



Umweltinstitut *Komplettlösungen für Ihren Ertrag*

ERGEBNISBERICHT

Thema: Prüfung der Mutagenität von Inhaltstoffen partikulärer Abgasbestandteile im Ames-Test

Auftraggeber: **bioltec evolv-ram GmbH**
Guerickestrasse 1
93053 Regensburg

Projekt-Nr.: 630094

Verfasser: Hansjürgen Krist, Helgard Fischer, Dr. Klaus Hoppenheidt

Datum: 25.07.07

Berichtserstellung:

bifa Umweltinstitut
Am Mittleren Moos 46
D-86167 Augsburg
Tel.: 0821/7000-0
Fax: 0821/7000-100

1 Zusammenfassung

Die während eines European Stationary Cycle 13 Stufentest-Verfahrens (ESC) mit einem EURO 5 Fahrzeug (DAF-CF 85) auf einem Rollenprüfstand aus dem Verdünnungskanal gewonnen Filterproben wurden mit Dichlormethan extrahiert.

In Relation zu mutagen wirkenden Reinchemikalien (Positivkontrollen) – mit Ausnahme von Methylmethansulfonat – erwiesen sich die untersuchten Extraktinhaltstoffe aller drei Proben im Ames-Test mit den Prüfstämmen TA98 und TA100 als vergleichsweise wenig wirksam (s. Tabelle 1). Bezogen auf die extrahierte Rußmenge war die Anzahl an Revertanten bei den Abgasruß-Extrakten aus Pflanzenöl mit bioltec-Umrüstung um den Faktor 2 bis 3 niedriger als bei den Diesel-Rußextrakten.

Tabelle 1: Ermittelte Anzahlen an zusätzlichen Revertanten bezogen auf ein Milligramm der Prüfsubstanzen¹

Netto-Revertanten pro mg	Positivkontrolle	P-Diesel Dieselruß	P-bioltec Rapsöl/Dieselruß mit bioltec
TA98 ohne S9	$1,5 \times 10^8^*$	220	135
TA98 mit S9	$2,2 \times 10^5^{**}$	134	n.n.
TA100 ohne S9	450 ^{***}	660	253
TA100 mit S9	$1,3 \times 10^5^{**}$	770	284

* = 3-NBA ; ** = 2-AF; *** = MMS

Im Unterschied hierzu hatte die FAL einen Faktor von 10 bis 30 der mutagenen Wirkung zwischen Dieselbetrieb und Rapsölbetrieb bei einem Motor anderer Bauart und identischer Fahrweise festgestellt (FAL, 2006; FAL, 2007; vgl. Tabelle 2). Dieser Unterschied hat sich bei den hier untersuchten Probenextrakten und beim Einsatz der bioltec-Umrüstungstechnologie nicht bestätigt. Allerdings wurde von der FAL ein Motor genutzt, der nicht an die eingesetzten Kraftstoffe angepasst gewesen sein soll. Zudem ist nicht bekannt, in wie weit der von der FAL eingesetzte Treibstoff der DIN 51 605 entsprach. Weiterhin ist nicht beschrieben, ob eine Umrüsttechnologie für Rapsölbetrieb genutzt wurde. Nähere Angaben der FAL zu den Versuchsbedingungen und den Motoreinstellungen könnten zur wissenschaftlichen Einordnung dieser Ergebnisse hilfreich sein.

Die mutagene Wirkung des Probenextraktes P-BIOLTEC lag teilweise an der unteren Nachweisgrenze. Ein Grund ist sicherlich die relativ geringe absolute Menge an Ruß, mit denen die Filter beladen waren. Bisherige Erfahrungen des bifa zeigten, dass erst ab einer Rußmenge von ca. 20 mg aufwärts deutlich signifikante mutagene Wirkungen bei EURO3 Motoren feststellbar waren (Probenahme aus dem Verdünnungskanal).

Die visuelle Beurteilung der DMSO Extrakte zeigt bei den Extrakten P-DIESEL (beide Filter wurden getrennt extrahiert) eine gelbliche Farbe. Der Extrakt der Probe P-BIOLTEC war im Vergleich dazu relativ klar mit einem nur leichten gelblichen Stich (Abbildung 3).

Die auf die Rußmenge bezogenen Ergebnisse der aktuellen Untersuchung stimmten bei der Nutzung von Diesel recht gut mit Literaturangaben überein (Tabelle 2), wobei tendenziell niedrigere mutagene Wirkungen (Faktor 2 bis 6) als von Krahl et al. (2003) für Dieselruß festgestellt wurden. Es ist anzunehmen, dass Varianten der Motortypen, der Motoreinstellungen, der Betriebsbedingungen, der Kraftstofftypen und der Probeentnahmeverbedingungen großen Einfluss auf die stoffliche Qualität der Rußpartikel haben können.

¹ Real können diese Konzentration nicht immer getestet werden, da ab einer bestimmten Konzentration toxische Effekte der Prüfsubstanz überwiegen können. Die in der Tabelle angegebenen Werte sind hochgerechnet auf eine hypothetische Konzentration von 1 mg der entsprechenden Substanz um einen Vergleich verschiedener Substanzen zu ermöglichen. Der rechnerische Wert gibt an, wie viele Revertanten zu erwarten sind, wenn man genügend Agar-Platten mit der real, im tatsächlichen Test maximal eingesetzte Konzentration beaufschlagen würde.

Tabelle 2: Literaturbefunde

	bifa/bioltec Dieselruß	bifa/bioltec Rapsölruß	Dieselruß	Rapsölruß	Quelle
TA 98 ohne S9	$2,20 \times 10^2/\text{mg}$	$1,36 \times 10^2/\text{mg}$	$7 \times 10^2/\text{mg}$	--	Krahl et al., 2003
			$4-13 \times 10^2/\text{mg}$	--	Nylund et al., 2004
TA 98 mit S9	$1,34 \times 10^2/\text{mg}$	$0,91 \times 10^2/\text{mg}$	$6 \times 10^2/\text{mg}$	--	Krahl et al., 2003
			$3-7 \times 10^2/\text{mg}$	--	Nylund et al., 2004

Werte von Krahl et al. (2003) und Nylund et al. (2004) wurden überwiegend aus publizierten Diagrammen abgelesen, so dass kleinere Abweichungen zu den Originalbefunden möglich sind

Zu Rapsölruß konnten keine Angaben bezogen auf die Rußmenge ermittelt werden

Es muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, die Ursachen für die Mehrbefunde der FAL bei Rapsölbetrieb zu ermitteln, da eine Reihe von Einflussgrößen (s.o.) die stoffliche Qualität des Rußes verändern kann.

Die von der bioltec eingebauten Systemkomponenten erwiesen sich in Hinblick auf die festgestellten mutagenen Wirkungen in den Tests als günstig. Die Rußmenge als auch die mutagenen Wirkungen sind beim Betrieb mit variabler Kraftstoffzusammensetzung tendenziell niedriger als bei reinem Dieselbetrieb.

2 Veranlassung

bioltec evolv-ram GmbH (im Folgenden „bioltec“) hat ein System entwickelt, welches bei der Verbrennung von Kraftstoffen in Motoren zur Optimierung des Ausbrands beiträgt. Dies führt vor allem zu Vorteilen beim kombinierten Einsatz von biogenen Treibstoffen wie z.B. Rapsöl (DIN 51 605) und Diesel (DIN EN 590).

Aktuell ist jedoch der Einsatz von Rapsöl in Verbrennungsmotoren in Kritik geraten, da Studien vorliegen, die dem Abgas aus der Verbrennung – hier vor allem den Rußpartikeln – ein erhöhtes mutagenes Potential zusprechen gegenüber dem Abgas aus dieselbetriebenen Motoren.

Zur Überprüfung, ob diese Aussage auch für das von bioltec entwickelte System gilt, wurde bifa von bioltec mit der Durchführung von Amestests an von bioltec beaufschlagten Filterproben beauftragt (Angebot 630094 T01). Eine Probe bestand aus je zwei Filtern, die im Amestest nach der *OECD-Guideline 471* (*Salmonella typhimurium, Reverse Mutation Assay*) in Anlehnung an das Protokoll von Maron u. Ames (1983) untersucht wurden.

3 Untersuchungsgang

3.1 Probenahme von partikulären Abgasbestandteilen

bioltec hat zur Überprüfung ihres Systems Testläufe am PAE-Labor eines marktführenden Mineralölkonzerns durchführen lassen. Ziel war ein Vergleich der Auswirkungen des Emissionsverhaltens eines Motors beim Einsatz verschiedener Treibstoffzusammensetzungen auf einem Rollenprüfstand. Dabei wurden unterschiedliche Lastverhältnisse gemäß des ESC 13 Stufentest-Verfahrens für Verbrennungsmotoren gefahren. Die für den Amestest relevanten Filterproben wurden während der Testläufe aus dem Verdünnungstunnel des Prüfstandes gezogen.

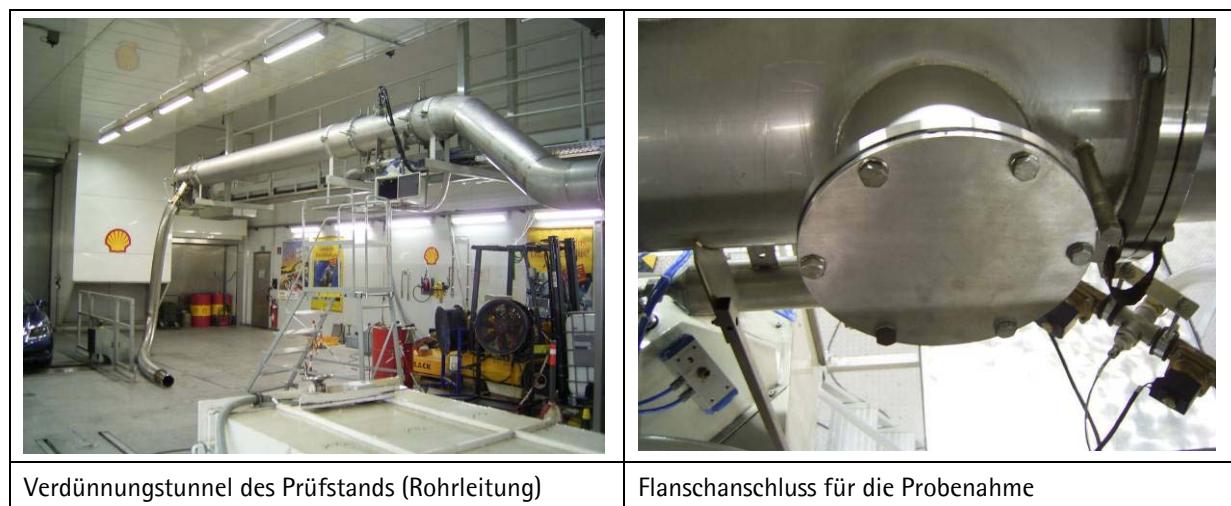


Abbildung 1: Rollenprüfstand des PAE-Labors in Hamburg

Der Amestest erfordert nach den Erfahrungen des bifa bis zu 30 mg Ruß einer Abgasprobe zur Anzeige mutagener Wirkungen. Um derartige Mengen an Rußpartikeln mit einem vertretbaren Aufwand sammeln zu können, wurde die Probenahme mit Hilfe eines vom bifa modifizierten High-Volume-Samplers durchgeführt. Nach Angaben des Prüflabors betrug der Abgasstrom während der Probenahme ca. 30 m³/min; das Probenahmenvolumen 600 L/min. Dadurch konnte das über einen bestimmten Zeitraum beprobtte Abgasvolumen gegenüber der herkömmlichen Probenahmeprozедur ungefähr vervierfacht werden. Die sich dabei einstellende Temperatur im Verdünnungstunnel erreichte maximal 50 °C.

Für die Probenahme wurden Glasfaserfilter (MN 85 / 90 BF; Ø 15 cm; Macherey-Nagel), welche in Dichlormethan vorgereinigt wurden, eingesetzt. Bis zum Eintreffen der Proben wurden diese gekühlt gelagert. Die Proben wurden nach der Messung vom beauftragten PAE-Labor entnommen, getrocknet und per Kurier direkt an bifa zur Untersuchung gesendet.

Die Proben wurden am 01.06.2007 am bifa angeliefert und bis zur Extraktion bei -55 °C eingelagert (Abbildung 2).



Abbildung 2: Beladene Filter nach der Probenahme (li. nach re.: Filter 1, 2, 5 und 7)

Tabelle 3 zeigt die Rußmengen, welche auf den Filtern gesammelt werden konnten. Für alle weiteren Berechnungen wurden diese Werte herangezogen.

Tabelle 3: Rußmengen

	Wägung PAE Labor in mg
Ruß aus Dieselbetrieb	21,48 (10,89 + 10,59)
Ruß aus Kraftstoffmixtest	9,01 (4,26 + 4,41)

3.2 Probenaufbereitung

Die Filter einer Probe wurden in 150 – 200 mL Dichlormethan (Geyer, BAKER ULTRA RESI-ANALYZED) im Soxhlet über 12 h extrahiert ($T_{\text{Heizbad}} = 70 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{Kühler}} = 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Anschließend wurde der Extrakt in einen Glaskolben überführt. Alle verwendeten Geräte (Glaskolben, Messkolben, ...), Materialien (Siedeperlen, Pinzetten, ...) und Arbeitflächen die in direkten Kontakt zu den Proben kommen konnten, wurden mit Dichlormethan vorgereinigt.

Vor dem Eindampfen im Rotationsverdampfer wurden aus dem Extrakt 10 % als Rückstellproben für chemische Analysen entnommen, die gegebenenfalls zur Plausibilitätskontrolle untersucht werden können.

Der restliche Extrakt wurde im Rotationsverdampfer ($T_{\text{Wasserbad}} = 54 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{Kühler}} = 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) auf ca. 5 – 10 mL eingeengt. Das Dichlormethan wurde dann mit hochreinem Stickstoff abgeblasen. Die Menge an Rückstand, die im Glaskolben zurückblieb, besaß eine ölige Konsistenz und war bei allen Proben sichtbar (Beispiel siehe Abbildung 3).



Abbildung 3: Extraktionsrückstand im 250 mL Rundkolben nach dem Abblasen des Dichlormethans

Der Rückstand wurde in 5000 μL hochreinem Dimethylsulfoxid (Merck, Qualitätsstufe pro analysis) rückgelöst und in dieser Form im Ames-Test eingesetzt. Die Filter 1 und 2 (Diesel) wurden getrennt aufgearbeitet. In die Testsysteme gelangten deshalb anstatt 100 μL 200 μL der Probe (je aufgereinigten Filter 100 μL).

3.3 Ames-Test

Im Ames-Test wird die mutagene Wirkung der Extrakte mit Hilfe von Bakterien bestimmt. Testorganismen sind die Mutantenstämme TA98 und TA100 von *Salmonella typhimurium LT2 (HisG)*. Diese sind nicht mehr in der Lage, die lebenswichtige Aminosäure Histidin selbst herzustellen und können so in einem histidinfreien Medium nur dann wachsen, wenn sie durch den Einfluss von mutagenen Substanzen die Fähigkeit zur Bildung von Histidin wiedererlangen (Rückmutation).

Mit den eingesetzten Stämmen werden Punktmutationen erfasst. 2 Stämme kommen deshalb zum Einsatz, da bei Punktmutationen 2 Klassen unterschieden werden müssen – Basenpaarsubstitutionen (Nachweis mit TA100) und Rasterschubmutationen (Nachweis mit TA98).

Die Anzahl der Rückmutationen (Revertanten) ist ein Maß für die Mutagenität. Durch Zugabe von Rattenleberextrakt (S9-Mix) können auch Substanzen erfasst werden, die erst nach einer metabolischen Aktivierung im Sägetierorganismus mutagen sind.

Obwohl sich die Struktur des bakteriellen „Chromosomes“ sehr stark von der viel komplexeren Struktur der Chromosomen von Säugerzellen unterscheidet und der Ames-Test somit nicht bei allen chemischen Verbindungsklassen eine gute Korrelation zwischen Mutagenität und Kanzerogenität aufweist, wird doch mit einer Sensitivität von annähernd 83 % ein kanzerogenes Potential erkannt.

3.3.1 Anzucht der Salmonellen

Die *Salmonella*-Mutantenstämme TA98 und TA100 wurden am Tag vor dem Test von einer Master-Platte in Nährbouillon mit 3,15 % Ampicillin überimpft und über Nacht bei 37 °C angezogen. Nach etwa 14 h Kultivierung bei 37 °C wurden die Teststämme am Morgen des Testtages nochmals in Ampicillin- Nährbouillon überimpft und 3 h bei 37 °C kultiviert, um sicherzustellen, dass sich die *Salmonellen* in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die optische Dichte der in den Tests eingesetzten Stämme bei 660 nm wurde auf ca. 0,75 eingestellt.

3.3.2 Testansatz

Gemäß *OECD-Guideline 471* (*Salmonella typhimurium*, Reverse Mutation Assay) wurde der Ames-Test in Anlehnung an das Protokoll von Maron u. Ames (1983) durchgeführt.

Vom jeweiligen Probenextrakt wurden zunächst durch Verdünnung mit hochreinem DMSO insgesamt 6 Konzentrationsstufen (6,25 %; 12,5 %; 25 %; 33 %; 50 %; 100 %) hergestellt.

In einer ersten Testreihe wurden jeweils 100 µL Probenextrakt bzw. Extraktverdünnung mit 100 µL frischer Bakterienkultur (~ 10⁹ Zellen pro mL), 500 µL Natriumhydrogenphosphat-Puffer und 2,0 mL Softagar als Topagar auf einer Petrischale mit histidinfreiem Minimalmedium inkubiert. Der Softagar enthielt gemäß der Testvorschrift auch eine geringe Menge Histidin, um den *Salmonellen* einige wenige Zellteilungen zu ermöglichen. Hintergrund ist, dass viele Mutagene erst während einer Wachstumsphase eine Wirkung erzielen können. In einer zweiten Testreihe wurde der Topagar zusätzlich mit 500 µL 4%igem S9-Mix versetzt (Abbildung 4).²

Nach 48 h Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Kolonien gezählt, die durch reverse Mutation zum Wildtyp auf den Platten wachsen konnten. Durch den Vergleich mit den Negativ-Kontrollen (dotiert mit jeweils 100 µL bzw. 200 µL hochreinem DMSO) wurde der Anteil an Revertanten bestimmt, der nicht spontan auftrat, sondern durch die Testsubstanzen verursacht wurde.

Als Positivkontrollen kamen die Mutagene *Methylmethansulfonat* und *3-Nitrobenzanthron* (im Test ohne metabolische Aktivierung durch S9-Mix) bzw. 2-Aminofluoren (im Test mit S9-Mix) zum Einsatz.

² Hinweis: Eine Variante der *OECD-Guideline 471* sieht eine Präinkubation der Prüfsubstanzen mit den Prüfkeimen vor. Durch kann bei einigen Stoffen die Sensitivität des Test erhöht werden. Die Untersuchungen der FAL wurden jedoch ohne Präinkubation durchgeführt, so dass auch bei dieser Untersuchung der konventionelle Arbeitsgang beibehalten wurde.

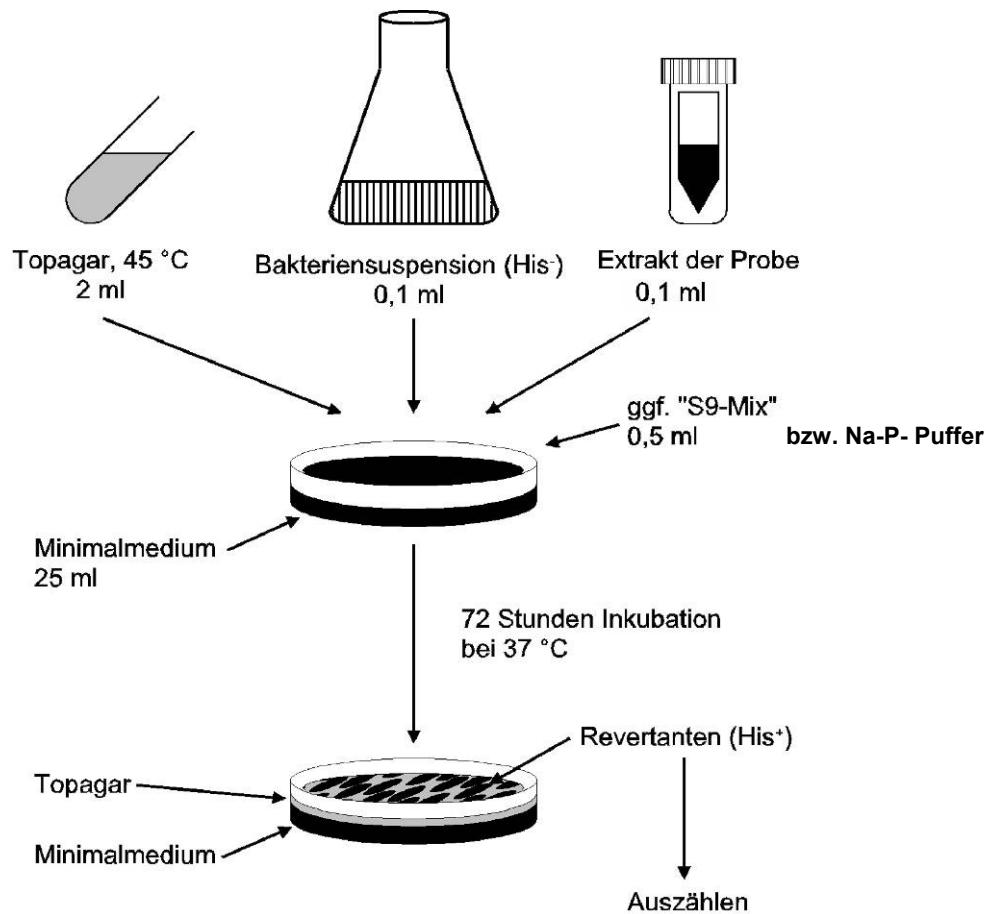


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Salmonella-Mutagenitätstests (Ames-Test).

3.3.3 Ergebnisauswertung

Bei der Prüfung der Mutagenität von Reinstoffen ist es möglich, im Testansatz nahezu beliebig hohe Konzentrationen der Testsubstanzen einzusetzen. Dies macht es möglich, in Vorversuchen jenen Konzentrationsbereich zu identifizieren, in dem mutagene Wirkungen nachweisbar werden. Für diesen Konzentrationsbereich werden bis zu 6 unterschiedliche Prüfkonzentrationen hergestellt, wobei der Konzentrationsbereich möglichst den unteren Wirkbereich sowie mehrere Prüfkonzentrationen im linearen Bereich der Dosis-Wirkungsbeziehung abdecken sollte. Häufig ergibt sich dieser lineare Bereich erst bei einer Auftragung des Wirkeffektes (hier die Anzahl der Revertanten) gegen den Logarithmus der Prüfkonzentration (vgl. Abbildung 5).

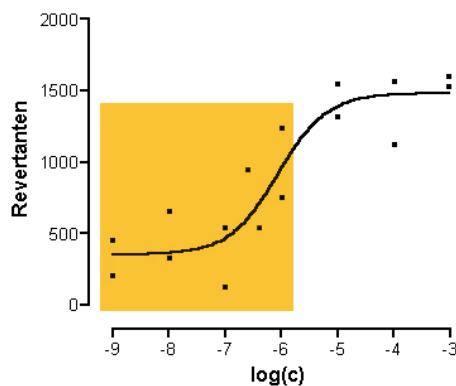


Abbildung 5: Idealisierte Dosis-Wirkungsbeziehung

Farbig: Der für die Auswertung von Ames-Tests relevante Anteil der Dosis-Wirkungsbeziehung

Für die weitere Auswertung werden die Messwerte aus dem linearen Bereich der Dosis-Wirkungsbeziehung herangezogen. Hierzu wird von der ermittelten Anzahl der Revertanten die Anzahl der Spontanrevertanten subtrahiert und die Netto-Revertantenanzahl gegen den Logarithmus der Prüfkonzentrationen aufgetragen. Mit Hilfe einer linearen Regression kann dann rechnerisch die für eine bekannte Prüfkonzentration erwartete Revertantenanzahl abgeschätzt werden.

Gerade bei niedrigen Spontanrevertantenanzahlen (z.B. beim TA98-Stamm: 20-50 Revertanten pro Platte) ist es in der Praxis aufgrund der Schwankung der Messwerte meist schwierig, den Beginn des linearen Bereichs der Dosis-Wirkungsbeziehung zu erkennen. Deshalb werden in diesem Fall erst Revertantenanzahlen als signifikant erhöht gewertet, wenn sie doppelt so hoch sind wie die Spontanrevertantenanzahl. Die Einhaltung dieser „2fachregel“ ist jedoch bei hinreichend hohen Spontanrevertantenanzahlen, wie sie z.B. beim TA100-Stamm (75-200 Revertanten pro Platte) beobachtet werden, nicht erforderlich (Mahon et al., 1989; Mortelmans u. Zeiger, 2000).

Im Vergleich zur Prüfung von Reinchemikalien ist die Auswertung der Prüfungen von Rußextrakten erschwert. Einerseits stehen nur begrenzte Mengen der Rußextrakte zur Verfügung, so dass nicht immer wünschenswert hohe Wirkbereiche der Rußextraktbestandteile erreicht werden. Zudem können sich die Dosis-Wirkungsbeziehungen unterschiedlicher, mutagen wirkender Rußextraktbestandteile so ergänzen, dass untypische summarische Dosis-Wirkungsbeziehungen erhalten werden.

4 Ergebnisse Ames-Test

Durch das Aufteilen der DCM-Extrakte in Teilmengen für den Ames-Test und für Rückstellproben für mögliche chemische Untersuchungen ergaben sich die in Tabelle 4 dargestellten Bezugsmengen.

Tabelle 4: Bezugsmengen für den Ames-Test und für die chemischen Analysen

Extrahierte Rußmengen	Dieselbetrieb	bioltec-Betrieb
	mg	mg
Gesamt	21,48	9,01
Ames-Test	19,33	8,11
Rückstellproben	2,15	0,90

4.1 Ergebnisse für die Extrakte im Ames-Test mit TA98

4.1.1 Ergebnisse mit TA98 ohne S9-Mix

Für die Negativkontrollen (nur DMSO 100 µL) wurden 18, 19, 34, 20 und 21 Revertanten pro Agarplatte ermittelt. Der Mittelwert von 22 Revertanten liegt damit im Wertebereich, der bei TA98 im Ames-Test erreicht werden soll (20 – 50 Revertanten pro Platte).

Für die Negativkontrollen mit doppelter Menge DMSO (200 µL) wurden 23, 26, 11, 24 und 23 Revertanten pro Agarplatte ermittelt. Der Mittelwert von 21 Revertanten liegt damit ebenfalls im genannten Wertebereich.

Tabelle 5: Bruttoanzahlen an Revertanten mit TA98 ohne S9 für das geprüfte DMSO, 100 µL und 200 µL

Dosis/Platte	DMSO					Mittelwert
	µL	A	B	C	D	
100	100	18	19	34	20	21
200	200	23	26	11	24	23

Ein Einfluss der doppelt dosierten DMSO Volumina auf das Testsystem konnte somit nicht festgestellt werden. Die mit den Dieselrußextrakten erzielten Ergebnisse können direkt mit den Diesel/Rapsölextrakten verglichen werden.

Tabelle 6: Bruttoanzahlen an Revertanten mit TA98 ohne S9 für die Positivkontrolle (3-NBA) sowie die Extrakte des Dieselrußes und Kraftstoffmix Raps/Dieselruß

Dosis/Platte	3-NBA		TA98 ohne S9	
	A	B	C	Mittelwert
pg				
14	28	25	30	28
29	28	22	30	27
57	26	15	36	26
115	37	38	46	40
230	68	62	68	66
459	85	96	88	90
Dosis/Platte	Dieselruß		TA98 ohne S9	
µg "Ruß"	A	B	C	Mittelwert
24	39	27	23	30
48	31	39	30	33
97	43	30	46	40
128	52	39	44	45
193	56	59	66	60
387	100	118	104	107
Dosis/Platte	Rapsöl-Dieselruß		TA98 ohne S9	
µg "Ruß"	A	B	C	Mittelwert
10	24	17	21	21
20	21	21	28	23
41	27	32	30	30
54	25	31	26	27
81	27	33	33	31
162	44	46	34	41

ROT: Anzahlen an Revertanten unterhalb der Schwelle „2facher Blindwert“;

BLAU: Anzahlen an Revertanten oberhalb der Schwelle „2facher Blindwert“

3-NBA: 3-Nitrobenzanthron

Die als Positivkontrolle eingesetzte Substanz 3-Nitrobenzanthron (3-NBA) lieferte bereits ab einer Dosis von rd. 230 pg/Platte Revertantenzahlen, die um mehr als Faktor 2 über dem Mittelwert der Blindwertextrakte (60 Revertanten/Platte) lagen. Die Auswertung dieser Netto-Revertantenzahlen ergab eine rechnerische Netto-Anzahl³ von $1,5 \times 10^8$ Revertanten pro mg 3-NBA. Dieser Wert deckt sich gut mit Angaben von Mücke et al. (2002), die $3,2 \times 10^8$ Revertanten pro mg 3-NBA angaben.

Im Vergleich dazu lieferten die Extrakte der untersuchten Rußproben nur sehr kleine Revertantenzahlen. Dies verdeutlicht auch Abbildung 6. Die Zunahme der Revertantenzahl bei steigender Extraktmenge weist auf eine direkte Korrelation bei allen Proben-Extrakten hin.

³ Hinweis zur Interpretation: Diese Anzahl wäre zu erwarten, wenn 1 mg 3-NBA in Dosen von 114 bis 459 pg 3-NBA auf eine entsprechend große Anzahl von Agarschalen einwirken würde.

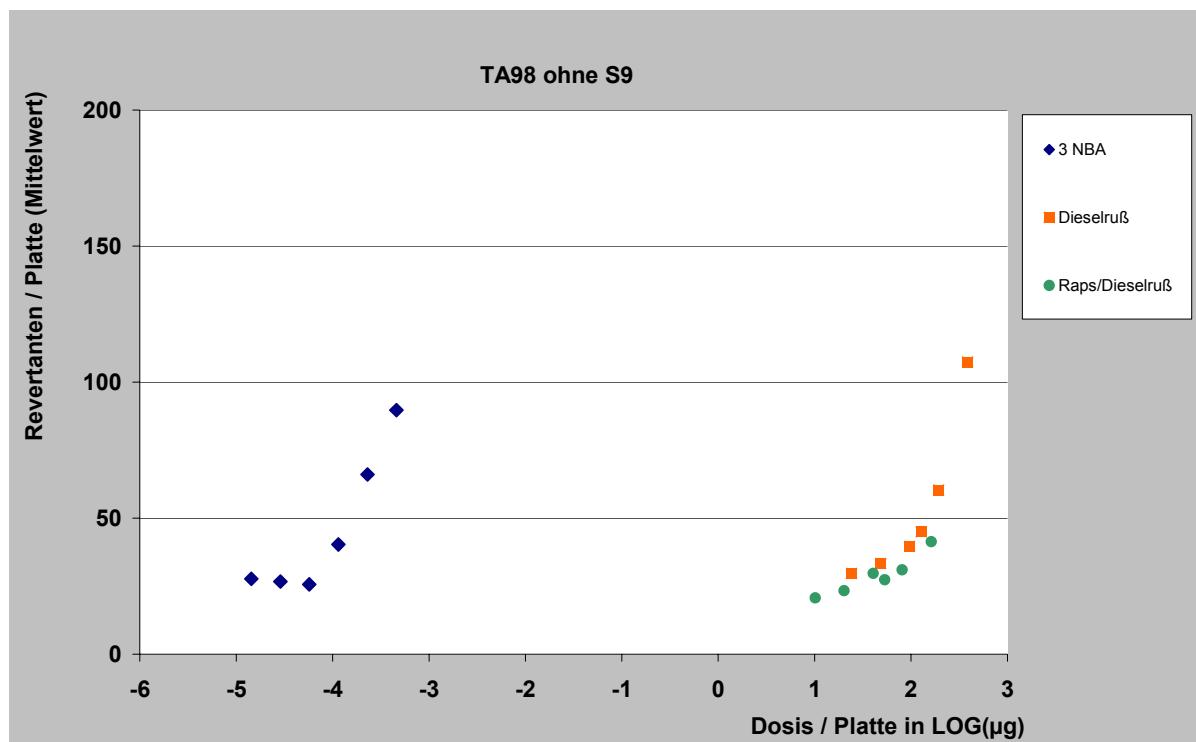


Abbildung 6: Vergleich der mit dem TA98-Stamm erzielten Dosis-Wirkungsbeziehungen für die Positivkontrolle mit 3-NBA sowie mit Extrakten von Dieselruß und Kraftstoffmix Raps/Dieselruß

BEACHTE: Log-skalierte X-Achse: Lesebeispiele: X-Wert = $-2,0 \cong 10^{-2} \mu\text{g}/\text{Platte}$; X-Wert = $3,0 \cong 10^3 \mu\text{g}/\text{Platte}$

Platten mit unverdünntem (entspricht 0,387 mg extrahierter Dieselruß) und 1:2 verdünntem Extrakt aus Dieselruß (entspricht 0,193 mg extrahierter Dieselruß pro Platte) wiesen erkennbar erhöhte Anzahlen an Revertanten auf. Die von Maron u. Ames (1983) für den Nachweis einer mutagenen Wirkung empfohlene Erhöhung der Revertantenanzahl je Platte (= Verdopplung der Revertantenanzahl im Vergleich zum Blindwert) wurde dabei erreicht. Bezogen auf 1 mg Dieselruß ergab sich eine Netto-Anzahl von 220 Revertanten.

Der Ruß aus dem bioltec-Kraftstoffmixtest zeigte ein entsprechendes Bild: der unverdünnte Extrakt (162 µg/Platte) wies tendenziell leicht erhöhte Revertantenzahlen gegenüber den von DMSO-Negativprobe ausgelösten Spontanmutationen auf. Die hochgerechnete Netto-Revertantenzahl aus den beiden höchsten Extraktkonzentrationen ergab 135 Netto-Revertantenzahl je mg Ruß aus dem Kraftstoffmixtest.

Die Revertantenzahl des bioltec-Extraktes pro mg Ruß lag damit bei etwa der Hälfte der Revertanten des Diesel-Rußextraktes.

4.1.2 Ergebnisse mit TA98 plus S9-Mix

Für die Negativkontrollen (nur DMSO) wurden im Mittel 30 Revertanten pro Agarplatte ermittelt. Der Wert lag im üblichen Wertebereich von 20 – 50 Revertanten pro Platte (Tabelle 7).

Für die Negativkontrollen mit doppelter Menge DMSO (200 µL) wurden im Mittel 31 Revertanten pro Agarplatte ermittelt. Ein Einfluss des doppelt dosierten DMSO auf die im Ames-Test eingesetzten Salmonellenkulturen konnte auch hier nicht festgestellt werden.

Tabelle 7: Bruttoanzahlen an Revertanten mit TA98 mit S9 für das geprüfte DMSO

Dosis/Platte	DMSO					Mittelwert
	µL	A	B	C	D	
100	32	25	28	26	40	30
200	33	31	28	30	34	31

Die als Positivkontrolle eingesetzte Substanz 2-Aminofluren (2-AF) lieferte bei 4 geprüften Dosierungen Revertanzenzahlen, die um mehr als den Faktor 2 höher lagen als die mit DMSO ausgelösten Spontanmutationsraten (vgl.

Tabelle 8). Die Auswertung der zugehörigen Netto-Revertantenanzahlen ergab eine rechnerische Netto-Anzahl⁴ von $2,2 \times 10^5$ Netto-Revertanten pro mg 2-AF. Dieser Wert liegt in der Größenordnung der Befunde von Maron u. Ames (1983), die $6,2 \times 10^5$ Revertanten pro mg 2-AF erfasst haben.

Der Extrakt der Dieselrußprobe ergab in der höchsten eingesetzten Konzentration von 387 µg/Platte Revertantenzahlen von mehr als dem doppelten gegenüber den Spontanmutationsraten von DMSO. Insgesamt würden sich bei einem Einsatz von 1 mg dieses Extrakts, aufgeteilt auf Konzentrationen von ca. 387 µg, rechnerisch 134 Netto-Revertanten / mg Dieselruß ergeben⁵.

Beim Extrakt, der aus dem bioltec-Raps/Diesel-Mixbetrieb gewonnen wurde, führte die maximal eingesetzte Konzentration zu keinen eindeutigen Ergebnissen. Es wird auf einen Bezug auf 1 mg Rapsöl-/Dieselruß verzichtet. Die Anzahl der Revertanten hebt sich nicht wesentlich von der Spontanmutationszahl auf der Negativprobe DMSO ab.

Insgesamt konnte durch die Zugabe von S9 keine Erhöhung der Mutationsraten gegenüber den Ansätzen ohne S9 erzielt werden. Die metabolische Wirkung ist bei diesen Extrakten für den Teststamm TA98 vernachlässigbar.

⁴ Hinweis zur Interpretation: Diese Anzahl wäre zu erwarten, wenn 1 mg 2-Aminofluren in Dosen von ca. 5 µg auf eine entsprechend große Anzahl von Agarschalen einwirken würde.

⁵ Hinweis zur Interpretation: Diese Anzahl wäre zu erwarten, wenn 1 mg Dieselrußextrakt in Portionen von ca. 387 µg auf eine entsprechend große Anzahl von Agarschalen einwirken würde.

Tabelle 8: Bruttoanzahlen an Revertanten mit TA98 mit S9 für die Positivkontrolle (2-AF) sowie die Extrakte des Dieselrußes und des bioltec-Kraftstoffmix Raps/Dieselrußes.

Dosis/Platte	TA98 mit S9			
	2-AF			
ng	A	B	C	Mittelwert
156,3	35	23	39	32
312,5	42	31	46	40
625	81	53	76	70
1250	157	168	147	157
2500	440	524	492	485
5000	1166	1135	1075	1125
Dosis/Platte	Dieselruß		TA98 ohne S9	
	A	B	C	Mittelwert
µg "Ruß"				
24	34	27	22	28
48	40	42	23	35
97	36	28	28	31
128	37	37	44	39
193	38	34	43	38
387	77	90	80	82
Dosis/Platte	Rapsöl-Dieselruß		TA98 ohne S9	
	A	B	C	Mittelwert
µg "Ruß"				
10	28	33	30	30
20	32	19	33	28
41	26	30	20	25
54	30	29	31	30
81	30	35	28	31
162	35	27	47	36

ROT: Anzahlen an Revertanten unterhalb der Schwelle „2facher Blindwert“;

BLAU: Anzahlen an Revertanten oberhalb der Schwelle „2facher Blindwert“

2-AF: 2-Aminofluren

Die mutagene Wirkung der zwei Proben-Extrakte auf den Teststamm TA98 mit Zugabe des S9-Mix unterschied sich nicht wesentlich (Abbildung 7). Ein Anstieg der Revertantenzahl mit zunehmender Konzentration ist aus dieser Abbildung für alle Probenextrakte ablesbar. Jedoch befindet sich der Anstieg für die Probenextrakte aus Raps/Dieselruß am unteren Teil der sigmoiden Kurve. Um eindeutigere Ergebnisse zu erhalten, wären größere Rußmengen erforderlich gewesen.

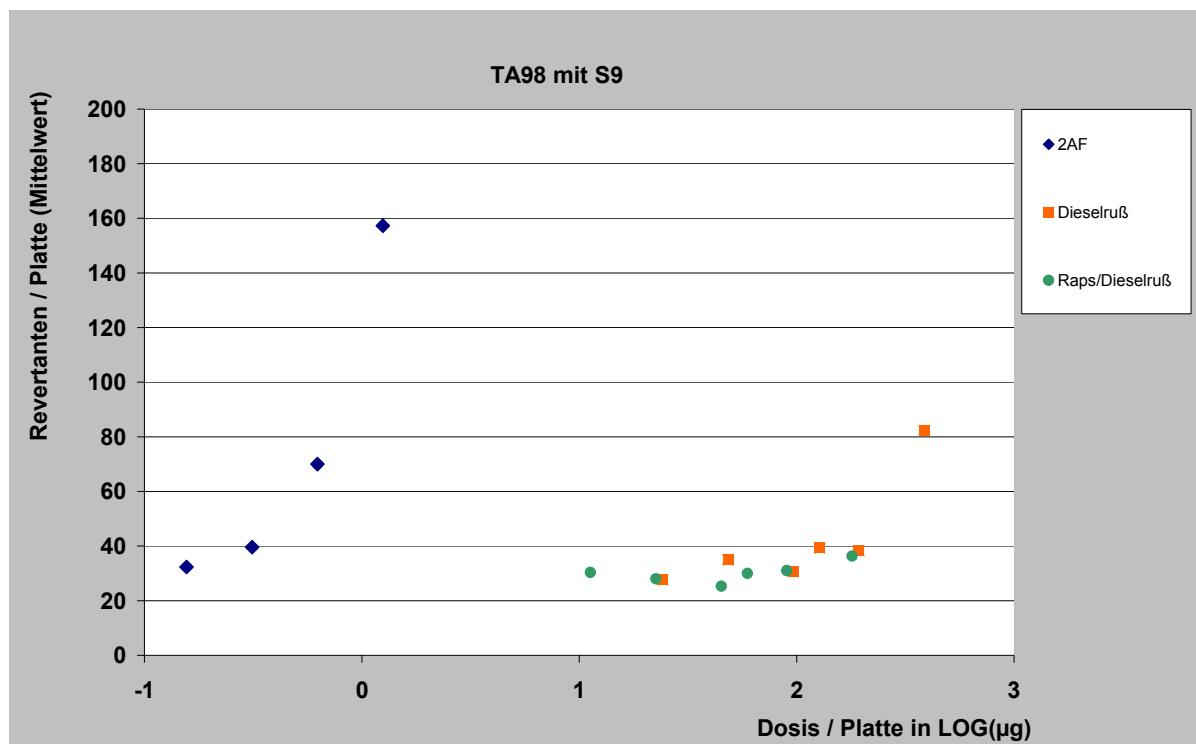


Abbildung 7: Vergleich der mit dem TA98-Stamm und S9-Mix erzielten Dosis-Wirkungsbeziehungen für die Positivkontrolle mit 2-AF sowie mit Extrakten von Diesel- und bioltec-Kraftstoffmix Raps/Dieselruß

BEACHTE: Log-skalierte X-Achse: Lesebeispiele: X-Wert = -1,0 $\geq 10^1$ µg/Platte; X-Wert = 2,0 $\geq 10^2$ µg/Platte
Die Werte für die beiden höchsten Konzentrationen für 2-AF wurden nicht eingetragen.

4.2 Ergebnisse für die Extrakte im Ames-Test mit TA100

4.2.1 Ergebnisse mit TA100 ohne S9-Mix

Für die Negativkontrollen (Tabelle 9; nur DMSO) wurden im Mittel 116 Revertanten pro Agarplatte ausgezählt. Für die Negativkontrolle mit 200 µL pro Agarplatte wurden im Mittel 136 Revertanten gezählt. Die Werte lagen im üblichen Wertebereich von 75-200 Revertanten pro Platte.

Tabelle 9: Bruttoanzahlen an Revertanten mit TA100 ohne S9 für das geprüfte DMSO

Dosis/Platte	DMSO					Mittelwert
	µL	A	B	C	D	
100	106	106	106	139	125	116
200	133	162	121	141	125	136

Beim Teststamm TA100 erhöhte sich die Revertantenzahl bei Einsatz der Positivkontrolle Methylmethansulfonat (MMS), ausgehend von rd. 116 Revertanten pro Platte bei den Blindwerten - in linearer Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Methylmethansulfonat - auf rd. 232 Revertanten pro Platte. Die spezifische mutagene

Wirkung von Methylmethansulfonat auf den Stamm TA100 errechnet sich damit zu 450 Netto-Revertanten pro mg⁶.

Im Vergleich zur Positivkontrolle lieferten die Extrakte der untersuchten Rußproben ähnliche Revertanzahlen (Abbildung 8). Zudem ist beim Dieselrußextrakt und auch ansatzweise bei den beiden anderen Extrakten ein linearer Zusammenhang von zugegebener Extraktmenge (Konzentration) und Revertanzahl erkennbar.

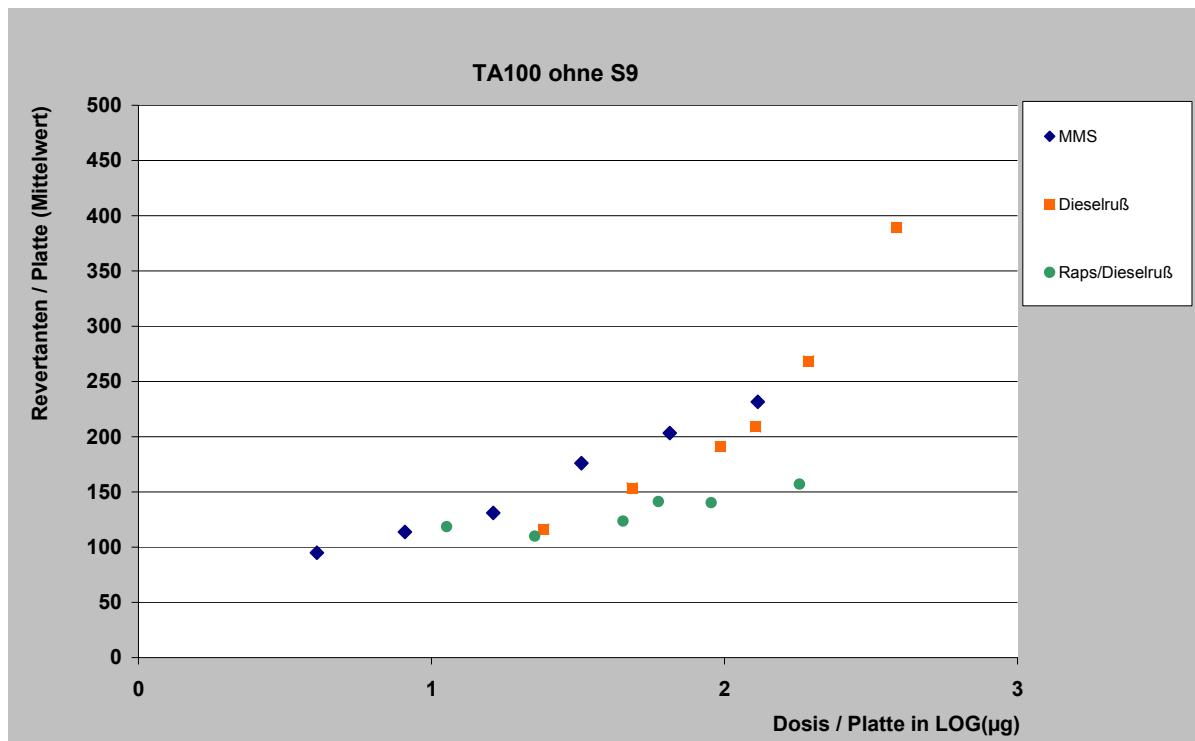


Abbildung 8: Vergleich der mit dem TA100-Stamm ohne S9-Mix erzielten Dosis-Wirkungsbeziehungen für die Positivkontrolle mit MMS sowie mit Extrakten von Dieselruß und Kraftstoffmix Raps/Dieselruß
BEACHTE: Log-skalierte X-Achse: Lesebeispiele: X-Wert = 2,0 $\geq 10^2$ µg/Platte

Platten, die mit höher konzentriertem Extrakt aus Dieselruß dotiert wurden, wiesen im Ames-Test erkennbar erhöhte Anzahlen an Revertanten auf (siehe

⁶ Hinweis zur Interpretation: Diese Anzahl wäre zu erwarten, wenn 1 mg Methylenmethansulfonat in Dosen von ca. 260 µg auf eine entsprechend große Anzahl von Agarschalen einwirken würde.

Tabelle 10). Bei dieser Konzentration wurden im Mittel 389 Revertanten pro Platte gezählt. Die Auswertung ergab eine Netto-Anzahl von rd. 660 Netto-Revertanten pro mg Dieselruß⁷.

Der untersuchte Extrakt des Rußes aus dem Kraftstoffmixtest erreichte rd. 253 Netto-Revertanten je mg Ruß.

⁷ Hinweis zur Interpretation: Diese Anzahl wäre zu erwarten, wenn 1 mg Dieselrußextrakt in Portionen von ca. 387 µg auf eine entsprechend große Anzahl von Agarschalen einwirken würde.

Tabelle 10: Bruttoanzahlen an Revertanten mit TA100 ohne S9 für die Positivkontrolle (MMS) sowie die Extrakte des Dieselrußes und Kraftstoffmix Raps/Dieselruß

Dosis/Platte	MMS		TA100 ohne S9		
	µg	A	B	C	Mittelwert
8,1		102	95	88	95
16		124	107	110	114
33		128	133	132	131
65		180	171	177	176
130		197	208	205	203
260		248	218	229	232
Dosis/Platte	Dieselruß		TA 100 ohne S9		
	µg "Ruß"	A	B	C	Mittelwert
24		118	112	119	116
48		156	139	166	154
97		175	215	183	191
128		200	222	205	209
193		276	270	259	268
387		409	389	370	389
Dosis/Platte	Rapsöl-Dieselruß		TA100 ohne S9		
	µg "Ruß"	A	B	C	Mittelwert
10		120	117	119	119
20		112	108	110	110
41		112	122	137	124
54		135	145	144	141
81		122	142	157	140
162		164	156	151	157

ROT: Anzahlen an Revertanten unterhalb der Schwelle „2facher Blindwert“;

BLAU: Anzahlen an Revertanten oberhalb der Schwelle „2facher Blindwert“

MMS: Methylmethansulfonat

Insgesamt wiesen alle drei untersuchten Probenextrakte einen ähnlichen Wirkbereich auf.

4.2.2 Ergebnisse mit TA100 mit S9-Mix

Für die Negativkontrollen mit S9 Mix (Tabelle 11) wurden im Mittel 135 Revertanten pro Agarplatte ermittelt. Für die Negativkontrolle mit 200 µL pro Agarplatte wurden im Mittel 125 Revertanten gezählt. Die Werte lagen im üblichen Wertebereich von 75-200 Revertanten pro Platte.

Tabelle 11: Bruttoanzahlen an Revertanten mit TA100 mit S9 für das geprüfte DMSO

Dosis/Platte	DMSO					Mittelwert	
	µL	A	B	C	D		
100		120	148	136	125	146	135
200		131	150	155	92	96	125

Wie die Abbildung 9 zeigt, besaß der Dieselrußextrakt eine um den Faktor 2 höhere mutagene Wirkung als die beiden anderen Probenextrakte. Zudem ist eindeutig ein linearer Anstieg der mutagenen Wirkung bei einer Konzentrationserhöhung erkennbar.

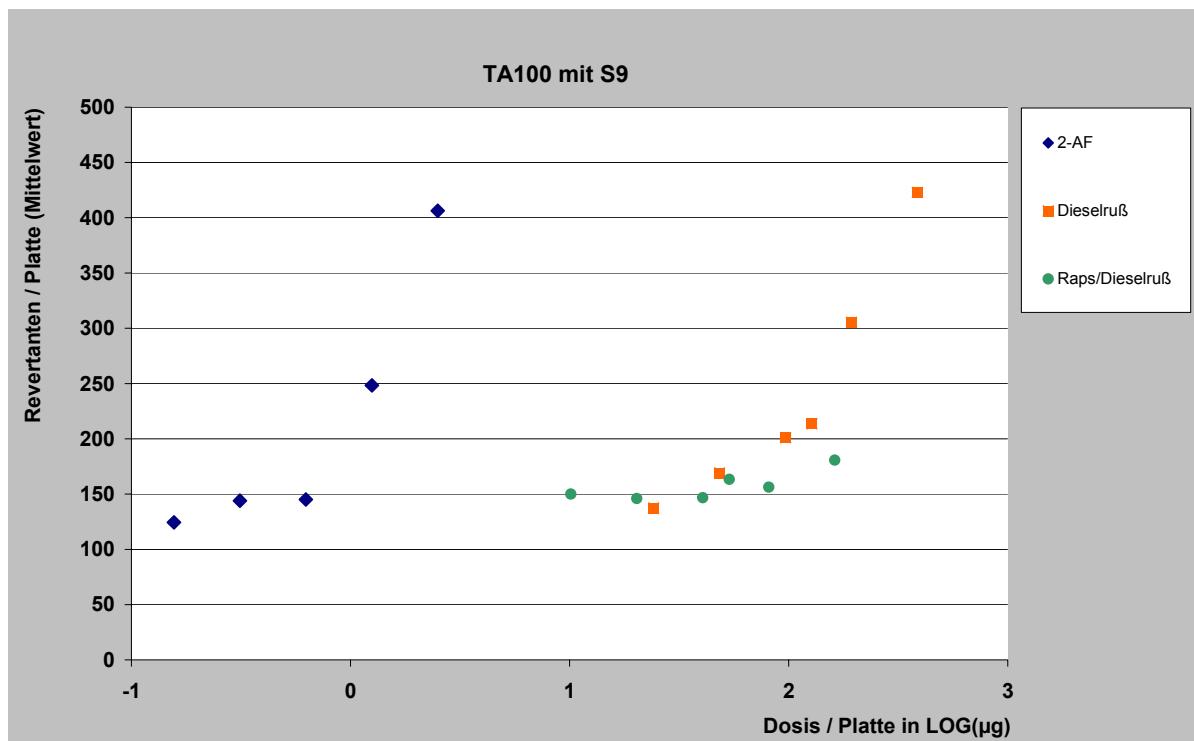


Abbildung 9: Vergleich der mit dem TA100-Stamm mit S9-Mix erzielten Dosis-Wirkungsbeziehungen für die Positivkontrolle mit 2-AF sowie mit Extrakten von Dieselruß und Kraftstoffmix Raps/Dieselruß
BEACHTE: Log-skalierte X-Achse: Lesebeispiele: X-Wert = 2,0 $\cong 10^2$ pg/Platte; X-Wert = 6,0 $\cong 10^6$ pg/Platte

Die Positivkontrolle 2-Aminofluren (2-AF) lieferte bei 2 geprüften Dosierungen Revertantenzahlen, die um mehr als den Faktor 2 höher lagen als die mit DMSO ausgelösten Spontanmutationsraten (vgl. Tabelle 12 und Tabelle 11). Die Auswertung der zugehörigen Netto-Revertantenzahlen ergab eine rechnerische Netto-Anzahl⁸ von $1,3 \times 10^5$ Netto-Revertanten pro mg 2-AF.

Der Extrakt der Dieselrußprobe ergab in der höchsten eingesetzten Konzentration von 387 µg/Platte Revertantenzahlen von mehr als dem doppelten gegenüber den mit reinem DMSO behandelten Platten. Insgesamt würden sich bei einem Einsatz von 1 mg dieses Extrakts, aufgeteilt auf Konzentrationen von ca. 387 µg rechnerisch 770 Netto-Revertanten / mg Ruß ergeben⁹.

Beim bioltec-Raps/Diesel-Mixbetrieb führten die maximal eingesetzte Konzentration zu Werten in einer Größenordnung von 284 Netto-Revertanten bezogen auf 1 mg Ruß.

Insgesamt führte die Zugabe von S9 zu einer geringfügigen Erhöhung der Mutationsraten gegenüber den Ansätzen ohne S9 (vgl.

⁸ Hinweis zur Interpretation: Diese Anzahl wäre zu erwarten, wenn 1 mg 2-Aminofluren in Dosen von ca. 5 µg auf eine entsprechend große Anzahl von Agarschalen einwirken würde.

⁹ Hinweis zur Interpretation: Diese Anzahl wäre zu erwarten, wenn 1 mg Dieselrußextrakt in Portionen von ca. 387 µg auf eine entsprechend große Anzahl von Agarschalen einwirken würde.

Tabelle 10 und Tabelle 12). Die metabolische Wirkung ist bei diesen Extrakten für den Teststamm TA100 ausgeprägter als beim Teststamm TA98.

Tabelle 12: Bruttoanzahlen an Revertanten mit TA100 mit S9 für die Positivkontrolle (2-AF) sowie die Extrakte des Dieselrußes und Kraftstoffmix Raps/Dieselruß

Dosis/Platte	2-AF			TA100 mit S9
	A	B	C	Mittelwert
ng				
156,3	121	135	117	124
312,5	139	156	137	144
625	172	134	129	145
1250	273	237	235	248
2500	374	409	436	406
5000	735	720	837	764
Dosis/Platte	Dieselruß			TA100 mit S9
	A	B	C	Mittelwert
µg "Ruß"				
24	141	116	155	137
48	142	181	184	169
97	174	207	222	201
128	230	206	205	214
193	300	348	268	305
387	386	396	487	423
Dosis/Platte	Rapsöl-Dieselruß			TA100 mit S9
	A	B	C	Mittelwert
µg "Ruß"				
10	148	151	151	150
20	146	151	141	146
41	133	147	160	147
54	183	163	144	163
81	167	136	166	156
162	159	188	195	181

ROT: Anzahlen an Revertanten unterhalb der Schwelle „2facher Blindwert“;

BLAU: Anzahlen an Revertanten oberhalb der Schwelle „2facher Blindwert“

MMS: Methylmethansulfonat

5 Literaturangaben

- FAL (2006): Hintergrund zur PANORAMA-Sendung am 29.06.2006 sowie zur dpa-Meldung vom 19.12.2006 - Ergebnisse des Rapsöl-Betriebs eines LKW-Motors (OM 906LA).
http://www.fal.de/nn_792590/SharedDocs/07_TB/DE/Downloads/panorama_07-2006;templatelid=raw,property=publicationFile.pdf/panorama_07-2006.pdf
- FAL (2007): Plusminus Sendung des MDR von Holger Balodis: Dienstag, 3. April 2007
- Krahl, J.; Munack, A.; Schröder, O.; Bünger, J. (2003): Influence of biodiesel and different designed diesel fuels on the exhaust gas emissions and health effects. SAE_paper_03FFL-40_final_2003-08-12.doc
- Mahon; G.A.T.; Middleton, B.; Robinson, W.D.; Green, M.H.L.; Mitchell, I. de G.; Tweats, D.J. (1989): Analysis of data from microbial colony assays. In: Kirkland, D.J. (ed.): Statistical evaluation of mutagenicity test data. Cambridge University Press, p. 26-65
- Maron, M.; Ames, B. N. (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research, 113, p. 173-215.
- Mortelmans, K.; Zeiger, E. (2000): The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Mutation Research, 455, p. 29-60
- Mücke, W. (Hrsg.); Huber, W.; Hunstein, R.; Nickel, T.; Koch, M.; Weindl, J.; Braun, A. (2002): Mutagenität und Nitro-PAK-Gehalt von Feinstaub – Untersuchungen an einem verkehrsbelasteten Standort. Endbericht zum Forschungsvorhaben im Auftrag des Bayerischen Landesamts für Umwelt. M. & D. Gräbner, Altendorf bei Bamberg, ISBN 3-932108-13-2
- Nylund, N.-O.; Erkkilä, K.; Lappi, M.; Ikonen, M. (2004): Transit Bus Emission Study: Comparison of Emissions from Diesel and Natural Gas Buses. VTT RESEARCH REPORT PRO3/P5150/04

Augsburg, 26.07.2007

Prof. Dr.-Ing. W. Rommel
Geschäftsführer

i. V. Dr. K. Hoppenheidt
Projektmanager
Biologische Verfahrenstechnik
und Analytik