

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

Vorgelegt von

Diplom-Biologin Kerstin Ulrich

aus: Schorndorf

Tag der mündlichen Prüfung:.....

**Gentoxische, mutagene und immunmodulatorische
Wirkung von Feinstaubextrakten einer Industrieanlage**

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Braunbeck
Dr. Lothar Erdinger

Danksagung

An dieser Stelle will ich versuchen all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, mit meinem Dank zu vermitteln was mir ihre Unterstützung in den letzten Jahren bedeutet hat. In diesen 3 Jahren habe ich mit vielen Menschen gearbeitet und Unterstützung von vielen Seiten bekommen. Bitte verzeiht, wenn ich Euch nicht alle aufzählen kann!

Die vorliegende Arbeit wurde in einer Industriekooperation durchgeführt. Daher unterliegen große Teile der Geheimhaltung. Um die Geheimhaltung nicht zu verletzen, sei an dieser Stelle allgemein allen Menschen gedankt, die zum Gelingen und der Finanzierung des Projektes beigetragen haben. Die letzten Jahre waren großartig!

Ein ganz herzliches Dankeschön an Herrn Prof. Braunbeck, der es mir ermöglicht hat diese Arbeit am zoologischen Institut der Universität Heidelberg anzufertigen. Für sein offenes Ohr bei Problemen, der Bereitschaft zu Projektbesprechungen einige Kilometer zu fahren und die fachliche Unterstützung, ohne die das Projekt in dieser Form nicht möglich gewesen wäre, vielen lieben Dank!

Ein ganz herzlicher Dank auch an Herrn Dr. Erdinger für die Übernahme des Co-Referats, der mit seinem fachlichen Rat bei Projektbesprechungen das Thema immer wieder von verschiedenen Seiten beleuchtete und mir die am Hygiene-Institut durchgeführten Tests ermöglichte. Auch für seinen Rat ein herzliches Dankeschön!

Die angenehme Arbeitsatmosphäre im zoologischen Institut erhellte den gelegentlich etwas stressigen Laboralltag erheblich. Ein ganz besonderer daher Dank an Lisa Baumann, Melanie Böttcher, Steffi Grund, Steffen Keiter, Thomas Kosmehl, Eva Lammer, Florian Schmidt, Nadja Schweitzer, Paula Soares-Rocha und Kirsten Wendler für die stetige Unterstützung und gute Laune.

Ohne Ulrike Diehl, Susanne Keiter und Katharina Schneider wäre die Durchführung dieser unglaublichen Anzahl an Bio-Assays nicht möglich gewesen. Insbesondere in den letzten Wochen vor Abschluss habt ihr unglaubliche Arbeit geleistet! Danke!

Aus dem Hygiene-Institut sei Blanka Novak und Kornelia Hornisch für die Unterstützung beim Ames-Test gedankt und Dr. Holger Bartz für seine Unterstützung und seinen fachlichen Rat bei den immunologischen Tests. Auch Aline Gierschke und Sabine Wölfle sei für die Hilfe bei unzähligen ELISAs gedankt.

Für seine liebevolle Unterstützung, vor allem in der letzten Zeit, danke ich meinem Ehemann Markus. Ohne die Momente des Glücks und der Entspannung in seiner Nähe, ohne seinen Rat und das Korrekturlesen hätte ich in der Zeit vor der Abgabe die Arbeit nicht mit dem notwendigen Abstand betrachten können.

Meiner Familie sei an dieser Stelle für ihre finanzielle und moralische Unterstützung während meines Studiums gedankt. Meiner Mutter Dr. Heidrun Dette-Schaudt und ihrem Ehemann Dr. Stephan Dette danke ich für ihr medizinisches und allgemeines Wissen, das mir nicht nur bei dieser Arbeit geholfen hat. Meinem Vater Rainer Schaudt und seiner Lebensgefährtin Helga Willerscheid danke ich für die wiederholte herzliche Aufnahme während meiner Aufenthalte in der Nähe meiner Probenahme und lustige Abende; meinen Geschwistern Melanie Schaudt und Christian Dette für den Zusammenhalt in Krisenzeiten. Ein ganz besonderer Dank auch an meine verstorbene Großmutter Irmgard Pöpl, die mich in jungen Jahren sehr geprägt hat. Vielen Dank an euch alle für das manchmal etwas chaotische, aber doch sehr intakte Familienleben!!!

Zusammenfassung / Abstract

1	Einleitung.....	1
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Probenahme.....	15
	2.1.1 <i>High Volume Sampler DHA-80</i>	15
	2.1.2 <i>Filter</i>	15
2.2	Aufbereitung der Proben.....	16
2.3	Testsysteme.....	17
	2.3.1 <i>V79 Zellen (Chinese Hamster Lung)</i>	17
	2.3.2 <i>Human Bronchial Epithelia Cells</i>	17
	2.3.3 <i>Salmonella typhimurium</i>	18
	2.3.4 <i>Metabolische Aktivierung</i>	18
2.4	Cytotoxizitätstest mit der Zelllinie V79	19
	2.4.1 <i>Durchführung</i>	19
	2.4.2 <i>Auswertung</i>	20
2.5	MTT - Assay mit der Zelllinie Beas2B	20
	2.5.1 <i>Durchführung</i>	20
	2.5.2 <i>Auswertung</i>	20
2.6	Comet - Assay mit der Zelllinie V79.....	21
	2.6.1 <i>Durchführung</i>	21
	2.6.2 <i>Auswertung</i>	23
2.7	Mikrokerntest mit der Zelllinie V79.....	25
	2.7.1 <i>Durchführung</i>	25
	2.7.2 <i>Auswertung</i>	26
2.8	Ames-Test mit <i>Salmonella typhimurium</i>	27
	2.8.1 <i>Durchführung</i>	27
	2.8.2 <i>Auswertung</i>	27
2.9	ELISA mit der Zelllinie Beas2B.....	28
	2.9.1 <i>Durchführung</i>	29
	2.9.2 <i>Auswertung</i>	29
2.10	Chemische Analysen.....	30
	2.10.1 <i>Trennung nach Säure/Basen-Eigenschaften</i>	30
	2.10.2 <i>Gaschromatographie mit Massenspektrometrie</i> <i>Kopplung (GC-MS)</i>	30
	2.10.3 <i>Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem</i> <i>Plasma (ICP-MS)</i>	31

3	Ergebnisse	33
3.1	Ergebnisdarstellung und -bewertung	33
3.1.1	<i>Expositionsszenarien</i>	33
3.1.2	<i>Darstellung und Bewertung der Bioassays</i>	34
3.2	Prozessketten der Anlagen A und B	35
3.2.1	<i>Partikelkonzentrationen</i>	35
3.2.2	<i>Prozesskontrollen</i>	38
3.2.3	<i>Bestimmung der Cytotoxizität</i>	39
3.2.4	<i>Comet-Assay</i>	42
3.2.5	<i>Mikrokerntest</i>	45
3.2.6	<i>Ames - Test</i>	54
3.2.7	<i>Immunologische Untersuchungen</i>	59
3.2.8	<i>ICP-MS - Analysen</i>	64
3.3	Fraktionierung nach Säure - Base Eigenschaften	70
3.3.1	<i>Prozesskontrollen</i>	70
3.3.2	<i>Cytotoxizität</i>	71
3.3.3	<i>Mikrokerntest</i>	73
3.3.4	<i>GCMS Analysen</i>	80
3.4	Immissionsmessung	87
3.4.1	<i>Meteorologie und Partikelkonzentrationen</i>	87
3.4.2	<i>Feldkontrollen</i>	93
3.4.3	<i>Cytotoxizität</i>	93
3.4.4	<i>Comet-Assay</i>	93
3.4.5	<i>Mikrokerntest</i>	95
3.4.6	<i>Ames - Test</i>	102
4	Diskussion	109
4.1	Ermittlung des ökotoxikologischen Potenzials entlang der Prozesskette von Anlage A	109
4.1.1	<i>Gentoxisches Potenzial der Prozessproben (Szenario 1)</i>	109
4.1.2	<i>Einfluss der Partikelkonzentration auf die Wirkung der Prozessproben in Anlage A (Szenario 2)</i>	115
4.1.3	<i>Identifizierung wirksamer Verbindungen durch chemische Fraktionierung ausgewählter Proben</i>	119
4.1.4	<i>Zusammenfassung der Bewertung der Luftqualität in der Prozesskette in Anlage A</i>	122
4.2	Äquivalente Messungen in Anlage B im Vergleich zu Anlage A	123
4.2.1	<i>Gentoxisches Potenzial der Prozessproben aus Anlage B im Vergleich zu Anlage A (Szenario 1)</i>	123
4.2.2	<i>Einfluss der Partikelkonzentration auf die Wirkung der Prozessproben aus Anlage B im Vergleich zu Anlage B (Szenario 2)</i>	129
4.2.3	<i>Identifizierung wirksamer Verbindungen durch chemische Fraktionierung ausgewählter Proben</i>	132
4.2.4	<i>Zusammenfassung der Bewertung der Luftqualität in der Prozesskette in Anlage B im Vergleich zu Anlage A</i>	134

4.3	Immunmodulatorisches Potenzial der Prozessproben aus Anlage A und B.....	134
4.3.1	<i>Immunmodulatorisches Potenzial der Proben aus Anlage A</i>	135
4.3.2	<i>Immunmodulatorisches Potenzial der Proben aus Anlage B</i>	137
4.3.3	<i>Luftkeimmessungen in Anlage A und B</i>	138
4.3.4	<i>Vergleich der immunmodulatorischen Wirksamkeit mit dem Standardstaub SRM 1649a</i>	139
4.4	Einfluss der Abluft aus Anlage A und klimatischer Faktoren auf die Luftqualität der Stadt bei Anlage A.....	140
4.4.1	<i>Gentoxische Wirkung der Luftstaubproben aus der Immissionsmessung</i>	140
4.4.2	<i>Abhängigkeit der gentoxischen Wirkung von der Partikelkonzentration zur Zeit der Probenahme</i>	142
4.4.3	<i>Abhängigkeit der gentoxischen Wirkung von der Stickoxidkonzentration zur Zeit der Probenahme</i>	148
4.4.4	<i>Abhängigkeit der gentoxischen Wirkung von der Außentemperatur zur Zeit der Probenahme</i>	152
4.4.5	<i>Diskussion der Ergebnisse der Außenluftproben aus der Beprobung der Prozesskette in Anlage A und Vergleich mit den Ergebnissen aus der Immissionsmessung</i>	154
4.4.6	<i>Einfluss der Abluftemission der Anlage auf die Luftqualität der Stadt</i>	165
4.5	Diskussion der verwendeten Methoden und Bewertungskriterien auf die Fragestellungen.....	166
4.5.1	<i>Durchführung einer acetonischen Extraktion</i>	166
4.5.2	<i>Variabilität der Zelllinie V79 in den verwendeten Tests zur Gentoxizität im Vergleich zur Zelllinie RTL</i>	166
4.5.3	<i>Verwendung der Zelllinien RTL und V79 zur Untersuchung der gentoxischen Wirkung von Luftstäuben</i>	168
4.5.4	<i>Betrachtung der gewählten Bezugsszenarien zur Bewertung der Prozessproben und Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Lebewesen</i>	169
4.5.5	<i>Ökotoxikologische Bewertung der Anlagen</i>	170
4.6	Handlungsempfehlungen.....	170
4.6.1	<i>Kurzfristige Maßnahmen</i>	170
4.6.2	<i>Längerfristige Maßnahmen</i>	170
5	Ausblick.....	171
6	Literatur.....	173

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war die Ermittlung der Veränderung des ökotoxikologischen Potenzials von Stäuben im Prozess der beprobten Anlagen. Des Weiteren war es Bestandteil dieser Arbeit vergleichende Messungen an einer weiteren Anlage (Anlage B) durchzuführen, da sich die Anlagen durch ihre Einsatzmaterialien jedoch nicht durch die Verfahrenstechnik unterscheiden. Die Beeinflussung der Abluftfahne der Anlage A auf die Luftqualität der Stadt durch eine Immissionsmessung war ebenfalls ein wichtiger Teil dieser Studie.

Zur Ermittlung des Schädigungspotenzials wurden die gesammelten Staubproben acetonisch extrahiert und in verschiedenen Biotests (Comet - Assay, Mikrokerntest, Ames-Test, ELISA) auf ihre Wirksamkeit untersucht. Die Untersuchungen in Anlage A zeigten deutlich gentoxische Effekte in der Außenluft. Diese Effekte konnten durch die Luftaufbereitung (Filtrierung) aufgehoben werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass für die Wirksamkeit der Außenluft die chemische Zusammensetzung der Partikel verantwortlich ist, also die Qualität der Partikel. Auch in der Abluft konnte ein deutlich gentoxisches Potenzial nachgewiesen werden. Dieses Potenzial entstand dagegen durch die Quantität an organisch extrahierbarem Material, nicht durch deren Qualität.

Der Vergleich zu einer anderen Anlage (Anlage B) zeigte in der Außenluft und der gereinigten Luft eine ähnliche Wirksamkeit wie die äquivalenten Proben aus Anlage A. In der Abluft von Anlage B konnte jedoch in Anlagenteil II eine deutlich geringere Wirksamkeit nachgewiesen werden. Da der Hauptunterschied zwischen beiden Anlagen in den Einsatzmaterialien liegt, ist dies auf diese zurückzuführen.

Um zu ermitteln, ob die Abluft der Anlage A einen negativen Einfluss auf die Luftqualität der angrenzenden Stadt hat, wurde eine einjährige Immissionsmessung entlang der Hauptwindrichtung durchgeführt. Diese Messung ergab, dass die Abluft der Anlage bezogen auf die gemessenen Endpunkte keinen negativen Einfluss auf die Luftqualität hat. Jedoch wurden auch in diesen Proben gentoxische Effekte festgestellt. Diese Effekte konnten mit der Stickoxidkonzentration und der Außentemperatur korreliert werden. Die Effekte, die in der Außenluft und während der Immissionsmessung gemessen worden waren, sind daher durch den umliegenden Verkehr und eventuell durch den Betrieb von Hausfeuerungsanlagen während der kalten Jahreszeiten induziert. Chemische Analysen ergaben außerdem Hinweise auf eine eventuelle Quelle in der nahegelegenen Müllverbrennungsanlage.

Durch die gewonnenen Erkenntnisse wird für die gemessenen Endpunkte empfohlen, den Abluftkamin nicht mehr ohne geeignete Schutzmasken zu betreten und in längerfristigen Planungen verfahrenstechnische Möglichkeiten zur Verringerung der Staubfracht einzubringen und in Anlagenteil II auf die in Anlage B verwendeten Materialien umzustellen.

Abstract

The aim of this study was to determine whether the ecotoxicological potential of particulate matter changes within a specific plant ("Plant A"). Furthermore comparable samples from a different plant ("Plant B") were taken as these plants differ in their used materials but not in the process engineering. To evaluate the impact of the exhaust air of "Plant A" on the nearby city was also an important part of this study.

To determine the potential to induce damages the samples of particulate matter were extracted with acetone and tested for their effects in a variety of bioassays (Comet - Assay, Micronucleus-Assay, Ames-Test, ELISA). In "Plant A" clear genotoxic effects could be shown when testing the samples from ambient air. Those effects could be neutralized by the air filter system installed in the plant. It could also be shown that the chemical composition (the quality of the particles) is responsible for these effects. The exhaust air also showed a clear genotoxic potential. However, it could be shown that the quantity of extracted material not the quality was responsible for these effects.

The comparison to „Plant B“ revealed that the plants show an equal genotoxic potential in the ambient and the filtered air. The samples of part II in "Plant B" show much less genotoxic activity when comparing the results to the corresponding sample point in „Plant A“. As the main difference between the plants is the used material, this must be the reason for these differences.

To evaluate whether the exhaust air of „Plant A“ has a negative impact on the quality of the ambient air of the city, for one year an immission measurement along the main wind direction was performed. The results show that the exhaust air does not have a negative impact on the quality of the city air, regarding the evaluated endpoints. Nevertheless genotoxic effects caused by samples of this examination could be shown. These effects could be correlated with the temperature and the concentration of nitric oxide in the air at the time of sampling. The effects caused by the samples of the immission measurement are therefore generated by the surrounding traffic and possibly by home firing systems used during the cold season. The chemical analysis showed an indication that a possible source could also be the near garbage incineration plant.

The obtained results indicate that the vent stack should not be entered without the appropriate protective clothing. For long-term planning procedural changes to reduce the quantity of particulate matter the results of this study should be considered. In part II of "Plant A" according to this study the same material should be used as in "Plant B".

1 Einleitung

Die Verunreinigung der Luft ist seit dem Ablauf der Frist am 01.01.2005 zur Umsetzung der EU-Richtlinie 1999/30/EG über Grenzwerte für Schwefeldioxid, Stickstoffdioxid und Stickstoffoxide, Partikel und Blei in der Luft wieder zunehmend in das öffentliche Bewusstsein gerückt. Spätestens als im März 2005 bereits 26 Städte in Deutschland die vorgeschriebene Feinstaubkonzentration von $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ an mehr als den im Gesetz verankerten 35 Tagen im Jahr überschritten hatten, wurde die Diskussion um den Zustand der Luft allgegenwärtig. Da das Gesetz bei zu häufigen Überschreitungen Maßnahmen zur Feinstaubreduzierung vorschreibt wurde im März 2007 in vielen Städten die Feinstaubplakette eingeführt. Diese soll stark emittierende Fahrzeuge den Innenstädten, so genannten Umweltzonen, fern halten. Die Einführung dieser Plaketten löste weitere Diskussionen um die Qualität der Luft deutscher Städte aus.

Geschichte der Luftverschmutzung

Luftverschmutzung und deren Folgen sind jedoch kein Problem, das erst im letzten Jahrhundert aufgetreten ist. Bei der Untersuchung ägyptischer Mumien fanden sich Staublungen, die wahrscheinlich durch das trockene Klima und Sandstürme verursacht worden waren (Cockburn et al. 1975). Erste dokumentierte Beschwerden über Luftverschmutzungen finden sich aus dem alten Rom um 150 n. Christus. Dort heißt es, der Rauch aus den Öfen von Glasmachern sei so störend gewesen, dass diese gezwungen wurden, ihre Werkstätten in die Vororte von Rom zu verlagern (Douglas and Frank 1972). Weitere Hinweise auf gesundheitliche Probleme durch Luftverschmutzungen fand Shaw (1981) im Lungengewebe peruanischer Minenarbeiter, die durch die andauernde Belastung mit Mineralstäuben an Lungenerkrankungen (Pneumoconiose und Silicose) litten.

Aufgrund der Smog-Katastrophe 1952 in London ist die Geschichte der Luftverschmutzung in England gut untersucht. Bereits im England des 13. Jahrhunderts veranlasste die Verbrennung schwefelhaltiger Kohle Königin Eleanor, die Frau Henrys III., Schloss Nottingham zu verlassen. König Edward I. verbot 1272 den Gebrauch dieser Kohle unter Androhung der Todesstrafe (Brimblecombe 1976). Trotz des Versuchs, den Gebrauch der Kohle als Heizmaterial zu unterbinden, konnte er nicht gänzlich gestoppt werden. Eine ansteigende Nutzung fand zunächst bei den Armen statt, doch der Adel zog nach, als König James I., der in Schottland schon mit Kohle heizte, den Thron übernahm (Stowe 1598). In der „kleinen Eiszeit“ des 17. Jahrhunderts stieg der Verbrauch an Kohle weiter an, da nasses Wetter den Gebrauch von Brennholz unmöglich machte. Bereits 1662 schloss John Graunt in seinem demographischen Werk „Natural and Political Observations“, dass die hohe Todesrate im damaligen London in engem Zusammenhang mit der Verbrennung von Kohle und anderen Umständen durch das Leben in der Stadt stand (Brimblecombe 1999). Eine Theorie von Howe (1972) besagt, dass im 17. Jahrhundert häufig Krankheiten beschrieben wurden, die auf einen Vitamin D-Mangel zurückzuführen sein könnten, ausgelöst durch mangelndes UV-Licht an kalten verräuchten

Wintertagen. Nur wenige Jahre später wurden die ersten Verbindungen zwischen Luftverschmutzung und Krebs gezogen. Percival Pott's (1775) Beobachtungen werden als erstes Werk über berufliche Erkrankung an Krebs angesehen (Brimblecombe 1999). Die Erfindungen des nächsten Jahrhunderts brachten eine weitere Verschlechterung. Kamine wurden gebaut und die Abgase in die umliegenden Regionen verteilt, außerdem wurde die Dampflok erfunden, deren Rauch augenscheinlich nur die Pflanzen entlang der Schienen schädigte. Dennoch entwickelte sich langsam ein Bewusstsein für die Problematik der Luftverschmutzung, unter Thomas Percival wurde 1800 in Manchester zur Bekämpfung des Rauchs ein „Board of Health“ gegründet.

Eines der erschreckendsten Beispiele der Folgen von Luftverschmutzung stellt jedoch der „Great London Smog“ von 1952 dar. Der Begriff Smog wurde in dieser Zeit durch den Zusammenschluss der Worte „Smoke“ und „Fog“ kreiert und steht seither für eine durch Emissionen verursachte Luftverschmutzung, die hauptsächlich in Großstädten auftritt. Der „Great London Smog“ mit Sichtweiten von 1 Fuß (30 cm) hielt 5 Tage an und kostete nach Berechnungen zwischen 4000 und 12000 Menschen das Leben. Als Folge dieser Katastrophe wurde 1956 der „Clean Air Act“ mit Maßnahmen zur Bekämpfung der Luftverschmutzung erlassen.

Aktuelle Rechtsgrundlage

Auf europäischer Ebene ist die Luftqualitätsrahmenrichtlinie mit ihren Tochterraichtlinien maßgebend für die Anforderungen an die zu ergreifenden Maßnahmen zur Messung und Verbesserung der Luftqualität. Die Tochterraichtlinien enthalten dabei Alarm- und Grenzwerte sowie viele schadstoffspezifische Regelungen. Diese Richtlinien werden in Deutschland durch das Bundesimmissionsschutzgesetz (BImSchG) mit Verordnungen (BImSchV) umgesetzt (Koch 2002).

Luftverunreinigungen im Sinne dieses Gesetzes sind Veränderungen der natürlichen Zusammensetzung der Luft, insbesondere durch Rauch, Ruß, Staub, Gase, Aerosole, Dämpfe oder Geruchsstoffe (§ 3 BImSchG).

Das Bundesimmissionsschutzgesetz trat am 15.03.1974 in Kraft und wurde seither mehrfach geändert. Es hat nicht nur Schutzfunktion, sondern basiert besonders auf dem Vorsorgeprinzip, einem der drei Grundprinzipien des Umweltrechts (Vorsorge-, Verursacher- und Kooperationsprinzip) (Sandner 1998). Das Vorsorgeprinzip setzt auf die langfristige Sicherung der ökologischen Grundlagen durch schonenden Umgang mit den Ressourcen und vorausschauendem Handeln, um dem Entstehen möglicher Umweltbelastungen vorzubeugen (Schmidt 2001). Der Geltungsbereich des Gesetzes erstreckt sich auf technische Anlagen und Stoffe, Fahrzeuge aller Art und Verkehrswege, da von diesen schädliche Umwelteinwirkungen ausgehen können (Sandner 1998). Den Kern des Gesetzes bilden die Vorschriften über die Errichtung und den Betrieb genehmigungsbedürftiger Anlagen, die nach der 4. BImSchV definiert sind. Im Anhang dieser Verordnung sind die Anlagen, die zur Betreibung einer Genehmigung bedürfen, aufgelistet.

Neben den verpflichtenden EU-Richtlinien gibt es eine Reihe freiwilliger Verpflichtungen im Rahmen des Völkervertragsrechts, da Luftverunreinigungen an Grenzen nicht halt machen und eine internationale Zusammenarbeit erfordern. Zu nennen wären das Genfer ECE-Übereinkommen von 1979 über weiträumige grenzüberschreitende Luftverunreinigung, das Wiener Übereinkommen zum Schutz der Ozonschicht von 1985 und die Klimarahmenkonvention als Ergebnis der Weltklimakonferenzen von 1979 und 1988, konkretisiert durch das Kyoto-Protokoll von 1997 (Koch 2002). Um in Europa eine weitere Verbesserung der Luftqualität zu erreichen, wurden in der Feinstaub-Richtlinie (99/30/EG) vom 22. April 1999 Grenzwertregelungen für PM_{10} (Partikel $< 10 \mu m$) festgelegt, die von den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union einzuhalten sind. So soll zum einen der Tagesmittelwert für PM_{10} (Partikel mit aerodynamischen Durchmesser $< 10 \mu m$) ab dem 01. Januar 2005 maximal $50 \mu g/m^3$ betragen, wobei nur 35 Überschreitungen im Kalenderjahr zugelassen sind. Zum anderen soll der Jahresmittelwert für PM_{10} ab dem Jahr 2005 nicht höher als $40 \mu g/m^3$ sein.

Feinstaub

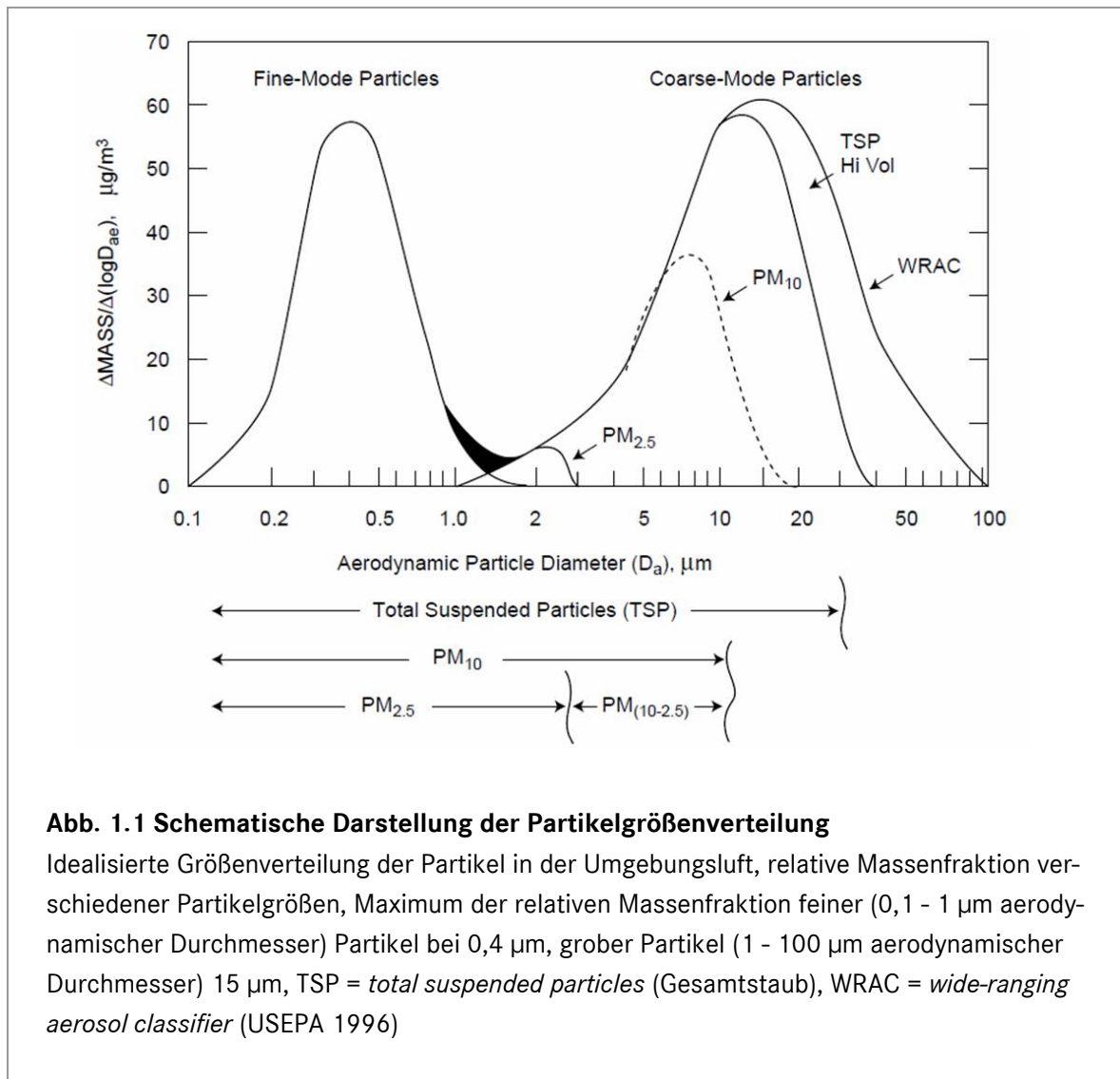
Staub ist eine komplexe Mischung aus organischen und anorganischen Substanzen, die flüssig oder fest sein können. Sind Partikel in ihrem Medium, verteilt ohne sofort wieder zu sedimentieren, bezeichnet man sie als Schwebstaub oder *Particulate Matter* (PM). Unter den Begriff „Feinstaub“ oder PM_{10} fallen nach der Definition der EU-Richtlinie (1999) alle

„Teilchen, die einen gröbenselektierenden Lufteinlass passieren, der für einen aerodynamischen Durchmesser von $10 \mu m$ eine Abscheidewirksamkeit von 50 % hat“.

Feinstaub kann nach dem Umweltbundesamt anhand seiner Größe weiter eingeteilt werden:

Ultrafeine Partikel:	Teilchen kleiner als $0,1 \mu m$
Feine Partikel:	Teilchen kleiner als $2,5 \mu m$ ($PM_{2,5}$)
Grobe Partikel:	Teilchen größer als $2,5 \mu m$, aber kleiner als $10 \mu m$ (PM_{10})

Abb. 1.1 zeigt eine Verteilungskurve der Masse von Staubpartikeln. Diese zeigt zwei Verteilungskurven innerhalb der Partikelgrößen 0,1 µm bis 100 µm. Die Verteilungskurve der feinen Partikel erreicht ihr Maximum bei ca. 0,4 µm, die Verteilungskurve der groben Partikel bei ca. 15 µm.



Im Folgenden werden die Entstehung dieser Partikel, ihre Verteilung und vor allem ihre Auswirkungen auf die Gesundheit näher betrachtet.

Feinstaubquellen

Laut Umweltbundesamt (2005) können Feinstäube sowohl durch anthropogenen Einfluss entstehen als auch einen natürlichen Ursprung haben. Beide Quellen wiederum lassen sich in primäre und sekundäre Quellen unterscheiden. Sekundäre Quellen setzen reaktionsfähige Gase frei, die sich über komplexe chemische Reaktionen in der Atmosphäre in sekundäre Staubteilchen umwandeln (Nukleation). Solche Gase sind Schwefeloxide (SO_2 , SO_3), Stickstoffoxide (NO , NO_2), Ammoniak (NH_3) und flüchtige Nichtmethankohlenwasserstoffe (NMVOC). Sie lagern sich leicht an feine Teilchen an, die sich bereits in der Atmosphäre befinden (sogenannte Kondensationskerne) und bilden so sekundäre Aerosole.

Beispiele für

Primäre natürliche Quellen:	Vulkane (ohne Gasemissionen), Meere (Seesalzaerosole in Küstenregionen), Bodenerosion in trockenen Regionen (Mineralstäube durch Verwitterung), Wald- und Buschfeuer, Pollen, Sporen, Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilze)
Sekundäre natürliche Quellen:	Gase aus Feuchtgebieten (CH_4), Vulkanen (SO_2 , H_2S , NH_3), Böden und Gewässer (SO_3 , NO_3 , N_2O)
Primäre anthropogene Quellen:	Verbrennungsanlagen zur Energieversorgung (Kraft- und Fernheizwerke), Abfallverbrennungsanlagen, Hausbrand (Gas, Öl, Kohle, Holz), Industrieprozesse (z.B. Metall-, Stahlerzeugung, Sinteranlagen), Schüttgutumschlag Straßenverkehr: Diesel-LKW und -PKW, Abrieb der Reifen, Bremsen und Kupplungsbeläge sowie der wieder aufgewirbelte Straßenstaub als so genannte diffuse Emissionen, Schienenverkehr, Schifffahrt, Luftverkehr
Sekundäre anthropogene Quellen:	Energieerzeugung, Industrie, Hausbrand (SO_2 , SO_3 , NO , NO_2), Landwirtschaft (NH_3), Lösemittelsinsatz, chemische Industrie, Petrochemie (NMVOC <i>non methane volatile organic compounds</i>)

(Umweltbundesamt 2005)

In Tab. 1.1 sind die Staubemissionen des Jahres 2002 laut Umweltbundesamt (2005) aufgelistet. Die Industrie hat dabei mit 45 % den größten Anteil an der Gesamtstaubemission in Deutschland.

Tab. 1.1 Gesamtstaubemission in Deutschland 2002

Ausgedrückt in Kilotonnen (kto) und prozentuaem Anteil am Gesamtausstoß (%)
(Umweltbundesamt 2005)

	Gesamtemission	Verbrennungsprozesse	Verkehr	Industrie	Schüttgutumschlag
kto	209	35	35	95	44
%	-	17 %	17 %	45 %	21 %

Ausbreitung von Feinstaub

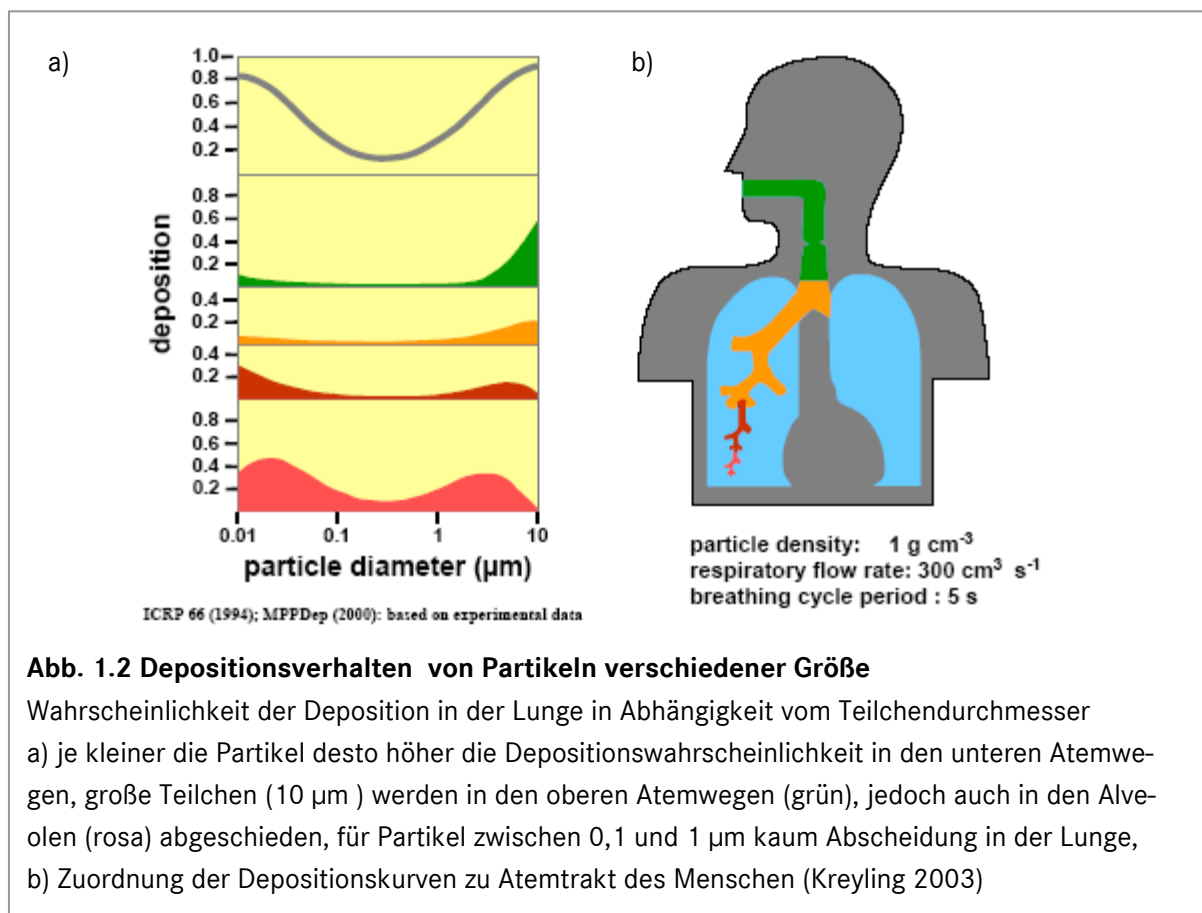
Die Ausbreitung der Partikel ist abhängig von ihrer Aufenthaltsdauer in der Luft. Diese wiederum hängt von der Größe der Partikel und den klimatischen Bedingungen ab. Partikel, die größer als 10 µm sind, sedimentieren unter Einwirkung der Schwerkraft relativ schnell, während kleinere Partikel 10 bis 30 Tage in der Atmosphäre verbleiben und durch Auswaschung, Deposition oder Trockenablagerung entfernt werden können. Während ihrer Zeit in der Atmosphäre können die Partikel über Tausende von Kilometern transportiert werden (Alloway and Ayres 1996). Der Scirocco (Wind aus Nordafrika) transportiert Saharasaand über das Mittelmeer mitunter bis Mitteleuropa (Hofrichter et al. 2002).

Partikel können jedoch nicht nur horizontal durch Winde transportiert werden, sondern auch vertikal mit aufsteigenden Luftmassen in die Troposphäre, je nach klimatischen Bedingungen sogar bis in die Stratosphäre aufsteigen und von dort aus horizontal weiterverteilt werden (auch als *long-range transport* bekannt). Eine große Rolle spielt dabei der vertikale Luftaustausch zwischen der planetarischen Grenzschicht (dünne Schicht der Atmosphäre, die mit der Erdoberfläche in Kontakt steht) und den höheren Schichten. Dieser Austausch kann durch die Ausbildung einer Inversionsschicht stark gestört werden. Inversionsschichten bilden sich aus, wenn die abfallende Luft eines Hochdruckgebiets sich stärker erwärmt als es dem adiabatischen Temperaturgradient (1 °C pro 100 m) entspricht. Sie bildet über der bodennahen Luft eine Schicht, die eine höhere Temperatur und damit eine niedrigere Dichte hat. Der Austausch zwischen der erdnahen kalten und daher dichteren Luft und der darüber liegenden warmen Luftschicht mit einer geringeren Dichte wird durch den Dichtegradienten verhindert. Schadstoffe können sich in der erdnahen Schicht anreichern und führen so zu den typischen regionalen Smogbildungen, die man aus Los Angeles oder San Francisco kennt (Alloway and Ayres 1996).

Wirkungen von Feinstaub

Bevor der Feinstaub seine Wirkung in der Lunge entfalten kann, müssen die Partikel in der Lunge abgeschieden werden. Für die Deposition eines Teilchens in der Lunge spielen vor allem die Dynamik der Teilchen, die Geometrie des Atemtrakts und die dort vorhandene Strömungsdynamik eine Rolle (Kreyling 2003).

In Abb. 1.2 ist die Depositionswahrscheinlichkeit der Partikel in der Lunge eines gesunden Menschen in Abhängigkeit zur Größe der Partikel nach Kreyling (2003) dargestellt. Die graue Kurve zeigt, dass das Minimum der Abscheidewahrscheinlichkeit bei einem Durchmesser von $0,5 \mu\text{m}$ liegt. Partikel dieser Größe scheinen zum größten Teil die Lunge durch das Ausatmen wieder zu verlassen. Größere Partikel scheiden sich vor allem in den oberen Atemwegen ab, während ultrafeine Partikel ($< 0,1 \mu\text{m}$) bis in die Alveolen der Lunge vordringen.



In der gesunden Lunge eines Nichtraucherers befinden sich pro Alveolus ca. 10 Makrophagen, die eine optimale Phagozytoserate bei Partikeln der Größe $1 - 2 \mu\text{m}$ leisten. Je kleiner die Partikel sind, umso schlechter werden sie phagozytiert. Durch die Alveolarmakrophagen werden ca. $1/3$ der unlöslichen Partikel in der Lunge entsorgt. Die restlichen $2/3$ der Partikel verbleiben auf dem Lungenepithel oder gelangen in den Blutkreislauf, über den sie im gesamten Organismus verteilt werden (Peters et al. 2002). Die Verteilung im Organismus kann in einzelnen Fällen sehr schnell von statten gehen. Oberdörster et al. (2002) zeigten, dass Kohlenstoffisotope (^{13}C), die eine Ratte inhaliert hatte, bereits nach einer halben Stunde in der Leber

nachweisbar waren. Ein statistisch signifikanter Unterschied des Anstiegs zur Negativkontrolle ergab sich nach 18 Stunden Exposition.

Setzen sich Partikel auf dem Lungenepithel ab, können sie dort Entzündungsreaktionen hervorrufen, die durch Freisetzung von Mediatoren zu einem prokoagulantem Zustand führen können. Dieser Zustand erhöht die Gefahr einer Thrombose und könnte eine mechanistische Erklärung für die erhöhte Mortalität von Patienten mit Herz-Kreislauf-Krankheiten bei erhöhten Feinstaubkonzentrationen sein (Borm 2003).

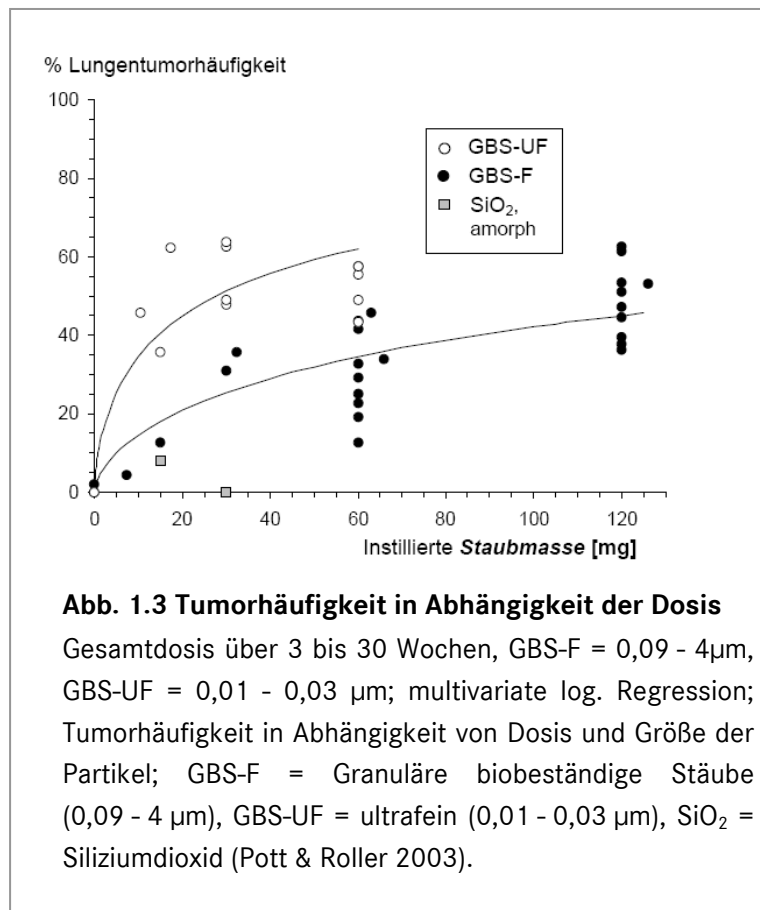
Nachdem im Jahr 1985 in Augsburg eine erhöhte Feinstaubkonzentration von $98 \mu\text{g}/\text{m}^3$ über einen Zeitraum von 13 Tagen gemessen wurde, führten Peters et al. (1997) und Koenig et al. (1997) verschiedene Studien über die Auswirkung dieser erhöhten Konzentration auf die Blutviskosität und Entzündungsparameter durch. Ergebnis der Studien von Peters war, dass durch die erhöhte Partikelkonzentration sowohl das Immunsystem angeregt als auch die Blutviskosität erhöht wurde. Peters et al. (2001) kamen zu dem Schluss, dass dies zu einem erhöhten Risiko einer Herz-Kreislauf-Erkrankung, die durch Luftverschmutzung gegeben sei, beitrage. Unterstützt wird diese Studie durch jene von Koenig et al. (1997), die zeigt, dass eine Erhöhung der Blutviskosität mit einem erhöhten Herzinfarktrisiko einhergeht. Zu dieser Zeit konnte eine erhöhte Partikelkonzentration nicht nur in Augsburg gemessen werden. Auch im Rhein-Ruhr-Gebiet kam es zu erhöhten Konzentrationen. Dies veranlasste Wichmann et al. (1989) zu einer Korrelation mit Krankenhauseinlieferungen. Er stellte fest, dass zu dieser Zeit die Krankenhauseinweisungen um 19 % erhöht waren, bei den Krankentransporten stellte er eine 25 %ige Erhöhung fest. Insbesondere war der Anstieg von Aufnahmen wegen Herzinsuffizienz (+ 30 %), Arrhythmien (+ 49 %) und zerebralen Durchblutungsstörungen (+ 57 %) bemerkenswert.

Neben diesen Kurzzeitwirkungen wurden zahlreiche Studien zu Langzeitwirkungen durchgeführt. Diese zeigen Zusammenhänge von Partikelkonzentrationen und Atemwegserkrankungen wie Bronchitis und anderen Infektionserkrankungen (Dockery et al. 1996; Heinrich et al. 2000; Peters et al. 1999b; Peters et al. 1999a; von Mutius et al. 1995).

Die Induktion von Lungenkrebs durch Feinstäube ist bei Überladung der Lunge durch Partikel erwiesen (Rödelsberger and Roller 2003). Dieses Phänomen ist wahrscheinlich auf eine Beeinträchtigung der alveolaren Makrophagen zurückzuführen. Durch chronische Entzündungen wird die Krebsentstehung wahrscheinlich sekundär unter Bildung von Sauerstoffradikalen sowie Zellproliferation ausgelöst (Rödelsberger and Roller 2003).

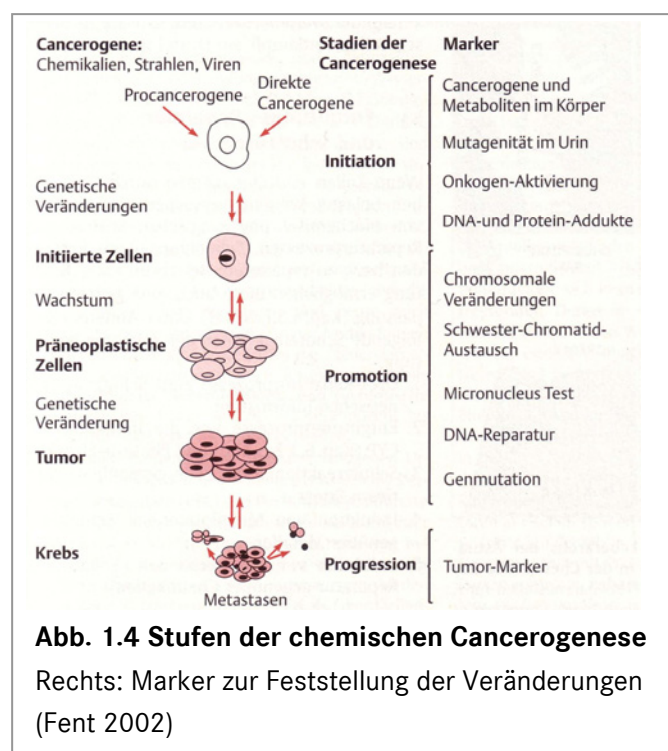
Pott und Roller (2003) zeigten, dass bereits instillierte¹ Gesamtstaubmengen von 10 mg in Rattenlungen eine Tumorraten von mehr als 10 % auslösen (Abb. 1.3). In ihren Untersuchungen wurde auch deutlich, dass die Größe der Partikel bei Kanzerogenität eine Rolle spielt.

¹ instillieren = langsame, tropfenweise Zugabe einer Lösung
eine nasale Applikation führt zur Deposition gelöster Partikel bis in die Lungenperipherie (Rückert 1999)



Den Zusammenhang zwischen erhöhten Partikelkonzentrationen und Lungenkrebs konnten auch Abbey et al. (1999) feststellen. Sie untersuchten von 1973 - 1992 Nichtraucher, die mindestens seit 10 Jahren in San Francisco, an der Südküste (Los Angeles oder östlicher) oder San Diego gelebt hatten. Sie fanden eine Beziehung zwischen den erhöhten Partikelkonzentrationen der Fraktion PM₁₀ an diesen Standorten und der Todesrate an Lungenkrebs.

Krebsentstehung kann sehr unterschiedliche Ursachen haben. Eine Ursache kann die Auslösung von Mutationen durch Einwirkungen von chemischen Stoffen auf die DNA sein. Die verschiedenen Stadien der chemischen Cancerogenese und den Markern zur Feststellung der Veränderungen der DNA sind in Abb. 1.4 dargestellt. Nach Fent (2002) sind 90 % aller mutagenen (erbgutverändernden) Stoffe auch cancerogen (krebsauslösend).



Um festzustellen, ob organische Verbindungen, die an die für diese Studie gesammelten Feinstäube gebunden sind, ein genotoxisches Potenzial haben, wurden die im Folgenden beschriebenen Tests durchgeführt.

Cytotoxizität

Cytotoxizitätstests sind Screeningtests, die die Überlebensrate belasteter Zellen bestimmen. Sie geben keine Auskunft über einzelne problematische Substanzen, jedoch über das Ausmaß des biologischen Schädigungspotenzials. Schadstoffkonzentrationen, bei der ein bestimmter Anteil an Zellen überlebt, können als Richtwert zur Berechnung der Konzentrationen für subletale Tests wie den Comet-Assay, den Mikrokerntest oder ELISAs verwendet werden.

In der vorliegenden Studie wurden zwei verschiedene Cytotoxizitätstests durchgeführt, der Neutralrottest (s. Kap. 3.4) und der MTT - Assay (s. Kap. 3.5).

Der Neutralrottest beruht auf der Aufnahme des wasserlöslichen, leicht basischen Farbstoffs Neutralrot (2-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin) in die Lysosomen intakter Zellen. Die Anreicherung des Neutralrots resultiert aus der Deprotonierung des Farbstoffs im sauren Milieu der Lysosomen oder einer Bindung an saure Moleküle der lysosomalen Matrix (Barile 1994; Bulychev et al. 1978; Segner 1998). Schädigungen der Zellmembran und der lysosomalen Membran führen zu einer verringerten Farbstoffretention die mittels einer photometrischen Messung bestimmt werden kann (Borenfreund and Puerner 1984).

Der MTT - Assay wurde von Mosmann (1983) als kolorimetrisches System zur Messung der Zahl lebender Zellen in Zellkultursystemen vorgestellt. Der Assay beruht auf einer enzymatischen Reduktion des Tetrazoliumsalses MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid) zu einem Formazan-Farbstoff. Die Farbstoffbildung wird photometrisch bestimmt und korreliert direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen in der Kultur.

Comet-Assay

Der Comet - Assay, auch Einzelzellgelelektrophorese genannt, wurde von Östling und Johanson (1984) entwickelt und von Singh et al. (1988) in der Säugertoxikologie etabliert. Der Test erlaubt eine bildliche Darstellung von DNA-Schäden in einzelnen Zellen (Fairbain et al. 1995).

Mit dem Comet-Assay lassen sich Einzel- und Doppelstrangbrüche, AP-Stellen (apurinische/apyrimidinische Stellen), Cross-links und die Intensität der zellulären Reparatur, ein indirektes Maß für die Bildung von DNA-Addukten nachweisen. Da die Durchführung des Tests mit fast jedem eukaryotischen Zelltyp möglich und vom Zellzyklus unabhängig ist, können DNA-Schäden sowohl in proliferierenden (Zellen im Teilungsstadium) als auch in nicht proliferierenden Zellen nachgewiesen werden (Schnurstein 2000).

Der Comet-Assay wird in der Medizin vielfach eingesetzt. Beispielsweise zur Untersuchung des Einflusses von Strahlung oder Chemikalien auf die DNA (Somorovska et al. 1999), oxidativen Stresses durch Krankheiten (Diabetes mellitus; Collins et al. 1998) und der Erkennung

von DNA-Schäden durch das Rauchen (Betti et al. 1994; Carnevali et al. 2003; Chen et al. 2004).

Doch auch in der Biologie findet der Comet-Assay inzwischen ein weites Anwendungsfeld in der Ökotoxikologie und im Biomonitoring. Bezogen auf die vorliegende Studie zur Anwendung des Comet-Assays auf Luftstäube sind exemplarisch die Arbeiten von Monarca et al. (2001), Gabelova et al. (2004), Karlsson et al. (2004), Lamy et al. (2004) und Shi et al. (2005) zu nennen.

Mikrokern-Test

Der Mikrokerntest wurde vor über 30 Jahren von Heddle (1973) und Schmid (1975) unabhängig voneinander vorgestellt. Er erlaubt die Detektion chromosomaler Schäden, ohne die Aberrationen in der Metaphase studieren zu müssen, und vermeidet dadurch enormen Laboraufwand. Der Test basiert auf der Ermittlung so genannter Mikrokerns und ist heute fest in der genetischen Toxikologie etabliert (Fenech 2000).

Um eine umfassende Beurteilung der Gentoxizität der Probe zu ermöglichen, wurde dieser Test zusätzlich zum Comet-Assay ausgewählt. Diese Vorgehensweise wird von Goethem et al. (1997) empfohlen, da der Comet-Assay auch reparable DNA Verletzungen aufzeigt, während der Mikrokerntest ausschließlich definitive Schäden identifiziert, die mindestens eine mitotische Teilung der Zelle überdauern haben. In Tabelle 1.2 sind die Hauptunterschiede der beiden gentoxischen Tests nach Goethem et al. (1997) zusammengefasst.

Tab. 1.2 Vergleich Mikrokerntest und Comet-Assay

Hauptunterschiede des Mikrokerntests und des Comet-Assays zur Einschätzung von DNA Schäden (nach Goethem et al. 1997)

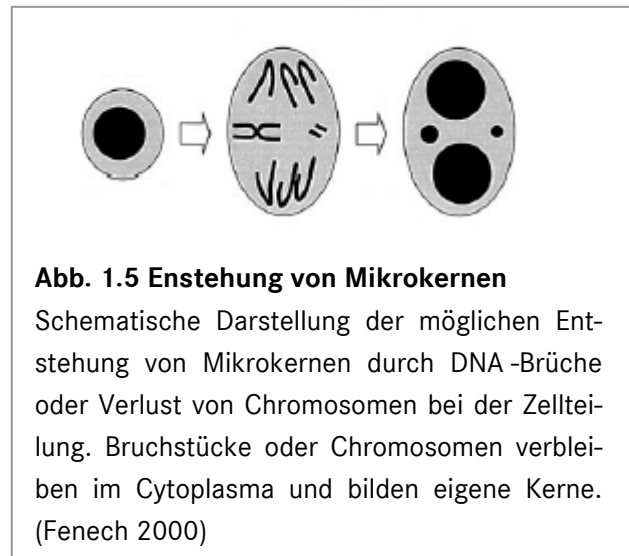
	Mikrokerntest	Comet - Assay
Endpunkte	Chromosom- / Genommutationen	DANN Schäden + Reparatur
Schaden	nicht reparabel	eventuell reparabel
Zellteilung	Notwendig	nicht notwendig
Belastungsdauer	mittel - lang (Stunden/Tage)	Kurz - mittel (Minuten/Stunden)
Apoptoseerkennung	möglich durch Zählen	Hinweis durch Tail Moment und Kometenform („hedgehogs“)
Aneuploidie	möglich durch FISH - Analyse	nicht möglich

Mikrokerns entstehen bei Zellteilungen, wenn die Chromosomen der Mutterzelle Bruchstücke ohne Centromer aufweisen und/oder Chromosomen nicht durch den Spindelapparat in der

Anaphase zu den Polen gezogen werden können (Al-Sabti and Metcalfe 1995). Diese Fragmente bzw. Chromosomen verbleiben im Cytoplasma und bilden in der Telophase eine eigene Kernhülle, die dieselbe Morphologie wie der Zellkern aufweist. Die Bildung einer eigenen Kernhülle von Chromosomen, die im Cytoplasma vorliegen ist, bei vielen Spezies in den ersten Entwicklungsstadien der larvalen Furchung bekannt (Lemaitre et al. 1998; Montag et al. 1988). Diese so genannten Karyomere erlauben eine Translation der Chromosomen noch während der Mitose, bevor die Karyomere in der Interphase unter Bildung einer gemeinsamen Kernhülle wieder verschmelzen (Lang 2002).

Entstehen diese Teilkern jedoch nicht während der Furchung, werden sie als „Mikrokerne“ bezeichnet. Diese Mikrokerne können sowohl einzelne Chromosomen als auch Chromosomenfragmente enthalten und stellen einen verlässlichen Parameter zur Ermittlung von DNA-Brüchen und Chromosomen-Verlust dar (Fenech 2000).

Abbildung 1.5 zeigt eine schematische Darstellung der möglichen Entstehung von Mikrokernen.



Ames-Test

Um ein Gesamtbild über das Schädigungspotenzial der Proben auf den verschiedenen Ebenen der Mutationen des Erbguts (Genommutation, Chromosommutation, Mutation der DNA-Sequenz) zu erhalten, wurde der prokaryotische Ames-Test zur Detektion der Veränderung der DNA-Sequenz hinzugezogen. Das Prinzip des Tests beruht darauf, dass die Reversionshäufigkeit von Histidin-auxotrophen (his^-) Mutanten von *Salmonella typhimurium* (s. Kap. 3.3.3) zu Histidinautotrophen (his^+) Bakterien in Abhängigkeit der Konzentration der zu untersuchenden Substanz bestimmt wird.

Der Ames-Test wurde in den siebziger Jahren von Bruce Ames und Mitarbeitern entwickelt (Ames 1972; McCann et al. 1975) und ist heute ein Routinetest zur Überprüfung mutagener Eigenschaften von Substanzen. Seine Anwendbarkeit auf die Untersuchung von Luftextrakten wurde in zahlreichen Studien bewiesen. Exemplarisch zu nennen wären hier die Arbeiten von Erdinger et al. (1997), Cerna et al. (1999), Monarca et al. (2001), Feilberg et al. (2002), Cassoni et al. (2003), Arlt et al. (2004) und Claxton et al. (2004).

Ames isolierte aus Mäusen 18 Histidinauxotrophe Stämme, von denen McCann et al. (1975) zwei durch Einbringen des pKM101-Plasmids zu den heute standardmäßig verwendeten Bakterienstämmen TA98 und TA100 transformierten (Kier et al. 1986; McCann et al. 1975). Diese beiden Stämme wurden auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Die Histidin-Auxotrophie hat in beiden Stämmen verschiedene Ursachen. Der Stamm TA 98 weist eine *frameshift*-Mutation auf, d.h. bei diesem Stamm wird die Histidinauxotrophie durch eine Verschiebung des Leserasters hervorgerufen. Im Stamm TA 100 ist eine Punktmutation verantwortlich, die eine Substitution der Aminosäure Leucin durch Prolin hervorruft (Maron and Ames 1983). Außer der Histidinauxotrophie weisen die Testbakterien weitere Mutationen auf. Die Mutation *rfa* sorgt für einen teilweisen Verlust der Lipopolysaccharidschicht, die die Bakterien umgibt und erhöht dadurch die Durchlässigkeit für große Moleküle (Ames et al. 1973). Die Mutation $\Delta uvrB$ schaltet das Excisionsreparatursystem aus und sorgt dadurch für eine erhöhte Sensitivität gegen mutagene Substanzen. Neben diesen Mutationen enthalten beide Stämme ein pKM101-Plasmid, das eine Tetracycline Resistenz enthält und außerdem die Schadenstoleranz bei der DNA-Synthese erhöht (Maron and Ames 1983).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Entzündungsreaktionen spielen eine wesentliche Rolle bei der Interaktion von Feinstäuben mit dem Lungenepithel und bei der Krebsentstehung. Daher wurde zur Beurteilung des proinflammatorischen Potenzials der Proben die Ausschüttung von Zytokinen ermittelt.

Zytokine werden bei einer Stimulierung des Immunsystems ausgeschüttet, vermitteln ihr Signal über spezifische Rezeptoren und können sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen haben (Nathan 1987, Vilcek und Lee 1991). Prototypen proinflammatorischer Zytokine in der Lunge sind die Interleukine Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8).

Da die Lunge nicht nur mit Stäuben in Kontakt kommt, sondern auch mit Mikroorganismen oder deren Bestandteilen (*pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs)), wurde für die vorliegende Studie ein Modellsystem entwickelt, um die gemeinsame Wirkung von Luftstaubextrakten und PAMPs auf Lungenepithelzellen zu untersuchen. Die Entwicklung des Modells soll wissenschaftlich veröffentlicht werden.

Chemische Analysen

Die Identifikation bestimmter Stoffe oder Stoffgruppen, die in komplexen Umweltproben für Effekte in Bioassays verantwortlich sind, stellt eine große Herausforderung der Umweltforschung dar. Verschiedene chemische Analysemethoden wurden bereits in einer Studie „Genotoxische organische Verbindungen in der Außenluft“ auf die partikulär gebundenen organischen Stoffe verschiedener Luftstäube angewendet (Erdinger et al. 1997). In dieser Studie wurden gaschromatographische, massenspektrometrische Analysen (GC-MS) und massenspektrometrische Untersuchungen mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) durchgeführt. Des Weiteren wurde eine Fraktionierung der Staubextrakte nach Säure/Base - Eigenschaften durchgeführt.

Das Prinzip der Gaschromatographie beruht auf der unterschiedlichen Retentionszeit verschiedener Substanzen an der Innenwand einer Kapillarsäule nach Überführung der Probe in die Gasphase. Dabei wird die Probe zunächst durch starkes Erhitzen verdampft und anschlie-

Bend in Kombination mit einem Inertgas in eine Kapillarsäule eingespritzt, deren Innenwand mit einer stationären Phase ausgekleidet ist. Je nach Polarität der Moleküle in der Gasprobe verweilen sie unterschiedlich lange auf der Säule, bevor sie vom Inertgas mitgerissen werden und vom Massenspektrometer detektiert werden. Durch schrittweises Erwärmen der Säule kann eine schnellere und präzisere Auftrennung erreicht werden.

Das Grundprinzip der Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) beruht auf der Ionisierung von Atomen in einem Stoffgemisch und deren anschließender Detektion in einem Massenspektrometer. Dazu wird Argon durch einen hochfrequenten Strahl ionisiert und die Probe auf über 5.000 °C erhitzt. Die dadurch entstandenen Ionen werden durch ein elektrisches Feld zum Massenspektrometer beschleunigt und dort erfasst (Bahrman 2007).

Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung

Die Motivation zur Untersuchung des ökotoxikologischen Schädigungspotenzials einer Industrieanlage lag in der besonderen Verantwortung der Industrie für seine Mitarbeiter und angrenzende Städte.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, die Veränderung des ökotoxikologischen Potenzials von Stäuben im Prozess einer Industrieanlage zu ermitteln. Des Weiteren war es Bestandteil dieser Arbeit, vergleichende Messungen in anderen Anlagen durchzuführen, zum Vergleich der Emissionen verschiedener Verfahrenstechniken. Die Ermittlung des Einflusses der Abluftfahne der Anlage auf die Luftqualität der angrenzenden Stadt durch eine Immissionsmessung war ebenfalls ein wichtiger Teil dieser Studie.

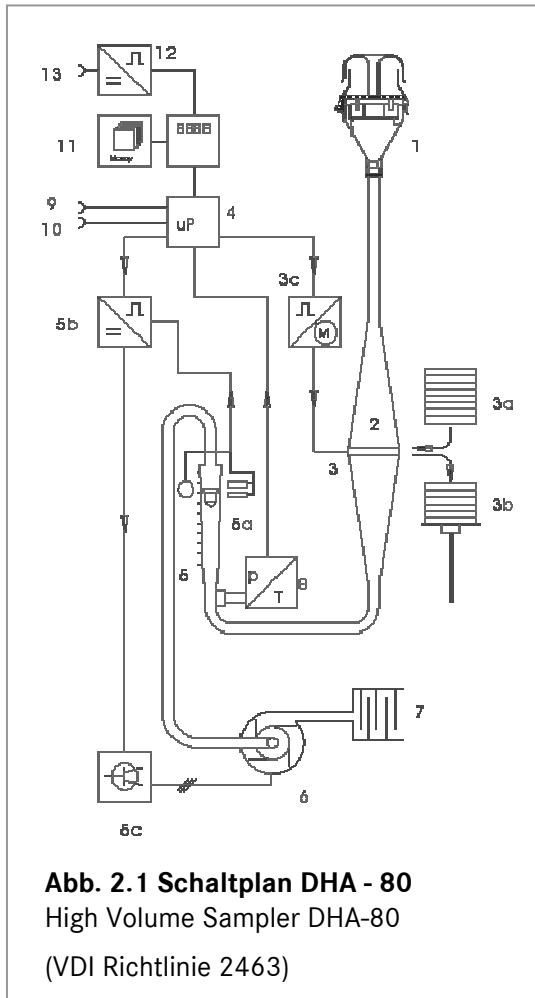
In der vorliegenden Arbeit galt es daher folgende Fragestellungen zu untersuchen:

- ⇒ Entsteht entlang der Prozesskette der beprobten Anlage ein ökotoxikologisches Potenzial?
- ⇒ Unterscheidet sich das ökotoxikologische Potenzial von Anlage A von dem in Anlage B durch die eingesetzte Verfahrenstechnik?
- ⇒ Beeinflusst die Emission der Anlage die Luftqualität der angrenzenden Stadt?

2 Material und Methoden

2.1 Probenahme

2.1.1 High Volume Sampler DHA-80



Die Probenahme erfolgte mit dem High Volume Sampler DHA-80 aus der Digital-Serie (Riemer, Hausen, Deutschland), dessen Schaltplan in Abbildung 2.1 dargestellt ist. Der DHA-80 sammelt in der Außenluft dispergierte Partikel auf Filter unter einem konstanten Volumenstrom. Der erfasste Partikelbereich wird durch die Wahl des Filters begrenzt. Durch Wiegen der Filter vor und nach der Messung kann die Konzentration der Partikel in der Luft bestimmt werden (VDI-Richtlinie 2002).

- | | | | |
|----|-------------------------|----|-------------------------|
| 1 | PM10 Vorabscheider | 5c | Frequenzumformer |
| 2 | Abscheidekammer | 6 | Saugturbine |
| 3 | aktueller Filter | 7 | Schalldämpfung |
| 3a | Filtervorrat | 8 | Druck & Temperatur |
| 3b | exponierter Filter | 9 | Druckerschnittstelle |
| 3c | Wechselelektronik | 10 | RS-232C Schnittstelle |
| 4 | Mikroprozessorsteuerung | 11 | PCMCIA Karte |
| 5 | Durchflussmesser | 12 | Blitzschutzprint |
| 5a | Durchflussabtastung | 13 | Winddaten Schnittstelle |
| 5b | Regelelektronik | | |

1, 11, 12 und 13 sind optional und waren bei dem verwendeten Gerät nicht installiert

2.1.2 Filter

Die Luftstäube wurden auf Glasfaserfilter (Fa. Machery - Nagel, Düren) beaufschlagt. Diese werden aus Borosilicatfasern gefertigt und sind chemisch beständig gegen die meisten organischen und anorganischen Lösungsmittel (ausgenommen Flusssäure). Die in dieser Studie verwendeten Filter MN 85/90 hatten einen Durchmesser von 15 cm, waren 0,4 mm dick und hatten ein Rückhaltevermögen von 0,5 μm . Dadurch konnte sichergestellt werden, dass auch Partikel $< 2,5 \mu\text{m}$ durch die Messung erfasst wurden. Um Effekte in den Biotests durch Rückstände in den Filtern auszuschließen, wurden regelmäßige Kontrollen durchgeführt. Dazu wurden Filter in die entsprechenden Halter eingelegt, in den Filtervorrat eingefügt, jedoch nicht mit Stäuben beaufschlagt. Die anschließende Aufbereitung der leeren Filter erfolgte analog zur Aufbereitung der Staubproben (s. Kap. 2.2).

2.2 Aufbereitung der Proben

Um die partikulär an die Staubteilchen gebundenen organischen Stoffe für die Biotests in eine flüssige Phase zu überführen, wurde eine organische Extraktion durchgeführt. Dies soll eine Ablösung organischer Stoffe beim Kontakt zwischen Partikel und Lunge simulieren.

Extraktionsablauf

In einer Soxhlet-Apparatur (Abb. 2.2), die aus einem Kolben mit dem Lösungsmittel (Wasser, Ethanol, Aceton, Dichlormethan oder Hexan) und 3 - 4 Siedesteinen, einem Extraktionsaufsatz und einem Rückflusskühler besteht, wird folgender Vorgang mehrmals wiederholt: Das Lösungsmittel im Kolben wird durch die Heizplatte erhitzt und verdampft teilweise. Das Gas steigt durch das Dampfleitungsrohr auf und kondensiert am Rückflusskühler. Es bilden sich Tropfen, die auf die Extraktionshülse, in der sich die Probe befindet, fallen. So wird das Extraktionsgut langsam aus der Probe gelöst. Durch die ständige Kondensation des Lösungsmittels steigt der Flüssigkeitsspiegel bis zur Biegung des Heberohrs. Auf Grund der dann auftretenden Saugheberwirkung wird die Flüssigkeit mit dem Extrakt in den darunter liegenden Kolben mit dem Lösungsmittel überführt.

Durch die wiederholte Rückführung des Kondensats reichern sich die abzutrennenden Stoffe im Kolben an (Hollert and Braunbeck 1997).

Durchführung

Die gesammelten Staubproben wurden direkt von den Filtern ohne weitere Aufbereitung extrahiert. Dazu wurden die Filter gefaltet und in eine Extraktionshülse (200 ml, Fa. Schleicher & Schuell) überführt. Um zu verhindern, dass die Probe durch das Lösungsmittel aus der Hülse geschwemmt wird, wurden die Proben mit Glaswolle abgedeckt. Aufgrund der hohen Extraktionsleistung bei geringer Umweltschädlichkeit wurde für die Extraktion Aceton verwendet (Hollert 2001). Die Filter wurden über 24 Stunden mit ca. 10 Zyklen pro Stunde extrahiert. Nach Beendigung der Soxhlet-Extraktion wurden die Proben im Rotationsverdampfer (300-500 mbar; 38 °C) auf ca. 3 - 4 ml eingeeengt. Die verbleibende Lösungsmenge wurde in verschließbare Reaktionsgefäße mit Teflondeckel aus Glas überführt und der Rundkolben drei Mal mit einer geringen Menge Aceton nachgespült. Anschließend wurden die Extrakte unter Stickstoff (N₂, 1,5 - 2 bar, leicht konkave Flüssigkeitsoberfläche) eingeeengt, um das restliche Aceton zu entfernen. Die eingeeengten Extrakte wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO, Fa. Serva,

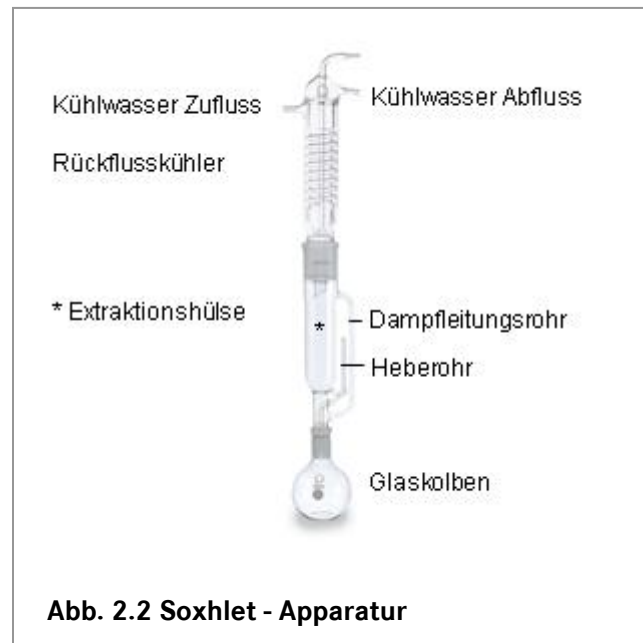


Abb. 2.2 Soxhlet - Apparatur

Heidelberg) rückgelöst und bei - 20 °C im Tiefkühlfach bis zur Weiterverwendung aufbewahrt. DMSO ist für Zellen in relativ hohen Konzentrationen untoxisch und löst keine Weichmacher aus Kunststoffen. Es verdampft nicht und somit bleiben die Konzentrationen erhalten.

2.3 Testsysteme

2.3.1 V79 Zellen (Chinese Hamster Lung)

Zur Untersuchung der Cytotoxizität im Neutralrottest (Kap. 2.4) und der Gentoxizität (Comet-Assay und Mikrokern-Test, Kap. 2.5 und 2.6) der Proben wurde die Dauerzelllinie V79 eingesetzt. Die Zelllinie wurde 2006 für einen Ringtest von der Firma CCR (Roßdorf, Deutschland) an teilnehmende Institute verteilt und auch für die vorliegende Studie verwendet.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in MEM Medium (Sigma Aldrich, München) mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS), Streptomycin und Penicillin (10.000 E/ml, 10.000 µg/ml in 0,9 % NaCl) in 80 cm²-Zellkulturflaschen (NunclonTM, Nunc, Langenselbold) bei einer Temperatur von 37 °C und 5 % CO₂.

Um die Zellen aus den Kulturflaschen herauszulösen wurde zunächst das Medium verworfen und die Zellen mit ca. 10 ml HBSS (Hanks' Balanced Salts, Sigma Aldrich, München) gewaschen. Dies verhindert, dass verbleibendes Medium die Wirkung des Trypsins hemmt. Zum Ablösen der Zellen wurden 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Sigma Trypsin-EDTA-Solution: 0,5 g/L porcine trypsin, 0,2 g/L EDTA x 4 Na; 1:200 in PBS) auf die Zellen pipettiert. Das Ablösen des matt erscheinenden Zell-Monolayers kann nach einigen Minuten deutlich beobachtet werden. Um die Wirkung des Trypsins zu stoppen, wurden 8 ml Medium zugegeben und die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und vereinzelt.

2.3.2 Human Bronchial Epithelial Cells

Um die Wirkung der Proben auf die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zu untersuchen, wurde die humane Zelllinie Beas2B eingesetzt. Diese wurde freundlicherweise von PD Dr. Dr. R. Bals, Klinik für Innere Medizin - Schwerpunkt Pneumologie, Philipps-Universität Marburg zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin) mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS), Streptomycin und Penicillin (10.000 E/ml, 10.000 µg/ml in 0,9 % NaCl) in 80 cm²-Zellkulturflaschen (NunclonTM, Nunc, Langenselbold) bei einer Temperatur von 37 °C und 5 % CO₂. Das Ablösen der Zellen erfolgte analog zur Zelllinie V79.

2.3.3 *Salmonella typhimurium*

Der Ames-Test (Kap. 2.8) wurde mit der Bakterienart *Salmonella typhimurium* (Erreger des Mäusetyphus) durchgeführt.

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in Nutrient Broth-Nährmedium unter Schütteln bei 37 °C für 10 h aus gefrorenen Stammkulturen gezüchtet. Dem Top-Agar wurde vor Testbeginn eine 10 %-ige Biotin/Histidin-Lösung zugegeben, um durch eine mehrmalige Teilung der Bakterien auch Promutagene zu erfassen und ein Anwachsen der Bakterien zu einem sog. Hintergrundrasen zu gewährleisten. Durch Erfassen des Hintergrundrasens konnte eine toxische Wirkung der Proben auf die Bakterien ausgeschlossen werden.

2.3.4 Metabolische Aktivierung

Weder die verwendeten Bakterien noch die Zelllinie V79 exprimieren das Enzymsystem Cytochrom P4501A, das die Bioaktivierung einer promutagenen Substanz herbeiführen könnte. Daher wurden Assays mit der Zelllinie V79 und *Salmonella typhimurium* in einem Ansatz mit einem Rattenleberhomogenat (S9-Mix) supplementiert. Zum Vergleich wurde ein weiterer Ansatz ohne Supplementation durchgeführt. Um die S9 Fraktion zu erhalten, werden Ratten polychlorierte Biphenyle (PCBs) injiziert (Czygan et al. 1973). Nach 5 Tagen werden die Ratten getötet, die Leber wird entfernt und nach Garner et. al. (1972) wird die S9 Fraktion durch Zentrifugation extrahiert (Maron and Ames 1983). Zur Abpufferung und Bereitstellung benötigter Energie für die Enzyme werden die in Tabelle 2.1 aufgelisteten Zugaben beigemischt.

Tab. 2.1 Zubereitung S9-Mix

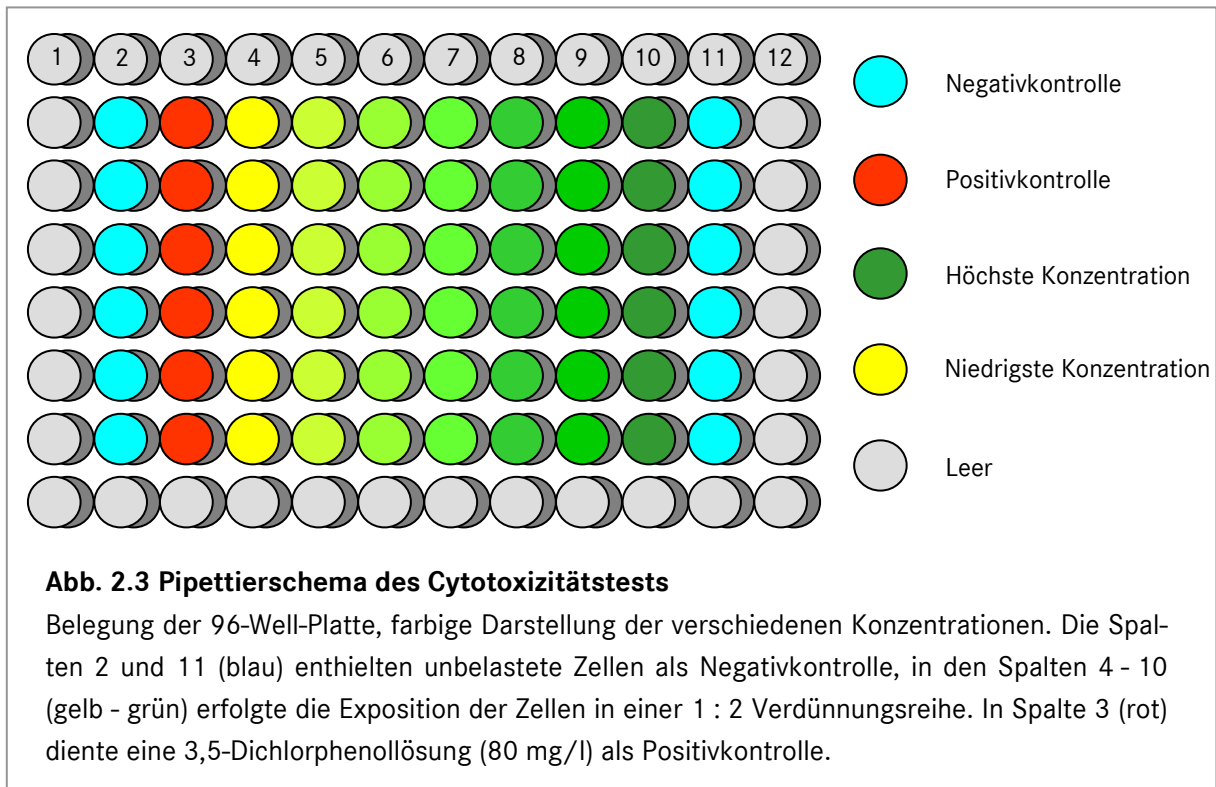
Menge für S9 - Mix	Beschreibung	Zubereitung/chemische Zusammensetzung
2 ml	S9 - Fraktion	Cytotest Cell Research GmbH, Roßdorf, Deutschland
1 ml	Salzlösung	61,5 g KCl + 40,7 g MgCl ₂ *6H ₂ O in 500 ml H ₂ O (bidest)
0,25 ml	G-6-P - Lösung	3,04 g Glucose-6-Phosphat in 10 ml H ₂ O (bidest)
2 ml	NADP-Lösung	393,7 mg Nicotinamidadeninukleotidphosphat in 5 ml H ₂ O (bidest)
25 ml	Puffer	27,6 g NaH ₂ PO ₄ in 1 l H ₂ O (bidest; L1), 28,4 g Na ₂ HPO ₄ in 1 l H ₂ O (bidest; L2), 60 ml aus L1 + 440 ml aus L2 mischen, mit 1m NaOH pH7,4 einstellen
19,75 ml	Destilliertes Wasser	H ₂ O (bidest)

2.4 Cytotoxizitätstest mit der Zelllinie V79

2.4.1 Durchführung

Dimethylsulfoxid (DMSO), in dem die Extrakte rückgelöst wurden, wirkt in hohen Konzentrationen cytotoxisch. Deshalb wurde in der höchste Konzentration maximal 1 % Lösungsmittel eingesetzt.

Abbildung 2.3 zeigt das Pipettierschema des Neutralrottests zur Bestimmung der Zelltoxizität, wie es in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde.



Konstante Versuchsbedingungen in allen Ansätzen wurde durch Einstellen der Zellkonzentration auf $4 - 5 \times 10^5$ Zellen/ml erreicht. Die Mikrotiterplatten wurden 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und in jedes Well eine 0,5 prozentige Neutralrot-Lösung pipettiert. Die Inkubation des Neutralrots erfolgte im Brutschrank für 3 Stunden. Um Farbstoff, der in dieser Zeit nicht von den Zellen aufgenommen worden war, aus den Wells zu entfernen, wurden sie zwei Mal mit PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich, München) gewaschen. Durch Zugabe einer Extraktionslösung (50 % Ethanol; 1 % Essigsäure, 49 % Aqua demin.) wurde in 30 min auf einem Schüttler durch Zerstörung der Zellen das Neutralrot aus den intakten Lysosomen rückgelöst.

2.4.2 Auswertung

Zunächst wurde quantitativ die Menge des extrahierten Neutralrots in einem Mikrotiterplattenreader (GENios, Fa. Tecan, Crailsheim, Deutschland), durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm, bestimmt.

Zur Ermittlung der prozentualen Überlebensrate der Zellen, wurde zunächst der Mittelwert der Absorption der leer gebliebenen Wells von allen Werten subtrahiert und die Absorptionsmediane der beiden Kontrollspalten verglichen (Abb. 2.3, Spalte 2 und 11). Lagen die Mediane mehr als 20 % auseinander wurde der Test wiederholt.

Anschließend wurde der prozentuale Anteil jedes Messwertes am Median von Kontrolle 1 berechnet, der Median und die Standardabweichung bestimmt und graphisch mit SigmaPlot 9.0 (Erkrath, Deutschland) dargestellt.

2.5 MTT - Assay mit der Zelllinie Beas2B

Der MTT - Assay (MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) ist ein weiterer Test zur Messung der Cytotoxizität. Er wurde als Kontrollsystem zusätzlich zum ELISA - Assay (s. Kap. 2.9) eingesetzt, um sicherzustellen, dass nicht die Cytotoxizität für die Ausschüttung von Zytokinen verantwortlich war. Der MTT-Assay wurde nach dem Protokoll des Herstellers (Promega, Mannheim) durchgeführt. Statt des schwer löslichen Salzes MTT, wurde das leichter lösliche Tetrazoliumsalz MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) in der Konzentration 1,9 mg/ml, gelöst in PBS (pH 6,0, Dulbecco´s phosphate buffered saline, Sigma Aldrich, München), eingesetzt. Dadurch waren auch zeitabhängige Messungen möglich.

2.5.1 Durchführung

Die humane Bronchialzelllinie Beas2B (s. Kap. 2.3.2) wurde auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen pro ml eingestellt und 100 µl der Suspension in jede Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert. Um eine Beeinflussung auf die Stressantwort der Zellen durch die Umplattierung zu verhindern wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ vorinkubiert. Am Tag darauf wurde eine Verdünnungsreihe der Probe in Medium (RPMI, Biochrom, Berlin) hergestellt und die Zellen mit weiteren 100 µl kontaminiertem Medium für 18 Stunden belastet.

2.5.2 Auswertung

Zur Auswertung wurden nach der Exposition 100 µl des Mediums entfernt und für den ELISA - Assay (Kap. 2.9) aufgehoben. Zu den verbliebenen 100 µl wurden 10 µl der MTS-Lösung gegeben und die Zellen für drei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Umsetzung des Salzes in einem Mikrotiterplattenreader (GENios, Tecan, Crailsheim,

Deutschland) photometrisch bei 450 nm bestimmt. Die weitere Auswertung erfolgte graphisch.

2.6 Comet - Assay

Der Comet-Assay wurde *in vitro* mit der permanenten Zelllinie V79 von Singh et al. (1988) mit den Modifikationen von Schnurstein (2000) durchgeführt.

Um auszuschließen, dass eine mögliche Cytotoxizität ein genotoxisches Potenzial der Probe vortäuscht (Hollert 2001), wurde die höchsten Expositionskonzentration so gewählt, dass 80 % der Zellen überleben.

Nach der Exposition wurden die Zellen in eine Agarose-Schicht gebettet. Anschließend wurden die Zellen um die Nucleoide lysiert und eine Elektrophorese unter alkalischen Bedingungen durchgeführt. Abhängig vom pH der Lyse und der Elektrophorese können im Comet-Assay verschiedene Effekte detektiert werden. Unter neutralen Bedingungen kommen Doppelstrangbrüche zum Vorschein während unter alkalischen Bedingungen auch Einzelstrangbrüche zur Geltung kommen (Lee and Steinert 2003). Nach Collins (2004) erhöht dies jedoch nicht die Sensitivität des Tests, beispielsweise durch eine Veränderung der niedrigsten Konzentration bei der ein Effekt nachweisbar ist (*lowest observable effect concentration*, LOEC), sondern verbessert lediglich die Auswertbarkeit.

Während der Elektrophorese wandern DNA-Fragmente durch ihre negative Ladung zum Pluspol der angelegten Spannung. Abhängig von ihrer Größe legen sie dabei unterschiedlich weite Strecken zurück. Diese Strecke und die Anzahl der wandernden Fragmente wurden als Kriterium zur Beurteilung des Ausmaßes der Schädigung herangezogen. Zur bildlichen Darstellung wurde die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt. Durch die Fragmente, die durch die Elektrophorese aus dem Nucleoid gezogen wurden, entsteht der Eindruck des Schweifes eines kleinen Kometen (Abb. 2.3). Je mehr Fragmente sich im Schweif sammeln, umso höher erscheint die Leuchtintensität, je kleiner die durch den Schadstoff entstandenen Fragmente sind, umso länger wird das Tail Moment (s. Kap. 2.6.2).

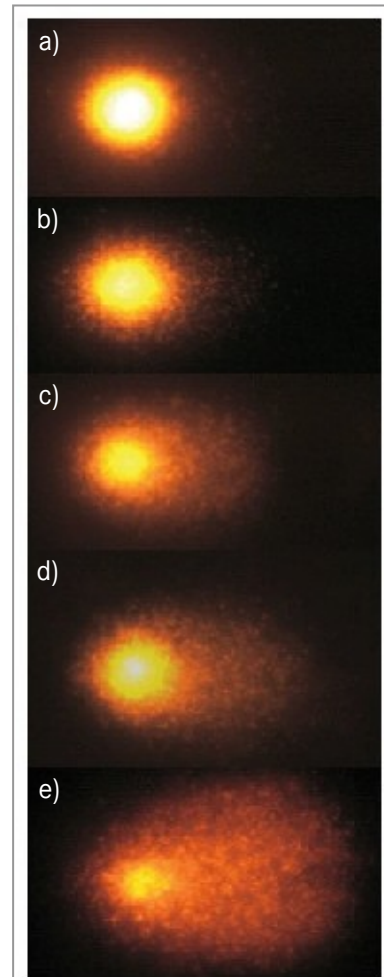


Abb. 2.3 Kometen

a) unfragmentierter Zellkern b) - e) zunehmende Fragmentierung der DNA (Kleinsasser et al. 2004)

2.6.1 Durchführung

Exposition der Zellen

Am Tag vor der Belastung wurden die Zellen aus Kulturflaschen entnommen, $3 - 4 \times 10^4$ Zellen pro Well wurden in sterile 6-Well Platten (Durchmesser 3,5 cm) überführt und mindestens 10 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Expositionsdauer der Zellen betrug 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂. Als höchste Belastungskonzentration wurde der NR₈₀-Wert (Überlebensrate von 80 %) aus dem Cytotoxizitätstest (s. Kap 2.4) herangezogen. Nach der Inkubationszeit von 24 Stunden wurde das Medium verworfen, die Zellen aus den 6-Well Platten herausgelöst, in Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pipettiert und bei 150 g und 4 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und das Pellet in 70 - 100 µl Medium rückgelöst.

Auftragen der Gelschichten

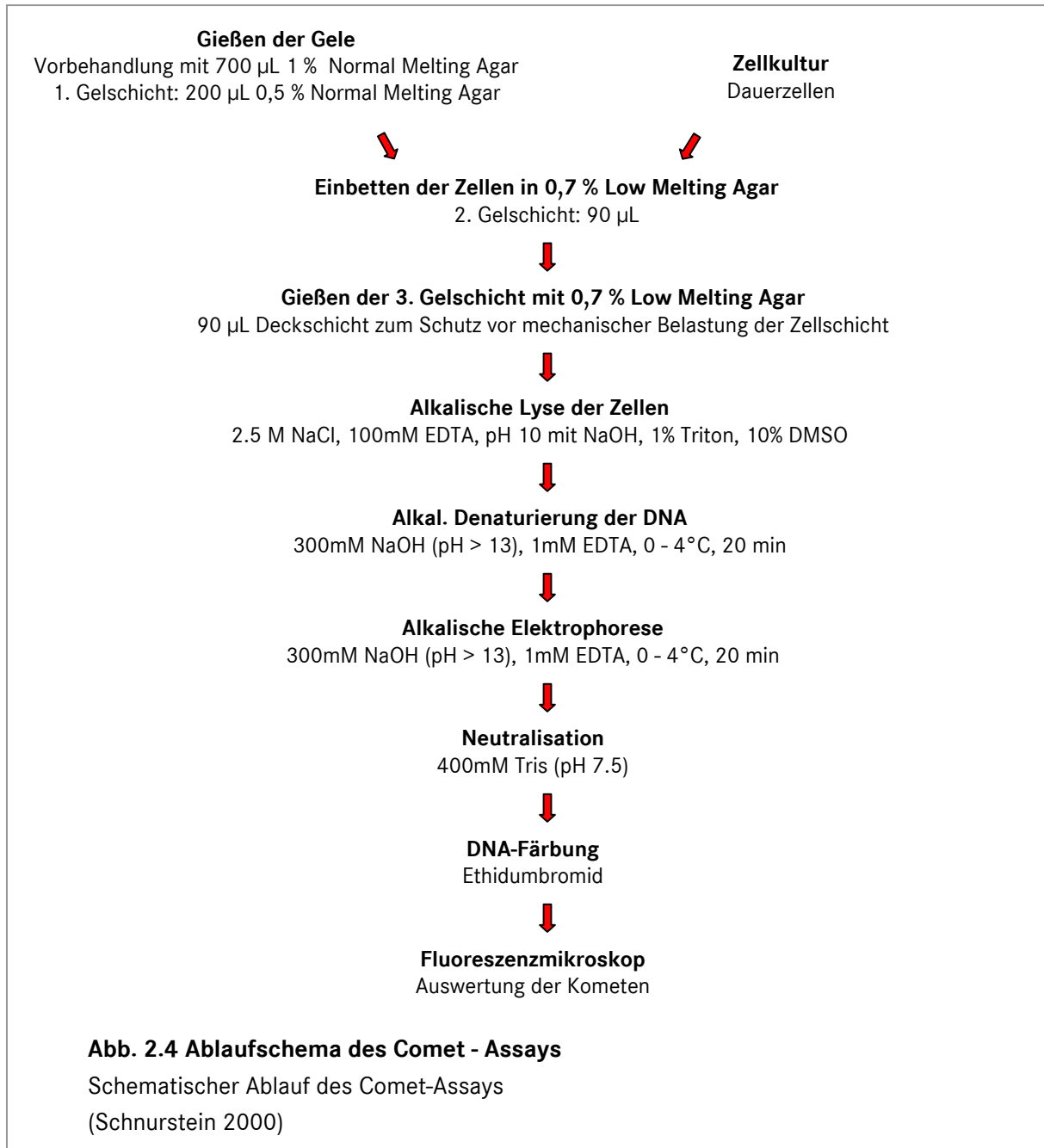
Um eine gute Haftung des Gels auf den Objektträgern zu erreichen, wurden aufgeraute Objektträger (Firma Langenbrink, Emmendingen, Deutschland) in 99 prozentigem Ethanol gereinigt und anschließend vollständig getrocknet. Um die Haftung weiter zu verbessern, wurde 1 % NMA (Normal temperature Melting Agar, Seakem Gold™, FMC Bioproducts, Rockland, USA) in PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Sigma Aldrich, München) gelöst, aufgekocht, mit einem Deckglas auf dem Objektträger aufgetragen und wieder abgeschabt. Anschließend wurden die Objektträger bei 37 °C vollständig getrocknet. Die erste verbleibende Gelschicht bestand aus 200 µl 0,5 prozentiger NMA-Lösung (durch Aufkochen in PBS gelöst), die 3 min auf Eis und 10 min im Wärmeschrank bei 37 °C ausgehärtet wurde. Für die zweite Gelschicht, die die Zellen enthält, wurde 0,7 % LMA (Low temperature Melting Agar, Seakem Gold™, FMC Bioproducts, Rockland, USA) in PBS aufgekocht und in einem geschlossenen Wasserbad bei 37 °C flüssig gehalten. 90 µl des LMA wurden mit der Zellsuspension im Eppendorfgefäß vermischt, auf den Objektträger aufgetragen und anschließend für 3 min auf Eis und 5 min im Wärmeschrank getrocknet. Als Schutzschicht wurden weitere 90 µl LMA auf den Objektträger aufgebracht und ebenfalls 5 min auf Eis und 5 min bei 37 °C ausgehärtet.

Lyse und Elektrophorese

Zur Lyse wurden die Objektträger in eine 4 °C kalte Lyselösung (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1 % Triton X-100 und 10 % DMSO; pH 13) gegeben, lichtdicht verpackt und für mindestens 2,5 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Um Schädigungen der DNA nach der Lyse vorzubeugen, wurde die Elektrophorese im Dunkeln auf Eis durchgeführt. Eine Vorinkubation der Objektträger in gekühltem Elektrophoresepuffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, 4 °C, pH > 13) erlaubte die Detektion von Einzelstrangbrüchen der DNA. Die Elektrophorese (Power Supply Model 200/2.0, Bio-Rad, Richmond, USA) wurde bei einer Spannung von 25 V und einer Leistung von 300 mA über eine Dauer von 20 min durchgeführt. Zur Neutralisation wurden die Objektträger für 2 min in Tris-Puffer (0,4 M, pH 7,5) getaucht.

Ablaufschema der Durchführung

In Abb. 2.4 ist der schematische Ablauf des Comet-Assays nach Schnurstein (2000) dargestellt.



2.6.2 Auswertung

Die Auswertung des Comet - Assays erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Aristoplan, Zeiss, Oberkochen) bei 340-facher Vergrößerung und einer Anregungswelle von 518 nm.

Die Anfärbung der DNA erfolgte durch Zugabe einer 60 µL Ethidiumbromidlösung (2 µM in Aqua demin.) auf jeden Objektträger. 100 Zellen pro Objektträger wurden mit einem Bildana-

lysesystem (Optilas, Puchheim), das aus einer Graustufen-CCD-Kamera (Pulnix TM-765E Kinetic) und einem angeschlossenen PC mit der Auswertungssoftware Kinetic 5.5™ (Kinetic Images, Liverpool, GB) besteht, bewertet.

Als Maß für die Schädigung der DNA wurde der Parameter *Tail Moment* (Abb. 2.5) gewählt, da diese Methode sowohl die Menge der fragmentierten DNA als auch den Grad der Fragmentierung berücksichtigt. Das *Tail Moment* berechnet sich aus dem Produkt der Schweiflänge (Grad der Fragmentierung) und dem prozentualen Anteil der Fluoreszenzintensität des Schweifes (Menge der fragmentierten DNA) an der Fluoreszenzintensität des Nucleoids dividiert durch die Anzahl der vermessenen Zellen.

$$\text{Tail Moment} = \frac{\text{Schweiflänge } [\mu\text{m}] * \text{Intensität } [\%]}{100}$$

Abb. 2.5 Berechnung des Tail-Moments

Die Bestimmung der Schweiflänge (*Tail Length*) wurde als Distanz zwischen der Mitte des Nucleoids und dem äußersten Ende des Kometen bestimmt (Abb. 2.6). Für die Bestimmung der prozentualen Fluoreszenzintensität wird die Leuchtkraft des Nucleoids zu der des tatsächlichen Schweifes ins Verhältnis gesetzt.

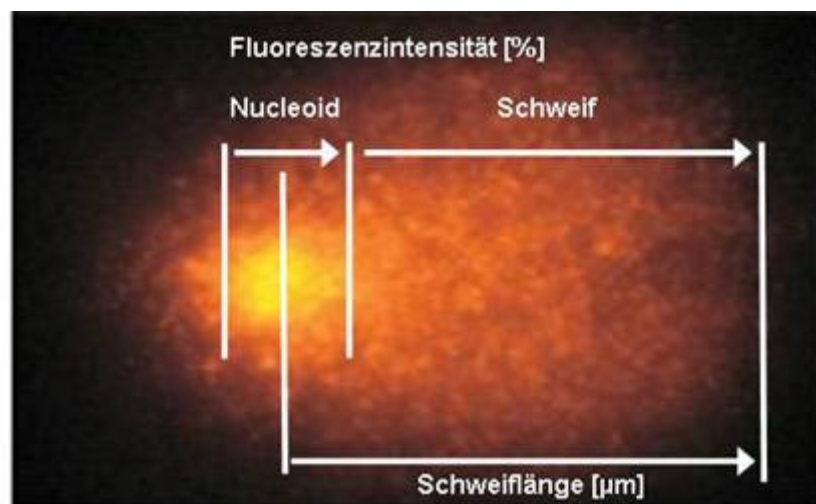


Abb. 2.6 Tail Moment - Darstellung

Schweiflänge als Distanz von Mitte Nucleoid bis Ende Schweif, Bestimmung der DNA Menge im Schweif durch Verhältnis Fluoreszenzintensität von Nucleoid und Schweif

Statistische Auswertung

Die statistische Analyse und Darstellung der Daten erfolgte mittels Sigma Plot 9.0 und Sigma Stat 3.1 (Systat, Erkrath, Deutschland). Zur Bestimmung der statistisch signifikant von der Negativkontrolle abweichenden Gruppen wurde eine *ANOVA on Ranks*-Analyse (nicht-parametrisch einfaktorielles Varianzanalyse) nach Kruskal-Wallis mit nachfolgendem Dunn's - Test gegen die Negativkontrolle durchgeführt.

2.7 Mikrokerntest

Um eine umfassende Beurteilung der Genotoxizität der Probe zu ermöglichen wurde der Mikrokerntest zusätzlich zum Comet-Assay durchgeführt.

2.7.1 Durchführung

Die Durchführung des Mikrokerntests erfolgte in Anlehnung an die ISO/DIS 21427 „Water Quality - Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei - Part2: Mixed population method using the cell line V79“ (ISO 2004).

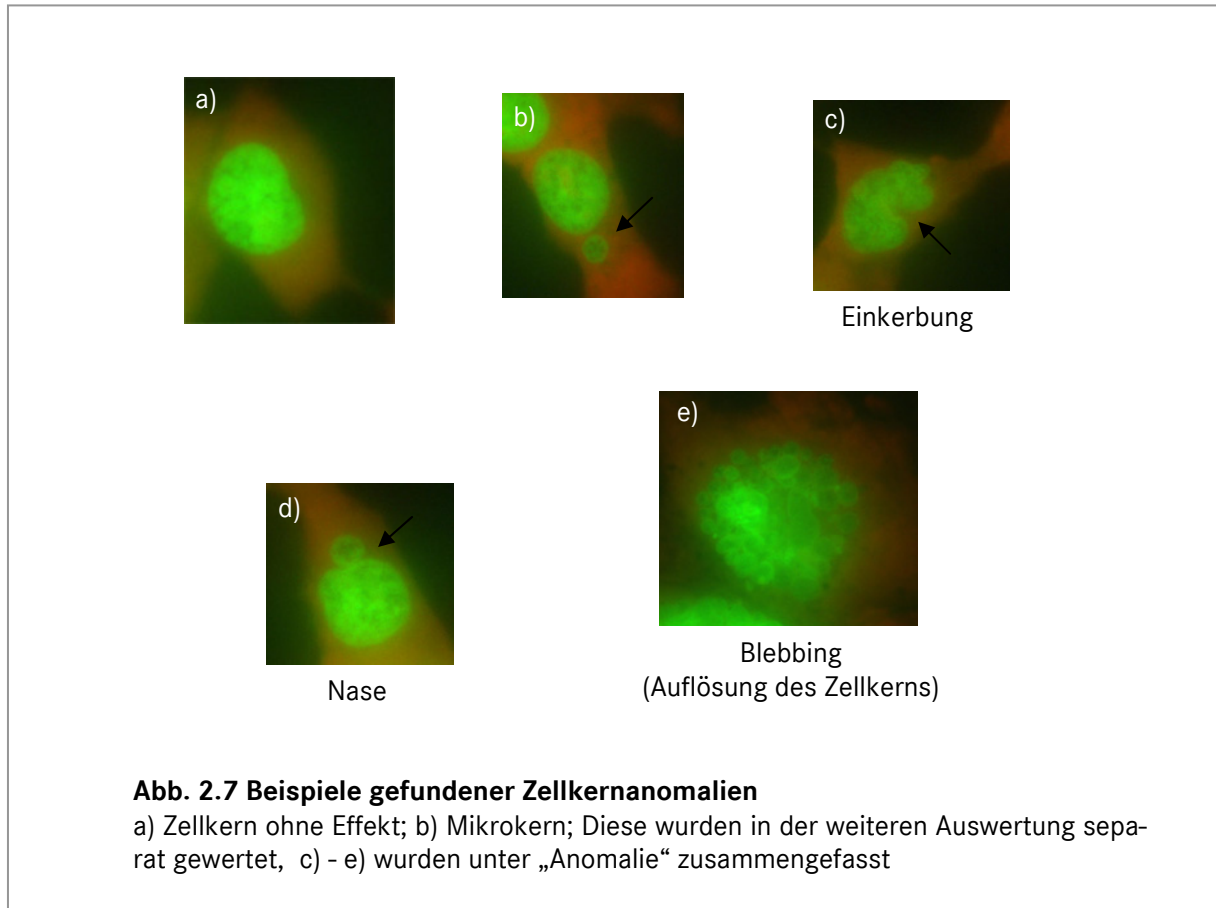
Exposition der Zellen

6 Stunden vor der Exposition wurden Deckgläser der Größe 22 x 22 mm (Fa. Assistent, Sondheim) in Ethanol (70 %) gelegt und unter UV-Licht bestrahlt, bis das Ethanol vollständig verdunstet war. Die gesäuberten Deckgläser wurden in sterile 6-Well Platten gelegt und mit $3 - 4 \times 10^4$ Zellen in 2 ml Medium bedeckt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ mit äquivalente Konzentrationen zum Comet - Assay exponiert. Anschließend an die Exposition wurde das belastete Medium entfernt, die Zellen mit Puffer (HBSS, Sigma Aldrich, Deisenhofen) gewaschen, unbelastetes Medium in die Wells pipettiert und die Zellen nochmals für 24 Stunden nachinkubiert, um statistisch jeder Zelle zu ermöglichen, sich einmal nach der Belastung zu teilen. Zur Fixierung der Zellen wurden die Deckgläser mit einer Pinzette aus den Wells genommen, 10 min in eine 1:1 Mischung PBS und Methanol/Essigsäure (Mischung 3 : 1) gelegt und anschließend weitere 10 min in Methanol/Essigsäure (Mischung 3 : 1) getaucht.

Nach der Fixierung wurden die Präparate luftgetrocknet und bis zur Auswertung in 6-Well Platten aufbewahrt. Zur Färbung wurde Acridine Orange (40 mg/l PBS; Sigma Aldrich, München) verwendet. Acridine Orange bindet an DNA und RNA gleichermaßen, jedoch liegt das Emissionsmaximum des DNA-Farbstoff-Komplexes bei einer Wellenlänge von 525 nm (grün), während der RNA-Farbstoff-Komplex ein Emissionsmaximum bei 650 nm (rot) zeigt, daher erscheinen Zellkerne nach Anregung grün, während das Cytoplasma durch die RNA rot erscheint.

2.7.2 Auswertung

Die Präparate wurden bei 1220-facher Vergrößerung am Mikroskop (Aristoplan, Leica, Deutschland) ausgewertet. Dazu wurden verschiedene Kriterien herangezogen, die in Abbildung 2.7 dargestellt sind.

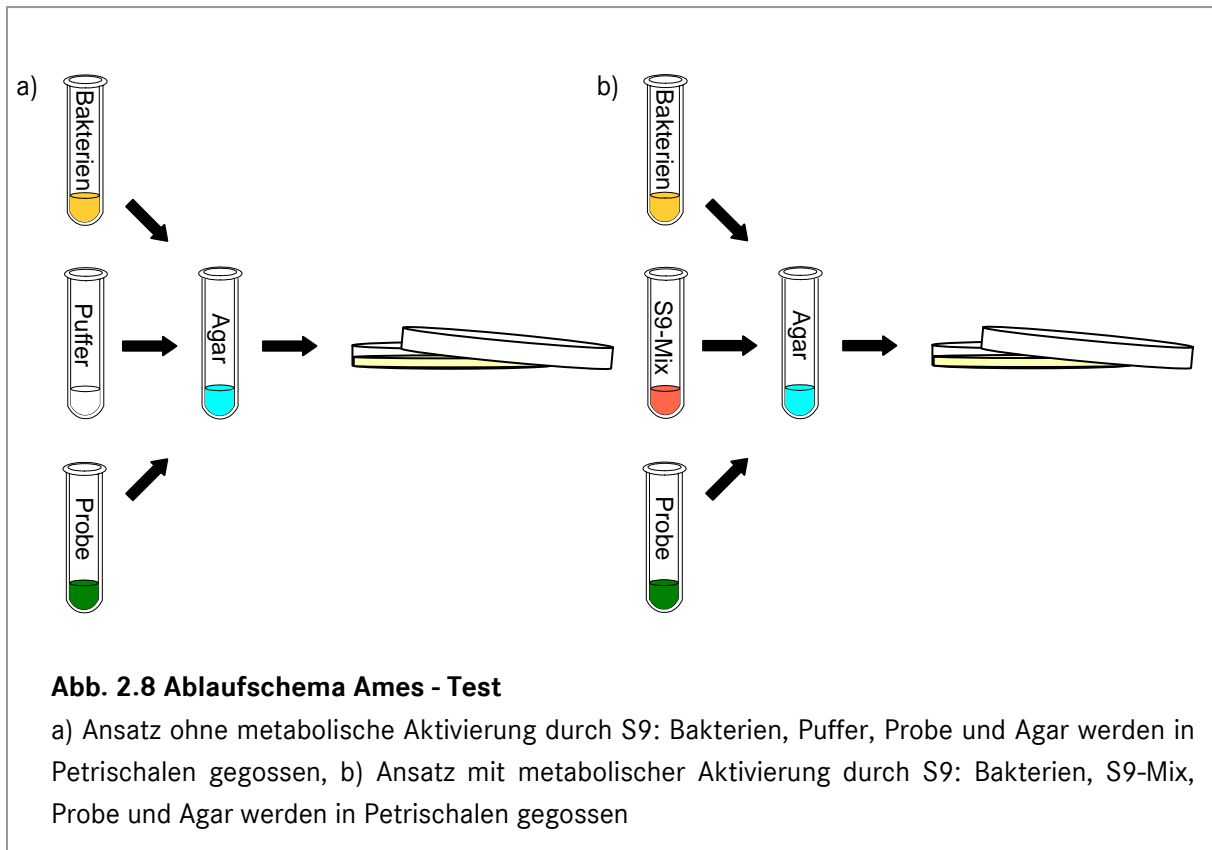


Kriterien zur Bestimmung eines Mikrokerns waren: komplette Trennung vom Hauptkern, Färbung des Mikrokerns in derselben Weise wie der Hauptkern und Lage beider Kerne in der gleichen Schärfeebene. Nur das Ereignis „Mikrokern“ wurde gewertet, unabhängig von der Anzahl der vorliegenden Mikrokerne (Abb. 2.7 b). War ein Kern in mehrere Teilkerne zerfallen, wurde dies als Deformation gewertet (Abb. 2.7 e). Neben dem Ereignis „Mikrokern“ wurden noch drei weitere Kriterien betrachtet: Einkerbung (Abb. 2.7 c), Nase (Abb. 2.7 d) und Deformationen (Bsp. Abb. 2.7 e).

2.8 Ames-Test mit *Salmonella typhimurium*

2.8.1 Durchführung

Die Durchführung orientierte sich an dem Protokoll von Maron & Ames (1983) und ist in Abbildung 2.8 schematisch dargestellt.



In Einmalkulturröhrchen wurden 2 ml Top-Agar (mit 10% Biotin/Histidin-Lösung für Hintergrundrasen), 50 µl der Testsubstanz, 500 µl Phosphatpuffer oder S9-Mix (bei metabolischer Aktivierung, s. Kap. 2.3.4) und 100 µl Testbakterien mit Hilfe eines Vortex-Gerätes gut durchmischt und auf Minimal-Agar in Petrischalen gegossen.

Die Platten wurden 72 Stunden bei 37 °C inkubiert.

2.8.2 Auswertung

Nach der Inkubation wurde zunächst der Hintergrundrasen bestimmt und die Revertanten ausgezählt. Wirkt die Probe toxisch auf die Bakterien, ist der Hintergrundrasen nicht erkennbar oder schwächer ausgeprägt als bei der Negativkontrolle.

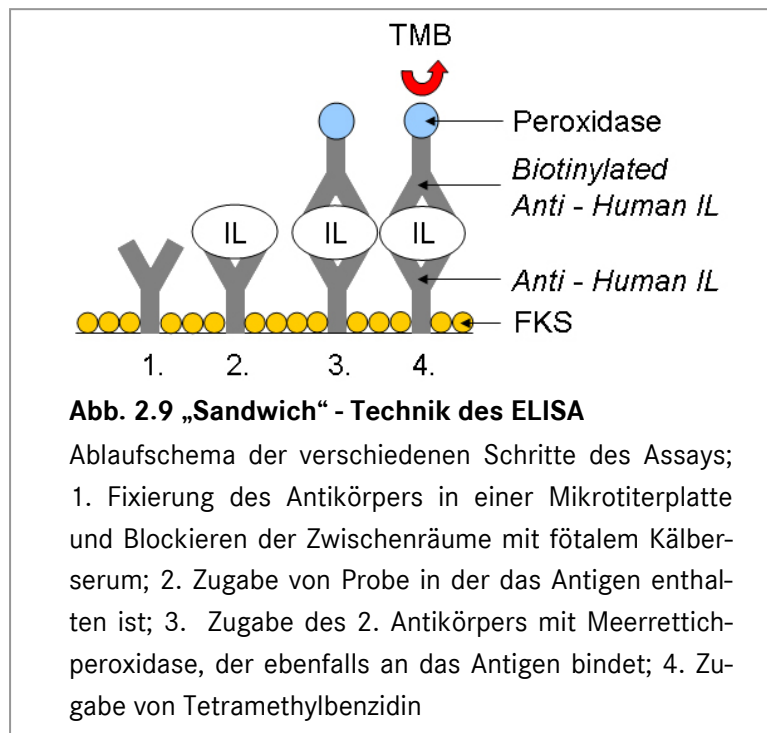
Die Revertanzahlen pro m³ Luftäquivalent wurden durch eine lineare Regression der Dosis-Wirkungsbeziehung mit dem Programm Microsoft Excel[®] berechnet (Erdinger et al. 1997).

2.9 ELISA-Assay auf proinflammatorische Substanzen

Durch den *Enzyme linked Immunoassay* (ELISA) wurde das Potenzial der Probe die Ausschüttung proinflammatorischer Interleukine zu induzieren ermittelt. Da die Ausschüttung dieser Zytokine in menschlichen Bronchialzelllinien sehr gut untersucht ist, wurde für diesen Assay die Zelllinie Beas2B (s. Kap. 2.3.2) gewählt.

Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Messung der Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) erfolgte über einen *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Der Assay wurde nach der „Sandwich“-ELISA Technik durchgeführt, die zwei Antikörper wählt, die an die Interleukine binden ohne sich zu blockieren: *Anti - Human IL* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) und *Biotinylated Anti-Human IL* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA; Abb. 2.9).



Der *Anti - Human IL* wird in einer Mikrotiterplatte fixiert und die Zwischenräume mit fötalem Kälber Serum (FKS) blockiert, so dass eine eventuelle Anheftung des zweiten Antikörpers (*Biotinylated Anti - Human IL*) am Boden der Wells verhindert wird (Abb. 2.9 1.). Nach der Fixierung wird die Probe mit dem Antigen dazugegeben und bindet an die fixierten Antikörper (Abb. 2.9 2.). Nach einem Waschvorgang, um die Reste der Probe zu entfernen, wird der zweite Antikörper zugegeben und bindet ebenfalls an das Antigen (Abb. 2.9 3.). An diesen zweiten Antikörper ist eine Meerrettichperoxidase gekoppelt, die das anschließend zugegebene Substrat (Tetramethylbenzidin, TMB) umsetzt (Abb. 2.9 4.). Durch die Umsetzung kommt es nach dem Abstoppen der Reaktion mit einer Säure zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Je höher die Konzentration des Antigens in der Probe war, desto höher ist die Umsetzungsrate von TMB und umso stärker ist die Farbintensität nach dem Abstoppen. Diese Farbintensität kann mit einem Photometer quantifiziert werden.

Anhand eines Standards mit bekannten Konzentrationen wurde eine Standardkurve erstellt, aus der die Konzentrationen der Probe abgelesen werden konnten.

2.9.1 Durchführung

Die Messung der Zytokinausschüttung wurde mit einem Human IL-8 ELISA Set bzw. Human IL-6 ELISA Set (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) und nach dessen Gebrauchsanleitung durchgeführt.

Zunächst musste der *Capture Antibody (Anti-Human IL)* 1 : 250 in *Coating Buffer* (0,1 M Na₂CO₃, pH 9,5) verdünnt werden. Anschließend wurden 100 µl dieser Lösung in jedes Well einer 96-Well Platte gegeben. Die Platte wurde verschlossen und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurde die Flüssigkeit aus den Wells abgenommen und verworfen. Die Wells wurden drei Mal mit 300 µl einer Waschlösung (PBS mit 0,05 % Tween-20) pro Well gewaschen und nach dem letzten Waschgang umgekehrt auf ein aufsaugendes Papier gelegt, um Reste der Waschlösung zu entfernen. Freie Stellen im Well, auf denen sich kein Antikörper angeheftet hatte wurden mit 200 µl einer *Assay Diluent* Lösung (PBS mit 10 % FKS, pH 7,0) blockiert und die Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter dreimaliger Waschvorgang.

In jedes Well der vorbereiteten Platte wurden entweder 100 µl des Überstands (Kap 2.5.2) oder 100 µl eines Standards pipettiert, anhand dessen die vorhandene IL - Konzentration in jedem Well berechnet wurde. Nach der Zugabe wurde die Platte verschlossen und bei Raumtemperatur zwei Stunden inkubiert. Danach wurde der Überstand entfernt und jedes Well fünf Mal mit der Waschlösung gewaschen. Anschließend wurden 100 µl einer *Working Detector* Lösung (*Detection Antibody* gelöst in einer 1 : 250 Verdünnung in *Assay Diluent*, *Enzyme Reagent* gelöst in einer 1 : 250 Verdünnung in *Detection Antibody*) in jedes Well pipettiert, die Platte verschlossen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten sieben Waschvorgänge, in denen die Waschlösung bei jeweils 30 s bis 1 min einwirken musste.

2.9.2 Auswertung

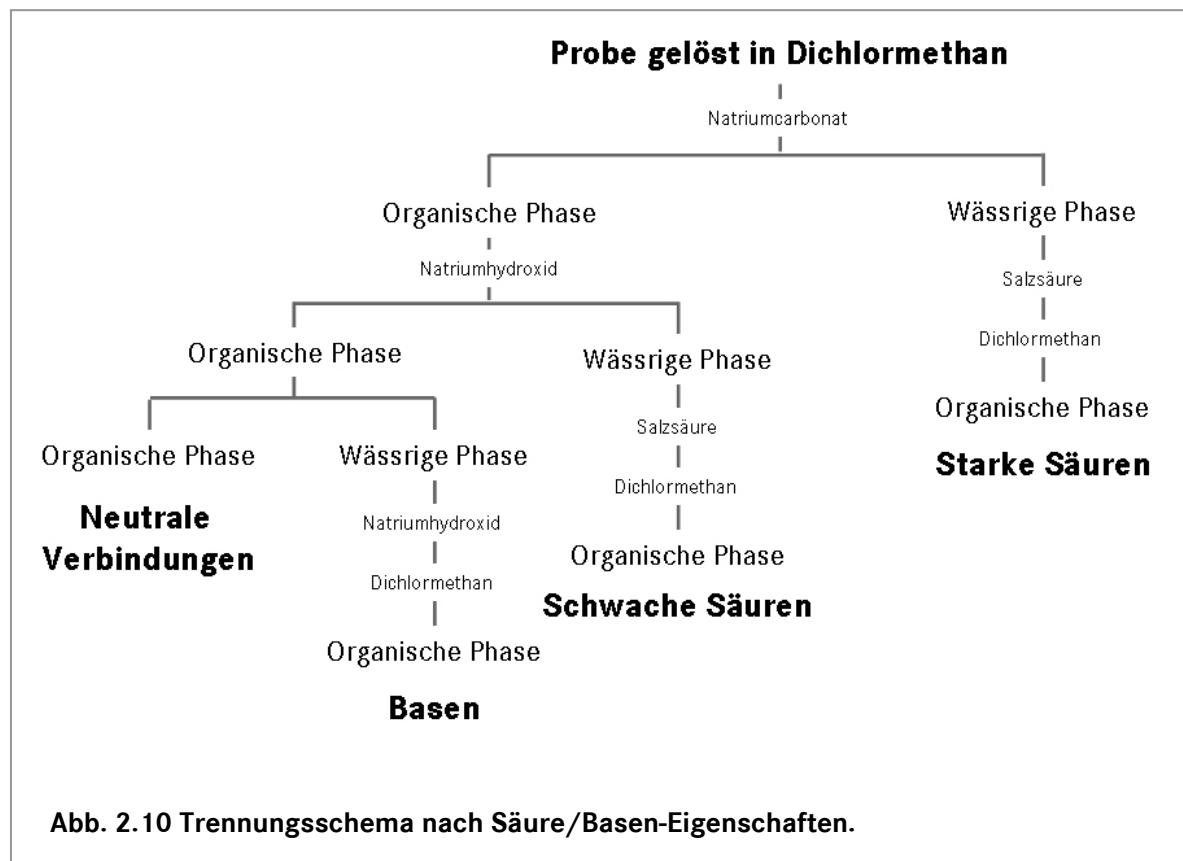
Nach dem letzten Waschvorgang wurden in jedes Well 100 µl *Substrate Solution* (Tetra-methylbenzidin, Wasserstoffperoxid, PharmingenTM TMB Reagent Set, San Diego, USA) gegeben und die Platte 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Um die Umsetzung des Substrats durch das Enzym zu stoppen wurde, in jedes Well 50 µl *Stop Solution* (1 M Schwefelsäure) pipettiert und die Menge an umgesetztem Substrat in einem Mikrotiterplattenreader (GENios, Fa. Tecan) photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

2.10 Chemische Analysen

Zur näheren chemischen Charakterisierung bestimmter Extrakte aus den Probenahmen in Anlage A und B wurden die in diesem Kapitel beschriebenen Verfahren der Studie von Erdinger et al. (1997) gewählt.

2.10.1 Trennung nach Säure/Basen-Eigenschaften

Die Trennung nach Säure/Basen-Eigenschaften erlaubt eine grobe Aufreinigung komplexer Stoffgemische zur Analyse der aktiven Fraktion in den Bioassays. Dazu wurde das unten abgebildete Trennungsschema zur Flüssig/Flüssig-Trennung durchgeführt (Abb. 2.10). Anschließend an die Trennung wurde die Probe geteilt und das Dichlormethan abgeblasen. Ein Teil der Probe wurde in Aceton rückgelöst und für die GC-MS - Analyse (s. Kap. 2.10.2) bereitgestellt. Der andere Teil wurde in DMSO rückgelöst und in ausgewählten Bioassays eingesetzt.



2.10.2 Gaschromatographie mit Massenspektrometrie - Kopplung

Zur Identifizierung der Verbindungen in den Fraktionen wurde eine Analyse mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie - Kopplung durchgeführt. Der Gaschromatograph dient dabei zur Auftrennung des Stoffgemisches, während das Massenspektrometer zur Identifizierung der Stoffe die Spektren mit einer Datenbank abgleicht.

Zu Detektion von Säuren und Basen müssen diese zuvor derivatisiert werden. Die Derivatisierung kann zu einer besseren Auftrennung und zu einer Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit führen (Vycudilik 1977). Die Derivatisierung der Säuren wurde durch eine Methylierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH, Macherey-Nagel, Düren) erreicht. Dazu wurden vor dem Einspritzen in die GC-MS in 100 µl der acetonischen Lösung 10 µl TMSH dazugegeben. Eine Derivatisierung der Basen wäre mit Diazomethan möglich, da Diazomethan jedoch stark giftig ist, wurde auf die Verwendung verzichtet und die Basen underivatisiert eingespritzt.

Bei der in dieser Analyse verwendeten Säule handelte es sich um eine HP-5 MS (Firma Alligent Technologies, Waldbronn). Sie war 30 m lang und 0,25 µm dick. Als Trägergas wurde Helium mit einer Geschwindigkeit von 1,25 ml pro Minute in die Säule eingeleitet.

Zur Auftrennung des Gemisches wurde folgendes Temperaturprogramm gewählt:

Durch einen Autosampler wurden 2 µl der Probe in den Injektor eingespritzt. Dieser erhitzte die Probe auf 290 °C, um eine vollständige Verdampfung der Probe zu erreichen. Die Säule war in einem Ofen befestigt, um durch kontrolliertes Erwärmen der Säule eine bessere Auftrennung zu erreichen. Die Anfangstemperatur betrug 50 °C und wurde für eine Minute auf dieser Höhe gehalten. Anschließend erfolgte eine Erhöhung der Temperatur von 4 °C pro Minute bis eine Temperatur von 290 °C erreicht wurde, die dann für fünf Minuten gehalten wurde.

2.10.3 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)

Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry, ICP-MS) ist eine Analysenmethode in der anorganischen Elementanalytik.

Zur Analyse der Proben wurde das Aceton mit Stickstoff abgeblasen und die Probe in 65 prozentiger Salpetersäure rückgelöst. Zur vollständigen Oxidation der Probe wurden die Reagenzgläser über Nacht mit lose aufgelegtem Deckel in einen Laborabzug gestellt. Am nächsten Tag wurde eine 1 : 10 und eine 1 : 100 Verdünnung der Probe mit 35 prozentiger Salpetersäure angesetzt und mit Hilfe eines Autosamplers in das Gerät eingespritzt.

3 Ergebnisse

Das folgende Kapitel gibt zunächst einen Überblick über Darstellungsweise und Bewertung der Ergebnisse der Bioassays (Kap. 3.1). Darauf folgt die Darstellung der Einzelergebnisse (Kap. 3.2 - 3.4). Zusätzlich zu den Luftproben wurden in jedem Bioassay Prozesskontrollen untersucht. Dafür wurden leere Filter, die in den Filtervorrat des Samplers eingefügt, jedoch nicht mit Staub beaufschlagt worden waren, verwendet (s. Kap. 2.1.2).

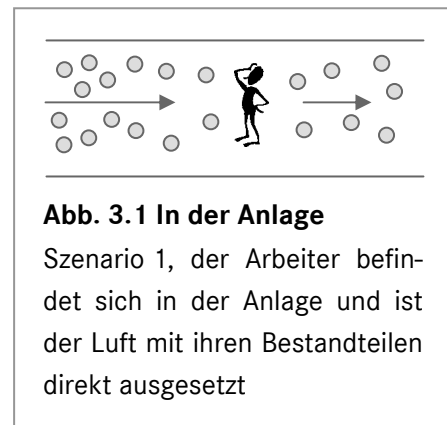
3.1 Ergebnisdarstellung und -bewertung

3.1.1 Expositionsszenarien

Zur Bewertung der toxischen Wirkung der Luftproben und Interpretation ihres Gefährdungspotenzials sind verschiedene Bezugsgrößen möglich. In dieser Studie wurden zwei Expositionsszenarien angenommen und die Wirkung der Proben in den Bioassays bezogen auf diese Szenarien interpretiert.

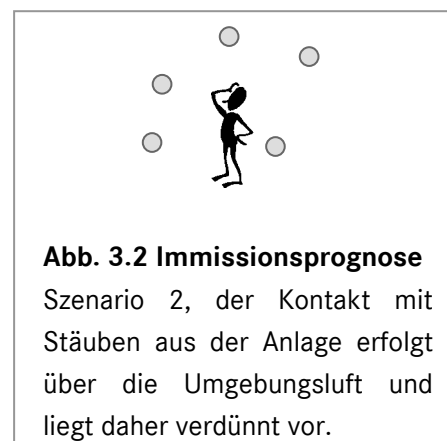
In der Anlage

Das erste Szenario geht von einer Belastung von Arbeitern direkt in der Anlage aus (Abb. 3.1). Bezugsgröße ist hierbei das Volumen der Luft in m^3 , deren Staub extrahiert wurde und mit deren Extrakt die Zellen belastet wurden. Über einen Zeitraum von jeweils einer Woche wurden je nach Probenahmestelle aus 1000 - 6000 m^3 Luft Stäube auf Filtern gesammelt, weiter aufbereitet (s. Kap. 2.2) und in einer definierten Konzentration [m^3/ml] in den Bioassays eingesetzt. Die Bezugsgröße ist daher unabhängig von der Partikelanzahl. Wurde beispielsweise mehrfach gefilterte Luft, untersucht, so wurden weit weniger Partikel extrahiert als in der Abluft der Anlage, die ihrerseits sehr partikelreich ist.



Immissionsprognose

Basis des zweiten Szenarios ist die Partikelkonzentration in der Anlage. Dabei wird rechnerisch angenommen, dass die Partikel aus der Abluft in einer Konzentration vorkommen, die einer Konzentration an Stäuben in der Umgebungsluft entspricht (Abb. 3.2). Dieses Szenario soll zeigen, ob die Partikel auch in Konzentrationen in denen Luftstäube alltäglich vorliegen, eine toxische Wirkung zeigen oder ob nur die Quantität der Partikel für die Toxizität verantwortlich ist.



3.1.2 Darstellung und Bewertung der Bioassays

Im folgenden Kapitel 3.2 werden die Ergebnisse der Bioassays auf die oben beschriebenen Szenarien nach den folgenden Methoden ausgewertet.

In der Anlage

Im *Technical Guidance Document for human health hazard assesment* (TGD) der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD 2006) wird in Tab. 3.1 (Abb. 3.3) für Arbeiter mit leichter körperlicher Anstrengung ein Atemvolumen von 10 m³ pro Arbeitstag (8 h) angenommen.

Table 3-1 Default physiological parameters under the allometric scaling principle

Respiratory volume light activity for worker (wRV) 8 h exposure		10 m ³ /person
--	--	---------------------------

a Difference between metabolic rate scaling and body weight scaling for rats and humans: 4 (see also Table 3-2)

Abb. 3.3 Tabelle aus TGD der OECD

Für Arbeiter mit leichter körperlicher Anstrengung wird ein Atemvolumen von 10 m³ / Arbeitstag angenommen.

Daher wurde die höchste Konzentration in den verwendeten Bioassays auf 10 m³ Luftprobe pro ml Medium festgelegt. Die Definition der Bewertung der Ergebnisse ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

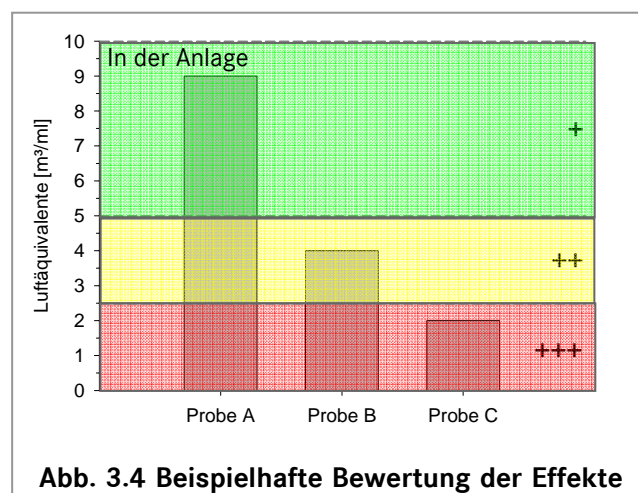


Abb. 3.4 Beispielhafte Bewertung der Effekte in verschiedenen Konzentrationsbereichen

5 - 10 m³/ml + (grün), 2,5 - 5 m³/ml ++ (gelb), < 2,5 m³/ml +++ (rot); Probe A, B und C dienen als beispielhafte imaginäre Werte zur Veranschaulichung der Bewertungsgrenzen

Immissionsprognose

Seit 2005 gilt die in deutsches Recht umgesetzte Richtlinie der EU über Grenzwerte für Schwefeldioxid, Stickstoff-dioxid und Stickstoffoxide, Partikel und Blei in der Luft (EU 1999). Nach dieser Richtlinie darf eine Feinstaubkonzentration von 50 µg Feinstaub pro m³ Luft nur an 35 Tagen im Jahr überschritten werden. In Anlage A konnte während der Immissionsmessung ein Jahresmittelwert von 20 µg/m³ ermittelt werden. Zur Betrachtung des zweiten Szenarios wurde ein *worst case* von durchgängig 50 µg/m³ angenommen. Bei 10 m³ Atemvolumen pro Arbeitstag (s. oben) würde die Lunge mit 500 µg pro Tag beaufschlagt werden. Daher wurde die obere Grenze zur Bewertung der Effekte bei 500 µg extrahierter Staub pro ml Medium festgelegt (Abb. 3.5). Analog zur Betrachtung *In der Anlage* wurde die Bewertung für Effekte in den entsprechenden Konzentrationsbereichen wie in Abbildung 3.5 festgelegt.

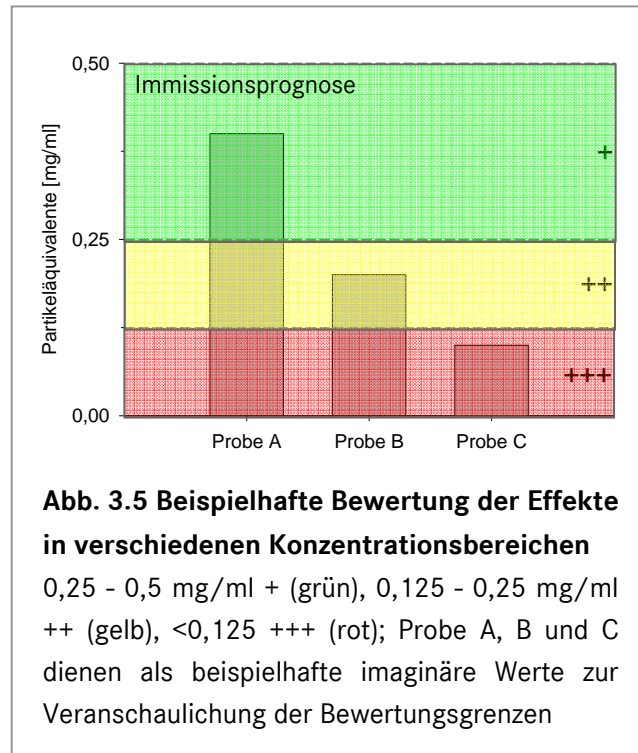


Abb. 3.5 Beispielhafte Bewertung der Effekte in verschiedenen Konzentrationsbereichen

0,25 - 0,5 mg/ml + (grün), 0,125 - 0,25 mg/ml ++ (gelb), <0,125 +++ (rot); Probe A, B und C dienen als beispielhafte imaginäre Werte zur Veranschaulichung der Bewertungsgrenzen

3.2 Prozessketten der Anlagen A und B

3.2.1 Partikelkonzentrationen

Durch Auswiegen der Filter vor und nach der Belegung wurde über das angesaugte Volumen und die Zeitdauer der Messung die Konzentration der Partikel in der Luft nach folgender Gleichung (Abb. 3.6) berechnet.

$$C_{(\text{Partikel})} = \frac{\text{Filter}_{\text{beaufschlagt}} - \text{Filter}_{\text{leer}} [\mu\text{g}]}{\text{Angesaugtes Volumen} [\text{m}^3]}$$

Abb. 3.6 Konzentrationsberechnung

Verwendete Gleichung zur Berechnung der Partikelkonzentration aus Filtergewicht und angesaugtem Volumen des Samplers

Da der Sampler während der Beprobung der Prozessketten ohne PM₁₀ Vorabscheider verwendet wurde, wurden die Filter mit Gesamtstaub beaufschlagt und nicht ausschließlich mit Feinstaub.

In den nachfolgenden Tabellen 3.1 bis 3.4 sind die Partikelkonzentrationen des Gesamtstaubs an den angegebenen Probenahmestellen zu den entsprechenden Probenahmezeitpunkten aufgelistet.

Tab. 3.1 Partikelkonzentrationen der Anlage AI zur Zeit der Probenahme

Nach Auswiegen der Filter errechnete Partikelkonzentrationen zur Zeit der jeweiligen Probenahme

Probenahmestelle	Zeitraum	Partikelkonzentration [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
Außenluft	04.09. - 08.09.06	25,97
	16.10. - 20.10.06	34,23
	05.02. - 09.02.07	21,15
Filtrierte Luft	31.07. - 04.08.06	12,24
	18.09. - 22.09.06	17,85
	19.03. - 23.03.07	15,85
Abluft vor Wärmetauscher	31.07. - 04.08.06	795,33
	18.09. - 22.09.06	834,95
	19.03. - 23.03.07	878,18
Abluft nach Wärmetauscher	04.09. - 08.09.06	506,45
	16.10. - 20.10.06	516,61
	05.02. - 09.02.07	717,27

Tab. 3.2 Partikelkonzentrationen der Anlage All und nach der Verbrennung zur Zeit der Probenahme

Nach Auswiegen der Filter errechnete Partikelkonzentrationen zur Zeit der jeweiligen Probenahme

Probenahmestelle	Zeitraum	Partikelkonzentration [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
Außenluft	14.08. - 18.08.06	16,70
	09.10. - 13.10.06	34,53
	19.02. - 23.02.07	45,69
Filtrierte Luft	07.08. - 11.08.06	11,15
	25.09. - 29.09.06	15,43
	12.03. - 16.03.07	33,98
Abluft vor Wärmetauscher	07.08. - 11.08.06	449,59
	25.09. - 29.09.06	556,83
	12.03. - 16.03.07	686,72
Abluft nach Wärmetauscher	14.08. - 18.08.06	187,99
	09.10. - 13.10.06	432,74
	19.02. - 23.02.07	427,85
Abluft nach Verbrennung	10.07. - 14.07.06	332,40
	11.09. - 15.09.06	134,05
	26.03. - 30.03.07	182,68

Tab. 3.3 Partikelkonzentrationen der Anlage BI zur Zeit der Probenahme

Nach Auswiegen der Filter errechnete Partikelkonzentrationen zur Zeit der jeweiligen Probenahme

Probenahmestelle	Zeitraum	Partikelkonzentration [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
Außenluft	23.10. - 27.10.06	25,89
	27.11. - 01.12.06	33,53
Zuluft nach Wärmetauscher	30.10. - 03.11.06	18,57
	20.11. - 24.11.06	17,59
Abluft vor Wärmetauscher	30.10. - 03.11.06	257,70
	20.11. - 24.11.06	204,40
Abluft nach Wärmetauscher	23.10. - 27.10.06	247,04
	27.11. - 01.12.06	218,28
	22.01. - 26.01.07	317,35

Tab. 3.4 Partikelkonzentrationen in Anlage BII zur Zeit der Probenahme

Nach Auswiegen der Filter errechnete Partikelkonzentrationen zur Zeit der jeweiligen Probenahme

Probenahmestelle	Zeitraum	Partikelkonzentration [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
Außenluft	06.11. - 10.11.06	33,58
	11.12. - 15.12.06	23,30
Zuluft nach Wärmetauscher	13.11. - 17.11.06	36,78
	04.12. - 08.12.06	29,34
Abluft vor Wärmetauscher	13.11. - 17.11.06	356,34
	04.12. - 08.12.06	252,87
Abluft nach Wärmetauscher	06.11. - 10.11.06	330,59
	11.12. - 15.12.06	326,86
Filtrierte Luft	15.01. - 19.01.07	6,61
	22.01. - 26.01.07	5,70
	29.01. - 02.02.07	15,78

Sowohl Anlage A und Anlage B zeigen eine deutlich erhöhte Partikelkonzentration in der Abluft im Gegensatz zur angesaugten Außenluft und der Probenahmestelle „filtrierte Luft“.

3.2.2 Prozesskontrollen

Die Prozesskontrollen stellen sicher, dass die Effekte in den Bioassays nicht durch die Filter auf denen die Stäube beaufschlagt worden waren oder deren Aufbereitung entstanden. Aus jedem Probenahmezyklus wurden Filter, die zur Zeit der Probenahme im Gerät waren, jedoch nicht mit Staub beaufschlagt wurden, entnommen und auf dieselbe Weise aufbereitet wie die Staubextrakte. Die Prozesskontrollen sollen einen *worst case* darstellen. Da die hohe Partikelkonzentration in den Abluftproben zu einer hohen Anzahl an verwendeten Filtern (6 Stück) führte, wurde auch die Prozesskontrollprobe aus 6 Filtern erstellt. Tabelle 3.5 fasst die Prozesskontrollen zusammen.

Tab. 3.5 Prozesskontrollen der Anlagen A und B

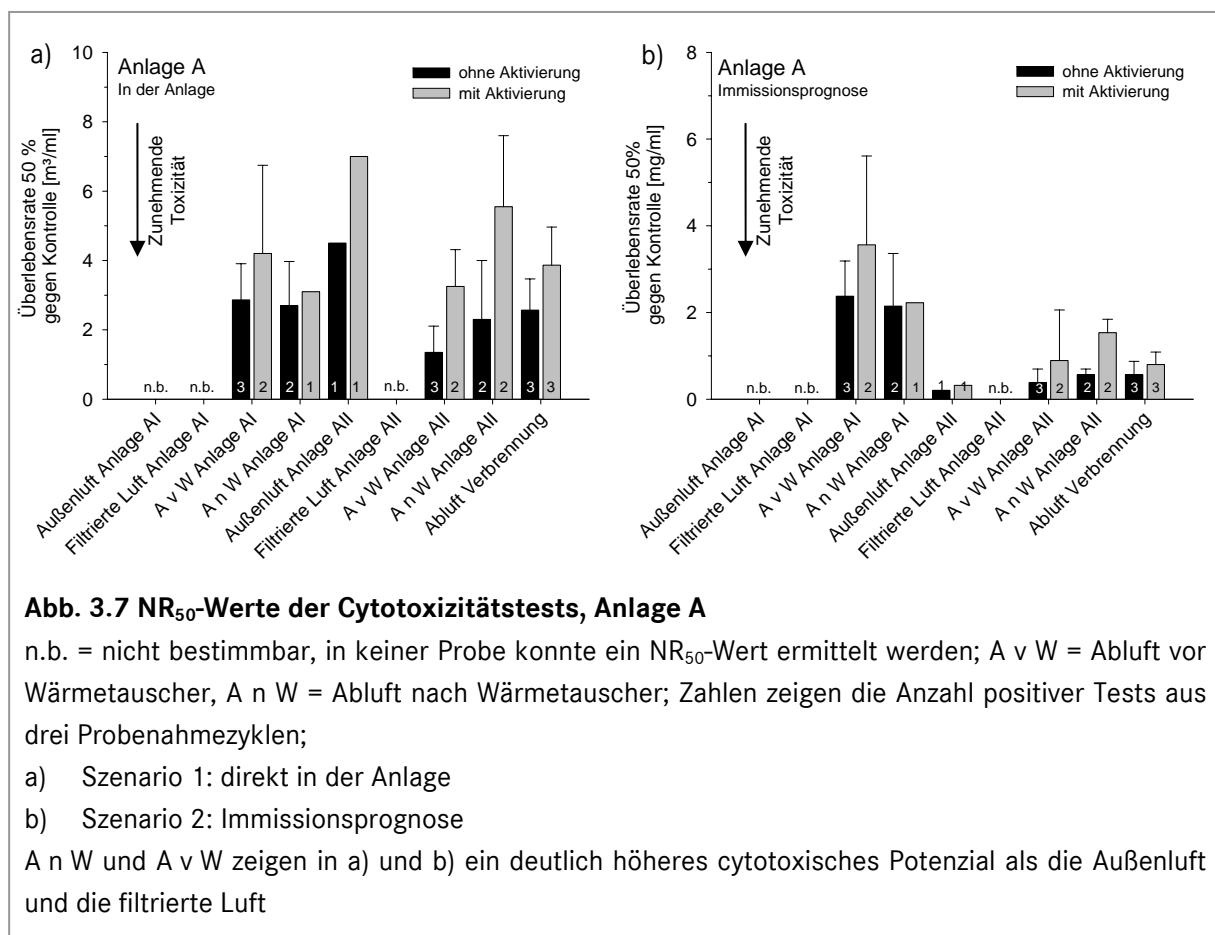
Name	Herkunft	Zeitraum	Anzahl
Kontrolle 1	Feldkontrolle aus Zyklus 1 in Anlage A	10.07. - 08.09.06	6
Kontrolle 2	Feldkontrolle aus Zyklus 2 in Anlage A	11.09. - 20.10.06	1
Kontrolle 3	Feldkontrolle aus Zyklus 1 in Anlage B	23.10. - 17.11.06	1
Kontrolle 4	Feldkontrolle aus Zyklus 3 in Anlage A	05.02. - 30.03.07	1

3.2.3 Bestimmung der Cytotoxizität

Filterextrakte

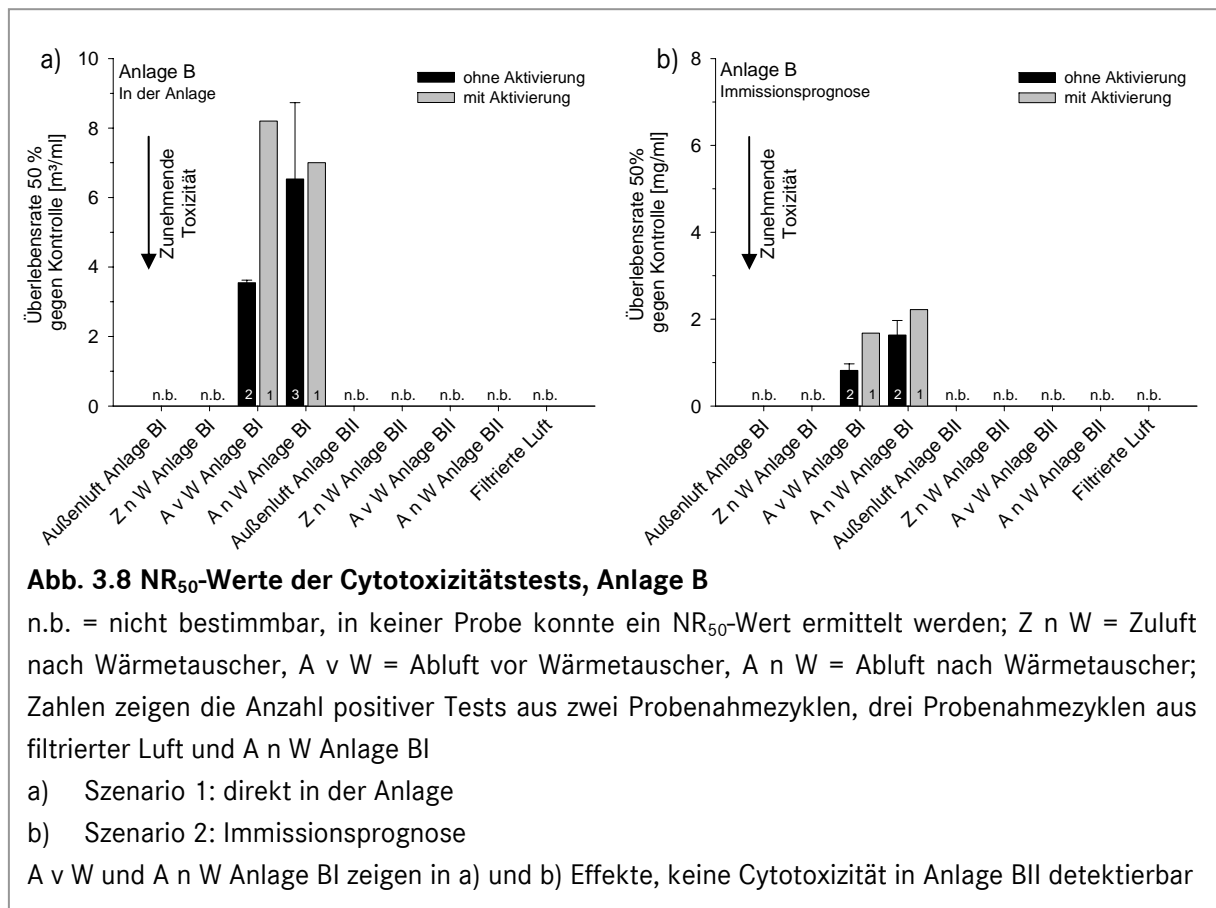
Das cytotoxische Potenzial der acetonischen Filterextrakte der Proben aus Anlage A und Anlage B wurde an der Säugerzelllinie V79 mit dem Endpunkt Neutralrotretention untersucht (vgl. Kap. 2.4). Die Bewertung des cytotoxischen Potenzials erfolgte anhand des NR₅₀-Wertes, der angibt, bei welcher Schadstoffkonzentration 50 % der Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle überleben.

Aus drei unterschiedlichen Probenahmezeiträumen wurde für jede Probe der NR₅₀-Wert in drei Replika mit und ohne metabolischer Aktivierung (s. Kap. 2.3.4) graphisch ermittelt und auf die in Kap. 3.1.1 beschriebenen Szenarien bezogen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen aller Werte aus Anlage A sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Keine der Kontrollproben (Kap. 3.2.2) löste einen Effekt im Cytotoxizitätstests aus.



Die Proben aus der Abluft (A v W und A n W) zeigen sowohl in Anlage AI und AII in beiden Szenarien ein höheres cytotoxisches Potenzial als die Proben aus der Außenluft und der filtrierte Luft. In der Außenluft konnte nur in einer Probe ein NR₅₀-Wert bestimmt werden. Diese Probe wurde im Zeitraum 19.02. - 23.02.07 in der Außenluft von Anlage AII gesammelt und hatte im Vergleich zu den anderen Außenluftproben einen sehr hohen Staubgehalt (45,69 µg/m³; s. Tab. 3.2).

Zur Bewertung der Proben aus Anlage B wurden ebenfalls aus unterschiedlichen Probenahmezeiträumen für jede Probe der NR_{50} -Wert in drei Replika mit und ohne metabolische Aktivierung graphisch ermittelt und auf die in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Szenarien bezogen. Die filtrierte Luft und die Abluft nach dem Wärmetauscher aus Anlage BI konnten jeweils drei Mal beprobt werden, die restlichen Proben konnten nur zwei Mal gesammelt werden (vgl. Kap. 3.2.1). Die Mittelwerte und Standardabweichungen aller Werte sind in Abbildung 3.8 dargestellt.



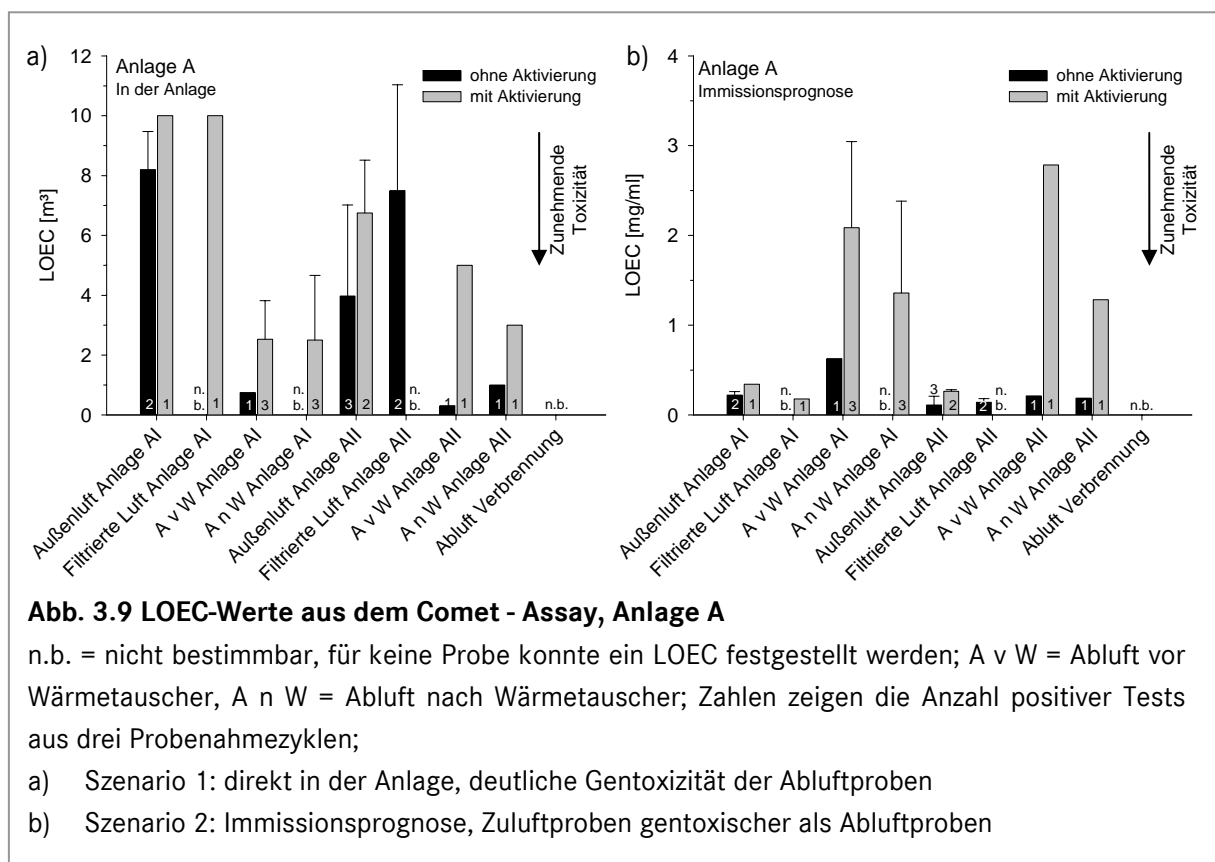
Die Proben aus Anlage B zeigen eine deutlich geringere Cytotoxizität als die Proben aus Anlage A, insbesondere in BII im Vergleich zu AII. In beiden Szenarien konnte nur in der Abluft der Anlage BI eine Cytotoxizität festgestellt werden.

Legt man für die Proben aus Anlage A die in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Maßstäbe zur Bewertung an, erhält man die in Tabelle 3.6 dargestellten Ergebnisse. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Toxizität der Abluft durch die Menge an extrahierten Partikeln hervorgerufen wird, da der Effekt durch rechnerische Verdünnung der Konzentration auf normale Konzentrationen an Stäuben in der Außenluft aufgehoben werden kann.

3.2.4 Comet - Assay

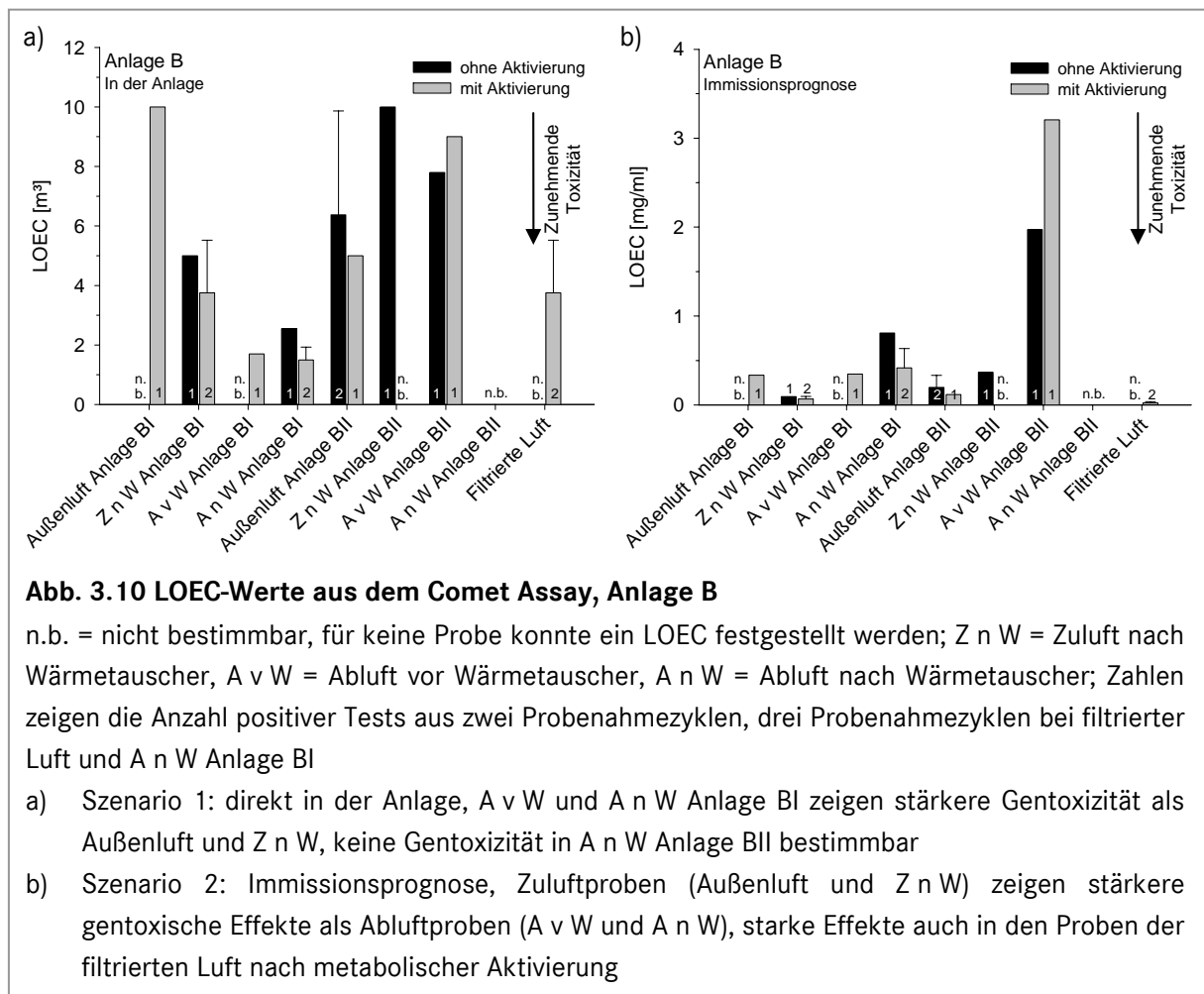
Der Comet - Assay mit der Säugerzelllinie V79 wurde zur Bestimmung der Gentoxizität der acetonischen Filterextrakte, wie in Kapitel 2.6 beschrieben, durchgeführt.

Aus drei unterschiedlichen Probenahmezeiträumen wurde in Anlage A für jede Probe mit und ohne metabolische Aktivierung die niedrigste Konzentration ermittelt, bei der ein statistisch signifikanter gentoxische Effekt im Vergleich zur Negativkontrolle bestand (*lowest observable effect concentration*, LOEC) und auf die in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Szenarien bezogen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen aller Werte sind in Abbildung 3.9 dargestellt. Keine der Kontrollproben (Kap. 3.2.2) löste einen Effekt im Comet - Assay aus.



Bezogen auf Szenario 1 (*In der Anlage*, Abb. 3.9 a) wirkten die Proben der Abluft gentoxischer im Comet-Assay als die Proben aus der Außenluft. In der Zuluft der Anlage All konnte während aller Probenahmen ein Effekt festgestellt werden, so dass diese Effekte nicht gänzlich auf die klimatischen Bedingungen zurückzuführen sind. Weder für die Abluft nach dem Wärmetauscher in Anlage AI noch für die Abluft nach der Verbrennung konnte ein LOEC im Comet - Assay bestimmt werden. Aufgrund der hohen Cytotoxizität der Proben konnte jedoch keine höhere Konzentration eingesetzt werden, da der Zerfall der DNA während des Absterbens der Zellen eine Gentoxizität vorgetäuscht hätte. Die Zugabe des S9-Mixes zur metabolischen Aktivierung bestimmter Stoffe (vgl. Kap. 2.3.4), führte in allen Proben zu erhöhten LOECs und damit zu einer Verminderung der gentoxischen Wirkung.

Zur Bewertung der Proben aus Anlage B wurden ebenfalls aus unterschiedlichen Probenahmezeiträumen für jede Probe mit und ohne metabolische Aktivierung die niedrigste Konzentration ermittelt, bei der ein statistisch signifikanter gentoxischer Effekt gegenüber der Negativkontrolle nachzuweisen war und auf die in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Szenarien bezogen. Die gefilterte Luft und die Abluft von Anlage BI nach dem Wärmetauscher konnten jeweils drei Mal beprobt werden, die weiteren Proben konnten nur zwei Mal gesammelt werden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen aller Werte sind in Abb. 3.10 dargestellt.



Im Bereich BI in Szenario 1 (*In der Anlage*, Abb. 3.10 a) konnte wie bereits in Anlage A in der Abluft vor und nach dem Wärmetauscher eine höhere Gentoxizität als im Zuluftbereich festgestellt werden. In Anlage BII hingegen war die Gentoxizität in der Abluft nach dem Wärmetauscher nicht bestimmbar, während vor dem Wärmetauscher eine geringe Gentoxizität in einer der Proben gefunden werden konnte. Die Zugabe von S9-Mix zur metabolischen Aktivierung von Stoffen führte bei der Belastung mit den Proben Zuluft nach Wärmetauscher in Anlage BI, Abluft nach Wärmetauscher in Anlage BI und der Außenluft vor Anlage BII zu niedrigeren LOECs und damit zu einer Verstärkung des gentoxischen Effekts.

Legt man für die Proben aus Anlage A die in Kap. 3.1.2 beschriebene Bewertungsmethode an, erhält man die in Tab. 3.8 aufgelisteten Ergebnisse.

Tab. 3.8 Bewertung der Ergebnisse des Comet-Assays, Anlage A

Toxizität der Abluft durch Menge an Partikeln, schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung; A v W = Abluft vor Wärmetauscher, A n W = Abluft nach Wärmetauscher,

	AI				AII				Verbrennung
	Außenluft	Filtrierte Luft	A v W	A n W	Außenluft	Filtrierte Luft	A v W	A n W	
In der Anlage	+/+	-/+	+++/**	-/**	**/+	+/-	+++/**	+++/** +	-/-
Immissionsp.	**/+	-/**	-/-	-/-	+++/**	**/-	**/-	**/-	-/-

Unterschiede in beiden Bezugsszenarien sind in allen Proben erkennbar. In den Abluftproben, insbesondere in Anlage AI, kommt es zu einer geringeren Einstufung des Gefährdungspotenzials bei rechnerischer Verdünnung der Partikelkonzentration auf Werte der Außenluft. Die gentoxischen Effekte werden daher durch die Menge an extrahiertem Material ausgelöst, nicht jedoch durch eine extreme Toxizität der Partikel. Die Zuluft hingegen erweist sich bezogen auf die Luftmenge als weniger toxisch als bezogen auf die Partikel selbst, da sie im Vergleich zur Abluft sehr wenige Partikel enthält, die jedoch ein gentoxisches Potenzial aufweisen.

In Tabelle 3.9 sind die Ergebnisse nach der Bewertung, der in Kap. 3.1.2 beschriebenen Methode für die Proben aus Anlage B, aufgelistet.

Tab. 3.9 Bewertung der Ergebnisse des Comet-Assays, Anlage B

Toxizität der Abluft durch Menge an Partikeln, schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung; Z n W = Zuluft nach Wärmetauscher, A v W = Abluft vor Wärmetauscher, A n W = Abluft nach Wärmetauscher

	BI				BII				Filtrierte Luft
	Außenluft	Z n W	A v W	A n W	Außenluft	Z n W	A v W	A n W	
In der Anlage	-/+	**/**	-/**	**/**	+/**	+/-	+/**	-/-	-/**
Immissionsp.	-/+	+++/**	-/+	-/+	+++/**	+/-	-/-	-/-	-/**

Unterschiede sind in Tab. 3.9 deutlich vor allem im Zuluftbereich (Zuluft nach Wärmetauscher Anlage BI, Außenluft Anlage BII) und in der filtrierten Luft zu erkennen. Die höhere Einstufung resultiert aus der geringen Partikelzahl, da hier geringe Partikelmengen bereits einen Effekt im Comet-Assay hervorriefen. Anders hingegen verhält es sich in Anlage B in der Abluft der Anlage BII. Die hohe Einstufung aus Szenario 1 (*In der Anlage*) wird in Szenario 2 (*Immissionsprognose*) deutlich reduziert, da die rechnerische Verdünnung der Partikelkonzentration auf die Außenluft, den Effekt unter die definierten Grenzen drückt.

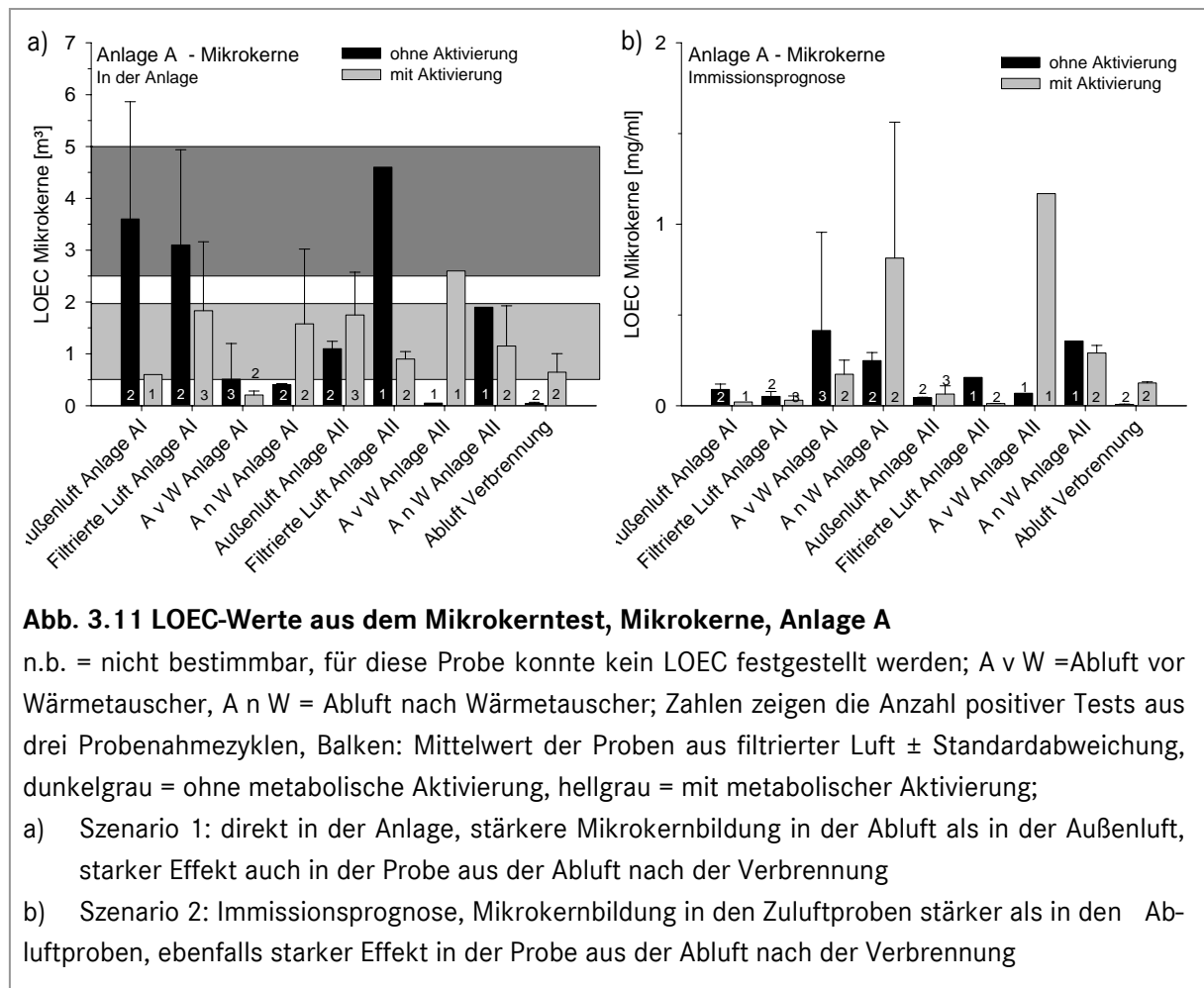
3.2.5 Mikrokerntest

Als zusätzlicher Gentoxizitätstest zum Comet-Assay wurde, wie in Kapitel 2.6 beschrieben, der Mikrokerntest durchgeführt. Dabei wurde sowohl das Potenzial der Probe, Mikrokerne zu induzieren, betrachtet, als auch Anomalien des Zellkerns hervorzurufen. Beide Endpunkte wurde bei der Auswertung betrachtet und werden im folgenden Kapitel getrennt bewertet.

Mikrokerne

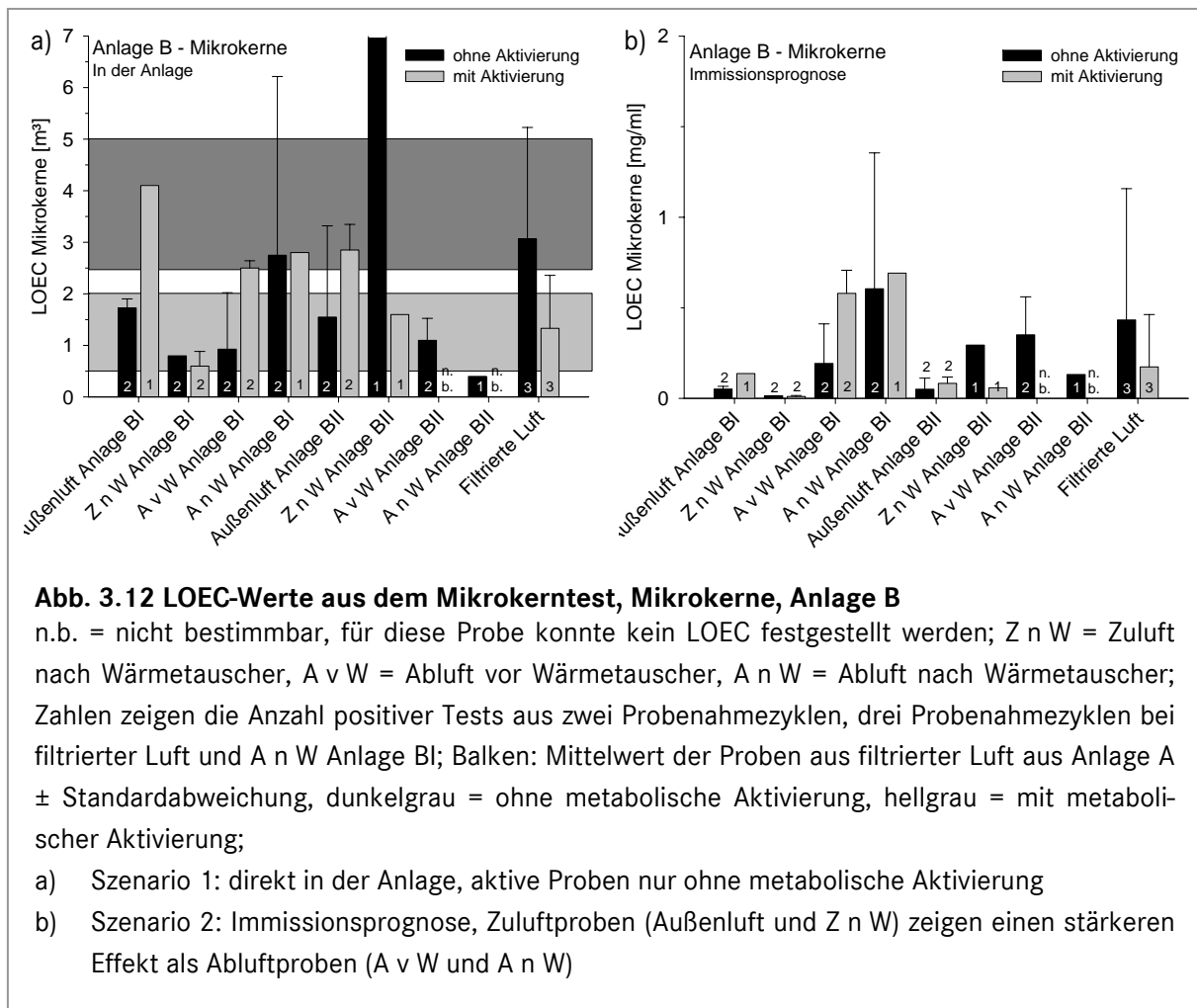
Zur Ermittlung der LOECs (*lowest observable effect concentrations*) wurden zunächst alle Negativkontrollen (Anlage A und B) gemittelt und deren Standardabweichung bestimmt. Die Werte lagen ohne metabolische Aktivierung durch S9-Mix bei $1,43 \% \pm 0,43$, im Ansatz mit metabolischer Aktivierung durch S9 bei $2,71 \% \pm 1,24$. Die Standardabweichung wurde verdoppelt und zum Mittelwert hinzuaddiert, um Grenzen zu definieren, ab der ein Effekt auftritt. Durch die Verdopplung der Standardabweichung konnte sichergestellt werden, dass mit 97,5 prozentiger Wahrscheinlichkeit kein Wert falsch positiv bewertet wurde. Anschließend wurde graphisch die Konzentration ermittelt, bei der ohne S9-Mix 2,5 % und mit S9-Mix 5,5 % Mikrokerne erreicht wurden. Diese Werte wurden als LOECs festgelegt.

Abb. 3.11 zeigt die Mittelwerte aller LOECs mit Standardabweichung. Da die Zellen im Mikrokerntest sensitiver als der Comet - Assay auf die Exposition reagierten, wurde bei Szenario 1 (*In der Anlage*) eine andere Bewertung herangezogen als in Kapitel 3.1.2. Die Proben aus der filtrierten Luft dienten für diesen Test als Referenz, da die Luft, wenn sie diesen Probenahmeort erreicht, bereits mehrere Filter durchlaufen hat und als „sauber“ gilt. Zur Bestimmung der Effektgrenze wurde der Mittelwert aus allen Werten der Proben aus der filtrierten Luft gebildet und die Standardabweichung addiert und subtrahiert. Werte, die in diesem Bereich lagen, galten als „negativ“ und sind in Abbildung 3.11 durch graue Balken gekennzeichnet. Werte unterhalb der Grenze von $2,5 \text{ m}^3$ wurden mit ++, Werte unterhalb einer Grenze von $1,25 \text{ m}^3$ mit +++ bewertet. Für die Immissionsprognose gelten die in Kap. 3.1.2 festgelegten Bewertungsgrenzen.



Effekte im Mikrokerntest konnten bezogen auf Szenario 1 (*In der Anlage*, Abb. 3.11 a) im Außenluftbereich nur für die Zuluft von Anlage All in 2 von 3 Probenahmen gefunden werden. Sehr starke Effekte zeigten die Abluft vor dem Wärmetauscher in allen Probenahmen und die Abluft nach dem Wärmetauscher in 2 von 3 Probenahmen ohne metabolische Aktivierung. Durch die metabolische Aktivierung konnten die Effekte der Probe Abluft nach dem Wärmetauscher wieder aufgehoben werden. Die Effekte der Abluft aus Anlage All konnten nur in einer Probe festgestellt werden und ebenfalls durch metabolische Aktivierung aufgehoben werden. Die Proben aus der Abluft nach der Verbrennung zeigten ebenfalls ohne metabolische Aktivierung eine starke Mikrokernelbildung. In Szenario 2 (*Immissionsprognose*, Abb. 3.11 b) konnte hingegen gezeigt werden, dass die starke Effektwirkung auf die Menge der Partikel zurückzuführen ist, da die Abluftproben bezogen auf ihre Partikelzahl eine geringere Wirkung als die Proben aus der Außenluft zeigten.

Abb. 3.12 zeigt die Mittelwerte aller LOECs mit Standardabweichung für die Proben aus Anlage B. Als Referenz wurden die Proben aus Anlage B ebenfalls die Proben aus der filtrierten Luft in Anlage A gewählt.



Die Proben aus Anlage B waren im Mikrokerntest, bezogen auf Szenario 1 (*In der Anlage*, Abb. 3.12 a), ausschließlich ohne metabolische Aktivierung durch S9 aktiv. Durch die Zugabe des S9-Mixes konnten alle Effekte im Mikrokerntest aufgehoben werden. Keine Aktivität konnte nur in den Proben Abluft nach dem Wärmetauscher - in Anlage BI, Zuluft nach dem Wärmetauscher - Anlage BII und den Proben aus der gefilterten Luft gefunden werden.

Da auch die Prozesskontrollen Effekte im Mikrokerntest zeigten, wurden diese in Tab. 3.10 zusammengefasst.

Tab. 3.10 Effekte der Prozesskontrollen im Mikrokerntest, Mikrokerne

Werte sind errechnete Nominalkonzentrationen, bei denen ein Effekt auftrat (maximal eingesetzt 10 µl/ml). Schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung

	Mikrokerne
Kontrolle 1 Anlage A	- / -
Kontrolle 2 Anlage A	9,6 µl/ml / -
Kontrolle 1 Anlage B	- / -
Kontrolle 3 Anlage A	- / -

Zur Bewertung der Ergebnisse des Mikrokerntest wurde der Effekt der Prozesskontrolle 2 aus Anlage A bei den Versuchen ohne metabolische Aktivierung mit einbezogen. Dazu wurden zunächst alle Proben aus der zweiten Probenahme in Anlage A, die Effekte gezeigt hatten und bei denen die eingesetzte Maximalkonzentration 9,6 µl/ml überstieg, genau betrachtet.

Die Voraussetzungen trafen auf zwei Proben zu: die Probe aus der filtrierten Luft der Anlage AI und die Probe aus der Außenluft der Anlage All. Beide Proben zeigen eine nahezu linear ansteigende Kurve, mit Effekten in weit niedrigeren Konzentrationen als die Prozesskontrolle. Ein falsch positives Ergebnis durch Effekte aus der Aufbereitung kann daher ausgeschlossen werden.

Die Bewertung des Mikrokerntests mit dem Endpunkt „Mikrokerne“ ist in Tab. 3.11 zusammengefasst.

Tab. 3.11 Bewertung der Ergebnisse des Mikrokerntests, Mikrokerne: Anlage A

schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung, A v W = Abluft vor Wärmetauscher, A n W = Abluft nach Wärmetauscher

	AI				All				Verbrennung
	Außenluft	Filtrierte Luft	A v W	A n W	Außenluft	Filtrierte Luft	A v W	A n W	
In der Anlage	-/-	-/-	+++ / +++	+++ / -	+++ / -	-/-	+++ / -	++ / -	+++ / -
Immissionsp.	+++ / +++	+++ / +++	+ / ++	++ / -	+++ / +++	++ / +++	+++ / -	+ / +	+++ / ++

Deutlich ist auch hier wieder ein Unterschied der Einstufung in beiden Szenarien zu erkennen. Während die Außenluft in Szenario 1 (*In der Anlage*) ein sehr geringes Gefährdungspotenzial aufweist, erhöht sich dieses Potenzial durch rechnerische Aufkonzentrierung der Staubkonzentrationen. Hingegen vermindert sich das Potenzial der Abluftpartikel durch rechnerische Verdünnung.

Die Bewertung der Ergebnisse aus Anlage B ist in Tab. 3.12 zusammengefasst.

Tab. 3.12 Bewertung der Ergebnisse des Mikrokerntests, Mikrokerne: Anlage B

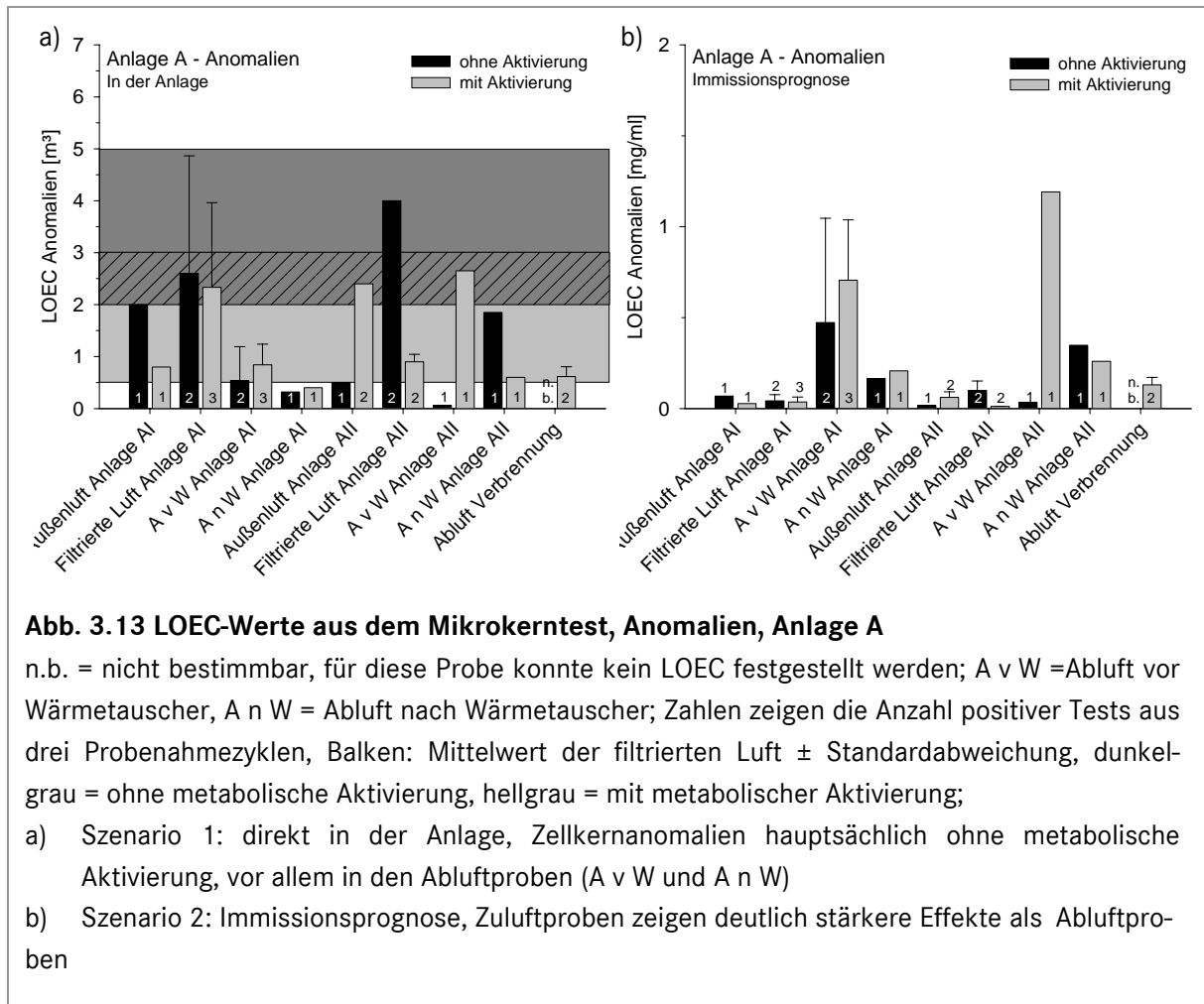
schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung, Z n W = Zuluft nach Wärmetauscher, A v W = Abluft nach Wärmetauscher

	BI				BII				Filtrierte Luft
	Außenluft	Z n W	A v W	A n W	Außenluft	Z n W	A v W	A n W	
In der Anlage	++/-	+++/-	+++/-	-/-	++/-	-/-	+++/-	+++/-	-/-
Immissionsp.	+++/>++	+++/>+++	++/-	-/-	+++/>+++	+/>+++	+/-	++/-	+/>++

Besonders auffällig ist, dass die Abluft nach dem Wärmetauscher aus Anlage BI in beiden Szenarien keine Aktivität im Mikrokerntest aufweist. Des Weiteren kann durch metabolische Aktivierung eine Aufhebung der Effekte der Abluft aus Anlage BII erreicht werden. Durch die geringe Partikelkonzentration in der filtrierte Luft sind die dort gefundenen Effekte nur in Szenario 2 zu erkennen.

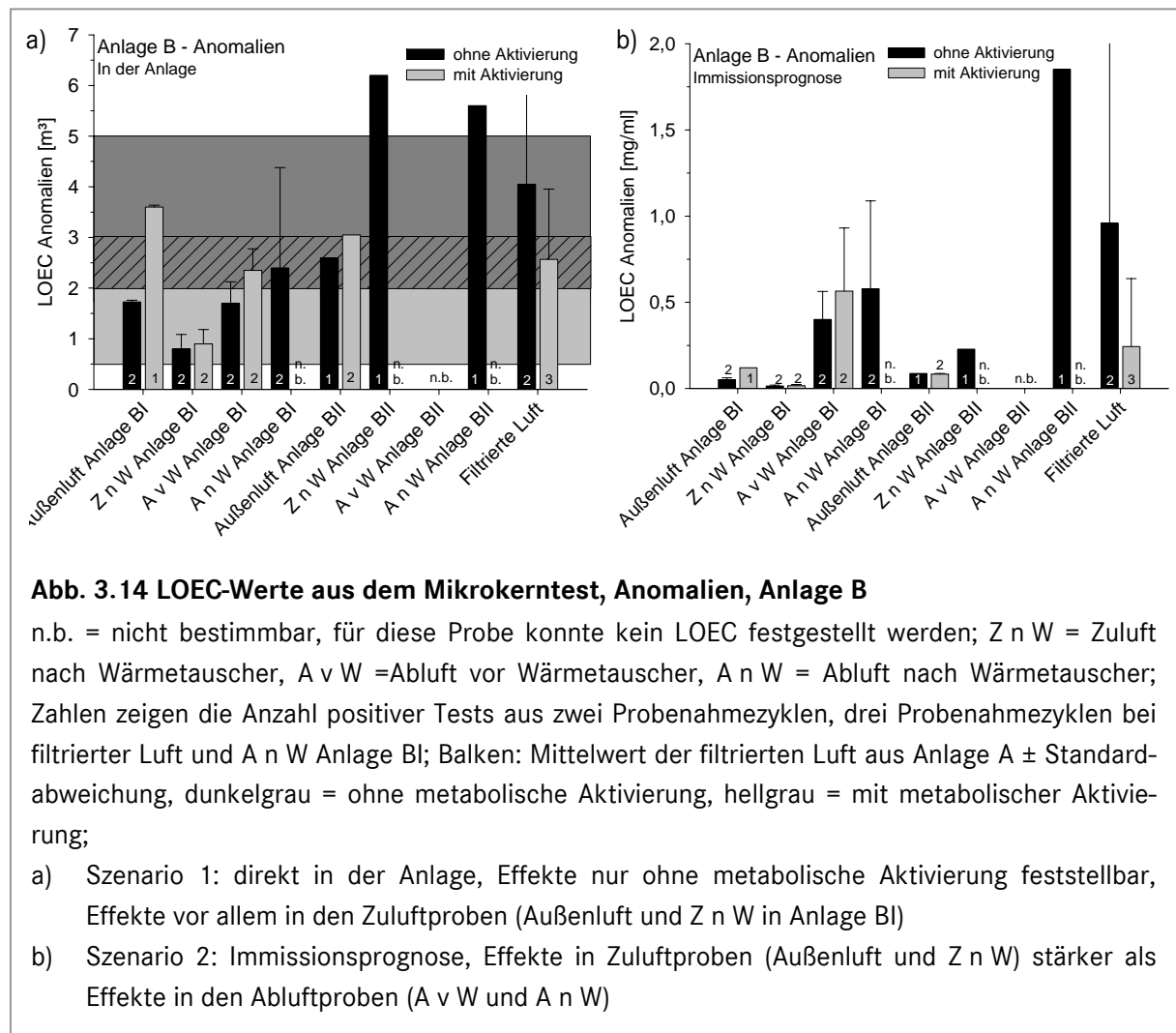
Anomalien

Bei der Auswertung des Mikrokerntests wurden nicht nur Mikrokerne, sondern auch Anomalien der Zellkerne ausgewertet (s. Kap 2.7.2). Diese wurden analog zur Auswertung der Mikrokerne aufgetragen und wie oben beschrieben ausgewertet. Der Mittelwert der Negativkontrollen lag bei $1,99\% \pm 1,33$ ohne metabolische Aktivierung und bei $3,32\% \pm 2,12$ mit metabolischer Aktivierung durch S9. Zur graphischen Ermittlung des LOEC wurde ohne S9-Mix die Konzentration bestimmt, bei der 5 % der Zellen Anomalien aufwiesen, im Versuch mit metabolischer Aktivierung wurde die Konzentration gewählt, bei der 8 % der Zellen Anomalien aufwiesen, da bereits die Verwendung des S9-Mixes Schädigungen der Zellkerne in den Negativkontrollen hervorrief. Die ermittelten Werte für die Proben aus Anlage A sind in Abb. 3.13 dargestellt. Wie oben beschrieben wurde auch hier für die Bewertung des Szenario 1 (*In der Anlage*) auf die Ergebnisse der filtrierte Luft bezogen (dargestellt als graue Balken).



Zellkernanomalien konnten bezogen auf Szenario 1 (*In der Anlage*, Abb. 3.13 a) hauptsächlich ohne metabolische Aktivierung gefunden werden. Mit metabolischer Aktivierung wurde die Effektgrenze nur in einer Probe der Abluft aus Anlage AI unterschritten. Starke Effekte konnten auch in der Abluft vor dem Wärmetauscher aus Anlage AI in 2 von 3 Proben ermittelt werden. Szenario 2 (Immissionsprognose, Abb. 3.13 b) zeigt ein ähnliches Bild wie bei der Ermittlung des Potenzials, Mikrokerne zu induzieren. Besonders die Effekte, die durch die Abluft vor dem Wärmetauscher ausgelöst werden, scheinen auf die Partikelmenge zurückzuführen zu sein, da sie durch rechnerisches Verdünnen der Probe deutlich schwächer als die Effekte aus der Außenluft zu bewerten sind.

Die ermittelten Werte für die Proben aus Anlage B sind in Abb. 3.14 dargestellt. Wie oben beschrieben wurde auch hier für die Bewertung des Szenario 1 (*In der Anlage*) auf die Ergebnisse der filtrierten Luft aus Anlage A bezogen (dargestellt als graue Balken).



Wie bereits bei der Induktion von Mikrokerneln zu beobachten, riefen die Proben aus Anlage B bezogen auf Szenario 1 (*In der Anlage*, Abb. 3.14 a), mit metabolischer Aktivierung nicht mehr Zellkernanomalien als die Proben aus der filtrierten Luft hervor. Ohne metabolische Aktivierung konnten Effekte in Anlage BI, bis auf die Probe Abluft nach dem Wärmetauscher Anlage BI, nachgewiesen werden. Szenario 2 (*Immissionsprognose*, Abb. 3.14 b) zeigt wiederum deutlich die Bedeutung der Partikelzahl in der Luft bei der Betrachtung der Wirkung in den Biosays.

Die Prozesskontrollen zeigten auch Effekte im Mikrokerntest mit dem Endpunkt „Anomalien“. Daher wurden diese in Tab. 3.13 zusammengefasst.

Tab. 3.13 Effekte der Prozesskontrollen im Mikrokerntest, Anomalien

Werte sind errechnete Nominalkonzentrationen, bei denen ein Effekt auftrat (maximal eingesetzt 10 µl/ml). Schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung

	Anomalien
Kontrolle 1 Anlage A	- / -
Kontrolle 2 Anlage A	- / -
Kontrolle 1 Anlage B	- / -
Kontrolle 3 Anlage A	- / 9,6 µl/ml

Aufgrund der Effekte im Mikrokerntest in Prozesskontrolle 3 aus Anlage A wurden die Effekte aus dem dritten Probenahmezyklus, deren eingesetzte Maximalkonzentration 9,6 µl/ml überstieg, nochmals genau betrachtet.

Für den Endpunkt „Anomalien“ traf dies nur auf die Probe aus der filtrierten Luft aus Anlage A1 zu. Im Mikrokerntest mit dem Endpunkt „Anomalien“ ergab sich für diese Probe zunächst ein starker Anstieg der Anzahl der gefundenen Zellkernanomalien mit einem Höhepunkt in der zweithöchsten Konzentration. Die Anzahl der Zellkernanomalien in der höchsten Konzentration entsprach der aus der Negativkontrolle. Da die Prozesskontrolle jedoch nur in der höchsten Konzentration Effekte zeigen, ist ein falsch positives Ergebnis durch die Behandlung der Filter ausgeschlossen.

In Tabelle 3.14 ist die Bewertung der Ergebnisse für Anlage A zusammengefasst.

Tab. 3.14 Bewertung der Ergebnisse des Mikrokerntests, Anomalien, Anlage A

schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung, A v W = Abluft vor Wärmetauscher, A n W = Abluft nach Wärmetauscher

	A1				A11				Verbrennung
	Außenluft	Filtrierte Luft	A v W	A n W	Außenluft	Filtrierte Luft	A v W	A n W	
In der Anlage	-/-	-/-	+++/-	+++/**	**/-	-/-	+++/-	**/-	-/-
Immissionsp.	+++/**	+++/**	+/-	**/**	+++/**	+++/**	+++/-	+/**	-/**

Der Unterschied in der Einstufung in beiden Szenarien ist deutlich in der Außenluft und in der filtrierten Luft zu erkennen. Während die Außenluft in Szenario 1 (*In der Anlage*) ein sehr geringes Gefährdungspotenzial aufweist, erhöht sich dieses Potenzial durch rechnerische Aufkonzentrierung der Staubkonzentrationen. Hingegen vermindert sich das Potenzial der Abluftpartikel durch rechnerische Verdünnung. Auffällig ist die geringe Wirkung der Proben aus der Abluft nach der Verbrennung in beiden Szenarien. Diese Proben lösen die Bildung von Mikrokernen aus, Anomalien der Zellkerne jedoch nur mit metabolischer Aktivierung in Szenario 2.

In Tabelle 3.15 ist die Bewertung der Ergebnisse der gefundenen Zellkernanomalien im Mikrokerntest für die Proben aus Anlage B zusammengefasst.

Tab. 3.15 Bewertung der Ergebnisse des Mikrokerntests, Anomalien, Anlage B

schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung, Z n W = Zuluft nach Wärmetauscher, A v W = Abluft vor Wärmetauscher, A n W = Abluft nach Wärmetauscher

	BI				BII				Verbrennung
	Außenluft	Z n W	A v W	A n W	Außenluft	Z n W	A v W	A n W	
In der Anlage	++/-	+++/-	++/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Immissionsp.	+++ / +++	+++ / +++	+/-	-/-	+++ / +++	++/-	-/-	-/-	- / +++

Die Prozessluft aus Anlage BII zeigt in Szenario 1 (*In der Anlage*) weder mit noch ohne metabolische Aktivierung einen Effekt. Auch die Abluft nach dem Wärmetauscher in Anlage BI ruft in keinem Szenario Anomalien der Zellkerne hervor. Auffällig ist dagegen die hohe Wirksamkeit der Außenluftproben in Anlage BI und BII. Die rechnerische Aufkonzentrierung zeigt eine größere Wirksamkeit der Partikel aus der Außenluft als die Partikel aus der Abluft aufweisen können.

3.2.5 Ames - Test

Die Mutagenität der acetonischen Extrakte der Luftproben wurde wie in Kap. 2.8 beschrieben durch den Ames-Test mit den Stämmen TA98 und TA100 von *Salmonella typhimurimum* jeweils mit und ohne metabolische Aktivierung durch S9 bestimmt.

Die Anzahl der Revertanten wurde gegen die eingesetzte Menge an Luftäquivalenten aufgetragen und über die Steigung einer linearen Regressionsgerade die Anzahl der Revertanten pro m³ Luft ermittelt. Diese Vorgehensweise ist besonders für Proben mit hohen Revertantenzahlen geeignet, bei Revertantenzahlen unterhalb von 5 Revertanten/m³ verschlechtert sich die Qualität der linearen Dosis-Wirkungsbeziehung, so dass diese Werte in ihrer quantitativen Aussage nur begrenzt belastbar sind (Erdinger et al. 1997). Die Aussagefähigkeit der berechneten Revertanten pro m³ Luftäquivalent bemisst sich an der Höhe der berechneten Korrelationsfaktoren, daher wurden nur die Proben bewertet, die einen Korrelationsfaktor über 0,80 aufwiesen. Für alle anderen Proben wurde bestimmt, dass kein Effekt im Ames - Test gefunden werden konnte. Um eine Darstellung der Ergebnisse zu erreichen, die der Darstellung der anderen Assays entspricht (höhere Toxizität bei kleiner werdenden Balken), wurde der reziproke Wert der Steigung der linearen Regressionsgerade verwendet, um die Einheit m³/Revertant zu erreichen. Die Bewertungsgrenzen wurden auf Basis von Versuchen mit Proben aus einem Reinluftgebiet nahe Freiburg („Kälbelescheuer“), da diese Probe „saubere Waldluft“ darstellt. Die Effektgrenzen lagen daher bei den in Tabelle 3.16 aufgelisteten Werten. Keine der Prozesskontrollen (s. Kap. 3.2.2) wies im Ames - Test einen Effekt auf.

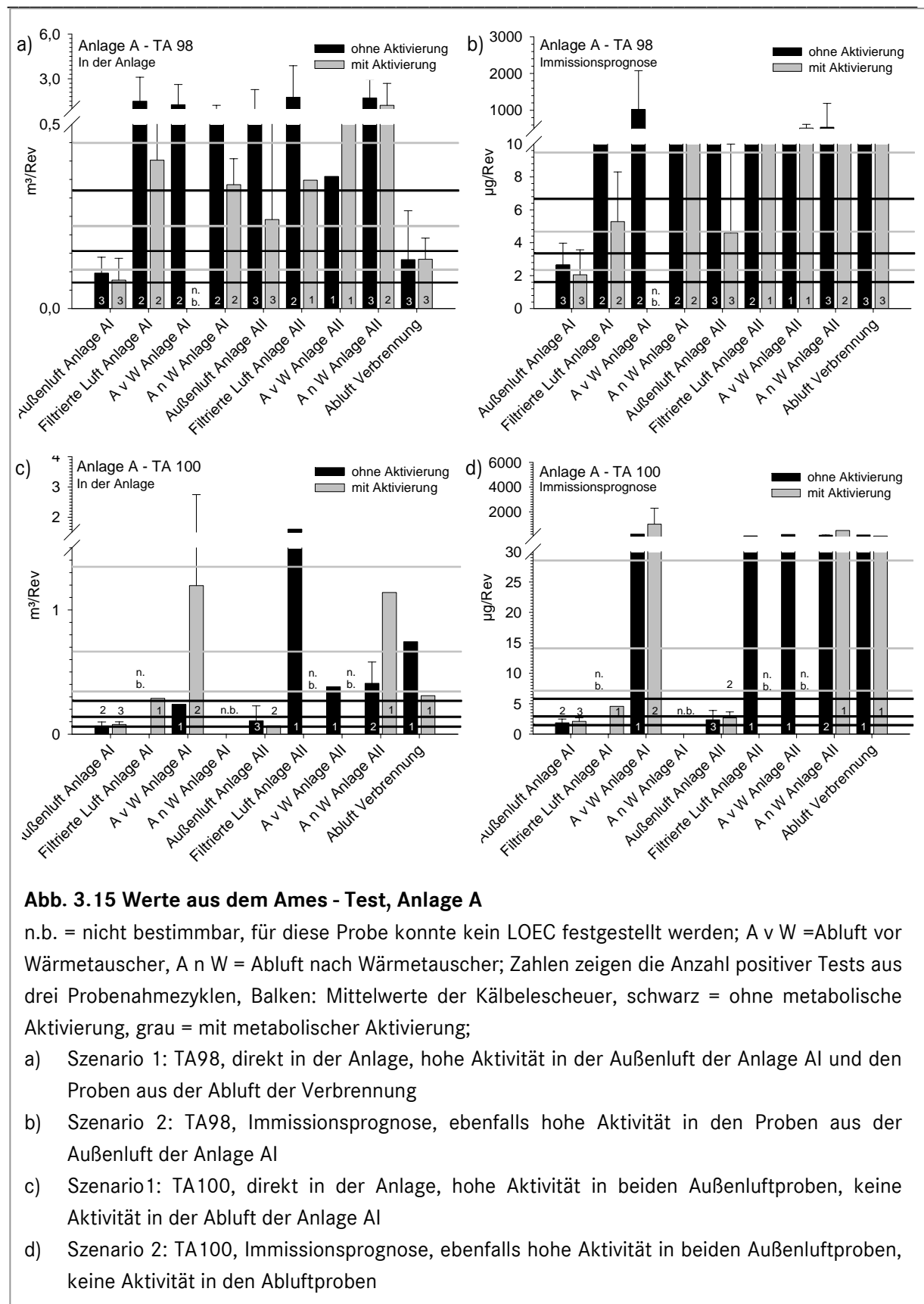
Tab. 3.16 Effektgrenzen im Ames-Test

Unter Grenze 1: +, unter Grenze 2: ++, unter Grenze 3: +++

Stamm	In der Anlage [m ³ /Rev]				Immissionsprognose [µg/Rev]			
	TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9	TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
1. Grenze	0,32	0,45	0,28	1,35	6,70	9,48	5,93	28,70
2. Grenze	0,16	0,23	0,14	0,68	3,35	4,74	2,96	14,35
3. Grenze	0,08	0,11	0,07	0,34	1,68	2,37	1,48	7,18

Auffällig sind die hohen Grenzen beim Stamm TA 100 mit metabolischer Aktivierung. In dieser Kombination konnten nur geringe Effekte der Probe „Kälbelescheuer“ im Ames-Test gefunden werden.

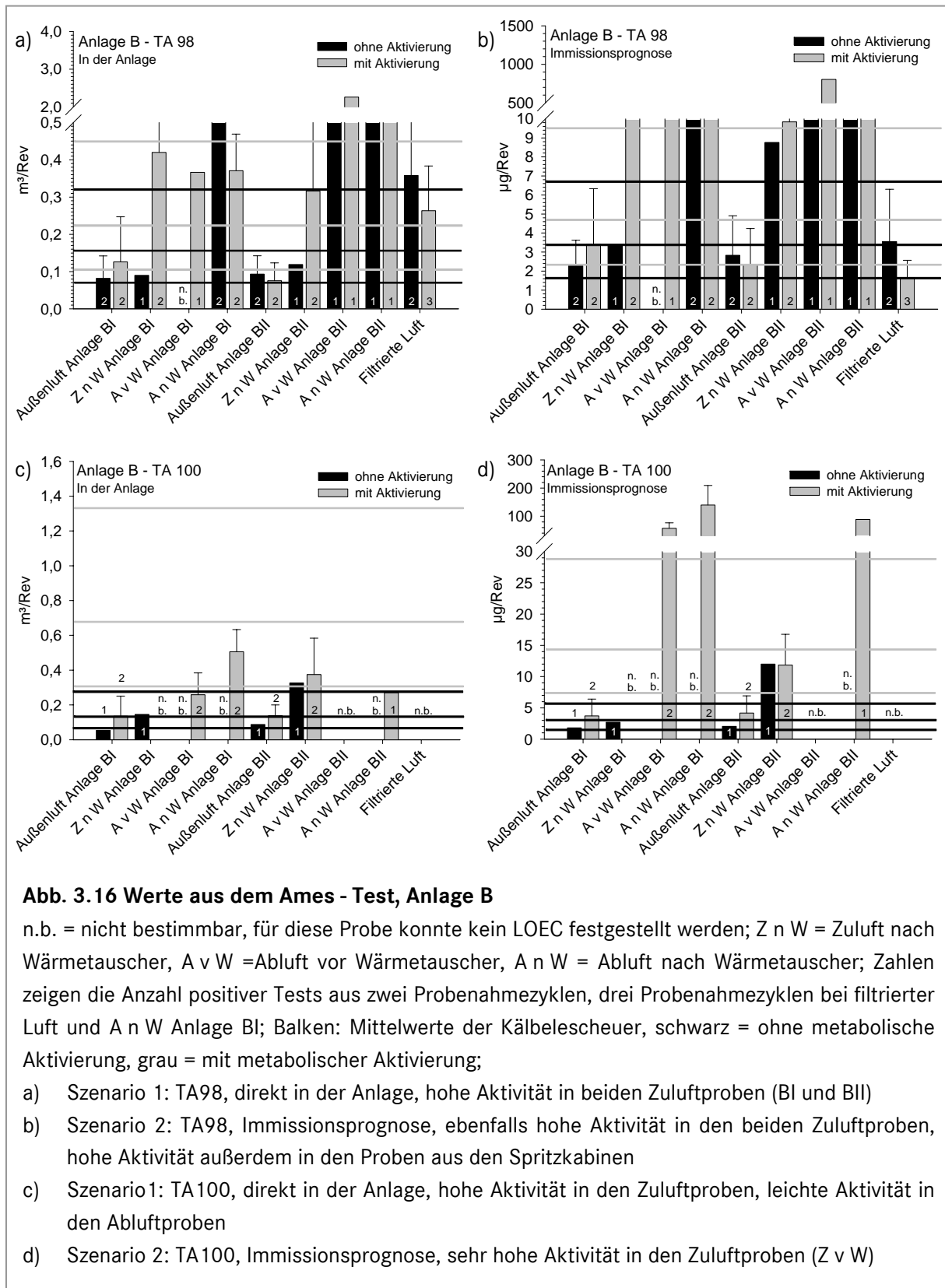
Abbildung 3.15 zeigt die Ergebnisse der Ames - Tests unter Einzeichnung der Grenzen, die in Tabelle 3.16 aufgelistet sind.



Insbesondere die Proben aus der Außenluft der Anlage AI weisen in beiden Stämmen und beiden Betrachtungsszenarien mit und ohne metabolische Aktivierung eine hohe Aktivität im Ames - Test auf. Auch die Außenluft der Anlage All zeigt in allen Betrachtungen eine hohe

Aktivität. Im Gegensatz dazu kann in den Abluftproben vor und nach dem Wärmetauscher nur in Einzelfällen eine geringe Mutagenität im Ames - Test in Szenario 1 (In der Anlage, Abb. 3.16 a) und c)) festgestellt werden (A n W Anlage AI TA98 +S9, A v W Anlage AI TA100 ± S9 und A n W Anlage All TA 100 +S9).

Abb. 3.16 zeigt die Ergebnisse im Ames - Test der Proben aus Anlage B.



Auch in Anlage B zeigten die Zuluftproben eine deutlich höhere Aktivität im Ames - Test als die Proben, die in der Abluft gesammelt wurden. Hohe Effekte konnten dabei insbesondere in der Außenluft vor dem Wärmetauscher festgestellt werden. Mutagenität im Ames - Test konnten in den Abluftproben nur nach Zugabe von S9 - Mix zur metabolischen Aktivierung gefunden werden. Die Proben, die in der filtrierten Luft gesammelt wurden, zeigten im TA100 weder mit noch ohne metabolische Aktivierung einen Effekt, jedoch im TA98, insbesondere im Szenario 2 (Immissionsprognose, Abb. 3.16 b) mit metabolischer Aktivierung stark mutagene Effekte in allen 3 Proben.

In Tabelle 3.17 ist die Bewertung der Ergebnisse der Proben aus Anlage A nach den oben beschriebenen Grenzen für die verschiedenen Teststämme zusammengefasst.

Tab. 3.17a Bewertung der Ergebnisse im Ames - Test, TA 98, Anlage A

schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung, A v W = Abluft vor Wärmetauscher, A n W = Abluft nach Wärmetauscher

	AI				All				Verbrennung
	Außenluft	Filtrierte Luft	A v W	A n W	Außenluft	Filtrierte Luft	A v W	A n W	
In der Anlage	++/++	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	++/++
Immissionsp.	++/+++	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-

Tab. 3.17 b Bewertung der Ergebnisse im Ames - Test, TA 100, Anlage A

schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung, A v W = Abluft vor Wärmetauscher, A n W = Abluft nach Wärmetauscher

	AI				All				Verbrennung
	Außenluft	Filtrierte Luft	A v W	A n W	Außenluft	Filtrierte Luft	A v W	A n W	
In der Anlage	+++ / +++	- / +++	+ / +	- / -	++ / +++	- / -	- / -	- / +	- / +++
Immissionsp.	++ / +++	- / +++	- / -	- / -	++ / +++	- / -	- / -	- / -	- / -

Deutlich wird die hohe mutagene Wirkung der Außenluftproben, insbesondere in Anlage AI. Auch die gefilterte Luft aus Anlage AI zeigt eine hohe Bewertung der Mutagenität im Stamm TA 100 mit metabolischer Aktivierung. Diese Einschätzung konnte jedoch nur in der 3. Probe festgestellt werden. Diese wurde vom 19.03. - 23.03.07 gesammelt und wies keine erhöhten Staubkonzentrationen auf (s. Tab. 3.1). Die parallel dazu gesammelte Probe Abluft vor Wärmetauscher aus Anlage AI wies zur selben Zeit ebenfalls eine hohe Aktivität im Ames - Test auf, die sich jedoch durch eine weitere Probe mit geringerer Aktivität ausglich (s. hohe Standardabweichung Abb. 3.15 c). Die metabolische Aktivierung der Proben durch den S9-Mix

führte in keinem Fall zu einer Verringerung des mutagenen Potenzials der Proben, die Mutagenität blieb durch die Aktivierung im selben Bereich oder stieg an. Die Probe aus der Abluft nach der Verbrennung stieg in der Bewertung in Szenario 1 (*In der Anlage*) im Stamm TA 100 von - zu +++.

Tabelle 3.18 fasst die Bewertung der Ergebnisse der Proben aus Anlage B nach den oben beschriebenen Grenzen für die verschiedenen Teststämme zusammen.

Tab. 3.18a Bewertung der Ergebnisse im Ames - Test, TA 98, Anlage B

schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung;
Z n W = Zuluft nach Wärmetauscher, A v W = Abluft vor Wärmetauscher, A n W = Abluft nach Wärmetauscher

	BI				BII				Filtrierte Luft
	Außenluft	Z n W	A v W	A n W	Außenluft	Z n W	A v W	A n W	
In der Anlage	++/++	++/+	-/+	-/+	++/+++	++/+	-/-	-/-	-/+
Immissionsp.	++/++	++/-	-/-	-/-	++/+++	-/-	-/-	-/-	+ /+++

Tab. 3.18b Bewertung der Ergebnisse im Ames - Test, TA 100, Anlage B

schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung,
Z n W = Zuluft nach Wärmetauscher, A v W = Abluft vor Wärmetauscher, A n W = Abluft nach Wärmetauscher

	BI				BII				Filtrierte Luft
	Außenluft	Z n W	A v W	A n W	Außenluft	Z n W	A v W	A n W	
In der Anlage	+++ /+++	+/-	- /+++	- /++	++ /+++	- /++	- /-	- /+++	- /-
Immissionsp.	++ /+++	++ /-	- /-	- /-	++ /+++	- /++	- /-	- /-	- /-

Auffällig sind in Anlage B ebenso wie in Anlage A die als hoch bewertete Mutagenität der Außenluftproben in Abschnitt I und Abschnitt II. Auch die Proben aus der gefilterten Luft, die saubere Luft ohne Partikelbeaufschlagung darstellen, zeigen eine als hoch bewertete mutagene Wirkung im Stamm TA 98 mit metabolischer Aktivierung in Szenario 2 (Immissionsprognose). Die metabolische Aktivierung der Proben durch den S9-Mix führte im Gegensatz zu den Proben aus Anlage A in wenigen Fällen zu einer Verringerung des mutagenen Potenzials der Proben.

3.2.6 Immunologische Untersuchungen

Zur Ermittlung des Potenzials der Proben das Immunsystem zu beeinflussen, wurde die Ausschüttung von Interleukinen im ELISA Assay (s. Kap. 2.9) untersucht. Dazu wurde ein selbst entwickeltes Modellsystem verwendet.

In diesem Modell wird zunächst die Wirkung der Staubextrakte auf die Interleukinausschüttung der Lungenepithelzellen selbst untersucht. Da die Lunge sich jedoch täglich nicht nur mit Luftstäuben, sondern auch mit Bestandteilen von Mikroorganismen auseinandersetzen muss, wurden die Zellen einer Co-Stimulation ausgesetzt. Dazu wurde in einem weiteren Ansatz die Interleukinausschüttung durch ein artifizielles Analogon doppelsträngiger viraler RNA (Poly(I:C)) stimuliert und damit eine Immunreaktion der Zellen hervorgerufen. Dadurch konnte gezeigt werden, ob sich die Ausschüttung, die durch die mikrobielle Stimulation hervorgerufen wurde, durch eine zusätzliche Belastung mit den Staubextrakten verändert.

Parallel zu allen ELISAs wurde ein MTT - Assay durchgeführt (s. Kap. 2.5), um sicherzustellen, dass die Interleukinausschüttung nicht durch letale Effekte hervorgerufen oder beeinflusst wurde. Die verwendeten Konzentrationen für MTT und ELISA wurden aus dem Cytotoxizitätstest mit V79-Zellen abgeleitet und sind für Anlage A in Tab. 3.19 aufgelistet. Die eingesetzten Konzentrationen der Proben aus Anlage B sind in Tab. 3.20 zusammengefasst.

Tab. 3.19 Konzentrationen für MTT und ELISA, Anlage A

A v W = Abluft vor Wärmetauscher, A n W = Abluft nach Wärmetauscher

		Probenahme 1	Probenahme 2	Probenahme 3
		[m ³ /ml]	[m ³ /ml]	[m ³ /ml]
Anlage AI	Außenluft	2,5	2,5	2,5
	Filtrierte Luft	2,5	2,5	2,5
	A v W	0,25	0,25	0,25
	A n W	0,125	0,25	0,125
Anlage AII	Außenluft	2,5	2,5	1,25
	Filtrierte Luft	2,5	2,5	2,5
	A v W	0,25	0,25	0,125
	A n W	1,25	0,25	0,25
	Abluft Verbrennung	0,25	0,125	0,25
Kontrollen	Prozesskontrolle	0,25 %	0,25 %	0,25 %
	DMSO	0,25 %	0,25 %	-

Tab. 3.20 Konzentrationen für MTT und ELISA, Anlage B

Z n W = Zuluft nach Wärmetauscher, A v W =Abluft vor Wärmetauscher, A n W = Abluft nach Wärmetauscher

		Probenahme 1 [m ³ /ml]	Probenahme 2 [m ² /ml]	Probenahme 3 [m ³ /ml]
Anlage BI	Außenluft	2,5	2,5	-
	Z n W	2,5	2,5	-
	A v W	1,25	2,5	-
	A n W	2,5	2,5	-
<hr/>				
Anlage BII	Außenluft	2,5	2,5	-
	Z n W	2,5	2,5	-
	A v W	2,5	2,5	-
	A n W	2,5	2,5	-
<hr/>				
Filtrierte Luft		2,5	2,5	2,5
<hr/>				
Kontrollen	Prozesskontrolle	0,25 %	0,25 %	0,25 %
	DMSO	0,25 %	0,25 %	-

Abb. 3.17 zeigt die Ergebnisse des MTT-Assays aus 2 Messungen der Proben aus Anlage A. Aufgrund der unterschiedlichen eingesetzten Konzentrationen aus den verschiedenen Probenahmen wurde auf eine Mittelwertbildung verzichtet und die Proben separat dargestellt. Keine der Prozesskontrollen (Kap. 3.2.2) zeigte einen Effekt.

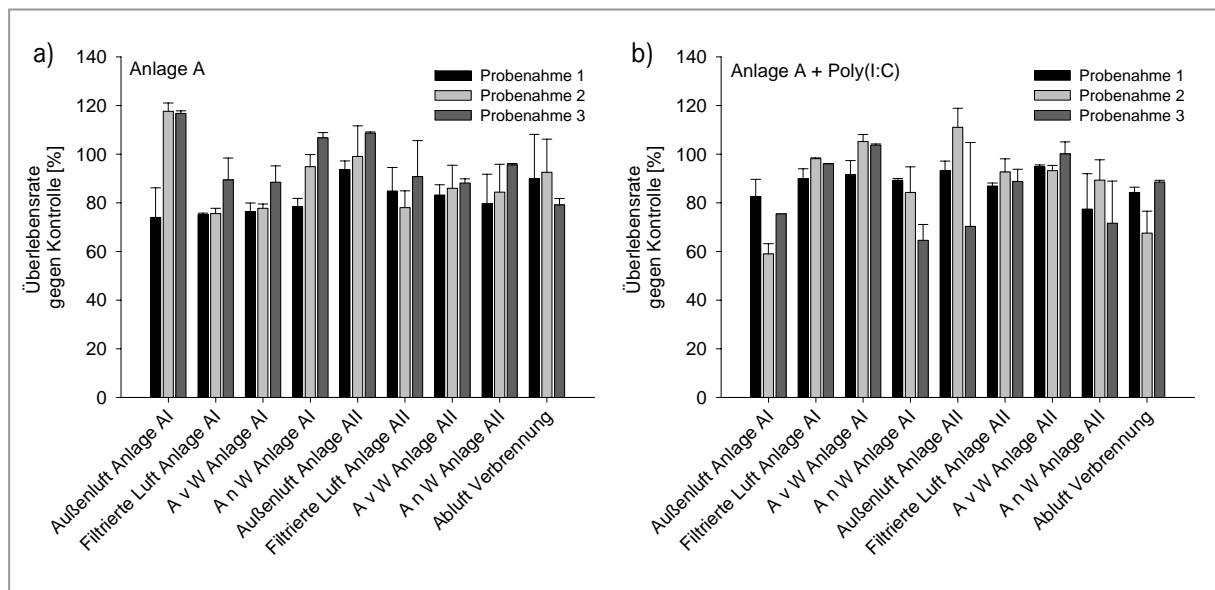


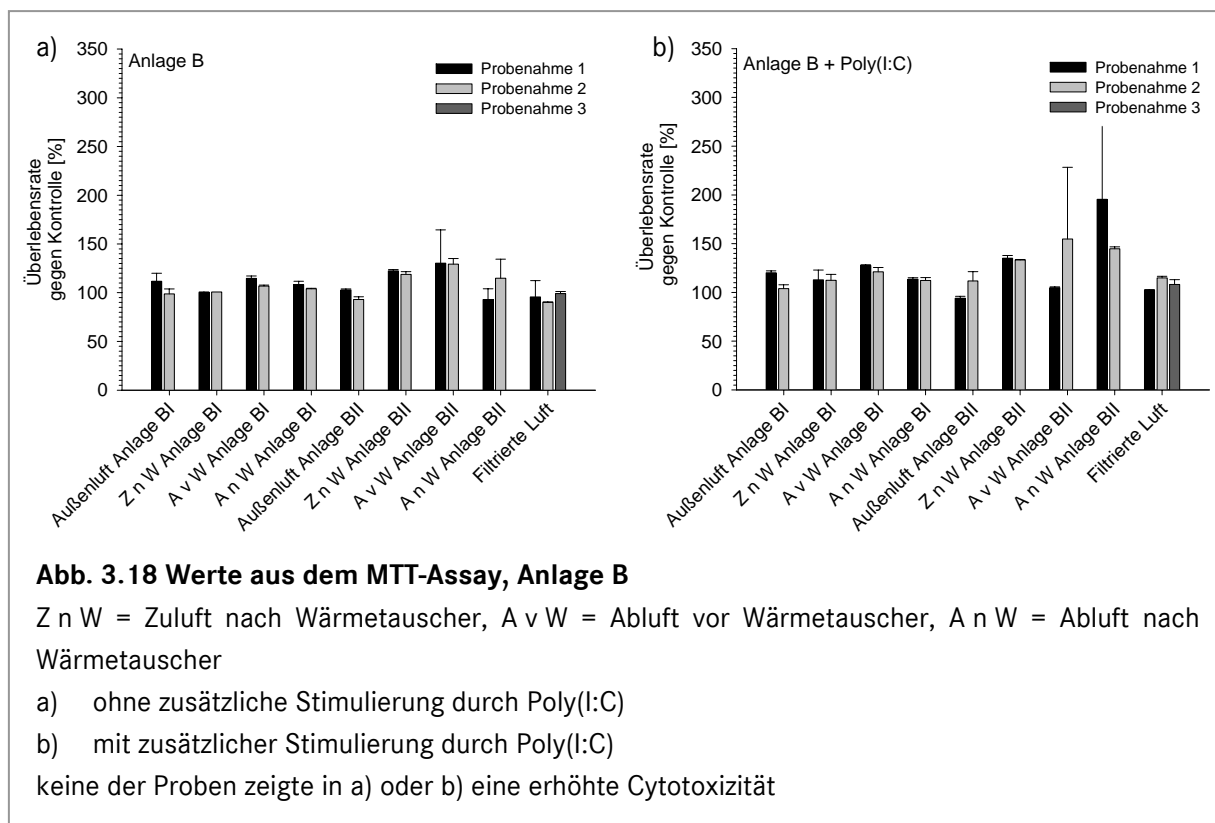
Abb. 3.17 Werte aus dem MTT-Assay, Anlage A

A v W =Abluft vor Wärmetauscher, A n W = Abluft nach Wärmetauscher;

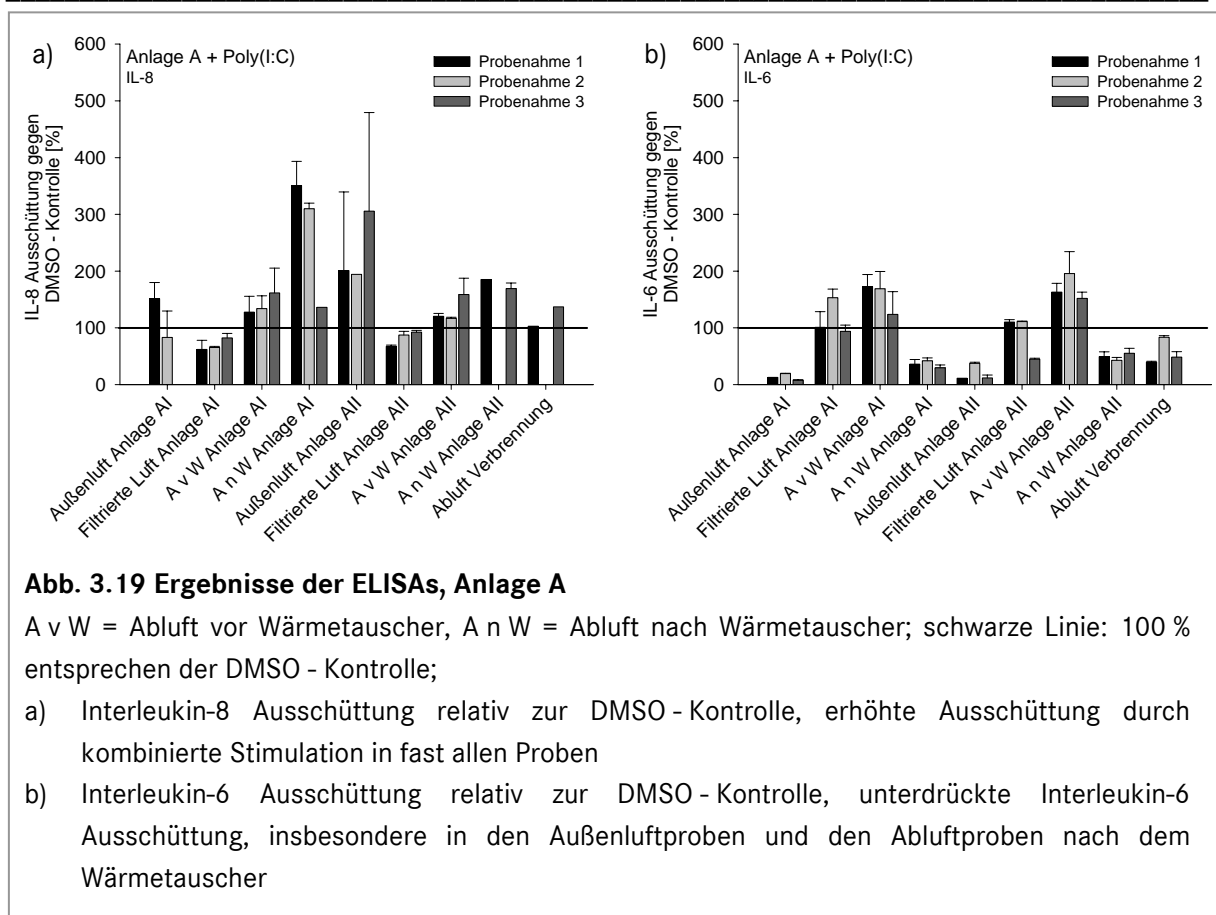
- a) ohne zusätzliche Stimulierung durch Poly(I:C), keine erhöhte Cytotoxizität feststellbar
- b) mit zusätzlicher Stimulierung durch Poly(I:C), toxische Wirkung einzelner Proben aus Außenluft und Abluft Anlage AI und Abluft nach der Verbrennung in kombinierter Stimulation

Eine erhöhte Cytotoxizität mit einer Überlebensrate unter 80 % konnte nur in der Außenluft und der Abluft der Anlage AI und der Abluft nach der Verbrennung mit zusätzlicher Stimulierung durch Poly(I:C) in einzelnen Proben festgestellt werden. Diese Beobachtung muss bei der Bewertung der Interleukinausschüttung berücksichtigt werden.

Abb. 3.18 zeigt die Ergebnisse des MTT - Assays aus 2 Messungen der Proben aus Anlage B. Bei keiner Probe konnte eine erhöhte Cytotoxizität mit einer Überlebensrate unter 80 % festgestellt werden. Die Abluftproben aus Anlage BII zeigen mit Poly(I:C) eine deutlich gesteigerte Überlebensrate in der Probe aus der ersten Probenahme.

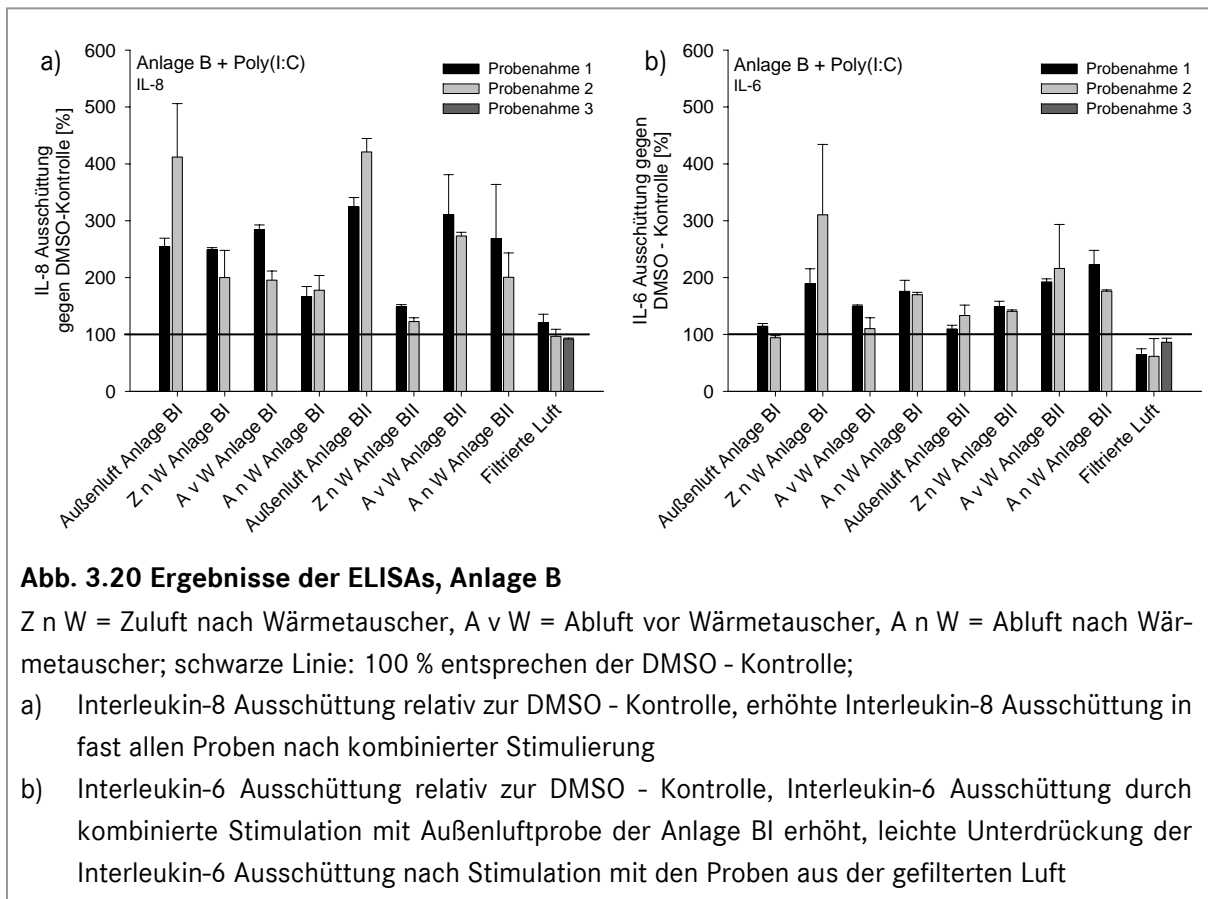


Die Staubextrakte waren ohne mikrobielle Stimulierung nicht aktiv. Abb. 3.19 zeigt die Interleukinausschüttung nach kombinierter Stimulierung mit Poly(I:C) und den Staubextrakten. Die Stimulation der Zellen mit den Proben aus den Prozesskontrollen (Kap. 3.2.2) ergab keine Änderung der Interleukinausschüttung.



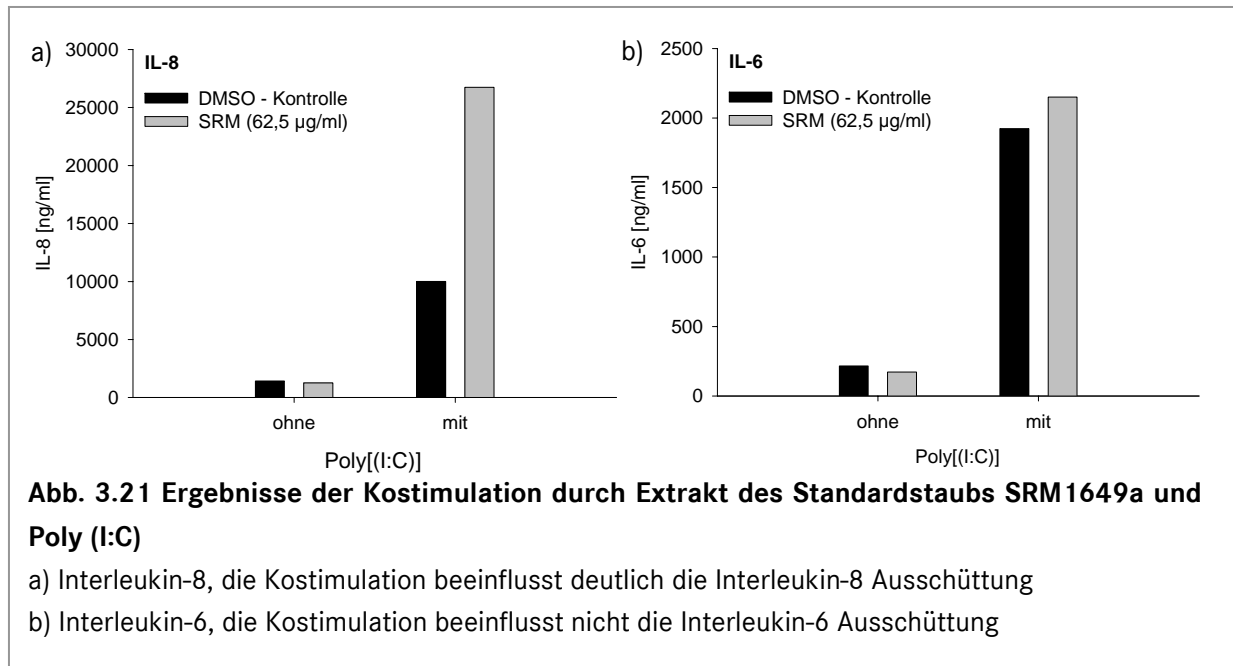
Die Ausschüttung von Interleukin-8 erhöht sich tendenziell in fast allen Proben, während die Ausschüttung von Interleukin-6 unterdrückt wird. Die Proben aus der gefilterten Luft zeigen weder in der Interleukin-8 noch in der Interleukin-6 - Ausschüttung starke Effekte. Die Proben aus der Außenluft der Anlage AI der Probenahmen 2 und 3 wirkten in der eingesetzten Konzentration cytotoxisch, daher konnte für die 2. Probenahme nur eine geringfügige Interleukin-8 - Ausschüttung bestimmt werden. Für die 3. Probenahme konnte in beiden Messungen keine Interleukin-8 - Ausschüttung gemessen werden. Die Interleukin-6 - Ausschüttung wurde in allen 3 Proben stark unterdrückt. Die Außenluft der Anlage AII hingegen wies keine Cytotoxizität auf und zeigte eine hohe Interleukin-8 und ebenfalls sehr geringe Interleukin-6 - Ausschüttung. Auch in der Abluft der Anlage AI verhindert die cytotoxische Wirkung der Probe aus der 3. Probenahme die extrem verstärkte Interleukin-8 - Ausschüttung aus den ersten beiden Probenahmen. Die Proben aus den ersten beiden Probenahmen hingegen zeigen eine erhöhte Interleukin-8 - Ausschüttung von bis zu 300 % der DMSO - Kontrolle. Die Interleukin-6 - Ausschüttung wurde auch durch die Probe aus der Abluft der Anlage AI stark unterdrückt.

Auch die Staubextrakte aus Anlage B waren ohne mikrobielle Stimulierung nicht aktiv. Abb. 3.20 zeigt die Interleukinausschüttung nach kombinierter Stimulierung mit Poly(I:C) und den Staubextrakten.



In fast allen Proben, ausgenommen den Proben aus der gefilterten Luft und den Zuluftproben nach dem Wärmetauscher in Anlage BII, konnte eine erhöhte Interleukin-8 - Ausschüttung nach kombinierter Stimulierung der Zellen mit den Staubextrakten und einem mikrobiellen Stimulus festgestellt werden. In der Zuluft vor dem Wärmetauscher in den Anlagen BI und BII erhöhte sich die Interleukin-8 Ausschüttung auf bis zu 400 % der DMSO - Kontrolle. Die Interleukin-6 - Ausschüttung hingegen wurde nicht negativ beeinflusst, sondern, anders als in Anlage A, in einigen Proben ebenfalls stimuliert oder zeigte Werte um die 100 % der DMSO - Kontrolle.

Um die Wirkung der Proben aus den Anlagen mit Stadtluft vergleichen zu können, wurden die Experimente mit einem Extrakt aus einem Standardstaub SRM 1649a (Urban Dust) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Beeinflussung der Interleukin-8 Ausschüttung bei Kostimulation durch Poly(I:C). Die Interleukin-6 Ausschüttung wurde nicht beeinflusst (s. Abb. 3.21).



3.2.7 ICP-MS Analysen

Zur Identifikation einiger Elemente in den Staubextrakten aus den Prozessketten wurde, wie in Kap. 2.10.3 beschrieben, eine ICP-MS Analyse durchgeführt.

Zunächst wurde das Gerät mithilfe einer Verdünnungsreihe eines Standardgemisches aus verschiedenen Elementen kalibriert. Um sicherzustellen, dass die Empfindlichkeit während der Messung nicht nachließ, wurde nach der 16., 50. und 82. Messungen (aus insgesamt 102 Messungen) ein weiteres Standardröhrchen eingefügt. Tab. 3.21 fasst die eingespritzten und gemessenen Werte der Standards zusammen.

Tab. 3.21 Wiedergefundene Mengen der Standards in den ICP-MS Analysen

	Eingespritzt [µg/L]	Standard 1 [µg/L]	Standard 2 [µg/L]	Standard 3 [µg/L]
Arsen	50	48,9	51,8	49
Cadmium	5	4,7	5,1	4,8
Chrom	5	5,1	6,6	6,5
Kupfer	5	5	5,9	5,7
Mangan	5	5,1	6,5	6,2
Nickel	5	5,1	6	5,9
Blei	5	4,5	5,4	4,9
Uran	5	4,3	5,3	4,9
Selen	50	47	44	41,1

Aluminium	5	5,5	8,1	6,9
Barium	5	5,5	5,7	5,5
Lithium	5	9,7	16,3	15,6
Kobalt	5	5	6,1	5,9
Zink	50	49,6	47,7	44,1
Strontium	5	5	6,2	5,9
Beryllium	50	71,7	90,8	90,5
Bor	50	58,5	84,2	77,1
Rubidium	5	4,8	5,8	5,7
Silber	5	4,7	5,3	5
Telur	5	4,6	4,3	4
Bismut	5	1,5	1,6	1,8
Eisen	50	19	30,2	47,1
Vanadium	5	4,9	6,5	6,4
Gallium	5	4,2	5,6	5,5
Molybdän	5	4,8	5,7	5,4
Thallium	5	4	4,9	4,5

Für fast alle Elemente konnte eine hohe Wiederfindungsrate gemessen werden. Für Lithium wurde in Standard 1 eine doppelt so hohe Konzentration, in Standard 2 und 3 sogar eine dreimal so hohe Konzentration wie ursprünglich eingesetzt gemessen. Ebenso wurde an Beryllium und Bor in der 2. und 3. Messung nahezu doppelt so hohe Konzentrationen gemessen wie ursprünglich eingesetzt. Für Bismut und Eisen dagegen wurde teilweise weniger als 50 % der eingesetzten Menge wiedergefunden.

Um sicherzugehen, dass die gemessenen Werte nicht durch Schwankungen der Bestimmung im Gerät beeinflusst wurden, wurde jede Probe 1:10 und 1:100 verdünnt und eingespritzt. Anschließend wurden nur die Messwerte weiter bewertet, die mindestens einen 5-fachen Unterschied zwischen der 1:100 und der 1:10-fach verdünnten Probe aufwiesen. Für alle Proben wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Elemente erstellt (Tab. 3.22 - 3.26).

Tab. 3.22 zeigt die Werte aus der ICP-MS Analyse für die Proben aus Anlage AI. Die Proben wurden insgesamt drei Mal gesammelt, aufbereitet und getestet.

Tab. 3.22 ICP-MS Analyse der Proben aus Anlage AI

Mittelwerte aus 3 Probenahmen mit Standardabweichung umgerechnet auf eine Konzentration in $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

	Außenluft [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Filtrierte Luft [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Abluft vor Wärme- tauscher [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Abluft nach Wär- metauscher [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
Arsen	33,82 ± 3,88		20,05	
Cadmium	42,15			
Kupfer	2.568 ± 1.712	254,14 ± 70,44	16.734 ± 23.068	9.630 ± 15.536
Mangan				4.276 ± 5.295
Selen	40,81		154,18 ± 14,04	
Barium	634,18			
Lithium				13.957
Zink	3.384 ± 953	1.241	23.837 ± 6.551	31.821 ± 8.430
Rubidium	44,08			
Vanadium			50,78	
Molybdän	92,91 ± 75,03			
Thallium	1,19			

Die gemessenen Konzentrationen aller Elemente zeigten deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Probenahmen. Sowohl Kupfer als auch Zink konnten an allen Probenahmestellen der Anlage AI gemessen werden. Die meisten unterschiedlichen Elemente finden sich in der Außenluft, oftmals jedoch nur während einer Probenahme. Die Probe aus der gefilterten Luft der Anlage AI wies nur Kupfer und Zink auf, alle anderen Elemente wurden entweder durch die Zuluftaufbereitung entfernt oder lagen aufgrund der geringen Partikelanzahl in der filtrierten Luft unter der Nachweisgrenze.

Tabelle 3.23 zeigt die in Anlage AI gemessenen Elemente analog zu den Werten aus dem Anlage AI.

Tab. 3.23 ICP-MS Analyse der Proben aus Anlage All

Mittelwerte aus 3 Probenahmen mit Standardabweichung umgerechnet auf eine Konzentration in $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

	Außenluft [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Filtrierte Luft [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Abluft vor Wärme- tauscher [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Abluft nach Wär- metauscher [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
Arsen	35,38 ± 15,00	21,53		33,15
Cadmium	107,57 ± 33,24			
Kupfer	5.878 ± 6.402	460,25 ± 263,90	14.994 ± 20.621	8.767 ± 11.947
Mangan				2.618
Selen	98,26		232 ± 31,84	
Lithium			805,05	293,08
Zink	7.529 ± 7.831		4.605 ± 1.407	1.868
Strontium			253,60	940,68
Rubidium	109,33 ± 5,45			
Silber	42,92 ± 5,90			
Vanadium	87,44 ± 74,71		12,25	
Molybdän	105,08 ± 38,22			
Thallium	2,66 ± 0,65			

Wie auch in Anlage AI ist in allen Proben aus Anlage All Kupfer an den verschiedenen Probenahmestellen zu finden. Auch in Anlage All unterlag die Kupferkonzentration großen Schwankungen in den einzelnen Messungen. In der gefilterten Luft waren auch in Anlage All nur wenige Elemente zu finden: Kupfer, das in jeder Probe vorkam und Arsen, ein Element, das hauptsächlich in den Außenluftproben vorkam und auch in einer Abluftprobe gefunden werden konnte. Wie auch in Anlage AI konnte Mangan nur in der Abluft nach dem Wärmetauscher gefunden werden. Selen konnte nur in der Abluft vor dem Wärmetauscher in den Anlagen AI und All nachgewiesen werden.

Analog zu den Proben aus Anlage A wurden die Prozessproben aus Anlage B aufbereitet und im ICP-MS gemessen. Die Ergebnisse aus beiden Probenahmen sind in Tab. 3.24 zusammengefasst.

Tab. 3.24 ICP-MS Analyse der Proben aus Anlage BI

Mittelwerte aus 2 Probenahmen mit Standardabweichung umgerechnet auf eine Konzentration in $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

	Außenluft [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Zuluft nach Wär- metauscher [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Abluft vor Wärme- tauscher [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Abluft nach Wär- metauscher [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
Arsen	31,36 ± 9,74	13,08	20,14 ± 15,93	7,90
Cadmium	106,96			
Kupfer	2.344 ± 707,10	868,49	1.202 ± 1.329	1.175
Mangan			432,70	
Selen	111,13			
Barium		742,53	3.828	
Lithium		110.738	9.521 ± 3.914	8.276 ± 5.111
Zink	17.491 ± 7.387	5.879 ± 4.461	3.760 ± 1.841	2.049
Strontium			3.386 ± 431,78	2.604 ± 1.799
Rubidium	59,43	24,38		
Silber	53,93			
Vanadium	32,18	24,73		10,13
Molybdän	411,61 ± 210,90	71,16		
Thallium	1,10	1,26	1,74	

In den Proben aus der Anlage BI konnten Arsen, Kupfer und Zink in allen Proben gefunden werden. Erstmals wurde in der Außenluft auch Silber gemessen. Die Zuluft nach dem Wärmetauscher wies ein ähnliches Elementenspektrum wie die Außenluft auf. Barium und Lithium konnten erst nach dem Wärmetauscher gemessen werden. Silber, Selen und Cadmium waren nur vor dem Wärmetauscher zu finden. Auch in den beiden Abluftproben zeigte sich ein ähnliches Spektrum. Mangan konnte, wie auch in Anlage A, nur in der Abluft vor dem Wärmetauscher gemessen werden.

Tab. 3.25 zeigt die Ergebnisse der ICP-MS Analyse der Proben aus Anlage BII.

Tab. 3.25 ICP-MS Analyse der Proben aus Anlage BII

Mittelwerte aus 2 Probenahmen mit Standardabweichung umgerechnet auf eine Konzentration in $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

	Zuluft vor Wärmetauscher [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Zuluft nach Wärmetauscher [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Abluft vor Wärmetauscher [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Abluft nach Wärmetauscher [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
Arsen	31,75	8,48 ± 6,89		
Cadmium	86,64			
Kupfer	1.967 ± 271,58	1.493 ± 259	2780	8657
Selen	122,63			
Lithium			4.304	16.014
Zink	10.772	5.923 ± 2.887	3.431	18.107
Rubidium	61,98	35,21		
Vanadium	32,59	12,83 ± 9,31		
Molybdän		95,61		
Thallium	1,44	0,31		

Auch in der Außenluft der Anlage BII konnte Cadmium gemessen werden. In der Zuluft nach dem Wärmetauscher war Cadmium nicht wieder zu finden. Kupfer und Zink konnten in der Anlage BII in allen Probenahmestellen nachgewiesen werden. Die Abluft der Anlage BII enthielt nur sehr geringe Mengen der nachweisbaren Elemente und keines der gemessenen Elemente wurde gleichzeitig in beiden Proben gefunden.

Auch die Proben aus der gefilterten Luft und die Probe nach der Verbrennung wurden mit Hilfe des ICP-MS untersucht. Tab. 3.26 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tab. 3.26 ICP-MS Analyse der Proben aus der gefilterten Luft aus Anlage B und der Abluft nach der Verbrennung aus Anlage A

Mittelwerte aus 3 Probenahmen mit Standardabweichung umgerechnet auf eine Konzentration in $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

	Filtrierte Luft (Anlage B) [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Abluft Verbrennung [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
Arsen	15,45 ± 5,32	
Kupfer	1.898 ± 465,15	1.975
Zink	1.859 ± 1.337	10.259 ± 2.305
Bor		11.530 ± 3,84
Vanadium	18,90 ± 12,07	

Die Werte aus der gefilterten Luft der Anlage B zeigen ein ähnliches Elementarspektrum wie die gefilterte Luft aus Anlage A. Arsen, Kupfer und Zink konnten nachgewiesen werden, Vanadium konnte in den Proben aus der gefilterten Luft der Anlage A nicht gemessen werden, jedoch in den Außenluftproben und der Zuluft nach dem Wärmetauscher in Anlage B. In den Proben aus der Abluft nach der Verbrennung aus Anlage A konnte, im Gegensatz zu allen anderen Proben, Bor gemessen werden. Neben Bor konnte wie in allen Proben Kupfer und Zink nachgewiesen werden.

Um einen Hinweis auf die Elementenzusammensetzung der Prozesskontrollen zu erhalten, wurde eine ICP-MS Analyse durchgeführt. Für diese Analyse standen nur noch die Prozesskontrollen aus Anlage A zur Verfügung. Das einzige Element, das in den Prozesskontrollen gefunden werden konnte, war Kupfer. Prozesskontrolle 1 enthielt 255,78 µg Kupfer pro Liter Lösungsvermittler, Prozesskontrolle 2 19,7 µg/L und Prozesskontrolle 3 40,21 µg/L. Daraus errechnet sich eine Gesamtmenge von 20 - 40 µg Kupfer pro Filter bzw. pro Aufbereitung oder durch Lagerung im Probensammler.

3.3 Fraktionierung nach Säure - Base Eigenschaften

Zur Ermittlung der Ursachen für Wirkungen der Proben aus den Prozessketten in den durchgeführten Bio - Assays (Kap. 3.2) wurden ausgewählte Proben chemisch nach Säure-, Base - Eigenschaften nach dem in Kapitel 2.10.1 beschriebenen Verfahren aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen separat getestet. Des Weiteren wurden gaschromatographische Analysen mit gekoppeltem Massenspektrometer durchgeführt, um einen Hinweis auf die Verbindungen in den Fraktionen zu erhalten. Die Fraktionierung wurde mit den in Tabelle 3.27 aufgelisteten Proben durchgeführt. Da der Mikrokerntest in den unfraktionierten Proben am sensitivsten war, wurden die Fraktionen ausschließlich im Mikrokerntest auf ihre Wirksamkeit getestet. Der Cytotoxizitätstest diente zur Ermittlung der im Mikrokerntest einsetzbaren Konzentrationen.

3.3.1 Prozesskontrollen

Für die Fraktionierung wurde jeweils eine Prozesskontrolle aus Anlage A und Anlage B (s. Kap. 3.2.2) verwendet, um sicherzustellen, dass die Effekte nicht durch Fehlbehandlung der Filter oder der Proben entstanden. Dazu wurden die Filter der Feldkontrolle 1 aus Anlage A und B verwendet (Tab. 3.27).

Tab. 3.27 Proben für die Fraktionierung nach Säure-Base - Eigenschaften

	Anlage A	Anlage B
Zuluft Anlagenteil I	16.10. – 20.10.06	27.11. – 01.12.06
Abluft Anlagenteil II	18.04 – 28.04.06	23.10. – 27.10.06
Zuluft Anlagenteil I	09.10. – 13.10.06	11.12. – 15.12.06
Abluft Anlagenteil II	14.08. – 18.08.06	06.11. – 10.11.06
Prozesskontrolle	Feldkontrolle 1	Feldkontrolle 1

3.3.2 Cytotoxizität

Die fraktionierten Proben wurden auf ihre Cytotoxizität mit der Zelllinie V79, wie in Kapitel 2.4 beschrieben, untersucht. Zum Vergleich der Toxizität der Proben wurde im folgenden Kapitel die Darstellung der NR_{80} - Werte, also der Wert bei dem 80 % der Zellen überleben, gewählt.

Anlage A

Tabelle 3.28 fasst die Konzentrationen zusammen, bei denen 80 % der Zellen nach Belastung durch die entsprechenden Proben aus Anlage A überlebten.

Tab. 3.28 NR_{80} - Werte der Fraktionen im Cytotoxizitätstest, Anlage A in m^3/ml
schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung

	Anlage AI		Anlage All	
	Zuluft	Abluft	Zuluft	Abluft
Unfraktioniert	- / -	2,8 / 3,5	- / -	2,1 / 4,5
Starke Säuren	- / -	- / -	- / -	- / -
Schwache Säuren	- / -	- / -	- / -	- / -
Neutrale Verbindungen	- / -	7 / -	- / -	3 / 6,1
Basen	- / -	- / -	- / -	4,1 / -

In den Fraktionen der Proben aus der Zuluft konnte eine Cytotoxizität weder in der unfraktionierten Probe noch in einer der Fraktionen festgestellt werden. Auch die Prozesskontrolle zeigte nach der Fraktionierung keine cytotoxischen Effekte. Die Probe aus der Abluft der Anlage AI hingegen zeigte nur unfraktioniert sowohl mit als auch ohne metabolische Aktivierung eine cytotoxische Wirkung auf die Zellen. Nach der Fraktionierung war jedoch nur noch die Fraktion mit den neutralen Verbindungen im Ansatz ohne metabolische Aktivierung schwach

aktiv. Die Probe aus der Abluft der Anlage All zeigte nach der Fraktionierung Effekte in den Fraktionen „Neutrale Verbindungen“ und „Basen“. Im Ansatz mit metabolischer Aktivierung konnte nur in der Fraktion mit den neutralen Verbindungen eine schwache cytotoxische Wirkung ermittelt werden.

Um sicherzustellen, dass durch die Fraktionierung die Toxizität nicht verloren gegangen war, wurden die Fraktionen von Abluft aus Anlage AI, Abluft aus Anlage All und der Prozesskontrolle wieder vereinigt und nochmals im Cytotoxizitätstest eingesetzt. Für die Abluft der Anlage AI ergaben sich Werte von 2,6 m³/ml ohne metabolische Aktivierung und 7 m³/ml mit metabolischer Aktivierung, für die Probe aus der Abluft der Anlage All 2,6 m³/ml und 6,8 m³/ml. Diese Werte entsprechen den gemessenen Toxizitäten der ursprünglichen Proben (vgl. Kapitel 3.2.3).

In den Feldkontrollen konnte weder in der unfraktionierten Probe noch in den Fraktionen eine Cytotoxizität gemessen werden. Auch das Wiedervereinigen der Feldkontrolle zur Sicherstellung, dass die Fraktionierung die Proben nicht verändert hat, erbrachte keine Wirkung im Cytotoxizitätstest.

Anlage B

Tabelle 3.29 fasst die Konzentrationen zusammen bei denen 80 % der Zellen nach Belastung durch die entsprechenden Proben aus Anlage B überlebt haben.

Tab. 3.29 NR₈₀ - Werte der Fraktionen im Cytotoxizitätstest, Anlage B in m³/ml
schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung

	BI		BII	
	Zuluft	Abluft	Zuluft	Abluft
Unfraktioniert	9 / -	- / -	10 / 10	8,8 / 10
Starke Säuren	- / -	- / -	- / -	2,9 / 7,1
Schwache Säuren	- / -	- / -	- / -	- / -
Neutrale Verbindungen	- / -	7,9 / -	- / -	10 / -
Basen	- / -	- / -	- / -	- / -

Die Proben aus Anlage B wiesen vor der Fraktionierung keine bzw. eine sehr schwache Cytotoxizität auf (NR₈₀ - Werte zwischen 8,8 und 10 m³/ml). In den Fraktionen der Zuluftproben und der Prozesskontrolle konnte keine Cytotoxizität festgestellt werden. Die Fraktion mit den neutralen Verbindungen aus der Abluft der Anlage BI zeigte im Ansatz mit metabolischer Aktivierung eine leichte Cytotoxizität bei 7,9 m³/ml. Die Abluft der Anlage BII dagegen wies in der Fraktion, die die starken Säuren enthält, im Ansatz ohne metabolische Aktivierung eine starke Cytotoxizität auf. Diese konnte durch die metabolische Aktivierung deutlich abgeschwächt

werden. Eine leichte Wirkung konnte ebenfalls in der Fraktion mit den neutralen Verbindungen im Ansatz ohne metabolische Aktivierung gemessen werden.

Da die unfraktionierten Proben aus Anlage B nur eine geringe Cytotoxizität aufwiesen, wurde auf eine Wiedervereinigung der Proben verzichtet. In der Prozesskontrolle aus Anlage B konnte keine Cytotoxizität festgestellt werden.

3.3.3 Mikrokerntest

Zur Untersuchung des Potenzials der einzelnen Fraktionen, die Bildung von Mikrokerneln zu induzieren, wurde der Mikrokerntest mit der Zelllinie V79, wie in Kap. 2.7 beschrieben, durchgeführt.

Mikrokerne

Zur Bestimmung der Konzentration, ab der ein Effekt feststellbar war (Lowest Observable Effect Concentration, LOEC) wurde ebenso verfahren wie bei den Mikrokerntests aus der Prozesskette (Kap. 3.2.5). Zunächst wurde der Mittelwert aus allen Negativkontrollen gebildet und deren Standardabweichung bestimmt. Die Werte lagen ohne metabolische Aktivierung durch S9-Mix bei $1,9 \pm 0,87\%$, im Ansatz mit metabolischer Aktivierung durch S9 bei $2,7 \pm 1,01\%$. Die Standardabweichung wurde verdoppelt und zum Mittelwert hinzuaddiert, um die Grenze zu definieren, ab der ein Effekt auftritt. Durch die Verdopplung der Standardabweichung konnte sichergestellt werden, dass mit 97,5 prozentiger Wahrscheinlichkeit kein Wert falsch positiv bewertet wurde. Anschließend wurde graphisch die Konzentration ermittelt, bei der ohne S9-Mix 4 % und mit S9-Mix 5 % Mikrokerne erreicht wurden. Diese Werte wurden als LOECs festgelegt und sind in Abb. 3.22 dargestellt.

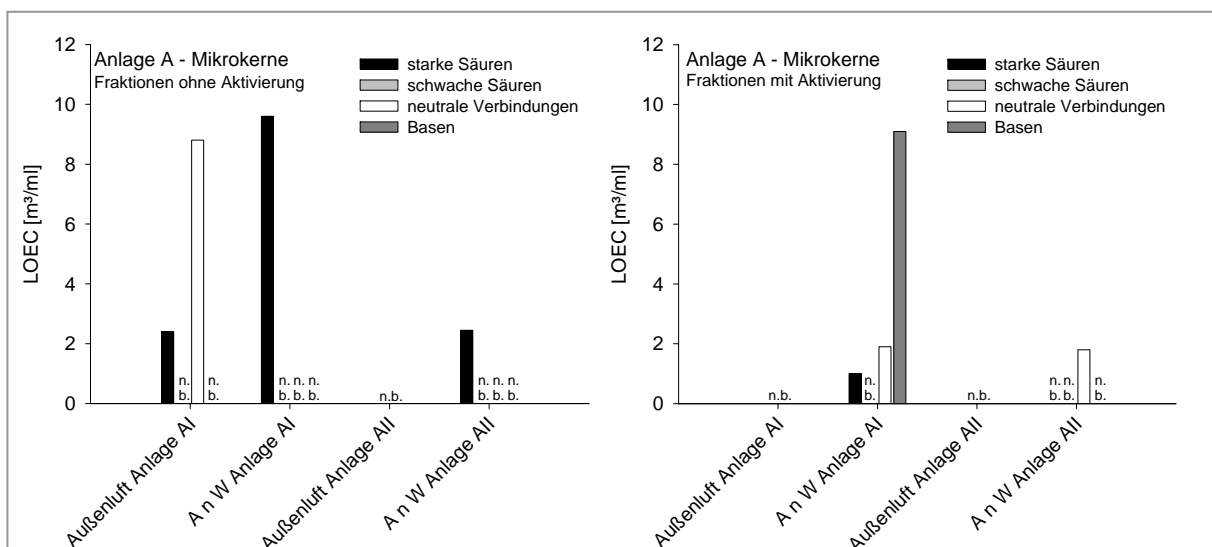


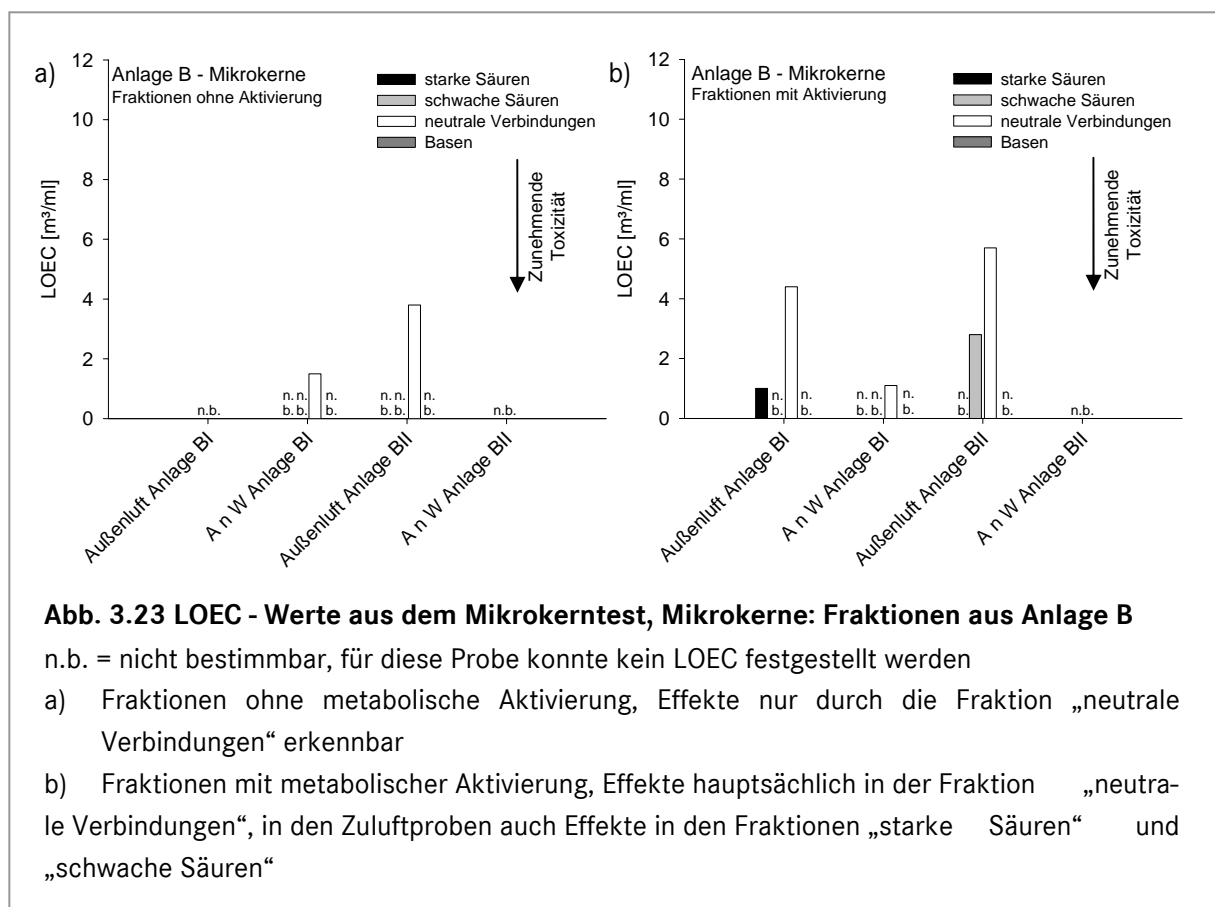
Abb. 3.22 LOEC - Werte aus dem Mikrokerntest, Mikrokerne: Fraktionen aus Anlage A

n.b. = nicht bestimmbar, für diese Probe konnte kein LOEC festgestellt werden, A n W = Abluft nach Wärmetauscher

- Fraktionen ohne metabolische Aktivierung, Effekte nur durch die Fraktionen „starke Säuren“ und „neutrale Verbindungen“ erkennbar
- Fraktionen mit metabolischer Aktivierung, Effekte nur in den Abluftproben, dort jedoch keine Effekte in der Fraktion „schwache Säuren“

Ohne metabolische Aktivierung (Abb. 3.21 a) konnten Effekte im Mikrokerntest nur in den Fraktionen „starke Säuren“ und „neutrale Verbindungen“ ermittelt werden. Die „Neutralen Verbindungen“ waren ohne metabolische Aktivierung nur aus der Zuluft der Anlage AI aktiv. Der Parallelansatz mit metabolischer Aktivierung (Abb. 3.21 b) dagegen hob die Effekte aus der Zuluft der Anlage All auf. In diesem Ansatz konnten Effekt nur in den Abluftproben festgestellt werden. Hier waren insbesondere die Fraktionen „starke Säuren“ und „neutrale Verbindungen“ aktiv. Schwache Effekte konnten auch in der basischen Fraktion der Abluft der Anlage AI gefunden werden.

Zur näheren Charakterisierung der Proben aus Anlage B wurden diese ebenfalls fraktioniert und die Fraktionen in den Mikrokerntest eingesetzt. Abb. 3.23 zeigt die LOECs der Proben aus Anlage B.



Im Ansatz ohne metabolische Aktivierung (Abb. 3.23 a) konnten Effekte nur in der Fraktion „neutrale Verbindungen“ gefunden werden. Starke Effekte zeigten sich hier in der Abluft der Anlage BI. Durch die Zugabe des S9 - Mixes zur metabolischen Aktivierung (s. Kap 2.3.4) konnte eine Zunahme an aktiven Fraktionen in den Zuluftproben beobachtet werden (Abb. 3.23 b): die Fraktionen „starke Säuren“ und „neutrale Verbindungen“ der Zuluft aus Anlage BI, sowie die Fraktion „schwache Säuren“ aus der Zuluft der Anlage BII wiesen durch die Zugabe an S9 - Mix verstärkte Effekt auf. Auf die Fraktionen aus den Abluftproben hatte die metabolische Aktivierung keinen Einfluss.

Alle Fraktionen zeigten Effekte im Mikrokerntest. Tab. 3.30 zeigt die Ergebnisse des Mikrokerntest mit den Prozesskontrollen.

Tab. 3.30 Ergebnisse des Mikrokerntests mit den Prozesskontrollen in $\mu\text{l/ml}$

Werte sind Nominalkonzentrationen, bei denen ein Effekt auftrat (maximal eingesetzt 10 $\mu\text{l/ml}$). Schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung

	Anlage A	Anlage B
Starke Säuren	- / -	- / 0,2
Schwache Säuren	- / -	- / -
Neutrale Verbindungen	- / -	- / 0,4
Basen	- / 2	3,2 / -

Effekte traten hauptsächlich bei der Untersuchung mit metabolischer Aktivierung auf. Ohne metabolische Aktivierung konnten Effekte in der Prozesskontrolle nur in der basischen Fraktion gefunden werden. Die Effekte in den Prozesskontrollen wurden bei der Bewertung der Ergebnisse mit einbezogen (s.u.).

Tabelle 3.31 zeigt die Bewertung der Ergebnisse aus den Fraktionen im Mikrokerntest - Endpunkt „Mikrokerne“ nach den in Kapitel 3.2.5 beschriebenen Bewertungsmaßstäben auf Basis der gefilterten Luft aus Szenario 1.

Tab. 3.31 Bewertung der Ergebnisse des Mikrokerntests, Mikrokerne: Anlage A

schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung

	AI		All	
	Zuluft	Abluft	Zuluft	Abluft
Unfraktioniert	-/-	+++/-	+++/-	++/-
Starke Säuren	++/-	-/-	-/-	++/-
Schwache Säuren	-/-	-/-	-/-	-/-
Neutrale Verbindungen	-/-	-/-	-/-	-/-
Basen	-/-	-/-	-/-	-/-

Die Feldkontrolle aus Anlage A zeigte Effekte in der basischen Fraktion mit metabolischer Aktivierung. Die Proben aus Zu- und Abluft jedoch nicht. Daher wurde für den Endpunkt „Mikrokerne“

rokerne“ der Proben aus Anlage A aufgrund der Effekte in der Prozesskontrolle keine Neubewertung vorgenommen.

Durch die Fraktionierung ergaben sich Effekte im Mikrokerntest in der Probe aus der Zuluft der Anlage AI in der Fraktion der starken Säuren im Ansatz ohne metabolische Aktivierung, wohingegen die unfraktionierte Probe nicht aktiv war. Die Effekte aus der unfraktionierten Probe der Abluft der Anlage AI ohne metabolische Aktivierung konnten durch die Fraktionierung aufgehoben werden. Aufgehoben wurden durch die Fraktionierung auch die Effekte aus der Zuluft der Anlage AII. Die Probe aus der Abluft der Anlage AII zeigte sowohl unfraktioniert als auch in der Fraktion der starken Säuren das Potenzial Mikrokerne zu induzieren.

Tab. 3.32 Bewertung der Ergebnisse des Mikrokerntests, Mikrokerne: Anlage B

schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung

	BI		BII	
	Zuluft	Abluft	Zuluft	Abluft
Unfraktioniert	++/-	-/-	++/-	+++/-
Starke Säuren	-/-	-/-	-/-	-/-
Schwache Säuren	-/-	-/-	-/-	-/-
Neutrale Verbindungen	-/-	++/-	-/-	-/-
Basen	-/-	-/-	-/-	-/-

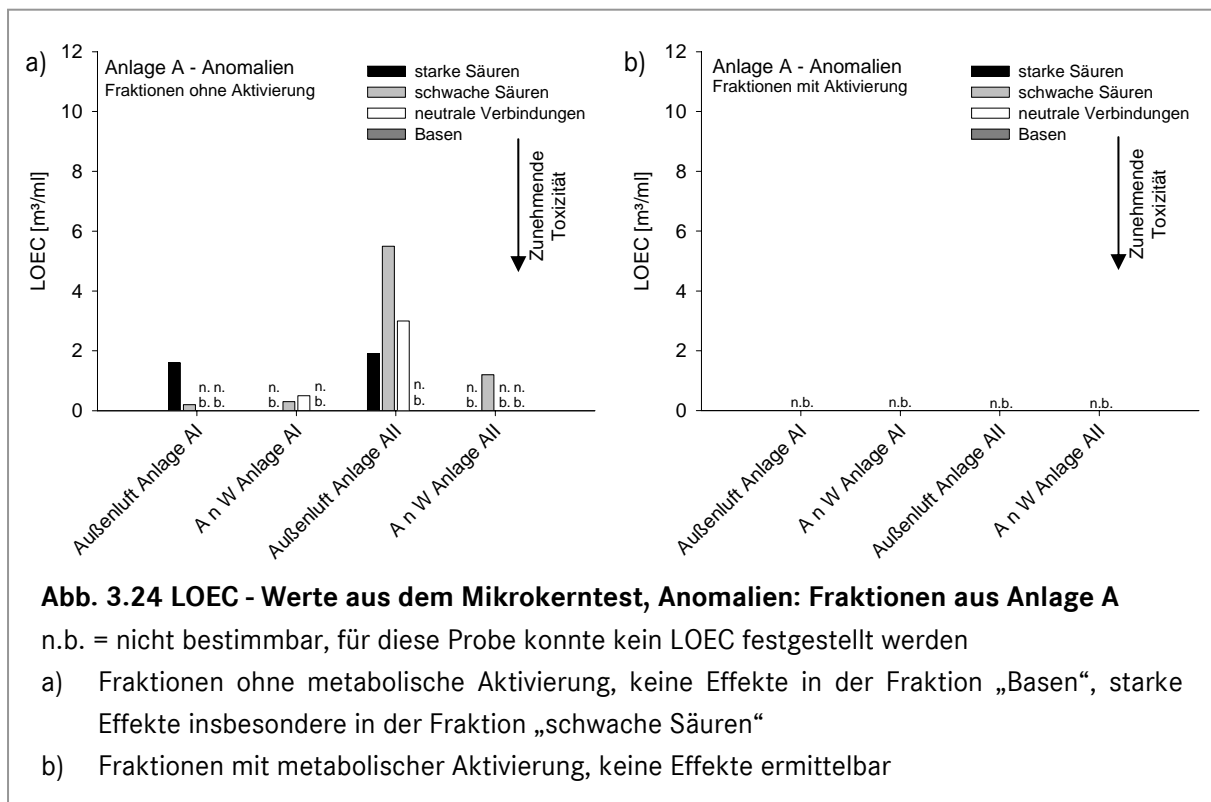
Die Effekte der Prozesskontrollen wurden nicht in die Bewertung mit einbezogen, da die Fraktionen der starken Säuren und neutralen Verbindungen im Vergleich zur gefilterten Luft aus Anlage A als nicht wirksam zu betrachten waren.

Die Effekte der Proben aus der Zuluft aus Anlage BI und BII, sowie die Effekte aus der Probe der Abluft aus Anlage BII konnten durch die Fraktionierung aufgehoben werden. Dagegen zeigte die neutrale Fraktion der Abluft der Anlage BI deutliche Effekte, die in der unfraktionierten Probe nicht auftraten.

Anomalien

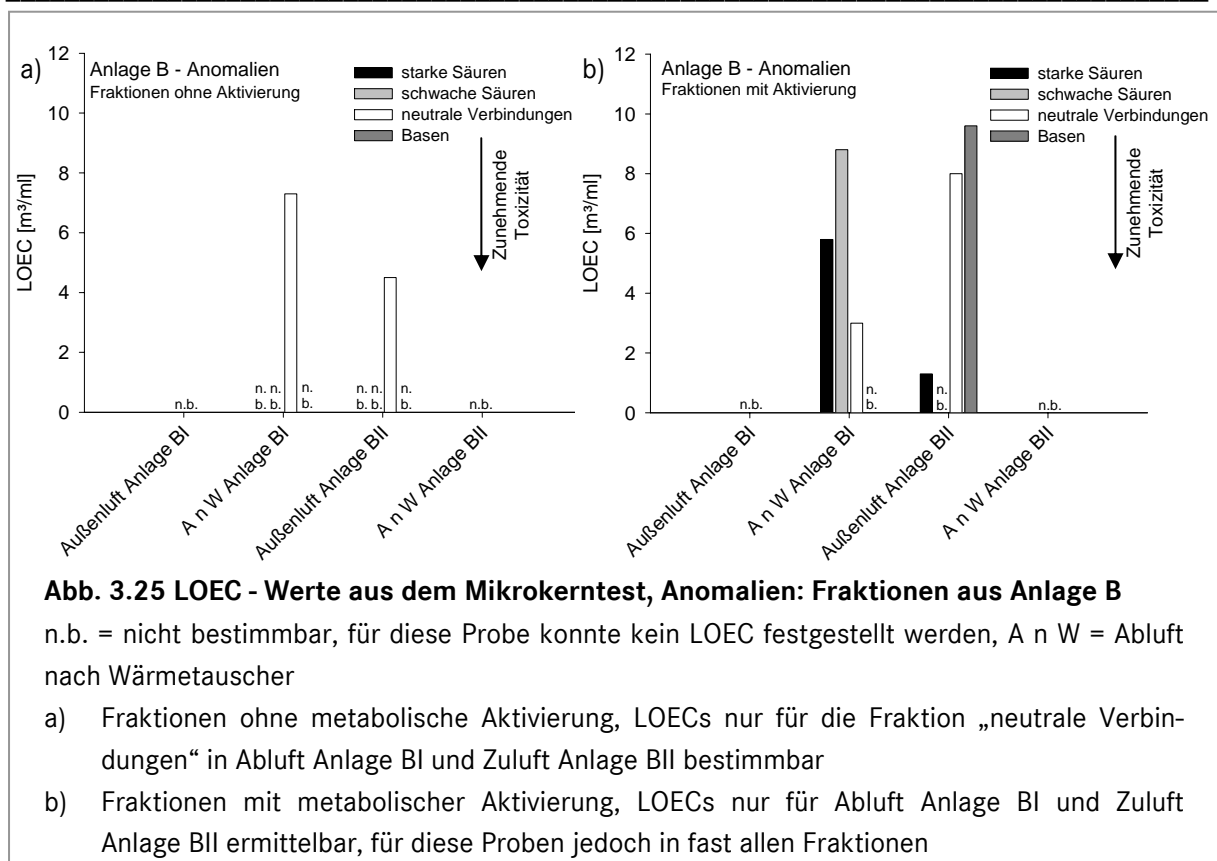
Neben der Betrachtung des Endpunkts „Mikrokerne“ wurden, wie in Kap. 2.7.2 beschrieben, auch Zellkernanomalien betrachtet und unter dem Begriff „Anomalien“ zusammengefasst. Diese wurden analog zur Auswertung der Mikrokerne aufgetragen und wie oben beschrieben ausgewertet. Der Mittelwert der Negativkontrollen lag bei $2,7 \pm 2,13$ % ohne metabolische Aktivierung und bei $4,6 \pm 2,61$ % mit metabolischer Aktivierung durch S9. Zur graphischen Ermittlung des LOEC wurde ohne S9-Mix die Konzentration bestimmt, bei der 7 % der Zellen Anomalien aufwiesen. Im Versuch mit metabolischer Aktivierung wurde die Konzentration

gewählt, bei der 10 % der Zellen Anomalien aufwiesen, da bereits die Verwendung des S9-Mixes Schädigungen der Zellkerne in den Negativkontrollen hervorrief. In Abb. 3.24 sind die LOECs für den Endpunkt „Anomalien“ zusammengefasst.



Ohne metabolische Aktivierung (Abb. 3.24 a) sind Effekte in geringen Konzentrationen in allen Fraktionen außer der Fraktion „Basen“ zu erkennen. Zellkernanomalien wurden durch die Fraktion „schwache Säuren“ aus den Proben Zu- und Abluft der Anlage AI schon bei sehr geringen Konzentrationen ausgelöst. Die Zugabe des S9 - Mixes zur metabolischen Aktivierung (s. Kap. 2.3.4) hob alle Effekte wieder auf: es konnte kein LOEC bestimmt werden.

Zur näheren Charakterisierung der Proben aus Anlage B, wurden diese ebenfalls fraktioniert und die Fraktionen in den Mikrokerntest eingesetzt. Abb. 3.25 zeigt die LOECs der ausgelösten Zellkernanomalien der Proben aus Anlage B.



Im Ansatz ohne metabolische Aktivierung konnten LOECs bei der Betrachtung des Endpunkts „Anomalien“ der Proben aus Anlage B nur für die Fraktion „neutrale Verbindungen“ aus Abluft Anlage BI und Zuluft Anlage BII bestimmt werden. Durch die metabolische Aktivierung wurden ebenfalls nur die Proben aus der Abluft der Anlage BI und der Zuluft der Anlage BII beeinflusst. In der Abluft der Anlage BI verstärkt sich durch die Aktivierung die Wirkung der Fraktion „starke Säuren“, „schwache Säuren“ und „neutrale Verbindungen“. In der Zuluft der Anlage BII verstärkte sich die Wirkung der Fraktionen „starke Säuren“ und „Basen“, die Wirkung der Fraktion „neutrale Verbindungen“ konnte dagegen abgeschwächt werden. Die Fraktionen der Proben zeigten auch Effekte im Endpunkt „Anomalien“ des Mikrokerntests. Tabelle 3.33 zeigt die Ergebnisse des Mikrokerntests mit den Prozesskontrollen.

Tab. 3.33 Ergebnisse des Mikrokerntests mit den Prozesskontrollen

Werte sind Nominalkonzentrationen, bei denen ein Effekt auftrat (maximal eingesetzt 10 µl/ml). schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung, Einheit [µl/ml]

	Anlage A	Anlage B
Starke Säuren	- / -	- / 3
Schwache Säuren	3,4 / 2	- / 5,6
Neutrale Verbindungen	- / 3	- / -
Basen	- / -	- / 3,6

Tabelle 3.34 zeigt die Bewertung der Ergebnisse im Mikrokerntest - Endpunkt „Anomalien“ - der Fraktionen der Proben aus Anlage A nach den in Kap. 3.2.5 beschriebenen Bewertungsmaßstäben auf Basis der gefilterten Luft aus Szenario 1.

Tab. 3.34 Bewertung der Ergebnisse des Mikrokerntests, Anomalien: Anlage A

schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung, in Klammern = falsch positives Ergebnis durch Wirkung der Feldkontrolle

	AI		All	
	Zuluft	Abluft	Zuluft	Abluft
Unfraktioniert	-/-	+++ / ++	+++ / -	++ / -
Starke Säuren	++ / -	- / -	++ / -	- / -
Schwache Säuren	(+++) - / -	+++ / -	- / -	++ / -
Neutrale Verbindungen	- / -	+++ / -	- / -	- / -
Basen	- / -	- / -	- / -	- / -

Aufgrund der ähnlichen Dosis-Wirkungsbeziehung der Feldkontrolle und der Zuluft der Anlage AI in der Fraktion schwache Säuren (zunächst starker Anstieg, dann Abfallen der Kurve) wurde dieser Effekt als falsch-positiv gewertet. Die Dosis-Wirkungsbeziehungen der Abluftproben in der Fraktion schwache Säuren hingegen verliefen nahezu linear ansteigend ohne Abfallen der Kurve in der höchsten Konzentration und werden daher nicht als falsch positiv bewertet.

Die Induktion von Zellkernanomalien durch die Proben aus der Abluft der Anlage AI konnte in den Fraktionen der schwachen Säuren und der neutralen Verbindungen wiedergefunden werden. Auch in der Abluft der Anlage All gibt es eine Übereinstimmung der Wirkungsweise der unfraktionierten Probe und der Fraktion mit den schwachen Säuren.

In Tabelle 3.35 ist die Bewertung der Induktion von Zellkernanomalien der unfraktionierten und fraktionierten Proben aus Anlage B zusammengefasst.

Tab. 3.35 Bewertung der Ergebnisse des Mikrokerntests, Anomalien: Anlage B

schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung

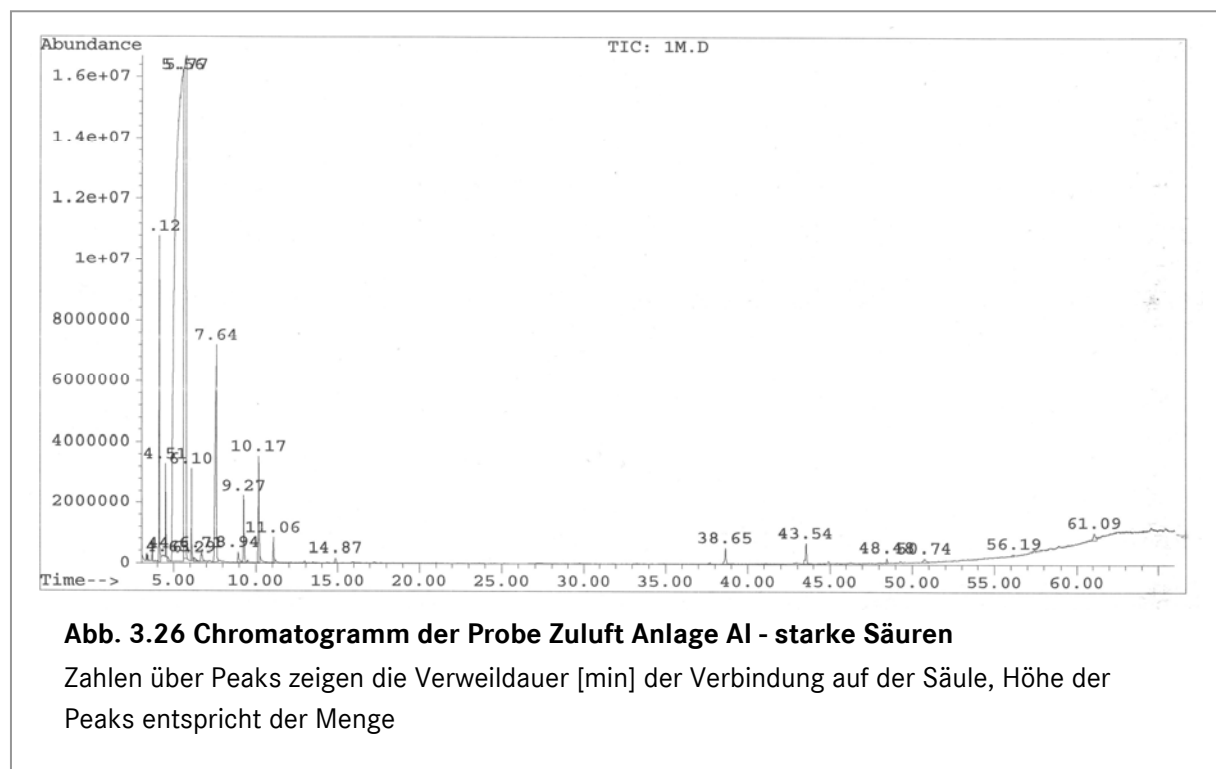
	BI		BII	
	Zuluft	Abluft	Zuluft	Abluft
Unfraktioniert	++/-	-/-	-/-	-/-
Starke Säuren	-/-	-/-	-/-	-/-
Schwache Säuren	-/-	-/-	-/-	-/-
Neutrale Verbindungen	-/-	-/-	-/-	-/-
Basen	-/-	-/-	-/-	-/-

Keine der Fraktionen der Proben aus Anlage B zeigte einen Effekt bei der Betrachtung des Endpunktes „Zellkernanomalien“.

3.3.4 Gaschromatographische Untersuchungen mit massenspektrometrischer Analyse

Zur Identifizierung in den Fraktionen enthaltener Verbindungen wurde eine gaschromatographische Untersuchung mit gekoppelter massenspektrometrischer Analyse, wie in Kap. 2.10.2 beschrieben, durchgeführt.

Abb. 3.26 zeigt stellvertretend das Chromatogramm der Fraktion „starke Säuren“ der Probe Zuluft Anlage AI.



Über das angehängte Massenspektrometer wurde das entsprechende Massenspektrum jedes Peaks mit einer Datenbank verglichen. Dazu werden die fünf höchsten Molekülpeaks miteinander verglichen und angegeben, zu welchem Prozentsatz das gemessene Spektrum mit dem Spektrum der Datenbank übereinstimmt. In den folgenden Tabellen sind die gefundenen Verbindungen der einzelnen Proben mit ihrer Retentionszeit und der prozentualen Übereinstimmung des Massenspektrums aufgelistet. Dabei wurden nur die Verbindungen aufgenommen, deren Massenspektrum über 70 % mit dem Spektrum der Datenbank übereinstimmte und somit ein Hinweis zur Identifizierung gegeben ist. Die identifizierten Verbindungen sind mit ihrer Übereinstimmungswahrscheinlichkeit und der Retentionszeit auf der Säule in den Tabellen 3.36 - 3.45 aufgelistet.

Tab. 3.36 Verbindungen in den Fraktionen der Probe Zuluft Anlage AI

Übereinstimmung der Massenspektren und Retentionszeit der einzelnen Verbindungen

Verbindungsname	Übereinstimmung [%]	Retentionszeit [min]
Starke Säuren		
2-Methoxy-furan	90	4,12
Hexamethylcyclotrisiloxan	83	4,50
4-Hydroxy-4-methyl-2-pentan	72	5,83
Octamethylcyclotetrasiloxan	86	9,27
Decamethylcyclopentasiloxan	72	14,84
Hexadecansäure, methylester	97	38,64
Octadecansäure, methylester	96	43,54
Schwache Säuren		
2-Methoxy-furan	90	4,12
Octamethylcyclotereasiloxan	80	9,35
Hexadecansäure	95	38,70
Octadecansäure, methylester	97	43,60
Neutrale Verbindungen		
4-Methyl-3-penten-2-on	81	4,05
Hexamethylcyclotrisiloxan	83	4,47
2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperisinon	72	13,22
Dodecamethylcyclohexasiloxan	86	20,94
Basen		
4-Methyl-3-penten-2-on	80	4,12
Dodecamethylcyclohexasiloxan	72	20,94

Tab. 3.37 Verbindungen in den Fraktionen der Probe Abluft Anlage AI

Übereinstimmung der Massenspektren und Retentionszeit der einzelnen Verbindungen

Verbindungsname	Übereinstimmung [%]	Retentionszeit [min]
Starke Säuren		
4-Methyl-3-penten-2-on	91	4,12
Octamethylcyclotetrasiloxan	72	9,34
Nonansäure, methyl ester	96	17,24
Hexanedidonsäure, dimethyl ester	91	17,97
Dimethylphthalat	70	25,09
Dimethyl-1,3-benzendicarboxylsäure	96	26,95
Trimethyl-1,2,4-benzentricarboxylsäure	96	36,45
Hexadecansäure, methyl ester	98	38,62
(Z,Z)-Methyl-9,12-octadecadiensäure	99	42,79
(Z,Z)-9-octadecensäure, methyl ester	99	42,92
Octadecansäure, methyl ester	98	43,53
(Z,Z)-methyl-9,12-octadecadiensäure	95	43,96
9,12-Octadecadiensäure, methyl ester	95	44,12
(Z,Z)-9,12-Octadecadiensäure, methyl ester	94	44,93
Docosansäure, methyl ester	98	52,17
Schwache Säuren		
4,4-Dimethyl-2-imidazolin	72	3,19
2-Methoxy-furan	90	3,92
4-Methoxy-4-methyl-2-pentanon	72	6,99
Octamethylcyclotetrasiloxan	72	9,28
Hexadecansäure, methyl ester	96	38,64
Octadecansäure, methyl ester	94	43,56
Neutrale Verbindungen		
Methyl Isobutyl Keton	90	3,25
2-Methoxy-furan	86	4,07
Hexamethylcyclotrisiloxan	83	4,46
1,3-Dimethyl-benzen	70	5,49
2-Butoxy-ethanol	90	6,39
2-Ethyl-1-hexanol	83	10,21
1(1-Isocyanato-1-methylethyl)-benzen	91	25,37
Basen		
4-Methyl-3-penten-2-on	72	4,07
Hexamethylcyclotrisiloxan	83	4,48

Tab. 3.38 Verbindungen in den Fraktionen der Probe Zuluft Anlage All

Übereinstimmung der Massenspektren und Retentionszeit der einzelnen Verbindungen

Verbindungsname	Übereinstimmung [%]	Retentionszeit [min]
Starke Säuren		
3,4-Dimethyl-2-penten	78	3,23
4-Methyl-3-penten-2-on	91	3,96
Octamethylcyclotetrasiloxan	86	9,27
Hexadecansäure, methyl ester	93	38,65
Octadecansäure, methyl ester	97	43,56
Schwache Säuren		
2,4-Dimethyl-2-penten	72	3,36
4-Methyl-3-penten-2-on	91	4,12
1,2-Bis(methylthio)-ethan	78	10,43
Hexadecansäure, methyl ester	96	38,67
Octadecansäure, methyl ester	94	43,57
Neutrale Verbindungen		
4-Methyl-3-penten-2-on	78	4,07

Tab. 3.39 Verbindungen in den Fraktionen der Probe Abluft Anlage All

Übereinstimmung der Massenspektren und Retentionszeit der einzelnen Verbindungen

Verbindungsname	Übereinstimmung [%]	Retentionszeit [min]
Starke Säuren		
3,4-Dimethyl-2-penten	72	3,38
4-Methyl-3-penten-2-on	91	4,12
Octadecansäure, methyl ester	94	43,53
Schwache Säuren		
3,4-Dimethyl-2-penten	78	3,39
4-Methyl-3-penten-2-on	91	4,12
1,2-Bis(methylthio)-ethan	78	10,42
Octadecansäure, methyl ester	94	43,61
Neutrale Verbindungen		
Trans-1-butyl-2-methylcyclopropan	70	3,88
Methyl-cyclohexan	74	4,03
Camphen	94	7,61
2-Methyl-2-propensäure, butyl ester	74	8,56
1-Methyl-4-(1-methylethenyl)-benzen	93	12,05
Methyl(1-methylethenyl)-benzen	90	12,31
2-Ethyl-1-dodecanol	80	35,32
2-Hexyl-1-decanol	90	35,28
2-Hexyl-1-decanol	90	40,45
2-Hexyl-1-decanol	90	45,18
Basen		
4-Methyl-3-penten-2-on	83	4,08

Tab. 3.40 Verbindungen in den Fraktionen der Probe Zuluft Anlage BI

Übereinstimmung der Massenspektren und Retentionszeit der einzelnen Verbindungen

Verbindungsname	Übereinstimmung [%]	Retentionszeit [min]
Starke Säuren		
2-Methoxy-furan	83	4,12
Hexadecansäure, methyl ester	97	38,61
Octadecansäure, methyl ester	94	43,53
1,2,3,4,4-1-Phenanthrenecarboxylsäure	98	48,44
Schwache Säuren		
4-Hydroxy-4-methylpentanon	83	4,25
Hexadecansäure, methyl ester	94	38,63
Octadecansäure, methyl ester	97	43,35
Neutrale Verbindungen		
2-Methoxy-furan	72	4,04
Basen		
4-Methyl-3-penten-2-on	80	4,07

Tab. 3.41 Verbindungen in den Fraktionen der Probe Abluft Anlage BI

Übereinstimmung der Massenspektren und Retentionszeit der einzelnen Verbindungen

Verbindungsname	Übereinstimmung [%]	Retentionszeit [min]
Starke Säuren		
2-Methoxy-furan	83	4,043
Hexadecansäure, methyl ester	97	38,624
Octadecansäure, methyl ester	98	43,51
Schwache Säuren		
4-Methyl-3-penten-2-on	83	4,278
2,5-Hexanedion	72	8,639
Hexadecansäure, methyl ester	96	38,643
Octadecansäure, methyl ester	98	43,52
Neutrale Verbindungen		
Methyl Isobutyl Keton	90	3,246
3,5-Dimethyl-1-hexyn-3-ol	78	5,27
N-butyl-benzensulfonamid	87	34,998
Bis(2-methylpropyl)-1,2-benzendicarboxylsäure	78	37,076
Butyl-2-methylpropyl-1,2-benzendicarboxylsäure	78	39,504
Basen		
4-Methyl-3-penten-2-on	78	3,988

Tab. 3.42 Verbindungen in den Fraktionen der Probe Zuluft Anlage BII

Übereinstimmung der Massenspektren und Retentionszeit der einzelnen Verbindungen

Verbindungsname	Übereinstimmung [%]	Retentionszeit [min]
Starke Säuren		
4-Methyl-3-penten-2-on	83	4,32
Hexadecansäure, methyl ester	95	38,62
Octadecansäure, methyl ester	98	43,49
1,2,3,4,4-1-Phenanthrenecarboxylsäure	97	48,42
Schwache Säuren		
3-Methyl-2-cyclohexen-1-on	86	13,08
2,6-Dimethyl-2,5-heptadien-4-on	91	14,03
Hexadecansäure, methyl ester	98	38,58
Octadecansäure, methyl ester	98	43,49
Neutrale Verbindungen		
4-Methyl-3-penten-2-on	80	3,98
Hexamethylcyclotrisiloxan	83	4,38
Basen		
2-Methoxy-furan	78	4,03
Hexamethylcyclotrisiloxan	74	4,43

Tab. 3.43 Verbindungen in den Fraktionen der Probe Abluft Anlage BII

Übereinstimmung der Massenspektren und Retentionszeit der einzelnen Verbindungen

Verbindungsname	Übereinstimmung [%]	Retentionszeit [min]
Starke Säuren		
3,4,5-Trimethylpyrazol	78	7,98
2-Methyl-2-propensäure, butyl ester	74	8,52
2,4-Dimethyl-1H-imidazol	78	10,73
Hexadecansäure, methyl ester	98	38,60
Octadecansäure, methyl ester	96	43,47
Schwache Säuren		
4-Methyl-3-penten-2-on	83	3,84
1,2-Bis(methylthio)-ethan	93	10,49
Hexadecansäure, methyl ester	97	38,58
Octadecansäure, methyl ester	97	43,48
Neutrale Verbindungen		
2-Methyl-2-propensäure, butyl ester	83	8,57
3,5-Dimethyl-1H-pyrazol	83	11,13
Octadecan	96	35,22
Nonadecan	86	37,88
Eicosan	87	40,39
Basen		
1,4-Dimethyl-pyrazol	78	9,22

Tab. 3.44 Verbindungen in den Fraktionen der Probe Prozesskontrolle Anlage A

Übereinstimmung der Massenspektren und Retentionszeit der einzelnen Verbindungen

Verbindungsname	Übereinstimmung [%]	Retentionszeit [min]
Starke Säuren		
2-Methoxy-furan	83	4,18
Octadecansäure, methyl ester	90	43,60
Octadecansäure, methyl ester	90	43,61
Schwache Säuren		
2-Methoxy-furan	83	4,23
1,2-Bis(methylthio)-ethan	72	10,60
Hexadecansäure, methyl ester	81	38,75
Octadecansäure, methyl ester	95	43,60
Neutrale Verbindungen		
4-Methyl-3-penten-2-on	80	4,04
Hexamethylcyclotrisiloxan	83	4,44
Basen		
2-Methoxy-furan	80	4,04

Tab. 3.45 Verbindungen in den Fraktionen der Probe Prozesskontrolle Anlage B

Übereinstimmung der Massenspektren und Retentionszeit der einzelnen Verbindungen

Verbindungsname	Übereinstimmung [%]	Retentionszeit [min]
Starke Säuren		
2-Methoxy-furan	83	4,19
Hexadecansäure, methyl ester	97	38,61
Octadecansäure, methyl ester	96	43,51
Schwache Säuren		
4-Methyl-3-penten-2-on	83	4,25
Hexadecansäure, methyl ester	94	38,70
Octadecansäure, methyl ester	93	43,56
Neutrale Verbindungen		
2-Methoxy-furan	78	4,05
Hexamethyl-cyclotrisiloxan	78	4,47
Butyl-2-methylpropyl-1,2-Benzendicarboxylsäure	78	37,08
Butyl octyl ester-1,2-Benzendicarboxylsäure	83	39,46
Basen		
4-Methyl -3-Penten-2-on	86	3,99

3.4 Einjährige kontinuierliche Immissionsmessung

Das Ziel der einjährigen Immissionsmessung war, den Einfluss der Abluft aus der berobten Anlage A auf die Luftqualität der angrenzenden Stadt zu untersuchen. Da die Hauptwindrichtung dieser Gegend, aus Süd - Westen kommend, zunächst über die Anlage hin zur Stadt liegt, wird die Blockade der Frischluftversorgung der Stadt durch die Anlage immer wieder diskutiert. Für diese Immissionsmessung wurden daher ein Messpunkt in Hauptwindrichtung vor der Anlage (vor Anlage), ein Messpunkt in Hauptwindrichtung nach der Anlage (nach Anlage) und ein Messpunkt in Hauptwindrichtung nach der Stadt (nach Stadt) zur Beprobung ausgewählt, um eine Beeinflussung der Abluft aus der Anlage zu ermitteln. Die Ergebnisse der Untersuchung werden im folgenden Kapitel dargestellt.

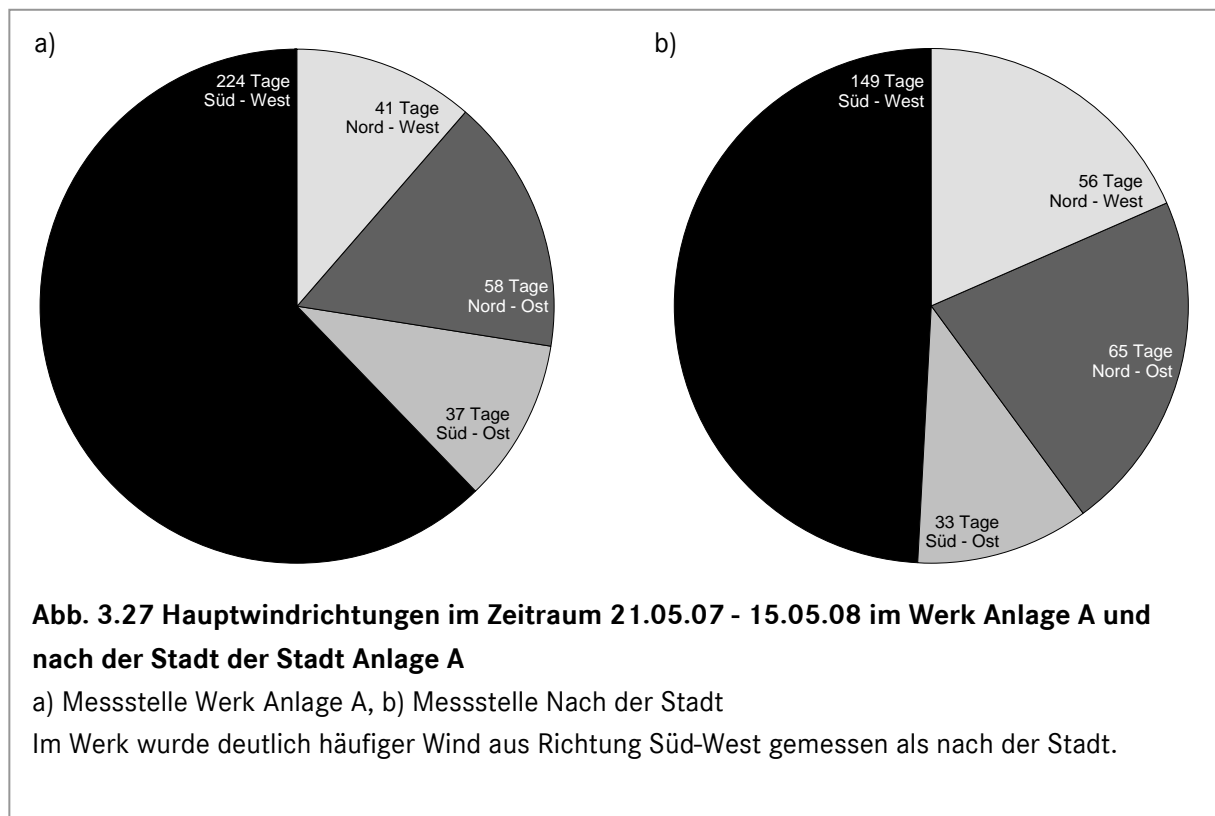
3.4.1 Meteorologie und Partikelkonzentrationen

Windrichtung

Während der Immissionsmessung wurde an einer meteorologischen Messstation an der Anlage die Windrichtung bestimmt, um Tagesproben für die Untersuchung in den Bioassays auszuwählen, bei deren Probenahme der Hauptwind aus Süd - Westen kam. Zum Vergleich wurden Daten der meteorologischen Station, die nach der Stadt installiert ist, herangezogen.

Die meteorologische Station an der Anlage bestimmt die Windrichtung im Abstand von fünf Minuten; die Station nach der Stadt ermittelt halbstündige Werte. Um die Hauptwindrichtung eines Tages zu bestimmen, wurde, anhand der gemessenen Gradzahlen, die hauptsächliche Windrichtung jedes Tages errechnet.

Die Ergebnisse der Hauptwindrichtungen im Zeitraum 21.05.07 - 15.05.08 beider Stationen sind in Abb. 3.27 dargestellt. An der Anlage wurde während der Probenahme von 361 Tagen an 360 Tagen die Windrichtung bestimmt, nach der Stadt konnten an 303 Tagen Daten zur Bestimmung der Windrichtung ermittelt werden.



Probenahmetage

Die Probenahme vor und nach der Anlage erfolgte durch automatischen täglichen Filterwechsel und erlaubte daher eine kontinuierliche tägliche Messung über ein Jahr. Nach der Stadt fand die Probenahme durch den fehlenden Filterwechsler von Montag bis Freitag statt, außerdem wurde dort Gesamtstaub (TSP) gesammelt, da für das verwendete Gerät keine Vorabscheider zur Verfügung standen. Durch technische Störungen der Sampler und Betriebsruhe während der Probenahme konnten Proben nur zu den in Abb. 3.28 angezeigten Zeiträumen gesammelt werden.

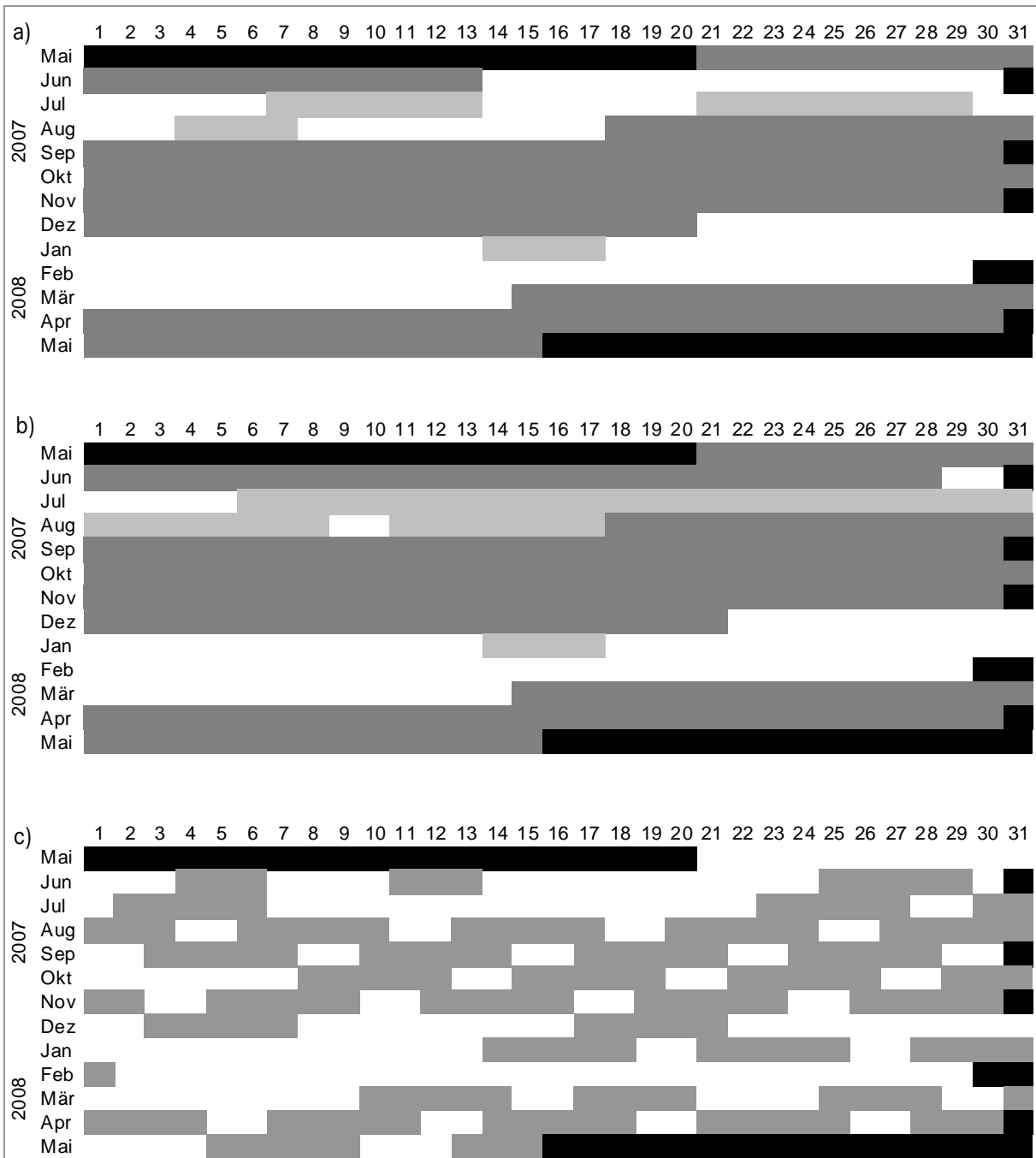


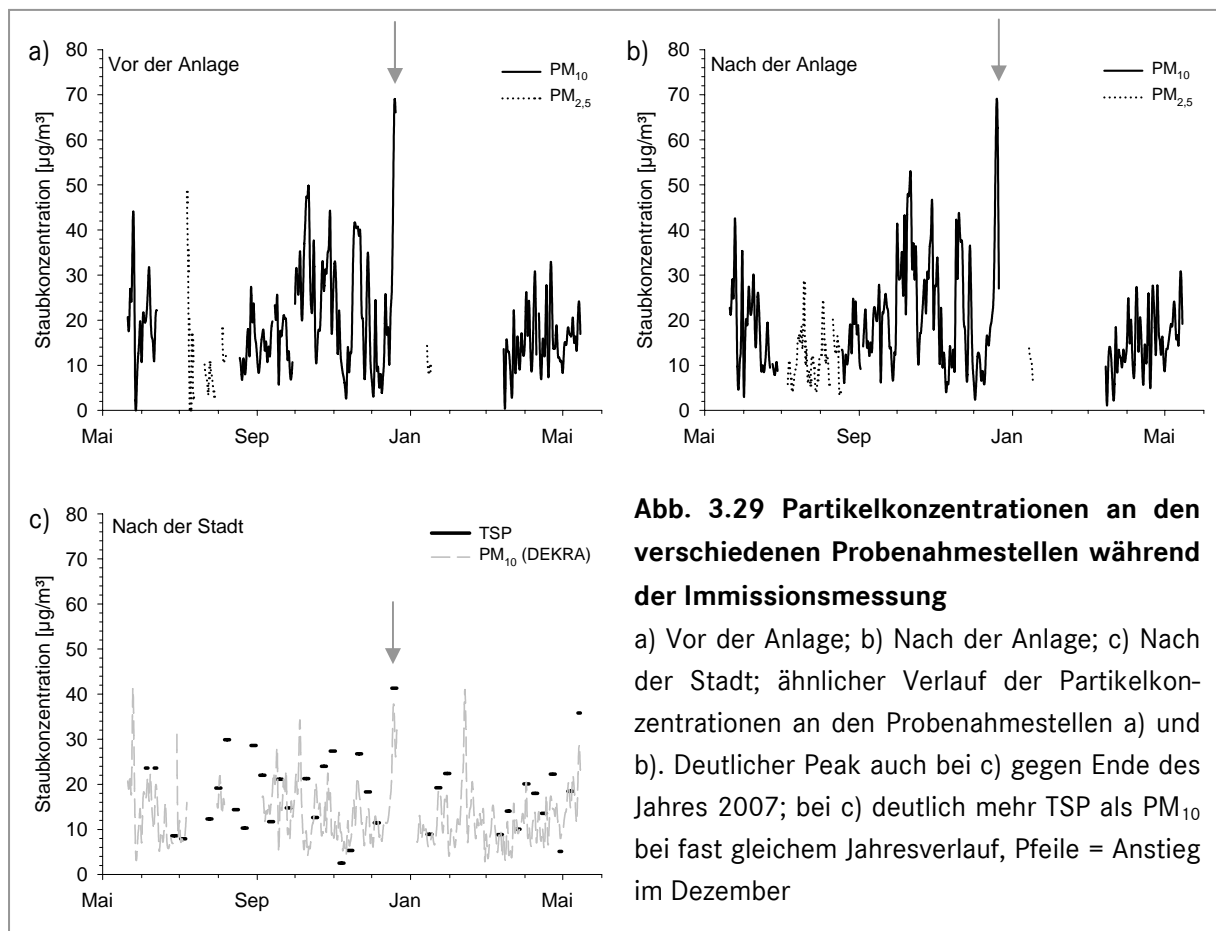
Abb. 3.28 Probenahmetage der Immissionsmessung

weiß hinterlegte Felder: keine Probenahme; schwarz hinterlegte Felder: außerhalb des Probenahmezeitraums

- a) Vor der Anlage, dunkelgrau hinterlegt: PM₁₀ Probenahme, hellgrau hinterlegt: PM_{2,5} Probenahme;
- b) Nach der Anlage, dunkelgrau hinterlegt: PM₁₀ Probenahme, hellgrau hinterlegt: PM_{2,5} Probenahme;
- c) Nach der Stadt, mittelgrau hinterlegt: Gesamtstaub (TSP) Probenahme;

Ermittelte Partikelkonzentrationen

Durch Auswiegen der Filter vor und nach der Belegung, konnte die Partikelkonzentration in der Luft zur Zeit der Probenahme, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, berechnet werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.29 im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die an der meteorologischen Station gemessenen PM_{10} -Werte wurden halbstündig erhoben und in Tagesmittelwerte umgerechnet (Abb. 3.29 c)).



Die Partikelkonzentrationen vor und nach der Anlage (Abb. 3.29 a) und b)) zeigen einen ähnlichen Jahresverlauf. Insbesondere der hohe Peak Mitte Dezember 2007 ist an beiden Probenahmestellen zu verzeichnen. Die Partikelkonzentrationen nach der Stadt (Abb. 3.29 c)) sind tendenziell niedriger als vor und nach der Anlage, jedoch konnte auch hier ein starker Anstieg der Konzentration an TSP und PM_{10} im Dezember 2007 beobachtet werden (Abb. 3.29 Pfeile). Durch die Sammlung von TSP liegen die selbst ermittelten Werte über den Werten für PM_{10} , die von der meteorologischen Station gemessen wurden.

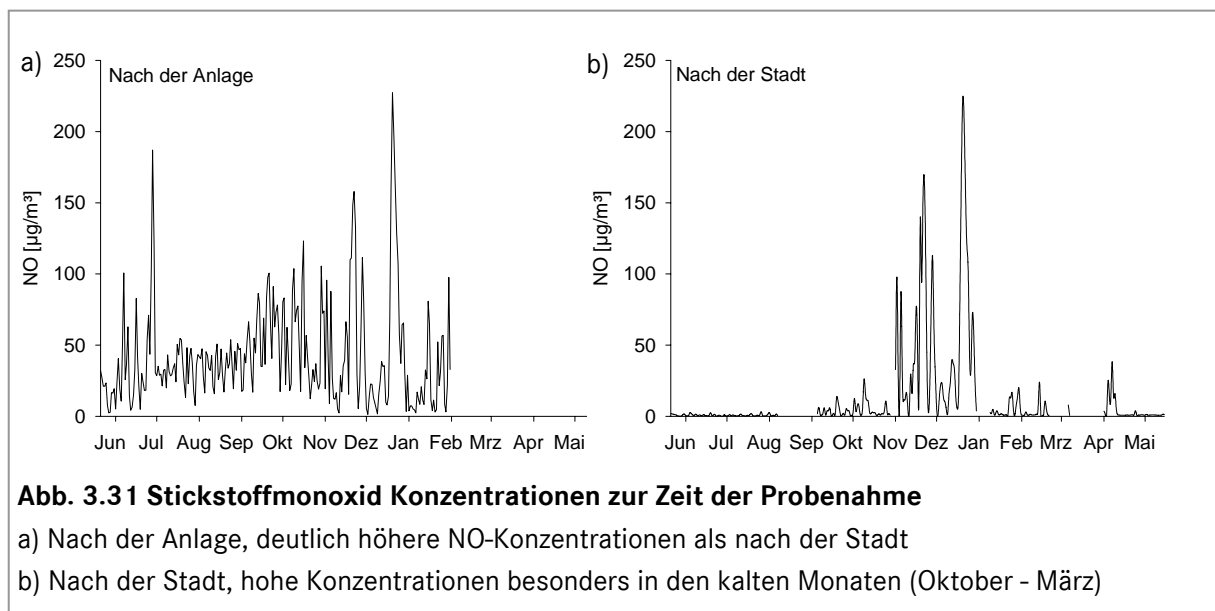
Ermittelte Stickoxidwerte der meteorologischen Station zur Zeit der Probenahme

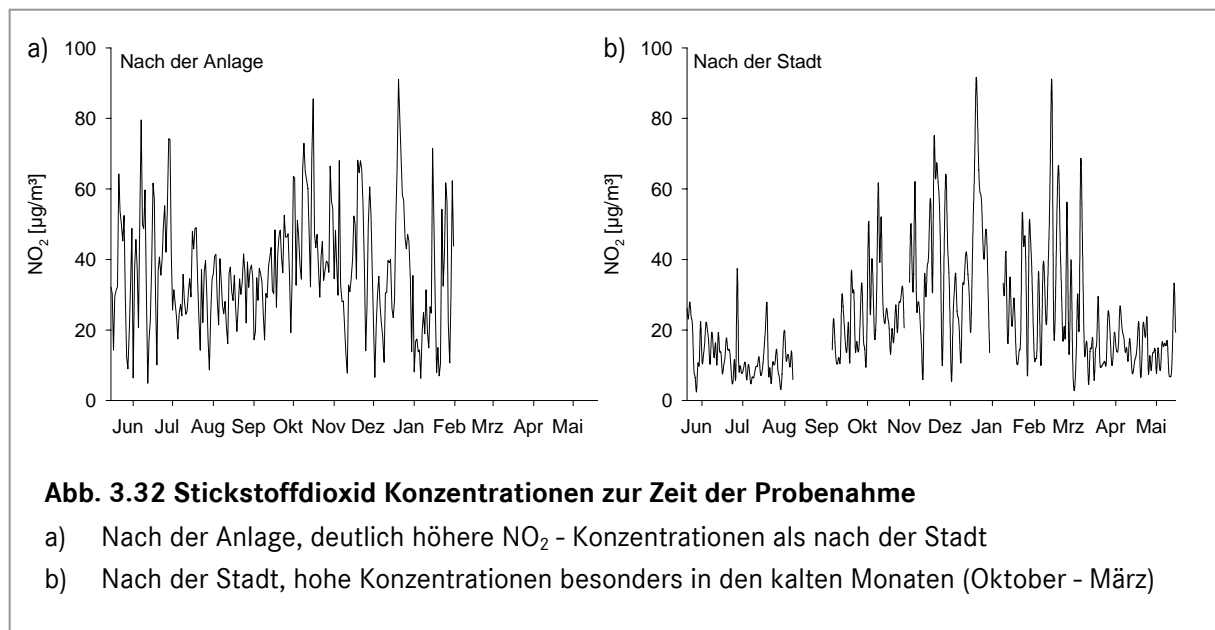
Während der Probenahme wurde nach der Anlage und nach der Stadt kontinuierlich Stickstoffdioxid und Stickstoffmonoxid gemessen. Durch eine Softwareumstellung der Messgeräte wurden die Daten im Zeitraum Mai bis Oktober 2007 und Januar bis März 2008 in der Einheit ppm bereitgestellt, von November bis Dezember 2007 und April bis Mai 2008 in der Einheit $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Um eine einheitliche Darstellung zu gewährleisten, wurden die Daten mit der Einheit ppm nach der in Abb. 3.30 dargestellten Formel umgerechnet.

$$c = \frac{\text{Messwert [ppm]} \times \text{molare Masse [g/mol]}}{22,4 \text{ mol}}$$

Abb. 3.30 Gleichung zur Umrechnung von ppm in $\mu\text{g}/\text{m}^3$

Sowohl die Konzentrationen an Stickstoffdioxid als auch an Stickstoffmonoxid zeigen ein deutliches Maximum in den kalten Monaten. Dabei zeigt Stickstoffdioxid von Oktober bis März höhere Werte als in den warmen Monaten von Juni bis August 2007 und ab April 2008 (Abb. 3.31). Dieser Anstieg zeigt sich in der Stickstoffmonoxidbetrachtung noch deutlicher. Hohe Konzentrationen an Stickstoffmonoxid sind im Zeitraum November 2007 bis Januar 2008 zu finden (Abb. 3.32).

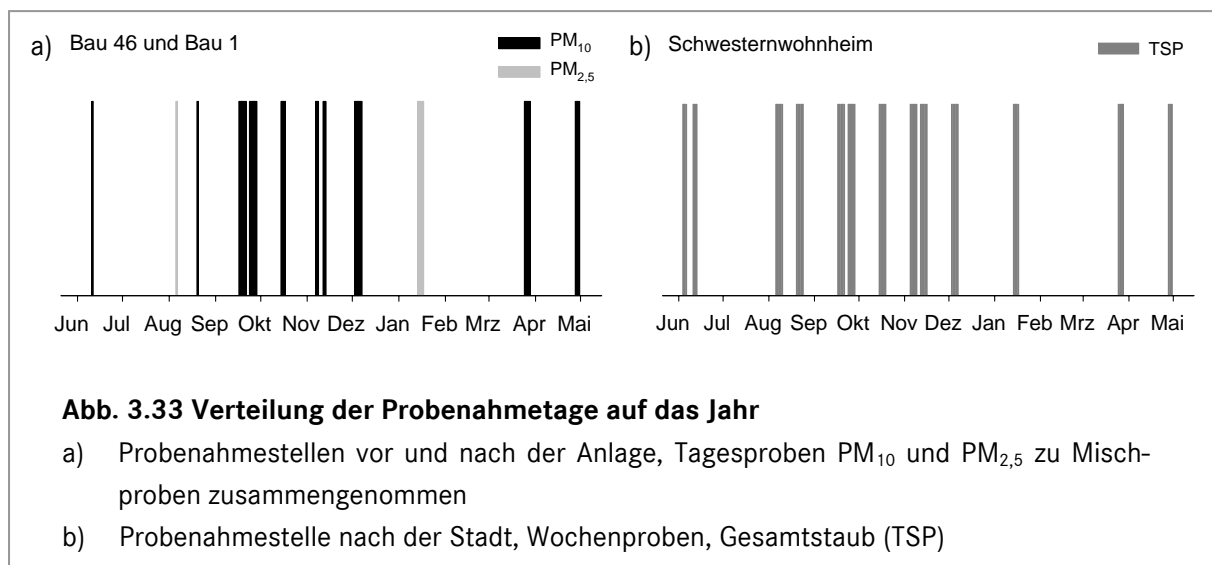




Probenauswahl für die Bioassays

Zur Auswahl der Proben für die Bioassays wurden Tage ausgewählt an denen beide Stationen Wind aus Süd - Westen meldeten, die Produktion in der Anlage lief und von allen drei Probenahmestellen beaufschlagte Filter vorlagen. Lagten alle drei Kriterien an mehreren Tagen nacheinander vor, wurden diese zu Mischproben zusammengenommen. Für den Probenahmezeitraum ergaben sich dadurch 8 PM_{10} - Mischproben, eine $\text{PM}_{2,5}$ - Mischprobe und 3 Proben von Einzeltagen.

Abb. 3.33 zeigt die Verteilung der Proben und die jeweilige Fraktion über das Jahr an allen Probenahmestellen.



3.4.2 Feldkontrollen

Um sicherzustellen, dass weder die Behandlung der Filter noch eine fehlerhafte Aufbereitung für die Effekte in den Bioassays verantwortlich waren, wurden insgesamt 3 Feldkontrollen und ein leerer Filter aus der Packung analysiert. Bei den Feldkontrollen handelte es sich um Filter, die in das Gerät eingesetzt, jedoch nicht mit Staub beaufschlagt worden waren.

Kontrolle 1	Leerer Filter aus der Packung
Kontrolle 2	Vor der Anlage April 2008
Kontrolle 3	Nach der Anlage Mai 2008
Kontrolle 4	Vor der Anlage Mai 2008

3.4.3 Bestimmung der Cytotoxizität

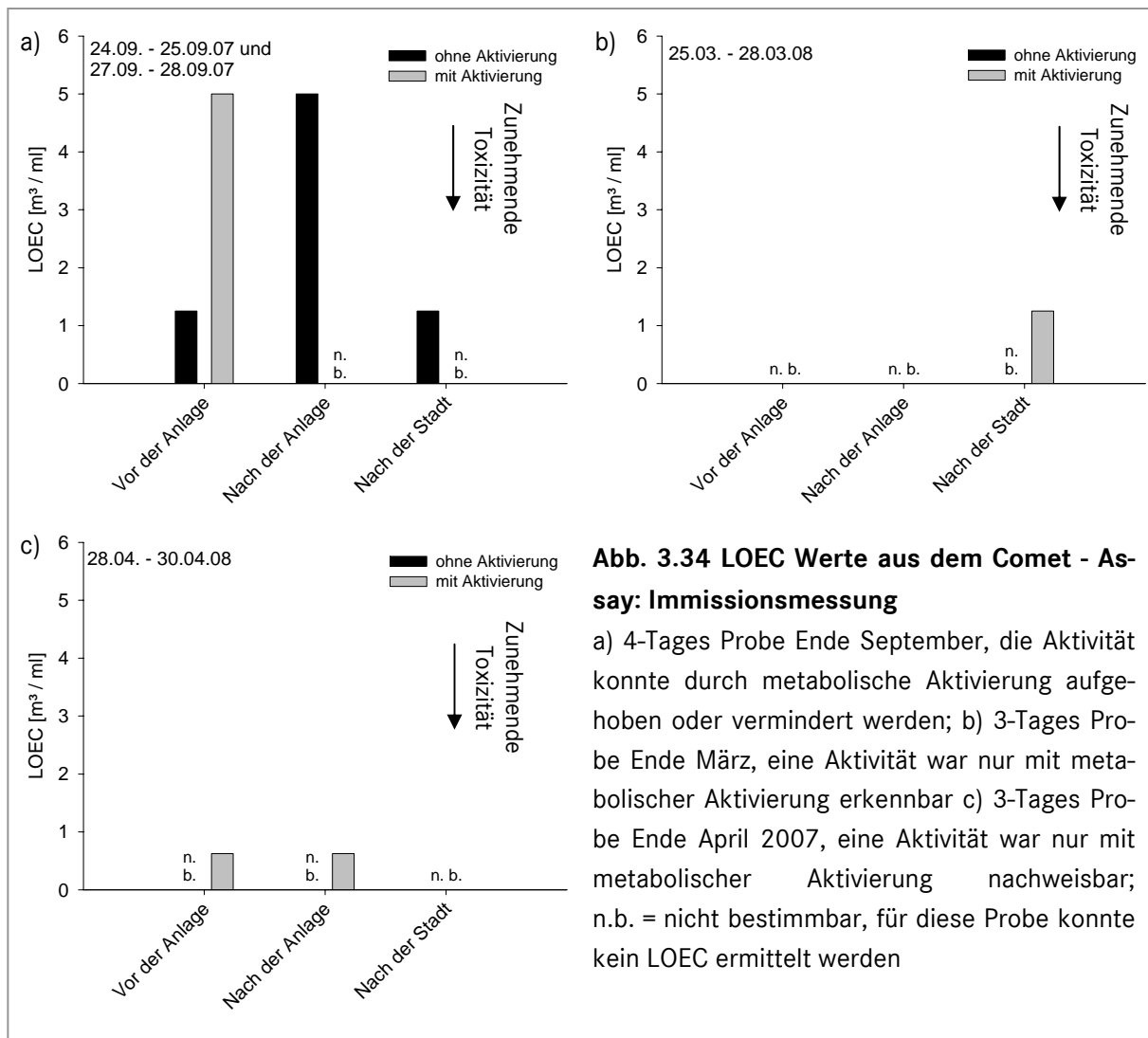
Das cytotoxische Potenzial der acetonischen Filterextrakte der Immissionsproben wurde an der Zelllinie V79 mit dem Endpunkt Neutralrotretention untersucht (vgl. Kap. 2.4). Die Bewertung des Potenzials erfolgte anhand des NR_{50} -Werts, der angibt, bei welcher Schadstoffkonzentration 50 % der Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle überleben.

Ein NR_{50} -Wert konnte in keiner getesteten Probe bestimmt werden, daher konnten alle Proben im durchgeführten Assay als nicht wirksam eingestuft werden.

3.4.4 Comet - Assay

Der Comet - Assay mit der Säugerzelllinie V79 wurde zur Bestimmung der Genotoxizität der acetonischen Filterextrakte aus der Immissionsmessung, wie in Kap. 2.6 beschrieben, durchgeführt.

Für jede Probe wurde dabei mit und ohne metabolische Aktivierung die niedrigste Konzentration ermittelt, bei der ein statistisch signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle bestand. Eine Aktivität im Comet - Assay konnte nur für die Proben aus drei Probenahmezeiträumen festgestellt werden. Die Werte der aktiven Proben sind in Abb. 3.34 dargestellt. Keine der Feldkontrollen zeigte eine Wirkung im Comet - Assay.



In den 12 untersuchten Probennahmezeiträumen aus der Immissionsmessung konnten im Comet - Assay aktive Proben nur während 3 Zeiträumen ermittelt werden. Die höchste Aktivität zeigten die Proben, die Ende September 2007 gesammelt wurden (Abb. 3.34 a)). In der Probe vom 25.03. - 28.03.08 konnte ein Effekt durch metabolische Aktivierung in der Gesamtstaubprobe, die nach der Stadt gesammelt worden war, ermittelt werden. Derselbe Effekt konnte in der Probe vom 28.04. - 30.04.08 in den Proben von vor und nach der Anlage gezeigt werden.

Legt man die in Kapitel 3.1.2 dargestellten Bewertungsmaßstäbe an, erhält man die in Tabelle 3.46 dargestellten Ergebnisse. Da es sich um eine Immissionsmessung handelt, wurde auf die Betrachtungsweise „Immissionsprognose“ in diesem Kapitel verzichtet.

Tab. 3.46 Bewertung des Comet - Assays, Immissionsmessung

Eine Aktivität im Comet - Assay konnte nur in sehr wenigen Proben festgestellt werden; schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung

2007						
	Mitte Juni	Anfang August	Mitte August	Mitte September	Ende September	Mitte Oktober
Vor der Anlage	-/-	-/-	-/-	-/-	+++/**	-/-
Nach der Anlage	-/-	-/-	-/-	-/-	**/-	-/-
Nach der Stadt	-/-	-/-	-/-	-/-	+++/-	-/-

2007			2008			
	Anfang November	Mitte November	Anfang Dezember	Mitte Januar	Ende März	Ende April
Vor der Anlage	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+++
Nach der Anlage	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+++
Nach der Stadt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+++	-/-

Die starke Aktivität der Proben, die Ende September gesammelt wurden, konnte durch metabolische Aktivierung (Zugabe von S9-Mix, s. Kap. 2.3.4) stark verringert oder aufgehoben werden. Hingegen zeigten die Proben, die Ende März und Ende April 2008 gesammelt wurden, nur durch metabolische Aktivierung einen Effekt im Comet - Assay.

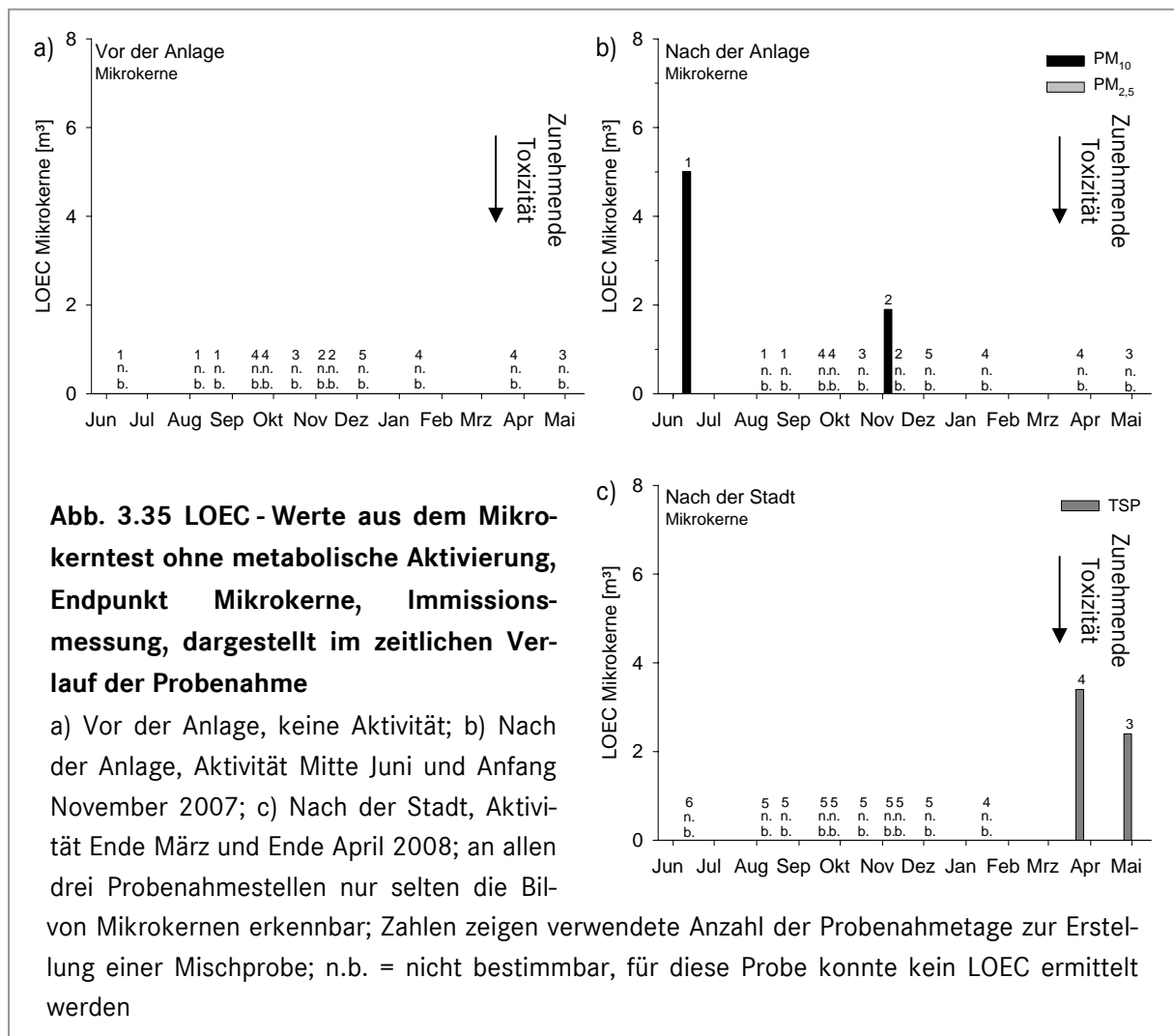
3.4.5 Mikrokerntest

Der Mikrokerntest mit der Säugerzelllinie V79 wurde zusätzlich zum Comet - Assay zur weiteren Bestimmung der Gentoxizität der acetonischen Filterextrakte aus der Immissionsmessung, wie in Kapitel 2.7 beschrieben, durchgeführt.

Mikrokerne

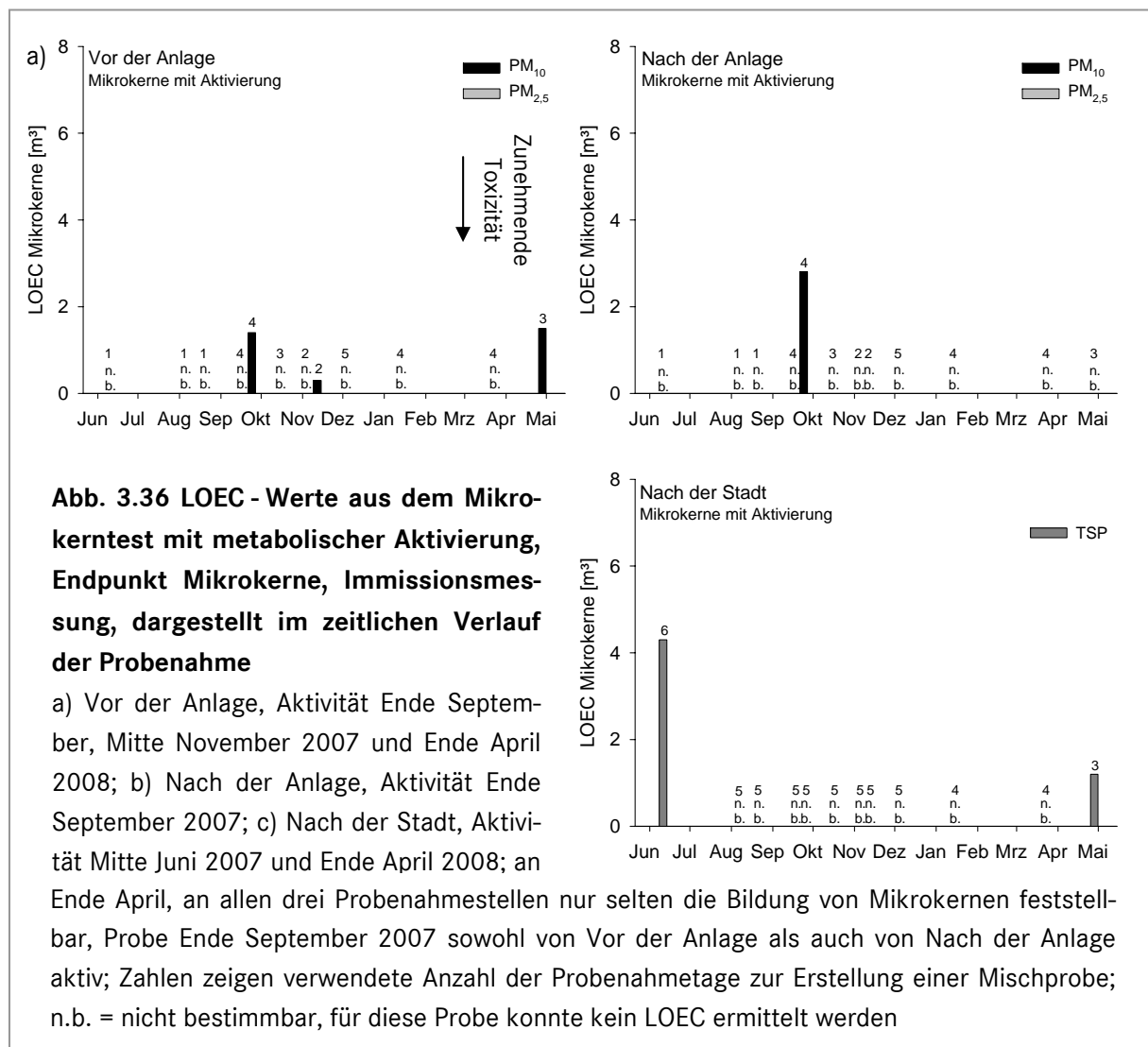
Zur Bestimmung der Konzentration, ab der ein Effekt feststellbar war (lowest observable effect concentration, LOEC) wurde der Mittelwert aus allen Negativkontrollen gebildet und deren Standardabweichung bestimmt. Die Werte lagen ohne metabolische Aktivierung durch S9-Mix bei $1,8 \% \pm 0,88$, im Ansatz mit metabolischer Aktivierung durch S9 bei $3,06 \% \pm 1,25$. Die Standardabweichung wurde verdoppelt und zum Mittelwert hinzuaddiert, um die Grenze zu definieren, ab der ein Effekt auftritt. Durch die Verdopplung der Standardabweichung konnte sichergestellt werden, dass mit 97,5 %iger Wahrscheinlichkeit kein Wert falsch positiv bewertet wurde. Anschließend wurde graphisch die Konzentration ermittelt, bei der ohne S9-Mix 4 % und mit S9-Mix 6 % Mikrokerne erreicht wurden. Diese Werte wurden als LOECs (lo-

west observable effect levels) festgelegt und sind für die Ansätze ohne metabolische Aktivierung in Abb. 3.35 dargestellt.



Keine der Proben, die vor der Anlage gesammelt wurden, zeigten ohne metabolische Aktivierung einen Effekt im Mikrokerntest bei der Betrachtung des Endpunkts „Mikrokerne“. Nach der Anlage konnte dagegen in zwei Proben Effekte gefunden werden, Mitte Juni und Anfang November 2007. Die Gesamtstaubproben, die nach der Stadt gesammelt worden waren wiesen Ende März und Ende April 2008 eine Aktivität auf.

In Abb. 3.36 sind die LOECs der Ansätze mit metabolischer Aktivierung unter Betrachtung des Endpunktes „Mikrokerne“ dargestellt.



Die Proben von vor der Anlage wiesen mit metabolischer Aktivierung bei der Betrachtung des Endpunkts „Mikrokerne“ Ende September, Mitte November 2007 und Ende April 2008 die Induktion von Mikrokerne auf. Ende September konnte auch eine Aktivität der Proben nach der Anlage gefunden werden. Beide Proben lösten ohne metabolische Aktivierung keine vermehrte Mikrokernebildung aus. Dagegen konnte die Aktivität der Proben von nach der Anlage, die ohne metabolische Aktivierung Mitte Juni und Anfang November festgestellt wurde, durch die metabolische Aktivierung aufgehoben werden. Die Proben, die nach der Stadt gesammelt worden waren, zeigten Anfang Juni 2007 und Ende April 2008 eine Aktivität im Mikrokerntest. Durch die metabolische Aktivierung wurde die Wirkung der Probe von Ende April verstärkt und erstmals eine Wirkung der Probe von Anfang Juni gemessen. Dagegen wurde durch die metabolische Aktivierung die Wirkung der Probe von Ende März aufgehoben.

Tabelle 3.47 fasst die Ergebnisse der Feldkontrollen im Mikrokerntest mit dem Endpunkt Mikrokerne zusammen.

Tab. 3.47 Ergebnisse des Mikrokerntests: Kontrollen

Werte sind errechnete Nominalkonzentrationen, bei denen ein Effekt auftrat (maximal eingesetzt 10 µl/ml). Schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung

	Mikrokerne		Mikrokerne
Kontrolle 1	3,8 µl/ml / -	Kontrolle 3	- / -
Kontrolle 2	- / 3,1 µl/ml	Kontrolle 4	- / -

Um sicherzustellen, dass die Effekte nicht durch die Aufbereitung der Proben oder das Filtermaterial entstanden waren, wurden alle Dosis-Wirkungsbeziehungen der aktiven Proben im Ansatz ohne metabolische Aktivierung mit der Dosis-Wirkungsbeziehung der Kontrolle verglichen.

In Tabelle 3.48 sind die Ergebnisse des Mikrokerntests zusammengefasst nach dem die in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Bewertungsmaßstäbe angelegt wurden.

Tab. 3.48 Bewertung des Mikrokerntests, Endpunkt Mikrokerne, Immissionsmessung

Mikrokerne lösten nur in 9 von 36 Proben aus; schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung; in Klammern = falsch positives Ergebnis

2007						
	Mitte Juni	Anfang August	Mitte August	Mitte September	Ende September	Mitte Oktober
Vor der Anlage	-/-	-/-	-/-	-/+++	-/-	-/-
Nach der Anlage	++/-	-/-	-/-	-/-	-/++	-/-
Nach der Stadt	-/- (++)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

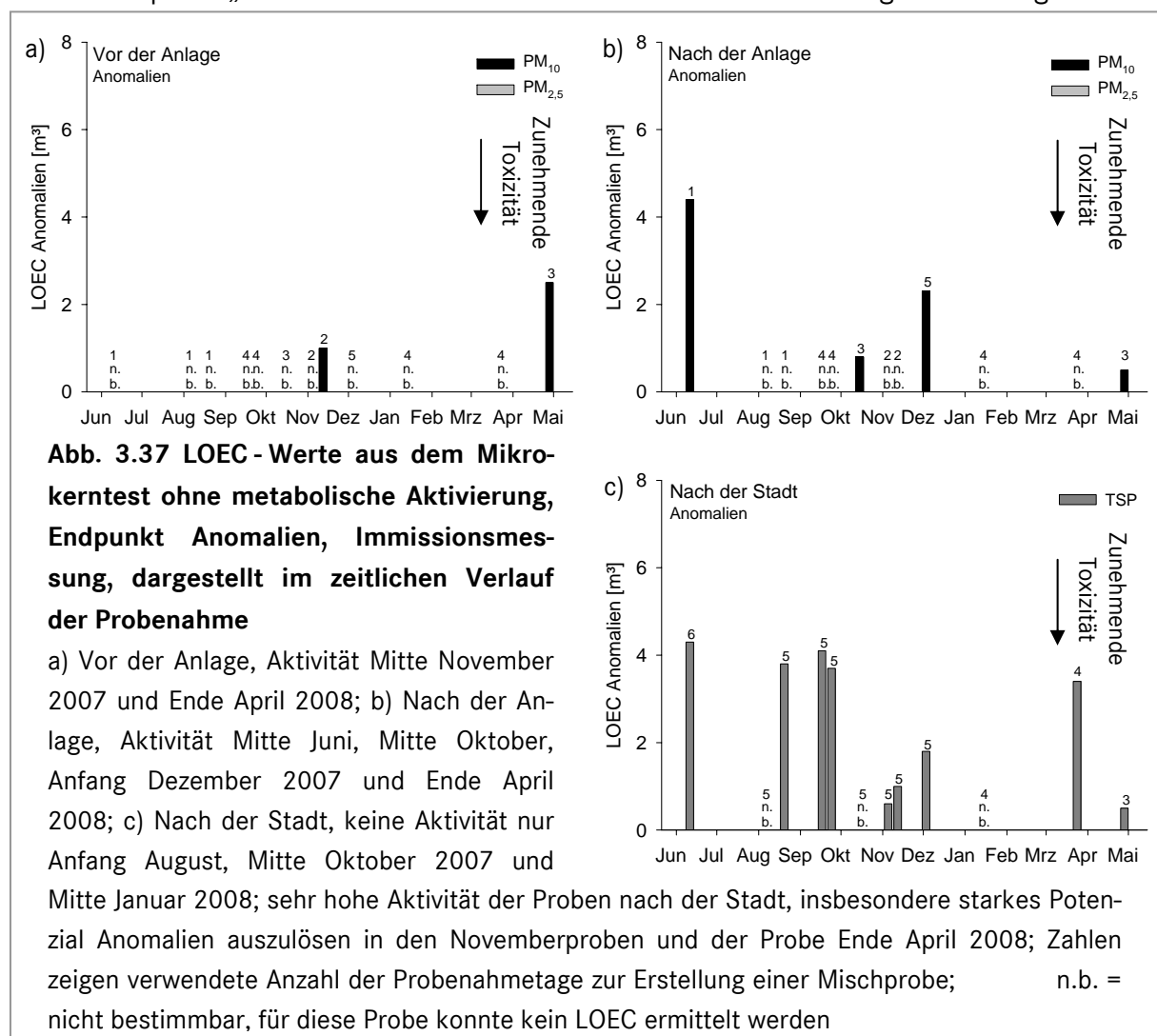
2007							2008	
	Anfang November	Mitte November	Anfang Dezember	Mitte Januar	Ende März	Ende April		
Vor der Anlage	-/-	-/+++	-/-	-/-	-/-	-/+++		
Nach der Anlage	(+++)-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		
Nach der Stadt	-/-	-/-	-/-	-/-	++/-	+++ / +++		

Ein Potenzial Mikrokerne zu induzieren konnte hauptsächlich durch Zugabe von S9-Mix, also durch metabolische Aktivierung, festgestellt werden (vor der Anlage Mitte September, Mitte November 2007 und Ende April 2008, nach der Anlage Ende September 2007). Ebenso konnte jedoch durch metabolische Aktivierung die Aktivität von Proben aufgehoben werden (nach der Anlage Mitte Juni und Anfang November 2007, nach der Stadt Ende März 2008). Auffällig ist vor allem die hohe Aktivität der Probe, die Ende April 2008 nach der Stadt gesammelt

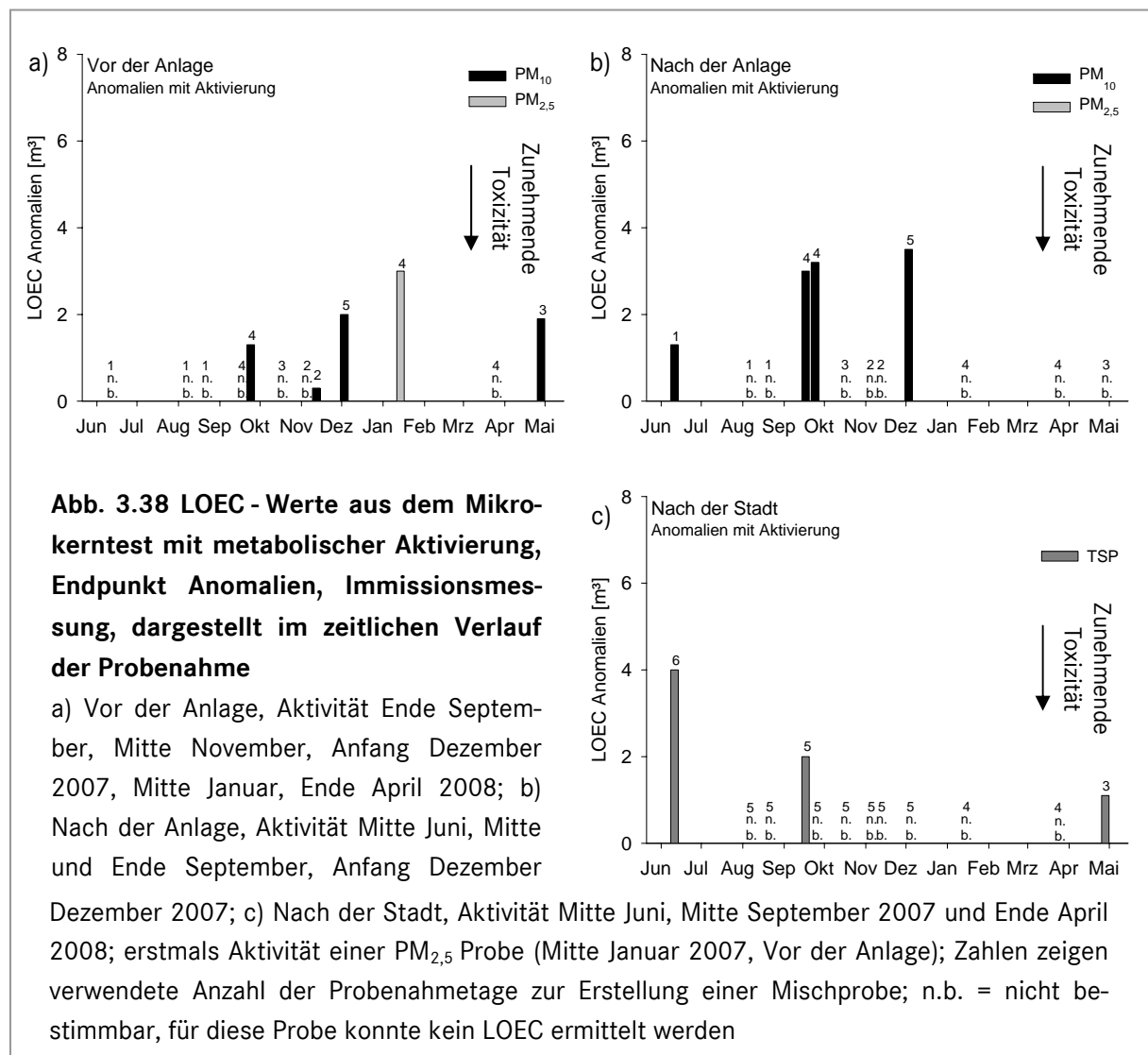
wurde. Die Wirkung der Probe von Anfang November 2007 wurde durch Vergleich der Dosis-Wirkungsbeziehung mit Kontrolle 1 als falsch positiv bewertet, da beide Proben einen starken Anstieg in der ersten und vierten Konzentration zeigten und identische Kurvenverläufe aufwiesen. Auch die Wirkung der Probe nach der Stadt von Mitte Juni 2007 wurde aufgrund des Verlaufs ihrer Dosis-Wirkungsbeziehung als falsch positiv bewertet.

Zellkernanomalien

Neben der Betrachtung des Endpunkts „Mikrokerne“ wurden, wie in Kap. 2.7.2 beschrieben, auch Zellkernanomalien betrachtet und unter dem Begriff Anomalien zusammengefasst. Diese wurden analog zur Auswertung der Mikrokerne aufgetragen und wie oben beschrieben ausgewertet. Der Mittelwert der Negativkontrollen lag bei $1,58 \% \pm 1,26$ ohne metabolische Aktivierung und bei $3,89 \% \pm 2,43$ mit metabolischer Aktivierung durch S9. Zur graphischen Ermittlung des LOEC wurde ohne S9-Mix die Konzentration bestimmt, bei der 4,5 % der Zellen Anomalien aufwiesen. Im Versuch mit metabolischer Aktivierung wurde die Konzentration gewählt bei der 9 % der Zellen Anomalien aufwiesen, da bereits die Verwendung des S9-Mixes Schädigungen der Zellkerne in den Negativkontrollen hervorrief. In Abb. 3.37 sind die LOECs für den Endpunkt „Anomalien“ im Ansatz ohne metabolische Aktivierung zusammengefasst.



Zellkernanomalien konnten bei den Proben von vor der Anlage nur durch die Proben ausgelöst werden, die Mitte November 2007 und Ende April 2008 gesammelt wurden. Hingegen riefen Proben, die nach der Anlage Mitte Juni, Mitte Oktober, Anfang Dezember im Jahr 2007 und Proben, die Ende April 2008 gesammelt wurden, Zellkernanomalien hervor. Die meiste Aktivität bezüglich des Auslösens von Zellkernanomalien wiesen die Proben auf, die nach der Stadt gesammelt worden waren. Hier konnte keine Aktivität Anfang August, Mitte Oktober 2007 und Mitte Januar 2008 nachgewiesen werden. Eine sehr hohe Aktivität wies hier ebenfalls die Probe auf, die Ende April gesammelt worden war und auch vor und nach der Anlage bereits ein Potenzial, Zellkernanomalien zu verursachen, aufwies. In Abb. 3.38 sind die LOEC - Werte der Ansätze mit metabolischer Aktivierung unter Betrachtung des Endpunktes „Anomalien“ dargestellt.



Mit metabolischer Aktivierung konnte erstmals eine Aktivität einer $PM_{2,5}$ Probe festgestellt werden. Neben der Probe, die Mitte Januar vor der Anlage gesammelt wurde, wiesen außerdem die Proben von Ende September, Mitte November, Anfang Dezember 2007 und Ende April 2008 ein Potenzial auf, Zellkernanomalien zu induzieren. Eine Aktivität der Proben von nach der Anlage konnte Mitte Juni, Mitte und Ende September sowie Anfang Dezember 2007

festgestellt werden. Durch die metabolische Aktivierung konnte die häufige Aktivität der Proben, die nach der Stadt gesammelt worden waren, nahezu aufgehoben werden. Nur die Proben, die Mitte Juni, Mitte September 2007 und Ende April 2008 gesammelt wurden, wiesen noch eine Aktivität im Mikrokerntest, bei der Betrachtung des Endpunkts „Zellkernanomalien“ auf. Tabelle 3.49 fasst die Ergebnisse der Prozesskontrollen im Mikrokerntest mit dem Endpunkt „Anomalien“ zusammen.

Tab. 3.49 Ergebnisse des Mikrokerntests: Kontrollen

Werte sind errechnete Nominalkonzentrationen, bei denen ein Effekt auftrat (maximal eingesetzt 10 µl/ml). Schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung

	Anomalien		Anomalien
Kontrolle 1	- / -	Kontrolle 3	9,7 µl/ml / -
Kontrolle 2	9,6 µl/ml / -	Kontrolle 4	- / -

Zur Bewertung wurden wie bereits bei der Betrachtung des Endpunktes „Mikrokerne“ die Dosis-Wirkungsbeziehungen der Kontrollen mit denen der Proben verglichen. Tab. 3.50 fasst die Ergebnisse des Mikrokerntests bei der Betrachtung des Endpunkts „Anomalien“ zusammen.

Tab. 3.50 Bewertung des Mikrokerntests, Endpunkt Anomalien, Immissionsmessung

Ein Potenzial Anomalien auszulösen konnte in vielen Proben (18 von 36) festgestellt werden; schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung; in Klammern = falsch positive Ergebnisse

	2007						
	Mitte Juni	Anfang August	Mitte August	Au- gust	Mitte Sep- tember	Ende Sep- tember	Mitte Okto- ber
Vor der Anlage	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+++	-/-
Nach der Anlage	(++) -/+++	-/-	-/-	-/-	-/++	-/++	+++/-
Nach der Stadt	(++) -/++	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+++	-/-
	2007			2008			
	Anfang November	Mitte No- vember	Anfang De- zember	Mitte Janu- ar	Ende März	Ende April	
Vor der Anlage	-/-	+++ / +++	- / +++	- / ++	- / -	++ / +++	
Nach der Anlage	-/-	-/-	+++ / ++	- / -	- / -	+++ / -	
Nach der Stadt	+++ / -	+++ / -	+++ / -	- / -	++ / -	+++ / +++	

Die Proben wiesen ein deutlich höheres Potenzial auf, Zellkernanomalien auszulösen, als Mikrokerne zu induzieren. Einige Proben wurden erst durch die metabolische Aktivierung aktiv, daher konnte in den Proben, die Ende September gesammelt wurden, nur nach metabolischer Aktivierung ein Potenzial Zellkernanomalien auszulösen ermittelt werden. Auffällig ist eine hohe Aktivität der Proben aus Anfang Dezember und Ende April. Die Proben, die Ende April gesammelt wurden, wiesen bereits bei der Betrachtung des Endpunkts Mikrokerne eine hohe Aktivität auf. Durch das Einbeziehen der Effekte aus den Prozesskontrollen wurden zwei Ergebnisse als falsch positiv bewertet: Nach der Anlage und nach der Stadt von Mitte Juni. Beide Proben zeigten nahezu identische Dosis-Wirkungsbeziehungen wie die Feldkontrollen.

3.4.6 Ames - Test

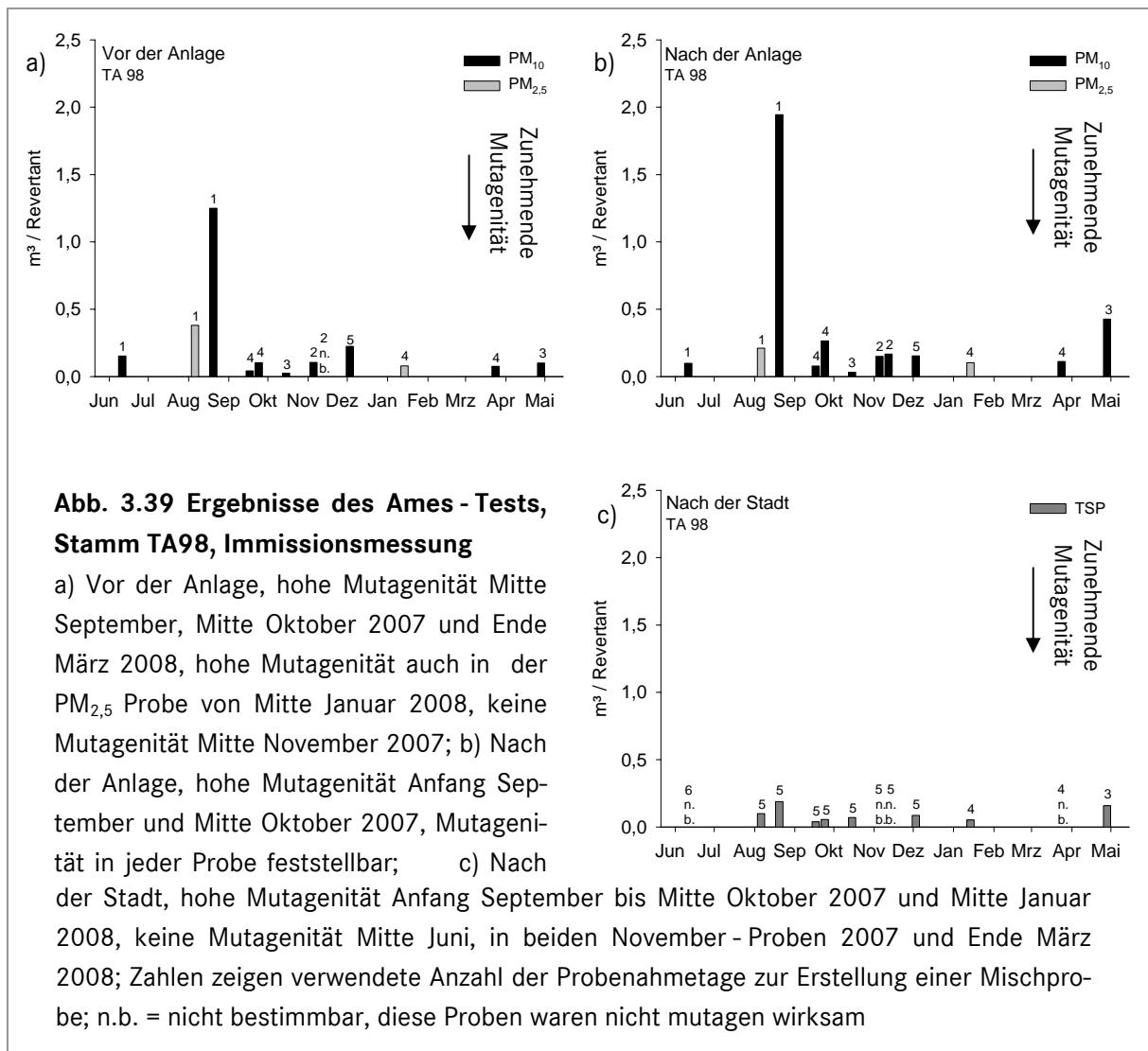
Die Mutagenität der acetonischen Extrakte der Luftproben aus der Immissionsmessung wurde, wie in Kapitel 2.8 beschrieben, durch den Ames-Test mit den Stämmen TA98 und TA100 von *Salmonella typhimurimum* jeweils mit und ohne metabolische Aktivierung durch S9 bestimmt.

Zur Auswertung des Ames - Tests wurde verfahren, wie in Kap. 3.2.5 beschrieben. Es wurde die Anzahl der Revertanten gegen die eingesetzte Menge an Luftäquivalenten aufgetragen, über die Steigung der linearen Regressionsgerade die Anzahl der Revertanten pro m³ Luft ermittelt und nur die Proben bewertet, die einen Korrelationsfaktor über 0,80 aufwiesen. Anschließend wurde zur Darstellung der reziproke Wert der Steigung der linearen Regressionsgerade verwendet, um die Einheit m³ Luft pro Revertant zu erreichen. Die Bewertungsgrenzen wurden auf Basis der Daten der Kälbelescheuer gewählt, da dieses Gebiet als Reinluftgebiet gilt und daher „saubere Waldluft“ darstellt. Die Effektgrenzen lagen ebenfalls bei den in Tabelle 4.11 aufgelisteten Werten. In keiner der getesteten Feldkontrollen konnte eine Mutagenität im Ames - Test festgestellt werden.

Stamm TA 98

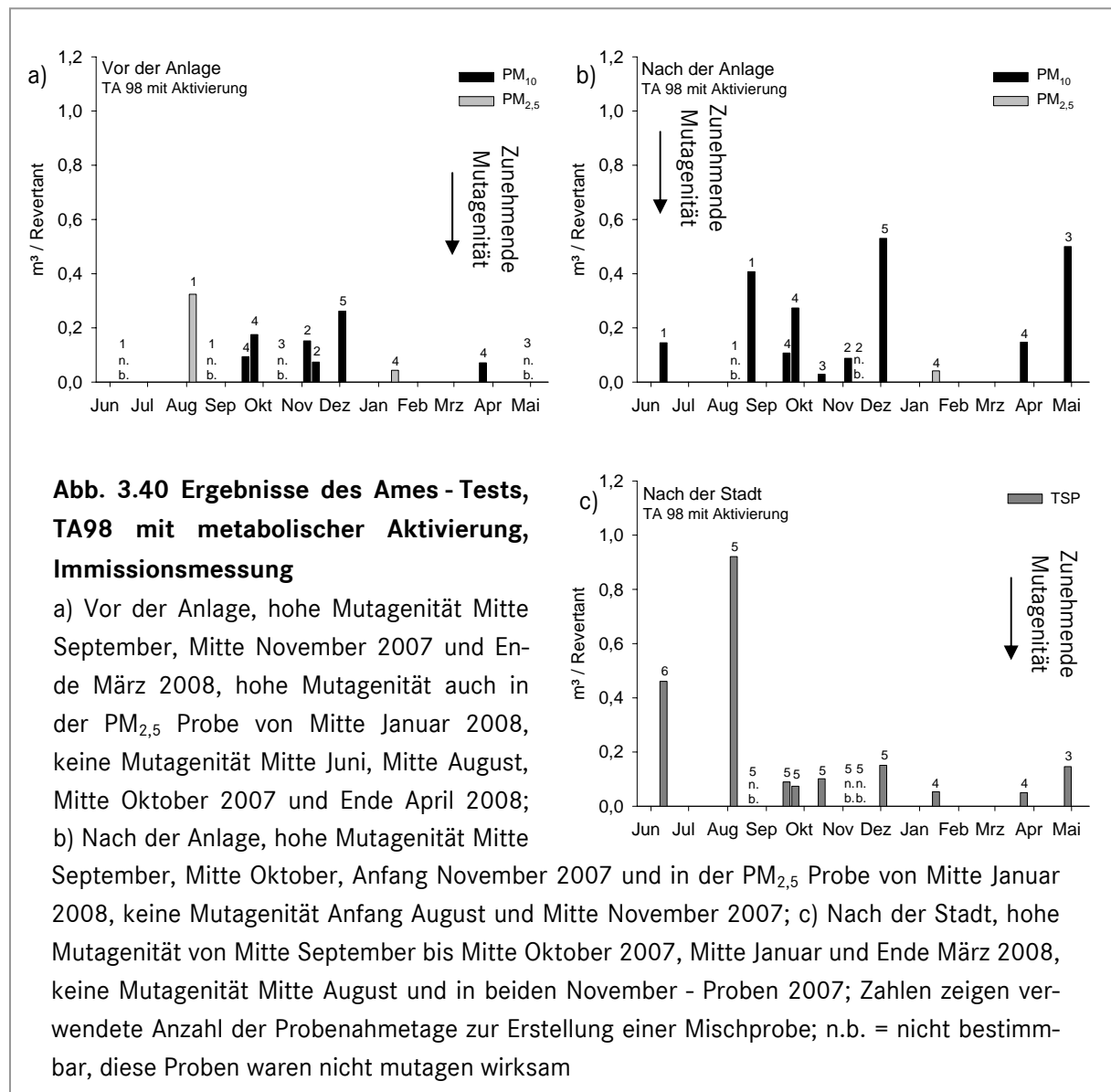
Der Stamm TA 98 kann durch eine Mutation im Leseraster kein Histidin produzieren und wird deshalb zur Ermittlung von Proben, die eine Leserastermutation auslösen verwendet.

Abb. 3.39 zeigt die Ergebnisse des Ames - Tests im Stamm TA 98 ohne metabolische Aktivierung, dargestellt im zeitlichen Verlauf der Probenahme.



Die höchste Mutagenität im Ames - Test ist bei allen drei Probenahmestellen in den Proben von Mitte September und Mitte Oktober feststellbar. Eine stark mutagene Wirkung zeigen auch die PM_{2,5} Proben, die im Januar gesammelt wurden, sowie die entsprechende TSP - Probe, die nach der Stadt gesammelt worden war. Kaum Aktivität konnte in den Proben vor und nach der Anlage von Anfang und Mitte August gefunden werden, die Proben, die nach der Stadt gesammelt worden waren, zeigten dagegen im August eine Wirkung im Ames - Test.

Abb. 3.40 zeigt die Ergebnisse aus dem Ames - Test des Stammes TA 98 im Ansatz mit metabolischer Aktivierung.



Eine stark mutagene Wirkung im Ansatz mit metabolischer Aktivierung im Stamm TA 98 konnte in allen Proben festgestellt werden, die Mitte September gesammelt wurden. Stark mutagen wirkten ebenfalls die PM_{2,5} - Proben, die Mitte Januar vor und nach der Anlage gesammelt wurden, sowie die dazugehörige TSP - Probe von nach der Stadt. Nahezu keine Mutagenität konnte dagegen in den Proben ermittelt werden, die Anfang und Mitte August gesammelt wurden. Auch die Proben von Ende April 2008 wiesen nur eine geringe mutagene Wirkung auf.

Tab. 3.51 fasst die Bewertung des Ames - Tests im Stamm TA 98 nach den oben beschriebenen Kriterien (Vergleich zur Waldluft von der Kälbelescheuer) zusammen.

Tab. 3.51 Bewertung des Ames - Tests, TA 98, Immissionsmessung

schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung

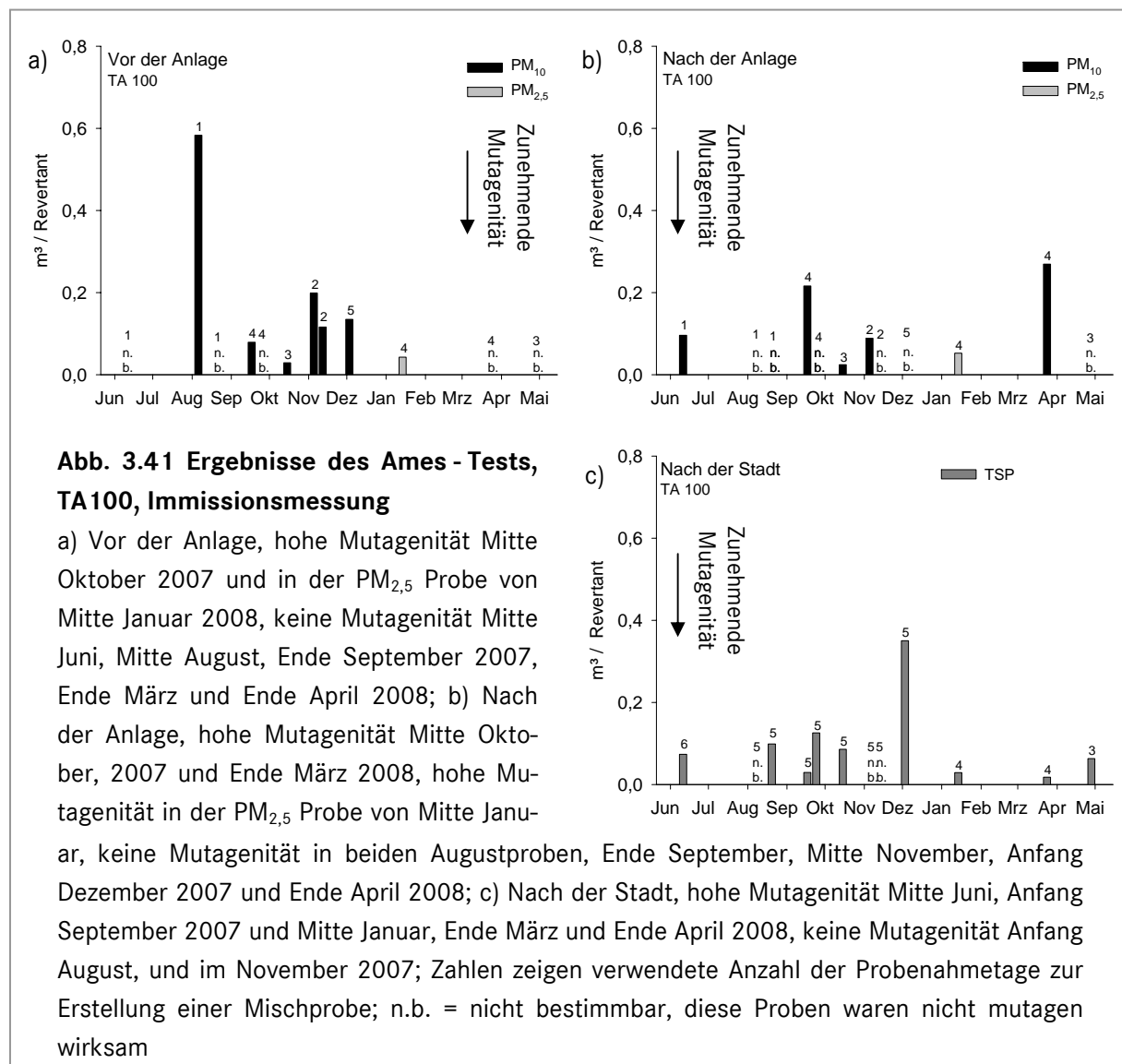
		2007					
		Mitte Juni	Anfang August	Mitte August	Mitte September	Ende September	Mitte Oktober
Vor der Anlage		++/-	-/+	-/-	+++ /+++	++/++	+++/-
Nach der Anlage		++/++	+/-	-/+	+++ /+++	+ /+	+++ /+++
Nach der Stadt		-/-	++/-	+/-	+++ /+++	+++ /+++	+++ /+++
		2007			2008		
		Anfang November	Mitte November	Anfang Dezember	Mitte Januar	Ende März	Ende April
Vor der Anlage		++/++	-/+++	+ /+	+++ /+++	+++ /+++	++/-
Nach der Anlage		++/+++	++/-	++/-	++/+++	++/++	-/-
Nach der Stadt		-/-	-/-	++/++	+++ /+++	-/+++	++/++

Die Zugabe von S9-Mix zur metabolischen Aktivierung der Proben beeinflusste das Ergebnis nur in wenigen Fällen. Eine Reduktion der mutagenen Wirkung konnte in folgenden Proben beobachtet werden: vor der Anlage: Mitte Juni, Mitte Oktober 2007 und Ende April 2008, nach der Anlage: Anfang August, Mitte November und Anfang Dezember 2007, nach der Stadt: Anfang und Mitte August 2007. Jedoch wurde die mutagene Wirkung mancher Proben durch die metabolische Aktivierung stärker. Dies konnte bei den folgenden Proben beobachtet werden: vor der Anlage: Anfang August und insbesondere Mitte November 2007, nach der Anlage: Mitte August 2007, nach der Stadt: starke Aktivierung der Probe von Ende März 2008.

Stamm TA100

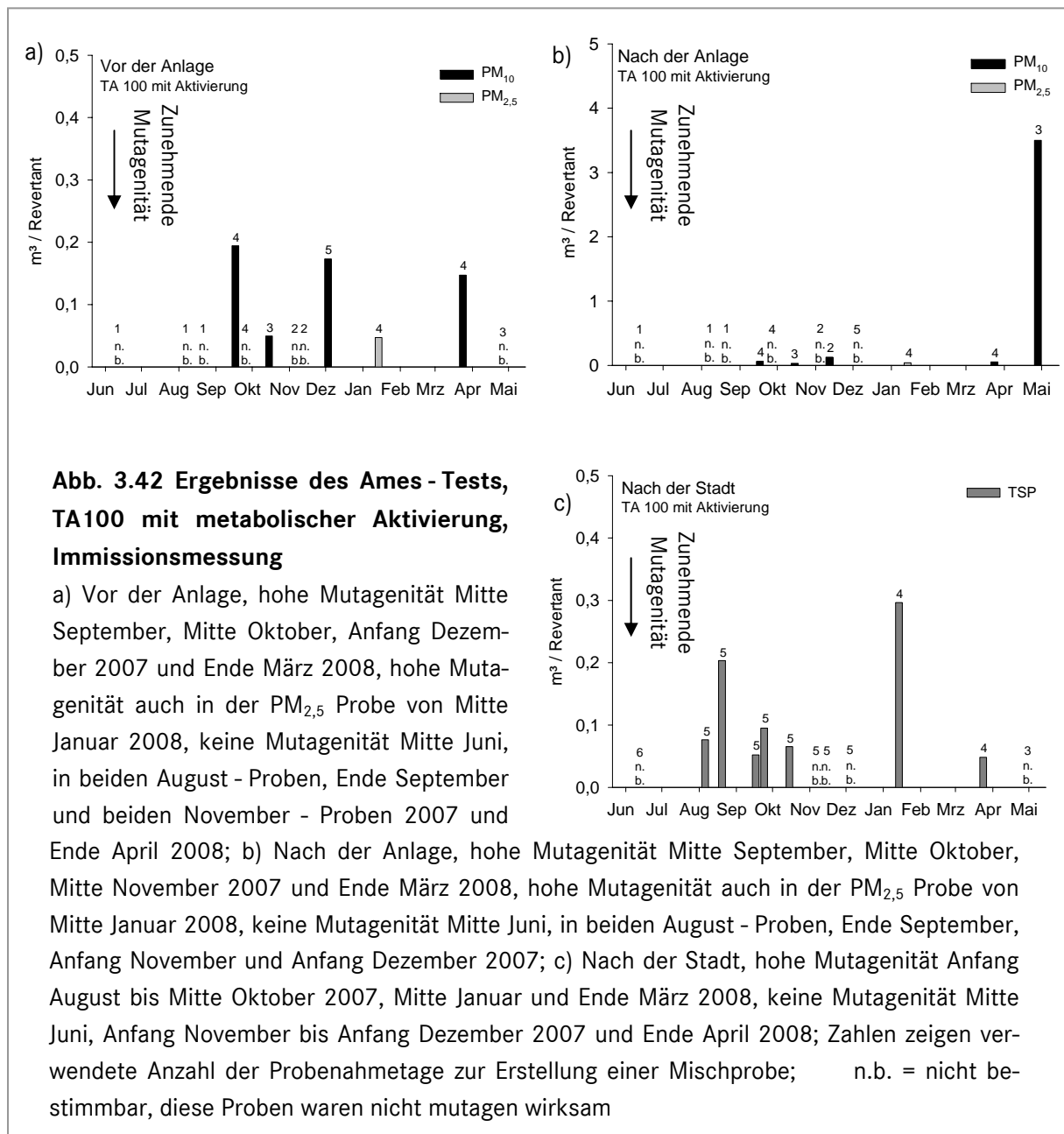
Im Gegensatz zum Stamm TA98 verursacht eine Punktmutation die Histidinauxotrophie des Stammes TA100. Dieser kann daher zur Ermittlung von Punktmutationen auslösenden Proben verwendet werden.

Abb. 3.41 zeigt die Ergebnisse aus dem Ames - Test des Stammes TA 100 im Ansatz ohne metabolische Aktivierung.



Die höchste Mutagenität in den Versuchen mit dem Stamm TA100 ohne metabolische Wirkung an allen drei Probenahmestandorten wiesen die PM_{2,5} - Proben von Mitte Januar 2008 auf. Keine mutagene Wirkung konnte jedoch in den PM_{2,5} - Proben von Anfang August nachgewiesen werden. Eine hohe Mutagenität an allen Probenahmestellen konnte außerdem in den Proben die Mitte Oktober 2007 gesammelt wurden, festgestellt werden. Die entsprechenden Proben, die nach der Stadt gesammelt worden waren, zeigten eine geringfügig geringere Mutagenität. Die Proben von Mitte Juni bis Mitte September 2007 von vor und nach der Anlage hatten eine deutlich geringere mutagene Wirkung im Ames - Test als die entsprechenden Proben von nach der Stadt. Die Proben von nach der Stadt, die im Zeitraum Anfang November bis Anfang Dezember gesammelt wurden, wiesen eine deutlich geringere Mutagenität auf als die zeitgleich gesammelten Proben von vor und nach der Anlage.

Abb. 3.42 zeigt die Ergebnisse aus dem Ames - Test des Stammes TA 100 im Ansatz mit metabolischer Aktivierung.



Im Ansatz TA100 mit metabolischer Aktivierung waren die Proben von Mitte September, Mitte Oktober 2007, Mitte Januar und Ende März 2008 besonders auffällig. Diese Proben zeigten an allen Probenahmestandorten eine starke Mutagenität im Ames - Test. Dagegen wiesen die Proben von Anfang November 2007 an keinem Probenahmestandort eine Mutagenität auf. Die Proben, die nach der Stadt gesammelt worden waren, zeigten auch mit metabolischer Aktivierung eine deutlich stärkere Mutagenität im Zeitraum von Anfang August bis Ende September 2007. Dagegen wiesen die Proben von vor und nach der Anlage, die von Mitte November bis Anfang Dezember 2007 gesammelt wurden, eine höhere Mutagenität auf als die entsprechenden Proben von nach der Stadt.

Tab. 3.52 fasst die Bewertung der Versuche mit dem Stamm TA100 nach den oben beschriebenen Kriterien zusammen.

Tab. 3.52 Bewertung des Ames - Tests, TA 100, Immissionsmessung

schwarz = ohne metabolische Aktivierung, grau = mit metabolischer Aktivierung

		2007					
		Mitte Juni	Anfang August	Mitte August	Mitte September	Ende September	Mitte Oktober
Vor der Anlage		-/-	-/-	-/-	++/+++	-/-	+++ /+++
Nach der Anlage		++/-	-/-	-/-	+ /+++	-/-	+++ /+++
Nach der Stadt		+++/-	- /+++	++ /+++	+++ /+++	++ /+++	++ /+++
		2007			2008		
		Anfang November	Mitte November	Anfang Dezember	Mitte Januar	Ende März	Ende April
Vor der Anlage		+/-	++/-	++ /+++	+++ /+++	- /+++	-/-
Nach der Anlage		++/-	- /+++	-/-	+++ /+++	++ /+++	- /+++
Nach der Stadt		-/-	-/-	-/-	+++ /+++	+++ /+++	+++ /-

Eine durch Zugabe von S9-Mix verstärkte mutagene Wirkung konnte bei folgenden Proben gezeigt werden: vor der Anlage: Mitte September, Anfang Dezember 2007 und Ende März 2008, nach der Anlage: Mitte September, Mitte November 2007, Ende März und Ende April 2008, nach der Stadt: beide August - Proben, Ende September und Mitte Oktober 2007. Auffällig ist dabei dass insbesondere die Proben von Mitte September einer Aktivierung unterliegen. Eine Verminderung der mutagenen Wirkung konnte bei den folgenden Proben beobachtet werden: vor der Anlage: beide November - Proben 2007, nach der Anlage: Mitte Juni und Anfang November 2007, nach der Stadt: Mitte Juni 2007 und Ende April 2008.

4 Diskussion

Wie eingangs erwähnt, wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen untersucht:

- ⇒ Entsteht entlang der Prozesskette der beprobten Anlagen ein ökotoxikologisches Potenzial?
- ⇒ Unterscheidet sich das ökotoxikologische Potenzial von Anlage A von dem in Anlage B durch die eingesetzte Verfahrenstechnik?
- ⇒ Beeinflusst die Emission der Anlage die Luftqualität der angrenzenden Stadt?

4.1 Bewertung des ökotoxikologischen Potenzials entlang der Prozesskette der Anlage A

Die Bewertung des ökotoxikologischen Potenzials der Proben aus Anlage A erfolgte auf der Basis der beiden in Kapitel 3.1 beschriebenen Expositionsszenarien. Die Bewertung der Außenluft ergab, dass die Partikel bereits in der Außenluft ein ökotoxikologisches Potenzial aufwiesen. Durch die Luftaufbereitung verbesserte sich die Qualität der Luftproben in den verwendeten Bioassays. In der Abluft konnte gezeigt werden, dass die gentoxische Wirkung durch die Menge an extrahiertem Material zustande kam, da zur Induktion gentoxischer Effekte das Extrakt einer sehr großen Partikelmenge notwendig war. Die Analyse der enthaltenen Elemente konnte die starke gentoxische Wirkung der Proben aus der Abluft nicht erklären. Zur Identifizierung eventuell verantwortlicher Verbindungen für die gentoxische Wirkung wurde eine chemische Fraktionierung nach Säure- und Base-Eigenschaften mit anschließender gaschromatographischer Analyse mit gekoppeltem Massenspektrometer durchgeführt.

4.1.1 Gentoxisches Potenzial der Prozessproben (Szenario 1)

Die Betrachtung der Wirkung der Prozessproben aus Anlage A in Szenario 1 („In der Anlage“) ergab, dass die gemessenen Effekte der Außenluftproben durch die Luftaufbereitung aufgehoben werden konnten. Keine Erklärung konnte in dieser Betrachtung für die starke gentoxische Wirkung der Abluftproben, sowohl vor als auch nach dem Wärmetauscher, gefunden werden, da die Analyse der chemischen Elemente keine Erklärung für die starken Effekte lieferte. Weitere Hinweise auf die gentoxisch wirksame Komponente wurden daher durch die Betrachtung des Szenarios 2 („Immissionsprognose“, Kap. 4.1.2) erwartet.

Die Bewertung der Außenluftproben und der Proben aus der gefilterten Luft zeigte ein ökotoxikologisches Potenzial in der Außenluft, das durch die Luftaufbereitung nahezu gänzlich herausgefiltert wurde und in der gefilterten Luft nicht mehr nachweisbar war. Um zu ermitteln, ob entlang der Prozesskette ein ökotoxikologisches Potenzial entsteht, wurde daher die gefilterte Luft als „saubere“ Referenz behandelt. Die Bewertung und Diskussion der Qualität der Außenluft erfolgt in einem separaten Kapitel (Kap. 4.4.5).

Bewertung der gefilterten Luft durch den Vergleich mit der Außenluft

Durch die Luftaufbereitung verbessert sich die Qualität der Luft bezogen auf die Ergebnisse der verwendeten Bioassays. Daher wird durch die Reinigung der Luft durch Filter entlang der Prozesskette eine durchgängige Verbesserung der Luftqualität erreicht.

Eine abschließende bildliche Bewertung der gefilterten Luft in den durchgeführten Bioassays im Vergleich zur Außenluft ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tab. 4.1 Abschließende Bewertung der gefilterten Luft im Vergleich zur Außenluft in Szenario 1
grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt

	Anlage AI		Anlage All	
	Außenluft	Gefilterte Luft	Außenluft	Gefilterte Luft
Cytotoxizität	grün	grün	grün	grün
Comet - Assay	grün	grün	gelb	grün
Mikrokerntest	grün	grün	rot	grün
Ames - Test	rot	grün	gelb	grün

Es konnten keine Effekte nachgewiesen werden, die durch die Exposition der Zellen mit den Proben aus der gefilterten Luft entstanden. Die Analyse der Effekte in der Außenluft erfolgt in Kapitel 4.4.5.

Die Untersuchung der Elementzusammensetzung der Proben aus der gefilterten Luft ergab eine geringe Konzentration an Zink im Anlage AI und Arsen in Anlage All. Elemente, die eine gentoxische Wirksamkeit haben, konnten nicht nachgewiesen werden.

Bewertung der Abluft vor dem Wärmetauscher durch den Vergleich mit der Außenluft und der gefilterten Luft

Die Abluft vor dem Wärmetauscher zeigt vor allem in Anlage All ein deutlich höheres gentoxisches Potenzial als die gefilterte Luft. Die Elementanalyse konnte die starke gentoxische Wirkung der Proben aus der Abluft vor dem Wärmetauscher nicht erklären (zur weiteren Ursachenfindung der hohen Gentoxizität s. Kap. 4.1.2).

Tabelle 4.2 zeigt die abschließende Bewertung der Abluft vor dem Wärmetauscher im Vergleich zur Außenluft und den Proben aus der gefilterten Luft.

Tab. 4.2 Abschließende Bewertung der Abluft vor dem Wärmetauscher im Vergleich zur Außenluft und der gefilterten Luft in Szenario 1
grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt, A v W = Abluft vor Wärmetauscher

	Anlage AI			Anlage All		
	Außenluft	Gefilterte Luft	A v W	Außenluft	Gefilterte Luft	A v W
Cytotoxizität	grün	grün	gelb	grün	grün	rot
Comet - Assay	grün	grün	rot	gelb	grün	rot
Mikrokerntest	grün	grün	rot	rot	grün	rot
Ames - Test	rot	grün	grün	gelb	grün	grün

Sowohl in Anlage AI als auch in Anlage All konnte im Vergleich zur Außenluft und der gefilterten Luft in der Abluft vor dem Wärmetauscher eine Cytotoxizität festgestellt werden. Auch im Comet - Assay und im Mikrokerntest konnten im Vergleich zur gefilterten Luft sehr starke Effekte in den Bioassays ermittelt werden. Der Ames-Test zeigte weder bei der Probe aus der Abluft vor dem Wärmetauscher von Anlage AI noch bei der äquivalenten Probe aus Anlage All ein mutagenes Potenzial.

Der Vergleich der Elementspektren (s. Kap. 3.3.8) zeigte deutliche Veränderungen zwischen der Außenluft, der gefilterten Luft und der Abluft vor dem Wärmetauscher. Elemente, die in der Außenluft und der gefilterten Luft nicht oder nur sehr gering gemessen wurden, konnten in der Abluft vor dem Wärmetauscher in höherer Konzentration ermittelt werden. Anlage AI konnte ein im Vergleich zu den anderen Proben erhöhtes Vorkommen von Selen und Zink gemessen werden. In Anlage All konnte neben einer erhöhten Selenkonzentration auch Lithium und Strontium gemessen werden.

Von Selen ist bekannt, dass Diphenyldiselenid die Wirkung verschiedener mutagener Verbindungen im Mikrokerntest aufhebt (Rosa et al. 2007). Da jedoch starke Wirkungen der Proben im Mikrokerntest festgestellt werden konnten, verhinderte das in dieser Probe vorliegende Selen die Wirkung hier scheinbar nicht. Jedoch nicht nur Selen soll die mutagene Wirkung von Substanzen im Mikrokerntest unterbinden, auch Zinkchlorid konnte die mikrokerninduzierende Wirkung von Cadmiumchlorid aufheben (Hurná and Hurná 2000). Über die gentoxische Wirkung von Barium und Lithium ist bislang nichts bekannt. Die Analyse der Elementspektren erbrachte daher keine Erkenntnis über die wirksamen Komponenten in den gentoxischen Tests. Da die Abluft vor dem Wärmetauscher eine sehr hohe Konzentration an Partikeln enthält, könnte die Menge an extrahierter organischer Materie für die gentoxischen Effekte verantwortlich sein. Diese Theorie wird in Kapitel 4.1.2 diskutiert.

Bewertung der Abluft nach dem Wärmetauscher durch den Vergleich mit den vorherigen Proben

Die Abluft nach dem Wärmetauscher zeigt im Vergleich zur gefilterten Luft eine deutliche Verschlechterung der Luftqualität bezüglich der gentoxischen Wirkung. Im Vergleich zur Außenluft verschlechtert sich die Qualität der Luft sowohl in Anlage AI als auch in Anlage All nur geringfügig. Die Untersuchung des Elementspektrums konnte die starke Wirkung in Comet - Assay und Ames-Test nicht erklären (zur weiteren Ursachenfindung der hohen Gentoxizität s. Kap. 4.1.2).

Anschließend an den Wärmetauscher wird die Luft in die Außenluft abgegeben.

Tabelle 4.3 zeigt die abschließende Bewertung der Abluft nach dem Wärmetauscher im Vergleich zur Außenluft, der gefilterten Luft und der Abluft vor dem Wärmetauscher.

Tab. 4.3 Abschließende Bewertung der Abluft nach dem Wärmetauscher im Vergleich zur Außenluft, der gefilterten Luft und der Abluft vor dem Wärmetauscher in Szenario 1
 A v W = Abluft vor Wärmetauscher, A n W = Abluft nach Wärmetauscher, grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt

	Anlage AI				Anlage All			
	Außenluft	Gefilterte Luft	A v W	A n W	Außenluft	Gefilterte Luft	A v W	A n W
Cytotoxizität	grün	grün	gelb	gelb	grün	grün	rot	rot
Comet - Assay	grün	grün	rot	gelb	gelb	grün	rot	rot
Mikrokerntest	grün	grün	rot	rot	rot	grün	rot	gelb
Ames - Test	rot	grün	grün	grün	gelb	grün	grün	grün

Im Vergleich zur gefilterten Luft wies die Abluft nach dem Wärmetauscher in Anlage AI und All dieselbe cytotoxische Wirkung wie die Proben vor dem Wärmetauscher auf. In Anlage AI wurde die gentoxische Wirkung im Comet - Assay durch den Wärmetauscher vermindert, in Anlage All konnte nach dem Wärmetauscher weniger Gentoxizität im Mikrokerntest gemessen werden, als vor dem Wärmetauscher.

Das Elementspektrum der Proben aus der Abluft von Anlage AI wies Mangan auf. Die gentoxische Wirkung im Mikrokerntest von Mangan ist bekannt (Snyder and Friedman 1998) und könnte für die hohe Gentoxizität in der Abluft nach dem Wärmetauscher, sowohl in Anlage AI als auch in Anlage All mitverantwortlich sein. Abgesehen von der Mangankonzentration konnten keine Unterschiede im Elementspektrum zwischen der Abluft vor dem Wärmetauscher und der Abluft nach dem Wärmetauscher gefunden werden, welche die unterschiedliche Wirkung der beiden Proben erklären könnte. Jedoch wurde Mangan in der Abluft in Konzentrationen von $4,2 \text{ ng/m}^3$ gemessen. Eine normale Konzentration in städtischer Luft liegt bei $20 - 100 \text{ ng/m}^3$ (Umweltbundesamt 1999), so dass die gemessene Konzentration im Abluftkanal weit unter der normalen städtischen Luft liegt. Effekte durch eine Exposition gegenüber Mangan wurden erst in Konzentrationen von $50 \text{ } \mu\text{g}$ festgestellt (Snyder and Friedman 1998), so dass eine Menge von 10.000 m^3 Luftäquivalenten in die Tests eingesetzt werden müsste, um Effekte zu erzielen (tatsächliche Höchstkonzentration in den Assays 10 m^3 Luftäquivalente). Die gemessenen Mangankonzentrationen sind daher viel zu gering, um die ermittelten Effekte zu erklären. Auch nach dem Wärmetauscher konnten sehr hohe Partikelkonzentrationen gemessen werden, so dass die ermittelten gentoxischen Effekte durch die Menge an extrahiertem, organischem Material induziert worden sein könnten. Diese Theorie wird in Kapitel 4.1.2 diskutiert.

Bewertung der Abluft nach der Verbrennung durch den Vergleich mit der gefilterten Luft

Im Vergleich zur gefilterten Luft wies die Abluft nach der Verbrennung ein deutliches ökotoxikologisches Potenzial auf. Die Elementzusammensetzung lieferte auch hier keine Erklärung für die Ursache der gentoxischen Wirkung. Die Entstehung und Wirksamkeit von PAKs (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) ist als Ursache für die gentoxische Wirkung jedoch sehr wahrscheinlich.

Tabelle 4.4 fasst die Ergebnisse der Probe aus dem Kanal im Anschluss an die Verbrennung zusammen.

Tab. 4.4 Abschließende Bewertung der Abluft nach der Verbrennung im Vergleich zur gefilterten Luft in Szenario 1
grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt

	Anlage AI Gefilterte Luft	Anlage All Gefilterte Luft	Verbrennung
Cytotoxizität	grün	grün	gelb
Comet - Assay	grün	grün	grün
Mikrokerntest	grün	grün	rot
Ames - Test	grün	grün	gelb

Die Proben aus der Abluft nach der Verbrennung wiesen im Vergleich zu den Proben aus der gefilterten Luft eine cytotoxische Wirkung sowie eine starke Wirkung in Mikrokerntest und mutagenes Potenzial im Ames-Test auf.

Die Untersuchung der Elemente aus den Proben nach der Verbrennung wies eine hohe Konzentration an Bor in allen drei Proben auf. Bor konnte in keiner anderen Probe nachgewiesen werden. Eine genotoxische Wirkung von Bor im Mikrokerntest konnte bislang nur in Verbindung mit γ -Strahlung nachgewiesen werden (Oliveira et al. 2001). Als metallisches Borid findet Bor wegen seiner Widerstandsfähigkeit und Beständigkeit vielfach in der Montanindustrie Anwendung. Sie werden in Schmelztiegeln, Verdampfungsgefäßen und als Auskleidung von Verbrennungsöfen verwendet. Das Bor könnte daher aus der Innenverkleidung der Verbrennungsanlage stammen.

Durch die Verbrennung werden polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffen (PAKs) gebildet. Messungen in der Abluft nach der Verbrennung durch die Firma DEKRA Umwelt GmbH zeigten einen Gehalt von $1 \mu\text{g PAKs}/\text{m}^3$. Die genotoxische Wirkung von PAKs wurde bereits in vielen Studien belegt (Borm et al. 2005; Botta et al. 2008; Jedrychowski et al. 2007; Perera et al. 2008). Bei einer Konzentration von $1 \mu\text{g PAKs}/\text{m}^3$ wurden bei vollständiger Extraktion bis zu $0,7 \mu\text{g PAKs}$ pro ml Medium in den Mikrokerntest eingesetzt. Benzo[a]pyren löst ab einer Konzentration von $1,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ eine erhöhte Konzentration von Mikrokernen aus (Matsuoka et al. 1999). Die durch die Verbrennung entstandenen PAKs sind daher sehr wahrscheinlich die Ursache für die starken Effekte im Mikrokerntest durch die Abluft nach der Verbrennung.

Wirkung der Prozesskontrollen

Um sicherzustellen, dass die untersuchten Effekte durch die Proben ausgelöst wurden und nicht durch das Filtermaterial oder die chemische Aufbereitung der Proben, wurden während der Beprobung drei Kontrollen entnommen und parallel zu den Bioassays untersucht. Eine Wirkung der Prozesskontrollen konnte nur im Mikrokerntest bei der Betrachtung beider Endpunkte (Mikrokerne und Anomalien) festgestellt werden. Die Analyse der Elementzusammensetzung der Prozesskontrolle zeigte Kupfer in einer durchschnittlichen Konzentration von 255 µg pro Liter Lösungsvermittler in den Kontrollen. Kupfer induziert die Bildung von Mikrokerne (Snyder and Friedman 1998), so dass die Wirkung in den Prozesskontrollen wahrscheinlich auf den Kupfergehalt zurückzuführen ist. Da Kupfer auch in allen Proben gemessen werden konnte, und um auszuschließen, dass Proben aufgrund des Kupfers als „falsch-positiv“ gewertet wurden, erfolgte im Mikrokerntest ein genauer Vergleich der Dosis-Wirkungsbeziehungen in den Proben und den Prozesskontrollen (s. Kap. 3.2.5).

4.1.2 Einfluss der Partikelkonzentration auf die Wirkung der Prozessproben (Szenario 2)

Die Bewertung der Proben in Szenario 2 zeigt deutlich, dass in Außenluft und gefilterter Luft die chemische Beschaffenheit der Partikel für die gentoxische Wirkung verantwortlich ist, da das Extrakt einer sehr geringen Partikelmenge ausreichend war, eine gentoxische Wirkung zu induzieren. Die Proben aus der Abluft hingegen zeigen deutlich, dass für die gentoxische Wirkung das Extrakt einer sehr großen Partikelmenge notwendig ist, so dass die gentoxische Wirkung durch die Quantität an extrahiertem Material zustande kommt. Zur weiteren Untermauerung dieser These wurden chemische Fraktionierungen ausgewählter Proben mit anschließender gaschromatographischer Analyse mit gekoppeltem Massenspektrometer (GC-MS, Kap. 4.1.3) durchgeführt.

Unterschiede der Prozessproben finden sich nicht nur in der chemischen Zusammensetzung, wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, sondern auch in der Partikelkonzentration in der Luft der verschiedenen Probenahmestellen. Die durchschnittliche Partikelkonzentration in der Außenluft und der gefilterten Luft lag bei 24 µg/m³, in der Abluft vor und nach dem Wärmetauscher bei durchschnittlich 582 µg/m³. Um festzustellen, ob die hohe Gentoxizität der Abluft durch die Qualität oder die Quantität der Partikel ausgelöst wurde, wurde die Bewertung aller Ergebnisse auch auf die jeweilige Partikelkonzentration bezogen und anhand einer durchschnittlichen Umgebungskonzentration bewertet (s. Kap. 3.1.1, Szenario 2 „*Immissionsprognose*“). Die durch diese Bewertung erhaltenen Ergebnisse wurden den Ergebnissen aus der Bewertung in Szenario 1 (Kap. 4.1.1) gegenübergestellt.

Die Betrachtung der Ergebnisse in Szenario 2 ergab, dass in der Außenluft und der gefilterten Luft die chemische Zusammensetzung der Partikel für die Wirksamkeit verantwortlich war, da

bereits geringe Partikelkonzentrationen Effekte induzierten. In den Abluftproben waren sehr große Partikelmengen zur Induktion der Effekte nötig, so dass die Effekte in der Abluft durch die Quantität der Partikel ausgelöst wurden, nicht durch deren Qualität.

Bewertung der Außenluft und der gefilterten Luft in Szenario 2 („Immissionsprognose“)

Eine bildliche Darstellung der Ergebnisse der Bewertung der Proben aus der Außenluft und der gefilterten Luft in beiden Bezugsszenarien aus Kap. 3.1.1 ist in Tabelle 4.5 dargestellt.

Tab. 4.5 Bewertung der Außenluft und der gefilterten Luft in Szenario 1 und 2
 grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt, 1 = Szenario 1 (In der Anlage), 2 = Szenario 2 (Immissionsprognose)

Szenario	Anlage AI				Anlage All				
	Außenluft		Gefilterte Luft		Außenluft		Gefilterte Luft		
	1	2	1	2	1	2	1	2	
Cytotoxizität	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün
Comet - Assay	grün	gelb	grün	gelb	gelb	rot	grün	gelb	gelb
Mikrokerntest	grün	rot	grün	rot	rot	rot	grün	rot	rot
Ames - Test	rot	rot	grün	gelb	gelb	gelb	grün	grün	grün

Weder die Proben aus der Außenluft noch aus der gefilterten Luft aus Anlage AI und All zeigten eine messbare Cytotoxizität in einem der beiden Szenarien. Die Bewertung der Proben in Szenario 2 ergab, dass alle Proben aus der Außenluft und der gefilterten Luft basierend auf der Wirkung der Partikel im Comet - Assay und Mikrokerntest gentoxisch wirksam waren. Da bereits wenige Partikel dieser Proben ausreichen, um eine gentoxische Wirkung zu induzieren, ist die Wirkung der Proben vor der Spritzkabine nicht von der Quantität der Partikel abhängig, sondern von der Qualität, also der chemischen Eigenschaften und Zusammensetzung der Partikel. Auf die Qualität der Partikel aus der Außenluft wird in Kapitel 4.4.5 eingegangen. Die Zusammensetzung der Elemente in den Proben der gefilterten Luft ergab keinen Hinweis auf die Ursache der starken Wirksamkeit. Da die Effekte aus der Außenluft in die gefilterte Luft eingetragen wurden, sind gentoxische Verbindungen wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, die durch den Verkehr im Werk erzeugt werden wahrscheinlich und eventuell auch für die starken Effekte im Ames-Test verantwortlich. Da diese stark gentoxischen Verbindungen nur in einer sehr geringen Konzentration vorkommen ($15 \mu\text{g}/\text{m}^3$) und daher in der Masse der Abluftpartikel nur einen Bruchteil darstellen und außerdem bei laufender Anlage

Die cytotoxische Wirkung der Abluftproben, sowohl in Anlage AI als auch in All, konnte durch die Betrachtung in Szenario 2 aufgehoben werden: In allen Bioassays zeigten alle Proben bei der Betrachtung der Effekte bezogen auf die Partikelkonzentration eine geringere toxische Wirkung als durch die Betrachtung in Szenario 1. Anders als bei den Proben aus der Außenluft und der gefilterten Luft kann daher davon ausgegangen werden, dass für die Gentoxizität der Abluftproben, sowohl vor als auch nach dem Wärmetauscher, die Quantität der Partikel entscheidend ist und nicht die Qualität. Diese Beobachtung erklärt die mangelhafte Aussagefähigkeit der Elementspektren zur Identifikation gentoxisch wirksamer Elemente in den Abluftproben. Zur Untermauerung dieser Aussage wurden chemische Fraktionierungen einiger Proben aus Außen- und Abluft durchgeführt und eine gaschromatographische Auftrennung mit gekoppeltem Massenspektrometer durchgeführt (vgl. Kap. 4.1.3), um gentoxische Verbindungen in der Abluft zu identifizieren.

Bewertung der Abluft nach der Verbrennung in Szenario 2 („Immissionsprognose“)

Tabelle 4.7 zeigt die Bewertung der Abluft nach der Verbrennung im Vergleich zu den Ergebnissen der Außenluftproben bezogen auf beide Expositionsszenarien.

Tab. 4.7 Abschließende Bewertung der Abluft nach der Verbrennung im Vergleich zur Außenluft in Szenario 1 und 2
 1 = Szenario 1 (In der Anlage), 2 = Szenario 2 (Immissionsprognose)

Szenario	Anlage AI		Anlage All		Verbrennung	
	Gefilterte Luft		Gefilterte Luft		Verbrennung	
	1	2	1	2	1	2
Cytotoxizität	Grün	Grün	Grün	Grün	Gelb	Grün
Comet - Assay	Grün	Gelb	Grün	Gelb	Grün	Grün
Mikrokerntest	Grün	Rot	Grün	Rot	Rot	Rot
Ames - Test	Grün	Gelb	Grün	Grün	Gelb	Grün

Die Abluft nach der Verbrennung zeigt eine Verbesserung der Luftqualität durch die Bewertung der Ergebnisse in Szenario 2. Eine Aktivität der Partikel konnte nur im Mikrokerntest nachgewiesen werden. Wie bereits in Kapitel 4.1.1 beschrieben, entstehen polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe durch die Verbrennung, so dass die gentoxische Wirkung dieser Abluftprobe sowohl auf die Partikelkonzentration als auch die Art der Partikel zurückzuführen ist.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Bio - Assays nach Bewertung in Szenario 2

Die Bewertung der Proben in Szenario 2 zeigt deutlich, dass in den Proben der Außenluft und der gefilterten Luft die chemische Beschaffenheit der Partikel für die gentoxische Wirkung verantwortlich ist, da das Extrakt einer sehr geringen Partikelmenge ausreichend war, eine gentoxische Wirkung zu induzieren. Die Proben aus der Abluft hingegen zeigen deutlich, dass für die gentoxische Wirkung das Extrakt einer sehr großen Partikelmenge notwendig ist, so dass die gentoxische Wirkung durch die Quantität an extrahiertem Material zustande kommt. Zur weiteren Untermauerung dieser These wurden chemische Fraktionierungen ausgewählter Proben mit anschließender gaschromatographischer Analyse mit gekoppeltem Massenspektrometer (GC-MS, Kap. 4.1.3) durchgeführt.

4.1.3 Identifizierung wirksamer Verbindungen durch chemische Fraktionierung ausgewählter Proben und Analyse der Fraktionen mittels GC-MS

Die gaschromatographische Analyse mit gekoppeltem Massenspektrum lieferte keine Aussage über Verbindungen als gentoxische Wirkkomponente in den durchgeführten Mikrokerntests. Hinweise zur gentoxischen Wirkkomponente lieferten die Verbindungen 2-Butoxyethanol und Imidazol. Zur weiteren Bestimmung sind jedoch quantitative Messungen notwendig. Die Ergebnisse untermauern die Theorie, dass die Quantität an Partikeln für die Wirksamkeit der Proben aus der Abluft von Anlage AI und Anlage All verantwortlich ist und nicht einzelne Verbindungen.

Um eine eventuelle Identifizierung der wirksamen Verbindungen in den Prozessproben zu ermöglichen, wurde zunächst, wie in Kap. 2.10.1 beschrieben, eine Auftrennung einiger Proben nach sauren und basischen Eigenschaften durchgeführt. Die gewonnenen Fraktionen wurden in die Bioassays Cytotoxizitätstest und Mikrokerntest eingesetzt, da sich der Mikrokerntest als sensitivster Test herausgestellt hatte. Anschließend wurden die Proben mittels gaschromatographischer Analyse mit gekoppeltem Massenspektrometer (GC-MS) analysiert.

Zur Bewertung der Wirksamkeit der Fraktionen wurde der Mikrokerntest herangezogen. Im Mikrokerntest ergab die chemische Fraktionierung die in Tabelle 4.8 dargestellten Ergebnisse.

Tab. 4.8 Bewertung der Ergebnisse aus dem Mikrokerntest nach Exposition mit den Fraktionen, Anlage A
grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt

	Anlage AI	Anlage All
	Abluft	Abluft
Unfraktioniert	rot	gelb
Starke Säuren	grün	gelb
Schwache Säuren	gelb	gelb
Neutrale Verbindungen	gelb	grün
Basen	grün	grün

Die Abluft der Anlage AI zeigte unfraktioniert ein hohes Potenzial, die Bildung von Mikrokernten und Zellkernanomalien zu induzieren. Dieses Potenzial konnte durch die chemische Fraktionierung den schwachen Säuren und neutralen Verbindungen zugewiesen werden. Die Probe aus der Abluft der Anlage All zeigte sowohl unfraktioniert wie auch in den Fraktionen der starken und schwachen Säuren Effekte im Mikrokerntest. Die basische Fraktion aller Proben wies im Mikrokerntest keine messbaren Effekte auf.

Zur möglichen Identifizierung für die Gentoxizität verantwortlicher Verbindungen wurde eine gaschromatographische Analyse mit gekoppeltem Massenspektrometer durchgeführt. In den nächsten Unterkapiteln werden die identifizierten Verbindungen der Abluft in den im Mikrokerntest wirksamen Fraktionen diskutiert. Die Diskussion der identifizierten Verbindungen aus den Außenluftproben erfolgt in Kapitel 4.4.5.

Fraktion schwache Säuren aus der Probe „Abluft Anlage AI“

Die Analyse der Fraktion „schwache Säuren“ aus der Abluft der Anlage AI ergab folgende Verbindungen: 4-Methoxy-4-methyl-2-pentan-2-on, Octamethylcyclotetrasiloxan und 4,4-Dimethyl-2-imidazol

Von 4-Methoxy-4-methyl-2-pentan-2-on ist keine gentoxische Wirksamkeit bekannt. Um die Exposition an Siloxanen und deren Wirksamkeit zu untersuchen, wurden diese Verbindungen

in die „Priority Testing List“ der US Environmental Protection Agency (EPA) aufgenommen. Studien zu den dort aufgeführten Substanzen wurden von diversen Laboren durchgeführt und in einem Report zusammengestellt (EPA 1992). Das in der Fraktion der schwachen Säuren in der Abluft der Anlage AI gemessene Octamethylcyclotetrasiloxan konnte in der Außenluft verschiedener Standorte nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der mutagenen Wirksamkeit wurden Studien diverser gentoxischer Tests herangezogen. Octamethylcyclotetrasiloxan zeigte mutagene Effekte in einem Test zur Gentoxizität (*chromosomal aberration test in mouse lymphoma*) nach metabolischer Aktivierung durch S9. Ohne metabolische Aktivierung konnte keine Gentoxizität dieser Verbindung festgestellt werden. Die Fraktion der schwachen Säuren aus der Abluft der Anlage AI zeigte jedoch nur im Ansatz ohne metabolische Aktivierung ein gentoxisches Potenzial, so dass Octamethylcyclotetrasiloxan wahrscheinlich nicht die wirksame Komponente darstellt.

Über die gentoxische Wirkung von 4,4-Dimethyl-2-imidazol ist nichts bekannt, jedoch sind Imidazole und deren Derivate als mutagen wirksam im Ames - Test beschrieben worden (Aydoğan and Kutlu 2007).

Eine gentoxische Substanz, die den Effekt im Mikrokerntest ausgelöst haben könnte, konnte durch die gaschromatographische Analyse mit gekoppeltem Massenspektrometer nicht identifiziert werden. Ein Hinweis auf eine im Ames - Test mutagene Verbindung konnte jedoch in Form eines Aushärtungsmittels ermittelt werden, das eventuell auch für die Effekte im Mikrokerntest verantwortlich ist.

Fraktion neutrale Verbindungen aus der Probe „Abluft Anlage AI“

In der Fraktion der neutralen Verbindungen konnten folgende Substanzen durch die massenspektrometrische Analyse identifiziert werden: Methylisobutylketon, 1,3-Dimethylbenzol, 2-Butoxyethanol und 2-Ethylhexanol.

Methylisobutylketon entsteht aus Aceton und Wasser in Gegenwart eines Katalysators. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das Methylisobutylketon durch die acetonische Extraktion und die anschließende Fraktionierung entstanden ist und nicht durch die Probenahme in die Probe gelangte. Zur Gentoxizität dieser Verbindung ist nichts bekannt.

m-Xylol oder 1,3-Dimethylbenzen sind bekannte Lösemittel. Xylole wurden von der Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg als nicht gentoxisch wirksam eingestuft (LUBW 1994). Weitere Lösemittel sind 2-Butoxyethanol und 2-Ethylhexanol. Die gentoxische Wirkung von 2-Butoxyethanol wurde in einem Review zusammengetragen (Elliott and Ashby 1997). Studien konnten belegen, dass 2-Butoxyethanol im Mikrokerntest mit der Zelllinie V79 leichte Effekte hervorrief, es wurde jedoch als insgesamt nicht gentoxisch wirksam bewertet. 2-Ethylhexanol ist nicht gentoxisch wirksam, koppelt jedoch die oxidative Phosphorylierung (Keller et al. 1991) und könnte daher Zellkernanomalien auslösen.

Durch die massenspektrometrische Analyse konnte also keine Verbindung identifiziert werden, die für die gentoxische Wirkung der Fraktion „neutrale Verbindungen“ der Abluft aus Anlage AI eindeutig verantwortlich ist. Einen Hinweis konnte jedoch die schwache Wirksamkeit von 2-Butoxyethanol im Mikrokerntest mit der in dieser Studie verwendeten Zelllinie geben.

Fraktion starke Säuren aus der Probe „Abluft Anlage AI“

In der Fraktion der starken Säuren aus der Abluft der Anlage AI konnte 3,4-Dimethyl-2-penten gemessen werden. 3,4-Dimethyl-2-penten konnte weder einer bestimmten Verwendung zugewiesen werden, noch als gentoxisch wirksam bewertet werden. Weitere Verbindungen konnten nicht identifiziert werden.

Fraktion schwache Säuren aus der Probe „Abluft Anlage AI“

3,4-Dimethyl-2-penten war auch in der Fraktion der schwachen Säuren aus der Abluft der Anlage AI zu finden. Neben dieser Verbindung konnte außerdem 1,2-Bis(methylthio)-ethan identifiziert werden. Auch über 1,2-Bis(methylthio)-ethan konnte weder eine Verwendung noch ein toxikologisches Profil in Erfahrung gebracht werden.

4.1.4 Zusammenfassung der Bewertung der Luftqualität in der Prozesskette in Anlage A

Die Gesamtstaubproben aus der Außenluft sind in den durchgeführten Assays als gentoxisch wirksam zu betrachten. Die Bewertung der Wirksamkeit der Proben auf Basis der extrahierten Partikelmenge zeigt, dass eindeutig die chemische Beschaffenheit der Partikel für die gentoxische Wirkung verantwortlich ist, da das Extrakt einer sehr geringen Partikelmenge ausreichend war, eine gentoxische Wirkung zu induzieren (s. Kapitel 4.4.5). Durch die Luftaufbereitung verbessert sich die Qualität der Luftproben in den verwendeten Bioassays. Durch die Reinigung der Luft entlang der Prozesskette wird eine durchgängige Verbesserung der Luftqualität erreicht. Die wenigen Partikel in der gefilterten Luft haben jedoch ein eindeutig gentoxisches Potenzial. Da sich dort bei laufender Anlage kein Arbeiter befindet, spielt dieses Potenzial keine Rolle.

Nach Beladung der Luft durch Partikel steigt die gentoxische Wirkung der Luftproben bezogen auf das Luftvolumen stark an. Die Abluft vor und nach dem Wärmetauscher zeigt ein deutlich höheres gentoxisches Potenzial als die gefilterte Luft. Die Elementanalyse konnte jedoch die starke gentoxische Wirkung der Proben aus der Abluft nicht erklären. Durch die Betrachtung der Ergebnisse bezogen auf die extrahierte Partikelmenge zeigten die Proben aus der Abluft jedoch deutlich, dass die gentoxische Wirkung durch die Quantität an extrahiertem Material zustande kommt, da das Extrakt einer sehr großen Partikelmenge zur Induktion gentoxischer Effekte notwendig war. In der Abluft nach der Verbrennung konnten ebenfalls gentoxische Effekte festgestellt werden. Da die Elementzusammensetzung auch hier keinen Aufschluss über die Ursache der Wirkung ergab, ist die Wirksamkeit der durch die Verbrennung entste-

henden polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in den Bioassays sehr wahrscheinlich.

Die Fraktionierung einiger Proben nach ihren Säure- und Base-Eigenschaften mit anschließender gaschromatographischer Analyse mit gekoppeltem Massenspektrometer ergab Hinweise auf gentoxische Verbindungen in der Abluft der Anlage AI (2-Butoxyethanol und 4,4-Dimethyl-2-imidazol).

4.2 Äquivalente Messungen in Anlage B im Vergleich zu Anlage A

Neben der Ermittlung des ökotoxikologischen Potenzials der Luft entlang der Prozesskette von Anlage A war es ein Ziel der vorliegenden Arbeit zu ermitteln, ob durch die unterschiedlichen Verfahren in den Anlage A und Anlage B auch Unterschiede im ökotoxikologischen Potenzial entstehen. Beide Anlagen unterscheiden sich hauptsächlich in den Einsatzstoffen, nicht jedoch in der Verfahrenstechnik.

Deutliche Unterschiede in den Bioassays zwischen Anlage A und Anlage B konnten insbesondere im Abschnitt II festgestellt werden. Hier wiesen die Proben aus Anlage B ein deutlich geringeres ökotoxikologisches Potenzial auf als die Proben aus Anlage A. In Anlagenabschnitt I war das ökotoxikologische Potenzial nahezu identisch. In Anlage B konnte, wie auch in Anlage A, gezeigt werden, dass die Quantität, nicht die Qualität der Partikel für die toxische Wirkung verantwortlich war.

4.2.1 Gentoxisches Potenzial der Prozessproben aus Anlage B im Vergleich zu Anlage A (Szenario 1)

Die gentoxische Wirkung der Außenluft vor und nach dem Wärmetauscher unterschied sich nicht von der Wirkung der Proben aus Anlage A. Durch die Luftaufbereitung konnte sowohl in Anlage B als auch in Anlage A eine deutliche Verbesserung der Luftqualität erreicht werden. Die Proben aus der Abluft vor dem Wärmetauscher in Anlage B waren deutlich weniger aktiv in den verwendeten Bioassays, als die Proben aus Anlage A. Die Proben aus der Abluft nach dem Wärmetauscher waren in Anlage B II deutlich weniger aktiv als in Anlage A II. Die Proben aus der Abluft nach dem Wärmetauscher in Anlagenabschnitt I wiesen ein ähnlich starkes gentoxisches Potenzial, wie die Proben aus Anlage A auf.

Aufgrund der räumlichen Gegebenheiten vor Ort, war in Anlage B die Beprobung nicht immer an den exakt gleichen Probenahmestellen zu Anlage A möglich. Beispielsweise konnte die Außenluft nicht vor der Ansaugung in das Gebäude beprobt werden, da die Ansaugung in Anlage B über das Dach erfolgt. Die Beprobung der Außenluft wurde in dem Raum vor dem Wärmetauscher durchgeführt, da die Luft auf dem Weg in das Gebäude nicht verändert wird und die Probenahmestelle daher der in Anlage A entspricht. Zur Bewertung des Einflusses der

Wärmetauscher auf die Luftqualität wurde in Anlage B zusätzlich die Luft in der Außenluft nach dem Wärmetauscher untersucht.

Bewertung der Außenluft vor und nach dem Wärmetauscher durch den Vergleich mit Anlage A

Die gentoxische Wirkung der Außenluft vor und nach dem Wärmetauscher unterschied sich nicht von der Wirkung der Proben aus Anlage A. Durch die Analyse der Elementspektren konnten die für die gentoxische Wirkung verantwortlichen Elemente in den Proben, die nach dem Wärmetauscher in Anlage B gesammelt worden waren, nicht identifiziert werden. Eine Ursache könnte die Wirkung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen sein, die durch den nahen Straßenverlauf durch den Verkehr oder durch die Nähe der Stadt und deren Hausfeuerungsanlagen eingetragen werden. Weitere Analysen zur Ursachenfindung der schlechten Außenluftwerte werden in Kap. 4.4.5 diskutiert.

In Tabelle 4.9 ist die abschließende Bewertung nach Szenario 1 („In der Anlage“) der Außenluft in Anlage B vor und nach dem Wärmetauscher zusammengefasst. Eine Diskussion der möglichen Verursacher der Effekte in der Außenluft aus Anlage B erfolgt in einem separaten Kapitel (Kap. 4.4.5).

Tab. 4.9 Abschließende Bewertung der Außenluft in Anlage B (Szenario 1)

grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt, Z v W = Außenluft vor Wärmetauscher, Z n W = Außenluft nach Wärmetauscher

	Anlage BI		Anlage BII	
	Z v W	Z n W	Z v W	Z n W
Cytotoxizität	grün	grün	grün	grün
Comet - Assay	grün	gelb	gelb	grün
Mikrokerntest	gelb	rot	gelb	grün
Ames - Test	rot	gelb	rot	gelb

Keine der Außenluftproben zeigte eine nachweisbare cytotoxische Wirkung. Die Wirkung der Proben im Comet - Assay lässt auf eine Verschlechterung der Luftqualität durch das Wärmetauscher in der Außenluft der Anlage BI schließen, in Anlage BII verbesserte sich die gentoxische Wirkung der Luftproben im Comet - Assay durch den Wärmetauscher. Auch konnten in Anlage BI nach dem Wärmetauscher stärkere gentoxische Effekte im Mikrokerntest nachge-

wiesen werden als vor dem Wärmetauscher. In Anlage BII wiederum konnte, wie im Comet - Assay, im Mikrokerntest durch den Wärmetauscher eine Verbesserung der gentoxischen Wirkung der Luftstaubextrakte gemessen werden. Ein mutagenes Potenzial im Ames-Test konnte in beiden Außenluftproben vor dem Wärmetauscher nachgewiesen werden, es verminderte sich durch das Passieren der Luft durch den Wärmetauscher.

Die Elementanalyse der Proben aus Anlage B vor und nach dem Wärmetauscher zeigte, dass Elemente, die sowohl vor als auch nach dem Wärmetauscher gemessen wurden, nach dem Wärmetauscher in deutlich geringeren Konzentrationen vorlagen (s. Tab. 3.24 und 3.25). Einige Elemente wie Barium und Lithium in Anlage BI und Molybdän in Anlage BII konnten in Anlage B jedoch nur nach dem Wärmetauscher gefunden werden. Eine Erklärung hierfür könnte der Mitritt von Partikeln durch das Wärmetauscher aus der Abluft vor dem Wärmetauscher in die Außenluft nach dem Wärmetauscher sein. Eine genaue Diskussion dieser Theorie erfolgt in Kapitel 4.2.2.

Lithium und Barium konnten nur in der Außenluft nach dem Wärmetauscher in Anlage BI gemessen werden. Barium lag in derselben Konzentration vor wie in der Außenluft von Anlage AI. Da die Außenluft der Anlage BI keinen starken Effekt im Mikrokerntest zeigte, ist Barium wahrscheinlich nicht für die gentoxische Wirkung der Probe „Außenluft nach Wärmetauscher“ in Anlage BI verantwortlich. Über die gentoxische Wirkung von Lithiumpartikeln ist nichts bekannt. Alle weiteren Elemente in der Außenluft von Anlage BI konnten nur in deutlich geringerer Konzentration als vor dem Wärmetauscher nachgewiesen werden, die weniger ökotoxikologisches Potenzial aufwies. Durch das Elementspektrum konnte also kein weiteres Element identifiziert werden, das für die starke gentoxische Wirkung im Comet - Assay verantwortlich sein könnte. Neben den Elementen könnten organische Verbindungen, die an die Partikel gebunden sind für die gentoxische Wirkung verantwortlich sein. Insbesondere polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs), die durch Verbrennungsprozesse in Motoren entstehen, könnten durch die Straße, die an der Anlage vorbeiführt in die Außenluftansaugung gelangen. Denkbar ist auch eine Wirkung von PAKs, die aus Hausfeuerungsanlagen stammen (s. Kap. 4.4)

Bewertung der Luftqualität der gefilterten Luft durch den Vergleich von Anlage A und B

Durch die Luftaufbereitung konnte sowohl in Anlage B als auch in Anlage A eine deutliche Verbesserung der Luftqualität erreicht werden.

Die abschließende Bewertung der gefilterten Luft aus Anlage B nach der Bewertung in Szenario 1 („In der Anlage“) ist in Tabelle 4.10 zusammengefasst.

Tab. 4.10 Abschließende Bewertung der Luft in den Spritzkabinen in Anlage B im Vergleich zur Außenluft (Szenario 1)
 grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt, Z v W = Außenluft vor Wärmetauscher, Z n W = Außenluft nach Wärmetauscher

	Anlage BI		Anlage BII		gefiltert
	Z v W	Z n W	Z v W	Z n W	
Cytotoxizität	grün	grün	grün	grün	grün
Comet - Assay	grün	gelb	gelb	grün	gelb
Mikrokerntest	gelb	rot	gelb	grün	grün
Ames - Test	rot	gelb	rot	gelb	grün

Durch die Luftaufbereitung in Anlage B konnte eine deutliche Verbesserung der Luftqualität erreicht werden. Ein gentoxischer Effekt konnte nur im Comet - Assay nachgewiesen werden. In Anlage A erbrachte die Luftaufbereitung ebenfalls eine Aufhebung der in der Außenluft gemessenen Effekte.

Die Elementanalyse der Proben aus der gefilterten Luft zeigt, dass Vanadium in den Proben enthalten war. Da die Konzentration der Elemente Vanadium und Zink in den Proben aus der gefilterten Luft geringer war als in anderen Proben, die keine Effekte im Comet - Assay aufwiesen, sind die gemessenen Elemente wahrscheinlich nicht für die DNA-schädigenden Effekte im Comet - Assay verantwortlich. Auch in der gefilterten Luft könnten Partikel, die mit polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen beladen waren, noch zu finden sein. Eventuell konnte die Luftaufbereitung nicht alle beladenen Partikel herausfiltern, so dass auch die geringe Partikelmenge in der gefilterten Luft noch eine Wirkung aufweist.

Bewertung der Abluft vor dem Wärmetauscher durch den Vergleich mit Anlage A

Die Proben aus der Abluft vor dem Wärmetauscher in Anlage B waren in den verwendeten Bioassays deutlich weniger gentoxisch aktiv als die entsprechenden Proben aus Anlage A. Insbesondere in Anlage BII konnten bezüglich der Wirkung im Cytotoxizitätstest und im Comet - Assay deutlich geringere Effekte nachgewiesen werden. Im Vergleich zur gefilterten Luft verschlechterte sich die Luftqualität in Anlage BI, jedoch nicht in Anlage BII. Der Hauptunterschied zwischen Anlage A und Anlage B liegt in den Einsatzmaterialien und darin begründet sich wahrscheinlich auch die unterschiedliche Wirksamkeit. Die Untersuchung der Einsatzmaterialien unterliegt der Geheimhaltung. Wie auch in Anlage A hängt die Toxizität der Abluftproben wahrscheinlich nicht von der Qualität der Partikel, sondern von der Quantität ab. Diese Theorie wird in Kapitel 4.2.2 diskutiert.

In Anlage B und Anlage A erfolgt die Abluftaufbereitung nach demselben Prinzip.

Eine abschließende Bewertung der Abluft vor dem Wärmetauscher in Anlage B im Vergleich zur Außenluft ist in Tabelle 4.11 zusammengefasst.

Tab. 4.11 Abschließende Bewertung der Abluft vor dem Wärmetauscher in Anlage B im Vergleich zur Außenluft (Szenario 1)
 grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt, Z v W = Außenluft vor Wärmetauscher, Z n W = Außenluft nach Wärmetauscher, gef. = gefilterte Luft, A v W = Abluft vor Wärmetauscher

	Anlage BI				Anlage BII			
	Z v W	Z n W	gef.	A v W	Z v W	Z n W	gef.	A v W
Cytotoxizität	grün	grün	grün	gelb	grün	grün	grün	grün
Comet - Assay	grün	gelb	gelb	gelb	gelb	grün	gelb	grün
Mikrokerntest	gelb	rot	grün	gelb	gelb	grün	grün	gelb
Ames - Test	rot	gelb	grün	gelb	rot	gelb	grün	grün

Die Abluft vor dem Wärmetauscher in Anlage BI erwies sich als deutlich aktiver in den Biossays, als die Abluft vor dem Wärmetauscher in Anlage BII. Effekte, die durch die Exposition der Zellen mit dem Extrakt der Abluft vor dem Wärmetauscher aus Anlage BII ausgelöst wurden, konnten nur im Mikrokerntest festgestellt werden. Die Abluft vor dem Wärmetauscher in Anlage BI zeigte dagegen in allen Assays ungefähr gleich starke Effekte. Im Vergleich zur Luftqualität der gefilterten Luft verschlechtert sich die Luftqualität in Anlage BI. In Anlage BII ist insgesamt keine Verschlechterung der Luftqualität erkennlich.

Im Gegensatz zu den Proben aus Anlage A (s. Kap. 4.1) zeigten die Proben aus Anlage B in der Abluft vor dem Wärmetauscher ein deutlich geringeres genotoxisches Potenzial. Effekte, die in den Proben der Abluft vor dem Wärmetauscher des Anlagenteils I gemessen werden konnten, unterschieden sich nicht zwischen Anlage A und Anlage B. Da der Hauptunterschied zwischen Anlage A und Anlage B der Einsatz verschiedener Materialien ist, insbesondere im Anlagenteil II, wurden diese ebenfalls auf ihre Wirksamkeit untersucht. Die Ergebnisse unterliegen der Geheimhaltung.

In Anlage B konnte im Gegensatz zu Anlage A in der Abluft vor dem Wärmetauscher weder Selen noch Vanadium in den Anlagenteilen I und II gemessen werden. Neben Kupfer, das auch in den Prozesskontrollen gemessen werden konnte, enthielt die Abluft vor dem Wärmetauscher von Anlage BII nur Lithium und Zink. Da über die genotoxische Wirkung von Lithium nichts bekannt ist und Zink der Bildung von Mikrokerneln vorbeugt, konnten die Verantwort-

tung der Effekte im Mikrokerntest keinem gemessenen Element zugewiesen werden. In der Abluft vor dem Wärmetauscher von Anlage BI waren deutlich mehr Elemente zu finden. Neben Mangan konnten auch Barium und Strontium gemessen werden. Wie in Kap. 4.1.1 bereits beschrieben, ist über die gentoxische Wirkung von dieser beiden Substanzen nichts bekannt, Mangan kann jedoch die Bildung von Mikrokernen induzieren (Snyder and Friedman 1998).

Bewertung der Abluft nach dem Wärmetauscher durch den Vergleich mit Anlage A

Die Proben aus der Abluft nach dem Wärmetauscher waren in Anlage BII deutlich weniger gentoxisch als in Anlage A. In Anlagenteil II zeigten die Proben aus Anlage A ein deutlich gentoxisches Potenzial im Mikrokerntest. Im Vergleich dazu konnte in den Proben aus Anlage B deutliche Wirkungen im Comet - Assay gemessen werden. Die deutlich höhere Toxizität der Proben aus Anlage A ist eventuell durch das Vorkommen von Mangan zu erklären. Wahrscheinlicher ist jedoch auch in Anlage B eine Abhängigkeit der gentoxischen Wirkung, nicht von der Qualität der Partikel, sondern von der Quantität (s. Kap. 5.2.2).

In Tabelle 4.12 ist die abschließende Bewertung der Abluft nach dem Wärmetauscher in Anlage B im Vergleich zu den anderen Prozessproben dargestellt.

Tab. 5.12 Abschließende Bewertung der Abluft nach dem Wärmetauscher in Anlage B im Vergleich zur Außenluft und der Abluft vor dem Wärmetauscher (Szenario 1)

grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt, Z v W = Außenluft vor Wärmetauscher, Z n W = Außenluft nach Wärmetauscher, gef. = gefiltert, A v W = Abluft vor Wärmetauscher, A n W = Abluft nach Wärmetauscher

	Anlage BI					Anlage BII				
	Z v W	Z n W	gef.	A v W	A n W	Z v W	Z n W	gef.	A v W	A n W
Cytotoxizität	grün	grün	grün	gelb	grün	grün	grün	grün	grün	grün
Comet - Assay	grün	gelb	gelb	gelb	rot	gelb	grün	gelb	grün	grün
Mikrokerntest	gelb	rot	grün	gelb	grün	gelb	grün	grün	gelb	gelb
Ames - Test	rot	gelb	grün	gelb	gelb	rot	gelb	grün	grün	gelb

Die Abluft nach dem Wärmetauscher in Anlage BI zeigte einen starken Effekt im Comet - Assay und einen Effekt im Ames-Test. Ein Effekt im Ames-Test konnte bereits in der Abluft vor dem Wärmetauscher gemessen werden. Durch den Wärmetauscher verstärkte sich der gentoxische Effekt der Luftproben im Comet - Assay. Eine Abnahme der gentoxischen

Wirkung der Partikel in der Luft konnte durch das Passieren der Luft durch den Wärmetauscher im Cytotoxizitätstest und im Mikrokerntest erreicht werden. In der Abluft der Anlage BII hatte das Passieren der Luft durch den Wärmetauscher keinen Einfluss auf die gentoxische Wirkung der Extrakte im Mikrokerntest. In der Abluft der Anlage BII nach dem Wärmetauscher konnte ein mutagenes Potenzial im Ames-Test ermittelt werden, das die Probe der Abluft vor dem Wärmetauscher nicht aufwies.

Im Vergleich zu Anlage A (s. Kap. 4.1), dort löste die Abluft nach dem Wärmetauscher in Anlage AI Effekte im Cytotoxizitätstest und im Comet - Assay sowie starke Effekte im Mikrokerntest aus, zeigen die Proben aus Anlage B ein geringeres cytotoxisches und gentoxisches Potenzial im Mikrokerntest, jedoch ein höheres Potenzial im Comet - Assay und Ames-Test. In der Abluft von Anlagenteil II konnte in Anlage B ein deutlich geringeres ökotoxikologisches Potenzial gemessen werden. Die Abluft der Anlage AII löste starke Effekte im Cytotoxizitätstest und im Comet - Assay sowie Effekte im Mikrokerntest aus. Dagegen zeigten die Abluftproben der Anlage BII kein cytotoxisches und gentoxisches Potenzial im Comet - Assay, jedoch ein mutagenes Potenzial im Ames-Test.

Der Vergleich der Elementspektren der Abluftproben nach dem Wärmetauscher aus Anlage A und Anlage B zeigte die Abwesenheit von Mangan in Anlage B. Lithium und Zink konnten sowohl in Anlage B als auch in Anlage A gemessen werden. Die höhere Gentoxizität der Proben aus Anlage A ist daher wahrscheinlich mit der höheren Mangankonzentration zu erklären.

4.2.2 Einfluss der Partikelkonzentration auf die Wirkung der Prozessproben aus Anlage B im Vergleich zu Anlage A (Szenario 2)

Die Proben aus Anlage BII zeigten in der Abluft ein deutlich geringeres gentoxisches Potenzial als die Proben aus Anlage AII. Die Toxizität der Proben aus der Abluft von Anlage BI entspricht ungefähr der Toxizität der Proben aus Anlage A. Der Wärmetauscher dient eventuell als Transporter toxischer Verbindungen aus der Abluft vor dem Wärmetauscher in die Außenluft nach dem Wärmetauscher.

Szenario 2 dient der Bestimmung, ob die gentoxische Wirkung durch die Qualität oder die Quantität der Partikel hervorgerufen wurde (vgl. Kapitel 4.1.2).

Bewertung der Außenluft vor und nach dem Wärmetauscher und der gefilterten Luft nach Szenario 2 („Immissionsprognose“)

Die Bewertung in beiden Expositionszenarien aus Kapitel 3.1 der Prozessluft vor und nach der Filterung ist in Tabelle 4.13 zusammengefasst.

Tab. 4.13 Abschließende Bewertung der Außenluft vor und nach dem Wärmetauscher und der gefilterten Luft in Anlage B in Szenario 1 und 2
 grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt, 1 = Szenario 1 (*In der Anlage*), 2 = Szenario 2 (*Immissionsprognose*), Z v W = Außenluft vor Wärmetauscher, Z n W = Außenluft nach Wärmetauscher, gef. = gefilterte Luft

Szenario	Anlage BI						Anlage BII						
	Z v W		Z n W		gef.		Z v W		Z n W		gef.		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Cytotoxizität	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün
Comet - Assay	grün	grün	gelb	rot	gelb	rot	gelb	rot	grün	grün	gelb	rot	rot
Mikrokerntest	gelb	rot	rot	rot	grün	gelb	rot	rot	grün	gelb	grün	gelb	gelb
Ames - Test	rot	gelb	gelb	gelb	grün	gelb	rot	rot	gelb	gelb	grün	gelb	gelb

Eine cytotoxische Wirkung konnte in keinem der beiden Szenarien, weder in den Außenluftproben noch in den Proben aus der gefilterten Luft, ermittelt werden. In Tabelle 4.13 ist deutlich erkennbar, dass sich durch die Bewertung in Szenario 2 nahezu alle Bewertungsstufen bezüglich der genotoxischen Wirkung verschlechtern. Da bereits geringe Partikelmengen eine genotoxische Wirkung verursachen, ist eindeutig die Qualität der Partikel für die genotoxische Wirkung verantwortlich. Durch den Wärmetauscher wird die Qualität der Partikel in der Außenluft der Anlage BI verschlechtert, während in der Außenluft der Anlage BII der Wärmetauscher einen verbessernden Einfluss auf die Qualität der Partikel hat. Der Einfluss des Wärmetauschers auf die Luftqualität der Außenluft nach dem Wärmetauscher wird bei der Betrachtung der Abluft (s. u.) diskutiert. Hohe Wirksamkeit zeigen auch die Partikel, die in der gefilterten Luft gesammelt wurden.

Bewertung der Abluft vor und nach dem Wärmetauscher im Vergleich zu den anderen Prozessproben nach Szenario 2 („Immissionsprognose“)

Einen Überblick über die abschließende Bewertung in beiden Expositionsszenarien der Prozessproben aus Anlage B gibt Tabelle 4.14.

Tab. 4.14 Abschließende Bewertung der Prozessproben aus Anlage B in Szenario 1 und 2

grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt, 1 = Szenario 1 (*In der Anlage*), 2 = Szenario 2 (*Immissionsprognose*), Z v W = Außenluft vor Wärmetauscher, Z n W = Außenluft nach Wärmetauscher, gef. = gefilterte Luft, A v W = Abluft vor Wärmetauscher, A n W = Abluft nach Wärmetauscher

		Anlage BI									
		Z v W		Z n W		gef.		A v W		A n W	
Szenario		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Cytotoxizität		grün	grün	grün	grün	grün	grün	gelb	grün	grün	grün
Comet - Assay		grün	grün	gelb	rot	gelb	rot	gelb	gelb	rot	grün
Mikrokerntest		gelb	rot	rot	rot	grün	gelb	gelb	gelb	grün	grün
Ames - Test		rot	gelb	gelb	gelb	grün	gelb	gelb	grün	gelb	grün

		Anlage BII									
		Z v W		Z n W		gef.		A v W		A n W	
Szenario		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Cytotoxizität		grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün
Comet - Assay		gelb	rot	grün	grün	gelb	rot	grün	grün	grün	grün
Mikrokerntest		gelb	rot	grün	gelb	grün	gelb	gelb	grün	gelb	gelb
Ames - Test		rot	rot	gelb	gelb	grün	gelb	grün	grün	gelb	grün

Im Vergleich zwischen Anlagenteil I und II wird der Einfluss des Wärmetauschers auf die Toxizität der Proben deutlich sichtbar. In Anlage BI weist die Abluft vor dem Wärmetauscher durch die beaufschlagten Partikel und die anschließende Reinigung eine deutlich toxische Wirkung auf. Der Wärmetauscher scheint daher einen Einfluss auf die Luftqualität zu haben.

Durch den Wärmetauscher wird die Abwärme der Abluft zur Anwärmung der Außenluft genutzt. Eine Spülluft soll den Übertrag von Abluft in die Außenluft durch den Wärmetauscher verhindern. Das Luftvolumen, das sich jedoch im Wärmetauscher zur Zeit des Übergangs von Abluft zu Außenluft befindet, wird aus der Abluft in die Außenluft übertragen. Ebenso wird umgekehrt Luft aus der Außenluft vor dem Wärmetauscher in die Abluft nach dem Wärmetauscher übertragen.

Untermauert wird diese These durch die Analyse der Elementzusammensetzung. Beispielsweise konnten Barium und Lithium in Anlage BI nur in der Außenluft nach dem Wärmetauscher, der Abluft vor dem Wärmetauscher und der Abluft nach dem Wärmetauscher gemessen werden. Da Barium und Lithium jedoch nicht in der Außenluft vor dem Wärmetauscher bestimmt wurden, konnten diese Elemente nur durch den Wärmetauscher in die Außenluft nach dem Wärmetauscher eingebracht werden.

Da in Anlage A die Außenluft nach dem Wärmetauscher nicht beprobt wurde, konnte diese These anhand der Proben aus Anlage A nicht verifiziert werden.

4.2.3 Identifizierung wirksamer Verbindungen durch chemische Fraktionierung ausgewählter Proben

Anhand der gaschromatographischen Analyse mit gekoppeltem Massenspektrometer konnte die Aktivität der Fraktion „neutrale Verbindungen“ der Abluft nach dem Wärmetauscher aus Anlage BI nicht erklärt werden.

Wie in Kapitel 4.1.3 bereits beschrieben, wurde zur Identifizierung der wirksamen Verbindungen in den Prozessproben eine chemische Fraktionierung ausgewählter Proben mit anschließender gaschromatographischer Analyse mit gekoppeltem Massenspektrometer durchgeführt. Des Weiteren wurde die Wirksamkeit der einzelnen chemischen Fraktionen in den Bioassays Cytotoxizitäts- und Mikrokerntest untersucht.

Der Cytotoxizitätstest zeigte weder eine cytotoxische Wirkung der unfraktionierten Proben, noch der eingesetzten Einzelfraktionen. Die Ergebnisse des Mikrokerntest der Fraktionen führten zu den in Tabelle 4.15 dargestellten Bewertungen.

Tab. 4.15 Bewertung der Ergebnisse aus dem Mikrokerntest nach Exposition mit den Fraktionen, Anlage B

grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt

	Anlage BI	Anlage BII
	Abluft	Abluft
Unfraktioniert	grün	gelb
Starke Säuren	grün	grün
Schwache Säuren	grün	grün
Neutrale Verbindungen	gelb	grün
Basen	grün	grün

Die Effekte der unfraktionierten Proben konnten im Mikrokerntest in keiner Fraktion wiedergefunden werden. Dagegen wies die Fraktion der neutralen Verbindungen aus der Abluft der Anlage BI ein Potenzial auf die Bildung von Mikrokernen zu induzieren. Dieses Potenzial konnte in der unfraktionierten Probe der Abluft aus Anlage BI nicht beobachtet werden. Zur möglichen Identifizierung der Verbindungen, die diese Wirkung auslösten wurde eine gaschromatographische Analyse mit gekoppeltem Massenspektrometer durchgeführt.

Fraktion neutrale Verbindungen aus der Probe „Abluft Anlage BI“

Die Analyse der Fraktion identifizierte folgende Verbindungen: Methylisobutylketon, 3,5-Dimethyl-1-hexin-3-ol, N-Butyl-benzenesulfonamid und Bis(2-methylpropyl)-1,2-benzoldicarboxylsäure

Zur gentoxischen Wirkung von Methylisobutylketon liegen bisher keine Erkenntnisse vor. Methylisobutylketon entsteht aus Wasser und Aceton und könnte daher ein Fragment aus der chemischen Aufbereitung der Proben sein.

3,5-Dimethyl-1-hexin-3-ol wird in Verbindung mit Octamethylcyclotetrasiloxan, das auch in Proben aus Anlage A gefunden wurde, dazu verwendet, Reinigungsflüssigkeiten mit verringerter Entzündbarkeit für die Wartung, Pflege, Reparatur und Montage von Fahrzeugteilen und Fahrzeugen herzustellen (Sprügel 2006). Zur Gentoxizität dieser Verbindung liegen derzeit keine Studien vor. N-Butyl-benzolsulfonamid wird als Weichmacher in verschiedenen Polymeren, insbesondere Polyamiden, eingesetzt. Eine gentoxische Wirkung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Poet et al. 2006). Die Verbindung Bis(2-methylpropyl)-1,2-

benzendicarboxylsäure wurde in diversen Bioassays (nach PubChem 145) getestet, eine genotoxische Wirkung ist nicht bekannt.

4.2.4 Zusammenfassung der Bewertung der Luftqualität in der Prozesskette in Anlage B im Vergleich zu Anlage A

Die Außenluftproben wiesen in den Bioassays keine wesentlich unterschiedliche Wirkung in Anlage A und Anlage B auf. Beide Standorte zeigten, dass die Qualität der Partikel in der Außenluft für die genotoxische Wirkung verantwortlich ist, da bereits geringe Partikelkonzentrationen toxische Effekte auslösten (genaue Diskussion s. Kap. 4.4.5). An beiden Standorten konnte gezeigt werden, dass die Filterung der Luft das toxikologische Potenzial der Proben vermindert. Die Abluftproben aus Anlage B zeigten deutliche Unterschiede zwischen Anlagenteil I und II. Das toxikologische Potenzial der Proben aus Anlage BI war in der Abluft deutlich größer als das Potenzial der Proben aus Anlage BII. Eine Übertragung der genotoxisch wirksamen Partikel aus der Abluft vor dem Wärmetauscher durch den Wärmetauscher in die Außenluft nach dem Wärmetauscher ist sehr wahrscheinlich. Die geringe Toxizität der Abluft vor dem Wärmetauscher in Anlage BII spiegelt sich in der ebenfalls geringen Toxizität der Außenluft nach dem Wärmetauscher in Anlage BII wieder. Untermuert wird diese Theorie durch die Betrachtung der Elementanalyse der Abluftproben aus Anlage BI. Da die Außenluft nach dem Wärmetauscher in Anlage A nicht beprobt wurde, kann diese These nicht durch Ergebnisse aus Anlage A verifiziert werden. Durch die chemische Fraktionierung ausgewählter Proben aus Anlage B konnten keine potenziell genotoxisch wirksamen Verbindungen identifiziert werden.

4.3 Immunmodulatorisches Potenzial der Prozessproben aus Anlage A und Anlage B

Zur Ermittlung des immunmodulatorischen Potenzials der Proben aus den Prozessketten in Anlage A und Anlage B, wurde ein Modell entwickelt.

Das Modell umfasst die Exposition einer menschlichen Lungezelllinie mit den Staubextrakten aus den Prozessketten und in einem zweiten Ansatz die kombinierte Stimulation der Zellen mit einem viralen Stimulus und dem Staubextrakt. Diese kombinierte Stimulation wurde, wie in Kapitel 1 beschrieben, gewählt, da die Lunge täglich nicht nur mit Stäuben, sondern auch mit mikrobiellen Bestandteilen in Kontakt kommt.

Es ist bekannt, dass die Stimulation von Lungenepithelzellen mit mikrobiellen Bestandteilen die Ausschüttung von Interleukinen induziert (Becker et al. 2005; Matsukura et al. 2006; Pace et al. 2008). In der vorliegenden Studie wurde für die mikrobielle Stimulation ein artifizielles Analogon zu doppelsträngiger RNA (polyinosinic:polycytidylic acid, [poly(I:C)]) verwendet, das eine virale Infektion, wie beispielsweise durch Influenza, simuliert. Durch die Stimulation der humanen Bronchialepithelzelllinie Beas-2B werden die Interleukine Interleukin-8 (IL-8) und Interleukin-6 (IL-6) ausgeschüttet. Ziel dieser Untersuchung war zu beobachten, ob die

Staubextrakte aus Anlage A und Anlage B eine Interleukinausschüttung induzieren und ob sie die Interleukinausschüttung beeinflussen, die durch den viralen Stimulus ausgelöst wird.

4.3.1 Immunmodulatorisches Potenzial der Proben aus Anlage A

Eine starke immunmodulatorische Wirksamkeit der Proben in Kombination mit dem viralen Stimulus konnte in der Außenluft von Anlage A festgestellt werden. Die Proben der gefilterten Luft und der Abluft vor dem Wärmetauscher wiesen keine immunmodulatorische Wirksamkeit auf. Die Abluft der Anlage AI zeigte ebenfalls starke Effekte, die eventuell durch den Wärmetauscher von der Außenluft in die Abluft übertragen oder durch mikrobielle Bestandteile induziert werden, die aus der mikrobiellen Schicht auf dem Wärmetauscher stammen. In Anlage AII konnten in der Abluft ebenfalls immunmodulatorische Effekte festgestellt werden, die wahrscheinlich auch durch den Wärmetauscher aus der Außenluft übertragen wurden oder durch einen Mitriss an Mikroben entstehen, da sie vor dem Wärmetauscher nicht messbar waren. Die Abluft nach der Verbrennung zeigte eine immunmodulatorische Wirksamkeit, die wahrscheinlich durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, die bei der Verbrennung entstehen, induziert wurde. Die chemischen Analysen der Elemente und Verbindungen durch die gaschromatographische Analyse mit gekoppeltem Massenspektrometer ergab keinen Aufschluss über die verantwortlichen Verbindungen (s. Kap. 4.3.3).

Bewertung der Außenluft und der gefilterten Luft

Die Staubextrakte waren ohne mikrobielle Stimulation nicht immunmodulatorisch aktiv. Eine immunmodulatorische Wirkung war nur in Kombination mit der viralen Stimulation erkennbar.

Die Bewertung der immunmodulatorischen Wirkung der Proben aus der Außenluft und der gefilterten Luft in Anlage A ist in Tabelle 4.16 zusammengefasst.

Tab. 4.16 Abschließende immunmodulatorische Bewertung der Außenluft und der gefilterten Luft in Anlage A
grün = kein Effekt, rot = starker Effekt

	Anlage AI		Anlage AII	
	Außenluft	Gefilterte Luft	Außenluft	Gefilterte Luft
Immunologie	rot	grün	rot	grün

Stark immunmodulatorische Wirkung zeigten die Proben aus der Außenluft. Durch die Filtrierung der Luft konnte diese Aktivität wieder aufgehoben werden. Die Diskussion möglicher Ursachen für die immunmodulatorische Wirkung der Außenluft erfolgt in Kapitel 4.4.5.

Bewertung der Abluft vor und nach dem Wärmetauscher im Vergleich zur Außenluft und der gefilterten Luft

Die immunmodulatorische Bewertung der Proben aus der Abluft vor und nach dem Wärmetauscher ist in Tabelle 4.17 zusammengefasst.

Tab. 4.17 Abschließende immunmodulatorische Bewertung der Abluft vor und nach dem Wärmetauscher in Anlage A im Vergleich zu Außenluft und gefilterter Luft
 grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt, A v W = Abluft vor Wärmetauscher, A n W = Abluft nach Wärmetauscher

	Anlage AI				Anlage All			
	Außenluft	Gef. Luft	A v W	A n W	Außenluft	Gef. Luft	A v W	A n W
Immunologie	rot	grün	grün	rot	rot	grün	grün	gelb

In der Abluft der Anlage All konnte vor dem Wärmetauscher keine immunmodulatorische Wirkung in Kombination mit dem viralen Stimulus ermittelt werden. Eine starke Wirkung wurde jedoch nach dem Wärmetauscher festgestellt. In der Abluft der Anlage All konnte ebenfalls vor dem Wärmetauscher keine immunmodulatorische Wirkung gezeigt werden, nach dem Wärmetauscher wurden jedoch Effekte festgestellt.

Für die starke Wirkung der Probe aus der Abluft der Anlage AI könnte auf der einen Seite die Übertragung wirksamer Komponenten aus der Außenluft durch den Wärmetauscher in die Abluft ursächlich sein. Koplanare Verbindungen sind für die immunmodulatorische Wirkung von Umweltproben entscheidend. Durch die gaschromatographische Analyse mit gekoppeltem Massenspektrometer konnte jedoch keine Verbindung in der Abluft der Anlage A ermittelt werden, der die Wirksamkeit eindeutig zuzuordnen ist. Eine weitere Erklärung für die starken immunmodulatorischen Effekte der Abluftproben könnte in der mikrobiellen Schicht auf dem Wärmetauscher liegen. Durch einen Mitriss der Mikroben könnten deren Bestandteile durch die Extraktion in die Probe gelangen und für die immunologische Reaktion von Bedeutung sein (s. Kap. 4.3.3).

Die Analyse der Proben auf ihre gentoxische Wirkung ergab, dass in der Abluft nicht die Qualität der Partikel, sondern die Quantität entscheidend ist. Da in der Abluft vor dem Wärmetauscher keine Effekte festgestellt werden konnten und die Partikelkonzentration in der Abluft vor dem Wärmetauscher größer war als in der Abluft nach dem Wärmetauscher, spielt die Quantität der Partikel in den immunologischen Experimenten keine Rolle.

Bewertung der Abluft nach der Verbrennung

Die Bewertung der Proben aus der Abluft nach der Verbrennung im entwickelten immunologischen Modell ist in Tabelle 4.18 zusammengefasst.

Tab. 4.18 Abschließende immunmodulatorische Bewertung der Proben nach der Verbrennung im Vergleich zur Außenluft
gelb = Effekt, rot = starker Effekt

	Anlage AI		Anlage All	
	Außenluft	Außenluft	Verbrennung	
Immunologie				

Die Probe aus der Abluft nach der Verbrennung wies eine immunmodulatorische Wirksamkeit auf. Durch die Verbrennung werden polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs) gebildet. Diese spielen eine große Rolle bei der Wirkung im entwickelten immunologischen Modell. Da die Effekte weniger deutlich waren als in der Außenluft, scheinen in der Außenluft entweder höhere Konzentrationen vorzuliegen oder weitere Komponenten die immunologische Reaktion zu beeinflussen.

4.3.2 Immunmodulatorisches Potenzial der Proben aus Anlage B

Zum Vergleich der beiden Anlagen wurden die Proben aus Anlage B ebenfalls in das Modell zum Test auf immunmodulatorische Wirksamkeit eingesetzt. Auch die Proben aus Anlage B zeigten ohne viralen Stimulus keine immunmodulatorische Aktivität

Bewertung der Außenluft vor und nach dem Wärmetauscher, sowie der Proben aus der gefilterten Luft

Die Bewertung der Proben aus der Außenluft vor und nach dem Wärmetauscher, sowie der gefilterten Luft ist in Tabelle 4.19 zusammengefasst.

Tab. 4.19 Abschließende immunmodulatorische Bewertung der Außenluft vor und nach dem Wärmetauscher, sowie der gefilterten Luft in Anlage B
grün = kein Effekt, gelb = Effekt, Z v W = Außenluft vor Wärmetauscher, Z n W = Außenluft nach Wärmetauscher, gef. = gefilterte Luft

	Anlage BI		Anlage BII		
	Z v W	Z n W	Z v W	Z n W	gef.
Immunologie					

Die Außenluftproben zeigen in Anlage B ein immunmodulatorisches Potenzial. Die Außenluft nach dem Wärmetauscher in Anlage BII zeigte keine immunmodulatorische Aktivität. Durch die Filtrierung der Außenluft waren die Proben nicht immunmodulatorisch aktiv. Zuständige Verbindungen konnten durch die gaschromatographische Analyse mit gekoppeltem Massenspektrometer nicht detektiert werden. Eine Diskussion der möglichen Ursachen für die immunmodulatorische Wirksamkeit der Proben aus der Außenluft erfolgt in Kapitel 4.4.5.

Bewertung der Abluft vor und nach dem Wärmetauscher im Vergleich zur Außenluft und der gefilterten Luft

Die Bewertung der Abluftproben, die in Anlage B vor und nach dem Wärmetauscher gesammelt worden waren ist in Tabelle 4.20 zusammengefasst.

	Anlage BI					Anlage BII				
	Z v W	Z n W	gef.	A v W	A n W	Z v W	Z n W	gef.	A v W	A n W
Immunologie	gelb	gelb	rot	rot	rot	gelb	rot	rot	rot	rot

Die Abluft aus Anlage B zeigte kein Potenzial die immunologische Reaktion der Zellen auf einen viralen Stimulus zu beeinflussen. Die immunmodulatorische Wirksamkeit der Proben aus Anlage B war schwächer als die der Proben aus Anlage A. Eine Übertragung der wirksamen Partikel aus der Außenluft in die Abluft durch den Wärmetauscher konnte in Anlage B nicht nachgewiesen werden. Dies untermauert die Theorie, dass ein Mitriss vom mikrobiellen Film auf dem Wärmetauscher für die immunmodulatorische Wirksamkeit in Anlage A verantwortlich ist.

4.3.3 Luftkeimmessungen in Anlage A und Anlage B

Um die Theorie eines Mitrisses von Mikroben, die sich auf dem Wärmetauscher ansiedeln und der Extraktion mikrobieller Bestandteile aus der Abluft nach dem Wärmetauscher zu untermauern, wurden Luftkeimmessungen von einem externen Institut durchgeführt.

Die in den Werken Anlage A und Anlage B durchgeführten Luftkeimmessungen zeigten das Vorkommen von aeroben Sporenbildnern, koagulase negativen Staphylokokken, Mikrokokken, Pseudomonaden und Schimmelpilzen in der Außen- und Abluft der Anlagen. Die Ergebnisse wiesen große Schwankungen der Keimzahlen auf. In der Abluft von Anlage AI konnten beispielsweise in der ersten Messung im August 2006 pro m³ Luft 280 koloniebildende Einheiten bestehend aus aerobe Sporenbildnern, koagulase negative Staphylokokken und Schimmelpilzen gemessen werden. Die zweite Messung im Oktober 2006 zeigte pro m³ Luft

an der gleichen Probenahmestelle 20 Schimmelpilze. In der dritten Messung im Dezember 2006 konnten in der Abluft der Anlage AI pro m³ Luft 100 aerobe Sporenbildner, 50 koagula-se-negative Staphylokokken, 30 Mikrokokken und 2110 Pseudomonaden gemessen werden. Ob die hohen Schwankungen durch die Außentemperatur bedingt sind, konnte aufgrund der geringen Anzahl an Probenahmetagen nicht festgestellt werden. Der Vergleich der Keimzahlen und des Keimspektrums vor und nach dem Wärmetauscher, lieferte keine Begründung für die hohe immunmodulatorische Aktivität der Abluftproben nach dem Wärmetauscher im Gegensatz zu vor dem Wärmetauscher. Da die Keimmessungen hohen Schwankungen unterlagen, sollten sie in weiteren Analysen zur immunmodulatorischen Wirksamkeit der Proben direkt parallel zur Probenahme der Luftstäube durchgeführt werden. Die Schwankungen sind wahrscheinlich vom Reinigungszustand der Wärmetauscher abhängig, so dass auch die Reinigungszyklen bei weiteren Probenahmen beachtet werden müssen. Des Weiteren werden Abstriche des Wärmetauschers zur Differenzierung der mikrobiellen Schicht auf dem Wärmetauscher empfehlenswert, um die Ursache für die hohen immunmodulatorischen Effekte der Abluftproben zu klären.

4.3.4 Vergleich der immunmodulatorischen Wirksamkeit der Prozessproben mit dem Standardstaub SRM 1649a

Zur Entwicklung des verwendeten Modells wurde der Standardstaub SRM 1649a eingesetzt. SRM 1649a wurde in der Nähe von Washington in den Jahren 1976 - 1977 gesammelt und chemisch charakterisiert. Er kann vom „*National Institute of Standards and Technology*“ (Washington, USA) bezogen werden.

Die Experimente zur Untersuchung der immunmodulatorischen Wirksamkeit mit dem organischen Extrakt von SRM 1649a in Kostimulation mit einem Virus, ergaben eine erhöhte Interleukin-8 Ausschüttung und keine Beeinflussung der Interleukin-6 Ausschüttung. Diese Reaktion konnte ebenfalls bei den Proben aus Anlage B beobachtet werden. Mechanistische Untersuchungen ergaben, dass eine erhöhte Ausschüttung von Interleukin-8 und eine verminderte Ausschüttung von Interleukin-6 bei der Wirkung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAHs) erwartet wird (Vogel and Matsumura 2008).

Interleukin-8 und Interleukin-6 sind proinflammatorische Zytokine und stimulieren dadurch Entzündungsreaktionen als Immunantwort auf Stressoren. Die erhöhte Interleukin-8 Ausschüttung in der Lunge lockt neutrophile Granulozyten an, die Mikroorganismen identifizieren und zerstören sollen. Als Phagozyten sind sie ebenfalls in der Lage Partikel aufzunehmen und zu zerstören. Dringen jedoch zu viele neutrophile Granulozyten in die Lunge ein, wird das Lungengewebe geschädigt (Soethout et al. 2002).

Entzündungsreaktionen spielen auch bei der Krebsentstehung eine große Rolle (Williams et al. 2008). Zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Entzündungsreaktionen in der Lunge und der Krebsentstehung wurde vom National Institute for Health 2007 Geld zur Verfügung gestellt (NIH 2007). Ein eindeutiger Mechanismus wurde bisher jedoch nicht gefunden.

Die hohe Wirksamkeit der Proben aus Anlage A in den immunmodulatorischen Tests könnte daher im Zusammenhang mit der hohen Wirksamkeit der Partikel aus der Außenluft in den gentoxischen Tests stehen. Der Mechanismus hinter diesem Zusammenhang ist bisher nicht vollständig aufgeklärt und wird Gegenstand weiterer Forschung sein.

4.4 Einfluss der Abluft aus Anlage A und klimatischer Bedingungen auf die Luftqualität der Stadt bei Anlage A

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Studie war es zu bewerten, ob die Emission aus Anlage A einen Einfluss auf die Luftqualität der Stadt hat. Daher wurde eine einjährige Immissionsmessung vom 21.05.07 bis 15.05.08 in Hauptwindrichtung entlang der Abluftfahne durchgeführt.

Die kontinuierliche Immissionsmessung fand an drei ausgewählten Messpunkten statt. Eine Messstelle in Hauptwindrichtung vor der Anlage, eine Messstelle in Hauptwindrichtung nach der Anlage und eine Messstelle in Hauptwindrichtung nach der Stadt.

Die Emissionen führten nicht zu einer deutlichen Verschlechterung des ökotoxikologischen Potenzials der Luftstäube entlang der Windrichtung. Daher hat die Emission aus der Anlage keinen negativen Einfluss auf die Luftqualität der Stadt bezüglich der gemessenen Endpunkte. Es konnten jedoch teilweise starke gentoxische Effekte in den Proben gemessen werden, die nicht in Zusammenhang mit Emissionen aus der beprobten Anlage gebracht werden konnten. Um Ursachen für diese Effekte zu ermitteln, wird in den folgenden Kapiteln der Zusammenhang gentoxischer Effekte und klimatischer Bedingungen untersucht. Die gemessenen Effekte werden dazu mit der entsprechenden Partikelkonzentration, Stickoxidkonzentration und Außen-temperatur zur Zeit der Probenahme korreliert. Des Weiteren werden die Ergebnisse aus der Außenluft in der Anlagen A und B (vgl. Kap. 4.1 und Kap. 4.2) diskutiert, um für die dort gemessenen Effekte Erklärungen zu finden.

4.4.1 Gentoxische Wirkung der Luftstaubproben aus der Immissionsmessung

Zur Ermittlung des Einflusses der Emission aus der Anlage auf die Luftqualität der Stadt wurden für die Bewertung der Immissionsproben dieselben Bioassays und Kriterien zur Bewertung wie bei der Bewertung der Prozessketten herangezogen. In diesem Kapitel wird zunächst die Luftqualität an den verschiedenen Standorten bewertet und dann entlang der Windrichtung verglichen.

Keine der gesammelten Proben aus der Immissionsmessung wies ein cytotoxisches Potenzial auf. Im Comet - Assay, Mikrokerntest und Ames - Test konnten gentoxische Effekte der Proben gemessen werden, daher werden diese Assays zur Bewertung der Luftproben herangezogen.

Probenahmestelle „Vor der Anlage“

In Tabelle 4.21 ist die Bewertung der Proben von „Vor der Anlage“ in allen Tests zur gentoxischen Wirkung über das Jahr verteilt aufgelistet.

Tab. 4.21 Bewertung der Immissionsproben von „Vor der Anlage“ bezüglich ihrer gentoxischen Wirksamkeit
 grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt

2007						
	Mitte Juni	Anfang August	Mitte August	Mitte September	Ende September	Mitte Oktober
Comet - Assay	grün	grün	grün	grün	rot	grün
Mikrokerntest	grün	grün	grün	gelb	gelb	grün
Ames - Test	grün	grün	grün	rot	gelb	rot

2007			2008			
	Anfang November	Mitte November	Anfang Dezember	Mitte Januar	Ende März	Ende April
Comet - Assay	grün	grün	grün	grün	grün	gelb
Mikrokerntest	grün	rot	gelb	grün	grün	rot
Ames - Test	gelb	gelb	gelb	rot	rot	grün

Die Proben der Probenahmestellen, die in Hauptwindrichtung vor den Emissionen der Anlage lagen („Vor der Anlage“), zeigten in den Sommermonaten Juni und August keine gentoxische Wirkung. Eine gentoxische Wirkung im Comet - Assay und Mikrokerntest konnte in den Proben aus September, Mitte November, Anfang Dezember und Ende April 2008 nachgewiesen werden. Der Ames-Test zeigte eine mutagene Wirkung der Proben von Mitte September bis Ende März. Auffällig ist dabei, dass die Wirksamkeit der Proben im Ames-Test in den kalten Monaten verstärkt auftritt. Da dies ein Hinweis auf den Einfluss klimatischer Bedingungen auf die gentoxische Wirksamkeit von Luftstäuben ist, werden die Ergebnisse in einem folgenden Kapitel (Kap. 4.4.4) mit der Außentemperatur korreliert.

Probenahmestelle „Nach der Anlage“

In Tabelle 4.22 ist die Bewertung der Proben von „Nach der Anlage“ in den Tests zur Prüfung auf gentoxische Wirkung dargestellt.

Tab. 4.22 Bewertung der Immissionsproben von „Nach der Anlage“ bezüglich ihrer gentoxischen Wirksamkeit
grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt

		2007					
		Mitte Juni	Anfang August	Mitte August	Mitte September	Ende September	Mitte Oktober
Comet - Assay		grün	grün	grün	grün	gelb	grün
Mikrokerntest		gelb	grün	grün	grün	gelb	gelb
Ames - Test		gelb	grün	grün	rot	grün	rot
		2007			2008		
		Anfang November	Mitte November	Anfang Dezember	Mitte Januar	Ende März	Ende April
Comet - Assay		grün	grün	grün	grün	grün	gelb
Mikrokerntest		grün	grün	gelb	grün	grün	gelb
Ames - Test		rot	gelb	gelb	rot	rot	gelb

Die Proben, die in Hauptwindrichtung nach der Anlage gesammelt worden waren, wiesen keine deutliche Häufung der gentoxischen Wirksamkeit der Proben aus den kalten Monaten auf. Die Probe aus Mitte Juni zeigte Effekte im Mikrokerntest und im Ames-Test. Eine gentoxische Aktivität der Proben konnte, wie in Hauptwindrichtung vor der Anlage im September und im April nachgewiesen werden. Da kein eindeutiges Muster über den Jahresverlauf erkennbar ist, werden auch hier die Ergebnisse zur Ursachenermittlung in den folgenden Kapiteln mit den verschiedenen klimatischen Randparametern verglichen.

Probenahmestelle „Nach der Stadt“

Tabelle 4.23 zeigt die Zusammenfassung der Bewertungen der Wirkung der Proben vom „Nach der Stadt“ in den einzelnen Bioassays.

Tab. 5.23 Bewertung der Immissionsproben vom „Nach der Stadt“ bezüglich ihrer gentoxischen Wirksamkeit
 grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt

2007						
	Mitte Juni	Anfang August	Mitte August	Mitte September	Ende September	Mitte Oktober
Comet - Assay	grün	grün	grün	grün	rot	grün
Mikrokerntest	grün	grün	grün	grün	gelb	grün
Ames - Test	gelb	gelb	rot	rot	rot	rot

2007			2008			
	Anfang November	Mitte November	Anfang Dezember	Mitte Januar	Ende März	Ende April
Comet - Assay	grün	grün	grün	grün	gelb	grün
Mikrokerntest	gelb	gelb	gelb	grün	gelb	rot
Ames - Test	grün	grün	grün	rot	rot	gelb

Auch die Proben, die in Hauptwindrichtung nach der Stadt gesammelt worden waren zeigten kein deutliches Maximum der gentoxischen Aktivität in den kalten Monaten. Insbesondere im Ames-Test konnten starke Wirkungen von Mitte August bis Mitte Oktober, im Januar und Ende März festgestellt werden. Da sich hier ebenfalls keine Häufung der Wirksamkeit in den kalten Monaten zeigte, werden die Proben von „Nach der Stadt“ durch andere Parameter beeinflusst als die Proben von „Vor der Anlage“. Zur Ermittlung der Ursache, werden auch hier die Daten mit klimatischen Parametern (Kap. 4.4.3 - Kap. 4.4.5) korreliert.

Bewertung des gentoxischen Potenzials entlang der Windrichtung

Tabelle 4.24 fasst die Bewertung aller Probenahmestellen entlang der Windrichtung nochmals zusammen.

Tab. 4.24 Bewertung des gentoxischen Potenzials der Immissionsproben
 C = Comet - Assay, M = Mikrokernstest, A = Ames - Test, grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt

		2007																							
		Mitte Juni			Anfang August			Mitte August			Mitte September			Ende September			Mitte Oktober								
		C	M	A	C	M	A	C	M	A	C	M	A	C	M	A	C	M	A						
Vor der Anlage		grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	gelb	rot	rot	gelb	gelb	grün	grün	rot						
Nach der Anlage		grün	gelb	gelb	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	rot	gelb	gelb	grün	grün	gelb	rot						
Schwesterstw.		grün	grün	gelb	grün	grün	gelb	grün	grün	rot	grün	grün	rot	rot	gelb	rot	grün	grün	rot						
		2007																		2008					
		Anfang November			Mitte November			Anfang Dezember			Mitte Januar			Ende März			Ende April								
		C	M	A	C	M	A	C	M	A	C	M	A	C	M	A	C	M	A						
Vor der Anlage		grün	grün	gelb	grün	rot	gelb	grün	gelb	gelb	grün	grün	rot	grün	grün	rot	gelb	rot	grün						
Nach der Anlage		grün	grün	rot	grün	grün	gelb	grün	gelb	gelb	grün	grün	rot	grün	grün	rot	gelb	gelb	gelb						
Schwesterstw.		grün	gelb	grün	grün	gelb	grün	grün	gelb	grün	grün	grün	rot	gelb	gelb	rot	grün	rot	gelb						

In der Hauptwindrichtung von „Vor der Anlage“ nach „Nach der Anlage“ zu „Nach der Stadt“, kann keine eindeutige Verteilung einer gentoxischen Wirkung der Staubextrakte festgestellt werden. Die Proben, die in Hauptwindrichtung vor der Anlage gesammelt worden waren, wiesen eine deutlich gentoxische Wirksamkeit vor. Eine ähnlich starke Wirksamkeit zeigten die Proben von „Nach der Anlage“. Eine Verstärkung der gentoxischen Wirksamkeit der Partikel durch die Abluft der Anlage konnte nicht ermittelt werden. Die Proben von „Nach der Stadt“ wiesen ebenfalls ein gentoxisches Potenzial auf. Unterschiede zur Wirksamkeit der Proben konnten jedoch insbesondere im Ames - Test nachgewiesen werden. Diese Unterschiede könnten durch die Sammlung von PM₁₀ (Partikel < 10 µm) und PM_{2,5} (Partikel < 2,5 µm) vor und nach der Anlage und TSP (total suspended particles, Gesamtstaub) nach der Stadt, entstanden sein.

4.4.2 Abhängigkeit der gentoxischen Wirkung von der Partikelkonzentration zur Zeit der Probenahme

Eine eindeutige Korrelation der gentoxischen Effekte in den Bioassays mit der Partikelkonzentration zur Zeit der Probenahme konnte für keinen Bioassay gezeigt werden.

Zur Ermittlung der Ursache der gentoxischen Wirksamkeit der Proben, wurde die Wirksamkeit zunächst mit der Partikelkonzentration zur Zeit der Probenahme korreliert.

Eine eindeutige Korrelation der gentoxischen Effekte in den Bioassays mit der Partikelkonzentration zur Zeit der Probenahme konnte für keinen Bioassay gezeigt werden.

Wirksamkeit im Comet - Assay

Abbildung 4.1 fasst die Ergebnisse des Comet - Assays im Vergleich zur Partikelkonzentration zusammen.

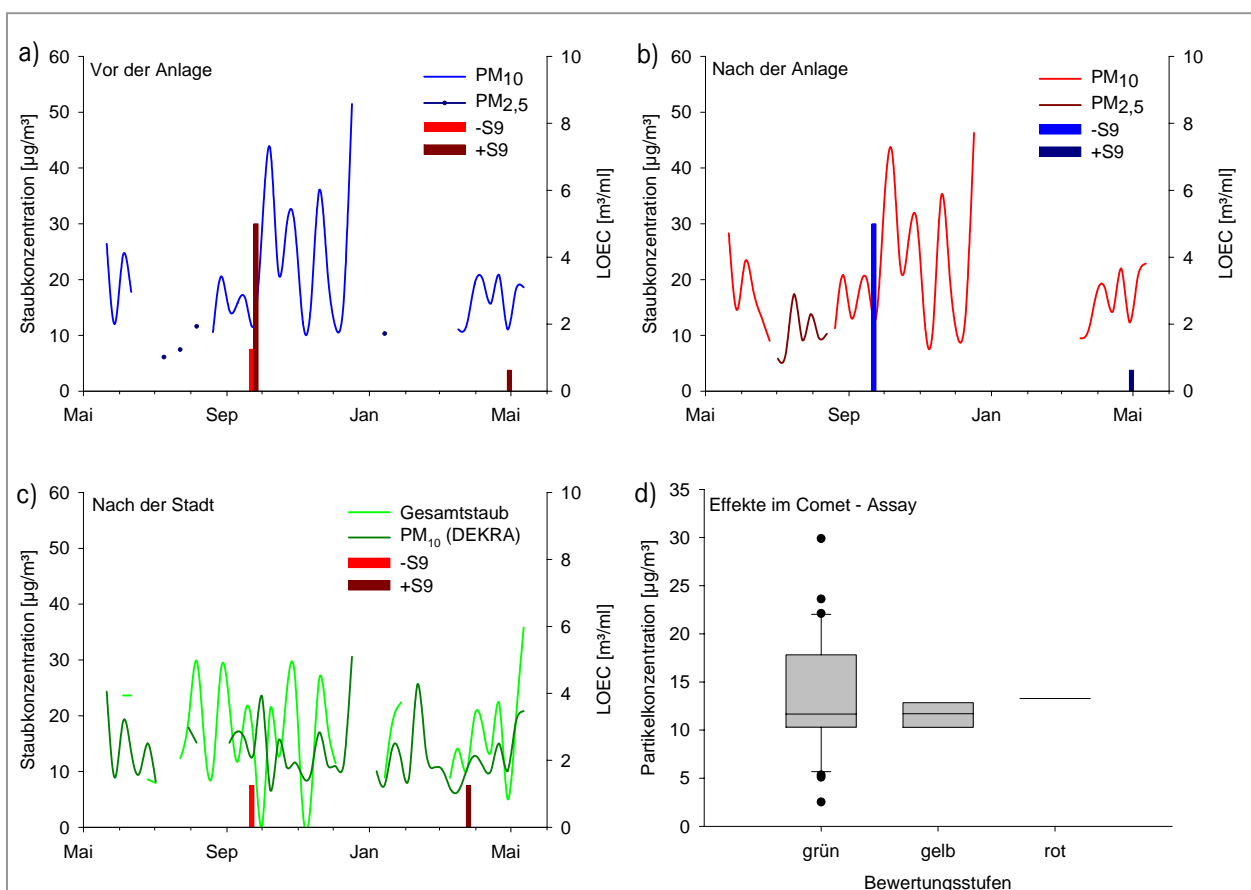


Abb. 4.1 Abhängigkeit der Wirksamkeit der Immissionsproben im Comet - Assay von der Partikelkonzentration

a) „Vor der Anlage“, b) „Nach der Anlage“, c) „Nach der Stadt“, durch die seltenen Effekte im Comet - Assay ist keine deutliche Übereinstimmung mit der Partikelkonzentration erkennbar; d) Korrelation der Partikelkonzentration mit den Bewertungsstufen: es ist keine Korrelation erkennbar, keine statistische Signifikanz (ANOVA on Ranks, $p = 0,815$)

Die Wirksamkeit der Partikel im Comet - Assay ist eindeutig nicht von der Partikelkonzentration abhängig. Proben, die in einem Elektrostahlwerk gesammelt worden waren, zeigten deutliche Effekte im Comet - Assay in weit geringeren Konzentrationen (unter $0,5 \text{ m}^3/\text{ml}$; Cavallo et al. 2008). Die Effekte korrelierten in dieser Studie mit dem erhöhten Vorkommen an Partikeln in der Luft ($1 \text{ mg}/\text{m}^3$). Dies konnte in der vorliegenden Studie nicht gezeigt werden, da die Partikelkonzentrationen deutlich geringer waren. Da die Partikelkonzentration keinen Aufschluss über die Wirksamkeit im Comet - Assay ergab, wurden die Ergebnisse mit der Stickoxidkonzentration (Kap. 5.5.3) und der Außentemperatur korreliert (Kap. 4.4.4).

Mikrokerntest

Abbildung 4.2 fasst die Ergebnisse des Mikrokerntests im Vergleich zur Partikelkonzentration zusammen.

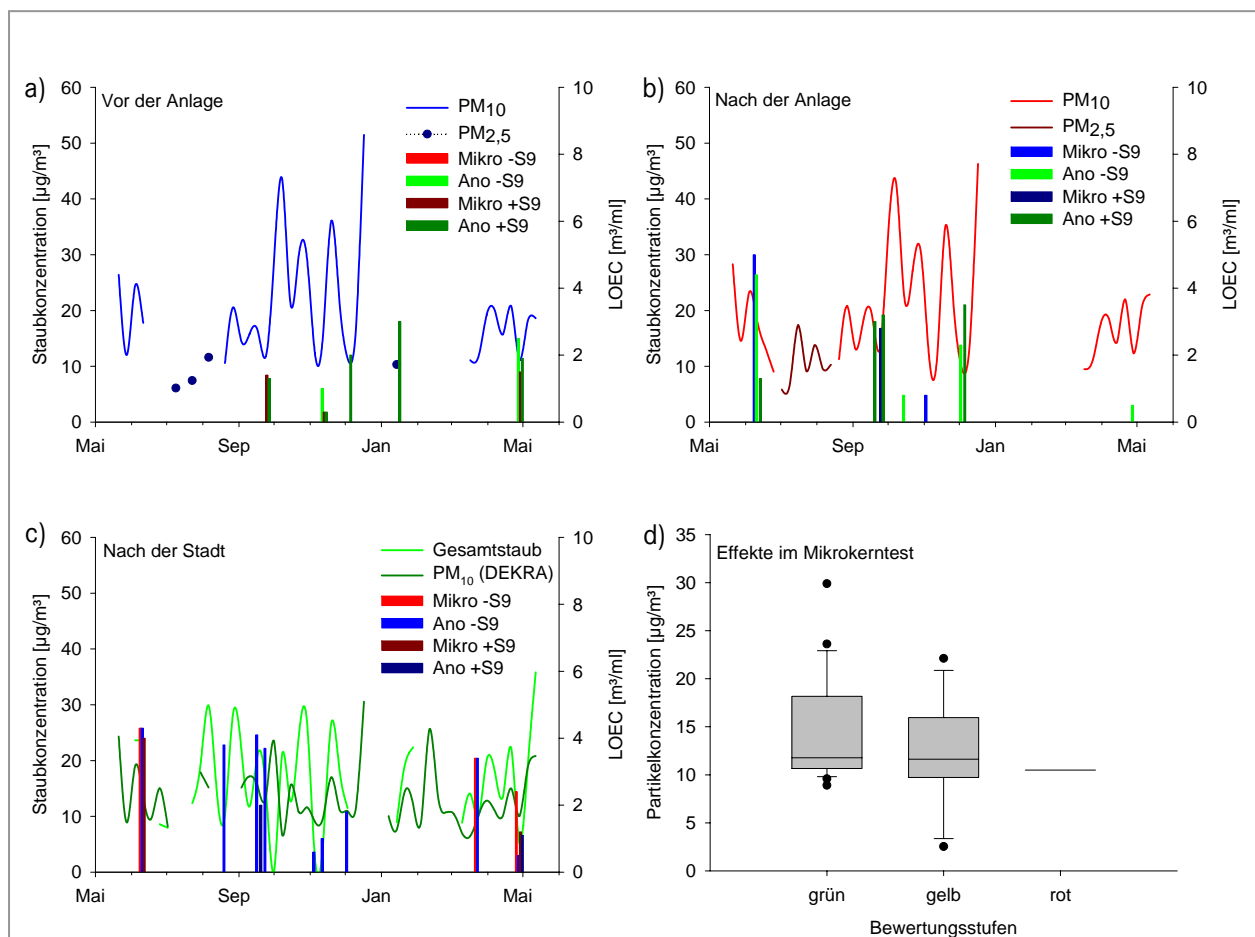


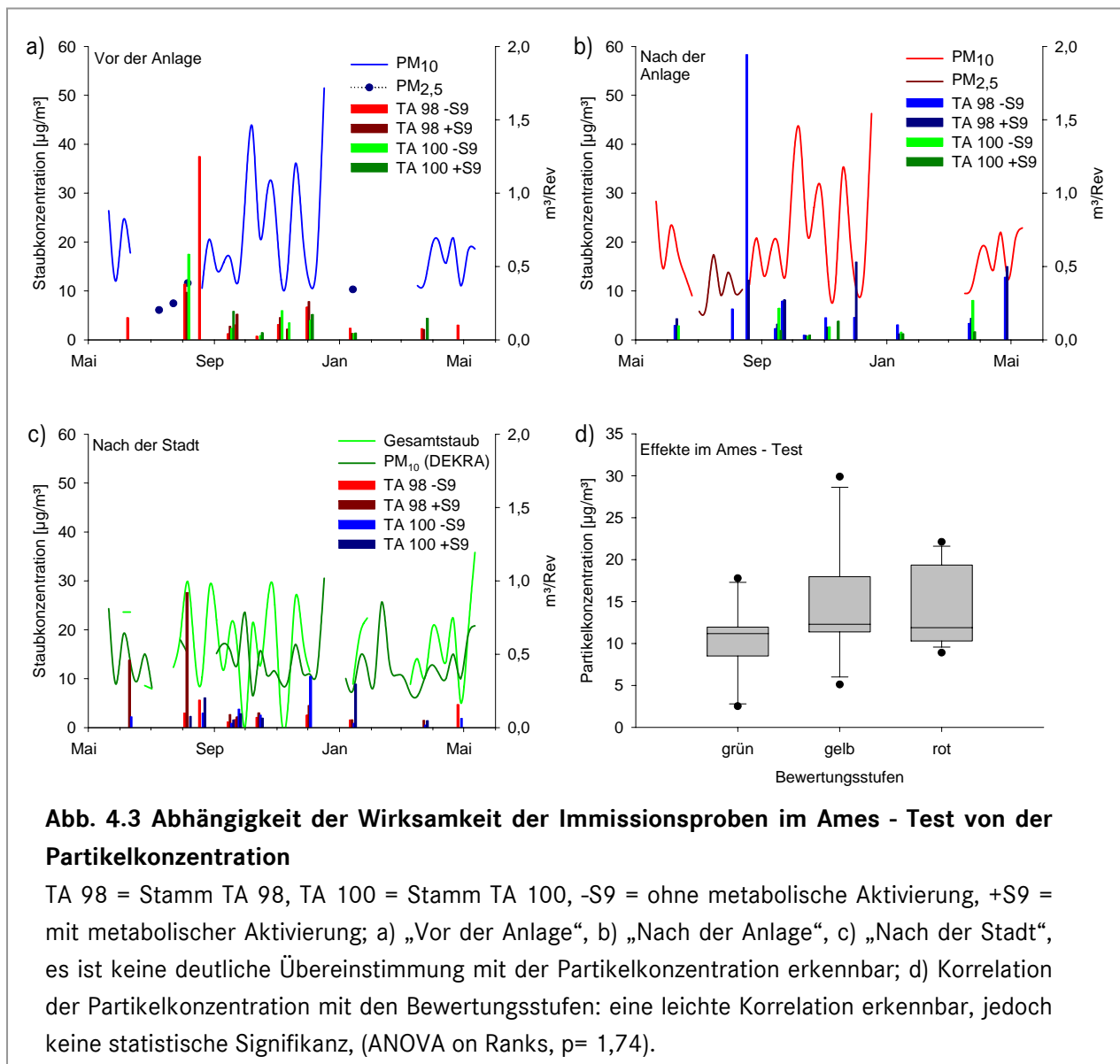
Abb. 4.2 Abhängigkeit der Wirksamkeit der Immissionsproben im Mikrokerntest von der Partikelkonzentration

Mikro = Ergebnisse der Betrachtung der induzierten Mikrokerne, Ano = Ergebnisse der Betrachtung der Anomalien, -S9 = ohne metabolische Aktivierung, +S9 = mit metabolischer Aktivierung; a) „Vor der Anlage“, b) „Nach der Anlage“, c) „Nach der Stadt“, es ist keine deutliche Übereinstimmung mit der Partikelkonzentration erkennbar; d) Korrelation der Partikelkonzentration mit den Bewertungsstufen: es ist keine Korrelation erkennbar, keine statistische Signifikanz (ANOVA on Ranks, $p = 0,726$).

Eine Korrelation der Partikelkonzentration und der Wirksamkeit der Proben ergab auch im Mikrokerntest keinen eindeutigen Zusammenhang. Studien aus Mexiko zeigen, dass sowohl organische Extrakte von Luftstäuben als auch die Stäube an sich die Bildung von Mikrokerneln induzieren (Roubicek et al. 2007). Eine Korrelation der Partikelkonzentration und Effekten im Mikrokerntest konnte in der vorliegenden Studie jedoch nicht gezeigt werden.

Ames - Test

Abbildung 4.3 fasst die Ergebnisse des Ames-Tests im Vergleich zur Partikelkonzentration zusammen.



Die Korrelation der Ergebnisse aus dem Ames-Test mit der Partikelkonzentration zur Zeit der Probenahme lässt eine Korrelation vermuten, die sich jedoch nicht statistisch beweisbar ist. Betrachtet man Abb. 4.3 d) erkennt man, dass die Bewertungsstufen gelb und rot tendenziell auf höhere Partikelkonzentrationen verteilt sind. Die Wirksamkeit der Proben im Ames-Test ist

deutlich mit der Konzentration an PAHs in der Luft korrelierbar (ElAssouli et al. 2007). Die Studie von ElAssouli et al. (2007) zeigte deutlich, dass die Probenahmestelle mit der höchsten PM_{10} Konzentration ($40 \mu\text{g}/\text{m}^3$) auch die Probenahmestelle mit der höchsten Revertanzahl pro m^3 (56 Revertanten pro m^3) aufwies. Des Weiteren konnten an dieser Probenahmestelle $0,83 \text{ ng}/\text{m}^3$ PAHs gemessen werden. Die Ergebnisse von ElAssouli et al. (2007) sind direkt mit den Ergebnissen der Proben der vorliegenden Studie vergleichbar. Da die Studien in Baden - Württemberg gezeigt hatten, dass Ergebnisse im Ames-Test mit der Stickoxidkonzentration korrelierbar sind (Erdinger et al. 1997), werden die Ergebnisse des Ames-Tests im folgenden Kapitel mit den Stickoxidkonzentrationen korreliert.

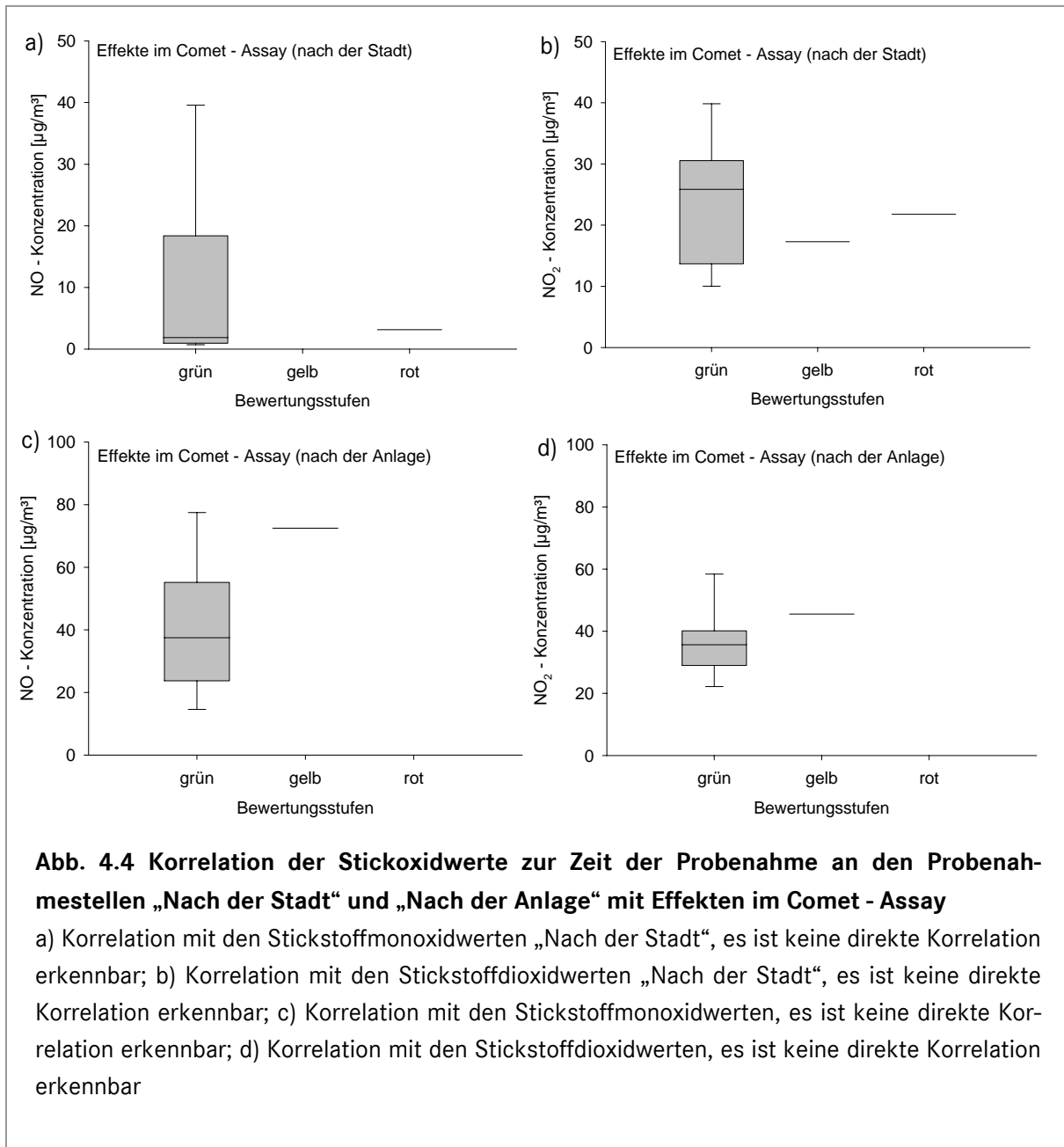
4.4.3 Abhängigkeit der gentoxischen Wirkung von der Stickoxidkonzentration zur Zeit der Probenahme

Eine Abhängigkeit der gentoxischen Wirksamkeit von der Stickoxidkonzentration in der Außenluft konnte nur im Mikrokerntest gezeigt werden. Das Potenzial Mikrokerne zu induzieren, ist mit der Konzentration an Stickstoffmonoxid in der Luft korrelierbar. Die Stickoxidkonzentrationen lieferten jedoch keinen Hinweis auf die Ursache für die gentoxische Wirkung der Proben in Comet - Assay und Ames-Test.

Studien, die in Baden - Württemberg durchgeführt worden waren, konnten zeigen, dass im Ames-Test die Wirksamkeit der Partikel mit der Stickoxidkonzentration zur Zeit der Probenahme korrelierbar ist (Erdinger et al. 2005). Um festzustellen, ob dies auch für die Proben aus der Immissionsmessung der vorliegenden Studie zutrifft und auch für die gemessenen Effekte in Comet - Assay und Mikrokerntest, wurden die gemessenen Ergebnisse mit den Stickoxidkonzentrationen zur Zeit der Probenahme korreliert. Für die Korrelation wurden einerseits die Ergebnisse der Proben von „Nach der Stadt“ verwendet, da die Messung der Stickoxidkonzentrationen an dieser Probenahmestelle von der Firma DEKRA GmbH durchgeführt wurde. Des Weiteren wurden die Ergebnisse der Proben von „Nach der Anlage“ mit den Stickoxidwerten einer Messstelle in unmittelbarer Nähe (Messung durch Firma DEKRA GmbH) korreliert.

Comet - Assay

Abbildung 4.4 fasst die Korrelation der Effekte im Comet - Assay mit der Stickstoffmonoxid- und der Stickstoffdioxidkonzentration zur Zeit der Probenahme zusammen.

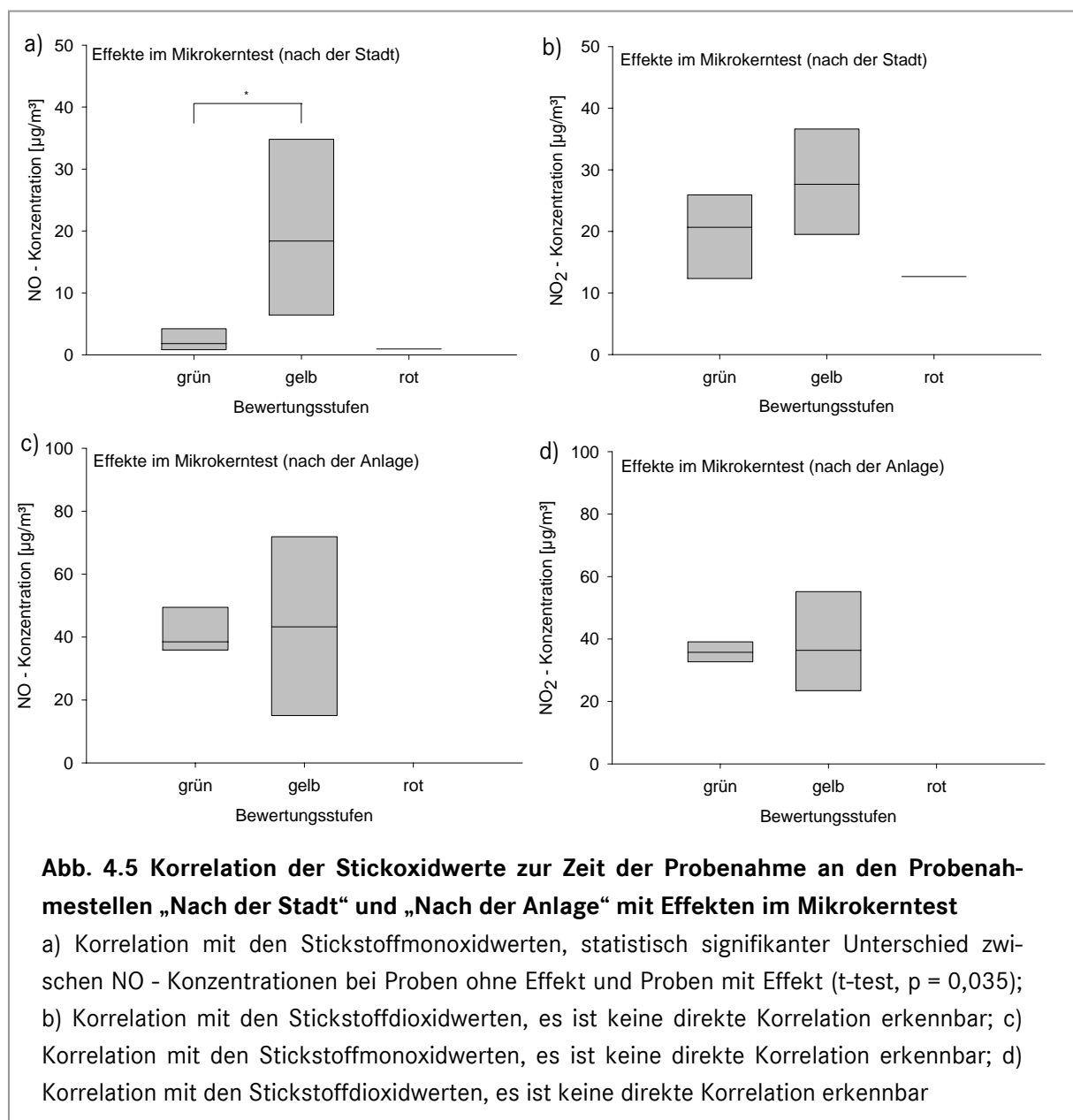


Die Proben, die nach der Stadt gesammelt worden waren zeigten genotoxische Effekte im Comet - Assay nur Ende September 2007 und Ende März 2008. Diese beiden aktiven Proben konnten nicht mit einer erhöhten Stickoxidkonzentration in Verbindung gebracht werden. Dass die Konzentration von Stickoxiden selbst keinen Einfluss auf die genotoxische Wirksamkeit hat, konnte in einer Studie aus Dänemark gezeigt werden (Bräuner et al. 2007). In dieser Studie wurden die Zellen zusätzlich mit Stickoxiden und Ozon begast. Erhöhte Stickstoffmonoxid- und Stickstoffdioxidwerte nach der Anlage konnten zur selben Zeit gemessen werden,

als Proben nach der Anlage gesammelt wurden, die einen Effekt im Comet - Assay zeigten. Dies zeigt einen Einfluss des Verkehrs auf die Luftqualität der Probenahmestelle „Nach der Anlage“. Die Stickoxidkonzentration kann als Marker für die Luftqualität herangezogen werden, daher werden auch die Ergebnisse der weiteren gentoxischen Tests mit der Stickoxidkonzentration korreliert.

Mikrokerntest

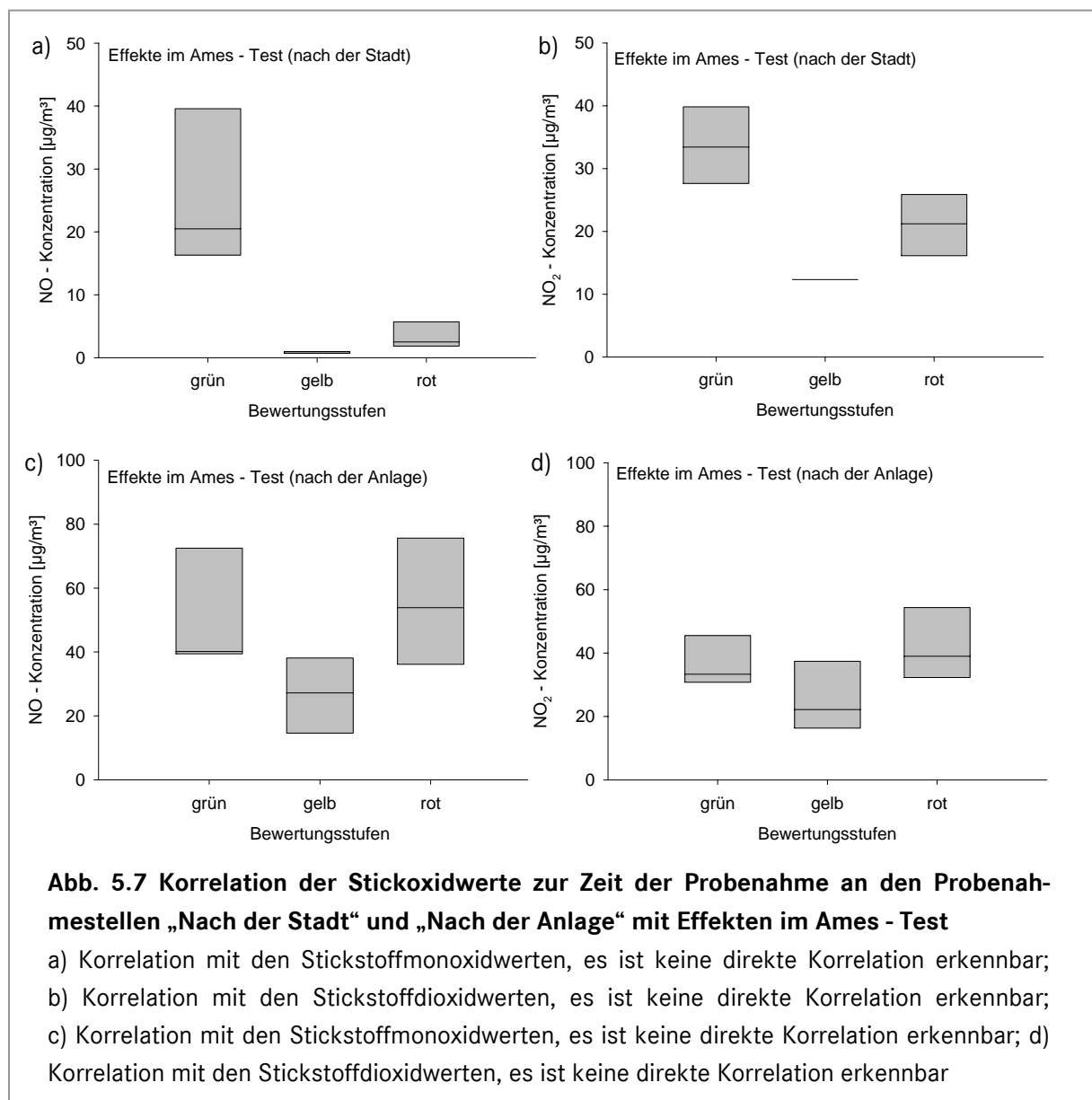
Abbildung 4.5 fasst die Korrelation der Effekte im Mikrokerntest mit der Stickstoffmonoxid- und der Stickstoffdioxidkonzentration zur Zeit der Probenahme zusammen.



Die Korrelation der Stickoxidwerte mit den Bewertungsstufen der Bioassays zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,035$) zwischen der Probengruppe, die keinen Effekt im Mikrokerntest zeigte und der Gruppe, die einen Effekt zeigte. Effekte im Mikrokerntest konnten bei erhöhten Stickstoffmonoxidwerten festgestellt werden. Sehr starke Effekte konnten im Mikrokerntest nur in einer Probe von „Nach der Stadt“ ermittelt werden. Dieser Effekt konnte nicht mit der Stickstoffmonoxidkonzentration in Verbindung gebracht werden. Die Korrelation mit den Stickstoffdioxidwerten zur Zeit der Probenahme erbrachte kein Ergebnis. Die Korrelation der Ergebnisse aus den Mikrokerntests mit den Proben von „Nach der Anlage“ ergab keinen Zusammenhang. Weitere mögliche Ursachen für die Effekte werden in den folgenden Kapiteln (Kap. 4.4.4 und 4.4.5) diskutiert.

Ames-Test

Abbildung 4.6 fasst die Korrelation der Effekte im Mikrokerntest mit der Stickstoffmonoxid- und der Stickstoffdioxidkonzentration zur Zeit der Probenahme zusammen.



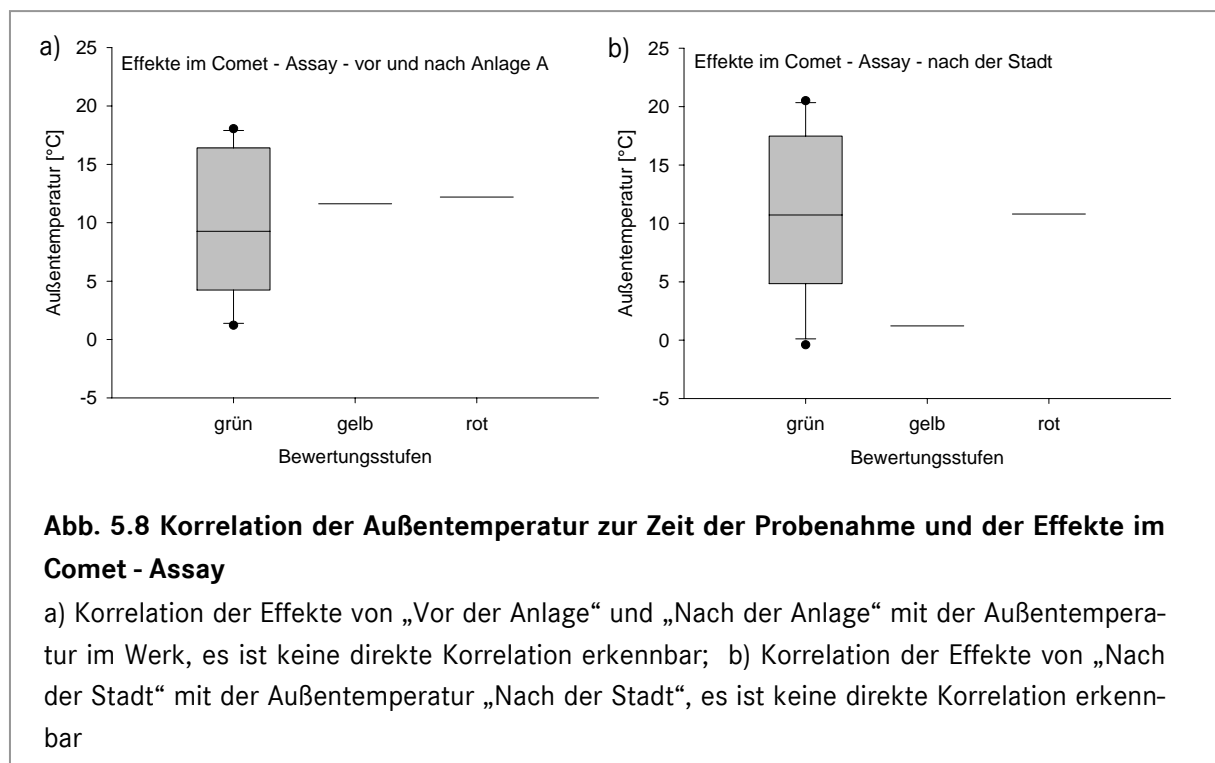
Eine direkte Korrelation zwischen den Stickoxidwerten und den Effekten im Ames-Test konnte bei den Proben von „Nach der Stadt“ und von „Nach der Anlage“ im Gegensatz zur Studie von Erdinger et al. (2005) nicht bestimmt werden. Starke Effekte im Ames-Test traten bei niedrigen Stickoxidkonzentrationen auf, während Proben, die zu einer Zeit gesammelt wurden in der hohe Stickoxidkonzentrationen gemessen wurden, keine mutagenen Effekte auslösten. Um einen Zusammenhang der Mutagenität mit saisonalen Unterschieden (Sommer - Winter) zu ermitteln, wurden die Ergebnisse im folgenden Kapitel mit der Außentemperatur korreliert.

4.4.4 Abhängigkeit der gentoxischen Wirkung von der Außentemperatur zur Zeit der Probenahme

Die Auftragung der Ergebnisse nach den Jahreszeiten ergab Häufungen gentoxischer Effekte in kalten Monaten. Um zu ermitteln, ob diese These der Wahrheit entspricht, wurden die Effekte mit der Außentemperatur zum Probenahmezeitraum korreliert.

Comet - Assay

Abbildung 4.7 fasst die Korrelation der Effekte im Comet - Assay mit der Außentemperatur zur Zeit der Probenahme zusammen.

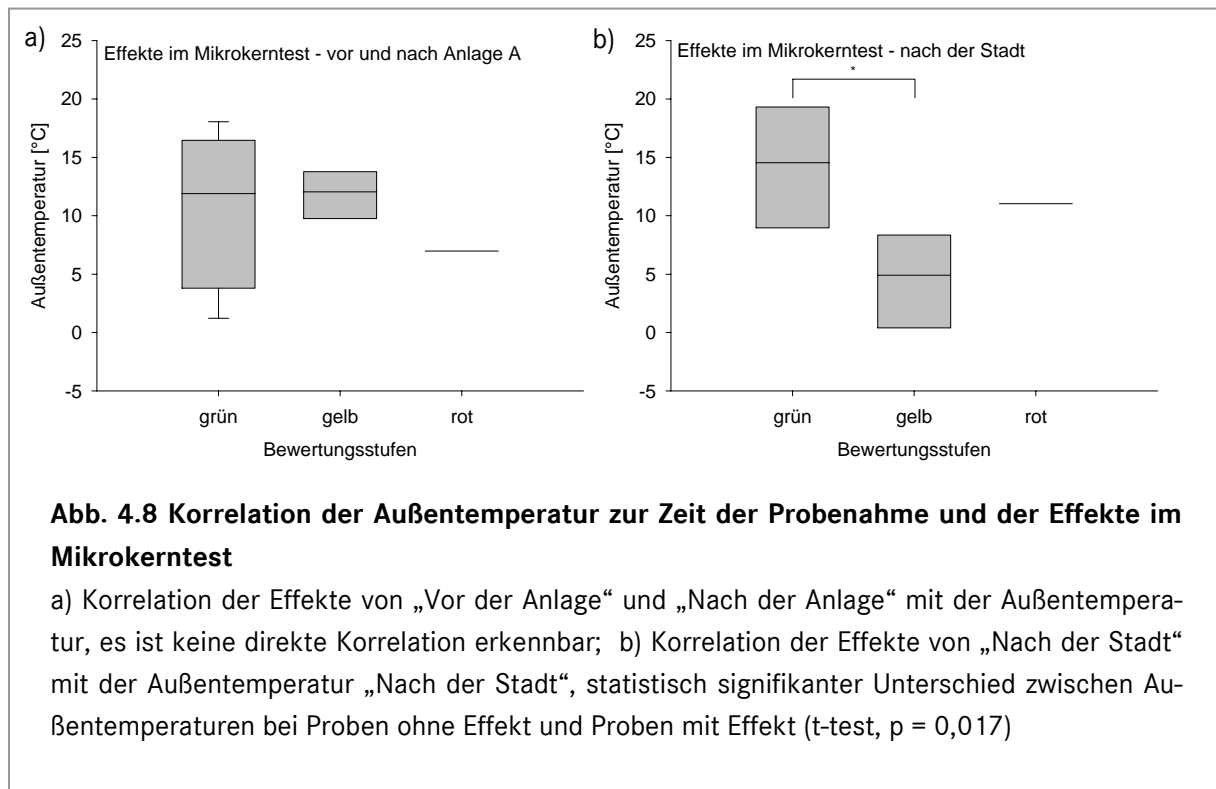


Für die Ergebnisse des Comet - Assay war keine Korrelation mit der Außentemperatur erkennbar. Weder die Effekte bei der Anlage (Abb. 5.8 a) noch die „Nach der Stadt“ (Abb. 5.8 b) konnten durch die Außentemperatur erklärt werden. Eine Studie aus Frankreich konnte dagegen zeigen, dass Effekte im Comet - Assay durch Proben die im Winter gesammelt worden

waren deutlich stärkere Effekte aufwiesen als Proben, die im Sommer gesammelt wurden (Chakra et al. 2007). Eine Erklärung für diese Effekte lieferte die Studie nicht.

Mikrokerntest

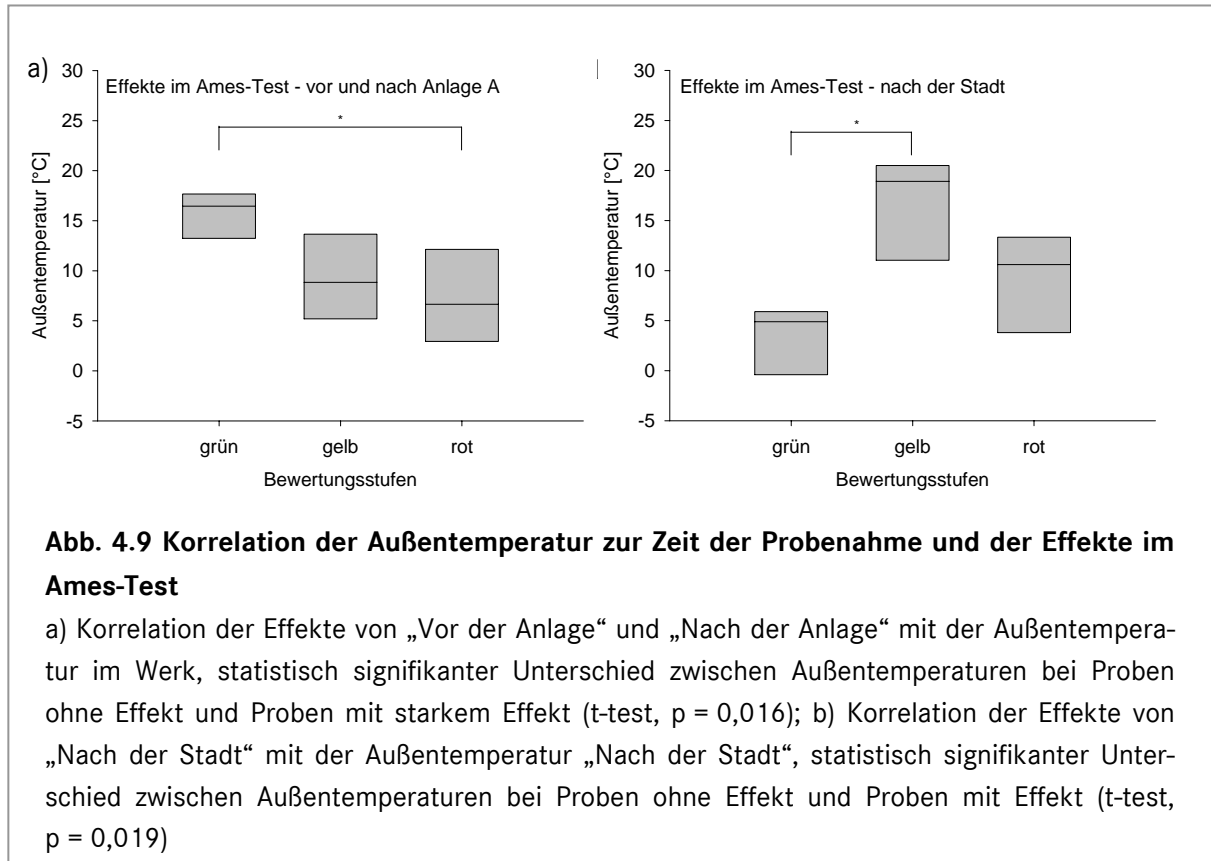
Abbildung 4.8 fasst die Korrelation der Effekte im Mikrokerntest mit der Außentemperatur zur Zeit der Probenahme zusammen.



Im Gegensatz zum Comet - Assay konnte im Mikrokerntest ein statistisch signifikanter Unterschied (t-test, $p = 0,017$) „Nach der Stadt“ zwischen den Außentemperaturen, die bei der Sammlung von Proben gemessen wurden, die keinen Effekt zeigten und den Außentemperaturen zur Zeit der Probenahme von Proben die einen Effekt im Mikrokerntest aufwiesen. Dabei zeigte sich „Nach der Stadt“ deutlich, dass je kälter die Temperaturen waren, desto stärker waren die Effekte. Da sehr starke Effekte nur in einem Fall auftraten, konnte die Temperaturkorrelation zu sehr starken nicht durchgeführt werden. Die Proben, die vor und nach der Anlage gesammelt worden waren, zeigten keine Abhängigkeit von der Außentemperatur zur Zeit der Sammlung. Die Diskussion dieser Erkenntnis erfolgt in Kapitel 4.4.5.

Ames-Test

Abbildung 4.9 fasst die Korrelation der Effekte im Ames-Test mit der Außentemperatur zur Zeit der Probenahme zusammen.



Die Ergebnisse des Ames-Tests mit den Proben bei Anlage A zeigten eine Korrelation zwischen der Außentemperatur und sehr starken Effekten. Vor und nach der Anlage konnten sehr starke Effekte im Ames-Test bei statistisch signifikant kälteren Außentemperaturen festgestellt werden. Die Proben von „Nach der Stadt“ zeigten ein anderes Bild. Hier konnten Effekte im Ames-Test bei statistisch signifikant höheren Temperaturen festgestellt werden, als bei niedrigen Temperaturen. Die Diskussion dieser Erkenntnisse erfolgt in Kapitel 4.4.5 beim Vergleich mit den Ergebnissen aus der Außenluft.

4.4.5 Diskussion der Ergebnisse der Außenluftproben aus der Beprobung der Prozesskette in Anlage A und Vergleich mit den Ergebnissen aus der Immissionsmessung

Neben der Beurteilung, ob entlang der Prozesskette der Anlagen ein ökotoxikologisches Potenzial entsteht, wurde auch das ökotoxikologische Potenzial der Außenluft betrachtet.

Die Außenluft vor Anlage A kann als wirksam in den gentoxischen Tests beurteilt werden. Die Wirksamkeit ist durch die chemische Zusammensetzung bedingt, da bereits eine geringe Menge an Partikeln ausreichend ist, ein gentoxisches Potenzial zu induzieren. Insbesondere

die Metalle Cadmium, Silber und Vanadium, die in der Außenluft gemessen wurden, sind wahrscheinlich für die gentoxischen Wirkungen verantwortlich (s. Kap. 4.1).

Die Außenluft vor Anlage B kann ebenfalls als gentoxisch wirksam eingestuft werden. Vor Anlage B ist die Wirksamkeit wahrscheinlich durch das Vorkommen der Metalle Cadmium, Mangan, Silber und Vanadium bedingt, da diese Metalle bekanntermaßen Mikrokerne induzieren und eine Fragmentierung der DNA auslösen (s. Kap. 4.2).

Die in der Außenluft gemessenen Metalle, denen eine gentoxische Wirkung zugesprochen wird, stammen wahrscheinlich aus den Hausfeuerungsanlagen der Städte in der Nähe der Anlagen. Eine Müllverbrennungsanlage in der Nähe könnte ebenfalls zu den gemessenen Metallkonzentrationen beitragen. Des Weiteren werden durch den angrenzenden Verkehr und die naheliegende Autobahn mit gentoxisch wirksamen Verbindungen beladene Partikel (Metalle und PAHs) in die Außenluft eingetragen.

Bewertung der Außenluft vor Anlage A

Die Außenluft vor Anlage A kann als wirksam in den gentoxischen Tests beurteilt werden. Die Wirksamkeit in Comet - Assay und Mikrokerntest ist wahrscheinlich durch das Vorkommen der Metalle Cadmium, Silber und Vanadium bedingt, da diese Metalle bekanntermaßen Mikrokerne induzieren und eine Fragmentierung der DNA auslösen. Die Effekte im Ames - Test konnten durch die Elementzusammensetzung nicht erklärt werden. Im Vergleich zu anderen Messstellen fallen die Metallkonzentrationen in der Außenluft gering aus. Um weitere Verbindungen, die für die Wirksamkeit verantwortlich sein könnten zu identifizieren, wurde eine chemische Fraktionierung einzelner Proben mit anschließender gaschromatographischer Analyse mit gekoppeltem Massenspektrometer durchgeführt. Diese Analyse ergab keinen Hinweis auf gentoxisch wirksame Verbindungen in der Außenluft. Daher wird von einer Wirksamkeit der beschriebenen Metalle ausgegangen. Die Diskussion der Herkunft dieser Metalle erfolgt nach dem Vergleich mit den Proben aus der Außenluft vor Anlage B (s. u.).

Tabelle 4.25 fasst die nach Kapitel 4.1.2 bewerteten Ergebnisse aus Szenario 1 (*In der Anlage*) für die Außenluftproben vor Anlage A zusammen.

Tab. 4.25 Abschließende Bewertung der Außenluft in Szenario 1, Anlage A
 grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt

	Anlage AI	Anlage All
Cytotoxizität	grün	grün
Comet - Assay	grün	gelb
Mikrokerntest	grün	rot
Ames - Test	rot	gelb

Die Außenluft vor Anlage AI zeigte weder im Cytotoxizitätstest noch im Comet - Assay oder Mikrokerntest einen relevanten Effekt. Eine hohe mutagene Wirksamkeit der Außenluftproben konnte jedoch im Ames-Test festgestellt werden. In der Außenluft vor Anlage All hingegen konnten zusätzlich Effekte im Comet - Assay und im Mikrokerntest gefunden werden.

Die unterschiedliche Wirkung der Außenluftproben beider Anlagenteile kann ihren Ursprung in der räumlichen Distanz haben. Da die Proben nicht zeitgleich gesammelt wurden, können jedoch auch klimatische Bedingungen dazu beigetragen haben. Die Ergebnisse der Außenluft wurden daher wieder in ihre Einzelproben aufgetrennt und nochmals bewertet (Tab. 4.26).

Tab. 4.26 Abschließende Bewertung der Außenluft in Szenario 1 nach Auftrennung in Einzelproben, Anlage A
 grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt

	Anlage AI			Anlage All		
	Sep. 06	Okt. 06	Feb. 07	Aug. 06	Okt. 06	Feb. 07
Cytotoxizität	grün	grün	grün	grün	grün	gelb
Comet - Assay	grün	grün	grün	grün	grün	rot
Mikrokerntest	grün	grün	grün	grün	gelb	rot
Ames-Test	gelb	rot	rot	grün	rot	rot

Insbesondere vor Anlage All ist deutlich zu erkennen, dass die Proben in den kalten Monaten (Oktober und Februar) ein deutlich höheres ökotoxikologisches Potenzial aufweisen, als in

dem Sommermonat (August). Auch in Anlage AI zeigen die Proben aus Oktober und Februar eine stärkere mutagene Wirkung als die Probe aus dem September 2006.

Die Ergebnisse des Ames-Tests wurden bereits im Vergleich zu den Proben der Kälbelescheuer (s. Kap. 3.2.6) bewertet. Sie zeigen, dass die Proben aus der Außenluft deutlich stärker mutagen wirksam sind als die Waldluft aus dem Schwarzwald. Weitere Studien zur Wirkung von Luftstäuben im Ames-Test zeigen, dass die mutagene Wirkung von Luftstäuben starken saisonalen Schwankungen unterliegt mit Spitzen der mutagenen Wirkung von Stäuben, die in den kalten Jahreszeiten gesammelt worden waren (Erdinger et al. 2005).

Die Betrachtung der Effekte der Proben in Szenario 2 (*Immissionsprognose*) zeigte, dass in der Außenluft, im Gegensatz zur Abluft die Qualität der Partikel entscheidend ist und nicht die Quantität (Kap. 4.1.2). Daher wurden chemische Analysen der Proben aus der Außenluft durchgeführt. Dabei konnten saisonale Unterschiede bei der Beprobung auch in der Elementzusammensetzung festgestellt werden (s. Kap 3.3.8). Tabelle 4.27 fasst die Elementkonzentrationen in den unterschiedlichen Probenahmemonaten zusammen.

Tab. 4.27 Elementzusammensetzung der Außenluftproben vor Anlage A in den unterschiedlichen Probemonaten, Einheit [pg/m³]

	Anlage AI [pg/m ³]			Anlage All [pg/m ³]		
	Sep. 06	Okt. 06	Feb. 07	Aug. 08	Okt. 06	Feb. 07
Arsen	31,1	36,6		24,8	28,8	52,6
Cadmium			42,2		84,1	131,1
Selen			40,8			98,3
Barium		634,2				
Zink	3296	4378	2478	563,8	6017	16006
Rubidium		44,1			113,2	105,8
Silber					38,8	47,1
Vanadium					34,6	140,3
Molybdän	145,9		39,4	145,7	99,7	69,9
Thallium			1,2		2,2	3,2

Einzelne Elemente, denen ein gentoxisches Potenzial zugesprochen wird (Cadmium, Silber und Vanadium) traten vor Anlage AI im Februar 2007, vor Anlage All im Oktober 2006 und im Februar 2007 auf.

Die Inhalation von Vanadiumpentoxid führte zur DNA Fragmentierung von Leukozyten im Blut von Arbeitern (Ehrlich et al. 2008). Die Fragmentierung der DNA und die Induktion von Mikrokernen durch Cadmium ist schon sehr lange bekannt und konnte auch in der Zelllinie V79 gezeigt werden (Seelbach et al. 1993; Jianhua et al. 2006). Auch Silber-Nanopartikel induzieren die Bildung von Mikrokernen (AshaRani et al. 2009). Des Weiteren konnte eine Studie belegen, dass inerte Titandioxidpartikel, die mit Vanadiumpentoxid beschichtet worden waren, ebenfalls Mikrokern in V79 Zellen induzierten (Bhattacharya et al. 2008). Eine mutagene Wirksamkeit von Cadmiumchlorid, Vanadiumpentoxid oder Silberiodid im Ames-Test konnte nicht nachgewiesen werden (Lewis et al. 1996; Pesheva et al. 1997; Eliopoulos and Mourelatos 1998).

Daher sind wahrscheinlich die Elemente Cadmium, Silber und Vanadium für die gentoxische Wirksamkeit der Außenluftproben im Comet - Assay und Mikrokerntest verantwortlich, jedoch nicht für die Effekte im Ames-Test. Die Effekte im Ames-Test werden beim Vergleich zu den Proben aus der Immissionsmessung diskutiert (s. u.).

2007 betrug nach Daten des Luftmessnetzes von Mecklenburg-Vorpommern die Cadmiumkonzentration in Rostock 90 pg/m^3 (LUNG 2007). Weitere Studien zeigten Cadmiumkonzentrationen von $0,8 \text{ ng/m}^3$ und $3,3 \text{ ng/m}^3$ (Karar et al. 2006, Falta et al. 2008). Diese Werte lagen deutlich über den in dieser Studie gemessenen Konzentrationen.

Eine Vanadiumkonzentration von $10 - 90 \text{ ng/m}^3$ wird für typische städtische Gebiete angenommen (LUBW 1997). In der Außenluft vor Anlage All konnten $0,09 \text{ ng/m}^3$ gemessen werden.

Insgesamt sind die gemessenen Elementkonzentrationen in den Außenluftproben deutlich geringer als an vergleichbaren Standorten. Wahrscheinlich ist die Ursache dafür in der acetonischen Extraktion der Partikel zu suchen. Durch die Extraktion werden nur Elemente, die an organische Materie gebunden waren vom Filter abgelöst und gelangen in das Extrakt. Nichtsdestotrotz können die gemessenen Elemente einen Hinweis auf Ursache für die ermittelten gentoxischen Effekte geben. Insbesondere, da die Proben mit einem Vanadium- und Silbergehalt, sowie die Proben in denen Cadmium nachgewiesen wurde die höchsten Effekte in den Bioassays aufwiesen.

Zur Analyse weiterer Verbindungen wurde eine chemische Fraktionierung von Außenluftproben, die im Oktober 2006 gesammelt worden waren, mit anschließender gaschromatographischer Analyse mit gekoppeltem Massenspektrometer durchgeführt. Die Fraktionen wurden im Cytotoxizitätstest und im Mikrokerntest auf ihre Wirksamkeit hin überprüft.

Der Cytotoxizitätstest ergab keine cytotoxische Wirkung (Überlebensrate gegen die Kontrolle von unter 50 %). Die Ergebnisse des Mikrokerntests sind in Tabelle 4.28 zusammengefasst.

Tab. 4.28 Bewertung der Ergebnisse aus dem Mikrokerntest nach Exposition mit den Fraktionen, Anlage A
grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt

	Anlage AI	Anlage All
Unfraktioniert	grün	rot
Starke Säuren	gelb	gelb
Schwache Säuren	grün	grün
Neutrale Verbindungen	grün	grün
Basen	grün	grün

Die Außenluftprobe vor Anlage AI zeigte unfraktioniert keinen Effekt im Mikrokerntest. Durch die Fraktionierung konnte jedoch ein gentoxisches Potenzial in der Fraktion der starken Säuren ermittelt werden. Ebenfalls gentoxisch wirksam im Mikrokerntest waren die unfraktionierte Probe und die Fraktion der starken Säuren aus der Probe der Außenluft vor Anlage All. Da durch die Zugabe der Proben keine Verfärbung des Mediums auftrat, das eine Verschiebung des pH Wertes anzeigt, sind Effekte durch eine pH-Wert Verschiebung durch die starken Säuren auszuschließen. Die Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse mit gekoppeltem Massenspektrometer der aktiven Fraktionen werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

In der Fraktion der starken Säuren konnten 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentan-2-on und drei Siloxane gefunden werden.

Um die Exposition an Siloxanen und deren Wirksamkeit zu untersuchen, wurden diese Verbindungen in die „Priority Testing List“ der „Environmental Protection Agency (EPA)“ aufgenommen. Studien zu den dort aufgeführten Substanzen wurden von diversen Laboren durchgeführt und in einem Report zusammengestellt (EPA 1992). Die drei in der Fraktion der starken Säuren gefunden Siloxane (Hexamethylcyclotrisiloxan, Octamethylcyclotetrasiloxan und Decamethylcyclopentasiloxan) konnten in der Außenluft verschiedener Standorte nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der mutagenen Wirksamkeit der Siloxane wurden Studien diverser gentoxischer Tests herangezogen. Hexamethylcyclotrisiloxan und Decamethylcyclopentasiloxan erwiesen sich in allen Tests als negativ. Octamethylcyclotetrasiloxan dagegen zeigte mutagene Effekte in einem Test zur Gentoxizität (*chromosomal aberration test in mouse lymphoma*) nach metabolischer Aktivierung durch S9. Ohne metabolische Aktivierung konnte keine Gentoxizität dieser Verbindung festgestellt werden. Die Fraktion der starken Säuren aus

der Außenluft vor Anlage A1 zeigte jedoch nur im Ansatz ohne metabolische Aktivierung ein Potenzial Zellkernanomalien auszulösen, so dass Octamethylcyclotetrasiloxan wahrscheinlich nicht die wirksame Komponente darstellt.

Da 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentan-2-on unter Einfluss basischer Reagenzien durch die Dimerisierung zweier Acetonmoleküle entsteht, ist dieses Molekül wahrscheinlich durch die chemische Aufbereitung der Luftfilter entstanden. Eine gentoxische Wirkung dieser Verbindung ist nicht bekannt.

Die Analyse der Verbindungen der Fraktion „starke Säuren“ aus der Probe „Außenluft vor Anlage A11“ erbrachte folgende Verbindungen: 3,4-Dimethyl-2-penten und Octamethylcyclotetrasiloxan.

3,4-Dimethyl-2-penten konnte weder einer bestimmten Verwendung zugewiesen werden, noch als gentoxisch wirksam bewertet werden. Octamethylcyclotetrasiloxan wurde bereits in der Fraktion der starken Säuren aus der Außenluft vor Anlage A1 gefunden und an dieser Stelle diskutiert.

Bewertung der Außenluft vor Anlage B

Die Außenluft vor Anlage B kann ebenfalls, wie die Außenluft vor Anlage A, als gentoxisch wirksam eingestuft werden. Wie auch vor Anlage A ist die Wirksamkeit wahrscheinlich durch das Vorkommen der Metalle Cadmium, Mangan, Silber und Vanadium bedingt, da diese Metalle bekanntermaßen Mikrokerne induzieren und eine Fragmentierung der DNA auslösen. Die Effekte im Ames-Test konnten durch die Elementzusammensetzung nicht erklärt werden. Im Vergleich zu anderen Messstellen aus der Literatur fallen die Metallkonzentrationen in der Außenluft gering aus. Um weitere Verbindungen, die für die Wirksamkeit verantwortlich sein könnten zu identifizieren, wurde eine chemische Fraktionierung einzelner Proben durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen wiesen keine Wirksamkeit im Mikrokerntest auf. Daher wird von einer Wirksamkeit der beschriebenen Metalle ausgegangen.

Im Vergleich zu Anlage A wirkte die Außenluft vor dem Wärmetauscher vor Anlage B ähnlich gentoxisch wie die Außenluft vor Anlage A11.

Die abschließende Bewertung der Außenluftproben vor Anlage B in Szenario 1 ist in Tabelle 4.29 zusammengefasst.

Tab. 4.29 Abschließende Bewertung der Außenluft in Szenario 1, Anlage B
 grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt

	Anlage BI	Anlage BII
Cytotoxizität	grün	grün
Comet - Assay	grün	grün
Mikrokerntest	gelb	grün
Ames - Test	rot	gelb

Die unterschiedliche Wirkung der Außenluftproben vor beiden Anlagenteilen kann ihren Ursprung in der räumlichen Distanz haben. Da die Proben nicht zeitgleich gesammelt wurden, können jedoch auch klimatische Bedingungen dazu beigetragen haben. Die Ergebnisse der Außenluft wurden daher wieder in ihre Einzelproben aufgetrennt und nochmals bewertet (Tab. 4.30).

Tab. 4.30 Abschließende Bewertung der Außenluft in Szenario 1 nach Auftrennung in Einzelproben, Anlage B
 grün = kein Effekt, gelb = Effekt, rot = starker Effekt

	Anlage BI		Anlage BII	
	Okt. 06	Nov. 06	Nov. 06	Dez. 06
Cytotoxizität	grün	grün	grün	grün
Comet - Assay	grün	grün	grün	gelb
Mikrokerntest	gelb	gelb	grün	gelb
Ames - Test	gelb	rot	gelb	rot

Insbesondere ist vor Anlage B, wie vor Anlage A, in Anlagenabschnitt II deutlich zu erkennen, dass die Proben von Dezember ein deutlich höheres ökotoxikologisches Potenzial aufweist, als von November. Auch in Anlagenteil I zeigt die Probe aus dem Oktober eine geringere mutagene Wirkung als die Probe aus dem November.

Die Ergebnisse des Ames-Tests wurden, wie in Anlage A, bereits im Vergleich zu den Proben der Kälbelescheuer (s. Kap. 3.2.6) bewertet. Sie zeigen, dass die Proben aus der Außenluft deutlich stärker mutagen wirksam sind als die Waldluft aus dem Schwarzwald. Weitere Studien zur Wirkung von Luftstäuben im Ames-Test zeigen, dass die mutagene Wirkung von Luftstäuben starken saisonalen Schwankungen unterliegt mit Spitzen der mutagenen Wirkung von Stäuben, die in den kalten Jahreszeiten gesammelt worden waren (Erdinger et al. 2005).

Die Betrachtung der Effekte der Proben in Szenario 2 zeigte, dass in der Außenluft, im Gegensatz zur Abluft die Qualität der Partikel entscheidend ist und nicht die Quantität (Kap. 4.1.2). Daher wurden chemische Analysen der Proben aus der Außenluft durchgeführt. Dabei konnten saisonale Unterschiede bei der Beprobung auch in der Elementzusammensetzung festgestellt werden (s. Kap 3.3.8). Tabelle 4.31 fasst die Elementkonzentrationen für Anlage B in den unterschiedlichen Probenahmemonaten zusammen.

Tab. 4.31 Elementzusammensetzung der Außenluftproben aus Anlage B in den unterschiedlichen Probemonaten, Einheit [pg/m³]

	Anlage BI [pg/m ³]		Anlage BII [pg/m ³]	
	Okt. 06	Nov. 06	Nov. 06	Dez. 06
Arsen	24,5	38,8		31,8
Cadmium		107		86,6
Mangan	1450			
Selen		111,1		122,6
Zink	22715	12267		10772
Rubidium	59,4			
Silber	53,9			
Vanadium	32,2			32,6
Molybdän	262,5	560,7		
Thallium		1,1		1,4

Einzelne Elemente, denen ein gentoxisches Potenzial zugesprochen wird (Cadmium, Mangan, Silber, und Vanadium) treten in Anlage BI im Oktober und November 2006, in Anlage BII im Dezember 2006 auf. Keine Elemente konnten in der Probe aus der Außenluft vor Anlage BII, die im November 2006 gesammelt worden war, nachgewiesen werden.

Die gentoxische Wirkung von Cadmium, Vanadium und Silber wurde bereits in der Diskussion der Außenluftproben vor Anlage A beschrieben. Mangan konnte in der Außenluft nur vor Anlage BI, die im Oktober 2006 gesammelt worden war, nachgewiesen werden. Leukozyten aus Ratten, die Mangan ausgesetzt waren zeigten keinen Effekt im Comet - Assay (Miller et al. 2006), jedoch konnte gezeigt werden, dass Mangan die Bildung von Mikrokernen in der in dieser Studie verwendeten Zelllinie (V79) induziert (Snyder and Friedman 1998). Eine normale Konzentration an Mangan in städtischer Luft liegt bei 20 - 100 ng/m³ (Umweltbundesamt 1999), so dass die gemessene Konzentration in der Außenluft vor Anlage BI (1,45 ng/m³) weit unter der normalen städtischen Luft liegt.

Auch für die Proben vor Anlage B gilt, dass die gemessenen Konzentrationen der Elemente deutlich unter den Werten anderer Studien lagen. Wie auch vor Anlage A ist dafür wahrscheinlich die acetonische Extraktion der Luftextrakte verantwortlich.

Da die Probenahme vor Anlage B im Winter (23.10.2006 bis 15.12.2006) statt fand, könnte auch die kalte Temperatur und deren Folgen für die starken Effekte in den gentoxischen Tests verantwortlich sein. Diese Theorie wird beim Vergleich der Ergebnisse aus der Außenluft mit den Immissionsmessungen diskutiert (s. u.).

Zur weiteren Ursachenfindung wurden Proben aus der Außenluft vor Anlage B nach Säure-Base-Eigenschaften fraktioniert und anschließend auf ihre Wirksamkeit im Mikrokernstest untersucht.

Tabelle 4.32 fasst die Bewertung der Ergebnisse des Mikrokernstests mit den Fraktionen der Proben aus Anlage B zusammen.

Tab. 4.32 Bewertung der Ergebnisse aus dem Mikrokernstest nach Exposition mit den Fraktionen, Anlage B
grün = kein Effekt, gelb = Effekt

	Anlage BI Außenluft	Anlage BII Außenluft
Unfraktioniert	gelb	gelb
Starke Säuren	grün	grün
Schwache Säuren	grün	grün
Neutrale Verbindungen	grün	grün
Basen	grün	grün

Die Fraktionen der Außenluftproben vor Anlage B zeigten keine gentoxische Wirkung im Mikrokernstest.

Herkunft der analysierten Metalle und Vergleich der Ergebnisse aus der Außenluft mit den Ergebnissen aus der Immissionsmessung

Die gemessenen Metalle in der Außenluft denen eine gentoxische Wirkung zugesprochen wird, stammen wahrscheinlich aus den Hausfeuerungsanlagen der angrenzenden Städte. Die Müllverbrennungsanlage in der Nähe von Anlage A könnte ebenfalls zu den gemessenen Metallkonzentrationen beitragen. Des Weiteren werden durch den Verkehr und die naheliegende Autobahn mit gentoxisch wirksamen Verbindungen beladene Partikel (Metalle und PAHs) in die Außenluft eingetragen. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen aus der Immissionsmessung wider.

In der Umgebungsluft gemessene Cadmiumkonzentrationen stammen nach einem Bericht der WHO (2000) zu 9,3 % aus natürlichen Emittenten, zu 20,4 % aus der Nichteisen-Metallindustrie, zu 17,9 % aus der Verbrennung von Öl, zu 17,5 % aus der Müllverbrennung, zu 15,3 % aus der Eisen und Stahlindustrie, zu 13,4 % aus der Kohleverbrennung, zu 4,4 % aus der Zementerzeugung und zu 1,8 % aus anderen Quellen (WHO 2000 a). Vanadiumemissionen entstehen bei der Metallherstellung und bei der Bearbeitung von Metall bei hohen Temperaturen. Hauptemittent weltweit sind Kraftwerke, die zur Erzeugung von Strom Kohle und Öl verwenden. In Deutschland wird Vanadium hauptsächlich bei der Verbrennung von Heizöl emittiert (LUBW 1997). Mangan wird hauptsächlich in metallurgischen Prozessen verwendet, jedoch auch als Öl- und Kraftstoffadditiv eingesetzt, so dass durch den Verkehr Mangan in die Luft emittiert wird (WHO 2000 b). Silberemissionen haben ihren Ursprung in Schmelzprozessen, Herstellung und Entsorgung von Geräten zur Photographie, der Verbrennung von Kohle und Öl und dem Animpfen von Wolken zur Verhinderung von Hagelniederschlägen (Silberiodid).

Alle beschriebenen Metalle werden auch bei der Verbrennung von Heizöl freigesetzt, so dass das vermehrte Auftreten dieser Metalle in den kalten Monaten wahrscheinlich hauptsächlich den Hausfeuerungsanlagen der Städte zugewiesen werden kann. Dies erklärt außerdem die starken gentoxischen Effekte in den kalten Monaten in der Außenluft vor Anlage A. Des Weiteren steht in der Nähe eine Müllverbrennungsanlage, die für die Cadmiumemissionen verantwortlich sein könnte. Das Heizkraftwerk in der Umgebung erzeugt Strom durch die Verbrennung von Erdgas und trägt somit nicht zu den gemessenen Metallkonzentrationen bei. Neben Metallen werden bei der Verbrennung in Hausfeuerungsanlagen polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs) frei, deren gentoxische Wirkung in vielen Studien belegt wurde (exemplarisch Borm et al. 2005; Botta et al. 2008; Jedrychowski et al. 2007; Perera et al. 2008). PAHs entstehen außerdem bei der Verbrennung von Kraftstoffen, so dass zu der Belastung der Außenluft durch die Hausfeuerungsanlagen auch die Autobahn in der Nähe und die Straße, die direkt an der Außenluftansaugung vorbeiführt, beitragen.

Auch für die Immissionsmessungen konnte gezeigt werden, dass die Effekte mit der Außentemperatur korrelierbar sind (s. Kap. 4.5.4). Statistisch signifikante Unterschiede in der Wirksamkeit bei unterschiedlichen Außentemperaturen konnte an der Probenahmestelle „Nach der Stadt“ für den Mikrokerntest gezeigt werden. Bei hohen Temperaturen zur Zeit der Probenahme konnten keine Effekte im Mikrokerntest gezeigt werden, bei niedrigeren Temperaturen konnten gentoxische Effekte im Mikrokerntest ermittelt werden. Im Ames - Test konnte für die Proben vor und nach der Anlage ebenfalls eine statistisch signifikante Abhängigkeit der Lufttemperatur und der Wirksamkeit festgestellt werden. Proben, die bei hohen Temperaturen gesammelt wurden, zeigten weniger Effekt im Ames-Test als Proben, die bei niedrigeren Temperaturen gesammelt worden waren. Die Emission von Luftschadstoffen durch Hausfeuerungsanlagen führte daher zu Effekten bei niedrigen Außentemperaturen. Im Gegensatz dazu konnte für die Proben von „Nach der Stadt“ gezeigt werden, dass Proben, die bei niedrigen Außentemperaturen gesammelt wurden, statistisch signifikant weniger mutagene Wirkung aufwiesen, als Proben, die bei höheren Temperaturen gesammelt worden waren. Dies zeigt, dass die mutagene Wirkung Proben von „Nach der Stadt“ durch andere Faktoren als die Proben von vor und nach der Anlage beeinflusst werden. Da es das Ziel dieser Studie war, den Einfluss der Anlage auf die Luftqualität der Stadt zu untersuchen und zu erklären, warum die Außenluft vor der Anlage gentoxisch wirksam ist, wurden keine chemische Analysen der Proben von „Nach der Stadt“ durchgeführt, die diesen Befund erklären könnten.

Die Probenahme vor Anlage B fand ebenfalls in den kalten Monaten (Ende Oktober bis Mitte Dezember) statt. Da auch die Anlage B direkt an einer Straße liegt, wird auch hier ein kombinierter Einfluss der Emissionen aus Hausfeuerungsanlagen und Verkehr angenommen, der zu gentoxisch wirksamen Extrakten aus Außenluftpartikeln führt.

Immunologische Wirkung der Außenluftproben vor Anlage A und B

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und andere koplanare Verbindungen, die in den Lungenzellen an den Arylhydrocarbon - Rezeptor binden, spielen eine große Rolle bei der erhöhten Interleukin-8 und verminderten Interleukin-6 Ausschüttungen. Durch die oben genannten Gründe ist es sehr wahrscheinlich, dass Verkehrsemissionen und die Emissionen aus Hausfeuerungsanlagen für die immunmodulatorische Wirkung verantwortlich sind und die Partikel, die mit den wirksamen Verbindungen beladen sind und immunmodulatorisch wirksam werden.

4.5.6 Einfluss der Abluftemission der Anlage auf die Luftqualität der Stadt

Durch die oben beschriebenen Erkenntnisse konnte gezeigt werden, dass die Abluft der Anlage bezüglich der untersuchten Endpunkte keinen Einfluss auf die Luftqualität der Stadt hat. Die Luftqualität wird durch den Verkehr und durch die Hausfeuerungsanlagen in kalten Monaten beeinflusst (s. Kap. 4.5.5).

Nach Angaben der Firma DEKRA Umwelt GmbH schlägt sich die Abluft aus der Anlage bei durchschnittlichen Wetterbedingungen an der Probenahmestelle „Nach der Anlage“ nieder. Da an der Messstelle „Nach der Anlage“ keine deutliche Verschlechterung der Luft im Vergleich zu „Vor der Anlage“ festgestellt werden konnte, hat die Abluft aus der Anlage keinen negativen Einfluss auf die Luftqualität der Stadt bezüglich der gemessenen Endpunkte.

4.5 Diskussion der verwendeten Methoden und Bewertungskriterien auf die Fragestellung

4.5.1 Durchführung einer acetonischen Extraktion

Zur Ermittlung der Wirkung der organischen Fraktion der Partikel wurde eine acetonische Extraktion durchgeführt. Aceton wird aufgrund seiner hohen Ausbeute an organischem Material empfohlen (Fried 2001). Neben dem Vorteil der Abbildung eines „worst-case“ Szenarios bietet die Extraktion den Vorteil, dass Effekte durch mechanische Reizungen der Zellen durch den Kontakt mit den Partikeln ausgeschlossen werden. Des Weiteren wird die Lunge von Mensch und Säugetieren von einer lipidreichen Schicht überzogen, dem Surfactant. Beim Kontakt von Partikeln mit dem Surfactant können sich organische Substanzen von den Partikeln ähnlich einer Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel lösen und mit den Lungenzellen direkt in Kontakt treten.

Ein Nachteil der acetonischen Extraktion besteht zum einen im Verlust leicht flüchtiger Verbindungen und der eventuellen Entstehung neuer Verbindungen durch die Extraktion. So konnte in der gaschromatographischen Analyse mit gekoppeltem Massenspektrometer die Verbindung Methylisobutylketon in mehreren Proben nachgewiesen werden. Diese Verbindung entsteht aus der Reaktion von Aceton mit Wasser in Gegenwart eines Katalysators und könnte daher ein Rückstand aus der Extraktion sein. Eine Wirksamkeit konnte dieser Verbindung in den verwendeten Assays nicht nachgewiesen werden, jedoch ist nicht auszuschließen, dass durch die Extraktion weitere Verbindungen entstehen, die ursprünglich nicht in der Luft nachweisbar wären.

Versuche, die mit acetonischen Extrakten durchgeführt wurden, haben daher eindeutige Vor- und Nachteile. Die Extraktion darf bei der Bewertung der Ergebnisse jedoch nie unberücksichtigt bleiben.

4.5.2 Variabilität der Zelllinie V79 in den verwendeten Tests auf Gentoxizität im Vergleich zur Zelllinie RTL

Die in dieser Studie verwendete Zelllinie V79 (*Chinese Hamster Lung*) wurde statt in vorbereitenden Versuchen verwendeten Zelllinie RTL-W1 (*Rainbow Trout Liver*) eingesetzt, um die Wirkung von Luftstäuben auf Säugerlungenzellen statt Fischleberzellen zu untersuchen. V79-Zellen sind Lungenfibroblasten, die sich durch ihre leichte Kultivierbarkeit auszeichnen und einen stabilen Karyotyp besitzen (Themis et al. 2003). Da sie jedoch im Gegensatz zu den

Fischleberzellen kein Enzymsystem zur Metabolisierung von Fremdstoffen exprimieren, ist man für Untersuchungen von eventuell entstehenden Metaboliten auf die Zugabe eines externen Enzymsystems angewiesen. Die Zugabe der Enzyme erfolgte nach ISO Norm 21427 - 1 (ISO 2004) durch Zugabe des sogenannten S9 - Mixes. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit und ohne metabolische Aktivierung zu verbessern, wurden die Zellen jedoch bei beiden Ansätzen für 24 Stunden exponiert. Die Exposition der Zellen durch den S9 - Mix hatte im Comet - Assay keinen Einfluss auf die Variabilität der Negativkontrollen (Abb. 4.10).

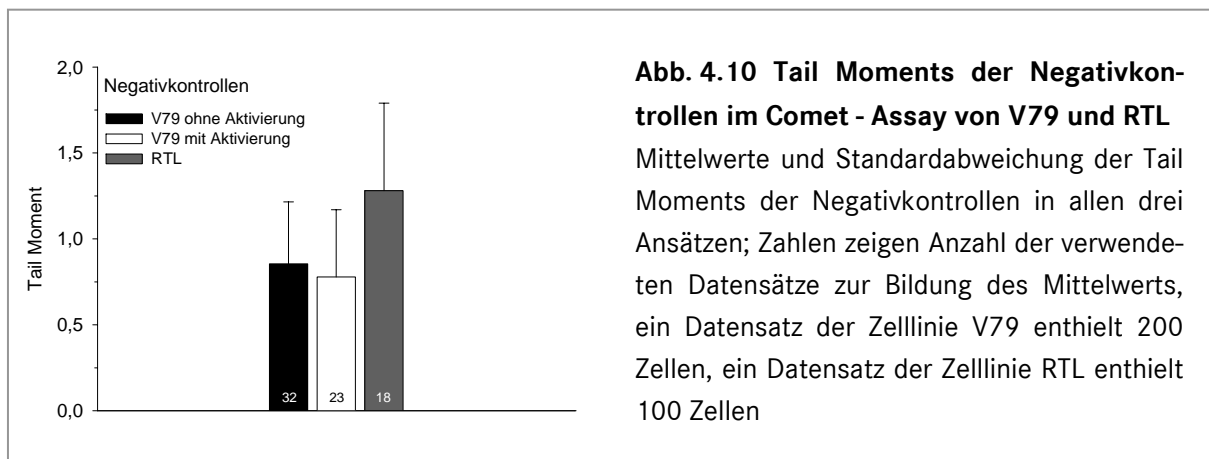


Abb. 4.10 Tail Moments der Negativkontrollen im Comet - Assay von V79 und RTL

Mittelwerte und Standardabweichung der Tail Moments der Negativkontrollen in allen drei Ansätzen; Zahlen zeigen Anzahl der verwendeten Datensätze zur Bildung des Mittelwerts, ein Datensatz der Zelllinie V79 enthielt 200 Zellen, ein Datensatz der Zelllinie RTL enthielt 100 Zellen

Die Zelllinie RTL zeigte einen deutlich höheren Grundeffekt der Negativkontrollen im Comet - Assay als die Zelllinie V79. Die Durchführung des Comet - Assays wirkte sich daher stärker auf die RTL Zellen aus als auf die V79 Zellen mit und ohne metabolische Aktivierung.

Ein anderes Bild zeigt sich jedoch bei der Betrachtung der Negativkontrollen aus dem Mikrokerntest (Abb. 5.12).

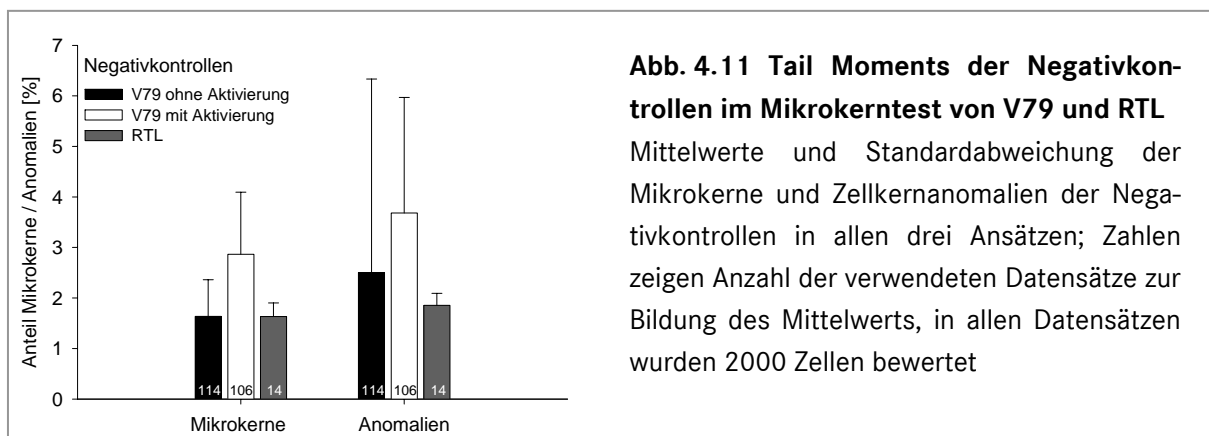


Abb. 4.11 Tail Moments der Negativkontrollen im Mikrokerntest von V79 und RTL

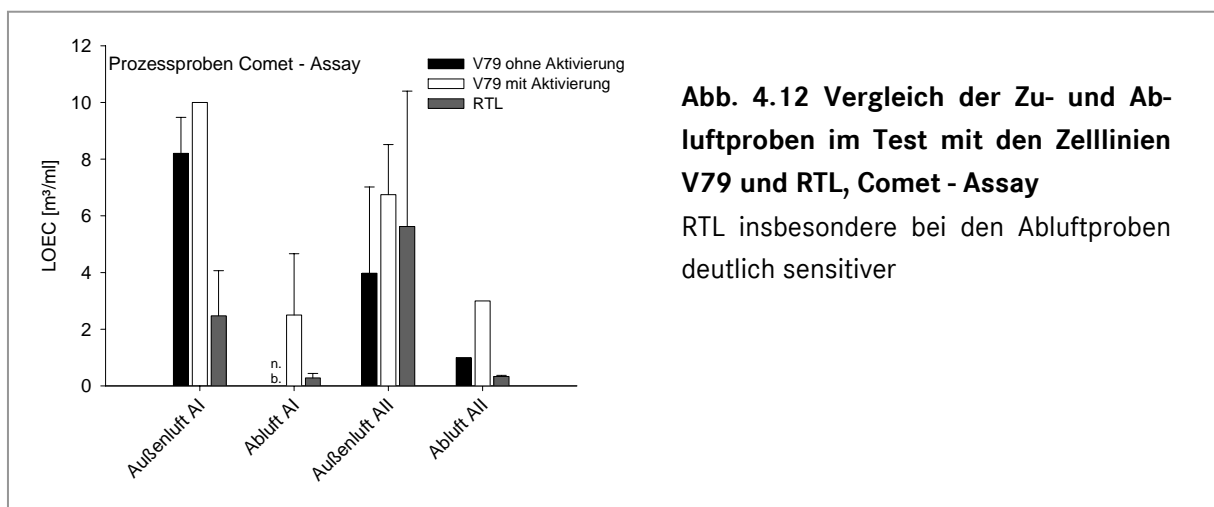
Mittelwerte und Standardabweichung der Mikrokerne und Zellkernanomalien der Negativkontrollen in allen drei Ansätzen; Zahlen zeigen Anzahl der verwendeten Datensätze zur Bildung des Mittelwerts, in allen Datensätzen wurden 2000 Zellen bewertet

Die Zelllinie RTL und die Zelllinie V79 im Ansatz ohne metabolische Aktivierung zeigen eine sehr geringe Variabilität bei der Induktion von Mikrokerne in den Negativkontrollen. Die Induktion von Mikrokerne steigt jedoch durch die Zugabe des S9 - Mixes zur metabolischen Aktivierung an. Dies könnte mit der verlängerten Expositionszeit durch den S9 - Mix zusammenhängen, da dieser auch als gentoxisch beschrieben wird (Müller-Tegethoff et al. 1997). Eine sehr hohe Variabilität weist die Betrachtung des Endpunkts „Zellkernanomalien“ auf. Sowohl im Ansatz ohne S9 - Mix als auch mit S9 - Mix zeigt die Zelllinie V79 große Schwan-

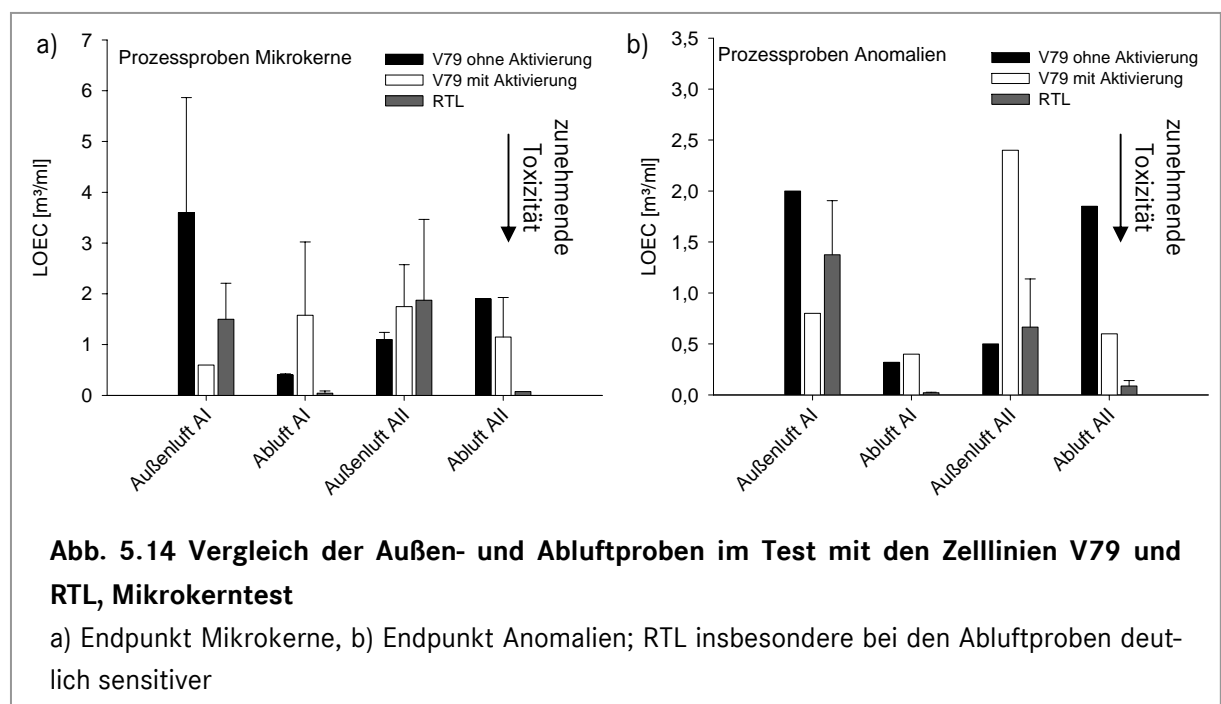
kungen der Anomalien in der Negativkontrolle. Dies konnte bei der Zelllinie RTL nicht beobachtet werden. Aufgrund der geringen Variabilität der Zelllinie RTL und der Möglichkeit auf ein externes Enzymsystem zur Aktivierung zu verzichten, stellt die Zelllinie RTL eindeutig das stabilere Testsystem dar.

4.5.3 Verwendung der Zelllinien RTL und V79 zur Untersuchung der genotoxischen Wirkung von Luftstäuben

Ein Vergleich der Ergebnisse aus vorbereitenden Versuchen und der vorliegenden Studie, zeigt deutlich, dass die Zelllinie RTL sensitiver auf die Exposition mit Luftstaubextrakten reagiert als die Zelllinie V79. In Abb. 4.12 sind die Ergebnisse des Comet - Assays aus beiden Arbeiten aufgetragen.



Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zelllinie RTL, insbesondere in der Abluft, deutlich höhere Effekte aufweist als die Zelllinie V79. Abb. 4.13 zeigt einen Vergleich der Daten des Mikrokerntests, ebenfalls mit den oben erwähnten Vorarbeiten.



Auch hier kann in beiden Endpunkten eine deutlich höhere Sensitivität der Zelllinie RTL erkannt werden.

Es ist bekannt, dass Fischzellen nur ein sehr gering wirksames DNA Reparatursystem besitzen und daher wahrscheinlich sensitiver auf die Belastung mit gentoxische Verbindungen reagieren (Castano et al. 2003). Dies würde dafür sprechen, dass die Effekte, die in den RTL Zellen ausgelöst wurden, durch DNA Reparatursysteme wieder aufgehoben werden können. Weitere Studien sollten daher mit einer menschlichen Lungenzelllinie durchgeführt werden, beispielsweise den Beas2B, einer humanen Lungenbronchialepithelzelllinie.

4.5.4 Betrachtung der gewählten Bezugsszenarien zur Bewertung der Prozessproben und Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Lebewesen

Bezugsszenarien der Prozessproben

Für die Beurteilung der Wirksamkeit der Proben wurden zwei Bezugsszenarien verwendet. Szenario 1 betrachtete die Exposition direkt in der Anlage, während Szenario 2 eine rechnerische Verdünnung der Partikel auf die Außenkonzentration beinhaltete und damit eine Immissionsprognose gab.

Zur Bewertung der Toxizität der Probe wurde in Szenario 1 nach OECD (2006) angenommen, dass ein Arbeiter bei leichter Arbeit 10 m³ Luft an einem Arbeitstag veratmet. Die Effekte aus den Bioassays wurden daraufhin bewertet. Da jedoch die Stäube extrahiert, in einem Lösungsmittel rückgelöst und in einem definierten Volumen an Medium in die Bioassays eingesetzt wurden, wurde ein „worst case“ Szenario betrachtet. Szenario 2 lag die Richtlinie der EU (1999) zugrunde, nach der eine Feinstaubkonzentration von 50 µg/m³ nur 35 mal im Jahr überschritten werden darf. Für den schlechtesten Fall wurden daher 50 µg/m³ als Konzentration der verwendeten Probe angenommen und wiederum ein „worst case“ Szenario betrachtet. Daher sind alle Ergebnisse nur als Hinweis auf ein mögliches gentoxisches Potenzial zu verstehen, nicht als definitiven Auslöser von Lungenkrebs beim Einatmen einer der Proben.

Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Lebewesen

Untersuchungen, die an Zelllinien durchgeführt werden, haben einige Vorteile gegenüber Tierversuchen. Zunächst erlauben sie die Identifizierung toxischer Mechanismen auf molekularer Zellebene in einer kontrollierten Umgebung und erlaubt die Untersuchung einer großen Anzahl von Proben (Castano et al. 2003). Die physiologische Umgebung des menschlichen Körpers wird bei der Verwendung von Zellkulturen jedoch vernachlässigt. Dies untermauert die Aussage, dass die Ergebnisse nur als Hinweis auf ein Potenzial zu sehen sind, nicht als direkter Auslöser von Lungenerkrankungen.

4.5.5 Ökotoxikologische Bewertung der Anlagen

Aufgabe der vorliegenden Studie war die ökotoxikologische Bewertung der Feinstäube aus den beprobten Anlagen, also die Bewertung des Einflusses auf die Umwelt. Als Bewertungsgrundlage wurde in dieser Studie das Atemvolumen des Menschen angenommen, da durch Arbeitsplatzmessungen für den Menschen Grenz- und Richtwerte vorliegen. Für eine Ratte wird ein Atemvolumen von 6 l/h/kg angenommen (TRGS 2008), für ein Kaninchen 15,6 l/kg/h und für einen Hund 18 l/kg/h. In der vorliegenden Studie wurde für eine Expositionszeit von 8 Arbeitsstunden ein Atemvolumen von 10 m³ eines 70 kg schweren Menschen angenommen, daher werden 17,8 l/h/kg veratmet. Die Effektgrenzen, die am Beispiel des Menschen bestimmt wurden, können daher für alle Säugetiere angewandt werden und dienen für die Umwelt als Betrachtung eines „worst-case“ Szenarios, da kleinere Säugetiere weit weniger Luft veratmen. Die Übertragung der Ergebnisse auf Vögel und Amphibien ist deutlich schwieriger. Die Atmung der Vögel unterscheidet sich grundsätzlich von dem der Säugetiere, da durch einen ständigen Luftstrom in der Lunge kein definiertes Atemvolumen bestimmt werden kann. Die Atmung der Amphibien erfolgt sowohl über die Lunge als auch über die Haut. Da der Effekt der Luftpartikel auf die Haut der Amphibien nicht untersucht wurde, fällt eine Übertragung sehr schwer. Die ökotoxikologische Bewertung der Auswirkungen der Feinstäube aus den Anlagen betrachtete in der vorliegenden Studie daher die Auswirkungen auf Säugerlungen unter Festlegung der Effektgrenzen am Modell Mensch.

4.6 Handlungsempfehlungen

4.6.1 Kurzfristige Maßnahmen

Da die Versuche mit den Proben aus der Abluft ein deutlich gentoxisches Potenzial aufwiesen, sollten die Abluftkamine nur noch in dringenden Fällen und mit geeignetem Schutz betreten werden. Feinstaubmasken der Stufe FFP3 sollten einen ausreichenden Schutz bieten. Längere Wartungsarbeiten sollten nur bei Stillstand der Anlage durchgeführt werden.

4.6.2 Längerfristige Maßnahmen

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen zeigen deutlich, dass die toxischen Wirkungen der Abluftproben durch die Menge der Partikel in der Abluft zustande kommen. Daher sollte längerfristig verfahrenstechnisch eine Alternative zu den bisherigen Abluftreinigungsmaßnahmen gesucht werden. Die Filterung der Luft in der Außenluftaufbereitung zeigte deutlich, dass das ökotoxikologische Potenzial der Außenluft in der gefilterten Luft nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Eine Filterung der Abluft könnte das Potenzial verringern. Für die gemessenen Endpunkte konnte deutlich gezeigt werden, dass die Verwendung der Materialien aus Anlage BII in einer Abluft in einem geringeren ökotoxikologischen Potenzial resultiert. Für die gemessenen Endpunkte wäre daher eine Umstellung empfehlenswert.

5 Ausblick

In der vorliegenden Studie wurden Anlagen beprobt, die nach Abschluss der Studie nicht mehr dem neuesten Stand der Technik entsprechen. Die Beprobung einer bereits umgebauten Anlage zum Vergleich könnte weitere Erkenntnisse liefern.

Des Weiteren könnten alle Einsatzmaterialien der Anlagen in allen verwendeten Bioassays eingesetzt werden, um weiteren Aufschluss über deren Wirkweise zu erhalten.

Zur Untersuchung des Einflusses der Hausfeuerungsanlagen, des Verkehrs und der Müllverbrennungsanlage könnten weitere Untersuchungen an ausgewählten Standorten nützliche Hinweise liefern.

6 Literatur

- Abbey DE, Nishino N, McDonnell WF, Burchette RJ, Knutsen SF, Beeson WW, Yang JX. 1999. Longterm inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine* 159:373 - 382.
- Al-Sabti K, Metcalfe C. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research* 343:121 - 135.
- Alloway BJ, Ayres DC. 1996. *Schadstoffe in der Umwelt*. Heidelberg: Spektrum Verlag.
- Ames BN. 1972. A bacterial system for detecting mutagens and carcinogens. Sutton HE, Harris MI, editors: Academic Press, New York. 57 - 66 p.
- Ames BN, Lee FD, Durston WE. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Science* 70:782-786.
- Arlt VM, Cole KJ, Phillips DH. 2004. Activation of 3-nitrobenzanthrone and its metabolites to DNA-damaging species in human lymphoblastoid MCL-5 cells. *Mutagenesis* 19:149 - 156.
- AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, S. V. 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3(2):279 - 290.
- Aydođan G, Kutlu M. 2007. Mutagenic activities of ten imidazole derivatives in *Salmonella typhimurium*. *Biologia* 62(1):6 - 12.
- Bahrman P. 2007. Einführung eines Quadrupol ICP-MS am Landesamt für Geologie und Bergbau Rheinland-Pfalz. *Mainzer geowissenschaftliche Mitteilungen* 35:187 - 216.
- Barile FA. 1994. *Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanisms and methods*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Becker S, Mundandhara S, Devlin RB, Madden M. 2005. Regulation of cytokine production in human alveolar macrophages and airway epithelial cells in response to ambient air pollution particles: Further mechanistic studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 207(2):S269 - S275.
- Betti C, Davini T, Gianessi L, Loprieno N, Barale R. 1994. Microgel electrophoresis assay (comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutation Research* 307:323 -333.

- Bhattacharya K, Cramer H, Albrecht C, Schins R, Rahman Q, Zimmermann U, Dopp E. 2008. Vanadium pentoxide-coated ultrafine titanium dioxide particles induce cellular damage and micronucleus formation in V79 cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 71(13 - 14):976 - 980.
- Borenfreund E, Puerner JA. 1984. A simple quantitative procedure using monolayer cultures or cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of Tissue Culture Methods* 9:7 - 9.
- Borm P, Cakmak G, Jerman E, Weishaupt C, Kempers P, van Schooten FJ, Oberdörster G, Schins R. 2005. Formation of PHA-DNA adducts after in vivo and in vitro exposure of rats and lung cells to different commercial carbon blacks. *Toxicology and applied Pharmacology* 205:157 - 167.
- Borm PJA. 2003. Die Toxikologie ultrafeiner Partikel. In: Riediger G, editor. BIA - Report "Ultrafeine Aerosole an Arbeitsplätzen". Sankt Augustin.
- Botta C, Giorgio CD, Sabatier A-S, Meo MD. 2008. Effects of UVA and Visible Light on the Photogenotoxicity of Benzo[a]pyrene and Pyrene. *Environmental Toxicology* epub ahead of print.
- Bräuner EV, Forchhammer L, Møller P, Simonsen J, Glasius M, Wåhlin P, Raaschou-Nielsen O, S.; L. 2007. Exposure to ultrafine particles from ambient air and oxidative stress-induced DNA damage. *Environmental Health Perspectives* 115(8):1177 - 1182.
- Brimblecombe P. 1976. Attitudes and Responses Towards Air Pollution in Medieval England *Journal of the Air Pollution Control Association* 26:941 - 945.
- Brimblecombe P. 1999. Air pollution and Health History. In: Holgate ST, Samet JM, Koren HS, Maynard RL, editors. *Air pollution and Health History*.
- Bulychev A, Trouet A, Tulkens P. 1978. Uptake and intracellular distribution of neutral red in cultured fibroblasts. *Experimental Cell Research* 115:343 - 355.
- Carnevali S, Petruzzelli S, Longoni B, Vanacore R, Barale R, Cipollini M, Scatena F, Paggiaro P, Celi A, Giutini C. 2003. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *American Journal of Physiology* 284:955 - 963.
- Cassoni F, Bocchi C, Martino A, Pinto G, Fontana F, Buschini A. 2003. The Salmonella mutagenicity of urban particulate matter (PM_{2,5}) from eight sites of the Emilia-Romagna regional monitoring network (Italy). *Science of the Total Environment* 324:79 - 90.
- Castano A, Bols N, Braunbeck T, Dierickx P, Halder M, Isomaa B, Kawahara K, Lee L, Mothersill C, Pärt P and others. 2003. The Use of Fish Cells in Ecotoxicology. 312-351 p.

-
- Cavallo D, Ursini CL, Maiello R, Apostoli P, Catalani S, Ciervo A, Iavicoli S. 2008. Genotoxic and oxidative effects induced on A549 cells by extract of PM10 collected in an electric steel plant. *Acta bio-medica: Atenei parmensis* 79 (Suppl 1):87 - 96.
- Cerna M, Pastorkova A, Vrbikova V, Smid J, Rössner P. 1999. Mutagenicity monitoring of airborne particulate matter (PM10) in Czech Republic. *Mutation Research* 444:373 - 386.
- Chakra ORA, Joyeux M, Nerrière E, Strub MP, Zmirou-Navier D. 2007. Genotoxicity of organic extracts of urban airborne particulate matter: an assessment within a personal exposure study. *Chemosphere* 66(7):1375 - 1381.
- Chen H-W, Chien M-L, Chaung Y-H, Lii C-K, Wang T-S. 2004. Extracts from cigarette smoke induce DNA damage and cell adhesion molecule expression through different pathways *Chemico-Biological Interactions* 150:233 - 241.
- Claxton LD, Matthews PP, H.; WS. 2004. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: *Samonella* mutagenicity. *Mutation Research* 567:347 - 399.
- Cockburn A, Barraco RA, Reyman TA, Peck WH. 1975. Autopsy of an Egyptian Mummy. *Science* 187:1555 - 1160.
- Collins A. 2004. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. *Molecular Biotechnology* 26:249 - 261.
- Collins A, Raslova K, Somorovska M, Petrovska H, Ondrusova A, Vohnout B, Fabry R, Dusinska M. 1998. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radical Biology and Medicine* 25:373 - 377.
- Czygan P, Greim H, Garro AJ, Hutterer F, Schaffner F, Popper H, Rosenthal O, Cooper DY. 1973. Microsomal metabolism of dimethylnitrosamine and the cytochrom P450 dependency of its activation to a mutagen. *Cancer Research* 33:2983 - 2986.
- Dockery DW, Cunningham J, Damokosh AI, Neas LM, Spengler JD, Koutrakis P, Ware JH, Speizer FE. 1996. Health Effects of acid aerosols on North American Children: Respiratory Symptoms *Environmental Health Perspectives* 104:500 - 505.
- Douglas RW, Frank S. 1972. *History of Glass Making*. 238 p.
- Ehrlich VA, Nersesyan AK, Atefie K, Hoelzl C, Ferk F, Bichler J, Valic E, Schaffer A, Schulte-Hermann R, Fenech M and others. 2008. Inhalative Exposure to Vanadium Pentoxide Causes DNA Damage in Workers: Results of a Multiple End Point Study. *Environmental Health Perspectives* 116(12):1689 - 1693.

-
- EIAssouli S, M.; AlQahtani MH, Milaat W. 2007. Genotoxicity of Air Borne Particulates Assessed by Comet and the Salmonella Mutagenicity Test in Jeddah, Saudi Arabia. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 4(3):195 - 259.
- Eliopoulos P, Mourelatos D. 1998. Lack of genotoxicity of silver iodide in the SCE assay in vitro, in vivo, and in the Ames/microsome test. *Teratogenesis, Carcinogenesis, Mutagenesis* 18(6):303 - 308.
- Elliott BM, Ashby J. 1997. Review of the genotoxicity of 2-butoxyethanol. *Mutation Research* 387(2):89 - 96.
- EPA. 1992. Thirtieth Report of the Interagency Testing Committee to the Administrator, Receipt of Report and Request for Comments regarding Priority Testing List of Chemicals. *Federal Register* 57(132).
- Erdinger L, Dürr M, Höpker K-A. 2005. Correlations between mutagenic activity of organic extracts of airborne particulate matter, NO_x and sulphur dioxide in southern germany - Results of a two-year study. *Environmental Science and Pollution Research* 12(1):10 - 20.
- Erdinger L, Höpker K-A, Dörr I, Fried M, Dürr M. 1997. Genotoxische organische Verbindungen in der Außenluft.
- EU. 1999. Richtlinie 1999/30/EG des Rates vom 22. April 1999 über Grenzwerte für Schwefeldioxid, Stickstoffdioxid und Stickstoffoxide, Partikel und Blei in der Luft.
- Fairbain DW, Olive PL, O'Neill KL. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339:37-59.
- Falta T, Limbeck A, Koellensperger G, Hann S. 2008. Bioaccessibility of selected trace metals in urban PM_{2.5} and PM₁₀ samples: a model study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390(4):1149 - 1157.
- Feilberg A, Nielsen T, Binderup M-L, Skov H, Poulsen M. 2002. Observation of the effect of atmospheric processes on the genotoxic potency of airborne particulate matter. *Atmospheric Environment* 36:4617 - 4625.
- Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 455(1-2):81-95.
- Fent K. 2002. *Ökotoxikologie*: Thieme - Verlag, Stuttgart.
- Fried M. 2001. Charakterisierung von genotoxischen organischen Luftstaubextrakten.
- Gabelova A, Valovicova Z, Horvathova E, Slamena D, Binkova B, Sram RJ, Farmer PB. 2004. Genotoxicity of environmental air pollution in three European cities: Prague, Kosice and Sofia. *Mutation Research* 563:49 - 59.

- Garner RC, Miller EC, Miller JA. 1972. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B₁ to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA1530. *Cancer Research* 32:2058 - 2066.
- Goethem Fv, Lison; D, Kirsch-Volders M. 1997. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutation Research* 392:31-43.
- Heddle JA. 1973. A rapid in vivo test for chromosome damage. *Mutation Research* 18:187-192.
- Heinrich J, Hölscher B, Wichmann HE. 2000. Decline of ambient air pollution and respiratory symptoms in children. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine* 161:1930 - 1936.
- Hofrichter R, Kern W, Beckel L, Domnig I, Zankel A, Hein A. 2002. 3. Geographie und Klima. Das Mittelmeer - Band I. Heidelberg: Spektrum - Verlag.
- Hollert H. 2001. Entwicklung eines kombinierten Untersuchungssystems für die Bewertung der ökotoxikologischen Belastung von Fließgewässersedimenten und -schwebstoffen [Dissertation].
- Hollert H, Braunbeck T. 1997. Ökotoxikologie *in vitro* - Gefährdungspotential in Wasser, Sediment und Schwebstoffen. 189 p.
- Howe GM. 1972. *Man, Environment and Disease in Britain*. Newton Abbot: David and Charles.
- Hurná E, Hurná S. 2000. Protective effect of zinc on cadmium-induced micronuclei in V79 cells. *Journal of trace elements in medicine and biology* 14(1):55 - 57.
- ISO. 2004. Water quality - Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei - Part 2: 'Mixed population' method using the cell line V79. ISO/DIS 21427-2.
- Jedrychowski W, Pac A, Choi H, Jacek R, Sochacka-Tatara E, Dumyahn TS, Spengler JD, Cammann DE, Perera FP. 2007. Personal exposure to fine particles and benzo[a]pyrene. Relation with indoor and outdoor concentrations of these pollutants in Krakow. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 20(4):339 - 348.
- Jianhua Z, Lian X, Shuanlai Z, Juan D, Shuanxi Y. 2006. DNA lesion and Hprt mutant frequency in rat lymphocytes and V79 Chinese hamster lung cells exposed to cadmium. *Journal of Occupational Health* 48(2):93 - 99.

- Karar K, Gupta AK, Kumar A, Biswas AK. 2006. Characterization and identification of the sources of chromium, zinc, lead, cadmium, nickel, manganese and iron in PM10 particulates at the two sites of Kolkata, India. *Environmental Monitoring and Assessment* 120(1 - 3):347 - 360.
- Karlsson HL, Nygren J, Möller L. 2004. Genotoxicity of airborne particulate matter: the role of cell-particle interaction and of substances with adduct-forming and oxidizing capacity. *Mutation Research* 565:1 - 10.
- Keller BJ, Liang D, Thurman RG. 1991. 2-Ethylhexanol uncouples oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Toxicology Letters* 57(1):113 - 120.
- Kier LD, Brusick DJ, Auletta AE, von Halle ES, Brown MM, Simmon VF, Dunkel V, McCann J, Mortelmans K. 1986. The Salmonella typhimurium/mammalian microsomal assay. *Mutation Research* 168(2):69 - 240.
- Koch H-J. 2002. *Umweltrecht*. 135 - 195 p.
- Koenig W, Sund M, Filipiak B, Döring A, Löwel H, Ernst E. 1997. Plasma Viscosity and the Risk of Coronary Heart Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 18:768 - 772.
- Kreyling WG. 2003. Deposition, Retention, Clearance von ultrafeinen Partikeln. In: Riediger G, editor. *BIA - Workshop "Ultrafeine Aerosole an Arbeitsplätzen"*. Sankt Augustin: Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften.
- Lamy E, Kassie F, Gminski R, Schmeiser HH, Mersch-Sundermann V. 2004. 3-Nitrobenzanthrone (3-NBA) induced micronucleus formation and DNA damage in human hepatoma (HepG2) cells. *Toxicology Letters* 146:103 - 109.
- Lang C. 2002. Molekulare Charakterisierung, Expressionsmuster und Interaktionen der Lamina-assoziierten Polypeptide 2 (LAP2) in *Xenopus laevis* [Dissertation]. Würzburg: Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Lee R, Steinert S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research* 544:43-64.
- Lemaitre JM, Geraud G, Mechali M. 1998. Dynamics of the genome during early *Xenopus laevis* development : Karyomeres as independent units of replication. *Journal of Cell Biology* 142:1159 - 1166.
- Lewis DF, Ioannides C, Parke DV. 1996. COMPACT and molecular structure in toxicity assessment: a prospective evaluation of 30 chemicals currently being tested for rodent carcinogenicity by the NCI/NTP. *Environmental Health Perspectives* 104(5):1011 - 1016.

-
- LUBW. 1994. Kompendium Stoffdatenblätter - Anhang Gentoxizität. Texte und Berichte zur Altlastenbearbeitung.
- LUBW. 1997. Immissionswerte von Vanadium und seinen Verbindungen. <http://www.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/11870/>.
- LUNG. 2007. Mittlere jährliche Cadmiumkonzentrationen im Feinstaub (PM10) von 1998 bis 2007 in ng/m³. http://www.lung.mv-regierung.de/umwelt/luft/trend/jast_cd.htm.
- Maron D, Ames B. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research* 113:173-215.
- Matsukura S, Kokubu F, Kurokawa M, Kawaguchi M, Ieki K, Kuga H, Odaka M, Suzuki S, Watanabe S, Takeuchi H and others. 2006. Synthetic double-stranded RNA induces multiple genes related to inflammation through Toll-like receptor 3 depending on NF- κ B and/or IRF-3 in airway epithelial cells. *Clinical and Experimental Allergy* 36:1049 - 1062.
- Matsuoka A, Matsuura K, Sakamoto H, Hayashi M, T.; S. 1999. A proposal for a simple way to distinguish aneuploids from clastogens in the in vitro micronucleus test. *Mutagenesis* 14(4):385 - 389.
- McCann J, Spingarn NE, Kobori J, Ames B. 1975. Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids. *Proceedings of the National Academy of Science* 72(3):979 - 983.
- Miller KB, Caton JS, Finley JW. 2006. Manganese depresses rat heart muscle respiration. *Biofactors* 28(1):33 - 46.
- Monarca S, Feretti D, Zanardini A, Moretti M, Villarini M, Spiegelhalder B, Zerbini I, Gelatti U, Lebbolo E. 2001. Monitoring airborne genotoxicants in the rubber industry using genotoxicity tests and chemical analyses. *Mutation Research* 490:159 - 169.
- Montag M, Spring H, Trendelenburg MF. 1988. Structural analysis of the mitotic cycle in pre-gastrula *Xenopus* embryos. *Chromosoma*. 96(3):187 - 196.
- Müller-Tegethoff K, Kersten B, Kasper P, Müller L. 1997. Application of the in vitro rat hepatocyte micronucleus assay in genetic toxicology testing. *Mutation Research* 392:125 - 138.
- NIH. 2007. Lung Cancer and Inflammation. <http://grants.nih.gov/grants/guide/rfa-files/RFA-CA-07-046.html>.

- Oberdörster G, Utell M, Beckett W, Cox C, Finkelstein J, Frampton M, Looney J, Marder V, Morrow PE, O'Reilly M and others. 2002. Ultrafine Particles: Characterization, health effects and pathophysiological mechanisms. Presented at the EPA Science Forum - Washington, D.C.
- OECD. 2006. Reference preliminary Technical Guidance Document (reference p-TGD) Chapter 3, Human health hazard assessment. RIP3.2-2_REF_PTGD_HH 3 V5.
- Oliveira NG, Castro M, Rodrigues AS, Gonçalves IC, Cassapo R, Fernandes AP, Chaveca T, Toscano-Rico JM, Rueff J. 2001. Evaluation of the genotoxic effects of the boron neutron capture reaction in human melanoma cells using the cytokinesis block micronucleus assay. *Mutagenesis* 16(5):369 - 375.
- Östling O, Johansson KJ. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 123:291-298.
- Pace E, Ferraro M, Siena L, Melis M, Montalbano AM, Johnson M, Bonsignore MR, Bonsignore G, Gjomarkaj M. 2008. Cigarette smoke increases Toll-like receptor 4 and modifies lipopolysaccharide-mediated responses in airway epithelial cells. *Immunology* 124:401 - 411.
- Perera F, Li TY, Zhou ZJ, Yuan T, Chen YH, Qu L, Rauh VA, Zhang Y, Tang D. 2008. Benefits of reducing prenatal exposure to coal-burning pollutants to children's neurodevelopment in China. *Environmental Health Perspectives* 116(10):1396 - 1400.
- Pesheva MG, Chankova SG, Avramova T, Milanov DV, Genova GK. 1997. Genotoxic effect of cadmium chloride in various test-systems. *Genetika* 33(2):183 - 188.
- Peters A, Döring A, E.; WH, Koenig W. 1997. Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality? *The Lancet* 349:1582 - 1587.
- Peters A, Fröhlich M, Döring A, Immervoll T, Wichmann HE, Hutchinson WL, Pepys MB, König W. 2001. Particulate air pollution is associated with an acute phase response in men, results from the MONICA-Augsburg study. *European Heart Journal* 22:1198 - 1204.
- Peters A, Schulz H, Kreyling WG, Wichmann HE. 2002. VI. 2 Feine und ultrafeine Partikel. In: Wichmann, Schlipköter, Fülgraff, editors. *Handbuch der Umweltmedizin - Band III (IV), 24. Ergänzungslieferung.*
- Peters JM, Avol E, Gaudermann WJ, Linn WS, Navidi W, London SJ, Margolis H, Rappaport E, Vora H, Gong H and others. 1999b. A study of twelve southern california communities with differing levels and types of air pollution - II - Effects on pulmonary function *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine* 159:768 - 775.

-
- Peters JM, Avol E, Gaudermann WJ, Lurmann F, Linn WS, Margolis H, Rappaport E, Gong H, Thomas DC. 1999a. A study of twelve southern california communities with differing levels and types of air pollution - I - Prevalence of respiratory morbidity American Journal of Respiratory Critical Care Medicine 159:760 - 767.
- Poet TS, Mast TJ, Huckaby JL. 2006. Screening Values for Non-Carcinogenic Hanford Waste Tank Vapor Chmicals that Lack Estabilshed Occupationel Exposure Limits. Prepared for the U.S. Department of Energy under Contract DE-AC05-76RL01830.
- Pott F, Roller M. 2003. Untersuchungen zur Kanzerogenität granulärer Stäube an Ratten - Ergebnisse und Interpretationen.
- Pott P. 1775. Chirurgical Observations relative to the Cataract, the polypus of the nose, the cancer of the scrotum, ... ruptures, and the mortification of the toes, etc
- Rödelsberger K, Roller M. 2003. Pulmonale Kanzerogenität granulärer biobeständiger Stäube ohne wesentliche spezifische Toxizität (GBS): Relevanz für den Arbeitsschutz. In: Riediger G, editor. BIA - Workshop "Ultrafeine Aerosole an Arbeitsplätzen". Sankt Augustin.
- Rosa RM, Moura DJ, Romano E, C.; SA, Saffi J, Pêgas Henriques JA. 2007. Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells. Mutation Research 631(1):44 - 45.
- Roubicek DA, Gutiérrez-Castillo ME, Sordo M, Cebrián-García ME, Ostrosky-Wegman P. 2007. Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City. Mutation Research 631(1):9 - 15.
- Rückert R. 1999. Bakterieller Superantigen verstärkt die Atemwegsinfektion und bronchiale Atemwegsreagibilität in einem Mausmodell der allergischen Sensibilisierung.
- Sandner W. 1998. Immissionsschutzrecht. In: Kahl WVK, Andreas, editor. Grundkurs Umweltrecht. 2. ed. p 140 - 175.
- Schmid W. 1975. The micronucleus test. Mutation Research 31:9-15.
- Schmidt R. 2001. Einführung in das Umweltrecht. Weber H, editor. 1 - 44 p.
- Schnurstein A. 2000. Untersuchungen zur Genotoxizität in Fischen und Fischzellen mit der Einzellzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) - Möglichkeiten und Grenzen im Umweltmonitoring -. Heidelberg: Ruprecht-Karls-Universität.
- Seelbach A, Fissler B, Madle S. 1993. Further evaluation of a modified micronucleus assay with V79 cells for detection of aneugenic effects. Mutation Research 303(4):163 - 169.

- Segner H. 1998. Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. *Exs* 86:1 - 38.
- Shaw AB. 1981. Knapper´s rot - silicosis in East-Anglian flint-knappers. *Med History* 25:151.
- Shi T, Duffin R, Borm PJA, Li H, Weishaupt C, Schins RP. 2005. Hydroxyl-radical-dependent DNA damage by ambient particulate matter from contrasting sampling locations. *Environmental Research* Epub ahead of print.
- Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. 1988. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research* 175:184-191.
- Snyder RD, Friedman MB. 1998. Enhancement of cytotoxicity and clastogenicity of L-DOPA and dopamine by manganese and copper. *Mutation Research* 405(1):1 - 8.
- Soethout EC, Müller KE, Rutten VPMG. 2002. Neutrophil migration in the lung, general and bovine-specific aspects. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 87(3 - 4):277 - 285.
- Somorovska M, Szabova E, Vodicka P, Tulinska J, Barancokova M, Fabry R, Liskova A, Riegerova Z, Petrovska H, Kubova J and others. 1999. Biomonitoring of genotoxic risk in workers in a rubber factory: comparison of the Comet assay with cytogenetic methods and immunology. *Mutation Research* 30:181 - 192.
- Sprügel FA, 81825 München, DE; 2006. Reinigungsflüssigkeit mit verringerter Entzündbarkeit. Germany.
- Stowe J. 1598. A Survey of London.
- Themis M, May D, Coutelle C, Newbold RF. 2003. Mutational effects of retrovirus insertion on the genome of V79 cells by an attenuated retrovirus vector: implications for gene therapy. *Gene Therapy* 10:1703 - 1711.
- TRGS. 2008. Bekanntmachung 910 - Risikowerte und Exposition-Risiko-Beziehungen für Tätigkeiten mit krebserzeugenden Gefahrstoffen.
- Umweltbundesamt. 1999. Jahresbericht 1999 aus dem Messnetz des Umweltbundesamt.
- Umweltbundesamt. 2005. Hintergrundpapier zum Thema Staub/Feinstaub (PM).
- USEPA. 1996. Air quality criteria for particulate matter. US Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC.
- VDI-Richtlinie. 2002. Messen von Partikeln; Messen der Massenkonzentration (Immission); Filterverfahren; LIS/P-Filtergerät. Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) im VDI und DIN - Normenausschuss.

-
- Vogel CFA, Matsumura F. 2008. A new crosstalk between the Aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NFkB family. *Biochemical Pharmacology* doi:10.1016/j.bcp.2008.09.036.
- von Mutius E, Sherrill DL, Fritsch C, Martinez FD, Lebowitz MD. 1995. Air pollution and upper respiratory symptoms in children from East Germany. *European Respiratory Journal* 8:723 - 728.
- Vycudilik W. 1977. Die Derivatisierung in der gaschromatographischen Analyse - Anwendung in der toxikologischen Praxis. *Zeitschrift für Rechtsmedizin* 80:197 - 203.
- WHO. 2000 a. Air quality guidelines for Europe - Chapter 6.3 Cadmium.
- WHO. 2000 b. Air quality guidelines for Europe - Chapter 6.8 Manganese.
- Wichmann HE, Mueller W, Allhoff P, Beckmann M, Bocter N, Csicsaky MJ, Jung M, Molik B, Schoeneberg G. 1989. Health Effects During a Smog Episode in West Germany in 1985. *Environmental Health Perspectives* 79:89 - 99.
- Williams AE, Perry MM, Moschos SA, Larner-Svensson HM, Lindsay MA. 2008. Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer. *Biochemical Society Transactions* 36(6):1211 - 1215.

