

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

**Mutagenität von Dieselmotoremissionen bei Verbrennung von biogenen
Kraftstoffen unter besonderer Berücksichtigung der Kraftstoffalterung
(Oxidationsstabilität)**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Markus F. E. Trißler
aus
Neustadt an der Aisch
Göttingen 2013

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

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

II. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. med. A. Schaper

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2013

Inhalt

1.	Einleitung	01
1.1	Dieselmotor	01
1.2	Diesekraftstoffe	02
1.2.1	Mineralölkraftstoff (DK)	02
1.2.2	Biokraftstoffe (FAME, fatty acid methyl esters)	02
1.2.3	Kraftstoffblends	04
1.2.4	Oxidationsstabilität	04
1.3	Dieselmotoremissionen (DME)	04
1.3.1	Partikelphase der DME	05
1.3.2	Gasphase der DME	06
1.3.3	Unterschiede der Zusammensetzung der DME bei Verbrennung von DK und FAME	06
1.4	Biologische Wirkungen der DME	08
1.4.1	Humankanzerogenität (Epidemiologie)	08
1.4.2	Kanzerogenität im Tierversuch	13
1.4.3	Mutagenität	15
1.5	Fragestellungen der vorliegenden Studie	17
1.5.1	Auswirkung der Doppelbindungen der Biokraftstoffmoleküle auf die DME	17
1.5.2	Auswirkung der Alterung der Biokraftstoffe auf die DME	17

2.	Materialien und Methoden	18
2.1	Materialien / Lösungen	18
2.1.1	Soxhlet-Extraktion	18
2.1.2	Trocknung der Kondensate und Partikelextrakte	18
2.1.3	Ames-Test	19
2.1.4	Auswertung	20
2.2	Methoden	20
2.2.1	Eingesetzte Biokraftstoffe	20
2.2.2	Alterung (Oxidation) der Kraftstoffe	24
2.2.3	Herstellung und Lagerung der Motoremissionen	24
2.2.4	Vorbereitung der Kondensate und Filter für die Testung	28
	2.2.4.1 Trocknung der Kondensate und Erstellung der Proben	28
	2.2.4.2 Extraktion der Filter und Erstellung der Proben	29
2.2.5	Ames-Tests (Salmonella-typhimurium/Mikrosomen-Test)	29
2.2.6	Auswertung des Tests	31
3.	Ergebnisse	32
3.1	Partikelmassen	32
3.1.1	Gesamtpartikelmassen	32
3.1.2	Lösliche organische und unlösliche Fraktionen	32
3.2	Mutagenität der Biokraftstoffemissionen	34
3.2.1	Vergleich der Mutagenität der Kondensate der FAME im Überblick	35

3.2.1.1 Vergleich der Kondensate von Leinölmethylester, Rapsölmethylester und Palmölmethylester mit dem Referenzkraftstoff	36
3.2.1.2 Vergleich der Kondensate von Palmölmethylester, Rapsölmethylester und Leinölmethylester untereinander	37
3.2.2 Vergleich der Mutagenität der Partikulate der FAME im Überblick	40
3.2.2.1 Vergleich der Partikulate von Leinölmethylester, Rapsölmethylester und Palmölmethylester mit dem Referenzkraftstoff	43
3.2.2.2 Vergleich der Partikulate von Palmölmethylester, Rapsölmethylester und Leinölmethylester untereinander	44
3.2.3 Vergleich der Mutagenität im Alterungsversuch	47
3.2.3.1 Kondensate	48
3.2.3.2 Partikulate	50
4. Diskussion	52
4.1 Auswirkungen der Anzahl an mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf die Mutagenität von FAME-Abgasen	52
4.2 Mutagenität der Kondensate im Vergleich zu den Partikulaten	54
4.3 Einfluss der Oxidationsstabilität	55
5. Zusammenfassung	57
6. Literaturverzeichnis	59

Abkürzungsverzeichnis

AF	Aminofluoren
AG	Aktiengesellschaft
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm ³	Kubikzentimeter
CO	Kohlenstoffmonoxid
DCM	Dichlormethan
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DK	Diesekraftstoff
DME	Dieselmotoremissionen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
ESC	European Stationary Cycle
et al.	et alii (und andere)
Fa.	Firma
FAME	Fatty Acid Methyl Ester
FSME	Fettsäuremethylester
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GPM	Gesamtpartikelmasse
h	hora (Stunde)
HC	Hydrocarbon (Kohlenwasserstoff)
HEI	Health Effects Institute
HFRR	High frequency reciprocating rig
his	Histidin
IARC	International Agency for Research on Cancer
IGS	Informationssystem Gefährliche Stoffe
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
kin.	kinetisch
kW	Kilowatt
L	Liter

LKW	Lastkraftwagen
LME	Leinölmethylester
LOF	lösliche organische Fraktion
LS-DF	Low sulfur diesel fuel
μL	Mikroliter
m^3	Kubikmeter
mehrf. unges. FS	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
mg	Milligramm
Mill.	Million
Min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mMol	Millimol
MMS	Methylmethansulfonat
MWV	Mineralölwirtschaftsverband
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NBA	Nitrobenzanthron
nm	Nanometer
NO_3^-	Nitrat
NO_x	Stickoxide
OR	Odds Ratio
OT	oberer Totpunkt
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PKW	Personenkraftwagen
PM	Partikelmasse
PME	Palmölmethylester
RME	Rapsölmethylester
RRB	Railroad Retirement Board
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SME	Sojamethylester
SO	Schwefelmonoxid
SO_2	Schwefeldioxid
SO_4^{2-}	Sulfat

sog.	so genannte
TAG	Triacylglycerin
TG	Triglyceride
UF	unlösliche Fraktion
U.K.	United Kingdom
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency
UT	unterer Totpunkt
v.a.	vor allem
VDI	Verein Deutscher Ingenieure
vTI	Johann Heinrich von Thünen-Institut
WB	Wasserbad
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Dieselmotor

Rudolf Diesel stellte im Jahr 1882 der Öffentlichkeit einen Motor mit neuem Funktionsprinzip vor. Dabei wird die Luft im Kolben des Motors so stark komprimiert, dass sie sich auf ca. 700-900 °C erwärmt. In diese heiße Luft wird eine genau dosierte Menge des Dieselkraftstoffs eingespritzt. Dabei entzündet sich der Kraftstoff beim Eintreten in die heiße, verdichtete Luft, verursacht eine Explosion und erzeugt damit die gewünschte Energie.

Der Dieselmotor ist genau wie der Ottomotor ein Viertaktmotor, mit folgenden Takten:

1) Ansaugtakt:

Der Kolben bewegt sich vom oberen Totpunkt (OT) zum unteren Totpunkt (UT) und saugt reine Verbrennungsluft durch das geöffnete Einlassventil an.

2) Verdichtungstakt:

Die angesaugte Luft wird bei geschlossenen Ventilen durch die Kolbenbewegung vom UT zum OT stark verdichtet (30-60 bar), dadurch ergibt sich eine Temperaturerhöhung von ca. 300-400 °C auf ca. 700-900 °C.

3) Arbeitstakt (Arbeitshub):

Der Dieselkraftstoff verbrennt mit dem Sauerstoff der Luft und der Druck der Verbrennungsgase schiebt den Kolben vom OT zum UT.

4) Ausstoßtakt:

Die verbrannten Gase werden durch die Bewegung des Kolbens vom UT zum OT durch das geöffnete Auslassventil ausgestoßen.

Anfänglich wurde der Dieselmotor vorwiegend bei LKWs und Maschinen der Landwirtschaft verwendet. Durch seinen niedrigeren Verbrauch verglichen zum Otto-

Motor während des Betriebes wird er immer mehr im PKW-Bereich eingesetzt. Der Dieselmotor stellt heute eine zum Otto-Motor vergleichbar gute Möglichkeit dar, erneuerbare Kraftstoffe als Antriebskraftstoff für den PKW-Bereich zu verwenden. Zur Verbrennung der in diesen Versuchen verwendeten Kraftstoffe wurde ein Motor des Typs Mercedes Benz OM 906 LA verwendet, der im Abschnitt 2.2.3 noch genauer beschrieben wird.

1.2 Dieselkraftstoffe

1.2.1 Mineralölkraftstoff (DK)

Der herkömmliche Dieselkraftstoff besteht aus Alkanen, Cykloalkanen und aromatischen Kohlenwasserstoffen (10-22 Kohlenstoff-Atomen pro Molekül). Gewonnen wird er durch Destillation von Rohöl als Mitteldestillat (IGS-Stoffliste 09/2008).

Wegen der in Deutschland im Vergleich zum herkömmlichen Benzin geringeren Mineralölsteuer gewinnen Dieselkraftstoffe immer mehr an Bedeutung. Die in den kommenden Jahren drohende Mineralölknappheit zwingt die Industrie auf erneuerbare Kraftstoffe auszuweichen (z.B. auf Biodiesel, der aus verschiedenen Pflanzenölen gewonnen wird). Die Verbrennung von Kraftstoffen ruft Emissionen hervor, die eine gesundheitsbeeinträchtigende Wirkung haben können. In der vorliegenden Arbeit wurden die Emissionen der biogenen Kraftstoffe mit den Ergebnissen für den Referenzkraftstoff (DK) verglichen. Zur Darstellung der Emissionen wurden die Ergebnisse der Verbrennung des Referenzkraftstoffes (DK = 100%) und die Ergebnisse der Biodiesel in ein relatives Verhältnis gesetzt.

Geliefert wurde der DK von der Firma Haltermann Products, Zweigniederlassung der Dow Olefinverbund GmbH, in Hamburg.

1.2.2 Biokraftstoffe (FAME, fatty acid methyl esters)

Biodiesel, auch Fettsäuremethylester (FSME) bzw. im Englischen *Fatty Acid Methyl Ester* (FAME) genannt, bestehen aus mit Methanol oder Ethanol veresterten

Fettsäuren und werden aus Pflanzenölen hergestellt (in seltenen Fällen auch aus tierischen Fetten).

Pflanzliche Öle sind Ester aus Glycerin (Triglyceride, TG) mit verschiedenen Fettsäuren (gesättigt oder ungesättigt), auch Triacylglycerin (TAG) genannt. Bei TAG sind drei Fettsäuren über Esterbindungen kovalent an ein Glycerinmolekül gebunden (Fang und McCormick 2006; Bünger et al. 2000).

Zur Herstellung von FAME werden die TG mit Methanol umgeestert. Die Reaktion wird entweder durch Säuren oder, wie im technischen Prozess verwendet, durch Basen katalysiert. Dabei entstehen aus einem Triglyceridmolekül drei Moleküle FAME.

FAME beinhalten im Vergleich zu DK weniger Schwefel und keine Aromaten (Fang und McCormick 2006).

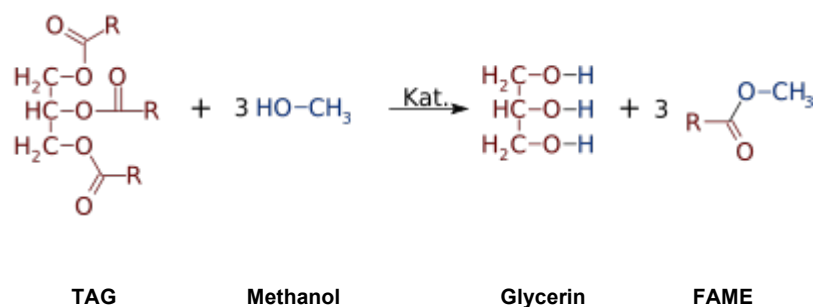


Abbildung 1: Umesterung der Pflanzenöle (Triglyceride)

Verglichen zu DK bringen FAME einige Vorteile mit sich: FAME zeigen neben höherer Umweltfreundlichkeit eine bessere Kosten- und Verwendungseffizienz auf, sobald mindestens 10% FAME zum normalen Kraftstoff hinzu gemischt werden (Liu et al. 2008). Die Verbrennung von FAME in Dieselmotoren führt zur Reduktion von Kohlenwasserstoffen (HC), Kohlenstoffmonoxid (CO) und Partikelmasse (PM) in den Emissionen (Durbin und Norbeck 2002). Hierauf wird unter 1.3.3 (S. 6) näher eingegangen.

1.2.3 Kraftstoffblends

Als Alternative zu herkömmlichen Mineralöl-Dieselmotorkraftstoffen eignet sich die Verwendung von FAME für den Betrieb von Motoren. Allerdings werden FAME als Reinkraftstoff in nur wenigen Ländern (Deutschland und Österreich) verwendet. Meist liegen vielmehr Gemische, sog. Blends, aus Mineralölkraftstoff und FAME vor. Neben der Verwendung von FAME als Reinkraftstoff werden in Deutschland 7% FAME zum DK dazu gegeben (MWV, Amtliche Mineralölstatistik 2011, Tabelle 9). In den USA ist der gängige Anteil an FAME mit 20% Beimischung deutlich höher als in Deutschland (Fang und McCormick 2006). Die momentanen Spezifikationen der FAME werden in den USA über die ASTM D6751 und in Europa über die EN14214 bestimmt (Fang und McCormick 2006).

1.2.4 Oxidationsstabilität

FAME haben unterschiedliche Oxidationspunkte. Ist der Oxidationspunkt nach längerer Zufuhr von Sauerstoff erreicht, altern die FAME. Die Molekülstruktur der FAME beginnt sich zu verändern und eine Sedimentierung der sich bildenden Oligomere tritt ein. Eine solche Alterung wurde in diesen Versuchen künstlich durchgeführt, um zu testen, ob die Molekülveränderungen und die Oligomere Auswirkungen auf die Verbrennung und somit auf die Mutagenität der Verbrennungsabgase der FAME haben. Der genaue Vorgang wird unter 2.2.2 (S. 24) beschrieben.

1.3 Dieselmotoremissionen (DME)

Bei der Verbrennung von DK und FAME entstehen Dieselmotoremissionen (DME). Die entstehenden Emissionen beinhalten gesetzlich limitierte und nicht limitierte Komponenten. Zu den limitierten Komponenten zählen Stickoxide (NO_x), Kohlenstoffmonoxid (CO), Kohlenwasserstoffe (HC, *Hydrocarbons*) und Partikelmasse (PM). Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK),

Aldehyde, Ketone, Aromaten, 1,3-Butadien, Benzol, Toluol und Xylol bilden einen Teil der HC, sind aber im Einzelnen nicht limitiert (Di et al. 2008). Vermehrtes Augenmerk wird auf die PAK gelegt, da sie zum großen Teil mutagene und kanzerogene Wirkungen haben. Sie verursachen oxidative und genetische Schäden und führen zu reproduktionstoxischen und kardiovaskulären Effekten (Lewtas 2007). Des Weiteren wird zwischen Partikel- und Gasphase unterschieden, auf die unter 1.3.1 (S. 5) und 1.3.2 (S. 6) genauer eingegangen wird.

Die Zusammensetzung der DME ist stark von der Kraftstoffqualität, der Art des Motors, der Einspritztechnik, der Abgasnachbehandlung, dem Motoröl, der Motorlast und der Motordrehzahl abhängig (Scheepers und Bos 1992a).

Nach der Verbrennung werden die DME in die Atmosphäre ausgestoßen. Dort agglomerieren die Primärpartikel zu immer größeren Komplexen, adsorbieren HC und andere Stoffe und es entsteht eine Vielzahl an Ionen (wie Sulfat (SO_4^{2-}) aus Schwefeldioxid (SO_2) oder Nitrat (NO_3^-) aus Stickoxiden (NO)). Viele dieser Ionen finden sich in der Partikelphase wieder (Meng et al. 1997). Ein Teil der PAK reagiert zusammen mit anderen Abgaskomponenten zu sogenannten substituierten PAK, wie z.B. Nitro-PAK, Oxy-PAK, Alkyl-PAK, Thio-PAK (IARC 1989, Scheepers und Bos 1992a, Winer und Busby 1995).

1.3.1 Partikelphase der DME

Während der Kraftstoffverbrennung entstehen aus einem Kern elementaren Kohlenstoffs (65%-70%), um den sich PAK (30%-35%) und Sulfate mit Nitraten (4%-5%) formieren, ultrafeine Kohlenstoffpartikel, die zu Ruß aggregieren und agglomerieren (McDonald et al. 2004a, 2004b). An den Ruß lagern sich sekundär, neben weiteren Stoffen, organische Verbindungen an wie Schmierölbestandteile oder unverbrannter Kraftstoff (HEI 1995). Die aus dem Abgas herausgefilterten Partikel haben einen aerodynamischen Durchmesser bis 1000 nm. Nanopartikel (Durchmesser < 100 nm) haben einen numerisch größeren, aber in der Masse kleineren Anteil bezogen auf die Verbrennungsprodukte (Kittelson 1998). Die partikuläre Phase wird nach ihrer Extrahierbarkeit mit organischen Lösemitteln wie Dichlormethan (DCM), Toluol oder Methanol in die so genannte lösliche organische Fraktion (LOF) und unlösliche Fraktion (UF) unterteilt. Die LOF besteht vor allem aus HC, PAK, die relevante toxische Wirkungen haben, Carbonylen und unverbrannten

Kraftstoffresten (Scheepers und Bos 1992b). Die UF wird vorwiegend aus Ruß (elementarem Kohlenstoff), Sulfaten und Spuren von Metallen gebildet (Scheepers und Bos 1992b).

1.3.2 Gasphase der DME

Die Gasphase besteht vorwiegend aus CO, CO₂, NO_x, Schwefelmonoxid (SO), SO₂ und einer Vielzahl von kleinmolekularen HC, vor allem Aldehyden und Ketonen, aber auch PAK, die nicht an Partikel gebunden sind. Viele dieser Verbindungen sind akut zytotoxisch, wie z.B. Formaldehyd, Acrolein und Acetaldehyd. Neben den zytotoxischen entstehen auch Stoffe mit humankanzerogenen Eigenschaften wie z.B. PAK, Benzol und 1,3-Butadien (Scheepers und Bos 1992a, HEI 1995).

1.3.3 Unterschiede der Zusammensetzung der DME bei Verbrennung von DK und FAME

Die Verbrennung von FAME führt im Vergleich zu DK zur Reduktion von CO₂, CO, HC, PAK und meistens PM, jedoch zur Erhöhung von NO_x (U.S. EPA 2002a, Krahl et al. 2001, Krahl 2002, Krahl et al. 2005, Lapuerta et al. 2008).

Krahl et al. zeigten in einer Studie, dass Rapsölmethylester (RME) im Vergleich zu DK bis zu 57% weniger HC- und bis zu 46% weniger CO-Emissionen zur Folge hatte. Ebenso zeigten sie in der Gegenüberstellung von FAME zu DK, dass bei FAME CO₂ und PAK erniedrigt und NO_x erhöht waren (Krahl et al. 2007).

Gleiche Ergebnisse lieferten Munack et al. (2008). Auch hier waren die Emissionen von HC und CO von RME geringer als bei DK, ebenso wie PM. NO_x war bei RME höher als bei DK. Munack et al. bestätigten so die Ergebnisse aus den Vorversuchen von Krahl et al. (1996 und 2007) und von Schröder et al. aus dem Jahr 1999 (Krahl et al. 1996a, 2007, Schröder et al. 1999, Munack et al. 2008).

Krahl et al. führten 2009 einen weiteren Versuch zu den Unterschieden in der Zusammensetzung der DME bei der Verbrennung von DK und FAME durch. Bei der erneuten Testung von RME und DK zeigten sie, dass bei RME HC, CO und PM gegenüber DK verringert und NO_x erhöht waren (Krahl et al. 2009).

Laut U.S. EPA führt B20 zu einer Reduktion von PM um 10,1%, CO um 11% und HC um 21,1%. Ebenso wie bei 100%igem FAME hatte auch die Verbrennung von B20 eine Erhöhung von NO_x, in diesem Falle um 2% zur Folge (U.S. EPA 2002a).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass bei Verbrennung von B20 die UF der Partikelphase sank und die LOF anstieg (Graboski und McCormick 1998).

Sowohl Peng et al. bei B20, als auch Krahl et al. bei reinem FAME konnten eine Reduktion von Formaldehyd in den DME nachweisen (Peng et al. 2008, Krahl et al. 2003); wohingegen Turrio-Baldassari et al. und Correa und Arbilla einen Anstieg von Formaldehyd in den DME beschrieben (Turrio-Baldassari et al. 2003, Correa und Arbilla 2008). Zervas fand 2008 heraus, dass bei einem Anstieg von HC Formaldehyd sank (Zervas 2008). Eine weitere Studie zeigte, dass je mehr die Konzentration an FAME in einem Blend stieg, die Formaldehydkonzentration in den Emissionen abnahm (Di et al. 2008).

Eine Reduktion der PM bei steigendem FAME-Anteil im Blend veröffentlichten Zou und Atkinson 2003. Sie schrieben, dass bei Verwendung von 100% FAME eine Reduktion der PM um 33% möglich ist. Die PM-Emissionen waren bei der Verwendung eines OM 906 Motors stets unterhalb des Euro III Limits von 0,1 g/kWh. Zusätzlich wurden die Konzentrationen der PAK bei B20 und DK innerhalb der bei der Verbrennung entstehenden Gas- und Partikelphase verglichen und festgestellt, dass B20 in beiden Phasen niedrigere Konzentrationen aufwies als DK (Zou und Atkinson 2003).

In einer schwedischen Studie wurden durch die Verwendung eines DK mit sehr geringem Schwefelgehalt (MK1) (0,7 mg/kg) die Emissionen deutlich gesenkt. Die Ergebnisse zeigten im Vergleich zum üblichen Tankstellendiesel, dass bei MK1 die Emissionen von Aldehyden, Alkenen und CO gleich blieben, jedoch die Emissionen von PAK um 88% und von 1-Nitropyren um 98% geringer waren (Westerholm und Christensen 2001).

Nach den derzeit vorliegenden Ergebnissen weisen FAME eine Reduktion von CO, HC, PAK und PM aus, jedoch eine Erhöhung von NO_x (U.S. EPA 2002a, Krahl et al. 2001, Krahl 2002, Krahl et al. 2005, Lapuerta et al. 2008, Bünger et al. 2012). Es ist bereits möglich, die HC bis zu 70% und CO und PM bis zu 50% zu reduzieren. Allerdings können NO_x bis zu 15% ansteigen.

1.4 Biologische Wirkungen der DME

DME können mutagene, kanzerogene und weiter toxische Wirkungen hervorrufen. Nicht-kanzerogene Effekte von DME auf den Menschen können entweder akut, jedoch auch chronisch sein.

Akute Wirkungen wurden 1992 von Scheepers und Bos beschrieben, die Reizungen der Mukosa, der oberen Atemwege und der Augen beobachteten. Die Ursache wurde in den gasförmigen Komponenten der Abgase der DME gesehen (Scheepers und Bos 1992b). Neben Reizungen wurden signifikante Ergebnisse für das rasche Entstehen der systemischen und pulmonalen Inflammationen beschrieben. Eine Beeinträchtigung der Lungenfunktion lag nicht vor (Salvi et al. 1999, Nightingale et al. 2000, Nordenhall et al. 2000). Stenfors et al. wiesen auf eine neu aufgetretene pulmonale inflammatorische Reaktion von gesunden Menschen hin, wogegen Asthmatiker keine neu entstandene pulmonale inflammatorische Reaktion auf DME-Exposition zeigten (Stenfors et al. 2004). Vor allem bei den feinen (PM_{2,5}) und ultrafeinen (PM_{0,1}) Partikeln besteht der Verdacht, dass sie chronische Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem und die Atemwege haben (Dockery et al. 1993, Schwartz 1993, Pope et al. 1995, Samet et al. 1995, Peters et al. 1997, Schwartz 2000, Schwartz und Neas 2000, Wichmann 2007). Mills et al. beschrieben vaskuläre Beeinträchtigungen und Dysfunktionen bedingt durch Nanopartikel (Mills et al. 2011). Die gesundheitsschädigende Wirkung der Nanopartikel durch Inhalation wurde vermehrt bei Kindern beobachtet (Seaton et al. 1995, Schwartz und Neas 2000, Oberdörster 2001). Auch eine Verschlechterung von allergischen Symptomen oder bereits das Auslösen von Allergien werden auf DME zurückgeführt (Heinrich und Wichmann 2004, Brauer et al. 2007, Morgenstern et al. 2008). Laut Hesterberg et al. liegt eher eine Verschlechterung bzw. Verstärkung als ein Neuauslösen von allergischen Symptomen vor. Ein direkter Beweis für das Auslösen einer Allergie durch DME liegt bisher nicht vor (Hesterberg et al. 2009).

1.4.1 Humankanzerogenität (Epidemiologie)

Seit dem 12.06.2012 werden DME von der IARC in die Gruppe 1 „krebserzeugend beim Menschen“ eingestuft. Die Entscheidung fußt unter anderem auf den beiden

Auswertungen der „Diesel Exhaust in Miners Study (DEMS)“ von Attfield et al. und Silverman et al., auf die im Folgenden genauer eingegangen wird (Attfield et al. 2012, Silverman et al. 2012).

In vorhergehenden Studien wurden bereits Ergebnisse erzielt, die einen Zusammenhang zwischen Lungenkrebskrankungen und DME-Expositionen vermuten ließen:

Garshick et al. (1987) und Steenland et al. (1990) haben beide an retrospektiven Studien gezeigt, dass ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko durch Exposition mit DME besteht. Garshick et al. werteten Daten von Bahnarbeitern aus, die bei der *Railroad Retirement Board* (RRB) verzeichnet waren, die zwischen dem 1. März 1981 und dem 28. Februar 1982 gestorben waren, mindestens zehn Jahre bei der Bahn beschäftigt waren und im Jahr 1900 oder später geboren wurden. Die Sterbedaten und der Sterbegrund wurden aus den Sterbeurkunden der Arbeiter entnommen. Berücksichtigt wurde die Art des Arbeitsplatzes, ob der Arbeitsplatz gegenüber DME exponiert oder nicht exponiert war, ob eine Exposition mit Asbest vorlag, das Rauchverhalten der Arbeiter und in welchem Alter die Arbeiter berentet wurden (vor dem 64. Jahr oder nach dem 65. Jahr). Weitere Daten von 534 Bahnarbeitern, die mindestens zehn Jahre bei einer Bahngesellschaft gearbeitet hatten, wurden in die Studie eingespeist. Den Lungenkrebsfällen wurden zwei Kontrollen gegenübergestellt, deren Geburtsdatum nicht mehr als 2,5 Jahre und deren Todesdatum nicht mehr als 31 Tage vom Fall abwichen. Nach Auswerten und gegenseitigem Abwägen der Daten kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass ein um den Faktor 1,5 erhöhtes Lungenkrebsrisiko durch DME bestand (Garshick et al. 1987).

Steenland et al. untersuchten ebenso anhand von Sterbeurkunden männliche Arbeiter mit Lungenkrebs, die zwischen 1982 und 1983 gestorben waren. Es handelte sich um Berufskraftfahrer, die Mitglieder in der Gewerkschaft „*Teamster Union*“ waren. Auch diesen Personen wurden Kontrollpersonen gegenübergestellt. Daten wurden über einen Fragebogen zusammengetragen, den die Angehörigen und die Teamster Union ausfüllten. Berücksichtigt wurden Angaben zu Alter, Arbeitsplätzen mit und ohne mögliche Exposition an DME, das Rauchverhalten der Arbeiter, deren Ernährung und Asbestexposition. Die Teamster Union lieferte noch Angaben über die verschiedenen Arbeitsplätze, an denen die Arbeiter eingesetzt

wurden. Da die Angaben der Angehörigen nicht komplett mit denen der Teamster Union übereinstimmten und auch keine konkreten Informationen über die in den Fahrzeugen verwendeten Kraftstoffe vorlagen, war eine vollständige Auswertung nicht möglich. Es wurden zwei eingeschränkt verwertbare Datensätze zur Auswertung herangezogen. Ein Datensatz beinhaltete die Arbeitsplätze und Kovariablen (Rauchen etc.) aus den Fragebögen, ein anderer beinhaltete die Arbeitsplatzinformationen von der Teamster Union verbunden mit Kovariablen aus den Fragebögen. Anschließend wurde der Datensatz mit Daten der Teamster Union auf einen Zusammenhang zwischen Expositionsjahren und einer Erhöhung der Odds Ratio (OR) geprüft. Bei Verwendung einer Exposition ab 1960 war für Fern- und Kurzstreckenfahrer ein signifikanter Anstieg der OR mit zunehmender Exposition bis 1,55 (Konfidenzintervall (KI): 0,97-2,47) bei Fernfahrern und 1,79 (KI: 0,94-3,42) bei Kurzstreckenfahrern nach ≥ 18 Expositionsjahren zu verzeichnen. Bei einer Betrachtung der Exposition nach 1964 konnte ein solches Ergebnis nur noch bei den Fernfahrern mit einer Expositionszeit von ≥ 13 Jahren verzeichnet werden (OR = 1,64 (KI: 1,05-2,57)). Der Datensatz aus den Befragungen der Angehörigen lieferte keine signifikanten Ergebnisse. Bei beiden Datensätzen zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Alter und Exposition, sowie zwischen Rauchen und Exposition. Es lagen wahrscheinlich Fehleinschätzungen der Exposition und des Rauchens durch die Angehörigen vor, die zu einer Einschränkung der Aussagekraft der Studie führten. Außerdem war die Latenzzeit kurz, das Kontrollkollektiv klein und es fehlten Expositionsmessungen. Trotz allem lagen die Ergebnisse im Bereich anderer Studien. Die Einschränkungen führten eher zu einer Unterschätzung des Lungenkrebsrisikos in dieser Studie (Steenland et al. 1990).

Ein kanzerogener Effekt bei Menschen wurde auch von Pukkala et al., in der bisher weltweit größten prospektiven Kohortenstudie beschrieben. Die Studie umfasst 15 Mill. Menschen aus Skandinavien und Island. Die Bevölkerungserhebung zu dieser Studie wurde in den 1970er bis 1990er Jahren durchgeführt. Die Leute mussten im Alter von 30-64 Jahren sein und in dem jeweiligen Land seit dem 1. Januar nach dem Erhebungsjahr leben. Es wurden Fragebögen versandt, die Fragen zu Name, Adresse, Familienstand, Ausbildung, Geschäftstätigkeit, Beruf und industriellen Tätigkeiten beinhalteten. Über eine persönliche Identifikationsnummer wurden diese Fragebogenergebnisse mit den Daten der Studienteilnehmer in den zentralen

Statistikbüros der Sozialversicherung des jeweiligen Landes zusammengeführt . Daten über die Krankheiten bzw. Tumorleiden der Teilnehmer wurden von Krankenhäusern, privaten Kliniken, Fach- und Allgemeinärzten und von Pathologiezentren eingeholt. In den Jahren von 1960 bis 2005 wurden 2,8 Mill. neue Krebserkrankungen beobachtet. Für Menschen, die in Berufen mit DME-Exposition arbeiteten, konnte eine signifikante Risikoerhöhung für Lungenkrebs verzeichnet werden. Dies betraf folgende Berufsgruppen: Mechaniker, Kraftfahrer, Motorenbediener, Seeleute und Bergleute. Zusätzlich wurde ein erhöhtes Blasenkrebsrisiko in diesen Berufsgruppen gefunden. Dass der Krebs durch die Partikelwirkung an der Blase hervorgerufen wurde, wird von den Autoren als äußerst unwahrscheinlich erachtet. Vielmehr wird es als naheliegend eingeschätzt, dass der Effekt durch die in den Abgasen enthaltenen PAK und Nitro-PAK auf systemische Weise hervorgerufen wurde. Der Confounder Rauchen konnte in dieser Studie allerdings nicht berücksichtigt werden, da keine Informationen über das Rauchverhalten der Probanden vorlagen (Pukkala et al. 2009).

Olsson et al. (2011) analysierten Daten aus der SYNERGY-Studie (Metaanalyse von 11 Fall-Kontroll-Studien), die Informationen über Lungenkrebserkrankungen der Probanden mit Daten über die lebenslange Exposition am Arbeitsplatz und deren Rauchgewohnheiten zusammenführt. Die SYNERGY-Studie umfasst 13.304 Lungenkrebsfälle und 16.282 Kontrollen aus 11 Studien, die in Europa und Kanada erhoben wurden.

Die Arbeitsplätze wurden bezüglich ihrer Exposition durch Dieselabgase in nicht exponiert = 0, leicht exponiert = 1 und hoch exponiert = 4 eingeteilt. Um die Daten der Studien vergleichen zu können, wurden drei Einteilungen vorgenommen: (1) Alter (<45, 45-49, 50-54, 55-59, 60-64, 65-69, 70-74, 75+), Geschlecht und Ausbildung; (2) ob der Proband jemals in einem „Kategorie A“ Beruf gearbeitet hat; (3) Rauchverhalten und wann das Rauchen aufgegeben wurde (aktueller Raucher, Rauchen aufgegeben vor 2-7 Jahren, vor 16-25 Jahren, oder vor 26+ Jahren vor der Datenerhebung, niemals geraucht). Aktuelle Raucher wurden definiert als Personen, die >1 Zigarette pro Tag für >1 Jahr geraucht haben und die das Rauchen erst in den letzten 2 Jahren vor der Datenerhebung aufgegeben hatten. Ein „Kategorie A“ Beruf ist ein mit DME hoch exponierter Beruf/Arbeitsplatz.

Die erhobenen Daten umfassten nach Herausnahme der Probanden mit unsicheren Angaben schließlich noch 13.304 Lungenkrebsfälle und 16.282 Kontrollen. Nach Auswertung der Daten kamen Olsson et al. zu dem Ergebnis, dass eine schwache konstante Assoziation zwischen DME-Exposition am Arbeitsplatz und Lungenkrebsrisiko besteht, sowie signifikante Reaktionen auf die Exposition von DME. Wurde die Expositionshöhe in Quartile eingeteilt, war die OR mit dem höchsten Quartil statistisch signifikant (OR: 1,31 bei 95% KI: 1,19-1,43). Diese Assoziation kam sehr wahrscheinlich nicht zufällig durch Messfehler oder durch fehlerhafte Zuordnung oder Erstellung von Modellen und Analysen in Sub-Gruppen von Nicht-Exponierten, die potentielle Confounder darstellen könnten, zustande (Olsson et al. 2011).

Attfield et al. führten eine Kohortenstudie zur Mortalität von 12.315 Arbeitern durch, die in acht Nicht-Metall-Bergbauunternehmen während der Arbeit DME ausgesetzt waren. Historische Messungen, ähnliche vergleichbare Belastungsdaten, gemeinsam mit industriellen Hygienemessungen wurden verwendet, um retrospektive quantitative Abschätzungen der Belastung von lungengängigem elementarem Kohlenstoff jeden Arbeiters machen zu können. Standardisierte Sterberaten und intern abgestimmte Gefahrenmodelle wurden verwendet, um das durch lungengängigen elementaren Kohlenstoff (als Surrogatparameter der DME-Exposition) bedingte Belastungsrisiko zu evaluieren.

Standardisierte Mortalitätsraten für Lungenkrebs (1,26; 95%-KI = 1,09-1,44), Oesophaguskrebs (1,83; 95%-KI = 1,16-2,75) und Pneumokoniose (12,20; 95%-KI = 6,82-20,12) waren in der kompletten Kohorte erhöht, verglichen mit bevölkerungsbasierten Mortalitätsraten. Risikounterschiede bei den Arbeitsplätzen waren anfänglich schwach mit einem Anstieg der Dieselbelastungs-Wirkungs-Beziehung bei Lungenkrebs in der kompletten Kohorte zu verzeichnen. Bei der Betrachtung einer 15-Jahres-Belastung durch lungengängigen elementaren Kohlenstoff stiegen die Risiken, an Lungenkrebs zu versterben, bei den Arbeitern, die immer unter Tage arbeiteten (verglichen mit der Referenzkategorie (0 bis <20 $\mu\text{g}/\text{m}^3\text{-y}$)), bei einer Beschäftigungsdauer von 5 oder mehr Jahren, mit einer Belastung von 640 oder weniger als 1280 $\mu\text{g}/\text{m}^3\text{-y}$. Allerdings fiel das Risiko bei noch höheren Belastungen ab. Ansteigende Risiken für eine Dieselbelastungs-Wirkungs-Beziehung waren ebenso bei Arbeitern zu sehen, die nicht unter Tage arbeiteten.

Die Ergebnisse dieser Studie liefern weitere Evidenz, dass die Belastung mit DME das Mortalitätsrisiko von Lungenkrebs ansteigen lässt (Attfield et al. 2012).

Silverman et al. führten eine in die Studie von Attfield et al. eingebettete Fall-Kontroll-Studie durch. Diese Studie beinhaltete 198 Lungenkrebs-Todesfälle und 562 Kontrollpersonen. Für jede Fallperson wurden vier Kontrollpersonen ausgewählt. Die Auswahl erfolgte individuell bezüglich Bergbauarbeitsbereich, Geschlecht, Rasse/Volkszugehörigkeit und Geburtsjahr (innerhalb 5 Jahren) aus allen Arbeitern, die vor dem Todestag der Fallperson am Leben waren. Für jeden Einzelnen wurde die Diesel-Abgas-Belastung anhand des lungengängigen elementaren Kohlenstoffs, anhand des Jobs und des Jahres, basierend auf einer umfangreichen retrospektiven Belastungs-Begutachtung einer jeden Bergbaubeschäftigung abgeschätzt. Weiterhin führten sie sowohl die kategorische als auch die kontinuierliche Regressionsanalyse angepasst an das Rauchen und andere potentielle Confounder durch, OR und 95% KI abschätzen zu können.

Sie beobachteten ein statistisch signifikant ansteigendes Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken, mit steigendem kumulativem lungengängigem elementarem Kohlenstoff und dessen durchschnittlicher Expositionsintensität. Lungengängiger elementarer Kohlenstoff als Surrogatparameter für die kumulierte Dieselabgasexposition über 15 Jahre zeigte einen statistisch signifikanten Anstieg für Lungenkrebsrisiko insgesamt ($p = 0,001$) (Silverman et al. 2012).

1.4.2 Kanzerogenität im Tierversuch

Die bisher durchgeführten Studien haben gezeigt, dass DME neben nicht-gentoxischen Wirkungen auch mutagene und kanzerogene Effekte sowohl beim Tier, als auch beim Menschen hervorrufen (DFG 1987, IARC 1989, U.S. EPA 2002b). Aufgrund vermehrter Tumoren bei den Versuchstieren wurden 1987 DME von der Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) als krebserzeugender Stoff in die Kategorie IIIA2 (aktuell in die Kategorie 2) der krebserzeugenden Stoffe eingestuft (erwiesenermaßen krebserzeugend im Tierversuch). Wie oben schon dargestellt, hat die IARC Dieselabgase seit dem 12.06.2012 in Gruppe 1 umgestuft (erwiesenermaßen krebserzeugend beim

Menschen). Ob die DFG dieser internationalen Einstufung folgen wird, ist derzeit Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion.

Heinrich et al. führten Langzeitinhalationsversuche an Hamstern, Ratten und Mäusen durch (Heinrich et al. 1982, Heinrich et al. 1986, Heinrich et al. 1995). 1982 exponierten sie syrische Hamster und Ratten beiden Geschlechts gegenüber gefilterten und ungefilterten DME, mit einem Partikelanteil von $3,9 \text{ mg/m}^3$. Die Expositionsdauer betrug 7-8 Stunden pro Tag, 5 Tage die Woche, über 120 Wochen. Ziel war es, den toxischen Effekt der gefilterten und ungefilterten DME zu belegen. Bei den Ratten ließen sich weder bei den gefilterten, noch bei den ungefilterten DME Veränderungen in den Lungen erkennen. Hingegen zeigten sich bei den syrischen Hamstern bei beiden Expositionen histologische Veränderungen, wie adenomatöse Proliferationen in der Lunge (Heinrich et al. 1982).

Eine weitere Versuchsreihe führten Heinrich et al. 1986 durch. Hier exponierten sie neben Hamstern und Ratten zusätzlich Mäuse. Die Exposition dauerte 19 Stunden pro Tag, 5 Tage die Woche über 120 Wochen (Exposition der Hamster) bzw. 140 Wochen (Exposition der Ratten und Mäuse), mit einer Konzentration der DME von $4,24 \text{ mg/m}^3$. Die Hamster zeigten keine Erhöhung der Tumorrates (weder gutartige Tumoren, noch bösartige Tumoren) auf die Exposition. Die Mäuse boten völlig uneinheitliche Ergebnisse, so dass kein Zusammenhang zwischen Exposition und Ausbildung von Lungentumoren hergestellt werden konnte. Bei den Ratten konnten aber Lungentumoren - allerdings nur bei Expositionen mit ungefilterten DME - beobachtet werden. Die Studie zeigte, dass DME-Expositionen mit hoher Konzentration über längere Zeit mit einer eindeutig dosisabhängigen Zunahme der Inzidenz von Lungentumoren bei Ratten vergesellschaftet sind, was bei der Exposition von Hamstern und Mäusen nicht nachzuweisen war (Heinrich et al. 1986).

Nikula et al. (1995) verglichen anhand von Inhalationsversuchen an Ratten die Wirkung von DME und Kohlenstaub. Die Ratten wurden 16 h pro Tag, 5 Tage pro Woche über maximal 24 Monate mit Konzentrationen von $2,5 \text{ mg/m}^3$ (DME) bzw. $6,5 \text{ mg/m}^3$ (Kohlenstoff) exponiert. Es zeigten sich pathologische Veränderungen (Hyperplasien) in den Rattenlungen. Die DME hatten eine leicht höhere dosisabhängige Kanzerogenität im Vergleich zu Kohlenstaub, die jedoch nicht

signifikant höher war. Das mutagene Potential der beiden Stoffe wurde anschließend im Salmonella-Rückmutationstest nach Ames (Ames-Test) untersucht und es zeigte sich, dass DME eine um 10^3 höhere Mutagenität haben als Kohlenstaub. Ebenso konnten Nikula et al. zeigen, dass ein Unterschied innerhalb der Partikelgrößenverteilung bestand. Die Größe der Partikel ist der Parameter, der hauptsächlich die Aufnahme in die Lunge bestimmt. Im Tierversuch war zusätzlich zu sehen, dass die Beladung der Rattenlungen mit Partikeln von DME deutlich höher war, als von Kohlenstaub. Außerdem waren nicht-kanzerogene Effekte bei beiden Stoffen unterschiedlich und auch nicht in denselben Lungenregionen angesiedelt (Nikula et al. 1995).

In ihren Studien entdeckten Heinrich et al. und Nikula et al., dass bei Ratten ab einer Dosis von $\geq 2,0 \text{ mg/m}^3$ PM-Exposition Lungentumoren nachweisbar waren. Unterhalb dieses Wertes konnten keine signifikanten Anstiege an Lungentumoren ausgemacht werden (Heinrich et al. 1995, Nikula et al. 1995).

1.4.3 Mutagenität

Der erste Nachweis des mutagenen Potentials von Dieselrußpartikelextrakten wurde 1978 von Huisinigh et al. erbracht (Huisinigh et al. 1978). Anschließend wurde dieses Ergebnis von weiteren Arbeitsgruppen, wie der um Clark und Virgil, Claxton und Barnes oder Lewtas bestätigt (Clark und Virgil 1980, Claxton und Barnes 1981, Lewtas 1983).

Zusätzlich wurde gezeigt, dass im Ames-Test die Partikel selbst ebenso ein mutagenes Potential aufweisen (Brooks et al. 1980, Siak et al. 1981, Belisario et al. 1984), genauso wie die Kondensate der Gasphase von DME (Stump et al. 1982, Rannug et al. 1983).

Bei Dieselrußpartikeln wird zwischen direkter und indirekter Mutagenität unterschieden. Direkte Mutagenität bedeutet, dass die Partikelextrakte ohne vorherige metabolische Aktivierung mutagen sind. Direkt mutagen sind v.a. die substituierten PAK wie Nitro-PAK oder Oxy-PAK (Wang et al. 1978, Pederson und Siak 1981, Ohe 1984). Bei der indirekten Mutagenität müssen die nativen PAK erst enzymatisch in aktive Metabolite überführt werden. Dies geschieht, indem z.B. Benzo[a]pyren im Körper durch Monoxygenasen aus der Cytochrom-P450-Familie

(Subtypen CYP1A1 und CYP1B1) zunächst zu Benzo[a]pyren-7,8-Epoxid umgewandelt wird. Nach der Hydrolyse der Epoxidgruppe durch eine Epoxid-Hydrolase wird das entstandene 7,8-Dihydroxybenzo[a]pyren in Position 9 erneut epoxidiert und so zum kanzerogenen Benzo[a]pyren-7,8-Dihydroxy-9,10-Epoxid umgesetzt. Dessen Epoxid-Gruppe reagiert chemisch mit dem Guanin der DNA und beeinträchtigt so die Struktur der DNA, was Zellteilungen verhindern oder Mutationen begünstigen kann. Im Ames-Test wird diese metabolische Aktivierung durch ein Enzym-Mix (S9-Mix), der aus Rattenlebern gewonnen wird, erreicht. Näheres zu dem S9-Mix wird unter 2.2.5 beschrieben.

Bünger et al. verglichen 1998 RME mit DK im Salmonella-typhimurium-Test mit den Teststämmen TA97a, TA98, TA100 und TA102. Sie verzeichneten als Ergebnis, dass in den Stämmen TA98 und TA100 die DME der FAME weniger mutagen waren, als die des DK. In den Petrischalen lagen bei RME weniger Revertanten vor, als bei DK. TA97a und TA102 lieferten als Ergebnis keine signifikanten Unterschiede. Ebenso war die LOF bei RME kleiner als bei DK. Weiterhin wurde von ihnen beschrieben, dass die Konzentration von Ruß und PAK bei den FAME im Vergleich zu DK kleiner war (Bünger et al. 1998, Krahl et al. 1996a, Krahl et al. 1996b).

Die PM-Konzentration stieg bei der Verwendung von FAME, da der verwendete Motor auf die Verbrennung von DK ausgelegt war. Die erhöhte PM bestand aus unverbranntem RME (Bünger et al. 1998).

Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Studie von Bagley et al. beobachtet. Hier wurden allerdings Sojamethylester (SME) und DK verglichen. In dieser Studie waren die DME von DK vierfach mutagener als die der FAME (Bagley et al. 1998).

Bünger et al. verglichen im Jahr 2000 SME, RME, DK und LS-DK (*low-sulfur* DK mit einem Schwefelgehalt von 1 ppm) miteinander. Ihre Ergebnisse zeigten, dass DK und SME zweimal mehr PAK bei der Verbrennung produzierten, als LS-DK und RME. Die DME von SME und RME wiesen geringere Mutagenität als die von LS-DK und DK auf; die DME von LS-DK waren geringer mutagen als die des DK (Bünger et al. 2000). Es zeigt sich, dass die Produktion von PM und PAK umso geringer wird, je geringer der Schwefelgehalt im Kraftstoff ist. Dies zeigt sich auch bei FAME, die weniger Schwefel als DK enthalten (Bagley et al. 1998). Zusätzlich steigt die Mutagenität mit steigender Schwefelkonzentration im Kraftstoff, da bei der

Verbrennung von schwefelhaltigem Kraftstoff PAK entstehen, die bekanntlich mutagenes Potential besitzen. Zusätzlich haben FAME nahezu keine aromatischen Komponenten, im Gegensatz zu DK, der 3-40 Vol.-% Aromaten enthält, darunter PAK bis zu 340 mg/L (Sjögren et al. 1995).

1.5 Fragestellungen der vorliegenden Studie

Nicht nur der oben beschriebene Schwefelgehalt und der Aromatengehalt haben Auswirkungen auf die Mutagenität der DME, sondern auch andere Faktoren, die eine nicht optimale Verbrennung des Kraftstoffes bewirken.

1.5.1 Auswirkung der Doppelbindungen der Biokraftstoffmoleküle auf die DME

In einer Studie von Büniger et al. wurden unter anderem RME und SME miteinander verglichen. SME hat mit 61% einen höheren Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (mehrf. unges. FS) als RME (29%). Die Studie zeigte, dass bei den Motorläufen, „Volle Last (Lastpunkt A)“ und „Leerlauf (Lastpunkt E)“, die DME von SME höhere Mutagenität als die von RME besaßen (Büniger et al. 2000). Folglich ist ein Unterschied bezüglich der Mutagenität der DME zwischen verschiedenen FAME-Arten zu erkennen. Angeregt durch die Studie von Büniger et al. wird in dieser Arbeit systematisch geprüft, ob die Anzahl der Doppelbindungen der veresterten Fettsäuren einen Einfluss auf die Mutagenität der DME hat. Es wird untersucht, ob bei zunehmender Anzahl an mehrfach ungesättigten Fettsäuren der FAME-Kraftstoff schlechter verbrannt wird und die DME eine höhere mutagene Wirkung haben.

1.5.2 Auswirkung der Alterung der Biokraftstoffe auf die DME

Fang und McCormick zeigten 2006, dass durch eine Oxidation der FAME und Blends vermehrt Oligomere entstehen, die schlechter verbrennen und somit den DME des Kraftstoffs ein erhöhtes mutagenes Potential verleihen könnten (Fang und McCormick 2006). Büniger et al. griffen diese Ergebnisse auf und zeigten, dass die DME von B20 in ihrem Versuch mutagener als die von reinem DK oder reinen FAME

(RME) waren (Bünger et al. 2009). In dieser Arbeit wird geprüft, ob die Oxidation (künstliche Alterung) verschiedener FAME und Blends höhere Mutagenität der DME bewirkt.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien / Lösungen

2.1.1 Soxhlet-Extraktion

- Dichlormethan p. a., Merck, Darmstadt
- Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt
- Finnpipette 1000 µL-5000 µL (Thermo Scientific)
- Probenröhrchen, 4,5 ml Polystyrol-Röhrchen, Greiner, Solingen
- Rotationsverdampfer, Typ VV1, Heidolph, Kehlheim
- Rundkolben 250 mL, Brand, Wertheim
- Soxhlet-Extraktionsapparat 100 mL, Brand, Wertheim
- Teflonbeschichtete Glasfaserfilter, T60 A20, Pallflex Products Corp., Putnam, CT, U.S.A.
- Wasserbad WB 2001, Heidolph, Kehlheim

2.1.2 Trocknung der Kondensate und Partikelextrakte

- Dichlormethan (DCM), Merck, Darmstadt
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Fluka, Buchs, Schweiz
- Probenröhrchen, 4,5 mL Polystyrol-Röhrchen, Greiner, Solingen
- Rotationsverdampfer, Typ VV1, Heidolph, Kehlheim
- Rundkolben 250 mL, Brand, Wertheim
- Wasserbad: WB 2001, Heidolph, Kehlheim
- Wasserstrahlpumpe

2.1.3 Ames-Test

- 2-Aminofluoren (2-AF), Molekulargewicht 181,24, Sigma-Aldrich, Steinheim
- 3-Nitrobenzanthron (3-NBA), Reinheit >90%, im Johann Heinrich von Thünen-Institut (vTI) in Braunschweig synthetisiert und analysiert
- β -D-glucose-6-Phosphat-Natriumsalz, Molekulargewicht 282,12, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Agar-Agar Kobe I, Serva, Heidelberg
- D-Biotin, Molekulargewicht 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
- EppendorfgefäÙe, Sarstedt/Eppendorf
- Heraeus-Brutschrank, Functionline BB 16, Heraeus Instruments, Hannover
- Heraeus-Sicherheitswerkbank, Herasafe HS 18, Heraeus Instruments, Hannover
- Kaliumchlorid (KCl), Molekulargewicht 74,55, Sigma-Aldrich, Steinheim
- L-Histidin, HCl, Molekulargewicht 209,63, Merck, Darmstadt
- Magnesiumchlorid, MG 203,30, Merck, Darmstadt
- Magnesiumsulfat, MG 246,48, Merck, Darmstadt
- NADP-Natriumsalz, Molekulargewicht 765,39, AppliChem, Darmstadt
- Natriumamminohydrogenphosphat, MG 209,07, Riedel de Haen, Seelze
- Natriumchlorid (NaCl), Molekulargewicht 58,44, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Natriumphosphat dibasisch, Molekulargewicht 177,99, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Petrischalen aus Polystyrol 94x16 mm, mit Deckel, ohne Nocken, Greiner, Solingen
- Pipetten, Eppendorf Research 0,5 μ L-10 μ L (Eppendorf),
Eppendorf Reference 10 μ L-100 μ L (Eppendorf),
Finnpipette 1000 μ L-5000 μ L (Thermo Scientific)
- Pipettenspitzen, Sarstedt/Eppendorf
- Polystyrol-Röhrchen, Greiner, Solingen
- PS-Röhrchen, Greiner, Solingen
- Reagenzgläser 10 mL, Glas-Schott, Mainz

- S9-Fraktion, Trinova, Gießen
- Salmonella-typhimurium-Teststämme TA98 und TA100, B.N. Ames, Department for Biochemistry, University of Berkeley, California, U.S.A.
- Waage, Analysenwaage MC 1 Analytic AC 210 S, Sartorius, Göttingen
- Wasserbad WB 2001, Heidolph, Kehlheim
- Vortex, Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Ludwigsburg
- Zitronensäuremonohydrat, p.a.-Ware, MG 210,14, Merck, Darmstadt

2.1.4 Auswertung

- Koloniezählgerät, Cardinal 1.17, Perspective Instruments, Haverhill, Suffolk, U.K.

2.2 Methoden

2.2.1 Eingesetzte Biokraftstoffe

Um den Einfluss verschiedener FAME-Qualitäten bzw. Gemische aus DK und FAME auf die Verbrennung und die Mutagenität zu vergleichen, wurden verschiedene FAME-Qualitäten bezogen, zu Blends gemischt und getestet. Der als Referenzkraftstoff verwendete DK wurde von der Firma Haltermann Products, Zweigniederlassung der Dow Olefinverbund GmbH, in Hamburg geliefert.

		Grenzwerte		DK	LME	RME	PME
		Einheit	Min.	Max			
Cetanzahl	-	49	-	52,9		52	65,9
Cetanindex	-	46	-				
Dichte (15 °C)	kg/m ³	820	845	833,6		883,3	876,6
PAK	% (m/m)	-	11	4,4			
Schwefelgehalt	mg/kg	-	50	1,6		< 10	<1
Flammpunkt	°C	>55	-	88		> 151	162
Koksrückstand	% (m/m)	-	0,30	<0,01		< 0,3	0,15
Aschegehalt	% (m/m)	-	0,01	0,002	0,02	< 0,01	<0,01
Wassergehalt	mg/kg	-	200	26	500	250	420
Gesamtverschmutzung	mg/kg	-	24		24	1	9
Korrosionswirkung auf Kupfer (3 h bei 50°C)	Korr.Grad	-	1	1A	1	1	1
Oxidationsstabilität	g/m ³	-	25	<1		>6	1,0
HFRR (bei 60°C)	µm	-	460	207			
Kin. Viskosität (40 °C)	mm ² /s	2	4,5	2,93	3,723	4,462	4,678
CFPP	°C	-	0/-10/-20	-20	-8	-17	+1
Monoaromaten	% (m/m)			19			
Diaromaten	% (m/m)			4,3			
Tri+weitere	% (m/m)			<0.1			
Polyaromaten	% (m/m)			4,4			
Polyzyklen	% (m/m)						
Gesamtaromaten	% (m/m)			23,4 [% wt]			

Tabelle 1: Die im Versuch verwendeten FAME im Vergleich

Palmölmethylester (PME)

Palmöl stammt hauptsächlich aus Südostasien. Die wichtigsten Produktionsländer sind Malaysia und Indonesien. Palmöl wird aus dem Fruchtfleisch der Ölpalmenfrucht gewonnen. Aus Palmöl wird durch Umesterung PME hergestellt.

Palmöl beinhaltet folgende Fettsäuren (vTI):

1% Myristinsäure (C14:0), 43,8% Palmitinsäure (C16:0), 0,5% Palmitoleinsäure (C 16:1), 5% Stearinsäure (C18:0), 39% Ölsäure (C18:1), 10% Linolsäure (C 18:2), 0,2% Linolensäure (C 18:3), 0,5% Arachinsäure (C 20:0). Insgesamt hat das Palmöl einen prozentualen Anteil von 39,5% einfach ungesättigten und 10,2% mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Geliefert wurde der Kraftstoff von der Firma ADM Archer Daniels Midland Company, Hamburg AG, Werk Leer.

Leinölmethylester (LME)

Leinöl wird in Europa v.a. in Russland und Ungarn produziert. Weitere Produktionsländer sind Ägypten, Kanada, Argentinien, Uruguay und Paraguay. Leinöl wird aus der Flachspflanze gewonnen. LME wird durch die Umesterung von Leinöl gewonnen.

Leinöl besitzt folgende Fettsäurezusammensetzung (vTI):

6,5% Palmitinsäure (C16:0), 3,5% Stearinsäure (C18:0), 18% Ölsäure (C18:1), 14% Linolsäure (18:2) und 58% Linolensäure (18:3).

Folglich hat LME einen Anteil von 18% an einfach ungesättigten und 72% an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, davon 58% dreifach ungesättigte Fettsäuren.

Die Firma ASG Analytik-Service Gesellschaft mbH aus Neusäß war Lieferant für LME.

Rapsölmethylester (RME)

In Mittel- und Westeuropa dominiert der Anbau von Raps (weit überwiegend sogenannter 00-Raps) zur Herstellung von Biodiesel. Zur Gewinnung von RME wird Rapsöl umgeestert.

Rapsöl beinhaltet folgende Fettsäuren (vTI):

4% Palmitinsäure (C16:0), 1,5% Stearinsäure (C18:0), 63% Ölsäure (C18:1), 20% Linolsäure (C18:2), 9% Linolensäure (C18:3), 0,5% Arachinsäure (C20:0), 1% Eicosensäure (C20:1) und 0,5% Erucasäure (C22:1).

Folglich hat Rapsöl einen prozentualen Anteil von 64,5% einfach ungesättigten und 29% mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

RME wurde von der Firma ADM Archer Daniels Midland Company, Hamburg AG, Werk Leer, geliefert.

Rapsölmethylester-alt (RMEalt)

Die Ausgangszusammensetzung war identisch zu RME, jedoch wurde dieser Kraftstoff künstlich gealtert. Auf die künstliche Alterung wird später im Punkt 2.2.2 (S. 24) näher eingegangen.

B20

B20 ist ein Blend, bei dem 80% des Referenzdiesels (DK) mit 20% RME gemischt wurden.

Daraus ergibt sich eine Zusammensetzung der Fettsäuren bei B20 wie folgt:

0,8% Palmitinsäure (C16:0), 0,3% Stearinsäure (C18:0), 12,6% Ölsäure (C18:1), 4% Linolsäure (C18:2), 1,8% Linolensäure (C18:3), 0,1% Arachinsäure (C20:0), 0,2% Eicosensäure (C20:1) und 0,1% Erucasäure (C22:1).

Demnach beträgt der Gehalt von B20 12,9% einfach ungesättigten Fettsäuren und 5,8% mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Alle Blends wurden direkt im Johann Heinrich von Thünen–Institut (vTI) in Braunschweig gemischt.

B20alt

Bei diesem Kraftstoff handelt es sich um dasselbe Gemisch wie bei B20, nur wurde B20alt wie RMEalt künstlich gealtert.

B20E2

B20E2 beinhaltet dasselbe Mischungsverhältnis wie B20, nur, dass zu B20 noch 2% Ethanol (EtOH) und 2% Butanol (BuOH) hinzu gemischt wurden. Somit besteht die Zusammensetzung aus 76% DK, 20% FAME, 2% Ethanol und 2% Butanol. Warum Ethanol und Butanol hinzugefügt wurden, wird unter Punkt 4.3 behandelt.

B20altE2

Auch hier handelt es sich um dieselbe Zusammensetzung wie bei B20E2, lediglich im gealterten Zustand.

Zur Herstellung der Blends wurde der unter 1.2.1 beschriebene Referenzkraftstoff (DK) verwendet.

2.2.2 Alterung (Oxidation) der Kraftstoffe

Im Vorversuch wurde die Oxidationsstabilität der Kraftstoffe getestet. Beobachtet wurde, dass FAME im Vergleich zu DK weniger stabil sind und während der Lagerung im Tank oxidieren. Um zu testen, ob ein im Laufe der Zeit eingetretener Alterungsprozess der FAME sich auf die Mutagenität der Abgase auswirkt, wurden Kraftstoffe künstlich gealtert.

Um eine solche künstliche Alterung herbeizuführen, wurden 10 L RME in einem Gefäß mit einer externen elektrischen Heizung auf 110 °C über 40 Stunden erwärmt. Währenddessen wurden ca. 200 mL/min Luft eingeleitet, um den Oxidationsprozess zu beschleunigen. Der Aufbau des Versuchs wurde offen betrieben, sodass flüchtige Komponenten entweichen konnten.

2.2.3 Herstellung und Lagerung der Motoremissionen

Die Verbrennung des DKs und der FAME erfolgte im vTI in Braunschweig. Es wurde ein Motor des Typs Mercedes Benz OM 906 LA verwendet, der der EURO-III-Abgasnorm entspricht. Er wird für kleine bis mittlere Lastkraftwagen und Busse eingesetzt. Mit seinen sechs Zylindern erlangt der Motor eine Leistung von 205 kW. Tabelle 2 beinhaltet weitere Daten des Motors.

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

Tabelle 2: Daten des im Versuch verwendeten Motors

Der Motor war auf den Betrieb mit DK optimiert und lief im stationären Betrieb, was bedeutet, dass der Motor auf dem Prüfstand betrieben wurde und nicht in ein Fahrzeug eingebaut war. Die Verbrennung der Kraftstoffe erfolgte im so genannten *European Stationary Cycle* (ESC). Dieser Zyklus simuliert eine LKW-Fahrt. Er beinhaltet 13 Phasen, die in Drehzahlen, Lasten und Geschwindigkeiten des Motors unterschiedlich sind. Die Dauer eines Testzyklus betrug 28 Minuten.

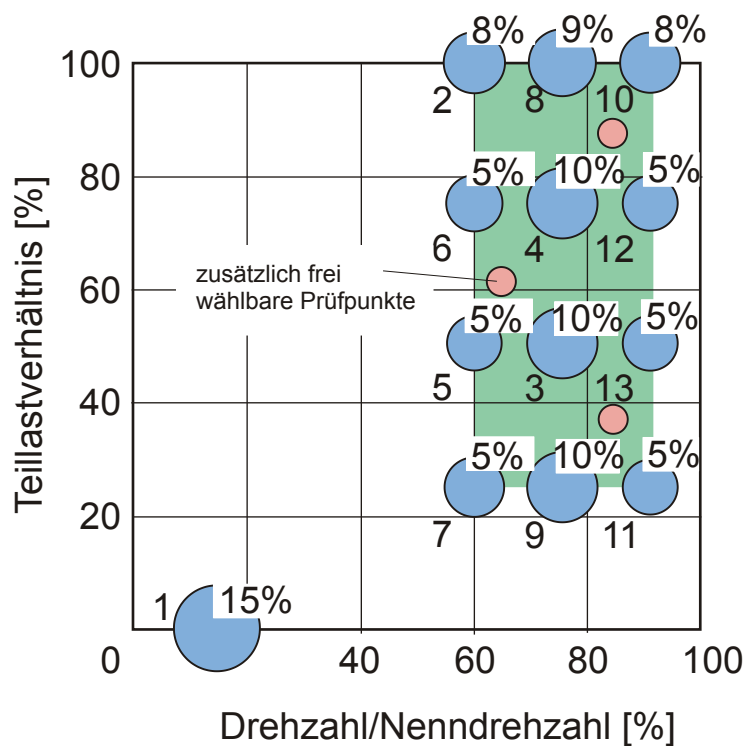


Abbildung 2: Die 13 Phasen des European Stationary Cycle (ESC)

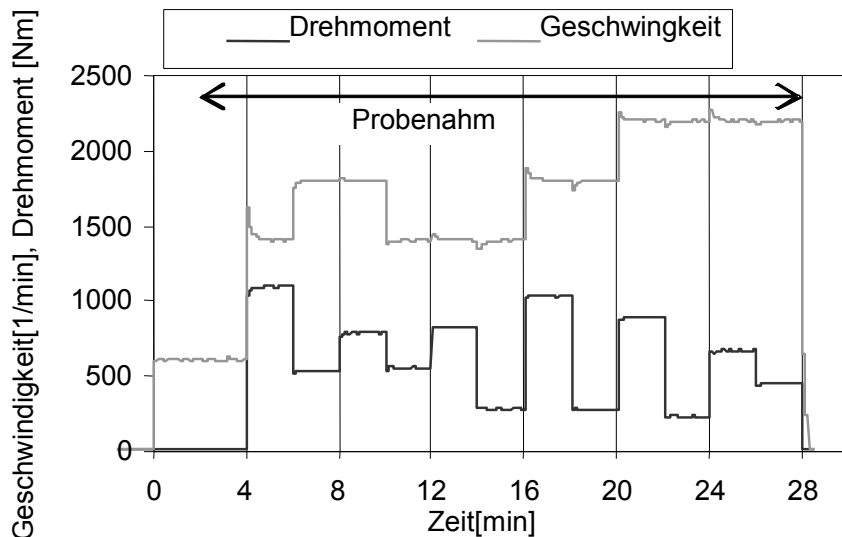


Abbildung 3: Auftragung der Drehzahlen und Drehmomente im Verlauf des ESC-Tests

Die Versuche wurden ohne Oxidationskatalysator oder eine andere Form der Abgasnachbehandlung durchgeführt.

Bevor die Kraftstoffe verbrannt und die dabei entstehenden Partikel in den dafür vorgesehenen Glasfaserfiltern aufgefangen wurden, wurden die Filter zweimal gewogen, um deren Leergewicht zu ermitteln. Dazu wurden die Filter für 24 Stunden in einer Klimakammer bei $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $48 \pm 8\%$ konditioniert.

Die Glasfaserfilter (Pallflex T60A20, mit 70 mm Durchmesser, der Firma Pall) wurden im vTI in Braunschweig belegt.

Die Emissionen wurden mit folgender Apparatur gesammelt:

Hinter einen Dimrothkühler wurde ein Intensivkühler geschaltet. Beide Kühler wurden durch einen Kryostaten auf $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ herabgekühlt. Als Kühlmittel wurde Glykol verwendet. Durch das Herabkühlen der Kühler wurde das heiße Abgas, das bei der Verbrennung der Kraftstoffe entsteht, gemäß VDI-Richtlinien auf Temperaturen unter $+50 \text{ }^\circ\text{C}$ herabgekühlt. Das Rohabgas, das mit Hilfe eines Teflonschlauchs und einer Glasolive in die Kühler geleitet wurde, wurde direkt hinter dem Schalldämpfer abgenommen. Über ein T-Stück wurde ein 250 mL Rundkolben am Dimrothkühler befestigt und so das während des Motorlaufs entstehende Kondensat aufgefangen. Dieser Rundkolben wurde mit Alu-Folie ummantelt, um die im Kolben befindlichen

PAK vor Sonnenlicht zu schützen. Hinter die Kühler wurde ein Filterhalter geschaltet. Anschließend an den Filterhalter wurde eine Vakuumpumpe installiert, die das zu untersuchende Abgas ansaugt. Am Ende des Motorlaufs wurde die Apparatur mit 100 mL Dichlormethan (DCM) gespült und das DCM zusammen mit dem Kondensat im Rundkolben aufgefangen. Anschließend wurden die Rundkolben bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Kühler wurden mit gefilterter, trockener Druckluft für 20 Minuten getrocknet.

Im Filterhalter befanden sich zwei Filter. Der erste Filter (Hauptfilter) sollte die durch die Verbrennung entstehenden Partikel aufnehmen, aus denen durch Soxhlet-Extraktion die PAK und andere lösliche Komponenten gewonnen werden sollten. Der zweite Filter (Sekundärfilter) diente zur Sammlung der Partikel, die den ersten Filter passierten. Der Probenstrom des Versuches wurde durch einen Massenflussregler auf 25 L/min geregelt. Pro Kraftstoff wurden alle 13 Phasen des ESC dreimal angefahren. Somit entstanden pro Durchlauf ein belegter Filter und ein 250-mL-Rundkolben mit Kondensat. Nach drei Durchläufen pro Kraftstoff entstanden schließlich drei 250-mL-Rundkolben mit Kondensat und drei belegte Filter. Die belegten Filter wurden direkt nach dem Motorlauf auf $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ herabgekühlt, erneut gewogen und dann bis zur Extraktion bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.



Abbildung 4: Apparatur zur Probengewinnung im Johann Heinrich von Thünen-Institut (vTI), Braunschweig

2.2.4 Vorbereitung der Kondensate und Filter für die Testung

2.2.4.1 Trocknung der Kondensate und Erstellung der Proben

Das im 250-mL-Rundkolben aufgefangene Kondensat der Gasphase wurde im Rotationsverdampfer vom DCM und Wasser getrennt. Hierzu wurde folgender Aufbau der Apparatur verwendet:

Der 250-mL-Rundkolben wurde an einem Rotationsverdampfer (Typ 51111, Heidolph) befestigt und in ein Wasserbad (WB 2001, Heidolph) bei ca. +45 °C gehängt und rotiert. Durch die Rotation des Rundkolbens im warmen Wasserbad verdampfte das Lösungsmittel (DCM) gleichmäßig an allen Stellen des Rundkolbens. Die Vakuumpumpe an dem Intensivkühler zog das verdampfende Lösungsmittel

durch den Intensivkühler nach oben. Dort kondensierte das Lösungsmittel und floss in den zusätzlich am Intensivkühler befindlichen Kolben. Im Rundkolben blieb nur der feste Rückstand der Gasphase zurück. Pro Kraftstoff erfolgten drei Motortestläufe. Für jeden Motortestlauf wurde ein extra Kolben verwendet.

Die Rückstände aller drei Kolben wurden mit 4 mL Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, das nach jeweils ca. dreiminütigem Ausschwenken von Kolben zu Kolben weiter pipettiert und danach in einem kleinen sterilen Probengefäß (4 mL) bei -18 °C eingefroren und aufbewahrt wurde.

2.2.4.2 Extraktion der Filter und Erstellung der Proben

Vor Extraktionsbeginn wurden alle Filter nochmals gewogen und danach jeweils drei Filter mit dem darauf befindlichen Abgaspartikulat desselben Kraftstoffes in je einen Soxhlet-Apparat (Brand, Wertheim) gegeben.

Zur Soxhlet-Extraktion wurde folgender Aufbau verwendet:

Unter den Soxhlet-Apparat wurde ein mit 180 mL DCM befüllter Kolben in ein ca. +65 °C warmes Wasserbad gehängt. Anschließend zirkulierte das DCM durch den Soxhlet-Apparat. Dieser Waschzyklus dauerte ca. 15 Min. Bei einer Extraktionszeit von sechs Stunden ergaben sich 24 Zyklen.

Nun wurde der Kolben mit den aus den Filtern extrahierten PAK einrotiert. Dies wurde, wie unter 2.2.4.1 (S. 28) beschrieben, durchgeführt.

Nach der Extraktion wurden die getrockneten Filter erneut gewogen, um die Masse der LOF zu errechnen (Gewicht der Filter nach der Extraktion subtrahiert vom Gewicht der Filter vor der Extraktion ergibt die Masse der LOF). Hauptbestandteil des sich noch auf den Filtern befindlichen Belages ist unverbrannter Kraftstoff.

2.2.5 Ames-Test (Salmonella-typhimurium/Mikrosomen-Test)

Um die Mutagenität eines unbekanntes Stoffgemisches bzw. einer unbekanntes Substanz zu testen, wurde der Salmonella-typhimurium/Mikrosomen-Test verwendet. Der Ames-Test ist momentan das weltweit am häufigsten verwendete *in-vitro*-Testverfahren, um komplexe Stoffgemische auf deren Mutagenität zu prüfen. Dieses Testsystem wurde 1973 von Bruce Ames und seinem Forschungsteam entwickelt

und veröffentlicht (Ames et al. 1973). In den Jahren 1975 und 1983 lieferten Ames et al. überarbeitete Versionen (Ames et al. 1975, Maron und Ames 1983).

Der Test beruht auf dem Nachweis der Fähigkeit eines Bakterienstammes nach einer Rückmutation Histidin wieder selbst produzieren zu können. Es wurden genetisch veränderte *Salmonella-typhimurium*-Stämme verwendet, die his-auxotroph und somit nicht in der Lage sind, Histidin selbst zu produzieren. Wurde die zu testende Substanz zu den Bakterienstämmen in eine Agarplatte gegeben und wirkte diese Substanz mutagen, erfolgte eine Rückmutation der Bakterienstämme. Die Stämme wurden his-prototroph (= Wildtyp), konnten erneut Histidin selbst produzieren und in Kolonien wachsen.

Um den Test für die in der Arbeit verwendeten Proben anzuwenden, wurden manche Änderungen zum aktuellen Standardprotokoll von Maron und Ames (1983) vorgenommen (Maron und Ames, 1983). Es wurden nur die Bakterienstämme TA98 und TA100 verwendet und nicht die Stämme TA97a und TA102, da diese in früheren Versuchsreihen keine konstanten Ergebnisse für Extrakte von DK und FAME lieferten. TA98 beweist eine Rasterschubmutation, TA100 eine Basenpaarsubstitution in der DNA der Bakterien.

Um die enzymatische Aktivierung der im Organismus befindlichen Promutagene nachzustellen, wurde ein 4%iger S9-Mix, wie im Standardprotokoll, verwandt. Um sicher zu gehen, dass die S9-Fraktion PAK aktiviert, wurden in einer früheren Studie enzymkinetische Untersuchungen des im Labor selbst hergestellten S9 durchgeführt (Bünger et al. 2000).

Wie von Maron und Ames (1983) beschrieben, wurden in dieser Arbeit für die Versuche auch Methylmethansulfonat (MMS) und 2-Aminofluren (2-AF) als Mutagene für Positivkontrollen genommen. DMSO diente als Negativkontrolle. MMS testet v.a. Basenpaarsubstitutionen, da die Werte bei TA 100 deutlich anstiegen. Bei 2-AF wird der S9-Mix auf seine Funktion getestet, da die Werte der Mutationen nur im Stamm TA 98 +S9 deutlich anstiegen. Ergänzend wurde 3-Nitrobenzanthon (3-NBA) mit in dem Test verwendet. 3-NBA stellt einen Vertreter der Gruppe der direkten Mutagene, der Nitro-PAK, dar. Die Extrakte wurden vor dem Testverfahren in 4 mL DMSO gelöst. Zu 100 µg/mL 2-AF und 10 ng/mL 3-NBA wurden ebenso 4 mL DMSO hinzu gegeben. MMS (10µg/mL) wurde mit destilliertem Wasser verdünnt. Gemeinsam mit 2,5 mL flüssigem Top-Agar, der 0,05 mMol Histidin und 0,05 mMol Biotin enthielt, wurden 25 µL, 50 µL und 100 µL einer Testkonzentration der Extrakte

und 100 µL einer Übernachtskultur eines Teststammes in einem Reagenzglas gemischt. Anschließend wurde das Gemisch kurz auf einem Vortex geschüttelt und auf eine Minimal-Agarplatte gegeben, die Vogel-Bonner-E-Medium enthielt. Jeder der Extrakte wurde sowohl mit und ohne Zugabe von S9 in einem Versuchsdurchgang und mit beiden Teststämmen untersucht. Um eine Dosis-Wirkungs-Beziehung aufstellen zu können, wurden 25 µL, 50 µL und 100 µL von jedem Extrakt verwendet und mindestens drei Versuchsdurchgänge angesetzt. Pro Versuch wurden einmal alle Positivkontrollen und Extrakte gemessen.

Bei höheren Extraktkonzentrationen kann es zu toxischen Wirkungen und zum Absterben der Bakterien kommen. Dieser toxische Effekt führt zu einer Ergebnisverfälschung, da ein linearer Anstieg der Dosis-Wirkungs-Kurve damit nicht mehr möglich ist (Krewski et al. 1992). Zum Testen einer linearen Dosis-Wirkungs-Beziehung müssen daher niedrigere Dosen verwendet werden. Die Steigung der Funktion zeigt dabei den Wert der Mutagenität des Extraktes an.

2.2.6 Auswertung des Tests

Die mit dem Extrakt behandelten Agarplatten wurden 48 h lang im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und anschließend ausgewertet. Zur Auszählung der entstandenen Kolonien auf den Petrischalen wurde ein Bildauswertungssystem (Cardinal, Perspective Instruments, Haverhill, Great Britain) verwendet. Von jeder Platte wurden zweimal alle Kolonien gezählt und aus den Ergebnissen der Mittelwert berechnet. Dieser Wert wurde dokumentiert und später mit der Basisrate (Wert der DMSO-Kontrollen) verglichen. Kriterien waren, ob die Anzahl der Revertanten doppelt so hoch war, wie die Basisrate und ob eine reproduzierbare Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erkennen war.

Als letzter Schritt der Auswertung wurde der Boden der Petrischalen betrachtet, um toxische Effekte des Extraktes auf das Bakterienwachstum, so genannte Mikrokolonien, zu erkennen. Der Boden der Agarplatte wirkt dann glänzend und leicht durchsichtig mit einer übermäßig hohen Zahl an sehr kleinen Kolonien.

Da die Verbrennung von Kraftstoffen immer Emissionen hervorruft, die eine gesundheitsschädliche Wirkung haben können, die Höhe und Zusammensetzung der Abgase aber variieren, wurden keine absoluten Konzentrationen der Emissionen der FAME angegeben, sondern mit den Ergebnissen für den Referenzkraftstoff (DK)

verglichen. Dazu wurden zur Darstellung der Emissionen die Ergebnisse der Verbrennung des Referenzkraftstoffes DK = 100% gesetzt und die Ergebnisse der FAME in relativem Verhältnis dazu.

3. Ergebnisse

3.1 Partikelmassen

Wie unter Punkt 1.3.1 (S. 5) beschrieben, wird die auf den Filtern gesammelte Partikelphase als Gesamtpartikelmasse (GPM) bestimmt und nach Extraktion in eine LOF und eine UF eingeteilt, auf die im nachfolgenden Punkt näher eingegangen wird. Pro Kraftstoff erfolgten drei Motortestläufe. Pro Motortestlauf wurde ein Filter mit Partikeln belegt. Die Extraktionsergebnisse der drei Filter für einen Kraftstoff wurden gemeinsam ausgewertet und der Mittelwert mit der Standardabweichung (SD) berechnet.

3.1.1 Gesamtpartikelmassen

Die FAME weisen die geringsten Gesamtpartikelmassen (GPM) im Vergleich zu DK oder den Blends auf. PME, LME und RME ergeben eine GPM von ca. 1,8 mg. Bei dem Vergleich von DK mit den Blends B20 und B20alt zeigen alle drei Kraftstoffe gleich hohe Werte auf. Aus der Reihe fallen B20E2 und B20altE2. Diese beiden Kraftstoffe haben die höchsten Werte für die GPM mit 3,6 mg (B20E2) und 2,9 mg (B20altE2).

3.1.2 Lösliche organische und unlösliche Fraktionen

Bei den FAME machen die LOF den größten Teil der GPM aus, mit Anteilen von 74%-84%. Bei den Blends liegt fast ein Verhältnis 50% : 50% (LOF : UF) vor. DK hat die niedrigste LOF und weist damit den höchsten Rußanteil auf.

Kraftstoff	GPM [mg] ± SD	LOF [mg] ± SD	%-Anteil von LOF an GPM	UF [mg] ± SD	%-Anteil von UF an GPM
PME	1,8 ± 0,17	1,30 ± 0,23	74%	0,50 ± 0,06	26%
LME	1,8 ± 0,10	1,50 ± 0,12	81%	0,30 ± 0,06	19%
RME	1,9 ± 0,25	1,60 ± 0,15	84%	0,30 ± 0,10	16%
RMEalt	1,4 ± 0,59	1,10 ± 0,36	80%	0,40 ± 0,12	20%
DK	2,4 ± 0,44	1,00 ± 0,20	41%	1,40 ± 0,26	59%
B20	2,4 ± 0,70	1,20 ± 0,32	52%	1,40 ± 0,42	48%
B20alt	2,2 ± 0,49	1,00 ± 0,15	48%	1,10 ± 0,38	52%
B20E2	3,6 ± 0,90	1,80 ± 0,44	50%	1,80 ± 0,55	50%
B20altE2	2,9 ± 0,38	1,50 ± 0,21	52%	1,40 ± 0,17	48%

Tabelle 3: Gesamtpartikelmassen (GPM) der Emissionen der FAME, DK und Blends [mg/Filter]; LOF und UF der verwendeten FAME, DK und Blends [mg/Filter]

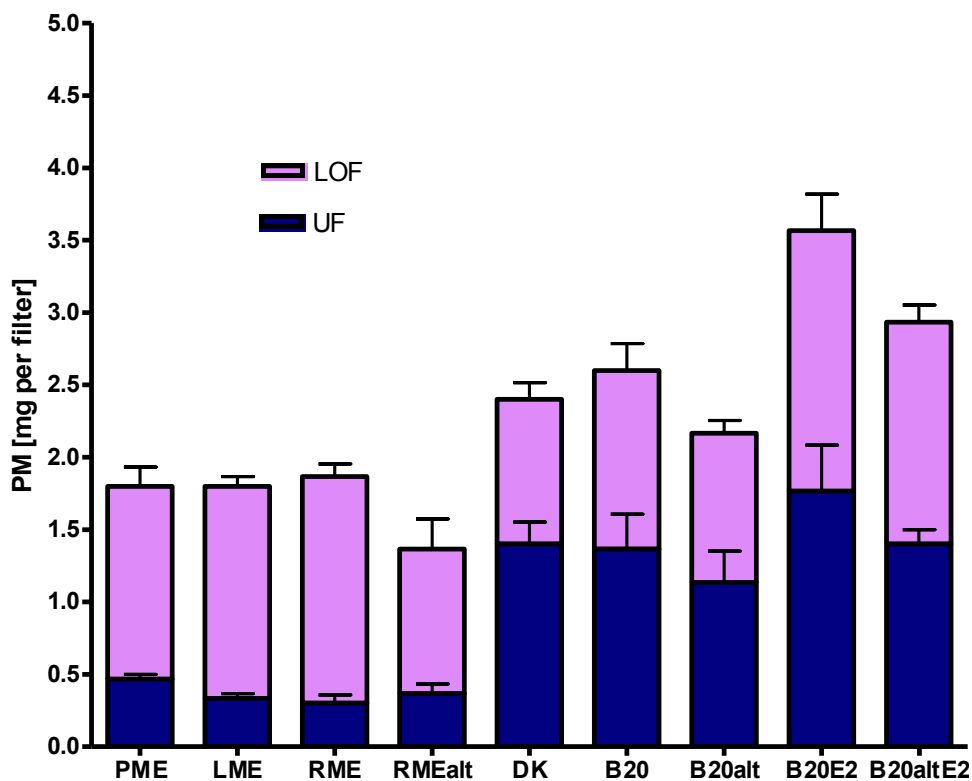


Abbildung 5: LOF und UF der Kraftstoffe

3.2 Mutagenität der Biokraftstoffemissionen

Die folgenden Balkendiagramme zeigen, dass jeder Kraftstoff einen Balken mit positiven Werten aufweist. Dies belegt, dass jeder der getesteten Kraftstoffe abzüglich der Basisrate erhöhte Mutationen verursachte. Die Standardabweichungen der Balken zeigen eine prozentuale Abweichung der Mutagenität von 9%-16% je nach Kraftstoff im Stamm TA98 ohne enzymatische Aktivierung und von 15%-16% im Stamm TA98 mit enzymatischer Aktivierung. Im Stamm TA100 beträgt die prozentuale Abweichung der Mutagenität 12%-13% ohne enzymatische Aktivierung und 18%-20% mit enzymatischer Aktivierung.

Weiterhin wurde beobachtet, dass die Mutagenität der Gasphase des Kraftstoffes höhere Werte aufweist, als die Mutagenität der Partikelphase des Kraftstoffes. Die mögliche Ursache wird in der Diskussion behandelt.

Die beschriebenen Ergebnisse beziehen sich fast ausschließlich auf die Werte mit TA98, da dieser Stamm sensitiver war als der Stamm TA100. TA98 zeigte das mutagene Potential bei Partikelextrakten und Kondensaten an, das von TA100 nicht mehr erfasst wurde. Im Stamm TA98 wurde bei einer Dosis von 100 µL noch Mutagenität erfasst, wohingegen im Stamm TA100 teilweise keine positiven Ergebnisse mehr verzeichnet wurden.

Bei Betrachtung der Blends zeigt sich, dass die DME im Stamm TA98 außer B20altE2 weniger mutagen wirken als die bei DK. Im Stamm TA100 zeigt sich ein gegensätzliches Bild. Hier sind die DME der Blends mutagener als die des DK. Dennoch zeigen weder der Stamm TA98, noch der Stamm TA100 sowohl mit als auch ohne enzymatische Aktivierung signifikante Unterschiede in der Mutagenität. Aus diesen Gründen werden die Blends nicht graphisch dargestellt und weiter beschrieben. Lediglich der Alterungsversuch der Blends wird unter Punkt 3.2.3 (S. 47) näher betrachtet.

3.2.1 Vergleich der Mutagenität der Kondensate der FAME im Überblick

Die Grafiken für die einzelnen Kraftstoffe (Abbildung 6 und 7) zeigen, dass außer bei PME die DME der FAME mutagener sind als die des DK. Die Mutagenität ohne metabolische Aktivierung mit S9 ist größer als mit metabolischer Aktivierung.

Aufgrund der Hypothese, dass die DME der FAME mit einer höheren Anzahl an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ein höheres mutagenes Potential aufweisen, werden im Folgenden die einzelnen FAME untereinander und im Bezug zu DK verglichen. RMEalt wird nicht mit den anderen FAME verglichen dargestellt, sondern nur in den Alterungsversuchen verwendet.

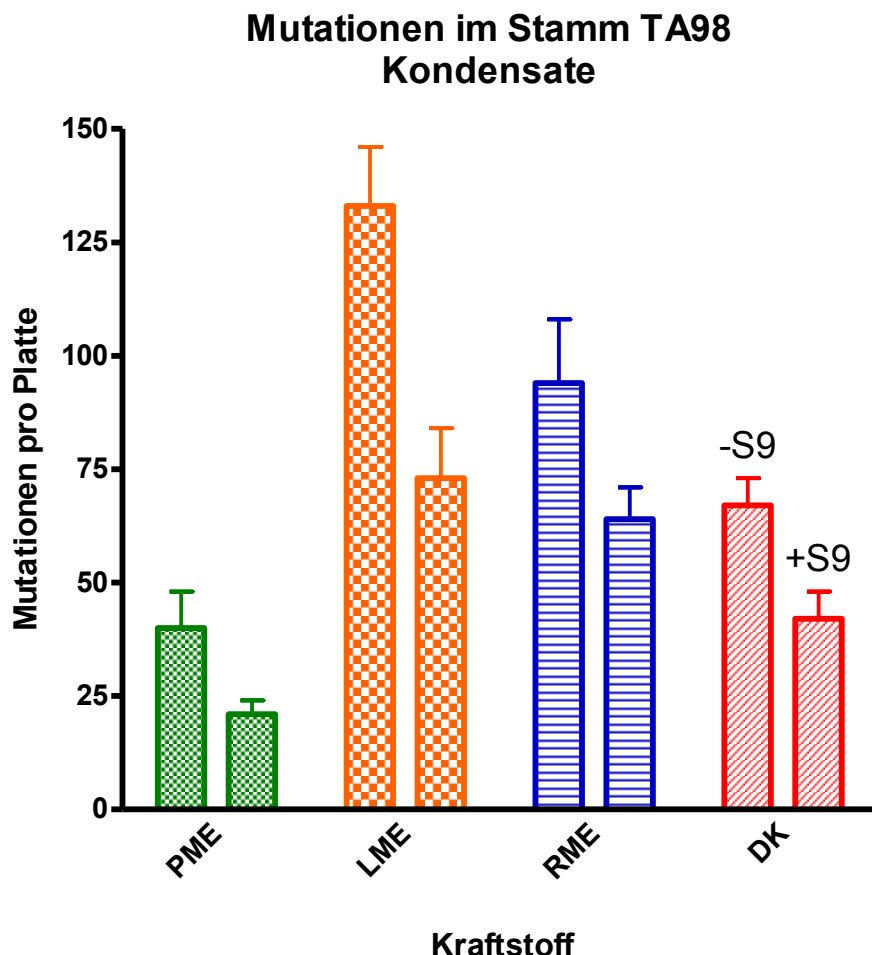


Abbildung 6: Mutagenität der Kondensate der FAME im Stamm TA98 mit und ohne metabolische Aktivierung im direkten Vergleich (linke Säule jeweils ohne metabolische Aktivierung (-S9), rechte Säule mit metabolischer Aktivierung (+S9))

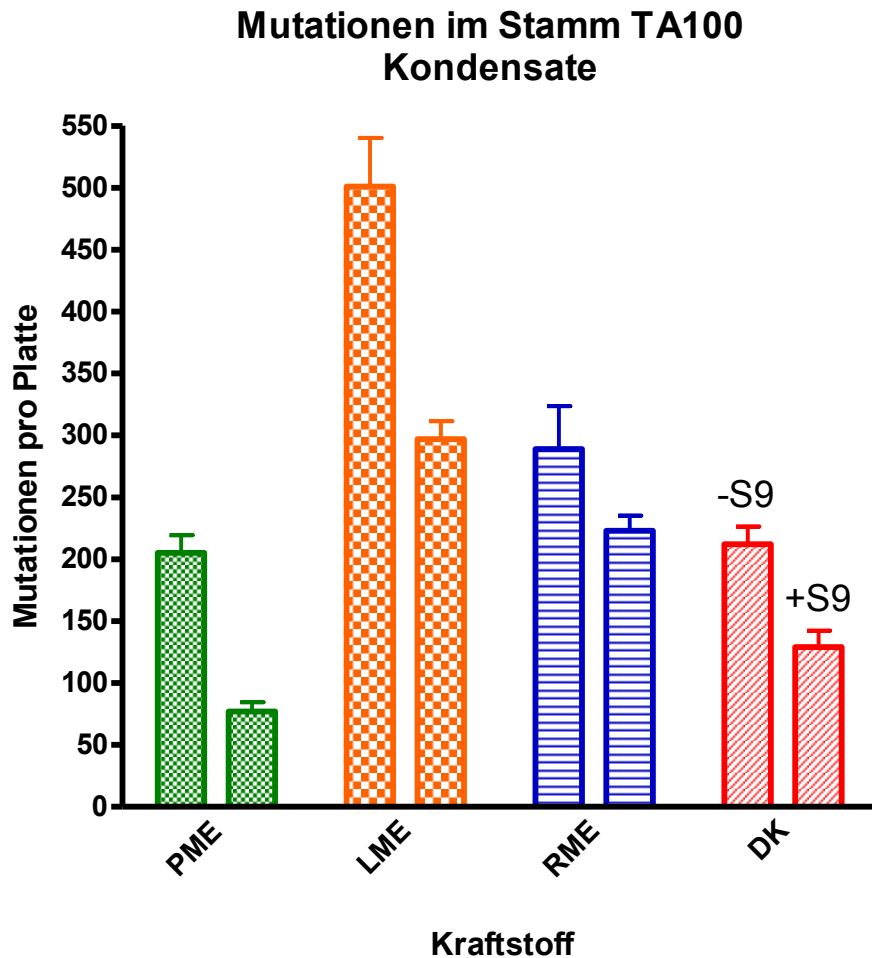


Abbildung 7: Mutagenität der Kondensate der FAME im Stamm TA100 mit und ohne metabolische Aktivierung im direkten Vergleich (linke Säule jeweils ohne metabolische Aktivierung (-S9), rechte Säule mit metabolischer Aktivierung (+S9))

3.2.1.1 Vergleich der Kondensate von Leinölmethylester, Rapsölmethylester und Palmölmethylester mit dem Referenzkraftstoff

Im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung ist das Kondensat von LME signifikant mutagener als DK ($p < 0,001$). RME weist einen ähnlichen Trend auf, liefert jedoch keine signifikanten Werte. Die DME von PME sind geringer mutagen als die des DK, wie bereits in der allgemeinen Übersicht zu erkennen ist. Dieser Zusammenhang ist jedoch nicht signifikant.

Der Stamm TA98 mit enzymatischer Aktivierung liefert ähnliche Ergebnisse. Diesmal sind die DME von LME und RME signifikant mutagener als die des DK (LME: $p =$

0,025; RME: $p = 0,022$). Die DME von PME sind ebenso nicht signifikant geringer mutagen als die des DK.

Es zeigt sich ein tendenziell höheres mutagenes Potential der FAME in den Kondensaten, insbesondere nach metabolischer Aktivierung der PAK.

Im Stamm TA100 ohne metabolische Aktivierung finden sich ähnliche Verhältnisse wie im Stamm TA98. Als Ergebnis wurde ein signifikanter Unterschied bei dem Vergleich zwischen DK und LME erzielt, bei dem die DME von LME signifikant mutagener sind als die des DK ($p = 0,001$). Ebenso mutagener, jedoch nicht signifikant, sind die DME von RME und PME verglichen mit denen des DK. PME und DK weisen ziemlich gleiche Ergebnisse auf. Im Stamm TA100 mit metabolischer Aktivierung haben die Kondensate der FAME durchgängig signifikant höhere Mutagenität als die des DK (LME und DK ($p < 0,001$), RME und DK ($p = 0,007$), PME und DK ($p = 0,024$)).

3.2.1.2 Vergleich der Kondensate von Palmölmethylester, Rapsölmethylester und Leinölmethylester untereinander

Im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung mit S9 ergeben sich signifikante Unterschiede, die eine Reihenfolge zeigen, in der die DME von PME am geringsten mutagen, die von RME mutagener und die von LME am stärksten mutagen von den drei FAME sind. Der Unterschied der Mutagenität der DME von LME ist im Vergleich zu den von RME ($p = 0,046$) und verglichen zu den von PME ($p < 0,001$) signifikant (Abbildungen 8 und 9). Abbildung 10 zeigt, dass die DME von RME signifikant mutagener als die von PME ($p = 0,012$) sind. Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich nach metabolischer Aktivierung. Der Unterschied ist, dass nach metabolischer Aktivierung LME verglichen zu RME gleiche Werte zeigt. Ansonsten sind die DME von LME signifikant mutagener als die von PME ($p = 0,004$) und die von RME sind signifikant mutagener als die von PME ($p = 0,001$).

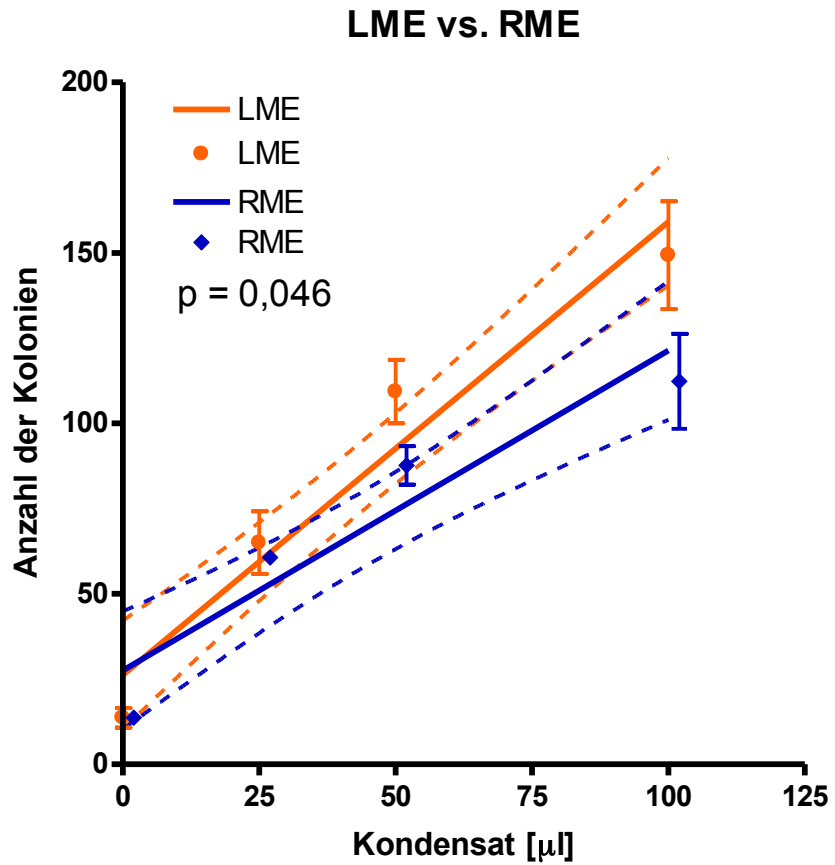


Abbildung 8: Vergleich der Mutagenität der Kondensate von LME zu RME im Stamm TA98 -S9 mittels linearer Regression

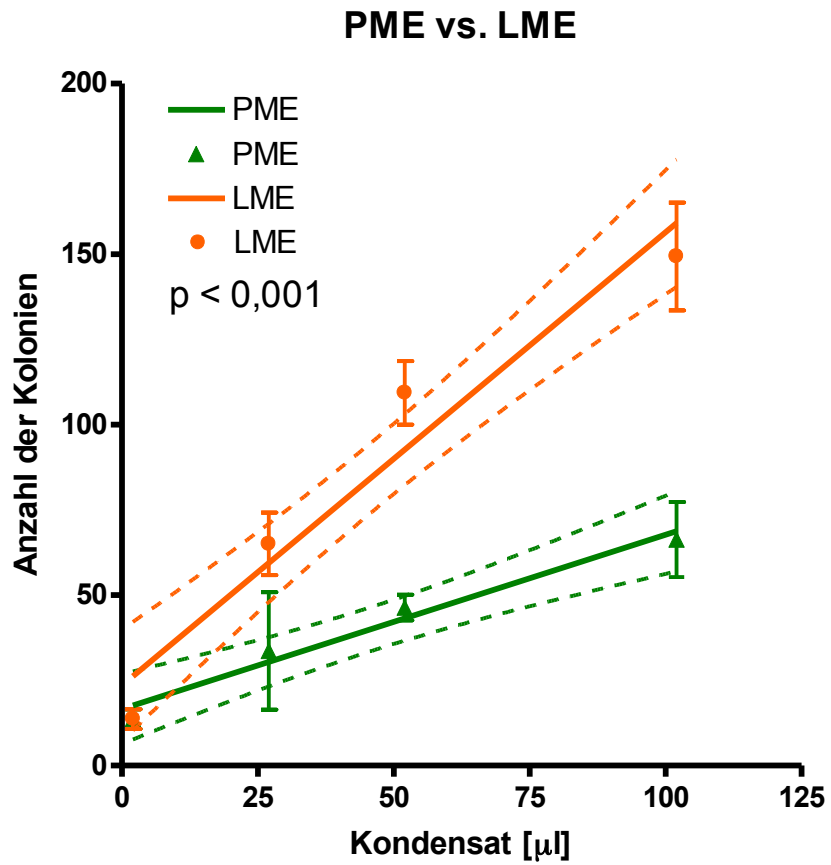


Abbildung 9: Vergleich der Mutagenität der Kondensate von PME zu LME im Stamm TA98 -S9 mittels linearer Regression

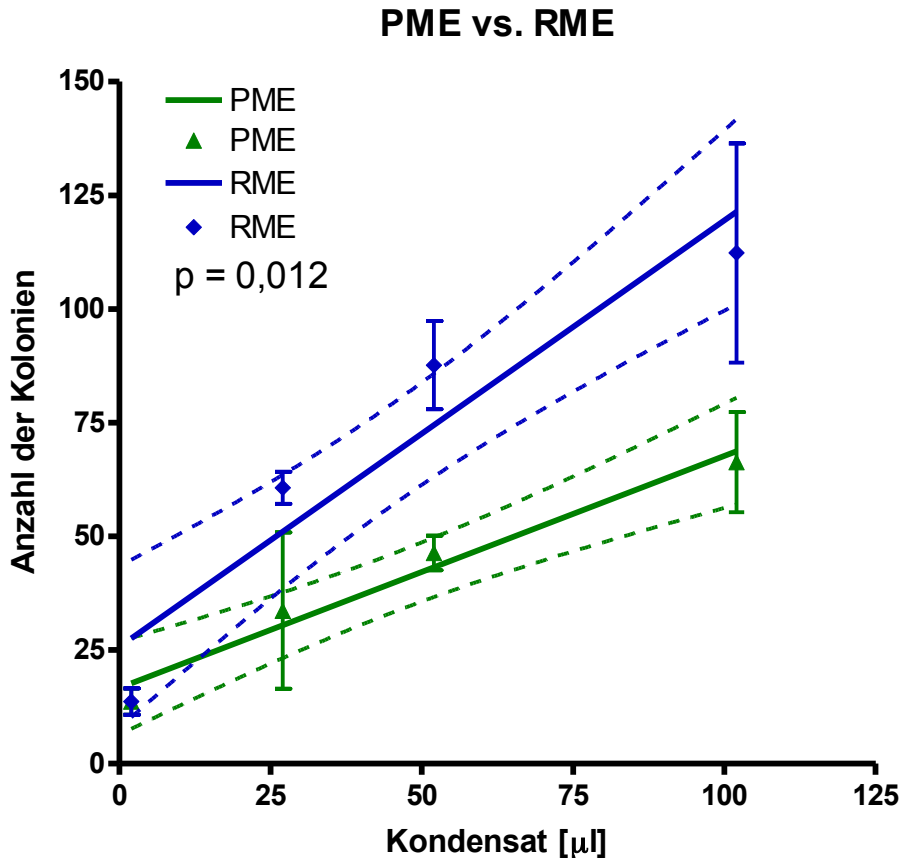


Abbildung 10: Vergleich der Mutagenität der Kondensate von PME zu RME im Stamm TA98 -S9 mittels linearer Regression

Der weniger sensitive Stamm TA100 verhält sich in gleicher Weise wie der Stamm TA98. Ohne metabolische Aktivierung sind im Stamm TA100 die DME von LME signifikant mutagener als die von RME ($p = 0,029$) und von PME ($p = 0,004$). Lediglich der Vergleich zwischen RME und PME ist nicht signifikant, obwohl RME höhere Werte aufweist. Mit metabolischer Aktivierung zeigen sich im Stamm TA100 in allen drei Vergleichen signifikante Unterschiede, die der Reihenfolge LME > RME > PME entsprechen (absteigende Mutagenität der DME der FAME).

3.2.2 Vergleich der Mutagenität der Partikulate der FAME im Überblick

Ebenso wie bei den Kondensaten ist in beiden Stämmen (TA98 und TA100) Mutagenität (nach Abzug der Basisrate) zu verzeichnen (Abbildungen 11 und 12).

Die SD der Balken zeigt, dass die Mutagenität der Kraftstoffe eine prozentuale Abweichung von 7%-24% im Stamm TA98 ohne enzymatische Aktivierung und von 9%-16% im Stamm TA98 mit enzymatischer Aktivierung hat. Im Stamm TA100 ist die prozentuale Abweichung der Mutagenität 10%-17% ohne enzymatische Aktivierung und 23%-31% mit enzymatischer Aktivierung.

Im Stamm TA98 ohne enzymatische Aktivierung mit S9 wirkt der Partikelextrakt von DK mutagener als der der FAME PME und RME, im Gegensatz zu den Kondensaten, die bei den FAME mutagener sind als bei DK. Die DME von LME zeigen wie bei den Kondensaten eine höhere Mutagenität als die des DK.

Bei der Betrachtung der Blends zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den Kondensaten. Im Stamm TA98 sind die DME von DK mutagener als die der Blends und im Stamm TA100 sind die DME von B20, B20E2 und B20altE2 mutagener als die des DK. Aber auch hier sind weder im Stamm TA98 noch im Stamm TA100 sowohl mit als auch ohne enzymatische Aktivierung signifikante Unterschiede im Hinblick auf die Mutagenität zu verzeichnen.

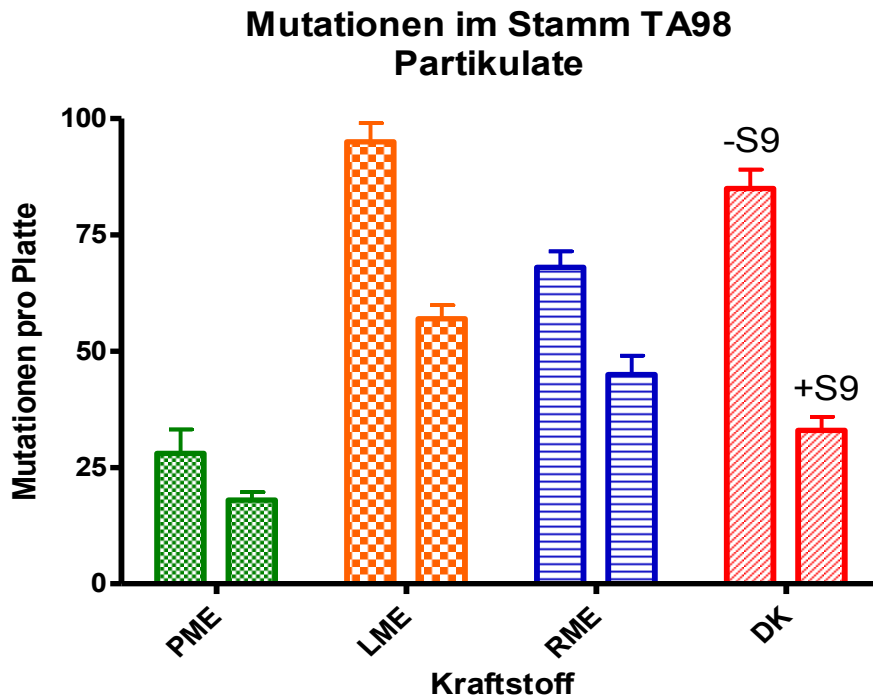


Abbildung 11: Mutagenität der Partikulate der FAME im Stamm TA98 mit und ohne metabolische Aktivierung im direkten Vergleich (linke Säule jeweils ohne metabolische Aktivierung (-S9), rechte Säule mit metabolischer Aktivierung (+S9))

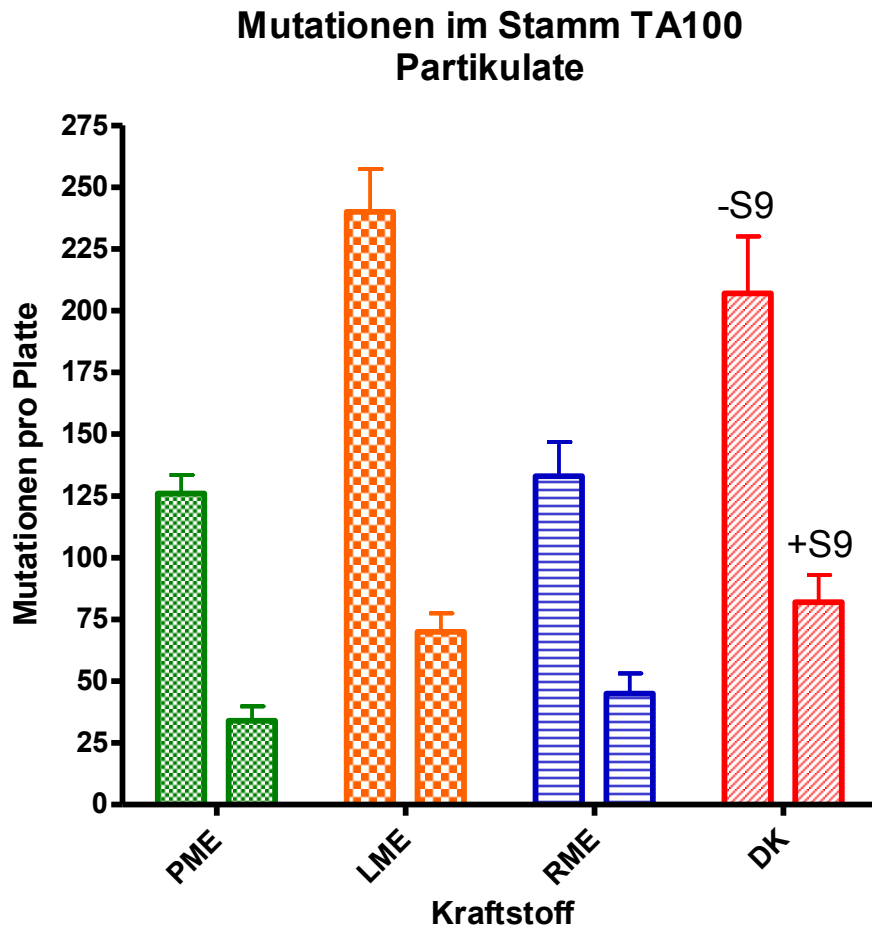


Abbildung 12: Mutagenität der Partikulate der FAME im Stamm TA100 mit und ohne metabolische Aktivierung im direkten Vergleich (linke Säule jeweils ohne metabolische Aktivierung (-S9), rechte Säule mit metabolischer Aktivierung (+S9))

3.2.2.1 Vergleich der Partikulate von Leinölmethylester, Rapsölmethylester und Palmölmethylester mit dem Referenzkraftstoff

In der Betrachtung des Stammes TA98 ohne enzymatische Aktivierung liefert der Vergleich von DK mit PME den einzigen signifikanten Unterschied zwischen beiden Kraftstoffen. Hier sind die Partikulate von DK signifikant mutagener als die von PME ($p = 0,003$). RME liefert im Vergleich zu DK keine signifikanten Unterschiede. DK und LME zeigen ähnliche Ergebnisse und sind daher auch nicht signifikant unterschiedlich.

Im Stamm TA98 mit metabolischer Aktivierung zeigt sich, dass die Partikulate von LME signifikant mutagener sind als die von DK ($p = 0,004$). Die Partikulate von RME sind ebenso mutagener als die von DK, zeigen aber keinen signifikanten Unterschied. Bei dem Vergleich mit PME sind die Partikulate von DK mutagener, aber auch dieser Vergleich liefert keinen signifikanten Unterschied.

Bei dem weniger sensitiven Stamm TA100 liegen sowohl ohne als auch mit metabolischer Aktivierung keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf höhere Mutagenität der Partikulate von DK gegenüber FAME vor.

3.2.2.2 Vergleich der Partikulate von Palmölmethylester, Rapsölmethylester und Leinölmethylester untereinander

Bei einem Vergleich der FAME untereinander liegt im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung dieselbe Reihenfolge wie bei den Kondensaten innerhalb der mutagenen Potenz der FAME vor: LME > RME > PME. Die Partikulate von LME sind signifikant mutagener als die von RME ($p = 0,012$) und PME ($p = 0,004$) (Abbildungen 13 und 14). Die Partikulate von RME sind signifikant mutagener als die von PME ($p = 0,039$) (Abbildung 15). Diese Reihenfolge wiederholt sich in sehr ähnlicher Weise bei den Ergebnissen mit enzymatischer Aktivierung. Die Partikulate von LME zeigen höhere Mutagenität gegenüber denen der RME und PME. Die Partikulate von RME sind mutagener als die der PME. Der einzige signifikante Unterschied bezogen auf die Mutagenität der Partikulate ist allerdings der Vergleich zwischen LME und PME ($p = 0,009$).

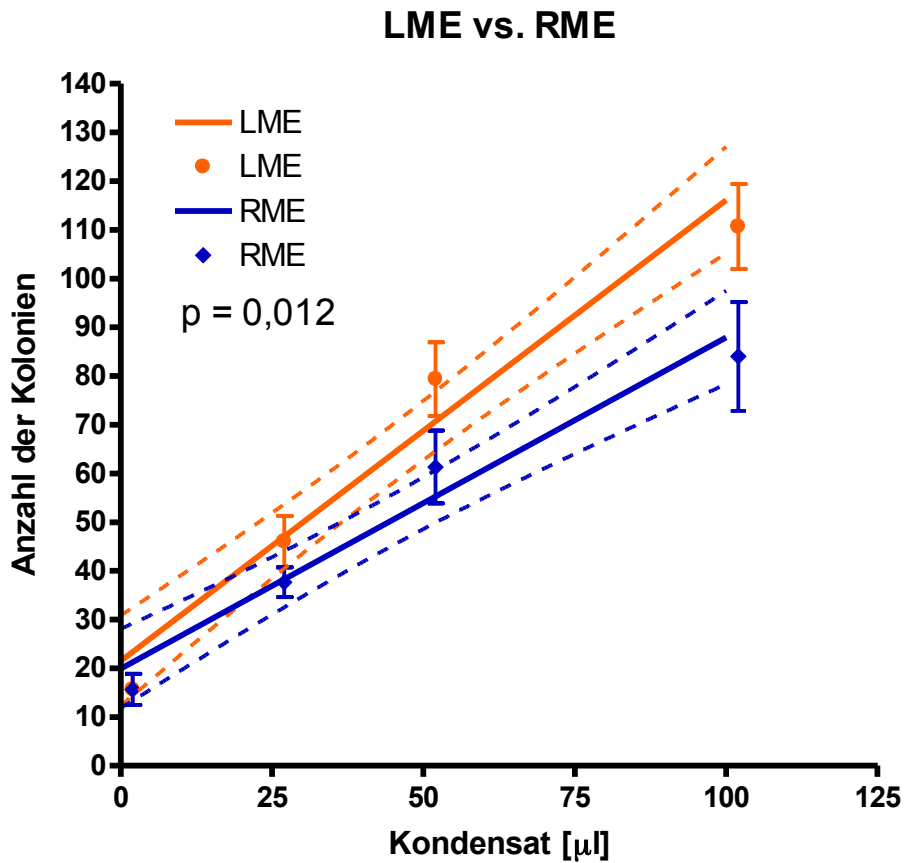


Abbildung 13: Vergleich der Mutagenität der Partikulate von LME zu RME im Stamm TA98 -S9 mittels linearer Regression

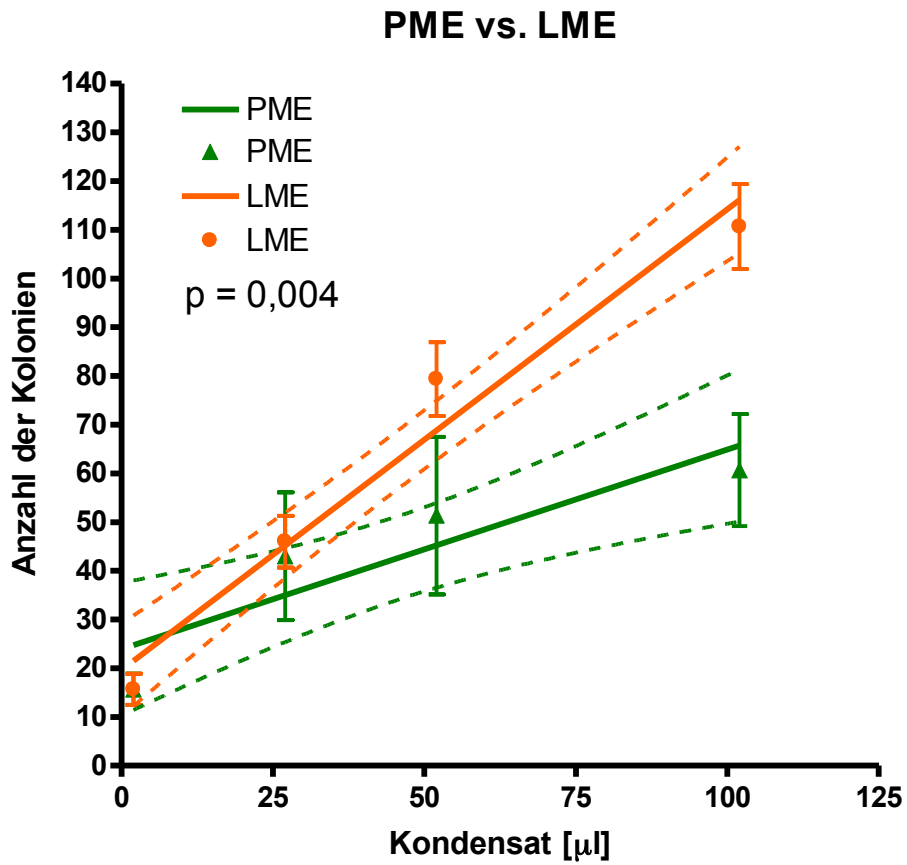


Abbildung 14: Vergleich der Mutagenität der Partikulate von PME zu LME im Stamm TA98 -S9 mittels linearer Regression

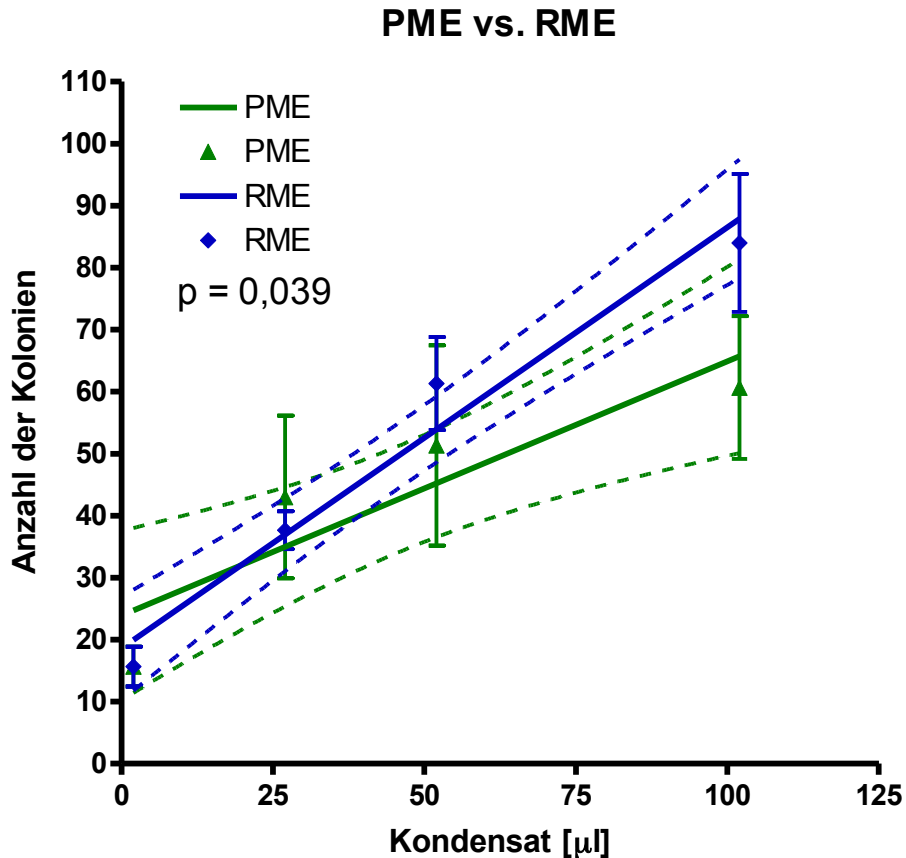


Abbildung 15: Vergleich der Mutagenität der Partikulate von PME zu RME im Stamm TA98 -S9 mittels linearer Regression

Im Stamm TA100 ohne metabolische Aktivierung wurden signifikante Unterschiede der Mutagenität der Partikulate für LME > RME ($p = 0,011$) und LME > PME ($p = 0,015$), jedoch keine Signifikanz für PME verglichen mit RME erzielt. Bei TA100 mit enzymatischer Aktivierung liegen keine signifikanten Unterschiede als Ergebnis vor.

3.2.3 Vergleich der Mutagenität im Alterungsversuch

Wie bereits im Punkt 2.2.2 (S. 24) beschrieben, wurden einige FAME und Blends künstlich gealtert, um deren Oxidationsstabilität und deren mutagenes Potential der DME im gealterten Zustand zu prüfen.

3.2.3.1 Kondensate

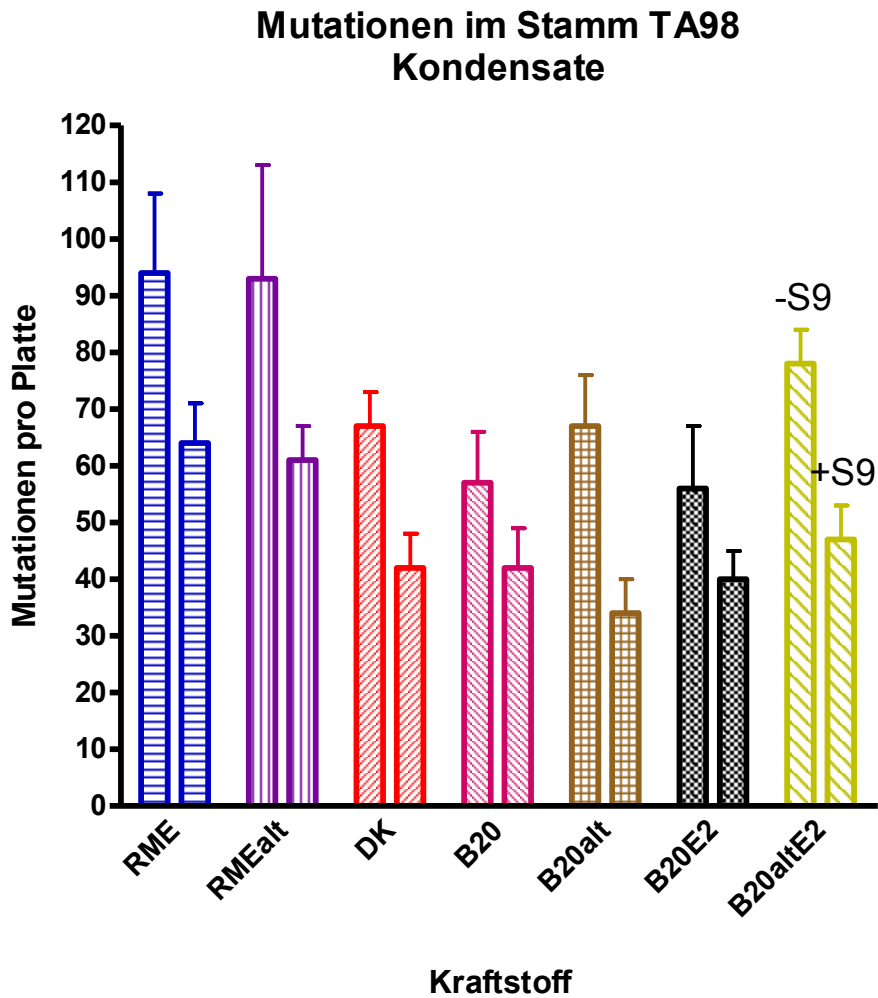


Abbildung 16: Mutagenität der Kondensate der Blends im Stamm TA98 mit und ohne metabolische Aktivierung im direkten Vergleich (linke Säule jeweils ohne metabolische Aktivierung (-S9), rechte Säule mit metabolischer Aktivierung (+S9))

Mutationen im Stamm TA100 Kondensate

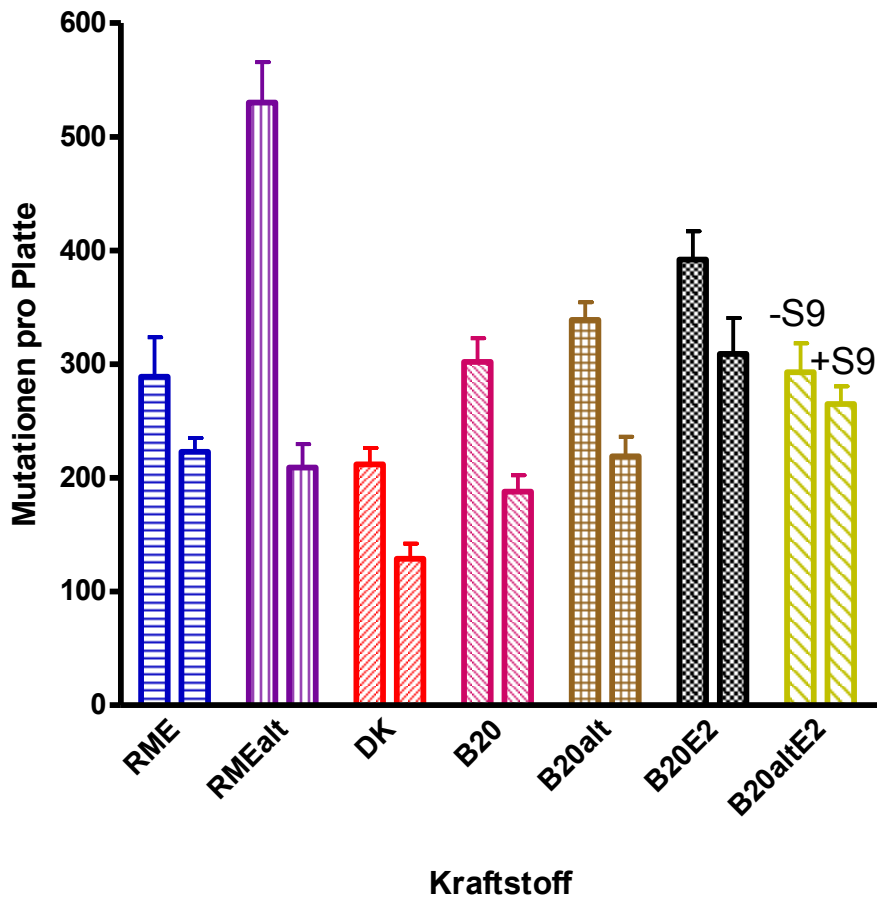


Abbildung 17: Mutagenität der Kondensate der Blends im Stamm TA100 mit und ohne metabolische Aktivierung im direkten Vergleich (linke Säule jeweils ohne metabolische Aktivierung (-S9), rechte Säule mit metabolischer Aktivierung (+S9))

In beiden Teststämmen (TA98 und TA100) ist weder mit noch ohne Aktivierung durch den S9-Mix ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Mutagenität zwischen nicht gealtertem und gealtertem Kraftstoff zu verzeichnen.

3.2.3.2 Partikulate

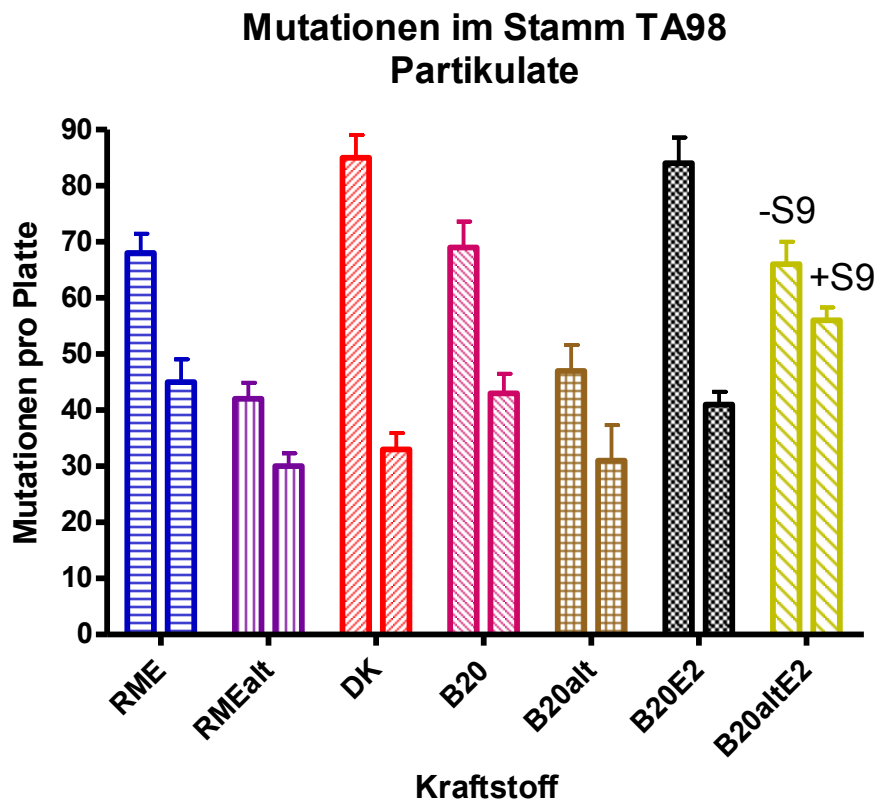


Abbildung 18: Mutagenität der Partikulate der Blends im Stamm TA98 mit und ohne metabolische Aktivierung im direkten Vergleich (linke Säule jeweils ohne metabolische Aktivierung (-S9), rechte Säule mit metabolischer Aktivierung (+S9))

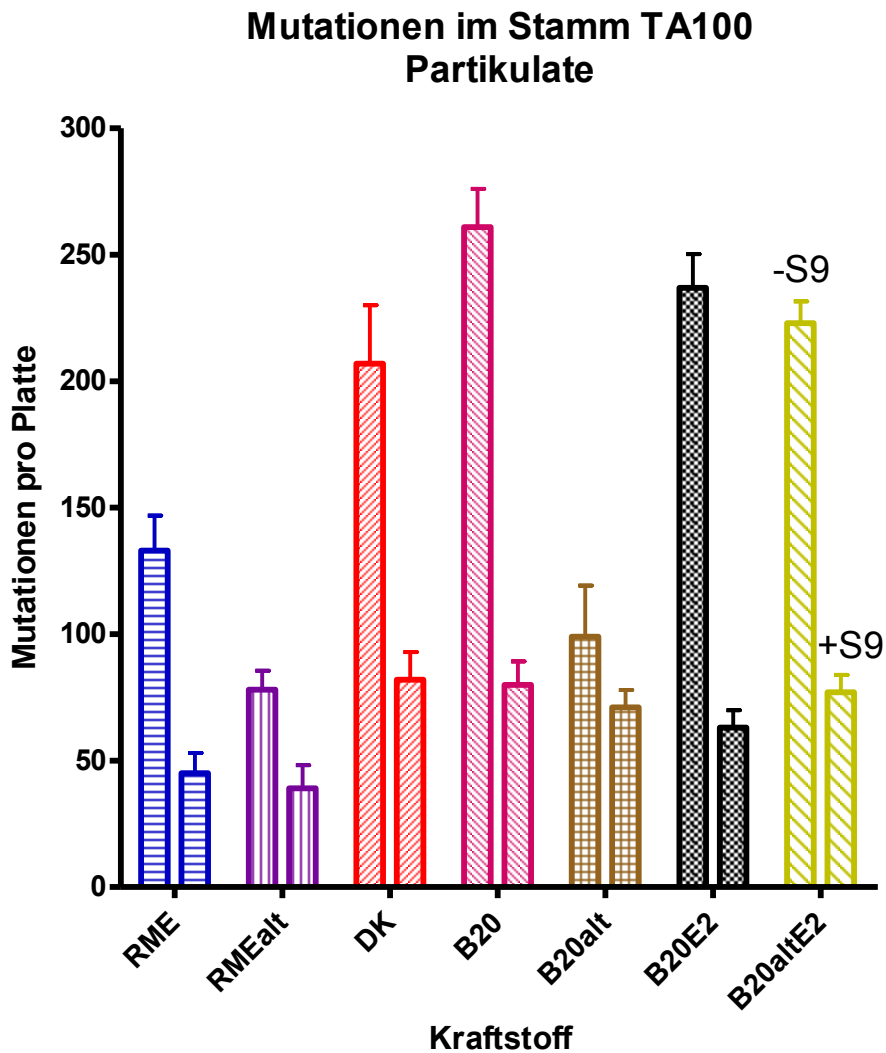


Abbildung 19: Mutagenität der Partikulate der Blends im Stamm TA100 mit und ohne metabolische Aktivierung im direkten Vergleich (linke Säule jeweils ohne metabolische Aktivierung (-S9), rechte Säule mit metabolischer Aktivierung (+S9))

Bei den Partikulaten werden zwei signifikante Unterschiede beobachtet: Eine signifikant höhere Mutagenität der Partikulate von B20altE2 gegenüber den von B20E2 (Stamm TA98 -S9) ($p = 0,019$) und von den Partikulaten von B20 gegenüber

den von B20alt (Stamm TA100 -S9) ($p = 0,001$). Diese zwei Ergebnisse treten aber in unterschiedlichen Teststämmen auf. Die Partikulate der nichtgealterten Kraftstoffe sind nicht durchgängig weniger mutagen als die der gealterten, oder umgekehrt. Insgesamt lässt sich kein konsistenter Effekt der Alterung zeigen.

4. Diskussion

In älteren Publikationen wurden die Rückmutationen von Partikelextrakten von fossilem DK auf 1 mg lösliche organische Fraktion bezogen (Claxton et al. 1992). In dieser Arbeit wurde nicht so vorgegangen, da die Ergebnisse verfälscht dargestellt worden wären. Da der Anteil der löslichen organischen Fraktionen bei den FAME wesentlich höher waren, als die des fossilen DK, hätte der Bezug auf die LOF niedrigere Mutagenität vorgetäuscht (Bünger et al. 2000). Um eine der Wirklichkeit entsprechende Bezugsgröße zu erhalten, wurden die Rückmutationen auf die Testzyklen bezogen, da die Dauer des Motorbetriebs für alle Kraftstoffe exakt identisch war.

4.1 Auswirkungen der Anzahl an mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf die Mutagenität von FAME-Abgasen

Dass die DME von FAME eine geringere Mutagenität als DK-Abgase aufweisen, wurde in vorhergehenden Studien ausgiebig untersucht und bestätigt (Bünger et al. 1998, Krahl et al. 1996a, Krahl et al. 1996b, Bagley et al. 1998, Bünger et al. 2000). Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob DME der FAME mit einem höheren Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren stärker mutagen sind als DME der FAME mit weniger mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Die im Ames-Test gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass eine Einstufung der FAME hinsichtlich der Mutagenität ihrer DME sowohl bei den Kondensaten, als auch bei den Partikulaten im Stamm TA98 sowohl mit, als auch ohne enzymatische Aktivierung möglich ist. Die

Reihung der verwendeten FAME bezogen auf die mutagene Wirkung ihrer DME ergibt folgende Abfolge: PME < RME < LME (Tabellen 4 und 5).

Die DME von PME wirken am wenigsten mutagen; PME hat einen prozentualen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren von 10,2%, darunter einen Anteil an der dreifach ungesättigten Linolensäure von 0,2%. Der Unterschied der Mutagenität der DME von RME verglichen mit der Mutagenität der DME von PME ist signifikant. RME hat einen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren von 29% und einen Gehalt an Linolensäure von 9%. Beide Anteile der mehrfach und dreifach ungesättigten Fettsäuren von RME sind höher als die Anteile von PME. Die DME von LME sind von den drei getesteten DME der FAME am stärksten mutagen. LME weist einen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren von 72% und einen Anteil an Linolensäure von 58% auf. Es zeigt sich, dass sowohl der prozentuale Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren als auch der Anteil der am stärksten (dreifach) ungesättigten Fettsäure Linolensäure ausschlaggebend für die Höhe der Mutagenität sein kann.

TA98 -S9	PME	RME	LME
Muta ± SD	51 ± 8	94 ± 14	133 ± 12
mehrf. unges. FS	10,2%	29%	72%
Linolensäure	0,2 %	9%	58%

Tabelle 4: Auflistung der Mutationen der Kondensate und des prozentualen Anteils an mehrfach ungesättigten Fettsäuren der FAME

TA98 -S9	PME	RME	LME
Muta ± SD	41 ± 10	68 ± 6	95 ± 7
mehrf. unges. FS	10,2%	29%	72%
Linolensäure	0,2 %	9%	58%

Tabelle 5: Auflistung der Mutationen der Partikulate und des prozentualen Anteils an mehrfach ungesättigten Fettsäuren der FAME

Bünger et al. verzeichneten im Jahr 2000 ähnliche Ergebnisse. Sie untersuchten die Mutagenität der DME von RME, SME, DK und LS-DK in unterschiedlichen Laststufen des Motors. Es wurde ein luftgekühlter Einzylinder Viertakt Dieselmotor (Farymann 18 D, 4,2 kW) verwendet. Der Motor lief in einem stationären Fünf-Stufen-Test, der die Belastungen eines normalen Landwirtschaftstraktors simulierte. Die Ergebnisse zeigten, dass die DME der FAME weniger mutagen waren als die DME des DK. Innerhalb der FAME waren die DME von RME geringer mutagen als die von SME (Bünger et al. 2000). SME hat mit 6,6% verglichen zu RME mit 9% zwar einen etwas niedrigeren prozentualen Anteil der Zusammensetzung an Linolensäure, aber mit 60,5% (SME) einen deutlich höheren Gesamtanteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (RME besitzt 29% mehrfach ungesättigte Fettsäuren). Folglich zeichnete sich bei Bünger et al. dieselbe Tendenz einer höheren Mutagenität der DME der FAME mit steigendem Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ab, wie in den Ergebnissen dieser Studie.

Wie in früheren Studien ist auch hier zu beobachten, dass die mutagene Wirkung der DME ohne metabolische Aktivierung verglichen zur enzymatischen Aktivierung durch den S9-Mix sowohl bei den FAME als auch den Blends und dem DK höher ist (Huisingh et al. 1978, Clark und Vigil 1980, Claxton 1983, Stalder et al. 1993, Carraro et al. 1997, Bagley et al. 1998, Bünger et al. 1998). Das lässt vermuten, dass genügend direkte Mutagene wie Nitro-PAK in den Extrakten sind, die nicht erst noch aktiviert werden müssen. Zusätzlich wird von den meisten Autoren angenommen, dass der S9-Mix durch seinen Proteingehalt aktive Mutagene bindet und dadurch das mutagene Potential der Kondensate bzw. Partikulate eines Kraftstoffs verringert (Bünger et al. 1998). Auf diese Weise werden unter Umständen Mutagene, inaktiviert. Möglicherweise werden auch Mutagene durch im S9-Mix befindliche Enzyme, sog. mischfunktionelle Oxidasen, inaktiviert (Clark und Virgil 1980, Wang und Wei 1981, Wang et al. 1981).

4.2 Mutagenität der Kondensate im Vergleich zu den Partikulaten

Der Vergleich der Kondensate mit den Partikulaten ergibt eine höhere Mutagenität für die Kondensate. Die Ergebnisse früherer Studien ergaben eine höhere

Mutagenität der Partikulate. Es gibt für diesen Effekt noch keine definitive Erklärung, aber eine Hypothese, die plausibel ist. Die verbesserte Qualität der Kraftstoffe und die bessere Motortechnologie führen zu DME mit geringeren Partikelzahlen. So verringert sich die Wahrscheinlichkeit, dass PAK an Partikel binden, da entweder die Angriffsfläche für die PAK zu klein wird, oder zu wenige Partikel vorhanden sind. Es steigt dadurch die Wahrscheinlichkeit, dass PAK im Kondensat abgeschieden werden und dort eine erhöhte Zahl von Mutationen auslösen.

Neuere Studien zeigen, dass die DME der FAME ein steigendes mutagenes Potential gegenüber der des DK haben (Bünger et al. 2007, Krahl et al. 2007). In früheren Studien wurde bereits beschrieben, dass FAME aufgrund höherer Viskosität im Vergleich zu DK einen erhöhten spezifischen Kraftstoffverbrauch haben, da durch die erhöhte Viskosität die Effizienz der Verbrennung herabgesetzt wird (Monyem und Van Gerpen 2001, Ramadhas et al. 2005). Dieser Effekt zeigt sich auch in der Verbrennung von Blends. Je höher der Anteil an beigemischtem FAME ist (ab einem Wert > 50%), desto schwerer sind die Blends zu verbrennen und desto mehr steigt der spezifische Kraftstoffverbrauch. Zusätzlich steigt der Wert der PM. Dies wird von Liu et al. ebenso auf die erschwerte Verbrennung von FAME aufgrund ihrer höheren Viskosität gegenüber DK zurückgeführt (Liu et al. 2008). Eine andere Hypothese ist, dass die für die Studien verwendeten Motoren oft auf die Verbrennung von DK ausgelegt sind. Folglich ist eine bestmögliche Verbrennung von FAME kaum zu erreichen und es entstehen vermehrt Partikel (Munack et al. 2008). Weiterhin wird angenommen, dass FAME bei der Verbrennung bzw. der Zersetzung im Motor zu sieden beginnen und hierbei mutagene Produkte entstehen (Munack et al. 2008).

4.3 Einfluss der Oxidationsstabilität

Fang und McCormick publizierten 2006, dass bei der Oxidation von FAME Oligomere entstehen können, die ausfallen und im Motor zu schlechterer Verbrennung führen.

Das Ausfallen von Oligomeren während der Oxidation von FAME entsteht auf zwei Wegen, die als Ausgangsstoff Peroxide haben. Peroxide entstehen in der Initialphase der Oxidation. Diese Peroxide können in Aldehyde, Ketone und Säuren zerfallen. Diese drei entstandenen Produkte können in einer Aldol-Reaktion

Oligomere bilden. Zusätzlich können Peroxide mit Fettsäureketten reagieren und Dimere und höhere Oligomere bilden.

Dieses Verhalten war insbesondere bei Blends zu beobachten. Bei einer Beimischung von 5% FAME zu DK (B5) war die Konzentration an FAME zu gering, um Oligomere zu bilden. Bei einer Beimischung von 50% FAME (B50) war die flüssige Mischung polar genug, um die entstandenen Oligomere in der Lösung zu halten. Der Bereich von B20-B30 erwies sich als derjenige, der am meisten Oligomere erzeugte. In diesem Bereich waren die Konzentration der entstandenen Oligomere groß und die Polarität der Lösung niedrig genug, dass die entstehenden Oligomere ausfallen konnten (Fang und McCormick 2006). Büniger et al. erzielten dazu passende Ergebnisse, als sie Blends aus DK und RME untersuchten. In dieser Versuchsreihe lieferte B20 höheres mutagenes Potential als reiner DK oder reiner RME. Sie stellten die Hypothese auf, dass die Oligomere, die bei der Oxidation der Blends (v.a. bei B20) entstehen, durch ihren höheren Siedepunkt schlechter verbrannt werden und dadurch stärkere mutagene Effekte produzieren (Büniger et al. 2009). Zu derselben Schlussfolgerung kamen Munack et al. bereits 2008.

In dieser Studie wurden die mutagenen Potentiale verschiedener FAME und ihrer Blends in ihrer ungealterten Form mit der oxidierten Form verglichen. Bei den Partikulaten wurden zwei signifikante Ergebnisse erzielt. Die DME von B20altE2 wies gegenüber den von B20E2 eine signifikant höhere Mutagenität im Stamm TA98 -S9 auf und die DME von B20 waren signifikant mutagener gegenüber den von B20alt im Stamm TA100 -S9. Hier lässt sich aber trotz der signifikanten Unterschiede als Ergebnis kein einheitlicher Trend verzeichnen, da die DME in der oxidierten Form nicht durchgehend signifikant mutagener gegenüber denen in der nicht oxidierten Form sind. Zusätzlich liegt immer nur ein signifikanter Unterschied als Ergebnis aus einem Teststamm vor. Somit finden sich keine konkordanten Werte der Teststämme, die auf ein einheitliches Verhalten der Mutagenität hinweisen. Die Ergebnisse lassen eher vermuten, dass sich bei einer Oxidation die von Fang und McCormick sowie Büniger et al. beschriebenen Oligomere zwar bilden, diese aber wahrscheinlich nicht zu einer schlechteren Verbrennung führen und daher auch keine höhere Mutagenität der Abgase des oxidierten Kraftstoffes verursachen. Allerdings ist dies möglicherweise auch von der verwendeten Motortechnologie abhängig (Munack et al. 2008). Außerdem ist auch noch die Dauer der Oxidation zu berücksichtigen. Es

wird angenommen, dass ein merklicher Effekt der Mutagenität erst nach mehreren Monaten eintritt und nicht bereits nach ein paar Wochen, wie bisher angenommen. Bei einem Kraftstoff (B20E2) wurde zusätzlich der Effekt der Alkoholadditivierung mit 2% Ethanol und 2% Butanol getestet. Auf diese Weise sollte eine Homogenisierung des FAME-Anteils durch Sedimentauflösung von oxidativen Abbauprodukten von FAME-Blends bewirkt werden. Nachdem aber keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Mutagenität der Abgase der Blends untereinander verzeichnet wurden, ist anzunehmen, dass die Zugabe von Ethanol nicht die gewünschte Sedimentauflösung von oxidativen Abbauprodukten von FAME-Blends bewirkte und eine Reduktion der Mutagenität der Abgase der Blends deshalb nicht erfolgte.

5. Zusammenfassung

Um die beiden Hypothesen, dass (1) die Anzahl der Doppelbindungen der veresterten Fettsäuren einen Einfluss auf die Mutagenität der DME hat, und (2) dass die Oxidation (künstliche Alterung) verschiedener FAME und Blends höhere Mutagenität der DME bewirkt, zu untersuchen, wurden Abgasproben der folgenden Kraftstoffe verwendet: DK, PME, RME, LME, B20, B20alt, B20E2, B20altE2, RMEalt. Die Abgasproben wurden über Testläufe mit einem Mercedes-Benz OM 906 Euro-III-Motor, der im ESC Testzyklus betrieben wurde, gewonnen. Die Mutagenität der Abgasproben wurde mittels des Ames-Tests untersucht. Sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrollen bestätigten, dass die Reagenzien und Teststämme für die Versuche geeignet waren.

Die Ergebnisse zeigten, dass sich die unter Punkt 1.5.1 (S. 17) beschriebene Hypothese, dass die Anzahl der Doppelbindungen der veresterten Fettsäuren einen Einfluss auf die Mutagenität der DME hat, bestätigte. Sowohl bei den Kondensaten, als auch den Partikulaten konnte gezeigt werden, dass die DME der FAME mit der geringeren Anzahl an mehrfach ungesättigten Fettsäuren signifikant geringer mutagen waren, als die DME der FAME mit der höheren Anzahl an mehrfach

ungesättigten Fettsäuren. So ergab sich eine Reihenfolge der FAME mit aufsteigender Mutagenität ihrer DME: PME < RME < LME.

Dieses Ergebnis war vor allem bei den Kondensaten in beiden Teststämmen (TA98, TA100) mit als auch ohne metabolische Aktivierung und bei den Partikulaten im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung zu sehen.

Die zweite Hypothese, dass die Oxidation (künstliche Alterung) verschiedener FAME und Blends höhere Mutagenität der DME bewirkt, wurde widerlegt. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden neben FAME (RME, RMEalt) folgende Blends verwendet: B20, B20alt, B20E2, B20altE2. Es konnten zwei signifikante Unterschiede erzielt werden, die jedoch für einen Beweis nicht ausreichten. Zusätzlich traten die signifikanten Unterschiede nicht im selben Teststamm auf und die Abgase der gealterten Form waren nicht durchgängig mutagener als die Abgase der nicht gealterten Form. Der Beweis eines signifikanten Unterschiedes, dass die Oxidation von FAME höhere Mutagenität der DME der dadurch gealterten FAME hervorruft, war daher nicht möglich. Weiterhin wurde ein Blend mit 2% Ethanol und 2% Butanol verschnitten. Der erhoffte Effekt der Alkoholadditivierung, eine Homogenisierung des FAME-Anteils durch Sedimentauflösung von oxidativen Abbauprodukten von FAME-Blends zu bewirken, blieb ebenso aus.

Bei der Betrachtung der GPM zeigte sich, dass die FAME nicht die höchste GPM, aber die größte LOF besitzen. Dies spiegelte sich in der Mutagenität der DME der FAME verglichen mit denen des DK wieder. DK hatte zwar einen höheren Wert der GPM, aber einen kleineren Anteil der LOF. Die Abgase der FAME zeigten sich tendenziell mutagener als die des DK, jedoch ohne signifikante Ergebnisse. Dieser Effekt war v.a. bei den Kondensaten zu sehen. Die erhöhte Mutagenität der FAME-Abgase gegenüber den DK-Abgasen lässt sich anhand verschiedener Hypothesen erklären, die aber noch nicht ausreichend untersucht oder bewiesen sind.

6. Literaturverzeichnis

Ames BN, Lee FD, Durston WE (1973): An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 70, 782-786

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

Attfield MD, Schleiff PL, Lubin JH, Blair AE, Steward PA, Vermeulen R, Coble JB, Silverman DT (2012): The Diesel Exhaust in Miners Study: A Cohort Mortality Study With Emphasis on Lung Cancer. *J Natl Cancer Inst* 104, 1-15

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

Belisario MA, Buonocore V, De Marinis E, De Lorenzo F (1984): Biological availability of mutagenic compounds adsorbed onto diesel exhaust particulate. *Mutat Res* 135, 1-9

Brauer M, Hoek G, Smit HA, de Jongste JC, Gerritsen J, Postma DS, Kerkhof M, Brunekreef B (2007): Air pollution and development of asthma, allergy and infections in a birth cohort. *Eur Respir J* 5, 879-888

Brooks AL, Wolff RK, Royer RE, Clark CR, Sanchez A, McClellan RO: Biological availability of mutagenic chemicals associated with diesel exhaust particles; in: *Health Effects of Diesel Engine Emissions*; hrsg. V. Pepelko WE, Danner RM, Clarke NA; EPA, Cincinnati, USA 1980, 9-80

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

Bünger J, Müller MM, Krahl J, Baum K, Weigel A, Hallier E, Schulz TG (2000): Mutagenicity of diesel exhaust particles from two fossil and two plant oil fuels. *Mutagenesis* 15, 391-397

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

Bünger J, Krahl J, Munack A (2009): Health hazards from biodiesel blends? *Inform* 9/2009, 560-562

Bünger J, Krahl J, Schröder O, Schmidt L, Westphal GA (2012): Potential hazards associated with combustion of bio-derived versus petroleum-derived diesel fuel. *Crit Rev Toxicol* 42, 732-750

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

Clark CR, Virgil CL (1980): Influence of rat lung and liver homogenates on the mutagenicity of diesel exhaust particulate extracts. *Toxicol Appl Pharmacol* 56, 100-115

Claxton LD (1983): Characterization of automotive emissions by bacterial mutagenesis bioassay: a review. *Environ Mutagen* 5, 609-631

Claxton LD, Barnes HM (1981): The mutagenicity of diesel-exhaust particle extracts collected under smoke-chamber conditions using the *Salmonella typhimurium* test system. *Mutat Res* 88, 255-272

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

Correa SM, Arbilla G (2008): Carbonyl emissions in diesel and biodiesel exhaust. *Atmos Environ* 42, 769-775

DFG - Deutsche Forschungsgemeinschaft (1987): Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten: Dieselmotoremissionen. Wiley-VCH, Weinheim 1987

Di Y, Cheung CS, Huang Z (2008): Experimental investigation on regulated and unregulated emissions of a diesel engine fueled with ultra-low sulfur diesel fuel blended with biodiesel from waste cooking oil. *Sci Total Environ* 407, 835-846

Dockery DW, Pope CA III, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG, Speizer FE (1993): An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med* 329, 1753-1759

Durbin TD, Norbeck JM (2002): Effects of Biodiesel Blends and Arco EC-Diesel on Emissions from Light Heavy-Duty Diesel Vehicles. *Environ Sci Technol* 36, 1686-1691

Fang HL, McCormick RL (2006): Spectroscopic Study of Biodiesel Degradation Pathways. Society of Automotive Engineers, Warrendale, PA, USA, SAE Tec Pap Ser No 2006-01-3300, doi:10.4271/2006-01-3300, 1-9

Garshick E, Schenker MB, Munoz A, 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

Graboski MS, McCormick RL (1998): Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines. *Prog Energy Combust Sci* 24, 125-163

HEI - Health Effects Institute (1995): Diesel exhaust: A critical analysis of emissions, exposure, and health effects. A special report of the institute's diesel working group. Cambridge, MA, USA

Heinrich J, Wichmann HE (2004): Traffic related pollutants in Europe and their effect on allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4, 341-348

Heinrich U, Peters L, Funcke W, Pott F, Mohr U, Stöber W: Investigation of toxic and carcinogenic effects of diesel exhaust in long-term inhalation exposure of rodents. in: Toxicological effects of emissions from diesel engines: proceedings of the Environmental Protection Agency diesel emissions symposium; October 1981; (Developments in toxicology and environmental science Vol. 10) Elsevier Biomedical, Lewtas J, ed. New York, Raleigh, NC 1982, 225-242

Heinrich U, Muhle H, Takenaka S, Ernst H, Fuhst R, Mohr U, Pott F, Stöber W (1986): 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

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

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

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

IARC - International Agency for Research on Cancer (1989): IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 46, 1-458

IGS - Informationssystem Gefährliche Stoffe-Stoffliste, IGS-Stoffliste 09/2008
http://igsvtu.lua.nrw.de/igs_portal/oberfl/portal/formHtml/Datei.app?USER_ID=0&DATEI=login_maske.vm&P_IGS_HOME=/oberfl/portal&DATENBESTAND=PORTAL&sprache=de&oberfl=portal&P_PORTAL=1&INIT=1&LOGDATEI=login.cry

Kittleson DB (1998): Engines and Nanoparticles – a review J Aerosol Sci 29(5), 575-588

Krahl J (2002): Rapsölmethylester in dieselmotorischer Verbrennung – Emissionen, Umwelteffekte, Optimierungspotenziale. Landbauforschung Völknerode, Sonderheft 233, 1-190

Krahl J, Munack A, Bahadir M, Schumacher L, Elser N (1996a): Review: Utilization of Rapeseed Oil, Rapeseed Oil Methyl Ester or Diesel Fuel: Exhaust Gas Emissions and Estimation of Environmental Effects, Society of Automotive Engineers, SAE Tec Pap Ser No 962096, 1996, doi:10.4271/962096

Krahl J, Seidel H, Bünger J: Exhaust gas emissions of rapeseed oil based fuels and effects on environment and human health; in: Chartier P, Ferrero GL, Henius UM, Hultberg S, Sachau J, Wiinblad (Eds.) M, Proceedings of the 9th European Bioenergy Conference, Elsevier, Oxford 1996b, 1657-1661

Krahl J, Baum K, Hackbarth U, Jeberien HE, Munack A, Schütt C, Schröder O, Walter N, Bünger J, Müller MM (2001): Gaseous compounds, ozone precursors, particle number and size distributions, and mutagenic effects due to biodiesel. Transactions ASAE 44, 179-191

Krahl J, Munack A, Schröder O, Stein H, Bünger J (2003): Influence of biodiesel and different designed diesel fuels on the exhaust gas emissions and health effects. SAE Tec Pap Ser No 2003-01-0233, doi:10.4271/2003-01-3199

Krahl J, Munack A, Schröder O, Stein H, Herbst L, Kaufmann A, Bünge J (2005): The Influence of fuel design on the exhaust gas emissions and health effects. SAE Tec Pap Ser No 2005-01-3772. doi:10.4271/2005-01-3772

Krahl J, Munack A, Grope N, Ruschel Y, Schröder O, Bünge 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(5), 417-426

Krahl J, Knothe G, Munack A, Ruschel Y, Schröder O, Hallier E, Westphal G, Bünge 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

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

Lapuerta M, Armas O, Jose RF (2008): Effect of biodiesel fuels on diesel engine emission. Prog Energ Combust 34, 198-223

Lewtas J (1983): Evaluation of the mutagenicity and carcinogenicity of motor vehicle emissions in short-term bioassays. Environ Health Perspect 47, 141-152

Lewtas J (2007): Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. 1. Mutat Res 636(1-3), 95-133

Liu Y-Y, Lin T-C, Wang Y-J, Ho W-L (2008): Biological toxicities of emissions from an unmodified engine fueled with diesel and biodiesel blend. J Environ Sci Health Part A 43, 1735-1743

Maron DM, Ames BN (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat Res 113, 173-215

McDonald JD, Barr EB, White RK (2004a): Design, characterization, and evaluation of a small-scale diesel exhaust exposure system. *Aerosol Sci Technol* 38, 62-78

McDonald JD, Barr EB, White RK, Chow JC, Schauer JJ, Zielinska B, Grosjean E (2004b): Generation and characterization of four dilutions of diesel engine exhaust for a subchronic inhalation study. *Environ Sci Technol* 38, 2513-2522

Meng Z, Dabdub D, Seinfeld JH (1997): Chemical coupling between atmospheric ozone and particulate matter. *Science* 277, 116-119

Mills NL, Miller MR, Lucking AJ, Beveridge J, Flint L, Boere AJF, Fokkens PH, Boon NA, Sandstrom T, Blomberg A et al. (2011): Combustion-derived nanoparticulate induces the adverse effects of diesel exhaust inhalation. *Eur Heart J* 32, 2660-2671

Monyem AH, Van Gerpen J (2001): The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions. *Biomass Bioenergy* 20(4), 317-325

Morgenstern V, Zutavern A, Cyrys J, Brockow I, Koletzko S, Krämer U, Behrendt H, Herbarth O, von Berg A, Bauer CP (2008): Atopic diseases, allergic sensitization, and exposure to traffic-related air pollution in children. *Am J Respir Crit Care Med* 177, 1331-1337

Munack A, Krahl J, Bünger J, Ruschel Y, Schröder O (2008): Exhaust gas emissions and mutagenic effects of modern diesel fuels, GTL, biodiesel, and biodiesel blends. International Conference Agricultural Engineering : 37. Brazilian Congress of Agricultural Engineering; International Livestock Environment Symposium - ILES VIII; August 31st to September 4th, 2008, Iguassu Falls – Brazil

MWV - Mineralölwirtschaftsverband, Amtliche Mineralöldaten 2011, Tabelle 9
http://www.bafa.de/bafa/de/energie/mineraloel_rohoel/amtliche_mineraloeldaten/2011/index.html

Nightingale JA, Maggs R, Cullinan P, Donnelly LE, Rogers DF, Kinnersley R, Fan Chung K, Barnes PJ, Ashmore M, Newman-Taylor A (2000): Airway inflammation after controlled exposure to diesel exhaust particulates. *Am J Respir Crit Care Med* 162, 161-166

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

Nordenhall C, Pourazar J, Blomberg A, Levin JO, Sandström T, Adelroth E (2000): Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum. *Eur Respir J* 15, 1046-1051

Oberdörster G (2001): Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health* 74, 1-8

Ohe T (1984): Mutagenicity of photochemical reaction products of polycyclic aromatic hydrocarbons with nitrite. *Sci Total Environ* 39, 161-175

Olsson AC, Gustavsson P, Kromhout H, Peters S, Vermeulen R, Brüske I, Pesch B, Siemiatycki J, Pintos J, Brüning T (2011): Exposure to diesel motor exhaust and lung cancer risk in a pooled analysis from case-control studies in Europe and Canada. *Am J Respir Crit Care Med* 183(7), 941-948

Pederson TC, Siak JS (1981): The role of nitroarene compounds in the direct-acting mutagenicity of diesel particle extracts. *J Appl Toxicol* 1, 54-60

Peng CY, Yang HH, Lan CH, Chien SM (2008): Effect of the biodiesel blend fuel on aldehyde emissions from diesel engine exhaust. *Atmos Environ* 42, 906-915

Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J (1997): Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 1376-1383

Pope CA III, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE, Heath CW (1995): Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am J Respir Crit Care Med* 151, 669-674

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

Ramadhas AS, Muraleedharan C, Jayaraj S (2005): Performance and emission evaluation of a diesel engine fueled with methyl ester of rubber seed oil. *Renew Energy* 30(12), 1789-1800

Rannug U, Sundvall A, Westerholm R, Alsberg T, Stenberg U (1983): Some aspects of mutagenicity testing of the particulate phase and the gas phase of diluted and undiluted automobile exhaust. *Environ Sci Res* 27, 3-16

Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandström T, Holgate ST, Frew A (1999): Acute inflammatory response in the airways and peripheral blood after short term exposure to diesel exhaust in healthy volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 159, 702-709

Samet JM, Zeger SL, Birhane K: The association of mortality and particulate air pollution. in: *Particulate air pollution and daily mortality: Replication and validation of selected studies, the Phase I. A report of the particle epidemiology evaluation project.* HEI, Cambridge, USA 1995

Scheepers PTJ, Bos RP (1992a): Combustion of diesel fuel from a toxicological perspective, I. Origin of incomplete combustion products. *Int Arch Occup Environ Health* 64, 149-161

Scheepers PTJ, Bos RP (1992b): Combustion of diesel fuel from a toxicological perspective, II. Toxicity. *Int Arch Occup Environ Health* 64, 163-177

Schröder O, Krahl J, Munack A, Bünger J (1999): Environmental and health effects caused by the use of biodiesel; in: Gasoline Direct Injection and Diesel Aftertreatment – SP-1476; hrsg. v. Society of Automotive Engineers, Warrendale, USA 1999, 89-99

Schwartz J (1993): Particulate air pollution and chronic respiratory disease. Environ Res 62, 7-13

Schwartz J (2000): Daily deaths are associated with combustion particles rather than SO₂ in Philadelphia. Occup Environ Med 57, 692-697

Schwartz J, Neas LM (2000): Fine particles are more strongly associated than coarse particles with acute respiratory health effects in school children. Epidemiology 11, 6-10

Seaton A, MacNee W, Donaldson K, Godden D (1995): Particulate air pollution and acute health effects. Lancet 345 (8943), 176-178

Siak JS, Chan JL, Lee PS (1981): Diesel particulate extracts in bacterial test systems. Environ Int 5, 243-248

Silverman DT, Samanic CM, Lubin JH, Blair AE, Steward 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, 1-14

Sjögren M, Li H, Rannug U, Westerholm R (1995): A multivariate statistical analysis of chemical composition and physical characteristics of ten diesel fuels. Fuel 74, 983-989

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

Steenland NK, Silverman DT, Hornung RW (1990): Case-control study of lung cancer and truck driving in the teamster union. *Am J Public Health* 80, 670-674

Stenfors N, Nordenhäll C, Salvi SS, Mudway I, Söderberg M, Blomberg A, Helleday R, Levin JO, Holgate ST, Kelly FJ (2004): Different airway inflammatory response in asthmatic and healthy humans exposed to diesel. *Eur Respir J* 23, 82-86

Stump F, Bradow R, Ray W, Dropkin D, Zwedinger R, Sigsby J, Snow R (1982): Trapping gaseous hydrocarbons for mutagenic testing; SAE Tec Pap Ser No 820776, doi:10.4271/820776

Turrio-Baldassarri L, Battistelli CL, Conti L, Crebelli R, Berardis BD, Iamiceli AL, Gambino M, Iannaccone S (2003): Emission comparison of urban bus engine fueled with diesel oil and 'biodiesel' blend. *Sci Total Environ* 327, 146-162

U.S. EPA: A comprehensive analysis of biodiesel impacts on exhaust emissions. EPA420-P-02-001. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency 2002a

U.S. EPA (2002b): Health assessment document for diesel engine exhaust. *Federal Register* 2002, Vol. 67, No. 170

Wang YY, Wei ET (1981): Ability of liver homogenates and proteins to reduce the mutagenic effect of diesel exhaust particulates, in: Waters MD, Nesnow S, Huisingh JL, Sandhu SS, Claxton LD (Eds.): *Application of short-term bioassay in the fractionation and analysis of complex environmental mixtures*, Plenum Press 1979, New York, 359-368

Wang YY, Rappaport SM, Sawyer RF, Talcott RE, Wei ET (1978): Direct-acting mutagens in automobile exhaust. *Cancer Lett* 5, 39-47

Wang YY, Talcott RE, Seid DA, Wei EJ (1981): Antimutagenic properties of liver homogenate protein and glutathione on diesel exhaust particulates, *Cancer Lett.* 11, 265-275

Westerholm R, Christensen A (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

Wichmann HE (2007): Diesel exhaust particles. *Inhal Toxicol* 19, Suppl. 1, 241-244

Winer AM, Busby WF: Atmospheric transport and transformation of diesel emissions; in: Diesel exhaust: A critical analysis of emissions, exposure, and health effects; hrsg. V. Health Effects Institute, Cambridge, USA 1995, 83-105

Zervas E (2008): Regulated and non-regulated pollutants emitted from two aliphatic and a commercial diesel fuel. *Fuel* 87, 1141-1147

Zou L, Atkinson S (2003): Characterising vehicle emissions from the burning of biodiesel made from vegetable oil. *Environ Tec* 24, 1253-1260

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.

Weiterhin möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Jürgen Bünger danken, der mir eine mehr als umfassende Betreuung bot. Ich konnte jederzeit seine Hilfe in Anspruch nehmen. Er überprüfte meine Anliegen in sehr detaillierter Weise. Durch ihn bekam ich viele Anregungen und Hilfestellungen für diese Arbeit. Für seine große Bereitschaft bin ich ihm sehr dankbar.

Des Weiteren gilt mein Dank all jenen, die außerhalb des Labors diese Arbeit ermöglichten. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle die beiden Dipl.-Chem. Olaf Schröder und Jens Schaak, die mir zu vielen meiner Fragen umgehend eine Antwort gaben, mir detailliert den Ablauf der Probengewinnung im Johann Heinrich von Thünen-Institut in Braunschweig erklärten, den Testbestand zeigten und ausführlich meine Fragen zur Abgasuntersuchung beantworteten.

Lebenslauf

Mein Name ist Markus, Friedrich, Emanuel Trißler. Ich wurde am 05. Juni 1985 als zweitgeborenes Kind von Dr. med. Friedrich Trißler und Mechtild Trißler (geb. Söffler) in Neustadt an der Aisch geboren. Zusammen mit meinen Eltern und meinem älteren Bruder Johannes (*1983) wuchs ich in Sugenheim (Bayern) auf.

1992 bis 1996 besuchte ich die Grundschule Sugenheim. Die Allgemeine Hochschulreife erwarb ich am Gymnasium Scheinfeld im Juni 2005. Anschließend absolvierte ich die für das Studium der Humanmedizin nötigen Pflegepraktika. Im April 2006 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen. Den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung absolvierte ich im Sommer 2008 erfolgreich. Die Tertiale des Praktischen Jahres absolvierte ich am Städtischen Klinikum in Wolfenbüttel (Innere Medizin), am Royal London Hospital in London (Chirurgie), am Pius-Hospital in Oldenburg (Chirurgie), sowie an der Klinik in Herzberg (Anästhesie). Das Studium werde ich voraussichtlich im Frühjahr 2013 mit Bestehen des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung abschließen.