

Der PAH-Metabolit 1-Hydroxypyren in der Galle von Klieschen (*Limanda limanda*) aus Nord- und Ostsee

The PAH metabolite 1-hydroxypyrene determined in bile fluids of dab (*Limanda limanda*) from the North Sea and Baltic Sea

Ulrike Kammann, Thomas Lang

Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Institut für Fischereiökologie

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) sind durch ihre karzinogenen Eigenschaften wichtige Umweltkontaminanten, die zu erhöhten Raten an tumorösen Leberveränderungen in Fischen führen können. Um die PAH-Belastung der Fische zu messen, wird die Konzentration der Abbauprodukte (Metabolite) in der Galle bestimmt. In der Gallenflüssigkeit von Klieschen aus Nord- und Ostsee wurden Gehalte des Hauptmetabolits 1-Hydroxypyren von <0,8 bis 189 ng/ml bestimmt. Die Höhe der Belastung ist vergleichbar mit der von Dorsch und Hering aus der Ostsee. Die höchsten Konzentrationen in Klieschengalle wurden in küstennah gefangenen Tieren aus der inneren Deutschen Bucht und aus der Kieler Bucht nachgewiesen.

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) sind eine Substanzklasse, die in fossilen Brennstoffen und als Nebenprodukt von Verbrennungsprodukten vorkommt. Ihre karzinogenen Eigenschaften und ihre weite Verbreitung aus verschiedenen Quellen wie Kraftwerken, Verkehr, Ölunfällen, Offshore-Ölindustrie usw. machen PAHs zu wichtigen Umweltschadstoffen. Im Meer adsorbieren in Wasser gelöste PAHs schnell an partikuläres Material, das als Schwebstoff suspendiert in der Wassersäule vorliegen kann oder als Bestandteil von Sediment zu Boden sinkt. PAHs können von aquatischen Organismen aufgenommen, metabolisiert und ggf. ausgeschieden werden. In den meisten Organismen ist dieser Metabolismus sehr effektiv, so dass es im Gegensatz zu vielen anderen lipophilen Umweltkontaminanten nicht zu einer starken Akkumulation der PAHs im Organismus kommt. Allerdings sind die Auswirkungen einer größeren Ölverschmutzung, z. B. durch ein Tankerunglück wie das der Exxon Valdez im Jahr 1989, auch Jahre später noch im Ökosystem spürbar (Peterson et al., 2003).

PAHs wirken erst nach der Umwandlung in Metabolite toxisch. Die Bildung von PAH-Metaboliten wird durch das Enzymsystem Cytochrom P450 katalysiert. Insbesondere das Enzym Cytochrom P450 1A1 spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Metabolite einiger karzinogener PAHs. Der erste Schritt der Metabolisierung der PAHs ist eine Oxidation. Die dabei entstehenden Epoxide oder Phenole können mit körpereigenen Makromolekülen konjugiert und die wasserlös-

lichen Konjugate z. B. über die Galle ausgeschieden werden. Einige Epoxide können weiter zu den stark karzinogenen Diolepiden oxidiert werden. Benzo[a]pyren wird beispielsweise zu etwa 20 Metaboliten oxidiert. Einige dieser Metabolite können Mutationen hervorrufen und/oder an zelluläre Makromoleküle wie DNA binden und damit die ersten Schritte zur Tumorgenese einleiten. Für einige PAHs sind solche Aktivitäten in verschiedenen Kurzzeittests nachgewiesen worden. Erhöhte Raten an Leberveränderungen und Tumoren in Fischpopulationen wurden in Fischen gefunden, die im Laborexperiment PAH-belasteten Sedimenten ausgesetzt waren (Vethaak et al. 1996).

Die Überwachung von PAHs ist Bestandteil vieler Monitoringprogramme. Die Erfassung ihrer Effekte auf

The PAH metabolite 1-hydroxypyrene determined in bile fluids of dab (*Limanda limanda*) from the North Sea and Baltic Sea

Due to their carcinogenic properties, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are important environmental contaminants which may lead to increased levels of neoplastic aberrations in fish liver. To measure the PAH contamination of fish, concentrations of PAH metabolites were determined in the bile. The main metabolite 1-hydroxypyrene was determined in concentrations from < 0.8 to 189 ng/ml in bile of dab caught in the North Sea and the Baltic Sea respectively. The concentrations are comparable to levels of 1-hydroxypyrene measured in cod and herring from the Baltic Sea. The highest concentrations in dab bile were measured in fish from the inner German Bight and the Kiel Bight.

marine Fische wird im „OSPAR Joint Assessment and Monitoring Programme (JAMP)“ beschrieben (OSPAR 1998). In Muskel- oder Lebergewebe von Fischen lassen sich nur geringe Konzentrationen von PAHs nachweisen. Daher werden PAH-Metabolite üblicherweise in der Gallenflüssigkeit bestimmt, wo sie bis zur Exkretion angereichert und gespeichert werden. Die Bestimmung von PAH-Metaboliten in Fischgalle gibt Auskunft über die aktuelle Belastungssituation der Fische mit PAHs und beschreibt damit einen wichtigen Parameter der Umweltqualität.

PAH-Metabolite wurden bereits erfolgreich in Gallen verschiedener mariner Fischarten nach Schadstoffexposition (Luthe et al. 2002; van Schanke et al. 2003; Roy et al. 2003) oder in direkt im Meer gefangenen Tieren (Voutisjärvi et al. 2004; Ruddock et al. 2003; Klumpp et al. 2003) quantifiziert. 1-Hydroxypyren (Abbildung 1) ist der Hauptmetabolit in Fischgalle. Als weitere Metabolite lassen sich 1-Hydroxyphenanthren, 1-Hydroxychrysen und drei Benz(a)pyren-Metabolite in geringen Mengen nachweisen (Ruddock et al., 2003).

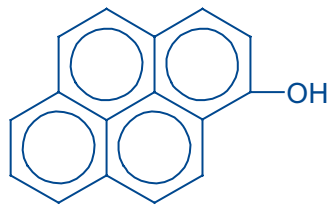


Abbildung 1: 1-Hydroxypyren
1-Hydroxypyrene

Ziel dieser Arbeit war die Quantifizierung von 1-Hydroxypyren in Gallenflüssigkeit von Klieschen sowie der regionale Vergleich der Belastungssituation der Fische.

Material

Gallenproben von Klieschen (*Limanda limanda*) wurden auf der 255. Reise des Fischereiforschungsschiffes Walther Herwig III im August und September 2003 gesammelt (Abbildung 2). Die Gallenflüssigkeit wurde von weiblichen Tieren mit einer Körperlänge von 20 bis 32 cm durch Punktion der Gallenblase mit einer Spritze gewonnen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Analyse gelagert.

Methode

Die Bestimmungsmethode basiert auf dem von Ariese et al. (1997) beschriebenen Verfahren. Nach enzymatischer Umsetzung mit β -Glukuronidase/Arylsulfatase schließt sich eine Trennung über Hochdruck-Flüssig-Chromatographie (HPLC) mittels Reversed-Phase-Säule

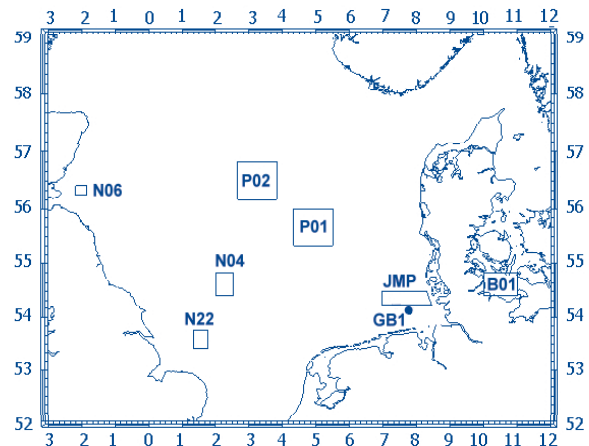


Abbildung 2: Probenahmestationen im August/September 2003.
Sampling locations in August/September 2003.

und Acetonitril/Trifluoressigsäure-Gradient an. Die Detektion erfolgt fluorimetrisch. Diese Methode erlaubt die Quantifizierung von 1-Hydroxypyren aus einem Probenvolumen von $25\text{ }\mu\text{l}$ Galle. Die Bestimmungsgrenze (BG) ermittelt nach DIN 32645 lag bei $0,8\text{ ng/ml}$ Galle. Die gesamte Methode wurde mit zertifiziertem Referenzmaterial überprüft.

Ergebnisse

Die Gehalte an 1-Hydroxypyren in Klieschengalle lagen bei Werten von unterhalb der Bestimmungsgrenze (BG) bis zu 189 ng/ml (Abbildung 3). Die höchsten Konzentrationen wurden in küstennah gefangenen Tieren aus der inneren Deutschen Bucht (GB1) und der Kieler Bucht (B01) nachgewiesen. Die 1-Hydroxypyrengehalte in Klieschen aus der nordwestlichen Nordsee lagen signifikant niedriger.

Eine Abhängigkeit zwischen der Körperlänge der Tiere und dem 1-Hydroxypyrengehalt konnte nicht festgestellt werden.

Diskussion

Die Gehalte an 1-Hydroxypyren in küstennah gefangenen Klieschen lagen mit bis zu 189 ng/ml in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie er für Dorsche (*Gadus morhua*) und Heringe (*Clupea harengus*) aus der Ostsee von Voutisjärvi et al. (2004) ermittelt wurde. Flundern (*Platichthys flesus*) und Aalmuttern (*Zoarces viviparus*) aus den Küstenbereichen der Ostsee sind mit bis zu 1000 ng/g (Voutisjärvi et al. 2004) etwa fünf-fach höher belastet als die in der vorliegenden Studie untersuchten Klieschen (Abbildung 3). Als ein möglicher Grund für die höhere Belastung von Flundern und Aalmuttern wird von Voutisjärvi et al. (2004) der di-

rekte Sedimentkontakt dieser Arten im Vergleich zu Hering und Dorsch gesehen. Aus den vorliegenden Ergebnissen an Klieschen wird deutlich, dass nicht nur die benthische Lebensweise der Tiere, sondern insbesondere der Fangort einen entscheidenden Einfluss auf die Belastung mit PAHs haben. Auffällig sind die niedrigen Konzentrationen von 1-Hydroxypyren (unter 50 ng/ml) in Klieschen aus küsternen Regionen.

Die Quellen für die PAH-Kontamination der Fische scheinen überwiegend in der Nähe der kontinentalen Küste zu finden zu sein, da hier die höchsten Werte gemessen wurden. Sedimentanalysen aus dem Jahr 2000 (Kammann et al. 2004) bestätigen diese Vermutung. So konnten beispielsweise in Sedimenten von der Ostseestation B01 etwa 20-fach höhere PAH-Konzentrationen bezogen auf die Trockenmasse (TM) gemessen werden als an der Station N06. (B01: 730 ng PAH/g TM; N06: 31 ng PAH/g TM).

Diese Unterschiede in der Sedimentbelastung spiegeln sich in den 1-Hydroxypyrengehalten der Klieschengalle wieder. Die erhöhten Werte in Klieschen aus Gebiet GB1 in der Deutschen Bucht stimmen überein mit Befunden von Untersuchungen an Kabeljau, die im Rahmen des ICES BECPELAG Workshops (Hylland et al. 2002) über einen Zeitraum von 5 bis 6 Wochen in Käfigen auf vier

Stationen (u. a. auch in Gebiet GB1) eines in nordwestlicher Richtung aus der Deutschen Bucht heraus verlaufenden Gradienten gehalten wurden. (Aas et al., 2002). Bei diesen Untersuchungen könnten erhöhte 1-Hydroxypyrengehalte in der Galle nur auf der küstennächsten Station in Gebiet GB1 gemessen werden.

Ein Einfluss durch die Bohrplattformen in den Gebieten P01 (Dan Field) und P02 (Ekofisk) auf die Gehalte an 1-Hydroxypyren in Klieschengalle ist mit den vorliegenden Ergebnissen nicht nachweisbar. Dieses erscheint zunächst überraschend, da bekannt ist, dass die Offshore-Ölindustrie eine bedeutende Quelle von PAH-Einträgen in die Nordsee darstellt (OSPAR 2000).

Allerdings gehört 1-Hydroxypyren zu den Metaboliten pyrogener PAHs, die überwiegend aufgrund landseitiger/urbaner Verbrennungsprozesse in die Umwelt gelangen und nicht zu den Metaboliten petrogener PAHs, deren Ursprung überwiegend die Ölindustrie ist (Aas et al. 2002).

Bei der Bewertung der Ergebnisse der vorliegenden Studie muss berücksichtigt werden, dass es sich hierbei um eine erste Bestandsaufnahme handelt. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob sich die beobachteten regionalen Belastungsunterschiede auch durch die Mes-

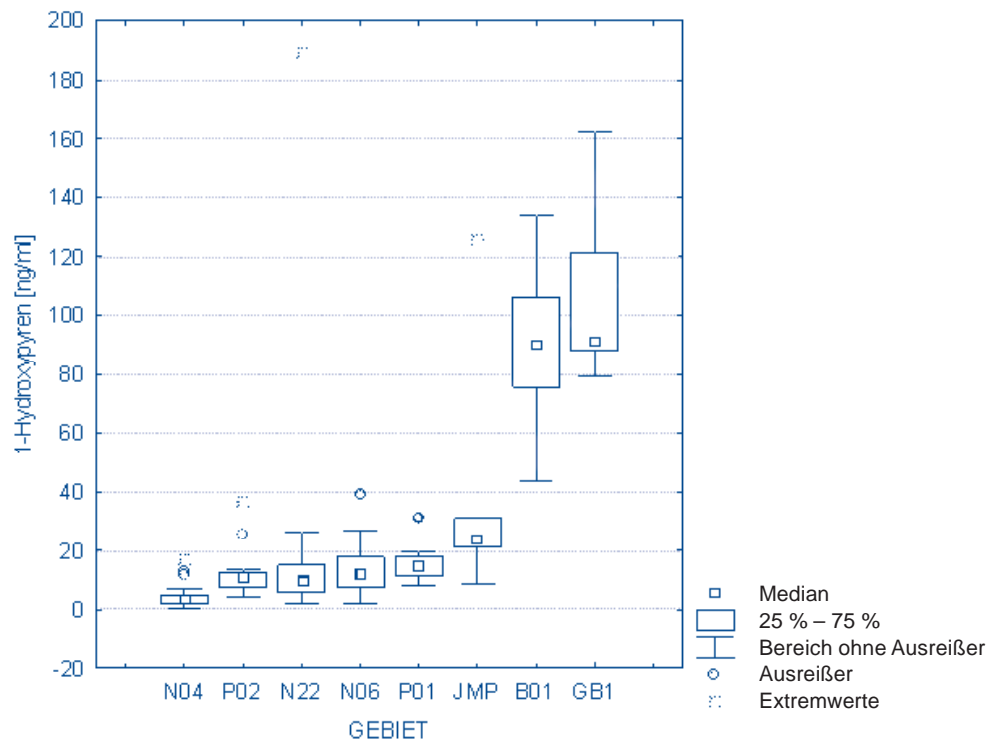


Abbildung 3: Gehalte an 1-Hydroxypyren [ng/mL] in Klieschen-Galle.
 Concentrations of 1-hydroxypyrene [ng/mL] in dab bile.

sung anderer PAH-Metabolite bestätigen lassen. Ferner soll geprüft werden, ob Zusammenhänge zwischen der Schadstoffbelastung der Klieschen und den Befunden der Überwachung von Fischkrankheiten, einschließlich tumoröser Leberveränderungen (Lang 2002), nachweisbar sind.

Danksagung

Unser Dank gilt Frau Ursula Kürschner für die wertvolle Unterstützung bei der Probenahme auf See und Herrn Alexander Schulz für die sorgfältige Durchführung der Analysen.

Zitierte Literatur

- Aas, E.; Jonsson, G.; Sundt, R.; Westerlund, S.; Sanni, S., 2002: PAH metabolites and metals in bile from cod caged in the North Sea serve as indicators of pollution. ICES CM 2002/X:01, 6 pp.
- Ariese, F.; Burgers, I.; Oudhoff, K.; Rutten, T.; Stroomberg, G.; Vethaak, D., 1997: Comparison of analytical approaches for PAH metabolites in fish bile samples for marine and estuarine monitoring. Vrije Universiteit Amsterdam, Instituut for Environmental Studies. R 97-9, 28 pp.
- Hylland, K.; Becker, G.; Klungsøyr, J.; Lang, T.; McIntosh, A.; Serigstad, B.; Thain, J.E.; Thomas, K.V.; Utvik, T.I.R.; Vethaak, D.; Wosniok, W., 2002: An ICES workshop on biological effects in pelagic ecosystems (BECPELAG): Overview of the programme. ICES CM 2002/X:02, 6 pp.
- Kammann, U.; Biselli, S.; Hühnerfuss, H.; Reineke, N.; Theobald, N.; Vobach, M.; Wosniok, W., 2004: Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. Environ. Pollut. (in press).
- Klumpp D.W.; Hong, H.S.; Humphrey, C.; Wang, X.H.; Codi, S., 2002: Toxic contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China. I. Organic pollutants in mussel and fish tissues. Mar. Pollut. Bull. 44 (8): 752–760.
- Lang, T., 2002: Untersuchungen zu biologischen Schadstoffeffekten bei Nordseefischen: Langzeitdaten zum Auftreten von Lebertumoren bei der Kliesche (*Limanda limanda*). Inf. Fischwirtsch. Fischereiforsch. 49 (1): 13–19.
- Luthe, G.; Stroomberg, G.J.; Ariese, F.; Brinkman, U.A.T.; van Straalen, N.M., 2002: Metabolism of 1-fluoropyrene and pyrene in marine flatfish and terrestrial isopods. Environ. Toxicol. Phar. 12 (4): 221–229.
- OSPAR, 1998: JAMP guidelines for general biological effects monitoring. OSPAR Oslo and Paris Commission, London, UK.
- OSPAR, 2000: Quality Status Report 2000, Region II - Greater North Sea. OSPAR Commission, London. 136+xiii pp.
- Peterson, C.H.; Rice, S.D.; Short, J.W.; Esler, D.; Bodkin, J.L.; Ballachey, B.E.; Irons, D.B., 2003: Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. Science. 302: 2082–2085.
- Roy, L.A.; Steinert, S.; Bay, S.M.; Greenstein, D.; Sapozhnikova, Y.; Bawardi, O.; Leifer, I.; Schlenk, D., 2003: Biochemical effects of petroleum exposure in hornyhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) exposed to a gradient of sediments collected from a natural petroleum seep in CA, USA. Aquat. Toxicol. 65 (2): 159–169.
- Ruddock, P.J.; Bird, D.J.; McEvoy, J.; Peters, L.D., 2003: Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in European eels *Anguilla anguilla* from United Kingdom estuaries. Sci. Total Environ. 301(1–3): 105–117.
- van Schanke, A.; Holtz, F.; van der Meer, J.; Boon, J.P.; Ariese, F.; Stroomberg, G.; van den Berg, M.; Everaarts, J.M., 2001: Dose- and time-dependent formation of biliary Benzo[a]pyrene metabolites in the marine flatfish dab (*Limanda limanda*). Environ. Toxicol. Chem. 20 (8): 1641–1647.
- Vethaak, A.D.; Jol, J.G.; Meiboom, A.; Eggens, M.L.; ap Reinallt, P.W.; Wester van der Zande, T.; Bergmann, A.; Dankers, A.; Ariese, F.; Baan, R.A.; Everts, J.M.; Opperhuizen, A.; Marquenie, J.M., 1996: Skin and liver diseases induced in flounder (*Platichthys flesus*) after long-term exposure to contaminated sediments in large-scale mesocosms. Environ. Health Persp. 104 (11): 1218–1229.
- Vountisjärvi, H.; Keinänen, M.; Peltonen, K.; Vourinen, P.J., 2004: A comparison of HPLC with fluorescence detection and fixed wavelength fluorescence methods for the determination of PAH metabolites in fish bile. Polycycl. Aromat. Comp. (in press).

Informationen

für die Fischwirtschaft

aus der Fischereiforschung

im Internet ab Band 44 (1997):

http://www.bfa-fish.de/iud/iud-d/veroeff/inf_n_dt.htm