

Beitragsserien

II. Bioindikationsmethoden

– Aktive Verfahren

Kombinierter Einsatz von Biotestsystemen und Schadstoffanalytik zur Überwachung von organischen Luftverunreinigungen

¹K. A. Höpker, ²L. Erdinger¹Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Sachgebiet Ökotoxikologie, Griesbachstraße 1, D-76185 Karlsruhe²Hygiene-Institut der Universität, Abt. Hygiene und Med. Mikrobiologie, Im Neuenheimer Feld 324, D-69120 Heidelberg

1 Einleitung

In der „klassischen“ Luftüberwachung werden mit Hilfe von physikalischen und chemischen Nachweismethoden Leitsubstanzen, die als Kriterium für die Luftqualität dienen, routinemäßig in Meßnetzen erfaßt. Hierzu gehören vor allem anorganische Verbindungen wie Schwefeldioxid, Stickoxide, Kohlenmonoxid, Schwermetalle u.a., sowie z.B. der Gesamtkohlenwasserstoffgehalt für den organischen Bereich. Mit Hilfe dieser Leitparameter können die komplexen Immissionsverhältnisse jedoch nicht ökologisch bzw. toxikologisch befriedigend beurteilt werden. So werden heute von den vielen Tausend in der Luft vorkommenden Verbindungen nur ein geringer Bruchteil in den Meßnetzen bestimmt. Nur für wenige Verbindungen sind toxikologische und ökotoxikologische Daten überhaupt bekannt (GRAEDEL et al. 1986). Zusätzlich liegen in der Luft durch bisher kaum verstandene photochemische Transformationsprozesse veränderte Stoffe vor. Diese hieraus entstehenden komplexen Verbindungsgemische können hinsichtlich der potentiellen toxikologischen Wirksamkeit nicht mit Hilfe der vorgenannten Leitparameter beurteilt werden, da neben der Muttersubstanz zahlreiche andere Parameter (z.B. UV-Strahlung, Klima) für die Entstehung dieser Verbindungen verantwortlich sind.

Diese organischen Luftverunreinigungen sind daher nur schwierig in Meßnetzen zu bestimmen und zu bewerten. Sie sind aber wegen ihrer zum Teil schlechten biologischen Abbaubarkeit, ihrer Neigung zur Bioakkumulation (wenn es sich um unpolare Verbindungen handelt), der großen Toxizität vieler Einzelverbindungen und den teilweise erheblichen Emissionsmengen von besonderer ökologischer Bedeutung (JENSEN et al. 1992). An vorderer Stelle stehen hier die Emissionen aus unvollständigen Verbrennungsprozessen – hierunter fallen Stoffe wie die Dioxine, die Furane aber auch die polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe. Daneben sind vor allem die halogenierten Lösungsmittel als Kontaminanten mit erheblicher ökotoxikologischer Bedeutung zu nennen.

Die Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg verfolgt, gefördert durch das „Projekt Angewandte Ökologie“ (PAÖ), seit 1991 im Rahmen des Ökologischen Wirkungskatasters (LFU 1993) ein Konzept zur Untersu-

chung der toxischen Effekte von organischen Luftverunreinigungen mit Hilfe von Biotests (→ Abb. 1).

Hierbei werden an verschiedenen Standorten Luftproben gezogen und im Labor mit Hilfe von Biotestsystemen hinsichtlich bestimmter toxikologischer und ökotoxikologischer Wirkungen untersucht, um über eine Art „biologischen Summenparameter“ eine Aussage über die Qualität der in der Luft enthaltenen organischen Verbindungen machen zu können.

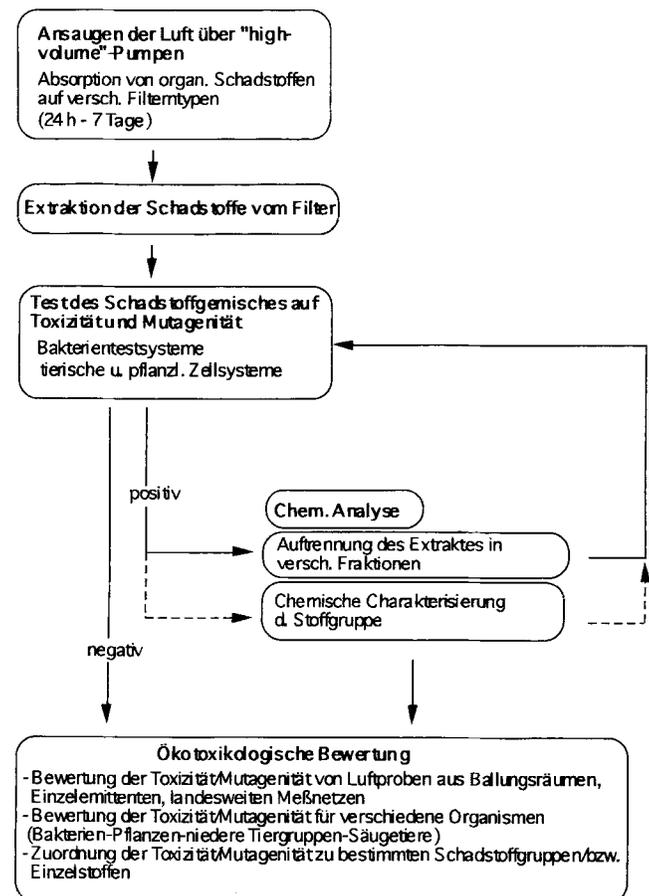


Abb. 1: Konzept zur Untersuchung organischer Luftverunreinigungen mit Biotests

In einem weiteren Ansatz wird versucht, die in den Testsystemen ermittelten toxischen Wirkungen bestimmten Substanzklassen zuzuordnen. Hierzu werden die Extrakte nach verschiedenen chemischen und physikalisch-chemischen Gesichtspunkten getrennt, die Fraktionen werden wiederum in den Testsystemen auf ihre Wirksamkeit geprüft. Hieraus sollen sich Hinweise darauf ergeben, welche Emissionsquellen und Transformationsprozesse in der Atmosphäre für die Entstehung von Verbindungen mit einem besonderen ökotoxischem Potential von Einfluß sind. Die für die verschiedenen Standorte im Land Baden-Württemberg ermittelten Ergebnisse werden mit den dort gleichzeitig erhobenen Routinedaten der Luftmeßnetze korreliert. Auch hier ist das Ziel, die toxische Wirkung mit bestimmten Emissionsquellen und atmosphärischen Transformationsprozessen zu verknüpfen.

Bei der Probenahme werden partikelgebundene und halbflüchtige organische Luftverunreinigungen durch Abscheidung auf einem Glasfaserfilter und einen nachgeschalteten Polyurethanschaumfilter getrennt erfaßt. Der Glasfilter hält die partikelgebundenen Schadstoffe zurück, während an dem Polyurethanschaum halbflüchtige Kohlenwasserstoffe angelagert werden. Nach einer Ansaugzeit von 24 Stunden bis einer Woche (je nach Ansaugrate bzw. Verschmutzungsgrad der Luft) werden die Filter im Labor weiterverarbeitet. Die Filter werden extrahiert und die Extrakte anschließend nach Zusatz eines Lösungsvermittlers den verschiedenen biologischen Tests zugeführt. Folgendes Spektrum an Testmethoden steht im Labor zur Zeit zur Verfügung:

- einfache Pflanzentests – Ermittlung der Phytotoxizität
- bakterielle Toxizitätssysteme
- bakterielle Mutagenitätstests
- Zellkulturtests an Säugetierzellen – Mutagenität.

Hierüber kann ein breites Spektrum der toxikologischen Wirkungsweise der Substanzgemische erfaßt werden. Über eine anschließende Fraktionierung und Charakterisierung des Substanzgemisches können die wirksam werdenden Stoffgruppen eingengt werden. Einzelne Fraktionen können wiederholt den biologischen Testsystemen zugeführt werden, so daß der Anteil der Toxizität einzelner Schadstoffgruppen zur Gesamtoxizität des Extraktes abgeschätzt werden kann.

Das vorgestellte Untersuchungskonzept mit dem Einsatz von Biotestsystemen hat bisher in Deutschland keinen Eingang in die reguläre Umweltüberwachung gefunden, obwohl Einzeluntersuchungen die Anwendbarkeit auf die Routineüberwachung anzeigen (MATSUSHITA et al. 1992). Verschiedene Arbeitsgruppen verwenden dieses Konzept der „Bioassay-directed Fractionation“ von Luftproben zur Ermittlung mutagener Verbindungen aus der Außenluft (SCHUETZLE & LEWTAS 1986; LEWTAS et al. 1990; GREENBERG et al. 1993; NISHIOKA et al. 1988; GUNDEL et al. 1993; HARGER et al. 1992; ZINBO et al. 1992). In Deutschland wurden im Rahmen von Meßnetzen nur partikelgebundene organische Luftverunreinigungen ansatzweise nach diesem Versuchskonzept untersucht (MARFELS et al. 1989).

In der Arbeitsgruppe wurden verschiedene Biotests („Ames-Test“, HGPRT-Test, Comet-Assay, Leuchtbakterientest) im Rahmen dieses Untersuchungskonzeptes eingesetzt. In mehreren Feldstudien wurde speziell die Verwendbarkeit des

„Ames-Test“ für die routinemäßige Umweltüberwachung von genotoxisch wirkenden Luftverunreinigungen geprüft. Es werden die apparativen Voraussetzungen und erste Ergebnisse vorgestellt.

2 Methodik

2.1 Luftprobenahme

Untersuchungen von genotoxisch wirkenden organischen Luftverunreinigungen wurden im Ballungsraum Mannheim (1991/92) und im landesweiten Meßnetz (seit 1993) an acht Stationen in den industriellen und städtischen Ballungsräumen (Mannheim, Karlsruhe, Stuttgart, Reutlingen, Freiburg und Weil am Rhein), sowie im ländlichen Raum (Kälble-scheuer und Freudenstadt) durchgeführt.

Die Luftprobenahme im landesweiten Meßnetz erfolgte mit einem automatischen „high-volume“-Sammler (DHA-80) der Fa. Riemer mit einer regelbaren Ansaugleistung von 100 – 1 000 l/min. Es wurde eine Entnahmesonde nach VDI 2463 verwendet. Bei diesem Gerät, welches in zahlreichen Meßnetzen in der Bundesrepublik zur Ermittlung der Staubbelastung eingesetzt wird, wurde zusätzlich hinter den Glasfaserfilter ($\varnothing = 15$ cm, Macherey & Nagel No. 8590 BF) noch ein Polyurethanschaumfilter in einer Glaskartusche gesetzt ($\varnothing = 11$ cm, h = 5 cm, Fa. Ziemer). Der Glasfaserfilter, der Partikel $> 0,5 \mu\text{m}$ zurückhält, kann von dem Gerät automatisch nach einem beliebigen Zeitintervall gegen einen Neuen ausgetauscht werden (maximal 15 Filter), während der PU-Schaum nur manuell austauschbar ist. Jeder Standort wurde einmal im Monat beprobt. Die Gesamtansaugzeit betrug fünf Tage pro Standort mit einer Ansaugleistung von 48 m³/h und einem Wechsel des Glasfaserfilters nach jeweils 24 Stunden. Um den Betreuungsaufwand während der Probenahme zu minimieren, wird derzeit eine digitale Fernabfrage des Gerätestatus mit dem Modacomservice (Fa. Telecom, Fa. Riemer) erprobt, so daß eine Gerätebetreuung vor Ort nur noch bei Störungen erforderlich ist. Der PU-Filter bleibt während der gesamten Probenahmezeit im Gerät, er wird nicht gewechselt.

Bei den kleinräumigeren Untersuchungen im Ballungsraum Mannheim wurde ein „high-volume“-Sammler der Fa. Ströhlein (HVS 100, 60 m³/h) verwendet. Die Probenahme erfolgte tagsüber an 5 Tagen/Standort, insgesamt wurden maximal 3 000 m³ Luft angesaugt. Im Aluminium-Filterkopf befanden sich zwei anorganisch gebundenen Glasfaserfilter ($\varnothing = 15$ cm, Macherey & Nagel No. 8590 BF) mit zwei dazwischenliegenden PU-Schäumen ($\varnothing = 15$ cm, h = 2,5 cm je Filter).

2.2 Filterbehandlung

Die Glasfaserfilter wurden ausgeheizt, und der PU-Schaum wird vor der Probenahme zehn Stunden in Toluol und mindestens zehn Stunden in Aceton durch Soxhlet-Extraktion vorgereinigt. Die beladenen Filter wurden ausgewogen und anschließend ebenfalls im Soxhlet mit Aceton zehn Stunden lang extrahiert. Der Extrakt wurde bis fast zur Trockene eingengt und danach in Dimethylsulfoxid für die biologische

Testung bzw. in einem geeigneten Lösungsmittel für die vorgesehene Fraktionierung und chemische Analytik aufgenommen.

Für die chemische Auftrennung der Extrakte liegen verschiedene Methodenbeschreibungen in der Literatur vor (ZINBO et al. 1992; SCHUETZLE & LEWTAS 1986; GREENBERG et al. 1993).

Die Aufarbeitung des Acetonextraktes erfolgte in Anlehnung an LEWTAS et al. (1990). Der in Dichlormethan überführte Extrakt wird zunächst durch Zusatz von fünfprozentiger Schwefelsäure in eine wässrige basische sowie eine neutrale und saure Phase getrennt. Die organischen Basen werden nach pH-Einstellung auf 12 – 13 in Dichlormethan überführt und mit Natriumsulfat zur Trocknung versetzt (Fraktion A). Mit der neutralen/sauren Phase wurden drei- bis fünfmal eine Flüssig/Flüssig-Verteilungen mit 5 %iger NaOH durchgeführt, bis die wässrige Phase klar war. Nach jedem Verteilungsschritt wurde bei 3 500 U/min für 1 min. zentrifugiert. Die wässrige Phase mit den sauren Verbindungen wurde mit 30 %iger Schwefelsäure auf pH 1 – 2 eingestellt, mit 3 x 10 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und mit Natriumsulfat zur Trocknung versetzt (Fraktion B). Die neutralen Verbindungen in der Dichlormethanphase wurden auf eine Silicagel-Säule 100 – 200, aktiv 60 A (ICN), die zuvor mit Hexan aufgeschlämmt und gespült wurde, gegeben. Mit 20 ml Hexan wurden aliphatische Verbindungen (Fraktion C), mit 25 ml Hexan/Toluol (1:1) aromatische Verbindungen (Fraktion D) mit 25 ml Dichlormethan moderat polare Verbindungen (Fraktion E) und mit 25 ml Methanol hoch polare Verbindungen (Fraktion F) eluiert. Die Lösungsmittel wurden gegebenenfalls anschließend abgeblasen und durch Lösungsmittel ersetzt, die für die Detektion geeignet sind. Für die biologische Testung wurde das jeweilige Lösungsmittel gegen Dimethylsulfoxid (DMSO) getauscht.

2.3 Biologische Testung

Zur Testung der biologischen Wirksamkeit der Luftsammelproben wurde das mutagene Potential der Proben mit dem „Ames-Test“ bestimmt. Dieser am häufigsten verwendete Mutagenitätstest bietet den Vorteil, daß er mit einem relativ geringen Aufwand durchgeführt werden kann, die Kosten gering sind und die Reproduzierbarkeit groß ist. Zudem ist die Zuverlässigkeit des Ames-Tests in vielen Untersuchungen mit bekannten Mutagenen ausführlich getestet worden. Derzeit gibt es trotz der z.T. berechtigten Kritik an bestimmten Teilaspekten des Tests kein Testsystem, für das derart viele Erfahrungen vorliegen und das auch aufgrund der relativ geringen Kosten bei hoher Reproduzierbarkeit ähnlich gut für routinemäßige Untersuchungen der Gentoxizität geeignet ist. Entsprechend wird dieser Test auch bei der Zulassung von Stoffen und Stoffgemischen nach dem Chemikaliengesetz gefordert.

Der Ames-Test wurde nach dem Standardprotokoll (MARON & AMES 1984) mit den Stämmen TA 98 und TA 100 durchgeführt. Beim Stamm TA 98 werden die Mutationen durch Verbindungen die frameshift-Mutationen, beim Stamm TA 100 durch Verbindungen die Basenpaarsubstitutionen verursachen, hervorgerufen. Die im Test eingesetzten Konzen-

trationen wurden so gewählt, daß bei der geringsten Verdünnung des Testansatzes die Inhaltsstoffe von ca. 25 m³ Luft getestet werden. Von dieser Konzentration ausgehend wurden vier Verdünnungen erstellt, um die Konzentrations-Wirkungsbeziehung darzustellen, die für die Auswertung des Ames-Tests zwingend notwendig ist. Jeder Test wurde mit mindestens 2 Parallelansätzen durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten jeweils mit und ohne metabolischer Aktivierung. Hierunter versteht man die Zugabe einer bestimmten enzymreichen Rattenleberfraktion (S9) in den Testansatz. Ziel ist es, durch dieses Vorgehen auch die endogen entstehenden Metabolite in ihrer mutagenen Wirksamkeit zu erfassen bzw. eine deaktivierende Wirkung der zellulären Enzyme auf die Mutagen feststellen zu können.

Ein Ames-Test wurde dann als positiv bewertet, wenn die Revertanzahl (= Mutanzahl) im Test mindestens doppelt so hoch als die Anzahl der Spontanrevertanten war und bei der linearen Regression über die Wertepaare Konzentration/Revertanzahl eine Korrelation von mindestens 0,9 erreicht wurde. Eine Datenreduktion und damit leichtere Bewertung der Ergebnisse kann erreicht werden, indem aus dem Koeffizient der Geradengleichung der linearen Regression die Revertanzahl pro Kubikmeter Luft berechnet wird. Der y-Achsenabschnitt stellt in diesem Fall die Anzahl der Spontanrevertanten dar. Die so rechnerisch ermittelte Zahl stimmte mit der gemessenen Zahl der Spontanrevertanten der Lösungsmittelkontrollen sehr gut überein.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die vorgestellte Probenahme mit high-volume-Pumpen entspricht der Vorgehensweise, wie sie zur Bestimmung bestimmter organischer Einzelverbindungen, z.B. Dioxine und Furane, PCBs, Pestizide und PAHs, nach den VDI-Richtlinien Verwendung findet. Am meisten verbreitet ist der Einsatz von PU-Schäumen als Absorbens (US-EPA, Environment Canada, VDI), die wegen der besseren Handhabbarkeit XAD-2, XAD-4 und Tenax vorgezogen werden, wenngleich verschiedentlich über Umwandlungen, irreversible Bindungen an den PU-Schaum sowie Veränderungen während der Lagerung berichtet wird (UMLAUFF & KAUPP 1993). HART et al. (1992) untersuchte PUF und Tenax parallel und kam zu vergleichbaren Ergebnissen. Um den bei hohen Luftdurchsätzen beobachteten Durchbruch von Verbindungen zu verhindern (HART et al. 1992), wurden fünf bzw. zehn Zentimeter dicke PU-Schaumlagen für die Rückhaltung organischer Verbindungen verwendet. Eigene Vorversuche mit dem Ströhlein-Sammler ergaben, daß bei den verwendeten Luftdurchsätzen 2 x 2,5 cm PU-Schaumlagen ausreichend sind. Nicht auszuschließen ist jedoch, daß während der Probenahme an den Filtern Stoffumsätze, z.B. durch hohe Ozon- oder Stickoxidkonzentrationen, erfolgen können. Generell ergaben sich bei der Probenahme Probleme bei Nebellagen im Hochschwarzwald, da sich der Filter durch Kondenswasser vollsetzte. Dieser Effekt ist auch durch eine Beheizung des Ansaugkopfes nicht zu vermeiden. Dem Problem kann in Zukunft aber z.T. durch zeitweises Ausschalten über die Fernsteuerung des Sammlers mit dem digitalen Modacom-Netz begegnet werden.

In den Ballungszentren färbte sich bei einem Luftdurchsatz von 600 l/min der Glasfaserfilter innerhalb von 24 Stunden schwarz, in ländlichen Gebieten liegt meist nur eine leichte Graufärbung des Glasfaserfilters vor. Die abgeschiedene Partikelmenge reichte in Ballungsräumen bis zu 137 mg/1 000 m³. In ländlichen Gebieten liegen die Werte sehr viel niedriger.

In Abb. 2 sind typische Dosis-Wirkungsbeziehungen dargestellt, wie sie bei Untersuchungen in einem industriellen Ballungsraum festgestellt wurden. An einem 40 km davon entfernten Luftkurort im Odenwald, ohne direkte Emittentenbeeinflussung, wurde die „Hintergrundbelastung“ mit mutagenen Schadstoffen bestimmt. Auch an diesem Standort waren zwar alle Proben positiv, die mutagene Wirkung der Extrakte war jedoch im Vergleich zu den Standorten in Mannheim sehr niedrig. Für beide Teststämme wurde eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung festgestellt. Die höheren Revertanzahlen beim Stamm TA 100 zeigen, daß in den Extrakten chemische Verbindungen die Basenpaarsubstitutionen hervorrufen, gegenüber Substanzen die frameshift-Mutationen (TA 98) erzeugen, überwiegen. Durch Zugabe der S9-Enzymfraktion verlor nur ein geringer Teil der Verbindungen durch Metabolisierung seine mutagenen Eigenschaften.

An dem Industriestandort „Friesenheimer Insel“, gekennzeichnet u.a. durch chemische und petrochemische Industrie, konnte für das Sommerhalbjahr die mit Abstand höchste Mutagenität festgestellt werden. An diesem Untersuchungsstandort überwogen ebenfalls Verbindungen im Extrakt, die Basenpaarsubstitutionen im Stamm TA 100 hervorriefen. Durch Zugabe der S9-Enzymfraktion wurde an diesem Standort eine stärkere Abnahme der mutagenen Eigenschaften der Verbindungen als bei dem Vergleichsstandort gefunden. Zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Untersuchungsstandorte wurden aus dem linearen Kurvenbereich dieser Dosis-Wirkungsbeziehungen über eine lineare Regression die Revertanzahl/m³ angesaugter Luft berechnet (→ Abb. 3). Die Luftbelastung mit mutagenen Verbindungen im Ballungs-

raum variierte demzufolge im Sommerhalbjahr bei dem in der Regel empfindlichsten Stamm TA 100 um den Faktor 4, mit 4 Rev/m³ am „Luftkurort“ und 16 Rev/m³ am Industriestandort Friesenheimer Insel.

Im Winter liegen veränderte Immissionsbedingungen als Folge der stärkeren Heizungs- und Verkehrsemissionen vor.

Die atmosphärischen Bedingungen im Winter können zu „Smogwetterlagen“ und zu veränderten chemischen Umsetzungen der Luftschadstoffe führen, so daß auch veränderte Einträge an mutagenen Stoffen zu erwarten sind. Während im Sommer des Vorjahres die meisten Werte in einem Bereich zwischen 10 – 12 Rev/m³ lagen, ergaben die Winteruntersuchungen eine sehr viel größere Streubreite der Werte (→ Abb. 4). Besonders auffällig sind die extrem hohen Revertanzahlen am Standort Käfental, einem als Wohngebiet (Hausbrand!) mit Verkehrsbelastung einzustufendem Untersuchungsstandort. Hier wurden mit 69 Rev/m³ (TA 100) fast 9 fach höhere Revertanzahlen als im Sommer 1991 ermittelt. Zudem lagen die Werte auch über dem am Industriestandort Friesenheimer Insel festgestellten Werten (15 Rev/m³). Der Standort Friesenheimer Insel und auch der Referenzstandort im Odenwald wiesen hingegen kaum veränderte Werte im Vergleich zum Vorjahressommer auf.

Bei den landesweiten Untersuchungen 1993 wurden erhebliche Unterschiede zwischen den Ballungsräumen und den ländlichen Standorten sowie zwischen der Winter- und Sommerbelastung mit Mutagenen festgestellt (→ Abb. 5, S. 57).

Überraschend hohe Revertanzahlen wurden beim Stamm TA 98 in Reutlingen gefunden, gefolgt von Mannheim, Karlsruhe und Stuttgart. Erwartungsgemäß war am Standort Kälblescheuer im Hochschwarzwald mutagene Wirkungen des Luftextraktes kaum nachweisbar. Der Standort Kälblescheuer eignet sich damit gut als Referenzstation für die Hintergrundbelastung. Grundsätzlich wurde der größte Anteil der Mutagenität in dem auf den Glasfaserfiltern abgeschiedenen Material gefunden. Die Mutagenität der Extrakte aus den PU-Schäumen war im Winter sehr viel niedriger als

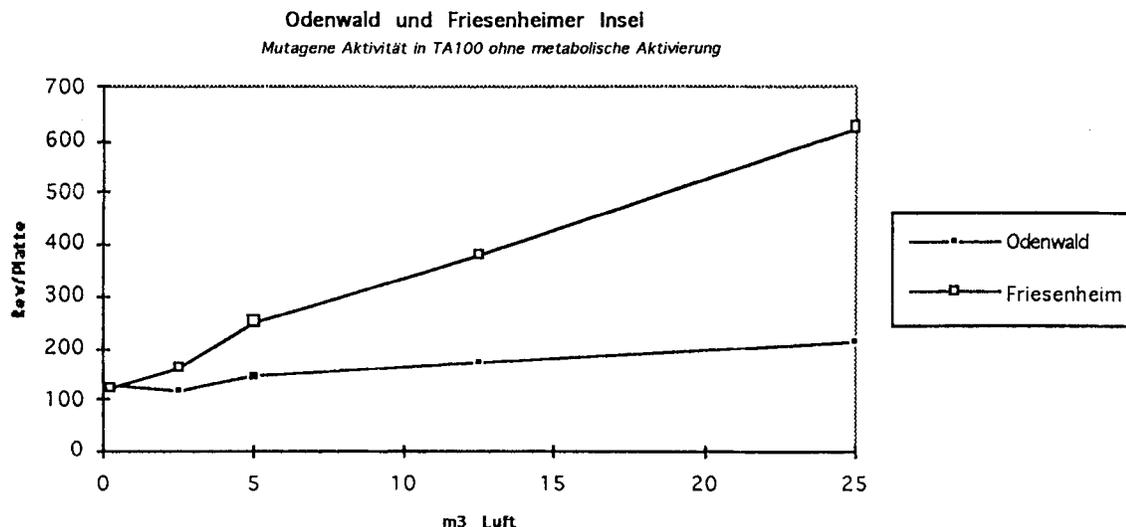


Abb. 2: Dosis Wirkungsbeziehungen für den Ames-Test an den Probenahmeorten Friesenheimer-Insel und Odenwald im Sommer 1991

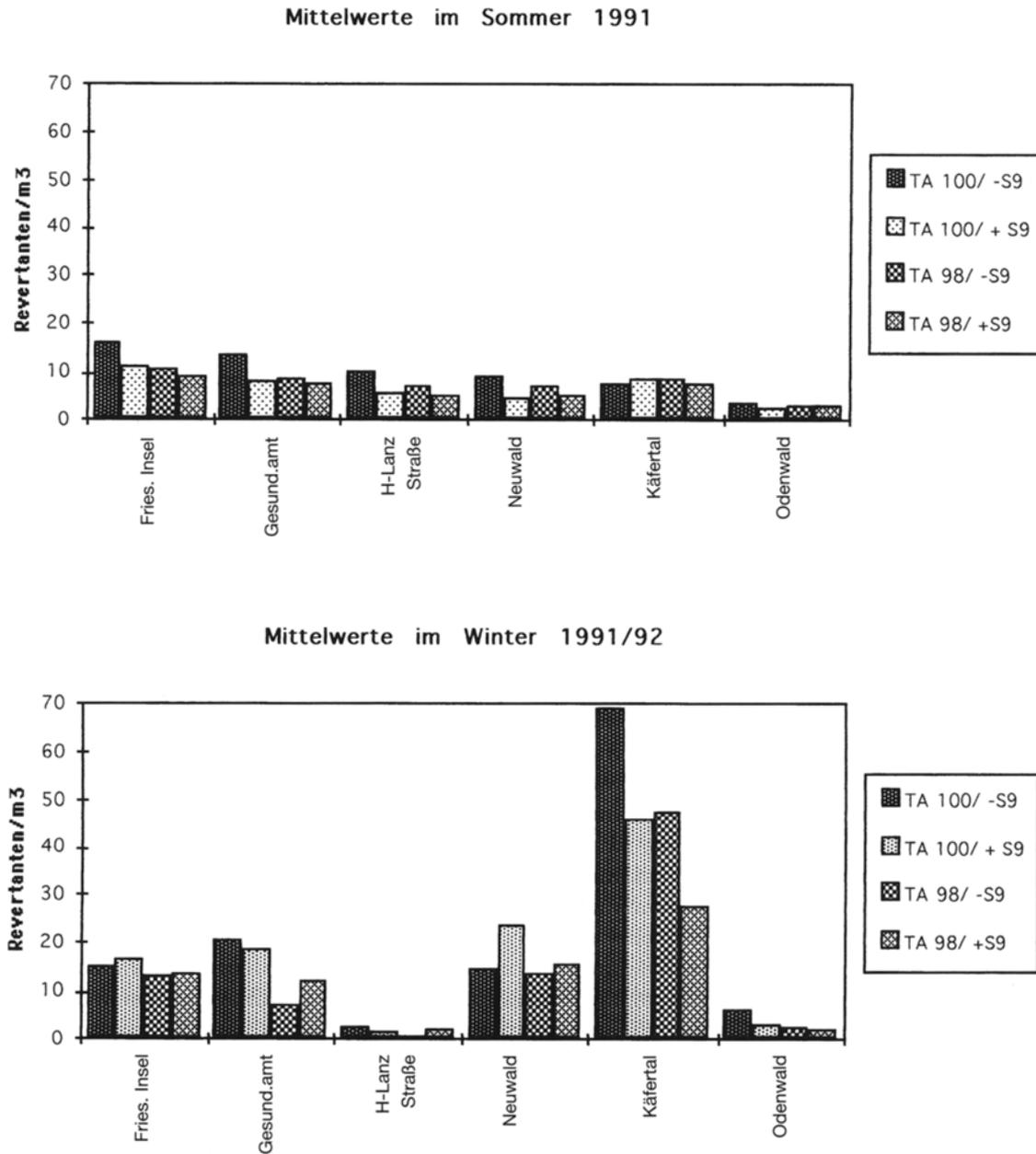


Abb. 3 und 4: Mittelwerte der Revertanten/m³ im Sommer 1991 und Winter 1991/92 im Ballungsraum Mannheim

die auf den entsprechenden Glasfaserfiltern gefundene Aktivität. Im Sommer näherten sich die Werte jedoch an, wobei bisweilen die Aktivität der PU-Extrakte höher als die der GF-Extrakte lag. HARGER et al. (1992) fand, daß an PUF gesammelte Verbindungen etwa gleichgroße mutagene Aktivitäten haben wie partikelgebundene Mutagene.

In dieser Untersuchung lagen somit vor allem in Ballungsräumen mit hoher Verkehrsbelastung und an Industriestandorten mit Einzelemittenten die höchsten Revertanzahlen vor. ERDINGER et al. (1994) konnte zeigen, daß an den verschiedenen Probenahmestellen die Belastung der Luft mit mutagenen Verbindungen mit dem Durchschnittswert der NO-Konzentration korreliert ist (→ Abb. 6).

BARALE et al. (1989) fanden im Winter und an verkehrsreichen Standorten in Pisa die höchsten Revertanzahlen mit ca. 50 Rev/m³ bei TA 98-S9. Es lag dabei eine gute Korrelation zwischen Staubmenge und Revertanzahl vor. In der stark verkehrsbelasteten Stadt Rom wurden vergleichsweise geringe Revertanzahlen gefunden, die im Winter bei 18 Rev/m³ und im Sommer nur bei 5–8 Rev/m³ lagen (CREBELLI et al. 1988). In Rom wurden nur an einem Standort Luftproben genommen. Die Auswahl des Standortes könnte hierbei Ursache für die relativ geringen Revertanzahlen sein. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß es durch die intensivere Sonneneinstrahlung zu einer weitergehenden Eliminierung mutagener Verbindungen kommt.

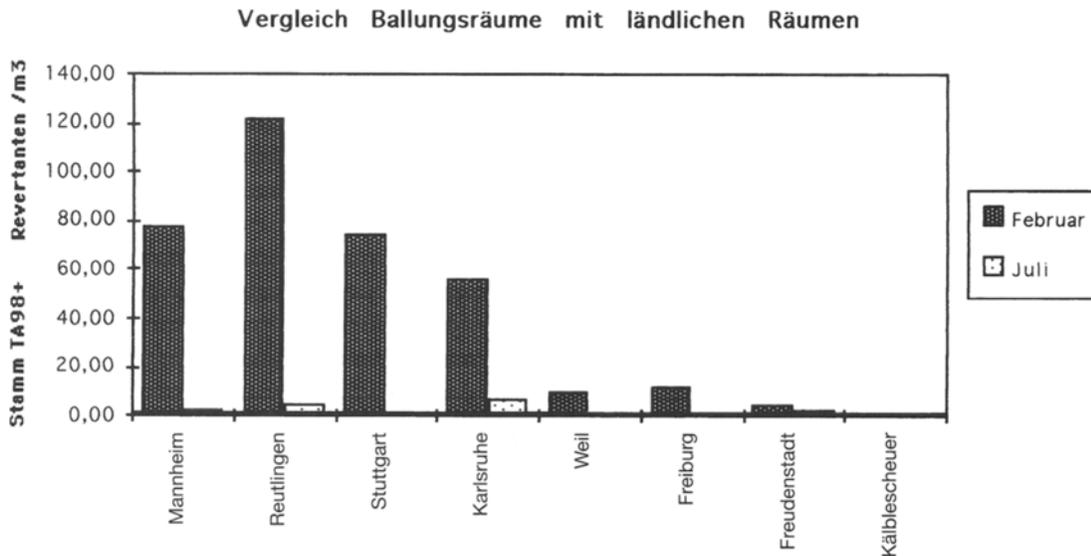
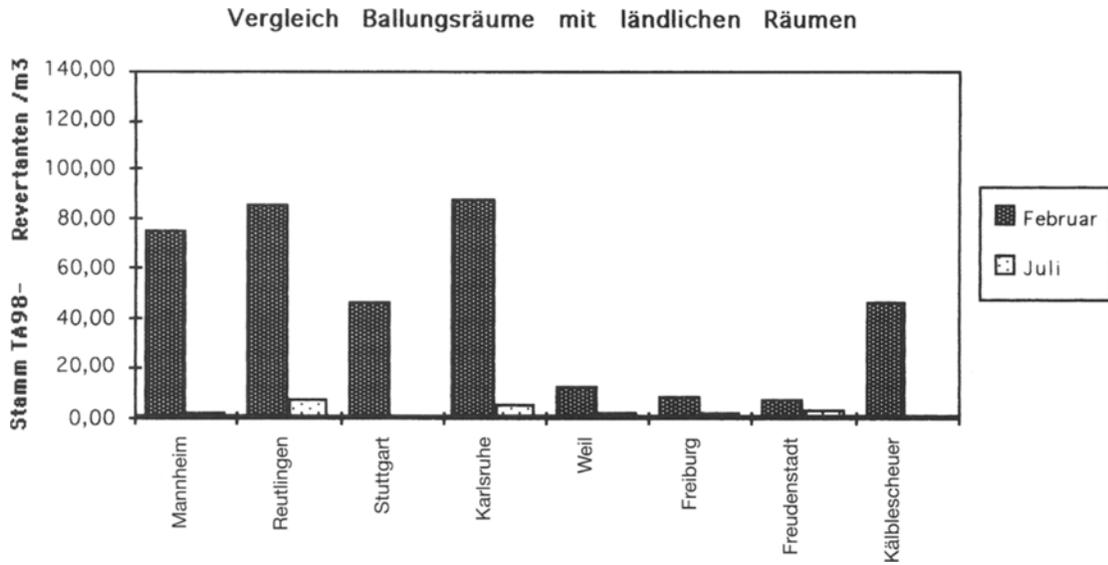


Abb. 5 und 6: Vergleich der Belastung mit mutagen wirkenden Luftverunreinigungen in verschiedenen Ballungsräumen und ländlichen Standorten Baden Württembergs

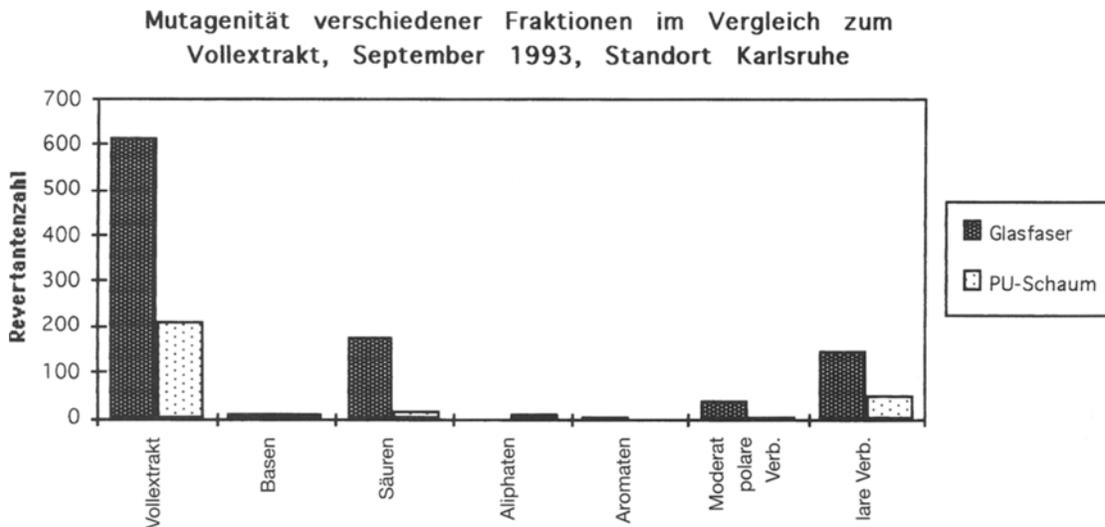


Abb. 7: Mutagenität nach Auftrennung des Vollextraktes in verschiedene Fraktionen

Die Fraktionierung einiger Extrakte ergab, daß überwiegend Fraktionen mit sehr polaren, oder sauren Verbindungen für die Mutagenität verantwortlich sind, nicht aber Fraktionen in denen polycyclische Aromate auftreten (\rightarrow Abb. 7, S. 57). Auch Untersuchungen partikelgebundener Schadstoffe aus standardisiertem Material (z.B. NBS SRM 1649 Umgebungsluft oder NBS SRM 1650 Dieselrußpartikel) zeigten, daß nur ein kleiner Teil der Mutagenität in den unpolaren Fraktionen, in denen auch die PAHs vorlagen, zu finden ist. Der größte Teil der Mutagenität lag in den sauren Fraktionen und in den neutralen moderat polaren bis polaren Fraktionen der Extrakte vor (SCHUETZLE & LEWTAS 1986; GREENBERG et al. 1993). Dieses Ergebnis ist insofern von Bedeutung, weil das genotoxische Benzo(a)pyren als Leitsubstanz für mutagene PAHs in der Umweltüberwachung bestimmt wird. Der Benzo(a)pyren-Gehalt korreliert allerdings nicht immer mit dem Gesamtgehalt an PAHs (LEWTAS 1993). Benzo(a)pyren wurde in Deutschland mit $0,5 - 30 \text{ ng/m}^3$ in der Luft gefunden (GRIMMER 1992). Die im Ballungsraum Ruhrgebiet gemessenen ca. $2 - 4 \text{ ng/m}^3$ würden im Ames-Test zu weniger als $0,5$ Revertanten/ m^3 führen. Die Ergebnisse weisen somit daraufhin, daß in den Luftgemischen Verbindungen eine Rolle spielen, die durch die Messung des Leitparameters Benzo(a)pyren nicht berücksichtigt werden, sondern bislang nur indirekt über ihre Wirkung im Ames-Test erfaßt werden.

In Frage kommen beispielsweise Nitro-PAHs aus Dieselpartikeln, die in den moderat-polaren bis polaren Fraktionen als sehr potente Mutagene (30 – 40 % der Gesamtmutagenität) gefunden wurden, sowie 2 – 6 Ring PAHs mit verschiedenen funktionellen Gruppen (SCHUETZLE & LEWTAS 1986). Insbesondere Standorte mit Verkehrsbelastung zeigen in den PAH/Nitro-PAH-Fraktionen hohe mutagene Aktivität (LEWTAS et al. 1990). AREY et al. (1988) (In: HARGER et al. 1992) schätzen, daß Nitropyrene und Nitrofluoranthene als Produkte von atmosphärischen Gasphasereaktionen bis zu zehn Prozent zur Gesamtmutagenität beitragen. In der organischen Säurefraktion werden hydroxilierte Nitro-Aromaten und Nitro-PAHs als atmosphärische Transformationsprodukte dafür verantwortlich gemacht (NISHIOKA et al. 1988). HELMIG et al. (1992) fanden beispielsweise Nitrobenzopyranone als potente Mutagene. Im Sommer könnten die polarerer Verbindungen und Nitro-PAHs durch höhere Ozon- und OH-Konzentrationen zunehmen (GREENBERG et al. 1993). In einem Simulationsexperiment mit verschiedenen Gasgemischen (NO_x , versch. Lösungsmittel, z.B. Toluol), die in ihrer Zusammensetzung den städtischen Verhältnissen glichen, wurden dafür auch Anhaltspunkte gefunden (KLEINDIENST et al. 1992). Der Anstieg der mutagenen Aktivität lief hier mit der Ozon- und PAN-Bildung parallel. Dies steht jedoch in deutlichem Widerspruch zu den vorliegenden Ergebnissen, die zeigen, daß die mutagene Aktivität im Sommer auf den Jahrestiefstand fällt und somit mit der Ozonkonzentration eher negativ korreliert ist. Die Ursache für die Diskrepanz dieser Ergebnisse kann zur Zeit nicht erklärt werden, da die diesen Transformationsprozessen zugrundeliegenden chemischen Reaktionen nicht hinreichend bekannt sind. In Luftprobenextrakten wurden aber auch oxidativ wirkende Mutagene (HOYER et al. 1992) und chlorierte PAHs (NILSSON & ÖSTMAN 1993) nachgewiesen, wobei letztere vermutlich Sekundärprodukte aus den Verkehrsemissionen darstellen.

4 Schlußfolgerungen

Nach den bisherigen Erfahrungen ist das vorgestellte Konzept für die Routineüberwachung im Rahmen von Luftreinhalteplänen oder zur Überwachung von Einzelemittenten grundsätzlich geeignet und führt zu neuen Erkenntnissen, die über andere Parameter nicht gewonnen werden können. Die Untersuchung von mutagen wirkenden Luftverunreinigungen in Baden-Württemberg zeigte, daß Belastungsunterschiede deutlich zu indizieren und auch unterschiedlichen Immissionssituationen zugeordnet werden können. Die mutagene Wirkung ist dabei auf zahlreiche Stoffverbindungen zurückzuführen, von denen z.B. die stark mutagenen Nitroaromaten bisher zu wenig in die Umweltüberwachung einbezogen wurden. Durch den Einsatz verschiedenster Biotests, von Bakterien- und Pflanzentests bis zu Säugetierzelltests, ist ein weiterer Bereich des potentiellen Wirkungsspektrums der absorbierbaren Luftverunreinigungen erfaßbar. Zur Bewertung derartiger Untersuchungen hat z.B. LEWTAS (1993) erste Ansätze zur Abschätzung des Krebsrisikos aus dem Ames-Test entwickelt.

Die Absorption und die stofflichen Umwandlungen auf den Filtern bedürfen jedoch weiterer Untersuchungen. Für leicht flüchtige Verbindungen ist ein geeignetes Sammelsystem für den Routineeinsatz noch zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Es wurde ein Untersuchungskonzept zur Überwachung organischer Luftverunreinigungen mit Hilfe von Biotests vorgestellt. Partikelgebundene und halbflüchtige Kohlenwasserstoffe wurden über „high-volume“ Pumpen an Filtern absorbiert und nach chemischer Extraktion verschiedenen Biotestsystemen zugeführt. Untersuchungen speziell der genotoxischen Wirkungen von organischen Luftverunreinigungen im Ames-Test ergaben für Baden-Württemberg sehr deutliche örtliche und jahreszeitliche Belastungsunterschiede für die Testorganismen mit mutagenen Luftverunreinigungen. Die Fraktionierung der Extrakte zeigte, daß der Hauptteil der Mutagenität durch Verbindungen in der sauren Fraktion sowie in den neutralen polaren Fraktionen hervorgerufen werden. Die Fraktionen, in denen die polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe vorlagen, zeigten nur geringe Mutagenität.

6 Literatur

- BARALE, R.; D. ZUCCONI; F. GIORGELLI; A. L. CARDUCCI; M. TONELLI & N. LOPRIENO (1989): Mutagenicity of Airborne Particles From a Nonindustrial Town in Italy. – *Environ. Mol. Mutagen.* 13, 227 – 233
- CREBELL, R.; S. FUSELLI; A. MENEGUZZ; G. AQUILINA; L. CONTI; P. LEOPARDI; A. ZIJNO & F. BARIS (1988): In vitro and in vivo mutagenicity studies with airborne particulate extracts. – *Mutation Research* 204, 565 – 575
- ERDINGER, L.; H. DITTON; M. DÜRR; I. DÖRR; M. FRIED; S. JEHL & H.-G. SONNTAG (1994): Entwicklung und Anwendung von in-vitro Testverfahren zur routinemäßigen Untersuchung mutagener und cytotoxischer Wirkungen organischer Luftschadstoffe. – *Veröff. PAÖ* 8, 501 – 515

- GRAEDEL, T. E.; D. T. HAWKINS & L. CLAXTON (1986): Atmospheric Chemical Compounds: Sources, Occurrence and Bioassay. – Academic Press, New York
- GREENBERG, A.; J.-H. LWO; T. B. ATHERHOLT; R. ROSEN; T. HARTMAN; J. BUTLER & J. LOUIS (1993): Bioassay-directed fractionation of organic compounds associated with airborne particulate matter: an interseasonal study. – *Atmosph. Environ.* 27A (19) 1609 – 1626
- GRIMMER, G. (1992): Eintrag, Monitoring und Bewertung der kanzerogenen Umweltbelastung durch polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe. – *GIT-Fachz. Lab.* 36 (1) 12 – 21
- GUNDEL, L. A.; J. M. DAISEY; L. R. F. DE CARVALHO; N. Y. KADO & D. SCHUETZLE (1993): Polar organic matter in airborne particles: Chemical characterization and mutagenic activity. – *Environ. Sci. Technol.* 27, 2112 – 2119
- HARGER, W. P.; J. AREY & R. ATKINSON (1992): The mutagenicity of HPLC-separated vapor-phase and particulate organics in ambient air. – *Atmosph. Environ.* 26A (13) 2463 – 2466
- HART, K. M.; M. I. LORNE & J. F. POKOW (1992): High-Volume Air Sampler for Particle and Gas Sampling. 1. Design and Gas Sampling Performance. – *Environ. Sci. Technol.* 26, 1048 – 1052
- HELMIG, D.; J. AREY; W. P. HARGER; R. ATKINSON & J. LÓPEZ-CANCIO (1992): Formation of mutagenic Nitrodibenzopyranones and their occurrence in ambient air. – *Environ. Sci. Technol.* 26, 622 – 624
- HOYER, M. E.; G. J. KEELER & J. E. BALL (1992): Detection of oxidative mutagens in an urban air-particulate extract: a preliminary study. – *Mutation Research* 283, 295 – 299
- JENSEN, S.; G. ERIKSSON & H. KYLIN (1992): Atmospheric pollution by persistent organic compounds: Monitoring with pine needles. – *Chemosphere* 24 (2) 229 – 241
- KLEINDIENST, T. E.; D. F. SMITH, E. E. HUDGENS; L. D. CLAXTON; J. J. BUFALINI & L. T. CUPITT (1992): Generation of mutagenic transformation products during irradiation of simulated urban atmospheres. – *Environ. Sci. Technol.* 26 (2) 320 – 329
- LEWTAS, J.; J. CHUNG; M. NISHIOKA, & B. PETERSEN (1990): Bioassay-directed fractionation of the organic extract of SRM 1649 urban air particulate matter. – *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 29, 245 – 256
- LEWTAS, J. (1993): Complex mixtures of air pollutants: Characterizing the cancer risk of polycyclic organic matter. – *Environ. Health Perspectives* 100, 211 – 218
- LFU – LANDESANSTALT FÜR UMWELTSCHUTZ (Hrsg.) (1993): Ökologisches Wirkungskataster Baden-Württemberg. – Jahresbericht 1990/91, Bd. 1, 142 S., Karlsruhe
- MARON, B. & B. AMES (1984): Revised methods for the salmonella mutagenicity test. – *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 93 – 160, Elsevier
- MARFELS, H.; K. SPURNY; J. IBBURG; A. WENZEL; U. GLASER & U. FRITSCHE (1989): Anthropogene Stäube in der Außenluft in Baden-Württemberg: Physikalisch-chemische Analyse und toxikologische Bewertung. – *Veröff. KFK-PEF*, Bd. 2, Karlsruhe
- MATSUSHITA, H.; O. ENDO; S. GOTO; H. SHIMIZU; H. MATSUMOTO; K. TAMAKAWA; T. ENDO; Y. SAKABE; H. TOKIWA & M. ANDO (1992): Collaborative study using the preincubation *Salmonella typhimurium* mutation assay for airborne particulate matter in Japan. A trial to minimize interlaboratory variation. – *Mut. Res.* 271, 1 – 12
- NILSSON, U. L. & C. E. ÖSTMAN (1993): Chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons: method of analysis and their occurrence in urban air. – *Environ. Sci. Technol.* 27, 1826 – 1831
- NISHIOKA, M. G.; C. C. HOWARD; D. A. CONTOS; L. M. BALL & J. LEWTAS (1988): Detection of hydroxylated nitro aromatic and hydroxylated nitro polycyclic aromatic compounds in an ambient air particulate extract using bioassay-directed fractionation. – *Environ. Sci. Technol.* 22, 908 – 915
- SCHUETZLE, D. & J. LEWTAS (1986): Bioassay-directed chemical analysis in environmental research. – *Anal. Chem.* 58 (11) 1060 – 1075
- UMLAUFF, G. & H. KAUPP (1993): A sampling device for semivolatile organic compounds in ambient air. – *Chemosphere* 27 (7), 1293 – 1296
- ZINBO, M.; D. SCHUETZLE; D. P. H. HSIEH; N. Y. KADO; J. M. DAISEY & L. A. GUNDEL (1992): An improved fractionation procedure for the bioassay-directed chemical analysis of ambient air particulate extracts. – *Anal. Sciences* 8, 461 – 468

In dieser Beitragsserie erscheinen demnächst die folgenden Arbeiten:

Teil III – 1: Bioindikationsmethoden, Passive Verfahren – Botanik

- Sukzessionsuntersuchungen an Dauerflechten
- Epiphytische Flechten – Einsatz als Reaktionsindikatoren
- Vitalitätserhebungen an Grünland und Waldbodenpflanzen
- Pflanzen als Akkumulationsindikatoren

Teil III – 2: Bioindikationsmethoden, passive Verfahren – Zoologie

- Terrestrische Gastropoden (Landschnecken) als Reaktions- und Akkumulationsindikatoren
- Regenwürmer als Akkumulationsindikatoren
- Käfer als Bioindikatoren zur ökologischen Bewertung von Waldstandorten
- Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikatoren
- Regenwürmer als Reaktionsindikatoren
- Collembolen als Reaktionsindikatoren