

Het mogelijke effect van toxische stoffen, afkomstig van de luchthaven Schiphol, op schapen die in de omgeving grazen

T. Sloomweg
L. Waanders
T.H.M. Hamers
A.J. Murk

Rapport 196

Het mogelijke effect van toxische stoffen, afkomstig van de luchthaven Schiphol, op de schapen die in de omgeving grazen



T. Sloopweg, L. Waanders, T.H.M. Hamers & A.J. Murk

Leerstoelgroep Toxicologie
Wageningen Universiteit en Researchcentrum

Wetenschapswinkel Wageningen UR
februari 2004

Rapport 196

Colofon

Het mogelijke effect van toxische stoffen, afkomstig van de luchthaven Schiphol, op de schapen die in de omgeving grazen

T. Slootweg, L. Waanders, T.H.M. Hamers & A.J. Murk
Leerstoelgroep Toxicologie, Wageningen UR

Wetenschapswinkel Wageningen UR, rapportnummer 196
februari 2004

ISBN : 90-6754-736-0
Omslag : Andrew Zeegers, Domino Design
Foto titelblad : Marie-José Jongerius (mail@photography2day.com)
Lay-out : Vormgeving, Plant Sciences Group
Prijs : € 10,00
www.wur.nl/wewi

Het mogelijke effect van toxische stoffen, afkomstig van de luchthaven Schiphol, op de schapen die in de omgeving grazen

Rapportnummer 196

T. Sloomweg, L. Waanders, T.H.M. Hamers & A.J. Murk, Wageningen, februari 2004

**Landelijke Inspectiedienst
Dierenbescherming/ Nederlandse
Vereniging tot Bescherming van Dieren**
Postbus 85980, 2508 CR Den Haag
Tel. 070-3142700, fax 070-3142777
e-mail info@dierenbescherming.nl
www.dierenbescherming.nl

De Dierenbescherming is met bijna 200.000 leden, duizenden actieve vrijwilligers en ruim 110 regionale afdelingen de grootste organisatie in Nederland die opkomt voor de belangen van alle dieren. Dit doet zij bijvoorbeeld door misstanden in de intensieve veehouderij aan de kaak te stellen. Door met de Landelijke Inspectiedienst Dierenbescherming dieren mishandeling en verwaarlozing aan te pakken. Of door het opvangen van duizenden 'dakloze' huisdieren in één van de ruim honderd bij haar aangesloten asielen. De Dierenbescherming werkt ook hard aan verbetering van de (Europese) wetgeving en stimuleert diervriendelijker (koop)gedrag.

**Leerstoelgroep Toxicologie
Wageningen Universiteit**
Postbus 8000
6700 EA Wageningen
E-mail: Tinka.Murk@WUR.nl
www.ftns.wau.nl/tox

Binnen de leerstoelgroep Toxicologie wordt onderzoek gedaan naar de mate waarin, en de wijze, waarop giftige stoffen uit het milieu en uit het voedsel een nadelig effect kan hebben op mens en dier. Een van de projecten ten tijde van dit onderzoek betrof het promotieonderzoek van T Hamers naar de toxische potentie en effecten van diffuse luchtverontreiniging.

Wetenschapswinkel Wageningen UR
Postbus 9101
6700 HB Wageningen
0317-484661
e-mail: wetenschapswinkel@wur.nl
www.wur.nl/wewi
www.wetenschapswinkels.nl

Maatschappelijke organisaties zoals verenigingen en belangengroepen, die niet over voldoende financiële middelen beschikken, kunnen met onderzoeksvragen terecht bij de Wetenschapswinkel Wageningen UR. Deze biedt ondersteuning bij de realisatie van onderzoeksprojecten. Aanvragen moeten aansluiten bij de werkgebieden van Wageningen UR: duurzame landbouw, voeding en gezondheid, een leefbare groene ruimte en maatschappelijke veranderingsprocessen.

Voorwoord

De Dierenbescherming en de aan haar gelieerde Landelijke Inspectiedienst Dierenbescherming krijgen vele vragen van burgers die zich zorgen maken over het welzijn van dieren. Op de meeste vragen kan de Dierenbescherming, eventueel na een kort onderzoek ter plaatse door de Inspectie, zelf een antwoord geven. Maar soms komen er vragen binnen waarop niet direct een goed gefundeerd antwoord valt te geven. Dat was het geval met de vraag van werknemers van de luchthaven Schiphol naar de effecten van de luchtvervuiling op de gezondheid van schape die naast de landingsbaan grazen. Een intrigerende vraag, want als de schape schade ondervinden zou het grazen bij de landingsbaan bekort of zelfs beëindigd moeten worden, in welk geval Schiphol het gras op andere wijze kort zal moeten gaan houden. Voor het beantwoorden van deze vraag zijn we naar de Wetenschapswinkel van Wageningen UR gestapt. Die vond de Leerstoelgroep Toxicologie van Wageningen Universiteit bereid de vraag te onderzoeken.

Twee studenten, Laurens Waanders en Tineke Slootweg hebben het onderzoek uitgevoerd. Zij werden daarbij begeleid door dr. Tinka Murk en ir. Timo Hamers. Ik wil hen en Elsje Oosterkamp van de Wetenschapswinkel heel hartelijk bedanken voor hun werk, dat ook nog eens extra lang duurde door een onderbreking als gevolg van de mond- en klauwzeercrisis in 2001.

Het resultaat is een lijvig wetenschappelijk rapport waarin de luchtkwaliteit bij Schiphol is vergeleken met die van een meetpunt in de Biesbosch en waarin wolmonsters van schape bij Schiphol zijn vergeleken met wolmonsters van schape in de buurt van Tilburg.

De conclusie is dat de kans dat schape schadelijke hoeveelheden stoffen binnen krijgen zeer klein is. Bovendien melden dierenartsen uit de omgeving dat ze geen verminderde vruchtbaarheid of grotere incidentie van spontane abortussen constateren in dit gebied. Omdat schape vaak niet langer dan 6 maanden op een zelfde plek grazen is het ook niet te verwachten dat ze last krijgen van luchtwegproblemen die eventueel bij chronische blootstelling zouden kunnen optreden.

De vervuiling waaraan de schape bij Schiphol blootstaan bleek niet alleen van Schiphol te komen, maar in belangrijke mate ook van de drukke verkeerswegen rond Schiphol. Zodoende zegt het onderzoek ook iets van schape die in de buurt van een snelweg grazen.

Al met al lijkt er dus geen reden tot extra bezorgdheid om de gezondheid van schape die in de buurt van Schiphol of een snelweg grazen, mits de dieren daar niet te lang verblijven.

Bert van den Berg, beleidsmedewerker veehouderij
Nederlandse Vereniging tot Bescherming van Dieren

Dankwoord

Langs deze weg willen wij graag een aantal mensen bedanken die hebben bijgedragen aan dit onderzoek. Op de eerste plaats Hans van de Berg voor zijn hulp bij het praktisch werk en voor het op en neer rijden naar de Biesbosch, ondanks het feit dat er altijd precies dan wanneer we wilden gaan zware stormen opstaken of de temperatuur tot ver beneden het vriespunt daalde. Ook willen wij graag Reinier Groeneveld bedanken voor het plaatsen van de filters en het verzamelen van de wolmonsters bij Schiphol, Frank Jonker voor het plaatsen van de filters in de Biesbosch en de familie Demand voor het verzamelen van de wolmonsters uit Tilburg.

De auteurs

Inhoudsopgave

Voorwoord		
Dankwoord		
Samenvatting	1	
1. Inleiding	3	
1.1 Aanleiding van het onderzoek	3	
1.2 Mogelijke bronnen van nadelige effecten op gezondheid en welzijn van schapen	3	
1.2.1 Luchtverontreiniging en neerslag van vliegtuigen	3	
1.2.2 Geur- en geluidshinder	3	
1.3 Mogelijke luchtverontreiniging bij Schiphol	4	
1.3.1 Soorten verontreiniging	4	
1.3.2 Chemische analyses	4	
1.3.3 Epidemiologisch onderzoek	5	
1.4 Polycyclische aromatische koolwaterstoffen	5	
1.5 Aanpak	7	
1.6 Onderzoeksvragen	8	
Subvraagstellingen	8	
2. Materiaal en Methoden	9	
2.1 Inleiding	9	
2.2 Bemonsteringslocaties	9	
2.3 Monsternamen luchtfilters	11	
2.4 Monsternamen en opwerking schapenwol	11	
2.5 DR-CALUX6hr	12	
2.6 UMU-assay	13	
2.7 Statistiek	14	
3. Resultaten	15	
3.1 Inleiding	15	
3.2 Resultaten luchtfiltermonsters	15	
3.2.1 DR-CALUX6hr	15	
3.2.2 UMU-assay	16	
3.3 Resultaten wolmonsters	18	
4. Discussie	21	
4.1 Inleiding	21	
4.2 Luchtmonsters	21	
4.3 Wolmonsters	25	
5. Conclusie	27	
6. Literatuurlijst	29	
Bijlage I	Filters voor luchtbemonstering	1 p.
Bijlage II	Opwerking wolmonsters	1 p.
Bijlage III	Celkweek	1 p.
Bijlage IV	DR-CALUX6hr	1 p.
Bijlage V	UMU-assay	1 p.
Bijlage VI	Gegevens luchtfilters	1 p.
Bijlage VII	Gegevens wolmonsters	1 p.

Samenvatting

Werknemers van de luchthaven Schiphol hebben de Landelijke Inspectiedienst Dierenbescherming (LID) gewezen op mogelijke gezondheidseffecten bij schape die langs de landingsbaan grazen en daar dag en nacht blootgesteld kunnen worden aan verontreiniging. De LID heeft de Wetenschapswinkel Wageningen UR gevraagd onderzoek te doen naar de mogelijke nadelige effecten van de luchthaven Schiphol op schape die daar grazen. Het onderzoek is aangenomen door de Leerstoelgroep Toxicologie van de Wageningen universiteit en in twee delen uitgevoerd. Het eerste deel is uitgevoerd door Laurens Waanders in 2001 en het tweede deel door Tineke Slootweg in 2003. Deze uitvoering in 2 delen was nodig omdat door de mond-en klauwzeer epidemie van 2001 de uitvoering van het 1^e deel van dit onderzoek ernstig vertraagd is. Waanders concludeerde op basis van literatuuronderzoek dat het belangrijkste deel van de verontreiniging die mogelijk een schadelijk effect zou kunnen hebben op schape gevormd wordt door polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) en daarop lijkende verbindingen. Om de schadelijke potentie van de luchtverontreiniging te meten zijn luchtmonsters genomen bij Schiphol en als referentiepunt in de Biesbosch, omdat daar de benodigde apparatuur reeds aanwezig was. Met een groot-monster-zuiger is gedurende 24 uur lucht over een filter gezogen. Ook is schapewol verzameld als een maat voor de langere termijn blootstelling van schape aan stoffen uit de lucht.

De filters en de wol zijn met een celttest die de aanwezigheid van PAKs op een bepaalde manier kan aantonen onderzocht op hun relatieve aanwezigheid. Benzo (a) Pyreen (B(a)P) is een van de PAK's die het meest potent is om deze assay, ook wel DR-CALUX-6hr genoemd. Daarom is de potentie om deze Ah-receptor te induceren dan ook uitgedrukt in B(a)P-equivalenten (BEQ).

De mutageniteit van de luchtmonsters is bepaald in de UMU-assay. In deze test wordt het vermogen van de monsters om DNA-schade te geven bepaald doordat de op de schade volgende SOS-respons wordt omgezet in een kleurreactie. Hoewel niet zo veel monsters verzameld konden worden als oorspronkelijk gehoopt (totaal 14 in 2001 en 13 in 2003), bleek uit de resultaten wel dat de luchtverontreiniging sterk afhankelijk is van de windrichting.

De gemiddelde BEQ-waarde van de luchtmonsters genomen in Schiphol verschilde zowel in 2001 als 2003 niet significant van de gemiddelde BEQ-waarde van luchtmonsters uit de Biesbosch. Wel waren de BEQ-waarden in 2001 (periode juni-augustus) iets lager dan in 2003 (periode februari-april), resp. tussen de 4 en 33 pmol/m³ lucht en tussen de 15 en 100 pmol BEQ/m³ lucht. Luchtmonsters genomen bij oostenwind bij Schiphol hebben een drie keer hogere BEQ-waarde dan luchtmonsters genomen bij de andere windrichtingen bij Schiphol. Bij oostenwind komt de wind bij de zuiger niet alleen via Schiphol maar ook via de drukke snelwegen aldaar. De hoogste waarden in de Biesbosch worden gemeten bij zuidenwind, wanneer de lucht over de Amercentrale bij Geertruidenberg komt.

De mutageniteit van de luchtmonsters geeft in grote lijnen hetzelfde beeld als voor de BEQ-waarden, hoewel het beeld iets verschilt voor luchtmonsters met en zonder bio-activatie van de aanwezige stoffen.

Op basis van een aantal grove aannamen en een vergelijking met resultaten van metingen naast de A2 in NL, wordt geschat dat de bijdrage van Schiphol aan de lokale verontreiniging met PAKs ongeveer 30% is.

De schapewolmonsters kunnen een indruk geven van de lange termijn blootstelling. De resultaten van de analyse van PAK-achtigen suggereren een vijf keer hogere blootstelling aan PAK-achtige stoffen bij schape die bij Schiphol en de naastliggende snelwegen grazen dan bij schape die in de Biesbosch grazen. Uitgaande van een schatting van de inname van PAKs door de schape bij Schiphol vergeleken met de grenswaarden waaronder volgens andere onderzoeken bij muizen nog geen problemen ontstaan, kan worden afgeleid (a)P dat de kans dat schape schadelijke hoeveelheden binnenkrijgen zeer klein is. Bovendien meldden

dierenartsen uit de omgeving desgevraagd dat ze geen verminderde vruchtbaarheid of grotere incidentie van spontane abortussen constateren in dit gebied. Omdat schape vaak niet langer dan 6 maanden op eenzelfde plek grazen is het ook niet te verwachten dat ze last krijgen van luchtwegproblemen die eventueel bij chronische blootstelling zouden kunnen optreden.

Lijst van afkortingen

α -MEM	α -Minimal Essential Medium
2-AA	2-aminoantracene
4-NQO	4-Nitroquinoline-oxide
Ah-receptor	Arylhydrocarbon receptor
B(a)P	Benzo(a)Pyreen
BB	Biesbosch
DNA	Desoxyribo Nucleic Acid
DMSO	Dimethylsulfoxide
DR-CALUX	Dioxin Receptor mediated Chemical Activated LUciferase gene eXpression assay
DRE	dioxin responsive element
EQ	equivalenten
FCS	Foetaal Calf Serum
Gromoz	groot monster zuiger
HBSS	Hank Buffered Salt Solution
LID	Landelijke Inspectiedienst Dierenbescherming
PAK	Polycyclische aromatische koolwaterstof
PBS	Phosphate Buffered Saline
RIVM	Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu
RLU	Relative Light Units
TCDD	2,3,7,8-Tetra Chloor Dibenzo-p-Dioxine

1. Inleiding

1.1 Aanleiding van het onderzoek

De aanleiding voor dit onderzoek is een vraag van de Landelijke Inspectiedienst voor Dieren (LID) aan de wetenschapswinkel. Bij een medewerker van Schiphol bestond zorg omdat in de nabije omgeving van de start- en landingsbanen van de luchthaven Schiphol schapen grazen. Deze medewerker constateerde dat er vooral bij nat weer zichtbare neerslag is van stoffen, afkomstig van de landende en stijgende vliegtuigen. Bij de betreffende medewerker leidt dit regelmatig tot hoofdpijn. Uit bezorgdheid over de schapen, die zich dag en nacht bij de luchthaven bevinden, heeft deze medewerker de LID dit mogelijke risico. De LID heeft opsporingsbevoegdheid voor overtredingen op het gebied van welzijn van dieren. Uit de literatuurstudie die de LID heeft gedaan naar mogelijke effecten van luchtverontreiniging door luchthavens op dieren, bleek dat daar nog niets over bekend was. Om die reden heeft de LID contact opgenomen met Wetenschapswinkel WUR om te kijken of het mogelijk zou zijn om een onderzoek uit te voeren naar de eventuele effecten van luchtverontreiniging door de luchthaven schiphol op dieren die daar grazen. Het onderzoek is aangenomen door de Leerstoelgroep Toxicologie omdat daar in het kader van het promotieonderzoek van Timo Hamers [37] al ervaring was met het bepalen van de toxische potentie van luchtverontreinigingen en de mogelijke effecten daarvan. Het onderzoek is uitgevoerd in de vorm van twee doctoraalonderzoeken, waarvan het eerste deel is uitgevoerd door Laurens Waanders in 2001 [1] en het tweede deel door Tineke SLootweg in 2003 [40].

Op basis van de resultaten van dit onderzoek wil de LID bepalen of aanvullende maatregelen nodig zijn, zoals bijvoorbeeld een nieuw beweidingadvies, waarin staat hoelang schapen waar kunnen staan.

1.2 Mogelijke bronnen van nadelige effecten op gezondheid en welzijn van schapen

1.2.1 Luchtverontreiniging en neerslag van vliegtuigen

Schapen die in de buurt van een vliegveld grazen worden direct blootgesteld aan verontreinigende stoffen in de lucht via inademing. Per minuut ademen schapen gemiddeld 120 ml lucht per kg lichaamsgewicht in [2]. Indirecte blootstelling vindt plaats door het eten van gras waarop vervuilende deeltjes uit de lucht, zoals roet, neerslaan. Schapen eten voornamelijk gras, ze hebben per dag een hoeveelheid van ongeveer 1 kg droog materiaal nodig. Het totale gewicht dat een schaap op een dag eet is dan 5 kg vochtig gras, bij een droge stofgehalte van 20%. Een drachtig of melkgevend schaap eet twee keer zoveel. Op 1 m² gras groeit 1.26 kg gras, wat betekent dat schapen ongeveer 4 m² gras per dag per schaap eten [3]. Fokschapen kunnen stoffen die zijn binnenkrijgen via het voedsel, opslaan in hun vet en in de zoogperiode via de moedermelk overdragen aan de lammeren [4].

Dit onderzoek zal zich vooral richten op de verontreinigingen die aanwezig zijn in aangezogen stofdeeltjes uit de lucht.

1.2.2 Geur- en geluidshinder

Naast luchtverontreiniging zijn andere problemen die in verband staan met de luchthaven geur- en geluidshinder. Het is bekend dat inademen van kerosine of koolmonoxide bij mensen misselijkheid kan veroorzaken [5]. Bij Schiphol is hiervan echter nooit melding gemaakt. Bij schapen is misselijkheid moeilijk vast te stellen. Geuremissies zijn tot maximaal 5 km afstand waarneembaar [6].

Er is een onderzoek gedaan naar effecten van geluidsoverlast van de luchthaven Schiphol bij mensen in nabij gelegen gemeenten. Daaruit blijkt dat kinderen in de buurt van Schiphol niet meer psychische problemen hebben [7].

Dieren kunnen waarschijnlijk makkelijker dan mensen geluiden als vaststaande omgevingsvariabelen accepteren, maar het is moeilijk om bij dieren stress als gevolg van geluidsoverlast te meten [8]. Uit eigen waarneming en op basis van gesprekken met boeren blijkt dat de schape geen enkele reactie tonen bij het geluid van opstijgende vliegtuigen [9]. Op basis van de bovenstaande waarneming wordt vermoed dat de schape geen welzijnsproblemen ondervinden van geur en geluid. Tijdens dit onderzoek wordt daarom verder niet naar de geur- en geluidshinder bij schape gekeken.

1.3 Mogelijke luchtverontreiniging bij Schiphol

1.3.1 Soorten verontreiniging

Een vliegveld kan verschillende soorten vervuiling met zich mee brengen [10, 11]. Die vervuiling ontstaat o.a. doordat de vliegtuigen voortgestuwd worden door turbines die kerosine verbranden. Bij de onvolledige verbranding van koolwaterstoffen kan een heel scala aan stoffen ontstaan, waarvan sommige schadelijk kunnen zijn voor organismen. Bij onvolledige verbranding van koolwaterstoffen worden naast H₂O en CO₂ ook koolmonoxide (CO), koolwaterstoffen met 2 tot 12 C-atomen en complexere koolwaterstoffen, zoals polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAKs) en dioxines gevormd. Aan het kerosinemengsel zelf wordt een aantal additieven toegevoegd o.a. stoffen om ijsvorming in het kerosinemengsel te voorkomen. De zogeheten anti-icers kunnen tijdens verbranding omgezet worden in andere verbindingen [12].

Bij het productieproces van kerosine is het niet mogelijk om uitsluitend pure stof te extraheren, vandaar dat er naast kerosine ook nog stoffen zoals nafta en benzeen bij kerosine zitten die vaak zelf in tegenstelling tot kerosine erg toxisch zijn.

De belangrijkste momenten van emissie voor het luchtverkeer zijn starten, stijgen, landen en taxiën [10]. Vooral bij starten verbruiken de straalmotoren veel brandstof omdat ze dan op vol vermogen moeten draaien. Dicht bij het vliegveld zal de concentratie aan toxische stoffen daarom het hoogst zijn, ook omdat daar de vliegtuigen nog laag zijn en omdat daar per vierkante meter meer vliegtuigen overkomen. Het vliegtuig is al vrij snel op een flinke hoogte waardoor de uitgestoten stoffen over een groot gebied neer zullen komen. In de praktijk blijkt dat de kans op gezondheidseffecten door blootstelling aan de anti-icers nauwelijks aanwezig is [13].

Lekkende ondergrondse opslagtanks en pijpleidingen en morsen van brandstof of lekkage tijdens het bijtanken van vliegtuigen zijn voorbeelden van bronnen van water- en bodemverontreiniging. Wanneer preventieve maatregelen zijn genomen om lekkage tegen te gaan, zijn de gevolgen voor de gezondheid gering [13].

1.3.2 Chemische analyses

Het meeste onderzoek naar luchtverontreiniging rond Schiphol is gedaan naar chemische gehalten van stoffen zoals benzeen, benzo(a)Pyreen (B(a)P) en CO [11]. Uit onderzoek van TNO bleek de uitstoot van een startend belast vliegtuig 5,1 ng/m³ benzo[a]pyreen te zijn. Ter vergelijking: de norm voor B[a]p voor de algemene Nederlandse luchtkwaliteit is 1 ng/m³ is. B(a)P is een vertegenwoordiger van de polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAKs) [14].

De niveaus van vluchtige koolwaterstoffen in het gebied rond Schiphol worden voor circa 65% bepaald door grootschalig transport uit verder gelegen brongebieden. Uit gemeten bronprofielen blijkt dat 74% van de bijdrage boven de achtergrond verklaard kan worden door de bijdrage van het intensieve wegverkeer in de omgeving van Schiphol. De bijdrage van verbrandingsemissies van vliegverkeer en op- en overslag van kerosine bedraagt bij Badhoevedorp ongeveer 17%. De andere 9% kan afkomstig zijn van bronnen als industriële en huishoudelijke emissies [6].

Voor CO en fijn stof is er op de meetpunten van de gemeente Noord Holland geen duidelijk herkenbare invloed van emissies op Schiphol. De bijdrage van CO en fijn stof wordt op de meetpunten geschat op maximaal enkele procenten [6].

Deze resultaten wijzen erop dat vooral PAKs de meest relevante verontreinigingen zijn in de stofdeeltjes in de lucht. Naar de concentratie van CO wordt geen onderzoek gedaan, omdat verwacht wordt dat de concentratie van deze stof te laag is om effecten te kunnen hebben op schape die op 2 kilometer van de landingsbaan grazen.

1.3.3 Epidemiologisch onderzoek

Bij schape zijn nog nooit onderzoeken gedaan naar effecten die optreden bij blootstelling aan luchtverontreiniging via de longen. Bij mensen kunnen gevolgen van langdurige blootstelling aan luchtverontreiniging onder meer bestaan uit luchtwegklachten, luchtwegaandoeningen, verminderde vruchtbaarheid en het ontstaan van tumoren. Aan de hand van epidemiologisch onderzoek dat gedaan is bij mensen, wordt geschat dat er in Nederland enige honderdduizenden mensen schade ondervinden van luchtverontreiniging, met effecten variërend van eendaagse vermindering van de longfunctie tot kanker [15]. Bij de huidige blootstellingsniveaus is het jaarlijkse aantal gevallen van longkanker in Nederland in 1995 als gevolg van stedelijke buitenluchtverontreiniging, waaronder PAKs en van verontreiniging door het binnenmilieu geschat op 100 [16].

De omwonenden van Schiphol maakten zich zorgen dat hun kinderen meer luchtwegaandoeningen zouden hebben dan kinderen in andere gebieden.

In 1999 is toen door het Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) een onderzoek uitgevoerd naar de incidentie van luchtwegaandoeningen bij kinderen die wonen in de buurt van de luchthaven Schiphol [14]. Daaruit bleken de kinderen niet aantoonbaar meer luchtwegaandoeningen te hebben dan andere kinderen in een stedelijk referentiegebied [13]. De kans dat een kind een luchtwegaandoening krijgt in een stedelijk gebied is iets groter dan in een wat landelijker gebied [17]. Ander onderzoek liet geen verschil zien tussen het optreden van kanker rond Schiphol en in bepaalde wijken van Amsterdam [18].

Uit epidemiologisch onderzoek blijkt dat bij Schiphol de kans op schadelijke effecten, ontstaan door blootstelling aan luchtverontreiniging niet groter is dan in stedelijke gebieden.

1.4 Polycyclische aromatische koolwaterstoffen

De belangrijkste en meest toxische luchtverontreinigende stoffen die door vliegtuigen worden uitgestoten zijn Polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAKs) en eventueel dioxines. Uit het onderzoek van Waanders blijken de achtergrondconcentraties van dioxines bij Schiphol zeer laag te zijn, even laag als in de rest van Nederland, dus daar is in dit vervolgonderzoek geen aandacht meer aan besteed [1].

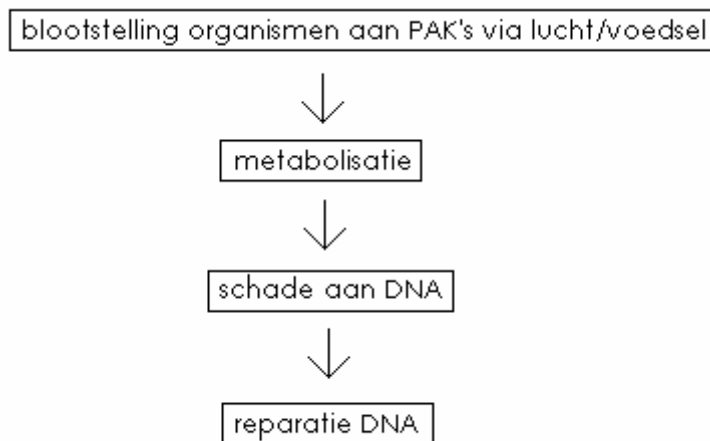
PAKs zijn organische stoffen die zijn opgebouwd uit twee of meer aromatische ringen [19]. Ze komen voor in diffuus verontreinigde lucht [19]. PAKs worden gevormd als gevolg van onvolledige verbranding van organisch materiaal en worden onder meer aangetroffen in

verkeeremissies. In Nederland zijn verkeer (246 ton/jaar), industrie (86 ton/jaar), houtverduurzaming (629 ton/jaar) en verbranding en verwarming (135 ton/jaar) belangrijke bronnen voor uitstoot naar de lucht [19].

In de lucht zijn PAKs voornamelijk gebonden aan deeltjes aanwezig, waardoor ze vrij stabiel zijn en over grote afstanden getransporteerd kunnen worden [20].

PAKs kunnen via neerslag vanuit de lucht en/of door opname vanuit de bodem in planten terechtkomen en hiermee beschikbaar komen voor de terrestrische voedselketen. Ook kunnen PAKs via de lucht worden ingeademd.

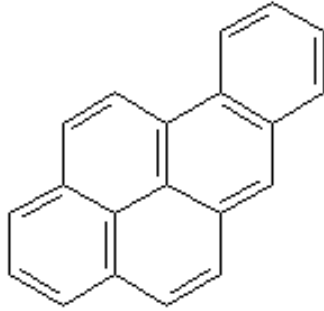
Metingen van PAKs in biota zijn schaars. De meeste hogere dieren lijken PAKs op een efficiënte wijze te kunnen omzetten in andere stoffen, waardoor accumulatie van de PAKs niet of in zeer geringe mate optreedt. Eerder onderzoek naar PAKs in de bosspitsmuis, heeft dan ook aangetoond dat PAKs niet aantoonbaar zijn in weefsels omdat ze relatief snel afgebroken worden. [19]. Ook planten zijn in staat PAKs te metaboliseren [21].



Figuur 1.1. Opeenvolging van processen in het lichaam na blootstelling van organismen aan PAKs.

PAKs kunnen als ze een cel binnenkomen, binden aan een eiwit, de arylhydrocarbon-receptor (Ah-receptor). Deze receptor transformeert dan en migreert naar de celkern. In de celkern bindt de Ah-receptor aan specifieke stukjes DNA, de DREs (Dioxin Responsive Elements), met als gevolg dat bepaalde genen die onder controle staan van de DREs worden 'afgeschreven' of geblokkeerd en er extra of juist minder eiwitten worden gevormd. Hierop ontstaat verhoogde expressie van bepaalde genen coderend voor transformatie-enzymen (zoals P450) en factoren die de celdifferentiatie en celproliferatie beheersen. Dit kan resulteren in de verstoring van de normale fysiologie en in toxische effecten [22].

Verschillende studies hebben de mutagene potentie van een aantal PAKs bij proefdieren aangetoond na blootstelling via de ademhaling [23-25]. Uit die studies blijkt dat afbraakproducten van PAKs, die tijdens de metabolisatie kunnen worden gevormd, in staat zijn om een binding aan te gaan met groepen in het DNA (adduct-vorming). Deze adducten zijn een vorm van DNA-schade en kunnen tijdens de replicatie van DNA leiden tot mutaties. Metabolieten van PAKs kunnen ook mutaties in het DNA veroorzaken, door breuken te laten ontstaan in het DNA [26]. Mutaties in het DNA kunnen uiteindelijk leiden tot de vorming van tumoren. Vaak treedt er echter ook reparatie van het DNA op (zie figuur 1.1). Bij blootstelling aan PAKs zullen de tumoren vooral ontstaan in de ademhalingswegen en het maagdarmkanaal [27]. De bekendste mutagene PAK is Benzo(a)Pyreen (BaP) (zie figuur 1.2).



Figuur 1.2. Molecuulstructuur Benzo(a)Pyreen.

Over de inname van PAKs door schapen via de lucht of voedsel is niets bekend. De gemiddelde totale dagelijkse inname van PAKs door mensen is geschat op 0.16–1.6 µg PAKs per persoon vanuit voedsel en 0.2 µg PAKs per persoon vanuit de lucht [28]. Voor PAKs in voeding zijn geen wettelijke normen vastgesteld omdat deze hoeveelheden zo laag zijn dat ze geen schade veroorzaken [29]. De meeste risico's worden gevormd door PAKs die mensen zelf creëren in hun voedsel door dit b.v. te barbecuen. Van muizen is bekend dat bij de toediening van 120 mg/kg lichaamsgewicht (lg) BaP in het dieet voor een tijdsduur van 180 dagen geen schadelijke effecten optreden. Bij doses van 10 mg BaP/kg lg in het dieet tijdens de zwangerschap veroorzaakt verminderde vruchtbaarheid en bij een doses van 120 mg BaP/kg lg/dag treden misvormingen en miskramen op [30].

Voor de concentratie PAKs in de buitenlucht zijn wel wettelijke normen gesteld. Voor de concentratie B(a)P als indicator voor PAKs in de lucht geldt een grenswaarde van 1 ng/m³. Daarbij wordt uitgegaan van een bijdrage van B(a)P aan de carcinogene potentie van tenminste 20% [31]. B(a)P maakt deel uit van minder dan 5% van de totale hoeveelheid PAKs die aanwezig zijn in de atmosfeer. De richtwaarde is gehandhaafd op 0.5 ng/m³. De jaargemiddelde concentratie van B(a)P ligt in Nederland gemiddeld ook rond de 0.5 ng/m³. De richtwaarde wordt in het zuiden van het land wel overschreden en in het noorden niet. Studies tonen aan dat de gemiddelde waarde van B(a)P concentraties in de wintermaanden 2-17 keer hoger ligt dan het jaarlijkse gemiddelde [32]. Uit onderzoek van TNO blijkt de uitstoot van een startend belast vliegtuig 5.1 ng/m³ B(a)P te zijn [14]. Er zijn geen gegevens bekend over de blootstelling van dieren of planten aan PAKs via de lucht.

1.5 Aanpak

De vraag van de LID was of luchtverontreiniging bij Schiphol een effect heeft op het welzijn van de schapen die grazen in de omgeving van de luchthaven. Daar valt dus het welzijnseffect van mogelijke geur- en geluidshinder buiten. Dit zou overigens ook moeilijk vast te stellen zijn geweest. Overigens verwachten deskundigen niet zo veel problemen op dit gebied omdat aangenomen wordt dat schapen, anders dan mensen, geen bewuste negatieve associaties hebben met het ruiken van een zeer lichte geur of het horen van enig geluid. Overigens is de verwachting dat echte stank of herrie bij schapen net zo goed een negatief effect op het welzijn zouden hebben.

Bij eerdere onderzoeken naar de luchtkwaliteit rond Schiphol is gebruik gemaakt van chemische analyses, waarbij de concentraties van individuele stoffen in de lucht worden gemeten. Om de toxische potentie van de lucht te bepalen zijn deze klassieke methoden niet geschikt, omdat lucht een mengsel is van zeer veel en vaak onbekende stoffen, waarvan zelfs het bekende deel een onbekende toxiciteit heeft. Voor een goede risicoschatting is het daarom beter om de geïntegreerde maat voor de toxiciteit van het luchtmengsel te bepalen door biomarkers te meten die specifiek reageren op belangrijke categorieën van stoffen in de lucht.

Biomarkers zijn geïnduceerde veranderingen in cellulaire of biochemische componenten of processen, structuren, functies of gedrag die meetbaar zijn in een biologisch systeem of monster. Deze veranderingen worden beschouwd als een vroeg waarschuwingssignaal voor negatieve effecten op hogere blootstellingsniveaus. Biomarkers kunnen *in vivo* gemeten worden in organismen die in vervuilde gebieden leven om de interne blootstelling van vervuilende stoffen te bepalen en om de grootte van de respons van het organisme te indiceren. Sommige van deze geïnduceerde veranderingen kunnen echter ook in *in vitro* bio-assays gemeten worden, waarbij gekweekte bacteriën of cellen blootgesteld worden aan omgevingsmonsters [22]. Een groot voordeel hiervan is dat je geen proefdieren hoeft te gebruiken.

Omdat PAKs waarschijnlijk de belangrijkste luchtverontreinigende stoffen zijn, wordt gekeken naar bio-assays die reageren op PAKs. In de DR-CALUX (Dioxin Receptor-mediated Chemical Activated Luciferase gene eXpression), een reporter-gen assay, wordt de mate van inductie van de Arylhydrocarbon (Ah)-receptor door een luchtmonster bepaald. Deze test is vooral gericht op het meten van de dioxine-achtige toxiciteit van stoffen en milieu-extracten. Wanneer deze test niet wordt uitgevoerd onder standaardomstandigheden (blootstelling gedurende 24 uur of langer) maar met aangepast groeimedium en gedurende slechts 6 uur, kan met deze test ook de aanwezigheid van bepaalde PAKs worden vastgesteld. Omdat PAKs een heel andere soort toxiciteit hebben dan dioxines wordt als standaard stof B(a)P gebruikt. Het resultaat wordt daarom uitgedrukt in B(a)P-equivalenten.

Met de UMU-assay is het mogelijk om de mutagene potentie van een luchtmonster te meten. De UMU-assay is ook een reporter-gen assay, maar dan in bacteriën. De test is gebaseerd op de detectie van een SOS-respons, een signaal dat geïnduceerd wordt door het ontstaan van DNA schade [33]. Beide assays zijn al eerder met succes toegepast op luchtmonsters [22]. Verdere uitleg over de uitvoering van de testen volgt in hoofdstuk 2.

Alle luchtmonsters worden verzameld met een Groot monster zuiger (Gromoz), die lucht over een filter zuigt waar deeltjes met daaraan schadelijke stoffen op blijven zitten. Ook wordt schapenwol verzameld. Uit het pilot-onderzoek van Waanders [1] blijkt dat schapenwolmonsters een goede en eenvoudige indruk kunnen geven van de lange termijn belasting van schapen aan PAK-achtige verbindingen.

De monsters worden opgewerkt en geanalyseerd in de twee bio-assays.

Zowel bij Hoofddorp (meetlocatie 'Schiphol' als ook in de Biesbosch zijn luchtmonsters en wolmonsters verzameld. In Tilburg is alleen wol verzameld. De twee andere locaties dienen om een vergelijking te maken met Schiphol.

1.6 Onderzoeksvragen

De vragen die gesteld zijn bij dit onderzoek zijn:

Hoofdvraagstelling

Is het waarschijnlijk dat schapen die in de buurt van de luchthaven Schiphol grazen, meetbare negatieve effecten ondervinden als gevolg van de luchtverontreiniging door Schiphol?

Subvraagstellingen

- Worden de schapen die grazen in de buurt van de luchthaven Schiphol via de lucht aan hogere concentraties mutagene stoffen in het algemeen en PAKs in het bijzonder blootgesteld dan schapen op andere plaatsen.
- Voegt Schiphol meetbare hoeveelheden luchtverontreiniging toe aan de achtergrondverontreiniging ter plaatse.
- Wordt de huidige norm van PAKs in de lucht overschreden bij Schiphol?

2. Materiaal en Methoden

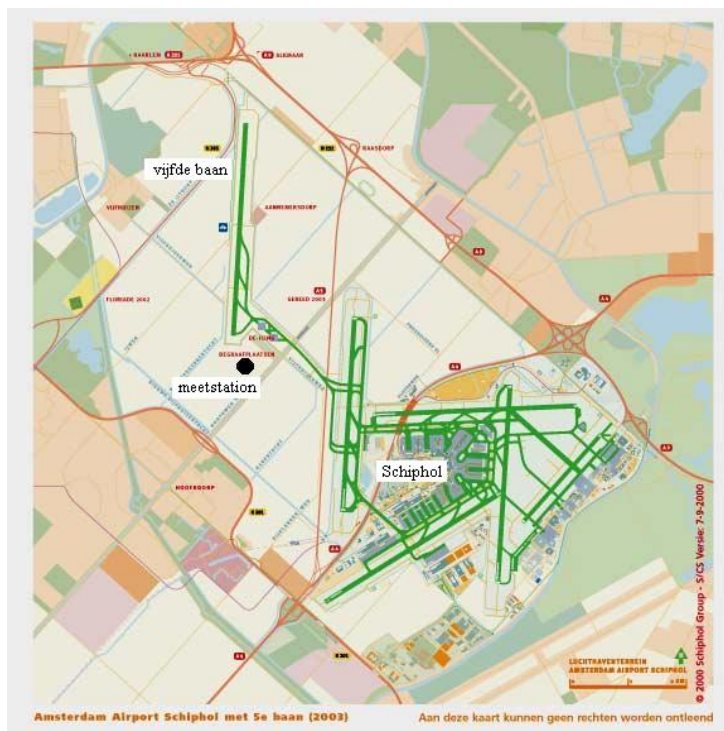
2.1 Inleiding

Het doel van de testen die zijn uitgevoerd met luchtfiltermonsters en schapenwolmonsters is het verkrijgen van inzicht in de toxische potentie van deze monsters, en dan specifiek in de potentie van de monsters om de Ah-receptor op een PAK-achtige manier te induceren en in de mutagene potentie van de monsters. De mutagene potentie wordt onderverdeeld in de directe mutageniteit (dus zonder bioactivatie door omzetting) en de indirecte mutageniteit (dus met omzetting door P450-enzymen).

De bemonsteringslocaties staan beschreven in paragraaf 2.2. De wijze waarop de filter- en de schapenwolmonsters zijn verzameld en opgewerkt staat beschreven in paragraaf 2.3 en 2.4. In paragraaf 2.5 wordt het principe van de DR-CALUX-6hr uitgelegd en in paragraaf 2.6 het principe van de UMU-assay. Tot slot worden in paragraaf 2.7 de toegepaste statistische methoden behandeld.

2.2 Bemonsteringslocaties

Filtermonsters zijn genomen op een plek dichtbij Schiphol, bij een meetstation voor luchtkwaliteit van de provincie Noord-Holland. De provincie meet vanuit dit station constant de luchtkwaliteit rond Schiphol. Het meetstation ligt aan de Vijfhuizerweg die vanaf Hoofddorp naar Schiphol loopt en het ligt ten oosten van de luchthaven Schiphol en de snelwegen die daar in de buurt lopen en ten zuiden van de vijfde baan (zie figuur 2.1). Deze baan is in februari 2003, dus na het 1^e deelonderzoek, in gebruik genomen en kan sindsdien ook een bijdrage kan leveren aan de verontreiniging die in de filters gemeten wordt. Verwacht wordt dat bij overwegend oostelijke windrichtingen de verontreiniging van Schiphol en omliggende snelwegen, plus verder weg de industriegebieden van Duitsland en voormalig Oost-Europa, afkomstig is en daardoor extra verontreinigd, terwijl westelijke windrichtingen, die vanaf de Noordzee komt relatief schoon zal zijn.



Figuur 2.1. Detailkaart van de omgeving van de bemonsteringslocatie bij Schiphol.

Om de verontreiniging in de omgeving van Schiphol ergens aan te kunnen relateren zijn ook monsters genomen in de Biesbosch. Hier was reeds een groot monster zuiger (gromoz) geplaatst in verband met het onderzoek van Timo Hamers. De Biesbosch is een natuurgebied in het zuiden van Nederland. De filtermonsters zijn genomen op het terrein van het waterwinbedrijf 'de Brabantse Biesbosch' in Werkendam.

In de Biesbosch, hemelsbreed op een afstand van ongeveer 7 km ten zuidoosten van de plek waar de luchtmonsters genomen worden, is de Amercentrale gelegen, een op kolengestookte elektriciteitscentrale die ongeveer 4500 ton kolen per dag verbruikt. Het waterwinbedrijf ligt noordoostelijk van het industriegebied van Moerdijk, waar een afvalverbrandingsbedrijf en veel petrochemische bedrijven gestationeerd zijn, onder andere van Shell-Pernis (zie figuur 2.2). In het noordwesten ligt de haven van Rotterdam, waar ook een groot deel van de chemische industrie van Nederland gevestigd is. Verder in het zuiden liggen de industrieterreinen van Antwerpen. De verwachting is daarom dat bij meer zuidelijke wind de lucht relatief vervuild zal zijn.

In de omgeving van Schiphol en in de Biesbosch zijn ook diverse wolmonsters van schape genomen. Tevens zijn wolmonsters genomen van schape die noordoostelijk van Tilburg grazen (zie figuur 2.3). In Tilburg heb je vooral textielindustrie, die niet in grote mate bijdraagt aan de luchtvervuiling. Verwacht wordt dan ook dat de lucht in dit gebied relatief schoon is.



Figuur 2.2. Detailkaart bemonsteringslocatie in de Biesbosch. Moerdijk en de Amercentrale staan ook aangegeven.



Figuur 2.3. Detailkaart bemonsteringslocatie bij Tilburg.

2.3 Monstername luchtfilters

Filterbemonstering wordt uitgevoerd gedurende 24 uur, zoals wordt beschreven in het artikel van Hamers (2000) met behulp van een gromoz-sampler (figuur 2.4). Tijdens de monstername zit in de kop van de gromoz een voorgespoeld kwartsfilter dat deeltjes uit de lucht filtert. Deze kop staat 1.60 meter boven de grond en er wordt per etmaal ongeveer 1500 m³ lucht door een filter met een diameter van 150 mm te gezogen. De motor van de gromoz loopt op stroom, omdat een verbrandingsmotor zelf ook aan de aangezogen verontreiniging zou bijdragen. De gromoz in de Biesbosch zuigt per uur minder lucht aan (ongeveer 1400 m³) omdat anders bij het opstarten van de zuiger scheuren ontstonden in het filter. Hiervoor is in de berekeningen gecorrigeerd. Voor en na de monstername worden de datum, tijd, windrichting, weersgesteldheid, tellerstand van de gasmeter, en eventuele bijzonderheden genoteerd. In de Biesbosch zijn de filters steeds voornamelijk gewisseld door Frank Jonker en bij Schiphol door Reinier Groenveld.



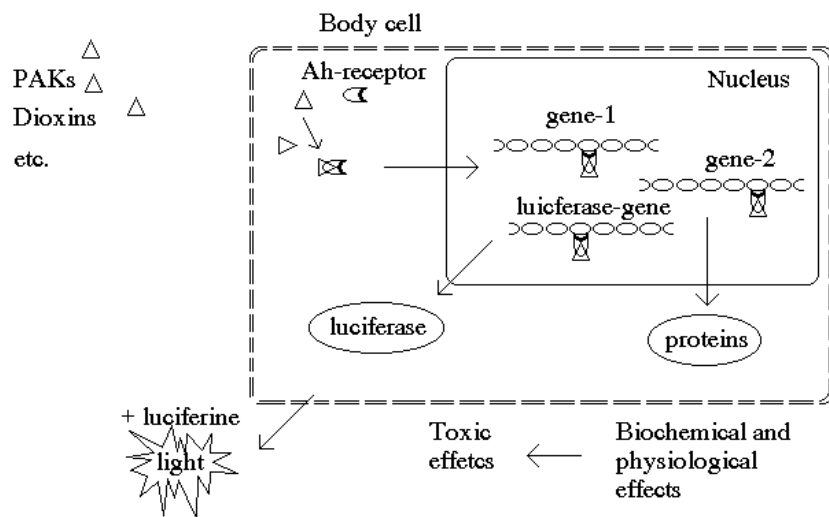
Figuur 2.4. Gromoz sampler zoals gebruikt voor het nemen van de luchtmonsters. In de kast zit de aanzuigpomp. De stang naar boven is het aanzuigstuk en aan het begin daarvan zit het kwartsfilter.

2.4 Monstername en opwerking schapenwol

In de Biesbosch en bij Schiphol is schapenwol van hekken verzameld. In Tilburg zijn de wolmonsters met een schaar van het schaap geknipt. De wolmonsters zijn verpakt in aluminiumfolie en bewaard bij -20°C tot extractie plaatsvond. Voor de extractie zijn de wolmonsters in stukken van ongeveer 250 mg geknipt en in een reageerbuis gebracht. Aan de wolmonsters is drie keer één ml hexaan: diethylether (97: 3 v/v) (respectievelijk Rathburn en Merck p.a.) toegevoegd. De reageerbuis werd gedurende één minuut gevortext. De extracten zijn over een Na₂SO₄-filter geleid om de grotere deeltjes uit het extract te filteren en opvangen in een schone, voorgewogen reageerbuis. De extractiebuis is nog 2x nagespoeld en het extract over het filter geleid. Het extract is droog gedampt onder een lichte stikstofstroom en teruggewogen zodat de hoeveelheid vet per monster bekend was. Daarna is het extract opnieuw opgelost in hexaan: diethylether en overgebracht in een puntvial. Aan het vet extract is 15 µl DMSO toegevoegd.

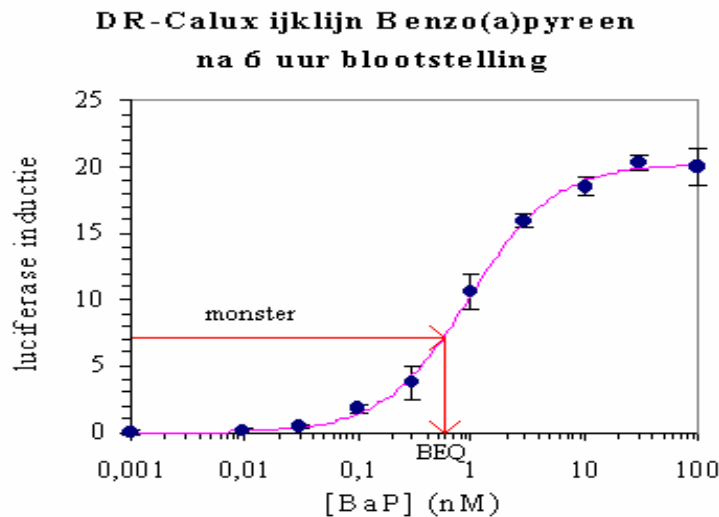
2.5 DR-CALUX6hr

De luchtfiltermonsters en wolmonsters zijn geanalyseerd op de hoeveelheid B(a)P-equivalenten (BEQ) in de DR-CALUX6hr. De DR-CALUX is een reporter-gen assay die oorspronkelijk is gemaakt om dioxine-achtige stoffen te kunnen bepalen. De test kan onder gewijzigde omstandigheden ook worden gebruikt om de aanwezigheid van PAKs die de Ah-receptor kunnen binden aan te tonen [22]. Voor de DR-CALUX wordt gebruik gemaakt van een rattenlever-cel lijn (H4IIE pGudLuc 1.1), die stabiel is voorzien van het luciferase gen afkomstig van het vuurvliegie (*Photinus pyralis*). Dit gen staat onder controle van de DREs (dioxin-responsive elements) en wordt geactiveerd na binding van een stof aan de Ah-receptor vervolgens naar de celkern gaat en daar bindt aan de DRE. Na dergelijke antipathie door stoffen van het luciferase gen wordt het enzym luciferase gevormd. De totale hoeveelheid luciferase wordt gemeten door de lichtproductie te meten in aanwezigheid van het substraat luciferine (zie figuur 2.5). De lichtproductie is een directe maat voor de mate van blootstelling van cellen aan Ah-receptor agonisten.



Figuur 2.5. Principe DR-Calux.

Voor de zeer stabiele dioxine-achtige verbindingen wordt 24 uur of langer geïncubeerd. De snel afbreekbare stoffen zoals PAKs worden na 6 uur blootstelling gedetecteerd. Als referentie wordt een ijkreeks van B(a)P gebruikt met concentraties van 0.01 tot 100 nM. De respons van de verschillende monsters wordt uitgedrukt als B(a)P-equivalenten (BEQ). Met de BEQ wordt de toxische potentie van een monster vergeleken met de potentie van B(a)P in de DR-CALUX6hr. Bij de berekeningen wordt de lichtproductie uitgedrukt als inductiefactoren, te weten de lichtproductie van het monster gedeeld door de lichtproductie van de achtergrond (blanco). De inductiefactoren van de milieuextracten worden geïnterpoleerd worden in de BaP ijklijn (zie figuur 2.6).

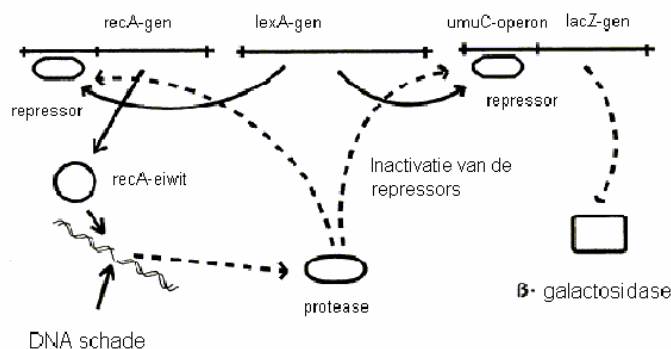


Figuur 2.6. Ijklijn Benzo(a)Pyreen in de DR-CALUX6hr.

2.6 UMU-assay

De mutagene potentie van de verschillende monsters wordt getest in de UMU-assay. De UMU-assay is ook een reporter-gen assay, maar dan in bacteriën. Het signaal is gebaseerd op de detectie van een SOS-respons, een noodsignaal dat geïnduceerd wordt door DNA schade en dat normaal moet leiden tot reparatie van de schade [33]. Meer specifiek: DNA schade leidt tot specifieke protease activiteit van het *recA* eiwit. De gen modulators *lexA* en *recA* reguleren de SOS-respons genen [33]. In cellen zonder DNA-schade worden de SOS genen onderdrukt door het *lexA* repressor eiwit. Het geactiveerde *recA* eiwit splitst het *lexA* repressor eiwit. Wanneer de hoeveelheid *lexA* kleiner wordt, kunnen verschillende SOS-genen, waaronder het *recA* gen op grotere schaal tot expressie komen. [34].

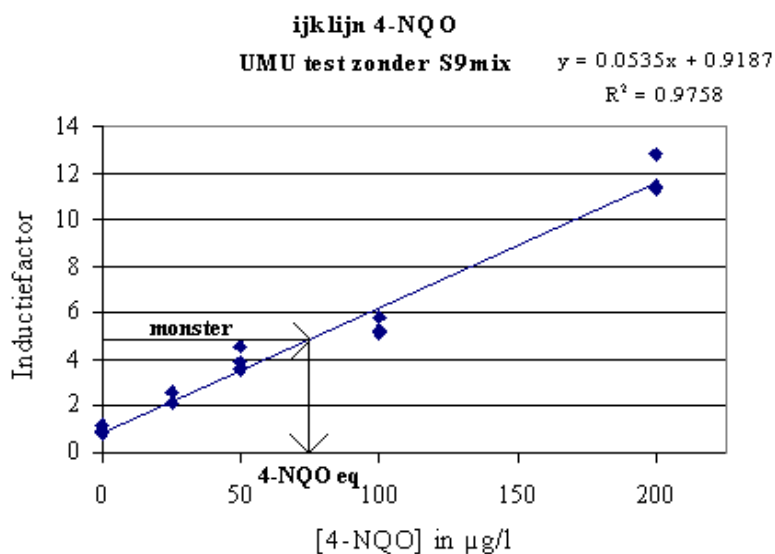
Voor de UMU-assay is gebruik gemaakt van de genetisch gemodificeerde bacteriën *Salmonella typhimurium* TA 1535 pSK1002 (gram negatieve, facultatief anaëroobe enterobacteriaceae). In de bacteriën is een DNA plasmide geïntroduceerd, dat bestaat uit het *umuC*-operon (een stukje DNA dat deel uitmaakt van het SOS operon), en uit een *lacZ* gen. Het *lacZ* reporter gen codeert voor eiwitten met β -galactosidase activiteit die het kleurloze (ONPG) (Sigma) kunnen metaboliseren in een geel gekleurd product (o-nitrophenol). Het *umuC*-gen codeert voor een DNA polymerase, die betrokken is in DNA reparatie processen. Het genconstruct *umuC'-lacZ'* is gekozen omdat *umuC* waarschijnlijk meer direct betrokken is in de mutagenese dan andere bekende SOS genen [35]. Wanneer de SOS/*umu* respons geïnduceerd wordt, zal het zal dit resulteren in een hogere β -galactosidase activiteit (zie figuur 2.7) [36]. Deze test is ook succesvol toegepast op luchtmonsters in het onderzoek van Hamers et. al. [22].



Figuur 2.7. Principe van de UMU-assay op moleculair niveau.

Sommige stoffen, waaronder veel PAKs zijn niet direct mutageen, maar pas na omzetting in een metaboliet. Hier wordt rekening mee gehouden door toevoeging van een mengsel van metabolisch belangrijke enzymen. Deze zogenaamde S9-mix bestaat voornamelijk uit P450 enzymen die stoffen tijdens de test eventueel kunnen omzetten in hun DNA beschadigende metabolieten. Responsen van de UMU-assay op directe en indirecte mutagene stoffen in monsters kunnen uitgedrukt worden in equivalent concentraties van respectievelijk de modelstoffen 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO) en 2-aminoanthraceen (2-AA) [22].

Er zijn ook stoffen die niet alleen mutageen zijn, maar ook cytotoxisch, waardoor de mutagene potentie onderschat zal worden, omdat β -galactosidase alleen geproduceerd wordt door levende bacteriën. Het is belangrijk om te weten wat de β -galactosidase activiteit is, gerelateerd aan het aantal bacteriën dat aanwezig is in het testmedium. Als controle voor cytotoxiciteit zal daarom ook de bacteriële groei worden bepaald. Uiteindelijk zal een inductie factor (IF) worden berekend, die de potentie om DNA schade te veroorzaken van een zekere stof indiceert ten opzichte van de controle, gecorrigeerd voor de bacteriedichtheid.



Figuur 2.8. Ijkljn 4-NQO in de UMU-assay.

2.7 Statistiek

De standaard ijkkreeksen van BaP in de DR-CALUX6hr zijn geplot met het programma LSW Data Analysis. De curve is gefit volgens het model General sigmoidal curve. De formule die bij deze fit hoort is $y = (a-d)/(1+(x/c)^b) + d$. In deze formule is 'c' de EC_{50} -waarde.

Voor de ijkkreeksen van de UMU-assay wordt het XY-scatter plot gebruikt. De reeksen zijn lineair gefit en de correlatiecoëfficiënt is met het programma Excel berekend. De waarden van de monsters zijn alleen geïnterpoleerd indien zij tussen de EC_{10} en de EC_{90} lagen.

De resultaten van de verschillende assays worden getest in SPSS 10.1. Voor de resultaten wordt eerst getest of de waarden normaal verdeeld zijn met behulp van de Kolmogorov-Smirnov test. Wanneer de waarden normaal verdeeld zijn, wordt een ANOVA uitgevoerd om te testen of de toxische potenties van de monsters van verschillende plaatsen significant van elkaar verschillen. Als significantie niveau wordt <0.05 aangehouden.

Bij de effecten van plaats op de schapenwol wordt gebruik gemaakt van post hoc testen, die een opdeling maakt tussen de bemonsteringslocaties die wel en niet significant van elkaar verschillen. Bij de normaal verdeelde monsters wordt gekeken of ze homogeen verdeeld zijn met Levene's test. Bij homogeen verdeelde waarden wordt de Tukey post hoc test gebruikt en bij niet homogene waarden Dunnett's test.

3. Resultaten

3.1 Inleiding

Voor het pilot-onderzoek zijn van juni tot en met augustus 2001 5 luchtfilter monsters genomen in de Biesbosch en 9 bij Schiphol. In de periode van februari tot en met april 2003 zijn 6 luchtfilter monsters genomen in de Biesbosch en 7 bij Schiphol voor het vervolgonderzoek. De exacte data waarop de luchtmonsters zijn genomen, de windrichting op die dag, de temperatuur, de hoeveelheid aangezogen lucht en het verschil in filtergewicht staan aangegeven in bijlage VI.

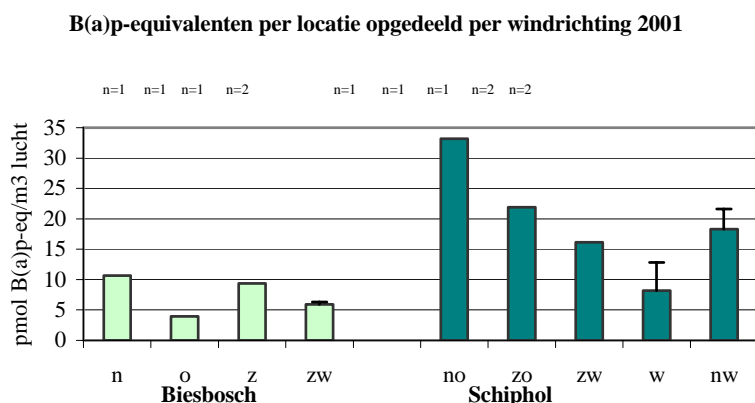
In 2001 is zowel in de Biesbosch als in Schiphol één wolmonster genomen. In 2003 zijn vier wolmonsters per locatie verzameld. In paragraaf 3.2.1 worden de resultaten weergegeven van de meting van de potentie van de extracten van de luchtfilters om de Ah-receptor te induceren in de DR-CALUX6hr. De mutagene potentie van de extracten van de luchtfilters, die gemeten wordt in de UMU-assay, wordt weergegeven in paragraaf 3.2.2. In de UMU-assay zijn alleen de vier eerste filtermonsters uit 2003 getest wegens tijdgebrek. In paragraaf 3.3 wordt de potentie van de extracten van de wolmonsters om de Ah-receptor te induceren in de DR-CALUX6hr weergegeven.

3.2 Resultaten luchtfiltermonsters

3.2.1 DR-CALUX6hr

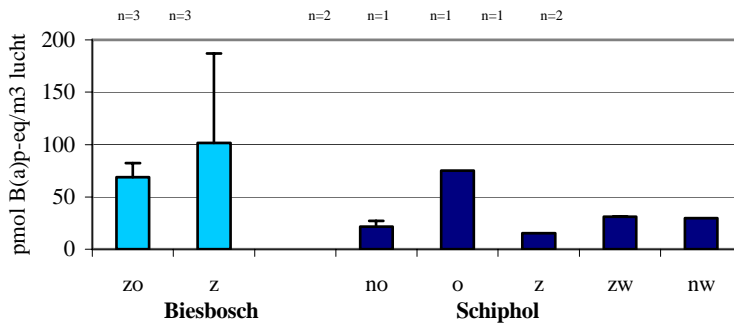
In figuur 3.1 staan het aantal B(a)P-equivalenten (BEQ) in de luchtmonsters uit 2001 weergegeven per windrichting voor de Biesbosch en Schiphol. Uit de grafiek blijkt dat het aantal BEQ per m³ lucht in de Biesbosch lager liggen dan bij Schiphol. Bij de Biesbosch liggen de BEQ gemiddeld rond de 7.47 pmol BEQ per m³ lucht en bij Schiphol liggen de BEQ rond de 19.54 BEQ per m³ lucht. Het verschil tussen de gemiddelden aantal BEQ per m³ lucht van de twee locaties is echter niet significant.

In de Biesbosch worden bij oostenwind het minste aantal BEQ per m³ lucht gemeten. Bij Schiphol is het aantal BEQ per m³ lucht het laagst bij westenwind, het aantal BEQ is dan 8.10 pmol BEQ per m³ lucht, wat ongeveer overeenkomt met het gemiddeld aantal BEQ in de Biesbosch. Bij noordoostenwind is het aantal BEQ bij Schiphol het hoogst met 33.22 pmol BEQ per m³ lucht.



Figuur 3.1. Per windrichting is het aantal B(a)P-equivalenten, bepaald met de DR-CALUX6hr, van de luchtmonsters die verzameld zijn in juni tot augustus 2001 weergegeven. Bij Schiphol wordt verontreiniging verwacht bij oostenwind, wanneer de lucht over de luchthaven komt. In de Biesbosch verwacht je de verontreiniging van industriegebieden bij zuidoosten tot westenwind.

B(a)p-equivalenten per locatie opgedeeld per windrichting 2003



Figuur 3.2. Per windrichting is het aantal B(a)P-equivalenten, bepaald met de DR-CALUX6hr, van de luchtmonsters die verzameld zijn in februari tot april 2003 weergegeven. Bij Schiphol wordt verontreiniging verwacht bij noord- tot oostenwind, wanneer de lucht over de luchthaven komt. In de Biesbosch verwacht je de verontreiniging van industriegebieden bij zuidoosten tot westenwind.

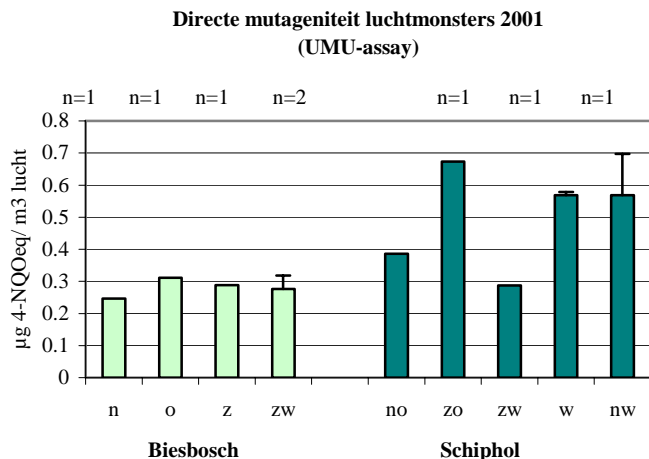
In de luchtmonsters genomen tussen februari en april 2003 is de potentie van de luchtfilter extracten om de Ah-receptor te induceren na een blootstelling van 6 uur gelijk aan 15 tot 100 pmol BEQ per m³ lucht. Het aantal BEQ in het luchtmonster van Schiphol dat genomen is tijdens oostenwind is ongeveer gelijk aan het aantal equivalenten in de monsters uit de Biesbosch die genomen zijn tijdens zuid/zuidoosten wind. De waarden liggen 2 tot 3 keer boven het aantal BEQ die gevonden worden in filterextracten van de luchtmonsters uit de Biesbosch en Schiphol die bij een zuidwestelijke tot noordwestelijke windrichting zijn genomen. Het verschil tussen de gemiddelden aantal BEQ per m³ lucht is niet significant.

3.2.2 UMU-assay

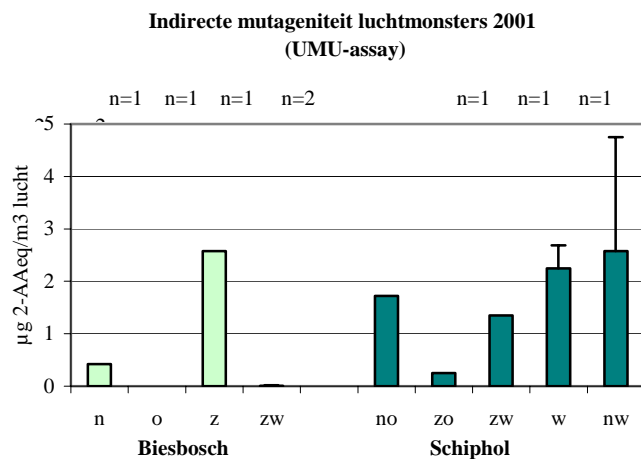
De UMU-assay is met luchtmonsters uitgevoerd, waarbij zowel met als zonder S9 mix geïncubeerd. De monsters die geïnduceerd worden met S9-mix zorgen voor de omzetting van stoffen in metabolieten zodat de indirecte mutageniteit bepaald kan worden. In figuur 3.3 en 3.4 staan de mutagene potenties van de filterextracten weergegeven van de monsters uit 2001, uitgedrukt in 4-NQO equivalenten (4-NQO-eq) per m³ lucht voor de directe mutageniteit en in 2-AA equivalenten (2-AA-eq) per m³ lucht voor de indirecte mutageniteit.

De directe mutageniteit is in de monsters uit de Biesbosch bij alle aanwezige windrichtingen ongeveer gelijk, met een waarde rond de 0.27 µg 4-NQO-eq per m³ lucht. Bij Schiphol ligt het aantal 4-NQO-eq in luchtmonsters genomen zuidwestelijke wind ook rond de 0.27 µg 4-NQO-eq per m³ lucht. Bij de overige windrichtingen bij Schiphol ligt de directe mutageniteit in de luchtmonsters hoger, waarbij de hoogste directe mutageniteit gelijk is aan 0.68 µg 4-NQO-eq per m³ lucht bij zuidoostelijke windrichting.

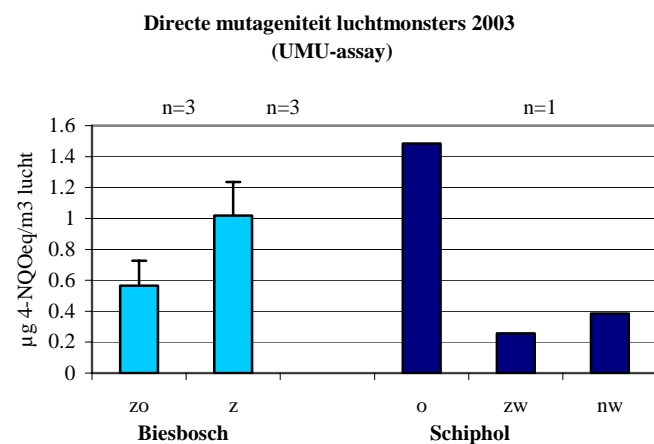
Bij de indirecte mutageniteit werd een grote spreiding in mutageniteit bij een zelfde windrichting gevonden. In de Biesbosch lag de mutagene potentie van de filterextracten nauwelijks boven de blanco-achtergrondwaarde. Bij zuidelijke windrichting is de mutagene potentie het hoogst met een waarde gelijk aan 2.66 µg 2-AA-eq per m³ lucht. In de luchtmonsters genomen bij Schiphol ligt de indirecte mutagene potentie tussen de 0.4 µg 2-AA-eq per m³ lucht bij zuidoostelijke windrichting en de 4.7 µg 2-AA-eq per m³ lucht bij noordwestelijke windrichting. De gemiddelde 4-NQO en 2-AA-eq waarden per m³ lucht in de Biesbosch en bij Schiphol verschillen niet significant.



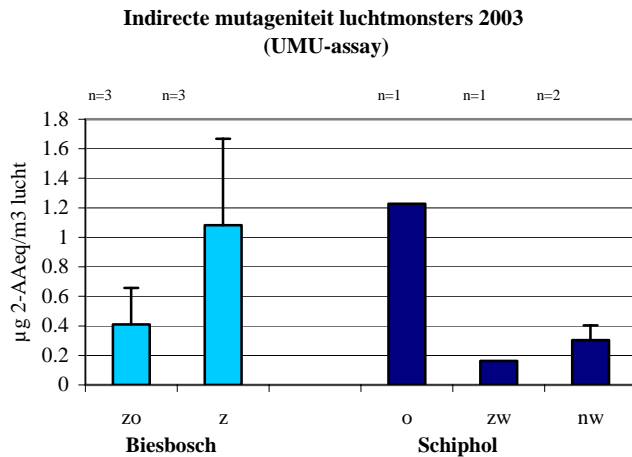
Figuur 3.3. De directe mutageniteit van luchtfilterextracten van luchtmonsters, die in 2001 genomen zijn bij Schiphol en in de Biesbosch, uitgedrukt in 4-NQO equivalenten per kubieke meter lucht. De luchtmonsters zijn per windrichting ingedeeld.



Figuur 3.4. De indirecte mutageniteit van luchtfilterextracten van luchtmonsters, die in 2001 genomen zijn bij Schiphol en in de Biesbosch, uitgedrukt in 4-NQO equivalenten per kubieke meter lucht. De luchtmonsters zijn per windrichting ingedeeld.



Figuur 3.5. De directe mutageniteit van luchtfilterextracten van luchtmonsters, die in 2003 genomen zijn bij Schiphol en in de Biesbosch, uitgedrukt in 4-NQO equivalenten per kubieke meter lucht. De luchtmonsters zijn per windrichting ingedeeld.



Figuur 3.6. De indirecte mutageniteit van luchtfilterextracten van luchtmonsters, die in 2003 genomen zijn bij Schiphol en in de Biesbosch, uitgedrukt in 4-NQO equivalenten per kubieke meter lucht. De luchtmonsters zijn per windrichting ingedeeld.

De directe mutageniteit van de luchtfilterextracten uit 2003 ligt bij oostenwind in Schiphol 5 keer hoger dan bij zuidwesten en noordwesten wind (figuur 3.5). Bij oostenwind ligt de 4-NQOeq bij 1.45 µg/m³ lucht en bij zuidwesten en noordwestenwind rond de 0.30 µg/m³ lucht. De 4-NQOeq van de luchtmonsters uit de Biesbosch liggen gemiddeld onder de waarde bij oostenwind in Schiphol, maar boven de waarden bij zuidwesten en noordwesten wind in Schiphol. De waarde ligt rond de 1.0 µg/m³ lucht bij zuid/zuidwestenwind, bij zuidoostenwind rond de 0.55 µg/m³ lucht en bij westenwind is de directe mutageniteit een stuk lager met een waarde van nog geen 0,20 µg 4-NQO-eq/m³ lucht.

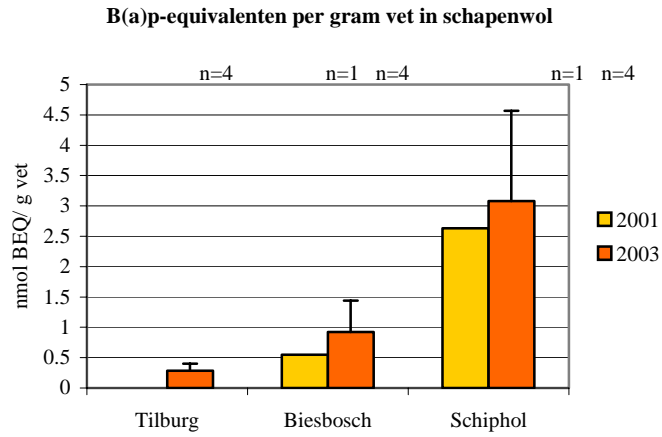
De indirecte mutagene potentie van het luchtmonster genomen bij oostenwind bij Schiphol is met een waarde van 1.2 µg 2-AA-eq per kubieke meter 5 keer hoger dan van de monsters die bij Schiphol genomen zijn tijdens zuidwesten en noordwestenwind (figuur 3.6). De 2-AAeq's van de luchtmonsters uit de Biesbosch liggen bij zuid tot westelijke wind rond hetzelfde bereik als bij oostenwind in Schiphol. Bij zuidoostenwind is de indirecte mutageniteit minder.

Ook hier zijn de verschillen tussen de gemiddelden 4-NQO-eq en 2-AA-eq waarden per m³ lucht in de Biesbosch en bij Schiphol niet significant.

3.3 Resultaten wolmonsters

De wolmonsters geven een indicatie van de blootstelling van schapen aan toxische stoffen gedurende een langere periode dan de 24 uur waarin de luchtfilters aan toxische stoffen worden blootgesteld.

In de DR-CALUX6hr zijn de cellen blootgesteld aan onverdunde extracten van de wolmonsters uit Tilburg en de Biesbosch. De extracten zorgen voor een respons in de DR-CALUX6hr, die in het lineaire gedeelte van de B(a)P-ijklijn ligt, en dus geïnterpoleerd konden worden om het aantal BEQ te bepalen. De extracten van de wolmonsters van Schiphol en zijn eerst twee keer verdund, omdat zij onverdund een te hoge respons gaven. De wolmonsters uit Tilburg bevatten gemiddeld 0.41 nmol BEQ per gram vet in de wol (figuur 3.7). De potentie van de extracten van de wolmonsters uit de Biesbosch om de Ah-receptor te induceren is in 2001 gelijk aan 0.55 nmol BEQ per gram vet en in 2003 gemiddeld 0.97 nmol BEQ per gram vet. De waarden van Tilburg en de Biesbosch wijken significant af van het aantal BEQ in de wol uit Schiphol, dat 3-7 keer hoger ligt bij 2.60 nmol BEQ per gram vet in 2001 en gemiddeld 3.12 nmol BEQ per gram vet in 2003 (p=0.007).



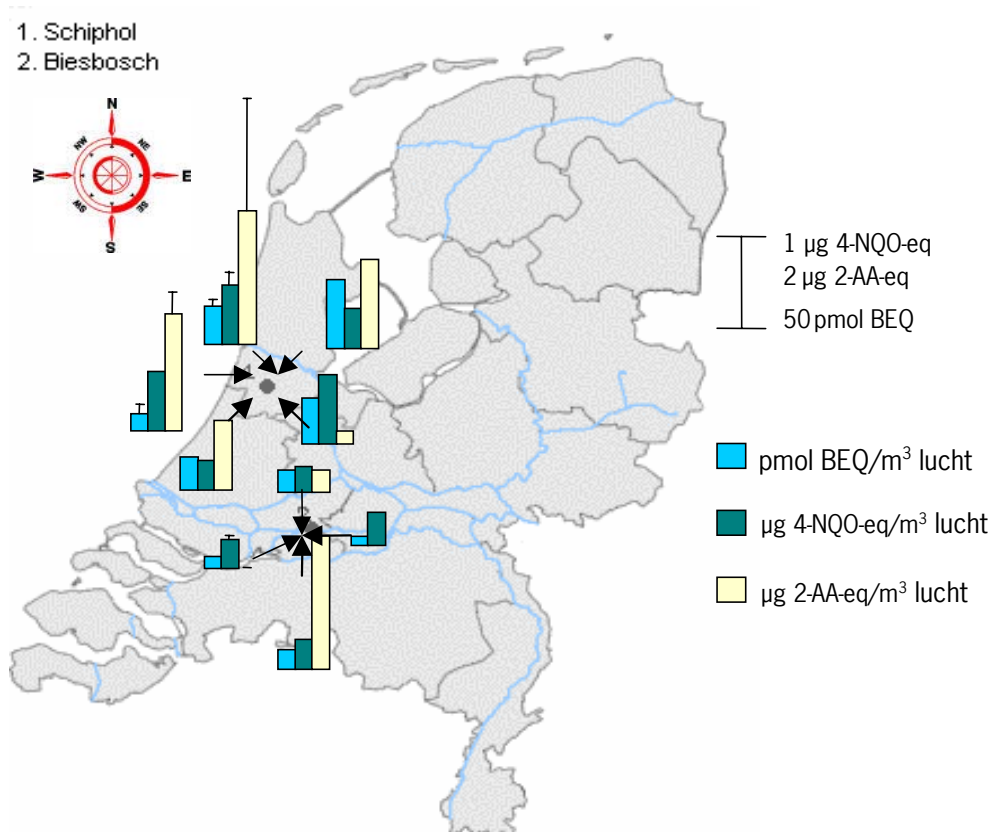
Figuur 3.7. De potentie van wolmonsters, verzameld in de omgeving van Tilburg, de Biesbosch en Schiphol in zowel 2001 als 2003, om de Ah-receptor te induceren uitgedrukt in B(a)P-equivalenten.

4. Discussie

4.1 Inleiding

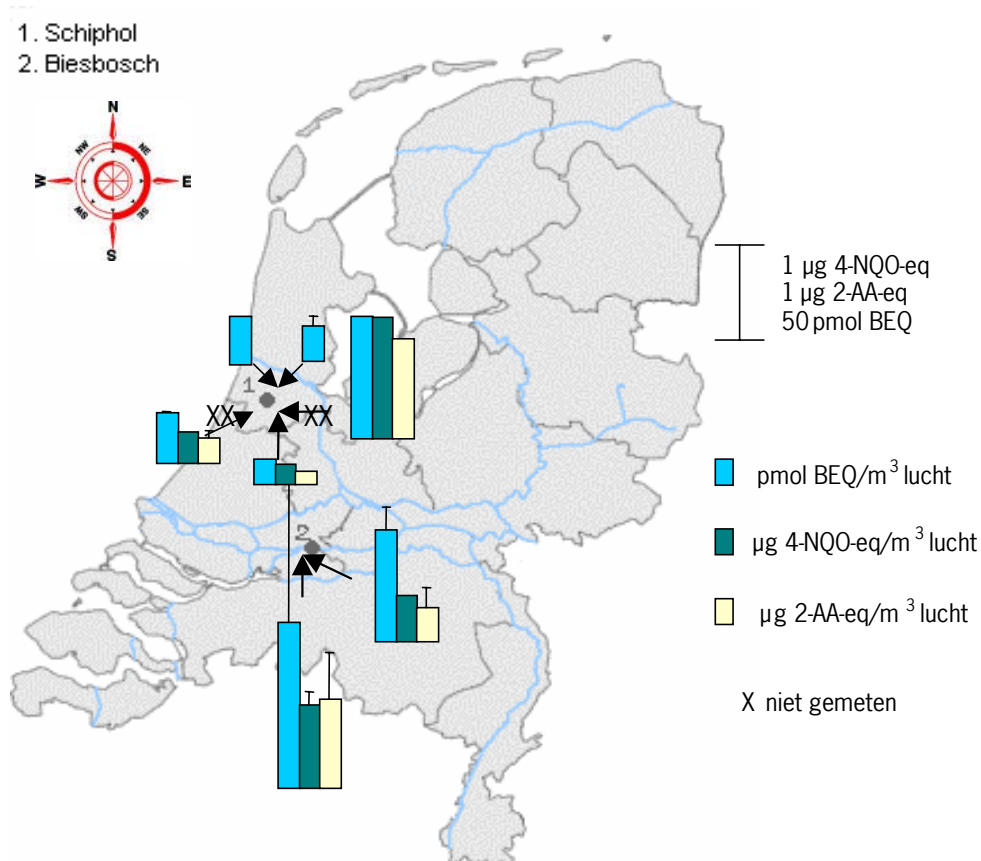
De luchtfiltermonsters, genomen bij Schiphol en in de Biesbosch, zijn geanalyseerd op hun vermogen om DNA te beschadigen. Met de DR-CALUX6hr wordt een maat verkregen van de aanwezigheid van PAKs op basis van de potentie van een deel van de PAKs om bij kortdurende blootstelling de Ah-receptor te induceren gemeten. De respons wordt uitgedrukt in BEQ, en is geen directe maat voor de toxiciteit van PAKs, meestal mutageniteit. Met de UMU-assay wordt wel de mutageniteit gemeten, zowel de directe als de indirecte mutageniteit, uitgedrukt in 4-NQO-eq en 2-AA-eq. Uit de metingen blijkt dat de extracten van de luchtfiltermonsters van 2001 in Schiphol gemiddeld een hogere potentie hebben om de Ah-receptor te induceren, deze verhoging is niet significant. In 2003 is juist de potentie van de luchtfilterextracten om de Ah-receptor te induceren hoger. De spreiding tussen de windrichtingen in een gebied is groot. Uit de UMU-assay blijkt dat de luchtfilterextracten van luchtmonsters van Schiphol in 2001 een iets hogere directe en indirecte mutageniteit hebben. In 2003 is er een duidelijke verhoging in de (in)directe mutageniteit bij oostenwind bij Schiphol. De mutageniteit is dan ongeveer gelijk aan deze van de luchtmonsters van uit de Biesbosch. In paragraaf 4.2 wordt verder ingegaan op de luchtfiltermonsters.

4.2 Luchtmonsters



Figuur 4.1. De B(a)P-equivalenten van luchtmonsters uit 2001, gemeten in de DR-CALUX6hr en de indirecte mutageniteit, uitgedrukt in 2-AA equivalenten en directe mutageniteit, uitgedrukt in 4-NQO equivalenten gemeten in de UMU-assay uitgesplitst naar windrichting in de Biesbosch en bij Schiphol.. Kanttekening is dat het totale aantal luchtmonsters slecht gering is: in de BB 5, en bij S 9.

In figuur 4.1 is te zien dat de indirecte mutageniteit uitgedrukt in 2-AA-eq en de directe mutageniteit uitgedrukt in 4-NQO-eq, gemeten in de UMU-assay, en de potentie om de Ah-receptor te induceren uitgedrukt in BEQ, gemeten in de DR-CALUX6hr geen zelfde beeld geven. Het aantal 2-AA-eq bij zuidenwind in de Biesbosch erg hoog is ten opzichte van het aantal 4-NQO-eq en het aantal BEQ. Bij zuidoostenwind bij Schiphol is de indirecte mutageniteit juist erg laag vergeleken met de directe mutageniteit en de potentie om de Ah-receptor te induceren. In de Biesbosch is het aantal BEQ en het aantal 4-NQO-eq bij iedere windrichting ongeveer gelijk, terwijl er juist een grote variatie zit in de indirecte mutageniteit per windrichting.



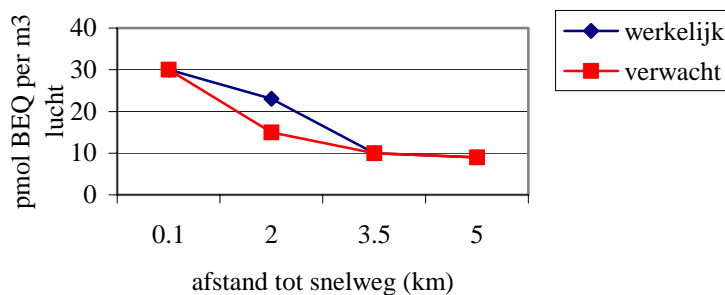
Figuur 4.2. Het aantal B(a)P-equivalenten in luchtmonsters uit 2003, gemeten in de DR-CALUX6hr en de indirecte mutageniteit, uitgedrukt in 2-AA equivalenten en directe mutageniteit, uitgedrukt in 4-NQO equivalenten gemeten in de UMU-assay uitgesplitst naar windrichting in de Biesbosch en bij Schiphol. Kanttekening is dat het totale aantal luchtmonsters slecht gering is: in de BB 6, en bij S 7 (UMU n=4).

In figuur 4.2 is te zien dat het aantal 4-NQO- en 2-AA-eq in de luchtmonsters uit 2003 bij Schiphol een zelfde beeld geven als het aantal BEQ. Het aantal BEQ, 4-NQO-eq en 2-AA-eq in de luchtmonsters zijn 2 tot 5 keer zo hoog wanneer de lucht met oostenwind is aangezogen vanuit Schiphol en de snelwegen, dan vanuit de andere richtingen. Ze zijn dan ongeveer even hoog als bij lucht in de Biesbosch die vanuit het zuiden over de Amercentrale komt. Dit betekent dat de kolencentrale vermoedelijk ongeveer net zoveel PAK-uitstoot geeft als de snelweg en de luchthaven Schiphol bij elkaar. Bij zuidoostenwind in de Biesbosch is de indirecte en directe mutageniteit (4-NQO-eq en 2-AA-eq) relatief hoog ten opzichte van andere windrichtingen vergeleken met het aantal BEQ. Ook bij westenwind is de indirecte mutageniteit hoog.

De lucht die uit het met oostenwind wordt aangevoerd komt ook over de snelweg heen (figuur 2.1). Het drukke wegverkeer produceert ook verontreiniging in de vorm van PAKs. Omdat er om veiligheidsredenen geen luchtmonsters mochten worden verzameld die alleen over de luchthaven heen zijn gegaan, is het niet mogelijk om de verontreiniging naar de bron te onderscheiden.

Uit het onderzoek van Timo Hamers, blijkt dat er ongeveer 30 pmol BEQ per m³ lucht op 10 meter naast een zeer drukke snelweg (A2 ter hoogte van Vianen) en 9 pmol BEQ per m³ lucht op een afstand van 5 kilometer gevonden worden [22]. Dit is weergegeven in figuur 4.3. Wanneer aangenomen wordt dat het aantal BEQ bij Hoofddorp alleen door de snelweg veroorzaakt hetzelfde zou zijn, en dat de verkeersintensiteiten vergelijkbaar zijn, zou op 2 kilometer afstand de concentratie ongeveer 14 pmol BEQ per m³ zijn (weergegeven met de rode lijn). Het gevonden aantal BEQ is echter 8 pmol BEQ per m³ lucht keer hoger, zo'n 35%, wat dan veroorzaakt door andere luchtverontreinigingsbronnen in het gebied aanwezig. Dit kan veroorzaakt worden door Schiphol., maar ook mede door verkeer over de provinciale wegen, en uitstoot van de stad Amsterdam.

Afstandsrelatie snelweg en PAK's



Figuur 4.3. Het aantal B(a)P-equivalenten neemt af met de afstand tot de bron. Op 10 meter naast de snelweg wordt een waarde gemeten van 30 pmol BEQ per m³ lucht, op 5 km is dat nog maar 9 pmol per m³ lucht. Het rode lijntje geeft het verwachte aantal BEQ aan. Het verschil tussen het blauwe en rode lijntje is dan afkomstig van andere bronnen.

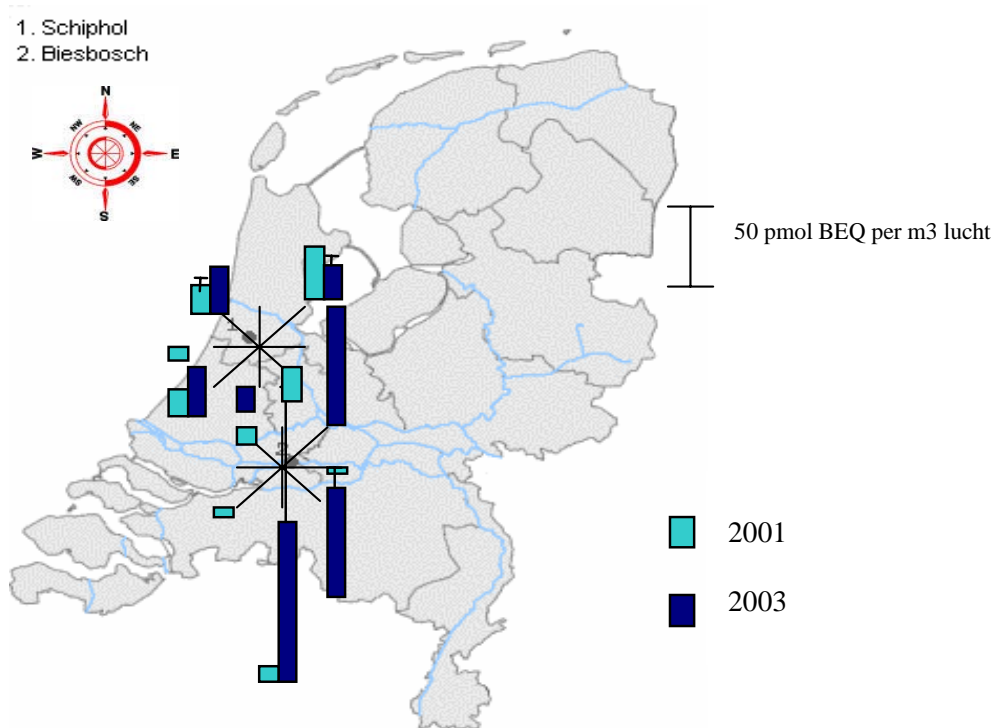
Deze resultaten sluiten aan bij die van een onderzoek door TNO waarin wordt geconcludeerd dat slechts ongeveer 7% procent van de luchtverontreiniging bij Schiphol, bestaande uit NO_x, CO, fijn stof en PAKs, door Schiphol zelf wordt veroorzaakt [6]. Het grootste deel van die verontreiniging, namelijk 65%, is afkomstig van verder weg gelegen bronnen, zoals de industriegebieden in oost Europa [6]. Dit kan gezien worden als de achtergrond vervuiling die in heel Nederland aanwezig is, vooral tijdens oostenwind. Overigens zit hierbij ook de verontreiniging van luchtverkeer in het algemeen, inclusief dat van vliegtuigen die via Schiphol reizen, aangezien vliegtuigen snel stijgen en dan de lucht niet zozeer lokaal verontreinigen, maar meer over grote oppervlakten verspreiden.

Omdat het grootste deel van de luchtvervuiling (NO_x, CO, PAKs, fijn stof) bij Schiphol door andere bronnen wordt verklaard, is de verwachting dat deze verontreiniging bij Schiphol niet veel hoger is dan bij zeer drukke snelwegen in Nederland.

De norm voor B(a)P, als indicatorstof voor PAK-achtige stoffen in de lucht is in Nederland vastgesteld op 1 ng/m³ omdat B(a)P representatief geacht wordt voor het risico bij blootstelling van de mens aan een PAK-mengsel. Aangenomen wordt dat B(a)P ongeveer 20% bijdraagt aan de toxische potentie van het totale PAK-mengsel [38]. Hoewel in de DR-CALUX6hr niet de echte PAK-toxiciteit wordt gemeten kan op basis van deze resultaten wel een grove

schatting worden gemaakt van de hoogte van de PAK-verontreiniging uitgedrukt in BEQ. De gemiddelde gevonden concentratie in de luchtmonsters uit 2001 en 2003 is 29.4 pmol BEQ per m³ lucht met een laagst gemeten concentratie van 3.9 pmol BEQ per m³ lucht en een hoogst gemeten concentratie van 101. pmol BEQ per m³ lucht. Deze waarden komen, na omrekening met een molmassa van B(a)P van 252, overeen met 7.44 ng BEQs per m³ lucht gemiddeld en 0.99 ng BEQs per m³ lucht en 25.7 ng BEQ per m³ lucht als hoogste concentratie. Wanneer 20% hiervan eigenlijk echt B(a)P zou zijn zou dat overeenkomen met gemiddeld 1.49 ng B(a)P per m³ lucht en maximaal 5.13 ng B(a)P per m³ lucht. Dit zou een behoorlijke overschrijding van de norm zijn, maar aangezien in bio-analyse ook onbekende toxische stoffen worden gemeten die bij chemische analyse onopgemerkt blijven is het aandeel B(a)P in de bioanalyse waarschijnlijk lager. (a)P(a)P Uit chemische analyses die gedaan zijn door de provincie Noord Holland blijkt dat de gemiddelde B(a)P-concentratie rond de 0.2 ng per m³ lucht ligt, lager dan de norm, maar in de winter worden waarden gemeten die 6-8 keer zo hoog liggen [11, 39], dus dat zou weer overeenkomen met onze gemiddelde waarde in het winterseizoen.

Dit verschil tussen winter en zomer wordt ook in andere onderzoeken beschreven [32]. Wanneer de BEQ-waarden van de luchtmonsters uit de zomer van 2001 vergeleken worden met de luchtmonsters uit de winter van 2003, is ook een duidelijke verhoging te zien in de hoogte van het aantal B(a)P-equivalenten. (zie figuur 4.3). Voor de gemiddelde waarden is dit verschil significant. De verschillen tussen de directe en indirecte mutageniteit in de luchtmonsters uit 2001 en 2003 zijn niet zo groot. De 4-NQO-eq en 2-AA-eq waarden hebben dezelfde orde van grootte.



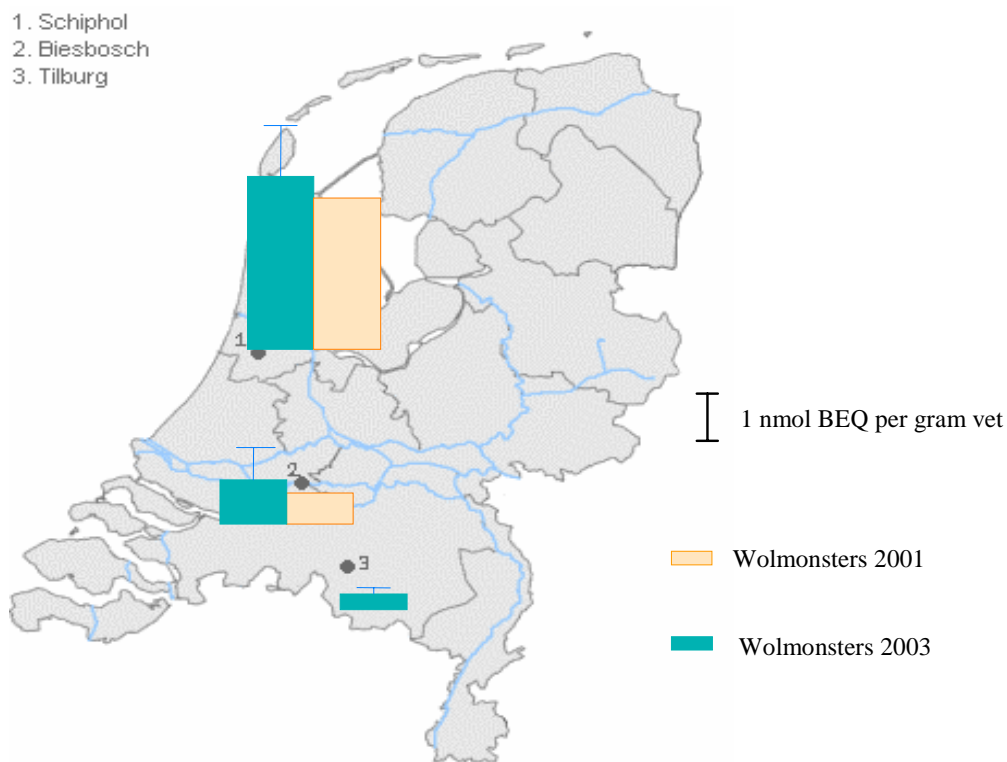
Figuur 4.4. Het aantal B(a)P(a)P-equivalenten in de filterextracten van de luchtmonsters uit de Biesbosch en van Schiphol genomen in 2001 (juni-augustus), vergeleken met het aantal B(a)P(a)P-equivalenten in de filterextracten van de luchtmonsters uit 2003 (februari-april).

De hoogte van het aantal BEQ in de luchtmonsters zou ook afhankelijk kunnen zijn van de windsnelheid, de temperatuur en de neerslag. Bij een hogere windsnelheid slaan de deeltjes pas later neer en worden ze over een grotere afstand verspreid. Bij neerslag worden de PAK deeltjes uit de lucht gespoeld waardoor in de luchtmonsters minder PAKs meetbaar zijn. Deze

factoren zouden de spreiding tussen de toxiciteit van de luchtmonsters bij eenzelfde windrichting kunnen verklaren.

4.3 Wolmonsters

De wolextracten gaven geen signaal in de UMU-assay. Het aantal B(a)P-equivalenten die zijn neergeslagen in de schapenwol is bij Schiphol zowel in 2001 als 2003 een factor drie hoger dan in de Biesbosch en een factor 7 hoger dan in Tilburg (figuur 4.5). De BEQ-waarden hebben in 2001 en 2003 dezelfde orde van grootte. Omdat PAKs zich ophopen in de schapenwol, kun je deze concentraties kunnen zien als een maat voor de langere termijn blootstelling van de schapen aan de toxische stoffen.



Figuur 4.5. Het aantal B(a)P-equivalenten per gram vet in de wolmonsters uit 2001 en 2003 bij Schiphol, de Biesbosch en Tilburg.

Nadat de PAKs via voedsel worden opgenomen in het lichaam, worden ze zo snel gemetaboliseerd dat men er vanuit gaat dat accumulatie niet snel zal optreden. De concentraties B(a)P die bij toediening gedurende een langere tijd (maanden) leiden tot schadelijke effecten als verminderde immuniteit en miskramen liggen bij muizen rond de 10 mg per kg lichaamsgewicht per dag bij toediening via het dieet. Bij het opwerken van de wolmonsters bleek dat in één cm² wol ongeveer 0.5 mg vet zit. Bij Schiphol is de hoeveelheid BEQ in de wol 3.11 µg per g vet in de wol, Dit komt overeen met ongeveer 1.55 ng BEQ per cm² wol. Per cm² gras is deze concentratie waarschijnlijk lager omdat het vet in de wol vetachtige stoffen zoals PAKs goed kunnen vasthouden. Een schaap dat 4m² gras per dag eet krijgt dus minder dan 0.062 mg BEQ per dag binnen, uitgaande van 1.55 ng BEQ per cm² gras. Per kilo lichaamsgewicht is dit ongeveer 1.55 µg BEQ per dag, wanneer je uitgaat van een schaap van 40 kg. Dit is zo'n 6500 maal minder dan de dosis die bij proefdieren nodig was om effecten te geven. Het is dus niet waarschijnlijk dat een schaap dat bij de gevonden concentratie BEQ in de wolmonsters een schadelijke concentratie binnenkrijgt. Dierenartsen in de buurt van Schiphol

hebben geen verminderde vruchtbaarheid of spontane abortussen geconstateerd bij de fokschape.

Er zijn geen studies gedaan naar concentraties PAKs die voor grote grazers, zoals schape bij inname gedurende lange tijd toxisch zijn. Na tientallen jaren zouden door blootstelling aan PAKs via de ademwegen tumoren kunnen ontstaan in de longen. Het is echter niet waarschijnlijk dat dit bij schape gebeurt. Schape grazen over het algemeen maar maximaal 6 maanden op dezelfde plek en dat is te kort om een flinke blootstelling op te lopen. Bovendien worden ze over het algemeen lang niet oud genoeg voor het ontwikkelen van tumoren.

Bij mensen is onderzoek gedaan naar het voorkomen van luchtwegklachten als gevolg van blootstelling aan vervuiling in de buurt van Schiphol. Hieruit blijkt dat er een negatief verband is tussen luchtwegaandoeningen en de woonafstand tot de luchthaven. Het is dus in principe mogelijk dat ook de schape last kunnen krijgen van luchtwegproblemen wanneer ze lange tijd in de buurt van de luchthaven grazen.

Omdat de bijdrage van Schiphol aan de luchtverontreiniging ter plaatse klein is ten opzichte van de bijdrage van verkeer en de achtergrond, is de verhoging in het aantal BEQ ten opzichte van andere plekken in Nederland waarschijnlijk voor een groot te wijten aan het complex van verontreinigingsbronnen rond Schiphol. Schape die naast andere drukke snelwegen elders in Nederland grazen, zullen waarschijnlijk ook verhoogde BEQ concentraties in hun wol hebben.

5. Conclusie

- Het aantal B(a)P-equivalenten in luchtmonsters genomen bij Schiphol in 2001 en 2003 verschillen niet significant van het aantal B(a)P-equivalenten in luchtmonsters genomen in de Biesbosch, hoewel ze in 2001 gemiddeld wel wat hoger lagen. De gemiddelde directe mutageniteit en de gemiddelde indirecte mutageniteit in de luchtmonsters genomen bij Schiphol en in de Biesbosch verschillen ook niet significant. Hierbij moet opgemerkt worden dat bij zo'n kleine aantal monsters alleen een echt groot verschil statistisch significant zou zijn.
- Tussen het aantal B(a)P-equivalenten in de luchtmonsters, genomen in de zomer van 2001 en de luchtmonsters, genomen in de winter van 2003 zit wel een significant verschil. Dit verschil wordt waarschijnlijk verklaard door het seizoen waarin de monsters genomen werden. Het verschil in verontreinigingsgraad tussen winter- en zomermonsters wordt ook in andere onderzoeken beschreven [32].
- Het aantal B(a)P-equivalenten, 4-NQO-equivalenten en 2-AA-equivalenten in de luchtmonsters is sterk afhankelijk van de windrichting. De hoogste B(a)P-equivalentie waarden in Schiphol worden gemeten in luchtmonsters die bij noordoosten tot zuidoostenwind genomen zijn bij Schiphol. Bij deze wind komt de lucht over Schiphol en de snelwegen. In 2003 is het aantal B(a)P-equivalenten in de lucht, die de Amercentrale in de Biesbosch passeert vergelijkbaar met het aantal in de lucht die Schiphol passeert. De directe mutageniteit is het hoogst in de luchtmonsters die over Schiphol en de snelwegen komen. De verschillen tussen de gemiddelde toxische equivalentiewaarden bij Schiphol en de Biesbosch zijn niet significant.
- Uit een schatting op basis van metingen van B(a)P-equivalenties naast de A2 door Hamers [22] en uit een chemisch onderzoek door TNO naar de herkomst van onder andere PAKs bij Schiphol [6] kan worden geconcludeerd dat de verhoging van de PAKs in luchtmonsters genomen bij Schiphol is waarschijnlijk voor minder dan 35% veroorzaakt door de luchtvaart. .
- De concentratie B(a)P wordt geschat op gemiddeld 1.49 ng B(a)P/m³ lucht. Dit is een overschrijding van de norm van 1.0 ng B(a)P/m³ lucht. In de luchtmonsters zit echter een mengsel van stoffen dat tijdens de bioanalyse een hogere toxische potentie kan hebben dan wanneer alleen B(a)P wordt gemeten. Uit chemische analyses die gedaan zijn door de provincie Noord Holland blijkt de gemiddelde B(a)P-concentraties rond de 0.2 ng/m³ lucht te liggen, onder de vastgestelde norm, maar dat deze gehalten in het winterseizoen 5-6 maal hoger zijn.
- Wolextracten suggereren met een waarde ongeveer 3 nmol B(a)P-equivalenten per gram vet een 3 tot 7 keer hogere blootstelling aan B(a)P-equivalenten bij schape die bij Schiphol grazen dan bij schape die in de Biesbosch of bij Tilburg grazen. Uitgaand van deze waarde wordt geschat dat schape ten hoogste 1.55 µg BEQ per kg per dag binnenkrijgen. Bij muizen treden schadelijke effecten pas op bij toediening van 10 mg B(a)P per kg lichaamsgewicht per dag. De kans dat schape schadelijke hoeveelheden binnenkrijgen is dus verwaarloosbaar. Dierenartsen in de omgeving hebben ook geen verminderde vruchtbaarheid of spontane abortussen geconstateerd. Effecten op de gezondheid van schape door de PAK-verontreiniging in de lucht zijn dus niet te verwachten.

6. Literatuurlijst

1. Waanders, L., De schadelijke invloed van toxische stoffen van de luchthaven Schiphol op aldaar grazende schapen. afstudeerverslag, toxicologie WUR, 2001.
2. Hemingway, A.H.a.C., Respiration of sheep at thermoneutral temperature. *Respiration Physiology*, 1966. **1**: p. 130-137.
3. Mengnian, L.a.L.Z., Research on Goat Stocking Rate in the Bushland of Karst Landform, Research on Goat Stocking Rate in the Bushland of Karst Landform. <http://www.iga-goatworld.org/publication/proceeding/abstract37.PDF>, 2002.
4. Liem, A.E.a., PCB's, PCDD's, PCDF's and organochlorine pesticides in human milk in the Netherlands, levels and trends. *Organohalogen Compounds*, 1995. **26**: p. 69-74.
5. Lercher P, S.R., Kofler W. 1995; 169: 71-4., Perceived traffic air pollution, associated behaviour and health in an and p. alpine area. *Science of the Total Environment*, Perceived traffic air pollution, associated behaviour and health in an alpine area. *Science of the Total Environment*, 1995. **169**(71): p. 4.
6. Thijsse, T.R.a.M.v.L., Nader onderzoek naar de luchtkwaliteit in de omgeving van Schiphol en de bijdrage van te onderscheiden bronnen. TNO-rapport R 2001, 2001: p. 1-39.
7. Herings, A.W.v.E.F.E.L.R., Geneesmiddelengebruik als indicator voor de effecten van milieuverontreiniging ; een studie in de regio Schiphol. RIVM Rapport 441520006, 1996.
8. Broek, F.v.d.
9. Boeren, B.m.s.b.S.
10. Thijsse, T.R.a.M.v.L., Onderzoek naar de luchtkwaliteit in de omgeving van Schiphol. TNO-MEP-Rapport, R 2000/028, 2000.
11. de Jonge, D., Datarapport Luchtkwaliteit Haarlemmermeer Resultaten 2000. Afdeling onderzoek provincie Noord-Holland 2001.15, 2001: p. 1-33.
12. Schreve, W., Use of aircraft fuel anti-icing additives U.S. Department of Transportation, federal aviation administration. bestelnummer 20-29B. http://www.faa.gov/avr/air/acs/AC20_29B.doc, 1972.
13. gezondheidsraad, Grote luchthavens en gezondheid. publicatie nr 1999/14.ISBN: 90-5549-278-7, 1999.
14. Vliet, P.E., Respiratory diseases in children around Amstredam Airport Schiphol. RIVM rapport 441520014 EOH Rapport 184, 1999.
15. Franssen, A.E.M.e.a., Health Impact Assessment Schiphol airport, overview of results until October 1999. RIVM Rapport 441520015, 1999: p. 49 p.
16. TNO, Buitenlucht. TNO-rapport R 2001, 1995.
17. Nieuwsbrief, Onderzoek toont geent relatie aan tussen luchtwegaandoeningen bij kinderen en luchtverontreiniging regio Schiphol. Gezondheidskundige Evaluatie Schiphol: Nieuwsbrief nr 3, 2001.
18. Visser O, W.J.v., Benraadt J, Incidentie van kanker in de omgeving van Schiphol in 1988-1993. *Nederlands Tijdschrift Geneeskunde*, 1997. **141**(10): p. 468-473.
19. Bosveld, A.T.C.a.P.A.F.d.B., Bodemverontreiniging in de Biesbosch en doorvergiftiging naar kleine zoogdieren. Wageningen, Alterra, 2003. Alterra-rapport 654, 2003: p. 1-64.
20. Schoonmade, J., Analyseren Ah-receptor actieve verbindingen in luchtaerosolen in een relatief belast en onbelast ecosysteem. afstudeerverslag, toxicologie WUR, 1997.
21. Van der Naald, W., Tamis, W, van den Berg, MMHE, Polycyclische Aromatische Koolwaterstoffen in het Nederlands Milieu. VROM 708245453/103, 1987.
22. Hamers, T., et al., The application of reporter gene assays for the determination of the toxic potency of airborne particulate matter. *Extension of Science of the Total Environment*, 2000. **262**: p. 159-174.
23. Maria, V.L., A.C. Correia, and M.A. Santos, Anguilla anguilla L. Biochemical and Genotoxic Responses to Benzo[a]pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2002. **53**: p. 86-92.

24. IARC, Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-para-dioxin [1746-01-6] and Benzo[a]pyrene [50-32-8]. 1997. **69**.
25. Heidelberger, C., Chemical carcinogenesis, chemotherapy: cancer's continuing core challenges. *Cancer research*, 1970. **30**: p. 1549-1569.
26. Ching, E., et al., DNA Adduct Formation and DNA Strand Breaks in Green-lipped Mussels (*Perna viridis*) Exposed to Benzo[a]pyrene: Dose- and Time-Dependent Relationships. *Marine Pollution Bulletin*, 2001. **42**(7): p. 603-610.
27. Smit, L.A.M., PAK gerelateerde DNA adducten en zware metalen in kleine zoogdieren afkomstig uit diffuus verontreinigde gebieden. afstudeerverslag, toxicologie WUR, 1999.
28. ATSDR., Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons PAH's. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, 1995.
29. Willems, J., Poucke, van I., Dioxinen: vastleggen van normen voor de voeding en bepalen van een aanvaardbare blootstelling. Preliminair rapport ten behoeve van de hoge gezondheidsraad, 1998: p. 1-13.
30. Faust, R.A.R., Toxicity summary for benzo(a)Pyrene. 1994.
31. Velze, V., PAK in stedelijke omgeving, benzo(a)Pyreen en mogelijke alternatieven als gidsstof voor PAK. RIVM-rapport nr 723301005, 1996.
32. VROM, Lucht. <http://www.vrom.nl/milieuhandboek>, 2002.
33. Oda, Y., et al., Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Research*, 1985. **147**: p. 219-229.
34. Walker, G., Mutagenesis and Inducible Responses to Deoxyribonucleic Acid Damage in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 1984. **48**: p. 60-93.
35. Reifferscheid, G., et al., A microplate version of the SOS/umu-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples. *Mutation Research*, 1991. **253**: p. 215-222.
36. de Maagd, P.G., Genotoxicity of effluents: relevance and assays. RIZA EMPO werkdokumentnummer 98.118X, 1998.
37. Hamers, T., Toxic potency and effects of diffuse air pollution, Thesis Wageningen University, 176 pp
38. James, N., Executive Summary: Benzo[a]pyrene as a Toxic Air Contaminant. <http://www.arb.ca.gov/toxics/summary/bap.pdf>, 1994.
39. Corus, Datarapport luchtkwaliteit IJmond Resultaten 2002. Datarapport provincie Noord Holland, 2003.
40. Sloomweg, T. Bioanalyse van PAK-achtige verbindingen in luchtmonsters van Schiphol en de Biesbosch. Doctoraalverslag WU, 2003.

Bijlage I. Filters voor luchtbemonstering

Voor bemonstering van lucht worden kwartfilters (QF20, Schleicher en Schuell) gebruikt die zijn voorgewassen in achtereenvolgens methanol (Lab scan Ltd. HPLC kwaliteit, 99% zuiver), dichloormethaan (Lab scan Ltd. HPLC kwaliteit, 99% zuiver) en hexaan (Rathburn, HPLC kwaliteit, 99% zuiver). De filters worden 24 uur in schalen met een oplosmiddel gelegd. Met de hand worden de schalen even geschud. Filters worden geconditioneerd door ze tenminste 24 uur in een exsiccator met een verzadigde K_2CO_3 -oplossing (luchtvochtigheid 45%) te leggen. Voor gebruik worden ze gewogen. Na de monsternamen worden de filters ingepakt in aluminium folie en bewaard bij $-20^\circ C$ tot de extractie plaatsvindt.

Vòòr de extractie worden de filters opnieuw 24 uur in het donker geconditioneerd in de exsiccator om te zorgen dat de vochtigheid van de filters voor en na monsternamen gelijk is. De filters worden vervolgens teruggewogen zodat het gewicht van de opgevangen deeltjes bekend is. Voor iedere extractie wordt een half filter gebruikt dat in kleine stukjes wordt geknipt. De stukjes worden verzameld in een roestvrij stalen huls en geëxtraheerd in een Tecator Soxtec apparaat (Höganäs, Zweden). De monsters worden één uur gekookt en één uur gespoeld bij $160^\circ C$ in 50 ml van een mengsel van aceton en dichloormethaan (1:1 v/v) (Labscan; Dublin, Ireland; HPLC kwaliteit). De ruwe extracten worden ingedampt tot ongeveer een 0,5 ml onder een lichte stikstofstroom bij $37^\circ C$ en overgebracht in een puntvial. Vlak voor droogvallen wordt 50 μl dimethylsulfoxide (DMSO; Acros 99,9% zuiver, Geel- België) toegevoegd en wordt het laatste restje oplosmiddel weggedampt. Het volledige protocol staat beschreven in de afstudeerverslagen van Slootweg en Waanders [1], [2].

Bijlage II. Opwerking wolmonsters

Materiaal

- Glazen Kolom (x)
- Biotex
- Technische alcohol (96%)
- Aceton (HPLC-kwaliteit)
- Extractievloeistof (aceton:dichloormethaan ACE:DCM 1:1 (v/v) HPLC-kwaliteit)
- Glaswol (Varian DMCS-behandeld)
- Gedroogd Na_2SO_4 (24 uur in schone oven van 150 °C)
- Reageerbuis 10 ml
- Pasteurpipet klein

Methode

- Knip de schapevool in stukjes van 250 mg
- Stop de wolmonsters in een reageerbuisje (1).
- Voeg 2 of 3 ml extractievloeistof toe en vortex gedurende 3 minuten
- Spoel de kolommen met demiwater
- Spoel de kolommen met technisch alcohol
- Spoel de kolommen met aceton
- Spoel de kolommen met hexaan: diethylether
- Spoel al het glaswerk 3 keer met extractievloeistof
- Duw een plukje glaswol in het eind van het smalle gedeelte van de kolom. Stamp het plukje aan met een satéstokje.
- Breng 1 gram gedroogd Na_2SO_4 in de kolom en tril met een graveerpen tegen de wand van de kolom.
- Breng het wolextract met een Pasteur pipet in de kolom en vang het extract op in een schone reageerbuis.
- Spoel de kolom en de reageerbuis(1) drie keer na met extractievloeistof.
- Verdamp het extract (35°C, milde N_2 -stroom) en breng het laatste restje over in een vial. Verdamp totdat er nog heel weinig vloeistof over is en voeg 15 μl DMSO toe.

Bijlage III. Celweek

Algemene opmerkingen

- De H4IIE pGudLuc 1.1-cellen moeten minstens twee keer per week worden overgezet.
- De confluentie mag bij overzetten niet lager komen dan 20%.
- De cellen mogen niet meer dan 90% confluent worden voor overzetten.
- Kweekflessen kunnen tot 3 maal gebruikt worden.
- Noteer op de flessen de datum, type cellen en je naam.
- Werk in VMT ruimtes.

Methode

- Haal de trypsine oplossing uit de vriezer en ontdooi deze.
- Laat kweekmedium en HBSS op kamertemperatuur komen.
- Zorg dat het medium niet in de hals van de fles klotst.
- Controleer de kweekflessen op confluentie en besmetting.
- Zorg voor een afvalpot die geautoclaveerd kan worden.
- Open de flessen bij een vlam en vlam de hals van de flessen af.
- Haal medium van de cellen af met een glazen pipet en doe dit in de afvalfles.
- Spoel de cellen met 5 ml HBSS.
- Breng 2 ml trypsine in de fles en haal het er na 30 seconden weer af.
- Laat de fles nog 1,5 minuten in de stoof staan en kijk onder de lichtmicroscopie of de cellen gezwollen zijn.
- Sla voorzichtig tegen de zijkant van de fles zodat de cellen van de bodem loskomen.
- Breng 10 ml kweekmedium op de cellen en resuspendeer.
- Voeg 2 of 3 ml van de verkregen suspensie toe aan een kweekfles.
- Doe daar 8 of 7 ml vers kweekmedium bij en zet de fles in de stoof.

Bijlage IV. DR-CALUX6hr

De H4IIE-cellen worden gekweekt in α -minimal essential medium (α -MEM)(Gibco) met 10% foetal calf serum (FCS) in een stoof met een luchtvochtigheid van 100%, een temperatuur van 37°C en een CO₂-gehalte van 5%. Voor gebruik wordt het medium van de cellen verwijderd, en dan worden ze gespoeld met Hank's basic salt solution (HBSS) (Gibco). De cellen worden behandeld met trypsine om te zorgen dat ze losraken van de bodem van de kweekfles. De cellen worden opnieuw opgelost in 20 ml α -MEM medium en vervolgens homogeen uitgeplaat in een witte viewplaat met 96 wells. In iedere well wordt 100 μ l medium met cellen uitgeplaat. De buitenste rijen van de plaat worden gevuld met HBSS, omdat deze wells een betere gasuitwisseling hebben dan de andere wells. De plaat wordt 24 uur geïncubeerd in een stoof. De volgende dag zijn cellen die minstens 95% confluent, waarna ze voor 6 of 48 uur worden blootgesteld.

Voor de 6-uurs blootstelling worden de monsters, opgelost in dimethylsulfoxide (DMSO), verdund in medium, dat al minstens 24 uur in contact is geweest met cellen. Gebruik je geen geconditioneerd medium dan is het mogelijk dat afbreekbare stoffen uit het medium een achtergrond signaal geven. Na langere blootstelling (vanaf 12 uur) speelt dit geen rol meer. In een 24-wellsplaat wordt 500 μ l wel of niet geconditioneerd medium per well gepipetteerd. Hieraan wordt vervolgens 4 μ l van een monster of van de ijkreeks opgelost in DMSO toegevoegd.

Ook worden cellen blootgesteld aan een DMSO procedureblanco en aan alleen medium om de zuiverheid van DMSO te controleren. Het blootstellingsmedium en het al aanwezige medium worden 10 minuten gemengd. De blootstellingen worden in triplo uitgevoerd. Aan de cellen in de 96-wellsplaat wordt 100 μ l blootstellingsmedium per well toegevoegd. De platen worden vervolgens 6 uur of 48 uur geïncubeerd in de stoof bij 37°C. Na incubatie wordt het medium verwijderd en de cellen gespoeld met 100 μ l 0.5 x Phosphate Buffered Saline (PBS) (Oxoid) om alle gekleurde mediumrestanten en dode cellen te verwijderen. Om de cellen te lyseren wordt 30 μ l low salt buffer toegevoegd. De plaat moet nu nog 10 minuten op ijs blijven staan, om vervolgens voor minstens een half uur in de -80 °C vriezer te worden geplaatst.

Daarna kan de luciferase productie door de cellen gemeten worden. Na 10 minuten schudden bij kamertemperatuur wordt de luciferase productie gemeten via lichtemissie in de luminometer. In de luminometer wordt eerst de achtergrondluminescentie in de plaat gemeten. Vervolgens wordt in een well 100 μ l Flashmix, dat het substraat luciferine bevat, gespoten. Er vindt nu een reactie plaats waarbij in de aanwezigheid van cofactoren ATP en zuurstof, oxyluciferine, koolstofdioxide en AMP worden gevormd. Bij deze reactie ontstaat licht dat door de luminometer gemeten kan worden en uitgedrukt wordt als Relative Light Units (RLUs). Tot slot wordt in de wells 100 μ l 0.2 M NaOH gespoten om de lichtemissie te doven, zodat blijvende lichtemissie niet via de transparante bodem doorstraalt naar naburige wells.

Voor de monsters wordt een verdunning gekozen waarbij de verkregen inductiefactoren in het lineaire gedeelte van de ijklijn liggen, dat wil zeggen tussen de EC₁₀ (gekozen detectielimiet) en EC₅₀. Dit is voor de luchtmonsters een concentratie van 0.01 m³ lucht per well en voor de schapen ongeveer 0.27 mg wol per well. Een complete beschrijving van het gevolgde protocol staat in de afstudeerverslagen van Slootweg en Waanders [1, 2].

Bijlage V. UMU-assay

De avond voordat de test uitgevoerd zal worden, wordt een voorcultuur gemaakt van de *Salmonella typhimurium* bacteriën onder VMT condities. De bacteriën krijgen overnacht de kans te groeien in een cultuur. De UMU-assay wordt uitgevoerd in een 96-wellsplaat. Stocks van 4-NQO en 2-AA worden gemaakt in DMSO en verdund met gedemineraliseerd water tot concentraties van 25 µg/l tot 200 µg/l voor 4-NQO en concentraties van 100 tot 800 µg/l voor 2-AA (4,5% DMSO). De bacteriën zijn blootgesteld aan extracten van luchtfilters in twee verschillende concentraties, namelijk 12m³ lucht per well en 16m³ lucht per well.

Aan 180 µl van ieder concentratie van een extract of teststof wordt 20 µl geconcentreerd groeimedium toegevoegd. In het geval van metabole activering van de testoplossingen, bevat dit geconcentreerde groeimedium ook co-factoren b-nicotinamide dinucleotide fosfaat (NADP) en glucose-6-fosfaat. Na 2 uur incubatie bij 37 °C zijn de bacteriën in hun exponentiele groeifase en kunnen ze worden gebruikt voor de test. Voor experimenten met metabole activering, wordt 450 µl S9-mix toegevoegd aan 15 ml bacterie cultuur. Aan iedere well wordt 70 µl bacteriecultuur toegevoegd (behalve aan de achtergrond wells) en de 96-wellsplaat wordt geïncubeerd bij 37 °C voor 2 uur terwijl hij constant geschud wordt om neerslag te voorkomen. Vervolgens wordt 30 µl van het geïncubeerde monster overgebracht in 270 µl vers groeimedium in een nieuwe 96-wellsplaat, zodat het monster 10 keer verdund wordt. Deze plaat wordt opnieuw 2 uur geïncubeerd bij 37°C, terwijl hij constant geschud wordt zodat de bacteriën kunnen groeien. Na twee uur wordt de bacteriële groei in de tweede plaat spectrofotometrisch gemeten ($\lambda=600\text{nm}$) en 30µl van iedere well werd verdund in een derde plaat, die reeds 120 µl lysisbuffer bevat. Om de β -galactosidase activiteit te meten, wordt aan iedere well 30 µl ONPG toegevoegd. De plaat wordt nu geïncubeerd bij 28 °C . Na 30 minuten wordt de β -galactosidase activiteit gestopt door toevoeging 120 µl Na₂CO₃. Het geelgekleurde ONPG-metaboliet o-nitrophenol kan nu spectrofotometrisch gemeten worden bij een golflengte van 420 nm.

Zowel de bacteriële groei en de β -galactosidase activiteit worden gecorrigeerd door de achtergrond waarde eraf te trekken en uitgedrukt als fractie van de controle activiteit, als inductiefactor. Door de inductiefactoren van de extracten te interpoleren in de ijklijn van de referentiemutagenen, kunnen de *umu*-responsen van de luchtmonsters uitgedrukt worden als equivalenten van 4-NQO of 2-AA. Een complete beschrijving van het gevolgde protocol staat in de afstudeerverslagen van Slootweg en Waanders [1, 2] .

Bijlage VI. Gegevens luchtfilters

Biesbosch

Nr	Datum	Windrichting	T	N	BaP (pmol/m ³)	2AA-eq (µg/m ³)	4NQO-eq (µg/m ³)	M ³
1	07-06-01	ZW	18		5.65	0.01	0.25	1558
2	13-06-01	NO	22		10.65	0.42	0.25	1501
3	28-06-01	ZW	24		6.19	0.00	0.30	1598
4	03-07-01	O	28		3.94	0.00	0.31	1513
5	05-07-01	ZO	19		9.38	2.57	0.29	1657
19	11-02-03	ZO	-1	0	53.43	2.05		1299.9
20	24-02-03	Z	0	0	193.91	1.62	1.152	1408.3
21	26-02-03	Z	-5	0	85.27	1.17	1.135	1406.1
22	03-03-03	ZO	8	0	73.18	0.58	0.679	1249.1
23	04-03-03	ZO	6	2	79.53	0.24	0.449	1514.0
24	05-03-03	Z	7	1	24.85	0.46	0.768	1270.7

Schiphol

Nr	Datum	Wind-richting	T	N	BaP (pmol/m ³)	2AA-eq (µg/m ³)	4NQO-eq (µg/m ³)	M ³
6	09-08-01	NO	18		20.63	0.18	0.38	1542
7	11-08-01	ZW	18		3.16	0.00	0.35	1805
8	14-08-01	ZW	28		7.48	3.94	0.37	1452
9	15-08-01	ZW	28		14.43	0.10	0.14	1453
10	17-08-01	N	23		15.94	0.44	0.57	1503
11	21-08-01	ZO	27		21.88	0.25	0.67	1455
12	22-08-01	NO	25		33.22	3.26	0.39	1467
44	23-01-03	ZW	4	4	30.67	0.23	0.385	1454.8
43	04-02-03	NW	3	6	29.73	0.37		1663.7
41	12-02-03	O	-3	0	74.90	1.23	1.484	1506.8
50	07-04-03	NO	3	0	25.42			1528.4
51	09-04-03	NO	3	0.5	17.80			1881.9
53	02-05-03	Z	12	9	15.42			1529.3

Bijlage VII. Gegevens wolmonsters

Plaats	Datum/weg	vet (mg)	wol (g)	mg vet/ g wol	BaP-eq (nmol/g vet)
Tilburg 1	19-01-03	2.79	0.2632	7.30	0.44
Tilburg 2	19-01-03	3.45	0.2770	4.17	0.17
Tilburg 3	19-01-01	8.56	0.2424	6.98	0.27
Tilburg 4	19-01-03	5.30	0.2762	6.86	0.25
Biesbosch	2001				0.54
Biesbosch 1	17-01-03	6.41	0.2518	62.15	1.29
Biesbosch 2	28-01-03	10.31	0.2542	36.25	0.56
Schiphol	2001				2.63
Schiphol 1	Fokkerweg 02-03	3.91	0.2563	43.80	2.55
Schiphol 2	Geniedijk 02-03	3.72	0.2496	77.00	1.93
Schiphol 3	Schipholweg 02-03	2.63	0.2520	54.07	4.76
Schiphol 4	Pekingweg 02-03	7.67	0.2485	58.29	2.36

