



UNIVERSITEIT  
GENT

FACULTEIT LANDBOUWKUNDIGE  
EN TOEGEPASTE BIOLOGISCHE WETENSCHAPPEN

---

Academiejaar 2002 - 2003

RISICO-INSCHATting BIJ INGESTIE VAN PAK-  
GECONTAMINEERDE BODEM DOOR MIDDEL  
VAN BIOASSAYS

Charlotte BOECKAERT

Promotor : Prof. dr. ir. W. Verstraete

Scriptie voorgedragen tot het behalen van de graad van  
BIO-INGENIEUR IN DE MILIEUTECHNOLOGIE





UNIVERSITEIT  
GENT

FACULTEIT LANDBOUWKUNDIGE  
EN TOEGEPASTE BIOLOGISCHE WETENSCHAPPEN

---

Academiejaar 2002 - 2003

RISICO-INSCHATTING BIJ INGESTIE VAN PAK-  
GECONTAMINEERDE BODEM DOOR MIDDEL  
VAN BIOASSAYS

Charlotte BOECKAERT

Promotor : Prof. dr. ir. W. Verstraete

Scriptie voorgedragen tot het behalen van de graad van  
BIO-INGENIEUR IN DE MILIEUTECHNOLOGIE

*De auteur en de promotor geven de toelating dit eindwerk voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van de resultaten uit dit eindwerk.*

*The author and the promotor give the permission to use this thesis for consultation and to copy parts of it for personal use. Every other is subject to the copyright laws, more specifically the source must be specified when using results from this thesis.*

*19 mei 2003*

*De promotor,  
Prof. dr. ir W. Verstraete*

*De auteur,  
Charlotte Boeckeaert*

# WOORD VOORAF

Gemengde gevoelens overheersen bij het aansnijden van de laatste paragraaf van vijf lange hoofdstukken. Ieder hoofdstuk was opnieuw een ontdekking, een persoonlijke verruiming van mijn kennis, mijn vrienden, mijn grenzen. Ik koester deze 5 studentenjaren, elk op hun eigen manier, diep in mijn hart. En nu, in de vooravond van het promovendi-status, wil ik de tijd nemen om iedereen te bedanken die heeft bijgedragen tot de vorming van toekomstig ir. Charlotte Boeckeaert.

Graag een woord van dank aan mijn promotor, professor Verstraete. Hij liet me de vrijheid om de wereld van het onderzoek stap voor stap te verkennen. Het kronkelende pad dat ik verkoos te bewandelen werd vertrouwensvol aangemoedigd met *proceed* en *prima werk*<sup>2</sup>. Dankuwel!

Een meer dan dikke dankjewel aan mijn begeleider Tom. Zijn geduld, openheid en bedachtzaamheid vormden de perfecte mix om mijn ideeën in de juiste richting te sturen. Hij heeft me fantastisch ingeleid en begeleid in het wetenschappelijk onderzoek. Dank u Tom!

Versleten schoenzolen heb ik te danken aan het gehuppel tussen 52 bis, labo 60, K2, blok D en het SHIME lokaal. Aan alle “bewoners” van deze laboratoria een welgemeende dank voor de hulp, de babbel en de lach. Onverstaanbare Gert, we hebben veel tijd in te halen! Dank je Wouter, voor het gezelschap in het computerlokaal!

Een dikke knuffel voor iedereen die me door deze 5 jaren heeft geloosd. *Soldiers of love : I want to break free!* Sing halleluja! Zotte Chiro treezebeezen, hopelijk konden mijn wilde beestjesverhalen de voor jullie onaangename SHIME geur wegdrijven.

Van de vele facetten die het studentenleven rijk is, zijn het vaak dezelfde die de minder aangename kant voorgeschoteld krijgen. Examenstress, paniekaanvallen en allerlei neveneffecten werd steeds voorbehouden voor mijn ouders, mijn broer(s) en zus(sen). Zeer binnenkort zullen ze ervan verlost worden! Ik zeg het te weinig maar ik apprecieer jullie zorgen, steun en vertrouwen enorm!

Tot slot, zonder veel woorden, de grootste en mooiste pluim voor Bernd!

# SAMENVATTING

Polycyclische aromatische koolwaterstoffen zijn veel voorkomende hydrofobe organische contaminanten die hoofdzakelijk door antropogene activiteiten in de atmosfeer, het water en de bodem worden verspreid. Ingestie van gecontamineerde bodemdeeltjes neemt een belangrijke plaats in bij de blootstellingswegen, langs dewelke PAK's het menselijk lichaam kunnen binnenkomen. Na desorptie van de PAK's uit de bodemmatrix in het gastro-intestinaal kanaal, kan een fractie van deze componenten geabsorbeerd worden doorheen de dunne darmwand. De geabsorbeerde PAK's kunnen in de enterocyten en hepatocyten gebiotransformeerd worden tot enerzijds minder toxische derivaten, maar anderzijds soms producten met estrogene, genotoxische of carcinogene eigenschappen vormen. De huidige humane risico-evaluatie brengt het intestinaal transport en xenobiotisch metabolisme in rekening, maar besteedt geen aandacht aan de fractie PAK's die niet geabsorbeerd wordt en die door de darmperistaltiek in de dikke darm terecht komt. Deze dikke darm wordt gekenmerkt door een rijke microbiële ecologie die over een brede waaier aan enzymen beschikt. Het risico bestaat dat een aantal van deze microbiota erin slagen om een fractie van de niet geabsorbeerde PAK's om te zetten, eventueel tot schadelijke componenten.

In dit onderzoek werd de menselijke risico-evaluatie in een ander daglicht geplaatst.

Volgende hypothese werd geformuleerd : PAK's in de dikke darm kunnen door microbiota gebiotransformeerd worden en deze biotransformatieproducten kunnen estrogene, carcinogene of genotoxische eigenschappen hebben. De gestelde hypothese werd kritisch onderzocht door digestietesten, die de maag, dunne- en dikke darm bij de mens simuleren, te combineren met drie verschillende bioassays.

In een eerste bioassay, de aryl hydrocarbon test, werd de bindingsaffiniteit voor de humane aryl hydrocarbon receptor van verschillende PAK's, alsook van PAK-gecontamineerde bodemdigesten bepaald. Binding impliceert de mogelijkheid tot biotransformatiereacties in de *in vivo* situatie. Het bekomen van een positief signaal bij zowel PAK's, OH-PAK's als maag-, dunne darm- en dikke darmdigesten op PAK-gecontamineerde bodems bevestigden de bruikbaarheid van de aryltest bij de analyse voor milieustalen.

In een tweede bioassay, de estrogene test, werd de (anti-)estrogeniciteit van PAK derivaten onderzocht. Hierbij werd de binding van componenten op de humane estrogene receptor opgevolgd. Het toepassen van de test op PAK's leerde dat deze componenten geen estrogeen

karakter vertonen. PAK's die geïncubeerd werden met microbiota uit de dikke darm leidden echter wel tot estrogene en zelfs anti-estrogene signalen. Dikke darmdigesties op PAK-gecontamineerde bodemstalen gaven eveneens een positief signaal. Dit deed het vermoeden rijzen dat humane darmmicrobiota wel degelijk in staat zijn om PAK's om te zetten. Dit werd bevestigd door de detectie van PAK-hydroxyl derivaten, bekend om hun estrogene eigenschap, via HPLC-MS. Inhibitie van bacteriën of fungi tijdens de incubatie van PAK's in de dikke darm toonde aan dat fungi waarschijnlijk iets meer in staat zijn om estrogene metabolieten te vormen. Vergelijken van de estrogene respons voor aëroob en anaëroob geïncubeerde PAK's wees op een lichte voorkeur voor aërobe omzettingsprocessen. Een bijkomende vaststelling was dat het verkrijgen van een estrogeen signaal sterk afhankelijk was van het fecaal inoculum gebruikt voor de dikke darmdigestie. De estrogene respons nam toe naarmate de colonsuspensie van een jongere leeftijdsklasse afkomstig was. Bij incubatie van PAK's in colonsuspensie van een vegetariër bleef het estrogeen signaal onder de detectielimiet.

In een derde bioassay, de SOS chromotest, werd DNA beschadiging door PAK's opgespoord. Deze genotoxiciteitstest werd geoptimaliseerd voor toepassing op 96-multiwell platen. Enkele van de geteste PAK's en OH-PAK's gaven een signaal, zij het beperkt, in de SOS chromotest. Indien darmmicrobiota xenobiotica kunnen omzetten tot meer toxische, estrogene of carcinogene componenten, kan het risico op bijvoorbeeld colonkanker stijgen. De voorgestelde resultaten bieden relevante informatie voor humane risico-inschatting en sporen aan tot verder onderzoek in deze materie.

# ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons are widespread hydrophobic organic pollutants that are released by anthropogenic activities in atmosphere, water and soil. Ingestion of contaminated soil particles by which the PAHs enter the human body, form an important exposure pathway. Upon desorption of PAHs from soil matrices in the gastrointestinal tract, a fraction of these compounds can be absorbed through the small intestinal wall. Absorbed PAHs can be biotransformed in the enterocytes and hepatocytes to less toxic derivatives or to products with estrogenic, genotoxic or carcinogenic properties. Current human risk assessment focuses on the intestinal transport and the xenobiotic metabolism, but does not take into account the fraction of PAHs that is not absorbed and enters the large intestine. This organ contains a rich microbial community which possesses a wide variety of enzymes. There is a possible risk that a few of these microbiota can transform the fraction of non-absorbed PAHs into harmful compounds.

In this study, additional ideas to human risk assessment are provided and the following hypothesis was formulated: PAHs present in the large intestine can be biotransformed by large intestinal microbiota and the biotransformation products can have estrogenic, carcinogenic and genotoxic characteristics.

In a first bioassay, the aryl hydrocarbon test, different PAHs and PAH contaminated soil digests were investigated on their affinity to bind the human aryl hydrocarbon receptor. Binding implicates the possibility to biotransformation reactions in in vivo situations. The positive signal of PAHs, hydroxylated PAHs but also stomach, small and large intestine digestions confirms the value of the aryl hydrocarbon test to be used for environmental samples.

In a second bioassay, the yeast estrogenic screen test, the (anti-)estrogenicity of PAH derivatives was investigated by monitoring the binding of compounds on the human estrogen receptor. In this test, PAHs didn't show an estrogenic character. PAHs incubated with microbiota of the large intestine did give estrogenic and even anti-estrogenic signals. Large intestine digestions of a PAH contaminated soil also gave a positive signal. These results presume that intestinal microbiota are capable to biotransform PAHs. This was confirmed by detection of hydroxylated PAH derivatives, known for their estrogenic capacities, in HPLC-MS analysis. Inhibition of bacteria or fungi during the incubation of PAHs in the large intestine



revealed that fungi are probably more capable to form estrogenic metabolites. Comparison of the estrogenic response after aerobic or anaerobic incubation of PAHs showed a slight preference for aerobic transformation processes. It was also noticed that the estrogenic signal depended on the faecal inoculum used for the colon digestions. The estrogenic response increased when the faeces came from a younger agegroup. After incubation of PAHs in the colon suspension of a vegetarian, the signal stayed below the limit of detection.

In a third bioassay, the SOS chromotest, DNA damage by PAHs could be traced. This genotoxicity test was optimised for application on 96-multiwell plates. A few of the tested PAHs and hydroxylated PAHs gave a signal in the SOS chromotest.

If intestinal microbiota can transform xenobiotics into toxic, estrogenic or carcinogenic compounds, there is a grown potential risk on colon cancer formation. The results shown in this study offer relevant information for human risk assessment and form an indication that further investigation is necessary.

# LIJST VAN TABELLEN

- Tabel 1.** Octanol-water partiticoëfficiënt en oplosbaarheid van de 16 EPA PAK's (Verschueren, 2001)
- Tabel 2.** Achtergrondwaarden voor organische verbindingen in de bodem (mg/kg.ds)
- Tabel 3.** Bodemsaneringsnormen voor organische verbindingen volgens bestemmingstype (mg/kg.ds)
- Tabel 4.** Samenstelling van de voeding voor de SHIME
- Tabel 5.** Samenstelling van de mix van PAK's (mg/L)
- Tabel 6.** Samenstelling van het minimaal medium voor de estrogene gisttest
- Tabel 7.** Samenstelling van de vitamineoplossing voor de estrogene test
- Tabel 8.** Samenstelling van het minimaal medium voor de aryltest
- Tabel 9.** Concentraties van de testcomponenten gebruikt in de verschillende bioassays
- Tabel 10.** Resultaten van de GC-MS analyse op de bodemdigesties bij initiële L/S = 100( $\mu\text{g/L}$ )
- Tabel 11.** Resultaten van GC-MS analyse op de extracten van de bodemdigesties ( $\mu\text{g/L}$ )
- Tabel 12.** Totaal aantal PAK's aanwezig in het opgeconcentreerde extract (100x) van de duodenum -en colondigestie bij initiële L/S = 40 (mg/L)

- Tabel 13.** Resultaten van de GC-MS analyse op de SHIME stalen ( $\mu\text{g/L}$ )
- Tabel 14.** Correcties voor particulier en opgelost OM en biotransformatie van PAK's door microbiota ( $\mu\text{g/L}$  en %)
- Tabel 15.** Toename van de OD (610 nm) van *Saccharomyces cerevisiae* in functie van de incubatietijd in de estrogene test
- Tabel 16.** Toename van OD (610 nm) in functie van de incubatietijd van *Saccharomyces cerevisiae* in de aryltest (glucosemedium)
- Tabel 17.** Toename van OD (610 nm) in functie van de incubatietijd van *Saccharomyces cerevisiae* in de aryltest (galactosemedium)
- Tabel 18.** Toename van OD (690 nm) in functie van de incubatietijd van *Escherichia coli* in de SOS chromotest
- Tabel 19.** Toename van OD (610 nm) in functie van de incubatietijd van *Saccharomyces cerevisiae* in de aryltest (glucosemedium)
- Tabel 20.** Log EC50 en maximale respons van EE2 en 8 PAK's
- Tabel 21.** Toename van de inductiefactor in functie van de log concentratie van NQO ( $\text{g/L}$ )

# LIJST VAN FIGUREN

- Figuur 1.** Bijdrage van de verschillende sectoren aan de totale PAK-emissie (Vlaanderen, 1990 - 2001)
- Figuur 2.** Algemeen beeld van de blootstellingswegen van PAK's
- Figuur 3.** Binding op de arylreceptor, transcriptie, translatie en proteïnesynthese
- Figuur 4.** Schematische voorstelling van het estrogeen geïnduceerde expressie systeem in de gist (Routledge and Sumpter, 1996)
- Figuur 5.** Schematische voorstelling van het verloop van de estrogene test
- Figuur 6.** Toename van de OD (610 nm) in functie van de incubatietijd bij *Saccharomyces cerevisiae* in de estrogene test
- Figuur 7.** Toename van de OD (610 nm) in functie van de incubatietijd bij *Saccharomyces cerevisiae* in de aryltest (glucosemedium)
- Figuur 8.** Toename van de OD (610 nm) in functie van de incubatietijd bij *Saccharomyces cerevisiae* in de aryltest (galactosemedium)
- Figuur 9.** Toename van de OD (690 nm) in functie van de incubatietijd bij *Escherichia coli* in de SOS chromotest
- Figuur 10.** % BaP equivalent voor 0,01 mmol PAK/L
- Figuur 11.** Respons van OH-PAK's in functie van de log concentratie in de aryltest (n=4)

- Figuur 12.** Toename van de OD (610 nm) in functie van de incubatietijd bij *Saccharomyces cerevisiae* in de aryltest
- Figuur 13.** Respons van gecontamineerde bodemdigesties bij toenemende log concentraties (n=4)
- Figuur 14.** Estrogene respons van PAK's in functie van de log concentratie (n=4)
- Figuur 15.** Estrogene respons van OH-PAK's in functie van de log concentratie (n=4)
- Figuur 16.** Estrogene respons bij colon van PAK-gecontamineerde bodem en leguminose bodem in functie van de log verdunning (n=4)
- Figuur 17.** Estrogene respons van PAK's geïncubeerd in SHIME suspensie in functie van de log concentratie (n=4)
- Figuur 18.** Estrogene respons van pancreassap in functie van de log verdunning (n=4)
- Figuur 19.** Estrogene respons van pancreassap en SHIME + pancreassap in functie van de log verdunning (n=4)
- Figuur 20.** % EE2 equivalent voor 0,01 mmol PAK/L
- Figuur 21.** Spreiding van EE2 en PAK's geïncubeerd in SHIME suspensie in functie van hun bindingsaffiniteit en estrogene werking
- Figuur 22.** Estrogene respons van een mix PAK's geïncubeerd in anaërobe of aërobe SHIME in functie van de log concentratie (n=4)
- Figuur 23.** Estrogene respons van mix van PAK's in functie van de log concentratie (n=4) bij verschillende inocula
- Figuur 24.** (Anti-)Estrogene respons van BaP geïncubeerd in SHIME suspensie in functie van de log concentratie (n=4)

- Figuur 25.** (Anti-)Estrogene respons van mix PAK's geïncubeerd in SHIME suspensie in functie van de log concentratie (n=4)
- Figuur 26.** Inductiefactor van NQO in functie van de log concentratie
- Figuur 27.** Inductiefactor van verschillende testcomponenten in functie van de log concentratie
- Figuur 28.** Verschillende fasen bij de groei van cultuurcellen
- Figuur 29.** Chemische configuratie van EE2, 1-OH naftaleen en 9-OH fenantreen
- Figuur 30.** Verandering van het aantal bacteriën in de feces in functie van de leeftijd (Mitsuoka, 1978)

# LIJST VAN AFKORTINGEN

AAS	atoom absorptie spectrometrie
AFB1	aflatoxine B1
AFM1	aflatoxine M1
AFQ1	aflatoxine Q1
Ah	aryl hydrocarbon
AHRC	aryl hydrocarbon receptor complex
Arnt	aryl hydrocarbon nuclear translocator
CH	cycloheximide
CPR	chlorophenol red
CPRG	chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside
DCM	dichloormethaan
DMSO	dimethylsulfoxide
DS	droge stof
EA	ethylacetaat
EE2	17 $\alpha$ -ethynylestradiol
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EPA	environmental protection agency
ER	estrogene receptor
ERE	estrogeen responsive element
GSH	glutathion
GST	glutathion S-transferases
hAR	human aryl receptor
HIS	histidine
IBS	interim bodemsanering
IF	inductiefactor
Kow	octanol-water partiticoëfficiënt
L/S	vloeistof-vast verhouding
MARS	microwave accelerated reaction system
MFO	microsomal mixed-function oxidase system

MM	minimaal medium
NQO	nitroquinoline
OD	optische dichtheid
OH-PAK	gehydroxyleerde polycyclische aromatische koolwaterstoffen
OM	organische materiaal
ONPG	o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside
PAK	polycyclische aromatische koolwaterstoffen
PNPP	p-nitrofenylfosfaat
POM	particulair organisch materiaal
SHIME	Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem
VLAREBO	Vlaams reglement betreffende de bodemsanering
XRE	xenobiotisch -responsive element
YES	yeast estrogenic screen



# INHOUDSTAFEL

<b>HOOFDSTUK 1 : LITERATUURSTUDIE .....</b>	<b>1</b>
1 Polycyclische aromatische koolwaterstoffen.....	1
1.1 Chemische en fysische eigenschappen .....	1
1.2 Bronnen PAK's.....	1
1.3 Milieuwetgeving PAK's .....	4
2 PAK's in relatie met de bodem.....	7
2.1 Biobeschikbaarheid van PAK's in een bodemmatrix .....	7
2.2 Biodegradatie .....	8
2.2.1 Aërobe biodegradatie.....	8
2.2.2 Anaërobe biodegradatie .....	9
3 PAK's in relatie met het menselijk lichaam .....	13
3.1 Blootstellingswegen.....	13
3.2 Fysiologie van het spijsverteringsstelsel.....	16
3.3 Rol van fase I en fase II biotransformaties bij de bioactivatie of .....	
detoxificatie van xenobiotica .....	18
3.3.1 Fase I reacties.....	18
3.3.2 Fase II reacties .....	20
3.4 Factoren die de biotransformatie enzymen beïnvloeden: determinanten ...	
voor bioactivatie of detoxificatie .....	20
4 Bioassays .....	23
4.1 De Aryl hydrocarbon test.....	23
4.3 De SOS chromotest.....	26
4.4 De AMES test .....	26
4.5 De komeetttest .....	27
5 Probleemstelling bij ingestie van PAK's .....	28
6 Relevantie en doel van dit onderzoek .....	29
<b>HOOFDSTUK 2: MATERIAAL EN METHODEN .....</b>	<b>30</b>
1 Staalname.....	30
1.1 Digestietesten.....	30
1.1.1 Maagdigestie.....	30
1.1.2 Duodenumdigestie .....	30
1.1.3 Colondigestie .....	31
1.1.4 Waterextractie.....	31
1.2 Proef met de SHIME reactor .....	31
1.3 Staalvoorbereiding .....	33
2 Omzetting van PAK's door darmmicrobiota .....	34
2.1 Correctie voor opgelost OM .....	34
2.2 Correctie voor particulier OM .....	34
2.3 Correctie voor enzymen.....	35
2.4 Omzetting van PAK's door darmmicrobiota.....	35
3 Bioassay testen.....	35
3.1 De estrogene test.....	35
3.1.1 Stockoplossingen en mediumbereiding .....	37

3.1.2	Opkweek van <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (dag 1)	38
3.1.3	Inzetten van de test (dag 2)	38
3.1.4	Aflezings van de platen (dag 3 en volgende)	39
3.2	De aryl test	40
3.2.1	Stockoplossingen en mediumbereiding	40
3.2.2	Opkweek van de gist in glucosemedium (dag 1)	41
3.2.3	Overbrengen van de gist in galactosemedium (dag 3)	41
3.2.4	Inzetten van de test (dag 4)	41
3.2.5	Aflezings van de platen (dag 4)	42
3.3	SOS chromotest	42
3.3.1	Mediumbereidingen en bufferoplossingen	43
3.3.2	Opkweek van de <i>Escherichia coli</i> PQ37 stam	43
3.3.3	Inzetten van de test	44
3.3.4	Aflezings van de $\beta$ -g platen	44
3.3.5	Aflezings van de ap platen	44
3.4	Concentraties van de testcomponenten	45

### **HOOFDSTUK 3: RESULTATEN ..... 46**

1	Resultaten van de GC-MS analyse	46
1.1	Digesties van PAK-gecontamineerde bodem	46
1.2	Transformatie van PAK's door darmmicrobiota	47
2	Opvolging van de groei van de testorganismen	50
2.1	Groei van <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in de estrogene test	50
2.2	Groei van <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in de aryltest	51
2.3	Groei van <i>Escherichia coli</i> in de SOS chromotest	53
3	Aryltest	54
3.1	PAK's	54
3.2	OH-PAK's	55
3.3	Digesties van PAK-gecontamineerde bodem	56
4	Estrogene test	58
4.1	PAK's	58
4.2	OH-PAK's	59
4.3	Digesties van PAK-gecontamineerde bodem	59
4.4	Incubatie van PAK's in SHIME suspensie	60
4.5	Aërobe pathway versus anaërobe pathway	65
4.6	Biotransformatie van PAK's in functie van verschillende inocula	66
4.7	Anti-estrogeen effect	67
5	SOS chromotest	69
5.1	NQO	69
5.2	PAK's	70

### **HOOFDSTUK 4: DISCUSSIE ..... 71**

1	Optimalisatie van de bioassays - Opvolging van de groei van de testorganismen	71
2	Aryltest	73
2.1	PAK's en OH-PAK's	73
2.2	Digesties van PAK-gecontamineerde bodem	74
3	Estrogene test	75
3.1	PAK's	76

3.2	OH-PAK's .....	77
3.3	Digesties van PAK-gecontamineerde bodem .....	78
3.4	Incubatie van PAK's in SHIME suspensie .....	80
3.5	Aërobe pathway versus anaërobe pathway .....	82
3.6	Biotransformatie van PAK's in functie van verschillende inocula.....	84
3.7	Anti-estrogeen effect.....	86
4	SOS chromotest .....	87
5	Besluit en suggesties voor verder onderzoek.....	88

**HOOFDSTUK 5: REFERENTIELIJST ..... 90**

# HOOFDSTUK 1 : LITERATUURSTUDIE

## 1 Polycyclische aromatische koolwaterstoffen

### 1.1 Chemische en fysische eigenschappen

Polycyclische aromatische koolwaterstoffen, kortweg PAK's, zijn ringstructuren die uitsluitend bestaan uit koolstof en waterstof. Eén of meerdere aromatische ringen worden aan elkaar gekoppeld via twee koolstofatomen waardoor de molecule een vlakke structuur aanneemt. Het ontbreken van functionele groepen aan het koolstof-waterstof skelet van PAK's maakt deze componenten zeer hydrofoob. Dit leidt tot een hoge octanol-water partiticoëfficiënt (Kow) die varieert van 3,37 (logaritmische waarde) voor naftaleen tot 6,04 en meer voor de hoogmoleculaire PAK's zoals benzo(a)pyreen (Verschuere, 2001). Naast het hydrofoob karakter worden PAK's eveneens gekenmerkt door een instabiliteit bij UV-licht (Oris & Giesy, 1985). Deze componenten zijn gevoelig voor ozon, hydroxylradicalen, stikstofoxides, nitraten en sulfaten.

Door hun slechte wateroplosbaarheid blijken deze componenten vrij persistent tegen afbraak wat, samen met hun lipofiliciteit, de kans op bioaccumulatie verhoogt. Onder invloed van O<sub>2</sub> zijn PAK's meer afbreekbaar dan onder anaërobe condities, waardoor biotransformatie in organismen mogelijk is.

PAK is in feite een verzamelnaam voor meer dan 500 verbindingen die ontstaan bij de verbranding van koolwaterstoffen. Onderzoek naar en analyse van PAK's gebeurt meestal op de 16 EPA PAK's, die de 16 meest voorkomende PAK's resorteert (Tabel 1).

### 1.2 Bronnen PAK's

PAK's kunnen op natuurlijke wijze gevormd worden onder anaërobe bodemomstandigheden (Falkenberg, 2002). Een natuurlijk verspreiding van PAK's in de omgeving komt tot stand door bosbranden. Antropogene activiteiten zijn echter dé grote oorzaak van de PAK-verspreiding in de omgeving. Olieraffinaderijen, teerdistillatie, asfaltproductie, afvalverbranding, het gebruik en opslaan van brandstoffen (energiecentrales, huishoudelijke verwarming, verkeer), de emissies bij verschillende transportvormen, verwarming en industrie

(auto's, vrachtwagens, vliegtuigen, treinen, huishoudelijke verwarming, houtstoven, energiecentrales en fabrieken)

zijn hier voorbeelden van. De bijdrage van de verschillende sectoren aan de totale PAK-emissie in Vlaanderen van 1990 tot 2001, evenals de middellange termijn doelstelling (MLTD) voor 2010 zijn te zien in Fig. 1.

**Tabel 2.** Octanol-water partiticoëfficiënt en oplosbaarheid van de 16 EPA PAK's (Verschuere, 2001)

	log Kow	S (mg/l) bij 25 °C
1. Naftaleen	3,01 - 3,45	31 – 34
2. Acenaftyleen	4,07	3,93
3. Acenaftteen	5,33	0,265
4. Fluoreen	4,18 - 4,38	1,9
5. Fenantreen	4,57	1,2
6. Antraceen	4,45	1,29
7. Pyreen	5,32	0,16
8. Fluoranteen	5,33	0,265
9. Chryseen	5,61	0,006
10. Benzo(a)antraceen	5,61	0,014
11. Benzo(b)fluoranteen	6,57	0,0012
12. Benzo(k)fluoranteen	6,84	0,00055
13. Benzo(a)pyreen	6,04	0,003
14. Indeno(1,2,3,-c,d)pyreen	7,66	0,062
15. Dibenzo(a,h)antraceen	5,97	0,0005
16. Benzo(g,h,i)peryleen	7,23	0,00026

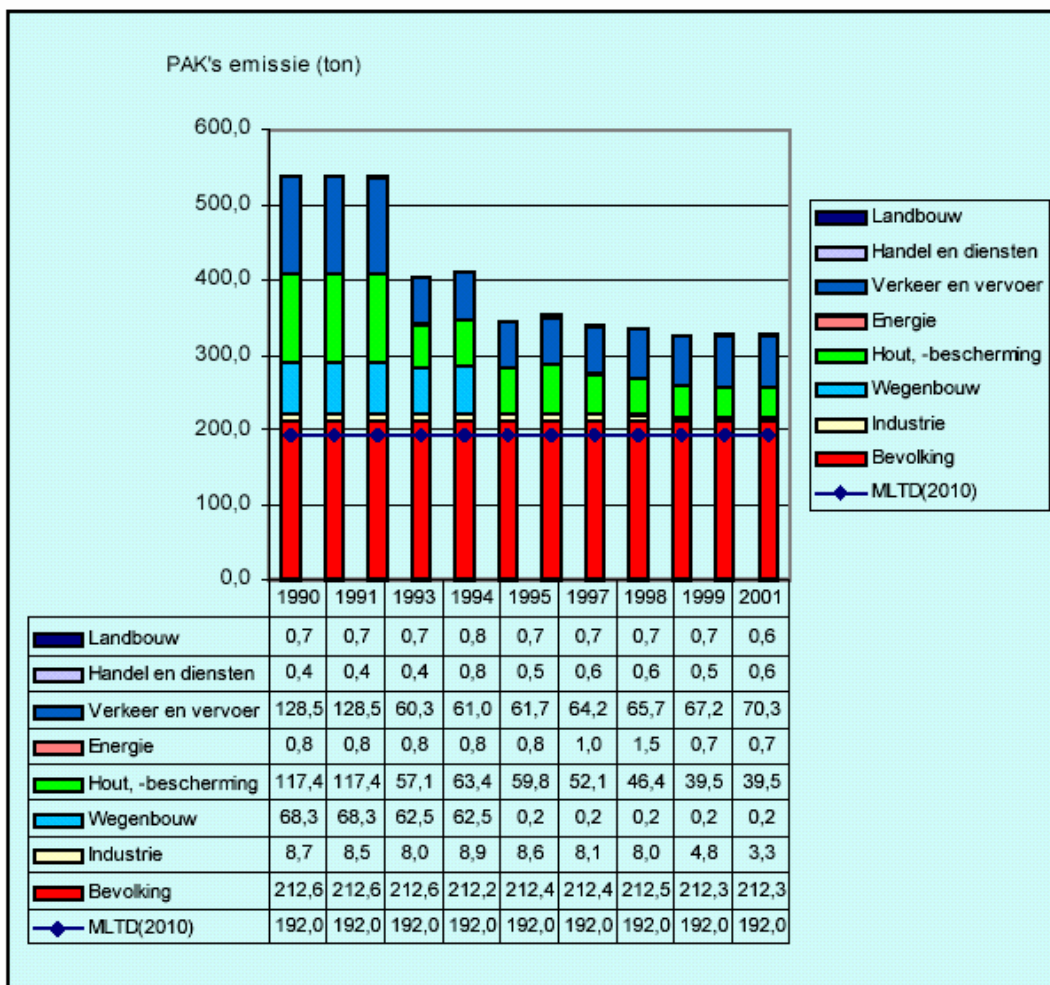
De hoofdbron van PAK's zijn fossiele brandstoffen zoals steenkolen, aardgas en aardolie. Bij het verwarmen van deze brandstoffen worden PAK's vrijgesteld. Onvolledige verbranding van organisch materiaal zoals kool, olie, hout en vegetatie kan eveneens leiden tot de vorming van PAK's. PAK's worden tevens aangetroffen in afval en afvalwater, in sedimenten en slib en als eindproducten in meststoffen.

Onder de vele PAK-houdende producten is koolteer van groot belang omwille van het gebruik in vele productieprocessen (wegbouw, bosbehoud, dakviltten) en de incorporatie in tal van producten (shampoos, huidcrèmes, zalven, verven, medicijnen, plastics, vloerbekleding, rookvrije brandstoffen, lakken, scheepsverven). Andere PAK-houdende materialen zijn ruwe olie, olieproducten, houtteren en cokes. Ruwe olie wordt gebruikt voor de productie van

bitumen dat steeds meer aangewend wordt als vervangmiddel voor teer, in wegebouw en dakviltten. Olieproducten zoals petroleum, dieselolie, verwarmingsolie, smeermiddelen en zware olie worden gedurende de laatste honderd jaar gebruikt voor transport, verwarming en industrie.

Vervuiling met PAK's komt tot stand door afvalvernietiging, het gebruik van creosoot voor bosbescherming, run-off, autobandenslijtage, industrieel afvalwater, het gebruik van compost en afvalwaterslib in de landbouw, coke ovens, gaswerken, olieraffinaderijen, bosbescherming, huishoudelijk afval, coke slakken, PAK-houdend industrieel afval, ...

De bronnen van vervuiling kunnen gekend zijn of diffuus. Het verschil tussen beiden is echter soms moeilijk te bepalen. Gekende bronnen (punt-, lijn- en oppervlaktebronnen) zijn dumpen, verspillen, ontlasten en afval van PAK-houdende producten en processen. Typische diffuse bronnen die leiden tot luchtvervuiling zijn verkeer of industriële emissie.



**Figuur 1.** Bijdrage van de verschillende sectoren aan de totale PAK-emissie (Vlaanderen, 1990 - 2001)

### 1.3 Milieuwetgeving PAK's

Volgende normen gelden volgens het milieuwetboek Vlarem II (Heyman & Smout, 1998):

#### Water

In oppervlaktewater moet de mediaan van de totale PAK-concentratie kleiner zijn dan 100 ng/L om aan de basismilieukwaliteitsnorm te voldoen.

Bij oppervlaktewater bestemd voor drinkwaterproductie gelden in functie van het aantal mensen dat van water moeten voorzien worden, jaarlijkse minimumfrequenties van bemonstering en analyse van de parameters van het oppervlaktewater. In het specifieke geval van PAK's is er minstens één monsternamen en analyse per jaar vereist. Dit wordt uitgevoerd door, of in opdracht van, de Vlaamse Milieumaatschappij. De imperatieve waarde voor PAK's, aanwezig in oppervlaktewater bestemd voor drinkwaterproductie, bedraagt 10 ng/l. Indien wordt vastgesteld dat de kwaliteit van het oppervlaktewater aanmerkelijk hoger is dan de normen, kan de frequentie van monsterneming worden verlaagd.

In grondwater bedraagt de maximaal toelaatbare concentratie voor PAK's 0,2 µg/L. Hierbij zijn fluoranteen, benzo(3,4)fluoranteen, benzo(11,12)fluoranteen, benzo(3,4)pyreen, benzo(1,12) peryleen en indeno(1,2,3-cd)pyreen de referentiestoffen.

Voor lozing in een riolering of in een waterloop (oppervlaktewater of kunstmatige afvoerweg) bedraagt de drempelwaarde voor de totale jaaremmissie van PAK's 0,1 µg/l of 0,5 kg/jaar.

#### Bodem

Bodems worden volgens hun aanduiding op het gewestplan en hun huidig gebruik ingedeeld in bestemmingstypes. Er kunnen 5 bestemmingstypes onderscheiden worden:

- |                       |           |
|-----------------------|-----------|
| - bestemmingstype I   | natuur    |
| - bestemmingstype II  | landbouw  |
| - bestemmingstype III | wonen     |
| - bestemmingstype IV  | recreatie |
| - bestemmingstype V   | industrie |

In het Vlaams reglement betreffende de bodemsanering (VLAREBO) zijn normen vastgelegd voor PAK's. Voor elk van deze verontreinigende parameters zijn achtergrondwaarden (Tabel 2) en bodemsaneringsnormen (Tabel 3) van toepassing. Ze gelden voor een standaardbodem, nl. een bodem met 10 % klei en 2 % organisch materiaal.

**Tabel 2.** Achtergrondwaarden voor organische verbindingen in de bodem (mg/kg.ds)

	Achtergrondwaarde (mg/kg.ds)
benzeen	0,1 (d)
tolueen	0,1 (d)
ethylbenzeen	0,1 (d)
xyleen	0,1 (d)
styreen	0,1 (d)
naftaleen	0,005
antraceen	0,01
benzo(a)pyreen	0,1
fenantreen	0,08
fluoranteen	0,2
benzo(a)antraceen	0,06
chryseen	0,15
benzo(k)fluoranteen	0,2
benzo(b)fluoranteen	0,2
benzo(g,h,i)peryleen	0,1
indeno(1,2,3-cd)pyreen	0,1
hexaan	0,5 (d)
heptaan	0,5 (d)
octaan	0,5 (d)
minerale olie	50

(d) detectielimiet

**Tabel 3.** Bodemsaneringsnormen voor organische verbindingen volgens bestemmingstype(mg/kg.ds)

Bestemmingstype	I	II	III	IV	V
benzeen	0,5	0,5	0,5	1	1
tolueen	5	5	15	135	200
ethylbenzeen	1,5	1,5	5	25	70
xyleen	3,5	3,5	15	70	190
styreen	0,5	0,5	1,5	6	13
naftaleen	3	3	20	160	320
benzo(a)pyreen	0,5	0,5	0,5	1	6,5
fenantreen	0,5	0,5	3,5	3,5	300
fluoranteen	2,5	2,5	40	40	270
benzo(a)antraceen	4	4	35	50	350
chryseen	7	7	400	400	800
benzo(k)fluoranteen	1	1	55	55	350
benzo(b)fluoranteen	1	1	55	55	350
benzo(g,h,i)peryleen	3,5	3,5	35	50	350
indeno(1,2,3-cd)pyreen	0,5	0,5	35	50	350
hexaan	1	1	1	6,5	10
heptaan	25	25	25	25	25
octaan	75	75	90	90	90
minerale olie	1000	1000	1000	1500	1500



## Lucht

Voor lozing in de omgevingslucht bedraagt de drempelwaarde voor de totale jaaremissie van PAK's 4 kg/jaar.

Hierbij is de representatieve reeks van PAK's:

- PAK-10 van IBS (Interim Bodemsanering)

1. Naftaleen
2. Fenantreen
3. Antraceen
4. Fluoranteen
5. Chryseen
6. Benzo(a)antraceen
7. Benzo(a)pyreen
8. Benzo(k)fluoranteen
9. Indeno(1,2,3-cd)pyreen
10. Benzo(g,h,i)peryleen

- aangevuld met:

11. Benzo(e)pyreen
12. Benzo(j)fluoranteen
13. Benzo(b)fluoranteen
14. Dibenzo(a,h)antraceen

## 2 PAK's in relatie met de bodem

### 2.1 Biobeschikbaarheid van PAK's in een bodemmatrix

Verschillende types beschikbaarheid kunnen onderscheiden worden wanneer PAK's, of contaminanten in het algemeen, aanwezig zijn in een bodemmatrix (Siciliano et al., 2002). De fractie PAK's die vrij of in kleine complexen in de bodemoplossing aanwezig is, wordt direct beschikbaar voor opname door bodemorganismen. Echter, PAK's die geadsorbeerd zijn aan bodemmateriaal zoals particulier organisch materiaal of kleideeltjes kunnen ook beschikbaar zijn voor opname, bijvoorbeeld bij ingestie van bodemdeeltjes door regenwormen (*Lumbricus terrestris*) of andere organismen. Deze beschikbare fractie voor opname is echter geen biobeschikbare fractie. Hiervoor is eerst transport doorheen een membraan vereist zoals de bacteriële celwand of het epitheliaal membraan van het gastro-intestinale kanaal van hogere organismen. De fractie van PAK's die geabsorbeerd wordt, en die na eventuele metabolisatie niet gesecreteerd wordt, noemt de biobeschikbare fractie. Tenslotte kan een biobeschikbare contaminant of een derivaat ervan getransporteerd worden naar een bepaald lichaamsdeel waar een toxisch effect optreedt. Dit wordt met toxische biobeschikbaarheid aangeduid.

De biobeschikbaarheid van PAK's voor bodemorganismen in gecontamineerde sites wordt bepaald door de weersomstandigheden, het totaal organisch koolstofgehalte, het bodemtype, de partikelgrootte, de pH, de hoeveelheid geconsumeerd bodemmateriaal en de uitloging. Zo is bij bodems met een laag organisch stofgehalte de bacteriële opname en de mineralisatie van PAK's groter (White et al., 1997).

Naarmate organische componenten langer aanwezig zijn in de bodem, zijn ze minder beschikbaar voor opname door organismen, voor biodegradatie en bioremediatie door micro-organismen en voor het uitoefenen van toxische effecten. Deze afnemende biobeschikbaarheid wordt niet in rekening gebracht bij de huidige chemische analysemethodes om de concentratie organische polluenten te bepalen. Sequentiële extractiemethodes die de verschillende niveau's van (bio)beschikbaarheid trachten in te schatten worden reeds toegepast voor zware metalen (Basta & Gradwohl, 2000), maar geven nog een graad van onzekerheid bij organische contaminanten. Nochtans is de ouderdom van polluenten in de bodemmatrix van toxicologisch belang omdat de assimilatie, de mogelijke acute en/of chronische toxiciteit van schadelijke componenten afneemt naarmate deze persistenten en worden geïsoleerd over de tijd. Risico-evaluatie besteedt nog onvoldoende aandacht aan deze criteria (Alexander, 2000).

Reversibele sorptie - desorptie processen van PAK's aan de bodem werden reeds waargenomen (Mihelcic et al., 1991). Deze processen kunnen de degradatie beïnvloeden en verklaren de persistentie van PAK's, zelfs in bodems die een rijke, actieve gemeenschap van PAK-degraderende micro-organismen bevat. De evenwichtverdeling van hydrofobe organische componenten tussen de waterfase en bodemfase resulteert uit een verdelingsproces dat gereguleerd wordt door de hoeveelheid organische koolstof in de bodem. Bij een normaal koolstofgehalte is de sorptie van PAK's gecorreleerd aan de mate van aromaticiteit in de humus (Gauthier et al., 1987). Bij onvoldoende koolstof (< 0,2 – 0,4 %) kunnen bodemmineralen en reactieve functionele groepen op PAK's de opname via verschillende mechanismen controleren (Curtis et al., 1986). Deze sorptie en desorptie gaat initieel snel, maar vertraagt door verminderde diffusie (Pavlovstathis & Jaglal, 1991). Equilibrium in de bodem of in sedimenten kan pas na maanden of jaren bereikt worden (Landrum et al., 1992). Sorptie beïnvloedt het microbieel metabolisme omdat gesorbeerde PAK's als onbeschikbaar worden beschouwd voor micro-organismen (Wodzynski & Coyle, 1974). Desorptie gebeurt snel in vergelijking met andere processen zoals het microbieel metabolisme (Pignatello, 1989). Het effect van desorptie op de biobeschikbaarheid van PAK's werd vastgesteld in laboratoriumstudies door Hatzinger en Alexander (1995). Recent toegevoegde PAK's kunnen door micro-organismen gemetaboliseerd worden terwijl verouderde PAK's persisteren in milieustalen, hoewel deze de geschikte microbiota bevatten. Veroudering van PAK's gaat immers gepaard met afname van desorptie (Jin et al., 1999).

## **2.2 Biodegradatie**

### **2.2.1 Aërobe biodegradatie**

De aërobe biodegradatie van PAK's in de omgeving wordt bepaald door diverse factoren : de chemische structuur, het aantal ringen, de biobeschikbaarheid, de concentratie, de beschikbaarheid van elektronenacceptoren, de zuurstofconcentratie en de mate van adaptatie door micro-organismen. Vroege studies uitgevoerd door Lee et al. (1984), Wilson et al. (1985), Shiaris (1989) en Herbes en Schwall (1978) toonden reeds aan dat PAK's in grondwater en in sedimenten worden gedegradeerd als voldoende moleculaire zuurstof aanwezig is. Laagmoleculaire PAK's zijn veel minder recalcitrant dan sommige extreem onoplosbare, hydrofobe hoogmoleculaire PAK's. Het belang van adaptatie van microbiële populaties bij de degradatie van laagmoleculaire PAK's werd aangetoond door de vaststelling

dat de degradatiesnelheid van naftaleen en fluoreen toeneemt met de tijd (Lee et al., 1984). Herbes en Schwall (1978) observeerden halfwaardetijden van 5, 280, 700 en 21 000 h in PAK-gecontamineerde sedimenten voor respectievelijk naftaleen, antracene, benzo(a)antracene en benzo(a)pyreen. Dit toont aan dat hoogmoleculaire PAK's een lagere degradatiesnelheid hebben. Deze halfwaardetijden waren 10 tot 400 keer lager dan de halfwaardetijden van niet-gecontamineerde sedimenten. Dit bevestigt dat adaptatie aan PAK's essentieel is voor microbiële PAK-degradatie. Shiaris (1989) bestudeerde de biotransformatie van naftaleen in gecontamineerde estuariene sedimenten. Stalen met hoge naftaleenconcentraties vertoonden hoge degradatiesnelheden door de ruime beschikbaarheid van naftaleen. De degradatiesnelheid van naftaleen hangt tevens af van omgevingscondities zoals temperatuur en zoutgehalte. Toenemende saliniteit resulteert in afnemende oplosbaarheid en dus in lagere biobeschikbaarheid van PAK's. Experimenten beschreven door Callahan et al. (1979) en Means et al. (1980) toonden aan dat naftaleen uit het grondwater werd verwijderd door sorptie aan de bodem. Dit was mogelijk doordat naftaleen een hydrofobe component is met een lage oplosbaarheid en een hoge  $K_{ow}$ . Uit een studie van Phillips et al. (1994) bleek dat cyanobacteriën zouden kunnen betrokken zijn bij PAK-degradatie. Naftaleen in een microbiële mat met cyanobacteriën, werd verwijderd door mineralisatie, volatilisatie en chemische degradatie.

Aërobe transformatie van PAK's in de bodem of het grondwater leidt vaak tot een snelle verminderde beschikbaarheid van opgeloste zuurstof. Dit brengt een lagere redoxpotentiaal (Eh) met zich mee. Dergelijke afname van de Eh creëert een geschikte groei-omgeving voor denitrificerende, sulfaatreducerende of zelfs methanogene ( $Eh < -0,3$  V) microbiële populaties. Ongeveer 10 tot 15 % van de bacteriële populatie in bodem, water en sedimenten wordt vertegenwoordigd door anaërobe organismen (Riser-Roberts, 1998).

### **2.2.2 Anaërobe biodegradatie**

Anaërobe afbraak van PAK's wordt beschouwd als traag en van beperkte ecologische betekenis. Bij zuurstoftekort kan de anaërobe biotransformatie echter een sleutelrol spelen in PAK-transformatie. In afwezigheid van moleculaire zuurstof speelt de Eh een kritische rol in de bepaling van de metabolische verscheidenheid van microbiële populaties in bodems, sedimenten en waterhoudende grondlagen.

## Denitrificatie

De microbiële reductie van  $\text{NO}_3^-$  tot  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  en  $\text{N}_2$  is gekend als denitrificatie. Bij de oxidatie van organische substraten fungeert nitraat als terminale elektronenacceptor en is stikstofgas gewoonlijk het finaal product van de denitrificatie. Denitrificatie is sterk afhankelijk van de beschikbaarheid van koolstof en treedt op als de concentratie opgeloste zuurstof beneden  $10 \mu\text{M}$  valt. De biotransformatie van organische contaminanten kan door denitrificatie ingeleid worden. Actieve nitraatrespirerende micro-organismen worden aangetroffen in verscheidene anoxische habitats zoals bodems, meren, rivieren en oceanen.

Aromaten die moleculaire zuurstof in hun ringstructuur incorporeren, gebruiken deze zuurstofmolecule voor het aromatisch katabolisme. Evans (1977) stelde vast dat benzoaten anaëroob worden afgebroken door initiële ringreductie, gevolgd door hydrolytische splitsing. Voor PAK-afbraak ging dergelijk mechanisme echter niet op. In de experimenten van Bauer en Capone (1985) konden antraceen en naftaleen gedegradeerd worden. De mate van PAK-mineralisatie was afhankelijk van de zuurstofconcentratie en de incubatietemperatuur. Bij afwezigheid van zuurstof trad geen PAK-afbraak op. Mihelcic & Luthy (1988a) toonden de biodegradatie van naftaleen aan onder denitrificerende omstandigheden. Bij een overmaat aan nitraat werden zowel acenaftyleen als naftaleen tot een niet detecteerbaar niveau afgebroken. Onder andere anaërobe testcondities bleven de componenten stabiel. In een andere studie observeerden Mihelcic & Luthy (1988b) een nitraatafname tijdens naftaleen degradatie. De studie toonde tevens aan dat PAK-afbraak onder denitrificerende condities afhankelijk is van de verhouding PAK's tot andere mineraliseerbare koolstofbronnen.

Hoewel resultaten bevestigen dat PAK's onder nitraat- en sulfaatreducerende omstandigheden biotransformatie kunnen ondergaan, is de degradatiegraad onder deze condities 10 tot 100 maal lager dan onder aërobe omstandigheden (Rockne & Strand, 1998).

Anaërobe degradatie onder denitrificerende omstandigheden kan echter de aërobe degradatie evenaren als de celdensiteiten gelijk zijn (McNally et al., 1998). In recent werk van Rockne et al. (1999, 2000) werden pure culturen van anaërobe, PAK-degraderende bacteriën geïsoleerd en geïdentificeerd als *Vibrio* sp. en *Pseudomonas* sp. Deze resultaten suggereren dat aromatische afbraak onder denitrificerende omstandigheden normaliter mogelijk is voor proteobacteriën.

### **Ijzerreductie**

Bij ijzerreductie is de geoxideerde vorm van ijzer, Fe(III), de terminale elektronenacceptor in aanwezigheid van een geschikte koolstof- en energiebron. Het begin van anaërobe condities in sedimenten in zoetwater en het hiermee gepaard gaande overvloedig voorkomen van Fe(III) maakt dit de meest potentiële electronenacceptor voor de oxidatie van organisch materiaal (Lovley et al., 1989). Accumulatie van Fe(II) gedurende anaërobe transformatie van organisch materiaal in waterlagen toont aan dat Fe(III) een mogelijke elektronenacceptor kan zijn in verscheidene omgevingen. Evenwel kon nog geen ijzergekoppelde PAK-biotransformatie aangetoond worden.

### **Sulfaatreductie**

Dissimilatorische sulfaatreductie gebeurt door anaërobe, organotrofe organismen die laag moleculaire zuren, alcoholen of H<sub>2</sub> als elektronendonors gebruiken (Paul & Clark, 1996). Sulfaatreducerders of sulfidogenen zijn strikt anaëroben die organisch materiaal als koolstof- en energiebron gebruiken. Ze worden voornamelijk aangetroffen in zoetwater en mariene sedimenten maar kunnen ook in de bodem gevonden worden (Riser-Roberts, 1998). Deze bacteriën kunnen aromaten afbreken zoals benzoaten, catecholen, indolderivaten en chlorofenolen. Sulfaatreductie wordt echter geïnhibeerd door molybdaat. De mogelijkheid van sulfidogenen om aromatische componenten tot CO<sub>2</sub> om te vormen toont de microbiële enzymatische capaciteiten van deze organismen aan (Paul & Clark, 1996). Onder sulfaatreducerende omstandigheden kunnen PAK's geoxideerd worden (Coates et al., 1996). Oxidatie van naftaleen en fenantreen tot CO<sub>2</sub> onder anaërobe omstandigheden gaat gepaard met sulfaatreductie. Dit toont aan dat het zelfreinigend karakter van PAK-gecontamineerde, sulfaatreducerende omgevingen groter kan zijn dan gedacht.

PAK's die zuivere anaërobe mariene sedimenten binnendringen zullen niet onmiddellijk worden afgebroken. Microbiële populaties, die de overmaat aan sulfaat als elektronenacceptor kunnen gebruiken, kunnen zich pas na verloop van tijd ontwikkelen en PAK's metaboliseren.

Volgens Zhang en Young (1997) is carboxylatie de initiële stap bij anaërobe transformatie van PAK's en is 2-naftoic zuur een tussenproduct. Deze carboxylatie leidt tot de formatie van benzoatanalogen. Dergelijke componenten zijn ideale substraten voor verdere activatie door co-enzyme A binding en ringreductie. Bedessem et al. (1997) suggereren dat hydroxylatie als

initiële stap bij anaërobe transformatie van PAK's kan beschouwd worden. Zij brengen naftalenol als tussenproduct naar voren.

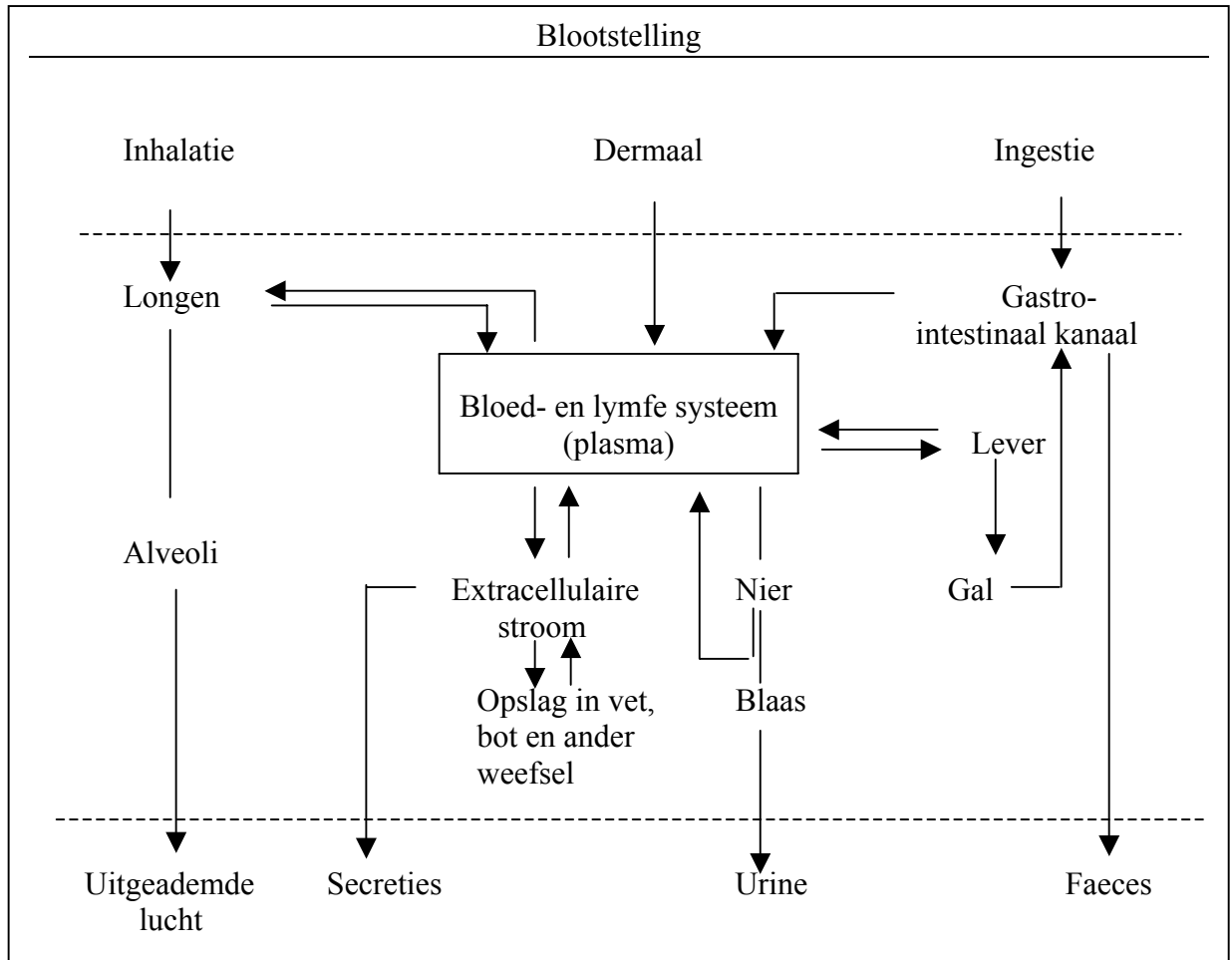
### **Methanogenese**

Methanogenese is een strikt anaëroob proces en methanogenen zijn obligaat anaëroben die eenvoudige, laag moleculaire organische zuren tot methaan fermenteren. De beschikbaarheid van een elektronendonor kan de competitie tussen sulfaatreducerende bacteriën en methanogenen in de hand werken. Als de beschikbaarheid van een elektronendonor gelimiteerd is, zullen bij lage sulfaatconcentraties (< 1 mg/L), sulfaatreducerende bacteriën methanogenen weg competitieren voor het beschikbaar substraat. Bij een overmaat aan elektronendonors kunnen methanogenen een deel van de elektronenflux afzonderen, zelfs als er voldoende sulfaat is voor sulfaatreductie (Riser-Roberts, 1998). Hoewel onder methanogene condities gesubstitueerde monoaromatische componenten getransformeerd worden tot CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> (Healy & Young, 1979 ; Kaiser & Hanselman, 1982), kon methanogene PAK-transformatie tot dusver nog niet worden aangetoond.

### 3 PAK's in relatie met het menselijk lichaam

#### 3.1 Blootstellingswegen

Er kunnen drie belangrijke blootstellingwegen van contaminanten naar het menselijk lichaam toe onderscheiden worden (Fig. 2). Deze zullen hieronder verder behandeld worden.



**Figuur 2.** Algemeen beeld van de blootstellingswegen van PAK's

#### Opname van contaminanten door inhalatie

Blootstelling langs de ademhalingswegen kan gebeuren door inhalatie van gassen, dampen, aërosolen en stof. Gassen worden onmiddellijk opgenomen in het bloed, terwijl stofdeeltjes ( $< 3 - 5 \mu\text{m}$ ) achterblijven in de luchtwegen of in de alveoli (Menichini, 1992). Door cellulaire interactie in de alveoli tussen verschillende blijvende en transitorische celtypes (macrofagen, neutrofielen, epitheel- en structuurcellen) kan toxiciteit van de stofdeeltjes



ontstaan. Chemische componenten kunnen door de cytochroom P450 enzymencomplexen in de longcellen gebiotransformeerd worden tot minder toxische maar soms ook tot mutagene of carcinogene species. Deze reactieve chemische species zijn in staat om het DNA te beschadigen wat kan leiden tot longtumoren (Hext, 1994). In de alveoli kunnen stofdeeltjes tevens langzaam worden gefagocyteerd door macrofagen en uit de longen worden getransporteerd door het mucociliaire transport. Dit mechanisme, waarbij de gifstoffen naar andere lichaamsdelen worden gebracht, kan 2 tot 3 dagen duren (Vincent, 1990). In de andere lichaamsdelen zullen de stofdeeltjes accumuleren of hun toxische werking uitoefenen. In sommige gevallen echter kunnen de stofdeeltjes voor meerdere honderden dagen in de alveoli ingebed blijven (Vincent, 1990). Deze lange termijn blootstelling kan resulteren in toxiciteit naar de blijvende epitheelcellen, de endotheliale cellen, de fibroblasten en de transitorische macrofagenpopulaties. Intoxicatie door inademing vertoont veelal een acuut karakter.

### **Opname van contaminanten door dermaal contact**

PAK's kunnen door de huid geabsorbeerd worden en zich in het lichaam opstapelen. De mate van absorptie doorheen de huid is moeilijk in te schatten. Diverse factoren spelen een rol: de chemische samenstelling, de concentratie, het huidcontactoppervlak, de duur van het huidcontact, de luchttemperatuur, de vochtigheid, de mate van fysieke inspanning en de huid zelf (beschadigde, zieke of poreuze huid).

Huidcontact met PAK's kan resulteren in dermatitis (huidirritatie en huiduitslag), wat afhankelijk van het individu en de blootstellingsduur zeer ernstig kan worden. Sommigen worden gevoelig na herhaalde blootstelling en ontwikkelen een allergische reactie voor toekomstige blootstellingen. Dermal contact met PAK's kan tevens leiden tot huidtumoren. Een tumor ontwikkelt zich wanneer er genetische beschadiging optreedt. Dit wil zeggen wanneer er DNA adducten gevormd worden. Deze tumorvorming door PAK's onderstreept de mogelijke carcinogene effecten van PAK's (Goldstein, 2001).

### **Opname van contaminanten door ingestie**

Blootstelling aan contaminanten langs orale weg kan op verschillende wijzen gebeuren. Zo werd een concentratie van 130 µg/kg PAK's genoteerd bij geroosterd vlees (Guillen et al. , 1997). Tevens vormt ingestie van verontreinigde grond een belangrijke blootstelling. Opname van bodemdeeltjes bij bv. slecht gereinigde groenten kan bij volwassenen leiden tot

een maximale grondinname die schommelt rond de 50 mg/d (U.S. Environmental protection agency, 1997). Daarnaast kunnen kleine kinderen (1 - 4 jaar) grond opnemen tijdens het spelen door hun karakteristieke hand-mond gedrag. Gronddeeltjes die aan vingers of andere voorwerpen zitten, worden in de mond gestopt en de grond wordt vervolgens ingeslikt. Dit leidt tot een gemiddelde dagelijkse grondinname tussen de 50 en 200 mg (Sedman, 1994). Naast dit normale gedrag vertonen sommige kinderen pica-gedrag (1 - 5% van de 1 tot 6-jarigen). Dit is een eetstoornis waarbij grote hoeveelheden materie zoals grond wordt ingeslikt. Op deze manier kan 1 tot 20 g grond op een enkele dag worden ingenomen. Aangenomen wordt dat grondingestie een belangrijke blootstellingsroute is voor veel verontreinigingen in de grond. Kinderen, vooral peuters, vormen de risicogroep omdat zij door hun hand-mond gedrag meer grond opnemen dan volwassenen en omdat zij gevoeliger kunnen zijn voor contaminanten.

Alvorens een contaminant uit een grond biobeschikbaar wordt, moet het een aantal stappen doorlopen. De grond moet in de eerste plaats worden ingenomen. Vervolgens moeten de contaminanten van de grond in het maag-darmkanaal gemobiliseerd worden. In de menselijke risico-evaluatie is er nog grote onzekerheid omtrent deze vrijstelling van contaminanten uit de bodemmatrix in het spijsverteringsstelsel. Recente studies waarbij *in vitro* methodes werden gebruikt om het gastro-intestinaal kanaal te simuleren, trachtten de vrijstellingsmechanismen en complexatiemechanismen op te helderen (Hack & Selenka, 1996; Oomen et al., 2000; Oomen et al., 2002, Van de Wiele et al., 2003). In deze studies wordt een onderscheid gemaakt tussen de biotoegankelijke fractie en de biobeschikbare fractie van een contaminant. De biotoegankelijke fractie van een contaminant is deze fractie die in het gastro-intestinaal kanaal wordt vrijgesteld uit een matrix (bodem, voedsel, ...) en die beschikbaar wordt voor intestinaal transport of opname doorheen de dunne darmwand (Oomen et al., 2002). Absorptie vindt vrijwel uitsluitend plaats in de dunne darm. Relatief hydrofiele componenten zoals zware metalen vereisen na mobilisatie dikwijls actief transport om door de dunne darm geabsorbeerd te worden. Gemobiliseerde hydrofobe contaminanten als PAK's zijn echter klein en hydrofoob genoeg om direct of via galzoutmicellen te worden geabsorbeerd (Oomen et al., 2000). De fractie wordt biobeschikbaar wanneer ze effectief doorheen de dunne darmwand wordt getransporteerd en, na eventuele metabolisatie, in het lichaam blijft. Deze biobeschikbare fractie kan via de bloedbaan of lymfebaan de doelorganen in het lichaam bereiken waar ze kunnen bioaccumuleren of een toxisch effect veroorzaken.

Voorbij de darmwand zijn er twee mogelijkheden: de contaminanten worden in de lever (hepatocyten) en/of de darmwand (enterocyten) gemetaboliseerd en worden uitgescheiden of

de contaminanten bereiken de systematische circulatie en worden biobeschikbaar. Alvorens verder in te gaan op deze biotransformatiereacties (punt 3.6), wordt eerst dieper ingegaan op de fysiologie van het spijsverteringsstelsel.

### 3.2 Fysiologie van het spijsverteringsstelsel

Geskes et al. (1984) beschreef de fysiologie van het spijsverteringsstelsel. Het spijsverteringskanaal bestaat uit de mond-keelholte (pharynx), de slokdarm (esophagus), de maag (ventriculus), de dunne darm (intestinum) en de dikke darm (colon). De dunne darm begint met een gedeelte dat met het peritoneum verbonden is, nl. de twaalfvingerige darm (duodenum). Daarna volgen de nuchtere darm (jejunum) en de einddarm (ileum). De dikke darm bestaat uit een opstijgend, een dwars verlopend en een afdalend gedeelte: colon adscendens, colon transversum en colon descendens. Ten slotte volgen nog de S-vormige dikke darm (colon sigmoideum), de endeldarm (rectum) en de anus. Het spijsverteringskanaal omvat, behalve het kanaal zelf, een aantal klieren met uitwendige afscheiding. Deze buiten het kanaal gelegen klieren (lever en alvleesklier) staan ten dienste van de spijsvertering.

#### Maag

De maag is een verwijd gedeelte van het spijsverteringskanaal, waarin het voedsel enige tijd verblijft en wordt voorverteerd. In de maag vindt digestie van voedsel plaats door een mechanische en chemische werking.

De mechanische activiteit van de maag leidt tot een intensief contact van het maagsap met alle delen van de voedselbrij. De kneding waarbij de voedselbestanddelen worden doorengemengd, alsmede de voortbeweging van de spijsbrij in de richting van de sluitspier komt tot stand door krachtige, ritmische samentrekkingen van de spieren in de maagwand. Door deze spiercontracties ontstaan voorwaarts gerichte 'golven' in de maagwand waarbij telkens een kleine hoeveelheid van de spijsbrij in de twaalfvingerige darm wordt toegelaten. Gedurende het verblijf in de maag ondergaat het voedsel een scheikundige afbraak door de inwerking van maagsap. Het maagsap is een waterige vloeistof die verscheidene anorganische ionen alsmede enzymen in oplossing bevat. De belangrijkste werkstoffen zijn zoutzuur en pepsine.

**Dunne darm**

De processen van mechanische en chemische digestie, die in de maag op gang komen, worden in de dunne darm voortgezet. Bovendien worden de afscheidingsproducten van het dunne darmslijmvlies bijgemengd. Ook treedt peristaltiek op, waardoor de inhoud van de dunne darm in de richting van de dikke darm opschuift. De gang door de dunne darm neemt 4 tot 5 uur in beslag, waarbij de duodenum in slechts een kwartier wordt doorlopen. Het verblijf in het ileum neemt de meeste tijd in beslag, hier is de peristaltiek spaarzaam en de kneding intensief. In de dunne darm worden drie sappen afgescheiden: gal, pancreassap en darmsap.

De digestie van het voedsel leidt tot de vorming van kleinmoleculaire nutriënten, die door de darmwand worden opgenomen en daarna aan het bloed worden afgegeven. Dit proces heet resorptie, het eigenlijke doel van de spijsvertering. De resorptie vindt plaats op moleculair niveau in de dunne darm. Vermits er zeer veel opnameplaatsen nodig zijn, is de grootte van het oppervlak dat de darmholte begrenst, van wezenlijk belang. Het inwendige oppervlak (100 m<sup>2</sup>) van de 6 tot 7 meter lange dunne darm wordt enorm vergroot door de aanwezigheid van de plooien van Kerckring en door de kleine darmvlokken waarmee het gehele oppervlak van het slijmvlies is bezaaid. De resorptie wordt bevorderd door de ritmische samentrekkingen van de cirkelvormige spieren in de darmwand. Het aantal darmvlokken, en daarmee de resorptie, neemt naar het einde van de dunne darm af.

**Dikke darm**

In de dikke darm overheerst de microbiële afbraak van nog niet verteerde voedselcomponenten, de mechanische digestie is hier minder van belang. De spierbewegingen van het opstijgende gedeelte van de dikke darm (colon ascendens) zijn overwegend knedend en weinig voortstuwend. In dit gedeelte vindt resorptie van water plaats, waardoor de darminhoud wordt ingedikt. In het dwars verlopende (colon transversum) en dalende (colon descendens) gedeelte van de dikke darm zorgt een krachtige peristaltiek ervoor dat de darminhoud snel naar de endeldarm voortdrijft. De motorische werkzaamheid van de dikke darm vindt met lange tussenpozen plaats. De gang van het opstijgende gedeelte neemt ongeveer 24 uur in beslag, de rest van de dikke darm wordt eveneens in ongeveer 24 uur doorlopen. In de dikke darm vinden verschillende processen plaats (fermentaties, absorpties, secreties). De fermentaties zijn belangrijk voor de vetzuurproductie, als stimulans voor het immuumsysteem, ... De rijkheid en verscheidenheid van de microbiële ecologie in de dikke darm is zeer kenmerkend. De darmmicrobiota bestaat uit een 400-tal soorten micro-

organismen (Acidophilus-, Bifidum-, melkzuur-, rottings- en gistingsbacteriën;  $10^{12}$  bacteriën/ ml darminhoud). Deze microbiota zorgen voor de afbraak van voedselresten en zijn noodzakelijk voor de vorming van vitamine K. Het slijmvlies van de dikke darm scheidt slijm af zonder enzymen. In de dikke darm wordt de kleurstof van de gal, de bilirubine, afgebroken. De ontlasting bevat de onverteerbare voedselbestanddelen en de dode en levende darmmicrobiota. Voorts bevinden zich in de ontlasting gedesquameerde slijmvliescellen, slijm en afbraakproducten van de galkleurstof.

### **3.3 Rol van fase I en fase II biotransformaties bij de bioactivatie of detoxificatie van xenobiotica**

Biotransformatie reacties kunnen in twee fases opgesplitst worden nl. fase I (functionele reacties zoals oxidatie, reductie en hydrolyse) en fase II (conjugatie reacties).

Biotransformatie verhoogt de hydrofylie van een component en vergemakkelijkt de excretie ervan. Hoewel de lever ongetwijfeld de hoofdplaats is voor xenobiotisch metabolisme, bezitten alle weefsels de mogelijkheid om lichaamsvreemde componenten te metaboliseren. Huid, hersenen, olfactorische mucosa, longen, hart, gastro-intestinaal systeem, nieren, geslachtsklieren en beenmerg zijn hier voorbeelden van (Connely & Bridges, 1980). De grote distributie van biotransformatie enzymen in het lichaam levert een goede uitleg voor de metabolische basis van “target organ toxicity” (Gram et al., 1986).

#### **3.3.1 Fase I reacties**

Gedurende fase I wordt een functionele groep (-OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -COOH) op de xenobiotische molecule geïntroduceerd. Hierdoor kan deze molecule gemakkelijker geconjugeerd worden met endogene substraten (Gibson & Skett, 1994).

#### **Oxidatiereacties**

Oxidatiereacties worden hoofdzakelijk uitgevoerd door het “microsomal mixed-function oxidase system” (MFO), dat gelegen is in het glad endoplasmatisch reticulum van de meeste weefsels en in de mitochondria. MFO's vereisen NADPH, O<sub>2</sub>, het flavoproteïne NADPH cytochroom c (P450) reductase en het haemoproteïne cytochroom P450 (P450). Hydroxylaties, epoxidaties, dealkylaties, oxidaties en desulfuraties kunnen door MFO gekatalyseerd worden. Cytochroom P450-gereguleerde oxidaties zijn de belangrijkste reacties

die leiden tot bioactivatie. Afhankelijk van het type reactie, kan cytochroom P450 een toxisch product activeren of detoxificeren. Bij hydroxylatie van aflatoxine B1 (AFB1) vormt zich het minder toxisch product aflatoxine M1 (AFM1) of aflatoxine Q1 (AFQ1), epoxidatie leidt tot de vorming van AFB1-8,9 epoxide met genotoxische en cytotoxische eigenschappen (Coulombe, 1993). In sommige gevallen echter worden er bij oxidatiereacties door P450 metabolieten gevormd die de toxische eigenschappen van hun moedercomponent behouden. P450 is betrokken bij veel bioactivatie reacties maar veel toxische metabolieten zijn goede substraten voor de fase II enzymen (zie 6.3.2). Het resulterende conjugaat hierbij is veel minder gevaarlijk dan het initiële metaboliet. De balans tussen toxificerende en detoxificerende pathways moet uiteindelijk bepalen wat het effect is van een component (Gibson & Skett, 1994).

### **Reductiereacties**

Reductiereacties worden uitgevoerd door het NADPH cytochroom c (P450) reductase of door het cytochroom P450 onder anaërobe condities. Xenobiotica met één van volgende functionele groepen kunnen gereduceerd worden:  $-RCHO$ ,  $-R_2C=O$ ,  $-R_2S=O$ ,  $-RSSR$ ,  $-quinon$ ,  $-N-oxide$ ,  $-RCH=CHR$ ,  $-RNO_2$ .

Bij het herbicide paraquat (PQ) wordt de redoxcyclus ingeleid door het NADPH cytochroom c (P450) reductase. Dit enzym brengt een reducerend equivalent van NADPH naar PQ over (Gram et al., 1986). De sterke vermindering van NADPH gedurende de PQ toxicose is niet enkel te wijten aan de PQ redoxcyclus maar ook aan de regeneratie van glutathion (GSH) uit geoxideerd GSH. Als gevolg van de productie van peroxidatieve species, stapelt GSH zich snel op in de cel (Keeling & Smith, 1982). De resulterende stimulatie van de hexose-monofosfaat aftakking, de meest belangrijke biochemische pathway voor NADPH synthese, kan initieel het NADPH verlies compenseren maar zal terzelfdertijd verder reducerende equivalenten leveren voor de vorming van zuurstofradicalen. De netto vermindering van NADPH zou de cel niet meer in staat stellen om vitale biosynthetische processen uit te voeren en zou de synthese van een defect longsurfactans veroorzaken (Delaunois et al., 1991). Vandaar de regeneratie van GSH uit geoxideerd glutathion.

## **Hydrolyse**

De hydrolyse van esters en amides gebeurt door een groep van microsomale en cytosolische enzymen nl. de esterases en de amidases. Deze enzymen zijn uiterst belangrijk bij de inactivatie van toxische producten zoals organische contaminanten (Abdelsalam, 1987; Mosha, 1993), pyrethroides (Dorman & Beasley, 1991) en mycotoxines (Knupp et al., 1987).

### **3.3.2 Fase II reacties**

Bij deze reacties is een diverse groep van microsomale en cytosolische transferases betrokken. Deze enzymen katalyseren de conjugatie van een endogene groep (glucuronzuur, sulfaat-, methyl-, acyl-, of gereduceerd GSH) met een xenobioticum. Het xenobioticum kan al dan niet een fase I reactie ondergaan hebben. De conjugaten bezitten een verhoogde wateroplosbaarheid en worden vrij snel via de gal of de urine uitgescheiden. Glutathion S-transferases (GST) zijn voornamelijk actief in de promotie van de conjugatie van electrofiële componenten met GSH. Dit resulteert in de inactivatie van toxische producten zoals epoxides (aflatoxine B1, bromobenzeen, benzo(a)pyreen), hydroperoxides en decompositieproducten van endogene lipiden zoals 4-hydroxy-non-2-enal (Ketterer & Mulder, 1990). Er wordt gepostuleerd dat GST een beschermende rol speelt in het voorkomen van sporidesmine toxiciteit in lammetjes (Flaoyen & Jensen, 1991). Behalve een paar uitzonderingen, kan er besloten worden dat fase II reacties hoofdzakelijk verantwoordelijk zijn voor de detoxificatie van xenobiotica.

### **3.4 Factoren die de biotransformatie enzymen beïnvloeden: determinanten voor bioactivatie of detoxificatie**

Het toxisch effect van een xenobioticum is het netto resultaat van de balans tussen activerende en detoxificerende pathways. De factoren die de totale biotransformatie capaciteit regelen zijn hierbij van uiterst belang.

#### **Interne factoren**

Hiertoe behoren species, stam, geslacht, leeftijd en fysiopathologische condities (zwangenschap, ziekte,...). Bij lage expressie van een specifieke biotransformatie pathway kan een soort gevoeliger zijn voor bepaalde componenten. Katten vertonen een lage glucuronidase

capaciteit bij aromatische componenten (Mulder et al., 1990). Bijgevolg zijn ze bijzonder gevoelig voor verscheidene geneesmiddelen en bewaarmiddelen (Clarke et al., 1981). De gevoeligheid voor lichaamsvreemde stoffen kan tevens een aanwijzing zijn voor de expressie van detoxificerende enzymen en/of voor de mate van relatieve productie van toxische metabolieten. Tevens zijn er geslachtsgerelateerde verschillen. Ratten van het mannelijke geslacht metaboliseren vreemde componenten vlugger dan vrouwelijke ratten. Dit verklaart hun hogere gevoeligheid voor rattengif zoals koolstoftetrachloride en heptachlor die een metabolische (P450-gereguleerde) bioactivatie vereisen (Timbrell, 1982).

Versillen in hun oxidatiemetabolisme tonen aan dat er geslachtsspecifieke P450 isoenzym patronen zijn: P450 2C11, 2C13 en 3A2 zijn enkel in expressie bij mannelijke ratten, P450 2C12 is enkel in expressie bij vrouwelijke ratten, P450 2E1, 2A1 en 2C7 komt meer tot expressie bij vrouwelijke dan bij mannelijke ratten (Kato & Yamazoe, 1992).

### **Externe factoren**

Een enkele of herhaalde blootstelling aan sommige xenobiotica kan aanpassingen veroorzaken in het metabolisme van een levend organisme. Bij verhoging van de metabolische snelheid van een endogeen of exogeen substraat is er sprake van inductie, bij verlaging van inhibitie.

Enzyminductie wordt bereikt door *de novo* synthese van proteïnen. Deze synthese is meestal het resultaat van verhoogde gentranscriptie hoewel andere mechanismen zoals proteïne- of mRNA stabilisatie ook verantwoordelijk kunnen zijn. Voor grote, planaire moleculen zoals PAK's is de inductie gereguleerd door binding op een cytosolische receptor (Ah receptor) (Gonzalez, 1989). Sommige inducers kunnen naast de expressie van P450 iso-enzymen tevens de expressie van andere fase I en fase II biotransformatie enzymen verhogen zoals NADPH cytochrom c reductase, esterases, GSTs, ... (Bock et al., 1990). Fenobarbital, 3-methylcholantreen en glucocorticoïden kunnen de activiteit van GSH-peroxidasen, die de cel beschermen tegen oxidatieve beschadiging, reguleren (Miyazaki, 1991). Door de lage substraat selectiviteit van fase I en fase II biotransformatie enzymen, kan een inducer het metabolisme van een endogeen substraat of van een vreemde component verhogen. Is deze toxisch, dan kan een verhoging van de metabolische snelheid een schadelijk of nuttig effect hebben op de biologische activiteit van het product en dus op de balans tussen toxificerende en detoxificerende pathways.

Enzyminhibitie kan veroorzaakt worden door verminderde proteïnesynthese of versnelde proteïnenafbraak, door reversibele of irreversibele interacties (zelfmoordinhibitie) met of



zonder voorafgaande metabolische activatie of door competitie van twee verschillende substraten voor dezelfde bindingsplaats. De effecten van inhibitoren op biotransformatie enzymen zijn weinig gekend. Naargelang de dosering, kan eenzelfde chemische component inhibitie of inductie van biotransformatie enzymen veroorzaken. Acute blootstelling aan trifenylytin zorgt voor een krachtige en selectieve inhibitie van P450-gereguleerde biotransformatie (Fent, 1996; Nebbia et al., 1999). Subchronische orale toediening van trifenylytin aan konijnen verhoogt de P450 en carboxylesterase activiteit (Nebbia et al., 1997). Recent kon worden aangetoond dat P450 inhibitoren niet-specifiek zijn of zich speciaal gedragen bij zeer lage concentraties (Miranda et al., 1998).

Enzyminhibitie kan de vorming van meer toxische metabolieten verhinderen. Melkkoeien die aan het mycotoxine AFB1 worden blootgesteld, secreteren AFM1 in hun melk. Dit metaboliet wordt door de P450-gereguleerde hepatische biotransformatie van AFB1 gevormd. Om melkcontaminatie te minimaliseren, moet de AFB1-absorptie door het gastro-intestinaal kanaal gereduceerd worden en moet het AFB1 metabolisme geblokkeerd worden. De vorming van AFB1 metabolieten kon recent volledig geïnhibeerd worden door het ditiol-tion synthetisch derivaat oltipraz in primaire culturen van bovine hepatocyten (Kuilman et al., 2000).

Geneesmiddelen, pesticiden en milieubelastende stoffen kunnen zowel inductie als inhibitie teweeg brengen.

## 4 Bioassays

Chemische contaminanten in het milieu kunnen via verschillende methodes gemeten worden. De chemische analytische methode (bv. GC-MS) is gevoelig en specifiek maar vaak duur in uitvoering (Farrington et al. 1987). Een alternatief is de immunoassay (bv. ELISA) die gebruik maakt van chemisch specifieke antilichamen (Szurdoki et al., 1996) of biosensoren. Deze biosensoren gebruiken antilichamen of andere herkenningsmoleculen gekoppeld aan electrochemische signaaltransductie systemen (Bender en Sadik, 1998). Assays die van biomarkers gebruik maken (bv. Aryl hydrocarbon assay) zijn een ander krachtig alternatief voor chemische analyses. Methodes gebaseerd op biologische effecten en de onderliggende mechanismen kunnen chemische analyses aanvullen of soms volledig vervangen. De voordelen van deze biologische methodes zijn de toxicologische specificiteit, de snelheid en de lage kost. “Toxicologische specificiteit” doelt op het verband tussen de assay respons en het toxisch potentieel van een milieustaal, eerder dan op de contaminantconcentratie. McLachlan (1993) noemt dit functionele toxicologie. Biologische assays omvatten *in vivo* biomarkers, *in vivo* bioassays en *in vitro* bioassays. Biomarkers zijn biochemische, fysiologische of andere biologische veranderingen die de aanwezigheid of effecten van xenobiotica aanduiden. *In vivo* bioassays houdt de blootstelling in van testdieren aan contaminanten of gecontamineerde materialen. Dit kan zowel op het veld als in het laboratorium gebeuren. Deze assay kan gebruikt worden om de biobeschikbaarheid van een milieustaal in te schatten. Nadelen hiervan zijn de kosten en de benodigde tijd. *In vitro* bioassays maken gebruik van cultuurcellen of cellulaire extracten om de aanwezigheid van contaminanten te detecteren. Assays die de receptor binding, de enzym inhibitie of veranderingen in genexpressie meten, zijn hier voorbeelden van. Voordelen op de chemische of *in vivo* methode zijn de snelheid, de lage kost en de biologische specificiteit. Niettemin vergt extrapolatie van *in vitro* bioassay resultaten tot *in vivo* situaties een grote voorzichtigheid. Het eindpunt en de blootstellingsomstandigheden kunnen immers sterk verschillend zijn.

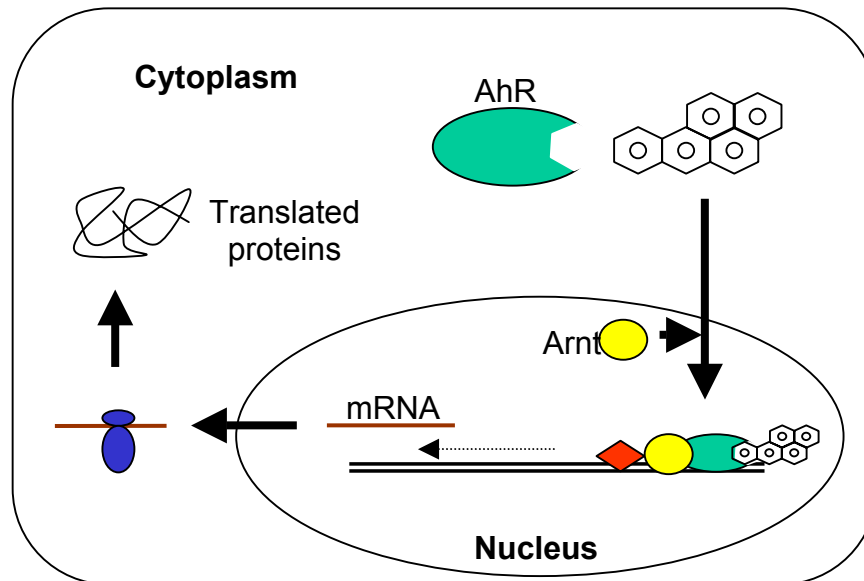
### 4.1 De Aryl hydrocarbon test

Met deze bioassay kan de affiniteit van een testcomponent bepaald worden om te binden op de humane aryl hydrocarbon receptor (AhR). De test steunt op het gebruik van de genetisch

gemodificeerde bakkersgist *Saccharomyces cerevisiae* waarbij de AhR werd ingebracht. Wanneer een xenobiotica bindt op deze receptor, kunnen biotransformatiereacties plaatsvinden. Deze reacties kunnen op hun beurt leiden tot de vorming van carcinogene of estrogene biotransformatieproducten. De humane AhR is een door een ligand geactiveerde component van een heterodimerische transcriptie factor. Deze transcriptie factor wordt het aryl hydrocarbon receptor complex (AHRC) genoemd (Hankinson, 1995; Schmidt & Bradfield, 1996). De aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) is de andere component van de AHRC transcriptie factor. Het AHRC staat in voor de regulatie van genproducten zoals specifieke fase I en II metabolische enzymen en andere regulatorische proteïnen (Hankinson, 1995; Nebert et al., 1993; Sutter et al., 1991). Bij binding van een ligand op de AhR vormt zich een AhR-ligand complex (Fig.3). Dit complex verplaatst zich naar de kern waar het bindt met de Arnt. Deze associatie leidt tot de omzetting van de AhR naar een hoge affiniteit DNA-bindingsvorm (Whitlock et al., 1996). Onder deze vorm bindt het met een xenobiotisch responsive element (XRE). Wanneer een ligand bindt op de Ah receptor komt het *lacZ* reporterplasmide tot expressie. Dit plasmide is opgebouwd uit een DRE23 enhancer sequence met drie AHRC response elements afkomstig van het murine CYP1A1 gen. Het genproduct van *lacZ*,  $\beta$ -galactosidase, leidt tot de omzetting van het gele chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG) tot het rode chlorophenol (CPR). Deze kleurreactie kan gemeten worden met een spectrofotometer.

Sommige liganden, zoals 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo(p)dioxine, activeren de AhR als initiële stap in een toxische pathway die leidt tot endocriene verstoringen, ontregeling van het immuunsysteem, voortplantingsproblemen, groeidefecten en kankers in vertebraten (Abbott et al., 1994; Poland & Knutson, 1982; Safe et al., 1997).

Mensen of andere organismen worden vaak aan een complex mengsel van toxische stoffen blootgesteld, veeleer dan aan één enkele stof. Dit toxisch mengsel kan een additief, een synergetisch of een antagonistisch effect hebben. Hiervoor is het van belang te weten of de toxiciteit te wijten is aan een receptor gereguleerd proces of aan een alternatief mechanisme. Bij een beperkte hoeveelheid AHRC in expressie is er een ligand-afhankelijke activatie van de *lacZ* expressie, bij een volledige expressie van AHRC is er een ligand-onafhankelijke activatie van de AhR (Chang & Puga, 1998; Miller, 1997, Singh et al., 1996). Overexpressie van de AhR en Arnt beïnvloedt een cellulaire factor, die instaat voor de regeling of compartimentalisatie van deze componenten.



**Figuur 3.** Binding op de arylreceptor, transcriptie, translatie en proteïnesynthese

#### 4.2 De estrogene test

Xeno-estrogenen, zoals sommige pesticiden of industriële chemicaliën, worden verantwoordelijk geacht voor het verstoren van de normale endocriene functies in dieren. Hierdoor treden abnormaliteiten en voortplantingsstoornissen op. Er wordt gesuggereerd dat deze chemicaliën tevens verantwoordelijk zijn voor de toename in voortplantingsabnormaliteiten bij de mens, de spermavermindering bij de man en de toenemende borstkanker bij vrouwen (Cooper & Kavlock, 1997; Davis & Bradlow, 1995; Sharpe, 1998; Sharpe & Shakkebaek, 1993). Om het potentieel estrogeen effect van een testcomponent te bepalen wordt de Yeast Estrogenic Screen (YES) gebruikt. In deze bioassay wordt, naar analogie met de aryl hydrocarbon test, gebruik gemaakt van een *Saccharomyces cerevisiae* stam waarin de humane estrogene receptor (ER) werd geïntegreerd. Interactie van een estrogene substantie met de ER veroorzaakt een conformatieverandering in de receptor. Hierdoor kan het estrogeen-ER complex binden met het estrogeen responsieve element (ERE).

Het *lacZ* reporter gen, gelegen op een reporterplasmide, komt hierdoor tot expressie. Het genproduct van *lacZ*,  $\beta$ -galactosidase, leidt tot de omzetting van het rode chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG) tot het gele chlorophenol. Deze kleurreactie kan gemeten worden met een spectrofotometer.

### 4.3 De SOS chromotest

De SOS chromotest (Quillardet, 1982) is gebaseerd op het gebruik van de darmbacterie *Escherichia coli* PQ37 om genotoxische effecten te kunnen aantonen. In *E.coli* PQ37 is het  $\beta$ -galactosidase gen (*lacZ*) onder de controle van het *sfiA* gen operon geplaatst. Dit reporter-gen behoort tot het SOS-repair system ( *sfiA::lacZ* fusie). Bij DNA beschadiging komt niet enkel het *sfiA* gen tot expressie maar tevens het *lacZ* gen. Het genproduct van *lacZ*,  $\beta$ -galactosidase, kan gemeten worden met een enzymtest. Op deze manier wordt tevens de DNA beschadiging gemeten. Om bacteriotoxische effecten te bepalen wordt de alkaline fosfatase activiteit gemeten. Dit is een indicator voor de algemene proteïnesynthese. Deze parameter blijft constant, zowel in geïnduceerde als in niet-geïnduceerde *E.coli*, indien beschadigende effecten voor de bacteriële groei, afwezig zijn.

### 4.4 De AMES test

De AMES-test is gebaseerd op het meten van de histidine-negatief ( $HIS^-$ ) naar de histidine-positief ( $HIS^+$ ) reversie door middel van chemische stoffen die in het histidinegen in het genoom van de *Salmonella typhimurium* bacterie een basepaarsubstitutie of frameshift mutatie kunnen veroorzaken. De mogelijkheid van een chemische stof om te interageren met het DNA van een bacterie is een maat voor het potentieel mutageen en/of carcinogeen karakter van deze stof in zoogdieren. Om de invloed van het metabolisme van zoogdieren op de teststoffen te bestuderen wordt S9 toegevoegd, dit is een metaboliserend ratteleverpreparaat. De test gebeurt met de bacteriestam TA98 die frameshift mutaties opspoorde in het gen dat codeert voor het tiende enzym (gen D) van de histidine biosynthese pathway. De mutante *Salmonella typhimurium* stammen kunnen niet groeien in media waarin histidine ontbreekt ( $His^-$ ). Indien er evenwel voldoende histidine in het medium aanwezig is om DNA-replicatie en celdeling toe te laten, dan is er kans dat een mutatie het defect in het histidine-genoom doet omslaan en aldus de bacterie toelaat te groeien wanneer het histidine is opgebruikt.

Het basisprincipe van de AMES-test is dus de mutante *Salmonella*-stammen in aanwezigheid van een teststof en een beetje histidine te laten groeien en verschillende celdelingen te laten ondergaan. Een kleine fractie van de bacteriën zal spontaan terugmuteren naar  $His^+$ . Als de teststof mutageen is zullen er significant meer bacteriën reverteren naar  $His^+$  dan spontaan.

Deze gereverteerde bacteriën kunnen herkend worden aan hun mogelijkheid om zichtbare kolonies in het medium te vormen, nadat de initiële histidine voorraad is opgebruikt.

#### **4.5 De komeettest**

Deze test is een microgel electroforese techniek waarmee DNA beschadiging in een cel kan gemeten worden. De alkalische versie, geïntroduceerd door Singh et al. (1988), detecteert DNA breuk, alkali labiele sites, open repair sites en cross links. In tegenstelling tot de overige bioassays ondergaan de organismen bij de komeettest geen metabolische reactie. Bij deze techniek worden de cellen gemengd met agarose gel, dat op een glasplaatje is uitgespreid. De cellen worden door hoge zoutconcentraties en detergenten gelyseerd. Denaturatie en electroforese van het overblijvende DNA gebeurt in een alkali buffer. De DNA fragmenten migreren uit de kern naar de positieve pool. Na electroforese wordt de bewegingen door een fluorochroom (bv. ethidiumbromide) gekleurd. Om de DNA beschadiging te kunnen meten wordt gebruik gemaakt van een beeldanalyse systeem. Omwille van de komeetvormen die onder de microscoop te zien zijn wordt deze assay de komeettest genoemd. De meest gebruikte parameters om DNA beschadiging te detecteren zijn de staartlengte, gemeten vanaf het centrum van de kern tot het einde van de staart van de komeet, het percentage DNA in de staart en het moment van de staart.

## 5 Probleemstelling bij ingestie van PAK's

Het menselijk lichaam kan aan PAK-gecontamineerde matrices blootgesteld worden langs orale weg. Na desorptie van de PAK's uit de matrix in het spijsverteringstelsel, kan een fractie van deze componenten geabsorbeerd worden doorheen de dunne darmwand. Deze geabsorbeerde PAK's kunnen in de enterocyten en vooral, na transport, in de hepatocyten gebiotransformeerd worden. Initieel zal een PAK molecule binden op de aryl hydrocarbon receptor. Dit ligand zal vervolgens, samen met de aryl hydrocarbon nucleaire translocator, de productie van het cytochroom P450 1A1 nl. CYP1A1 induceren (Levin et al., 1982; Fouchécourt et al., 1999). Samen met andere cytochroom complexen zoals CYP1B1 en CYP1A2 zullen deze enzymen de typische biotransformatiereacties beginnen. Zoals eerder besproken gebeuren deze in twee fasen. Fase I enzymen zullen de PAK's omvormen tot meer polaire metabolieten door het plaatsen van functionele groepen op de molecule. Tijdens fase II biotransformatie, zullen deze metabolieten verder geconjugeerd worden door glucuronosyltransferase, sulfotransferase of glutathion, wat leidt tot meer hydrofiele PAK-derivaten. Deze fase II metabolieten worden makkelijker uit het lichaam verwijderd via de nieren of via excretie in de gal terug in het lumen van de dunne darm.

Dit detoxificatie mechanisme is echter soms ontoereikend vermits sommige PAK's tijdens de biotransformatie kunnen gebioactiveerd worden en een genotoxisch, carcinogeen of zelf estrogeen karakter krijgen (Brauze et al., 1997; Hirose et al., 2001). PAK-conjugaten die gesecreteerd werden via de gal in de dunne darm, kunnen mogelijk gedeconjugeerd kunnen worden door bacteriële enzymen (bv. glucuronidase) in de dikke darm. Dit kan opnieuw aanleiding geven tot meer toxische intermediären (Winter et al., 1989; Aura et al., 2002). Een bijkomend aspect dat aandacht vraagt is de hoge diversiteit van micro-organismen in de dikke darm. Deze microbiota beschikken over een heel brede waaier aan enzymen. Sommige van deze enzymen kunnen in staat zijn xenobiotische componenten deels om te zetten en in sommige gevallen zelfs aanleiding kunnen geven tot de vorming van meer schadelijke componenten (Ilett et al., 1990).

In dit eindwerk wordt aandacht besteed aan dit laatste aspect. De vorming van meer schadelijke PAK derivaten in het lumen van de dikke darm is nog niet nader onderzocht en wordt in de huidige risico-evaluaties niet beschouwd. Toch kunnen dergelijke omzettingen significante gevolgen hebben. Zo zou de vorming van (pro)carcinogene stoffen in de dikke darm sneller aanleiding kunnen geven tot de vorming van colonkanker.

## 6 Relevantie en doel van dit onderzoek

Dit onderzoek kan worden opgesplitst in twee delen. Een eerste deel beschrijft het uitvoeren van digestie experimenten op pure PAK standaarden en milieustalen. Bij deze digesties worden zowel de maag, de dunne darm als de dikke darm gesimuleerd. De meeste aandacht gaat echter naar de simulatie van de dikke darm in korte en middellange termijn experimenten.

Een tweede deel behandelt de manier waarop digestiestalen aan verschillende bioassayexperimenten worden onderworpen om de bindingsaffiniteit op de humane aryl receptor (Aryl Hydrocarbon Bioassay) aan te tonen en om eventuele estrogene (Yeast Estrogen Screen Bioassay) of genotoxische (SOS chromotest) effecten op te sporen. Het bekomen van een positief signaal in de estrogene bioassay of SOS chromotest in combinatie met het uitvoeren van voldoende controle experimenten, is een eerste belangrijke en relevante aanwijzing dat omzettingsprocessen kunnen optreden tijdens incubatie in een colonsuspensie.



## **HOOFDSTUK 2: MATERIAAL EN METHODEN**

### **1 Staalname**

#### **1.1 Digestietesten**

Drie verschillende digestieprocessen van het menselijk gastro-intestinaal kanaal werden gesimuleerd. De gecontamineerde bodem die hierbij gebruikt werd, was afkomstig van de A-horizont van een PAK-gecontamineerd recreatiegebied. De totale PAK concentratie bedroeg  $49 \pm 1,5$  mg PAK/kg DS. Het organisch stofgehalte bedroeg 3,34 % en de pH 6,5 (1:10 H<sub>2</sub>O). De bodem bestond uit 94% zand, 4% leem en 2% klei en was geklasseerd als zandbodem.

De leguminosenbodem was een zand-leem bodem met een hoog percentage leem. De grondstalen werden gehomogeniseerd en bewaard bij 4 °C in de afwezigheid van licht. Voor de aanvang van de analyse werden kleine steentjes en plantenmateriaal verwijderd door zieving (2 mm).

##### **1.1.1 Maagdigestie**

Bij de simulatie van de maag werden de effecten van de pH, de vloeistof-vaste stof verhouding en de invloed van de voedselcomponenten bestudeerd. Een zoutoplossing bestaande uit KHCO<sub>3</sub> (0,1 mol/L) en NaCl (0,1 mol/L) werd toegevoegd aan 5 g bodem bij een vloeistof-vaste stof verhouding (L/S: liquid to solid ratio) van 10. Deze oplossing werd aangezuurd met zoutzuur tot pH 1,5 nadat 0,625 mL pepsine (32 mg/ 100 mL) was toegevoegd. Deze bodemsuspensie werd vervolgens gedurende 2 h geschud aan 150 tpm bij 37 °C.

Een L/S verhouding van 10 wordt toegepast om een bodemingestie van 20 g/d te simuleren bij pica-kinderen. Een L/S verhouding van 40 en 100 wordt gebruikt om meer courante effecten bij kinderen te benaderen.

##### **1.1.2 Duodenumdigestie**

Hoewel intestinale bacteriën reeds aanwezig zijn in de dunne darm is dit digestiemodel voornamelijk gericht op de enzymatische activiteiten, de galzouten en complexatie van

oplosbaar en particulier organisch materiaal. Aan de bodemsuspensie, die reeds een maagdigestie had ondergaan, werd na 2 uur schudden 25 mL pancreassap toegevoegd (samenstelling voor 1L: 12.5 g  $\text{NaHCO}_3$  (zorgt voor een pH van 6,3), 6 g oxgall en 0,9 g pancreatine). Deze dunne darm bodemoplossing werd gedurende 4 uur geschud aan 150 tpm bij 37 °C.

### 1.1.3 Colondigestie

Omzettingsmechanismen beïnvloed door darmmicrobiota werden onderzocht via het colondigestiemodel. De duodenum suspensie werd aangevuld met 50 mL SHIME suspensie. Deze suspensie is afkomstig van een reactor die het menselijk intestinaal microbiële ecosysteem simuleert (Simulator of the human intestinal microbial ecosystem). De SHIME suspensie bevat anaërobe en micro-aërobiele micro-organismen in vergelijkbare concentratie en samenstelling als in het menselijk colon (Molly et al., 1993).

De colondigestie werd micro-aërofiel geïncubeerd door te flushen met  $\text{N}_2$  gas. Voor anaërobe incubatie werd 0,2 mM fumarate toegevoerd en langdurig geflusht met  $\text{N}_2$  gas. Vervolgens werd gedurende 18 h geschud aan 150 tpm bij 37 °C.

### 1.1.4 Waterextractie

Om de uitloogbaarheid van PAK's in de bodemoplossing te simuleren werd gebruik gemaakt van een waterextractie. Hiertoe werd 5 g bodem afgewogen in een schottfles waaraan 50 mL water werd toegevoegd. Vervolgens werd de suspensie gedurende 24 h geschud aan 150 tpm bij 37 °C.

## 1.2 Proef met de SHIME reactor

Het opstarten van de SHIME (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem) reactor vereist fecaal materiaal. Er werd gewerkt in een 1/5 verhouding voor het suspenderen van fecaal materiaal in een anaërobe fosfaatbuffer. In 500 mL gedistilleerd water werd 0,1 M fosfaat gebracht onder de vorm van equivalente hoeveelheden  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Hiervoor werden 4,4 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 3,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 0,5 g natriumthioglycolaat opgelost in 500 mL gedistilleerd water. Na toevoeging van 100 g fecaal materiaal werd het geheel in de

stomacher geplaatst voor 10 minuten, zodat de suspensie goed gemengd werd. Vervolgens werd de bekomen suspensie in 50 mL falcon tubes gebracht, waarna gedurende 2 minuten aan 500 g werd afgecentrifugeerd om de grofste partikels (onverteerde voedselresten) te verwijderen. Het supernatans werd gebruikt als inoculum. Per colonreactor volstaat ongeveer 40 mL suspensie. Aan de rest van de suspensie werd 20 % (op volumebasis) glycerol toegevoegd (10 mL glycerol bij 40 mL supernatans brengen). Dit werd zeer grondig gevortexed en bij  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bewaard voor later gebruik.

De uitgevoerde SHIME runs waren verschillend van de conventionele methode in die zin dat 3 colonsvaten in parallel werden opgesteld. Hiermee kon het verschil in colonsamenstelling bij verschillende inocula onderzocht worden. Met een pH controller (Consort pH controller R301) werd de pH in een range van 6,6 tot 6,9 gehouden. Tweemaal per dag werd op mechanische wijze voeding toegediend en werd gedurende 15 min met  $\text{N}_2$  geflusht. De samenstelling van de voeding wordt weergegeven in Tabel 4.

**Tabel 4.** Samenstelling van de voeding voor de SHIME

Component	Concentratie (g/L)
Arabinogalactan	1
Pectine	2
Xylan	1
Aardappelzetmeel	3
Glucose	0,4
Gistextract	3
Pepton	3
Mucine	4
Cysteïne	0,5

Voor het inoculeren van de SHIME werd inoculum gebruikt van een:

- Baby (10 maanden)
- Volwassene (29 jaar)
- Vegetariër (23 jaar)
- Bejaarde (80 jaar)

Om een colonsuspensie met uitsluitend bacteriën te bekomen werd bij de colonsuspensie van de volwassen persoon een hoge dosis cycloheximide toegediend (100 mg volume%).

Colonsuspensie met uitsluitend fungi werd bekomen door toediening van ciprofloxacine

(100 mg volume%). Dit anti-bioticum wordt gebruikt voor een preoperatieve decontaminatie van de darm.

Na ontwikkeling en stabilisatie van de colonsuspensie ( $\pm 3$  dagen) werd een mix van PAK's (1,128 mg/L) toegediend. De dosering was erop gericht een concentratie van grootteorde 1 ppm te handhaven. Er werden SHIME stalen genomen na 1, 2, 3 en 4 dagen incubatie met een mix van PAK's.

### 1.3 Staalvoorbereiding

Hydrofobe componenten waaronder PAK's en eventuele biotransformatieproducten werden uit de digestiestalen geëxtraheerd via een vloeistof-vloeistof extractie. Vermits de stalen tijdens het uitvoeren van de bioassaytesten worden verdund, werden deze initieel opgeconcentreerd zodat de bioassays in het juiste concentratiegebied werden uitgevoerd. Het staal werd gedurende 5 min bij 1100 g gecentrifugeerd. Het supernatans van het staal werd overgebracht in een 500 mL scheitrechter, waarna ethylacetaat werd toegevoegd in een 1:2 verhouding met het supernatans. Het mengsel werd gedurende 2 min geschud zodat er een intens contact was tussen de producten. Vervolgens werden de twee fasen gescheiden van elkaar. Het staal werd opnieuw in de scheitrechter gebracht en nogmaals werd dezelfde hoeveelheid ethylacetaat toegevoegd. Na intens mengen werden de twee fasen opnieuw van elkaar gescheiden. De twee extracten werden samen in een kolf van een rotavapor gebracht. Een waterbadtemperatuur van 70 °C zorgde ervoor dat de ethylacetaatfractie verdampte. Wanneer ongeveer 5 mL extract in de kolf bleef, werd deze fractie in een proefbuis gebracht. Het extract werd verder uitgedampt door de proefbuis in een warmwaterbad van 80 °C te plaatsen. De PAK's bleven achter op de glaswand van de proefbuis. Na volledig verdampen van het ethylacetaat werd een volume dimethylsulfoxide (DMSO) toegevoegd zodat het staal 100x was opgeconcentreerd. De proefbuis werd voldoende geschud zodat de componenten van de glaswand naar de vloeistoffase konden overgaan. Na zorgvuldig afsluiten werd de proefbuis bij – 20 °C bewaard tot analyse in de bioassaytesten.

## 2 Omzetting van PAK's door darmmicrobiota

SHIME suspensie bevat een complexe microbiële ecologie die vergelijkbaar is met *in vivo* coloncondities (Molly et al., 1993). Per mL darminhoud worden  $10^{12}$  bacteriën en fungi aangetroffen. Naast darmmicrobiota bevat de SHIME suspensie ook opgelost organisch materiaal (OM), particulier organisch materiaal, galzouten, enzymen, grote aggregaten, ...

Om te onderzoeken of darmmicrobiota in staat zijn om PAK's te transformeren moeten correcties gemaakt worden voor het opgeloste OM, het particulier OM en de enzymen aanwezig in de SHIME suspensie. Bij koken van de SHIME suspensie worden de microbiota en de enzymen afgedood. Centrifugatie van SHIME suspensie resulteert in het neerslaan van het particulier OM en microbiota.

### 2.1 Correctie voor opgelost OM

In een erlenmeyer werd 100 mL SHIME suspensie gedurende 2 min aan de kook gebracht. Na afkoeling werd dit staal gedurende 5 min aan 3000 g gecentrifugeerd. Bij 50 mL van het gekookte en gecentrifugeerde staal werd 500  $\mu$ L van een mix van PAK's gebracht. De samenstelling van de mix wordt in Tabel 5 weergegeven. De gemiddelde concentratie van de mix bedraagt 564 mg/L. Dit staal bevatte enkel nog het opgelost OM.

**Tabel 5.** Samenstelling van de mix van PAK's (mg/L)

Component	Concentratie (mg/L)
Benzo(a)pyreen	396
Naftaleen	780
Pyreen	494
Fenantreen	561
Fluoranteen	494
Fluoreen	602
Antraceen	531
Acenaftyleen	657
<b>gemiddelde</b>	<b>564</b>

### 2.2 Correctie voor particulier OM

Bij 50 mL gekookte SHIME suspensie werd 500  $\mu$ L van een mix van PAK's gebracht. Dit staal bevatte het particulier OM en het opgeloste OM.

### 2.3 Correctie voor enzymen

Gedurende 5 min werd 75 mL SHIME suspensie aan 3000 g gecentrifugeerd. Bij 50 mL van het gecentrifugeerde staal werd 500 µL van een mix van PAK's gebracht. In dit staal waren de enzymen, het particulier OM en het opgelost OM aanwezig.

### 2.4 Omzetting van PAK's door darmmicrobiota

Bij 50 mL SHIME suspensie werd 500 µL van een mix van PAK's gebracht. In dit staal zijn zowel bacteriën als enzymen, particulier OM en opgelost OM aanwezig.

Deze 4 stalen werden geflusht onder een N<sub>2</sub>-stroom en vervolgens overnacht geschud aan 150 tpm bij 37 °C. Na centrifugatie van de 4 stalen (5 min, 3000 g) werd een GC-MS analyse uitgevoerd door het Environmental Research Center (Hofstade). De concentratie van de volgende PAK's kunnen door middel van GC-MS analyse bepaald worden:

1. Naftaleen
2. Benzo(a)pyreen
3. Fenantreen
4. Fluoranteen
5. Benzo(a)antraceen
6. Chryseen
7. Benzo(b)fluoranteen
8. Benzo(k)fluoranteen
9. Benzo(g,h,i)peryleen
10. Indeno(1,2,3-c,d)pyreen

Hierna zal met de som van de concentratie van deze 10 PAK's verder gewerkt worden.

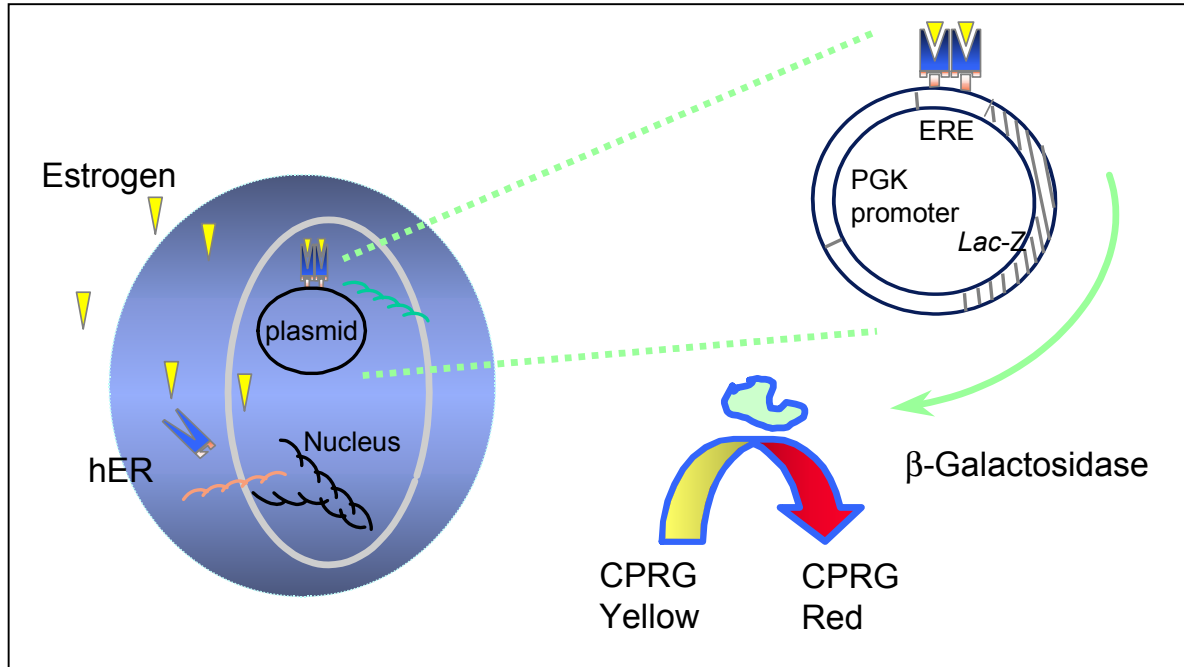
## 3 Bioassay testen

### 3.1 De estrogene test

Het uitvoeren van de estrogene gisttest is gebaseerd op een protocol dat werd uitgewerkt door Routledge en Sumpter (1996) en later werd aangepast door De Boever *et al.* (2001). Er wordt gebruik gemaakt van een genetisch gemodificeerde *Saccharomyces cerevisiae* stam waarin de menselijke estrogene receptor (hER) is geïntegreerd. Deze giststam bezit

expressieplasmiden en genen die geactiveerd worden na binding van bepaalde componenten op de estrogene receptor. De plasmiden bevatten het *lacZ* reporter gen, dat codeert voor het  $\beta$ -galactosidase enzym. Naargelang de bindingsgraad van estrogene componenten op de hER, zal het *lacZ* gen tot expressie gebracht worden met productie van  $\beta$ -galactosidase tot gevolg. Deze  $\beta$ -galactosidase activiteit wordt gekwantificeerd door de omzetting van een chromogeen substraat chlorophenolrood- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG). De omzetting veroorzaakt een kleurverandering van geel (CPRG) naar rood (CPR) waarvan de intensiteit kan gemeten worden bij een golflengte van 540 nm (D'Haese, 1999). Een schematische voorstelling van het estrogeen geïnduceerde expressie systeem in de gist wordt weergegeven in Fig. 3.

De testen worden uitgevoerd in microtiter platen waardoor een verdunningsreeks kan worden gemaakt voor verschillende stalen per plaat. De respons in de bioassays wordt uitgedrukt als het quotiënt van de absorbantie bij 540 nm ( $\beta$ -galactosidase activiteit) en de absorbantie bij 630 nm (optische densiteit van de gistcultuur). Deze waarden leiden tot een dosis-respons curve waaruit de maximale respons, de helling en de  $EC_{50}$  kan worden afgeleid.



Figuur 4. Schematische voorstelling van het estrogeen geïnduceerde expressie systeem in de gist (Routledge and Sumpter, 1996)

### 3.1.1 Stockoplossingen en mediumbereiding

Het medium van de gisttest werd onder steriele omstandigheden aangemaakt en bestaat uit een minimaal medium (MM), 5 additieven en 1 kleurstof. De samenstelling van het minimaal medium wordt weergegeven in Tabel 6.

Schott-flesjes met 45 mL minimaal medium werden geautoclaveerd bij 121 °C gedurende 20 minuten. Na afkoeling werd het geautoclaveerde medium bewaard bij kamertemperatuur voor onbepaalde tijd.

Ter voorbereiding van het opkweken van de gist, werden afzonderlijke oplossingen aangemaakt van glucose (40 g/100 mL MilliQ water), L-aspartaatzuuroplossing (800 mg/100 mL MilliQ water), vitamineoplossing (zie Tabel 7), L-threonineoplossing (4,8g/100 mL MilliQ water) en kopersulfaatoplossing (1,01g/ 100 mL MilliQ water).

Voor het testen van de  $\beta$ -galactosidaseproductie werden oplossingen aangemaakt van CPRG (100 mg/10 mL MilliQ water) en cycloheximide (200 mg/10 mL ethanol). Tenslotte werd MM, de cycloheximide-oplossing en de CPRG-oplossing samengevoegd in een verhouding van 4/1/0,2.

**Tabel 6.** Samenstelling van het minimaal medium voor de estrogene gisttest

Component	Concentratie (mg/L MilliQ water)
Kaliumdihydrofosfaat	$13,61 \cdot 10^3$
Ammoniumsulfaat	$1,98 \cdot 10^3$
Kaliumhydroxide	$4,2 \cdot 10^3$
Magnesiumsulfaat	409
Ijzer (III)sulfaat-oplossing	1 mL (98 mg/100 mL H <sub>2</sub> O)
L-leucine	50
L-histidine-HCl-H <sub>2</sub> O	67
Adenine	50
L-arginine-HCl	20
L-methionine	20
L-tyrosine	30
L-isoleucine	30
L-lysine-HCl	30
L-fenylalanine	25
L-glutaminezuur-Na	115
L-valine	150
L-serine	375



**Tabel 7.** Samenstelling van de vitamineoplossing voor de estrogene test

Component	Concentratie (mg/ 90 mL MilliQ water)
Thiamine-HCl	8
Pyridoxine-HCl	8
Pantotheniczuur-1/2 Ca	8
Myo-inositol	40
d-Biotine oplossing	20 mL (2 mg/100 mL MilliQ water)

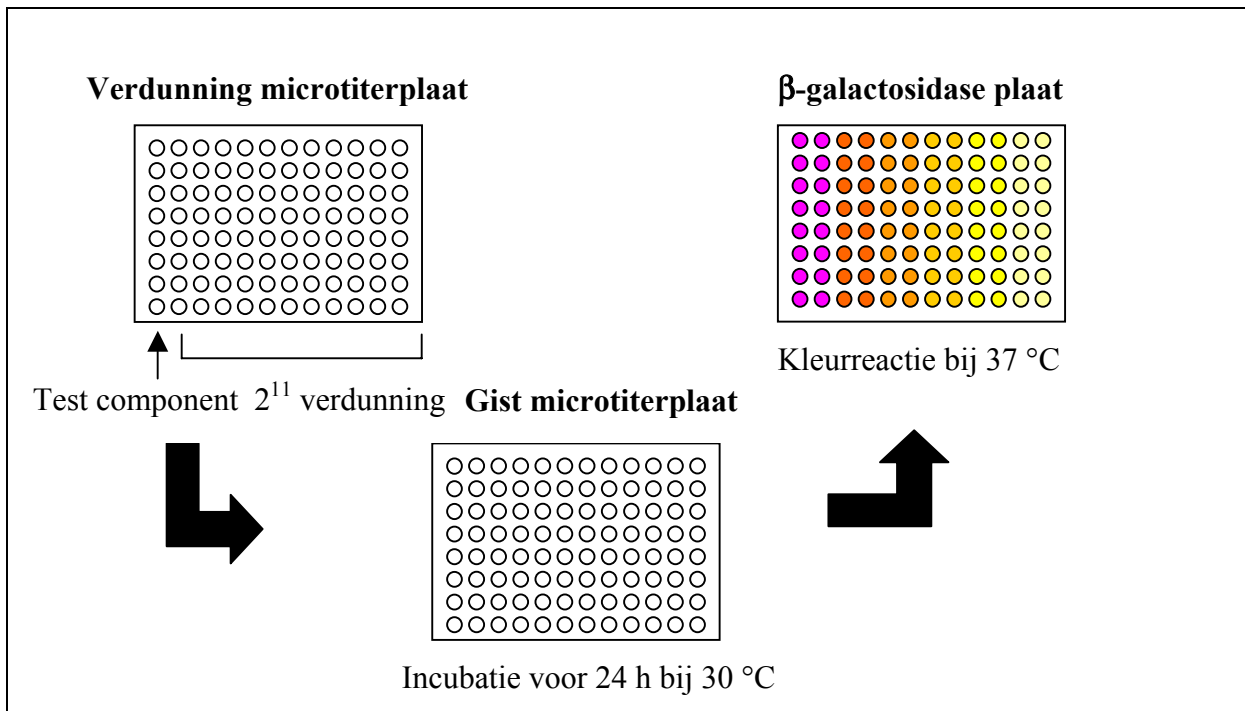
### 3.1.2 Opkweek van *Saccharomyces cerevisiae* (dag 1)

In recipiënten met 45 mL minimaal medium werden gekende hoeveelheden van de glucose- (2,5 mL), L-aspartaatzuur- (625 µL), vitamine- (250 µL), L-threonine (200 µL) en koper(II)sulfaatoplossing (62,5 µL) toegevoegd. Vervolgens werd 125 µL van de geconcentreerde giststock (-80°C) bij het groeimedium gebracht en gedurende 24 h bij 28 °C op een schudder geïncubeerd.

### 3.1.3 Inzetten van de test (dag 2)

In een 96 well microtiterplaat werden viervoudige verdunningsreeksen van de testcomponenten aangemaakt. Per microtiterplaat werden 2 componenten getest zodat er telkens 4 herhalingen waren binnen dezelfde bioassay test. De verdunningsreeks werd bekomen door het achtereenvolgens overbrengen van 100 µL van de testcomponent van een vorige kolom naar 100 µL DMSO van een volgende kolom. De laatste kolom van de verdunning microtiterplaat werd enkel gevuld met 100 µL DMSO om als blancowaarde te fungeren. De verdunningsstappen werden dus 11 maal uitgevoerd wat leidde tot een totale verdunning van  $2^{11} = 2048$  maal.

In een tweede stap werd 10 µL van de verdunning microtiterplaat overgebracht naar de gist microtiterplaat. Hierbij werd 240 µL van een gistcultuur met optische densiteit (OD) gelegen tussen 0,2 en 0,25 bij 610 nm (Dr. Lange IsiS 9000, Düsseldorf) toegevoegd. Deze gistplaat werd geïncubeerd gedurende 24 h bij 30 °C. Een schematische voorstelling van het verloop van de estrogene test wordt getoond in Fig. 4.



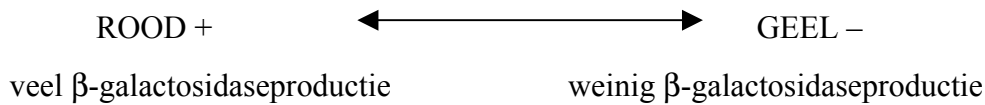
**Figuur 5.** Schematische voorstelling van het verloop van de estrogene test

### 3.1.4 Aflezing van de platen (dag 3 en volgende)

Na 24 h incubatie bij 30 °C werd 75  $\mu$ L van de gistplaat naar een nieuwe microtiterplaat overgebracht. Hierbij werd 25  $\mu$ l van de MM/CH/CPRG oplossing gevoegd waarna de absorbantie bij 540 nm en de optische densiteit bij 630 nm gemeten werd met behulp van een BioKinetics EL312e multi-well reader (Bio-tek Instruments Europe, Spijkenisse, Nederland). De platen werden na afsluiten met parafilm in de incubator gezet bij 37 °C. De verkleuring van de vloeistof in de platen werd opgevolgd en op welbepaalde tijdstippen werd de absorbantie gemeten bij 540 nm en 630 nm. De intensiteit bij 540 nm geeft een indicatie voor de activiteit van  $\beta$ -galactosidase, terwijl de intensiteit bij 630 nm toelaat een correctie te maken voor de hoeveelheid gistcellen aanwezig in de suspensie.

Om verschillende proeven en testcomponenten met elkaar te kunnen vergelijken, moet de incubatietijd dezelfde zijn. De werking van de MM/CH/CPRG oplossing kan als volgt verklaard worden:

- cycloheximide  $\Rightarrow$  stopt de  $\beta$ -galactosidaseproductie
- $\beta$ -galactosidase  $\Rightarrow$  omzetting van CPRG (geel) naar CPR (rood)



### 3.2 De aryl test

De aryl hydrocarbon test werd door Miller (1999) ontwikkeld en is nauw verwant met de estrogene test. In deze assay wordt gebruik gemaakt van een genetisch gemodificeerde *Saccharomyces cerevisiae* stam waarin de humane aryl hydrocarbon receptor (AhR) is geïntegreerd. Deze giststam bezit expressieplasmiden en genen die geactiveerd worden na binding van bepaalde componenten op de AhR. De plasmiden bevatten het *lacZ* reporter gen, dat codeert voor het  $\beta$ -galactosidase enzym. Naargelang de bindingsgraad van xenobiotische componenten op de AhR, zal het *lacZ* gen tot expressie gebracht worden met productie van  $\beta$ -galactosidase tot gevolg. Deze  $\beta$ -galactosidase activiteit wordt gekwantificeerd door de omzetting van een chromogeen substraat chlorophenolrood- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG). De omzetting veroorzaakt een kleurverandering van geel (CPRG) naar rood (CPR) waarvan de intensiteit kan gemeten worden bij een golflengte van 540 nm (D'Haese, 1999).

De testen worden uitgevoerd in microtiter platen waardoor een verdunningsreeks kan worden gemaakt voor verschillende stalen per plaat. De respons in de bioassays wordt uitgedrukt als het quotiënt van de absorbantie bij 540 nm ( $\beta$ -galactosidase activiteit) en de absorbantie bij 630 nm (optische densiteit van de gistcultuur). Deze waarden leiden tot een dosis-respons curve waaruit de maximale respons, de helling en de  $EC_{50}$  kan worden afgeleid.

#### 3.2.1 Stockoplossingen en mediumbereiding

Het medium van de aryltest werd onder steriele omstandigheden aangemaakt worden en bestaat uit een minimaal medium, 2 additieven en 1 kleurstof. De samenstelling van het minimaal medium wordt weergegeven in Tabel 8.

Schott-flesjes met 45 mL minimaal medium werden geautoclaveerd bij 121 °C gedurende 20 minuten. Na afkoeling werd het geautoclaveerde medium bewaard bij kamertemperatuur voor onbepaalde tijd.

Ter voorbereiding van het opkweken van de gist, werden afzonderlijke oplossingen aangemaakt van glucose (20 g/100 mL MilliQ water) en galactose (20 g/100 mL MilliQ water)

Voor het testen van de  $\beta$ -galactosidaseproductie werden oplossingen aangemaakt van CPRG (100 mg/10 mL MilliQ water) en cycloheximide (200 mg/10 mL Ethanol). Tenslotte werd minimaal medium, de cycloheximide-oplossing en de CPRG-oplossing samengevoegd in een verhouding van 4/1/0,2.

**Tabel 8.** Samenstelling van het minimaal medium voor de aryltest

Component	Concentratie (g/100 mL MilliQ water)
Stock 1: Yeast nitrogen base	1,7
ammoniumsulfaat	5
Histidine	0,1
Leucine	0,1
Adenine	0,1g/100mL 0,01 mol NaOH
Uracil	0,1g/100mL 0,01 mol NaOH
Stock 2: kaliumfosfaat	13,6
kaliumhydroxide	4,2

### 3.2.2 Opkweek van de gist in glucosemedium (dag 1)

In recipiënten met 45 mL minimaal medium werd 5 mL glucoseoplossing toegevoegd. Vervolgens werd 250  $\mu$ l van de geconcentreerde giststock (-80°C) bij het groeimedium gebracht en gedurende 48 h bij 28 °C op een schudder geïncubeerd.

### 3.2.3 Overbrengen van de gist in galactosemedium (dag 3)

In recipiënten met 45 mL minimaal medium werd 5 mL galactoseoplossing toegevoegd. Vervolgens werd 250  $\mu$ l van de in het glucosemedium gegroeide gist toegevoegd en gedurende 24 h bij 28 °C op een schudder geïncubeerd.

### 3.2.4 Inzetten van de test (dag 4)

In een 96 well microtiterplaat werden viervoudige verdunningsreeksen van de testcomponenten aangemaakt. Per microtiterplaat werden 2 componenten getest zodat er

telkens 4 herhalingen waren binnen dezelfde bioassay test. De verdunningsreeks werd bekomen door het achtereenvolgens overbrengen van 100  $\mu\text{L}$  van de testcomponent van een vorige kolom naar 100  $\mu\text{L}$  DMSO van een volgende kolom. De laatste kolom van de verdunning microtiterplaat werd enkel gevuld met 100  $\mu\text{L}$  DMSO om als blancowaarde te fungeren. De verdunningsstappen werden dus 11 maal uitgevoerd wat leidde tot een totale verdunning van  $2^{11} = 2048$  maal.

In een tweede stap werd 10  $\mu\text{L}$  van de verdunning microtiterplaat overgebracht naar de gist microtiterplaat. Hierbij werd 240  $\mu\text{L}$  van een gistcultuur met optische densiteit (OD) gelegen tussen 0,2 en 0,25 bij 610 nm (Dr. Lange IsiS 9000, Duitsland) toegevoegd. Deze gistplaat werd geïncubeerd gedurende 24 h bij 30 °C.

### 3.2.5 Aflezing van de platen (dag 4)

Na 24 h incubatie bij 30 °C werd 75  $\mu\text{L}$  van de gistplaat naar een nieuwe microtiterplaat overgebracht. Hierbij werd 25  $\mu\text{L}$  van de MM/CH/CPRG oplossing gevoegd waarna de absorbantie bij 540 nm en de optische densiteit bij 630 nm gemeten werd met behulp van een BioKinetic Reader (Bio-tek instruments EL 312 e, België). De platen werden na afsluiten met parafilm in de incubator gezet bij 37 °C. De verkleuring van de vloeistof in de platen werd opgevolgd en op welbepaalde tijdstippen werd de absorbantie gemeten bij 540 nm en 630 nm. De intensiteit bij 540 nm geeft een indicatie voor de activiteit van  $\beta$ -galactosidase, terwijl de intensiteit bij 630 nm toelaat een correctie te maken voor de hoeveelheid gistcellen aanwezig in de suspensie.

## 3.3 SOS chromotest

De uitvoering van deze genotoxiciteitstest is gebaseerd op een methode ontwikkeld door Quillardet et al. (1982). In *Escherichia coli* PQ37 is het *LacZ* gen onder de controle van het *sfiA* gen operon geplaatst. Dit reporter-gen behoort tot het SOS-repair systeem (*sfiA::lacZ* fusie). Bij DNA beschadiging is er activatie van het SOS-repair systeem, expressie van het *sfiA* gen en hieraan gekoppeld expressie van het *LacZ* gen. Het genproduct van *LacZ*,  $\beta$ -galactosidase, kan gemeten worden met een enzymtest bij 405 nm. De omzetting van o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactospyranoside door  $\beta$ -galactosidase wordt stopgezet door toevoeging van 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  oplossing. Om bacteriotoxische effecten te bepalen wordt de alkaline

fosfatase activiteit gemeten bij 405 nm. De omzetting van p-nitrophenyl fosfaat oplossing door alkaline fosfatase wordt stopgezet door toevoeging van 1,5 N NaOH oplossing.

De testen worden uitgevoerd in microtiter platen waardoor een verdunningsreeks kan worden gemaakt voor verschillende stalen per plaat. De inductiefactor in de bioassay wordt uitgedrukt als het quotiënt  $R(x)/R(0)$  met  $R(x) = \beta\text{-g/ap}$  bepaald voor de testcomponent en  $R(0) = \beta\text{-g/ap}$  bepaald voor DMSO. De inductiefactoren leiden tot een dosis-respons rechte waaruit de maximale respons, de helling en de  $EC_{50}$  kan worden afgeleid.

### 3.3.1 Mediumbereidingen en bufferoplossingen

LA medium: 10 g Bacto trypton, 5 g Bacto gistextract, 5 g NaCl, 20 mg ampicilline per liter gedistilleerd water.

L medium: LA medium zonder ampicilline

$\beta$ -g buffer: 16,1 g dinatriumwaterstoffosfaat; 5,5 g natriumdiwaterstoffosfaat; 0,75 g KCl; 0,25 g magnesiumsulfaat heptahydraat; 2,7 mL  $\beta$ -mercaptoethanol en 1 g natriumdodecylsulfaat per liter gedistilleerd water, op pH 7,0 gebracht met HCl.

Ap buffer: 121 g tris (hydroxymethyl)aminomethaan en 1 g natriumdodecylsulfaat per liter gedistilleerd water, op pH 8,8 gebracht met HCl.

P buffer: 61 mL dinatriumwaterstoffosfaat heptahydraat 0,1 M oplossing, 39 mL natriumdiwaterstoffosfaat monohydraat, op pH 7,0 gebracht.

$\beta$ -galactosidasesubstraat: ONPG oplossing (0,4 %): 400 mg o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) per 100 mL P buffer.

Alkaline fosfatase substraat: PNPP oplossing (0,4 %): 400 mg p-nitrofenylfosfaat (PNPP) per 100 mL ap buffer.

Deze oplossingen werden geautoclaveerd bij 121 °C gedurende 20 minuten. Na afkoeling werd het geautoclaveerde medium bewaard bij kamertemperatuur voor onbepaalde tijd.

### 3.3.2 Opkweek van de *Escherichia coli* PQ37 stam

In 10 mL LA medium werd 100  $\mu$ L van de bevroren (- 80 °C) *E. coli* PQ37 cultuur toegevoegd en overnacht geïncubeerd bij 37 °C op een schudder. Van deze cultuur werd 100

$\mu\text{L}$  bij 5 mL vers LA medium gebracht en geïncubeerd totdat een fotometrische transmissie van 45 % bij 695 nm bereikt werd.

### 3.3.3 Inzetten van de test

In een 96 well microtiterplaat werden viervoudige verdunningsreeksen van de testcomponenten aangemaakt. Per microtiterplaat werden 2 componenten getest zodat er telkens 4 herhalingen waren binnen dezelfde bioassay test. De verdunningsreeks werd bekomen door het achtereenvolgens overbrengen van 100  $\mu\text{L}$  van de testcomponent van een vorige kolom naar 100  $\mu\text{L}$  DMSO van een volgende kolom. De laatste kolom van de verdunning microtiterplaat werd enkel gevuld met 100  $\mu\text{L}$  DMSO om als blancowaarde te fungeren. De verdunningsstappen werden dus 11 maal uitgevoerd wat leidde tot een totale verdunning van  $2^{11} = 2048$  maal.

In een tweede stap werd 5  $\mu\text{L}$  van de verdunning microtiterplaat overgebracht naar de *E. coli* microtiterplaat. Hierbij werd 150  $\mu\text{L}$  van een verdunde bacteriecultuur (1,6 mL *E. coli* in 14,4 mL L medium) toegevoegd. Deze bacterieplaat werd geïncubeerd gedurende 2 uur bij 37 °C op een schudder.

### 3.3.4 Aflezing van de $\beta$ -g platen

Na 2 h incubatie bij 37 °C werd 15  $\mu\text{L}$  van de bacterieplaat naar een nieuwe microtiterplaat overgebracht. Hierbij werd 110  $\mu\text{L}$  van de  $\beta$ -g buffer en 25  $\mu\text{L}$  van het  $\beta$ -galactosidasesubstraat toegevoegd. Na 25 minuten in een 37 °C incubator werd 100  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  toegevoegd en werd de absorbantie gemeten bij 405 nm.

### 3.3.5 Aflezing van de ap platen

Analoog als bij de  $\beta$ -g platen werd na 2 h incubatie bij 37 °C 15  $\mu\text{L}$  van de bacterieplaat naar een nieuwe microtiterplaat overgebracht. Hierbij werd 110  $\mu\text{L}$  van de ap buffer en 25  $\mu\text{L}$  van het alkaline fosfatase substraat toegevoegd. Na 25 minuten in een 37 °C incubator werd 100  $\mu\text{L}$  1,5 N NaOH toegevoegd en werd de absorbantie gemeten bij 405 nm.

### 3.4 Concentraties van de testcomponenten

Tabel 9 geeft de concentraties weer van testcomponenten die in de verschillende bioassays gebruikt werden.

**Tabel 9.** Concentraties van de testcomponenten gebruikt in de verschillende bioassays (mg/L)

<b>Component</b>	<b>Concentratie (mg/L)</b>
<b>PAK's</b>	
Benzo(a)pyreen	504,6
Naftaleen	256,4
Pyreen	404,6
Fenantreen	356,4
Fluoranteen	404,6
Fluoreen	332,4
Antraceen	376,6
Acenaftyleen	304,4
Mix	564
<b>OH-PAK's</b>	
1-OH naftaleen	28800
1-OH pyreen	436
9-OH fenantreen	3880
9-OH fluoreen	36400
<b>SHIME +</b>	
Benzo(a)pyreen	5,046
Naftaleen	2,564
Pyreen	4,046
Fenantreen	3,564
Fluoranteen	4,046
Fluoreen	3,324
Antraceen	3,766
Acenaftyleen	3,044
Mix	5,64
<b>Gecontamineerde bodem</b>	
Maagdigestie	62,7
Duodenumdigestie	71,7
Colondigestie	51,6
<b>17<math>\alpha</math>-ethynylestradiol (EE2)</b>	54400
<b>4-nitroquinoline-N-oxide (NQO)</b>	951



## HOOFDSTUK 3: RESULTATEN

### 1 Resultaten van de GC-MS analyse

#### 1.1 Digesties van PAK-gecontamineerde bodem

De PAK-gecontamineerde bodem werd aan een maag-, duodenum- en colondigestie onderworpen bij initiële L/S = 100. De concentratie PAK's in deze stalen werd vervolgens via GC-MS analyse bepaald. Deze analyse detecteert en kwantificeert de PAK's aanwezig in de stalen. Hierbij dient opgemerkt te worden dat geen detectie van OH-PAK's mogelijk is. In Tabel 10 worden de resultaten van de GC-MS analyse weergegeven.

**Tabel 10.** Resultaten van de GC-MS analyse op de bodemdigesties bij initiële L/S = 100 ( $\mu\text{g/L}$ )

	<b>Maag</b>	<b>Duodenum</b>	<b>Colon</b>
Som PAK's ( $\mu\text{g/L}$ )	14	16	1,2

Vermits in de bioassays gewerkt werd met de opgezuiverde extracten van de bodemdigesties, werd tevens een GC-MS analyse uitgevoerd op de extracten van de duodenum- en colondigestie bij initiële L/S = 10 en L/S = 100. De resultaten van deze analyse worden voorgesteld in Tabel 11.

**Tabel 11.** Resultaten van GC-MS analyse op de extracten van de bodemdigesties ( $\mu\text{g/L}$ )

	<b>Duodenum L/S = 15</b>	<b>Duodenum L/S = 150</b>	<b>Colon L/S=25</b>	<b>Colon L/S=250</b>
Som PAK's ( $\mu\text{g/L}$ )	98,4	45	84,8	18,4

Voor een meer realistische benadering van de vloeistof-vast verhouding na bodemingestie door kinderen, werd verder gewerkt met een initiële L/S van 40 bij de bodemdigesties. Het totaal aantal PAK's (100x opgeconcentreerd) aanwezig in de maag, de duodenum en de colon bij initiële L/S = 40 wordt weergegeven in Tabel 12.

**Tabel 12.** Totaal aantal PAK's aanwezig in het opgeconcentreerde extract (100x) van de maag-, duodenum- en colondigestie bij initiële L/S = 40 (mg/L)

	<b>Maag L/S = 40</b>	<b>Duodenum L/S = 60</b>	<b>Colon L/S = 100</b>
Som PAK's (mg/L)	62,7	71,7	51,6

## 1.2 Transformatie van PAK's door darmmicrobiota

In 4 verschillende SHIME stalen werd de concentratie aan PAK's bepaald nadat een gekende hoeveelheid van een mengsel PAK's werd toegediend. Het eerste SHIME staal werd gekookt waardoor de aanwezige darmmicrobiota en enzymen werden vernietigd. Dit staal bevatte enkel nog particulier en opgelost organisch materiaal (OM). Een tweede SHIME staal werd na het koken gedurende 5 min gecentrifugeerd aan 3000 g. Hierdoor werden niet enkel de bacteriën maar tevens het particulier OM geëlimineerd. Dit staal bevatte dus vooral nog opgelost OM. Het derde, niet gekookte SHIME staal werd gedurende 5 min aan 3000 g gecentrifugeerd. Bacteriën en particulier OM werden neergeslagen, enzymen en opgelost OM bleven aanwezig. Het vierde SHIME staal werd niet behandeld. In dit staal waren zowel particulier OM, opgelost OM, bacteriën als enzymen aanwezig. Na toedienen van 500 µl mix (564 mg/L) aan 50 ml van elk staal werd overnacht geïncubeerd bij 37 °C. Tenslotte werden de 4 verschillende stalen met elk een concentratie van 5,64 mg mix PAK's/L gecentrifugeerd (5 min, 3000 g) en werd een GC-MS analyse uitgevoerd. In Tabel 13 worden de resultaten van de GC-MS analyse op de SHIME stalen weergegeven.

**Tabel 13.** Resultaten van de GC-MS analyse op de SHIME stalen (µg/L)

	<b>Gekookte SHIME suspensie (µg/L)</b>	<b>Gekookte SHIME suspensie + centrifugatie (µg/L)</b>	<b>SHIME suspensie (µg/L)</b>	<b>SHIME suspensie + centrifugatie (µg/L)</b>
	<b>Particulair OM</b>	<b>Opgelost OM</b>	<b>Microbiota + enzymen</b>	<b>Enzymen</b>
Naftaleen	170	95	73	400
Benzo(a)pyreen	200	240	130	265
Fenantreen	275	240	150	770
Fluoranteen	260	260	140	600

De finale centrifugatie van de 4 verschillende SHIME stalen zorgde ervoor dat ruwweg 90 % van het particulier OM werd afgecentrifugeerd. Hierdoor verdween ook het voornaamste deel van de mix van PAK's. Deze componenten zijn immers sterk met het particulier OM verweven en slaan er samen mee neer. De concentratie van de verschillende PAK's bedroeg na de tweede centrifugatie ongeveer 1/10 van wat er oorspronkelijk aan mix in de stalen werd gebracht. Deze concentraties stemmen overeen met de concentraties die voor het SHIME staal met enkel enzymen werden teruggevonden. Dit betekent dat enzymen niet in staat zijn om PAK's te biotransformeren. De concentraties die voor het enzym bevattende SHIME staal werden teruggevonden, kunnen dus als beginconcentraties voor de verdere berekeningen gebruikt worden.

Uitgaande van de gekende beginconcentratie van naftaleen, benzo(a)pyreen, fenantreen en fluoranteen, kunnen de correcties voor particulier OM en opgelost OM alsook de omzetting van PAK's door darmmicrobiota bepaald worden. De berekening gebeurt als volgt:

- **Concentratie PAK's in opgelost OM**  
(beginconcentratie) – (concentratie opgelost OM)
- **Concentratie PAK's in particulier OM**  
(concentratie particulier OM) – (concentratie opgelost OM)
- **Transformatie van PAK's tot OH-PAK's door darmmicrobiota**  
(concentratie particulier OM) – (concentratie microbiota + enzymen)

De resultaten van de berekeningen voor de verschillende PAK's zijn weergegeven in Tabel 14. Deze resultaten vertonen een variabiliteit van 5 %.

**Tabel 14.** Correcties voor particulier en opgelost OM en biotransformatie van PAK's door microbiota ( $\mu\text{g/L}$  en %)

	Concentratie ( $\mu\text{g/L}$ )	Procent (%)
<b>Naftaleen</b>		
Beginconcentratie	400	5,1
Concentratie in opgelost OM	305	3,9
Concentratie in particulier OM	75	1
Omzetting door darmmicrobiota	97	<b>1,2</b>
Omzetting door enzymen	0	0
<b>Benzo(a)pyreen</b>		
Beginconcentratie	265	6,7
Concentratie in opgelost OM	25	0,6
Concentratie in particulier OM	-	-
Omzetting door darmmicrobiota	70	<b>1,8</b>
Omzetting door enzymen	0	0

---

<b>Fenantreen</b>		
Beginconcentratie	770	13,7
Concentratie in opgelost OM	530	9,4
Concentratie in particulier OM	35	0,6
Omzetting door darmmicrobiota	125	<b>2,2</b>
Omzetting door enzymen	0	0
<b>Fluoranteen</b>		
Beginconcentratie	600	10
Concentratie in opgelost OM	340	5,6
Concentratie in particulier OM	0	0
Omzetting door darmmicrobiota	120	<b>2</b>
Omzetting door enzymen	0	0

---

(-) niet gedetecteerd

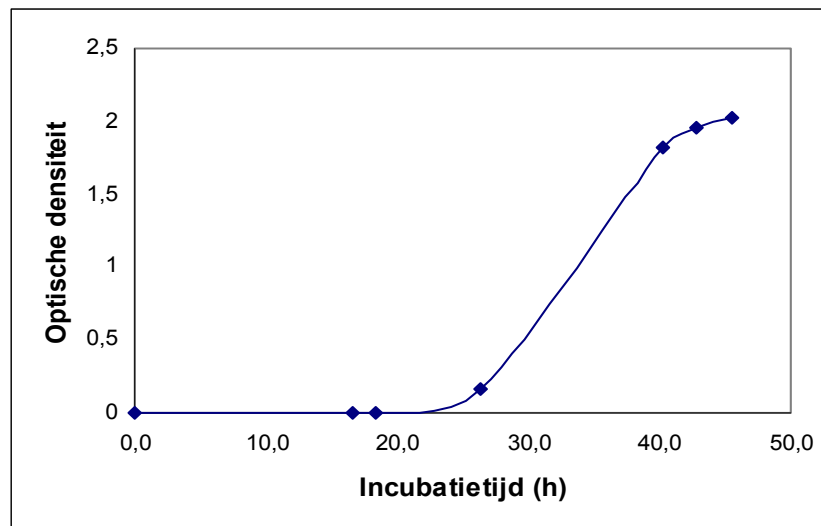
## 2 Opvolging van de groei van de testorganismen

Voorafgaand aan de eigenlijke bioassays werden groeicurven van de testorganismen opgesteld. Deze informatie maakte het mogelijk om, waar nodig, de test eventueel bij te sturen.

### 2.1 Groei van *Saccharomyces cerevisiae* in de estrogene test

**Tabel 15.** Toename van de OD (610 nm) van *Saccharomyces cerevisiae* in functie van de incubatietijd in de estrogene test

Incubatietijd	OD
0	0
16:40	0,005
18:25	0,005
26:25	0,168
40:15	1,821
42:45	1,951
45:30	2,027



**Figuur 6.** Toename van de OD (610 nm) in functie van de incubatietijd bij *Saccharomyces cerevisiae* in de estrogene test

In Fig. 6 kunnen de verschillende groeifasen van het testorganisme duidelijk onderscheiden worden. Na incubatie van *Saccharomyces cerevisiae* in het geschikte medium start de lag

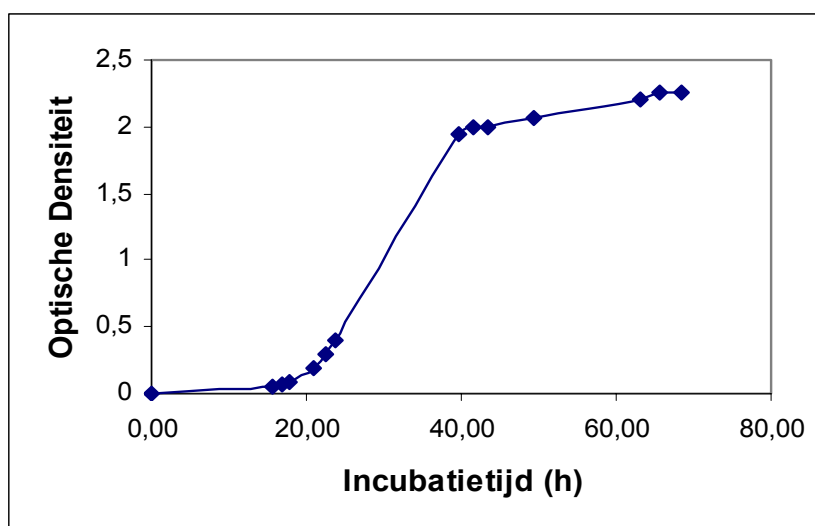
fase. Na 24 h celgroei begint de curve te stijgen wat de log fase inleidt. Voortdurende celdelingen leiden tot een exponentiële groei gedurende 16 h. Tijdens deze fase zijn de gisten het meest actief. De OD bij 610 nm stijgt in 16 h tijd van 0,168 tot 1,821. De log fase gaat na 40 h incubatie over naar de stationaire fase. Het buigpunt in de curve toont de overgang naar deze fase.

## 2.2 Groei van *Saccharomyces cerevisiae* in de aryltest

### In glucosemedium

**Tabel 16.** Toename van OD (610 nm) in functie van de incubatietijd van *Saccharomyces cerevisiae* in de aryltest (glucosemedium)

Incubatietijd	OD
0	0
15:40	0,056
16:45	0,074
17:55	0,085
20:55	0,195
22:25	0,298
23:45	0,407
39:35	1,941
41:25	1,991
43:20	1,998
49:22	2,063
63:15	2,201
65:45	2,258
68:30	2,261



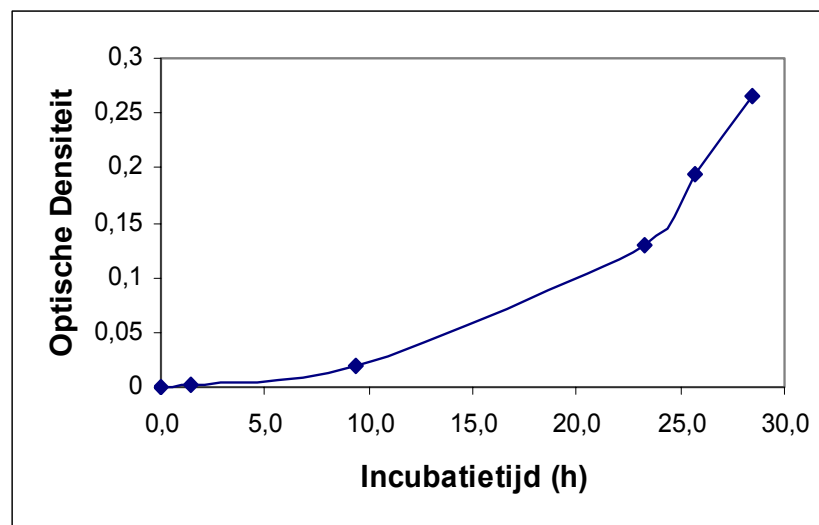
**Figuur 7.** Toename van de OD (610 nm) in functie van de incubatietijd bij *Saccharomyces cerevisiae* in de aryltest (glucosemedium)

Figuur 7 toont aan dat, na incubatie van *Saccharomyces cerevisiae* in glucosemedium, een 20 h durende lag fase start. Hierop volgt de log fase, gekenmerkt door exponentiële groei. De curve vertoont een stijging vanaf een OD (610 nm) van 0,195 tot een OD van 1,94. Het buigpunt in de curve leidt de stationaire fase in.

### In galactosemedium

**Tabel 17.** Toename van OD (610 nm) in functie van de incubatietijd van *Saccharomyces cerevisiae* in de aryltest (galactosemedium)

Incubatietijd	OD
0	0
1:25	0,003
9:25	0,02
23:15	0,13
25:45	0,195
28:30	0,266



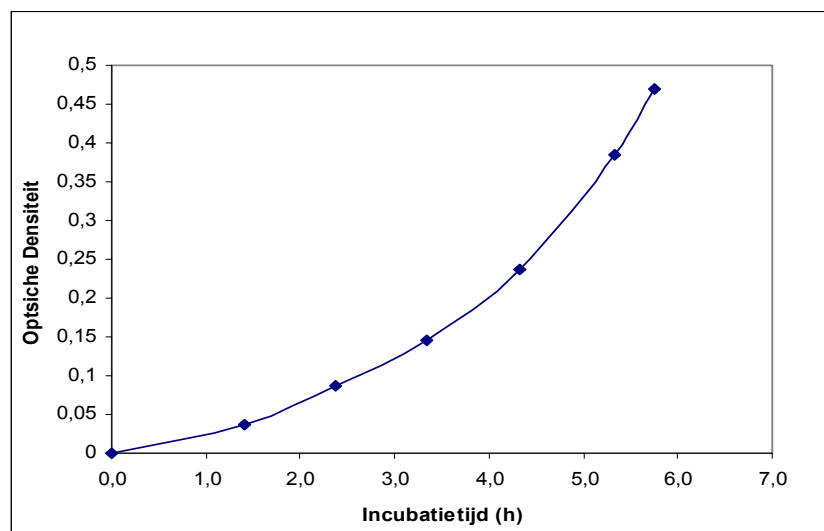
**Figuur 8.** Toename van de OD (610 nm) in functie van de incubatietijd bij *Saccharomyces cerevisiae* in de aryltest (galactosemedium)

In galactosemedium gaat na 23 h incubatie de lag fase over in de log fase. In Fig. 8 begint de curve vanaf een OD van 0,13 bij 610 nm lineair te stijgen.

### 2.3 Groei van *Escherichia coli* in de SOS chromotest

**Tabel 18.** Toename van OD (695 nm) in functie van de incubatietijd van *Escherichia coli* in de SOS chromotest

Incubatietijd	OD
0	0
1:25	0,037
2:22	0,087
3:20	0,145
4:20	0,238
5:20	0,384
5:45	0,469



**Figuur 9.** Toename van de OD (695 nm) in functie van de incubatietijd bij *Escherichia coli* in de SOS chromotest

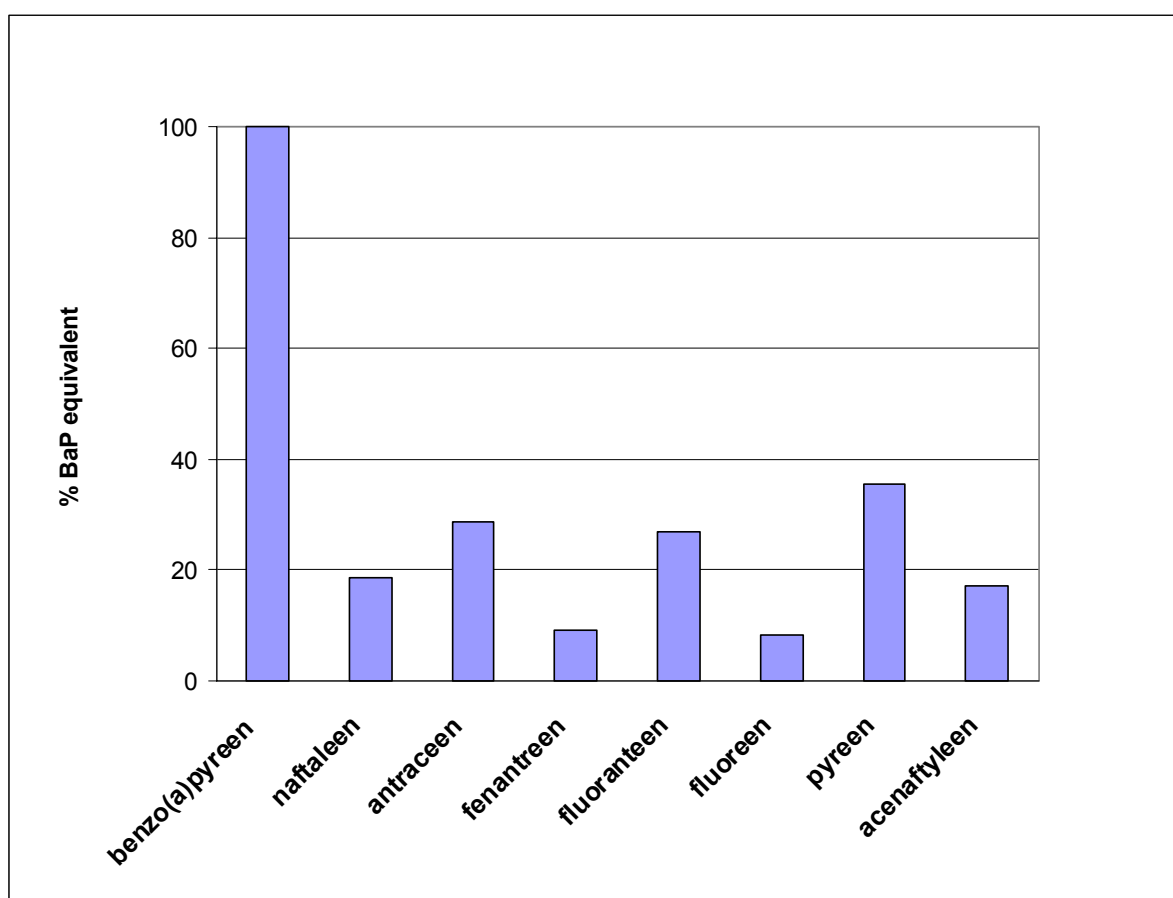
Zoals Fig. 9 toont is de overgang van de lag fase naar de log fase bij *Escherichia coli* moeilijk te onderscheiden. Het organisme vertoont een verdubbelingstijd die schommelt rond 1h30. Een optimale OD (695 nm) van 0,45 wordt bereikt na 5h30 incuberen.



### 3 Aryltest

In de aryltest wordt de bindingsaffiniteit van een PAK voor de humane aryl hydrocarbon receptor (AhR) bepaald. BaP wordt als standaard gebruikt en geldt als referentiestof om vergelijking met de respons van andere stalen mogelijk te maken.

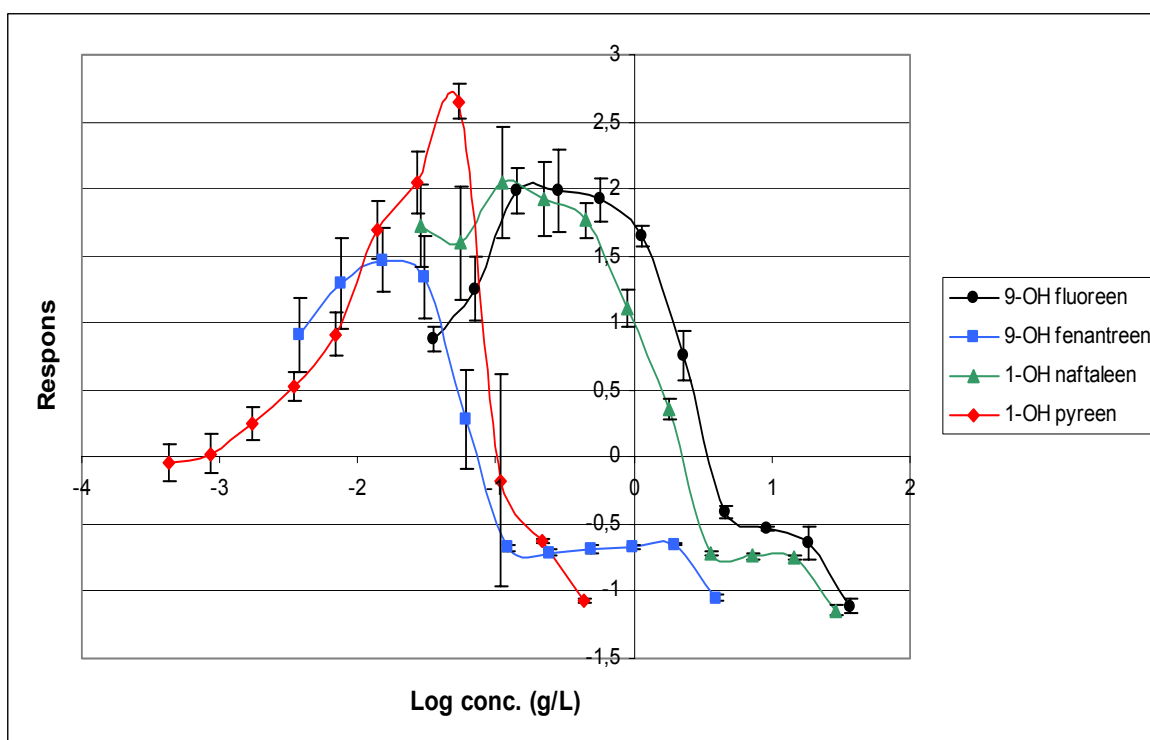
#### 3.1 PAK's



**Figuur 10.** % BaP equivalent voor 0,01 mmol PAK/L

In Fig. 10 wordt de procentuele equivalentie van de 8 verschillende PAK's met BaP voorgesteld. Deze bedraagt 18,5 % voor naftaleen; 28,7 % voor antraceen; 9,3 % voor fenantreen; 27,1 % voor fluoranteen; 8,4 voor fluoreen; 35,6 voor pyreen en 17,2 voor acenaftyleen.

## 3.2 OH-PAK's

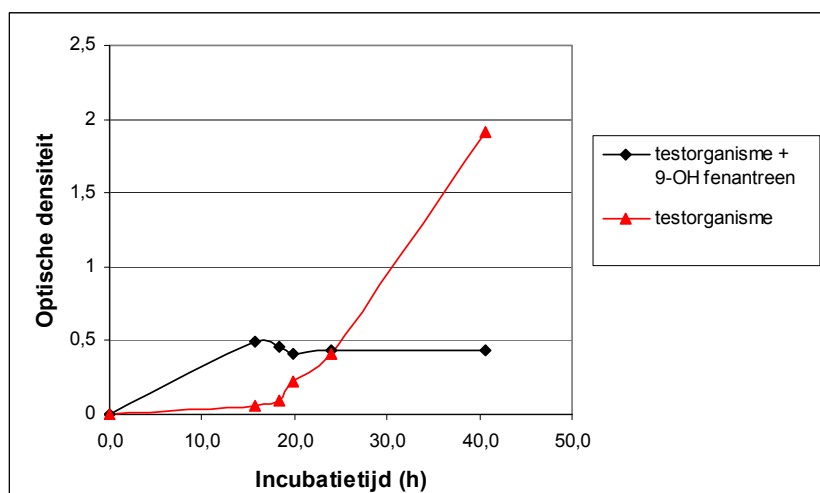


**Figuur 11.** Respons van OH-PAK's in functie van de log concentratie in de aryltest (n=4)

Figuur 11 toont aan dat OH-PAK's een sterk signaal geven in de aryltest. De maximale respons bedraagt 1,46 voor 9-OH fenantreen; 1,99 voor 9-OH fluoreen; 2,05 voor 1-OH naftaleen en 2,65 voor 1-OH pyreen. Bij hoge concentraties vertonen de curven van deze 4 componenten een sterke daling en afvlakking. Dit is te wijten aan de toxiciteit van de OH-PAK's voor het testorganisme *Saccharomyces cerevisiae*. Deze toxische eigenschappen worden aangetoond in Tabel 19.

**Tabel 19:** Toename van OD (610 nm) in functie van de incubatietijd van *Saccharomyces cerevisiae* in de aryltest (glucosemedium)

Incubatietijd	OD arylgist	OD arylgist + 9-OH fenantreen
0	0	0
15:40	0,053	0,492
18:25	0,091	0,452
19:55	0,223	0,41
24:00	0,41	0,437
40:40	1,91	0,43

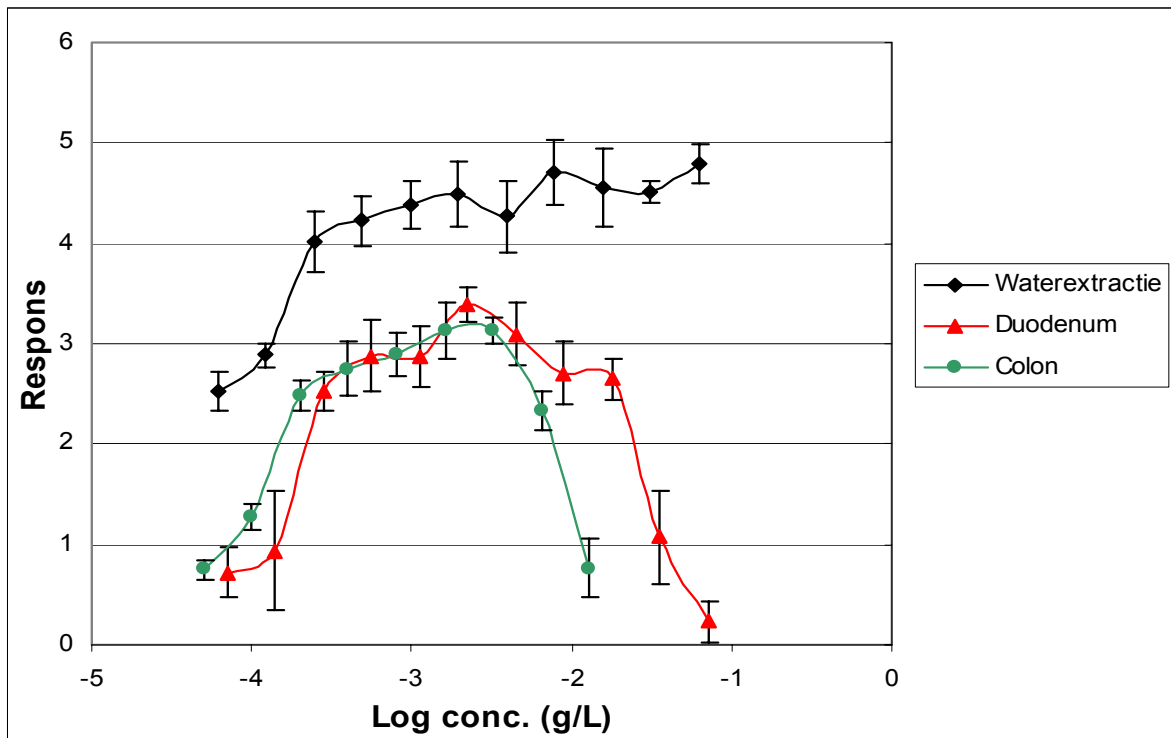


**Figuur 12.** Toename van de OD (610 nm) in functie van de incubatietijd bij *Saccharomyces cerevisiae* in de aryltest

In Fig. 12 wordt de toename van de OD bij 610 nm van *Saccharomyces cerevisiae* voorgesteld in functie van de incubatietijd. In afwezigheid van 9-OH fenantreen volgt na de incubatie een lag fase. Een 20 h later stijgt de curve lineair wat het begin van de log fase betekent. Gedurende deze exponentiële fase is er celtoename door celdeling. Bij toevoeging van 9-OH fenantreen (8,08 mg/L) aan het glucosemedium ontstaat een troebele, oranje vloeistof met een OD van 1,77. Na verloop van tijd vormen zich oranje kristallen waardoor de OD terugvalt tot 0,49. De OD blijft verder dalen vermits de kristallen bezinken. De aanwezigheid van 9-OH fenantreen zorgt er dus voor dat *Saccharomyces cerevisiae* zich niet kan ontwikkelen en is bijgevolg toxisch voor dit testorganisme.

### 3.3 Digesties van PAK-gecontamineerde bodem

Figuur 13 toont de respons die verkregen wordt wanneer gecontamineerde bodemdigesties aan de aryltest worden onderworpen. De maximale respons bedraagt 4,79 voor water; 3,38 voor duodenum en 3,14 voor colon.

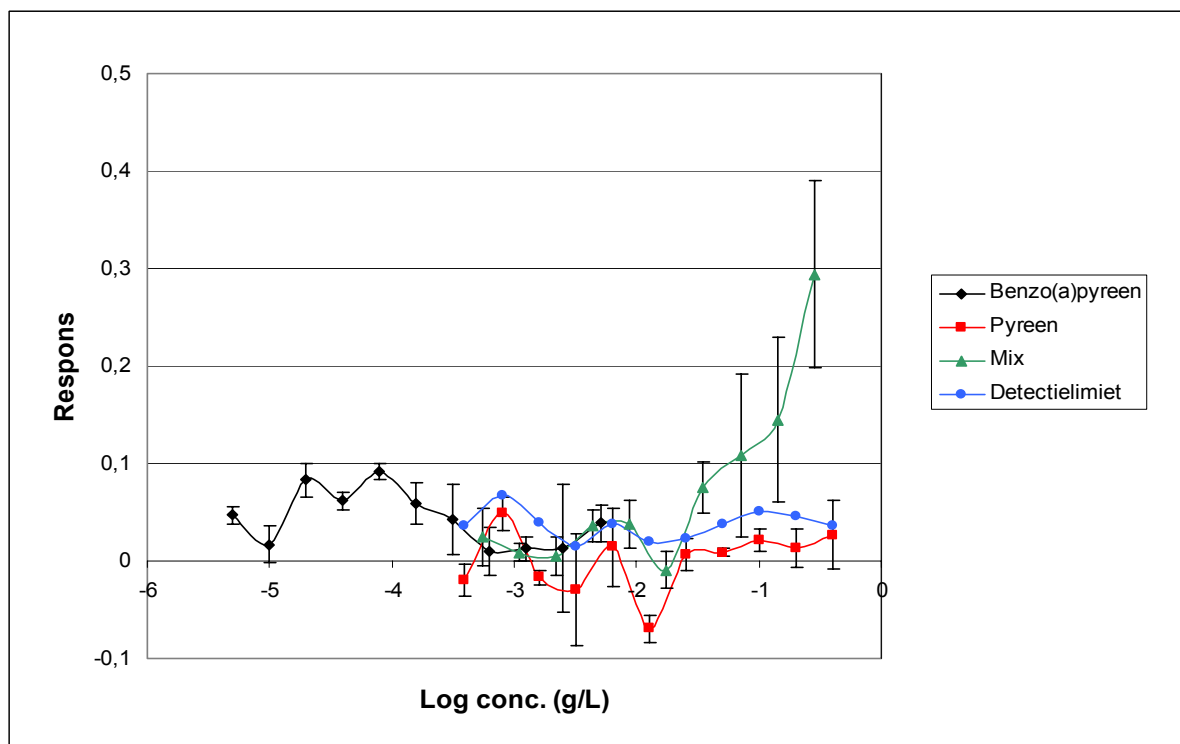


**Figuur 13.** Respons van gecontamineerde bodemdigesties bij toenemende log concentraties (n=4)

## 4 Estrogene test

De estrogene bioassay wordt gebruikt om estrogene of anti-estrogene componenten op te sporen. Als referentiestof wordt het synthetisch analoog van  $17\beta$ -estradiol, EE2, gebruikt.

### 4.1 PAK's

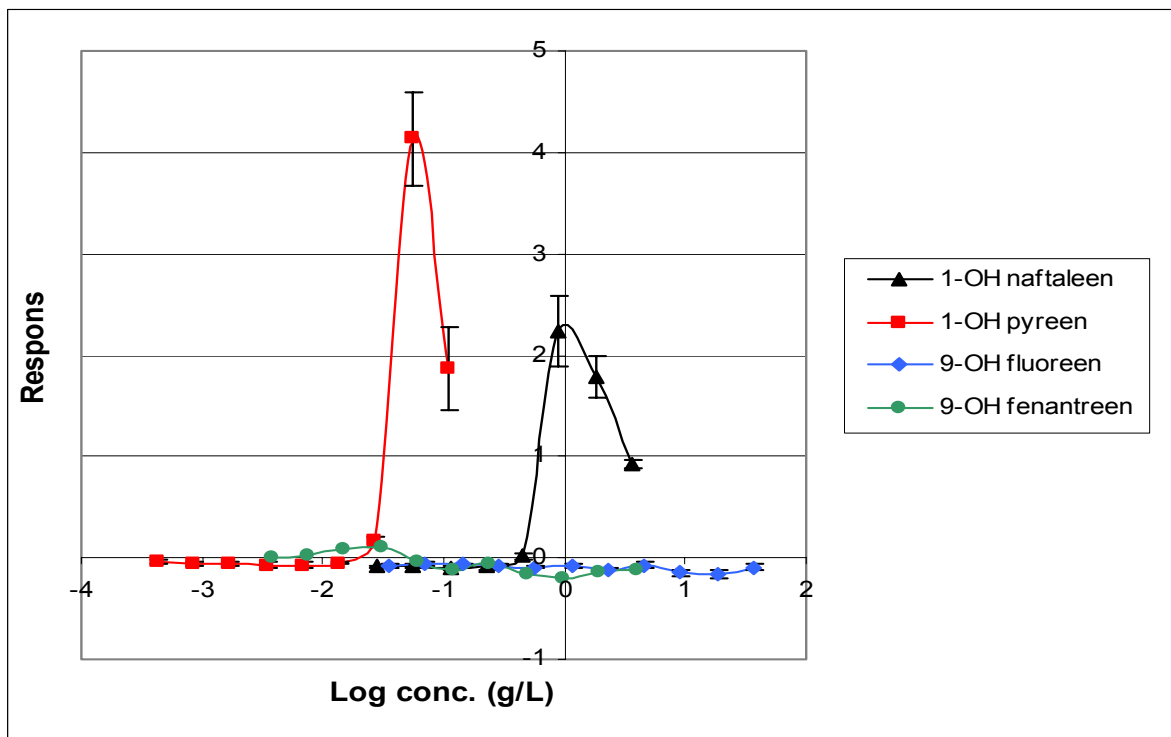


**Figuur 14.** Estrogene respons van PAK's in functie van de log concentratie (n=4)

Uit Fig. 14 blijkt dat PAK's een ruissignaal vertonen in de estrogene test dat schommelt rond de waarde 0. Benzo(a)pyreen (BaP) heeft een maximale respons bij 0,092; pyreen bij 0,049. Bij de mix van PAK's is er bij toenemende concentratie een lichte stijging in de respons tot een maximum van 0,294.

## 4.2 OH-PAK's

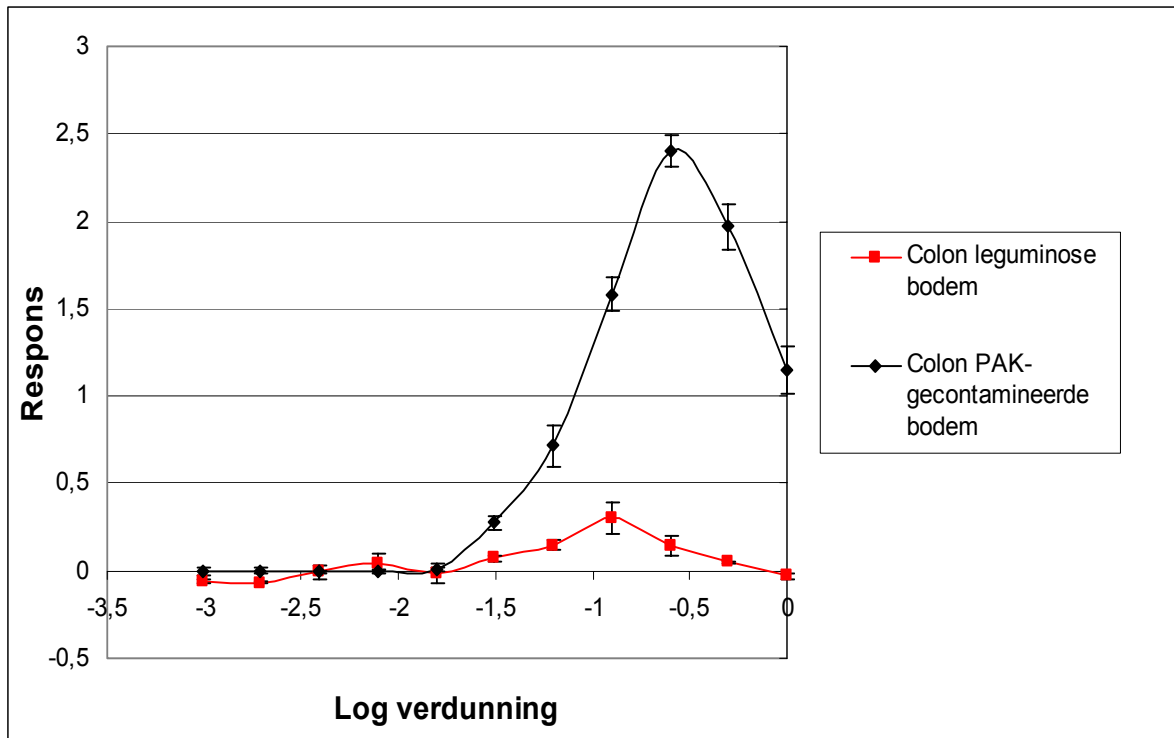
In tegenstelling tot de PAK's vertonen de OH-PAK's een duidelijke respons in de estrogene test. Figuur 15 toont dit aan. Dit geldt echter alleen voor de 1-OH PAK's. De maximale respons stijgt van -0,053 (9-OH fluoreen); 0,098 (9-OH fenantreen); 2,23 (1-OH naftaleen) tot 4,14 (1-OH pyreen).



**Figuur 15.** Estrogene respons van OH-PAK's in functie van de log concentratie (n=4)

## 4.3 Digesties van PAK-gecontamineerde bodem

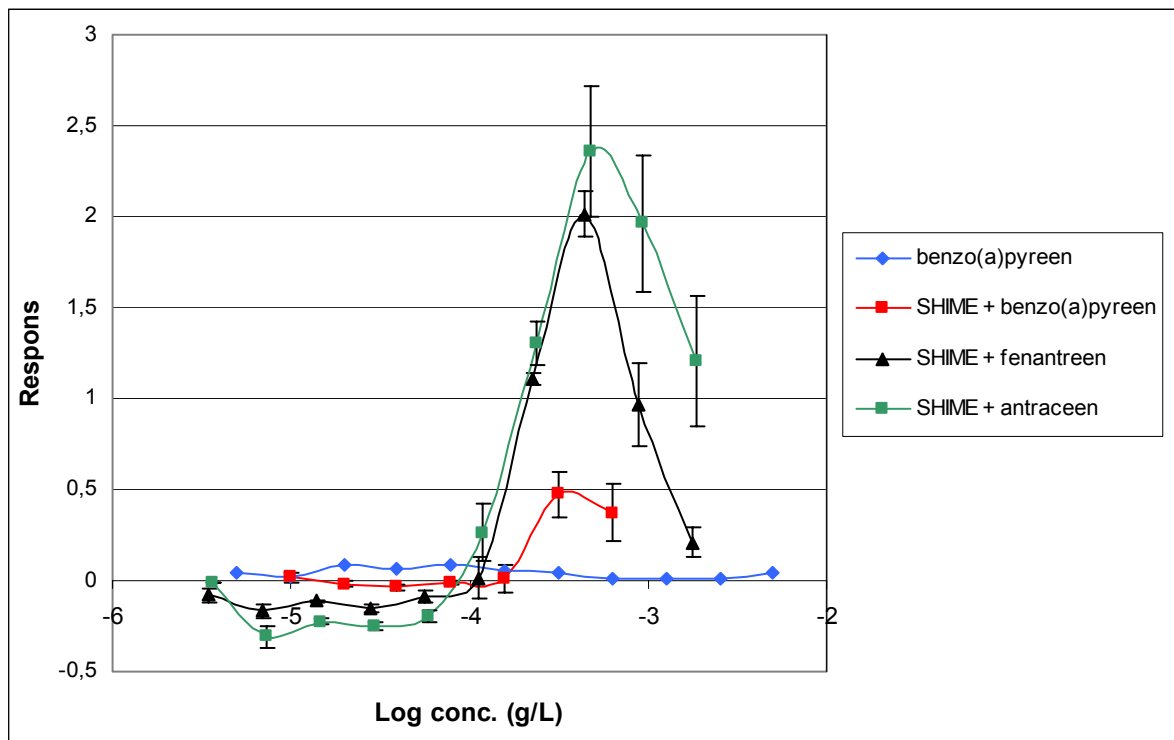
Figuur 16 toont de estrogene respons bij colondigestie van de gecontamineerde bodem en van een leguminose bodem. Deze laatste fungeert als positieve controle voor plantenhormonen. Fytoestrogenen zouden de estrogene test kunnen beïnvloeden door binding op de ER. De positieve controle wijst echter uit dat een hormonenrijke bodem zoals die van de Leguminosae geen significant signaal veroorzaakt in de estrogene test. De maximale respons voor de gecontamineerde bodem bedraagt 2,4; voor de leguminose bodem is dat 0,3.



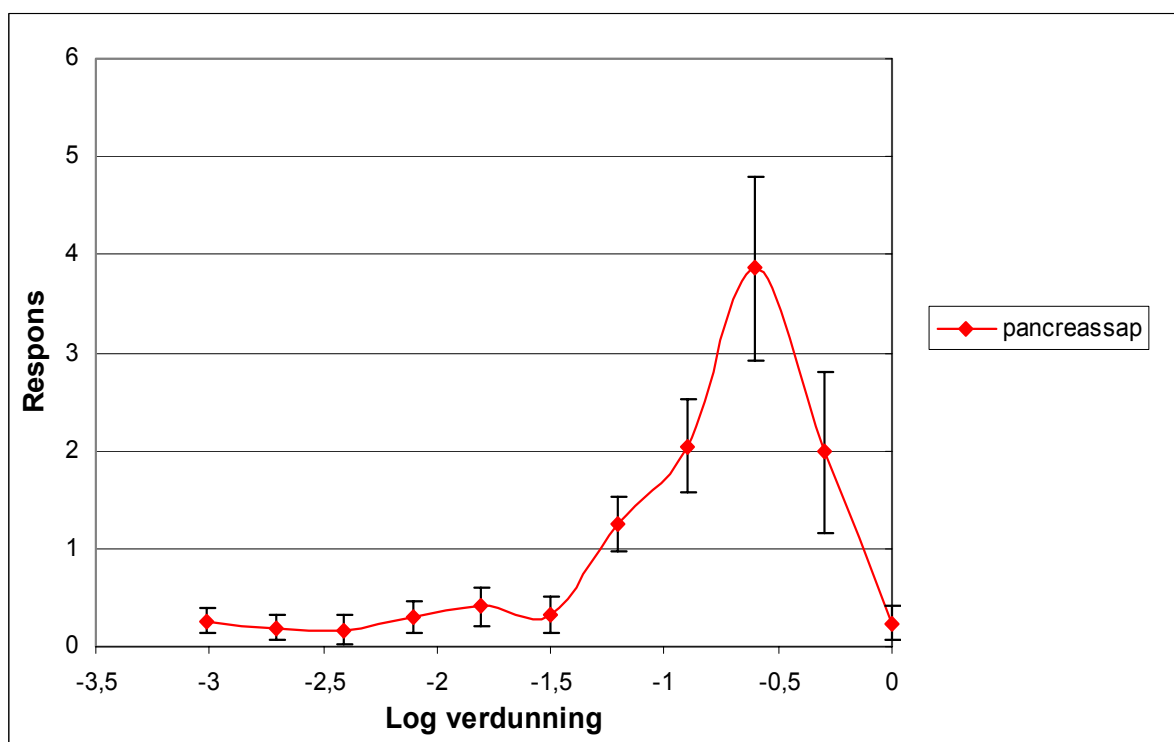
**Figuur 16.** Estrogene respons bij colon van PAK-gecontamineerde bodem en leguminose bodem in functie van de log verdunning (n=4)

#### 4.4 Incubatie van PAK's in SHIME suspensie

PAK's geïncubeerd in SHIME suspensie leveren een respons in de estrogene test. Dit resultaat werd voor de 8 geteste PAK's bekomen maar slechts enkele van de omzettingsproducten worden voorgesteld in Fig. 17. De maximale respons voor respectievelijk SHIME + BaP, SHIME + fenantreen en SHIME + antraceen bedraagt 1,28; 3,06 en 4,05. SHIME suspensie op zich geeft echter reeds een estrogeen signaal. De maximale respons hiervan is 2,08. Na correctie voor de SHIME suspensie werd de maximale respons 0,493 (SHIME + BaP); 2,01 (SHIME + fenantreen) en 2,36 (SHIME + antraceen).



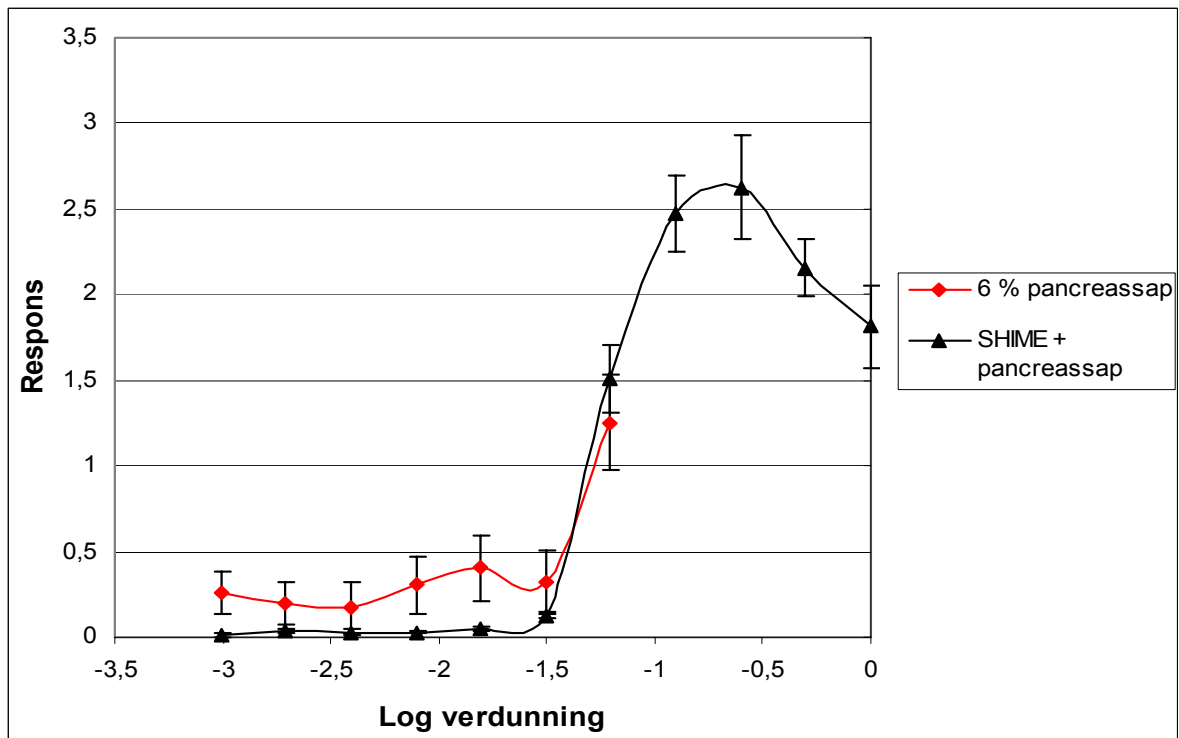
**Figuur 17.** Estrogene respons van PAK's geïncubeerd in SHIME suspensie in functie van de log concentratie (n=4)



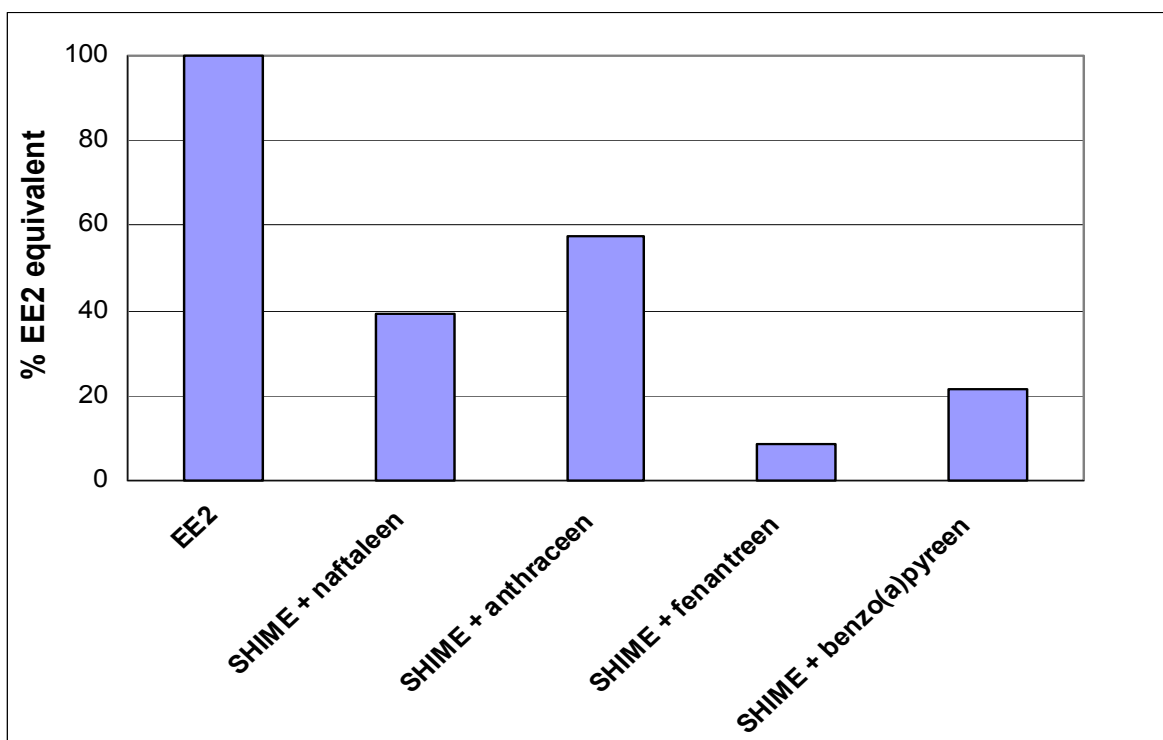
**Figuur 18.** Estrogene respons van pancreassap in functie van de log verdunning (n=4)



In Fig. 18 wordt de estrogene respons voor zuiver pancreassap weergegeven. Een maximaal signaal wordt bekomen bij 3,86 en toont aan dat galzouten in staat zijn om te binden op de ER. Om in vivo situaties te benaderen, is er 6 % pancreassap in de SHIME suspensie aanwezig. In Fig. 19 wordt het aandeel van deze 6 % in de estrogene respons van de SHIME suspensie weergegeven.



**Figuur 19.** Estrogene respons van pancreassap en SHIME + pancreassap in functie van de log verdunning (n=4)



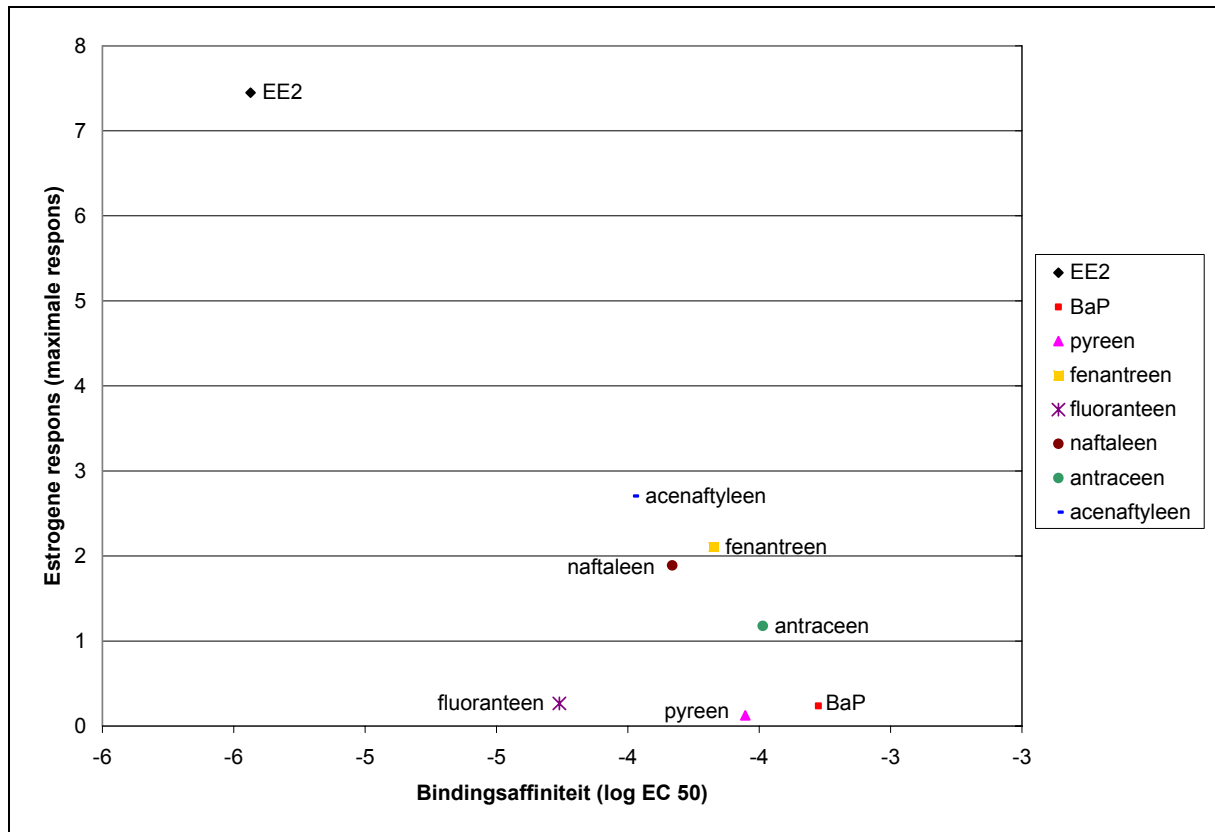
**Figuur 20.** % EE2 equivalent voor 0,01 mmol PAK/L

In Fig. 20 wordt de procentuele equivalentie van de omzettingsproducten met EE2 voorgesteld. Deze bedraagt 39,1 % voor SHIME + naftaleen, 57,7 % voor SHIME + anthraceen, 8,3 % voor SHIME + fenantreen en 21,7 % voor SHIME + BaP.

Tabel 20 bevat de log EC 50 en de maximale respons van EE2 en van de verschillende standaard PAK's

**Tabel 20.** Log EC50 en maximale respons van EE2 en 8 PAK's

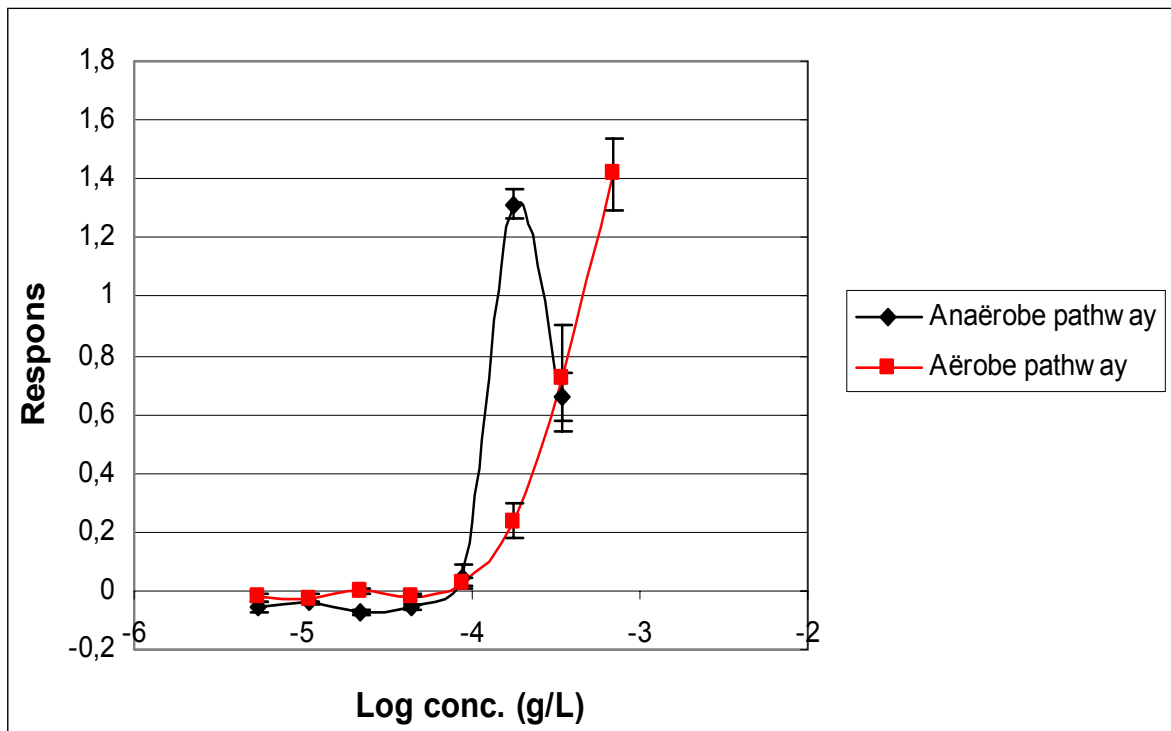
Component	Log EC 50	Maximale respons
EE2	-5,44	7,45
SHIME + BaP	-3,28	0,24
SHIME + pyreen	-3,55	0,13
SHIME + fenantreen	-3,67	2,11
SHIME + fluoranteen	-4,26	0,27
SHIME + naftaleen	-3,83	1,89
SHIME + anthraceen	-3,49	1,18
SHIME + acenaftyleen	-3,98	2,71



**Figuur 21.** Spreiding van EE2 en PAK's geïncubeerd in SHIME suspensie in functie van hun bindingsaffiniteit en estrogene werking

De bindingsaffiniteit en de estrogene werking van EE2 en van de 8 standaard PAK's wordt weergegeven in Fig. 21. EE2 heeft een hoge affiniteit (-5,44 logaritmische waarde) om te binden op de ER en vertoont bovendien een sterk estrogene effect. Bij de PAK's varieert de affiniteit tussen -3,28 en -4,26 log-eenheden. De estrogene respons verschilt naargelang de PAK. Een lage estrogene respons wordt verkregen bij fluoranteen (0,27), pyreen (0,25) en BaP (0,24). Bij antraceen is de estrogene respons 1,18. Acenafyleen, fenantreen en naftaleen vertonen een hogere estrogene respons van respectievelijk 2,71; 2,11 en 1,89.

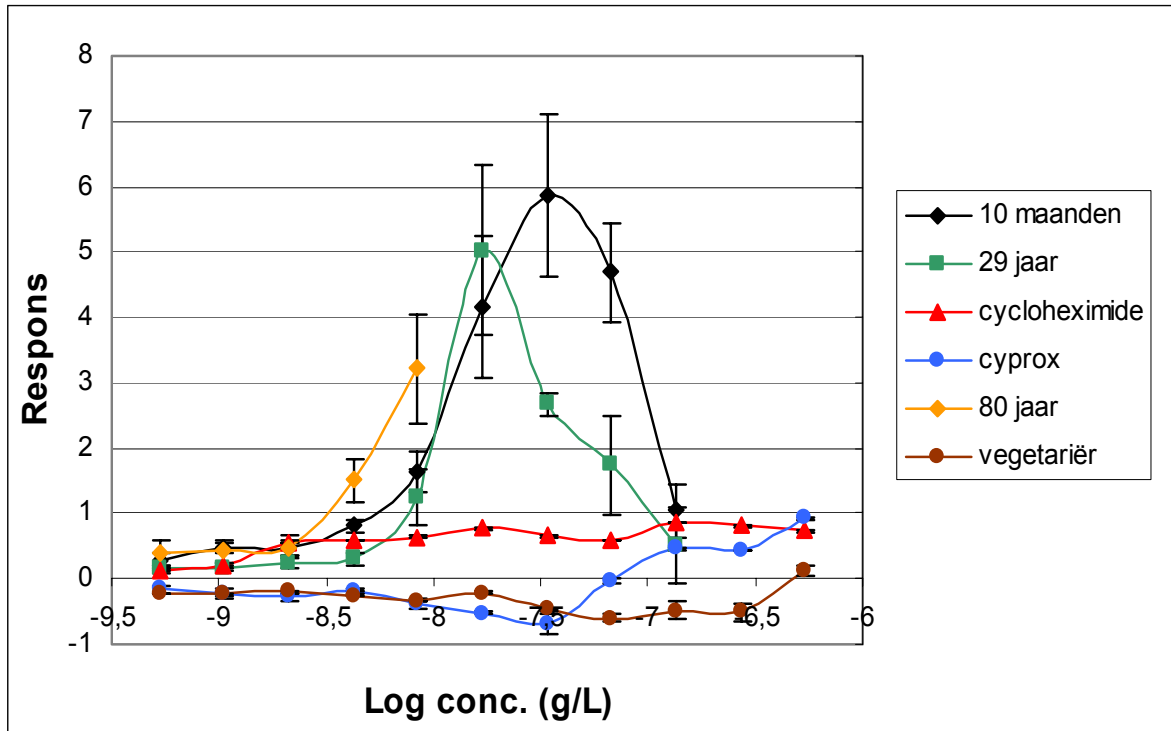
#### 4.5 Aërobe pathway versus anaërobe pathway



**Figuur 22.** Estrogene respons van een mix PAK's geïncubeerd in anaërobe of aërobe SHIME in functie van de log concentratie (n=4)

Figuur 22 toont het verschil in estrogene respons bij incubatie van een mix PAK's met SHIME suspensie volgens de anaërobe of de aërobe pathway. Bij volledig anaërobe incubatie (0,2 mM Fumaraat) is de maximale respons 1,31; volledig aërobe incubatie geeft een maximaal signaal bij 1,42.

#### 4.6 Biotransformatie van PAK's in functie van verschillende inocula

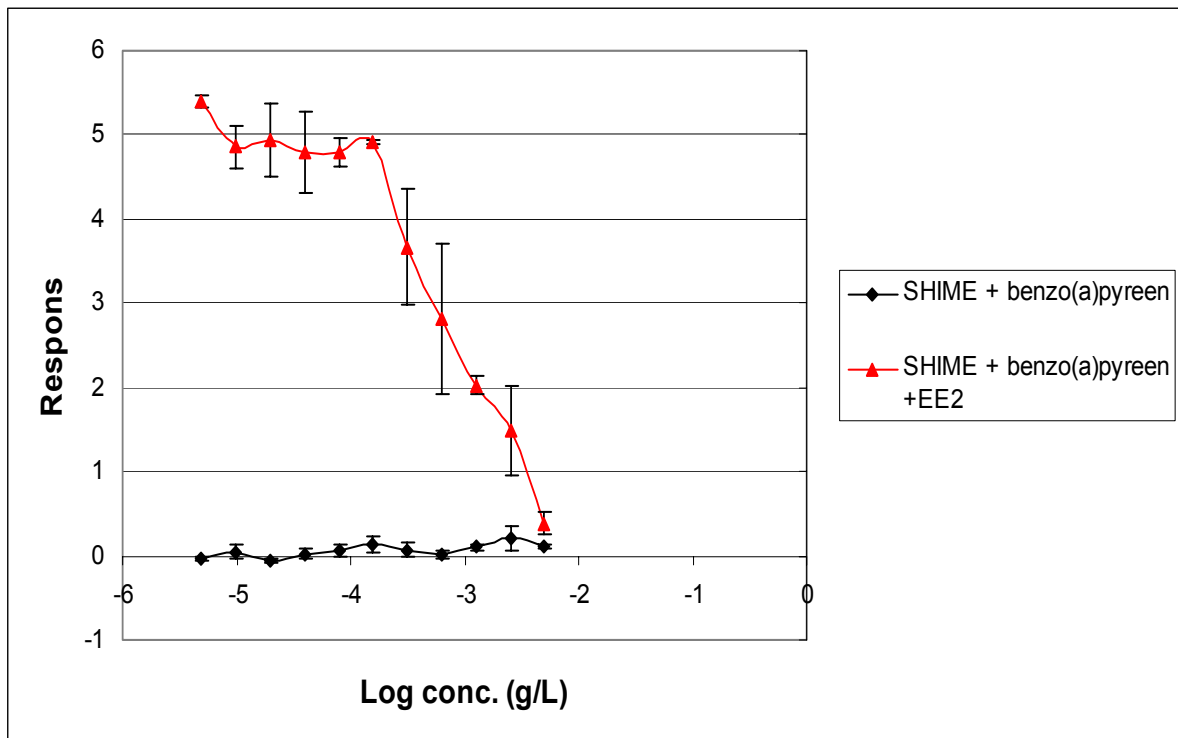


**Figuur 23.** Estrogene respons van mix van PAK's in functie van de log concentratie (n=4) bij verschillende inocula

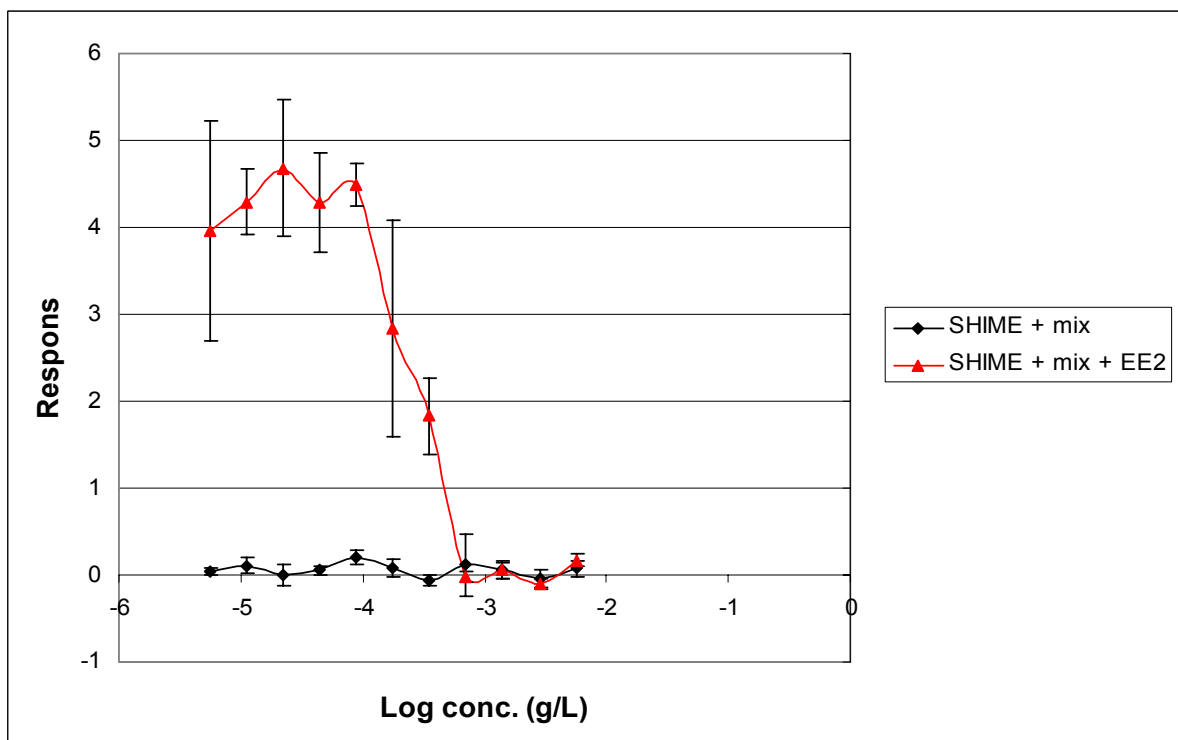
Een mix van PAK's incuberen in SHIME suspensie van verschillende inocula veroorzaakt uiteenlopende estrogene signalen. Dit wordt in Fig. 23 aangetoond.

Er is een stijgende maximale respons van 0,12 (vegetariër); 0,86 (cycloheximide); 0,92 (cyprox); 3,21 (80 jaar); 5,02 (29 jaar) tot 5,86 (10 maanden). In de dikke darm van baby's kunnen dus meer omzettingsproducten gevormd worden dan bij volwassenen of bejaarden. Tevens is er een indicatie dat vegetariërs geen PAK-transformatie ondergaan. Toevoeging van cyprofloxacin of cycloheximide voor het afdoden van respectievelijk bacteriën of fungi in de SHIME suspensie heeft ook de estrogene test beïnvloed.

## 4.7 Anti-estrogeen effect



**Figuur 24.** (Anti-)Estrogene respons van BaP geïncubeerd in SHIME suspensie in functie van de log concentratie (n=4)



**Figuur 25.** (Anti-)Estrogene respons van mix PAK's geïncubeerd in SHIME suspensie in functie van de log concentratie (n=4)

Zowel Fig. 24 als Fig. 25 vertonen na spiken met EE2 (6,8 µg/L) een dalende curve bij toenemende concentratie PAK. Bij BaP valt het maximaal signaal terug van 4,85 tot 0,39. Bij mix PAK's is er een daling van 4,29 tot 0,06. Zonder spiken bedraagt de maximale respons zowel voor SHIME + BaP als voor SHIME + mix 0,21.

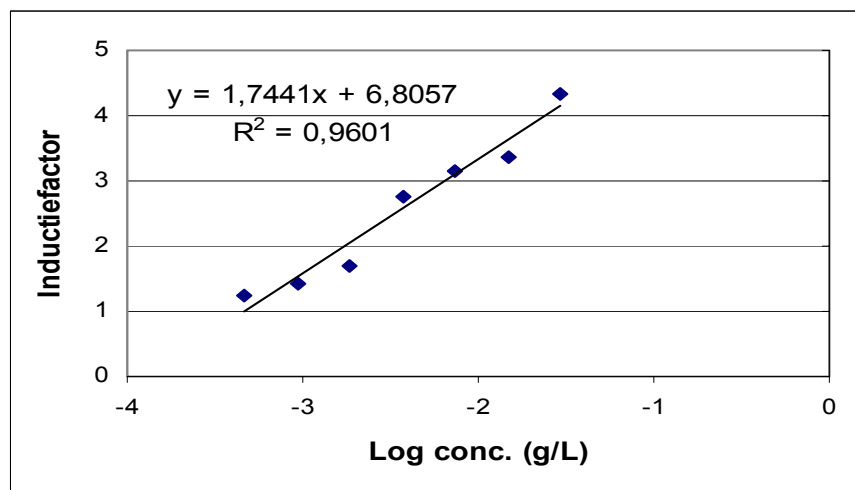
## 5 SOS chromotest

De SOS chromotest is een genotoxiciteitstest die wordt aangewend om DNA beschadiging door PAK's op te sporen. Bij deze test is 4 – nitroquinoline – N – oxide (NQO) de standaard.

### 5.1 NQO

**Tabel 21.** Toename van de inductiefactor in functie van de log concentratie van NQO (g/L)

Log NQO (g/L)	Inductiefactor
-3,33	1,23
-3,03	1,43
-2,73	1,69
-2,43	2,74
-2,13	3,16
-1,83	3,37
-1,53	4,34

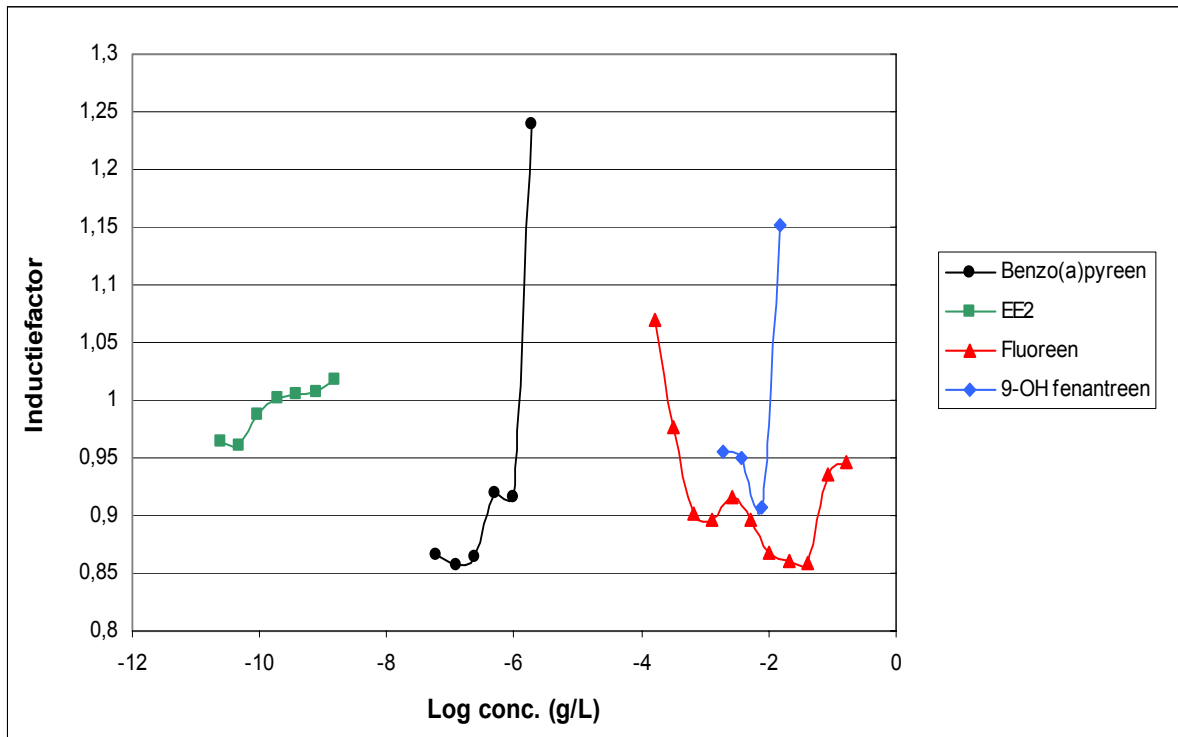


**Figuur 26.** Inductiefactor van NQO in functie van de log concentratie

Bij toenemende log concentratie NQO stijgt de inductiefactor (IF) volgens een rechte met vergelijking  $y = 1,7441x + 6,8057$ . Figuur 26 toont dit aan.



## 5.2 PAK's



**Figuur 27.** Inductiefactor van verschillende testcomponenten in functie van de log concentratie

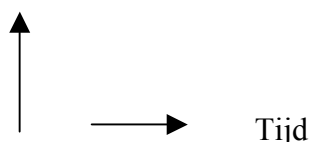
In Fig. 27 wordt de IF van verschillende componenten weergegeven bij toenemende log concentratie. De IF bedraagt 1,07 voor fluoreen; 1,08 voor EE2; 1,15 voor 9-OH fenantreen en 1,24 voor BaP.

## HOOFDSTUK 4: DISCUSSIE

### 1 Optimalisatie van de bioassays - Opvolging van de groei van de testorganismen

*In vitro* bioassay testen maken gebruik van cultuurcellen of cellulaire extracten om de aanwezigheid van contaminanten te detecteren. Zowel bij de estrogene bioassay als bij de aryl hydrocarbon test wordt een genetisch gemodificeerde bakkersgist *Saccharomyces cerevisiae* gebruikt. De SOS chromotest steunt op de gewijzigde darmbacterie *Escherichia coli* PQ37. De groeicurve van deze organismen vertoont 4 typische fasen: de lag fase, de log fase, de stationaire fase en de lethale fase (Fig. 28). Gedurende de lag fase is er een aanpassing van de cellen aan het nieuwe medium. De cellen nemen toe in omvang maar ondergaan nog geen deling (Vandamme, 2000). De lag fase wordt gevolgd door de log fase waarbij binaire delingen optreden. Tijdens deze logaritmische of exponentiële fase neemt het aantal cellen massaal toe met de tijd. De mate van celtoename is functie van het absolute aantal cellen. Hoe meer aanwezige cellen, hoe vlugger de celpopulatie toeneemt. De snelheid wordt mede bepaald door de temperatuur, de pH, de aard en de concentratie van de beschikbare nutriënten. Bij de stationaire fase treedt er een steady-state evenwicht op. De toename aan cellen door celdeling is in evenwicht met de afname in cellen door celdood. Afsterven van de organismen is hoofdzakelijk te wijten aan nutriëntafname maar ook de opstapeling van toxische afbraakproducten of een ongunstig verloop van de pH spelen een rol.

Log KVE



A : Lag fase
B : Log fase
C : Stationaire fase
D : Lethale fase

**Figuur 28.** Verschillende fasen bij de groei van cultuurcellen

Bij limiterende nutriëntencondities gaat de stationaire fase over naar de eindfase. Tijdens deze lethale fase delen de cellen niet meer, maar sterven af en worden gelyseerd door eigen enzymen.

Om optimale testresultaten te bekomen, worden bioassays steeds uitgevoerd met micro-organismen die in de exponentiële groeifase voorkomen. Bij de estrogene bioassay vertoonden de gisten een exponentiële groei bij een OD gelegen tussen 0,168 en 1,821 bij 610 nm (Fig. 6). Routledge en Sumpter (1996) stelden dat eventuele fluctuaties in respons het best kunnen opgevangen worden indien een gistcultuur wordt gebruikt met een OD (610 nm) van minstens 0,2. Om de reproduceerbaarheid van de bioassays te waarborgen, werd steeds gewerkt met gisten die een OD tussen 0,2 en 0,25 bereikt hadden.

De opkweek van de giststam voor de aryltest gebeurde in 2 fasen. In een eerste stap werd de gist gedurende 60 h geïncubeerd in glucosemedium. De nutriëntensamenstelling (glucose als koolstofbron, aminozuren, vitaminen, ...) liet intense celgroei en celdeling toe zodat de OD (610 nm) na 60 h stijgt tot 2,2 (Fig. 7). In een tweede stap werd de gist naar galactosemedium overgebracht. Galactose fungeert als een promotor en maakt in een latere fase de productie van galactosidase mogelijk. Indien binding van een PAK op de AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) in de giststam optreedt, verplaatst het AhR-ligand complex zich via de Arnt (aryl hydrocarbon nuclear translocator) naar de kern, waar het kan binden met de aryl responsieve elementen. (Miller *et al.*, 1999). Deze zijn vóór het *lacZ* gen gelocaliseerd op een reporterplasmide. Hierdoor komt het *lacZ* reporter gen tot expressie met de productie van  $\beta$ -galactosidase als gevolg. Bij de aryltest trad exponentiële groei op bij een OD (610 nm) gelegen tussen 0,195 en 1,941 (Fig.8). Opnieuw werd een minimum OD van 0,2 en een maximum OD van 0,25 in acht genomen om de werkbaarheid en reproduceerbaarheid van de bioassay te garanderen.

Bij dit onderzoek werd de werkmethode met gisten, ontwikkeld door Routledge en Sumpter (1996) en aangepast door De Boever *et al.* (1999), enigszins gewijzigd. In laatstvermelde studies werd gekozen om de testorganismen tot een OD van 1 te laten evolueren en vervolgens opnieuw te verdunnen met minimaal medium tot een OD tussen 0,2 en 0,25. Het toepassen van de gist gebaseerde bioassays op positieve controles leerde dat betere resultaten werden bekomen wanneer de testorganismen onmiddellijk bij een OD tussen 0,2 en 0,25 gebruikt werden in plaats van eerst een verdunningstap uit te voeren.

Voor de SOS chromotest werd de snelgroeïende *Escherichia coli* PQ37 als testorganisme gebruikt. De toename van de OD in functie van de incubatietijd verloopt vrij lineair. Na  $\pm$  5h30 incubatie werd een fotometrische transmissie van 45 % bereikt bij een golflengte van

695 nm (Fig. 9). Dit stemt overeen met een bacteriële telling van  $250 \times 10^6$  KVE/mL. In overeenstemming met het werkprotocol ontwikkeld door Mersch-Sundermann (1990), werd bij deze optische densiteit de bacterieplaat klaar gemaakt.

## 2 Aryltest

### 2.1 PAK's en OH-PAK's

Het grootste deel van de xenobiotica die het in het menselijk lichaam aanwezig zijn, ondergaan enzymatische reacties. Na deze biotransformaties wordt de xenobiotische molecule minder lipofiel en meer polair zodat de stof het lichaam via de normale excretie routes (gal, urine...) kan verlaten. Vroeger werd biotransformatie gelinkt aan detoxificatie. Recent werd echter ontdekt dat sommige biotransformatie enzymen, via het proces "bioactivatie", aanleiding kunnen geven tot stabiele of instabiele metabolische producten die opmerkelijk meer toxisch zijn dan de moedercomponenten (Nebbia, 2001). Biotransformatie reacties kunnen tevens de vorming van reactieve zuurstof species in de hand werken. Bovendien kunnen deze reacties de balans verstoren tussen endogene componenten zoals de NADP/NADPH verhouding, gereduceerd glutathion, sulfaat- of aminozuren gebruikt voor conjugatie. Het toxisch effect van een stof wordt gecorreleerd met de activatie van de AhR. Een potentieel ligand zoals 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo(p)dioxine (TCDD) activeert de Ah receptor als initiële stap in een toxische pathway die leidt tot endocriene verstoringen, ontregeling van het immuunsysteem, voortplantingsproblemen en kankers in vertebraten (Abbott et al. 1994; Poland & Knutson, 1982; Safe et al., 1997). De centrale rol van de AhR bij een toxische respons werd ondersteund door de bevinding dat muizen zonder AhR immuun bleken voor de toxische effecten van TCDD (Fernandez-Salguero et al., 1996). Onderzoek met ratten en gemuteerde cellijnen alsook onderzoek naar de relatie tussen de structuur en de activiteit van liganden heeft aangetoond dat de AhR van belang is bij de toxische respons van specifieke aromatische koolwaterstoffen (Hankinson, 1995; Schmidt & Bradfield, 1996).

Bij de U.S. EPA wordt BaP als standaard gebruikt in de risico-evaluatie omwille van de gekende carcinogene eigenschappen van deze stof. Op basis hiervan werd BaP tevens als standaard gebruikt in de aryltest. In dit onderzoek werd zowel voor PAK's als voor OH-PAK's een respons bekomen in de aryltest. De sterkte van het signaal steeg bij toenemende aromaticiteit (Fig. 11). Om vergelijking tussen de 8 PAK's mogelijk te maken, werden deze als equimolaire hoeveelheden uitgedrukt (0,01 mmol PAK/L). Op basis hiervan kon de procentuele equivalentie met BaP bepaald worden. Deze bedraagt 8,4 % voor fluoreen; 9,3 % voor fenantreen; 17,2 voor acenaftyleen; 18,5 % voor naftaleen; 27,1 % voor fluoranteen; 28,7 % voor antraceen en 35,6 voor pyreen (Fig. 10).

Bij de OH-PAK's vertoont de dosis-respons curve een sterke daling naarmate de concentratie toeneemt. Dit wijst op eventuele toxiciteit van de OH-PAK's voor het testorganisme. In een batchproef kon worden aangetoond dat 9-OH fenantreen toxisch is voor het testorganisme *Saccharomyces cerevisiae*. Bij incubatie van de gist in aanwezigheid van 9-OH fenantreen (8,08 mg/L) was de groei nihil (Fig. 12). Tijdens de opkweek van de gist varieerde de optische densiteitwaarde tussen 0,49 en 0,43 over 24 uur, wat te wijten was aan de minder goede oplosbaarheid van 9-OH fenantreen. Er werd echter geen significante groei van de gist vastgesteld wat een indicatie is dat sommige omzettingsproducten van PAK's, gevormd tijdens incubatieproeven, een toxisch signaal kunnen leveren.

Binding van PAK's en OH-PAK's op de arylreceptor betekent dat deze componenten biotransformatiereacties kunnen ondergaan. *In vivo* kan dit op zijn beurt leiden tot detoxificatie of vorming van carcinogene, estrogene of mutagene biotransformatieproducten.

## 2.2 Digesties van PAK-gecontamineerde bodem

Een PAK-gecontamineerde bodem werd aan een waterextractie en aan een duodenum- en colondigestie onderworpen bij een initiële L/S van 40. De waterextractie simuleert de uitloogbaarheid van PAK's in de bodem. De duodenum- en colondigestie bootst de transit door het menselijk lichaam na. Hierbij is de duodenumdigestie vooral gericht op de potentiële effecten van de galzouten op de PAK's. De colondigestie laat toe om eventuele omzettingsmechanismen door microbiota verder te onderzoeken. De respons in de aryltest was het sterkst voor de maagdigestie, nam af bij de duodenumdigestie en was het zwakst voor de colondigestie. De L/S verhouding voor de 3 stalen bedroeg hierbij respectievelijk 40, 60

en 100. Het verdunningseffect zou aan de basis kunnen liggen van de zwakkere respons naar de colon toe. De daling in de arylrespons zou echter ook kunnen verklaard worden door complexatie van de bestudeerde PAK's met opgelost organisch materiaal in de colon. Hierdoor daalt de fractie PAK's die de cel van de arylgist kunnen binnendringen. Te grote complexen kunnen de celwand immers niet penetreren, waardoor de PAK's op deze complexen niet kunnen binden met de AhR.

Deze resultaten met zuivere PAK componenten en verschillende bodemdigestiestalen tonen aan dat de aryltest als bioassay nuttige informatie kan leveren over de capaciteit van bepaalde stalen om te binden met de humane arylreceptor. Op deze manier wordt ruwweg een idee verkregen van de mate waarin biotransformatieprocessen kunnen optreden.

### 3 Estrogene test

Sinds enige tijd worden reproductiviteit- en ontwikkelingsabnormaliteiten vastgesteld bij wilde populaties invertebraten en vertebraten (Colborn, 1993). Deze observaties blijven in frequentie toenemen en worden verondersteld afkomstig te zijn van de antropogene productie van zogenaamde *endocrine disrupting chemicals* (EDCs). Endocriene verstoorders hebben een gelijkaardige moleculaire structuur als endogene hormonen en brengen het endocrien systeem uit balans door antagonistische effecten. Bovendien kunnen ze schadelijke effecten veroorzaken door de synthese of degradatie van endogene hormonen of hormonenreceptoren te beïnvloeden (Sonnenschein & Soto, 1998).

PAK's die de structuur van steroidale hormonen benaderen, kunnen een zwak estrogeen of anti-estrogeen effect uitoefenen. Hormonale estrogenen, PAK's en de metabolieten ervan kunnen op dezelfde wijze binden op de estrogene receptor of het estrogeen metabolisme beïnvloeden via het CYP 450 systeem. Estrogeen geïnduceerde carcinogenese kan hierdoor gerelateerd zijn met PAK geïnduceerde carcinogenese. Om te onderzoeken in welke mate PAK's en de omzettingproducten van PAK's in staat zijn om te binden op de estrogene receptor (ER) werd de YES (Yeast Estrogen Screentest) uitgevoerd. Hierbij wordt het synthetisch analoog van 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -ethynylestradiolestradiol (EE2), als standaard gebruikt. Deze krachtige xeno-estrogene stof wordt in orale contraceptiva verwerkt (Arcand-hoy *et al.*, 1998), wordt onvolledig afgebroken in afvalwaterzuiveringsinstallaties (WZI) en

draagt bij tot de feminisatie van mannelijke vissen in rivieren die het effluent van deze WZI's ontvangen (Desbrow *et al.*, 1998; Routledge *et al.*, 1998).

In tegenstelling tot sommige andere laboratoriumstudies werd in dit onderzoek tevens aandacht geschonken aan een mengsel van PAK's. In het milieu worden PAK's immers vaak als complexe mengsels teruggevonden. Resultaten van onderzoek met één enkele PAK mogen niet geëxtrapoleerd worden naar een mengsel dat die ene component bevat. Zo zal BaP in de aanwezigheid van andere PAK's geen tumorvorming induceren (Chaloupka *et al.*, 1995), BaP op zich wel (Goldstein, 1998).

### 3.1 PAK's

Uit de estrogene test bleek dat PAK's niet in staat zijn om te binden op de ER. Zowel voor benzo(a)pyreen (BaP) als voor pyreen werd geen estrogene respons teruggevonden (Fig. 14). De waarden schommelden rond de detectielimiet van de estrogene bioassay en zijn in overeenstemming met de resultaten van Hirose (2001). De resultaten van dit onderzoek toonden aan dat BaP en 5-OH BaP niet konden binden op de ER of geen  $\beta$ -galactosidase activiteit konden induceren door interactie met de ER. Beide componenten zijn dus noch agonist noch antagonist. Een uitzondering op deze resultaten is het estrogeen signaal bekomen met een mix van PAK's. Hiervan bedraagt het maximaal signaal 0,294. Deze niet te verwaarlozen respons lijkt strijdig met de eerdere bevinding dat PAK's geen estrogeen signaal veroorzaken in de estrogene test. Een zuiver mengsel van 8 PAK's zou hetzelfde resultaat moeten leveren tenzij het mengsel een reactie ondergaat en de reactieproducten wel kunnen binden op de ER. Uit de literatuur is bekend dat de toxiciteit van PAK's voor aquatische organismen zoals vissen en planten, stijgt bij blootstelling van deze componenten aan zonlicht, vooral UV-straling (UV-A, UV-B). De toename in toxiciteit gebeurt via 2 processen: fotosensitisatie reacties (bv. de productie van een radicaal zuurstofatoom) en foto-oxidatie van de componenten (Oris & Giesy, 1985; Newsted & Giesy, 1987; Huang *et al.*, 1993; Ankley *et al.*, 1994; Ren *et al.*, 1994; Bowling *et al.*, 1983; Gala & Giesy, 1992; Schoeny *et al.*, 1988). Een eerste stap in de foto-oxidatie pathway is de vorming van instabiele endoperoxiden en/of peroxide intermediären. Deze componenten leiden tot de vorming van meer toxische species zoals diolen en quinonen (Nikolaou *et al.*, 1984; Zepp & Schlotzhauer, 1979; Katz *et al.*, 1979; David & Boule, 1993; Arey *et al.*, 1992; Ren *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1995; Greenberg *et al.*, 1993; Basu & Saxena, 1978). Vermits deze

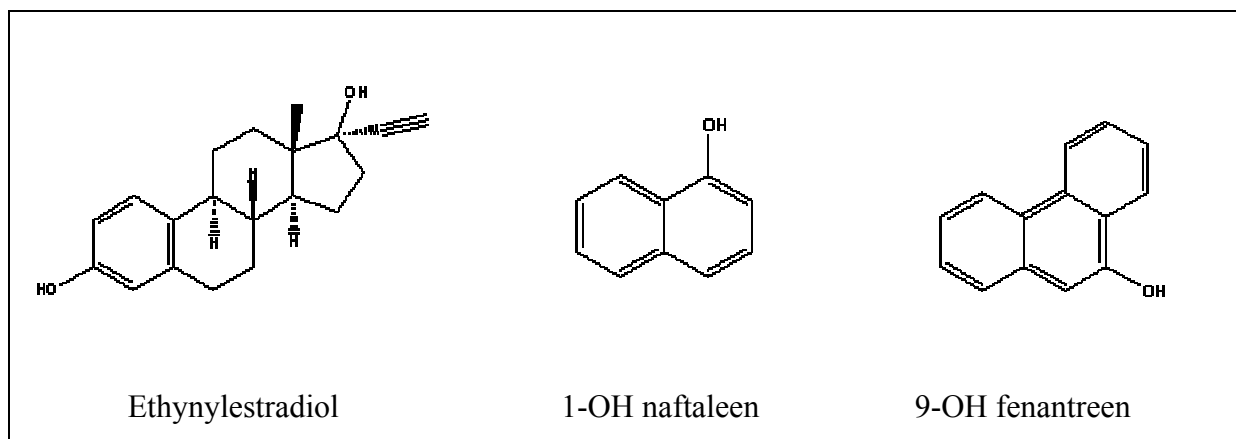
componenten meer wateroplosbaar zijn dan de oorspronkelijke PAK's kunnen organismen aan hogere concentraties ervan blootgesteld worden. Hierdoor ontstaat een groter toxisch risico vermits geoxideerde PAK's meer reactief en biologisch beschadigend zijn dan de moedercomponenten (Huang *et al.*, 1993; Ren *et al.*, 1994; Nikolaou *et al.*, 1984; Arey *et al.*, 1992). Fenantreen, één van de meest voorkomende PAK's in het milieu, vertoont een stijging in toxiciteit voor planten wanneer het fotogemodificeerd wordt door fotochemisch licht (Huang *et al.*, 1993; Greenberg *et al.*, 1993). Na blootstelling aan gesimuleerd of natuurlijk zonlicht wordt het fotoproduct van fenantreen, 9,10-fenantreenquinon (FQ), gevormd samen met andere fotoproducten (David & Boule, 1993; McConkey *et al.*, 1993). De toxiciteit van FQ werd niet gewijzigd door donker of zichtbaar licht wat de ongevoeligheid voor fotosensitisatie of fotomodificatie van FQ aantoont. Onderzoek van Huang (1993, 1995) wees uit dat de toxiciteit van antraceen en BaP dramatisch steeg na fotomodificatie.

Hoewel dit niet werd aangetoond zou het positieve signaal in de estrogene test voor het mengsel PAK's kunnen verklaard worden door dergelijke lichtgevoelige omzettingsprocessen van één van de PAK componenten. Bij incubatie van het mengsel PAK's in een suspensie met colonmicrobiota werd echter rekening gehouden met deze initiële positieve respons. Tijdens de labopraktijken werd erop gelet om de oplossing van zonlicht af te schermen door de kolf met aluminiumpapier te omwikkelen. Bij het openen van de kolf voor staalname zouden echter wel UV-stralen hebben kunnen interfereren. Het is immers bekend dat UV-A en UV-B stralen door glas kunnen penetreren.

### 3.2 OH-PAK's

Gehydroxyleerde PAK's zijn wel in staat om te binden op de ER. De maximale respons in de estrogene test bedroeg 4,14 voor 1-OH pyreen; 2,23 voor 1-OH naftaleen; 0,098 voor 9-OH fenantreen en – 0,053 voor 9-OH fluoreen (Fig. 15). Kenmerkend hierbij is dat de 1-OH PAK's een significant estrogeen signaal geven maar de 9-OH PAK's daarentegen niet. Een mogelijke verklaring hiervoor is de gelijkaardige chemische configuratie van 1-OH PAK's en EE2. Beide componenten binden op het eerste koolstofatoom een hydroxylgroep, in tegenstelling tot 9-OH PAK's waar de OH-groep op het negende koolstofatoom voorkomt (Fig. 28).





**Figuur 28.** Chemische configuratie van EE2, 1-OH naftaleen en 9-OH fenantreen

De resultaten voor de OH-PAK's worden bevestigd in het onderzoek uitgevoerd door Hirose (2001). In deze studie kon worden aangetoond dat verschillende monohydroxyderivaten van BaP (1-, 2-, 3- en 9-OH BaP) binden op de ER. Dit duidt op de agonistische werking van deze OH-PAK's. De monohydroxyderivaten van BaP hebben een gelijkaardige chemische structuur als  $17\beta$ -estradiol, de natuurlijke estrogene stof in het menselijk lichaam. Een klein verschil in de OH positie kan de interactie met het ER bindingscomplex significant beïnvloeden en maakt een component agonist, antagonist of geen van beide.

### 3.3 Digesties van PAK-gecontamineerde bodem

De estrogene bioassay werd tevens uitgevoerd op de maag-, duodenum- en colondigesties van een PAK-gecontamineerde grond. Ingestie van verontreinigde grond vormt immers een belangrijke PAK-blootstellingsroute en treedt zowel op bij volwassenen als bij kinderen.

Via de Simulator van het Humaan Intestinaal Microbieel Ecosysteem (SHIME) werd nagegaan in welke mate PAK's uit een gecontamineerde bodemmatrix in het spijsverteringsstelsel worden vrijgesteld. Hierbij werd onderscheid gemaakt tussen de maagdigestie (zure omstandigheden van pH 1 tot 2), de duodenumdigestie (enzymatische activiteit door pancreasenzymen en micelvorming door galzouten) en de colondigestie (omzettingen door microbiota). Er werd gewerkt met een initiële L/S verhouding van 40 om *in vivo* situaties bij kinderen te benaderen. Deze leeftijdsklasse vormt de grote risicogroep omwille van hun typisch hand-mond gedrag.

Het werken met milieustalen vereist een grote zorg naar correcties toe. Om te verzekeren dat de estrogene respons enkel afkomstig is van de omzettingsproducten van de PAK's aanwezig in de bodem, moeten alle mogelijke interferenties uitgeschakeld worden. Zo kan een bodem

op zich estrogene werking vertonen door de plantenhormonen die erin aanwezig zijn. Deze fyto-estrogenen (bv. isoflavonen en lignanen) zijn natuurlijke chemische constituenten in sommige planten en kunnen een estrogene of anti-estrogene activiteit uitoefenen bij dieren en mensen (Zampieron, 1999). Significante concentraties plantenhormonen worden dikwijls teruggevonden bij de familie van de Gramineae en de Leguminosae zoals bonen, erwten, luzerne en rode klaver. Vermits fyto-estrogenen de menselijke hormonenhuishouding kunnen beïnvloeden, bestaat de mogelijkheid dat deze componenten op de humane ER in de bioassay kunnen binden. Om hiervoor correctie te maken, werd een leguminosenbodem volgens de gebruikelijke werkwijze aan de maag-, de duodenum- en de colondigestie onderworpen. Het extract van het afgecentrifugeerde supernatans werd in de YES getest. De maximale respons bedroeg 0,0015 voor de maagdigestie; 1,97 voor de duodenumdigestie en 0,026 voor de colondigestie. Het sterke duodenumsignaal is te wijten aan de galzouten aanwezig in het pancreassap (zie 3.4). Op basis van deze resultaten kan gesteld worden dat eventuele plantenhormonen, aanwezig in de verontreinigde parkgrond, het estrogeen signaal niet zullen beïnvloeden. Immers, als een cultuurgrond van leguminosen slechts een achtergrondsignaal veroorzaakt dan zal de bodem uit deze studie dit vermoedelijk evenmin doen.

Naast plantenhormonen kan een bodem ook zware metalen bevatten. Deze stoffen kunnen mengsel-toxiciteit met PAK's veroorzaken. De biobeschikbaarheid van PAK's en zware metalen in de bodem wordt bepaald door het organische stofgehalte en het kleigehalte. Recente studies hebben aangetoond dat de minerale samenstelling (calciet-dolomiet verhouding) de sorptie van Cd en PAK's beïnvloedt (Kirso *et al.*, 2000; Alumaa *et al.*, 2001). Bodems met een relatief laag organische stof gehalte, een laag Ca gehalte en hoge amorfe bodemfase vertonen de hoogste gevoeligheid voor contaminatie door zware metalen (Cr, Pb, Cu, Cd) en PAK's (Irha *et al.*, 2003). Om een correctie voor zware metalen te kunnen doorvoeren, diende eerst het gehalte aan zware metalen bepaald te worden in de PAK-gecontamineerde bodem. Hiervoor werd zowel de MARS-destructie (Microwave Accelerated Reaction System) als de asrestmethode aangewend. Via AAS (Atoom Absorptie Spectrometrie) kon het gehalte aan Mn, Zn, Cu, Cd, Cr, Fe, Co, Ni en Ag bepaald worden in de oplossingen die volgens beide methodes werden bereid. Bij de asrestmethode lagen de waarden voor de verschillende zware metalen beneden de onderste bepalingsgrens. MARS-destructie leverde per g grond een vrijstelling van 0,2 mg Mn; 0,05 mg Zn; 0,01 mg Cu; 0,002 mg Cd; 0,03 mg Pb; 0,003 mg Co, 9,5 mg Fe, 0,02 mg Ni en 0,005 mg Ag. Hieruit bleek dat enkel Mn en Fe relevant zijn. Uit de literatuur is echter nog niet bekend dat deze componenten mengsel-toxiciteit kunnen veroorzaken. De verontrusting gaat eerder uit naar

Cd. De vrijstelling van Cd na behandeling met koningswater valt echter binnen het ppb niveau. In het gastrointestinaal kanaal zullen de maagzuren (zoutzuur) echter niet zo sterk kunnen reageren als koningswater om zware metalen uit de bodematrix vrij te stellen. Eventuele vrijstelling van zware metalen uit de gecontamineerde bodem in het spijsverteringsstelsel zal bijgevolg nog lager liggen dan de ppb grens. Beneden deze grens is nog geen samenwerking tussen zware metalen en PAK's gerapporteerd. Niettemin zal er in de toekomst verder rekening moeten gehouden worden met de mogelijke gevolgen te wijten aan mengsel-effecten.

### 3.4 Incubatie van PAK's in SHIME suspensie

Incubatie van SHIME suspensie met een PAK gaf indicatie dat PAK transformatie optreedt. Dit kan geconcludeerd worden uit de resultaten van de estrogene bioassay op PAK's geïncubeerd in SHIME suspensie en de GC-MS analyse. Later werd dit bevestigd via HPLC-MS.

Het signaal dat in de estrogene test werd bekomen was niet enkel afkomstig van de aanwezige omzettingsproducten in de SHIME matrix. SHIME suspensie op zich zorgt reeds voor een verkleuring van het gele CPRG naar het rode CPR. Een mogelijke oorzaak is de aanwezigheid van galzouten, die min of meer een gelijkaardige structuur vertonen als EE2. Er zijn echter geen literatuurgegevens bekend over eventuele binding van galzoutcomponenten op de estrogene receptor. Een andere mogelijke verklaring is het membraanbeschadigende effect dat galzouten kunnen hebben op de gist (De Boever et al., 2000). Hierdoor zou galactosidase, geproduceerd op basaal niveau, makkelijker uit de gistcel komen en aanleiding geven tot een beperkte omzetting van de chromogene substantie CPRG. De estrogene test uitgevoerd op zuiver pancreassap leverde een maximale respons van 3,86 (Fig. 18). Bij SHIME suspensie die in vivo colonsituatie benadert, is 48 % van de totale respons te wijten aan pancreassap. De resterende 52 % is afkomstig van de overige componenten (metabolieten, excretieproducten...) aanwezig in de SHIME suspensie (Fig. 19). Na correctie voor de SHIME suspensie, varieert de sterkte van het signaal voor de verschillende PAK's van 2,56 voor acenaftyleen tot 0,25 voor pyreen (Fig.17). Dit betekent dat het oorspronkelijke acenaftyleen het meest wordt gebiotransformeerd of biotransformatieproducten vormt die het best in staat zijn om te binden op de ER. Pyreen daarentegen wordt het minst omgezet of vormt omzettingsproducten met een lage bindingsaffiniteit voor de ER.

De spreiding van de estrogene respons in functie van de bindingsaffiniteit (Fig. 21) wijst op een mogelijk verband tussen sommige PAK's. De lage estrogene respons bij fluoranteen, pyreen en BaP kan te wijten zijn aan de complexe structuur van deze stoffen. Hierdoor zou een efficiënte binding op de ER kunnen verhinderd worden. Daarentegen zou de relatief hoge respons bij naftaleen, acenaftyleen en fenantreen op een meer gemakkelijke binding van deze componenten met de ER kunnen wijzen. Verder onderzoek is vereist om het eventuele verband op te helderen.

Het optreden van PAK-biotransformatie werd bevestigd met de resultaten bekomen uit GC-MS analyse. In 4 verschillende SHIME stalen werd de concentratie aan PAK's bepaald nadat een gekende hoeveelheid van een mengsel PAK's werd toegediend. Het eerste SHIME staal werd gekookt waardoor de aanwezige darmmicrobiota en enzymen werden vernietigd. Dit staal bevatte enkel nog particulier en opgelost organisch materiaal (OM). Een tweede SHIME staal werd na het koken gedurende 5 min gecentrifugeerd aan 3000 g. Hierdoor werden niet enkel de bacteriën maar tevens het particulier OM geëlimineerd. Dit staal bevatte dus vooral nog opgelost OM. Het derde niet-gekookte SHIME staal werd gedurende 5 min aan 3000 gecentrifugeerd. Bacteriën en particulier OM werden neergeslagen, enzymen en opgelost OM bleven aanwezig. Het vierde SHIME staal werd niet behandeld. In dit staal waren zowel actieve bacteriën, enzymen, particulier OM en opgelost OM aanwezig. Door de centrifugatiestap voor analyse werd 90% van de PAK's afgecentrifugeerd. Op het supernatans werd tenslotte een GC-MS analyse uitgevoerd. Uit de resultaten (Tabel 13) kon vastgesteld worden dat het grootste deel van de PAK's verdwijnen met het particulier OM. De grote organische partikels kunnen de PAK's complexeren of sorberen. Bij naftaleen verdween 98,3 % van deze stof met het particulier OM, bij BaP 95,7 %, bij fenantreen 95,7 % en bij fluoranteen 95,4 %. Het opgelost OM kan ook in mindere mate PAK's vasthouden. Voor BaP was dit 0,7 %, voor fenantreen 0,6%. Omzetting van PAK's door enzymen blijkt niet mogelijk te zijn. Belangrijker echter is de vaststelling dat, na correcties voor adsorptie aan particulier en opgelost OM, in het staal van de darmmicrobiota minder PAK's werden teruggevonden dan dat er oorspronkelijk werden in gebracht. Dit is een indicatie dat een fractie kan worden omgezet door de darmmicrobiota. De omzetting bedroeg voor naftaleen 1,7 %, voor BaP 1,2 %, voor fenantreen 2,2 % en voor fluoranteen 2,1 % (Tabel 14). Deze omzettingsproducten kunnen echter niet gekwantificeerd worden vermits de GC-MS analyse enkel PAK's detecteert, geen OH-PAK's of andere omzettingsproducten.

De positieve estrogene signalen vormen een duidelijke aanwijzing dat er iets gaande is in de colon. Welke omzettingsproducten precies gevormd worden, moet echter nog nader

onderzocht worden. In recent onderzoek (Van de Wiele *et al.*, 2003) werd de HPLC-ESI-MS methode gebruikt om SHIME suspensie, geïncubeerd met PAK's, te analyseren. Na 24h incubatie kon 1-OH pyreen via selectieve ionmonitoring gedetecteerd worden. De concentratie van 1-OH pyreen bedroeg 2,5 µg/L. Er werd tevens een kleine piek voor 9-OH fenantreen geobserveerd, hoewel beneden detectielimiet. Na incubatie van 1 ml SHIME staal met glucuronidase en arylsulfatase werd een concentratie van 4,4µg/L 1-OH pyreen teruggevonden. Ook andere OH-PAK's konden gedetecteerd worden: 1,1 µg/L 1-OH naftaleen; 0,24 µg/L 1-OH fenantreen en 1,9 µg/L 7-OH BaP. Het feit dat zo weinig componenten teruggevonden werden, kan verklaard worden door de korte incubatieduur (24h) van de PAK's in de SHIME suspensie. Bij andere studies wordt de PAK-biodegradatie in bodems, slib of sedimenten gedurende dagen en maanden opgevolgd (Colombo *et al.*, 1996; Canet *et al.*, 2001). Het is dus mogelijk dat een significante PAK-biotransformatie niet kon gedetecteerd worden binnen deze korte incubatieperiode. Bovendien kunnen zich andere omzettingsproducten vormen dan diegene waarop het HPLC-ESI-MS onderzoek gericht werd. In deze studie ging echter de volledige aandacht naar de OH-PAK's omwille van hun toxische, estrogene en mogelijk carcinogene eigenschappen.

Om de specifieke afbraakproducten meer in detail te bestuderen zou high performance liquid chromatografie (HPLC) met nuclear magnetic resonance (NMR) kunnen gecombineerd worden. Hiervoor zouden de darmmicrobiota van de complexe SHIME suspensie moeten geïsoleerd worden om interferentie met de SHIME matrix te vermijden. Vervolgens kunnen de micro-organismen met een gekende PAK geïncubeerd worden om te achterhalen welke sleutelmetabolieten gevormd worden. HPLC of thin layer chromatografie (TLC) in combinatie met NMR zou hierbij nuttige informatie kunnen leveren.

Eens de specifieke metabolieten gekend zijn, kan via HPLC-ESI-MS overgegaan worden tot kwantificatie en kinetica van de biotransformatieproducten (ESI staat voor electrospray ionisation).

### **3.5 Aërobe pathway versus anaërobe pathway**

Een anaërobe incubatie van een mengsel PAK's in SHIME suspensie werd uitgevoerd door het toevoegen van 0,2 mM fumarate. Dit substraat fungeert als terminale elektronenacceptor bij de anaërobe groei van micro-organismen en wordt onder redox condities gereduceerd tot succinaat. Na toevoeging van fumarate werd gedurende 20 min geflusht met N<sub>2</sub> gas om anaërobie te verzekeren. Volgens deze anaërobe pathway werd een maximale respons van

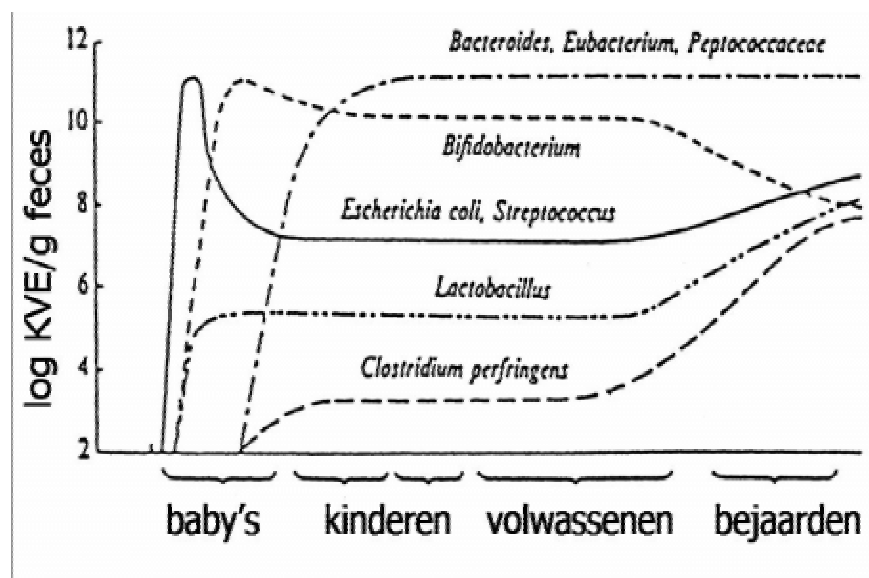
1,31 bereikt (Fig. 22). Bij volledig aërobe incubatie van een mix PAK's in SHIME suspensie bedroeg het maximum signaal 1,42. Hoewel het verschil in maximale respons klein is, kan er voorzichtig besloten worden dat er ofwel meer omzettingsproducten, ofwel meer producten met een hoge bindingsaffiniteit gevormd worden via de aërobe pathway. Indien de hydroxylderivaten van de bestudeerde PAK's verantwoordelijk zijn voor het estrogene signaal, gebeurt dit inderdaad logischerwijs via de aërobe pathway. Tenslotte is een hydroxylatie een oxidatiereactie. In de microaërobiele omstandigheden van de SHIME suspensie zou deze hydroxylatie kunnen uitgevoerd worden door de aanwezige gisten of schimmels, die algemeen aan een concentratie van  $10^3 - 10^4$  KVE/mL voorkomen (Molly *et al.*, 1994).

Monohydroxylaten van PAK's kunnen door sommige fungi gevormd worden. *Irpex lacteus*, een ligninolytische fungi, kan uit fenantreen 9-OH fenantreen vormen (Cajthaml *et al.*, 2002). Tevens is het mogelijk dat sommige eukaryoten in het microaërobiele gedeelte van de colon ascendens in beperkte mate PAK's kunnen biotransformeren. Een goede indicatie hiervoor blijkt uit het onderzoek van Van de Wiele *et al.* (2003). Hogere concentraties van 1-OH pyreen werden teruggevonden na enzymatische incubatie met glucuronidase en arylsulfatase. Dit impliceert dat fase II biotransformatieproducten aanwezig waren. Uit de literatuur (Leipelt *et al.*, 2001) blijkt dat fungi en gisten het P450 cytochroomcomplex bezitten om conjugatiereacties uit te voeren, wat leidt tot de vorming van deze fase II metabolieten. Bij geschikte darmcondities zouden deze organismen dus dergelijke reacties kunnen uitvoeren. Hydroxylatie van PAK's door prokaryoten in de darm lijkt weinig waarschijnlijk. Bacteriën kunnen PAK's in de bodem degraderen maar dit zijn allemaal aërobe organismen (Colombo *et al.* 1996). De meeste bacteriën in de darm zijn anaëroob of microaërofiel.

Indien anaërobe organismen verantwoordelijk worden geacht voor de omzetting van PAK's tot metabolieten die een estrogeen signaal kunnen geven, dan zal de eerste stap vermoedelijk een carboxylatiestap zijn. Dit werd reeds aangegeven door Karthikeyan en Bhandari (2001). Verder onderzoek moet uitwijzen welk organisme verantwoordelijk is voor de biotransformatie van PAK's in de colonsuspensie. Om inzicht te verwerven zou de *spray plate* techniek kunnen gebruikt worden (Yuan *et al.*, 1999). Hierbij worden cultuurcellen (bv. *Pseudomonas* sp.) op selectieve media aangebracht en vervolgens besprenkeld met een PAK zodat zich een waas vormt. Klaringszones duiden dan de PAK-degraderende culturen aan. Deze cellen kunnen dan naar een basaal PAK-bevattend medium worden overgebracht en worden geïdentificeerd.

### 3.6 Biotransformatie van PAK's in functie van verschillende inocula

In een verder verloop van het onderzoek werd de omzetting van PAK's in functie van het SHIME inoculum onderzocht. De opbouw en ontwikkeling van de intestinale microbiota gebeuren gedurende de eerste twee levensjaren van het kind. Nadien treden er nog maar weinig veranderingen op in de samenstelling van de microbiota (Fig. 29). Bij gezonde westerse volwassen mensen bestaat de darmmicrobiota voor 99 % uit anaërobe staafvormige Gram-negatieve (*Bacteroides* sp., *Fusobacterium* sp.) en Gram-positieve (*Bifidobacterium* sp., *Eubacterium* sp., *Fusobacterium* sp.) bacteriën. Andere genera die goed profileren in de darm zijn de strikt anaërobe clostridia en anaërobe cocci. De microaërofiële lactobacilli en streptococci zijn in kleinere aantallen aanwezig maar in grotere aantallen dan de dominant facultatieve organismen (de groep van de coliformen). De aantallen van de meest vertegenwoordigde groepen blijven constant in tijd, deze van de minder frequente groepen vertonen een aanzienlijke fluctuatie. Belangrijke veranderingen die optreden bij het ouder worden, zijn de afname van het aantal *Bifidobacteria* en de stijging van het aantal *Clostridium perfringens* (Verstraete, 2000).



**Figuur 29.** Verandering van het aantal bacteriën in de feces in functie van de leeftijd (Mitsuoka, 1978)

Voor de inoculatie van de SHIME reactor werd gewerkt met fecaal materiaal afkomstig van personen uit verschillende leeftijdsklassen en met verschillende voedingsgewoonten. Als inocula werden gebruikt: baby (10 maanden), vegetariër (23 jaar), volwassene (29 jaar) en bejaarde (80 jaar). Om een colonsuspensie met uitsluitend bacteriën te bekomen werd bij de colonsuspensie van de volwassen persoon cycloheximide (100 mg volume%) toegediend. Het toedienen van deze stof zorgt voor een afdoding van de gisten. Colonsuspensie met uitsluitend gisten werd bekomen door toediening van ciprofloxacine (100 mg volume%). Dit anti-bioticum wordt gebruikt voor een preoperatieve decontaminatie van de darm. Eliminatie van gisten, respectievelijk bacteriën had tot doel te achterhalen welke organismen precies verantwoordelijk zijn voor de biotransformatie van PAK's.

Na 4 dagen incubatie van een mix van PAK's in de SHIME suspensie steeg het maximaal signaal in de estrogene test van 0,12 (vegetariër); 0,86 (cycloheximide); 0,92 (ciprofloxacine); 3,21 (80 jaar); 5,02 (29 jaar) tot 5,86 (10 maanden) (Fig. 23). Deze resultaten impliceren dat het aantal omzettingsproducten of de bindingsaffiniteit van de omzettingsproducten voor de ER toeneemt naarmate de leeftijdsklasse verjongt. De darmmicrobiota van de baby en de volwassene in deze studie leverden een sterk estrogeen signaal. De intensiteit van dit signaal daalt met 37 % bij een 80-jarige ten opzichte van een volwassene. De darmmicrobiota van een vegetariër gaf slechts een ruissignaal rond de detectielimiet wat de afwezigheid of de geringe bindingsaffiniteit van omzettingsproducten inhoudt. Een andere samenstelling van de darmmicrobiota kan hiervan de oorzaak zijn. Na het doseren van cycloheximide in de SHIME suspensie werd een maximale estrogene respons van 0,86 bekomen. Dit betekent dat, na uitschakeling van de gisten in de darmsuspensie, de resterende bacteriën in staat zijn om omzettingsproducten te vormen uit de oorspronkelijke PAK's en dat deze componenten bovendien kunnen binden op de ER. Evenwel bedraagt de maximale estrogene respons 0,92 na toedienen van ciprofloxacine aan de SHIME suspensie. Het buiten spel zetten van bacteriën levert dus een hoger maximum signaal. Ondanks het kleine verschil, kan hieruit met enige voorzichtigheid besloten worden dat colongisten meer bekwaam zijn om PAK-transformatieproducten te vormen of tenminste meer omzettingsproducten met een estrogene werking.

Samenvattend moet vermeld worden dat deze resultaten afkomstig zijn van een eenmalig experiment en dus zeker nog bevestiging behoeven. Bovendien werd enkel de variabiliteit tussen verschillende leeftijdsklassen in rekening gebracht en niet de mogelijke variaties tussen leeftijdsgenoten.



### 3.7 Anti-estrogeen effect

Naast een estrogeen effect, kunnen de transformatieproducten van PAK's tevens een anti-estrogeen effect uitoefenen. Er bestaan 2 types anti-estrogene stoffen. Sommige zijn in feite zwakke estrogene stoffen die binden op de ER. De binding is echter zo zwak dat geen estrogene activiteit kan geïnduceerd worden. Deze componenten blokkeren de estrogene bindingsplaatsen en voorkomen op deze manier dat estrogene componenten binden op de ER en vervolgens estrogene activiteit induceren. Het andere type anti-estrogeen werkt volgens een mechanisme dat nog niet volledig is opgehelderd. Deze component verhindert de estrogeen geïnduceerde effecten van een estrogene component (Safe, 1994).

Spiken van SHIME + BaP met EE2 (6,8 µg/L) zorgt voor een daling van het estrogeen signaal van 4,85 naar 0,39 bij toenemende concentraties BaP (Fig. 24). Bij SHIME + mix daalt het estrogeen signaal van 4,29 naar 0,06 bij toenemende concentratie mix (Fig. 25). Hoge concentraties van beide componenten belemmeren dus de binding van EE2 op de estrogene receptor. Tran *et al.* (1996) rapporteerde reeds het anti-estrogeen effect van PAK's in een gisttest. Onderzoek van Hirose *et al.* (2001) toonde aan dat 8-OH BaP, in de aanwezigheid van 17β-estradiol, de productie van β-galactosidase inhibeerde. Vermits de celgroei hierdoor niet werd aangetast, kon gesteld worden dat 8-OH BaP een anti-estrogeen is.

Via welk mechanisme dit gebeurt is echter nog niet duidelijk. Brzozowski *et al.* (1997) bestudeerde de kristalstructuur van de hER gecomplexeerd met 17β-estradiol en van de hER gecomplexeerd met het anti-estrogeen raloxifeen. Hieruit bleek dat de positie van de "raloxifeen-bindingscomplex helix 12" interfereerde met de binding van de co-activator. De positie van de helix 12 met 17β-estradiol of genisteïne opende echter de co-activator bindingsplaats op de receptor.

## 4 SOS chromotest

De voorbije 10 jaar werden verschillende bioassays ontwikkeld om genotoxiciteit te testen. De Ames test, de SOS chromotest, de Umu-test, de Vitotox en de komeetttest zijn hier voorbeelden van. In dit onderzoek werd de SOS chromotest aangewend om de genotoxische eigenschappen van PAK's te bestuderen. Deze test detecteert DNA beschadiging door de inductie van het bacteriële SOS repair systeem. Deze genotoxiciteitstest, ontwikkeld door Quillardet *et al.* (1982) en aangepast door Mersch-Sundermann *et al.* (1991), werd tijdens het onderzoek voor dit eindwerk succesvol gewijzigd voor toepassing op 96-microwell platen. Als standaard werd 4-nitroquinoline-N-oxide (NQO) gebruikt. Deze genotoxische stof vertoont een inductiefactor (IF) van 4,34 aan een concentratie van 29,7 mg NQO/L (Fig. 26). Bij de testcomponenten stijgt de IF van 0,92 voor antraceen tot 1,24 voor benzo(a)pyreen (Fig. 27). Het criterium om het signaal van een component positief te beschouwen, verschilt naargelang de auteur (Dayan *et al.*, 1987; Mersch-Sundermann *et al.*, 1992; Ruiz & Marzin, 1997; Jolibois *et al.*, 2003). In het onderzoek van Jolibois *et al.* (2003) werd een stof als inducer voor het SOS repair systeem beschouwd indien de IF hoger was dan 1,5; de  $\beta$ -galactosidase activiteit significant toenam ten opzichte van de negatieve controle, het resultaat reproduceerbaar was en er een dosis-respons relatie was. Op basis hiervan zou kunnen besloten worden dat de geteste PAK's en OH-PAK's geen DNA beschadigen. Evenwel werd in de test van Jolibois *et al.* (2003) steriel gedestilleerd water zonder *E. coli* PQ37 als negatieve controle gebruikt. In dit onderzoek werd DMSO met *E. coli* PQ37 als negatieve controle gebruikt. De berekende inductiefactor komt dus sowieso lager te liggen wanneer de laatste methode wordt gevolgd ( $IF = R(x)/R(0)$ ). Verder onderzoek moet uitwijzen of PAK's en in het bijzonder biotransformatieproducten van PAK's daadwerkelijk een genotoxisch karakter hebben. Hiervoor moeten op zijn minst 2 testen uitgevoerd worden. Zowel bij lagere organismen (bacteriën) als bij hogere organismen (gisten, visembryo's, humane witte bloedcellen) moet genotoxiciteit worden getest alvorens evaluatie mogelijk is. Interlaboratoriumstudies, uitgevoerd door Corbisier en Barcelo (2000), hebben aangetoond dat een klein verschil in de testcondities van een specifieke test, evenals een verschil in interpretatie van de resultaten een grote invloed heeft op de eindconclusie, zelfs voor identieke testen. Na het uitvoeren van verschillende genotoxiciteitstesten met standaardstoffen, bevelen deze onderzoekers volgende testen aan: SOS chromotest, Vitotox en Umu test.

## 5 Besluit en suggesties voor verder onderzoek

In dit eindwerk werden de risico's, verbonden aan ingestie van PAK-gecontamineerde bodem, aan de hand van 3 bioassays onderzocht.

In een eerste bioassay, de aryl hydrocarbon test, werd de bindingsaffiniteit van PAK's voor de humane aryl hydrocarbon receptor (AhR) bepaald. Aanvankelijk werd gewerkt met zuivere oplossingen van PAK's en OH-PAK's, in een volgende stap werden de maag-, duodenum- en colondigestie van een verontreinigde bodem getest. De testresultaten toonden aan dat zowel PAK's, OH-PAK's als PAK-bodemdigesties een positieve respons leverden in de aryltest. Hieruit kon besloten worden dat PAK's en PAK-derivaten in staat zijn om te binden op de AhR. Deze binding impliceert dat in de in vivo situatie biotransformatiereacties mogelijk zijn. Dergelijke reacties kunnen op hun beurt leiden tot de vorming van carcinogene of estrogene biotransformatieproducten.

De tweede bioassay, de yeast estrogenic screen (YES), werd aangewend om de estrogene of anti-estrogene capaciteit van PAK's te bepalen. Afhankelijk van de interactie van de PAK-derivaat met de estrogene receptor (ER), oefent deze stof een agonistische of een antagonistische estrogene werking uit. Het toepassen van de test op PAK's leerde dat deze componenten geen estrogeen karakter vertonen. Colondigesties op PAK-gecontamineerde bodemstalen en OH-PAK's leidden echter wel tot estrogene signalen. Hierbij dient vermeld te worden dat correctie werd gemaakt voor de matrixeffecten in de SHIME suspensie. PAK's geïncubeerd in SHIME suspensie leverden eveneens een estrogene respons. Dit gaf aanleiding tot het vermoeden dat PAK's in de colon kunnen gebiotransformeerd worden door de darmmicrobiota en dat de gevormde omzettingsproducten kunnen binden op de ER. Dit vermoeden werd bevestigd door de detectie van PAK-hydroxyderivaten, bekend om hun estrogene eigenschap, via HPLC-MS. De estrogene respons van PAK's geïncubeerd in SHIME suspensie werd sterker naarmate het fecaal inoculum voor de opstart van de SHIME van een jongere leeftijdsklasse afkomstig was. Bij incubatie van PAK's in SHIME suspensie van een vegetariër bleef het estrogeen signaal onder de detectielimiet. Deze resultaten waren echter afkomstig van een eenmalig experiment en behoeven dus zeker nog herhaling. Verder onderzoek is derhalve vereist om de invloed van de microbiële samenstelling op de biotransformatie van PAK's te begrijpen. Het toedienen van ciprofloxacine of cycloheximide aan de SHIME suspensie voor het inhiberen van respectievelijk bacteriën en fungi, gevolgd door een incubatie van PAK's, leverde een hoger signaal bij de afwezigheid van bacteriën.

Uitgaande van deze resultaten is er een aanwijzing dat fungi ofwel meer omzettingsproducten kunnen vormen, ofwel omzettingsproducten met een hogere bindingsaffiniteit voor de ER. Een PAK-bevattend SHIME staal leverde na spiken met EE2 een lagere estrogene respons dan zuiver EE2. Dit was te wijten aan het inhiberend effect van de PAK op de binding van EE2 voor de estrogene receptor. Hiermee kon de anti-estrogene werking van sommige PAK's aangetoond worden.

Een derde bioassay, de SOS chromotest, werd gebruikt om DNA beschadiging door PAK's op te sporen. Deze genotoxiciteitstest stond nog niet op punt voor toepassing op 96-multiwell platen. In dit eindwerk werd deze bioassay met succes geoptimaliseerd. De positieve controle 4-nitroquinoline-N-oxide (NQO) bracht een inductiefactor (IF) van 4,34 teweeg wat in dezelfde lijn lag van de resultaten uit de literatuur. Enkele van de geteste PAK's en OH-PAK's gaven eveneens een signaal, zij het beperkt, in de SOS chromotest.

Verder onderzoek moet uitwijzen welke omzettingsproducten precies gevormd worden in de colonsuspensie. Hiervoor zou HPLC (high performance liquid chromatografie) met NMR (nuclear magnetic resonance) kunnen gecombineerd worden. Om te bepalen welke microbiota de biotransformatiereacties doorvoeren, zou de *spray plate* techniek kunnen aangewend worden. De vraag of PAK-transformaties in de colon afhankelijk zijn van de leeftijdsklasse vereist herhalingen per leeftijdsklasse. In een verder fase zou kunnen geopteerd worden om na te gaan of deze biotransformaties een effect kunnen veroorzaken *in vivo*

## HOOFDSTUK 5 : REFERENTIELIJST

ABBOTT, B.D. *et al.* (1994). Ah receptor in embryonic mouse palate and effects of TCDD on receptor expression. *Toxicology and applied pharmacology*, 126, 16-25.

ABDELSALAM, E.B. (1987). Organophosphorus compounds. II. Metabolic considerations. *Veterinary research communications*, 11, 589-597.

ALEXANDER, M. (2000). Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental science and technology*, 34, 4259-4265.

ANKLEY, G.T. *et al.* (1994). Influence of ultraviolet light on the toxicity of sediment contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental toxicology and chemistry*, 13, 1791-1796.

AREY, J. *et al.* (1992). Bioassay-directed fractionation of mutagenic PAH atmospheric photooxidation products and ambient particulate extracts. *Mutation research*, 281, 67-76.

AURA, A.M. *et al.* (2002). Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 1725-1730.

BASTA, N. & GRADWOHL, R. (2000). Estimation of Cd, Pb, and Zn bioavailability in smelter-contaminated soils by a sequential extraction procedure. *Journal of Soil Contamination*, 9(2), 149-164.

BASU, D.K. & SAXENA, J. (1978). Polynuclear aromatic hydrocarbons in selected US drinking waters and their raw water sources. *Environmental science and technology*, 12, 795-798.

BAUER, J.E. & CAPONE, D.G. (1985). Effects of four aromatic pollutants on microbial glucose metabolism and thymidine incorporation in marine sediments. *Applied and environmental microbiology*, 49, 828-835.

BEDESSEM, M.E. *et al.* (1997). Naphthalene mineralization coupled to sulphate reduction in aquifer-derived enrichments. *FEMS microbiology letters*, 152, 213-218.

BENDER, S. & SADIK, O.A. (1998). Direct electrochemical immunosensor for polychlorinated biphenyls. *Environmental science and technology*, 32, 788-797.

BOCK, K.W. *et al.* (1990). Induction of drug metabolism by xenobiotics. *Xenobiotica*, 11, 1101-1111.

BOWLING, J.W. *et al.* (1983). Acute mortality of anthracene-contaminated fish exposed to sunlight. *Aquatic toxicology*, 3, 79-90.

- BRAUZE, D. *et al.* (1997). Effect of the route of benzo[a]pyrene administration on sister chromatid exchange and DNA binding in bone marrow of mice differing with respect to cytochrome P450 1A1 induction. *Toxicology letters*, 91(3), 211-217.
- BRZOWSKI, A.M. *et al.* (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature (London)*, 389, 753-758.
- CALLAHAN, M.A. *et al.* (1979). Water-related environmental fate of 129 priority pollutants. EPA 4401479-029(a and b), NTIS (report no. 13.065, vol. 2), USA.
- CANET, R. *et al.* (2001). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. *Biosource technology*, 76, 113-117.
- CAJTHAML, T. *et al.* (2002). Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection. *Journal of chromatography A*, 974, 213-222.
- CHALOUPKA, K. *et al.* (1995). Induction of Cyp1a-1 and Cyp1a-2 gene expression by a reconstituted mixture of polynuclear aromatic hydrocarbons in B6C3F1 mice. *Chemico-biological interactions*, 96, 207-221.
- CLARKE, M.L. *et al.* (1981). *Veterinary Toxicology*. Baillière Tindall, London.
- COATES, J.D. *et al.* (1996). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulphate-reducing conditions. *Applied and environmental microbiology*, 62, 1099-1101.
- COLBORN, T. *et al.* (1993). Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental health perspectives*, 101, 378-384.
- COLOMBO, J.C. *et al.* (1996). Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolytic fungi. *Environmental pollution*, 94, 355-362.
- CONNELY, J.C. & BRIDGES, J.W. (1988). Species variation in target organ toxicity. In: *Target organ toxicity*. CRC Press Inc., Boca Raton, p. 89-120.
- COOPER, R.L. & KAVLOCK, R.J. (1997). Endocrine disrupters and reproductive development: a weight-of-evidence overview. *Journal of endocrinology*, 152, 159-166.
- CORBISIER, P. & BARCELO, D. (2000). Conclusions of the BIOSSET technical workshop on genotoxicity biosensing, Mol, Belgium.
- COULOMBE, R.A. (1993). Biological actions of mycotoxins. *Journal of dairy science*, 76, 880-891.

- CURTIS, G.P. *et al.* (1986). In: DAVIS, J.A. *et al.* Geochemical processes at mineral surfaces. American chemical society, Washington DC, p. 191-216.
- DAVID, B. & BOULE, P. (1993). Phototransformation of hydrophobic pollutants in aqueous media I-PAHs adsorbed on silica. *Chemosphere*, 26, 1617-1630.
- DAVIS, D.L. & BRADLOW, H.L. (1995). Can environmental estrogens cause breast cancer? *Science (Amerika)*, 273, 167-172.
- DAYAN, J. *et al.* (1987). Application of the SOS chromotest to 10 pharmaceutical agents. *Mutation research*, 187, 55-66.
- DEBOEVER, P. *et al.* (2000). Protective effect of bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* against bile salt cytotoxicity. *Applied microbiology and biotechnology*, 53, 709-714.
- DEBOEVER, P. *et al.* (2001). Optimization of a yeast estrogen screen and its applicability to study the release of estrogenic isoflavones from soygerm powder. *Environmental health perspectives*, 109, 691-697.
- DELAUNOIS, P. *et al.* (1991). Métabolisme et toxicité pulmonaire des pesticides chez les mammifères. *Annales de médecine vétérinaire*, 135, 157-174.
- DESBROW, C. *et al.* (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent: 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental science and technology*, 32, 1549-1558.
- D'HAESE, I. (2000). Pharmaceuticals in the environment: focus on 17 alpha ethinylestradiol. International seminar day. Technological institute section on environmental technology. Conference proceedings.
- DORMAN, D.C. & BEASLEY, V.R. (1991). Neurotoxicology of pyrethrin and the pyrethroid insecticides. *Veterinary and human toxicology*, 33, 238-243.
- EVANS, W.C. (1977). Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. *Nature (London)*, 270, 17-22.
- FALKENBERG, J.A. *et al.* (2002). Kilder til jordforurening med tjaere, herunder benzo(a)pyren I Danmark. Miljøprojekt 728.
- FARRINGTON, J. *et al.* (1986). Organic matter and biomarkers in the Peru upwelling area surface sediments-early diagenesis in a protodepositional environment. Abstract of papers of the American chemical society, 192, 93.
- FENT, K. (1996). Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical reviews in toxicology*, 26, 1-117.
- FERNANDEZ-SALGUERO, P.M. *et al.* (1996). Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2, 3, 7, 8 -tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 140, 173-179.

- FERTUCK, K.C. *et al.* (1999). Interaction of PAH-related compounds with the  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms of the estrogen receptor. *Toxicology Letters*, 121, 167-177.
- FLAOYEN, A. & JENSEN, E.G. (1991). Microsomal enzymes in lambs and adult sheep, and their possible relationship to alveld. *Veterinary research communications*, 15, 271-278.
- FOUCHECOURT, M.O. *et al.* (1999). Assessment of the bioavailability of PAHs in rats exposed to a polluted soil by natural routes : induction of EROD activity and DNA adducts and PAH burden in both liver and lung. *Environmental research section*, 80, 330-339.
- GALA, W.R. & GIESY, J.P. (1992). Photo-induced toxicity of anthracene to the green alga, *Selenastrum capricornutum*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 32, 103-132.
- GAUTHIER, T.D. *et al.* (1987). Effects of structural and compositional variations of dissolved humic materials on pyrene KOC values. *Environmental science and technology*, 21(3), 243-248.
- GESKES, G.G. *et al.* (1984). De grote medische encyclopedie in 15 delen, deel 4, voedingsleer, het maagdarmkanaal, de hulporganen van het maagdarmkanaal, rectum en anus. Uitgeverij HeideLand N.V., Hasselt, p.95-121.
- GIBSON, G.G. & SKETT, P. (1994). *Introduction to drug metabolism*. Blackie academic & professional, London.
- GOLDSTEIN, L.S. (2001). To BaP or not to BaP? That is the question. *Environmental health perspectives*, 109(8), 356-357.
- GOLDSTEIN, L.S. *et al.* (1998). Tumors and DNA adducts in mice exposed to benzo[a]pyrene and coal tars: implications for risk assessment. *Environmental health perspectives*, 106, 1325-1330.
- GONZALEZ, F.J. (1989). The molecular biology of cytochromes P450s. *Pharmacological reviews*, 40, 243-288.
- GRAM, E. *et al.* (1986). The metabolism of xenobiotics by certain extrahepatic organs and its relation to toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 26, 259-291.
- GREENBERG, B.M. *et al.* (1993). Quantitative structure activity relationships for the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to duckweed-A preliminary model. In: GORSUCH, J.W. *et al.* *Environmental toxicology and risk assessment: second volume*. American society for testing and materials, Philadelphia, p. 369-378.
- HACK, A. & SELENKA, F. (1996). Mobilization of PAH and PCB from contaminated soil using a digestive tract model. *Toxicology letters*, 88, 199-210.



- HANKINSON, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. Annual review of pharmacology and toxicology, 35, 307-340.
- HATZINGER, P.B. & ALEXANDER, M. (1995) Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. Environmental science and technology, 29(2), 537-545.
- HEALY, J.B. & YOUNG, L.Y. (1979). Anaerobic degradation of eleven aromatic compounds to methane. Applied and environmental microbiology, 38, 84-89.
- HERBES, S.E. & SCHWALL, L.R. (1978). Microbial transformations of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and petroleum-contaminated sediments. Applied environmental microbiology, 35, 306-316.
- HEXT, P.M. (1994). Current perspectives on particulate induced pulmonary tumors. Human and experimental toxicology, 13, 700-715.
- HEYMAN, J. & SMOUT, L. (1998). Milieuwetboek-Vlarem II bijlagen band 2. Kluwer rechtswetenschappen België, Antwerpen.
- HIROSE, T. *et al.* (2001). Estrogenic/antiestrogenic activities of benzo[a]pyrene monohydroxy derivatives. Journal of health science, 47(6), 552-558.
- HUANG, X.-D. *et al.* (1993). Impacts of UV radiation and photomodification on the toxicity of PAHs to the higher plant *Lemna gibba* (duckweed). Environmental toxicology and chemistry, 12, 1067-1077.
- HUANG, X.D. *et al.* (1995). Toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the duckweed *Lemna gibba* L. G-3 in natural sunlight. Ecotoxicology and environmental safety, 32, 194-200.
- ILETT, K.F. *et al.* (1990). Metabolism of drugs and other xenobiotics in the gut lumen and wall. Pharmacology and therapeutics, 46, 67-93.
- JIN, Z.W. *et al.* (1999). Bioavailability of freshly added and aged naphthalene in soils under gastric pH conditions. Environmental toxicology and chemistry, 18, 2751-2758.
- JOLIBOIS, B. *et al.* (2002). Glutaraldehyde in hospital wastewater. Archives of environmental contamination and toxicology, 42, 137-144.
- KAISER, J.P. & HANSELMAAN, K.W. (1982). Fermentative metabolisms of substituted monoaromatic compounds by a bacterial community from anaerobic sediments. Archives of microbiology, 133, 185-194.
- KARTHIKEYAN R. & BHANDARI A. (2001). Anaerobic biotransformation of aromatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in soil microcosms: a review. Journal of hazardous substance research, 3, 1-19.

- KATO, R. & YAMAZOE, Y. (1992). Sex-specific cytochrome P450 as a cause of sex- and species-related differences in drug toxicity. *Toxicology letters*, 64-65, 661-667.
- KATZ, M. *et al.* (1979). Relative rates of photochemical and biological oxidation (in vitro) of polynuclear aromatic hydrocarbons. In: JONES, P.W. and LEBER, P. Polynuclear aromatic hydrocarbons. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Michigan, p. 171-189.
- KEELING, P.I. & SMITH, L.L. (1982). Relevance of NADPH depletion and mixed disulphide formation to the mechanism of cell damage following paraquat administration. *Biochemical pharmacology*, 31, 3243-3251.
- KETTERER, B. & MULDER, G.J. (1990). Glutathione conjugation. In: Conjugation reactions in drug metabolism. Taylor & Francis Ltd., London, p. 307-364.
- KNUPP, C.A. *et al.* (1987). Comparative *in vitro* metabolism of T-2 toxin by microsomes prepared from Phenobarbital-induced or control rats, mice, rabbits and chickens. *Food and chemical toxicology*, 25, 859-865.
- KUILMAN, M.E. *et al.* (2000). Inhibition of aflatoxin M1 production. *Veterinary quarterly*, 22, 30-35.
- LANDRUM, P.F. *et al.* (1992) Variation in the bioavailability of polycyclic aromatic-hydrocarbons to the amphipod diporeia (spp) with sediment aging. *Environmental toxicology and chemistry*, 11, 1197-1208.
- LEE, M.D. *et al.* (1984). Microbial degradation of selected aromatics in a hazardous waste site. *Developments in industrial microbiology*, 25, 557-565.
- LEIPELT, M. *et al.* (2001). Glucosylceramide synthases, a gene family responsible for the biosynthesis of glucosphingolipids in animals, plants and fungi. *The journal of biological chemistry*, 276, 33621-33629.
- LEVIN, W. *et al.* (1982). Oxidative metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons to ultimate carcinogens. *Drug metabolism review*, 13, 555-580.
- LOVLEY, D.R. *et al.* (1989). Oxidation of aromatic compounds coupled to microbial iron reduction. *Nature*, 339, 297-299.
- MC CONKEY, B.J. *et al.* (1993). Photodegradation pathways of selected polycyclic aromatic hydrocarbons exposed to solar radiation. Proceedings, Ontario ministry of the environmental and energy technology transfer conference, Toronto, p. 60.
- MCLACHLAN, J.A. (1993). Functional toxicology – a new approach to detect biologically-active xenobiotics. *Environmental health perspectives*, 101, 386-387.
- MCNALLY *et al.* (1998). Biodegradation of three- and four-ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions. *Environmental science and technology*, 32, 2633-2639.

- MEANS, J.C. *et al.* (1980). Sorption properties of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. *Environmental science and technology*, 14, 1524-1528.
- MENICHINI, E. (1992). Urban air-pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons-levels and sources of variability. *Science of the total environment*, 116(1-2), 109-135.
- MERSCH-SUNDERMANN, V. *et al.* (1991). Sources of variability of the *Escherichia coli* PQ37 genotoxicity assay (SOS chromotest). *Mutation research*, 252, 51-60.
- MERSCH-SUNDERMANN, V. *et al.* (1992). Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Escherichia coli* PQ37. *Mutation research*, 278, 1-9.
- MIHELICIC, J.R. & LUTHY, R.G. (1988a). Degradation of polycyclic aromatic compounds under various redox conditions in soil-water systems. *Applied and environmental microbiology*, 54(5), 1182-1198.
- MIHELICIC, J.R. & LUTHY, R.G. (1988b). Microbial degradation of acenaphthene and naphthalene under denitrification conditions in soil-water systems. *Applied and environmental microbiology*, 54(5), 1188-1198.
- MIHELICIC, J.R. & LUTHY, R.G. (1991). Sorption and microbial-degradation of naphthalene in soil-water suspensions under denitrification conditions. *Environmental science and technology*, 25(1), 169-177.
- MILLER, C.A. (1999). A human aryl hydrocarbon receptor signaling pathway constructed in yeast displays additive responses to ligand mixtures. *Toxicology and applied pharmacology*, 160, 297-303.
- MIRANDA, C.L. *et al.* (1998). Evaluation of chemicals as inhibitors of trout's cytochrome P450. *Toxicology and applied pharmacology*, 148, 237-244.
- MITSUOKA, T. (1978). *Intestinal bacteria and health*. Harcourt brave jovanovich, Tokyo.
- MIYAZAKI, S. (1991). Effect of chemicals on glutathione peroxidase of chick liver. *Research in veterinary science*, 51, 120-122.
- MOLLY, K. *et al.* (1993). Development of A 5-step multichamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Applied microbiology and technology*, 39, 254-258.
- MOSHA, R.D. (1993). The toxicology of organophosphorus insecticides : a review. *Veterinary bulletin*, 63, 1039-1050.
- MULDER, G.J. *et al.* (1990). Glucuronidation. In: *Conjugation reactions in drug metabolism*. Taylor & Francis, London, p. 51-105.

- NEAL, G.E. (1998). Participation of animal biotransformation in mycotoxin toxicity. *Revue de médecine vétérinaire*, 149, 555-560.
- NEBBIA, C. *et al.* (1997). The comparative effects of the subchronic administration of triphenyltin acetate (TPTA) on the hepatic and renal drug-metabolizing enzymes in rabbits and lambs. *Veterinary research communications*, 21, 117-125.
- NEBBIA, C. *et al.* (1999). Triphenyltin acetate-mediated *in vitro* inactivation of rat liver cytochrome P450. *Journal of toxicology and environmental health part A*, 56, 433-447.
- NEBBIA, C. (2001). Biotransformation enzymes as determinants of xenobiotic toxicity in domestic animals. *The veterinary journal*, 161, 238-252.
- NEBERT, D.W. *et al.* (1993). Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Annual of academic sciences*, 685, 624-640.
- NEWSTED, J.L. & GIESY, J.P. (1987). Predictive models for photoinduced acute toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna*, Strauss (Cladocera, Crustacea). *Environmental toxicology and chemistry*, 6, 445-461.
- NIKOLAOU, K. *et al.* (1984) Sources and chemical reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbons in the atmosphere-A critical review. *Science of the total environment*, 32, 103-132.
- OOMEN, A.G. *et al.* (2000). Mobilization of PCBs and lindane from soil during *in vitro* digestion and their distribution among bile salt micelles and proteins of human digestive fluid and the soil. *Environmental science and technology*, 34, 297-303.
- OOMEN, A.G. *et al.* (2002). Comparison of five *in vitro* digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environmental Science and Technology*, 36, 3326-3334.
- ORIS, J.T. & GIESY, J.P. (1985). The photoinduced toxicity of anthracene to juvenile sunfish (*Lepomis spp.*). *Aquatic toxicology*, 6, 133-146.
- PAUL, E.A. & CLARK, F.E. (1996). Anaerobic degradation of benzene in BTEX mixtures dependent on sulphate reduction. *FEMS microbiology letters*, 145, 433-437.
- PAVLOSTATHIS, S.G. & JAGLAL, K. (1991). Desorptive behaviour of trichloroethylene in contaminated soil. *Environmental science and technology*, 25(2), 274-279.
- PHILLIPS, P. *et al.* (1994). Mineralization of naphthalene, phenanthrene, chrysene, and hexadecane with constructed silage microbial mat. In: HINCHEE, R.E. *et al.* *Applied biotechnology for site remediation*. CRC Press, New York.

- PIGNATELLO, J.J. (1989). In: Soils and sediments in reactions and movements of organic chemicals in soil. Soil science society of America. Sawhney B.L. and Brown K., Madison, p. 45-80.
- POLAND, A. & KNUTSON, J.C. (1982). 2, 3, 7, 8- Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: Examination of their mechanism of toxicity. Annual review of pharmacology and toxicology, 22, 517-554.
- QUILLARDET, P. *et al.* (1982). SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity. Natl acad sciences, Washington, 79(19), 5971-5975.
- REHEUL, D. (2000). Cursus plantaardige productiesystemen, hoofdstuk 8, p. 4.
- REN, L. *et al.* (1996). Photoinduced effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on *Brassica napus* (canola) during germination and early seedling development. Ecotoxicology and environmental safety, 33, 73-80.
- REN, L. *et al.*(1994). Photoinduced toxicity of three polycyclic aromatic hydrocarbons (fluoranthene, pyrene and naphthalene) to the duckweed *Lemna gibba* L. G-3. Ecotoxicology and environmental safety, 28, 160-171.
- RISER-ROBERTS, E. (1998). Remediation of petroleum-contaminated soils: biological, physical, and chemical processes. Lewis publishers, Boca Raton, p. 542.
- ROCKNE, K.J. & STRAND, S.E. (1998). Biodegradation of bicyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in anaerobic enrichments. Environmental science and technology, 32, 3962-3967.
- ROCKNE, K.J. *et al.* (1999). Naphthalene degradation and mineralization by nitrate-reducing and denitrifying pure cultures. In bioremediation technologies for polycyclic aromatic hydrocarbon compounds, Battelle Press, Columbus. p. 191-196.
- ROCKNE, K.J. *et al.* (2000). Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate reducing conditions. Applied and environmental microbiology, 66(4), 1595-1601.
- ROUTLEDGE, E.J. & SUMPTER, J.P. (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Environmental toxicology and chemistry, 15, 241-248.
- ROUTLEDGE, E.J. *et al.* (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. Environmental science and technology, 32, 1559-1565.
- RUIZ, M.J. & MARZIN, D. (1997). Genotoxicity of six pesticides by Salmonella mutagenicity test and SOS chromotest. Mutation research, 390, 245-255.
- SAFE, S. (1994). Environmental estrogens: fact of fiction. American council on science and health, 6, 4.

- SAFE, S. *et al.* (1997). Human exposure to endocrine-active chemicals: Hazard assessment problems. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 26, 52-58.
- SCHMIDT, J.V. & BRADFIELD, C.A. (1996). Ah receptor signaling pathways. *Annual review CELL DEV. BIOL.*, 12, 55-89.
- SCHOENY, R. *et al.* (1988). Metabolism of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons, by photosynthetic algal species. *Mutation research*, 197, 289-302.
- SEDMAN, R.M. & MAHMOOD, R.J. (1994). Soil ingestion by children and adults reconsidered using the results of recent tracer studies. *Journal of the air and waste management association*, 44(2), 141-144.
- SHARPE, R.M. & SHAKKEBAEK, N.E. (1993). Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*, 341, 1392-1395.
- SHARPE, R.M. (1998). The roles of oestrogen in the male. *Trends of endocrinol metabolism*, 9, 371-377.
- SHIARIS, M.P. (1989). Seasonal biotransformation of naphthalene, phenanthrene, and benzo[a]pyrene in surficial sediments. *Applied environmental microbiology*, 55, 1391-1399.
- SICILIANO, S. *et al.* (2002). Physicochemical: molecular and biomimetic devices for measuring bioavailability. SETAC short course, Salt Lake City, USA.
- SINGH, N.P. *et al.* (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 184-191.
- SONNENSCHN, C. & SOTO, A.M. (1998). An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 65, 143-150.
- SUTTER, T.R. *et al.* (1991). Targets for dioxin: Genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin-1 beta. *Science*, 254, 415-418.
- SZURDOKI, F. *et al.* (1996). Development of an enzyme immunoassay for *Alternaria alternata* fsp *lycopersici* toxins. *Immunoassays for residue analysis ACS symposium series*, 621, 330-340.
- TIMBRELL, J.A. (1982). *Principles of biochemical toxicology*. Taylor & Francis, London.
- TRAN, D.Q. *et al.* (1996). The anti-estrogenic activity of selected polynuclear aromatic hydrocarbons in yeast expressing human estrogen receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 229, 102-108.
- VANDAMME, E.J. (2000). *Cursus algemene microbiologie*, hoofdstuk 4, C, p. 112-114.

- VANDEWIELE, T.R. *et al.* (2003). Analysis of PAH hydroxylates, formed *in vitro* in the human gastrointestinal tract. *In progress for Journal of Chromatography*.
- VERSCHUEREN, K. (2001). Handbook of environmental data on organic chemicals. John Wiley & Sons, New York.
- VERSTRAETE, W. and TOP, E. (2000). Cursus microbiel ecologische processen, deel C, hoofdstuk 1, p. 14-16.
- VINCENT, J.H. (1990). Aerosol sampling science and practice. Chemical engineering science, 45, 1655.
- WEVERS, M. *et al.* (2001). Milieu- en natuurrapport Vlaanderen, Achtergronddocument 2001, 2.2 Verspreiding van producten van onvolledige verbranding (POV's) en PCB's, deel POV's. Vlaamse Milieumaatschappij.
- WHITE, J.C. *et al.* (1997). Factors affecting sequestration and bioavailability of phenanthrene in soils. Environmental toxicology and chemistry, 16, 2040-2045.
- WHITLOCK, J.P. *et al.* (1996). Cytochromes P450 5: induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription. FASEB journal, 10, 809-818.
- WILSON, J.T. *et al.* (1985). Influence of microbial adaptation on the fate of organic pollutants in groundwater. Environmental toxicology and chemistry, 4, 721-726.
- WINTER, R.B. *et al.* (1989). Efficient degradation of trichloroethylene by a recombinant Escherichia coli. Biotechnology, 7, 282-285.
- WODZINSKI, R.S. & COYLE, J.E. (1974). Physical state of phenanthrene for utilization by bacteria. Applied microbiology, 27, 1081-1084.
- YUAN, S.Y. *et al.* (2000). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. Chemosphere, 41, 1463-1468.
- ZAMPIERON, N.D. (1999). Phytoestrogens: a plant defensive strategy? Journal of naturopathic medicine, 2, 1.
- ZEPP, R.G. & SCHLOTZHAUER, P.F. (1979). Photoreactivity of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in water. In: JONES, P.W. & LEBER P. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. Arbor Science, Ann Arbor, Michigan, p.141-158.
- ZHANG, X. & YOUNG, L.Y. (1997). Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. Applied and environmental microbiology, 63(12), 4759-4764