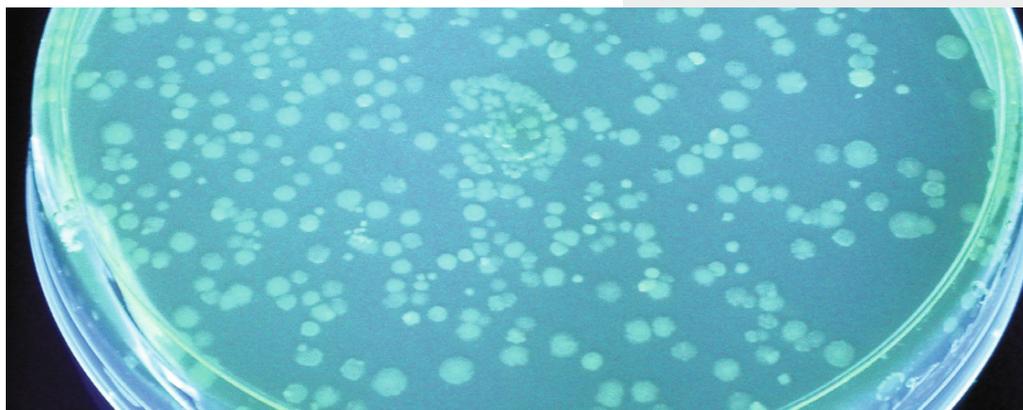


FUELS JOINT
RESEARCH GROUP



Band 17

Jörn Bünger

Gentoxizität von Dieselmotoremissionen bei der Verbrennung von Pflanzenölen, Mineralöldiesel und deren Mischkraftstoffen

Herausgeber: Jürgen Krahl, Axel Munack, Peter Eilts, Jürgen Bünger



Cuvillier Verlag Göttingen



Gentoxizität von Dieselmotoremissionen bei Verbrennung von Pflanzenölen, Mineralöldiesel und deren Mischkraftstoffen





Aus der Abteilung Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin
(Prof. Dr. med. E. Hallier)
im Zentrum Arbeits-, Sozial-, Umweltmedizin und Dermatologie, Venerologie und
Allergologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Gentoxizität von Dieselmotoremissionen bei Verbrennung von Pflanzenölen,
Mineralöldiesel und deren Mischkraftstoffen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Jörn Bünger
aus
Göttingen
Göttingen 2013



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2016

Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2013

Dekan : Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. E. Hallier

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2016

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2016

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9232-0

eISBN 978-3-7369-8232-1



Gliederung

1. Einleitung	7
1.1. Dieseldieselkraftstoffe auf Basis von Pflanzenölen	7
1.2. Dieselmotoremissionen (DME)	9
1.3. Gesundheitliche Effekte	12
1.3.1. Nicht kanzerogene Effekte	12
1.3.2. Kanzerogene Effekte	13
1.3.2.1. Epidemiologische Studien	13
1.3.2.2. Tierstudien	21
1.3.2.3. <i>In-vitro</i> -Studien	22
1.4. Fragestellungen der Studie	25
2. Material und Methoden	27
2.1. Material	27
2.1.1. Kraftstoffe	27
2.1.2. Motor	28
2.1.3. Materialien für die Soxhlet-Extraktion	31
2.1.4. Materialien für den Ames-Test	31
2.2. Methoden	32
2.2.1. Probenahme	32
2.2.2. Soxhlet-Extraktion	34
2.2.3. Bakterieller Rückmutationstest (Ames-Test)	35
2.2.4. Auswertung	38
3. Ergebnisse	39
3.1. Positiv- und Negativkontrollen	41
3.2. Partikelmasse	41



3.3.	Mutagenität der Partikulate	42
3.4.	Mutagenität der Kondensate	45
4.	Diskussion	48
4.1.	Einflussfaktoren auf die Mutagenität der DME	48
4.1.1.	Toxizität	49
4.1.2.	S9-Mix	49
4.1.3.	Kontrollen	50
4.1.4.	Partikelmassen	50
4.1.5.	Mutagenität der DME bei Verbrennung von Pflanzenölen	51
4.1.6.	Mutagenität der DME bei Verbrennung von Blends	56
5.	Zusammenfassung	58
6.	Ausblick	60
7.	Literaturverzeichnis	61
8.	Abkürzungsverzeichnis	69

1. Einleitung

1.1. Dieselkraftstoffe auf Basis von Pflanzenölen

Die Verwendung von Pflanzenölen als Kraftstoff für Dieselmotoren ist von vielen landwirtschaftlichen Betrieben und Speditionsunternehmen als finanziell günstige Alternative zu herkömmlichen Dieselkraftstoffen (DK) entdeckt worden. Im Vergleich zu Pflanzenölmethylestern und Kraftstoffen aus Erdöl werden die nativen, nicht umgeesterten Pflanzenöle niedriger besteuert und somit für Betriebe mit hohem Treibstoffverbrauch zu einer wirtschaftlich interessanten Alternative. Ohne den Prozess der Umesterung (s. Abbildung 1) sinken zusätzlich die Produktionskosten im Vergleich zu Biodiesel und damit auch der Kaufpreis.

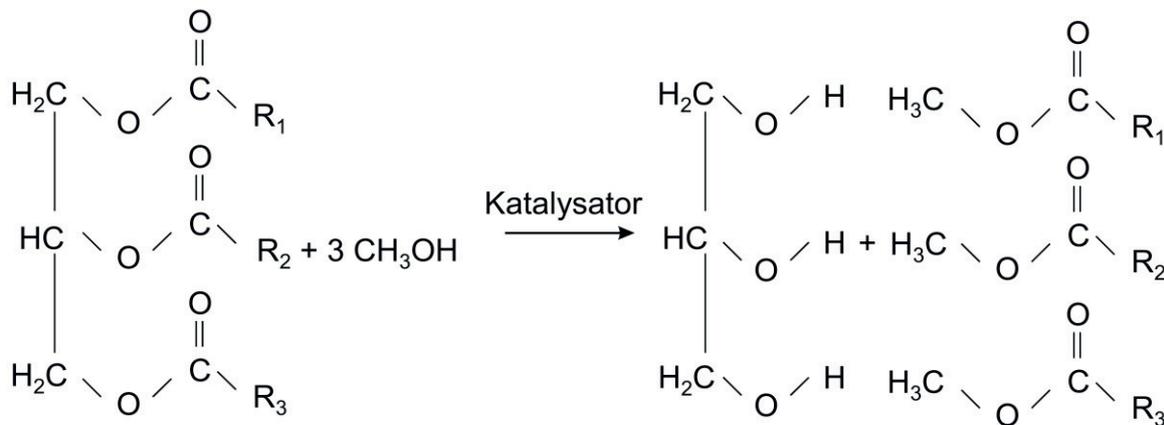


Abbildung 1: Stöchiometrische Gleichung der Umesterung von Pflanzenöl (Triglyceride) zu Fettsäuremethylestern (FSME).

Auf Grund des Preisvorteils von ca. 30 Cent pro Liter Kraftstoff sind Nachfrage und Angebot stark gewachsen, wie die Abbildung 2 zeigt.

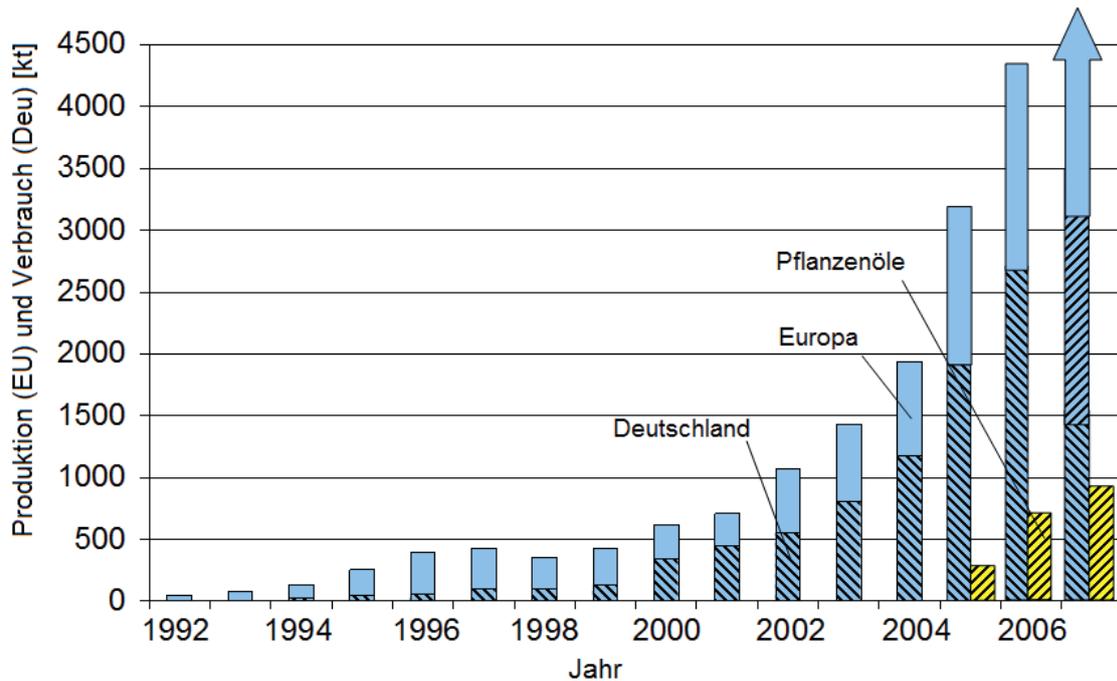


Abbildung 2: Biodieselproduktion in Europa und der Verbrauch von FSME (Biodiesel) und Pflanzenölen in Deutschland.

Zunächst wurde Anfang der 1980er Jahre Biodiesel als Reinkraftstoff (B100) auf den Markt gebracht.

Um die Abhängigkeit von den ölfördernden Staaten zu verringern und der erwähnten Erdölknappheit entgegenzuwirken, können DK in der Europäischen Union mit bis zu 7% biogenem Kraftstoff (B7) gemischt werden. In den USA wird die Beimischung von bis zu 20% Biodiesel (B20) steuerlich begünstigt, wodurch besonders die großen Logistikunternehmen einen wirtschaftlichen Vorteil haben, wenn sie diese Mischkraftstoffe nutzen. Die Mischungen von herkömmlichen DK und Biodiesel heißen Blends. Sie zeigen ein Phänomen, das von Fang und McCormick (2006) beschrieben wurde. Es findet eine Ausflockung durch die Mischung von Biodiesel und herkömmlichen DK statt, die ihr Maximum bei einer 20%igen Zugabe von Biodiesel erreicht. Das dadurch entstehende Sediment kann eine verschlechterte Verbrennung des Treibstoffs zur Folge haben, wodurch auch die Mutagenität der entstehenden Abgase beeinflusst werden kann (Krahl et al. 2008, Bünger et al. 2009).

Eine neue Alternative zu Blends und reinem Biodiesel ist die Hydrierung des Pflanzenöls, sogenanntes *Hydrotreating*. Als Kraftstoff resultiert HVO (*hydrotreated*



vegetable oil). Erste Ergebnisse lassen darauf schließen, dass dieser Kraftstoff sauberer verbrennt und damit weniger toxische Abgase ausstößt. Dadurch sinkt möglicherweise die Umweltbelastung und das mutagene Risiko (Krahl et al. 2011).

1.2. Dieselmotoremissionen (DME)

Durch die Kraftstoffverbrennung im Dieselmotor entstehen Emissionen, die sich in eine Gas- und eine Partikelphase teilen lassen. Die wesentlich größere Fraktion stellt die Gasphase dar. Sie besteht unter anderem aus Kohlenstoffmonoxid (CO), Kohlenstoffdioxid (CO₂), Stickstoffmonoxid (NO) und Stickstoffdioxid (NO₂), Schwefelmonoxid (SO) und Schwefeldioxid (SO₂) sowie einer Vielzahl von Kohlenwasserstoffen (*hydrocarbons*, HC). Die kleinere, partikuläre Phase setzt sich vorwiegend aus Ruß, Schmierölbestandteilen, höher molekularen Kohlenwasserstoffen und unverbranntem Kraftstoff zusammen. Sie lässt sich in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion teilen. Während Ruß den Großteil der unlöslichen Partikelmasse (UPM) stellt, sind in der löslichen organischen Fraktion (LOF) u.a. die polyzyklischen, aromatischen Kohlenwasserstoffe (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAH) und deren substituierte Produkte, z.B. die Nitro-PAH (nPAH), enthalten (Scheepers und Bos 1992 a, HEI 1995). Für PAH und nPAH ist eine mutagene und DNA-reaktive Wirkung erwiesen, ebenso wie ihr kanzerogener Effekt auf Nagetiere (Rosenkranz 1996, US-EPA 2002). Insbesondere den nPAH wird ein hohes direktes mutagenes Potenzial zugeschrieben (Hayakawa et al. 1997, Westerholm et al. 2001, Heeb et al. 2008).

Aufgrund von Gesundheitsrisiken und unter Umweltschutzaspekten werden der Ausstoß von HC, CO, Stickoxiden (NO_x) und die Partikelmasse (PM) bei Pkw und Lkw von der Europäischen Union stark reglementiert. Neben diesen limitierten gibt es jedoch auch die nicht-limitierten Abgasbestandteile, wie z.B. die PAH und nPAH.

Auf den Erkenntnissen basierend, dass

1. Mäuse nach Hautkontakt mit extrahierten Dieselaabgaspartikeln Hauttumore bekamen (Kotin et al. 1955),

2. die Mutagenität der Partikelextrakte im Ames-Test nachgewiesen wurde (Huisingh et al. 1978),
3. Ratten nach dem Inhalieren von Dieselabgasen über 2 Jahre Lungentumore entwickelten (Heinrich et al. 1986 a) und
4. die Mortalität an Lungenkrebs bei beruflich gegenüber DME exponierten Menschen erhöht ist (HEI 1999),

erklärte die *U.S. Environmental Protection Agency* 2002 DME als wahrscheinlich kanzerogen für Menschen (US-EPA 2002). In Deutschland wurden Dieselabgase von der Deutschen Forschungsgemeinschaft bereits 15 Jahre früher als krebserregend eingestuft (DFG 1987). Die IARC stufte auf Grund der Studien von Attfield et al. (2012) und Silverman et al. (2012) im Juni 2012 die kanzerogene Wirkung von DME bei Menschen als ausreichend bewiesen ein. Die Reglementierungen der EU und der U.S.A. beschränken sich jedoch bislang auf HC, CO, NO_x und PM. PAH, Aldehyde und andere toxische Abgasbestandteile werden nicht reguliert, obwohl ihre gesundheitsschädigende Wirkung bekannt ist (Hasford et al. 1998).

Um sowohl die limitierten als auch die nicht limitierten Emissionen zu senken und die europäischen Grenzwerte einzuhalten, verbessern die Autohersteller stetig die Verbrennung des Treibstoffs und die Abgasnachbehandlung. Aber auch die Wahl des Kraftstoffs ist für die Höhe der Emissionen ausschlaggebend.

Krahl et al. untersuchten 2007 in einer Studie die Abgase von sechs unterschiedlichen Kraftstoffen, unter anderem DK, Rapsölmethylester (RME) und Rapsöl (RÖ). Der HC-Ausstoß lag bei allen Treibstoffen weit unterhalb des EU-Limits: herkömmliche DK bis zu 40mal niedriger und RME sogar nochmal darunter. Nur reines RÖ erzielte einen lediglich 25mal niedrigeren Wert als die Euro-III-Norm. Auch die gemessenen CO-Werte erfüllten bei allen Kraftstoffen die Auflagen, wobei RME wieder den deutlich geringsten Ausstoß aufwies. Bei den NO_x lagen sowohl RÖ als auch RME knapp über der Grenze von 5 g/kWh, während DK-Emissionen knapp unterhalb des Limits blieben. Bei PM fiel nochmals RÖ durch den höchsten Wert auf, der knapp unter der Euro-III-Norm lag. RME hatte erneut die niedrigsten Emissionen. Allein aus diesen Werten ließ sich also nicht darauf schließen, dass DME bei Betrieb mit RÖ ein erhöhtes Gesundheitsrisiko darstellen könnten.

In der gleichen Untersuchung maßen Krahl et al. (2007) auch die Größe der Partikel und deren Anzahl. Auffällig war ein sehr hoher Anteil an ultrafeinen Partikeln bei der Verbrennung von RME. Feinstaub wird abhängig von seiner Größe in drei Fraktionen eingeteilt. Als PM_{10} werden Partikel $\leq 10\mu\text{m}$ bezeichnet, $PM_{2,5}$ umfasst jene $\leq 2,5\mu\text{m}$. Die ultrafeinen Partikel (UFP) sind $\leq 0,1\mu\text{m}$ groß. Der Durchmesser beeinflusst wesentlich die Eindringtiefe der Partikel in die unteren Atemwege. Der Großteil der eingeatmeten PM_{10} lagert sich bereits in der Trachea, den Hauptbronchien und Segmentalbronchien ab. Der Zilienschlag des Flimmerepithels befördert die Partikel in Richtung Rachen, wo sie verschluckt oder ausgehustet werden. $PM_{2,5}$ erreicht die Bronchioli terminales und die folgenden Atemwege. Das Epithel verfügt nicht mehr über Kinozilien, wodurch der Abtransport erschwert ist und sich die lokale Verweildauer der Partikel erhöht (Lüllmann-Rauch 2003). Dadurch steigt die Einwirkungsdauer von Schadstoffen wie der PAH und eine intrazelluläre Aufnahme in die Zelle wird ermöglicht. Auch die systemische Aufnahme in den Organismus wird möglich. Es steigt die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Krebs nicht nur im Organ der primären Einwirkung, sondern auch in weiteren wie z. B. der Harnblase (Pukkala et. al. 2009, Rushton et al. 2010).

Partikel und PAH werden zusammen mit den NO_x als die wesentlichen gesundheitsgefährdenden Inhaltsstoffe von DME betrachtet und auf Grund ihrer Effekte auf respiratorische und kardiovaskuläre Krankheiten sowie Lungenkrebs mit Bedenken beobachtet (EEA 2010, HEI 2010).

Zu den potenziell gesundheitsschädlichen Emissionen zählen unter anderen auch Aldehyde, PAH, Benzol, Toluol und Sulfoxide (SO_x). Ihr Ausstoß ist gesetzlich nicht begrenzt. Trotzdem wird ihre Wirkung untersucht. So ist beispielsweise bekannt, dass Aldehyde und SO_x einen reizenden Effekt auf das Schleimhautepithel des Respirationstraktes und der Augen haben (Scheepers und Bos 1992 b). SO_x spielen aber durch die weitgehende Entschwefelung des DK von früher bis zu 500 ppm auf jetzt weniger als 10 ppm kaum noch eine Rolle als Abgaskomponente von Dieselmotoren.

1.3. Gesundheitliche Effekte

1.3.1. Nicht kanzerogene Effekte

Hasford et al. (1998) beschäftigten sich in der bislang einzigen Studie an Menschen mit akuten, nicht kanzerogenen Gesundheitsrisiken von Biokraftstoffen im Vergleich zu herkömmlichem Mineralöldieselmotorkraftstoff. Die Probanden wurden in zwei Gruppen geteilt und entweder DME von DK oder RME ausgesetzt. Reizungen von Schleimhäuten und Atemwegen sowie ein unangenehmer Geruch wurden von der RME-Gruppe signifikant häufiger angegeben, generelle gesundheitliche Einschränkungen hingegen seltener als in der Kontrollgruppe. Auffällig war in beiden Gruppen, dass Probanden, die über den Geruch klagten, auch häufiger von anderen Symptomen berichteten. Im Lungenfunktionstest konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Den DME werden auch weitere akute bzw. subchronische gesundheitliche Effekte zugeschrieben, darunter Exazerbationen von Asthma, COPD, Verschlechterung kardiovaskulärer Krankheiten und allergische Reaktionen (Dockery und Pope 1994, Katsouyanni et al. 1997, Morgenstern et al. 2008).

Wichmann (2004) schätzte, dass 1% bis 2% der 800.000 Todesfälle in Deutschland durch DME verursacht sind, darunter 8.000 bis 17.000 durch Atemwegs- oder Herz-Kreislaufkrankheiten. Studien zu nicht kanzerogenen Effekten von DME sind von Hesterberg et al. (2009) auf ihre Limitationen überprüft und in einem Review zusammengefasst worden, in dem er auf große Unsicherheiten bei quantitativen Abschätzungen aus den vorliegenden epidemiologischen Studien verweist.

1.3.2. Kanzerogene Effekte

Die mutagene und kanzerogene Wirkung von DME werden seit über 30 Jahren intensiv in epidemiologischen und tierexperimentellen Studien sowie mittels *in-vitro*-



Assays untersucht. Nach dem Rauchen stellen laut Robert-Koch-Institut (2012) die Dieselabgase von allen Luftschadstoffen den wichtigsten Risikofaktor für Lungenkrebs in Deutschland dar.

1.3.2.1. Epidemiologische Studien

In epidemiologischen Kohorten- und Fall-Kontroll-Studien wurde seit Beginn der 1980er Jahre die krebserregende Wirkung von DME erforscht. Die Untersuchungen werden jedoch dadurch erschwert, dass Lungenkrebs eine Latenzzeit im Mittel von ca. 30 Jahren bis zur Manifestation hat. Daher sind entweder langfristig angelegte oder retrospektive Studien nötig. Umweltfaktoren wie Rauchen, Feinstaub und Industrieemissionen beeinflussen zusätzlich die Auswertbarkeit der erhobenen Daten. Diese Einflüsse werden als Confounder bezeichnet.

Kohortenstudien

In einer Kohortenstudie verglichen Howe und Lindsay (1983) die Mortalität von 43.826 männlichen Pensionären der *Canadian National Railway Company* mit der Mortalität in der kanadischen Bevölkerung zwischen 1965 und 1977. In Nordamerika wurden seit den 1950er Jahren im Schienenfernverkehr Dampf- zunehmend durch Diesellokomotiven ersetzt. Die Kohorte wurde von Experten anhand ihrer Aufgaben im Beruf in drei Expositionsgruppen unterteilt, nämlich Personen die nicht, möglicherweise, oder wahrscheinlich gegenüber DME exponiert waren, wobei die Kriterien, nach denen zugeordnet wurde, nicht näher dargelegt sind. Das relative Risiko (RR) für möglicherweise und wahrscheinlich gegenüber DME Exponierte, an Lungenkrebs zu erkranken, lag bei 1,2 bzw. 1,3. Auf Grund der unvollständigen beruflichen Vorgeschichte konnte die Belastungsabschätzung nur eingeschränkt durchgeführt werden. Die Exposition bestand bei einem großen Teil der Kohorte neben DME auch aus Kohlenstaub und Rauch aus Dampflokomotiven, wodurch keine sichere Aussage zum Risiko durch DME allein getroffen werden konnte.



In einer retrospektiven Kohortenstudie untersuchten Garshick et al. (2004) 43.593 Todesfälle bei weißen männlichen Eisenbahnarbeitern aus den U.S.A. im Zeitraum von 1959 bis 1996. Von den Todesfällen waren 4.351 durch Lungenkrebs bedingt. Die Kohorte wurde nach ihren Arbeitsbereichen in vier Gruppen geteilt, nämlich nicht gegenüber DME Exponierte, Ingenieure, Rangierer und Werkstattarbeiter. Die Arbeiter waren zu Beginn der Studie zwischen 40 und 64 Jahre alt und bereits 10 Jahre und länger in dem Beruf tätig. Aus der Studie wurden die Arbeiter mit Asbestexposition ausgeschlossen. Das statistisch signifikant erhöhte relative Risiko (RR), an Lungenkrebs zu sterben, betrug 1,40 (95% Konfidenzintervall (KI) = 1,30-1,51). Als die Qualität einschränkender Faktor muss gelten, dass nur die Expositionszeit als Maß für die Expositions-dosis diente. Außerdem wurde der Einfluss des Rauchens nicht berücksichtigt. Allerdings hatten Garshick et al. (1987) in einer vorausgegangenen Fall-Kontroll-Studie aus derselben Kohorte den Zigarettenkonsum der Probanden bereits erfasst und konnten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe feststellen. Auch mit diesen Einschränkungen weisen die Ergebnisse dieser Studie auf ein erhöhtes RR hin, bei berufsbedingter DME-Exposition an Lungenkrebs zu erkranken.

In einer Kohortenstudie von Säverin et al. (1999) wurden 5.536 Arbeiter aus deutschen Kalibergwerken untersucht, in denen dieselgetriebene Fahrzeuge und Maschinen betrieben wurden. Die Kohorte wurde in drei Kategorien nach ihrer Belastungsschwere aufgetrennt. Eine Subkohorte wurde aus 3.258 Männern gebildet, die schon länger als 10 Jahre unter Tage arbeiteten. Zur Ermittlung des Expositionsgrades wurden Luftproben aus den Schächten genommen und auf die DME-Belastung untersucht. Des Weiteren wurden die berufliche Vorgeschichte, persönliche Daten sowie das Rauchverhalten erfragt. Auf Grund der relativ geringen Zahl und des verhältnismäßig jungen Alters der Probanden sind die Ergebnisse trotz des deutlich erhöhten RR von 1,68 und 2,7 (95% KI = 0,49-5,8 und 0,52-14,1) für die Kohorte bzw. Subkohorte statistisch nicht signifikant. Darüber hinaus wurden zwischen 1970 und 1990 auch alle Arbeiter in die Kohorte aufgenommen, die wenigstens 1 Jahr im Bergbau gearbeitet hatten, so dass ein Teil der Probanden erst sehr kurz und damit insgesamt niedrig exponiert war. Außerdem ist das Follow-up der Studie mit 25 Jahren Laufzeit vielleicht etwas zu kurz gewählt bei einer Lungenkrebslatenzzeit von 30 Jahren und mehr. Trotz dieser Limitationen deutet auch diese Studie auf einen kausalen Zusammenhang zwischen DME-Exposition

und Lungenkrebs hin (US-EPA 2002). Die Stärke der Studie sind die Expositionsmessungen, durch die in Verbindung mit der Expositionszeit in Jahren eine qualitativ gute Abschätzung der Belastung möglich war.

Im Jahr 2009 publizierten Pukkala et al. die ersten Ergebnisse der weltweit größten Kohortenstudie zu Krebserkrankungen aus Skandinavien und Island mit 15 Millionen Teilnehmern (NOCCA-Studie). Die Daten wurden von 1960 bis 2005 erhoben. In diesem Zeitraum wurden 2,8 Millionen neue Krebserkrankungen registriert. Die Probanden wurden in 53 Berufsfelder eingeteilt. Es konnten signifikant erhöhte standardisierte Inzidenzraten (SIR) von Lungenkrebs bei Tätigkeiten festgestellt werden, die mit einer erhöhten DME-Exposition vergesellschaftet sind. So wurden bei Mechanikern eine SIR von 1,24 (95% KI = 1,22-1,26), von 1,28 (95% KI = 1,26-1,31) bei Kraftfahrern, von 1,62 (95% KI = 1,57-1,68) für Seeleute und von 1,58 (95% KI = 1,50-1,67) bei Bergleuten ermittelt.

Tabelle 1: Standardisierte Inzidenzraten (SIR) mit 95% Konfidenzintervall (KI (95%)) für Lungen- und Blasenkrebs in Berufen mit erhöhter Exposition durch DME (Pukkala et al. 2009).

Organ	Beruf	Fälle	SIR	KI (95%)
Lunge	Mechaniker	16.203	1,24	1,22 - 1,26
	Kraftfahrer	12.882	1,28	1,26 - 1,31
	Motorenbediener	4.848	1,20	1,17 - 1,23
	Seeleute	3.583	1,62	1,57 - 1,68
	Bergleute	1.445	1,58	1,50 - 1,67
Blase	Mechaniker	8.138	1,11	1,08 - 1,13
	Kraftfahrer	5.973	1,15	1,12 - 1,18
	Motorenbediener	2.220	1,06	1,02 - 1,10
	Seeleute	1.478	1,23	1,17 - 1,30

Außerdem waren in den gleichen Gruppen (außer bei Bergleuten) auch die SIR für Blasenkrebs signifikant erhöht. Das lässt den Schluss zu, dass DME nicht nur in der Lunge kanzerogen wirken, sondern auch in den Organismus aufgenommen werden und systemisch ihre DNA-verändernde Wirkung zeigen. Dies wird besonders in Organen deutlich, wo Giftstoffe kumulieren können, z.B. in der Blase. Daher stufte



die IARC 2012 die Kanzerogenität der DME in der Harnblase als ausreichend bewiesen ein (Benbrahim-Tallaa et al. 2012). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass nicht nur die Partikel für die kanzerogene Wirkung der DME verantwortlich sind, wie es in einigen deutschen Publikationen postuliert wurde (Pott et al. 1994, Heinrich et al. 1995). Die inhalierten PAH werden offensichtlich resorbiert und können daher in der Blase ihre Wirkung entfalten. Blasentumoren durch PAH sind bei Kokereiarbeitern und in anderen Berufen mit PAH-Exposition bereits beschrieben worden (Doll et al. 1972, Pesch et al. 2000, Baan et al. 2012). Ein Transfer von Partikeln in die Blase ist bislang nicht beobachtet worden und physiologisch auch schwer vorstellbar. Die Daten der NOCCA-Studie sind insgesamt allerdings vorsichtig zu interpretieren, da eine Adjustierung für den Confounder Rauchen nicht vollzogen werden konnte, da diese Daten bei den untersuchten Probanden nicht ermittelt wurden.

Attfield et al. (2012) stellten eine Studie mit 12315 Arbeitern aus 8 Bergwerken vor. Bei den U.S. amerikanischen Einrichtungen handelte es sich ausschließlich um Bergwerke, in denen keine Metalle abgebaut wurden und Dieselmotoren unter Tage arbeiteten. An den Arbeitsplätzen wurde die Abgasbelastung gemessen, um eine mögliche Verbindung zwischen DME-Belastung und der Mortalität durch Lungenkrebs der Arbeiter feststellen zu können. Die Kohorte wurde in zwei Untergruppen geteilt, in Arbeiter, die unter Tage tätig waren, und Arbeiter, die ausschließlich an der Oberfläche beschäftigt waren. Die Gesamtsterblichkeit, Standardized Mortality Ratio (SMR), in der gesamten Kohorte lag überraschenderweise bei nur 0,93 (95% KI = 0,89-0,97). Es konnte aber gezeigt werden, dass bereits die SMR der kompletten Kohorte für die Mortalität an Lungenkrebs mit 1,26 (95% KI = 1,09-1,44) statistisch signifikant erhöht war. Die Sterblichkeit durch Lungenkrebs war in den Untergruppen denen der gesamten Kohorte ähnlich. Jedoch lagen die Arbeiter an der Oberfläche mit einer SMR von 1,33 (95% KI = 1,06-1,66) höher als die Arbeiter unter Tage mit einer SMR von 1,21 (95% KI = 1,01-1,45). Wie viele Kohortenstudien weist auch diese eine paar Limitationen auf. So kann nicht sicher recherchiert werden, welchen Belastungen die Probanden an vorherigen Arbeitsplätzen ausgesetzt waren, bzw. ob es in anschließenden Beschäftigungen zur Belastung der Atemwege kam. Informationen zum Rauchverhalten der Beschäftigten waren leider auch nicht verfügbar.



Fall-Kontroll-Studien

In der bereits erwähnten Fall-Kontroll-Studie von Garshick et al. (1987) wurden 1.319 Fälle untersucht, die im Zeitraum von 1. März 1981 bis 28. Februar 1982 an Lungenkrebs verstorben waren. Als Kontrolle dienten 2.385 Fälle ebenfalls aus dem Archiv des *U.S. Railroad Retirement Board*. Alle Arbeiter hatten wenigstens 10 Jahre bei der Eisenbahn gearbeitet und kamen aus 39 unterschiedlichen Berufskategorien. Die Fälle wurden zunächst dichotom in die Gruppen der Exponierten und Nicht-Exponierten eingeteilt. Anhand der Daten wurden die Krebsfälle in zwei Alterskategorien, ≤ 64 und ≥ 65 Jahre und in drei Gruppen nach ihrer Expositionsdauer unterteilt. In der Altersgruppe ≤ 64 lag die Odds Ratio (OR) bei statistisch signifikanten 1,41 (95% KI = 1,06-1,88) auch bei Berücksichtigung der Asbestbelastung und des Zigarettenkonsums. Arbeiter mit einer Expositionsdauer von über 20 Jahren wiesen sogar ein OR von 1,64 (95% KI = 1,18-2,29) auf, während in der Gruppe mit einer Expositionszeit von 5-19 Jahren die OR nur bei 1,02 (95% KI = 0,72-1,45) lag. Schwächen dieser Studie sind die mögliche nachträgliche Fehleinschätzung der Verwandten über den Tabakkonsum der Verstorbenen. Außerdem kann es bei der Bestimmung der Todesursache zu falschen Diagnosen kommen. Ein sekundärer Lungenkrebs kann fälschlicherweise als primär beschrieben werden, oder umgekehrt. Trotzdem zeigt diese Studie einen starken Zusammenhang zwischen der beruflichen DME-Exposition und dem Entstehen von Lungenkrebs.

Steenland et al. (1990) publizierten eine Fall-Kontroll-Studie, in der 1.058 Lungenkrebstote zwischen 1982 und 1983 aus den Archiven der *Teamster Union* (Gewerkschaft im Transportwesen) mit 1.160 Todesfällen verglichen wurden, die nicht an Lungenkrebs, Blasenkrebs oder in Folge eines Autounfalls gestorben waren. Die Gruppeneinteilung erfolgte auf Grund des Arbeitsbereiches in Langstrecken-, Kurzstreckenfahrer, Mechaniker und Verladearbeiter. Für die Langstreckenfahrer wurde ein statistisch signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko (OR = 1,64 (95% KI = 1,05-2,57)) festgestellt, das mit zunehmender Beschäftigungsdauer weiter stieg (OR = 1,89 (95%KI = 1,04-3,42)). Die Ergebnisse wurden für Alter, Zigarettenkonsum und

Asbestexposition angepasst. Als Einschränkung der Qualität der Studie muss darauf hingewiesen werden, dass ein Teil der Daten aus Interviews mit Angehörigen der Verstorbenen stammen, und dadurch eine Fehleinschätzung des Rauchverhaltens und der Beschäftigungsbedingungen nicht ausgeschlossen werden kann. Trotzdem zeigt sich eine deutliche Assoziation zwischen einer längeren DME-Belastung und einem erhöhten Lungenkrebsrisiko. Um die individuelle Abgasexposition einzuschätzen, zogen Steenland et al. 1998 die Messung des elementaren Kohlenstoffs als Maß der DME-Exposition von Zaeber et al. (1991) hinzu. Die Ergebnisse wiesen keine größeren Abweichungen von den zuvor ermittelten Risiken auf. Verladearbeiter, die Propangas-betriebene Gabelstapler fahren, wiesen eine OR von 0,93 (95% KI = 0,55-1,55) und damit das niedrigste Risiko auf. Der höchsten Belastung mit elementarem Kohlenstoff waren die Mechaniker ausgesetzt. Dem entsprechend war bei ihnen die OR für Lungenkrebs mit 1,69 (95% KI = 0,92-3,09) am höchsten.

Swanson et al. (1993) veröffentlichten eine Fall-Kontroll-Studie mit 3.792 Lungenkrebs- und 1.966 Kolonkrebsfällen als Kontrollen, deren Diagnosen zwischen 1984 und 1987 gestellt wurden. Die Probanden waren weiße und dunkelhäutige Männer im Alter von 40-84 Jahren. Die telefonischen Interviews wurden mit den Betroffenen oder ihren Angehörigen geführt, um den beruflichen Werdegang, Rauchverhalten und andere Risikofaktoren zu erfragen. Die beruflichen Tätigkeiten wurden in zwei Kategorien eingeteilt, mit und ohne DME-Exposition. Sowohl Fernfahrer von großen und kleinen Lastkraftwagen als auch Beschäftigte in der Landwirtschaft und Eisenbahnarbeiter gehörten zu den Probanden mit einer potenziellen Exposition. In der Gruppe der Afroamerikaner hatten lediglich die in der Landwirtschaft Tätigen eine statistisch signifikant erhöhte OR von 10,4 (95% KI = 1,4-77,1), wenn sie bereits über 20 Jahre in diesem Job arbeiteten. Bei hellhäutigen Männern war einzig die OR von 2,4 (95% KI = 1,1-5,1) der Eisenbahnarbeiter mit einer Arbeitsdauer von über 10 Jahren statistisch signifikant erhöht. Die Ergebnisse wurden für Alter, Rauchervergangenheit und Rasse korrigiert. Sowohl die Befragung der Verwandten als auch die Belastungseinschätzungen anhand der *U.S. Census Bureau*-Klassifikation von 1980 sind mögliche Fehlerquellen. Besonders bei der hohen OR der Afroamerikaner in der Landwirtschaft muss der Einsatz von Pestiziden als ein nicht berücksichtigter Confounder angesehen werden.

Brüske-Hohlfeld et al. (1999) präsentierten eine Fall-Kontroll-Studie aus Deutschland, die gepoolte Daten von zwei vorausgegangenen Studien analysierte – Jöckel et al. (1995) und Wichmann et al. (1998). Gemeinsam handelt es sich um 3.498 Fälle und 3.541 Kontrollen. Der berufliche Werdegang und der Tabakkonsum wurden in Interviews ermittelt. Die Probanden wurden anhand der Informationen vier verschiedenen Berufsgruppen zugeteilt: A = LKW-, Bus- und Taxifahrer; B = z.B. Weichensteller, Lokführer und Gabelstaplerfahrer; C = Planierdrauhen- und Baggerfahrer; D = landwirtschaftlicher Traktorfahrer. Für jeden Teilnehmer wurde individuell die Belastung berechnet. Alle Ergebnisse wurden für Rauchervorgeschichte und Asbestbelastung adjustiert. Für die Kategorie A ergab sich eine OR von 1,25 (95% KI = 1,05-1,47), Kategorie B: 1,53 (95% KI = 1,04-2,24), Kategorie C: 2,31 (95% KI = 1,44-3,7) und in Kategorie D wurde die OR von 6,81 (95% KI = 1,17-39,51) erst nach einer Expositionsdauer von über 30 Jahren statistisch signifikant. Dennoch zeigte die Studie expositionsabhängige Zusammenhänge zwischen DME-Belastung und dem Auftreten von Lungenkrebs. Eine Schwäche der Studie ist auch hier die Berechnung der DME-Belastung, da es keine Messungen an den Arbeitsplätzen gab, sondern die Exposition über die Arbeitsdauer und die benutzte Ausrüstung abgeschätzt wurde.

Silverman et al. (2012) stellte eine Fall-Kontroll-Studie zur bereits dargestellten Kohorten-Studie von Attfield et al. (2011) vor. Die Ergebnisse wurden nach Erhebung der Raucheranamnese und anderer Confounder den neuen Erkenntnissen angepasst. Die Bestimmung der Abgasbelastung wurde durch die Messung des lungengängigen Rußes (*respirable elemental carbon*, REC) erlangt. Anhand der Abgasmessungen wurden die Arbeitsbereiche in 3 Gruppen eingeteilt, $< 8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ REC, $8 - 304 \mu\text{g}/\text{m}^3$ REC und $> 304 \mu\text{g}/\text{m}^3$ REC. Die Nichtraucher in der Gruppe mit der niedrigsten Exposition wurden als Referenzgruppe mit einem OR von 1,0 festgelegt. Während Nichtraucher mit 15 Arbeitsjahren in der mittleren Gruppe bereits ein OR von 1,47 (95% KI = 0,29 - 7,50) hatten, an Lungenkrebs zu sterben, stieg das OR bei gleicher Expositionsdauer für Nichtraucher in der höchsten Belastungsgruppe schon auf 7,30 (95% KI = 1,46 - 36,57). Trotz der deutlichen Ergebnisse gibt es Einschränkungen. Die Autoren beschreiben eine Plateauphase bei hoher DME-Exposition (über $3000 \mu\text{g}/\text{m}^3$), bzw. sogar ein Absinken der Dosis-Wirkungskurve. Beides gehört nicht zum typischen Bild einer Dosis-Wirkungskurve bei hohen Belastungswerten (Gamble et al. 2012).



Aufgrund der bereits genannten Problematik der Latenzzeit existieren noch keine epidemiologischen Studien zu Pflanzenölmethylestern, Pflanzenölen und Blends. Einzig in einer Studie des *South Coast Air Quality Management District* (SCAQMD 2000, Morris et al. 2003) wurde die Änderung des Gesundheitsrisikos durch DME bei Nutzung einer 20%igen Beimischung von Biodiesel zum herkömmlichen DK für die Bevölkerung eines Bezirks in Kalifornien, U.S.A. geschätzt. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass es zu 2% weniger Todesfällen kommen würde, wenn 50% aller Lastkraftwagen den Blend tanken würden. Würden sogar 100% der LKW mit der Mischung fahren, könnten die Todesfälle um 5% reduziert werden. Anzumerken ist allerdings, dass diese Studie sehr viele Annahmen und Schätzungen enthält, die die Berechnungen unsicher machen.

1.3.2.2. Tierstudien

Tierversuche mit inhalativen DME-Belastungen weisen ebenfalls auf eine kanzerogene Wirkung der DME hin.

Heinrich et al. (1986 a, 1986 b) untersuchten diese Wirkung an Wistar-Ratten, NMRI-Mäusen und syrischen Hamstern. Alle Spezies wurden in drei Gruppen geteilt. Je eine Gruppe bekam saubere Luft, die zweite gefilterte DME und die letzte ungefilterte DME in den Käfig geleitet. Die Ratten wurden 19 Stunden pro Tag, 5 Tage die Woche für bis zu 35 Monate exponiert. In den ersten beiden Gruppen konnte kein Tumorwachstum in der Lunge nachgewiesen werden. Von den 95 Ratten, die ungefilterte Abgase geatmet hatten, wurde bei 8 Tieren ein Adenom in der Lunge gefunden und bei 9 Tieren ein Plattenzellkarzinom. Somit betrug die Gesamtinzidenz dieser Tumorerkrankungen 17,8%. Außerdem wurde in dieser Gruppe ein hohes Auftreten von bronchoalveolären Hyperplasien (99%) und Metaplasien (65%) gefunden. Die Mäuse wurden für bis zu 30 Monate exponiert. Von 84 Tieren, die saubere Luft inhalierten, entwickelten 9 Mäuse ein Adenom und 2 weitere ein Adenokarzinom. Diese 11 Tumoren ergeben eine Inzidenz von 13%. In der Gruppe mit Exposition durch gefilterte DME, die aus 93 Tieren bestand, wurden 11 Adenome und 18 Adenokarzinome festgestellt. Damit liegt die Inzidenz bei 31%, womit eine signifikante Differenz zur Exposition gegen saubere Luft bestand. Die Gruppe mit Exposition durch ungefilterte DME bestand aus 76 Mäusen. Hier wurden 11 Adenome und 13 Adenokarzinome nachgewiesen. Die Inzidenz ist mit 32% auch hier signifikant höher als in der Gruppe der sauberen Luft. Allerdings ist nicht klar, ob die Mäuse durch die Partikelfraktion der DME erkrankten, da auch das gefilterte Abgas ähnlich viele Tumore auslöste. Die Hamsterpopulation wurde für 30 Monate den Emissionen ausgesetzt. Die drei Untergruppen zählten jeweils 96 Tiere, von denen kein einziges an einer tumorösen Erkrankung litt.

Nikula et al. (1995) veröffentlichten eine Studie an männlichen und weiblichen F344-Ratten. Sie wurden in 5 Gruppen eingeteilt. Jede Population bestand aus ca. 210 Tieren. Eine Gruppe bekam reine Luft, zwei weitere wurden gegenüber 2,5 bzw. 6,5 mg/m³ DME exponiert und die letzten beiden Gruppen waren 2,5 und 6,5 mg/m³ technischem Ruß (Carbon Black) ausgesetzt. Die Tiere wurden 16 Stunden pro Tag,

5 Tage die Woche für 24 Monate gegenüber den Abgasen exponiert und für weitere 6 Wochen beobachtet. Von den Ratten, die saubere Luft bekamen, fielen je eine mit Adenom, mit Adenokarzinom und mit Plattenepithelkarzinom auf (Inzidenz: 1%). Bei der Population mit 2,5 mg/m³ DME stieg die Inzidenz auf 6% (7 Tiere mit Adenom, 4 mit Adenokarzinom und 3 mit Plattenepithelkarzinom). Mit der erhöhten Partikeldichte von 6,5 mg/m³ traten auch mehr Neoplasien auf. Bei 23 Ratten entwickelten sich Adenome, bei 22 Adenokarzinome, bei dreien Plattenepithelkarzinome und eine Ratte hatte ein Adeno-Plattenepithelkarzinom. Die Inzidenz der Tumorbildung lag bei 23%. Es zeigte sich ein ähnliches Bild bei den Populationen, die durch Ruß exponiert waren. Von 5% bei leichter Belastung stieg die Inzidenzrate auf 19% an.

Auch in weiteren Studien wurden Tumore bei Ratten durch inhalative DME-Expositionen beobachtet (z.B. Ishinishi et al. 1986, Iwai et al. 1986). Bei Mäusen waren die Ergebnisse uneinheitlich, bei Hamstern negativ. Einschränkend ist auch anzumerken, dass die Expositionen der Tiere in diesen Studien so hoch waren, dass der Abbau bzw. der Abtransport der Partikel durch Makrophagen und das retikulohistiozytäre System, die sogenannte „Lungenclearance“, überfordert war. Die Übertragbarkeit auf den Menschen ist dadurch und durch die uneinheitlichen Ergebnisse für die verschiedenen Tierspezies eingeschränkt.

1.3.2.3. *In-vitro*-Studien

Ausgangspunkt für den Nachweis der Genotoxizität von krebserzeugenden Substanzen bzw. Gemischen wie DME im *in-vitro*-Verfahren ist die Induktion von Genmutationen in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen. Aus dem Nachweis von Mutationen in solchen Kurzzeittests lässt sich kostengünstig und rasch auf ein mögliches kanzerogenes Potenzial der untersuchten Substanzen und Gemische schließen.

Huisingh et al. (1978) als erste und weitere Autoren wie Claxton und Barnes (1981) wiesen die Mutagenität von Dieselpartikelextrakten im bakteriellen Rückmutationstest (s. Methodenteil 2.2.3. Seite 33) nach. Da wie oben erwähnt Lungenkrebs eine lange Latenzzeit hat, könnte durch epidemiologische Studien erst in vielen Jahren

festgestellt werden, ob die Verbrennung neuer Kraftstoffe, wie RME, Blends oder auch reiner Pflanzenöle, ebenfalls eine kanzerogene Wirkung hat, bzw. wie die kanzerogene Potenz der DME durch die neuen Kraftstoffe verändert wird. Das *in-vitro*-Verfahren bietet die Möglichkeit, schon jetzt eine Aussage über ein höheres oder niedrigeres mutagenes und damit wahrscheinlich auch kanzerogenes Potenzial der DME bei Verbrennung von Biokraftstoffen zu geben.

Carraro et al. (1997) nutzten zwei 1930-ccm-Turbodieselmotoren mit direkter und indirekter Einspritzung und Abgasrückführung, um RME und einen Referenzdiesel (DK) mit 1000 ppm Schwefel zu verbrennen und die Partikelextrakte auf ihre Mutagenität zu untersuchen. Die Motoren durchliefen den Europäischen Standard Testzyklus (ECE-EUDC). Die Emissionen wurden durch teflonbeschichtete Glasfaserfilter geleitet. Bevor die Filter 3 Stunden im Soxhlet in einer Benzol-Aceton-Mischung extrahiert wurden, behandelte man sie für eine Minute mit Aceton in einem Ultraschallbad (100W). Anschließend wurden die Proben mittels Rotationsverdampfer eingeeengt, und die Extrakte in 2 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) wieder aufgenommen. Der bakterielle Rückmutationstest (Ames-Test) diente als Nachweismethode mit den Teststämmen TA98 und TA100. Er wurde mit und ohne metabolische Aktivierung durch den S9-Mix durchgeführt. In den Ergebnissen zeigte sich mit und ohne S9-Mix eine höhere Mutagenität für die Partikelextrakte des DK im Vergleich zu RME im Stamm TA98.

Bünger et al. veröffentlichten 1998 eine Arbeit zur Mutagenität von DME, die im Ames-Test mit *Salmonella typhimurium* (TA97a, TA98, TA100, TA102) geprüft wurden. An Mäusefibroblasten (L929) wurde die Zytotoxizität der Abgasfraktionen getestet. Der 1,9L-Turbodieselmotor mit Direkteinspritzung und Katalysator wurde in verschiedenen Testzyklen gefahren: der Europäische MVEG-A im Original, und als abgewandelte Form MVEG-A1, der die Kaltstartphase mit einbezieht, sowie der US-amerikanische FTP-75. Die gewonnenen Proben wurden anschließend 12 Stunden in einem Soxhlet-Apparat mit Dichlormethan extrahiert. Die Extrakte wurden mittels Rotationsverdampfer getrocknet, und mit 4 ml DMSO in Probenröhrchen gesammelt.

Bei Betrieb mit RME war die Partikelmasse meistens höher als bei normalem DK. Die Ausnahmen waren die vier Proben, die während des FTP-75-Laufs gezogen wurden. Diese waren die einzigen, die eine wesentliche *in-vitro*-Toxizität aufwiesen. Unter RME-Betrieb zeigte sich ein etwas stärker ausgeprägter toxischer Effekt. In den



Teststämmen TA97a und TA102 waren keine Rückmutationen nachweisbar. TA98 und TA100 zeigten beide eine signifikant erhöhte Anzahl an Rückmutationen im Betrieb mit DK im Vergleich zu RME. Die metabolische Aktivierung durch den S9-Mix brachte keine erhöhte Mutagenität (Bünger et al. 1998).

Bagley et al. (1998) verglichen DME bei Verbrennung von herkömmlichen DK mit Sojaölmethylester (SME) im Hinblick auf die Mutagenität. Ein Caterpillar-Dieselmotor mit 7 L Hubraum und Oxidationskatalysator aus dem Jahr 1983, wie er im amerikanischen Bergbau verwendet wird, wurde mit 1500 U/min gefahren. In zwei Laststufen (Teillast und Vollast) erfolgte die Probenahme. Im Verdünnungstunnel wurden mittels eines „*TSI electrical aerosol analyzer*“ die Partikelanzahl und Partikelgrößenverteilung bestimmt. Zur Extraktion und Analyse der PAH und nPAH diente als Orientierung die US-EPA-Standardmethode. Mit einem etwas abgewandelten Ames-Test untersuchten sie die Mutagenität der einzelnen Abgasfraktionen. Einzig der Teststamm TA98 wurde verwendet, neben dem ursprünglichen Stamm allerdings auch zwei genetische veränderte Stämme. TA98NR kann keine Nitroreduktase produzieren und TA98/1,8-DNP₆ ist defizient für die Dinitroreduktase. Dadurch können die Bakterien die nPAH nicht aktivieren (McCoy et al. 1981). Daher ist die mutagene Wirkung an den defizitären Stämmen geringer. Dies ermöglicht es, den Anteil an nPAH im Gemisch abzuschätzen. Die partikuläre Phase der Abgase war dabei deutlich stärker mutagen als die flüchtige Fraktion, wobei beide Phasen im Betrieb mit Biodiesel einen geringeren Effekt hatten als die des DK. Der Katalysator verringerte die Mutagenität bei SME ebenfalls stärker als bei DK. Wie schon die Untersuchung mit den defizitären Stämmen annehmen ließ, bestätigte eine HPLC-Analyse, dass unter Biodieselbetrieb weniger PAH und nPAH nachgewiesen werden konnten. Auch hier hatte der Katalysator einen positiven Effekt auf die Abgase beider Kraftstoffe.

Bünger et al. (2007) veröffentlichten die erste Studie zur Mutagenität von Pflanzenölen. Sie stellten im Vergleich zu Biodiesel, herkömmlichen DK und GTL (Gas-to-Liquid, aus Erdgas synthetisierter Kraftstoff) eine stark erhöhte Rückmutationsrate fest. Die Studie wird in der Diskussion näher betrachtet.

Eine große Studie zu Biodiesel-Blends (Mischung aus Biodiesel und DK) wurde von Krahl et al. (2008) angelegt. In drei verschiedenen Motoren wurden Mischverhältnisse zwischen B5 und B50 untersucht. Die höchste Mutagenität wurde



stets für B20 gefunden, das heißt für Kraftstoffe mit 20% Biodieselanteil (V/V). In der Diskussion wird auch diese Studie weitergehend besprochen.

1.4. Fragestellungen der Studie

Da Abgase von Dieselmotoren mutagen und mit hoher Wahrscheinlichkeit kanzerogen für den Menschen sind, und alternative Kraftstoffe und Blends vermehrt eingesetzt werden, ergibt sich die Frage, ob bzw. in welchem Umfang auch bei der Verbrennung dieser Kraftstoffe mutagene und kanzerogene Substanzen entstehen. Epidemiologische Studien zur Kanzerogenität der DME könnten erst in vielen Jahren Aussagen treffen. Auch aussagekräftige tierexperimentelle Studien dauern 2-3 Jahre, sind sehr kostspielig und aus Tierschutzgründen umstritten. Daher sind *In-vitro*-Studien nötig, die schon jetzt das mutagene Potenzial feststellen können.

Nachdem in den zitierten vorherigen Studien der Arbeitsgruppe um Bünger und Krahl Rapsöl eine erhöhte Mutagenität gezeigt hatte, wurden in diesem Ansatz weitere Pflanzenöle mit unterschiedlich starkem Anteil ungesättigter Fettsäuren getestet. Blends wurden untersucht, weil eine Studie von Fang und McCormick (2006) bei Blends aus Biodiesel und DK eine Ausflockung der Kraftstoffmischungen mit Maximum bei B20 gezeigt hatte. Diese wurde der chemischen Reaktivität der Doppelbindungen der mehrfach ungesättigten Fettsäuren zugeschrieben. Da auch die Mutagenität von Biodieselblends bei B20 erhöht war, sollte untersucht werden, ob dieses Phänomen auch bei Pflanzenölblends auftritt.

Hypothesen:

1. Auch andere Pflanzenöle als Rapsöl führen im Vergleich zu DK zu erhöhter Mutagenität der DME.
2. Die Mutagenität der Pflanzenöle ist abhängig vom Anteil ungesättigter Fettsäuren bzw. der Zahl der Doppelbindungen der Pflanzenöle.



3. Wie bei Biodieselblends führen auch Pflanzenölblends zu erhöhter Mutagenität im Vergleich zu den Reinkraftstoffen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Kraftstoffe

In den Versuchen wurden pure Pflanzenöle und verschiedene Mischungsverhältnisse von Mineralöldiesel (DK) und Rapsöl (Blends) im Vergleich zu herkömmlichem Dieselmotorkraftstoff getestet. Der DK wurde von einer öffentlichen Shell-Tankstelle bezogen. Das Rapsöl wurde bei Cargill in Braunschweig erworben. Sowohl Lein- als auch Palmöl lieferte Thywissen, Neuss. Die Blends, bestehend aus 20% Rapsöl und 80% DK (R20), sowie 50% Rapsöl und 50% DK (R50), wurden im von Thünen-Institut (vTI) in Braunschweig gemischt. Das Mischungsverhältnis wurde nach Volumen hergestellt (V/V %).

Ausschlaggebend für die Wahl der Pflanzenöle war der prozentuale Anteil an gesättigten bzw. einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren, um die Hypothese der Abhängigkeit der Stärke der Mutagenität vom Sättigungsgrad zu untersuchen. Die folgende Tabelle 2 listet die relevanten Fettsäuren und physikochemischen Daten auf. Es ist allerdings zu beachten, dass die Zusammensetzung je nach Anbaubedingungen und Sorte der Pflanze variieren kann.

Während bei Leinöl (LÖ) vor allem der hohe Prozentsatz an dreifach ungesättigter Linolensäure auffällt, findet sich in Rapsöl der höchste Gehalt an einfach ungesättigter Ölsäure. Palmöl (PÖ) weist den höchsten Anteil gesättigter Fettsäuren und die wenigsten Doppelbindungen auf, Leinöl weitaus die meisten. Alle drei Pflanzenöle unterscheiden sich deutlich hinsichtlich des Anteils mehrfach gesättigter Fettsäuren.

Tabelle 2: Fettsäuregehalt und physikochemische Merkmale der Kraftstoffe.

Fettsäuren (FS)	Einheit	Leinöl	Palmöl	Rapsöl
16:0 Palmitinsäure	%	5,3	42	4,5
18:0 Stearinsäure	%	3,6	4,5	1,6
18:1 Ölsäure	%	19,8	40,9	62,2
18:2 Linolsäure	%	16,1	10,1	19,7
18:3 Linolensäure	%	54,0	0,3	8,7
mehrfach ungesättigte FS	%	70,1	10,4	28,4
gesamt ungesättigte FS	%	90,5	51,6	92,8
physikochemische Merkmale				
Dichte (15 °C)	kg/m ³	932,1	914,9	920,5
Flammpunkt P.-M.	°C	240,5	284,5	258,5
Kin. Viskosität (40 °C)	mm ² /s	26,0	41,48	36,05
Heizwert, unterer	kJ/kg	36975	37190	37167
Cetanzahl		32,9	69,8	54,3
Koksrückstand n. C.	Gew. %	0,39	0,31	0,28
Iodzahl	g Iod/100g	182	53	111
Schwefelgehalt	mg/kg	28,1	1,9	4
Gesamtverschmutzung	mg/kg	6	53	8
Säurezahl	mg KOH/g	1,01	0,213	0,11
Oxidationsstabilität	h	1,7	23,9	5,2
Phosphorgehalt	mg/kg	53	2	<0,5
Erdalkaligehalt	mg/kg	44,8	<0,5	<0,5
Oxidasche	Gew. %	0,017	0,001	<0,001
Wassergehalt	mg/kg	509	301	475

2.1.2. Motor

Als Versuchsmotor diente ein Mercedes-Benz OM 906 LA Motor mit Turbolader und Ladeluftkühlung. Der Sechszylindermotor hat eine Leistung von 205 kW und ist nach Euro III zertifiziert. Weitere Motordaten sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Kenndaten des Versuchsmotors

Zylinderhub	130 mm
Zylinderbohrung	102 mm
Zylinderanzahl	6
Hubvolumen	6370 cm ³
Nenndrehzahl	2300 min ⁻¹
Nennleistung	205 kW
Maximales Drehmoment	1100 Nm bei 1300 min ⁻¹
Abgasnorm	Euro-III

An die Motorwelle wurde eine Wirbelstrombremse der Firma Froude-Consine, Worcester, Großbritannien, angeschlossen, welche die verschiedenen Lastpunkte automatisch anfährt und damit die Motorlast bestimmt.

Als Testzyklus wurde der European Stationary Cycle (ESC) durchgeführt, der zur Zertifizierung von LKW-Motoren nach Euro-III dient. Er besteht aus dreizehn Phasen, die sich durch unterschiedliche Drehzahlen bei verschiedenen Geschwindigkeiten auszeichnen. Ein Testzyklus dauert 30 Minuten (s. Abbildungen 3 und 4).

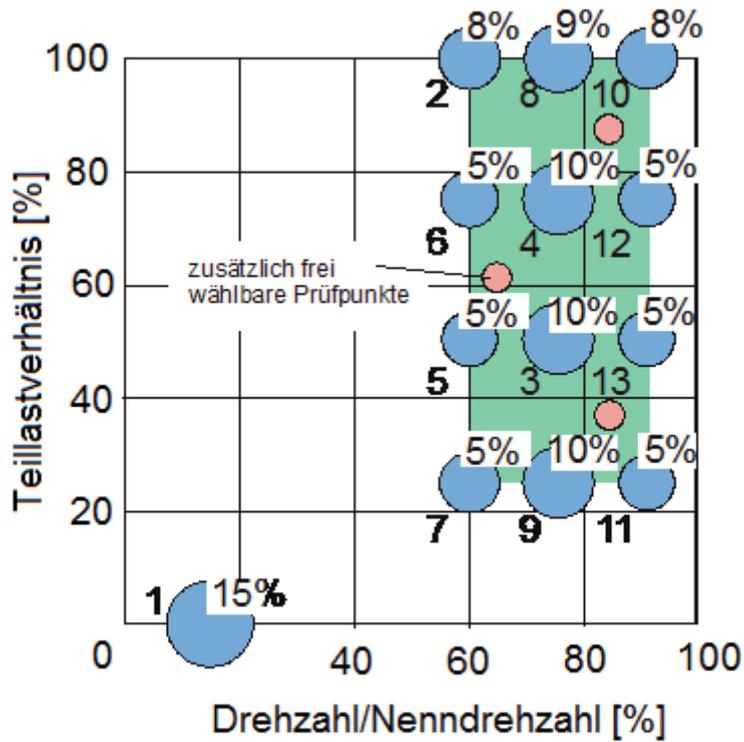


Abbildung 3: Prozentuale Anteile der 13 Phasen des ESC.

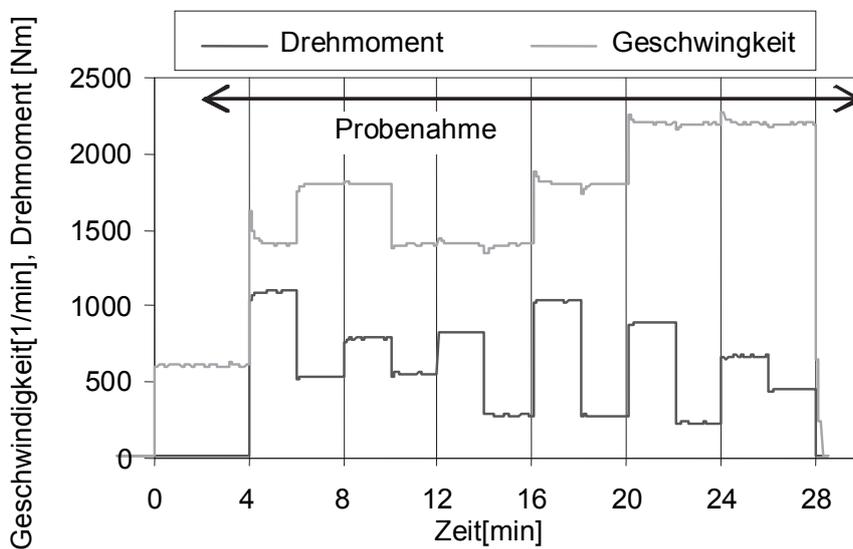


Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf des ESC

Das Belegen der teflonbeschichteten Glasfaserfilter fand im vTI statt. Dort steht der oben beschriebene Motorenprüfstand. Die belegten Filter und Kondensatkolben



wurden gekühlt (+4°C) an die Abteilung für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der Georg-August-Universität Göttingen geliefert und dort ebenfalls bei +4°C gelagert.

2.1.3. Materialien für die Soxhlet-Extraktion:

- Dichlormethan p. a., Merck, Darmstadt
- Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt
- Finnpipette, 5 ml
- Probenröhrchen, 4,5 ml Polystyrol-Röhrchen, Greiner, Solingen
- Rundkolben 250ml, Brand, Wertheim
- Soxhlet-Extraktionsapparat 100ml, Brand, Wertheim
- Teflonbeschichtete Glasfaserfilter (T60 A20, Pallflex Products Corp., Putnam, CT, U.S.A.)
- Rotationsverdampfer, Typ VV1, Heidolph, Kelheim
- Vakuumpumpe
- Wasserbad WB 2001, Heidolph, Kelheim

2.1.4. Materialien für den Ames-Test

- 2-Aminofluoren, MG 181,24, Sigma-Aldrich, Steinheim
- 3-Nitrobenzanthron, Reinheit >90%, im vTI synthetisiert und analysiert
- β -D-Glucose-6-Phosphat-Natriumsalz, MG 282,12, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Agar-Agar Kobe I, Serva, Heidelberg
- Automatisches Kolonien-Zählgerät, Cardinal 1.17, Perceptive Instruments, Suffolk, Großbritannien
- D-Biotin, MG 244,3, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Difco bacto nutrient broth, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.
- Dikaliumhydrogenphosphatanhydrid, MG 174,2, Serva, Heidelberg
- D(+)-Glukose, MG 180,16, Merck, Darmstadt
- Heraeus-Brutschrank, Functionline BB 16, Heraeus Instruments, Hannover

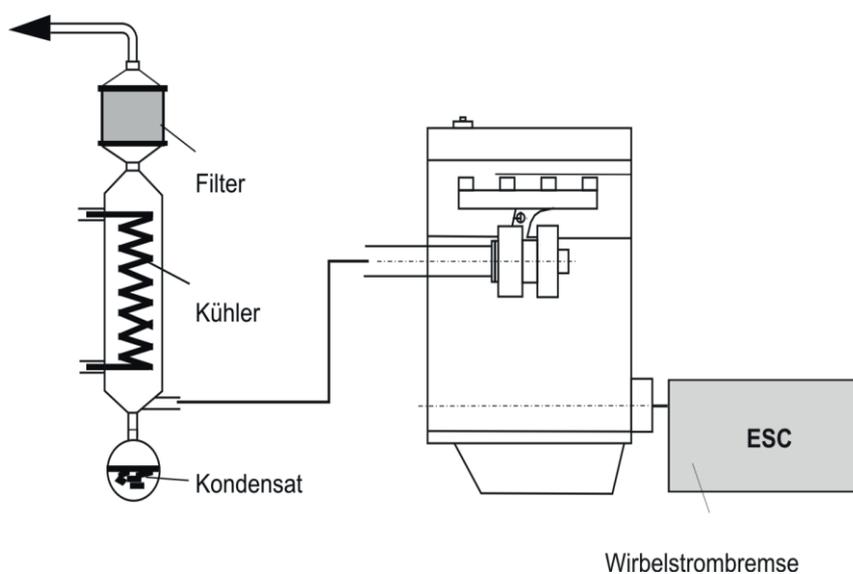
- Heraeus-Sicherheitswerkbank, Herasafe HS 18, Heraeus Instruments, Hannover
- Kaliumchlorid, MG 74,55, Sigma-Aldrich, Steinheim
- L-Histidin · HCl, G 209,63, Merck, Darmstadt
- Magnesiumchlorid, MG 203,30, Merck, Darmstadt
- Magnesiumsulfat , MG246,48, Merck, Darmstadt
- NADP-Natriumsalz, MG 765,39, AppliChem, Darmstadt
- Natriumamminohydrogenphosphat, MG 209,07, Riedel de Haen, Seelze
- Natriumchlorid, MG 58,44, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Natriumdihydrogenphosphat, MG 137,99, Merck, Darmstadt
- Natriumphosphat dibasisch, MG177,99, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Petrischalen aus Polystyrol 94x16 mm, mit Deckel, ohne Nocken, Greiner, Solingen
- PS-Röhrchen, Greiner, Solingen
- Reagenzgläser 10ml, Glas-Schott, Mainz
- S9-Fraktion aus eigener Produktion
- Salmonella-typhimurium-Teststämme TA98 und TA100, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B.N. Ames, Department for Biochemistry, University of Berkeley, California, U.S.A.
- Zitronensäuremonohydrat, p.a.-Ware, MG 210,14, Merck, Darmstadt

2.2. Methoden

2.2.1. Probenahme

Für die Probenahme werden ein Dimrothkühler und ein Intensivkühler verwendet, die hintereinandergeschaltet sind. Mittels eines Kryostaten werden die Kühler auf -18°C temperiert. Gemäß der VDI-Richtlinie 3872 Blatt 1 wird dadurch erreicht, dass das heiße Abgas auf eine Temperatur unter 52°C gekühlt wird. Als Kühlmittel wird Glykol verwendet. Das Probenahmesystem nach der VDI-Richtlinie 3872 Blatt 1 zeigt das Foto in Abb. 5. Die Isolierung ist zum Teil entfernt, um die Kühler zu zeigen.

Das heiße Rohabgas wird direkt hinter dem Schalldämpfer aus dem Abgasstrang über eine Sonde entnommen und mittels eines Teflonschlauches und einer Glasolive in die Kühler geleitet. Ein 250-ml-Rundkolben fängt das während des Motorlaufs entstehende Kondensat auf. Der verwendete Rundkolben ist mit Alu-Folie ummantelt, um die im Kondensat befindlichen PAH vor Licht zu schützen. Hinter die Kühler ist ein Filterhalter geschaltet, in dem hintereinander zwei Filter Platz finden. Der zweite Filter dient dabei als Sicherung und soll Partikel, die vom ersten Filter durchgelassen wurden, sammeln. Durch eine Vakuumpumpe wird das zu untersuchende Abgas angesogen. Der Probenstrom wird mittels eines Massenflussreglers, der sich zwischen dem Filterhalter und der Vakuumpumpe befindet, auf 25 L/Minute eingestellt. Während der Kaltstartphase (2min) läuft die Pumpe noch nicht. So bleiben bei einer Laufzeit von 30 Minuten noch 28 Minuten, in denen Proben gewonnen werden. Somit werden 700 Liter Abgas pro Zyklus gefiltert. In Abbildung 6 ist der Aufbau schematisch dargestellt.



Abbildungen 5 und 6: Foto und schematische Darstellung der Probenahme gemäß der VDI-Richtlinie 3872 Blatt 1.

Für die Beprobung werden teflonbeschichtete Glasfaserfilter verwendet. Die unbelegten Filter werden vor jeder Messung mit zweifacher Wiederholung gewogen, nachdem die Filter für 24 Stunden in einer Klimakammer bei einer Temperatur von $22 \pm 1^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $45 \pm 8\%$ konditioniert wurden.

Der Kryostat wird eine halbe Stunde vor dem Motorlauf eingeschaltet und es wird gewartet, bis die Kühler eine Temperatur von -18°C erreicht haben. Da die Kühler

dicht an der heißen Abgasanlage aufgebaut sind, werden die Kühler sowie die Schläuche, die das Kühlmittel transportieren, mittels geeigneter Isoliermaterialien vor den hohen Temperaturen geschützt.

Bei der Probenahme im ESC-Test wird das Abgas erst zwei Minuten nach Motorstart durch die Kühler geleitet, so dass sichergestellt wird, dass die Beprobung für jeden Betriebspunkt mit der gleichen Zeit erfolgt. Die Pumpe wird sofort nach Ende des Motorlaufs ausgeschaltet.

Die Filter werden aus dem Filterhalter genommen und unter Schutz vor Lichteinwirkung sofort in die Kühlkammer zur 24-stündigen Konditionierung gebracht. Der Kryostat wird nach dem Motorlauf ausgeschaltet, sodass die Kühler wieder enteisen können. Anschließend werden sie mit 100 ml Methanol gespült und das Methanol zusammen mit dem Kondensat im Rundkolben aufgefangen. Die Kolben werden bei -18°C bis zur weiteren Aufarbeitung aufbewahrt. Zur Trocknung werden die Kühler mit gefilterter, trockener Druckluft 20 Minuten gespült.

Nach der Konditionierung in der Klimakammer unter Lichtausschluss werden die Filter mit zweifacher Wiederholung ausgewogen und anschließend ebenfalls bei -18°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.2.2. Soxhlet-Extraktion

Als Extraktionsmethode wurde das Soxhlet-Verfahren verwendet, da diese Extrakte eine höhere Ausbeute an mutagener Aktivität erzielen als eine Ultraschall-Extraktion (Claxton et al. 1992). Dichlormethan (DCM) diente als Lösungsmittel, weil es gegenüber anderen polaren und unpolaren Lösungsmitteln eine bessere Ausbeute an mutagener Aktivität bei Dieselmotorpartikeln erreicht (Siak et al. 1981). Stalder et al. zeigten 1993, dass dies ebenfalls auf die Partikel bei Verbrennung von RME und Pflanzenöl zutrifft. Nachdem das DCM durch Eintrocknen im Rotationsverdampfer aus den Proben entfernt ist, werden die Partikelextrakte mit 4ml DMSO aufgenommen, und in Probenröhrchen überführt. DMSO stellte sich als am besten kompatibles Lösungsmittel für den Ames-Test heraus (Maron et al. 1981).

Die vom vTI in Braunschweig beprobten teflonbeschichteten Glasfaserfilter wurde sowohl vor als auch nach der Extraktion gewogen, um so die Masse an heraus gelösten organischen Substanzen als sogenannte „organische lösliche Fraktion“ (LOF) zu bestimmen. Darunter befinden sich auch die PAH, die im Wesentlichen die Mutagenität der Extrakte beeinflussen.

Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der PAH mussten sämtliche Extraktionen im Dunkel durchgeführt werden (Claxton 1983).

2.2.3. Bakterieller Rückmutationstest (Ames-Test)

Der Ames-Test wurde unter dem Namen „*Salmonella typhimurium/mammalian microsome test*“ 1973 von Bruce Ames und Mitarbeitern erstmals veröffentlicht, und hat sich seitdem zum weltweit führenden *in-vitro*-Testsystem zum Nachweis von Mutagenität in der Toxikologie und Umweltforschung entwickelt. 1975 und 1983 wurde diese Methode noch einmal von Ames und Mitarbeitern überarbeitet und ist 1997 auch von OECD als Guideline 471 „*Bacterial Reverse Mutation Test*“ übernommen worden.

Die im Test verwendeten *Salmonella-typhimurium*-Stämme sind genetisch derart veränderte Bakterien, dass sie his-auxotroph sind. Die mutagene Wirkung der zu testenden Substanzen lässt sie zurückmutieren, wodurch sie wieder his-prototroph (Wildtyp) werden und die Aminosäure Histidin selbst synthetisieren können. Daher wird der Test auch bakterieller Rückmutationstest genannt. Besonders bei unbekanntem Zusammensetzungen, wie sie bei den hier vorliegenden Verbrennungsprodukten auftreten, erwies sich diese Methode als sehr geeignet (Claxton 1983).

Bei der Auswahl der Bakterienstämme wichen wir von der OECD-Guideline 471 ab. Es wurden nur die Stämme TA98 und TA100 benutzt. Der Stamm TA98 deckt die Rasterschubmutationen auf, während TA100 die Basenpaarsubstitutionen erkennen lässt (Maron und Ames 1983). Die im Standardprotokoll vorgesehenen Stämme TA1535, TA97a und TA102 ergaben in früheren Studien keine besseren Ergebnisse



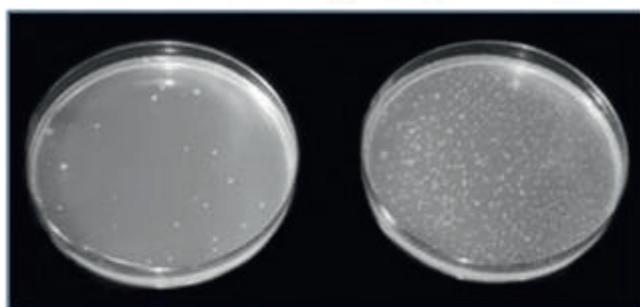
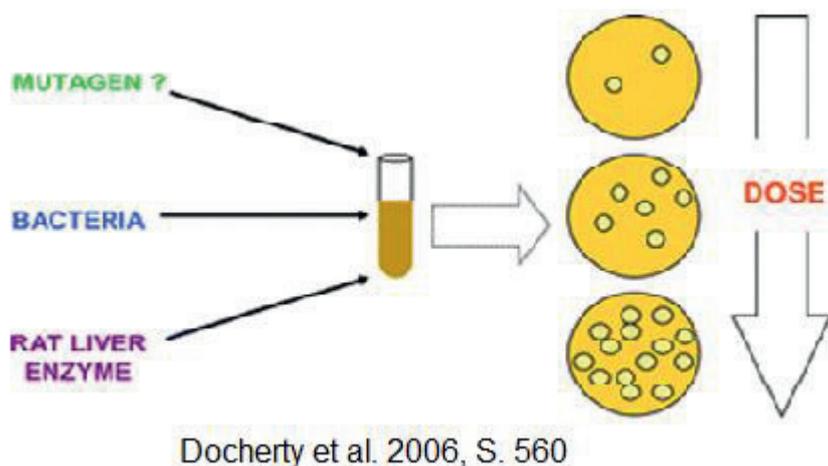
bzw. zusätzliche Informationen für die Emissionen bei Verbrennung von DK und RME (Krahl et al. 1996, Büniger et al. 1998) und wurden deshalb nicht mehr in diese Testreihe aufgenommen.

Eine weitere Änderung nahmen wir bei der Herstellung der S9-Fraktion (Mikrosomen) vor. Zur Enzyminduktion ersetzten wir das polychlorierte Biphenyl-Gemisch (PCB) Arochlor-1254 durch Nembutal (Applikation im Trinkwasser) und β -Naphthoflavin, das den Wistar-Ratten intraperitoneal injiziert wurde (Matsushima et al. 1976, Ong et al. 1980). Aus den Lebern der Ratten wurde dann die S9-Fraktion gewonnen wie bei Maron und Ames beschrieben (1983). Die Zugabe von S9-Mix in der Versuchsreihe soll die enzymatische Aktivierung der Promutagene bei höheren Organismen simulieren. Die Fähigkeit der so hergestellten S9-Fraktion, PAH zu aktivieren, wurde durch enzymkinetische Untersuchungen kontrolliert und bestätigt (Büniger et al. 2000).

Als Positivkontrollen wurden wie bei Maron und Ames (1983) beschrieben, sowohl Methylmethansulfonat (MMS) als auch 2-Aminofluren (2-AF) als Mutagene mit bekannter Wirkung verwendet. MMS wies seine Basenpaarsubstitutionen verursachende Wirkung nach, indem es nur im Stamm TA100 eine erhöhte Rückmutationsrate verursachte. Das 2-AF wurde sowohl ohne als auch mit vierprozentigem S9-Mix getestet. Nur das durch S9 metabolisch aktivierte Mutagen wies eine erhöhte Mutationsrate auf. Zusätzlich nutzten wir noch 3-Nitrobenzantron (3-NBA) als direktes Mutagen und Vertreter der nPAH zur Positivkontrolle. 3-NBA wird als stärkstes der bisher bekannten Mutagene unter den nPAH erachtet (Takamura-Enya et al. 2006).

Die Extrakte wurden gleichzeitig in einem Versuchsdurchgang mit und ohne S9-Zusatz in zunächst drei verschiedenen Dosierungen getestet (25 μ l, 50 μ l, 100 μ l). Jede Testreihe wurde mindestens dreimal wiederholt. Hohe Dosierungen der Extrakte können durch ihre toxische Wirkung die Vitalität der Bakterien vermindern, wodurch die Ergebnisse verfälscht werden und die Dosis-Wirkungs-Kurve abknickt (Krewski et al. 1992). Da dies bei einem Teil der Partikulate der Fall war, testeten wir zusätzlich noch zwei niedrigere Dosierungen (5 μ l und 10 μ l), damit mindestens drei Werte im linearen Teil der Dosis-Wirkungs-Kurve lagen.

Für die Versuchsdurchführung wurde am Vorabend unter sterilen Bedingungen ein wenig von den tiefgefrorenen Teststämmen TA98 und TA100 mit einem Spatel abgekratzt und in Reagenzgläser mit jeweils 8 ml Nährbouillon gegeben. Für 12 h wurden sie in einem 37°C warmen Schüttelwasserbad inkubiert. Die Minimal-Glukose-Platten wurden aus dem Kühlschrank genommen und beschriftet. Der Versuch fand in einer Sicherheitswerkbank statt. Vor Beginn des Versuchs wurden die gewonnenen Extrakte, ebenso wie der S9-Mix aufgetaut. Der S9-Mix lagerte während der Durchführung auf Eis. In einer Mikrowelle wurde der Top-Agar erhitzt und anschließend in ein 50°C warmes Wasserbad gestellt. Pro 100 ml Top-Agar wurden 10 ml Histidin/Biotin-Lösung hinzugegeben. Durch den Transfer des Top-Agars in ein Reagenzglas kühlte er etwas ab. So war der Temperaturunterschied zu den Bakterien geringer und ihre Lebensfähigkeit blieb unbeeinträchtigt. Die Reagenzgläser wurden vor dem Mischen und Ausgießen auf die Minimal-Glukose-Platten mit 2,5 ml Agar, 100 µl Bakterien und der zu testenden Menge des Extrakts (5 µl, 10 µl, 25 µl, 50 µl, oder 100 µl) befüllt. Im Versuch mit dem Rattenleberenzym wurden zusätzlich 0,5 ml des S9-Mixes in das Röhrchen gegeben und nur 2 ml Agar. Die Positiv- und Negativkontrollen wurden mit den entsprechenden Mutagenen, bzw. ohne ein mutagenes Material durchgeführt.



Spontanrate TA98

Positivkontrolle mit
3-NBA

Abbildungen 7 und 8:
Minimal-Glukose-
Platten mit
Bakterienkolonien und
eine schematische
Darstellung des Ames-
Tests.

2.2.4. Auswertung

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden bei 37°C wurde die Anzahl der bakteriellen Kolonien in den Petrischalen mittels des automatischen Kolonien-Zählgeräts Cardinal-1.17 gezählt. Stets wurden einige Platten manuell ausgewertet, um die Qualität der Ergebnisse des Geräts stichprobenartig zu überprüfen.

Bei einem dosisabhängigen Anstieg der Rückmutationsrate auf mindestens das Doppelte der spontanen Rückmutationsrate wurden die Ergebnisse aus den Versuchen als signifikant positiv gewertet (Maron und Ames 1983) und für den direkten Vergleich zwischen den Kraftstoffen als Anzahl der Mutationen pro Platte angegeben. In der Literatur werden die Rückmutationen zum Teil auch pro mg LOF dargestellt (Claxton et al. 1992). Dadurch würden die Ergebnisse im vorliegenden Fall jedoch wegen der unterschiedlich großen löslichen organischen Fraktionen von DK und RME verzerrt, und die Mutagenität des Biodiesel vermindert erscheinen lassen, da er eine erheblich größere lösliche Fraktion hat als die DK (Bünger et al. 2000).

3. Ergebnisse

Die Experimente ergaben Dosis-Wirkungskurven, aus deren linear ansteigenden Verläufen die Steigung errechnet wurde, die je steiler sie ist, eine desto stärkere mutagene Wirkung des Extrakts nachweist (s. Abb. 9). Wie aus dieser Darstellung der Ergebnisse im Stamm TA98 hervorgeht, wirkten die Pflanzenöle um ein mehrfaches mutagener als DK. Die Rapsöl- und Leinölextrakte zeigen in den hohen Dosierungen auch einen toxischen Effekt, so dass die Anzahl an Kolonien rückläufig waren. Die Ergebnisse dieser toxisch beeinflussten Tests werden daher von der Darstellung ausgeschlossen (bei RÖ 100µl, LÖ 50µl und LÖ 100 µl).

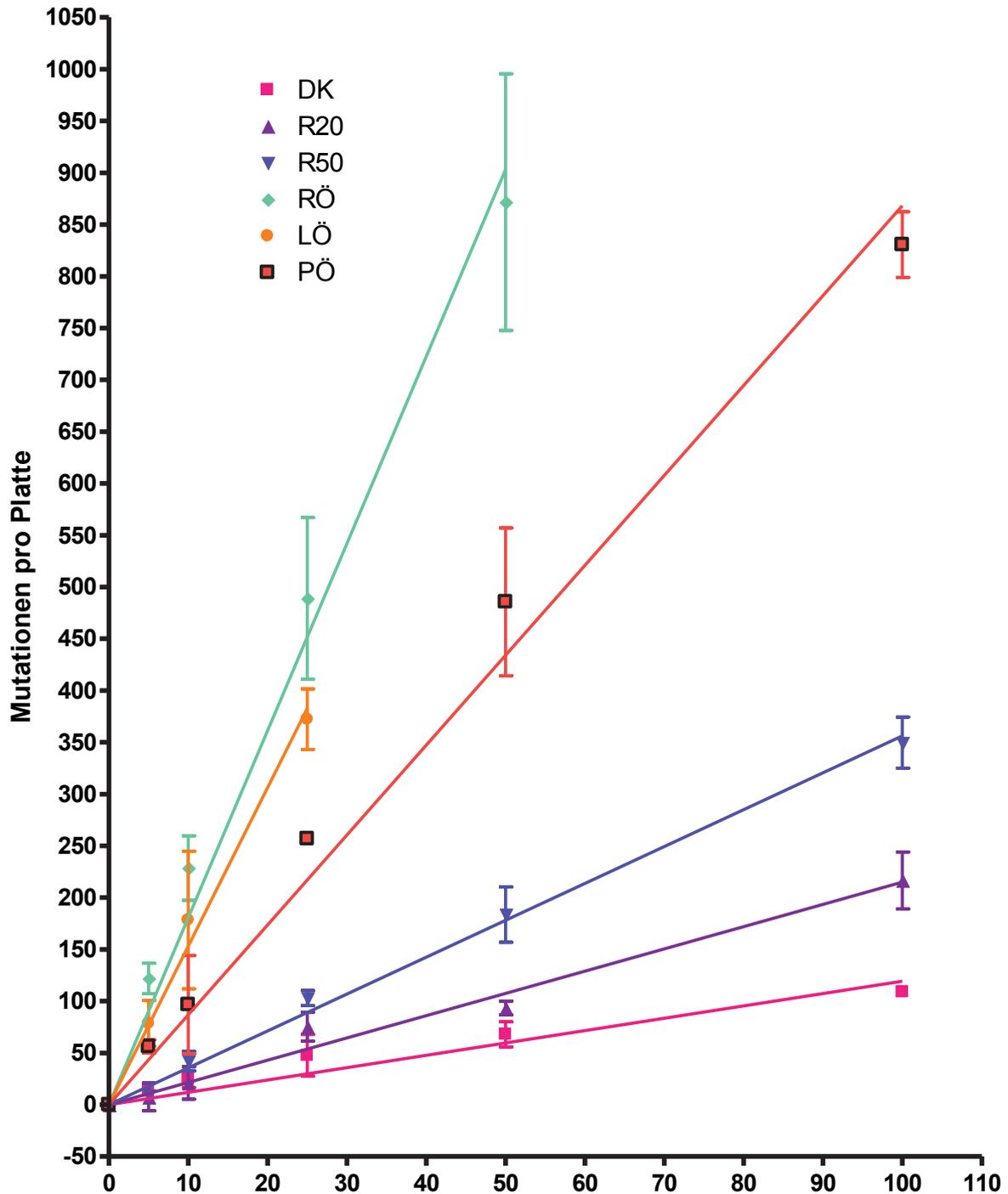


Abbildung 9: Konzentrationsabhängiger Anstieg der Rückmutationen am Beispiel des TA98-Stammes ohne S9. Gezeigt sind die Korrelationsgeraden und die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 bzw. 4 Testwiederholungen. Legende: DK = Dieselkraftstoff, R20 = 20% Rapsöl+80% DK, R50 = 50% Rapsöl+50% DK, RÖ = Rapsöl, LÖ = Leinöl, PÖ = Palmöl.

3.1. Positiv- und Negativkontrollen

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Kontrollen sind in der Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der Kontrollen in Kolonien/Platte.

Stämme	TA98		TA100	
Spontane Rückmutationsrate	32	± 14	154	± 39
Spontane Rückmutationsrate mit DMSO	28	± 9	144	± 30
Spontane Rückmutationsrate +S9	49	± 12	152	± 20
Methylmethansulfonat	35	± 10	1787	± 510
2-Aminofluoren	57	± 22	150	± 35
2-Aminofluoren +S9	2062	± 710	1061	± 337
3-Nitrobenzanthron	2622	± 461	1693	± 1214

3.2. Partikelmasse

Die Gesamtpartikelmasse (GPM) des R20 liegt kaum über der der DK, wobei der Anteil der LOF etwas größer erscheint. Der R50 dagegen imponiert mit sowohl der kleinsten UPM wie auch LOF. Bei den Pflanzenölen weist Palmöl die deutlich geringste GPM auf. Da die UPM unterhalb der der DK liegt, trägt die LOF zum Großteil der GPM bei. Im Vergleich zum Raps- bzw. Leinöl ist das jedoch immer noch verhältnismäßig wenig. Deren LOF wiegen 7,9 bzw. 13,8mg pro Filter. Die UPM vom Rapsöl ist unauffällig. Das Leinöl erzielt auch hier mit 5mg im Durchschnitt den Höchstwert.

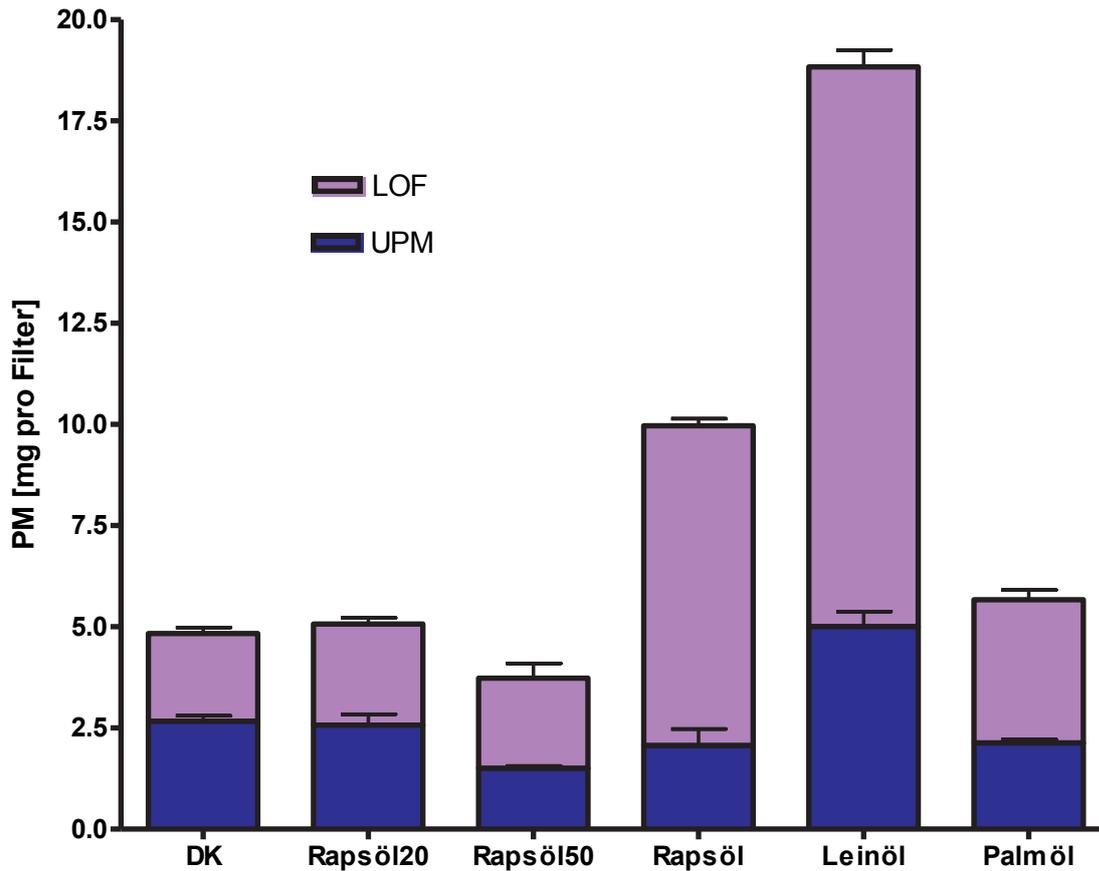


Abbildung 10: Darstellung der Gesamtpartikelmasse (GPM), aufgeteilt in die lösliche organische Fraktion (LOF) und die unlösliche Partikelmasse (UPM).

3.3. Mutagenität der Partikulate

Die Abbildungen 11 und 12 zeigen, dass die als Referenz mit getesteten DK mit und ohne S9-Mix sowohl bei dem TA98 als auch TA100-Teststamm die niedrigste Anzahl an Rückmutationen pro Platte aufweist. Im Versuch mit TA98 ohne S9 liegt die Mutagenität bei R20 etwa doppelt so hoch wie bei den DK, bei R50 sogar 3-4fach. Der TA100-Stamm hingegen zeigt einen Anstieg von weniger als 50%. Auch mit metabolischer Aktivierung zeigen sich im relativen Verhältnis etwa identische Resultate im Vergleich zu den Ergebnissen ohne S9.



Die reinen Pflanzenöle sind wiederum um ein Vielfaches stärker mutagen als die Blends bzw. die fossilen DK. Palmöl ist mit seinem hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren 7,3mal stärker mutagen als die DK. Leinöl und Rapsöl mit einer hohen Anzahl an (mehrfach) ungesättigten Fettsäuren liegen sogar 12,8 bzw. 15,1fach über dem Referenzkraftstoff. Durch die Zugabe des S9-Mixes ergibt sich auch hier eine verringerte Anzahl an Rückmutationen mit Ausnahme des Palmöls, das im Versuch mit TA98 kaum Veränderungen aufweist. Auch im Stamm TA100 sind die Rückmutationsraten erhöht. Allerdings liegt das Palmöl nur 3,9fach, Leinöl 4,2fach und Rapsöl 5,7fach über den DK. Palmöl zeigt sich ohne metabolische Aktivierung nahezu so mutagen wie Leinöl, während Rapsöl mit S9-Mix im Stamm TA100 nur noch gering stärker mutagen erscheint als Leinöl.

Die hohen Dosierungen der Extrakte führen besonders bei Raps- und Leinöl zu toxischen Wirkungen. Der Bakterienhintergrund ist ausgedünnt und die Ergebnisse zeigen eine starke Abflachung der Steigung, bzw. sogar einen Abfall der Mutationsrate. Aus diesen Gründen wurden die Versuche erneut mit niedrigeren Dosierungen wiederholt. Am stärksten ist der toxische Effekt bei TA100 ohne metabolische Aktivierung. Die toxischen Merkmale fallen bei allen drei Pflanzenölen bei den Konzentrationen 50µl und 100µl auf. Auch im Test mit TA98 zeigt Leinöl seine Toxizität bereits ab 50µl des Extraktes. Die anderen Kraftstoffe weisen keine toxische Wirkung auf.

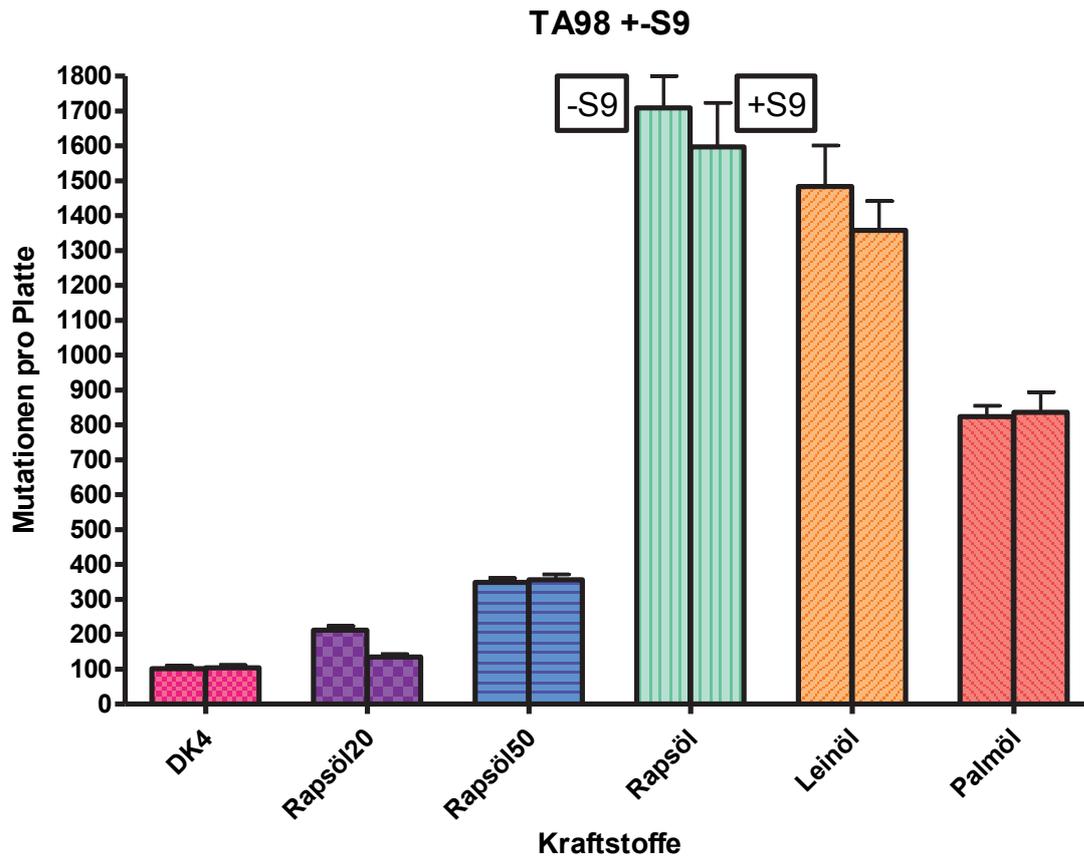


Abbildung 11: Darstellung der Mutagenität der Partikulate im Stamm TA98 mit und ohne enzymatische Aktivierung (+S9, -S9).

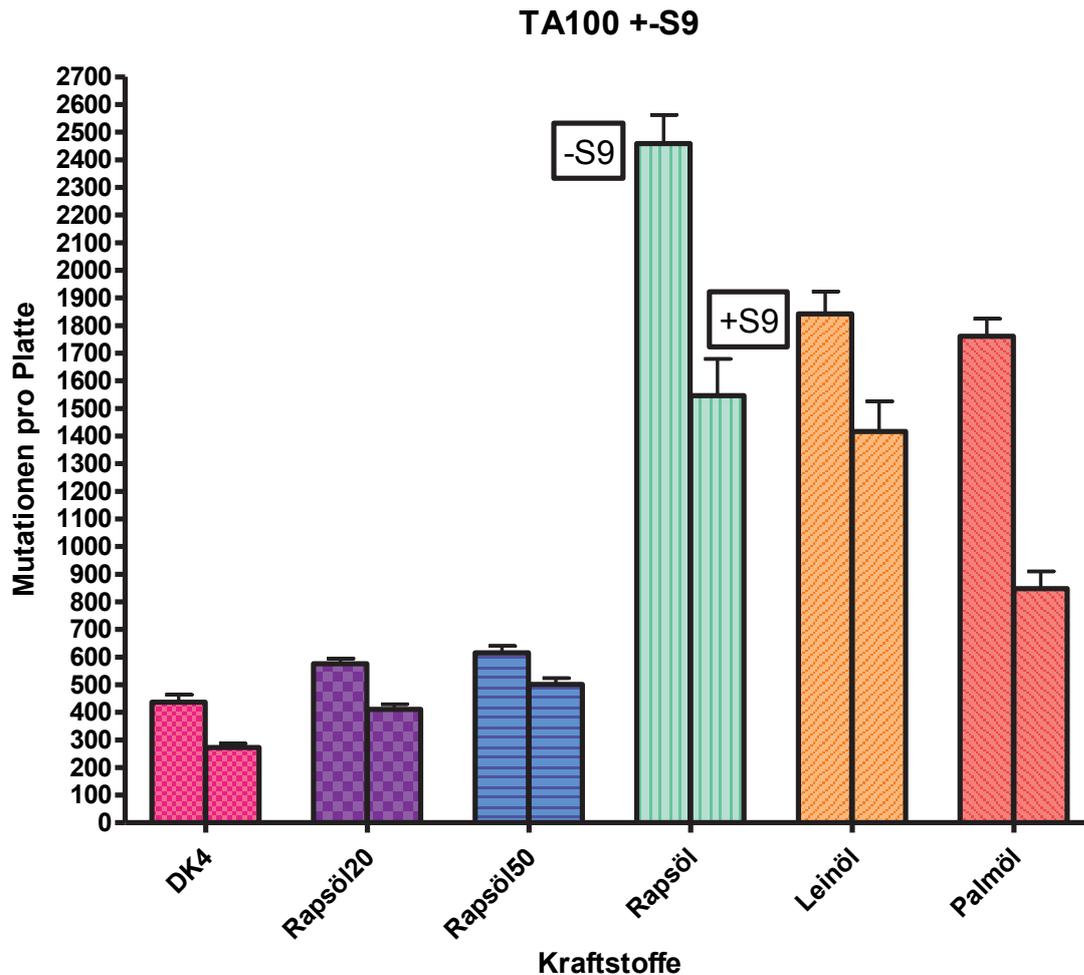


Abbildung 12: Darstellung der Mutagenität der Partikulate im Stamm TA100 mit und ohne enzymatische Aktivierung (+S9, -S9).

3.4. Mutagenität der Kondensate

Bei den Kondensaten ändert sich das Bild etwas. Insgesamt ist das Niveau der Rückmutationen deutlich niedriger. Die reinen DK sind weiterhin der Kraftstoff mit der niedrigsten Mutagenität. Alle Treibstoffe erzeugen weniger Rückmutationen als bei den Partikulaten. R50 ist der einzige Kraftstoff, der im Vergleich zu den Partikulaten, nicht in seiner Mutagenität abfällt. Er liegt bei beiden Tests ungefähr 3fach so hoch wie die DK. Damit liegt er bei den Basenpaarsubstitutionen ohne S9-Mix im ähnlichen Bereich wie Raps- und Leinöl und über dem Palmöl. Deren Kondensate sind maximal 4,5fach und 3,8fach höher als der Referenztreibstoff. Leinöl weist mit

metabolischer Aktivierung am TA98 und TA100 eine 5 bzw. 3mal höhere und damit die insgesamt höchste Mutagenität auf. Ohne S9-Mix liegt Rapsöl knapp über dem Leinöl. Palmöl hat mit und ohne S9 mit beiden Teststämmen weiterhin die niedrigste Anzahl an Rückmutationen aller Pflanzenöle. Im Versuch mit TA100 ist Palmöl weniger mutagen als R50 und weist mit metabolischer Aktivierung auch geringere Rückmutationszahlen als R20 auf. R20 ist im Versuch mit TA100 der einzige Kraftstoff, der mit dem S9-Mix eine höhere Mutagenität zeigt als ohne. Im Vergleich zwischen R20 und R50 ist im Versuch mit TA98 eine doppelt so hohe Anzahl an Rückmutationen auf der Seite von R50 festzustellen. Bei den Untersuchungen mit TA100 wiederum ist die Mutagenität ohne S9-Mix im Verhältnis zu R20 2,6mal so hoch. Mit metabolischer Aktivierung liegt der Unterschied beim 1,2fachen.

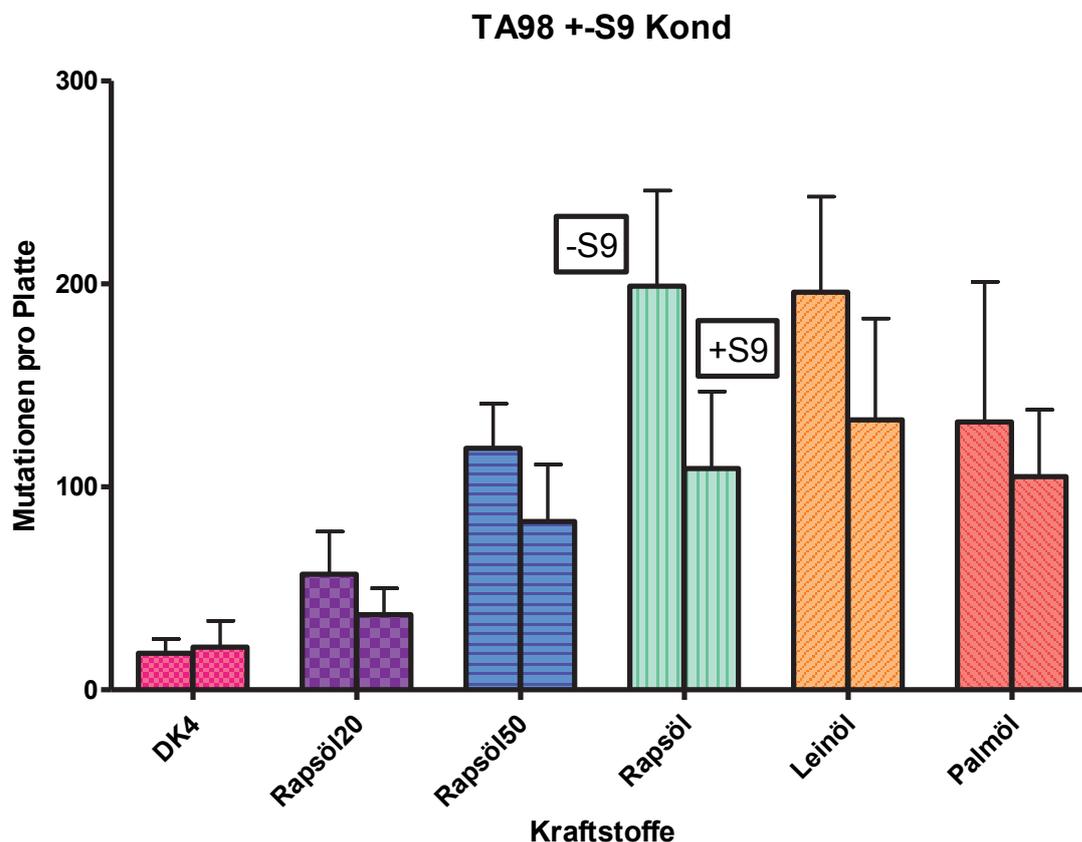


Abbildung 13: Darstellung der Mutagenität der Kondensate im Stamm TA98 mit und ohne enzymatische Aktivierung (+S9, -S9).

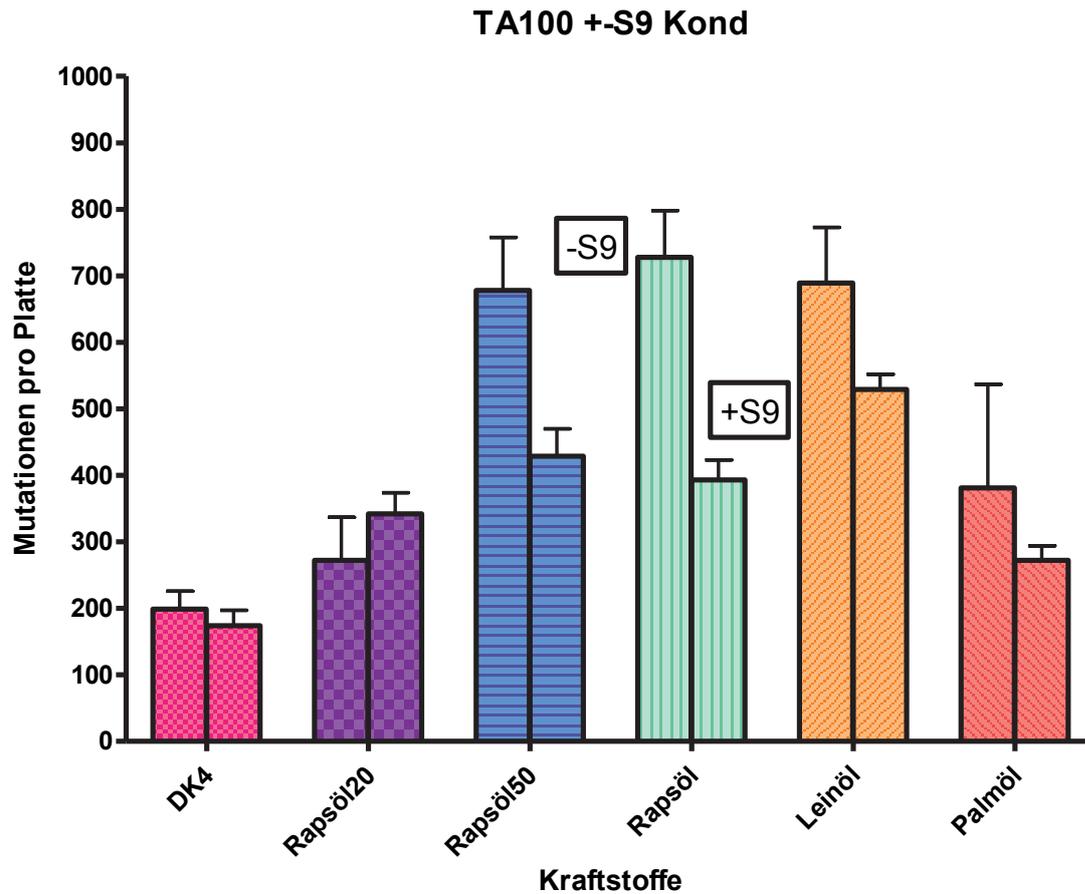


Abbildung 14: Darstellung der Mutagenität der Kondensate im Stamm TA100 mit und ohne enzymatische Aktivierung (+S9, -S9).

4. Diskussion

Die mutagenen und kanzerogenen Wirkungen von DME werden schon lange erforscht. Bereits 1978 wurde das mutagene Potenzial der Dieselpartikelextrakte von Huisingh et al. beschrieben. Mittlerweile haben zahlreiche Forschungsarbeiten dies bestätigt (Clark und Vigil 1980, Claxton und Barnes 1981, Lewtas 1983). Weitere Arbeitsgruppen bewiesen die Mutagenität der Kondensate der Gasphase von DME im Ames-Test (Stump et al. 1982, Rannug 1983, Matasushita et al. 1986).

Da sich Lungenkrebs über Jahrzehnte entwickelt, muss die Latenzzeit von ca. 30 Jahren bei epidemiologischen Studien berücksichtigt werden. Aufgrund der erst kurzen Nutzungszeit kann derzeit daher der Langzeiteffekt von DME auf den Menschen weder bei Verwendung von Biodiesel oder reinem Pflanzenöl noch der Blends abgesehen werden. Die Bestimmung der mutagenen Wirkung der Abgase bei Verbrennung neuartiger Kraftstoffe im Ames-Test ist daher ein wichtiges Hilfsmittel zur Abschätzung der Veränderung eines Gesundheitsrisikos durch DME. Die Mutagenität gibt Hinweise auf das kanzerogene Potenzial der Emissionen. Die Bedeutung dieses *in-vitro*-Verfahrens wird zusätzlich dadurch unterstrichen, dass auch noch keine vergleichenden tierexperimentellen Studien zu biologischen Wirkungen von DME bei Verbrennung von Pflanzenölen vorliegen. Das Ziel dieser *in-vitro*-Studie war, einen ersten Vergleich zwischen DK, den Blends sowie den reinen Pflanzenölen zu ziehen und die mögliche arbeits- und umweltmedizinische Relevanz aufzuzeigen.

4.1. Einflussfaktoren auf die Mutagenität der DME

Bevor die Ergebnisse zur Mutagenität der DME bei Verbrennung von Pflanzenölen und deren Blends mit DK im Einzelnen diskutiert werden, soll zunächst auf die testbedingten Einflüsse eingegangen und zu Stärken und Schwächen des Testsystems Stellung genommen werden.

4.1.1 Toxizität

Die Toxizität im Ames-Test zeigt sich durch eine im Vergleich zu den Kontrollen erkennbare Ausdünnung des Bakterienhintergrunds auf den Petrischalen und lässt sich im vorliegenden Fall bei den Pflanzenölen besonders gut beobachten. Ähnlich wie die Mutagenität tritt der toxische Effekt am stärksten beim LÖ und RÖ in Erscheinung. Bei den gewählten Dosierungen der Blends und der DK ist noch keine Toxizität erkennbar. Beide Beobachtungen könnten mit einer schlechteren Verbrennung der ungesättigten Fettsäuren zusammenhängen, die im LÖ und RÖ einen besonders hohen Anteil haben. Im Zusammenhang mit der Mutagenität wird diese Hypothese näher diskutiert. Sicher bedarf es jedoch noch weiterer Forschungsarbeiten, um diese Fragestellung vertieft zu prüfen.

4.1.1. S9-Mix

Dass der S9-Mix die Mutagenität der partikulären Extrakte und Kondensate häufig verringert, wurde bereits von vielen Autoren beschrieben (Huisinigh et al. 1978, Clark und Vigil 1980, Claxton 1983, Stalder et al. 1993, Carraro et al. 1997, Bagley et al. 1998, Büniger et al. 1998). Das deutet einerseits darauf hin, dass in den Extrakten ein großer Anteil an direkt mutagenen Substanzen wie z. B. nPAH enthalten ist, die keine metabolische Aktivierung benötigen. Andererseits wird angenommen, dass eine Bindung der PAH an die Proteine des S9-Mixes dafür verantwortlich ist, dass sie nicht mehr für die Reaktion mit der DNA der Bakterien zur Verfügung stehen. Des Weiteren wird dieser Effekt einer Deaktivierung der Mutagene durch mischfunktionelle Oxidasen zugeschrieben, die im S9-Mix mit enthalten sind (Clark und Vigil 1980, Wang et al. 1981).

4.1.2. Kontrollen

Der Mittelwert der Spontanmutationen des Stammes TA98 liegt im Bereich von 25-50 Mutationen pro Platte wie bei Maron und Ames (1983) beschrieben, aber einzelne Werte der spontanen Rückmutationsraten unterschreiten diesen Richtwert. Diese Abweichung wurde schon in anderen vorangegangenen Studien beschrieben (Huisingh et al. 1978, Claxton und Barnes 1981, Belisario et al. 1984) und wird auch durch frühere Versuche aus diesem Labor bestätigt (Stalder et al. 1993, Büniger et al. 1998). Die Spontanraten des Stammes TA100 unterschreiten nur in wenigen Einzelfällen den angegebenen Bereich von 120-180 Mutationen pro Platte.

In den Positivkontrollen mit MMS steigt wie erwartet nur die Mutationsrate des Stammes TA100 auf über das 10fache der Spontanmutationsrate. Das 2-AF zeigt als Mutagen, das metabolisch aktiviert werden muss, nur mit S9-Mix im Stamm TA98 eine ca. 40fach höhere Rückmutationsrate bzw. im TA100-Stamm 6fach mehr Kolonien im Vergleich zu den Spontanmutationen mit S9-Mix. Mit 3-NBA als direktes und sehr starkes Mutagen steigen die Mutationsraten sogar auf das 87 und 12fache für TA98 bzw. TA100.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Bakterienstämme wie erwartet auf die als Positivkontrollen eingesetzten mutagenen Substanzen reagieren und die Zahlen der Spontanmutationen im erwarteten Bereich liegen. Die Resultate mit 2-AF beweisen, dass der S9-Mix in der Lage ist, die indirekten Mutagene zu aktivieren, so dass sie mit der bakteriellen DNA reagieren können.

4.1.3. Partikelmassen

Die LOF der Pflanzenöle sprechen für die Hypothese, dass die unterschiedlichen Sättigungsgrade der Öle, Einfluss auf die Qualität der Verbrennung haben.

Leinöl mit vielen (mehrfach) ungesättigten Fettsäuren, zeigt gemäß der Annahme die mit Abstand höchste Partikelmasse und überschreitet mit 0,145 g/kWh auch den

gesetzlichen Grenzwert der Euro-III-Norm (0,1 g/kWh). Besonders auffällig ist die LOF, die 6fach größer ist als die LOF der DK. Die LOF besteht weitestgehend aus unverbranntem Kraftstoff, also den Triglyceriden des Pflanzenöls und den Produkten der unvollständigen Verbrennung, so z.B. den PAH die das mutagene Potenzial steigern, wie in früheren Studien beobachtet wurde (Scheepers und Bos 1992 a und b, Rosenkranz 1996). Eine hohe LOF ist also in der Regel durch eine unvollständige Verbrennung verursacht und führt zur erhöhten Mutagenität der DME.

Rapsöl, das weniger Doppelbindungen als Leinöl aber mehr als Palmöl aufweist, hat mit einer etwa 4fach erhöhten LOF die zweitgrößte lösliche Phase. Palmöl mit vielen gesättigten Fettsäuren hat die kleinste LOF der Pflanzenöle, die aber immer noch mehr als 2fach größer ist als die LOF von den DK.

Betrachtet man die Blends, sieht man zunächst die Ergebnisse von Fang und McCormick (2006), Krahl et al. (2007) und Büniger et al. (2009) bestätigt. Fang und McCormick (2006) untersuchen Blends aus Biodiesel und DK auf die Bildung von Sedimenten und Schwebstoffen. Es zeigte sich eine von 0% (V/V) ansteigende Kurve, die bei einer Beimischung von 20% (V/V) Biodiesel den Höhepunkt erreicht. Beim weiter steigenden Anteil an Biodiesel sank die Kurve wieder und erreichte den Tiefpunkt bei reinem Biodiesel. Die GPM von R20 liegt entsprechend des von Fang und McCormick (2006) festgestellten Ausflockungsmaximums über der GPM von R50. Dadurch liegt die Annahme nahe, dass die mit Biodiesel-DK-Mischungen gewonnenen Ergebnisse auf die hier mit Pflanzenöl produzierten Blends übertragbar sein könnten. R50 imponiert mit den niedrigsten GPM, UPM und LOF. Dies würde auf eine gute Verbrennung schließen lassen.

Der Einfluss der Pflanzenöle und Blends auf die Partikelbildung während der Verbrennung scheint damit zur formulierten Hypothese zu passen.

4.1.4. Mutagenität der DME bei Verbrennung von Pflanzenölen

Diese vergleichende *in-vitro*-Studie zeigt, dass die Verbrennung von Pflanzenölen im Dieselmotor deutlich stärker mutagene Abgase verursacht als die DK. Die limitierten

CO-Emissionen, die sonst in der Regel zur Beurteilung der Verbrennungsqualität herangezogen werden, lassen hingegen nicht auf diese schlechtere Verbrennung schließen. Alle gesetzlich regulierten Komponenten der DME bei Verbrennung der Pflanzenöle liegen im erlaubten Rahmen der Euro-III-Norm (CO: 2,1 g/kWh) und sogar niedriger als die DK (Bünger et al. 2007, Krahl et al. 2007, Krahl et al. 2009).

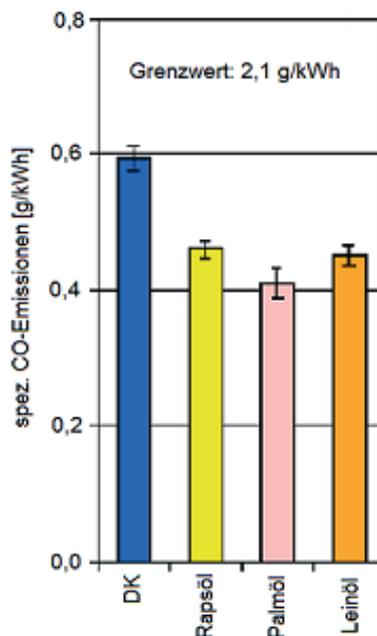


Abbildung 15:
Spezifische CO-Emissionen bei unterschiedlichen Pflanzenölsorten sowie DK = Dieselkraftstoffe.

Als möglicher Grund für die hohe Mutagenität der Pflanzenöle wird die höhere Viskosität der Öle diskutiert. Bünger et al. (2007) und Krahl et al. (2009) erhitzen das RÖ auf 70°C bevor es eingespritzt wurde, um so die Viskosität der der DK anzunähern. Die dadurch optimierte Verbrennung sollte eine niedrigere Mutagenität zur Folge haben. Statt zu sinken, stieg die Rückmutationsrate im Vergleich zur Einspritzung mit kühlem Öl aber nochmals weiter an. Dorn und Zahoransky (2009) erwärmten das RÖ mit der sogenannten Zwei-Tank-Lösung sogar auf 80-90 C°. Hierfür wurde ein zusätzlicher Tank eingebaut, in dem das Öl erhitzt wurde. War die entsprechende Temperatur erreicht und die Viskosität gesunken, wurde anstelle der DK, mit denen der Motor startete, dann das RÖ eingespritzt. Aufgrund der eingeschränkten Aussagekraft der Ames-Test-Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe, lässt sich nicht beurteilen, ob der erwünschte Effekt tatsächlich erzielt werden konnte, wie später noch dargestellt wird.

Dass die Motorenanpassung für den Betrieb mit Pflanzenöl wahrscheinlich von Wichtigkeit ist, konnten Thuneke et al. (2007) darlegen. Sie nutzten einen Deutz-

Traktormotor mit 119 kW, der für die Verbrennung von Rapsöl umgebaut wurde. Die Mutagenität der Partikelextrakte lag beim Rapsöl etwas unterhalb der des Referenzdiesels. Die Probenahme erfolgte jedoch erst nach der Stabilisierungsphase des jeweiligen Betriebspunktes im Testzyklus, so dass die Lastwechselreaktionen des Motors nicht berücksichtigt wurden. Während dieser Lastwechsel wird jedoch der Großteil der mutagenen Bestandteile des Abgases produziert, so dass der Effekt der Modifikation bei Probennahmen während des gesamten Testzyklus besser beurteilbar gewesen wäre.

Dorn und Zahoransky (2009) nutzten zur Probengewinnung für den Ames-Test einen auf den Betrieb mit Pflanzenöl umgerüsteten MAN-Motor, der die Abgasnorm Euro-IV erfüllte. Während die limitierten Abgase unter den Belastungen des ESC getestet wurden, erfolgte die Probenahme für die Mutagenitätsbestimmung im *steady state* bei 3300 U/min und 50 kW. Der Versuch wurde mittels eines Fluktuationsassays von Xenometrix GmbH an den Partikulaten durchgeführt. Dieses System wurde im Institut für Arbeitsmedizin der Universität Göttingen auch getestet. Die Ergebnisse waren denen des Ames-Tests deutlich unterlegen. Obwohl der Test sowohl an TA98, TA100 und einem TA-Mix durchgeführt wurde, sind nur die Daten mit dem weniger sensitiven TA100 beschrieben. Die Ergebnisse der Positivkontrollen wurden gar nicht angegeben. Damit lässt sich keine Aussage zu der Qualität des Fluktuationsassay machen. Aus den nicht signifikant erhöhten Rückmutationsraten wurde geschlossen, dass es keinen Unterschied zwischen Pflanzenölen und herkömmlichen DK in Bezug auf die Gesundheit gibt. Da jedoch die Mutagenität von DK seit über 20 Jahren bewiesen und anerkannt ist, schränken die genannten Aspekte die Aussagekraft der Ergebnisse ein.

Krahl et al (2009) untersuchten die Abgase von vier unterschiedlichen Kraftstoffen, GTL, RME, RÖ und DK. Als Testmotor diente ein Mercedes-Benz OM 906 LA Euro-III Motor. Die Proben wurden an den Teststämmen TA 98 und TA100 auf ihre Mutagenität getestet. Die Positivkontrollen des Ames-Tests wurden mit MMS (TA98: 29 ± 11 ; TA100: 2125 ± 142), 3-NBA (TA98: 3461 ± 301 ; TA100: 1887 ± 86) und 2-AF mit S9-Mix (TA98: 1528 ± 97 ; TA100: 1205 ± 60) durchgeführt. Die Rückmutationsraten zeigen eine adäquate Antwort auf die Agenzien gemäß der OECD Guideline 471. Auch die Negativkontrollen mit DMSO liegen im beschriebenen Rahmen von Maron und Ames (1983). Die Ergebnisse unterstreichen unsere

eigenen Resultate. RÖ lässt durch einen niedrigen CO-Wert auf eine gute Verbrennung schließen, zeigt aber im Ames-Test gegenüber DK eine vielfach erhöhte Zahl an Rückmutationen. Besonders die Partikulate des RÖ mit und ohne S9-Mix sind bis zu 10mal höher als die der DK.

Die Hypothese bezüglich der Fettsäuren und ihrer Sättigungsgrade lässt sich nur zum Teil bestätigen, da Palmöl zwar stets den niedrigsten mutagenen Effekt aufweist, aber bei Leinöl nicht entsprechend der Zahl seines hohen Anteils an 3fach ungesättigten Fettsäuren immer die höchste Mutagenität nachgewiesen werden kann. Betrachtet man den prozentualen Anteil der gesamten ungesättigten Fettsäuren, fällt aber auf, dass Rapsöl mit 92,8% höher liegt als Leinöl mit 90,5%. Dies entspricht den Ergebnissen des Ames-Tests und unterstützt unsere Hypothese. Die Abbildung 15 stellt die Korrelation für die Partikelextrakte zwischen der Zahl der Mutationen im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung und dem prozentualen Anteil ungesättigter Fettsäuren der einzelnen Kraftstoffe dar.

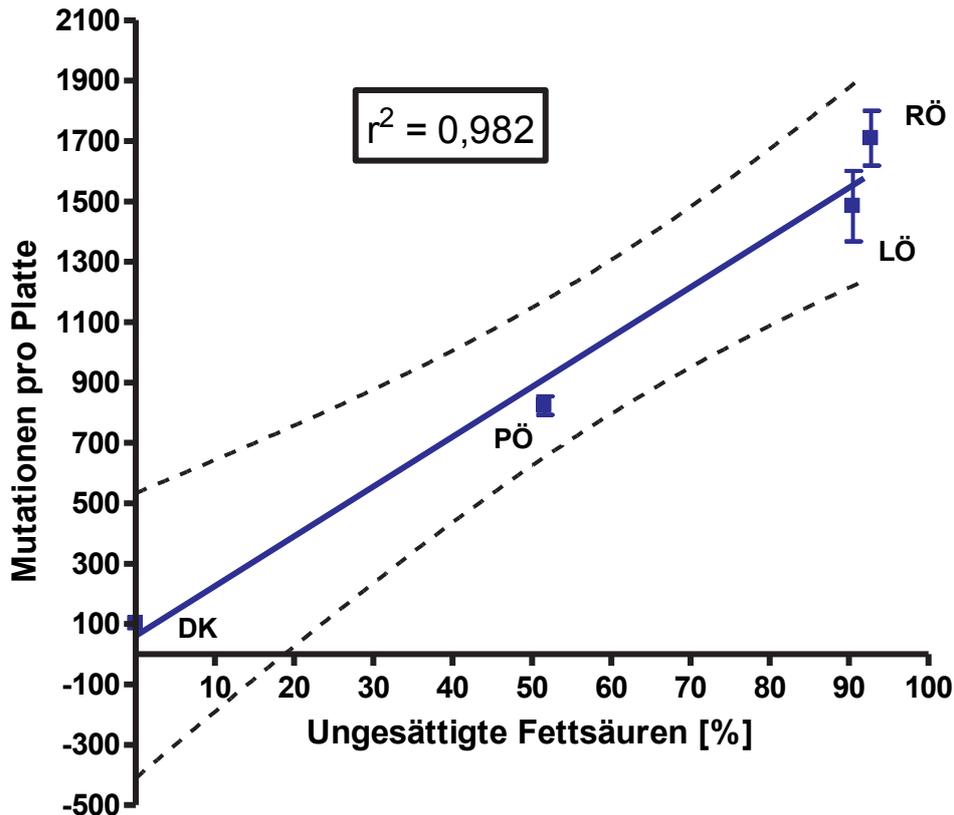


Abbildung 15: Korrelation für die Partikelextrakte zwischen der Zahl der Mutationen im Stamm TA98 ohne S9 und dem Anteil ungesättigter Fettsäuren der einzelnen Kraftstoffe. DK = Diesekraftstoffe, PÖ = Palmöl, LÖ = Leinöl, RÖ = Rapsöl, r^2 = Bestimmtheitsmaß

Für die übrigen Ergebnisse der Partikelextrakte und der Kondensate in beiden Teststämmen mit und ohne metabolische Aktivierung wurden Bestimmtheitsmaße (r^2) zwischen 0,7 und 0,95 berechnet (ohne Abbildung). Trotz der hohen Bestimmtheitsmaße dieser linearen Korrelationen ist das Ergebnis mit großer Vorsicht zu interpretieren, weil DK zwar keine ungesättigten Fettsäuren enthält, aber auch ein grundsätzlich anders zusammengesetzter Kraftstoff ist. Prinzipiell müsste

als Referenzkraftstoff ein Pflanzenöl ohne oder mit sehr geringem Anteil an ungesättigten Fettsäuren verwendet werden. Ein solcher Kraftstoff steht derzeit aber nicht zur Verfügung. Hinzu kommt, dass die Korrelationen nicht mehr stimmen, wenn statt des prozentualen Anteils an ungesättigten Fettsäuren die Zahl der Doppelbindungen, bzw. die mehrfach ungesättigten Fettsäuren als Maß herangezogen werden. Bei dieser Berechnung müsste die Mutagenität von Leinöl höher sein als die des Rapsöls.

4.1.6 Mutagenität der DME bei Verbrennung von Blends

Bei Betrachtung der Blends, fällt auf, dass R50 außer im Versuch mit den Partikulaten an TA100 in allen Untersuchungen deutlich stärker mutagen ist als R20. Dieses Ergebnis war unerwartet, da die maximale Ausflockung bei 20% Beimischung von RME lag (Fang und McCormick 2006). Andere Arbeitsgruppen stellten die höchste Mutagenität ebenfalls bei 20% fest (Kado et al. 1996, Krahl et al. 2008). Es liegt die Annahme nah, dass der Blend durch das Sediment schlechter verbrannt wird, und damit die Mutagenität durch die in den Abgasen befindlichen Kraftstoffüberreste steigt (Krahl et al. 2008, Bünger et al. 2009). Der vielleicht entscheidende Unterschied ist, dass unsere Blends nicht mit RME, sondern RÖ gemischt wurden und sich dadurch möglicherweise das Ausfällungsmaximum verschiebt. Dies bedarf noch weiterer Untersuchungen. Ein Vergleich zu Studien mit Pflanzenölmethylester im Blend ist nicht möglich, da die Reinkraftstoffe im Versuch zu große Unterschiede aufweisen (Krahl et al. 2009).

Krist et al. (2007) konnten keine nennenswerte Mutagenität für DK und den Blend feststellen. Auf die Zusammensetzung des Kraftstoffmixes wurde nicht weiter eingegangen. Dadurch ist die Beurteilung der Ergebnisse nur bedingt möglich, weil wie bereits erwähnt, die Mutagenität wesentlich vom Mischungsverhältnis abhängt. Die Autoren schreiben, dass das *bifa Umweltinstitut* für die Bestimmung der Mutagenität der DME mittels Ames-Test bis zu 30 mg Ruß benötigen. Es wurden jedoch nur 21,48 mg und 9,01 mg Ruß beim Diesel- bzw. Kraftstoffmixbetrieb gesammelt. Die Positivkontrollen sind weitestgehend unauffällig. Einzig der Stamm

TA100 reagierte nur eingeschränkt auf das MMS. Der Motor war ein DAF CF 85 PACCAR MX mit 12,9 L Hubraum. Er war aber mit einer *selektiven katalytischen Reduktion* (SCR) zur Abgasnachbehandlung ausgerüstet. Das System vermag nicht nur die limitierten, sondern auch nicht-limitierten Emissionen, wie z.B. PAH, effektiv zu reduzieren (Krahl et al. 2007). Dadurch sind die Schadstoffwerte so niedrig, dass der Motor als EURO-V zugelassen ist und keine mutagenen Effekte mehr dargestellt werden können. Daher ist leider kein Vergleich zu den eigenen Ergebnissen möglich. Die Verbrennungsqualität der Pflanzenöle sollte deswegen ohne Abgasnachbehandlung getestet werden.

Das Phänomen der Ausfällung wurde durch eine Di- bzw. Oligomerisierung von Kraftstoffbestandteilen erklärt (Fang und McCormick 2006). Durch die reaktiven Bindungsstellen der Fettsäuren kommt es zur Reaktion von Fettsäuren mit anderen Bestandteilen des Kraftstoffs. Dadurch flocken sie aus und bilden ein Sediment, das schlecht verbrennt. Die mögliche Folge ist eine vermehrte Bildung von PAH bei der Verbrennung und die dadurch erhöhte Mutagenität. Im Bereich der Blends von Fettsäuremethylestern (Biodiesel) ist die Studie von Krahl et al. (2008) die am größten angelegte. Es wurde mit 3 Motoren getestet. Die Mischverhältnisse der Blends variierten von B5 bis B50. Als Referenzkraftstoffe dienten DK und RME. An allen 3 Aggregaten wurde bei B20 die höchste Mutagenität gemessen, die bis zu 3mal so hoch lag wie bei den reinen Treibstoffen. Die Untersuchung spiegelt eine hohe Reproduzierbarkeit wider, die deutlich zeigt, dass besonders B20-Blends aus RME und DK ein erhöhtes mutagenes Potenzial gegenüber den Reinkraftstoffen haben. Daneben gibt es noch die Untersuchungen von Turrio-Baldassarri et al. (2004), die an einem IVECO 8360.46R mit 7,8 L Hubraum DK und B20 testeten. Die Ergebnisse des Ames-Tests waren wenig konsistent. Sie streuten erheblich. Daher konnte kein einheitlicher Trend festgestellt werden. Bei der Probenextraktion fällt auf, dass dies die einzige Arbeitsgruppe ist, die mit *Accelerated Solvent Extraction* (ASE) arbeitet. Das System extrahiert bei 100°C und einem Druck von 100 atm die Partikel. Die Studie vermag es nicht, eine Aussage über die Mutagenität von Mischkraftstoffen zu geben, da die Ergebnisse so stark schwankten.

5. Zusammenfassung

Zur Untersuchung der drei gebildeten Hypothesen wurden Abgasproben der Testkraftstoffe (DK, R20, R50, RÖ, LÖ und PÖ) am stationären Mercedes-Benz OM 906 LA Euro III während des ESC-Testzyklus gezogen. Die Mutagenität der DME wurde nach der Extraktion mittels des Ames-Tests untersucht. Sowohl die Positiv- als auch Negativkontrollen bestätigten, dass die Reagenzien und Teststämme für die Versuche geeignet waren.

Die Ergebnisse zeigten bei den Pflanzenölblends gegenüber dem DK eine erhöhte Mutagenität, wobei die Partikulate und Kondensate des R50 im Versuch mit beiden Teststämmen mehr Rückmutationen pro Platte aufwiesen als R20. Als nochmals stärker mutagen erwiesen sich die Pflanzenöle. PÖ war das am schwächsten mutagene Öl, aber damit immer noch stärker mutagen als DK und die Blends. Abgesehen von den Kondensaten im Versuch mit TA98 und S9-Mix hatte RÖ stets die höchste Anzahl an Rückmutationen.

Das mutagene Potenzial steht teilweise im Kontrast zur Partikelmasse. DK und R20 stoßen nach der Verbrennung eine fast gleich große GPM aus. Trotzdem fällt R20 mit einer höheren Mutagenität auf. Obwohl R50 die kleinste UPM-Phase hat und auch die LOF-Phase sehr klein ist, zeigt der Ames-Test nicht die geringste Anzahl an Rückmutationen. LÖ hingegen produziert die höchste GPM, UPM und LOF, ist jedoch weniger mutagen als RÖ.

Die Hypothese, dass auch andere Pflanzenöle als RÖ zu einer erhöhten Mutagenität der DME führen, konnte klar bewiesen werden. Sowohl beim Betrieb mit LÖ als auch PÖ wurden im Vergleich zu den DK erhöhte Zahlen an Rückmutationen im Ames-Test nachgewiesen. Auch die Hypothese zu der Mutagenität der Pflanzenölblends konnte bestätigt werden. Wie bei den Biodieselblends, sind auch die DME von Blends aus DK und Rapsöl höher mutagen als die reinen DK. Während das Mutagenitätsmaximum der Biodieselblends bei 20% Biodieselbeimischung liegt (Krahl et al. 2008), scheint es bei Pflanzenölblends jedoch verschoben zu sein. Dies genau festzulegen bedarf weiterführender Untersuchungen. Die dritte Hypothese bezüglich der Mutagenität in Abhängigkeit von der Zahl der ungesättigten Fettsäuren



ist bei Betrachten des gesamten Anteils an ungesättigten Fettsäuren in den jeweiligen Pflanzenölen und den entsprechenden Rückmutationsraten deutlich nachvollziehbar.



6. **Ausblick**

Die Hydrierung von Pflanzenölen zu „*Hydrotreated Vegetable Oil*“ (HVO) könnte zukünftig eine weitere Option für die Nutzung von Pflanzenölen als Biokraftstoff sein. Durch die Behandlung mit Wasserstoff werden die Fettsäuren zu kürzeren Kohlenstoffketten aufgespalten und die Doppelbindungen aufgelöst. Dadurch verbrennt der Kraftstoff sauberer, und die Mutagenität sinkt auf niedrigere Werte als bei FSME oder DK (Krahl et al. 2011). Bei den gesetzlich limitierten Emissionen wurde allerdings kein nennenswerter Vorteil des HVO gegenüber herkömmlichen DK beobachtet (Jalava et al. 2010).



7. Literaturverzeichnis

1. Ames BN, McCann J, Yamasaki E (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 31, 347 - 363
2. Attfield MD, Schleiff PL, Lubin JH, Blair A, Stewart PA, Vermeulen R, Coble JB, Silvermann DT (2012): The Diesel Exhaust in Miners Study: A Cohort Mortality Study With Emphasis on Lung Cancer. *J Natl Cancer Inst* 104, 869 – 883
3. Baan R, Grosse Y, Straif K, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa a, Neela Guha L, Freeman C, Galichet L (2009): A Review of Human Carcinogens – Part F: Chemical Agents and Related Occupations. *Lancet Oncol* 10, 1143 - 1144
4. Bagley ST, Gratz LD, Johnson JH, McDonald JF (1998): Effects of an oxidation catalytic converter and a biodiesel fuel on the chemical, mutagenic, and particle size characteristics of emissions from a diesel engine. *Environ Sci Technol* 32, 1183 - 1191
5. Benbrahim-Tallaa L, Baan RA, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Guha N, Loomis D, Straif K (2012): Carcinogenicity of diesel-engine and gasoline-engine exhausts and some nitroarenes. *Lancet Oncol* 7, 663 - 664
6. Belisario MA, Buonocore V, De Marinis E, De Lorenzo F (1984): Biological availability of mutagenic compounds absorbed on diesel exhaust particulate. *Mutat Res* 135, 1 - 9
7. Brüske-Hohlfeld I, Möhner M, Ahrens W, Pohlabein H, Heinrich J, Kreuzer M, Jöckel KH, Wichmann HE (1999): Lung Cancer Risk in Male Workers Occupationally Exposed to Diesel Motor Emissions in Germany. *Am J Ind Med* 36, 405 - 414
8. Bünger J, Krahl J, Franke HU, Munack A, Hallier E (1998): Mutagenic and cytotoxic effects of exhaust particulate matter of biodiesel compared to fossil diesel fuel. *Mutat Res* 415, 13 - 23
9. Bünger J, Müller MM, Krahl J, Baum K, Weigel A, Hallier E, Schulz TG (2000): Mutagenicity of diesel engine particles from two fossil and two plant oil fuels. *Mutagenesis* 15, 391 - 397
10. Bünger J, Krahl J, Munack A, Ruschel Y, Schröder O, Emmert B, Westphal G, Müller M, Hallier E, Brüning T (2007): Strong mutagenic effects of diesel engine emissions using vegetable oil as fuel. *Arch Toxicol* 81, 599 - 603
11. Bünger J, Krahl J, Munack A (2009): Health hazards from biodiesel blends? *Inform* 9, 560 - 562



12. Carraro E, Locatelli AL, Ferrero C, Fea E, Gilli G (1997): Biological activity of particle exhaust emissions from light-duty diesel engines. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 16, 101 - 109
13. Clark CR, Vigil CL (1980): Influence of rat lung and liver homogenates on the mutagenicity of diesel exhaust particulate extracts. *Toxicol Appl Pharmacol* 56, 100 - 115
14. Claxton LD (1983): Characterization of automotive emissions by bacterial mutagenesis bioassay: a review. *Environ Mutagen* 5, 609 - 631
15. Claxton LD, Barnes HM (1981): The mutagenicity of diesel-exhaust particle extracts collected under smog-chamber conditions using the *Salmonella typhimurium* test system. *Mutat Res* 88, 255 - 272
16. Claxton LD, Creason J, Leroux B, Agurell E, Bagley S, Bryant DW, Courtois YA, Douglas G, Clare CB, Goto S (1992): Results of the IPCS collaborative study on complex mixtures. *Mutat Res* 276, 23 - 32
17. DFG - Deutsche Forschungsgemeinschaft: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten: Dieselmotoremissionen. Wiley-VCH, Weinheim 1987
18. Diesel R: Die Entstehung des Dieselmotors; Springer Verlag, Berlin 1913
19. Docherty KM, Hebbeler SZ, Kulpa CF (2006): An assessment of ionic liquid mutagenicity using the Ames Test. *Green Chem* 8, 560 - 567
20. Dockery DW, Pope CA III (1994): Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu Rev Public Health* 15, 107 - 132
21. Doll R, Vessey MP, Beasley RWR, Buckley AR, Fear EC, Fisher REW, Gammon EJ, Gunn W, Hughes GO, Lee K, Norman-Smith B (1972): Mortality of gasworkers—final report of a prospective study. *Br J Ind Med* 29, 394 - 406
22. Dorn B, Zahoransky R (2009): Non-Esterified Plant Oil as Fuel – Engine Characteristics, Emissions and Mutagenic effects of PM. SAE Paper 2009-24-0097
23. EEA (European Environment Agency): The European Environment State and Outlook Air Pollution. Copenhagen, Denmark 2010
24. Fang HL, McCormick RL (2006): Spectroscopic Study of Biodiesel Degradation Pathways. SAE Technical Paper 2006-01-3300 (Society of Automotive Engineers, Warrendale, PA, U.S.A.), 1 - 9
25. Gamble JF, Nicolich MJ, Boffetta P (2012): Lung cancer and diesel exhaust: an updated critical review of the occupational epidemiology literature. *Crit Rev Toxicol* 42, 549 - 598
26. Garshick E, Schenker MB, Munoz BP, Segal M, Smith TJ, Woskie SR, Hammond SK, Speizer FE (1987): A Case-Control Study of Lung Cancer and



- Diesel Exhaust Exposure in Railroad Workers. *Am Rev Respir Dis* 135, 1242 - 1248
27. Garshick E, Laden F, Hart JE, Rosner B, Smith TJ, Dockery DW, Speizer FE (2004): Lung Cancer in Railroad Workers Exposed to Diesel Exhaust. *Environ Health Perspect* 112, 1539 - 1543
 28. Hasford B, Wimbauer M, Höpfe P, Fruhmann G, Weyermann M: Respiratory symptoms and lung function after exposure to exhaust fumes from rape seed oil in comparison to regular diesel fuel; in: *Advances in the Prevention of Occupational Respiratory Diseases*; hrsg. v. Chiyotani K, Hosoda Y, Aizawa Y, Elsevier Science, Amsterdam 1998, 131 - 135
 29. Hayakawa K, Nakamura A, Terai N, Kizu R, Ando K (1997): Nitroarene concentrations and direct-acting mutagenicity of diesel exhaust particulates fractionated by silica-gel column chromatography. *Chem Pharm Bull* 45, 1820 – 1822
 30. Heeb NV, Schmid P, Kohler M, Gujer E, Zennegg M, Wenger D, Wichser A, Ulrich A, Gfeller U, Honegger P (2008): Secondary effects of catalytic diesel particulate filters: conversion of PAHs versus formation of nitro-PAHs. *Environ Sci Technol* 42, 3773 - 3779
 31. HEI (Health Effects Institute): Diesel exhaust: A Critical Analysis of Emissions, Exposure, and Health Effects. A special report of the institute's diesel working group. Cambridge, MA, USA 1995
 32. HEI (Health Effects Institute): Diesel Exhaust and Lung Cancer: Epidemiology and Quantitative Risk Assessment. A Special Report of the Institute's Diesel Epidemiology Expert Panel. Cambridge, MA, USA 1999
 33. HEI (Health Effects Institute): Traffic-Related Air Pollution: A Critical Review of the Literature on Emissions, Exposure, and Health Effects. Boston, MA, USA 2010
 34. Heinrich U, Muhle H, Takenaka S, Ernst H, Fuhst R, Mohr U, Pott F, Stöber W (1986 a): Chronic effects on the respiratory tract of hamsters, mice and rat after long-term inhalation of high concentrations of filtered and unfiltered diesel engine emissions. *J Appl Toxicol* 6, 383 - 395
 35. Heinrich U, Pott F, Rittinghausen S: Comparison of chronic inhalation effects in rodents after long-term exposure to either coal oven flue gas mixed with pyrolyzed pitch or diesel engine exhaust; in: *Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust*. Ishinishi N, Koizumi A; McClellan R; Stöber W, eds.; Elsevier, Amsterdam 1986 b, 441 - 457
 36. Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W, Levsen K (1995): Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhal Toxicol* 7, 533 - 556



37. Hesterberg TW, Long CM, Bunn WB, Sax SN, Lapin CA, Valberg PA (2009): Non-cancer health effects of diesel exhaust: a critical assessment of recent human and animal toxicological literature. *Crit Rev Toxicol* 39, 195 - 227
38. Howe GR, Lindsay JP (1983): A follow-up study of a ten percent sample of the Canadian labour force. I. Cancer mortality in males, 1965-1973. *J Natl Cancer Inst* 70, 37 - 40
39. Huisingsh J, Bradow R, Jungers R, Claxton L, Zweidinger R, Tejada S, Bumgarner J, Duffield F, Waters M: Application of bioassay to the characterization of diesel particle emissions; in: Application of short-term bioassay in the fractionation and analysis of complex environmental mixtures; hrsg. v. Waters MD, Nesnow S, Huisingsh JL, Sandhu SS, Claxton LD; Plenum Press, New York 1978, 382 - 418
40. Ishinishi N, Kuwabara N, Nagase S, Suzuki T, Ishiwata S, Kohno T: Long-term inhalation studies on effects of exhaust from heavy and light duty diesel engines on F344 rats; in: Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust; hrsg. v. Ishinishi N, Koizumi A, Mc Clellan RO, Stöber W; Elsevier Science Publishing, New York 1986, 329 - 348
41. Iwai K, Udagawa T, Yamagishi M, Yanada H: Long-term inhalation studies of diesel exhaust on 344 SPF rats; in: Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust; hrsg. v. Ishinishi N, Koizumi A, Mc Clellan RO, Stöber W; Elsevier Science Publishing, New York 1986, 349 - 360
42. Jalava PI, Tapanainen M, Kuuspalo K, Markkanen A, Hakulinen P, Happonen MS, Pennanen AS, Ihalainen M, Yli-Pirilä P, Makkonen U (2010): Toxicological effects of emission particles from fossil- and biodiesel-fueled diesel engine with and without DOC/POC catalytic converter. *Inhal Toxicol* 2, 48 - 58
43. Jöckel KH, Ahrens W, Jahn I, Pohlmann H, Bolm-Audorff U: Untersuchungen zu Lungenkrebs und Risiken am Arbeitsplatz (Schlussbericht); Wirtschaftsverlag NW, Berlin 1995
44. Kado NY, Kuzmicky PA, Okamoto RA: Chemical and bioassay analyses of diesel and biodiesel particulate matter: Pilot Study- Final report, EDG-95-7561. Montana Department of Environmental Quality. Helena, Montana 1996
45. Katsouyanni K, Touloumi G, Spix C, Schwartz J, Balducci F, Medina S, Rossi G, Wojtyniak B, Sunyer J, Bacharova L, Schouten JP, Ponka A, Anderson HR (1997): Short-term effects of ambient sulphur dioxide and particulate matter on mortality in 12 European cities: Results from time series data from the APHEA project. *Air pollution and health: a European approach*. *BMJ* 314, 1658 - 1663
46. Kotin P, Falk H, Thomas M (1955): Aromatic hydrocarbons. III. Presence in the particulate phase of diesel engine exhausts and the carcinogenicity of exhaust extracts. *Arch Ind Health* 11, 113 - 120
47. Krahl J, Vellguth G, Munack A, Stalder K, Bahadir M (1996): Exhaust Gas Emissions and Environmental Effects by Use of Rape Seed Oil Based Fuels in Agricultural Tractors. SAE Paper 961847



48. Krahl J, Munack A, Grope N, Ruschel Y, Schröder O, Bünger J (2007): Biodiesel, Rapeseed Oil, Gas-To-Liquid, and a Premium Diesel Fuel in Heavy Duty Diesel Engines: Endurance, Emissions and Health Effects. *Clean* 35, 417 - 426
49. Krahl J, Munack A, Ruschel Y, Schröder O, Bünger J (2008): Exhaust Gas Emissions and Mutagenic Effects of Diesel Fuel, Biodiesel and Biodiesel Blends. SAE Paper 2008-01-2508
50. Krahl J, Knothe G, Munack A, Ruschel Y, Schröder O, Hallier E, Westphal G, Bünger J (2009): Comparison of exhaust emissions and their mutagenicity from the combustion of biodiesel, vegetable oil, gas-to-liquid and petrodiesel fuels. *Fuel* 88, 1064 - 1069
51. Krahl J, Munack A, Bünger J, Pabst C, Schaak J, Schmidt L, Schröder O: Fuel and Technology Alternatives for Buses – Measurements with NExBTL and Jatropa Oil Methyl Ester in a Euro III Heavy Duty Engine. Zitiert nach dem Vortrag vom 24.5.2011 auf: ExCo41, Karlsruhe, 24.-26.05.2011, Programm und Inhaltsangabe; o.O. 2011
52. Krewski D, Leroux BG, Creason J, Claxton L (1992): Sources of variation in mutagenic potency of complex chemical mixtures based on the Salmonella/mircosome assay. *Mutat Res* 276, 33 - 59
53. Krist H, Fischer H, Hoppenheidt K: Prüfung der Mutagenität von Inhaltsstoffen partikulärer Abgasbestandteile im Ames-Test. BIFA-Umweltinstitut, Projekt-Nr. 630094, Augsburg 2007, 1 - 19
54. Lewtas J (1983): Evaluation of the Mutagenicity and Carcinogenicity of Motor Vehicle Emissions in Short-Term Bioassays. *Environ Health* 47, 141 - 152
55. Lüllmann-Rauch R: Histologie Verstehen – Lernen – Nachschlagen. 1. Auflage ; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003
56. Maron DM, Ames BN (1983): Revised methods of the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113, 173 - 215
57. Maron DM, Katzenellenbogen J, Ames BN (1981): Compatibility of organic solvents with the Salmonella/mircosome test. *Mutat Res* 88, 343 - 350
58. Matasushita H, Goto S, Endo O, Lee JH, Kawai A : Mutagenicity of diesel exhaust and related chemicals, in: *Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust*; hrsg. v. Ishinishi N, Koizumi A, McClellan RO, Stöber W; Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Devision), Amsterdam 1986, 103 - 119
59. Matsushima T, Sawamura M, Hara K, Sugimura T: A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system; in: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*; hrsg. v. de Serres FJ, Fouts JR, Bend RM, Philpot RN; Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam 1976, 85 - 88



60. McCoy EC, Rosenkranz EJ, Rosenkranz HS, Mermelstein R (1981): Nitrated Fluorene Derivatives are potent Frameshift Mutagens. *Mutat Res* 90, 11 - 20
61. Morgenstern V, Zutavern A, Cyrus J, Brockow I, Koletzko S, Krämer U, Behrendt H, Herbarth O, von Berg A, Bauer CP, Wichmann HE, Heinrich J; GINI Study Group; LISA Study Group. (2008): Atopic diseases, allergic sensitization, and exposure to traffic-related air pollution in children. *Am J Respir Crit Care Med* 177, 1331 - 1337
62. Morris RE, Pollack AK, Mansell GE, Lindhjem C, Jia Y, Wilson G (2003): Impact of biodiesel fuels on air quality and human health. Summary Report, National Renewable Energy Laboratory. ENVIRON International Corporation Novato, California (URL: <http://www.nrel.gov/vehiclesandfuels/npdf/pdfs/33793.pdf>)
63. Nikula KJ, Snipes MB, Barr EB, Griffith WC, Henderson RF, Mauderly JL (1995): Comparative pulmonary toxicities and carcinogenicities of chronically inhaled diesel exhaust and carbon black in F344 rats. *Fundam Appl Toxicol* 25, 80 - 94
64. Ong T, Mukhtur M, Wolf CR, Zeiger E (1980): Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 4, 55 - 65
65. Pesch B, Haerting F, Ranft U, Kimpel A, Oelschlägel B, Schill W (2000): Occupational risk factors for renal cell carcinoma: agent-specific results from a case-control study in Germany. MURC Study Group. Multicenter urothelial and renal cancer study. *Int J Epidemiol* 29, 1014 - 1024
66. Pott F, Roller M, Kamino K, Bellmann B (1994): Significance of durability of mineral fibers for their toxicity and carcinogenic potency in the abdominal cavity of rats in comparison with the low sensitivity of inhalation studies. *Environ Health Perspect* 102, 145 - 150
67. Pukkala E, Martinsen JI, Lynge E, Gunnarsdottir HK, Sparén P, Tryggvadottir L, Weiderpass E, Kjaerheim K (2009): Occupation and cancer - follow-up of 15 million people in five Nordic countries. *Acta Oncol* 48, 646 - 790
68. Rannug U (1983): Data from short-term tests on motor vehicle exhausts. *Environ Health* 47, 161 - 169
69. Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). *Krebs in Deutschland 2007/2008*, 8. Ausgabe, RKI Berlin 2012, 57 - 59
70. Rosenkranz HS (1996): Mutagenic nitroarenes, diesel emissions, particle-induced mutations and cancer: an essay on cancer causation by a moving target. *Mutat Res* 367, 65 - 72
71. Rushton L, Bagga S, Bevan R, Brown TP, Cherrie JW, Holmes P, Fortunato L, Slack R, Van Tongeren M, Young C, Hutchings SJ (2010): Occupation and cancer in Britain. *Br J Cancer* 102, 1428 - 1437



72. Säverin R, Bräunlich A, Dahmann D, Enderlein G, Heuchert G (1999): Diesel Exhaust and Lung Cancer Mortality in Potash Mining. *Am J Ind Med* 36, 415 - 422
73. SCAQMD (2000): Multiple air toxics exposure study in the South Coast Air Basin-MATES II. South Coast Air Quality Management District, Diamond Bar, (URL: <http://www.aqmd.gov/matesiidf/matestoc.htm>)
74. Scheepers PTJ, Bos RP (1992 a): Combustion of diesel fuel from a toxicological perspective: 1. Origin of incomplete combustion products. *Int Arch Occup Environ Health* 64, 149 - 161
75. Scheepers PTJ, Bos RP (1992 b): Combustion of diesel fuel from a toxicological perspective: 2. Toxicity. *Int Arch Occup Environ Health* 64, 163 - 177
76. Siak JS, Chan TL, Lee PS (1981): Diesel particulate extracts in bacterial test systems. *Environ Int* 5, 243 - 248
77. Silverman DT, Samanic CM, Lubin JH, Blair AE, Stewart PA, Vermeulen R, Coble JB, Rothman N, Schleiff PL, Travis WD (2012): The Diesel Exhaust in Miners Study: A Nested Case-Control Study of Lung Cancer and Diesel Exhaust. *J Natl Cancer Inst* 104, 855 - 868
78. Stalder K, Gerhard V, Frohmann H, Krahl J: Zytotoxizität und Mutagenität von Dieselruß bei Verwendung von Rapsölmethylester als Kraftstoff; in: *Verhandlungen der deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. (Band 33)*; hrsg v. Triebig G, Stelzer O; Gentner, Stuttgart 1993, 75 - 78
79. Steenland NK, Silvermann DT, Hornung RW (1990): Case-control study of lung cancer and truck driving in the teamster union. *Am J Epidemiol* 126, 247 - 257
80. Steenland K, Deddens J, Stayner L (1998): Diesel exhaust and lung cancer in the trucking industry: exposure-response analyses and risk assessment. *Am J Ind Med* 34, 220 - 228
81. Swanson GM, Lin CS, Burns PB (1993): Diversity in the association between occupation and lung cancer among black and white men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2, 313 - 320
82. Stump F, Bradow R, Ray W, Dropkin D, Zwedinger R, Sigsby J, Snow R: Trapping gaseous hydrocarbons for mutagenic testing. Society of Automotive Engineers, Paper No. 820776, Warrendale USA 1982
83. Takamura-Enya T, Suzuki H, Hisamatsu Y (2006): Mutagenic activities and physicochemical properties of selected nitrobenzanthrones. *Mutagenesis* 21, 399 - 404
84. Thuneke K, Emberger P, Gassner T, Remmele E, Widmann B, Fischer H, Krist H, Schnelle-Kreis J, Hoppenheidt K (2007): Mutagenität der Partikelemissionen eines mit Rapsöl- und Dieselmotorkraftstoff betriebenen Traktors. *Berichte aus dem TFZ* 14, 1 - 96



85. Turrio-Baldassarri L, Battistelli CL, Conti L, Crebelli R, De Berardis B, Iamiceli AL, Gambino M, Iannaccone S (2004): Emission comparison of urban bus engine fueled with diesel oil and 'biodiesel' blend. *Sci Total Environ* 327, 147 - 162
86. US-EPA - Environmental Protection Agency (2002): Health assessment document for diesel engine exhaust. *Federal Register* 2002, Vol. 67, No. 170
87. Wang YY, Taclott RE, Seid DA, Wei EJ (1981): Antimutagenic properties of liver homogenate protein and glutathione on diesel exhaust particulates. *Cancer Lett* 11, 265 - 275
88. Westerholm R, Christensen A, Törnqvist M, Ehrenberg L, Rannug U, Sjögren M, Rafter J, Soontjens C, Almén J, Grägg K (2001): Comparison of exhaust emissions from Swedish environmental classified diesel fuel (MK1) and European Program on Emissions, Fuels and Engine Technologies (EPEFE) reference fuel: a chemical and biological characterization, with viewpoints on cancer risk. *Environ Sci Technol* 35, 1748 - 1754
89. Wichmann HE (2004): Positive gesundheitliche Auswirkungen des Einsatzes von Partikelfiltern bei Dieselfahrzeugen - Risikoabschätzung für die Mortalität in Deutschland. *Umweltmed Forsch Prax* 9, 85 - 99
90. Wichmann HE, Kreienbock L, Kreuzer M, Gerken M, Dingerkus G, Wellmann J, Keller G: Lungenkrebsrisiko durch Radon in der Bundesrepublik Deutschland (West). (Fortschritte in der Umweltmedizin); ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg/Lech 1998
91. Zaebst DD, Clapp DE, Blade LM, Marlow DA, Steenland K, Hornung RW, Scheutzle D, Butler J (1991): Quantitative determination of trucking industry workers' exposures to diesel exhaust particles. *Am Ind Hyg Assoc J* 52, 529 - 541



8. Abkürzungsverzeichnis

2-AF = 2-Aminofluoren

B5 = Dieselkraftstoff mit 5% Biodiesel

B7 = Dieselkraftstoff mit 7% Biodiesel

B20 = Dieselkraftstoff mit 20% Biodiesel

B50 = Dieselkraftstoff mit 50% Biodiesel

B100 = reiner Biodiesel

CO = Kohlenstoffmonoxid

CO₂ = Kohlenstoffdioxid

DCM = Dichlormethan

DK = Dieselkraftstoffe

DME = Dieselmotoremissionen

DMSO = Dimethylsulfoxid

ESC = European Stationary Cycle

FSME = Fettsäuremethylester

GPM = Gesamtpartikelmasse

GTL = Gas-to-Liquid (aus Erdgas synthetisierter Kraftstoff)

HC = hydrocarbons (Wasserstoffe)

HVO = Hydrotreated Vegetable Oil

KI = Konfidenzintervall

LÖ = Leinöl

LOF = organische lösliche Fraktion

MMS = Methylmethansulfonat

3-NBA = 3-Nitrobenzanthron

NO = Stickstoffmonoxid

NO₂ = Stickstoffdioxid

NO_x = Stickoxide

nPAH = Nitro-PAH

OR = Odds Ratio

PAH = *polycyclic aromatic hydrocarbons* (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe)

PM = Partikelmasse



PM_{2,5} = Partikel ≤ 2,5µm

PM₁₀ = Partikel ≤ 10µm

PÖ = Palmöl

r² = Bestimmtheitsmaß

R20 = Dieselkraftstoff mit 20% Rapsöl

R50 = Dieselkraftstoff mit 50% Rapsöl

REC = *respirable elemental carbon* (lungengängiger Ruß)

RME = Rapsölmethylester

RÖ = Rapsöl

RR = relatives Risiko

SIR = standardisierte Inzidenzraten

SME = Sojaölmethylester

SMR = Standardized Mortality Ratio

SO = Schwefelmonoxid

SO₂ = Schwefeldioxid

UFP = ultrafeine Partikel

UPM = unlösliche Partikelmasse



Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Ernst Hallier danken, der diese Doktorarbeit erst ermöglichte und mir stets mit seiner fachlichen Kompetenz zur Seite stand. Durch seine Anregungen und Ratschläge nahm er Einfluss auf mich und half mir die Arbeit in dieser Art und Weise zu vollenden.

Des Weiteren gilt mein Dank all jenen, die außerhalb meines Labors diese Arbeit ermöglichten. Besonders hervorzuheben sind hier: Sowohl Prof. Dr. Jürgen Krahl als Leiter der Forschungsgruppe im Bereich der Chemie und des Ingenieurwesens an der Hochschule Coburg, der mir die Funktionsweise des Dieselmotors und chemische Abläufe näher brachte, insbesondere die Oligomerisierung, als auch die beiden Dipl.-Chem. Olaf Schröder und Jens Schaak, die mir detailliert den Ablauf der Probengewinnung im Johann Heinrich von Thünen-Institut in Braunschweig erklärten, den Teststand zeigten und mir sämtliche Fragen zur Abgasuntersuchung beantworten konnten.



Curriculum vitae

Am 01.07.1984 wurde ich, Jörn Büniger, als zweiter Sohn von Jürgen Büniger und Sigrun Finkemeyer in Göttingen geboren. Die Einschulung in die Albani Grundschule in Göttingen erfolgte 1991. An der Orientierungsstufe der Lutherschule in Göttingen wurde die schulische Laufbahn 1995 fortgesetzt. Von 1997 bis 2004 besuchte ich das Hainberg Gymnasium in Göttingen, das mit dem Erhalt der Hochschulreife verlassen wurde. Das elfte Schuljahr verbrachte ich von 8/2001 bis 6/2002 an der East Highschool in Rockford, Illinois, USA.

Im Anschluss an die schulische Ausbildung leistete ich von 8/2004 bis Ende 5/2005 den Zivildienst als OP-Springer im Krankenhaus Neu-Mariahilf, Göttingen ab. Zum Wintersemester 2005/06 wurde das Studium der Humanmedizin an der Georg-August Universität Göttingen begonnen. Im Frühjahr 2008 absolvierte ich erfolgreich den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Es folgte der Wechsel an die Universität zu Lübeck, um das Studium dort fortzuführen. Die Tertiale des praktischen Jahres wurden am Klinikum Heide (Innere Medizin), an der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Boberg (Chirurgie) und dem Spital Rorschach, Schweiz (Orthopädie/Unfallchirurgie) absolviert. Ende 2012 absolvierte ich den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung und schloss damit erfolgreich das Studium der Humanmedizin ab.



