

UNIVERSITÄT
BAYREUTH



Projektverbund –
Ökotoxikologie in Bayern

Abschlussbericht Teilprojekt Nr. 5

Einfluss von Feinstaub auf Pflanzen

Projektverbund BayÖkotox

Ökotoxikologische Bewertung von Stoffen in der Umwelt

Projektnehmende/Bearbeitende

Universität Bayreuth
Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie
Prof. Dr. Stephan Clemens

weitere Bearbeitende
Ludwig Richtmann
Tel.: 0921-552638
E-Mail: ludwig.richtmann@uni-bay-reuth.de

Kooperationspartner

Universität Bayreuth
Lehrstuhl Keramische Werkstoffe
Dr. Nico Langhof

Thorsten Opel
0921-556525
thorsten.opel@uni-bayreuth.de

Bayerisches Landesamt für Umwelt
Dr. Marina Maier
marina.maier@lfu.bayern.de

Berichtszeitraum:

1. Februar 2020 bis 15. Juni 2023

Finanziert durch

Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz
Rosenkavalierplatz 2
81925 München



finanziert durch
Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Kurzzusammenfassung	5
2 Einleitung	6
3 Aufgabenstellung und Vorgehensweise	7
3.1 Arbeitspaket 1 (AP1): Charakterisierung metallischen Ultrafeinstaubes aus dem Verkehr	7
3.2 Arbeitspaket 2 (AP2): Freilandexpositionsexperimente I – Aufnahme von metallischem Ultrafeinstaub aus dem Verkehr.....	8
3.3 Arbeitspaket 3 (AP3): Kontrollierte Erzeugung von metallischen Ultrafeinstäuben durch Bremsabrieb	8
3.4 Arbeitspaket 4 (AP4): Charakterisierung der durch Bremsabrieb erzeugten Feinstäube	10
3.5 Arbeitspaket 5 (AP5): Entwicklung von Reporterlinien für die empfindliche Messung von physiologischen Effekten.....	10
3.6 Arbeitspaket 6 (AP6): Aufbau kontrollierter Expositionsexperimente mit Pflanzen	11
3.7 Arbeitspaket 7 (AP7): Molekulare Charakterisierung physiologischer Effekte, Entwicklung von ökotoxikologischen Markern	11
3.8 Arbeitspaket 8 (AP8): Freilandexpositionsexperimente II – Detektion und Quantifizierung ökotoxikologischer Effekte	12
4 Ergebnisse und Diskussion	13
4.1 Charakterisierung von metallischem Ultrafeinstaub aus dem Verkehr	13
4.2 Freilandexpositionsexperimente I – Aufnahme von metallischem Ultrafeinstaub aus dem Verkehr.....	14
4.3 Kontrollierte Erzeugung von metallischen Ultrafeinstäuben durch Bremsabrieb	17
4.3.1 Evaluierung des Reib- und Verschleißverhaltens	17
4.3.2 Erfassen des entstehenden Bremsabriebs.....	18
4.4 Charakterisierung der durch Bremsabrieb erzeugten Feinstäube	19
4.4.1 REM-Untersuchung.....	19
4.4.2 Feinstaubemissionsmessung	21
4.5 Entwicklung von Reporterlinien für die empfindliche Messung von physiologischen Effekten.....	22
4.6 Aufbau kontrollierter Expositionsexperimente mit Pflanzen	23

4.7	Molekulare Charakterisierung physiologischer Effekte, Entwicklung von ökotoxikologischen Markern.....	26
4.8	Freilandexpositionsexperimente II – Detektion und Quantifizierung ökotoxikologischer Effekte.....	27
5	Zusammenfassung	29
6	Ausblick.....	30
7	Veröffentlichungen	30
	Literaturverzeichnis.....	31
	Abbildungsverzeichnis.....	33
	Anhang	35

Abkürzungsverzeichnis

C/SiC:	Kohlenstoffverstärktes Siliciumcarbid
DEG:	Differenziell exprimierte Gene
EDX:	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
ELPI:	Elektrischer Niederdruckimpaktor (engl. Electrical Low-Pressure Impactor)
GFP:	Grün fluoreszierendes Protein
ICP-MS:	Massenspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IR:	Infrarot
kb:	Kilobasen
Kfz:	Kraftfahrzeug
LfU:	Bayerisches Landesamt für Umwelt
PKW:	Personenkraftwagen
REM:	Rasterelektronenmikroskopie / Rasterelektronenmikroskop
RNA:	Ribonukleinsäure
RT-qPCR:	Reverse transcription quantitative realtime polymerase chain reaction
UFP:	Ultrafeine Partikel
XRD:	Röntgenbeugung (engl. X-Ray-Defraction)

1 Kurzzusammenfassung

Bremsprozesse von Fahrzeugen im Straßenverkehr führen zum Abrieb von Bremsbelägen und tragen zur Feinstaubemission von PKW bei. Es handelt sich hierbei häufig um ultrafeine Partikel (UFP) metallischer Natur, deren mögliche ökotoxische Wirkung auf Pflanzen im Rahmen dieses Projekts untersucht wurde.

Bisher gibt es kaum Studien darüber, inwieweit Pflanzen oder andere Organismen von Bremsabrieben beeinträchtigt werden. Zusätzlich sind viele Nahrungspflanzen einer Belastung dauerhaft ausgesetzt, weswegen die Möglichkeit eines Eintrages in Lebensmittel und – über die Nahrungskette - einer Exposition der Bevölkerung besteht. Deshalb sollten in diesem Teilprojekt die Aufnahme von UFP in pflanzliche Gewebe und deren ökotoxikologisches Potenzial untersucht werden.

Aus diesen Gründen wurden in Teilprojekt 5 Partikelproben aus Bremsabrieb unter möglichst realitätsnahen Bedingungen erzeugt, gesammelt und umfassend charakterisiert. Es wurde festgestellt, dass mit Erhöhung der kinetischen Energie der Anteil von UFP im Bremsabrieb steigt. Des Weiteren liegen die emittierten Partikel größtenteils agglomeriert vor. Die chemische Zusammensetzung der UFP wurde mittels single particle ICP-MS (spICP-MS) charakterisiert.

Die Durchführung von kontrollierten Expositionsexperimenten mit luftgetragenen UFP aus Bremsabrieb sollte Aufschluss über physiologische Kurz- und Langzeiteffekte geben. Veränderungen in der Genexpression konnten identifiziert werden, jedoch wurde keine Reduktion der Fitness der Pflanzen gefunden. Allerdings legen die gemessenen Transkriptomveränderungen nahe, dass die Synthese von potentiell auch für den Menschen toxischen Abwehrstoffen aktiviert werden könnte, was Fragen für die Kultivierung von Pflanzen in urbanen Umgebungen („Urban farming“) aufwirft. Zusätzlich wurde sowohl nach kontrollierter Exposition als auch in Feldversuchen eine Quantifizierung der UFP mittels spCP-MS durchgeführt. Hierbei hat sich unter anderem gezeigt, dass die UFP-Deposition an einem stark belasteten Standort für die meisten Elemente mit der kontrollierten Exposition vergleichbar ist. Eine Aufnahme von UFP in pflanzliche Gewebe mit Transmissionselektro-nenmikroskopie konnte nicht gezeigt werden.

Zudem stellte sich die Frage, ob durch die Verwendung neuartiger verbundkeramischer Frik-tionsmaterialien in Bremsen eine schädliche Wirkung auf Organismen möglicherweise reduziert werden kann. Die Ergebnisse aus diesem Projekt zeigen, dass durch den Einsatz keramischer Leichtbaubremsscheiben die UFP-Emission im Gegensatz zu herkömmlichen Systemen um bis zu 95% reduziert werden kann.

2 Einleitung

In der Luft befindlicher Feinstaub besteht aus einer großen Bandbreite verschiedener Partikel. Generell wird eine Klassifizierung der Partikel basierend auf deren Durchmesser vorgenommen. PM_{10} beschreibt alle Partikel mit einem Durchmesser kleiner als $10\ \mu\text{m}$, $PM_{2,5}$ beinhaltet alle Partikel mit einem Durchmesser unter $2,5\ \mu\text{m}$ und Ultrafeinstaub besteht aus Partikeln kleiner als $100\ \text{nm}$ ($PM_{0,1}$) (Praticò & Briante 2020). Feinstaubbelastung stellt eine zentrale Komponente der atmosphärischen Luftverschmutzung dar und gefährdet die Gesundheit der menschlichen Bevölkerung in hohem Maße. Im Jahr 2015 wurden $\sim 4,2$ Millionen frühzeitige Todesfälle auf Luftverschmutzung durch $PM_{2,5}$ zurückgeführt. Damit nimmt $PM_{2,5}$ den fünften Platz globaler Risikofaktoren für frühzeitige Todesfälle ein (Cohen et al. 2017).

Straßenverkehr ist eine bedeutsame Quelle für die Luftverschmutzung durch Feinstaub. Der durch Fahrzeuge entstehende Eintrag kann in abgasbezogene und nicht-abgasbezogene Emissionen unterteilt werden. Als Quellen nicht-abgasbezogener Partikel können beispielsweise die Aufwirbelung von Staub an Straßen oder Abriebprozesse am Reifen, der Straßenoberfläche sowie an Bremsen genannt werden (Thorpe & Harrison 2008). Bremsabrieb kann in städtischen Umgebungen für mehr als 50 % der nicht-abgasbezogenen und für bis zu 21 % aller durch den Verkehr verursachten PM_{10} -Emissionen verantwortlich sein (Grigoratos & Martini 2015).

Ein erheblicher Anteil der durch Bremsabrieb verursachten Emissionen besteht aus metallischen UFP mit einer Größe $< 100\ \text{nm}$, welche als besonders problematisch bezüglich Gesundheits- und Umweltrisiken gesehen werden. Es wird beispielsweise davon ausgegangen, dass UFP bis in die alveolären Regionen der Lunge eindringen und eine gegenüber größeren Partikeln erhöhte Mobilität in der Umwelt aufweisen (Hedberg et al. 2017).

Die Toxizität von diversen Metallen, beispielsweise Pb, Cd, Zn oder Cu auf Pflanzen und Ökosysteme wird seit Jahrzehnten untersucht und ist mittlerweile klar erwiesen (Nagajyoti et al. 2010). Die Tatsache, dass die Effekte metallischer Ultrafeinstäube auf die Vegetation dahingehend nahezu völlig unerforscht sind, stellt einen Mangel an Wissen über die Ökotoxizität einer potenziell bedeutsamen Belastungsquelle dar. Zudem stellt sich die Frage, ob und in welchem Umfang die Aufnahme von metallischen UFP in pflanzliche Gewebe erfolgt und daher eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit, über aus Pflanzen gewonnene Lebensmittel, darstellt.

Aus den genannten Gründen wurden in diesem Teilprojekt metallische UFP präzise analysiert und die Effekte genau charakterisierter, metallischer UFP definierter Herkunft auf Pflanzen untersucht. Zudem sollte die Abschätzung des Eintritts solcher Partikel in Lebensmittel ermöglicht und wichtige Impulse zur Weiterentwicklung technischer Lösungen gegeben werden, vor allem in Bezug auf ökologisch weniger problematische Bremsmaterialien.

3 Aufgabenstellung und Vorgehensweise

3.1 Arbeitspaket 1 (AP1): Charakterisierung metallischen Ultrafeinstaubes aus dem Verkehr

Um Erkenntnisse über die Luftbelastung durch metallische Ultrafeinstäube zu gewinnen, wurden Messungen an Luftüberwachungsstationen des LfU durchgeführt. Dafür wurde ein Verfahren erarbeitet, das Anzahl- und Massenkonzentrationen von ultrafeinen metallischen Partikeln in der Luft erfassen kann. Die ultrafeinen Partikel in den Luftproben wurden mit dem Impaktorsystem ELPI gröÙenselektiv getrennt und gesammelt. Für die Analyse wurden die UFP (16-100 nm) in einer micellenbildenden Tensidlösung dispergiert und die Einzelpartikel damit sterisch stabilisiert. Die elementspezifische Analyse partikulärer Metalle im Ultrafeinstaub erfolgte mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (Triple Quadrupol ICP-MS, Agilent 8900) im Single Particle Modus (spICP-MS). Das Messverfahren spICP-MS basiert auf der Analyse einzelner Partikel mit Bestimmungsgrenzen bis in den Ultraspurenbereich (Abbildung 1).

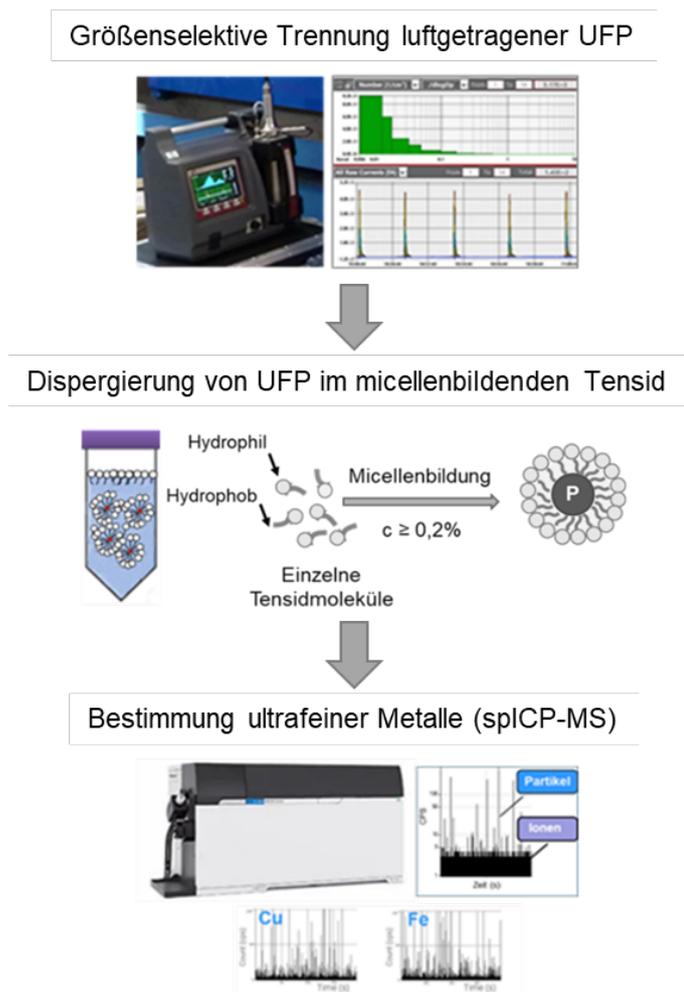


Abbildung 1: Analytisches Verfahren zur Bestimmung luftgetragener metallischer UFP

Gemessen wurde an bayerischen Messstationen mit hohem Verkehrsaufkommen sowie an „Reinluftstandorten“ (städtischer und regionaler Hintergrund) (Abbildung 2). Diese Orte wurden für die Expositionsexperimente mit Pflanzen vorgesehen. Alle Messungen wurden tagsüber (8-18 Uhr) bei trockenem Wetter durchgeführt.



Abbildung 2: Messstandorte

3.2 Arbeitspaket 2 (AP2): Freilandexpositionsexperimente I – Aufnahme von metallischem Ultrafeinstaub aus dem Verkehr

Um Informationen über die Aufnahme von metallischen Nanopartikeln in pflanzliche Gewebe zu erlangen, wurden in möglichst unmittelbarer Nähe der Messstationen (s. AP1) Expositionsexperimente mit *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) und *Lactuca sativa* (Kopfsalat) durchgeführt. An der Universität Bayreuth wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen der Pflanzen zum Nachweis metallischer Ultrafeinstäube durchgeführt, um diese lokalisieren zu können und eine genaue Differenzierung zwischen Oberfläche und Gewebe zu erreichen.

3.3 Arbeitspaket 3 (AP3): Kontrollierte Erzeugung von metallischen Ultrafeinstäuben durch Bremsabrieb

Um metallische UFP durch Bremsabrieb kontrolliert herzustellen, waren zunächst geeignete Prüfregime im Labormaßstab zu evaluieren. Dem Lehrstuhl Keramische Werkstoffe stand ein Bremsenprüfstand zur Verfügung, bei dem Bremscheiben in realer Größe geprüft werden konnten und mit Hilfe eines Schwungrades die Energie eines sich bewegenden Fahrzeuges simuliert werden konnte (Abbildung 3). Verschiedene typische Fahrsituationen aus dem PKW-Verkehr („Use Cases“) wurden identifiziert, die in Form von geschwindigkeits- und bremsdruckabhängigen Bremszyklen auf dem Bremsenprüfstand nachgebildet wurden.

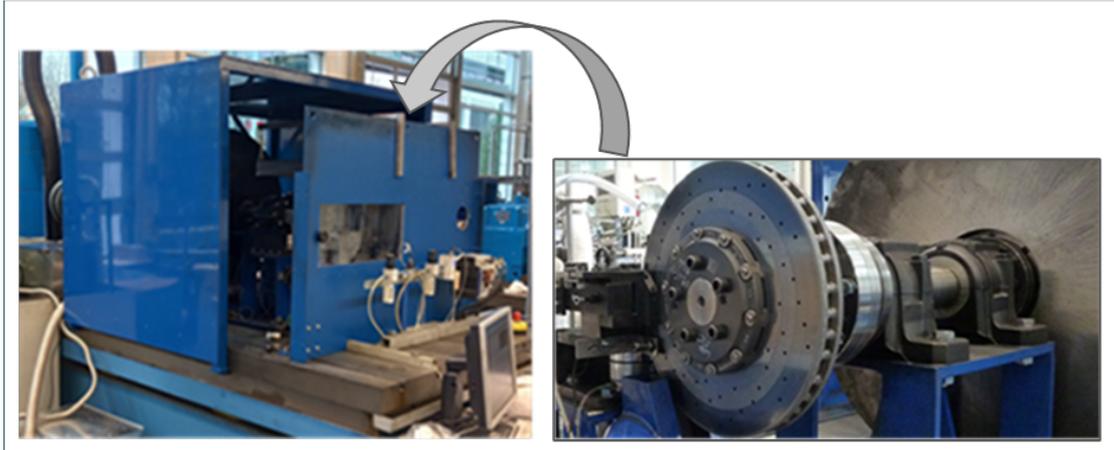


Abbildung 3: Bremsenprüfstand

Zur Festlegung dieser typischen Prüfzenarien wurden in Abwägung der realisierbaren Prüfbedingungen am Bremsenprüfstand drei „Use Cases“ festgelegt. Diese galten für das gesamte Projekt und wurden für alle Bremspaarungen bzw. Kombinationen aus Bremsscheiben und Bremsbelägen untersucht. Die durchgeführten Versuchsreihen bestanden aus direkt hintereinander durchgeführten Stopp-Bremungen ($n > 20$) mit zu den „Use-Cases“ korrespondierenden Energien. Besonders wurde dabei die zukünftige Verwendung der mechanisch betätigten Bremse berücksichtigt, die im Zuge der Elektromobilität eher als Not- denn als Betriebsbremse Verwendung finden wird. Daher sollte im Ergebnis mindestens ein exemplarischer Notbremsvorgang und ein Betriebsbremsvorgang auf dem Bremsenprüfstand simuliert werden, was bei der Festlegung der Use Cases berücksichtigt wurde. Zusätzlich wurden die Materialien, die als Bremsscheibe und Bremsbelag benutzt werden sollten, ausgewählt. Für die tribologischen Messungen wurden eine Graugussbremsscheibe aus der Legierung EN-GJL-150 sowie eine kommerziell verfügbare Carbon-Keramik-Bremsscheibe genutzt. Bremsbeläge waren dem Stand der Technik entsprechend Low-Met Beläge vom Typ HP306 der Firma TMD Friction, Leverkusen. Eine zweite Belagsart bestand aus C-faserverstärktem Siliziumcarbid (C/SiC), welches am Lehrstuhl Keramische Werkstoffe selbst gefertigt werden kann.

Neben der Erzeugung des Bremsabriebs war die Erfassung der metallischen UFP ein wesentlicher Bestandteil des Projekts. Um geeignete Stellen für die Detektion der Feinstaubpartikel-Messung zu wählen, wurden Vorversuche durchgeführt. Es wurde am Auslauf des Bremsbelages und im Absaugstrang des Bremsenprüfstandes Positionen ermittelt, bei denen die Menge an erzeugten Feinstaubpartikeln zuverlässig und reproduzierbar gemessen, aufgefangen und verglichen werden kann. Zur Sammlung des Bremsabriebs waren geeignete Auffangbehälter in Kombination mit dem Feinstaubdetektor und -Filter im Absaugstrang getestet. Für die UFP-Fractionen wurde den Impaktor ELPI+ eingesetzt.

Es musste jedoch festgestellt werden, dass die Leistung der vorhandenen Absaugung nicht ausreicht, um mit eingebrachtem Filter die benötigte Absaugwirkung zu erzielen. Ebenso konnte durch die durchgeführten Messungen des LfU mit Hilfe des High Resolution Impaktor ELPI+ bestätigt werden, dass die vorhandene Absaugung nicht ausreichend ist, um den gesamten am Bremsenprüfstand während der Bremsungen entstehenden Feinstaub abzusaugen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen des Forschungsprojektes eine neue Absaugung

beschafft und eingebaut. Nach Abschluss der Vorversuche wurden verschiedene Reibpaarungen gefertigt und am Bremsenprüfstand tribologisch untersucht. Begonnen wurde zunächst mit der Paarung Grauguss (Brems Scheibe) und Low-Met (Bremsbelag). Von beiden ist die Zusammensetzung bekannt bzw. konnte bestimmt werden. Diese Bremspaarung steht für den Stand der Technik und repräsentiert die Bremspaarung der überwiegenden Mehrheit der PKW in Europa. Gemessen wurden für alle „Use Cases“ der Verschleiß (volumetrisch (mm^3/MJ) und gravimetrisch (mg/MJ)), der Reibwert, die Reibarbeit und die Temperaturen von Bremsbelag und Brems Scheibe. Von Relevanz war, ob ein niedriger Gesamtverschleiß auch eine niedrige Menge an Feinstaub bedeutet. Verfolgt wurde auch, ob sich der Feinstaubanteil und die Feinstaubzusammensetzung bei wiederholten Bremsungen auf ein Level einpendelt, ansteigt oder sich reduziert. Auch der Einfluss der Temperatur auf die Menge an Feinstaub und dessen Zusammensetzung wurde in AP3 in Verbindung mit AP4 ermittelt.

Nach Untersuchung dieser Reibpaarung wurde als Brems Scheibe die Carbon-Keramik-Scheibe benutzt, die prinzipiell eine mind. fünffach höhere Lebensdauer hat als Grauguss-Brems Scheiben und auch keine Oxidationsspuren zeigt. Um den Verschleiß und Feinstaubanteil zu bestimmen, wurden die gleichen „Use Cases“ wie bei der Paarung Grauguss-Low-Met angewendet und die Ergebnisse verglichen. Gleiches galt für die Paarung Carbon-Keramik als Bremsbelag mit einer Grauguss-Brems Scheibe und einer rein keramischen Bremspaarung, die aus C/SiC Belägen und einer C/SiC Brems Scheibe besteht.

3.4 Arbeitspaket 4 (AP4): Charakterisierung der durch Bremsabrieb erzeugten Feinstäube

Der gesammelte Bremsabrieb sowie die Oberflächen der verwendeten Bremsbeläge wurden im REM (Rasterelektronenmikroskop) untersucht. Zur Analyse wurden die Bremsabriebspartikel auf ein Kohlenstoffpad aufgebracht und mit Gold besputtert. Die untersuchten Bremsbeläge ($30 \times 30 \times 10 \text{ mm}^3$) wurden ebenfalls mit Gold besputtert und im Ganzen in das REM eingeschleust. In beiden Fällen wurde ferner die energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) genutzt, um Rückschlüsse auf die in den Proben vorhandenen Elemente ziehen zu können. Zusätzlich wurden die TEM (Transmissionselektronenmikroskopie) und das Laser-Granulometer für die Ermittlung der Korngrößen der Bremsabriebpartikel eingesetzt. Mittels der Massenspektrometrie (ICP-MS) wurde chemische Zusammensetzung der verwendeten Ausgangsmaterialien für die Bremsung untersucht. Chemische Charakterisierung der UFP wurde mittels spICP-MS (s. AP1) durchgeführt.

3.5 Arbeitspaket 5 (AP5): Entwicklung von Reporterlinien für die empfindliche Messung von physiologischen Effekten

Molekularbiologische Techniken erlauben die Nutzung von stressresponsiven Promotoren und Reporterproteinen für den zeitlich und räumlich aufgelösten Nachweis toxikologischer Effekte auf Modellorganismen wie *A. thaliana*. Auf diese Weise können physiologische Veränderungen mit einer in anderen Arten nicht erreichbaren Empfindlichkeit nachgewiesen werden. So können grundlegende Erkenntnisse gewonnen werden, die dann auf Nutzpflanzen und ökologisch besonders relevante Arten übertragen werden können.

Um das bestehende Instrumentarium zu erweitern, sollten basierend auf umfangreichen Transkriptomdaten zur Metallbelastung von Pflanzen geeignete Promotoren für die Generierung von Reporterlinien zur Detektion von durch metallische Ultrafeinstäube verursachten Stress-Effekten identifiziert und die entsprechenden *A. thaliana*-Linien erzeugt werden. DNA-Konstrukte wurden in geeignete Genotypen durch Transformation eingebracht.

3.6 Arbeitspaket 6 (AP6): Aufbau kontrollierter Expositionsexperimente mit Pflanzen

Wesentliches Ziel des Projektes waren kontrollierte Expositionsexperimente mit genau charakterisierten Mischungen metallischer Feinstaubpartikel, die aus im Straßenverkehr relevanten Quellen stammen. Die Projektpartner haben eine Expositionskammer konstruiert, in denen Pflanzen kontrolliert erzeugt und im Detail charakterisierten Bremsabrieben ausgesetzt werden können (Abbildung 4). Damit wurde eine realitätsnahe Belastung der Pflanze mit Feinstaub nachgestellt und untersucht.

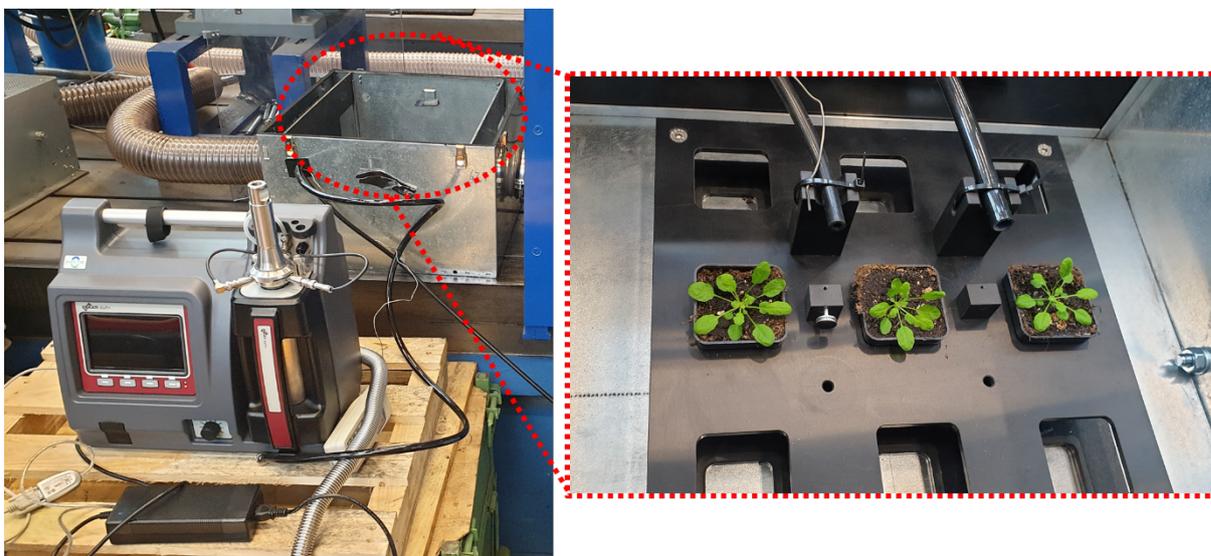


Abbildung 4: Versuchsaufbau zur Durchführung kontrollierter Expositionsexperimente mit Pflanzen: Impaktorsystem ELPI+ mit Expositionskammer sowie zu exponierende Pflanzen

Die Evaluation verschiedener Belastungsszenarien wurde durch ICP-MS-Messungen und elektronenmikroskopische Analysen der Blätter exponierter Pflanzen durchgeführt. Auch hier sollten Elemente quantifiziert und Erkenntnisse über die Lokalisation der Partikel erreicht werden.

3.7 Arbeitspaket 7 (AP7): Molekulare Charakterisierung physiologischer Effekte, Entwicklung von ökotoxikologischen Markern

Nach Etablierung geeigneter Expositionsbedingungen in AP6 sollte der Einfluss von metallischen UFP auf Pflanzen anhand des Modellsystems *A. thaliana* untersucht werden. Hierzu

wurde von den exponierten Pflanzen RNA extrahiert und eine Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung durchgeführt.

Ökotoxikologische Langzeiteffekte auf die Fitness von Pflanzen wurden untersucht, indem diese nach Expositionen weiter bis zur Samenreife kultiviert wurden. Samenproduktion sowie deren Keimfähigkeit wurden als Parameter zur Bestimmung der Fitness quantifiziert.

3.8 Arbeitspaket 8 (AP8): Freilandexpositionsexperimente II – Detektion und Quantifizierung ökotoxikologischer Effekte

In der Nähe von Stationen aus AP1 wurden *A. thaliana* und Kopfsalat kultiviert. Zur Bestimmung der Anzahlkonzentrationen von UFP auf den oberirdischen Pflanzengeweben wurden UFP extrahiert (Laughton et al., 2021). Die erhaltenen Extrakte wurden mittels spICP-MS auf metallische Partikel untersucht. Die Ergebnisse wurden mit den systematisch erhobenen Daten zur Konzentration von metallischen luftgetragenen Nanopartikeln (AP1) sowie den Daten zu Partikelkonzentration aus kontrollierten Expositionen (AP6) abgeglichen, um unter realen Bedingungen mögliche ökotoxikologische Effekte einschätzen zu können.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierung von metallischem Ultrafeinstaub aus dem Verkehr

An allen untersuchten Messstellen konnten ultrafeine Partikel detektiert werden (Abbildung 5). Die höchsten Partikelanzahlkonzentrationen wurden in der Innenstadt gemessen, gefolgt vom städtischen und regionalen Hintergrund.

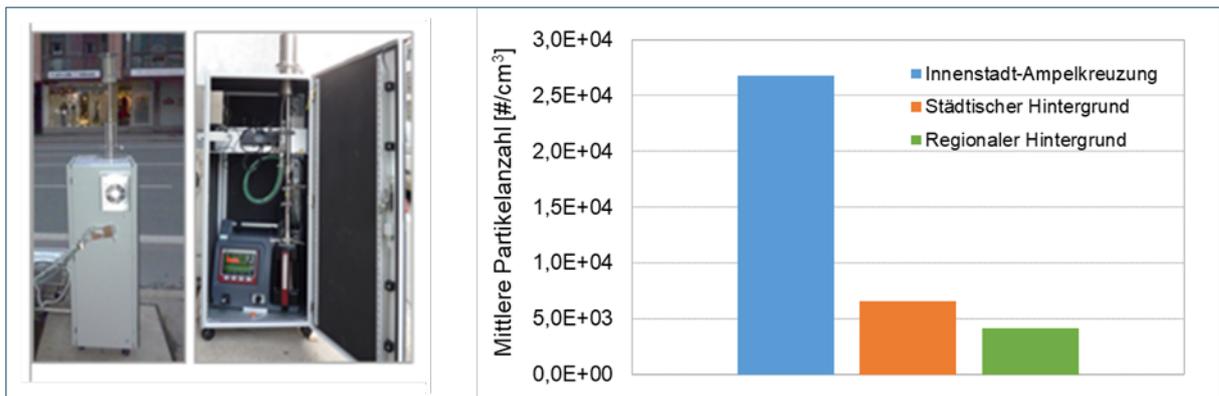


Abbildung 5: Mittlere Partikelanzahlkonzentration in der Luft tagsüber an drei Standorten

Das Vorkommen von UFP in der Außenluft ist offensichtlich von den Emissionsquellen der entsprechenden Standorte geprägt. In der Innenstadt stellt vor allem der Kfz-Verkehr die dominierende Quelle für die UFP dar (ca. 21 000 Kfz/24h). Es zeigt sich zudem, dass die Anzahl der metallischen UFP an dem verkehrsbelasteten Standort viel höher als an den Hintergrundmessstellen ist (Abbildung 6). Vor allem die Metalle Eisen, Aluminium, Kupfer, Zinn und Titan konnten in hoher Partikelanzahl nachgewiesen werden.

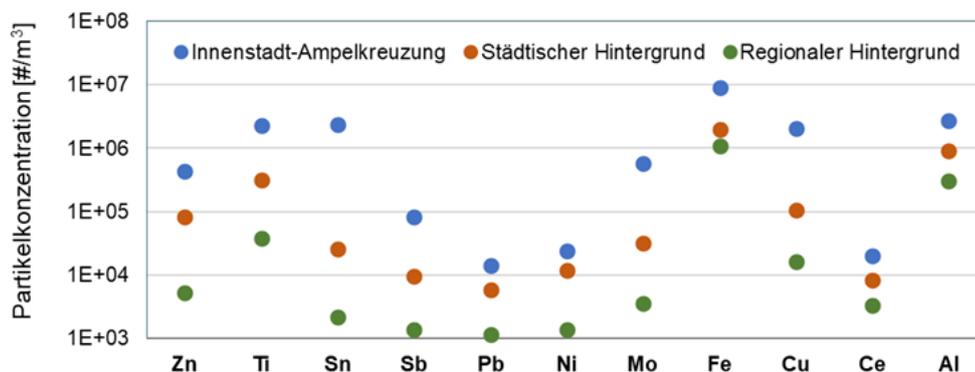


Abbildung 6: Anzahl ultrafeiner metallischer bzw. metallhaltiger Partikel (16-100 nm) an drei Standorten

Metallische Ultrafeinpartikel sind überwiegend primäre Partikel, die hauptsächlich bei verschiedenen Abriebprozessen (Bremsabrieb, Reifenabrieb, Fahrbahnabrieb etc.) entstehen oder als

nanopartikuläre Treibstoffadditive (wie Ceroxid) aus den Kfz freigesetzt werden (Sanderson, 2014). Eine eindeutige Zuordnung einzelner gemessener Metalle zu spezifischen Quellen ist schwierig, da die einzelnen Elemente in mehreren Bauteilen eingesetzt werden. Aus dem charakteristischen Vorkommen der einzelnen Metalle, die wie Zinn und Kupfer überwiegend aus Bremsbelägen stammen, können jedoch Rückschlüsse auf diesen Eintragsweg gezogen werden. Die Messstelle in der Innenstadt befindet sich in einem Bereich (Ampelkreuzung), in dem Fahrzeuge häufig abgebremst werden. Es ist daher davon auszugehen, dass metallische UFP an diesem Standort überwiegend aus dem Bremsabrieb stammen. Die Metalle Eisen, Aluminium und Zink sind ebenfalls in Bremsbelägen vorhanden, können aber auch aus anderen Quellen freigesetzt werden.

Für UFP gibt es derzeit weder einen Richt- noch einen Grenzwert zum Schutz der Gesundheit. Um solche Werte abzuleiten, müsste der Zusammenhang zwischen der auf den Menschen einwirkenden Menge an UFP und der daraus resultierenden Wirkung bekannt sein. Eine derartige Dosis-Wirkungsbeziehung kann mit den vorliegenden Daten aktuell nicht aufgestellt werden. Die Datenlage lässt zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch keine toxikologische Bewertung der hier gemessenen UFP zu. Die WHO empfiehlt die UFP-Konzentrationen über 10 000 Partikel/cm³ (Tagesmittel) als Orientierungshilfe für Entscheidungen über die Prioritäten der Überwachung von UFP-Emissionsquellen anzusehen. Gesundheitliche Bewertungen sind mit dieser Klassifizierung nicht verbunden (WHO global air quality guidelines, 2021).

Spezifische Grenzwerte für UFP sind bislang nur in den neuen Abgasnormen für Kraftfahrzeuge festgelegt. Die Normen Euro 5 und Euro 6 enthalten einen Emissionsgrenzwert von 6×10^{11} Feststoffpartikel pro Testzykluskilometer. Dieser Wert gilt für Partikel mit einem Durchmesser > 23 nm (Commission regulation no. 692/2008). Kleinere Partikel können wegen fehlender Messmethoden noch nicht in die Regelung einbezogen werden. Derzeit wird an der Entwicklung von Messverfahren gearbeitet, mit denen Partikel < 10 nm routinemäßig erfasst werden können.

Die neue Norm Euro 7 für Kraftfahrzeuge soll voraussichtlich 2025 eingeführt werden. Erstmals soll es nicht nur Grenzwerte für Auspuffabgase geben, sondern auch für Emissionen von Bremsen und Reifen.

4.2 Freilandexpositionsexperimente I – Aufnahme von metallischem Ultrafeinstaub aus dem Verkehr

Im Rahmen des Arbeitspakets 2 wurden die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* und Kopfsalat (*Lactuca sativa*), welcher eine bedeutende Nahrungspflanze darstellt und dessen konsumierte Organe eine große, direkt exponierte Oberfläche besitzt, an den in Arbeitspaket 1 charakterisierten Standorten für 4 Tage im Juni 2021 exponiert. Mit dem so generierten Material wurden zunächst elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt um zu klären, ob (i) metallische UFP innerhalb von Blattgeweben gefunden werden und (ii) metallische UFP auf Blattoberflächen gefunden werden und in welcher Form diese vorliegen.

Zunächst wurden Blätter der Pflanzen in ein Epon-Kunstharz eingebettet, um mit einem Mikrotom sehr dünne Schnittpräparate anfertigen zu können. Diese Schnitte wurden dann mithilfe eines Transmissionselektronenmikroskops untersucht, wobei spezifisch die Regionen unterhalb der Spaltöffnungen betrachtet wurden. Dabei zeigte sich, dass die Schnitte keine Rückschlüsse auf Unterschiede in der Anwesenheit von UFP zulassen.

In Abbildung 7: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Spaltöffnungen von *Lactuca sativa* Pflanzen aus den Freilandexpositionsexperimenten. Abgebildet sind Querschnitte von Blättern, das Blattinnere befindet sich in jedem Bild unten. Bei den Aufnahmen der unteren Reihe handelt es sich jeweils um Vergrößerungen der Aufnahmen der oberen Reihe. Es konnten keine Unterschiede detektiert werden

ist anhand einiger Schnitte von *Lactuca sativa* exemplarisch dargestellt, dass in keiner der untersuchten Proben UFP in der Nähe der Spaltöffnungen gefunden wurden.

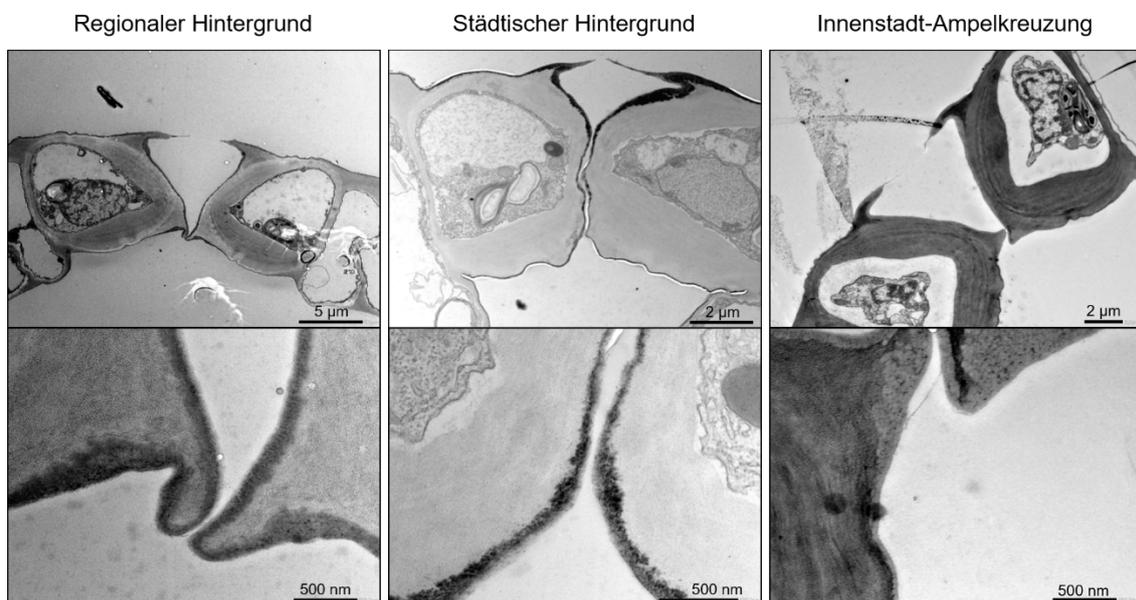


Abbildung 7: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Spaltöffnungen von *Lactuca sativa* Pflanzen aus den Freilandexpositionsexperimenten. Abgebildet sind Querschnitte von Blättern, das Blattinnere befindet sich in jedem Bild unten. Bei den Aufnahmen der unteren Reihe handelt es sich jeweils um Vergrößerungen der Aufnahmen der oberen Reihe. Es konnten keine Unterschiede detektiert werden

Des Weiteren wurden die *A. thaliana*-Proben mithilfe von Rasterelektronenmikroskopie auf das Vorhandensein von Partikeln auf Blattoberflächen hin untersucht. In Abbildung 8 ist dargestellt, dass sowohl im regionalen Hintergrund als auch im Hintergrund der Innenstadt-Ampelkreuzung agglomerierte partikuläre Ablagerungen auf den untersuchten Blattoberflächen zu finden sind. Mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) wurde im Elektronenmikroskop zusätzlich die elementare Zusammensetzung dieser Ablagerungen untersucht. Es wurde eine Vielzahl von Elementen nachgewiesen, beispielsweise Kupfer konnte vor allem

nach einer Exposition in der Innenstadt detektiert werden (Abbildung 21). Das Vorkommen von Kupfer in Bremsenabrieb wurde bereits beschrieben. (Hulskotte et al. 2007).

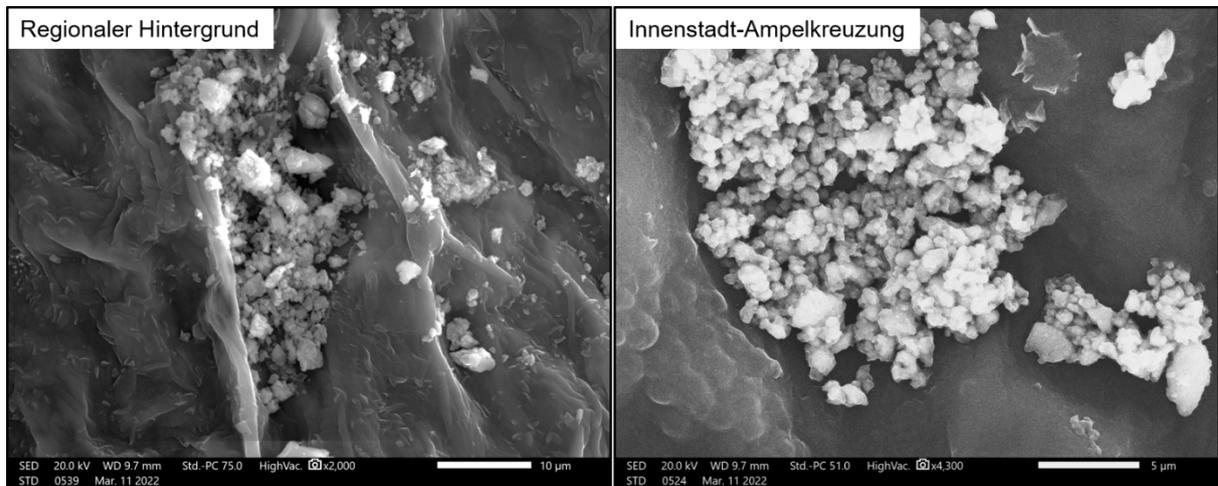


Abbildung 8: REM-Aufnahmen von *A. thaliana* Blattproben aus zwei Standorten der Freilandexposition

In Abbildung 9 ist eine Region, in der mittels EDX Kupfer nachgewiesen wurde, im Detail dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass die Partikel in größeren Agglomeraten auftreten.

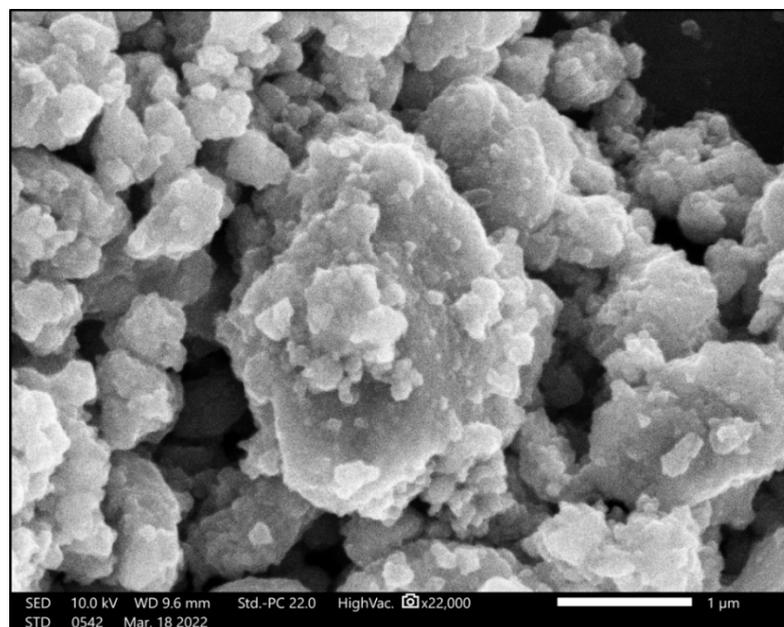


Abbildung 9: REM-Detailaufnahme von Cu-enthaltenden Partikeln auf der Blattoberfläche einer *A. thaliana*-Pflanze, die 4 Tage an einer Ampelkreuzung in der Innenstadt von Augsburg stand

4.3 Kontrollierte Erzeugung von metallischen Ultrafeinstäuben durch Bremsabrieb

4.3.1 Evaluierung des Reib- und Verschleißverhaltens

Für die kontrollierte Erzeugung metallischer Ultrafeinstäube durch Bremsabrieb ist es wichtig, das Reib- und Verschleißverhalten der Reibpaarung zu untersuchen. Hierzu wurden bei den vorher festgelegten „Use-Cases“:

- **Stadtfahrt:** Bremsung aus 50 km/h ($E_{\text{kin}} \approx 0,12$ MJ),
- **Überlandfahrt:** Bremsung aus 100 km/h ($E_{\text{kin}} \approx 0,48$ MJ) sowie
- **Autobahnfahrt:** Bremsung aus 190 km/h ($E_{\text{kin}} \approx 1,74$ MJ)

die durchschnittlichen Reibwerte und der kumulierte, während der Bremsungen auftretende Verschleiß der verwendeten Bremsbeläge gemessen. Hierbei wurden Brems scheiben an der Vorderachse betrachtet. Da 2/3 der Bremsenergie an der Vorderachse dissipiert wird, entfällt bei einer Bremsung rund 1/3 der gesamten kinetischen Energie des zu bremsenden PKW auf eine Brems scheibe an der Vorderachse. Die Bremsenergien für jeweils eine einzelne Stopp-Bremsung bei den drei untersuchten „Use-Cases“ betragen entsprechend ca. 0,04 MJ (Stadt), 0,16 MJ (Überland) sowie 0,58 MJ (Autobahn).

Die durchschnittlichen Reibwerte der untersuchten Reibpaarung wurden in Abhängigkeit der oben genannten „Use-Cases“ bei zwei unterschiedlichen Bremsdrücken (2 MPa sowie 3 MPa) gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass die Reibwerte bei 2 MPa Bremsdruck tendenziell etwas höher ausfallen, jedoch bewegen sich die Unterschiede innerhalb der ermittelten Standardabweichung. Weiterhin ist ein abnehmender Trend des Reibwerts hin zu höheren (Gleit-) Geschwindigkeiten (Stadt → Überland → Autobahn) erkennbar.

Für die kontrollierte Erzeugung von metallischen Ultrafeinstäuben ist das Verschleißverhalten der Bremsbeläge von übergeordneter Bedeutung. Der volumetrische Verschleißkoeffizient k ($[\text{mm}^3/\text{MJ}]$) gibt hierbei Aufschluss darüber, wie viel Bremsbelagsvolumen je dissipierter Bremsenergie verschliffen wird. Dabei ist der auftretende Verschleiß abhängig von der Startgleitgeschwindigkeit bzw. der in einer Bremsung zu dissipierenden Bremsenergie (s. o.).

Die gemessenen volumetrischen Verschleißkoeffizienten in Abhängigkeit der oben genannten „Use-Cases“ steigen sowohl für 2 MPa Bremsdruck als auch für 3 MPa Bremsdruck mit zunehmender (Startgleit-)Geschwindigkeit an. Ferner konnte festgestellt werden, dass der Verschleißkoeffizient bei 2 MPa Bremsdruck vor allem bei Stadt- und Überlandbremsungen deutlich höher ausfällt als bei den Vergleichsmessungen bei 3 MPa. Insgesamt ist bei beiden Bremsdrücken der Verschleißkoeffizient bei den Autobahnbremsungen am höchsten, wobei der gemessene Wert bei 2 MPa Bremsdruck im Vergleich zu 3 MPa Bremsdruck um ca. 40 % höher liegt. Folglich wird bei diesen Bremsungen am meisten Bremsstaub und UFP emittiert. Insgesamt wurde der höchste Verschleißkoeffizient bei einer Autobahnbremsung mit 2 MPa Bremsdruck gemessen, weshalb die durchgeführten kontrollierten Expositionsexperimente mit Pflanzen bei 2 MPa Bremsdruck sowie einer Startgleitgeschwindigkeit, die den Autobahnbremsungen entspricht, durchgeführt wurden.

4.3.2 Erfassen des entstehenden Bremsabriebs

Im Gegensatz zu der vorhandenen Absaugung wird bei der neuen Absaugung nicht nur an einer Stelle unterhalb des Bremssattels abgesaugt. Stattdessen befindet sich oberhalb der Bremsscheibe ein weiteres Absaugelement (Abbildung 10, Mitte, re.). Ferner verfügt die neue Anlage über zwei unterschiedliche Betriebsmodi, wobei zwischen einem Modus mit und einem Modus ohne Probennahme unterschieden wird (Abbildung 11). Im Prüfstandbetrieb ohne Probennahme wird der entstehende Bremsstaub direkt in die Absaugung gesaugt und in den darin verbauten großen und mittels Druckluft reinigbaren Filtern abgeschieden. Ein nachgeschalteter H-Filter garantiert einen höchstmöglichen Arbeitsschutz.

Mit Hilfe der Absaugung und den Filtern konnten UFP-Proben für die Charakterisierung in AP 4 gewonnen werden. Jedoch war der Abscheidegrad sehr niedrig, da die UFP nicht aus dem Filtervlies extrahiert werden konnten. Des Weiteren fand eine Agglomeration der gesammelten UFP statt (vgl. Kapitel 4.4), was für eine weitere Verwendung in nachgeschalteten Expositionen kritisch ist. Aus diesem Grund wurden ebenfalls Versuche mit einem elektrostatischen Abscheider aus Teilprojekt 4 durchgeführt. Auch hier konnte nur ein sehr niedriger Abscheidegrad erreicht werden und es kam zu einer Agglomeration der UFP.



Abbildung 10: Bremsenprüfstand der Universität Bayreuth: Bremsscheibe mit Bremszange, keramischer Bremsscheibe und Absaugstutzen mit eingebrachtem Filter (links); innerhalb des Projektes entwickelte angepasste Absaugelemente mit einer Absaugung unter- und oberhalb der Bremsscheibe (Mitte, rechts).

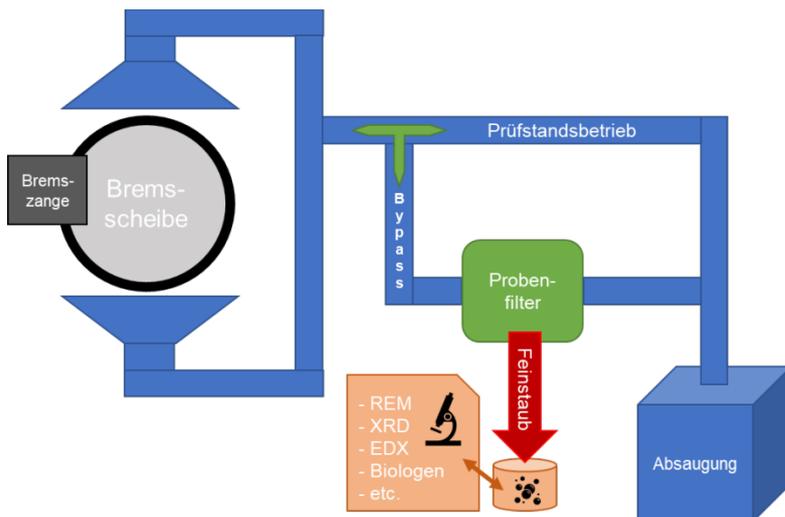


Abbildung 11: Schema der Absaugung mit zwei unterschiedlichen Betriebsmodi

4.4 Charakterisierung der durch Bremsabrieb erzeugten Feinstäube

4.4.1 REM-Untersuchung

Abbildung 12 zeigt eine Übersichts- sowie eine Detailaufnahme des gesammelten Bremsabriebs im REM. Es ist erkennbar, dass die Partikel größtenteils kantig sind und agglomeriert vorliegen. Es liegt ein weites Partikelgrößenspektrum vor, wobei sowohl Partikel im μm -Bereich, als auch agglomerierte Partikel bzw. an größeren Partikeln anhaftende Partikel im unteren nm-Bereich zu finden sind. Ein für den Bremsabrieb charakteristisches EDX-Summenspektrum kann Abbildung 13 entnommen werden. Die insgesamt nachgewiesenen Elemente (Al, Ba, C, Ca, Cr, Cu, F, Fe, Ga, K, Mg, O, S, Sn, Ti, Zn) entsprechen den laut Literatur zu erwartenden Elementen (Breuer, Bill, Bremsenhandbuch, p. 519, Springer, 2012).

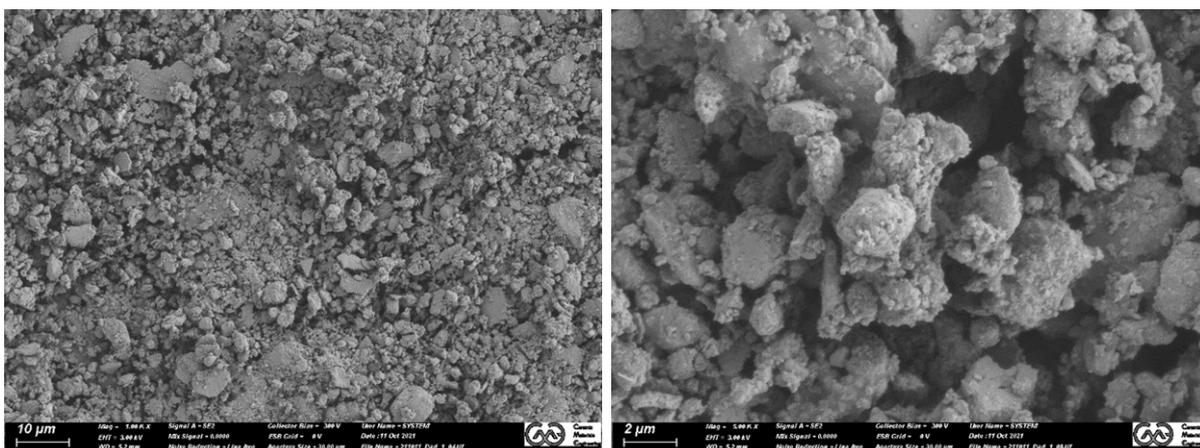


Abbildung 12: REM-Aufnahme von Bremsabriebspartikeln des Graugussbrems Scheibensystems auf Kohlenstoffpad. Links: Übersichtsaufnahme (Vergrößerung: 1.000x), rechts: Detailaufnahme (Vergrößerung: 5.000x).

Die Bremsbelagsoberfläche, die sich nach der tribologischen Prüfung auf den Bremsbelägen einstellt, kann Abbildung 14 entnommen werden. Es ist erkennbar, dass sich eine dichte Reibschicht auf der Bremsbelagsoberfläche ausbildet. Ferner sind kleinere Abriebpartikel im μm -Bereich sowohl auf der Übersichtsaufnahme als auch auf der Detailaufnahme zu erkennen, wobei auf der Detailaufnahme ebenfalls kleinere, auf der Bremsbelagsoberfläche haftende Abriebpartikel im unteren nm-Bereich sichtbar sind. Das repräsentative EDX-Summenspektrum eines Bereichs der Bremsbelagsoberfläche ist in Abbildung 15 zusammengefasst. Auch hier entsprechen die insgesamt nachgewiesenen Elemente (Al, Ba, C, Ca, Cr, Cu, F, Fe, Ga, K, Mg, O, S, Sn, Ti, Zn) den laut Literatur zu erwartenden Elementen (Breuer, Bill, Bremsenhandbuch, p. 519, Springer, 2012).

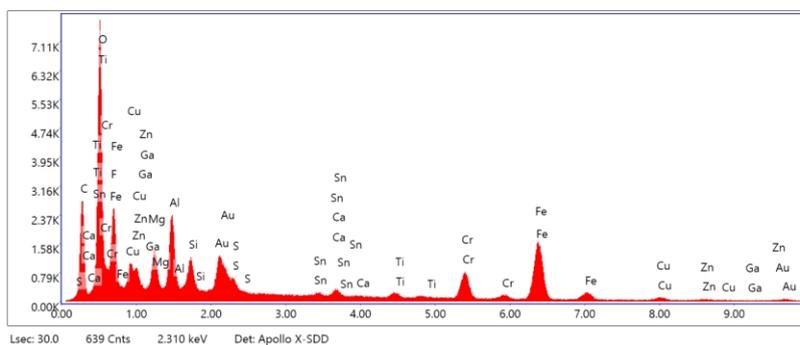


Abbildung 13: EDX-Summenspektrum gesammelter Bremsabriebspartikel (Rasterelektronenmikroskop: Zeiss GEMINI, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland, EDX-Detektor: EDAX Octane, EDAX, Deutschland)

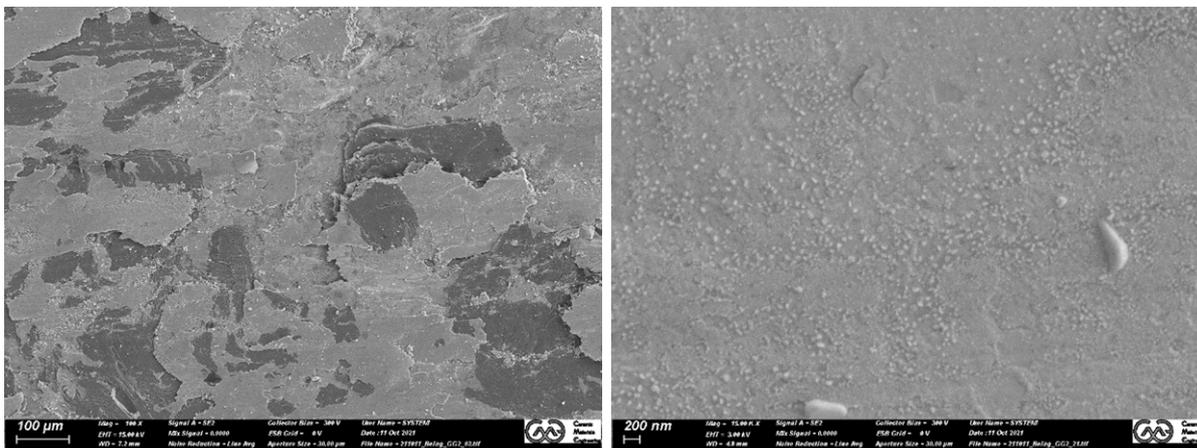


Abbildung 14: REM-Aufnahme der Bremsbelagsoberfläche nach der tribologischen Prüfung (Graugussbrems scheibensystems). Links: Übersichtsaufnahme (Vergrößerung: 100x), rechts: Detailaufnahme (Vergrößerung: 15.000x)

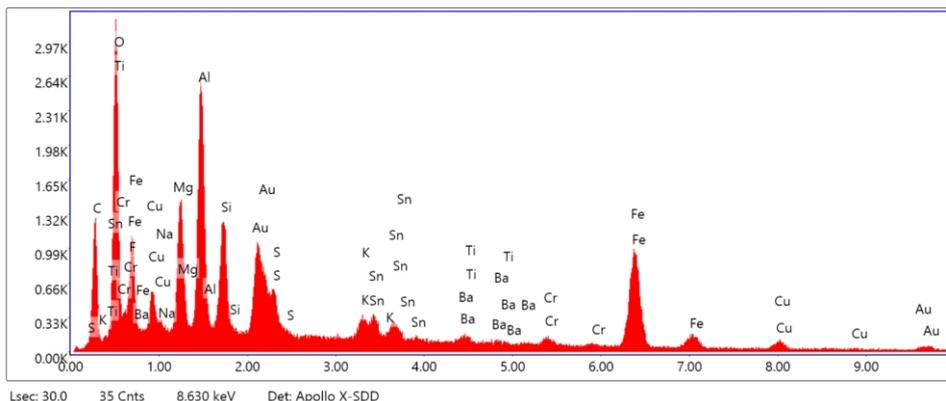


Abbildung 15: EDX-Summenspektrum eines Ausschnitts des Reibfilms auf einem bebremsen Graugussbremsbelag (Rasterelektronenmikroskop: Zeiss GEMINI, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland, EDX-Detektor: EDAX Octane, EDAX, Deutschland)

4.4.2 Feinstaubemissionsmessung

Zur Charakterisierung der Partikelgrößenverteilung des während Bremsungen der einzelnen „Use-Cases“ emittierten Feinstaubes wurden entsprechende Messungen am Bremsenprüfstand der Universität Bayreuth durchgeführt. Hierfür wurden zusammen mit dem LfU Augsburg in der Expositionskammer Feinstaubpartikelmessungen mit dem High Resolution Impaktor ELPI+ durchgeführt. Während der Messungen wurden jeweils 20 Bremsungen den „Use-Cases“ entsprechenden Bremsungen hintereinander (ohne Abkühlphasen) durchgeführt. Der Bremsdruck betrug bei allen Bremsungen und Versuchsreihen 2 MPa.

Es war zu erkennen, dass die Anzahl der emittierten ultrafeinen Partikel stark von den durchgeführten Bremsmanövern abhängen (Abbildung 16).

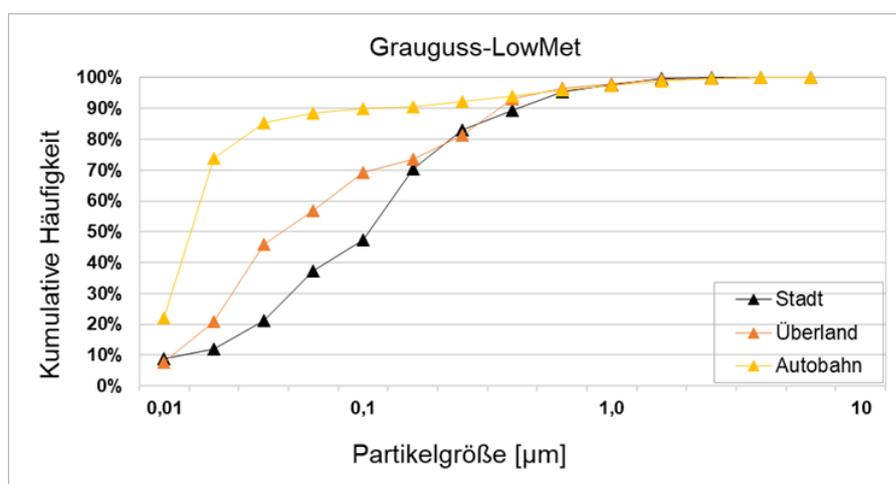


Abbildung 16: Relative Anteile der emittierten Partikelgrößenfraktionen bei Bremsvorgängen (Kaskadenimpaktor ELPI+, n=20)

So zeigt die Autobahn-Versuchsreihe einen sehr großen Anteil ultrafeiner Partikel. Es ist jedoch zu beachten, dass sich abhängig von der Versuchsreihe (Stadt, Überland, Autobahn) die zu dissipierende Bremsenergie stark unterscheidet. So liegt die Summe der anfallenden Bremsenergie bei der Stadt-Versuchsreihe bei ca. 0,8 MJ, wohingegen bei der Autobahn-Versuchsreihe insgesamt mehr als das Zehnfache (ca. 11,6 MJ) der Energie dissipiert werden muss. Dies hat einerseits einen Einfluss auf die Anzahl der generierten Partikel (je mehr Energie dissipiert werden muss, umso mehr UFP werden generiert) und andererseits kommt es deshalb zu höheren Brems scheiben- und Bremsbelagtemperaturen, welche ebenfalls eine höhere Feinstaubpartikelemission zur Folge haben. Dabei liegen die maximalen Brems scheiben-temperaturen bei der Stadt-Versuchsreihe im Bereich 85 °C, bei der Überland-Versuchsreihe bei $\approx 190^{\circ}\text{C}$ und bei der Autobahn-Versuchsreihe bei ca. 380 °C.

Neben dem Bremssystem Graugussbrems scheibe – LowMet-Bremsbelag wurden ebenfalls zwei weitere Bremssysteme untersucht, wobei LowMet-Bremsbeläge und keramische C/SiC-Bremsbeläge jeweils mit einer keramischen Leichtbaubrems scheibe der Fa. Brembo SGL Carbon Ceramic Brakes S.p.A. kombiniert wurden. Bei analog zu der Reibkombination Grauguss – LowMet-Bremsbelag durchgeführten Feinstaubmessungen konnte festgestellt werden, dass beim Bremssystem keramische Leichtbaubrems scheibe – LowMet-Bremsbelag, im Vergleich zur Graugussbrems scheibe, die Emission von UFP bei einer Autobahnbremsung um über 95 % reduziert werden konnte. Die Kombination keramische Leichtbaubrems scheibe – keramischer C/SiC Bremsbelag weist im Vergleich zu der Kombination Bremssystem keramische Leichtbaubrems scheibe – LowMet-Bremsbelag bei der Autobahnversuchsreihe einen um über 30 % reduzierten UFP-Ausstoß auf. Bei den Stadt- und Überland-Versuchsreihen reduziert sich die UFP-Emission, bei der Kombination keramische Leichtbaubrems scheibe – keramischer C/SiC Bremsbelag um ca. 78 % gegenüber der Reibkombination Grauguss – LowMet-Bremsbelag. Zu den UFP- und Feinstaubmessdaten ist eine Publikation in der Vorbereitung, aus der die Details entnommen werden können.

4.5 Entwicklung von Reporterlinien für die empfindliche Messung von physiologischen Effekten

Ein Ziel des Projektes war es, *A. thaliana*-Reporterlinien zur Detektion einer möglichen Stressantwort durch UFP zu generieren. Reporterlinien sind transgene Pflanzen, in denen beispielsweise ein endogener stressresponsiver Promoter an ein Gen für ein grün fluoreszierendes Protein gekoppelt ist. Bei einer Aktivierung des Promoters kann dann relativ einfach die Fluoreszenz an einem Mikroskop detektiert werden.

Für die Generierung der Linien innerhalb dieses Projekts wurde der Promoter des Gens *HSP17.4C1* (AT3G46230) gewählt. Die Expression dieses Gens unter verschiedenen stress-induzierenden Bedingungen wurde bereits umfangreich charakterisiert (Sewelam et al. 2019). Außerdem konnte in einem Vorversuch nach luftgetragener Exposition mit Rußpartikeln eine erhöhte Expression von *HSP17.4C1* im Vergleich zu Kontrollen festgestellt werden (Abbildung 22). Obwohl es sich hierbei nicht um UFP handelte, konnte so eine Induzierbarkeit des Gens durch Feinstaub gezeigt werden.

Fusionskonstrukte, mit 1kb und 2kb-Fragmenten dieses Promoters, dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und einer Glufosinat-Resistenzkassette wurden hergestellt und mithilfe der Floral Dip-Methode (Bent et al. 2006) in *A. thaliana* eingebracht. Um erfolgreich transformierte Pflanzen zu selektieren, wurden die Samen auf Agar-Platten mit Glufosinat ausgebracht und diejenigen Pflanzen weiter kultiviert, die eine Resistenz gegen das Herbizid zeigten. Selektierte Pflanzen wurden dann erneut angezogen und mit sich selbst bestäubt, um das Transgen in einem homozygoten Zustand vorliegen zu haben.

Um die Funktionalität der Linien zu verifizieren, wurde eine Behandlung mit Methylviologen appliziert, einem Induktor von oxidativem Stress. In Abbildung 17 ist ein Fluoreszenzsignal zu erkennen, das nur in der Linie HSP17.4C1_p::1kb:GFP_1-3-5 erfolgt. Somit konnte gezeigt werden, dass die GFP-Expression induzierbar ist. Jedoch ist die GFP-Fluoreszenz auf einem niedrigen Level, was auf eine geringe Sensitivität der Reporterlinie hindeutet.

Zusammenfassend kann die Reporterlinie bei zukünftigen Untersuchungen mit starken Stressoren als nützliches Werkzeug zu Rate gezogen werden. Da unsere Experimente im Projekt jedoch zeigten, dass UFP aus Bremsenabrieb einen eher geringen Einfluss auf Pflanzen haben, wurde die Priorität der Nutzung im Zuge des Projekts herabgestuft und die Reporterlinien wurden nicht für Versuche am Bremsenprüfstand herangezogen.

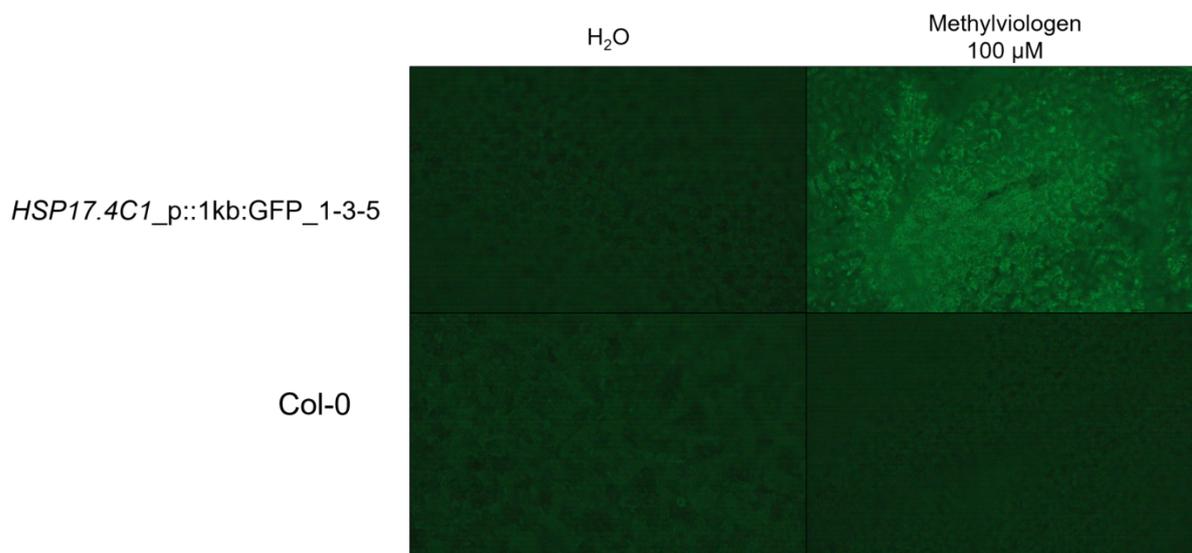


Abbildung 17: Induzierbarkeit der Fluoreszenz von pHSP17.4:GFP. Blätter homozygoter Linien wurden mit Methylviologen behandelt. „HSP17.4C1_p::1kb:GFP_1-3-5“ sind die transgenen Pflanzen, „Col-0“ sind wildtypische, nicht transformierte Pflanzen.

4.6 Aufbau kontrollierter Expositionsexperimente mit Pflanzen

Im Laufe des Projekts hat sich herausgestellt, dass die Sammlung des entstehenden Bremsstaubs einerseits zu einem hohen Grad der Agglomeration der UFP führt und andererseits die Mengen für nachgeschaltete Expositionen nicht ausreichend sind. Aus diesem Grund wurde eine Expositions-kammer entwickelt, die direkt in den Absaugstrang der Absaugung des Prüfstands integriert werden kann. Um die Kosten der Expositions-kammer so gering wie möglich

zu halten, wurde die Expositions-kammer aus Standardteilen, wie sie in der Lüftungstechnik eingesetzt werden, zusammengebaut (Abbildung 18, li.). Für die Exposition von Pflanzen in der Expositions-kammer wurde eine Kassette entwickelt, welche die gleichzeitige Exposition und reproduzierbare Positionierung von bis zu 9 Pflanzen ermöglicht. Ferner hat die Kassette Aufnahmen für den Messschlauch des Impaktors ELPI, sodass eine reproduzierbare Positionierung der Ansaugschläuche gewährleistet werden kann (Abbildung 18, re.). Zusätzlich können REM-Probenhalter mit Kohlenstoffpads montiert werden, um Proben für die spätere Untersuchung im REM nehmen zu können. Während der Expositionen mit Pflanzen kann zudem noch ein Thermo-element fixiert werden, welches eine Überwachung der Temperatur innerhalb der Expositions-kammer erlaubt.



Abbildung 18: Für die Exposition von Pflanzen im Absaugstrang des Bremsenprüfstand der Universität Bayreuth ausgelegte Expositions-kammer (links). Versuchsaufbau mit 3 Pflanzen, Thermo-element (Draht in der linken Bildhälfte) sowie Messschläuche des Impaktors ELPI (linker Schlauch) und „DMS500“ (rechter Schlauch) (rechts)

Mit der beschriebenen Expositions-kammer wurden wiederholt Expositionsversuche mit *A. thaliana* im Graugussbrems-scheibensystem durchgeführt. Dabei wurden, wie bereits in 4.3.1 beschrieben, Autobahn-Brem-sungen mit 2 MPa Bremsdruck durchgeführt, da bei diesen Bremsungen der gemessene Verschleißkoeffizient der Bremsbeläge maximal war. Ferner zeigen Autobahn-Brem-sungen den höchsten Anteil an UFP. Bei den Expositionsversuchen wurden 3-mal innerhalb von 30 Minuten 15 Autobahn-brem-sungen hintereinander durchgeführt, wobei die Absaugungsleistung auf 100% eingestellt wurde. Zur Kontrolle wurden Pflanzen desselben Entwicklungsstadiums 3-mal für 30 Minuten bei voller Absaugung ohne Bremsungen in der Kammer positioniert. Durch das Aufheizen der Brems-scheibe und die Ansaugung der Luft ergibt sich für die exponierten Pflanzen ein Temperaturanstieg innerhalb der Kammer. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass die Temperatur innerhalb der Kammer nicht über 30°C steigt. Die höchsten Partikelkonzentrationen bei den Expositionsversuchen wurde für Partikel im Größenbereich von 16 - 30 nm gemessen.

Für die Experimente am Prüfstand war es notwendig, (i) die Reproduzierbarkeit der kontrollierten Exposition zu verifizieren und (ii) quantitative Daten zur Menge applizierter UFP zu erheben. Aus diesen Gründen bestand die Notwendigkeit, eine Methode zur Messung von UFP

aus Bremsenabrieb in Pflanzenmaterial zu etablieren. Dazu wurde eine Extraktionsmethode für UFP aus einer Publikation adaptiert, mit deren Hilfe metallische UFP mittels spICP-MS gemessen werden können (Laughton et al. 2020). Die Methode wurde durch die Zugabe definierter Mengen kommerziell erhältlicher Cu-Nanopartikel (Copper Nanopowder APS 25 nm/99.5% SSA 30-50 m²/g – spherical, CAS no. 7440-50-8) vor der Extraktion unbehandelter Pflanzenproben verifiziert. In Abbildung 19, links ist zu sehen, dass die Partikelkonzentrationen in den zu erwartenden Abständen in einem linearen Verhältnis gemessen wurden. Zusätzlich wurden erwartungsgemäß die meisten Partikel bei einer Größe von 22-25 nm detektiert (Abbildung 19, rechts). Somit konnte gezeigt werden, dass die Extraktionsmethode mit Cu-Nanopartikeln akkurat funktioniert und dass die Partikel nicht zerstört werden.

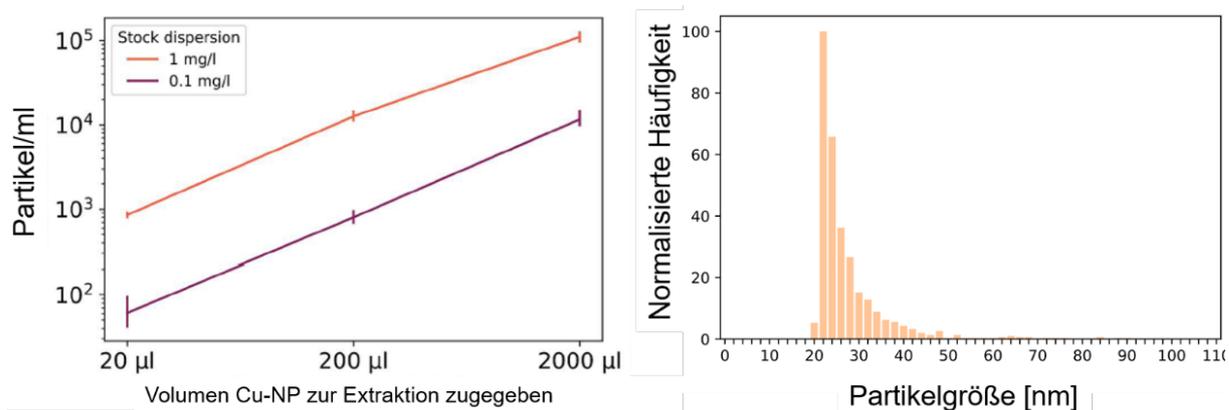


Abbildung 17: Validierung des Extraktionsprotokolls für UFP aus Pflanzenmaterial. Links: Evaluierung des Extraktionsprotokolls durch Zugabe unterschiedlicher Mengen zweier Cu-Partikeldispersionen zu Blattmaterial in Extraktionspuffer. Rechts: Größenverteilung der gemessenen Cu-Partikel nach der Extraktion

Für eine quantitative Messung der Partikelablagerung wurde wie oben beschrieben der Abrieb von 3 mal 15 Vollbremsungen appliziert. Metallische UFP wurden wie beschrieben extrahiert und mittels spICP-MS gemessen. Es konnte festgestellt werden, dass die meisten UFP aus Fe und Cu bestehen. Al, Sn, Ti und Zn waren in einer niedrigeren Größenordnung vorhanden. Mo, Ni und Pb UFP lagen in geringen Mengen vor.

Zusätzlich wurden Blätter von exponierten Pflanzen sowohl raster- als auch transmissionselektronenmikroskopisch untersucht. Hierbei wurden erneut keine Partikel im Bereich der Stomata im Inneren der Blätter gefunden. Auf den Oberflächen der Blätter lagen die Partikel mehrheitlich als größere Agglomerate vor.

Zusammenfassend konnte das Ausmaß der UFP-Ablagerung auf Blättern zuverlässig quantifiziert werden und eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit der Expositionsexperimente festgestellt werden. Die beschriebenen Expositionen sind unseres Wissens nach die ersten Experimente mit luftgetragenen UFP, die im Bezug auf die Menge applizierter UFP so genau charakterisiert wurden.

4.7 Molekulare Charakterisierung physiologischer Effekte, Entwicklung von ökotoxikologischen Markern

Um den Einfluss der UFP auf die pflanzliche Physiologie zu untersuchen, wurde in drei unabhängigen Replikaten 24h nach erfolgter Exposition am Prüfstand die gesamte RNA von adulten *A. thaliana* Blattrosetten isoliert und eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Dabei wurden die Pflanzen

- (i) der Platzierung innerhalb der Expositions-kammer, 3x15 Bremsungen und dem Sog der Absaugung ausgesetzt (= Behandlung)
- (ii) der Platzierung innerhalb der Expositions-kammer und lediglich 3x15min dem Sog der Absaugung ausgesetzt (= Kontrolle innen) und
- (iii) der Platzierung neben der Expositions-kammer am Bremsenprüfstand ausgesetzt (= Kontrolle außen).

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde festgestellt, dass zwischen der Kontrolle außen und der Kontrolle innen nur etwa halb so viele Gene differenziell exprimiert sind wie zwischen der Kontrolle außen und der Behandlung (Abbildung 20). Beschriebene Markergene für mechanischen Stress sind in beiden Vergleichen nicht differenziell exprimiert (Braam et al. 1996), was gegen einen nennenswerten Einfluss des Luftstroms auf die Genaktivität spricht.

Durch die sehr differenzierte Kategorisierung vieler *A. thaliana* Gene können die UFP-responsiven Gene mithilfe der Gene-Ontology (GO) (geneontology.org) physiologischen Funktionen zugeordnet werden. Beispielsweise sind einige Gene enthalten, die in früheren Studien Funktionen in der Eisenhomöostase, der Seneszenz oder dem Phytohormonmetabolismus gezeigt haben.

Zwischen „Kontrolle außen“ und „Behandlung“ herrschte neben der Präsenz von Partikeln zusätzlich noch ein Temperaturunterschied. Obwohl diese Unterschiede gering waren (~ 7°C) stellte sich die Frage, ob einige der identifizierten differenziell exprimierten Gene (DEG) temperaturresponsiv waren. Die funktionelle Kategorisierung der Gene mithilfe der Gene-Ontology zeigte jedoch keine Indikation für temperaturresponsive Kategorien.

Diese Ergebnisse deuten stark auf einen Effekt der UFP auf die Genexpression in den Pflanzen hin. Darüber hinaus erlaubt die Transkriptomanalyse die Extraktion von Kandidatengen für die Entwicklung von ökotoxikologischen Markern.

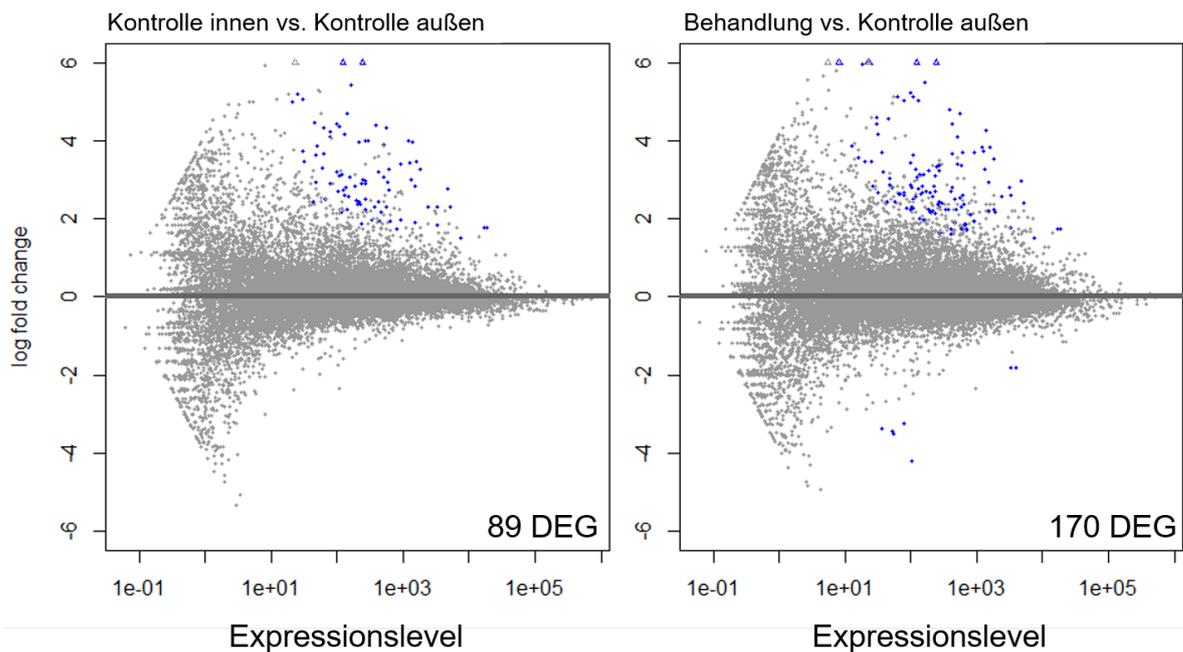


Abbildung 18: MA-plots zu den differentiellen Expressionsanalysen. Links: Kontrolle innen vs. Kontrolle außen. Rechts: Behandlung vs. Kontrolle außen. Signifikant differentiell exprimierte Gene (DEG) sind blau markiert, nicht signifikante grau. DEG wurden mit DESeq2 identifiziert ($p_{adj} < 0.05$). Rechts unten in den Abbildungen ist die Anzahl von DEG angegeben

Weiterhin wurde untersucht, ob die Behandlung zu Langzeit-Effekten in den Pflanzen führt. Dazu wurden Pflanzen nach kontrollierter Exposition zur Samenreife gebracht, um durch die Menge der produzierten Samen und deren Keimungsrate potenzielle Langzeiteffekte auf die Fitness zu detektieren. Hierbei haben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Pflanzen aus der Exposition mit UFP und den Kontrollen gezeigt.

4.8 Freilandexpositionsexperimente II – Detektion und Quantifizierung ökotoxikologischer Effekte

Im Herbst 2022 wurden erneut Freilandexpositionsexperimente mit *A. thaliana* an den in Arbeitspaket 1 charakterisierten Standorten (siehe Kapitel 4.2) durchgeführt um (i) durch die in Arbeitspaket 6 beschriebene Methode zur Quantifizierung von UFP (siehe Kapitel 4.6) die applizierten UFP-Mengen aus der kontrollierten Exposition in einen realen Kontext setzen zu können und (ii) Material zu generieren, um die Expression der in Arbeitspaket 7 extrahierten Kandidatengene (siehe Kapitel 4.7) für ökotoxikologische Marker mittels RT-qPCR gezielt messen zu können. Die Expositionsdauer betrug zwei Wochen.

Es wurde ermittelt, dass die Menge metallischer UFP auf den *Arabidopsis*-Pflanzen aus der Innenstadt am höchsten war, gefolgt von der Exposition an dem städtischen Hintergrund und dem regionalen Hintergrund. Am abundantesten sind an allen Standorten Fe-UFP, gefolgt von Sn-UFP, Zn-UFP, Al-UFP, Ti-UFP, Cu-UFP, Mo-UFP, Ni-UFP und Pb-UFP (Publikation in Vorbereitung).

Beim Vergleich der Partikelkonzentration in Pflanzenmaterial aus der Exposition an der Innenstadt-Ampelkreuzung mit der kontrollierten Exposition am Prüfstand unterscheiden sich UFP einzelner Metalle sehr stark. Für die meisten Elemente bewegen sich die Verhältnisse *Kontrollierte Exposition/Freilandexposition(Ampelkreuzung – Innenstadt)* jedoch zwischen Faktor 2 und 10 (Publikation in Vorbereitung). Dadurch wird deutlich, dass sich die beiden Expositionen in Bezug auf die Menge metallischer UFP auf den Pflanzen generell nicht sehr stark unterscheiden. Daher erlaubt die im Projekt entwickelte kontrollierte Exposition Experimente unter Bedingungen, die auch für reale Standorte Aussagen erlauben.

Die Messung von UFP-responsiven Genen aus der Transkriptomanalyse in den Freilandproben von *A. thaliana* mittels RT-qPCR ist zum Zeitpunkt dieses Berichts noch in Bearbeitung.

5 Zusammenfassung

In diesem Projekt sollten metallische UFP aus Bremsenabrieb analysiert und deren Effekte auf Pflanzen untersucht werden. Dazu wurden UFP am Bremsenprüfstand der Universität Bayreuth erzeugt und mit verschiedenen Methoden umfangreich charakterisiert. Dabei hat sich ergeben, dass das Ausmaß der UFP-Emission stark von der Art der Bremsung abhängt. Der Anteil von UFP an der gesamten Partikelemission ist bei einer Autobahnbremung wesentlich höher als bei Überland- oder Stadtbremungen. Zudem wurde herausgefunden, dass durch den Einsatz keramischer Leichtbaubremsscheiben die UFP-Emission im Gegensatz zu herkömmlichen Systemen um bis zu 95% reduziert werden kann.

Um kontrollierte Expositionsexperimente mit Pflanzen zu ermöglichen, wurde eine Expositionskammer in den Absaugstrang des Bremsenprüfstands integriert. Mithilfe einer eigens entwickelten Methode zur Messung von UFP in/auf Pflanzen wurde quantifiziert, wie viele UFP in welcher chemischen Zusammensetzung appliziert wurden. Zudem konnte bestätigt werden, dass die Expositionen in Bezug auf die applizierten UFP-Mengen reproduzierbar durchgeführt werden können. Mithilfe der neu entwickelten Expositionskammer konnten somit erfolgreich realitätsnahe und reproduzierbare Expositionen von Pflanzen durchgeführt werden.

Um eine erste Einschätzung über mögliche ökotoxikologische Effekte von UFP auf Pflanzen treffen zu können, wurden eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Hierbei hat sich ergeben, dass die Exposition zu Veränderungen in der Genexpression führt. Responsive Gene haben verschiedene Funktionen, beispielsweise in der Metallhomöostase oder Regulierung von Seneszenz. Die UFP-responsiven Gene können zudem als Quelle zur Extraktion ökotoxikologischer Marker für UFP dienen. Des Weiteren wurden Langzeiteffekte auf die Fitness von Pflanzen adressiert. Hierbei konnten keine signifikanten Effekte festgestellt werden.

Zusätzlich wurden Freilandexperimente an Standorten durchgeführt, die im Rahmen des Projekts bereits in Bezug auf UFP eingehend charakterisiert wurden. Mit dem so generierten Pflanzenmaterial wurden erneut Messungen zum Gehalt von UFP in/auf Blättern durchgeführt. Dadurch wurde deutlich, dass sich die Exposition am Bremsenprüfstand in Bezug auf die Menge metallischer UFP auf den Pflanzen generell nicht sehr stark von einer Exposition an einem hochbelasteten Standort (Innenstadt-Ampelkreuzung) unterscheidet.

Zusammenfassend wurden in diesem Projekt erstmals reproduzierbare Expositionsexperimente mit luftgetragenen UFP und dem Modellorganismus *A. thaliana* durchgeführt. Mit Transkriptomdaten konnte gezeigt werden, dass es in den Pflanzen eine Reaktion auf diese Partikel in Form von veränderter Genexpression gibt. Freilandexperimente haben ergeben, dass die Mengen applizierter UFP in den Expositionsexperimenten den Mengen unter realen Bedingungen an einem stark belasteten Standort ähneln. Somit kann davon ausgegangen werden, dass einige der beobachteten Effekte auf transkriptioneller Ebene wahrscheinlich auch unter Freilandbedingungen auftreten. Eine negative Beeinflussung der pflanzlichen Fitness konnte unter den getesteten Bedingungen nicht beobachtet werden.

6 Ausblick

In diesem Teilprojekt wurde wichtige Pionierarbeit zu den Effekten von metallischen UFP auf Pflanzen geleistet. Es sind wertvolle Erkenntnisse gewonnen worden, die wiederum zu neuen Fragestellungen führen.

Beispielsweise ist aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen hervorgegangen, dass UFP eine starke Tendenz zur Bildung von Agglomeraten zeigen. Obwohl dieses Verhalten von starker Relevanz für die Aufnahme in Blattgewebe oder beispielsweise den menschlichen Körper ist, wurde es bisher kaum im Detail charakterisiert. Es könnten Messungen an definierten Stellen innerhalb des Absaugstrangs durchgeführt werden, um festzustellen, ob sich die Partikelgrößenverteilung mit zunehmendem Abstand von der Bremsscheibe hin zu größeren Partikelgrößen verändert.

Mithilfe der Transkriptomanalyse konnten UFP-responsive Gene identifiziert werden. Die Messung der Expression dieser Gene in dem Material aus Freiland-exponierten Pflanzen wird noch Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Ferner wären Expositionen im Reibsystem keramische Leichtbaubremsscheibe – keramischer C/SiC Bremsbelag sinnvoll, um deren Einfluss auf die pflanzliche Genexpression zu untersuchen.

7 Veröffentlichungen

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt befindet sich eine Publikation für die Zeitschrift „Environmental Science & Technology“ mit dem Titel „*Effects of airborne ultra-fine particulate matter from brake wear on plants under realistic exposure conditions*“ unter Begutachtung.

Literaturverzeichnis

- [1] Apte, J. S., Marshall, J. D., Cohen, A. J., & Brauer, M. (2015). Addressing global mortality from ambient PM_{2.5}. *Environmental science & technology*, 49(13), 8057-8066.
- [2] B. Breuer und K. Bill, Bremsenhandbuch - Grundlagen, Komponenten, Systeme, Fahrdynamik, Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag, 2017.
- [3] Bent, A. (2006). Arabidopsis thaliana floral dip transformation method. *Agrobacterium protocols*, 87-104.
- [4] Cohen, A. J., Brauer, M., Burnett, R., Anderson, H. R., Frostad, J., Estep, K., & Forouzanfar, M. H. (2017). Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. *The Lancet*, 389(10082), 1907-1918.
- [5] Daresta, B. E., Italiano, F., de Gennaro, G., Trotta, M., Tutino, M., & Veronico, P. (2015). Atmospheric particulate matter (PM) effect on the growth of Solanum lycopersicum cv. Roma plants. *Chemosphere*, 119, 37-42.
- [6] Grigoratos T., Martini G.: Brake wear particle emissions: a review. *Environ Sci Pollut Res*, 22 (2015) 2491.
- [7] Hedberg, Y. S., Hedberg, J. F., Isaksson, S., Mei, N., Blomberg, E., Wold, S., & Wallinder, I. O. (2017). Nanoparticles of WC-Co, WC, Co and Cu of relevance for traffic wear particles—Particle stability and reactivity in synthetic surface water and influence of humic matter. *Environmental pollution*, 224, 275-288.
- [8] Hulskotte, J. H. J., Denier van der Gon, H. A. C., Visschedijk, A. J. H., & Schaap, M. (2007). Brake wear from vehicles as an important source of diffuse copper pollution. *Water science and technology*, 56(1), 223-231.
- [9] L. Selley, L. Schuster, H. Marbach, T. Forsthuber, B. Forbes, T. W. Gant, T. Sandström, N. Camiña, T. J. Athersuch, I. Mudway und A. Kumar, „Brake dust exposure exacerbates inflammation and transiently compromises phagocytosis in macrophages,“ *Metallomics*, Bd. 12, Nr. 3, pp. 371-386, 2020.
- [10] Lampropoulos, A., Sutikovic, Z., Wenzl, C., Maegele, I., Lohmann, J. U., & Forner, J. (2013). GreenGate—a novel, versatile, and efficient cloning system for plant transgenesis. *PloS one*, 8(12), e83043.
- [11] Laughton, S., Laycock, A., Bland, G., von der Kammer, F., Hofmann, T., Casman, E. A., & Lowry, G. V. (2021). Methanol-based extraction protocol for insoluble and moderately water-soluble nanoparticles in plants to enable characterization by single particle ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(2), 299-314.
- [12] Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental chemistry letters*, 8, 199-216.
- [13] Piacentini, D., Falasca, G., Canepari, S., & Massimi, L. (2019). Potential of PM-selected components to induce oxidative stress and root system alteration in a plant model organism. *Environment international*, 132, 105094.
- [14] Praticò, F. G., & Briante, P. G. (2020). Particulate Matter from Non-exhaust Sources. In *Environmental Engineering. Proceedings of the International Conference on Environmental Engineering. ICEE* (Vol. 11, pp. 1-9). Vilnius Gediminas Technical University, Department of Construction Economics & Property.
- [15] Scarpeci, T. E., Zanol, M. I., Carrillo, N., Mueller-Roeber, B., & Valle, E. M. (2008). Generation of superoxide anion in chloroplasts of Arabidopsis thaliana during active photosynthesis: a focus on rapidly induced genes. *Plant molecular biology*, 66(4), 361-378.
- [16] Sewelam, N., Kazan, K., Hüdig, M., Maurino, V. G., & Schenk, P. M. (2019). The AtHSP17.4C1 gene expression is mediated by diverse signals that link biotic and abiotic stress factors with ROS and can be a useful molecular marker for oxidative stress. *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3201.

- [17] Thorpe, A., & Harrison, R. M. (2008). Sources and properties of non-exhaust particulate matter from road traffic: a review. *Science of the total environment*, 400(1-3), 270-282.
- [18] Sanderson P., *A review of chemical and physical characterisation of atmospheric metallic nanoparticles*, Atmospheric Environment, 94 (2014) 353.
- [19] Braam, J., Sistrunk, M. L., Polisensky, D. H., Xu, W., Purugganan, M. M., Antosiewicz, D. M., ... & Johnson, K. A. (1996). Life in a changing world: TCH gene regulation of expression and responses to environmental signals. *Physiologia Plantarum*, 98(4), 909-916.

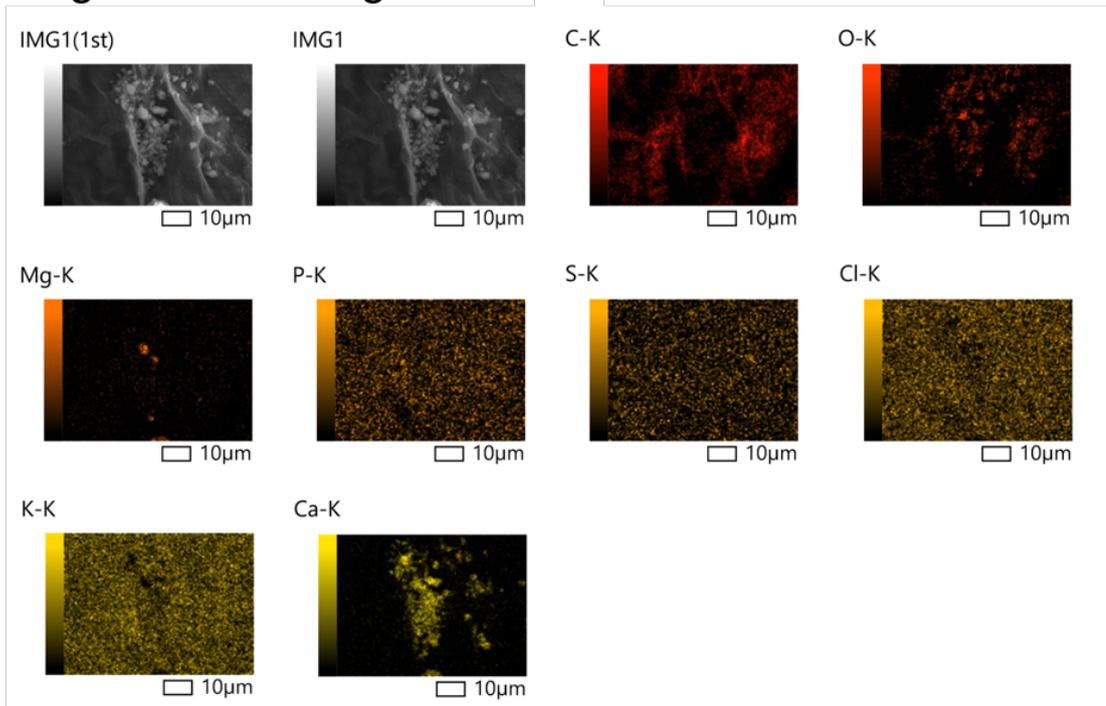
Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Analytisches Verfahren zur Bestimmung luftgetragener metallischer UFP	7
Abbildung 2:	Messstandorte	8
Abbildung 3:	Bremsenprüfstand	9
Abbildung 4:	Versuchsaufbau zur Durchführung kontrollierter Expositionsexperimente mit Pflanzen: Impaktorsystem ELPI+ mit Expositionskammer sowie zu exponierende Pflanzen	11
Abbildung 5:	Mittlere Partikelanzahlkonzentration in der Luft tagsüber an drei Standorten	13
Abbildung 6:	Anzahl ultrafeiner metallischer bzw. metallhaltiger Partikel (16-100 nm) an drei Standorten	13
Abbildung 7:	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Spaltöffnungen von <i>Lactuca sativa</i> Pflanzen aus den Freilandexpositionsexperimenten. Abgebildet sind Querschnitte von Blättern, das Blattinnere befindet sich in jedem Bild unten. Bei den Aufnahmen der unteren Reihe handelt es sich jeweils um Vergrößerungen der Aufnahmen der oberen Reihe. Es konnten keine Unterschiede detektiert werden	15
Abbildung 8:	REM-Aufnahmen von <i>A. thaliana</i> Blattproben aus zwei Standorten der Freilandexposition.....	16
Abbildung 9:	REM-Detailaufnahme von Cu-enthaltenden Partikeln auf der Blattoberfläche einer <i>A. thaliana</i> -Pflanze, die 4 Tage an einer Ampelkreuzung in der Innenstadt von Augsburg stand	16
Abbildung 10:	Bremsenprüfstand der Universität Bayreuth: Bremsscheibe mit Bremszange, keramischer Bremsscheibe und Absaugstutzen mit eingebrachtem Filter (links); innerhalb des Projektes entwickelte angepasste Absaugelemente mit einer Absaugung unter- und oberhalb der Bremsscheibe (Mitte, rechts).	18
Abbildung 11:	Schema der Absaugung mit zwei unterschiedlichen Betriebsmodi.....	19
Abbildung 12:	REM-Aufnahme von Bremsabriebspartikeln des Graugussbremsscheibensystems auf Kohlenstoffpad. Links: Übersichtsaufnahme (Vergrößerung: 1.000x), rechts: Detailaufnahme (Vergrößerung: 5.000x).....	19
Abbildung 13:	EDX-Summenspektrum gesammelter Bremsabriebspartikel (Rasterelektronenmikroskop: Zeiss GEMINI, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland, EDX-Detektor: EDAX Octane, EDAX, Deutschland)..	20
Abbildung 14:	REM-Aufnahme der Bremsbelagsoberfläche nach der tribologischen Prüfung (Graugussbremsscheibensystems). Links: Übersichtsaufnahme (Vergrößerung: 100x), rechts: Detailaufnahme (Vergrößerung: 15.000x)....	20

Abbildung 15:	EDX-Summenspektrum eines Ausschnitts des Reibfilms auf einem bebremsten Graugussbremsbelag (Rasterelektronenmikroskop: Zeiss GEMINI, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland, EDX-Detektor: EDAX Octane, EDAX, Deutschland).....	21
Abbildung 16:	Relative Anteile der emittierten Partikelgrößenfraktionen bei Bremsvorgängen (Kaskadenimpaktor ELPI+, n=20)	21
Abbildung 19:	Validierung des Extraktionsprotokolls für UFP aus Pflanzenmaterial. Links: Evaluierung des Extraktionsprotokolls durch Zugabe unterschiedlicher Mengen zweier Cu-Partikeldispersionen zu Blattmaterial in Extraktionspuffer. Rechts: Größenverteilung der gemessenen Cu-Partikel nach der Extraktion	25
Abbildung 20:	MA-plots zu den differentiellen Expressionsanalysen. Links: Kontrolle innen vs. Kontrolle außen. Rechts: Behandlung vs. Kontrolle außen. Signifikant differenziell exprimierte Gene (DEG) sind blau markiert, nicht signifikante grau. DEG wurden mit DESeq2 identifiziert ($p_{adj} < 0.05$). Rechts unten in den Abbildungen ist die Anzahl von DEG angegeben	27
Abbildung 21:	REM-Aufnahmen von Blattproben aus zwei Standorten der Freilandexposition. Dargestellt sind die beiden Aufnahmen aus Abbildung 2 und die EDX-Overlays, welche die Lokalisierung verschiedener Elemente zeigen	35
Abbildung 22:	Validierung von HSP17.4C1 als Kandidat für eine Reporterlinie. A: Größenverteilung der Partikel aus dem miniCAST 6204C Ruß-Generator (modifiziert aus Real Soot Generator Model 6204C miniCAST Instruction Manual). B: RT-qPCR Messung der Expression von <i>HSP17.4C1</i> in Blättern von Kontrollpflanzen und Pflanzen, die 5 Stunden lang Ruß ausgesetzt waren.....	36

Anhang

Regionaler Hintergrund



Innenstadt Ampelkreuzung

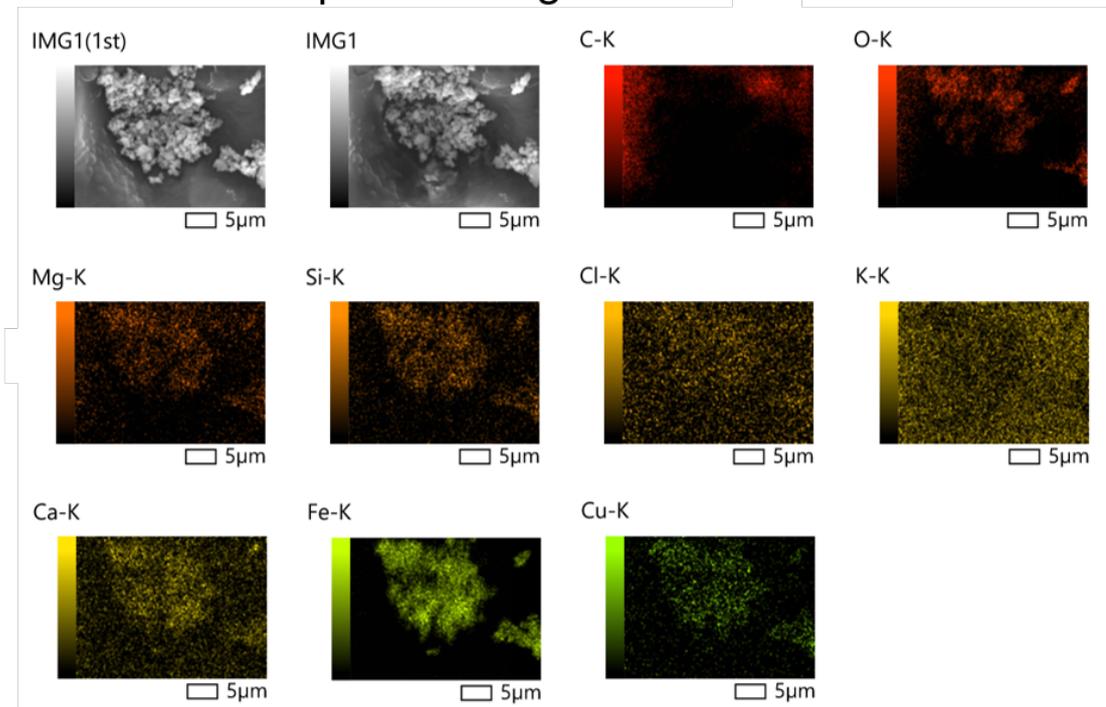


Abbildung 19: REM-Aufnahmen von Blattproben aus zwei Standorten der Freilandexposition. Dargestellt sind die beiden Aufnahmen aus Abbildung 2 und die EDX-Overlays, welche die Lokalisierung verschiedener Elemente zeigen

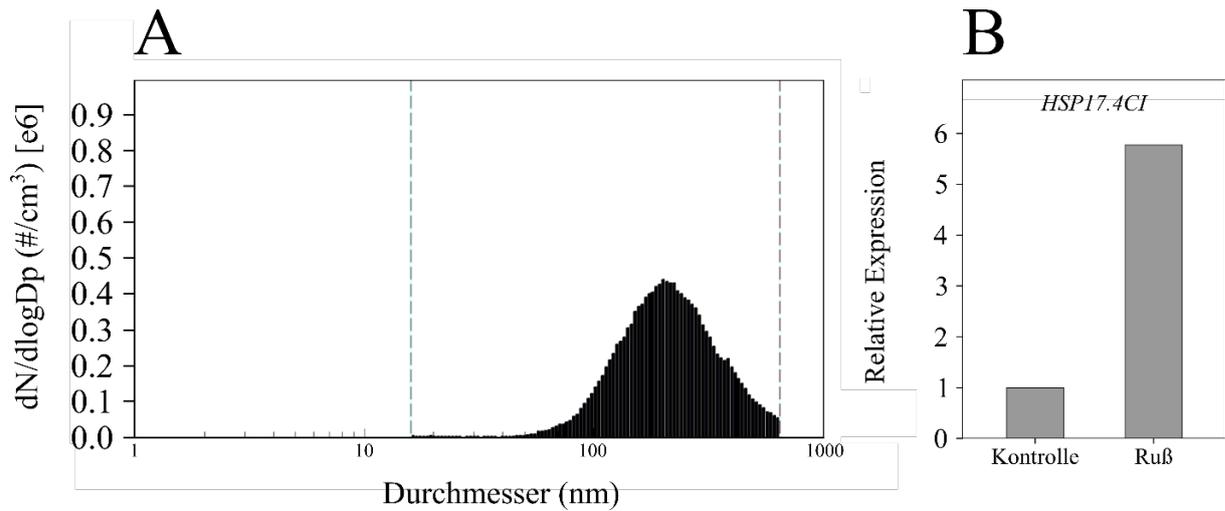


Abbildung 20: Validierung von HSP17.4C1 als Kandidat für eine Reporterlinie. A: Größenverteilung der Partikel aus dem miniCAST 6204C Ruß-Generator (modifiziert aus Real Soot Generator Model 6204C miniCAST Instruction Manual). B: RT-qPCR Messung der Expression von *HSP17.4C1* in Blättern von Kontrollpflanzen und Pflanzen, die 5 Stunden lang Ruß ausgesetzt waren