

**Aus dem Institut für Technologie und Biosystemtechnik**

**Jürgen Bünger  
Hendrik Stein**

**Jürgen Krahl  
Michael Müller**

**Partikelemissionen und Mutagenität von  
herkömmlichem Dieselkraftstoff, schwedischem  
Dieselkraftstoff MK 1 und Biodiesel**

Manuskript, zu finden in [www.fal.de](http://www.fal.de)

Published in: Landbauforschung Völkenrode Sonderheft 239,  
pp. 115-120

**Braunschweig  
Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL)  
2003**

## Partikelemissionen und Mutagenität von herkömmlichem Dieselkraftstoff, schwedischem Dieselkraftstoff MK 1 und Biodiesel

Jürgen Bünger<sup>1</sup>, Jürgen Krahl<sup>2, 3</sup>, Hendrik Stein<sup>3</sup>, Michael Müller<sup>1</sup>

### Zusammenfassung

Trotz nicht eindeutiger wissenschaftlicher Beweise sind Dieselmotoremissionen (DME) in Deutschland und anderen Staaten als krebserregend eingestuft, weil in epidemiologischen Studien eine leicht erhöhte Lungenkrebshäufigkeit bei beruflich durch Dieselabgas exponierten Personen beobachtet wurde und im Tierversuch Lungentumoren an Ratten auftraten. Die krebserregende Wirkung geht von den Partikelemissionen und den daran anhaftenden polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) aus. Die Höhe des kanzerogenen Potenzials lässt sich am effektivsten durch die Untersuchung der erbgutverändernden Wirkung (Mutagenität) an einzelnen Zellen untersuchen.

Wir haben daher die DME-Partikelphase von 3 verschiedenen Dieselkraftstoffen (herkömmlicher Dieselkraftstoff (DK), schwedischer Dieselkraftstoff (MK1) und Biodiesel (RME)) in ihre löslichen und unlöslichen Fraktionen aufgetrennt und die lösliche Fraktion im AMES-Test auf ihre mutagene Wirkung untersucht.

Im Vergleich zu DK waren sowohl die Gesamtmassen als auch die unlöslichen Fraktionen der emittierten Partikel bei der Verbrennung von MK1 und RME in den drei untersuchten Lastpunkten immer deutlich niedriger. Die Mutagenität der Partikelextrakte war bei Verwendung von RME als Kraftstoff in allen getesteten Betriebspunkten am niedrigsten. Dieser Unterschied ist mit großer Wahrscheinlichkeit durch den sehr niedrigen Gehalt an Schwefel und PAK im Biodiesel bedingt. MK1 hatte im Vergleich zu herkömmlichem DK ebenfalls eine deutlich niedrigere mutagene Wirkung. Dies ist wahrscheinlich ebenfalls auf die Absenkung des Schwefelgehaltes zurückzuführen.

Nach den bislang vorliegenden Kenntnissen kann das auf inhalede DME zurückzuführende Gesundheitsrisiko durch den Einsatz von RME als Kraftstoff absinken. Für fossile Dieselkraftstoffe kann ein ähnlicher Effekt sehr wahrscheinlich durch die Absenkung des Gehaltes an Schwefel und Aromaten erzielt werden.

### Einleitung

Eine viel diskutierte chronische Auswirkung der inhalativen Exposition durch Dieselrußpartikeln ist die Kanzerogenese. Während die krebserzeugende Wirkung von partikulären Dieselmotoremissionen im Tierversuch durch die Auslösung von Lungentumoren im Langzeitinhalationsversuch an Ratten eindeutig belegt ist (Heinrich et al., 1986, Heinrich et al., 1995, Nikula et al., 1995), ist die Bedeutung der inhalativen Exposition durch partikuläre Verbrennungsemissionen aus Dieselmotoren für die Induktion von malignen Lungentumoren beim Menschen immer noch umstritten. Epidemiologisch haben eine große Zahl von arbeitsmedizinischen Studien erhöhte relative Risiken von 1,2 bis 1,6 für Lungenkrebs nach langjähriger beruflicher Exposition gegenüber hohen Konzentrationen von Dieselmotoremissionen erbracht, wobei aber die 95%-Konfidenzintervalle (95% KI) in vielen dieser Studien für eine Signifikanz der Ergebnisse zu groß waren (Übersichten bei: Mauderly, 1994, Health Effects Institute, 1995, Bhatia et al., 1998, Health Effects Institute, 1999, Nold und Bochmann, 1999). Neben diesem epidemiologisch nur gering erhöhten Risiko wurde die Kausalität des Zusammenhangs auch aus anderen Gründen angezweifelt (Stöber und Abel, 1996, Muscat, 1996, Crump, 1999). So wiesen die meisten der oben genannten Studien erhebliche Mängel bei der Expositionsabschätzung und der Berücksichtigung von Confoundern (Rauchen, Asbest) auf.

Dennoch wurden Dieselmotoremissionen 1987 von der *Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft* (MAK-Kommission) als wahrscheinlich für den Menschen krebserregend eingestuft. Diese Bewertung wurde auch durch den *Ausschuss für Gefahrstoffe* (AGS) des Bundesministeriums für Arbeit und Sozialordnung mit der Aufnahme in die TRGS 905 (Einstufung K2) in nationales Recht überführt. Neben epidemiologischen Studien an beruflich exponierten Kohorten beruhte diese Einschätzung auch auf tierexperimentellen Studien.

Erste Hinweise auf die Kanzerogenität von DME ergab eine Studie aus den 50-er Jahren des vorigen

<sup>1</sup> Zentrum Umwelt- und Arbeitsmedizin, Georg-August-Universität Göttingen, Waldweg 37, D-37073 Göttingen

<sup>2</sup> Institut für Technologie und Biosystemtechnik, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig

<sup>3</sup> Fachhochschule Coburg, Friedrich-Streib-Straße 2, D-96450 Coburg

Jahrhunderts, bei der Extrakte von Dieselrußpartikeln und Kondensate der Gasphase auf die Haut von Mäusen aufgebracht wurden (Kotin et al., 1955). Endgültige Gewissheit über die kanzerogene Wirkung der DME erbrachten Inhalationsstudien, bei denen verschiedene Spezies (Ratte, Maus, syrischer Goldhamster) über 2 Jahre bzw. lebenslang gegenüber DME exponiert wurden. Die Versuche an Ratten zeigten konsistent, dass die Exposition durch hohe Konzentrationen von DME zu einer dosisabhängigen Inzidenz von Lungentumoren führt (Heinrich et al., 1986, Ishinishi et al., 1986, Iwai et al., 1986, Mauderly et al., 1987). Im Gegensatz zu diesen eindeutigen Ergebnissen an Ratten waren die Untersuchungen am syrischen Hamster durchweg negativ. Die Inhalationsstudien an Mäusen ergaben uneinheitliche Ergebnisse. (Übersicht bei Busby und Newberne, 1995).

Die Relevanz dieser Daten für die Abschätzung des humanen Lungenkrebsrisikos durch Dieselmotoremissionen wird sehr kontrovers beurteilt. Auffällig ist beispielsweise, dass die Tumoren in der Rattenlunge meist im Alveolarbereich entstehen, beim Menschen jedoch im Bronchialbaum (Pott und Roller, 1997). Darüber hinaus entstehen Tumoren in der Rattenlunge in der Regel erst durch eine Partikelkonzentration, bei der die Reinigungsfunktion (Clearance) überlastet wird (Health Effect Institute, 1995). Unterhalb einer Dosis von 2 mg Dieselpartikeln/m<sup>3</sup> Luft traten in diesen Inhalationsstudien keine statistisch signifikanten Anstiege der Lungentumorraten bei Ratten auf (Heinrich et al., 1995, Nikula et al., 1995).

Mechanistisch scheint es sowohl einen nicht genotoxischen als auch einen genotoxischen Schädigungsweg durch die in den Atemwegen deponierten Partikel von DME zu geben. Während die unlöslichen Anteile der Partikel über eine Aktivierung von Makrophagen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen und über die Ausschüttung von Zytokinen und anderen Mediatoren zu einer Inflammation mit Zellschädigung und Zellproliferation mit der Folge der Hyperplasie und der Fibrose führen, können die von den Partikeln desorbierten PAK zur Bildung von DNA-Addukten und Punktmutationen führen (Bond et al., 1988, Health Effects Institute, 1995).

Die hohe mutagene Potenz von Dieselpartikelextrakten wurde erstmals von Huisingh et al. (1978) beschrieben und wurde mittlerweile von vielen anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Clark und Vigil, 1980, Claxton und Barnes, 1981, Lewtas, 1983). Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch die Partikel selbst (Brooks et al., 1980, Siak et al., 1981, Belisario et al., 1984) und die Kondensate der Gasphase von DME im Ames-Test mutagen sind (Stump et al., 1982, Rannug et al., 1983, Matsushita et al., 1986).

Die direkte Mutagenität von Dieselrußpartikeln wird substituierten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen zugeschrieben, vor allem den Nitro-PAK (Wang et al., 1978, Pedersen und Siak, 1981, Ohe, 1984). Die nativen PAK müssen in aktive Metabolite überführt werden, um mutagen zu wirken. Im Ames-Test wird diese metabolische Aktivierung durch Rattenlebermikrosomen, deren Enzyme durch eine Vorbehandlung der Ratten mit Arochlor oder anderen enzyminduzierenden Substanzen induziert wurden, erreicht (Clark und Vigil, 1980). In einer Reihe von Untersuchungen wurden Nitro-PAK als Hauptverursacher der *in vitro*-Gentoxizität organischer Extrakte aus Dieselmotorabgasen identifiziert (Übersicht in: Rosenkranz und Mermelstein, 1983).

### Ziel der toxikologischen Untersuchungen

Neben der Weiterentwicklung der Motortechnologie und der Abgasnachbehandlung wurde in den letzten Jahren auch die Kraftstoffforschung intensiviert, um die neuen EU-Grenzwerte einhalten zu können. In diesem Zusammenhang wurde einerseits der Schwefelgehalt von Mineralöldiesel gesenkt, andererseits Kraftstoffen aus regenerativen Quellen (Pflanzenölmethylester, Biodiesel) verstärkt Aufmerksamkeit gewidmet (Krahl et al., 1998).

Da nicht alle gesundheitsrelevanten Dieselmotorabgasbestandteile bekannt sind, und die bisher untersuchten wegen ihrer großen Anzahl nicht alle quantitativ erfasst werden können, war es das Ziel der toxikologischen Studien, die partikulären Dieselmotoremissionen als Gemisch bei Verbrennung von Biodiesel im Vergleich zu fossilem Dieselkraftstoff mit einer *in vitro*-Methode (Ames-Test) auf ihre biologischen Wirkungen zu untersuchen und aus arbeits- und umweltmedizinischer Sicht zu bewerten.

### Material und Methoden

#### *Extraktion der filtergesammelten Partikel*

Aus dem Institut für Technologie und Biosystemtechnik der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft wurden mit Abgaspartikulat belegte Glasfaserfilter gekühlt zur Verfügung gestellt. Für jeden der 3 untersuchten Kraftstoffe (DK, MK1, RME) wurden je 5 Filterpaare und ein Referenzfilterpaar der Betriebspunkte 1, 3 und 6 des 13-Stufen-Tests (ECE R 49) untersucht. Die filtergesammelten Partikulate wurden einer Soxhlet-Extraktion mit Dichlormethan im Dunkeln unterzogen (Claxton, 1983). Dieses Verfahren ermöglicht die effektivste Gewinnung von Mutagenen aus Dieselabgaspartikulat (Siak et al., 1981). Das Filtergewicht wurde vor und nach der Extraktion

ermittelt und die lösliche Fraktion berechnet. Die gewonnenen Extrakte wurden im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft. Für den Ames-Test wurde der eingetrocknete Extrakt in 4 ml DMSO gelöst.

#### Mutagenitätsuntersuchung (Ames-Test)

Der sogenannte Ames-Test (Ames et al., 1973 und 1975) deckt die mutagenen Eigenschaften eines weiten Spektrums von chemischen Substanzen und Gemischen durch Rückmutationen in einer Serie von verschiedenen Teststämmen auf. Diese tragen Mutationen im Histidin-Operon. Die Mutationen bedingen eine Histidin-Auxotrophie der Teststämme im Gegensatz zu den Wildtypen von *Salmonella typhimurium*, die Histidin-prototroph sind. Der Ames-Test ist das weltweit am häufigsten eingesetzte in-vitro-Testverfahren (OECD-Methode 471), um die Mutagenität komplexer Gemische, wie z.B. von Verbrennungsprodukten, zu untersuchen. Die hier vorliegende Studie benutzte das revidierte Standardtestprotokoll von Maron und Ames aus dem Jahr 1983 mit den Teststämmen TA 98 und TA 100. TA 98 deckt Rasterschub-Mutationen und TA 100 Basenpaar-Substitutionen auf. Die Teststämme wurden freundlicherweise von Prof. B.N. Ames zur Verfügung gestellt.

Die Tests wurden mit und ohne metabolische Aktivierung durch mikrosomale Monooxygenasen (S9-Fraktion) durchgeführt. Die Präparation der S9-Fraktion aus Lebern von jungen Sprague-Dawley-Ratten wurde entsprechend der Anleitung von Maron und Ames (1983) durchgeführt. Für die Induktion der Leberenzyme wurden Phenobarbital und  $\beta$ -Naphthoflavon anstatt des polychlorierten Biphenyls Arochlor-1254 benutzt (Matsushima et al. 1976). Die mutagenen Methylmethansulfonat (MMS), 2-Amino-fluoren (2-AF) und 3-Nitrobenzantron (3-NBA) wurden als Positivkontrollen verwandt.

Direkt vor der Testung wurden die Extrakte in 4 ml DMSO gelöst. Ebenfalls unter Verwendung von DMSO wurde eine absteigende Verdünnungsreihe hergestellt, die für die Tests eingesetzt wurde. 2-AF (100  $\mu\text{g/ml}$ ) und 3-NBA (1  $\text{ng/ml}$ ) wurden ebenfalls in DMSO gelöst. MMS wurde mit destilliertem Wasser (10  $\mu\text{g/ml}$ ) verdünnt. Flüssiger Top-Agar (2,5 ml) der 0,05 mmol Histidin und 0,05 mmol Biotin enthielt, wurde mit 100  $\mu\text{l}$  einer Testkonzentration der Extrakte und 100  $\mu\text{l}$  einer Übernachtskultur eines Teststammes gemischt. Nach kurzem Schütteln auf einem Vortex-Gerät wurde das Gemisch direkt auf eine Minimal-Agarplatte, die Vogel-Bonner-E-Medium enthielt, verteilt. Jede Testkonzentration wurde mit beiden Teststämmen und mit und ohne Zusatz von 4%-igem S9 untersucht. Jeder Extrakt wurde doppelt

getestet. Die Tests wurden im Abstand von 1 bis 2 Wochen wiederholt.

Die Kolonienzahl der Rückmutanten auf den Petrischalen wurde nach 48 Stunden Inkubation bei 37 °C im Dunkeln gezählt. Das Hintergrundwachstum der Bakterien wurde regelmäßig mittels Lichtmikroskopie überprüft, da hohe Konzentrationen der Extrakte toxisch auf die Teststämme wirken und zu einer Ausdünnung des Hintergrundes sowie zu einem Rückgang der Mutationen führen können. Die Auszählung der Platten wurde mit Hilfe eines elektronischen Kolonienzählgerätes (Cardinal, Perceptive Instruments, Haverhill, Großbritannien) durchgeführt. Routinemäßig wurden zur Kontrolle 10 % der Platten handgezählt. Entsprechend der Kriterien von Ames et al. (1975) wurden die Ergebnisse als positiv gewertet, wenn die Kolonienzahl der Rückmutationen auf den Petrischalen eine Verdopplung der spontanen Mutationsrate und eine dosisabhängige, reproduzierbare Dosis-Wirkungs-Beziehung aufwiesen.

#### Ergebnisse und Diskussion

Je nach Lastpunkt zeigten die **Partikelmassen** ein unterschiedliches Verhalten. Im Vergleich zu DK war die Gesamtmasse der emittierten Partikel bei Verbrennung von MK1 und RME in den drei Lastpunkten aber immer deutlich niedriger (Abbildung 1).

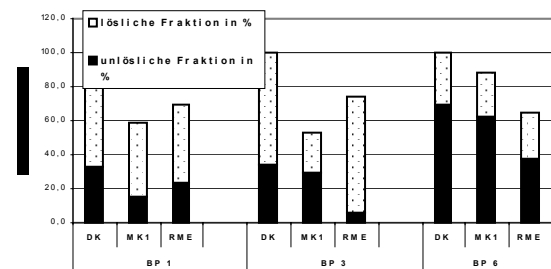


Abbildung 1:

Partikelmassen und lösliche Fraktionen der DME von DK, MK1 und RME im relativen Vergleich (DK = 100%).

Die löslichen Fraktionen verhielten sich insgesamt ähnlich wie die Gesamtmassen. Der sehr hohe prozentuale Anteil der löslichen Fraktionen bei niedriger Last spricht dafür, dass diese Fraktionen zu einem großen Anteil aus unverbranntem Kraftstoff bestehen.

Der Anteil unlöslicher Komponenten des Abgases, der näherungsweise dem Ruß entspricht, war insgesamt bei RME deutlich geringer als bei DK und MK1. Die in zahlreichen epidemiologischen Studien belegten Gesundheitsrisiken durch Partikelemissionen werden zu einem wesentlichen Teil auf den Rußausstoß von Dieselfahrzeugen zurückgeführt (Health Effects Institute, 1995). Daher ist die Reduktion der

unlöslichen Fraktion des Partikulates im RME-Betrieb aus arbeits- und umweltmedizinischer Sicht besonders positiv zu werten.

Die **Mutagenität** der Partikelextrakte auf den Teststamm TA98 war bei Verwendung von RME als Kraftstoff in allen getesteten Betriebspunkten am niedrigsten (Abbildung 2), wie dies auch in früheren Studien an anderen Motoren und Fahrzeugen nachgewiesen werden konnte (Bünger et al., 1998, Bagley et al., 1998, Bünger et al., 2000a, Bünger et al., 2000b). Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit durch den sehr niedrigen Gehalt an Schwefel (<10 ppm) und das Fehlen von polyzyklischen Aromaten im Biodiesel bedingt.

MK1 hatte im Vergleich zu herkömmlichem DK ebenfalls eine deutlich niedrigere mutagene Wirkung auf den Teststamm TA98. Dies ist vermutlich ebenfalls auf die Absenkung des Schwefelgehaltes im MK1 (2 ppm) im Vergleich zu DK (320 ppm) zurück-

zuführen. Je nach Schwefelgehalt des Kraftstoffs tragen Sulfationen, die aus dem im Abgas entstehenden Schwefeldioxid gebildet werden, zur Bildung der unlöslichen Partikelfraktion bei. Steigender DK-Schwefelgehalt bewirkt eine Zunahme der emittierten Partikelmasse bei verschiedenen Dieselmotoren (Rasmussen, 1990, Sjögren et al., 1996). Der Schwefelgehalt zeigt auch eine statistisch signifikante Assoziation zur Mutagenität von DK-Abgasextrakten (Sjögren et al., 1996).

Der mutagene Effekt auf den Teststamm TA100 war deutlich niedriger als im TA98, spiegelte aber insgesamt die gleichen Verhältnisse wider. Die Testung mit metabolischer Aktivierung durch mikrosomale Monoxygenasen ergab keine Verstärkung der Mutagenität. Die Revertanzahlen waren durchweg niedriger als im Test ohne Aktivierung.

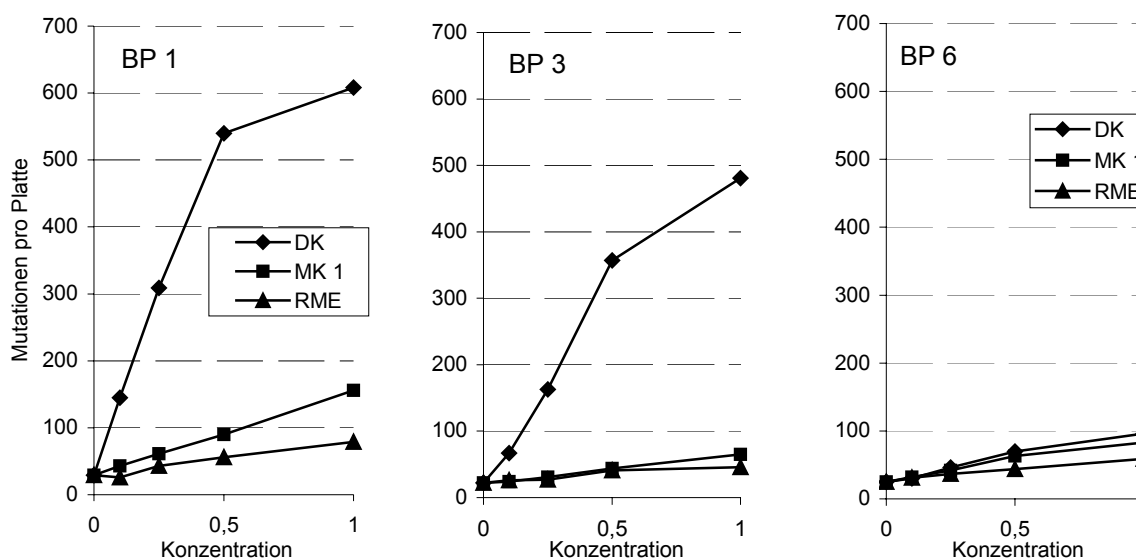


Abbildung 2:

Dosis-Wirkungs-Kurven der mutagenen Wirkung der Partikelextrakte auf den Teststamm TA98 in den Betriebspunkten 1, 3 und 6.

Auch der Gehalt des Kraftstoffs an polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) hat offensichtlich einen Einfluss auf die Mutagenität der Abgase. Bei DK stieg die Mutagenität in mehreren Studien deutlich mit dem Aromatengehalt des Kraftstoffs an (Clark et al., 1982, Crebelli et al., 1995, Rasmussen, 1990, Sjögren et al., 1996). Den größten Einfluss auf die Mutagenität ermittelten Sjögren et al. (1996) für folgende PAK und substituierte PAK: Picen, Phenanthrene, 2-Methylanthracen, 3-Methylphenanthren und Fluoranthren. Für die Phenanthrene wurde auch

schon von Clark et al. (1982) über eine starke Assoziation mit der Mutagenität von DK-Abgasextrakten berichtet. Der getestete DK enthielt 6,2 Gew.-% PAK, der MK1 weniger als 0,02 Gew.-%. Da RME normalerweise keine PAK enthält, ist hierin wahrscheinlich der Grund für die noch niedrigere Mutagenität im Vergleich zu MK1 zu sehen.

Wie die deutlich niedrigere Mutagenität der DME von MK1 und RME zeigt, lassen sich die krebserregenden Wirkungen von DME durch die Reduktion des PAK- und Schwefelgehaltes der Kraftstoffe effek-

tiv absenken. Biodiesel hat dabei den Vorteil, dass er von Natur aus praktisch schwefel- und PAK-frei ist.

#### Literatur

- Ames B N, Lee F D, Durston W E** (1973) An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**, 782 - 786
- Ames B N, McCann J, Yamasaki E** (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* **31**, 347 - 363
- Bagley S T, Gratz L D, Johnson J H, McDonald J F** (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 M A, Buonocore V, De Marinis E, De Lorenzo F** (1984) Biological availability of mutagenic compounds adsorbed onto diesel exhaust particulate. *Mutat Res* **135**, 1 - 9
- Bhatia R, Lopipero P, Smith A H** (1998) Diesel exhaust exposure and lung cancer. *Epidemiology* **9**, 84 - 91
- Bond J A, Wolff R K, Harkema J R, Mauderly J L, Henderson R F, Griffith W C, Mc Clellan R O** (1988) Distribution of DNA adducts in the respiratory tracts of rats exposed to diesel exhaust. *Toxicol Appl Pharmacol* **96**, 336 - 346
- Brooks A L, Wolff R K, Royer R E, Clark C R, Sanchez A, McClellan R O** (1980) Biological availability of mutagenic chemicals associated with diesel exhaust particles; in: *Health Effects of Diesel Engine Emissions*. In: Pepelko W E, Danner R M, Clarke N A (eds); EPA/600/9-80/57a; U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, USA
- Bünger J, Krahl J, Franke H U, 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 M M, Krahl J, Baum K, Weigel A, Hallier E, Schulz T G** (2000a) Mutagenicity of diesel engine particles from two fossil and two plant oil fuels. *Mutagenesis* **15**, 391 - 397
- Bünger J, Krahl J, Baum K, Schröder O, Müller M, Westphal G, Ruhnau P, Schulz T, Hallier E** (2000b) Comparison of diesel engine emissions from biodiesel and petrol diesel fuel: Particle size and number analysis, cytotoxic and mutagenic effects. *Arch Toxicol* **74**, 490 - 498
- Busby W F Jr, Newberne P M** (1995) Diesel emissions and other substances associated with animal carcinogenicity; in: *Diesel exhaust: A critical analysis of emissions, exposure, and health effects*; hrsg. v. Health Effects Institute, Cambridge, USA, 187 - 220
- Clark C R, Vigil C L** (1980) Influence of rat lung and liver homogenates on the mutagenicity of diesel exhaust particulate extracts. *Toxicol Appl Pharmacol* **56**: 100 - 115
- Clark C R, Henderson T R, Royer R E, Brooks A L, McClellan R O, Marshall W F, Naman T M** (1982) Mutagenicity of diesel exhaust particle extracts: Influence of fuel composition in two diesel engines. *Fundam Appl Toxicol* **2**, 38 - 43
- Claxton L D** (1983) Characterization of automotive emissions by bacterial mutagenesis bioassay: a review. *Environ Mutagen* **5**, 609 - 631
- Claxton L D, Barnes H M** (1981) The mutagenicity of diesel-exhaust particle extracts collected under smoke-chamber conditions using the Salmonella typhimurium test system. *Mutat Res* **88**, 255 - 272
- Crelli R, Conti L, Crochi B, Carere A, Bertoli C, Del Giacomo N** (1995) The effect of fuel composition on the mutagenicity of diesel engine exhaust. *Mutat Res* **346**, 167 - 172
- Crump K S** (1999) Lung cancer mortality and diesel exhaust: Reanalysis of a retrospective cohort study of U.S. Railroad workers. *Inhal Toxicol* **11**, 1 - 17
- Deutsche Forschungsgemeinschaft** (1987) *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten: Dieselmotoremissionen*. Wiley-VCH, Weinheim
- Deutsche Forschungsgemeinschaft, Senatskommission zur Prüfung gesundheits-schädlicher Arbeitsstoffe** (2000) *MAK- und BAT-Werte-Liste*. Wiley-VCH, Weinheim
- 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, USA
- Health Effects Institute** (1999) *Diesel exhaust and lung cancer: Epidemiology and quantitative risk assessment. A special report of the institute's diesel epidemiology expert panel*. Cambridge, USA
- 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, Belmann 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
- Huisingh J, Bradow R, Jungers R, Claxton L, Zweidinger R, Tejada S, Bumgarner J, Duffield F, Waters M** (1978) Application of bioassay to the characterization of diesel particle emissions: In: Waters M D, Nesnow S, Huisingh J L, Sandhu S S, Claxton L D (eds) *Application of short-term bioassay in the fractionation and analysis of complex environmental mixtures*. New York Plenum Press, pp 382 - 418
- Ishinishi N, Kuwabara N, Nagase S, Suzuki T, Ishiwata S, Kohno T** (1986) Long-term inhalation studies on effects of exhaust from heavy and light duty diesel engines on F344 rats. In: Ishinishi N, Koizumi A, Mc Clellan RO, Stöber W (eds) *Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust*. New York: Elsevier Science Publishing, pp 329 - 348
- Iwai K, Udagawa T, Yamagishi M, Yanada H** (1986) Long-term inhalation studies of diesel exhaust on 344 SPF rats. In: Ishinishi N, Koizumi A, Mc Clellan RO, Stöber W (eds) *Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust*. New York: Elsevier Science Publishing, pp 349 - 360
- Kotin P, Falk HL, Thomas M** (1955) Aromatic hydrocarbons: III. Presence in the particulate phase of diesel-engine exhausts and the carcinogenicity of exhaust extracts. *Arch Ind Health* **11**, 113 - 120
- Krahl J, Bünger J, Munack A** (1998) Biodiesel exhaust emissions and determination of their environmental and health effects. In: Martini N, Schell J (eds) *Plant oils as fuels: present state of science and future developments*. Berlin: Springer, pp 104 - 122
- Lewtas J** (1983) Evaluation of the mutagenicity and carcinogenicity of motor vehicle emissions in short-term bioassays. *Environ Health Perspect* **47**, 141 - 152
- Maron DM, Ames BN** (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* **113**, 173 - 215
- Matsushima T, Sawamura M, Hara K, Sugimura T** (1976) A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system. In: Serres F J, Fouts J R, Bend J R, Philpot R M (eds) *In vitro metabolic activation in mutagenesis testing*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland, pp 85 - 88

- Matsushita H, Goto S, Endo O, Lee J, Kawai A** (1986) Mutagenicity of diesel exhaust and related chemicals. In: Ishinishi N, Koizumi A, McClellan RO, Stöber W (eds) *Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust*. New York: Elsevier Science Publishing, pp 103 - 118
- Mauderly J L** (1994) Toxicological and epidemiological evidence for health risks from inhaled diesel engine emissions. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 4, 165 - 171
- Mauderly J L, Jones R K, Griffith W C, Henderson R F, McClellan R** (1987) Diesel exhaust is a pulmonary carcinogen in rats exposed chronically by inhalation. *Fundam Appl Toxicol* 9, 208 - 221
- Muscat J E** (1996) Carcinogenic effects of diesel emissions and lung cancer: the epidemiologic evidence is not causal. *J Clin Epidemiol* 49, 891 - 892
- Nikula K J, Snipes M B, Barr E B, Griffith W C, Henderson R F, Mauderly J L** (1995) Comparative pulmonary toxicities and carcinogenicities of chronically inhaled diesel exhaust and carbon black in F344 rats. *Fundam Appl Toxicol* 25, 80 - 94
- Nold A, Bochmann F** (1999) Epidemiologische Ergebnisse zu Dieselmotoremissionen und Lungenkrebs: Eine Synopse. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* 59, 289 - 298
- Ohe T** (1984) Mutagenicity of photochemical reaction products of polycyclic aromatic hydrocarbons with nitrite. *Sci Total Environ* 39, 161 - 175
- Pederson T C, Siak J S** (1981) The role of nitroaromatic compounds in the direct-acting mutagenicity of diesel particle extracts. *J Appl Toxicol* 1, 54 - 60
- Pott F, Roller M** (1997) Current data and questions of interest on the carcinogenicity of solid particles of diesel engine exhaust and other sources. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 200, 223 - 280
- 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
- Rasmussen R E** (1990) Effect of fuel properties on mutagenic activity in extracts of heavy-duty diesel exhaust particulate. *J Air Waste Manage Assoc* 40, 1391 - 1396
- Rosenkranz H S, Mermelstein R** (1983) Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes. All nitro-containing chemicals were not created equal. *Mutat Res* 114, 217 - 267
- Siak J S, Chan J L, Lee P S** (1981) Diesel particulate extracts in bacterial test systems. *Environ Int* 5, 243 - 248
- Sjögren M, Li H, Banner C, Rafter J, Westerholm R, Rannug U** (1996) Influence of physical and chemical characteristics of diesel fuels and exhaust emissions on biological effects of particle extracts: A multivariate statistical analysis of ten diesel fuels. *Chem Res Toxicol* 9, 197 - 207
- Stöber W, Abel U R** (1996) Lung cancer due to diesel soot particles in ambient air? A critical appraisal of epidemiological studies addressing this question. *Int Arch Occup Environ Health* 68 Suppl, 3 - 61
- Stump F, Bradow R, Ray W, Dropkin D, Zwedinger R, Sigsby J, Snow R** (1982) Trapping gaseous hydrocarbons for mutagenic testing; Paper No. 820776; Society of Automotive Engineers, Warrendale, USA
- Technische Regeln für Gefahrstoffe TRGS 905** (1997) Verzeichnis krebserzeugender, erbgutverändernder oder fortpflanzungsgefährdender Stoffe. *BArbBl.*, Nr. 6, 40 - 46, geändert durch *BArbBl.* 1997, Nr. 11, 27, geändert durch *BArbBl.* 1998, Nr. 5, 72 - 73, geändert durch *BArbBl.* 1998, Nr. 10, 76, geändert durch *BArbBl.* 1999, Nr. 4, 46
- Wang, Y Y, Rappaport S M, Sawyer R F, Talcott R E, Wei E T** (1978) Direct-acting mutagens in automobile exhaust. *Cancer Lett* 5, 39 - 47