



Wpływ biopaliw na częstość występowania mikrojąder w komórkach CHO-9 i A549¹

Effect of biofuels on frequency of micronuclei in CHO-9 and A549 cells¹

JOLANTA SKOWROŃ

<https://orcid.org/0000-0003-4550-5339>

e-mail: josko@ciop.pl

LIDIA ZAPÓR

<https://orcid.org/0000-0002-7398-4608>

KATARZYNA MIRANOWICZ-DZIERŻAWSKA

<https://orcid.org/0000-0003-0013-5047>

Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy
Central Institute for Labour Protection – National Research Institute, Warsaw, Poland

Streszczenie

Biopaliwa mają wiele zalet, które czynią je atrakcyjnym źródłem energii, jednak ich wpływ na organizm człowieka nie został jeszcze w pełni poznany. W artykule przedstawiono wyniki badań przeprowadzonych różnymi metodami w warunkach *in vitro* nad działaniem genotoksycznym czterech biopaliw otrzymanych w procesie transestryfikacji tłuszczów odpadowych. Badania uszkodzeń DNA (badanie mikrojąder) powodowanych przez biopaliwa przeprowadzono na komórkach nabłonka płuc pochodzenia nowotworowego (A549) oraz komórkach jajnika chomika chińskiego (CHO-9). Badane biopaliwa powodowały statystycznie istotny wzrost częstości występowania mikrojąder w komórkach CHO-9 ($p < 0,05$) w zależności od zastosowanych stężeń. Nie powodowały one jednak statystycznie znaczącego wzrostu częstości występowania mikrojąder w komórkach A549. Wyniki przeglądu baz danych (głównie MEDLINE i EMBASE) pozwoliły wskazać cztery główne źródła zagrożeń dla zdrowia ludzkiego, które są związane ze stosowaniem biopaliw: ryzyko zawodowe, zanieczyszczenie wody/gleby, zanieczyszczenie powietrza związane z produkcją i stosowaniem biopaliw oraz wpływ na ceny żywności. Wyniki przedstawionych badań stanowią jedynie etap oceny toksykologicznej biopaliw, których wpływ na komórki zależy od ich składu chemicznego i od rodzaju komórek stosowanych do badań. Biopaliwo II, otrzymywane z tłuszczu zwierzęcego i zawierające największe stężenie estrów metylowych kwasów tłuszczowych, wykazało działanie genotoksyczne (częstość występowania mikrojąder) w komórkach jajnika chomika chińskiego CHO-9. Przedstawione wyniki badań pozwolą producentom i użytkownikom biopaliw zapoznać się z ryzykiem związanym z ich produkcją i stosowaniem. Zakres tematyczny artykułu obejmuje zagadnienia zdrowia oraz bezpieczeństwa i higieny środowiska pracy będące przedmiotem badań z zakresu nauk o zdrowiu i inżynierii środowiska.

Słowa kluczowe: biopaliwa, genotoksyczność, test mikrojądrowy, *in vitro*, nauki o zdrowiu, inżynieria środowiskowa.

¹ Opracowano i wydano na podstawie wyników IV etapu programu krajowego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, dofinansowanego w latach 2017–2019 w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego/Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. Projekt nr II.N.12 pt. „Ocena metodami *in vitro* odległych skutków działania wybranych biopaliw II generacji produkowanych w procesie transestryfikacji tłuszczów odpadowych”. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

This paper has been based on the results of a research task carried out within the framework of the National Programme, Phase IV: ‘Improvement of safety and working conditions’, partly supported in the years 2017–2019 – within the scope of research and development – by the Ministry of Science and Higher Education/National Centre for Research and Development. Task no. II.N.12 ‘Assessment by *in vitro* methods the effects of 2nd generation biofuels obtained by transesterification waste fats’. The Central Institute for Labour Protection – National Research Institute is the Programme’s main co-ordinator.

Abstract

Biofuels have a number of advantages that make them an attractive source of energy. However, their effect on the human body has not been fully understood. The article presents the results of studies on the genotoxic effect of four biofuels obtained in the process of transesterification of waste fats with in vitro methods. DNA damage tests (micronucleus test) of biofuels were carried out on the cells of: neoplastic lung epithelium (A549) and Chinese hamster ovary (CHO-9). The tested biofuels caused a statistically significant increase in the frequency of micronuclei in CHO-9 cells ($p < 0.05$), depending on the concentrations used. However, they did not induce a statistically significant increase in the frequency of micronuclei in A549 cells. The results of the database review (mainly MEDLINE and EMBASE) identified four main sources of human health risks from biofuels: occupational hazards, water / soil contamination, air pollution from biofuel production and use, and the impact on food prices. The results of the presented studies are only a step in the toxicological assessment of biofuels, the effect of which on cells depends on their chemical composition and the type of cells used for the tests. Biofuel II, obtained from animal fat, containing the highest concentration of fatty acid methyl esters showed the strongest genotoxic effect (induced frequency of micronuclei) on CHO-9 Chinese hamster ovary cells. The presented research results could familiarize the producers and users of biofuels with the risks associated with their use. This article discusses the problems of occupational safety and health, which are covered by health sciences and environmental engineering.

Keywords: biofuels, genotoxicity, micronucleus assay, in vitro, health sciences, environmental engineering.

WPROWADZENIE

Rosnące globalne zużycie paliw ciekłych i duża emisja zanieczyszczeń do atmosfery w wyniku spalania tych paliw, a także globalne zmiany klimatu sprawiły, że konieczne stało się pilne poszukiwanie alternatywnych paliw odnawialnych. Obowiązująca w Polsce ustawa o biokomponentach i biopaliwach ciekłych z dnia 25 sierpnia 2006 r. wraz ze zmianami jako biopaliwa definiuje:

- a) benzyny silnikowe zawierające powyżej 10% objętościowo biokomponentów lub powyżej 22% objętościowo eterów, z wyłączeniem benzyn silnikowych zawierających biowęglowodory,
- b) olej napędowy zawierający powyżej 7% objętościowo biokomponentów, z wyłączeniem oleju napędowego zawierającego biowęglowodory ciekłe,
- c) bioetanol, biometanol, biobutanol, ester, bioeter dimetylowy, czysty olej roślinny, biowęglowodory ciekłe, bio propan-butan, skroplony biometan, sprężony biometan oraz biowodór – stanowiące samoistne paliwa (Ustawa o biokomponentach z 2022 r.; Dyrektywa 2009/28/WE).

Celem Unii Europejskiej jest zwiększenie do 2030 r. udziału energii odnawialnej w transporcie do co najmniej 14% z minimalnym udziałem 3,5% zaawansowanych biopaliw (zużyty olej kuchenny, tłuszcze zwierzęce zaliczone do kategorii

zagrożenia 1 i 2 zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1069/2009). Państwa UE są zobowiązane do nałożenia na dostawców paliw obowiązku, który zapewni osiągnięcie tego celu (Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2018/2001 z dnia 11 grudnia 2018 r. w sprawie promowania stosowania energii ze źródeł odnawialnych).

W literaturze przedmiotu opisano trzy generacje biopaliw (Joshi i in. 2017):

- biopaliwa pierwszej generacji, np. biodiesel, bioetanol, biometanol, tj. paliwa produkowane z surowców uzyskanych z biomasy pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego, głównie z produktów rolnych pierwotnie wyprodukowanych jako żywność, np. olej roślinny lub buraki cukrowe, z których produkowany jest odpowiednio biodiesel i bioetanol,
- biopaliwa drugiej generacji uzyskane z surowców nienadających się do spożycia przez ludzi i zwierzęta i/lub biopaliwa uzyskane z substancji odpadowych. Grupa ta obejmuje również biopaliwa, których podstawę stanowią oleje posmażalnicze (Skowroń, Golimowski 2015),
- biopaliwa trzeciej generacji produkowane z biomasy alg (Joshi i in. 2017; Lee, Lavoie 2013).

Różnice między każdą generacją biopaliw dotyczą surowca (żywność lub produkty inne niż

żywność) i zastosowanej technologii (Joshi i in. 2017).

Obecnie biopaliwo stanowi dominującą formę biomasy (Guarrieiro, Guarrieiro 2013). Biopaliwo produkuje się z olejów lub tłuszczów, wykorzystując reakcje transestryfikacji lub estryfikacji. Pod względem chemicznym składa się ono głównie z estrów metyloowych (lub etyloowych) kwasów tłuszczowych. Biopaliwo ma podobne właściwości jak paliwo na bazie oleju mineralnego i może być stosowane w postaci czystej (B100) lub zmieszanej z olejem napędowym w zakresie stężeń 5 ÷ 20% (Bünger i in. 2012), a mieszaniny te są nazwane odpowiednio: B5, B20 lub B100, co odpowiada objętościowemu odsetkowi składnika biopaliwa w mieszaninie z olejem napędowym, tj. odpowiednio: 5; 20 i 100% obj. W wielu państwach europej-

skich, a także w innych państwach, np. w Stanach Zjednoczonych lub Japonii, są dostępne w handlu paliwa z domieszką biopaliw.

Dotychczas większość badań toksyczności dotyczyła produktów spalania biodiesla w silnikach: spaliny, ich ekstrakty, cząstki stałe, tj. mikrocząstki różnej wielkości (Bünger i in. 2012; Lankoff i in. 2017; Kowalska i in. 2017). Znacznie mniej uwagi poświęcono zagadnieniu szkodliwości biopaliw, które mogą być cytotoksyczne i/lub genotoksyczne.

Celem badania było określenie genotoksyczności czterech biopaliw uzyskanych z tłuszczów odpadowych przy zastosowaniu testu tworzenia mikrojąder w warunkach *in vitro* w komórkach jajnika chomika chińskiego CHO-9 i w ludzkich komórkach nabłonka płuc pochodzenia nowotworowego A549.

MATERIAŁY I METODY

Przygotowanie biopaliwa

Badane biopaliwa otrzymano w reakcji transestryfikacji niskotemperaturowej w warunkach laboratoryjnych z: oleju rzepakowego przeterminowanego (BP I), tłuszczu zwierzęcego (BP II), roślinnego oleju posmażalniczego (BP III), (Frąckowiak 2002). Biopaliwo otrzymane w reakcji transestryfikacji surowego oleju rzepakowego (BP IV) pochodziło od producenta.

Przygotowanie podstawowego roztworu biodiesla w podłożu hodowli komórkowej

Na podstawie metody opisanej przez Chou i in. (2003) dla nierozpuszczalnych w wodzie węglodorów aromatycznych badane biopaliwa wstrząsano z podłożem hodowlanym (75% paliwa i 25% medium hodowlanego) w kolbach o pojemności 50 ml przez 18 h w temperaturze pokojowej i odwirowywano przy 400 obr./min. Zastosowano media hodowlane odpowiednie dla różnych linii komórkowych. Następnie warstwę powstałej emulsji po odwirowaniu odciągnano, a komórki narażano na mieszaninę medium z kropelkami tłuszczu (około 4 ml) zgodnie z założeniem, że będzie ono roztworem nasyconym estrów kwasów tłuszczowych, które odpowiednio rozcieńczano, przyjmując 75-procentowy roztwór badanego biopaliwa

w medium jako 100%, aby otrzymać zakres stężeń do ustalenia zależności stężenie-skutek. Badane biopaliwa nie rozpuszczały się w mediach hodowlanych, ale tworzyły mieszaninę medium i tłuszczu w postaci odrębnych kropli różnej wielkości, zawieszonych w medium, podobnych do oczek tłuszczu w rosole.

Badania identyfikacyjne składu 75-procentowych roztworów badanych biopaliw przeprowadzono z wykorzystaniem sprzężonych technik chromatografii gazowej z detekcją spektrometrii mas. Na podstawie sumarycznej powierzchni pików zidentyfikowanych estrów metyloowych kwasów tłuszczowych w badanych biopaliwach stwierdzono, że największe stężenie estrów oznaczano w biopaliwie II, czyli w biopaliwie otrzymanym z tłuszczu zwierzęcego. Oszacowano, że stężenie estrów kwasów tłuszczowych w biopaliwie I było o 23%, w biopaliwie III o 30%, a w biopaliwie IV o 78% niższe w stosunku do biopaliwa II (dane niepublikowane).

Hodowla komórkowa i podawanie biopaliw

Linie komórek ludzkiego nabłonka płuc pochodzenia nowotworowego A549 oraz linię komórek jajnika chomika chińskiego CHO-9 zakupiono w American Type Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Do hodowli komórek

nabłonka płuc pochodzenia nowotworowego (A549) stosowano medium Eagle'a w modyfikacji Dulbecco (DMEM), (numer kat. 31550-023) oraz płodową surowicę bydlęcą (numer kat. 10084-150), Antibiotic-Antimycotic (penicillin G sodium, streptomycin sulfate i amphotericin), (numer kat. 15240062) firmy Gibco BRL oraz roztwór trypsyny (0,25%) i EDTA (numer kat. T-4049) firmy Sigma. Do hodowli komórek jajnika chomika chińskiego CHO-9 stosowano medium F-10 (Ham) z L-glutaminą (numer kat. 31550-023) oraz płodową surowicę bydlęcą (numer kat. 10084-150), Antibiotic-Antimycotic (penicillin G sodium, streptomycin sulfate i amphotericin), (numer kat. 15240062) firmy Gibco BRL oraz roztwór trypsyny (0,25%) i EDTA (numer kat. T-4049) firmy Sigma.

Komórki A549 oraz CHO-9 przetrzymywano w warunkach sterylnych, w inkubatorze z dostępem 5% CO₂, w stałej temperaturze 37 °C i wilgotności 95%. Wzrost hodowli oceniano pod mikroskopem. Co kilka dni (w zależności od obserwowanego wzrostu) medium odżywcze wymieniano w celu zapewnienia komórkom dostępu do czynników wzrostu oraz usunięcia produktów przemiany materii.

Oba rodzaje komórek narażano na działanie różnych stężeń badanych biopaliw, przygotowanych w sposób opisany powyżej, w medium hodowlanym właściwym dla danych komórek. Komórki narażone i komórki kontrolne (bez biopaliwa) były one inkubowane przez 24 h, a następnie były trypsynizowane (0,25-procentowy roztwór trypsyny z EDTA, numer kat. T-4049, marki Sigma) na potrzeby kolejnych etapów eksperymentu.

Analiza genotoksyczności – test mikrojądrowy (MNA)

Genotoksyczność czterech badanych biopaliw oznaczono za pomocą testu mikrojądrowego (MNA). MNA jest jednym z najczęściej stosowanych testów do badania genotoksyczności substancji chemicznych, środków odurzających oraz promieniowania X (Fenech i in. 2011; Kirsch-Volders i in. 2014). Ujednolicony protokół z testu MNA wywodzi się z modyfikacji OECD TG 487 (2014).

Przygotowanie komórek A549 i CHO-9 z biopaliwem do testu MNA

Na szalki Petriego o średnicy 5 cm wysiewano odpowiednio 150 000 komórek jajnika chomika chińskiego CHO-9 lub 200 000 komórek

nabłonka płuc pochodzenia nowotworowego A549 i dodawano po 5 ml odpowiedniego medium hodowlanego. Po 24-godzinnej inkubacji (37 °C, 5% CO₂, wilgotność 95%), czyli po upływie czasu niezbędnego, aby komórki przykleiły się do płytek, do hodowli dodano biopaliwa o odpowiednich stężeniach, wybranych częściowo na podstawie wartości IC₅₀ wyznaczonych w testach NRU i MTT, częściowo na podstawie wyników testu klonogenego (test wydajności tworzenia kolonii, test CFEA), (dane oczekujące na publikację), a częściowo na podstawie wstępnych doświadczeń. Zgodnie z normą OECD TG 487 (2014) komórki inkubowano z biopaliwami przez 24 h. Dla każdej linii komórkowej przeprowadzono cztery doświadczenia. Do każdego doświadczenia stosowano kontrolę ujemną – komórki nie narażone na działanie badanych biopaliw oraz kontrolę dodatnią – komórki narażone promieniowaniem X w dawce 1 lub 2 Gy (defektoskop Smart200 Yxlon pracujący z napięciem 200 kV i natężeniem 4,5 mA, z filtracją Al 3 mm, przy dawce 1,271±0,089 Gy/min). W dwóch ostatnich doświadczeniach dodatkowo za kontrolę ujemną przyjęto hodowle z dodatkiem spożywczego oleju rzepakowego (olej Kujawski).

Test mikrojądrowy – utrwalanie komórek

Po 6 h od aplikacji biopaliw na płytce dodano cytochalazynę B (4,5 µg/ml) w celu zablokowania podziału cytoplazmy (Fenech 2000). Po 24 h od aplikacji biopaliwa usunięto, zastąpiono świeżym podłożem, a komórki inkubowano przez kolejne 2 h w obecności cytochalazyny B (4,5 µg/ml). Po inkubacji supernatant usuwano. Do osadu dodawano, wolno wytrząsając na vorteksie, zimny roztwór hipotoniczny KCl (75 mM). Następnie wirowano i usuwano supernatant. Do osadu dodawano 7 ml mieszaniny metanol: kwas octowy: roztwór Ringera (płyn izotoniczny) w stosunku 4 : 1 : 5, wytrząsając na vorteksie, i zostawiano na 12 h w lodówce. Z każdej kultury wykonano co najmniej dwa szkiełka, nakładając komórki na czyste szkiełka, które utrwalono płynem Antifade VECTASHIELD z DAPI do fluorescencji. Protokół utrwalania komórek opracowano na Uniwersytecie w Gandawie w Belgii i został on z powodzeniem wykorzystany w ramach europejskich projektów dotyczących dozymetrii biologicznej MULTIBIODOSE i RENEB (Thierens i in. 2014; Depuydt i in. 2017).

Analiza częstości występowania mikrojąder (MNA)

Półautomatyczne zliczanie MNA wykonano za pomocą oprogramowania MetaSystems Metafer 4 z komputerem o wysokiej rozdzielczości monochromatycznej megapikselowej matrycy CCD połączonej z mikroskopem (Zeiss Axio ImagerZ2) wyposażonym w odpowiedni filtr fluorescencyjny i stół z napędem silnikowym, który może pomieścić osiem szkiełek.

System wykonuje zdjęcia całych szkiełek mikroskopowych, a następnie umożliwia automatyczne wyszukiwanie komórek dwujądrowych i mikrojąder zgodnie z podanymi algorytmami (klasyfikatorami). W Pracowni Dozymetrii Biologicznej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie stworzono algorytmy zarówno dla linii CHO-9, jak i dla linii A549, które zostały nieznacznie zmodyfikowane dla tego eksperymentu. Komórki dwujądrowe, w których oprogramowanie

Metasystems wykryło mikrojądra, były sprawdzane przez doświadczonych cytogenetyków w celu zweryfikowania liczby zarejestrowanych mikrojąder; w razie potrzeby liczba mikrojąder była korygowana. Taka procedura, znana jako zliczanie półautomatyczne, została opracowana w trakcie trwania projektu MULTIBIODOSE (Thierens i in. 2014). Zastosowano standardowe kryteria identyfikacji mikrojąder wg Bolognesi i Fenecha (2013).

Analiza statystyczna

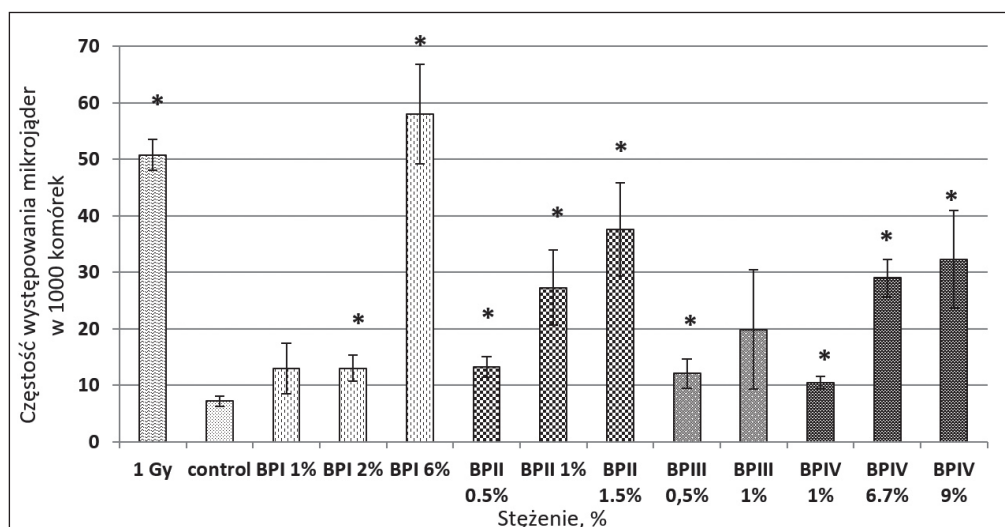
Przeprowadzono co najmniej trzy niezależne eksperymenty w odniesieniu do biopaliw. Wyniki testów wyrażono jako procent nienarażonej kontroli \pm odchylenie standardowe (*standard deviation*, SD). Wartości kontrolne ustalono na 100%. Różnice między próbkami a kontrolą oceniono testem *t*-Studenta. Istotność statystyczną przyjęto na poziomie $p < 0,05$.

WYNIKI

Częstość występowania mikrojąder w komórkach CHO-9, które nie były narażone na działanie badanych biopaliw, wynosiła 7,1 mikrojąder (Mn)/1000 komórek (odchylenie standardowe $\pm 0,9$). Częstość występowania mikrojąder w komórkach CHO-9 po dawce 1 Gy promieni X (kontrola dodatnia) wynosiła 50,8 Mn/1000 komórek (odchylenie standardowe $\pm 2,7$) i była znacznie wyższa od

częstości występowania mikrojąder w hodowli kontrolnej ($p = 0,00002$, dwustronny test *t*-Studenta).

Badane biopaliwa powodowały statystycznie istotny wzrost występowania mikrojąder w komórkach CHO-9 ($p < 0,05$) w zależności od zastosowanych stężeń (ryc. 1).



Rycina 1. Częstość występowania mikrojąder w komórkach CHO-9 poddanych działaniu badanych biopaliw. Słupki przedstawiają częstość występowania mikrojąder w komórkach CHO-9 w wyniku 24-godzinnej narażenia na działanie biopaliwa otrzymanego z przeterminowanego oleju rzepakowego (BP I), tłuszczu zwierzęcego (BP II), posmażalniczego oleju roślinnego (BP III) oraz surowego oleju rzepakowego (BP IV). Wyniki wyrażono jako procent średniej kontrolnej \pm SD trzech niezależnych eksperymentów. Gwiazdka (*) oznacza istotną statystycznie różnicę od hodowli kontrolnej ($p \geq 0,05$)

Każde stężenie biopaliwa I, z wyjątkiem stężenia 1% (różnica statystycznie nieistotna), indukowało powstanie znacznie większej liczby mikrojąder niż w preparatach kontrolnych.

Biopaliwo II spowodowało znaczny wzrost występowania mikrojąder w komórkach CHO-9 przy wszystkich badanych stężeniach (0,5; 1 lub 1,5%).

Biopaliwo III o stężeniu 0,5% spowodowało istotny wzrost częstości występowania mikrojąder w komórkach CHO-9 (ryc. 1). Przy stężeniu wynoszącym 1% stwierdzono ponad dwukrotnie większą liczbę mikrojąder niż w grupie kontrolnej, ale różnica nie była istotna statystycznie (ze względu na dużą wartość SD).

Biopaliwo IV powodowało istotny wzrost częstości występowania mikrojąder w komórkach CHO-9 przy każdym badanym stężeniu, ale badane stężenia były znacznie wyższe niż w przypadku pozostałych badanych biopaliw, tj. 1; 6,7 i 9%.

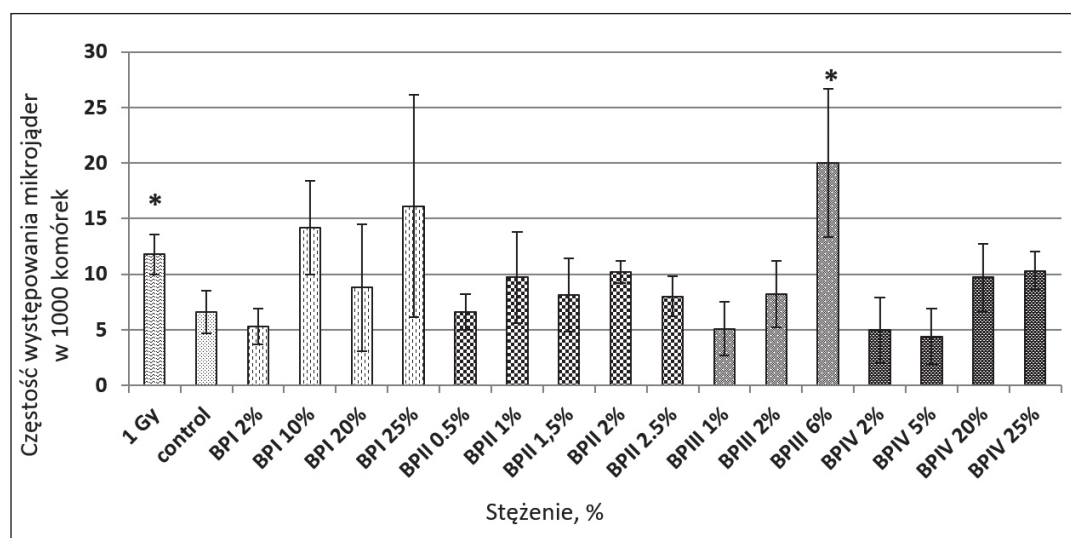
Najbardziej genotoksycznymi biopaliwami (istotny wzrost częstości występowania mikrojąder) były: biopaliwo II otrzymane z tłuszczu zwierzęcego oraz biopaliwo III otrzymane

z posmażalniczego oleju roślinnego. Wydaje się, że najmniej szkodliwe dla komórek CHO-9 było biopaliwo IV pochodzące z surowego oleju rzepakowego (ryc. 1).

Częstość występowania mikrojąder w hodowli kontrolnej komórek A549 (bez narażania na badane biopaliwa) wynosiła 7,0 Mn/1000 komórek (SD $\pm 1,8$). Częstość występowania mikrojąder w komórkach A549 po dawce 1 Gy promieniowania X (kontrola dodatnia) wynosiła 11,8 Mn/1000 komórek (SD $\pm 1,8$) i była statystycznie istotnie wyższa niż częstość występowania mikrojąder w hodowli kontrolnej ($p = 0,007$, dwustronny test t -Studenta).

Biopaliwo I, biopaliwo II, biopaliwo III i biopaliwo IV nie spowodowały istotnego wzrostu częstości występowania mikrojąder przy jakimkolwiek badanym stężeniu w komórkach A549, z wyjątkiem biopaliwa III o stężeniu 6% (ryc. 2).

Do komórek jajników chomika chińskiego CHO-9 bez badanych biopaliw dodawano cytochalazynę B zgodnie ze schematem opisanym powyżej (kontrola). W grupie kontrolnej 92% (SD $\pm 3,3$) wszystkich komórek stanowiły komórki dwujądrowe. Wraz ze wzrostem stężenia badanych

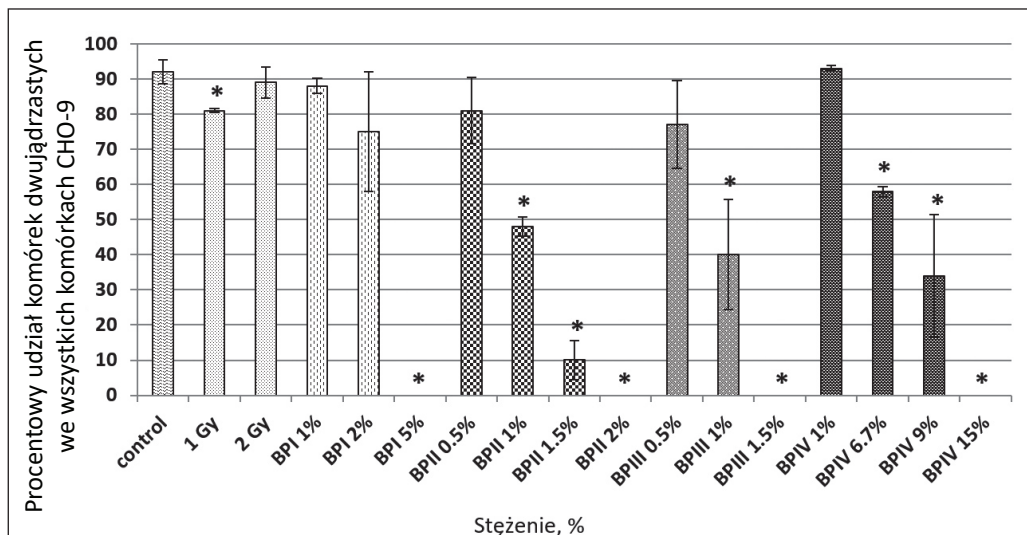


Rycina 2. Częstość występowania mikrojąder w komórkach A549 poddanych działaniu badanych biopaliw. Słupki przedstawiają częstość występowania mikrojąder w komórkach A549 w wyniku 24-godzinnej narażenia na działanie biopaliwa otrzymanego z przeterminowanego oleju rzepakowego (BP I), tłuszczu zwierzęcego (BP II), posmażalniczego oleju roślinnego (BP III) oraz surowego oleju rzepakowego (BP IV). Wyniki wyrażono jako procent średniej kontrolnej \pm SD trzech niezależnych eksperymentów. Gwiazdka (*) oznacza istotną statystycznie różnicę od hodowli kontrolnej ($p \geq 0,05$). Komórki A549 były mniej wrażliwe na badane biopaliwa niż komórki CHO-9

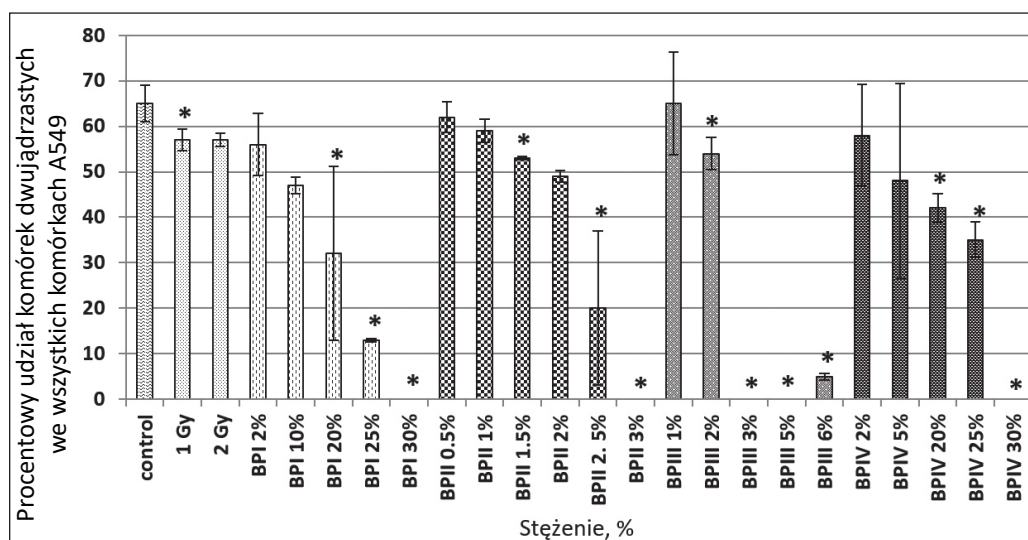
biopaliw zmniejszył się procent komórek dwujądrazstych (ryc. 3).

Po 24-godzinnej hodowli komórek A549 bez biopaliw i z dodatkiem cytochalazyny B 65% (SD ±4) wszystkich komórek A549 było komórka-

mi dwujądrazstymi, co może wskazywać na wolniejsze przechodzenie komórek A549 przez cykl podziału komórkowego w odróżnieniu od komórek jajnika chomika chińskiego CHO-9 (ryc. 4).



Rycina 3. Procentowy udział komórek dwujądrazstych w puli wszystkich komórek CHO-9 poddanych działaniu badanych biopaliw. Słupki przedstawiają procent komórek dwujądrazstych w puli komórek CHO-9 w wyniku 24-godzinnego narażenia na działanie biopaliwa otrzymanego z przeterminowanego oleju rzepakowego (BP I), tłuszczu zwierzęcego (BP II), posmażalnicy oleju roślinnego (BP III) oraz surowego oleju rzepakowego (BP IV). Wyniki wyrażono jako procent średniej kontrolnej ± SD trzech niezależnych eksperymentów. Gwiazdka (*) oznacza istotną statystycznie różnicę od hodowli kontrolnej ($p \geq 0,05$). Kontrola – komórki bez dodanego biopaliwa; kontrola dodatnia – komórki napromieniowane dawką 1 lub 2 Gy promieniowania X



Rycina 4. Procentowy udział komórek dwujądrazstych w puli wszystkich komórek A549 poddanych działaniu badanych biopaliw. Słupki przedstawiają procent komórek dwujądrazstych wśród komórek A549 w wyniku 24-godzinnego narażenia na działanie biopaliwa otrzymanego z przeterminowanego oleju rzepakowego (BP I), tłuszczu zwierzęcego (BP II), posmażalnicy oleju roślinnego (BP III) oraz surowego oleju rzepakowego (BP IV). Wyniki wyrażono jako procent średniej kontrolnej ± SD trzech niezależnych eksperymentów. Gwiazdka (*) oznacza istotną statystycznie różnicę od hodowli kontrolnej ($p \geq 0,05$). Kontrola – komórki bez dodanego biopaliwa; kontrola dodatnia – komórki napromieniowane dawką 1 lub 2 Gy promieniowania X

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wyniki przeglądu baz danych (głównie MEDLINE i EMBASE) pozwoliły wskazać cztery główne źródła zagrożeń dla zdrowia ludzkiego, które wiążą się ze stosowaniem biopaliw: ryzyko zawodowe, zanieczyszczenie wody/gleby, zanieczyszczenie powietrza związane z produkcją i stosowaniem biopaliw oraz wpływ na ceny żywności. Z ponad 5000 pozyskanych artykułów tylko 30 tytułów prezentowało wyniki badań eksperymentalnych biopaliw i ich analizę. Tylko dziewięć spośród tych 30 artykułów dotyczyło wyników badań epidemiologicznych i skutków zdrowotnych związanych z produkcją i stosowaniem biopaliw ciekłych (Scovronick, Wilkinson 2014).

Test mikrojądrowy (MNA) jest jednym z najbardziej wrażliwych wskaźników uszkodzeń DNA i został zastosowany w odniesieniu do kilku organizmów i tkanek w celu oceny zanieczyszczeń środowiskowych (Lemos i in. 2011).

Test mikrojądrowy w warunkach *in vitro* wykrywa niewielkie fragmenty DNA związane z błoną komórkową (mikrojądra) w cytoplazmie komórek w interfazie. Na podstawie wyników testu ocenia się klastogenność (pęknięcie chromosomu) i aneugenność (zmiany liczby chromosomów) badanych substancji chemicznych w komórkach, które przeszły podział komórek podczas narażenia lub po narażeniu (OECD TG 487 2014).

Wyniki testu tworzenia kolonii wykazały, że zdolność komórek CHO-9 do tworzenia kolonii oraz stopień inhibicji zależą od rodzaju i stężenia badanego biopaliwa. Najsilniejsze działanie w zakresie ograniczenia zdolności komórek CHO-9 do proliferacji wykazały biopaliwo II i biopaliwo III. Biopaliwo IV wpłynęło na zdolność komórek CHO-9 do tworzenia kolonii w stężeniu wyższym niż pozostałe biopaliwa (Skowroń 2018). Wszystkie badane biopaliwa blokowały zdolność komórek A549 do tworzenia kolonii w wyższych stężeniach w porównaniu z komórkami jajników chomika chińskiego CHO-9. Największy wpływ na ograniczenie zdolności komórek A549 do proliferacji wykazało biopaliwo II otrzymane z tłuszczu zwierzęcego oraz biopaliwo III otrzymane z posmażalniczego oleju roślinnego. Biopaliwo I przy tym samym stężeniu co biopaliwo IV hamowało zdolność

komórek A549 do formowania kolonii w mniejszym stopniu.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że badane biopaliwa indukowały powstanie mikrojąder w komórkach jajników chomika chińskiego CHO-9, natomiast nie indukowały powstania mikrojąder w komórkach nabłonka płuc pochodzenia nowotworowego A549. Działanie cytotoksyczne biopaliw na komórki CHO-9 prawdopodobnie spowodowało najpierw zablokowanie (spowolnienie) komórek w cyklu komórkowym, a następnie odklejenie komórek od podłoża szalki hodowlanej (co uznano za skutek cytotoksyczny) i ich umieranie.

Najsilniejszy wpływ na ograniczenie zdolności komórek CHO-9 do proliferacji i do tworzenia mikrojąder wykazało biopaliwo II. W tym biopaliwie otrzymanym z odpadów tłuszczów zwierzęcych oznaczono najwyższe stężenia estrów kwasów tłuszczowych. Wyższa cytotoksyczność biopaliwa III mogła być spowodowana zanieczyszczeniami występującymi w surowym materiale (Skowroń i in. 2015). Biopaliwo III w teście mikrojądrowym słabo indukowało powstawanie mikrojąder w komórkach CHO-9.

Istnieją różne sugestie dotyczące mechanizmów odpowiedzialnych za cytotoksyczność i genotoksyczność substancji/mieszanin chemicznych, w tym za zahamowanie funkcji mitochondriów, zmiany morfologii komórek, stres oksydacyjny lub zakłócenia w cyklu komórkowym (AshaRani i in. 2009). Jak wynika z badań poziomów IC50, spośród wszystkich analizowanych biopaliw najbardziej toksyczne dla linii komórkowej nabłonka skóry ludzkiej A431 było biopaliwo wytwarzane z posmażalniczego oleju roślinnego (biopaliwo III). Na kolejnym miejscu znalazły się biopaliwo z tłuszczu zwierzęcego (biopaliwo II), surowego oleju rzepakowego (biopaliwo IV) i przetworzonego oleju rzepakowego (biopaliwo I) – w obu testach: NRU – teście służącym do oceny integralności błon komórkowych i MTT – teście określającym metaboliczną aktywność mitochondriów.

Konieczne są dalsze badania w celu oceny mechanizmu oddziaływania genotoksycznego badanych biopaliw.

PODSUMOWANIE

- Wszystkie cztery badane biopaliwa miały właściwości genotoksyczne i indukowały powstanie mikrojąder w komórkach jajnika chomika chińskiego CHO-9.
- Najsilniejsze działanie genotoksyczne na komórki CHO-9 miało biopaliwo II otrzymane z odpadowych tłuszczów zwierzęcych oraz biopaliwo III otrzymane z olejów roślinnych posmażalniczych. Najsłabszą genotoksyczność wykazywało biopaliwo IV otrzymywane z surowego oleju rzepakowego.
- Wysokie stężenia badanych biopaliw w teście mikrojądrowym na komórkach CHO-9 spowodowały odklejenie komórek od płytki hodowlanej i prawdopodobnie ich umieranie, co świadczyło o ich działaniu cytotoksycznym.
- Żadne z badanych biopaliw nie wywołało statystycznie istotnego wzrostu częstości powstawania mikrojąder w komórkach A549, chociaż tendencja do ich powstania była oczywista przy większych stężeniach.
- Komórki nabłonka płuc pochodzenia nowotworowego (A549) były mniej wrażliwe na działanie badanych biopaliw niż komórki jajnika chomika chińskiego (CHO-9).
- Na podstawie zawartości komórek dwujądrzastych w puli wszystkich komórek po dodaniu do hodowli obu linii komórkowych cytochalazyny B można wnioskować, że komórki nabłonka płuc pochodzenia nowotworowego (A549) wolniej przechodziły przez cykl podziału komórkowego w odróżnieniu od komórek jajnika chomika chińskiego CHO-9.

Uzyskane wyniki badań wskazują na potencjalne zagrożenia związane z produkcją i stosowaniem biopaliw drugiej generacji oraz uzasadniają konieczność podjęcia środków mających na celu ocenę i ograniczenie ryzyka związanego z narażeniem na działanie biopaliw w miejscu pracy.

Słowa podziękowania kierujemy do Pana Profesora

Wojciecha Golimowskiego

z Instytutu Technologiczno-Przyrodniczego w Poznaniu za pomoc w produkcji badanych biopaliw. Pragniemy również wyrazić naszą wdzięczność za możliwość przeprowadzenia testu mikrojądrowego w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie.

INTRODUCTION

The increasing global consumption of liquid fuels and the high emission of pollutants into the atmosphere as a result of the combustion of these fuels as well as global climate change made it urgent to look for alternative renewable fuels. The current Polish Act on biocomponents and liquid biofuels of 25 August, 2006 with amendments, lists fuels being biofuels as:

- a) motor spirits containing more than 10.0% by volume of biocomponents or more than 22.0% by volume of ethers, excluding motor fuels containing liquid bio-hydrocarbons,

- b) diesel fuel containing more than 7% by volume of biocomponents, excluding diesel fuel containing liquid bio-hydrocarbons,
- c) bioethanol, biomethanol, biobutanol, ester, dimethyl bioether, pure vegetable oil, liquid bio-hydrocarbons, bio-pro-pane-butane, liquefied biomethane, compressed biomethane and biohydrogen – constituting spontaneous fuels (Act on biocomponents 2022; Directive 2009/28/EC).

By 2030, the European Union aims to increase the share of renewable energy in transport to at

least 14%, including a minimum share of 3.5% of advanced biofuels (used cooking oil, animal fats classified as categories 1 and 2 in accordance with Regulation (EC) No 1069/2009). EU countries are required to set out an obligation on fuel suppliers that ensures the achievement of this target (Directive (EU) 2018/2001 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on the promotion of the use of energy from renewable sources).

In the literature, three generations of biofuels have been described (Joshi et al. 2017):

- 1st generation biofuels, e.g. biodiesel, bioethanol, biomethanol, i.e. fuels made from raw materials obtained from biomass of plant or animal origin, mainly from agricultural products originally produced for food, e.g. vegetable oil or sugar beets, from which biodiesel and bioethanol are produced respectively;
- 2nd generation biofuels obtained from raw materials that are unfit for human and animal consumption and/or from waste substances. This group also includes biofuels, which are based on post-frying oils (Skowroń, Golimowski 2015);
- 3rd generation biofuel which would be produced from algal biomass (Joshi et al. 2017; Lee, Lavoie 2013).

The differences between each generation of biofuel are the feedstock (food or nonfood) and technology (Joshi et al. 2017).

Currently, biofuel is the predominant form of biomass (Guariero, Guariero 2013). Biofuel is produced from oils or fats using transesterification or esterification reactions. Chemically, it consists mostly of fatty acid methyl (or ethyl) esters. Biofuel has similar properties as the mineral oil-derived fuel and can be used in pure form (B100) or blended with fossil diesel fuel at concentration range from 5% to 20% (Bünger et al. 2012), and these blends are named as B5, B20 or B100 to represent the volume percentage of biofuel component in the blend with petro diesel as 5, 20 and 100 vol.%, respectively. Many countries in Europe and in other countries, for example the US and Japan, commercially use biofuel blends.

So far, most toxicity studies have been conducted on biodiesel combustion products in engines: exhaust gases, their extracts, solid particles, i.e. nanoparticles of various sizes (Bünger et al. 2012; Lankoff et al. 2017; Kowalska et al. 2017). Much less information exists about the harmfulness of biofuels, although they are also cyto- and genotoxic.

The purpose of this study was to determine genotoxicity of four tested biofuels obtained from waste fats, using the in vitro micronucleus test in Chinese hamster ovary CHO-9 cells and human alveolar tumour lung epithelial A549 cells.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of biofuel

The tested biofuels: BF I obtained from expired rapeseed oil; BF II obtained from waste animal fat; BF III obtained from vegetable waste oil for frying was produced on a laboratory scale by transesterification reaction using an experimental line for the production of vegetable oil and laboratory esterificators (Frąckowiak 2002); BF IV, obtained in the transesterification reaction of crude rapeseed oil, was sourced from the producer.

Preparation of biodiesels stock solution in cell culture medium

According to the method described by (Chou et al. 2003) for water-insoluble aromatic hydrocarbons, the tested biofuels were shaken with a culture medium, 75% fuel and 25% medium, in 50 ml flasks, for 18 h, at room temperature, at 400 rpm. Specific culture media adequate for different cell lines were used. The obtained solution was centrifuged and the top layer of the emulsion was drawn off, and next the cells were exposed to

a clear medium lower layer, assuming that it would be a saturated solution of fatty acid esters. The fraction of the medium with dissolved biodiesels was treated as the concentration of 100% biofuels, and in individual experiments it was diluted accordingly. The microscopic image of the medium + fatty acid fraction showed that biofuels are not dissolved in the medium but form a mixture of medium and fat in the form of separate drops of various sizes, suspended in cell medium, similar to 'fat eyes' in broth.

Identification of the composition of 75% solution of tested biofuels in a medium was carried out using gas chromatography techniques conjugated with mass spectrometric detection. On the basis of the total peak area of the identified fatty acid esters in the tested biofuels, it can be concluded that the highest concentrations of these compounds were determined in biofuel BF II from waste animal fats. It was estimated that the concentration of fatty acid esters in biofuel BF I from expired rapeseed oil was 23%, in biofuel BF III from vegetable oil for frying – 30%, and in biofuel BF IV from rapeseed oil – 78% lower compared to biofuel BF II (unpublished data).

Cell culture and biofuels treatment

A human alveolar tumour lung epithelial cell line A549 and CHO-9 Chinese hamster ovary cell line were used for the experiments; both lines were purchased from the American Type Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, US). A Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) (Cat # 31550-023) from Gibco containing 7% fetal bovine serum (Cat # 10084-150) and 1% Antibiotic-Antimycotic (penicillin G sodium, streptomycin sulphate and amphotericin) (Cat. # 15240062) from Gibco BRL was used to culture the A549 cells. For culturing the CHO-9 cells, the F-12 (Ham) medium with L-glutamine (Cat. # 31550-023) by Gibco with 7% fetal bovine serum (Cat. # 10084-150) and with 1% Antibiotic-Antimycotic (penicillin G sodium, streptomycin sulphate and amphotericin) (Cat. # 15240062) from Gibco BRL was used.

The A549 and CHO-9 cells were kept under sterile conditions in an incubator with 5% CO₂ at a constant temperature of 37 °C and a humidity of 95%. The growth of the culture was evaluated under a microscope. Every few days (depending

on the growth observed) the culture medium was exchanged to provide cells with access to growth factors and to remove metabolic products.

Both types of cells were exposed to different concentrations of tested biofuels prepared as described above, diluted in the cell-specific media. Exposed and control (without BF) cells were incubated for 24 h and then harvested with a solution of trypsin (0.25%) and EDTA (Cat. # T-4049) from Sigma for the next experimental steps.

Genotoxicity analysis – Micronucleus assay (MNA)

Genotoxicity of the four biodiesels was determined by Micronucleus assay (MNA). MNA is one of the most frequently used tests for testing genotoxicity of chemicals, drug agents and radiation (Fenech et al. 2011; Kirsch-Volders et al. 2014). The standardised protocol of MNA assay was modified from the OECD TG 487 (2014).

A549 and CHO-9 cells BF treatment for MNA test

200,000 and 150,000 of exponentially growing A549 and CHO-9 cells, respectively, were seeded on Petri dishes with a diameter of 5 cm, and 5 ml of the appropriate medium was added. After a 24 h incubation (37 °C, 5% CO₂, 95% humidity), the time necessary for the cells to adhere to the bottom of the dishes, the appropriate concentration of biofuels was added to the cultures, selected partially on the basis of IC₅₀ coefficients from the NRI and MTT tests, partly on the basis of the clonogenic test results (data in the process of publication), and partly on the basis of preliminary experiments. According to the OECD TG 487 (2014) standard, the cells were incubated with biofuels for further 24 h. Four experiments were carried out for each line. Negative and positive controls were selected for each experiment – cells without the addition of biofuel and cells irradiated with 1 Gy or 2 Gy of X-radiation, respectively (Smart200 Yxlon defectoscope, operating at 200 kV and 4.5 mA, with 3 mm Al filtration, at a dose rate of 1.271 ± 0.089 Gy/min). In the last two experiments, the cultures were treated additionally with a commercially available cooking rapeseed oil as a negative control.

Micronucleus assay – cell fixation

After 6 h from the application of biofuels, cytochalasin B (4.5 µg/ml) was added to the plates to block the division of the cytoplasm (Fenech 2000). After 24 h from the application, the biofuels were removed, replaced with a fresh medium, and the cells were incubated for a further 2 h in the presence of cytochalasin B (4.5 µg/mL). After incubation, the cells were harvested, treated with a hypotonic shock of 0.075 M KCl, fixed once with a 4/1/5 methanol/acetic acid/Ringer's solution mixture and subsequently three times with 4/1 methanol/acetic acid. At least two slides were made per culture by dropping cells on clean slides which were mounted with a VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI for Fluorescence. The cell fixation protocol used for the experiments was developed at the University of Ghent in Belgium and was successfully used during European projects on biological dosimetry MULTIBIODOSE and RENEB (Thierens et al. 2014; Depuydt et al. 2017).

MN scoring

A semi-automated MNA scoring was performed using the MetaSystems Metafer 4 software, consisting of a PC paired with a high-resolution, monochrome megapixel charge camera device, combined with a microscope (Zeiss Axio Imager Z2) equipped with an appropriate fluorescent

filter and a motorised scanning stage, which can contain eight slides.

The system takes photos of whole microscope slides and then it allows automatic searching of binucleated cells and micronuclei according to given algorithms (classifiers). In the Laboratory of Biological Dosimetry of Institute of Nuclear Chemistry and Technology in Warsaw, Poland there were developed algorithms for both the CHO-9 and A549 lines, which were slightly modified for this experiment. The binuclear cells – in which Metasystems found the micronuclei – were reviewed by experienced cytogenetics to verify the number of registered micronuclei and, if necessary, the number of micronuclei was corrected. Such a procedure, known as semi-automatic counting, was developed during the MULTIBIODOSE project (Thierens et al. 2014). Standard criteria for identifying micronuclei according to Bolognesi and Fenech (2013) were used.

Statistical analysis

At least three independent experiments were conducted for biofuels. Test results were expressed as a percentage of the unexposed control ± standard deviation (SD). Control values were set as 100%. Differences between samples and the control were evaluated using t-test. Results were considered statistically significantly different at $p < 0.05$.

RESULTS

The incidence of micronuclei in the CHO-9 cells not exposed to the tested biofuels was 7.1 micronuclei (Mn)/1000 cells (standard deviation ± 0.9). The incidence of micronuclei in the CHO-9 cells after 1 Gy of X-rays (positive control) was 50.8 Mn/1000 cells (standard deviation ± 2.7), and was significantly higher than the incidence of micronuclei in the control culture ($p = 0.00002$, two-tailed Student's t test).

The tested biofuels caused a statistically significant increase in the occurrence of micronuclei in the CHO-9 cells ($p < 0.05$) depending on the concentrations used (Fig. 1).

Each concentration of BF I, except from 1% concentration (statistically insignificant difference), induced significantly more micronuclei than in the control. BF II caused a significant

increase in the occurrence of micronuclei at all tested concentrations (0.5%; 1%; 1.5%) in the CHO-9 cells.

BF III caused a significant increase in the occurrence of micronuclei in the CHO-9 cells at the concentration of 0.5% (Fig. 1). At the concentration of 1%, there were found to be more than twice the number of micronuclei than was observed in the control culture, but the difference was not statistically significant (due to a large value for the SD).

BF IV caused a significant increase in the occurrence of micronuclei at each tested concentration in the CHO-9 cells, but the tested concentrations were significantly higher than the other biofuels tested, i.e., 1%; 6.7%; 9%. The most genotoxic (induced frequency of micronuclei)

biofuels were: BF II obtained from animal fats, and BF III obtained from vegetable oil for frying. The least harmful to the cells seemed to be BF IV derived from crude rapeseed oil (Fig. 1).

The incidence of micronuclei in the control culture of the A549 cells (without exposure to the tested biofuels) was 7.0 Mn/1000 cells (SD \pm 1.8). The incidence of micronuclei in the A549 cells after a dose of 1 Gy of X-rays (positive control)

was 11.8 Mn/1000 cells (SD \pm 1.8) and was statistically significantly higher than the incidence of micronuclei in the control culture ($p = 0.007$, two-sided test t -Student).

BF I, BF II, biofuel III and BF IV did not cause a significant increase in the incidence of micronuclei at any concentration tested in the A549 cells, with an exception of BF III at the concentration of 6% (Fig. 2).

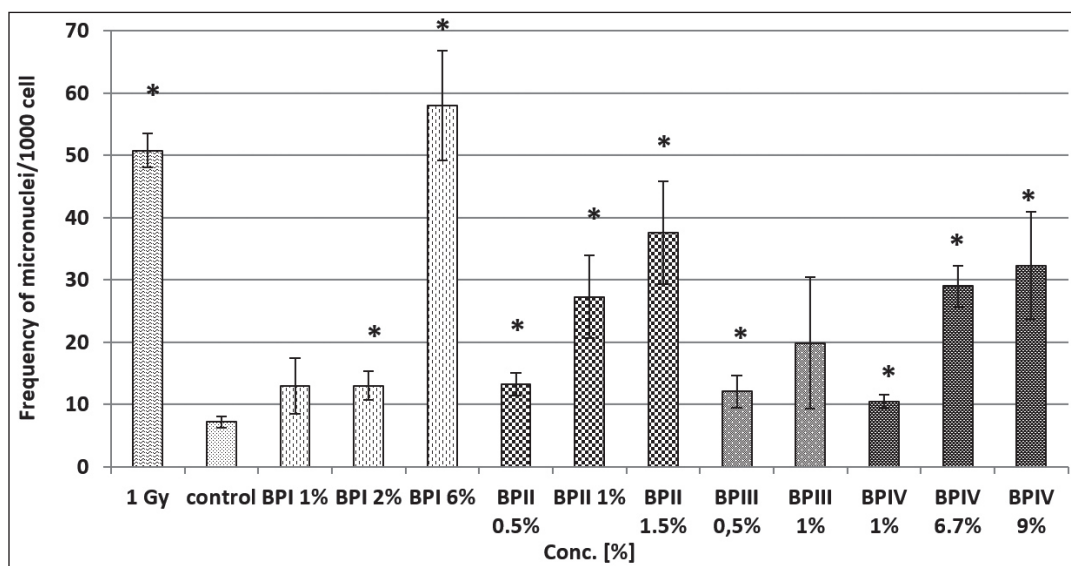


Figure 1. Frequency of micronuclei in the CHO-9 cells treated with the tested biofuels. Bars showing frequency of micronuclei in CHO-9 cells as determined following 24 h exposure to biofuel obtained from: expired rapeseed oil (BF I), waste animal fats (BF II), vegetable oil for frying (BF III), and rapeseed oil (BF IV). Results are expressed as a percentage of the control mean \pm SD of three independent experiments. Asterisk (*) denotes a significant difference from the control ($p \geq 0.05$)

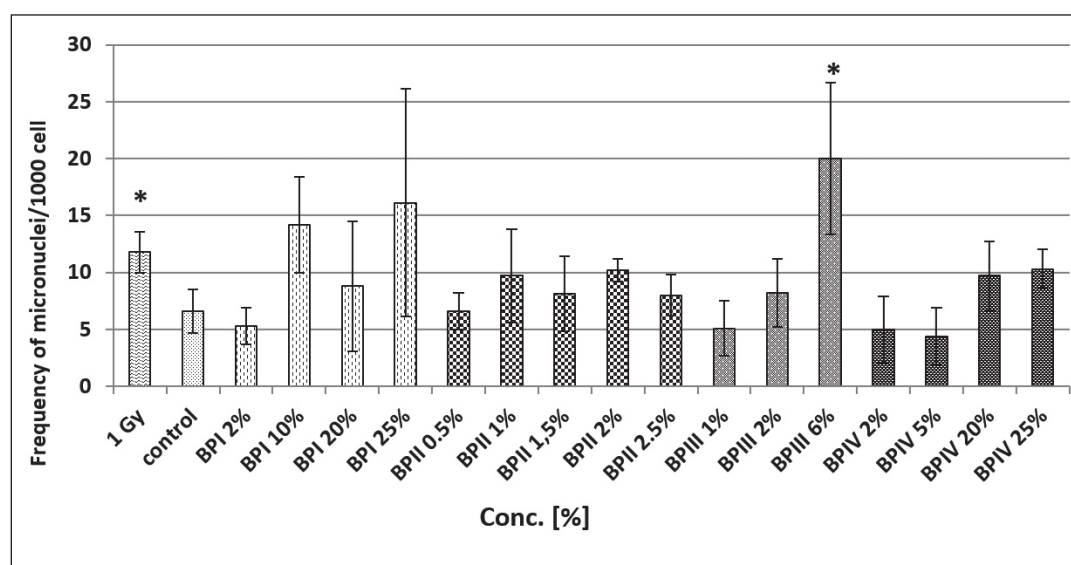


Figure 2. Frequency of micronuclei in the A549 cells treated with the tested biofuels. Bars showing frequency of micronuclei in the A549 cells as determined following 24 h exposure to biofuel obtained from: rapeseed expired oil (BF I), waste animal fats (BF II), vegetable oil for frying (BF III), and rapeseed oil (BF IV). Results are expressed as a percentage of the control mean \pm SD of three independent experiments. Asterisk (*) denotes a significant difference from the control culture ($p \geq 0.05$). The A549 cells were less sensitive to the tested biofuels than the CHO-9 cells

Cytochalasin B was added to the Chinese hamster ovary CHO-9 cells without the tested biofuels, according to the scheme described above (control). In the control culture, 92% (SD ± 3.3) of all cells were binucleated. With the increase in the concentration of tested biofuels, the percentage of binuclear cells in the CHO-9 cells decreased (Fig. 3).

After 24 h of culturing of the A549 cells without biofuels, and with an addition of cytochalasin B, 65% (SD ± 4) of all the A549 cells were binucleated cells, which may indicate a slower A549 cell migration through the cell division cycle as opposed to Chinese hamster ovary CHO-9 cells (Fig. 4).

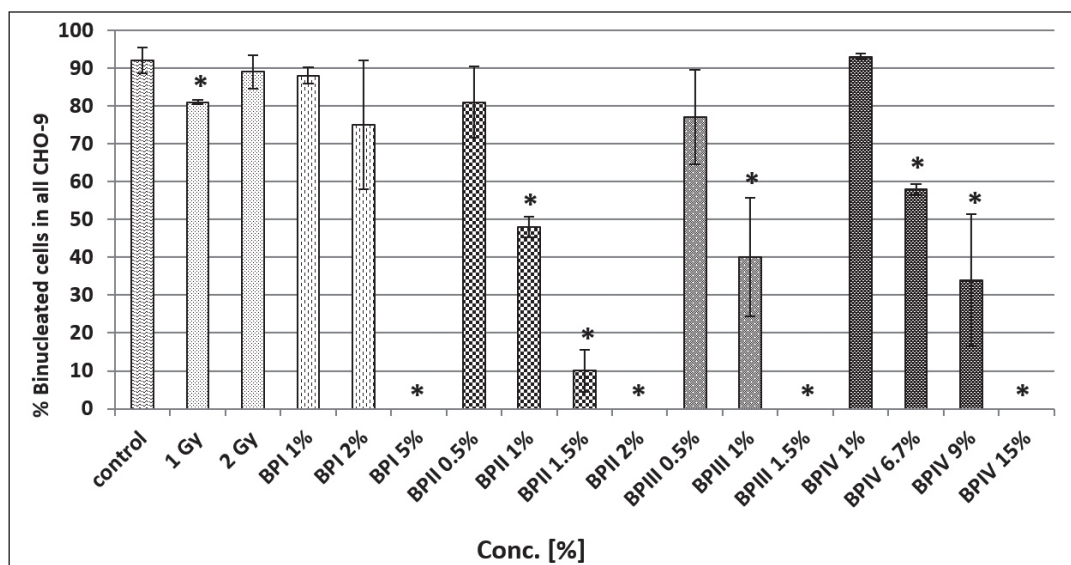


Figure 3. The percentage of binucleated cells in the pool of all the CHO-9 cells treated with the tested biofuels. Bars showing % of binucleated cells in the CHO-9 cells as determined following 24 h exposure to biofuel obtained from: expired rapeseed oil (BF I), waste animal fats (BF II), vegetable oil for frying (BF III), and rapeseed oil (BF IV). Results are expressed as a percentage of the control mean ± SD of three independent experiments. Asterisk (*) denotes a significant difference from the control culture ($p \geq 0.05$). Control – cells without the addition of biofuel; control positive – cells irradiated with 1 Gy or 2 Gy of X-radiation

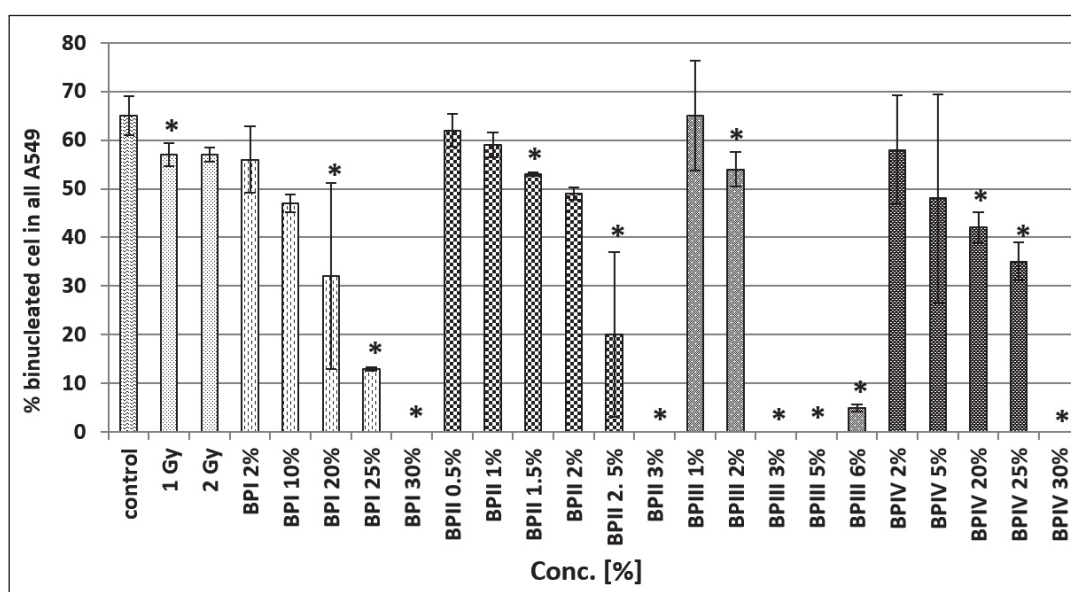


Figure 4. The percentage of binucleated cells in the pool of all A549 cells treated with the tested biofuels. Bars showing % of binucleated cells in A549 cells as determined following 24 h exposures to biofuel obtained from: rapeseed expired oil (BF I), waste animal fats (BF II), vegetable oil for frying (BF III), and rapeseed oil (BF IV). Results are expressed as a percentage of the control mean ± SD of three independent experiments. Asterisk (*) denotes a significant difference from the control ($p \geq 0.05$) culture. The control – cells without the addition of biofuel; control positive – cells irradiated with 1 Gy or 2 Gy of X-radiation

DISCUSSION

The results of the database review (mainly MEDLINE and EMBASE) identified four main sources of human health risks from biofuels: occupational hazards, water/soil contamination, air pollution from biofuel production and use, and the impact on food prices. Out of over 5,000 sourced articles, only 30 articles contained the results of experimental research on biofuels and their analysis. Of these 30 articles, only 9 dealt with the results of epidemiological studies and health effects related to the production and use of liquid biofuels (*Scovronick, Wilkinson 2014*).

The micronucleus (MN) test is among the most sensitive DNA damage indicators and it has been applied to several organisms and tissues for the evaluation of environmental contaminants (*Lemos et al. 2011*). The in vitro micronucleus assay detects small membrane bound DNA fragments (micronuclei) in the cytoplasm of interphase cells. The assay measures the clastogenicity (chromosome breakage) and aneugenicity (changes in chromosome number) of test chemicals in cells that have undergone cell division during or after exposure (OECD TG 487 2014).

Previous colony test results demonstrated that the ability of CHO-9 cells to form colonies and the degree of inhibition depended on the type and concentration of the tested biofuel. The strongest action in reducing the CHO-9 cell proliferation capacity was demonstrated by BF II and BF III. BF IV impacted on the ability of the CHO-9 cells to colony forming at a higher concentration than others (*Skowroń 2018*). All the tested biofuels inhibited the ability of the A549 cells to form colonies at higher concentrations compared to the Chinese hamster ovary CHO-9 cells. The strongest effect in reducing the ability of the A549 cells to proliferate was demonstrated by BF II obtained from animal fats, and BF III obtained from vegetable oil for frying. BF I, at the same concentration of solutions as BF IV, inhibited the colony forming capacity of A549 cells to a lesser extent.

Our findings indicate that the tested biofuels induced the formation of micronuclei in the Chinese hamster ovary CHO-9 cells, but did not induce micronuclei in the A549 cells. The cytotoxic effect of biofuels on the CHO-9 cells probably resulted in first blocking (slowing down) the cells in the cell cycle, and then detaching them from the bottom and the dying of the cells.

The strongest effect of reducing the ability of the CHO-9 cells to proliferate and to form micronuclei was demonstrated by BF II. In this biofuel, obtained from waste animal fats, the highest concentrations of fatty acid esters were determined. The higher cytotoxicity of BF III may be due to the contamination present in the raw material (*Skowroń et al. 2015*). This biofuel in our study had a weak positive response to the induction of micronuclei in the CHO-9 cells.

Various suggestions have been made regarding the mechanisms responsible for this possible cytotoxicity and genotoxicity, including reduced mitochondrial function, changes in cell morphology, oxidative stress, and/or disruptions in the cell cycle (*AshaRani et al. 2009*). Based on the results of the IC50 levels, among the analysed biofuels the one produced from vegetable oil for frying (BF III) was the most toxic to the human epithelial skin cell line A431, followed by those produced from waste animals fats (BF II), rapeseed oil (BF IV) and expired rapeseed oil (BF I) in both tests: NRU – a test used to assess cell membranes integrity and MTT – a test which determines the metabolic activity of mitochondria.

Further research is necessary to evaluate the mechanism of genotoxic action of the tested biofuels.

CONCLUSION

- All four tested biofuels had genotoxic properties and induced the formation of micronuclei in Chinese hamster ovary CHO-9 cells.
- The most potent genotoxic effect on CHO-9 cells was from BF II produced from waste animal fats, and BF III produced from vegetable oil for frying. The least genotoxic effect was from BF IV produced from crude rapeseed oil.
- High concentrations of tested biofuels in the micronuclei test on CHO-9 cells caused the detachment of cells from the culture dish and probably their death, which indicates their cytotoxic effects.
- None of the tested biofuels induced a statistically significant formation of micronuclei in the A549 cells, although the tendency to induce micronuclei was evident at higher concentrations.
- The A549 cells were less sensitive to the biofuels than the CHO-9 cells.
- The percentage of binucleated cells in the pool of all CHO-9 and A549 cells decreased with the increase of the concentration of the tested biofuels, indicating that biofuels delay the passage of both types of cells through the cell cycle.

The obtained results indicate the potential risks associated with the production and use of second-generation biofuels, and justify taking measures to assess and reduce the risks associated with the exposure to biofuels at workplaces.

*We would like to thank
Professor Wojciech Golimowski
from the Institute of Technology
and Life Sciences, Poznań, Poland,
for his help in producing the tested biofuels.
The authors also wish to express gratitude
for the opportunity to conduct the
Micronuclei assay at the Institute
of Nuclear Chemistry and Technology
in Warsaw, Poland.*

PIŚMIENNICTWO/REFERENCES

AshaRani P.V., Low Kah Mun G., Hande M.P. i in. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3, 279–290.

Bolognesi C., Fenech M. (2013). Micronucleus assay in human cells: lymphocytes and buccal cells. *Methods Mol. Biol.* 1044, 191–207.

Bünger J., Krahl J., Schröder O. i in. (2012). Potential hazards associated with combustion of bio-derived versus petroleum-derived diesel fuel. *Crit. Rev. Toxicol.* 42(9), 732–750.

Chou C.C., Riviere J.E., Monteiro-Riviere N.A. (2003). The cytotoxicity of jet fuel aromatic hydrocarbons and dose-related interleukin-8 release from human epidermal keratinocytes. *Arch. Toxicol.* 77, 384–391.

Depuydt J., Baeyens A., Barnard S. i in. (2017). RENEB intercomparison exercises analyzing micronuclei (Cytokinesis-block Micronucleus Assay). *Int. J. Radiat. Biol.* 93(1), 36–47.

Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/28/WE z dnia 23 kwietnia 2009 r. w sprawie promowania stosowania energii ze źródeł odnawialnych zmieniająca i w następstwie

uchylająca dyrektywy 2001/77/WE oraz 2003/30/WE (Tekst mający znaczenie dla EOG). *Dz. Urz. L* 140 z 5.06.2009, s. 16 [Directive 2009/28/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the promotion of the use of energy from renewable sources and amending and subsequently repealing Directives 2001/77/EC and 2003/30/EC. *OJ L* 140, 5.06.2009, p. 16].

Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2018/2001 z dnia 11 grudnia 2018 r. w sprawie promowania stosowania energii ze źródeł odnawialnych (wersja przekształcona) (Tekst mający znaczenie dla EOG). *Dz. Urz. UE L* 328/82 z 21.12.2018, s. 82–209 [Directive (EU) 2018/2001 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on the promotion of the use of energy from renewable sources *OJ L* 328, 21.12.2018, p. 82–209].

Fenech M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455(1–2), 81–95.

Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A.T. i in. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26(1), 125–132.

- Frąckowiak P. (2002). Badania procesu estryfikacji oleju rzepakowego na paliwo ciągnikowe w prototypowych wytwórniach o wydajności 400 litrów na dobę [Testing of esterification process of rape oil for tractor fuel in the prototype production plants of 400 dm³ output]. *J. Res. Appl. Agr. Eng.* 47, 67–73.
- Guarrieiro L., Guarrieiro A. (2013). Biofuels – Economy, Environment and Sustainability. INTECH, chapter Vehicle Emissions: What Will Change with Use of Biofuel?, 357–386.
- Joshi G., Pandey J.K., Ranab S. i in. (2017). Challenges and opportunities for the application of biofuel. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 79, 850–866.
- Kirsch-Volders M., Bonassi S., Knasmueller S. i in. (2014). Commentary: critical questions, misconceptions and a road map for improving the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for in vivo biomonitoring of human exposure to genotoxic chemicals—a HUMN project perspective. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 759, 49–58.
- Kowalska M., Wegierek-Ciuk A., Brzoska K. i in. (2017). Genotoxic potential of diesel exhaust particles from the combustion of first- and second-generation biodiesel fuels the FuelHealth project. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24(31), 24223–24234.
- Lankoff A., Brzoska K., Czarnocka J. i in. (2017). A comparative analysis of in vitro toxicity of diesel exhaust particles from combustion of 1st- and 2nd-generation biodiesel fuels in relation to their physicochemical properties—the FuelHealth project. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24, 19357–19374.
- Lee R. A., Lavoie J.M. (2013). From first- to third-generation biofuels: challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers* 3(2), 6–11.
- Lemos A.O., Oliviera N.C.D., Lemos C.T. (2011). In vitro micronuclei test to evaluate the genotoxicity of surface water under the influence of tanneries. *Toxicol. In Vitro* 25, 761–766.
- OECD (2014). Guidelines for the Testing of Chemicals – in vitro mammalian cell micronucleus test TG 487.
- Scovronick N., Wilkinson P. (2014). Health impacts of liquid biofuel production and use: a review. *Glob. Environ. Change* 24, 155–164.
- Skowroń J., Golimowski W. (2015). Produkcja biopaliw – priorytetowy kierunek badań naukowych [Biofuels production – priority trend of research]. *Podst. Metod. Ocen. Srod. Pr.* 2(84), 5–15.
- Skowroń J., Zapór L., Miranowicz-Dzierżawska K. (2015). Cytotoxicity of biofuels produced by esterification of waste materials: vegetable oils or animal fats on A431 skin cells. *Toxicol. Lett.* 238(2S), 345, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.08.985>.
- Skowroń J. (2018). The effect of biofuels on colony formation of CHO-9 cells. *Roczn. Ochron. Srod.* 20, 1026–1034.
- Thierens H., Vral A., Vandevoorde C. i in. (2014). Is a semi-automated approach indicated in the application of the automated micronucleus assay for triage purposes? *Radiat. Prot. Dosimetry* 159(1–4), 87–94.
- Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o biokomponentach i biopaliwach ciekłych. T.j. DzU 2022, poz. 403 [Act on biocomponent and liquid biofuels from August 25 2006. Consolidated text: Journal of Laws 2022, item 403].

Adres do korespondencji/Contact details:

JOLANTA SKOWROŃ

e-mail: josko@ciop

Centralny Instytut Ochrony Pracy –

Państwowy Instytut Badawczy

ul. Czerniakowska 16, 00-701 Warszawa

POLAND