

**Mgr inż. Agnieszka Kozłowska**

**Tytuł rozprawy doktorskiej: „Biopaliwa jako środowiskowe zagrożenie zdrowia - analiza właściwości mutagennych i cytotoksycznych ekstraktów organicznych wybranych mieszanek biodiesla”**

**Promotor rozprawy: Dr hab. n. med. Lucyna Kapka-Skrzypczak, prof. IMW**

### **Streszczenie**

Biodiesel to paliwo przeznaczone do napędzania silników wysokoprężnych. Zawiera w swym składzie biologiczny komponent w postaci metylowych estrów kwasów tłuszczowych (FAME – ang. *Fatty Acid Methyl Esters*) lub uwodornionych olejów roślinnych (HVO – ang. *Hydrotreated Vegetable Oil*). FAME, otrzymywane jest głównie poprzez transestryfikację olejów roślinnych. HVO to paliwo uzyskiwane na drodze katalitycznej hydrogenacji, podczas której usuwany jest tlen i wiązania nienasycone ze struktur triglicerydów.

Celem pracy była ocena właściwości mutagennych organicznych ekstraktów wybranych organicznych mieszanek biodiesla z wykorzystaniem mikroplótkowego testu Ames oraz dokonanie analizy aktywności biologicznej w kontekście ich oddziaływania na metabolizm komórkowy makrofagów mysich RAW 264.7 a w perspektywie – na organizm ludzki.

Na stanowisku do wytwarzania i badania spalin w *Laboratorium Badań Emisji Spalin Instytutu Badań i Rozwoju Motoryzacji BOSMAL* w Bielsku Białej, pobrano próbki pyłów ze spalin na filtry teflonowe, wykorzystując samochód osobowy z silnikiem wysokoprężnym. Próbkę pobierano według znormalizowanego Nowego Europejskiego Cyklu Jeźdźnego (ang. *New European Driving Cycle*, NEDC), służącego do oceny toksyczności spalin i zużycia paliwa. Pył pobrany na filtry ekstrahowano w aparacie Soxhleta przy użyciu chlorku metylenu. Następnie rozpuszczalnik odparowano w atmosferze azotu, a suche organiczne ekstrakty rozpuszczono. Przebadano różne mieszanki paliw: B0 (olej napędowy, ON), B7 (7% FAME + 93% ON), B15 (15% FAME + 85% ON), B30 (30% FAME + 70% ON), B100 (biodiesel), HVO30 (30% HVO + 70% ON).

Do badania mutagenności organicznych ekstraktów z wybranych mieszanek biodiesla zastosowano test Ames MPF Fluctuation Assay, w formacie mikroplótkowym opracowany przez Xenometrix (Szwajcaria) zgodnie z wytycznymi OECD 471 (ang. *Organization for Economic Co-operation and Development*) i wykorzystano szczepy bakterii *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 i YG1024. Szczep TA98 wykrywa mutacje powodujące przesunięcie ramki, natomiast szczep TA100 wykrywa mutacje powodujące zmiany par zasad Z kolei szczep YG1024 posiada

wbudowany plazmid pYG233, dzięki któremu jest on wyjątkowo czuły na działanie nitrowych i aminowych związków aromatycznych. Test Amesa prowadzony był w dwóch wariantach: bez aktywacji i z aktywacją metaboliczną.

Badania cytotoksyczności ekstraktów mieszanek biodiesla prowadzono na liniach komórkowych RAW 264.7. Do badań wykorzystano test MTT który umożliwia pomiar aktywności przemian energetycznych w mitochondriach. Zasada testu polega na określeniu żywotności komórek za pomocą testu redukcji soli tetrazolowej MTT – bromku 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazolu – (substratu rozpuszczonego w wodzie o żółtym zabarwieniu) do nierozpuszczalnego formazanu (o zabarwieniu fioletowym). Przekształcenie soli tetrazolowych do formazanu przebiega w mitochondriach w żywych, aktywnych metabolicznie komórkach. Jeżeli komórki zostały wcześniej uszkodzone lub zniszczone przez toksynę, to reakcja ta jest mniej intensywna lub nie zachodzi w ogóle, co można stwierdzić po zmianie barwy i oznaczyć spektrofotometrycznie przy długości fali 570nm.

We wszystkich badanych organicznych ekstraktach biodiesla zaobserwowano zależność dawka – odpowiedź. Zarówno olej napędowy (B0) jak i estry metylowe kwasów tłuszczowych (B100) wykazały bardzo duże właściwości mutagenne dla szczepu TA98. Nieco niższą odpowiedź aktywności mutagennej uzyskano dla tego samego szczepu w wariacie z aktywacją metaboliczną (+S9). Mutagenne związki wywołujące podstawienie pary zasad w DNA w przypadku szczepu TA100 obecne były w ekstraktach HVO30 i B7. Najbardziej mutagenne właściwości uzyskano dla organicznego ekstraktu HVO30 w obu badanych wariantach w przypadku szczepu TA100. Znacznie wyższe wartości aktywności mutagennej (AM) uzyskano w teście Ames MPF dla szczepu YG1024. Najbardziej mutagenny okazał się organiczny ekstrakt uzyskany z oleju napędowego (B0). Po zastosowaniu frakcji mikrosomalnej S9 zaobserwowano znaczny spadek aktywności mutagennej badanych próbek.

W przypadku wyników z testu cytotoksyczności we wszystkich próbkach stwierdzono zależność śmierci komórek makrofagów mysich od zastosowanej dawki. Im wyższa testowana dawka badanych próbek tym niższa przeżywalność komórek. Najbardziej cytotoksyczna dla linii komórkowej RAW264.7 okazała się mieszanka ON z 30% zawartością HVO (HVO30), najmniej B100 i B7.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że potencjał mutagenny ekstraktów organicznych wybranych biopaliw uzależniony jest od zawartości poszczególnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych jak również ich sumarycznej zawartości. Potencjał mutagenny badanych ekstraktów biopaliw oraz czystego oleju napędowego był wysoki a najwyższym z nich charakteryzowały się ekstrakty zawierające 15% i 30% biokomponentu rzepakowego. Wyniku testu Ames z zastosowaniem szczepów TA98 oraz YG1024 wskazują na obniżenie aktywności

mutagennej mieszanek z dodatkiem biokomponentów uwodornionych olejów roślinnych, w porównaniu do oleju napędowego. Niemniej jednak stwierdzono, że mieszanka ta zawiera w swoim składzie znaczną ilość amin aromatycznych i nitrowych pochodnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych o działaniu bezpośrednim (bez dodatku frakcji mikrosomalnej S9) na bakterie *Salmonella typhimurium* szczepu YG1024, które mogą stanowić zagrożenie dla ludzi ze względu na łatwość wchłaniania trucizn przez układ oddechowy i możliwość wystąpienia szybkiego działania toksycznego. Najniższą mutagennością dla organizmów żywych charakteryzował się biodiesel z 7% zawartością biokomponentu rzepakowego. Natomiast cytotoksyczność ekstraktów organicznych z biodiesla dla komórek makrofagów mysich wzrastała wraz z zawartością biokomponentu w składzie mieszanki. Podsumowując można wnioskować, iż narażenie człowieka na spaliny z biodiesla może prowadzić do powstawania mutacji w komórkach, co z kolei w konsekwencji może przyczyniać się do indukcji procesu nowotworowego.

## Summary

Biodiesel is a fuel designed for the propulsion of diesel engines. In its composition it contains a biological component in the form of Fatty Acid Methyl Esters (FAME) or Hydrotreated Vegetable Oil (HVO). FAME is obtained mainly by the transesterification of plant oil. HVO is the fuel obtained by catalytic hydrogenation, during which oxygen and unsaturated bonds are removed from the structures of triglycerides.

The objective of the study was evaluation of the mutagenic properties of organic extracts in selected organic biodiesel mixtures, using the Ames microplate format test, and performance of analysis of biological activity in the context of their effect on cell metabolism of mouse macrophages RAW 264.7, and in perspective – on the human body.

At the workplace for the production and examination of fumes in the *Laboratory for Fumes Emission at the Institute for Studies and Development of Motorisation* BOSMAL in Bielsko Biala, dust samples were collected on teflon filters, using a passenger car with a diesel engine. The samples were collected according to the standardized New European Driving Cycle (NEDC), for assessment of the toxicity of fumes and fuel consumption. Dust collected on the filters was extracted in a Soxhlet apparatus using methylene chloride. Subsequently, the solvent was evaporated under nitrogen conditions, and dry organic extracts dissolved in dimethyl sulfoxide. Various fuel mixtures were examined: B0 (diesel oil, ON), B7 (7% FAME + 93% ON), B15 (15% FAME + 85% ON), B30 (30% FAME + 70% ON), B100 (biodiesel), and HVO30 (30% HVO+ 70% ON).

Mutagenicity of organic extracts selected from biodiesel mixtures was investigated using the Ames MPF Fluctuation Assay in microplate format designed by Xenometrix (Switzerland), according to the recommendations by the OECD 471 (*Organization for Economic Co-operation and Development*), and the strains of bacteria *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 and YG1024 were used. The strain TA98 detects mutations causing frameshift, whereas the strain TA100 detects mutations causing a base-pair change. In turn, the strain YG1024 contains the plasmid pYG233, due to which it is especially sensitive to the effect of aromatic nitro and amino compounds. The Ames test was performed in two variants: with and without metabolic activation.

The study of cytotoxicity of the extracts of biodiesel mixtures was conducted on cell-lines RAW 264.7, using the MTT test, which enables measurement of the activity of energy transformation in mitochondria. The test consists in the determination of the viability of cells by means of tetrazolium salt 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (yellow water-soluble substrate) which is reduced to purple water-insoluble formazan. The transformation of tetrazolium salt to formazan takes place in mitochondria in live, metabolically active cells. If the cells had been previously damaged or destroyed by the toxin, the reaction is less

intense or does not take place at all, which may be observed based in the change of colour, and determined spectrophotometrically at the wave length of 570nm.

The relationship dose-response was observed in all the examined organic biodiesel extracts. Both diesel oil (B0) and fatty acid methyl esters (B100) show very strong mutagenic properties for the strain TA98. A slightly weaker mutagenic activity response was obtained for the same strain in the variant with metabolic activation (+S9). Mutagenic compounds generating the replacement of base pairs in the DNA in the case of the strain TA100 were present in the extracts HVO30 and B7. The strongest mutagenic properties were obtained for the organic abstract HVO30 in both investigated variants in the case of the strain TA100. Considerably higher values of mutagenic activity (MA) were obtained in the Ames MPF test for the strain YG1024. The organic extract obtained from diesel oil (B0) occurred to be most mutagenic. After the use of microsomal fraction S9, a considerable decrease was observed in the mutagenic activity of the examined samples.

Considering the results of test for cytotoxicity, in all samples the relationship was observed between death of mouse macrophage cells and the dose applied. The higher the tested dose of the examined samples, the lower the survival of cells. The most toxic for the cell line RAW264.7 was the mixture of ON with 30% content of HVO (HVO30), while the least toxic - B100 and B7. Based on the results of the study, it was found that the mutagenic potential of organic extracts of the selected biofuels depends on the content of individual polycyclic aromatic hydrocarbons, and well as the total value of PAH. The mutagenic potential of the examined biofuel extracts and pure diesel oil was high, with the highest potential observed for extracts containing 15% and 30% of rapeseed bio-component. The results of the Ames test with the use of the strains TA98 and YG1024 indicate a decrease in mutagenic activity of mixtures with the addition of hydrogenated plant oils biocomponents, compared to diesel oil. However, it was found that this mixture contains in it composition a considerable amount of aromatic and nitro amines derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons acting directly (without the addition of microsomal fraction S9) on the bacteria *Salmonella typhimurium* of the strain YG1024, which may create risk for humans due to easy absorption of poisons via the respiratory system, and the possibility of the occurrence of a rapid toxic effect. The lowest mutagenicity for live organisms was observed for biodiesel with 7% of rapeseed component. In turn, cytotoxicity of organic extracts from biodiesel for mouse macrophage cells increased with the content of biocomponent in the composition of the mixture. Summing up, it may be presumed that human exposure to biodiesel fumes may lead to the development of mutations in cells which, in consequence, may contribute to the induction of the cancerous process.