

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|----------|
| 1 | Umweltprobenbank des Bundes | 2 |
| 2 | Zielsetzung dieser Richtlinie | 2 |
| 3 | Begriffe | 2 |
| | 3.1 Cryobedingungen | 2 |
| 4 | Sicherheitshinweise für den Umgang mit Flüssigstickstoff | 2 |
| 5 | Lagerbetrieb | 2 |
| | 5.1 Gebäude | 2 |
| | 5.2 Systembeschreibung | 3 |
| 6 | Regulärer Betrieb | 3 |
| | 6.1 Sicherheitsregeln | 3 |
| | 6.2 Lagerungsbedingungen | 3 |
| | 6.3 Automatische Befüllungsregelung und Alarmsystem | 4 |
| | 6.4 Kontrolle | 4 |
| | 6.5 Reinigungsvorschrift | 4 |
| | 6.6 Wartung | 4 |
| | 6.7 Notfallvorkehrungen | 4 |
| 7 | Organisation eines Bereitschaftsdienstes für Störfälle | 4 |
| 8 | Dokumentation | 5 |
| 9 | Literatur | 5 |
| | Anhang A: Betriebsanweisung Flüssigstickstoff | 6 |
| | Anhang B: Produktdatenblatt Flüssigstickstoff | 7 |

**Verfahrensrichtlinien für Probenahme, Transport, Lagerung und chemische Charakterisierung von
Umwelt- und Humanproben**

Dezember 2008, V 2.0.0

1 Umweltprobenbank des Bundes

Die Umweltprobenbank des Bundes (UPB) ist ein Instrument der Umweltbeobachtung des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) unter fachlicher und administrativer Koordinierung des Umweltbundesamtes (UBA). Die UPB sammelt ökologisch repräsentative Umweltproben sowie Humanproben, lagert sie ein und untersucht sie auf umweltrelevante Stoffe.

Die Langzeitlagerung erfolgt unter Bedingungen, die eine Zustandsveränderung oder einen Verlust chemischer Eigenschaften über einen Zeitraum von mehreren Jahrzehnten weitestgehend ausschließen. Damit stellt das Archiv Proben für die retrospektive Untersuchung solcher Stoffe bereit, deren Gefährdungspotential für die Umwelt oder die menschliche Gesundheit heute noch nicht bekannt ist.

Umfassende Informationen zur UPB sind unter www.umweltprobenbank.de verfügbar.

2 Zielsetzung dieser Richtlinie

Diese Vorschrift gilt für biologische Umweltproben wie z.B. Blasentang, Brassenmuskulatur, Regenwurm, Fichtentriebe sowie abiotische Proben wie Boden und Schwebstoff.

Für die Lagerung in der UPB werden sämtliche Proben zum Zeitpunkt der Probenahme eingefroren, wobei anschließend die Kühlkette nicht mehr unterbrochen wird. Transport, Lagerung sowie Zerkleinerung und Homogenisierung des Probenmaterials findet deshalb unter Cryobedingungen (Temperatur unterhalb von ca. -130°C) unter Beachtung spezieller Sicherheitsbestimmungen statt.

Der besonders hohe Anspruch an Qualitätssicherung ergibt sich aus der außergewöhnlichen Bedeutung der Proben als Archivmaterial. Repräsentativität und Reproduzierbarkeit der Proben sind Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse in Zeit und Raum.

Ziel dieser Richtlinie ist die Bereitstellung von Informationen zur sicheren Lagerung von temperaturempfindlichen Proben unter Cryobedingun-

gen unter Beachtung der Arbeitssicherheitsvorschriften und ohne Minderung der Probenqualität bzw. ohne Veränderung der in den Proben enthaltenen Information zu Stoffgehalten.

3 Begriffe

3.1 Cryobedingungen

Cryobedingungen herrschen bei Temperaturen von unter ca. -130°C (ca. $< 140\text{ K}$). Die Temperatur liegt damit unter der Glasumwandlungstemperatur des Wassers. Es erfolgt keine Rekristallisation von Eis mehr und damit kein weiteres Wachstum von Eiskristallen (BURDEN 1999). So ist sichergestellt, dass in den Proben chemische Prozesse minimiert sind und morphologische Veränderungen z.B. durch weiteres Eiskristallwachstum verhindert werden. Bei Lagerung in der Gasphase über Flüssigstickstoff wird außerdem durch den verdampfenden Stickstoff im Probenlagerbehälter eine Inertgasatmosphäre erzeugt, die auch Veränderungen der Proben durch Sauerstoff aus der Umgebungsluft (Oxidationsprozesse) weitgehend verhindert.

4 Sicherheitshinweise für den Umgang mit Flüssigstickstoff

Achtung: Flüssigstickstoff ist tiefkalt (Gefahr der Haut- und Gewebeschädigung bei Kontakt) und wirkt bei Verdampfung erstickend. Wenn in geschlossenen Räumen mit Flüssigstickstoff umgegangen wird, ist eine ausreichende Belüftung sicherzustellen. Der Sauerstoffgehalt der Raumluft muss mit einem tragbaren Sauerstoffsensormessgerät bzw. mit einer fest installierten Sauerstoffmangelmeldeanlage überwacht werden (Einstellungen: z.B. Voralarm bei Sauerstoffgehalten $\leq 19\%$, Hauptalarm bei $\leq 17\%$).

Die Betriebsanweisung für Flüssigstickstoff ist zu beachten (Anhang A).

5 Lagerbetrieb

5.1 Gebäude

Für die Lagerung unter Cryobedingungen ist ein Raum bzw. Gebäude erforderlich, dass über eine geregelte Belüftung verfügt (z.B. drei- bis vierfacher Luftwechsel pro Stunde; gefilterte Zuluft), so dass Anreicherungen von verdampfenden

Stickstoff in der Raumluft verhindert werden. Außerdem sollte eine ständige Überwachung des Sauerstoffgehalts erfolgen. Der Zugang zum Gebäude darf nur befugten Personen möglich sein.

Die Proben lagern in separaten Gebäuden. Im Normalbetrieb erfolgt ein drei- bis vierfacher Luftwechsel pro Stunde. Im Notfallbetrieb (d.h. bei Absinken des Sauerstoffgehalts der Raumluft unter 17 %) wird automatisch auf einen sieben- bis achtfachen Luftwechsel pro Stunde umgestellt. Die Zuluft wird über Partikel- und Aktivkohlefilter gereinigt. In den Lagerhallen sind Sensoren installiert, die den Sauerstoffgehalt der Raumluft kontinuierlich überwachen. Der Zugang zum Lagergebäude wird elektronisch kontrolliert und ist nur autorisiertem Personal gestattet.

5.2 Systembeschreibung

Das System zur Cryolagerung von Proben besteht aus folgenden Komponenten:

1. Cryolagerbehälter mit Flüssigstickstoffkühlung: Behälter verschiedener Hersteller (z.B. Chronos 1400 von Fa. Cryotherm oder ABC 1400-B von Achenbach Buschhütten Cryotechnik, jeweils ca. 1400 L Rauminhalt).
2. Geräte zur Überwachung des Füllstands und zur Regelung der automatischen Befüllung der Cryolagerbehälter mit Flüssigstickstoff (ADUR-Geräte der Fa. Cryotherm).
3. Gerät zur Kontrolle von Alarmierungsparametern (z.B. Temperatur oder Flüssigstickstoffmangel) und zur möglichen Alarmierung über ein Textnachrichtenabsetzsystem bzw. ein Telefonwählgerät. Eingesetzt wird das Biosafe-System der Fa. Cryotherm wobei es sich um ein rechnergestütztes Überwachungssystem mit der Biosafe-Software handelt, die über zwei Programmgruppen zur Überwachung von jeweils bis zu 32 Cryolagerbehältern (Biosafe 1 und Biosafe 2, für insgesamt 64 Cryolagerbehälter) verfügt. Das System ist an die Gebäudeleittechnik angeschlossen, um Alarme per Mobiltelefon an die Bereitschaft melden zu können (Fehlertypen: z.B. Stickstoffmangel, Überfüllung, Temperaturüberschreitung). Weitere mögliche Störfälle im Lagergebäude werden ebenfalls erfasst und über die Gebäudeleittechnik an die Bereitschaft

gemeldet (z.B. Stromausfall, Rechnerausfall, Sauerstoffmangel).

4. Vakuumisolierte Leitungen zur Versorgung der Cryolagerbehälter mit Flüssigstickstoff (Fa. Cryotherm).
5. Je nach System evtl. ein Phasentrenner, zur Abtrennung von gasförmigen Stickstoff, um die vakuumisolierten Leitungen immer vollständig mit Flüssigstickstoff gefüllt zu halten (Fa. Cryotherm).
6. Vorratstank für Flüssigstickstoff (Miettank der Fa. Air Liquide, Kapazität ca. 14000 L, ausreichend für mindestens 10 Tage; wöchentliche Befüllung).
7. Probenlagersystem, bevorzugt aus Metall: Kanister und Lagergestelle aus Aluminium, die speziell für Probenfläschchen vom Typ „Szintillationsvials“ (Durchmesser ca. 26 mm; Höhe ca. 58 mm; Volumen ca. 20 mL) oder für 100 mL Duranglas-Flaschen mit Schraubdeckeln konzipiert und angefertigt sind. Zur Probenaufarbeitung angeliefertes Roh-Probenmaterial wird in Edelstahlbehältern (genormte 1,5 L-, 3,5 L- oder 5,5 L-Behälter mit quadratischer Grundfläche aus dem Gastronomiebedarf) direkt in den Cryolagerbehältern gelagert (zur leichteren Entnahme vorwiegend in 1000 L-Cryolagerbehältern).
8. Flüssigstickstoff der Qualität 5.0 ($\geq 99,999\%$; z.B. Fa. Air Liquide, Produktnummer 0319; siehe Datenblatt in Anhang B).

6 Regulärer Betrieb

6.1 Sicherheitsregeln

Die Betriebsanweisung für den Umgang mit Flüssigstickstoff ist zu beachten (Anhang A). Die Überwachung des Sauerstoffgehalts der Atemluft erfolgt mit einem fest installierten System bzw. mit tragbaren Sauerstoffsensoren. Die Belüftung des Lagerraums muss gewährleistet sein. Beim Umgang mit Flüssigstickstoff ist Schutzkleidung zu tragen (Schutzbrille, Kittel, Isolierhandschuhe).

6.2 Lagerungsbedingungen

Alle Proben werden in der Gasphase über flüssigem Stickstoff gelagert. Die Abdampftrate beträgt nach Herstellerangaben ca. 1 % des

Behältervolumens an Flüssigstickstoff pro Tag bei geschlossenem Behälter (d.h. ca. 14 L pro 1400 L-Behälter) bzw. ca. 20 L Flüssigstickstoff pro Tag bei durchschnittlicher Handhabung (gelegentliche Probenentnahme aus dem bzw. Einlagerung in den Cryolagerbehälter). Bei Erreichen des unteren Pegels wird automatisch das Magnetventil geöffnet und Flüssigstickstoff aus dem Phasentrenner nachgefüllt.

6.3 Automatische Befüllungsregelung und Alarmsystem

Um die Befüllung der Cryolagerbehälter jederzeit sicherzustellen, ist immer die „automatische Befüllung“ an den ADUR-Geräten einzustellen.

Die Abdeckklappen der Geräte sind verschlossen zu halten, um ein unbeabsichtigtes Umstellen eines Behälters in den manuellen Füllbetrieb zu verhindern. An der Füllstandsanzeige des ADUR-Geräts lässt sich der Befüllungsgrad mit Flüssigstickstoff an fünf Leuchtdioden erkennen: "Alarm oben" - "Maximum" - "Füllen" - "Minimum" - "Alarm unten". Bei normaler Funktion erfolgt die Füllung automatisch beim Unterschreiten des unteren Füllstandes "Minimum". Es kann aber auch manuell nachgefüllt werden.

6.4 Kontrolle

Das gesamte Lagersystem ist arbeitstäglich zu kontrollieren (visuelle Kontrolle der Cryolagerbehälter, Kontrolle am Rechner über den Überwachungsrechner). Der Vorratstank ist regelmäßig zu befüllen (üblicherweise einmal pro Woche). Insbesondere vor Feiertagen ist sicherzustellen, dass genügend Flüssigstickstoff zur Verfügung steht. Gegebenenfalls ist kurzfristig eine zusätzliche Lieferung zu organisieren. Eine entsprechende Vereinbarung ist mit dem Flüssigstickstoff-Lieferanten zu treffen.

Falls ein EDV-System zur Überwachung und Protokollierung der Alarme eingesetzt wird, ist in regelmäßigen Abständen eine Datensicherung durchzuführen. Im Falle des Biosafesystems muss dieser Vorgang separat für die zwei Programmgruppen erfolgen (Gruppe Biosafe 1 bzw. Biosafe 2).

6.5 Reinigungsvorschrift

Falls eine Reinigung erforderlich ist, werden die entleerten Cryolagerbehälter auf Raumtemperatur erwärmt. Die Oberflächen werden mit einem milden Reinigungsmittel abgewaschen. Der Behälter wird gründlich getrocknet. Erst nach dem Trocknen wird der Deckel wieder aufgesetzt. Durch die Reinigung soll eine Verunreinigung der Proben ausgeschlossen und eine Gesundheitsgefährdung durch mikrobiellen Befall verhindert werden.

6.6 Wartung

Es wird empfohlen, die gesamte Flüssigstickstoffanlage jährlich durch einen Fachbetrieb überprüfen zu lassen. Dabei wird die Funktionsfähigkeit aller Komponenten geprüft. Dies umfasst z.B. die Überprüfung und eventuelle Justierung der Sensoren zur Erfassung des Füllstands mit Flüssigstickstoff in den Cryolagerbehältern sowie Funktionstest zur Alarmierung.

6.7 Notfallvorkehrungen

Für den Notfall sind geeignete Vorkehrungen zu treffen. So ist sicherzustellen, dass bei Ausfall eines Cryolagerbehälters ein Reservebehälter zur Verfügung steht. Bei Stromausfall über mehrere Stunden ist die manuelle Befüllung der Cryolagerbehälter sicherzustellen (gegebenenfalls auch außerhalb der regulären Arbeitszeit durch Bereitschaftspersonal).

Bei Flüssigstickstoffmangel (z.B. bei Auslaufen des Vorratstanks durch Fehlbedienung) muss kurzfristig eine Ersatzlieferung erfolgen. Hierzu ist eine Vereinbarung mit dem Lieferanten zu treffen.

7 Organisation eines Bereitschaftsdienstes für Störfälle

Falls der Betrieb der Stickstoffanlage zur Versorgung der Cryolagerbehälter mit Flüssigstickstoff gestört ist, wird eine Fehlermeldung ausgegeben, damit das Bereitschaftspersonal informiert wird. Ein entsprechender Bereitschaftsdienst (mindestens sechs Personen im wöchentlichen Wechsel) kompetenter Personen ist sicherzustellen.

Die Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen sind in den Umgang mit der Flüssigstickstoffanlage eingewiesen, so dass sie die meisten Störungen direkt

beheben können. Die Alarmierung erfolgt über das Hausalarmsystem, das Textnachrichten auf das Mobiltelefon des Bereitschaftspersonals sendet. Der Alarm wird quittiert. Bei relevanten Störungen muss die Bereitschaftsperson dann kurzfristig den Fehler vor Ort in Augenschein nehmen und geeignete Maßnahmen zur Behebung ergreifen. Gegebenenfalls ist aus Sicherheitsgründen eine zweite Person hinzuzuziehen (bei Umgang mit Flüssigstickstoff). Hierzu steht eine separate Arbeitssicherheitsbereitschaft ebenfalls rund um die Uhr zur Verfügung.

Bei Störungen, die nicht durch das eigene Personal zu beheben sind, ist der Notdienst der Firma, die die Flüssigstickstoffanlage wartet, in Anspruch zu nehmen.

8 Dokumentation

Alle besonderen Vorkommnisse sind zu protokollieren und an die für die Probenlagerung verantwortliche Person zu melden. Der Lagerbestand ist zu dokumentieren.

Alle wichtigen Ereignisse müssen in einem Lagerbuch protokolliert werden. Die Alarmer der Cryolagerbehälter werden elektronisch gespeichert (Biosafe-System).

Der jeweilige Lagerbestand wird in einer Microsoft Access-Datenbank dokumentiert, aus der Lagerbestandsberichte abgerufen werden können. Mindestens einmal pro Jahr wird ein Lagerbestandsbericht angefertigt.

9 Literatur

BMU (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Hrsg.) (2008): Umweltprobenbank des Bundes – Konzeption (Stand: Oktober 2008); www.umweltprobenbank.de

Burden, D. W. (1999): Issues in Contamination and Temperature Variation in the Cryopreservation of Animal Cells and Tissues. Revco Technologies, Asheville, NC 28806 (USA), Application Note 99-08.

Umweltbundesamt (1996): Umweltprobenbank des Bundes - Verfahrensrichtlinien. Herausgeber: Umweltbundesamt, Berlin. Erich Schmidt Verlag, Berlin.

Anhang A: Betriebsanweisung Flüssigstickstoff

GEFAHREN FÜR MENSCH UND UMWELT

Flüssiger, tiefkalter Stickstoff verursacht bei Kontakt mit Augen oder Haut schwerste Erfrierungen mit verbrennungsartigen Schäden (Rötung, Schwellung, Blasenbildung), bis hin zu tiefen Gewebeerstörungen. Das kalte Gas ist schwerer als Luft, kriecht am Boden entlang und kann den Sauerstoff in tieferen Räumen verdrängen. 1 Liter flüssiger Stickstoff entwickelt ca. 650 Liter Gas! Bei Konzentrationen über 85 % in der Atemluft tritt Sauerstoffmangel ein (Symptome: Schläfrigkeit, Unwohlsein, Blutdruckanstieg, Atemnot), ab 88% sofortige Bewusstlosigkeit und Erstickungsgefahr!

SCHUTZMAßNAHMEN UND VERHALTENSREGELN

Der Transport und Umgang mit flüssigem Stickstoff darf nur in geeigneten Cryogefäßen oder kältebeständigen Geräten erfolgen. Niemals große Mengen in kleinen, schlecht belüfteten Räumen handhaben. Kontakt der tiefkalten Flüssigkeit/Gas mit Haut und Augen unbedingt vermeiden. Kältebeständige Schutzkleidung, gegen "Hineinlaufen" geschützte Schuhe, Schutzhandschuhe aus Leder und Vollsichtbrille benutzen. Bei unvermeidbarer oder zu erwartender hoher Gasfreisetzung Isoliergerät verwenden. Bei Arbeiten in engen oder nicht ausreichend belüftbaren Räumen ist eine weitere Person außerhalb des Gefahrenbereiches erforderlich, die ggf. Rettungsalarm auslöst.

VERHALTEN IM GEFAHRFALL

Brand: Stickstoff brennt nicht. Löschmaßnahmen auf die Umgebung abstimmen. Kann ein Umgebungsbrand nicht unmittelbar gelöscht werden, Gefahrenbereich sofort verlassen. Niemals flüssigen Stickstoff zum Löschen in die Flammen gießen! Bei Freisetzung größerer Mengen Stickstoff sofort KollegInnen warnen, Gefahrenbereich verlassen und nur wieder mit Isoliergerät betreten. Falls möglich Leck abdichten. Der Gefahrenbereich darf ohne Isoliergerät erst nach gründlicher Be- und Entlüftung wieder betreten werden (falls erforderlich, Sauerstoff-Konzentration messen).

ERSTE HILFE

Einatmen: Sofort an die frische Luft bringen, falls erforderlich Atemspende mit Maske und AMBU-Beutel. Arzt hinzuziehen! Augenkontakt: Sofort Augenarzt hinzuziehen! Hautkontakt: Steifgefrorene Körperteile nicht reiben oder bewegen, vorsichtig mit (kaltem) Wasser auftauen, Kleidung entfernen und Haut mit sterilem Verbandmaterial lose abdecken. Arzt hinzuziehen!

SACHGERECHTE ENTSORGUNG

Im Freien langsam verdampfen lassen. Dabei Gefäßöffnung lose abdecken um die Kondensation und Anreicherung von Sauerstoff aus der Luft im Flüssigkeitsrest zu vermeiden.

Anhang B: Produktdatenblatt Flüssigstickstoff



Produktdatenblatt Technische Gase

Stickstoff flüssig reinst

Produktnummer
0319

| | | | | |
|----------------------------------|--|--|--|-------|
| Reinheit in Vol-%: | ≥ 99,999 % | | | |
| Fremdgase: | O ₂ | ≤ | 2 ppm (v/v) | |
| | H ₂ O | ≤ | 1 ppm (v/v) | |
| Sicherheitsdaten: | EG-Sicherheitsdatenblatt gemäss TRGS 220 (auf Anfrage) | | | |
| Umrechnungsfaktoren: | | m ³ Gas (1 bar und 15°C) | Liter Flüssigkeit (Siedetemperatur bei 1 bar) | kg |
| | m ³ | 1 | 1,448 | 1,170 |
| | Liter | 0,691 | 1 | 0,808 |
| | kg | 0,855 | 0,238 | 1 |
| Formel: | - N ₂ | | | |
| Haupteigenschaften: | <ul style="list-style-type: none"> - inert, nicht brennbar - nicht giftig, erstickend in hohen Konzentrationen - tiefgekühlt flüssiges Gas kann Erfrierungen hervorrufen - Konzentration in der Luft 78,08 Vol.% | | | |
| Phys-Chem. Eigenschaften: | Aussehen: | farblos | | |
| | Geruch: | geruchlos | | |
| | Molmasse: | 28,01 g/mol | | |
| | Zustand bei 20°C: | gasförmig | | |
| | Tripelpunkt: | -210°C (bei 1,013 bar) | | |
| | Siedepunkt: (Sublimation) | -196 °C (bei 1,013 bar) | | |
| | Kritische Temperatur: | -147°C | | |
| | Kritischer Druck: | 34 bar | | |
| | Dichte, flüssig,(Siedetemp., 1bar): | 812 kg/m ³ | | |
| | Dichte, gasf., (15°C, 1 bar): | 1,17 kg/m ³ | | |
| | Relative Dichte, gasf., (Luft = 1): | 0,97 | | |
| | Löslichkeit in Wasser (20°C, 1 bar): | 20 mg/l | | |
| Anwendungen: | Stickstoff wird industriell zum Spülen und Inertisieren von Atmosphären, zum Entgasen von Flüssigkeiten sowie als Kühl- und Gefriermittel eingesetzt. | | | |
| Andere Lieferformen | Gasförmig in verschiedenen Qualitäten in Stahlflaschen, einzeln oder in Bündeln. | | | |