4.5	8	3.7	6.4	163	0.7	362	46.0	345	1.7
Phenanthren	3	43	3.0	5.1	50	28.5	54.2	296	3.6	582	145	611	4.3
Anthracen	3	31	7.1	12.6	17	12.4	19.2	44.5	1.5	113	33.6	79.5	1.2
Summe: 3-Ring PAK		140	16.5	25.0	96	66.8	92.2	747	9.1	1432	269.8	1561	18.1
Fluoranthren	4	691	41.9	41.8	114	77.9	118.0	331	27.0	339	147	231	31.1
Pyren	4	313	26.8	40.1	88	64.4	91.0	70.4	30.3	180	89.9	112	22.0
Benzo[a]anthracen	4	135	23.7	18.5	95	66.3	73.7	46.1	21.9	188	97.2	82.4	15.6
Chrysen	4	73	23.0	25.3	56	45.2	59.5	32.0	19.3	242	67.6	49.0	9.3
Summe: 4-Ring PAK		1212	115.4	125.7	353	253.8	342.2	479.5	98.5	949	401.7	474.4	78.0
Benzo[b]fluoranthren	5	49	29.6	43.2	70	56.8	57.8	24.4	28.1	109	111	46.8	15.2
Benzo[k]fluoranthren	5	19	15.1	12.7	20	29.4	26.8	11.2	12.6	54.6	41.3	21.3	6.6
Benzo[a]pyren	5	30	20.9	18.8	69	60.6	53.9	24.2	24.0	107	80.2	39.4	12.9
Dibenzo[ah]anthracen	5	2	2.5	1.4	12	12.9	6.8	3.5	2.9	16.5	12.7	6.8	2.1
Summe: 5-Ring PAK		100	68.1	67.1	171	159.7	145.3	63.3	67.6	287.1	245.2	114.3	36.8
Benzo[ghi]perylen	6	7	3.7	7.4	39	29.4	33.0	16.3	16.4	51.0	40.6	22.5	6.5
Indeno[1,2,3cd]pyren	6	10	5.1	6.8	40	32.2	26.8	16.8	13.2	60.7	43.3	24.3	7.4
Summe: 6-Ring PAK		17	8.8	14.2	79	61.6	59.8	33.1	29.6	111.7	83.9	46.8	13.9
Summen													
Gesamt-PAK	2 - 6	1477.0	209.9	234.6	708.0	546.1	646.8	1328.7	204.8	2803.5	1023.3	2388.6	156.4
5- und 6-Ring PAK	5 - 6	117.0	76.9	81.3	250.5	221.3	205.1	96.4	97.2	398.8	329.1	161.1	50.7
Verhältnisse													
Anteil 5-, 6-Ring PAK (% der Gesamt-PAK)	—	7.9	36.6	34.7	35.3	40.5	31.7	7.3	47.5	14.2	32.2	6.7	32.4

BH, FW, LO, SL und VI: Originalböden. Die in Suspension beziehungsweise mittels Mietenverfahren behandelten Böden sind durch die Zusätze s und m gekennzeichnet. TOC, total organic carbon in %

schen hoch (5- und 6-Ring) und niedrig kondensierten Aromaten (2- bis 4-Ring) deutlich variieren. Während der Anteil an 5- und 6-Ring-PAK von Boden BH bei 7,9% liegt, beträgt er für Boden FW ca. 35%. Für eine Gefahrenabschätzung ist aber nicht nur die Gesamtbelastung an PAK bedeutsam sondern gerade auch der Anteil höherkondensierter Aromaten, da diese im Säugetierorganismus in reaktive, carcinogene Metaboliten überführt werden können.

Durch eine Sanierung wird das PAK-Muster der Böden zugunsten der höher kondensierten Aromaten verschoben. Ihre Anteile betragen nach der Sanierung zwischen 30% und 50% der gesamten EPA-PAK (→ *Tabelle 1*). Anhand der Daten aus *Tabelle 2* läßt sich zeigen, daß durch eine biologische Bodensanierung im wesentlichen nur PAK mit maximal 4 Ringen eliminiert werden. Auch nach den Sanierungsmaßnahmen verbleiben dementsprechend zwischen 70% und 90%

Tabelle 2: TOC-Gehalte und prozentuale Restgehalte von PAK-Gruppen nach biologischer Sanierung kontaminierter Böden

Bodenprobe	VIs	BHs	BHm	LOm	SLm	FWs	FWm
TOC des Originalbodens	0.8	1.0		1.7	10.0	13.6	
mg PAK/kg im Originalboden	2389	1477		1329	2803	708	
% PAK nach Sanierung:							
Gesamt EPA-PAK	6.5	14.2	15.9	15.4	36.5	77.1	91.4
2- bis 4-Ring PAK	4.7	9.8	11.3	8.7	28.9	70.9	96.4
5- bis 6-Ring PAK	31.5	65.7	69.5	100.8	82.5	88.5	82.0

s = Sanierung in Suspension.
m = Sanierung mittels Mietenverfahren

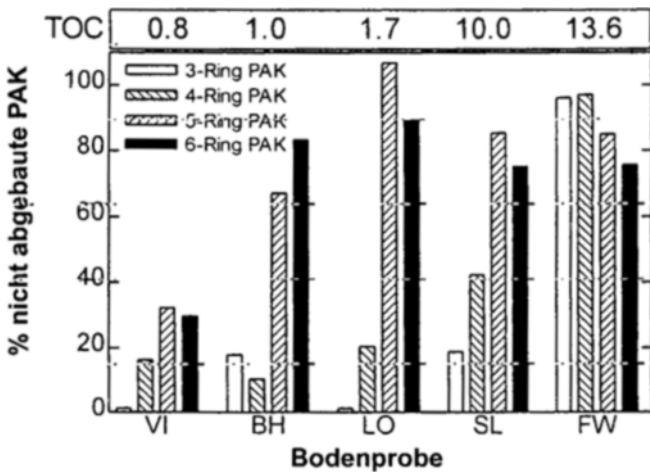


Abb. 1: Prozentuale Restgehalte von PAK-Gruppen nach biologischer Sanierung. Die Bodenproben sind nach ihrem TOC-Gehalt gereiht

der 5- und 6-Ring PAK im Boden. In Böden mit einem hohen Gehalt an organischem Kohlenstoff kann zudem die Eliminierbarkeit auch der niedrigkernigen PAK mit 3 und 4 Ringen erheblich eingeschränkt sein (→ Abb. 1). Ein solcher Effekt wird an den Bodenproben SL und FW verdeutlicht, deren Gehalte an 4-Ring PAK durch eine Sanierung im Mietenverfahren nur halbiert (42%) bzw. fast gar nicht verändert werden (96,9%) (→ Tabelle 1). Die biologische Sanierung von Böden mit niedrigem TOC bewirkt eine erhebliche Reduktion an Gesamt-PAK. So liegt die verbleibende Belastung der Böden VI, BH und LO zwischen 5% und 15% (→ Tabelle 2).

Im Lumineszenz-Hemmtest (*Vibrio fischeri*) zeigt sich ein eindeutiger Sanierungserfolg für die getesteten Bodenproben. Hier sind insbesondere die Böden LO und SL zu nennen, die nach Sanierung keine meßbare Toxizität mehr aufweisen (→ Tabelle 3). Es ist zu bemerken, daß die Böden SL und FW trotz ihrer hohen PAK-Gehalte auch im unsanierten Zustand eine nur niedrige bzw. keine toxische Wirkung aufweisen. Für diesen Effekt kann wieder der organische Kohlenstoffgehalt dieser Böden verantwortlich gemacht werden, der offenbar die Mobilisierbarkeit der Schadstoffe effizient vermindern kann (WEISENFELS, 1992; ROOS et al., 1994b).

Tabelle 3: Effekt einer biologischen Sanierung auf die im Biolumineszenz-Hemmtest bestimmte Toxizität PAK-belasteter Böden für *Vibrio fischeri*

Boden	Sanierung	GL ₂₀ -Wert	
		vor Sanierung	nach Sanierung
VI	Suspension	262	17
LO	Miete	230	1
SL	Miete	74	1
BH	Miete	33	2
FW	Miete	1	1

Der GL₂₀-Wert gibt die größte Verdünnung des wässrigen Bodeneluates an, die noch eine Hemmwirkung von 20% zeigt

Hinsichtlich des lebermikrosomalen CYP1A1 zeigen alle unsanierten und sanierten Böden eine Induktionswirkung (→ Tabelle 4). Die orale Aufnahme von Boden FW bewirkt eine besonders hohe Induktion (19,9 nMol Resorufin/mg Protein · min). Die gemessene induzierte EROD-Aktivität liegt hiermit an der Obergrenze der mikrosomalen Kapazität. EROD-Aktivitäten von maximal 20 nMol Resorufin/mg Protein · min oder bezogen auf Cytochrom P450 von ca. 13 nMol Resorufin/nMol P450 · min können durch intraperitoneale Applikation von PAK wie Benzo[a]pyren oder 3-Methylcholanthren erzielt werden (Roos et al., 1997). Zum Vergleich liegt die auf konstitutiv exprimierten P450-Enzymen basierende Hintergrundaktivität in unbehandelten und mit nicht-kontaminiertem Boden gefütterten Ratten bei ca. 0,2 nMol Resorufin/mg Protein · min. Die PAK-Analyse der kontaminierten Proben zeigt, daß Boden FW zwar den niedrigsten Gehalt an Gesamt-PAK, aber den höchsten Gehalt an 5- und 6-Ring PAK aufweist. Wie schon in früheren Arbeiten gezeigt (Roos et al., 1994a; 1996), korreliert die CYP1A1-Induktion mit den Gehalten der Böden an 5- und 6-Ring PAK. Diese Beziehung gilt auch unter Einschluß der biologisch sanierten Böden (→ Abb. 2).

Durch die biologischen Sanierungen wird das Induktionsvermögen der kontaminierten Böden für lebermikrosomales CYP1A1 und damit auch das Toxizitätspotential für den Menschen nur unzureichend vermindert (Probe LO, → Tabelle 4). Im Falle des Bodens SL finden wir sogar ein gesteigertes Induktionsvermögen nach Sanierung. Der Grund für das nach Sanierung nur wenig veränderte Induktionspotential der Böden ist die ineffiziente Eliminierung der höherkernigen PAK, mit deren Gehalt, wie in Abb. 2 gezeigt, die induzierende Wirkung korreliert. Eine Ausnahme hinsichtlich der Sanierbarkeit bildet der Boden VI, dessen Gehalt an 5- und 6-Ring PAK im Suspensionsverfahren auf fast 30% reduziert werden konnte. Die noch verbliebenen PAK führen aber immer noch zu einer Induktion von CYP1A1, wenn auch in geringem Maße (→ Tabelle 4). Ob die nach Sanierung leicht verringerte Induktionswirkung von Boden FW ein signifikanter Sanierungseffekt ist, kann an Hand der vorliegenden

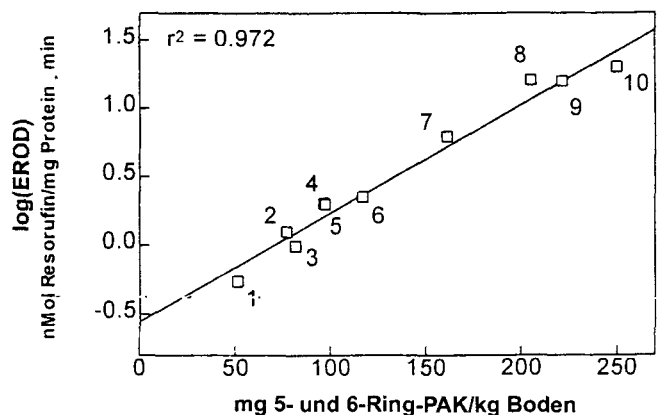


Abb. 2: Induzierte EROD-Aktivität nach oraler Aufnahme von Originalböden und den entsprechenden sanierten Böden: Abhängigkeit vom Gehalt der Böden an 5- und 6-Ring PAK in halblogarithmischer Auftragung. Bodenproben: 1 = VIs; 2 = BHs; 3 = BHm; 4 = LO; 5 = LOm; 6 = BH; 7 = VI; 8 = FWm; 9 = FWs; 10 = FW. Sanierung: s, in Suspension; m, Miete

Tabelle 4: Induzierte EROD-Aktivitäten nach oraler Aufnahme der Originalböden VI, BH, LO, SL, FW und der entsprechenden sanierten Böden

Boden	EROD-Aktivität (nMol Resorufin/mg Protein · min)		
	Original	Saniert, Miete	Saniert, Suspension
VI	6.20 ± 1.38	-----	0.55 ± 0.15
BH	2.24 ± 0.58	1.25 ± 0.05	0.99 ± 0.26
LO	2.03 ± 0.59	1.99 ± 0.23	-----
SL	7.24 ± 1.72	16.80 ± 1.80	-----
FW	19.90 ± 1.81	15.99 ± 1.59	15.69 ± 4.84
STK	0.23 ± 0.04	-----	-----
U	0.26 ± 0.04	-----	-----

STK = nicht kontaminierter Boden
 U = unbehandelte Tiere

Daten nicht beurteilt werden. Eine eingeschränkte Mobilisierbarkeit der für die Induktion verantwortlichen Substanzen, wie sie sich im Sanierungsergebnis und auch im Lumineszenz-Hemmtest widerspiegelt, trifft für den Extraktionsprozess im Gastrointestinaltrakt nach oraler Aufnahme der Böden offenbar nicht zu. Somit lassen sich Ergebnisse des Lumineszenz-Tests nicht zur Abschätzung des Toxizitätspotentials für den Menschen verwenden. Die mit dem *in vitro*-Lumineszenz-Test und dem *in vivo*-Enzyminduktions-Test erzielten Ergebnisse liefern zur Bewertung des Sanierungserfolgs unterschiedliche Kriterien, die je nach Gefährdungspfad und Nutzungsszenario differenziert gewichtet werden müssen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen hinsichtlich der hier untersuchten Bodenproben, daß die eingesetzten biologischen Sanierungsverfahren zur Gefährdungsminderung über den Wasserpfad effektiv eingesetzt werden können, während sie zur Verminderung des Toxizitätspotentials hinsichtlich des oralen Aufnahmepfads bei Säugetieren unbrauchbar erscheinen.

Die in den Zellen der Leber erreichten und für CYP1A1-Induktionen erforderlichen lokalen PAK-Konzentrationen sind uns nicht bekannt. Divergierende Angaben gibt es über den Anteil der vom Darm tatsächlich aufgenommenen Schadstoffe. So werden nach Weissenfels (1998) nach oraler Applikation PAK-dotierter Nahrungsmittel weniger als 1% der Schadstoffe resorbiert, während Fries et al. (1989) für verschiedene polychlorierte Biphenyle orale Bioverfügbarkeiten zwischen 67% und 82% bestimmt haben. Für bodengebundenes Dioxin finden Umbreit et al. (1986) ebenfalls eine hohe orale Bioverfügbarkeit. Hier gibt es offensichtlich unbeantwortete Fragen, die das Schicksal der Schadstoffe nach ihrer Mobilisierung im Gastrointestinal-Trakt betreffen. Fragen nach den beteiligten Prozessen und ihrer anteiligen Bedeutung an der Schadstoff-Verarbeitung sind zu klären.

Die mit den verschiedenen Analysemethoden erzielten Ergebnisse machen die Notwendigkeit eines spezifischen Tests zur Abschätzung der Bioverfügbarkeit und des Toxizitätspotentials bodengebundener Schadstoffe für Säugetiere und den Menschen deutlich. Die hier gezeigte Induktion des P450 Isoenzym CYP1A1 durch bodengebundene Schadstoffe kann als ein Beispiel für die Verwendung von Cytochromen P450 als Biomarker angesehen werden. Eine Ausweitung der Biomarker-Analytik auf weitere P450-Isoenzyme und damit

auch andere Substanzklassen erscheint möglich und wünschenswert. So wirken bestimmte PCB-Congenerere als Induktoren für CYP2B- oder CYP1A-Isoenzyme (PARKINSON et al., 1988), kleinere Moleküle wie Benzol und Toluol induzieren CYP2E1 (PYKKO, 1983; WANG et al., 1993), während komplexere, insbesondere nicht-planare Moleküle wie einige Pestizide, die Expression der vornehmlich Pharmaka-metabolisierenden CYP3A-Isoenzyme modulieren (PAOLINI et al., 1997). Die Einbeziehung des erst kürzlich entdeckten P450-Enzyms CYP1B1 (SUTTER et al., 1994) erscheint ebenfalls sinnvoll, da es durch PAK induzierbar ist und zudem an der Aktivierung verschiedener Procarcinogene beteiligt ist (SHIMADA et al., 1996; LUCH et al., 1998). Die zunächst im Rattenmodell erhaltenen Ergebnisse lassen sich weitgehend aufgrund entsprechend vorhandener und ähnlich regulierter orthologer Enzyme auf den Menschen übertragen, was insbesondere für das hier genutzte CYP1A1 gilt (NELSON et al., 1993; NEBERT & JONES, 1989). Die Analyse des P450-Isoenzymstatus bietet also potentiell die Möglichkeit, aktuelle Expositionen gegenüber verschiedenen Substanzklassen zu diagnostizieren. Sie liefert zudem Informationen über das individuelle Metabolisierungspotential für Schadstoffe und unterscheidet sich insofern von anderen Biomarkertests wie zum Beispiel der Bestimmung von Addukten zwischen DNA und PAK-Metaboliten. Die einzelnen Testverfahren liefern unterschiedliche Spektren von Bewertungskriterien und sind daher zunächst nicht als Alternativmethoden anzusehen. Inwieweit die verschiedenen Methoden praxisrelevant und kostengünstig für Risikobewertungen eingesetzt werden können, wird die Zukunft zeigen.

Danksagungen

Für die technische Assistenz bei der Versuchsdurchführung danken wir Frau C. Paschmann und Frau I. Bichbäumer. Ebenso danken wir dem anonymen Gutachter für seine kritischen Anmerkungen und nützlichen Hinweise zum Manuskript.

4 Literatur

ANONYMUS (1993): Bodenreinigungsanlagen: Standorte von Bodenreinigungsanlagen mit dem TERRAFERM-Verfahren der UMWELTSCHUTZ NORD-Gruppe. Prospekt der Umweltschutz Nord GmbH, Ganderkesee

BURKE, M.D.; THOMPSON, S.; ELCOMBE, C.R.; HALPERT, J.; HAAPARANTA, T.; MAYER, R.T. (1985): Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 3337-3345

CROSSMANN, G.; LIPHARD, K.G.; EUSTERMANN, K. (1992): Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe in Böden und Pflanzen, Bd. I Untersuchungsverfahren. Kommunalverband Ruhrgebiet (Herausgeber), Essen, pp. 17-29

DIN 38412, Teil 34 (1991): Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum*. Beuth-Verlag, Berlin

DIN 38414, Teil 4 (1984): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammbestimmung. Schlamm und Sedimente: Bestimmung der Eluierbarkeit mit Wasser (S4)

FRIES, G.F.; MARROW, G.S.; SOMICH, C.J. (1989): Oral bioavailability of aged polychlorinated biphenyl residues contained in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **43**, 683-690

GUENGERICH, F.P. (1977): Separation and purification of multiple forms of microsomal cytochrome P450. Partial characterization of three apparently homogeneous cytochromes P450 prepared from liv-

- ers of phenobarbital and 3-methylcholanthrene treated rats. *J. Biol. Chem.* **252**, 3970-3979
- GUENGERICH, F.P.; MARTIN, M.V. (1980): Purification of cytochrome P-450, NADPH-cytochrome P450-reductase, and epoxide hydratase from a single preparation of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **205**, 365-379
- GUENGERICH, F.P. (1992): Metabolic activation of carcinogens. *Pharmacol. Ther.* **54**, 17-61
- HACK, A.; SELENKA, F. (1996): Mobilization of PAH and PCB from contaminated soil using a digestive tract model. *Toxicol. Lett.* **88**, 199-210
- HOFMAIER, A.M.; SCHWIRZER, S.M.G.; WIEBEL, F.J.; SCHRAMM, K.-W.; WEGENKE, M.; KETTRUP, A.A.F. (1999) Bioassay zur Bestimmung von TCDD-Toxizitätsäquivalenten (TEQ) von Umweltproben und Reststoffen. *Z. Umweltchem. Ökotox.* **11**, 2-8
- IOANNIDES, C.; PARKE, D.V. (1993): Induction of cytochrome P4501 as an indicator of potential chemical carcinogenesis. *Drug. Metab. Rev.* **25**, 485-501
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- LUCH, A.; COFFING, S.L.; TANG, Y.M.; SCHNEIDER, A.; SOBALLA, V.; GREIM, H.; JEFICOATE, C.R.; SEIDEL, A.; GREENLEE, W.F.; BAIRD, W.M.; DOEHMER, J. (1998): Stable expression of human cytochrome P450 1B1 in V79 Chinese hamster cells and metabolically catalyzed DNA adduct formation of dibenzo[a,l]pyrene. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 686-95
- LÜSSEN, H.; RAHMAN, A. (1980): Wurzellängentest mit Gartenkresse – ein einfacher ökotoxikologischer Test. *Vom Wasser* **54**, 29-35
- NEBERT, D.W.; JONES, J.E. (1989): Regulation of the mammalian cytochrome P₁-450 (CYP1A1) gene. *Int. J. Biochem.* **21**, 243-252
- NELSON, D.R.; KAMATAKI, T.; WAXMAN, D.J.; GUENGERICH, F.P.; ESTABROOK, R.W.; FEYEREISEN, R.; GONZALEZ, F.J.; COON, M.J.; GUNSALES, I.C.; GOTOH, O.; OKUDA, K.; NEBERT, D.W. (1993): The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* **12**, 1-51
- NELSON, D.R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMANN, J.J.; FEYEREISEN, R.; WAXMAN, D.J.; WATERMAN, M.R.; GOTOH, O.; COON, M.J.; ESTABROOK, R.W.; GUNSALES, I.C.; NEBERT, D.W. (1996): The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1-42
- OMURA, T.; SATO, R. (1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-2378
- PAOLINI, M.; MESIRCA, R.; POZZETTI, L.; SAPONE, A.; CANTELLI-FORTI, G. (1997): Biomarkers of effect in evaluating dithionon carcinogenesis: selective induction and suppression of murine CYP3A isoform. *Cancer Lett.* **113**, 221-228
- PARKINSON, P.; THOMAS, P.E.; RYAN, D.E.; LEVIN, W.; FUJITA, T.; SAFE, S. (1988): Induction of rat liver microsomal cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase by a series of 4'-substituted-2,3,4,5-tetrachlorobiphenyls. *Toxicology* **53**, 289-300
- PYKKO, K. (1983): Time-course of effects of toluene on microsomal enzymes in rat liver, kidney, and lung during and after inhalation exposure. *Chem. Biol. Interact.* **44**, 299-310
- ROOS, P.H.; VAN AFFERDEN, M.; STROTKAMP, D.; HANSTEIN, W.G. (1994a): Bioverfügbarkeit bodengebundener PAK für Säugetiere: Cytochrome P450 1A1 als Expositionsbiomarker. In: Alef, K.; Blum, W.; Schwarz, S.; Riss, A.; Fiedler, H.; Hutzinger, O. (Hrsg.): *Ecoinforma, Umweltbundesamt, Wien, Vol. 6*, pp. 183-196
- ROOS, P.H.; VAN AFFERDEN, M.; STROTKAMP, D.; PFEIFER, F.; HANSTEIN, W.G. (1994b): Gefährdungspotential kontaminierter Böden: Bioverfügbarkeit bodengebundener PAK für Bakterien und Säuger. In: Alef, K.; Blum, W.; Schwarz, S.; Riss, A.; Fiedler, H.; Hutzinger, O. (Hrsg.): *Ecoinforma, Umweltbundesamt, Wien, Vol. 6*, pp. 169-182
- ROOS, P.H.; VAN AFFERDEN, M.; STROTKAMP, D.; PFEIFER, F.; HANSTEIN, W.G. (1996): Liver microsomal levels of CYP1A as biomarker for exposure and for bioavailability of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **30**, 107-113
- ROOS, P.H.; VAN AFFERDEN, M.; HANSTEIN, W.G. (1997): Biological effect-monitoring: Cytochrom P450 als Expositionsbiomarker für Umweltschadstoffe. In: Heiden, S.; W. Dott (Hrsg.), *Miniaturisierte und automatisierte Testverfahren zur human-ökotoxikologischen Bewertung von Schadstoffen in Umweltproben, Initiativen zum Umweltschutz 7*. Deutsche Bundesstiftung Umwelt, Osnabrück, pp. 21-55
- RUMSBY, P.C.; YARDLEY-JONES, A.; ANDERSON, D.; PHILLIMORE, H.E.; DAVIES, M.J. (1996): Detection of CYP1A1 mRNA levels and CYP1A1 Msp 1 polymorphisms as possible biomarkers of exposure and susceptibility in smokers and non-smokers. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* **16**, 65-74
- SERAT, W.F.; BUDINGER, F.E.; MUELLER, P.K. (1965): Evaluation of biological effects of air pollutants by use of luminous bacteria. *J. Bacteriol.* **90**, 832-833
- SHEPPARD, S.C.; EVENDEN, W.G. (1994): Simple whole-soil bioassay on microarthropods. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* **52**, 95-101
- SHIMADA, T.; HAYES, C.L.; YAMAZAKI, H.; AMMIM, S.; HECHT, S.S.; GUENGERICH, F.P.; SUTTER, T.R. (1996): Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.* **56**, 2979-2984
- STUBENRAUCH, S.; HEMPFING, R.; SIMMLEIT, N.; MATHEWS, T.; DOETSCH, P. (1994): Abschätzung der Schadstoffexposition in Abhängigkeit von Expositionsszenarien und Nutzergruppen. II. Vorschläge für orale Aufnahmeraten von Boden, Badewasser und Nahrungsmitteln des Eigenanbaus. *Z. Umweltchem. Ökotox.* **6**, 165-174
- SUTTER, T.R.; TANG, Y.M.; HAYES, C.L.; WO, Y.Y.; JABS, E.W.; LI, X.; YIN, H.; CODY, C.W.; GREENEY, W.F. (1994): Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J. Biol. Chem.* **269**, 13092-13099
- THOMAS, P.E.; REIK, L.M.; RYAN, D.E.; LEVIN, W. (1983): Induction of two immunochemically related rat liver cytochrome P-450 isozymes, cytochromes P-450c and P-450d, by structurally diverse xenobiotics. *J. Biol. Chem.* **258**, 4590-4598
- UMBREIT T.H.; HESSE, E.J.; GALLO, M.A. (1986): Bioavailability of dioxin in soil from a 2,4,5-T manufacturing site. *Science* **232**, 497-499
- VANDEN HEUVEL, J.P.; CLARK, G.C.; THOMPSON, C.L.; MCCOY, Z.; MILLER, C.R.; LUCIER, G.W.; BELL, D.A. (1993): CYP1A1 mRNA levels as a human exposure biomarker: use of quantitative polymerase chain reaction to measure CYP1A1 expression in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* **14**, 2003-2006
- WANG, R.-H.; NAKAJIMA, T.; PARK, S.S.; GELBOIN, H.V.; MURAYAMA, N. (1993): Monoclonal antibody-directed assessment of toluene induction of rat hepatic cytochrome P450 isozymes. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 413-419
- WEISSENFELS, W. (1990): Mikrobieller Abbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in definierten Submerskulturen und kontaminierten Böden. *Dissertationsschrift, Universität Münster*
- WEISSENFELS, W.D.; KLEVER, H.-J.; LANGHOFF, J. (1992): Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 689-696
- WEISSENFELS, W. (1994): Die Bioverfügbarkeit polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) in aquatischen und terrestrischen Systemen. In: Weigert, B. (Ed.): *Biologischer Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung 4*. Technische Universität Berlin
- WEISSENFELS, W. (1998): Bewertung von Gefährdungspotential und mikrobiologische Sanierbarkeit PAK-kontaminierter Böden. In: Franzius, V., K. Wolf, E. Brandt (Hrsg.): *Handbuch der Altlastensanierung. Ordner 1, 11. Ergänzungslieferung der 2. Auflage*. Heidelberg

Eingegangen am: 22.02.1999

Akzeptiert am: 05.05.1999

Online-Publikation am: 26.11.1999