

GENOTOXICKÝ POTENCIÁL ORGANICKÝCH EXTRAKTŮ Z PEVNÝCH EMISÍ MOTORŮ NA NAFTU A ŘEPKOVÝ OLEJ

¹Jan Topinka, ¹Alena Milcová, ¹Jana Schmuczerová, ²Martin Mazač, ²Martin Pechout, ²Michal Vojtíšek

¹Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Praha, jtopinka@biomed.cas.cz

²Technická univerzita v Liberci

ABSTRAKT

Tato studie byla provedena s cílem identifikovat možnou genotoxicitu indukovanou organickými extrakty z částic emisí ze dvou běžných naftových motorů poháněných naftou a přehřátým řepkovým olejem: motor Cummins ISBe4 byl testován s použitím cyklu WHSC (World Harmonized Steady Cycle) a s použitím modifikovaného cyklu ESC (Engine Steady Cycle). Motor Zetor 1505 byl testován s použitím cyklu NRSC (Non-Road Steady Cycle). Dále pak byla na motoru Cummins testována bionafta B-100 s použitím modifikovaného cyklu ESC. Ředěné emise byly odebírány vysokoobjemovými vzorkovači na filtry potažené teflonem. Filtry byly extrahovány dichlormetanem. DNA adukty indukované extrahovatelnou organickou hmotou (EOM) byly stanoveny v nebuněčném testu s nativní DNA s použitím metody 32P-postlabeling v přítomnosti a nepřítomnosti jaterní mikrosomální frakce S9 potkana. Současně byla provedena chemická analýza 12 prioritních polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU), včetně 7 karcinogenních PAU (k-PAU). Výsledky ukazují, že naftové emise obsahují podstatně více PAU než emise z řepkového oleje (pro cyklus ESC) anebo jsou tyto hodnoty srovnatelné (pro cykly WHSC a NRSC), ačkoli koncentrace k-PAU jsou srovnatelné (pro cyklus ESC) anebo významně vyšší (pro cykly WHSC a NRSC) pro emise z řepkového oleje. Hladiny DNA aduktů indukované EOM z naftových emisí a emisí z řepkového oleje byly srovnatelné, ale konzistentně lehce vyšší pro naftu. Byla nalezena vysoce významná pozitivní korelace mezi koncentrací 12 prioritních PAU a DNA adukty (0,980; $p < 0,001$) a tato korelace byla ještě vyšší pro k-PAU (0,990; $p < 0,001$). Metabolická aktivace S9 mikrosomální frakce indukovala několikanásobně vyšší genotoxicitu, což ukazuje na hlavní podíl PAU na genotoxicitě EOM. Celkově se ukázalo, že DNA adukty jsou více závislé na typu použitého motoru a testovacím cyklu než na typu paliva. Výsledky ukazují, že genotoxicita částic v emisích z motorů poháněných řepkovým olejem je srovnatelná s emisemi motorů poháněných naftou. Právě probíhá detailnější studie ověřující a rozšiřující tyto předběžné výsledky.

Klíčová slova: bionafta, naftové emise, DNA adukty, genotoxicita, PAU, rostlinný olej

GENOTOXIC POTENTIAL OF ORGANIC EXTRACTS FROM PARTICLE EMISSIONS OF DIESEL AND RAPESEED OIL POWERED ENGINES

The present study was performed to identify possible genotoxicity induced by organic extracts from particulate matter in the exhaust of two typical diesel engines run on diesel fuel and neat heated fuel-grade rapeseed oil: A Cummins ISBe4 engine tested using the World Harmonized Steady Cycle (WHSC) and modified Engine Steady Cycle (ESC) and a Zetor 1505 engine tested using the Non-Road Steady Cycle (NRSC). In addition, biodiesel B-100 (neat methylester of rapeseed oil) was tested in the Cummins engine run on the modified ESC cycle. Diluted exhaust was sampled with high-volume samplers on Teflon coated filters. Filters were extracted with dichlormethane and DNA adduct levels induced by extractable organic matter (EOM) in an acellular assay of calf thymus DNA coupled with 32P-postlabeling in the presence and absence of rat liver microsomal S9 fraction were employed. Simultaneously, the chemical analysis of 12 priority PAHs in EOM, including 7 carcinogenic PAHs (c-PAHs) was performed. The results suggest that diesel emissions contain substantially more total PAHs than rapeseed oil emissions (for the ESC cycle) or that these concentrations were comparable (for the WHSC and NRSC cycles), while c-PAHs levels were comparable (for the ESC cycle) or significantly higher (for the WHSC and NRSC cycles) for rapeseed oil emissions. DNA adduct levels induced by diesel and rapeseed oil derived EOM were comparable, but consistently slightly higher for diesel than for rapeseed oil. Highly significant correlations were found between 12 priority PAHs concentrations and DNA adduct levels (0.980; $p < 0.001$) and these correlations were even stronger for c-PAHs (0.990; $p < 0.001$). Metabolic activation by the microsomal S9 fraction resulted in several fold higher genotoxicity, suggesting a major contribution of PAHs to genotoxicity. Generally, DNA adduct levels were more dependent on the type of engine and the test cycle than on the fuel. Our findings suggest that the genotoxicity of particulate emissions from the combustion of rapeseed oil is significant and is comparable to that from the combustion of diesel fuel. A more detailed study is ongoing to verify and extend these preliminary findings.

Key words: biodiesel, diesel emissions, DNA adducts, genotoxicity, PAHs, vegetable oil

ÚVOD

Nové technologie motorů, často navrhované s cílem snížit celkové emise, mohou představovat nová rizika. Průměr částic emitovaných motory s vnitřním spalováním se pohybuje řádově v jednotkách až stovkách nanometrů [1, 2]. Problematika je dále komplikována zaváděním biopaliv produkovaných z místně dostupných obnovitelných zdrojů s cílem snížit závislost na dovozu a s cílem diverzifikace energetických zdrojů. Nejběžnější biopaliva v EU zahrnují bionaftu, řepkový olej a etanol. Bionafta je směs metylesterů mastných kyselin, která může nahradit klasice-

kou naftu. Bionafta bývá obvykle přidávána do nafty v nízkých koncentracích (několik procent), v USA jsou však běžné i směsi s obsahem bionafty 20 % (B-20) a v EU 30 % (B-30). Užívá se též čistá bionafta B-100. Palivový řepkový olej a ostatní rostlinné oleje jsou v některých zemích používány jako paliva pro silniční vozidla, zemědělskou techniku a pro topení a elektrárny. Částice emitované motory používajícími biopaliva se liší od částic z motorů na klasickou naftu nejen množstvím, ale i velikostí, složením a tím pravděpodobně i stupněm rizika pro lidské zdraví. Je známo, že bionafta snižuje celkovou hmotu částic emisí [3, 4], avšak rozpustná organická hmota u emisí z bionafty je obvykle

větší než u klasické nafty, naopak procento nerozpustné hmoty je menší [5]. Knothe a kol. [6] zjistili 30% pokles v emisích částic s použitím čisté bionafty, avšak podíl rozpustné organické frakce se zvýšil o 40 %. Za použití rostlinného oleje byla hmota částic v emisích srovnatelná nebo menší při středních a vyšších otáčkách [7, 8], ale při nižších otáčkách, typických pro městský provoz, byla hmota emisí často vyšší [8]. Při nižších otáčkách byl též nižší median velikosti částic [8, 9].

Přehledný článek Karavalakise a kol. [10] o vlivu bionafty na emise polycyklických aromatických uhlovodíků upozorňuje na rozporuplnost dosažených výsledků. Lapuerta a kol. [11] ve svém přehledném článku také poukazuje na nízkou opakovatelnost a rozporuplnost výsledků dosavadních studií, často zpochybňovaných samotnými autory. Studie Zou a Atkinsona [12] uvádí, že naftový motor poháněný bionaftou snižuje emise plyných méně toxických PAU, zatímco produkce těžších toxičtějších PAU je srovnatelná s klasickou naftou. Yang a kol. [13] zjistili nižší emise PAU v naftě s 20 % biosložky než v čisté naftě. Studie na zvířatech ukázaly, že subchronická expozice potkanů emisím z motorů spalujících bionaftu indukuje v závislosti na dávce vznik alveolárních makrofágů, což je běžně pozorováno u klasické nafty [14, 15].

Celkově lze konstatovat, že o mechanismech toxicity emisí z motorů poháněných biopalivy je známo velmi málo. V této studii jsme se proto zaměřili na srovnání genotoxicity organických látek tvořících pevnou složku emisí motorů poháněných klasickou naftou a některými běžnými biopalivy.

MATERIÁL A METODY

Motory a paliva

Jako zdroj částic byly použity dva přepřítované čtyřválcové vznětové motory s přímým vstřikem paliva, vybrané jako zástupci běžně používaných technologií motorů. Prvním motorem byl Cummins ISBe4, zdvihový objem 4,5 litru, výkon 136 kW, rok výroby 2003, se vstřikováním paliva elektronicky řízeným systémem Common Rail druhé generace (Bosch), který, s různými konfiguracemi katalytických zařízení, je používán v menších autobusech a nákladních automobilech, s homologací Euro 3 nebo Euro 4. Druhým motorem byl Zetor 1505, zdvihový objem 4,16 litru, výkon 90 kW, rok výroby 2007, s mechanicky řízeným řadovým vstřikovacím čerpadlem (Motorpal), homologovaný jako nesilniční motor emisní kategorie Stage III-A. Oba motory byly instalovány na vodní motorové brzdě (Schenck Dynabar D-630 a D-700) v laboratorích Katedry vozidel a motorů na Technické univerzitě v Liberci

a provozovány na silniční naftu (EN 590, KM Prona), komerční 100% bionaftu (B-100, metylestery řepkového oleje, EN 14214, Agropodnik Jihlava) a neesterifikovaný řepkový olej palivové kvality (DIN 51605, FabioProdukt Holín). V motoru Cummins byl použit klasický minerální mazací olej, v motoru Zetor biologicky odbouratelný mazací olej Plantomot (Fuchs Oil) na bázi rostlinných esterů. Pro spalování neesterifikovaného řepkového oleje byly oba motory vybaveny přídatným vyhříváním palivovým systémem, který sestává z vyhřívání nádrže (zavařovací hrnec), vyhřívání palivového filtru, izolovaného potrubí a kohoutů pro přepínání přívodní a vratné větve paliva, které umožňují start a ohřev motoru na naftu, provoz na naftu nebo na ohřátý rostlinný olej a proplach motoru naftou před jeho odstavením. Tento přídatný palivový systém byl popsán v pracích [8, 16, 17].

Vzorkování emisí

Vzhledem k většímu množství částic potřebnému pro analýzu [18, 19] byly použity vysokoobjemové vzorkovače, napojené na systém odsávání výfukových plynů z laboratoře, který sloužil jako improvizovaný ředící tunel s ředícím poměrem od 10:1 až 15:1 při plném zatížení do cca 100:1 při volnoběhu. Průtok tunelem byl stanoven experimentálně jako 8800 m³/h na základě měření koncentrací oxidu uhličitého [17] a gravimetrického měření emisí částic [20]. Vzorek ředěných výfukových plynů byl odebírán vysokoobjemovými vzorkovači Digitel DH-77 pracujícími s průtokem 500–1000 dm³/min.

Testovací podmínky

Oba motory byly provozovány ve stacionárních režimech. Motor Cummins byl provozován dle režimů Evropského stacionárního cyklu ESC (direktiva EU 2005/55/EC) a Světového harmonizovaného stacionárního cyklu WHSC (World Harmonized Steady State Test Cycle, UN EC dokument ECE/TRANS/180/Add.4; <http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/main/wp29/wp29wgs/wp29gen/wp29registry/ECE-TRANS-180a4e.pdf>). Motor Zetor byl provozován v režimech definovaných ve stacionárním cyklu pro nesilniční motory (NRSC, Non-Road Steady State Cycle, dle EU direktivy 1996/96/EC, též popsán v ISO-8178, režim C-1 [<http://dieselnet.com/standards/cycles/iso8178.php>]. Vyjma cyklu WHSC, který byl replikován přesně podle předpisu, byly testy upraveny tak, aby bylo možné kontinuální vzorkování vysokoobjemovým vzorkovačem. V této úpravě byla délka každého bodu cyklu upravena úměrně váze přiřazené danému bodu, u cyklu ESC byla celková délka 1000 s, u cyklu NRSC

Tab. 1: Vzorkování motorových emisí z vybraných paliv

Motor Vstřikování paliva	Testované palivo	Testovací cyklus	Výkon [kW]	Ředěné emise na vzorek [m ³]		Frakce ¹ [%]	PM emise [mg/kWh]
				vzorkovač	celkem		
Cummins ISBe4 Common Rail	Nafta	2 × ESC-modifikovaný ²	40	25,9	4200	0,62	30,7
	Řepkový olej	4 × ESC-modifikovaný	80	55,5	8400	0,66	23,8
	Bionafta B-100	2 × ESC-modifikovaný	40	31,9	4200	0,76	20,2
	Nafta	2 × WHSC	42	62,7	7467	0,84	6,9
	Řepkový olej	2 × WHSC	42	61,7	7467	0,83	7,2
Zetor 1505 řadové čerpadlo	Nafta	1 × NRSC	21	16,3	3733	0,44	185
	Řepkový olej	1 × NRSC	21	17,3	3733	0,46	202

¹Frakce emisí vzorkovaná vysokoobjemovým vzorkovačem [%].

²ESC-modifikovaný cyklus: 13-modální silniční motorový cyklus ESC s dobou trvání každého módu úměrnou jeho váze s dvacetisekundovým přechodem mezi módy a celkovou délkou 1000 s.

1800 s, délka plynulého přechodu mezi režimy byla 20 s. Před začátkem cyklu byl motor provozován 10 min. nebo déle v ustalujícím režimu (preconditioning) předepsaném pro daný cyklus, tj. v režimu 4 pro cyklus ESC, v režimu 9 pro WHSC a v režimu 1 pro NRSC. V případě motoru Cummins byly cykly opakovány dvakrát až čtyřikrát až do nashromáždění potřebného množství vzorku.

Extrakce EOM a chemická analýza

Filtry byly extrahovány dichlormetanem. Chemická analýza polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) byla provedena akreditovanou laboratoří firmy ALS Czech Republic, s.r.o. V každém vzorku extraktu bylo stanoveno 12 prioritních PAU, konkrétně benz[*a*]antracen (B[*a*]A), chrysen (CHRY), benzo[*b*]fluoranten (B[*b*]F), benzo[*k*]fluoranten (B[*k*]F), benzo[*a*]pyren (B[*a*]P), di-benzo[*a,h*]antracen (DB[*ah*]A), indeno[1,2,3-*cd*]pyren (I[*cd*]P), benzo[*g,h,i*]perylene (B[*ghi*]P), fenantren (PHE), antracen (ANT), fluoranten (FLU) a pyren (PYR). Prvních sedm v tomto seznamu je považováno dle IARC [21] za karcinogenní PAU (k-PAU). Pro *in vitro* experimenty byly vzorky extraktů odpařeny dusíkem a uloženy při -80 °C až do provedení analýzy.

In vitro acelulární test – analýza DNA aduktů

Acelulární test byl proveden dle dříve popsaného postupu [22, 23]. DNA (1 mg/ml) byla inkubována se vzorky extraktů (100 µg/ml) za aerobních podmínek bez a s metabolickou aktivací s použitím S-9 mikrosomální frakce (S-9, TOXILA, Pardubice-Rybitví, 1 mg bílkoviny/ml). Doba inkubace byla 24 h, při teplotě 37 °C, v prostředí S-9 pufru pH 7,4. Jako pozitivní kontrola byl používán benzo[*a*]pyren (10 µg/ml). Inkubace byla ukončena přidáním stejného objemového množství směsi CIP (chloroform : isoamylalkohol : fenol = 24 : 1 : 25) používané k extrakci DNA [24].

Analýza DNA aduktů byla prováděna metodou ³²P-postlabeling s použitím nukleázy P1 k obohacení DNA aduktů [25, 26]. ³²P-značené DNA adukty byly separovány vícerozměrnou tenkovrstevnou chromatografií (TLC) na 10 × 10 cm polyetylenimin-celulózy (PEI) fóliích a vizualizovány autoradiograficky. Vzorky odvozené od komplexních směsí vykazují na autoradiogramech tzv. diagonální radioaktivní zónu (DRZ), která je směsí překrývajících se spotů charakteristických pro DNA adukty indukované jednotlivými genotoxickými látkami ve směsi. Celková hladina DNA aduktů je dána celkovou radioaktivitou v DRZ a je vyjadřována jako celkový počet DNA aduktů/10⁸ nukleotidů. Celková koncentrace nukleotidů ve vzorcích byla stanovena metodou HPLC po hydrolyze DNA.

Statistická analýza

Pro analýzu korelace mezi hladinami DNA aduktů a obsahem PAU a k-PAU v extraktech z částic byl použit Pearsonův korelační koeficient. Před vlastní korelační analýzou byly proměnné log-log transformovány, aby bylo dosaženo normálního rozdělení hodnot.

Tab. 2: Chemická analýza prioritních PAU

Motor Vstřikování paliva	Testované palivo	Testovací cyklus	12 PAU ¹ [µg/kWh]	7 k-PAU ² [µg/kWh]	B[<i>a</i>]P [µg/kWh]
Cummins ISBe4 Common Rail	Nafta	ESC-modifikovaný ³	11	2,1	0,05
	Řepkový olej	ESC-modifikovaný	5,8	1,8	0,05
	Bionafta B-100	ESC-modifikovaný	3,8	1,6	0,09
	Nafta	WHSC	1,6	0,8	0,04
Zetor 1505 řadové čerpadlo	Řepkový olej	WHSC	1,8	2,1	0,05
	Nafta	NRSC	54	11	n.d.
	Řepkový olej	NRSC	51	18	0,2

^{1,2}Seznam 12 PAU a 7 k-PAU je v kapitole Materiál a Metodika.

³ESC-modifikovaný cyklus: 13-modální silniční motorový cyklus ESC s dobou trvání každého módu úměrnou jeho váze s dvacetisekundovým přechodem mezi módy a celkovou délkou 1000 s.

VÝSLEDKY

Vzorkování a chemická analýza

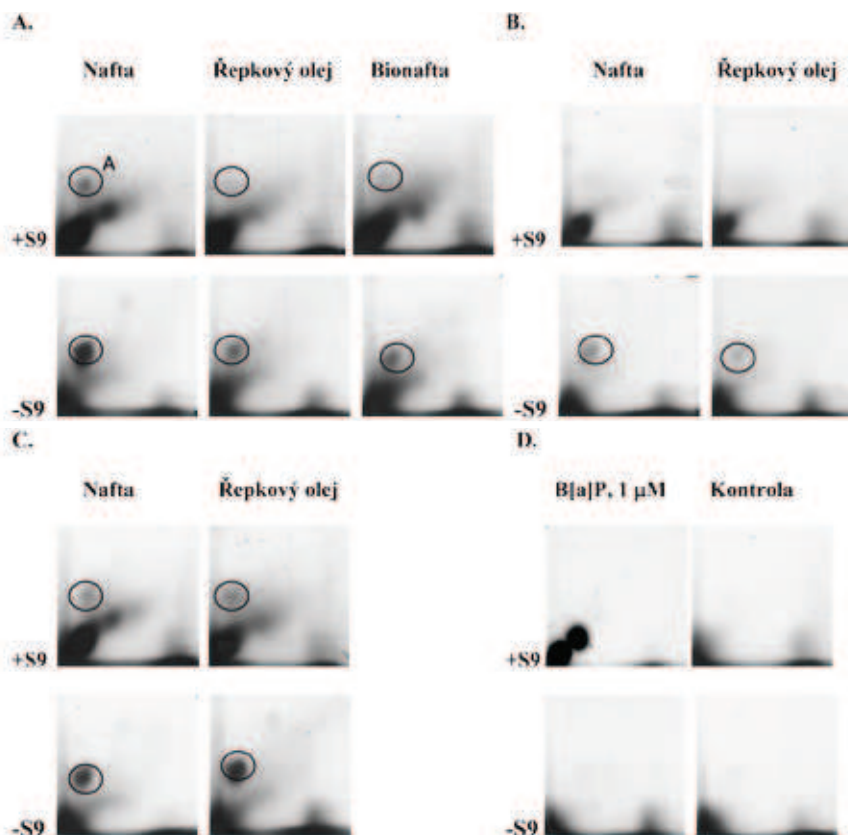
Gravimetrická analýza celkové hmoty částic emisí zachycené na filtrech (PM) při použití motorů Cummins and Zetor poháněných klasickou naftou (EN 590), řepkovým olejem (DIN 51605) a bionaftou (EN 14214) v různých testovacích cyklech ukázala, že PM emise na kWh výkonu jsou více závislé na typu motoru a testovacím cyklu než na typu paliva (**tabulka 1**). Během modifikovaného ESC cyklu bylo motorem Cummins generováno 20,2–30,7 mg PM/kWh, zatímco během WHSC cyklu byly PM emise 3 až 5krát nižší (6,9–7,2 mg/kWh), a to jak při použití nafty, tak bionafty. U motoru Zetor 1505 v NRSC cyklu bylo množství PM pro obě paliva srovnatelné (185–202 mg/kWh), ale o řád vyšší než u motoru Cummins.

Chemická analýza 12 prioritních PAU v extraktech prokázala u motoru Cummins testovaného v ESC cyklu 2 až 3násobný obsah PAU na kWh při použití nafty ve srovnání s řepkovým olejem a bionaftou B-100 (11 vs. 5,8 a 3,8 µg PAU/kWh) a srovnatelný obsah PAU pro testovací cyklus WHSC (1,6 vs. 1,8 µg PAU/kWh) (**tabulka 2**). Hladiny PAU v PM u motoru Zetor 1505 byly pro naftu a řepkový olej srovnatelné (54 a 51 µg PAU/kWh), ale byly obecně výrazně vyšší než u motoru Cummins. Jestliže však bere me v úvahu pouze 7 karcinogenních PAU (k-PAU) (**tabulka 2**), potom toto srovnání ukazuje, že u motoru Cummins v ESC cyklu jsou pro všechny 3 typy paliv koncentrace k-PAU v PM srovnatelné. Pro tenýž motor ve WHSC cyklu jsou k-PAU dokonce více než 2krát vyšší při použití klasické nafty než pro řepkový olej (2,1 vs. 0,8 µg k-PAU/kWh). Podobně u motoru Zetor 1505 testovaného v NRSC cyklu obsahují emise o více než 60 % větší množství k-PAU (18 vs. 11 µg k-PAU/kWh). Podobné závěry lze učinit porovnáním obsahu samotného benzo[*a*]pyrenu (B[*a*]P) jako nejdůležitějšího z k-PAU.

DNA adukty

Genotoxický potenciál organického podílu pevných motorových emisí byl stanoven analýzou DNA aduktů metodou ³²P-postlabeling. Na chromatogramech byly autoradiograficky detekovány ³²P-značené individuální adukty a diagonální radioaktivní zóny (DRZ) reprezentující mnoho překrývajících se různých DNA aduktů, které pocházejí z řady genotoxických sloučenin obsažených v pevné složce motorových emisí. DNA adukty byly detekovány pro emise z obou motorů Cummins i Zetor, pro všechny testovací cykly a pro všechna 3 paliva (**obrázek 1 A-D**). Vzorky

Obr. 1: Autoradiogramy DNA aduktů indukovaných extrakty z částic emisí z motorů Cummins a Zetor 1505 po inkubaci nativní DNA v přítomnosti (+S9) a nepřítomnosti (-S9) jaterní mikrosomální frakce potkana k aktivaci k-PAU. Porovnání pro různé typy paliv. Vzorky DNA byly inkubovány s množstvím extraktů odpovídajícím 3 m³ (motor Cummins) nebo 1 m³ (motor Zetor) ředěného vzorku emisí: motor Cummins byl testován modifikovaným cyklem ESC (A), motor Cummins byl testován cyklem WHSC (B), motor Zetor 1505 byl testován cyklem NRSC (C). Kontrolní vzorky (D) představují analýzu DNA inkubovanou s B[a]P (1 μM, ±S9) a propandiolem (±S9) (F). Doba expozice na film byla 24 h při -80 °C



nativní DNA inkubované s a bez jaterní mikrosomální S9 frakce po dobu 24 h s množstvím extraktů představujícím 3 m³ (Cummins) nebo 1 m³ (Zetor) zředěného vzorku emisí indukovaly kvalitativně podobné rozložení DNA aduktů na chromatogramech. U motoru Cummins testovaného v ESC cyklu byla pozorována podstatně intenzivnější DRZ za podmínek zajišťujících metabolickou aktivaci PAU (+S9) než za podmínek bez této aktivity (-S9). Intenzita individuálního aduktu A (obrázek 1A) však je dost vysoká ve vzorcích -S9, což ukazuje na přítomnost přímo působících genotoxických látek v motorových emisích.

Téměř žádná DRZ nebyla pozorována u motoru Cummins poháněného naftou a řepkovým olejem v testovacím cyklu WHSC (obrázek 1B). V těchto vzorcích byl za podmínek metabolické aktivity PAU pozorován silný adukt s podobnou chromatografickou mobilitou jako jeden z hlavních aduktů indukovaných B[a]P (obrázek 1D). Podobně jako u vzorků odebraných v ESC cyklu, byl ve vzorcích z WHSC bez metabolické aktivity (-S9) pozorován adukt A, indukovaný přímo působící genotoxickou látkou v extraktech.

Kvantitativní srovnání genotoxického potenciálu různých vzorků motorových emisí je možné po normalizaci na mg PM, anebo ještě lépe na kWh výkonu (tabulka 3). Motor Cummins vykazuje pro oba testovací cykly ESC a WHSC snížené hladiny DNA aduktů o 37–57 % pro řepkový olej ve srovnání s naftou. Pro vzorky WHSC cyklu s a bez metabolické aktivity (-S9) je

tento rozdíl ještě mnohem vyšší (více než 7násobný). U motoru Zetor 1505 byl vliv použitého paliva na genotoxicitu emisí nízký: méně než 25 % pokles hladiny DNA aduktů pro řepkový olej ve vzorcích s S9 a nulový vliv pro vzorky bez S9. Extrakty z pevných emisí motoru Zetor 1505 poháněného oběma typy paliv indukují 5–10krát vyšší hladiny DNA aduktů než vzorky z motoru Cummins (tabulka 3).

Analýza dávkové závislosti indukce DNA aduktů byla studována pro 2 dávky: koncentrace extraktů odpovídající 0,3 a 3 m³ (motor Cummins) a 0,1 a 1 m³ (motor Zetor) ředěných emisí. Pro všechny vzorky byla pozorována pozitivní dávková závislost tvorby DNA aduktů (tabulka 4), přičemž nebyly detekovány DNA adukty pro nižší dávky 0,3 a 0,1 m³ bez metabolické aktivity S9 frakce.

Byla nalezena silná pozitivní korelace (tabulka 5) mezi obsahem 12 prioritních PAU v extraktech a celkovou hladinou DNA aduktů ve vzorcích s metabolickou aktivací ($R = 0,980$; $p < 0,001$). Tato korelace je ještě silnější pro 7 k-PAU ($R = 0,990$; $p < 0,001$).

DISKUZE

V předcházejících studiích jsme opakovaně prokázali, že genotoxicita organických extraktů z částic vznikajících

spalovacími procesy je spojena zejména s účinkem k-PAU [27–29]. Tyto látky jsou obsaženy v plynných emisích spalovacích motorů a vznikají spalováním paliv i mazacích olejů. Poslední desetiletí jsou charakterizovány masivním využíváním alternativních paliv, včetně biopaliv.

Tato pilotní studie byla provedena s cílem identifikovat možné genotoxické účinky organických extraktů ze vzorků emisí dvou běžných typů naftových motorů poháněných naftou, řepkovým olejem a bionaftou B-100, což je metylester řepkového oleje. Motory byly testovány v laboratorních podmínkách s použitím dynamometru.

Při diskuzi o vztahu mezi genotoxicitou detekovanou jako DNA adukty v nativní DNA a obsahem PAU v pevných emisích je třeba mít na paměti, že z 12 prioritních PAU analyzovaných v této studii jich pouze 7 (k-PAU) indukují DNA adukty po metabolické aktivaci S9 frakcí [23]. V této studii byl celkový obsah prioritních PAU obecně vyšší v naftových emisích než v emisích z řepkového oleje. Naproti tomu obsah k-PAU byl srovnatelný (ESC a NRSC testovací cykly) nebo dokonce vyšší než v emisích z řepkového oleje (WHSC testovací cyklus). Tento rozdíl je pro srovnání toxicity emisí velmi důležitý. Studie srovnávající obsah PAU v motorových emisích z nafty a řepkového oleje poskytují rozporuplná data. U motorů s nepřímým vstříkáváním poháněných neesterifikovanými rostlinnými oleji byl pozorován nižší obsah PAU než u motorů poháněných klasickou naftou [30]. Další studie [3]

Tab. 3: Celkové hladiny DNA aduktů indukované extrahovatelnou organickou hmotou z částic emisí motorů poháněných naftou, řepkovým olejem a bionaftou B100

Motor Vstříkovaní paliva	Testované palivo	Testovací cyklus	DNA adukty/10 ⁸ nukleotidů				+S9/-S9
			na mg TPM ^a		na kWh ^b		
			+S9 ^c	-S9 ^d	+S9	-S9	
Cummins ISBe4 Common Rail	Nafta	2 × ESC-modifikovaný	16,8	7,4	517	228	2,27
	Řepkový olej	4 × ESC-modifikovaný	15,9	6,1	378	145	2,61
	Bionafta B-100	2 × ESC-modifikovaný	21,4	7,2	433	145	2,99
	Nafta	2 × WHSC	31,5	13,9	217	96	2,26
	Řepkový olej	2 × WHSC	22,1	1,8	159	13	12,2
Zetor 1505 řadové čerpadlo	Nafta	1 × NRSC	15,9	4,5	2932	828	3,54
	Řepkový olej	1 × NRSC	11,7	4,3	2351	874	2,69

^aVzorky DNA byly inkubovány s množstvím extraktů odpovídajícím 3 m³ (motor Cummins) nebo 1 m³ (motor Zetor) ředěného vzorku emisí. Hodnoty představují průměr ze dvou měření s odchylkou nejvýše ± 15 %.

^bDNA adukty na kWh výkonu.

^cS metabolickou aktivací jaterní mikrosomální frakcí S9.

^dBez metabolické aktivace jaterní mikrosomální frakcí S9.

uvádí 2–3krát vyšší emise PAU pro nízkozátěžový test ECE-15, o 60 % nižší nebo až o 100 % vyšší emise PAU při testovacím cyklu FTP-75, o 40–75 % nižší pro ESC cyklus a o 90 % nižší pro pěti-modální test motorů pro zemědělské stroje ve srovnání s motory poháněnými naftou. Naproti tomu další studie uvádí významně nižší emise PAU pro motor Perkins poháněný slunečnicovým olejem s tím, že většina PAU nepochází přímo ze spalování paliva, ale zejména z desorpce PAU v minulosti deponovaných ve výfukovém systému [31]. Lea-Langton [32] prokazuje zvýšené emise při částečném zatížení, naopak další studie uvádí relativně nízké emise při částečném zatížení ve srovnání s plným zatížením motoru, přičemž emise PAU byly ve všech případech nižší pro rostlinný olej než pro naftu [33]. Nižší emise PAU pro rostlinný olej jsou také uváděny ve studii [34]. Jak ukazuje naše studie, hladiny PAU v PM jsou silně závislé na typu motoru a použitém testovacím cyklu. Tyto rozdíly, spolu s experimentálními nejistotami, jsou pravděpodobně hlavním důvodem rozporných výsledků publikovaných různými autory.

Podobně jako studie porovnávající obsah PAU v emisích motorů poháněných naftou a biopalivy, také studie o toxicitě těchto emisí jsou rozporuplné. Emise z řepkového oleje byly 4krát více cytotoxické než emise z nafty [35]. V *in vitro* testech na bakteriích byla za většinu mutagenní aktivity emisí z bionafty zodpovědná rozpustná organická frakce, zejména PAU [36]. Jiné studie [3, 36] prokazují o řád vyšší mutagenitu emisí z rostlinného oleje v Amesově testu v porovnání s naftou, ačkoli Thuneker [37] ve svých experimentech žádný rozdíl nepozoroval. Jak je uvedeno výše, naše studie prokázala, že PM z naftou poháněných motorů obecně obsahuje více PAU na kWh výkonu, ale koncentrace k-PAU včetně B[a]P jsou velmi podobné nebo dokonce nižší než u motorů poháněných řepkovým olejem. V dřívějších studiích jsme opakovaně prokázali [21, 26, 27], že hladiny k-PAU v environmentálních komplexních směsích jsou spolehlivými indikátory genotoxicity. V této studii jsme našli silnou pozitivní korelaci mezi obsahem PAU a celkovými hladinami DNA aduktů ve vzorcích s metabolickou aktivací mikrosomálními enzymy. Silná asociace

mezi obsahem k-PAU v extraktech a celkovou hladinou DNA aduktů je zřejmá z porovnání výsledků pro oba motory Cummins a Zetor 1505. Průměrné koncentrace k-PAU byly přibližně 9krát vyšší a celkové DNA adukty přibližně 8krát vyšší pro motor Zetor než pro motor Cummins.

Je zajímavé, že významná (ačkoli slabší) korelace hladin DNA aduktů s obsahem 12 prioritních PAU byla zjištěna i pro vzorky bez metabolické aktivace frakcí S9. Protože PAU nejsou schopny tvořit DNA adukty bez této metabolické aktivace, je pravděpodobné, že přítomnost PAU v komplexní směsi je indikátorem přítomnosti dalších genotoxických látek. Tyto látky mohou zahrnovat nitrované a hydroxylované deriváty PAU [38, 39]. V minulosti jsme prokázali, že některé nitro-PAU jsou mnohem více genotoxické než původní PAU [25] a jejich příspěvek k celkové genotoxicitě by mohl být významný. Genotoxicita jiných látek než PAU v motorových emisích je v této studii podpořena silným aduktem A detekovaným ve všech vzorcích bez metabolické aktivace.

Hlavním omezením této studie je fakt, že byla studována genotoxicita organických extraktů a nikoli částic emisí samotných. Tyto extrakty nemohou být použity pro kvantifikaci některých dalších důležitých účinků částic, např. oxidačního poškození. Metoda je dále založena na předpokladu, že genotoxické látky jsou po depozici částic v plicích z těchto částic účinně uvolněny. Jedna z předchozích studií [40] prokazuje, že vysoce lipofilní karcinogeny

Tab. 4: Dávková závislost indukce DNA aduktů extrakty z částic motorových emisí

Motor Vstříkovaní paliva	Testované palivo	Testovací cyklus	DNA adukty/10 ⁸ nukleotidů			
			0,3 m ³		3 m ³	
			+S9 ^b	-S9 ^c	+S9	-S9
Cummins ISBe4 Common Rail	Nafta	2 × ESC-modifikovaný	2,96	n.d.	14,8	6,52
	Řepkový olej	4 × ESC-modifikovaný	2,67	n.d.	10,8	4,15
	Bionafta B-100	2 × ESC-modifikovaný	2,04	n.d.	12,4	4,14
	Nafta	2 × WHSC	0,19	n.d.	3,67	1,62
	Řepkový olej	2 × WHSC	0,51	n.d.	2,69	0,22
Zetor 1505 řadové čerpadlo	Nafta	1 × NRSC	3,03*	n.d.	16,5**	4,66**
	Řepkový olej	1 × NRSC	5,52*	n.d.	13,2**	4,92**

^aVzorky DNA byly inkubovány s množstvím extraktů odpovídajícím 3 m³ (motor Cummins) nebo 1 m³ (motor Zetor) ředěného vzorku emisí. Hodnoty představují průměr ze dvou měření s odchylkou nejvýše ± 15 %.

^bS metabolickou aktivací jaterní mikrosomální frakcí S9.

^cBez metabolické aktivace jaterní mikrosomální frakcí S9.

*dávkovány extrakty z emisí odpovídající 0,1 m³.

**dávkovány extrakty z emisí odpovídající 1 m³.

Tab. 5: Korelace hladin DNA aduktů indukovaných extrakty z částic motorových emisí s obsahem PAU vázaných na částice

	DNA adukty/10 ⁸ nukleotidů			
	+S9		-S9	
	R ^a	p ^b	R ^a	p ^b
12 prioritních PAU ¹	0,980	<0,001	0,906	0,002
7 karcinogenních PAU ²	0,990	<0,001	0,739	0,004

^aPearsonův korelační koeficient pro log-log transformované proměnné.

^bVýznamnost (2-tailed).

^{1,2}Seznam 12 PAU a 7 k-PAU je v kapitole Materiál a metodika.

jako B[a]P jsou z cca 80 % deponovány v alveolární oblasti plic, odkud jsou nemetabolizované transportovány do krve, zatímco cca 20 % částic je deponováno v dýchacích cestách, odkud je pomalu uvolňováno a aktivováno na reaktivní metabolity. Extrakce částic emisí dichlormetanem, použitá v této studii, je jistě účinnější než desorpce v plicích *in vivo*, nehledě na omezenou depozici částic samotných. Nicméně výsledky uvedené výše ukazují, že většina k-PAU je rychle desorbována po depozici částic.

ZÁVĚR

Acelulární test s nativní DNA prokázal srovnatelnou genotoxicitu organické složky částic emisí motorů poháněných klasickou naftou a řepkovým olejem. Pro všechny testy a paliva vedla metabolická aktivace (+S9) k několikanásobnému zvýšení genotoxicity oproti vzorkům bez aktivace (-S9), což ukazuje na hlavní příspěvek k-PAU k celkové genotoxicitě. Ukázali jsme, že genotoxicita motorových emisí je více ovlivněna typem motoru a použitým testovacím cyklem než typem paliva. Tyto výsledky musí být chápány jako předběžné a v současnosti plánujeme detailnější studii k jejich ověření s širším výběrem motorů a paliv, testů toxicity a též za podmínek reálného provozu.

Poděkování

Studie byla provedena s finanční podporou Evropského programu LIFE+ (LIFE10 ENV/CZ/651), Ministerstva životního prostředí ČR a Grantové agentury České republiky (P503/12/G147).

LITERATURA

- [1] Kittelson, D. B., Watts, W. F., Johnson, J. P.: On-road and laboratory evaluation of combustion aerosols. Part 1: Summary of diesel engine results. *J. Aerosol Sci.* 37, 2006, s. 913-930.
- [2] Kittelson, D. B., Watts, W. F., Johnson, J. P., Schauer, J. J., Lawson, D. R.: On-road and laboratory evaluation of combustion aerosols. Part 2: Summary of spark ignition engine results. *J. Aerosol Sci.* 37, 2006, s. 931-949.
- [3] Krahl, J.: Comparison of emissions and mutagenicity from biodiesel, vegetable oil, GTL and diesel fuel. SAE Technical Paper No. 2007-01-4042, Society of Automotive Engineers, Warrendale, PA, USA, 2007.
- [4] Bünger, J., Krahl, J., Munack, A., Ruschel, Y., Schröder, O., Emmert, B., Westphal, G., Müller, M.: Strong mutagenic effects of diesel engine emissions using vegetable oil as fuel. *Arch. Toxicol.* 81, 2007, s. 599-603.
- [5] Durbin, T.D., Collins, J., Norbeck, J., Smith, M.: Effects of biodiesel, biodiesel blends, and a synthetic diesel on emissions from light heavy-duty diesel vehicles. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2000, s. 349-355.
- [6] Knothe, G., Sharp, C. A., Ryan, T. W.: Exhaust emissions of biodiesel, petrodiesel, neat methyl esters, and alkanes in a new technology engine. *Energy Fuel* 20, 2006, s. 403-408.
- [7] Czerwinski, J., Zimmerli, Y., Kasper, M., Meyer, M.: A modern HD-diesel engine with rapeseed oil, DPF and SCR. SAE Technical Paper No. 2008-01-1382, Society of Automotive Engineers, Warrendale, PA, USA, 2008.
- [8] Vojtisek-Lom, M., Pechout, M., Blažek, J., Moc, L., Hlavenka, T.: Effects of current and prior operating conditions on particulate matter emissions from a diesel engine operated on heated rapeseed oil. SAE Technical Paper No. 2009-01-1913, Society of Automotive Engineers, Warrendale, PA, USA, 2009.
- [9] Lance, D., Andersson, J.: Emissions performance of pure vegetable oil in two European light duty vehicles. SAE Technical Paper No. 2004-01-1881, Society of Automotive Engineers, Warrendale, PA, USA, 2004.
- [10] Karavalakis, G., Fontaras, G., Ampatzoglou, D., Kousoulidou, M., Stournas, S., Samaras, Z., Bakeas, E.: Effects of low concentration biodiesel blends application on modern passenger cars. Part 3: Impact on PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH emissions. *Environ. Pollut.* 158, 2010, s. 1584-1594.
- [11] Lapuerta, M., Armas, O., Rodríguez-Fernández, J.: Effect of biodiesel blends on diesel engine emissions. *Progr. Energy Combust. Sci.* 34, 2008, s. 198-223.
- [12] Zou, L., Atkinson, S.: Characterising vehicle emissions from the burning of biodiesel made from vegetable oil. *Environ. Technol.* 24, 2003, s. 1253-1260.
- [13] Yang, H. H., Chien, S. M., Lo, M. Y., Lan, J. C. W., Lu, W. C., Ku, Y. Y.: Effects of biodiesel on emissions of regulated air pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons under engine durability testing. *Atmos. Environ.* 41, 2007, s. 7232-7240.
- [14] Finch, G. L., Hobbs, C. H., Blair, L. F., Barr, E. B., Hahn, F. F., Jaramillo, R. J., Kubatko, J. E., March, T. H., White, R. K., Krone, J. R., Ménache, M. G., Nikula, K. J., Mauderly, J. L., Van Gerpen, J., Merceica, M. D., Zielinska, B., Stankowski, L., Burling, K., Howell, S.: Effects of subchronic inhalation exposure of rats to emissions from a diesel engine burning soybean oil-derived biodiesel fuel. *Inhal. Toxicol.* 14, 2002, s. 1017-1048.
- [15] Mauderly, J. L.: Toxicological and epidemiological evidence for health risks from inhaled engine emissions. *Environ. Health Perspect.* 102, 1994, s. 165-171.
- [16] Vojtisek-Lom, M., Blažek, J., Dufek, M., Fenkl, M.: Investigation of combustion rates and injection and ignition onset of heated rapeseed oil in direct-injection turbodiesel engines. SAE Technical Paper 2009-01-1914, Society of Automotive Engineers, Warrendale, PA, USA, 2009.
- [17] Vojtisek-Lom, M., Pechout, M., Mazac, M.: Experimental investigation of rapeseed oil combustion in a modern common-rail diesel engine. SAE Technical Paper 2011-24-0104, Society of Automotive Engineers, Warrendale, PA, USA, 2011.
- [18] Li, H., Banner, C. D., Mason, G. G., Westerholm, R. N., Rafter J. J.: Determination of polycyclic aromatic compounds and dioxin receptor ligands present in diesel exhaust particulate extracts. *Atmos. Environ.* 30, 1996, s. 3537-3546.
- [19] Kado, N. Y., Okamoto, R. A., Kuzmicky, P. A., Rathbun C. J., Hsieh, D. P. H.: Integrated supercritical fluid extraction, bioassay and chemical screening methods for analyzing vapor-phase compounds of an environmental complex mixture: Diesel exhaust. *Chemosphere* 33, 1996, s. 495-516.
- [20] Vojtisek-Lom, M., Pechout, M., Mazač, M., Dittrich, A., Čihák, M.: Particulate matter measurement with an improvised full-flow dilution tunnel. In: Proc. of 42nd Intern. Sci. Conference KOKA 2011, Žilina, Slovakia, Sept. 7-9, 2011. *Technológ* 3, 2011, ISSN 1337-8996.

MEDETOX

- [21] Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC-WHO, Vol. 92, 2010.
- [22] Smith, W. A., Arif, J. M., Gupta, R. C.: Effect of cancer chemopreventive agents on microsome-mediated DNA adduction of the breast carcinogen dibenzo[*a,l*]pyrene. *Mutat. Res.* 412, 1998, s. 307–314.
- [23] Binkova, B., Topinka, J., Sram, R. J., Sevastyanova, O., Novakova, Z., Schmuczerova, J., Kalina, I., Popov, T., Farmer, P. B.: In vitro genotoxicity of PAH mixtures and organic extract from urban air particles: Part I: Acellular assay. *Mutat. Res.* 620, 2007, s. 114–122.
- [24] Gupta, R. C.: Enhanced sensitivity of ³²P-postlabeling analysis of aromatic carcinogen: DNA adducts. *Cancer Res.* 45, 1985, s. 5656–5662.
- [25] Reddy, M. V., Randerath, K.: Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of 32P-postlabelling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* 7, 1986, s. 1543–1551.
- [26] Phillips, D. H., Castegnaro, M.: Standardization and validation of DNA adduct postlabelling methods: report of interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis* 14, 1999, s. 301–315.
- [27] Topinka, J., Schwarz, L. R., Wiebel, F. J., Cerna, M., Wolff, T.: Genotoxicity of urban air pollution in the Czech Republic. Part 2: DNA adduct formation in mammalian cells by extractable organic matter. *Mutat. Res.* 469, 2000, s. 83–93.
- [28] Topinka, J., Rossner Jr., P., Milcova, A., Schmuczerova, J., Svecova, V., Sram, R. J.: DNA adducts and oxidative DNA damage induced by organic extracts from PM_{2.5} in an acellular assay. *Toxicol. Lett.* 198, 2010, s. 304–311.
- [29] Topinka, J., Hovorka, J., Milcova, A., Schmuczerova, J., Krouzek, J., Rossner Jr., P., Sram, R. J.: DNA adducts and oxidative DNA damage induced by organic extracts from PM_{2.5} in an acellular assay. *Toxicol. Lett.* 202, 2011, s. 186–192.
- [30] Kalam, M. A., Saifullah, M. G., Masjuki, H. H., Husnawan, M., Mahlia, T. M. I.: PAH and other emissions from coconut oil blended fuels. *J. Sci. & Industr. Res.* 67, 2008, s. 1031–1035.
- [31] Abbass, M. K., Andrews, G. E., Williams, P. T., Bartle, K. D., Davies, I. L., Lalah, J. O.: The composition of the organic fraction of particulate emissions of a diesel engine operated on vegetable oil. SAE Technical Paper 901563. Society of Automotive Engineers, Warrendale, PA, USA, 1990.
- [32] Lea-Langton, A.: Comparison of particulate PAH emissions for diesel, biodiesel and cooking oil using a heavy duty DI diesel engine. SAE Techn. Paper C2008-01-1811. Society of Automotive Engineers, Warrendale, PA, USA, 2008.
- [33] Mills, G. A., Howard, A. G.: Preliminary investigation of polynuclear aromatic hydrocarbon emissions from a diesel engine operating on vegetable oil-based alternative fuels. *J. Inst. Energy* 56, 1983, s. 131–137.
- [34] Dorn, B., Wehmann, C., Winterhalter, R., Zahoransky, R.: Particle and gaseous emissions of diesel engines fuelled by different non-esterified plant oils. SAE Technical Paper No. 2007-24-0127, Society of Automotive Engineers, Warrendale, PA, USA, 2007.
- [35] Mauderly, J. L.: Health issues concerning inhalation of petroleum diesel and biodiesel exhaust. In: *Plant Oils as Fuels: Present State of Science and Future Developments* (Martini, N., Schell, J., eds.). Berlin: Springer Verl. 1997, s. 92–103.
- [36] Bünger, J., Krahl, J., Baum, K., Schröder, O., Müller, M., Westphal, G., Ruhna, P., Schulz, T. G., Hallier, E.: Cytotoxic and mutagenic effects, particle size and concentration analysis of diesel engine emissions using biodiesel and petrol diesel as fuel. *Arch. Toxicol.* 74, 2000, s. 490–498.
- [37] Thuncke, K., Emberger, P., Gassner, T., Remmele, E.: Mutagenic potential of particle emissions of a vegetable oil compatible tractor. Proc. of 16th European Biomass Conference & Exhibition, Valencia, Spain, 2–6 June, 2008.
- [38] Park, E. J., Roh, J., Kang, M. S., Kim, S. N., Kim, Y., Coi, S.: Biological responses to diesel exhaust particles (DEPs) depend on the physicochemical properties of the DEPs. *PLoS ONE* 6, 2011, s. 10
- [39] Claxton, L. D., Matthews, P. P., Warren, S. H.: The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: salmonella mutagenicity. *Mutat. Res.* 567, 2004, s. 347–399.
- [40] Gerde P, Muggenburg, B. A., Lundborg, M., Dahl, A. R.: The rapid alveolar absorption of diesel soot-adsorbed benzo[*a*]pyrene: bioavailability, metabolism and dosimetry of an inhaled particle-borne carcinogen. *Carcinogenesis* 22, 2001, s. 741–749.

NANOČÁSTICE EMITOVANÉ SPALOVACÍMI MOTORY V MĚSTSKÉM PROVOZU

Michal Vojtíšek

Technická univerzita v Liberci, michal.vojtisek@tul.cz

ABSTRAKT

Nanočástice jsou považovány za nejrizikovější složku výfukových plynů spalovacích motorů, protože se zachycují v plicních sklípcích, mají schopnost pronikat buněčnou membránou do krevního oběhu a dodávají do organismu složitou směs více i méně škodlivých organických sloučenin vznikajících spalováním uhlíkatých paliv a mazacích olejů. Snížení limitu celkové hmotnosti částic nepřineslo předpokládané proporcionální snížení emise nanočástic, naopak s narůstající intenzitou silniční dopravy a využíváním stavebních a dalších strojů dochází

NANOPARTICLES EMITTED BY COMBUSTION ENGINES IN URBAN TRAFFIC

Nanoparticles are considered to be the most dangerous component of internal combustion engine exhaust, as they are efficiently retained in human lung alveoli and they can penetrate through cell membrane into blood, delivering a complex mixture of hazardous organic compounds formed by the combustion of fuel and lubricating oil. The emissions of nanoparticles have not been reduced in proportion to the total particulate mass, but, to the contrary, are increasing with the