



31.3.2017

Zusammenfassung des Berichts

Zytotoxizität von Abgasen aus Holzfeuerungen

Peter Zotter, Stéphane Richard, Marcel Egli und Thomas Nussbaumer, Hochschule Luzern

Der vollständige Bericht in Englisch wird zu einem späteren Zeitpunkt auf der [Website des BAFU](#) verfügbar sein

1 Hintergrund und Zielsetzung

Um die Ziele der schweizerischen Energiestrategie 2050 erreichen zu können, wird ein Anstieg der Holzenergienutzung um 50% erwartet. Da Holzfeuerungen einen relevanten Beitrag zur Luftverschmutzung, insbesondere zum Feinstaub kleiner 10 Mikrometer (PM10) verursachen, besteht ein potenzieller Zielkonflikt zwischen der vermehrten Nutzung von Energieholz und den Zielen der Luftreinhaltung. Im Zusammenhang mit den Feinstaubemissionen aus Holzfeuerungen ist zu beachten, dass die Emissionen je nach Anlagentyp und Betriebsweise grosse Unterschiede in Art, Menge und Zusammensetzung verschiedener Komponenten aufweisen. Die primären Partikel, die im heissen Abgas in fester oder flüssiger Form vorliegen, werden daher in drei Kategorien unterteilt:

1. Anorganische Partikel (vorwiegend Salze als dominierende Partikelfraktion bei nahezu vollständiger Verbrennung).
2. Russ (gebildet bei hohen Verbrennungstemperaturen und Sauerstoffmangel).
3. Kondensierbare organische Verbindungen (Condensable Organic Compounds, COC, gebildet bei niedrigen Verbrennungstemperaturen).

Von den drei Partikelarten zeigen eigene frühere Untersuchungen für COC die höchste Zytotoxizität und Karzinogenität, gefolgt von Russ, während Salzpartikel die geringste Wirkung aufweisen. Zytotoxizität ist die Fähigkeit einer chemischen Substanz, eines Virus oder einer Immunzelle lebende Zellen zu schädigen oder zu zerstören. COC sind in Abhängigkeit von Temperatur und Konzentration entweder in der Gas- oder Flüssigphase zu finden. Im heissen Abgas befinden sich COC in der Gasphase und sind Teil der flüchtigen organischen Verbindungen (Volatile Organic Compounds, VOC). In der Atmosphäre können COC kondensieren und tragen dann zu den primären organischen Aerosolen (POA) bei, während VOC durch fotochemische Reaktionen in der Atmosphäre sekundäre organische Aerosole (SOA) bilden können.

Da die Emissionsgrenzwerte für Staub in der Luftreinhalte-Verordnung (LRV) auf einer Probenahme im heissen Abgas basieren, liegen zu COC und SOA, mit Ausnahme einer Messung von VOC als mögliche SOA-Vorläufer, in der Regel keine Informationen vor. Aus diesem Grund besteht eine Wissenslücke beim Zusammenhang zwischen den gemessenen Schadstoffemissionen im heissen Abgas und dem Einfluss der Umgebungsluft auf die menschliche Gesundheit. Zudem sind experimentelle Methoden zur Untersuchung von Gesundheitsauswirkungen von Schadstoffen komplex und teuer. Informationen über Gesundheitseffekte von Emissionen aus Holzfeuerungen liegen deshalb nur vereinzelt vor und sind meist auf eine kleine Anzahl spezifischer Anwendungen beschränkt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist deshalb, die Entwicklung eines einfachen Verfahrens für Probenahme und anschließender In-vitro-Zellanalyse von Abgasen aus der Holzverbrennung.

2 Vorgehen und Methode zur Toxizitätsanalyse

Um eine einfache Probenahme zu realisieren, wurden zwei nacheinander durchgeführte Standard-Probenahmeverfahren angewandt. In einem ersten Schritt wird dabei heisses Abgas durch eine beheizte Probenahme bis zu einem beheizten Filter geleitet. Dieser Teil entspricht der Probenahme zur gravimetrischen Bestimmung der Feststoffe im heissen Abgas nach BAFU- Messempfehlung [Emissionmessung bei stationären Anlagen](#) (EN 13284-1 (VDI 2066)). Anschliessend wird das heisse, gefilterte Abgas durch drei in einem Wasserbad auf 5 °C gekühlte Gaswaschflaschen geleitet. Zwei Flaschen sind mit Wasser gefüllt, die dritte ist leer. Die rasche Abkühlung bewirkt die Kondensation von COC sowie von Salzen, Schwermetallen und Wasserdampf in den Gaswaschflaschen. Nach den Flaschen befindet sich ein weiterer, nicht beheizter Filter. Auf diesem werden mitgerissene Tröpfchen sowie Partikel, die durch Abkühlung in den Gaswaschflaschen entstanden sind, aber nicht im Wasser abgeschieden wurden, gesammelt. Die Gaswaschflaschen mit nachfolgendem Filter entsprechen der Methode nach US-EPA 5H.

Zusätzlich zur Kombination der beiden Standardprobenahmen wurden anstelle von Wasser auch verschiedene Zellnährstofflöslichkeiten in den Gaswaschflaschen verwendet wie auch Versuche ohne Filter vor den Gaswaschflaschen durchgeführt. Dabei werden zusätzlich zu den kondensierbaren Verbindungen auch Feststoffe in den Flaschen abgeschieden. Um die Wirkung sowohl für kondensierbare Stoffe als auch für Partikel bestimmen zu können, werden parallel zwei Probenahmelinien aufgebaut, eine mit Filter vor den Gaswaschflaschen (Methode 1) und eine ohne Filter (Methode 2):

- Methode 1 liefert die Toxizität von COC ohne die Feststoffe im Abgas.
- Methode 2 liefert die Toxizität von COC inklusive Feststoffe.

Im Biologielabor werden die Flüssigkeiten der Gaswaschflaschen nach der Probenahme im Verbrennungslabor mit Zellkulturen gemischt. Nach einer gewissen Expositionsdauer der Zellen wird anschliessend die Zellüberlebensrate bestimmt. Diese wird als Mass für die Zytotoxizität von COC und Feststoffen aus Holzfeuerungsabgasen betrachtet und bezeichnet den Anteil lebender Zellen einer Zellpopulation nach einer bestimmten Expositionsdauer. Zur Charakterisierung der Probenahme und der dazugehörigen Arbeitsschritte wurden folgende Tests durchgeführt:

- Evaluation des Verfahrens zur Bestimmung der Zellüberlebensrate.
- Untersuchung von Blindproben und des Einflusses der Sterilität des zur Probenahme verwendeten Materials.
- Art und Menge der Probenahmeflüssigkeit sowie Absauggeschwindigkeit.
- Einfluss der Zeitdauer zwischen Probenahme im Verbrennungslabor und Beginn der Zellanalyse (Probenlagerungsdauer).
- Vergleich verschiedener Zelllinien.

3 Resultate der Methodenentwicklung

- Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) kann zur Bestimmung der Zellüberlebensrate für Proben, die mit der entwickelten Probenahme gesammelt wurden, angewendet werden. Es waren keine Interferenzen von Feststoffen, die nicht in der Probenahmeflüssigkeit gelöst, sondern in Suspension waren, mit der FACS-Analyse ersichtlich. Diese Ergebnisse stimmen mit Erkenntnissen aus der Literatur überein.
- Es wurden keine Unterschiede in der Zellüberlebensrate zwischen Proben mit sterilem und nicht sterilem Zubehör gefunden. Zudem zeigten Blindproben mit Probenahmeflüssigkeit, die nicht mit Abgasen durchströmt wurde, keinen Unterschied zu Negativkontrollen (Zellkulturen, die mit frischem Medium oder sterilem Wasser hergestellt wurden, das keine Arbeitsschritte im Verbrennungslabor durchlaufen hat).
- Als Probenahmeflüssigkeit wurde steriles Wasser oder Zellnährstofflöslichkeiten verwendet. Es wurde jedoch kein Einfluss der Flüssigkeit auf die Zellüberlebensrate gefunden. Da Wasser für chemische Analysen, insbesondere des organischen Kohlenstoffs (Total Organic Content, TOC), besser geeignet ist, wurde für die nachfolgenden Experimente ausschliesslich steriles Wasser eingesetzt.
- Die Untersuchung des Einflusses der Zeitdauer zwischen Probenahme im Verbrennungslabor und Beginn der Zellanalyse (bei Lagerung der Proben im Kühlschrank bei ca. 4°C) zeigte für dieselbe Probe einen Anstieg der Zellüberlebensrate nach zwei Wochen im Vergleich zu einer Lagerung von nur 15–19 Stunden. Das heisst, die Zytotoxizität nimmt bei langen Probelagerungszeiten ab. Innerhalb der ersten 31 Stunden waren jedoch keine Effekte erkennbar. Daher wurde für alle Proben die Zellanalyse 15–19 Stunden nach der Probenahme im Verbrennungslabor gestartet.

- Die Untersuchung verschiedener Absauggeschwindigkeiten während der Probenahme zeigte, dass Durchflussraten zwischen 5 und 15 l/min keinen Einfluss auf den Abscheidegrad von COC haben. Jedoch sollte ausreichend Flüssigkeit und ein hoher Flüssigkeitsstand in den Gaswaschflaschen verwendet werden, damit der grösstmögliche Abscheidegrad von COC erreicht wird.
- Die Reproduzierbarkeit der Zellüberlebensrate von Mehrfachmessungen desselben Betriebszustandes beinhaltet die Variabilität der Verbrennungs- und Probenahmebedingungen sowie der Zellanalyse. Wiederholte Messungen von Proben aus einem Pelletkessel zeigten eine Gesamtvariabilität von weniger als 30% bei einer Zellexposition von 24 Stunden. Da eine kürzere Exposition zu einer höheren Variabilität führte, wurden alle nachfolgenden Zellanalysen mit einer Exposition von 24 Stunden durchgeführt. Die Gesamtvariabilität variiert jedoch für unterschiedliche COC-Konzentrationen, Feuerungen und Betriebsbedingungen. Daher wurden jeweils zwei oder mehr Proben für jede Feuerung und Betriebsbedingung analysiert.
- Für die ersten Tests und die Methodencharakterisierung wurden sog. C2C12-Skelettmuskelzellen von Mäusen verwendet, zu denen bereits Erfahrungen vorlagen. Um für den Menschen relevantere Ergebnisse zu erhalten, wurden anschliessend menschliche H187-Lungenepithelzellen untersucht. Ein Vergleich zwischen den beiden Zelltypen ergab keine signifikanten Unterschiede der Zellüberlebensrate für dieselben Proben. Zusätzlich wurden noch vier Tests mit der A549-Zelllinie (Lungenepithelzellen mit Eigenschaften von Alveolartyp-II) durchgeführt. Der Vergleich der Zellüberlebensrate als Funktion von TOC zwischen den A549 und H187 Zellen zeigte, dass die Dosis-Wirkungskurven zwar dieselbe Form aufweisen, jedoch bei den A549-Zellen eine höhere TOC-Menge erforderlich ist, um dieselbe Zytotoxizität wie bei den H187-Zellen zu induzieren.

4 Bestimmung der Zytotoxizität von Holzfeuerungsabgasen

Nach der Charakterisierung der Probenahme wurden folgende Feuerungen bei unterschiedlichen Betriebsarten untersucht:

- 15 kW Pelletkessel optimal betrieben, sowie mit Luftmangel und hohem Luftüberschuss.
- 150 kW Vorschubrostfeuerung mit Waldhackschnitzel unter Voll- und Teillastbetrieb sowie Abfahren von Teillast auf Standby.
- 8 kW Holzofen bei stationärer Verbrennung, sowie bei Kaltstart und Nachlegen.
- 30 kW Stückholzkessel unter optimalen Bedingungen, sowie bei Kaltstart und Luftmangel.

5 Resultate der Zytotoxizitätsbestimmung von Holzfeuerungsabgasen

- Die höchsten Emissionen an CO, flüchtigen Nicht-Methan-Kohlenwasserstoffverbindungen (NMVOC), COC und Feststoffen wurden im Holzofen bei Kaltstart mit Anfeuern von unten gefunden, gefolgt vom Nachlegen im Holzofen. Auch bei den anderen Feuerungen verursachten ungünstige Betriebsbedingungen (Kaltstart und Luftmangel im Stückholzkessel, Abfahren von Teillast auf Standby in der Vorschubrostfeuerung, sowie hoher Luftüberschuss und Luftmangel im Pelletkessel) hohe NMVOC- und vor allem hohe CO-Emissionen. Während des stationären Betriebs traten bei allen untersuchten Feuerungen viel geringere Emissionen auf, bei organischen Verbindungen sogar um mehr als eine Grössenordnung. Es zeigte sich auch, dass die TOC-Mengen in der Probenahme flüssigkeit gut mit den NMVOC im heissen Abgas korrelieren ($R^2 = 0.74$). COC-Emissionen können die Feststoffemissionen im heissen Abgas deutlich übersteigen.
- Beim Vergleich der Zellüberlebensrate von COC-Proben (ohne Feststoffe) als Funktion von TOC in der Probenahme flüssigkeit wurde keine bzw. nur eine geringe Zytotoxizität für stationäre Bedingungen in der Vorschubrostfeuerung (Voll- und Teillast), im Stückholzkessel und im Pelletkessel gefunden. Für ungünstige Betriebsbedingungen in den untersuchten Kesseln (Kaltstart und Luftmangel im Stückholzkessel, Abfahren von Teillast auf Standby in der Vorschubrostfeuerung, sowie hoher Luftüberschuss und Luftmangel im Pelletkessel) sowie allen Betriebsarten im Holzofen nahm die Zellüberlebensrate mit zunehmender TOC-Konzentration hingegen deutlich ab. TOC-Konzentrationen, die eine letale Dosis von 50% (LD50) induzierten, erstrecken sich jedoch nur über einen Konzentrationsbereich von 6–19 mg/l. Dies zeigt, dass vergleichbare Mengen an organischen Verbindungen von verschiedenen Feuerungen und Betriebsbedingungen eine ähnliche Zytotoxizität aufweisen.
- Wenn die Zellüberlebensraten auf die beprobte Abgasmenge bezogen wird, was vereinfacht einer Toxizität pro zugeführter Energie entspricht, resultierte für COC-Proben (ohne Feststoffe) von guten und schlechten Verbrennungszuständen eine um bis zu zwei Grössenordnungen unterschiedliche Toxizität. Dies ist eine Folge der deutlich höheren Gehalte an organischen Verbindungen im Abgas bei schlechten Bedingungen. Die kleinste Abgasmenge für LD50, und somit die höchste

Toxizität verursachte der Betrieb des Stückholzkessels mit Luftmangel. Jedoch wiesen alle ungünstigen Betriebsbedingungen der untersuchten Feuerungen ähnliche Werte auf. Grosse Abgas-mengen aus stationären Bedingungen in der Vorschubrostfeuerung sowie aus optimalen Bedingungen im Pelletkessel und im Stückholzkessel zeigten hingegen keine bzw. nur eine geringe toxische Wirkung.

- Zur Untersuchung der Zytotoxizität der Feststoffe liegen zwei Resultate vor:
 1. Die Zellüberlebensraten von Proben mit COC allein und von Proben, in denen COC und Feststoffe abgeschieden wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede. Somit wurde für Feststoffe mit der vorliegenden Methode keine zusätzliche toxische Wirkung gegenüber COC gefunden.
 2. Für Feststoffproben, die durch Wasserextraktion des Filters vor den Gaswaschflaschen in Methode 1 hergestellt wurden, konnte keine Abnahme der Zellüberlebensrate gefunden werden. Dies gilt auch für TOC-Konzentrationen, bei denen für Proben mit COC allein bereits eine signifikante Zytotoxizität vorhanden war.

Diese Beobachtungen zeigen einerseits die hohe Gesundheitsrelevanz von COC. Andererseits wird mit der entwickelten Probenahme aber nicht die gesamte Menge an Feststoffen abgeschieden. So führen Feststoffe im Vergleich zu COC im Mittel nur zu rund 10% zusätzlichem TOC in den Probenahmeflüssigkeiten. Wasserunlösliche Stoffe wie polyaromatische Kohlenwasserstoffe und Russ werden praktisch nicht abgeschieden. Um die toxische Wirkung von Feststoffen, die wissenschaftlich belegt ist, zu analysieren, müssten daher Feststoffe separat gesammelt und analysiert werden. Zu erwähnen ist auch, dass toxische Effekte, welche die Zellüberlebensrate um weniger als 10% verringern, nicht detektiert werden können, da 10% der Zellen auch ohne Zugabe von Holzfeuerungsproben sterben. Von Interesse wäre auch die Untersuchung von zusätzlichen Zelleffekten wie oxidativer Stress und Entzündungsmarker, welche für Feststoffe eine sensitivere Bewertung ermöglichen könnten. Deren Analyse ist jedoch aufwändiger.