



Bayerisches Landesamt für
Umwelt



Untersuchung von Umweltproben auf erbgutschädigendes Potenzial im Hinblick auf einen nachhaltigen Gewässerschutz

Impressum

Untersuchung von Umweltproben auf erbgutschädigendes Potenzial im Hinblick auf einen nachhaltigen Gewässerschutz

Herausgeber:

Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU)
Bürgermeister-Ulrich-Straße 160
86179 Augsburg
Tel.: (08 21) 90 71-0
Fax: (08 21) 90 71-55 56
E-Mail: poststelle@lfu.bayern.de
Internet: www.lfu.bayern.de

Bearbeitung/Text/Konzept:

LfU, Referat 77, Dr. Stefanie Huber, Willi Kopf, Dr. Margit Schade

Redaktion:

LfU, Referat 77, Dr. Stefanie Huber, Willi Kopf, Dr. Margit Schade

Bildnachweis:

Bayerisches Landesamt für Umwelt

Druck:

Gedruckt auf Papier aus 100 % Altpapier.

Stand:

Februar 2012

Diese Druckschrift wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Sofern in dieser Druckschrift auf Internetangebote Dritter hingewiesen wird, sind wir für deren Inhalte nicht verantwortlich.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Der Ames-Fluktuationstest	5
3	Material und Methoden	7
3.1	Teststämme und Positivkontrollsubstanzen	7
3.2	Erstellung einer Eichkurve	7
3.3	Probenvorbereitung	7
3.4	Testdurchführung zur Untersuchung von Wasserproben	8
4	Ergebnisse	10
4.1	Eichkurve zur Umrechnung der optischen Dichte in Trübungswerte	10
4.2	Probleme bei der Etablierung des Ames-Fluktuationstests	11
4.2.1	Teststamm TA100	11
4.2.2	Teststamm TA98	11
4.2.3	Zytotoxizitätsmessung	11
4.3	Interner Ringversuch	12
4.4	Internationaler Ringversuch	12
4.5	Statistische Ergebnisbestimmung	12
4.6	Untersuchung von Abwasserproben	13
4.6.1	Proben aus der chemischen Industrie	13
4.6.1.1	Bestimmung der Zytotoxizität	13
4.6.1.2	Ausfällungen	14
4.6.1.3	Ergebnisse des Ames-Fluktuationstests im Vergleich zum umu-Test	14
4.6.1.4	Proben mit erbgutschädigendem Potenzial	16
4.6.2	Proben aus der Papierindustrie	19
4.6.3	Proben aus anderen Industriezweigen	19
4.6.4	Proben aus kommunalen Kläranlagen	19
4.7	Untersuchung von Deponiesickerwässern	19
5	Diskussion	20
5.1	Probleme mit den Teststämmen und der Zytotoxizitätsmessung	20
5.2	Statistische Auswertung des Ames-Fluktuationstests	20

5.3	Vergleich zwischen umu- und Ames-Fluktuationstest	20
5.3.1	Kommunale Kläranlagen	21
5.3.2	Deponiesickerwässer	21
5.3.3	Papierindustrie	21
5.3.4	Chemische Industrie	22
6	Schlussfolgerungen	22
7	Zusammenfassung	23
8	Literatur	24

1 Einleitung

Über kommunale und industrielle Abwässer können Stoffe mit einem erbgutschädigenden (gentoxischen) Potenzial in Oberflächengewässer gelangen. Diese Stoffe stellen eine besondere Gefährdung für die Umwelt und letztendlich für den Menschen dar. Durch die ständige Weiter- und Neuentwicklung von Substanzen verändert sich die Zusammensetzung von Industrieabwässern stetig.

Im Projekt wurde ein neues Testsystem zur Erfassung erbgutschädigender Wirkungen von Umweltproben, der Ames-Fluktuationstest, etabliert und optimiert. Zudem wurden Erkenntnisse darüber gewonnen, wie praktikabel und aufwändig sich die Durchführung des Ames-Fluktuationstests darstellt. Nach erfolgreicher Etablierung wurden Umweltproben, insbesondere Industrieabwässer, auf erbgutschädigendes Potenzial mit Hilfe des neuen Tests untersucht und die Ergebnisse mit denen des umu-Tests (DIN 38412-3), einem bereits etablierten Gentoxizitätstest, hinsichtlich Wirkungsspektrum und Empfindlichkeit verglichen.

Die Etablierung von standardisierten Wirktests als Ergänzung zur instrumentellen Analytik ermöglicht einerseits ein Screening zur Erfassung summarischer Schadwirkungen in Umweltproben unbekannter Zusammensetzung. Andererseits bilden solche Wirktests die Grundlage für die ökotoxikologische Bewertung von Substanzen in der Umwelt (Kopf und Pluta 2009).

2 Der Ames-Fluktuationstest

Der konventionelle Ames-Test auf festen Nährmedien (Agarplatten) wurde in den 1970er Jahren von Bruce Ames entwickelt (Ames et al. 1973). Die bei diesem Test eingesetzten *Salmonella*-Teststämme haben u. a. Mutationen in Genen, die für die Histidin-Biosynthese verantwortlich sind, und können deshalb ohne Histidin im Nährmedium nicht wachsen. Im Testgut vorhandene gentoxische Substanzen induzieren Rückmutationen und somit wieder Wachstum in histidinfreien Nährmedien.

Im Ames-Fluktuationstest wird das gleiche Prinzip angewandt, im Gegensatz zum konventionellen Ames-Test wird er aber in Flüssigmedium in Mikrotiterplatten durchgeführt. Fluktuationstests sind sensitiver und deshalb besonders gut für wässrige Proben mit geringen Konzentrationen an mutagenen Substanzen geeignet (Bridges 1980). Außerdem wird Material und Zeit eingespart und die Ergebnisse können statistisch besser ausgewertet werden.

Für die Durchführung eines Ames-Fluktuationstests gibt es verschiedene Methodenvorschriften (z. B. Perez et al. 2003, Reifferscheid und von Oepen 2002). Auch kommerziell ist der Test unter dem Namen „Ames II-Test“ (Firma Xenometrix) erhältlich. Zur Standardisierung der Testbedingungen wurde in den letzten Jahren vom DIN-Arbeitskreis „Gentoxizität“ (NA 119-01-03-07-03) ein Entwurf für eine ISO (International Organization for Standardization)-Norm für den Ames-Fluktuationstest erarbeitet. Das Normungsverfahren (ISO 11350) wurde im Jahr 2011 abgeschlossen. Im Projekt wurde nach der Verfahrensvorschrift des Entwurfs der ISO-Norm, die allerdings mehrfach innerhalb des Projektzeitraums geringfügig abgeändert wurde, gearbeitet. Als Testorganismen dienen die *Salmonella*-Stämme TA98 und TA100. Der Stamm TA98 besitzt eine Rasterschubmutation (s. Abb. 1) im hisD3052-Gen, TA100 eine Basenaustausch-Mutation (s. Abb. 2) im hisG46-Gen. Gentoxische Substanzen, die bevorzugt Rasterschub-Mutationen auslösen, führen bei TA98 zu Rückmutationen. Dazu gehören aromatische Amino- und Nitroverbindungen sowie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK). Alkylierende Mutagene bewirken Basenaustausch-Mutationen und somit Rückmutationen bei TA100. Da manche Substanzen, z. B. PAK, erst durch metabolische Aktivierung im menschlichen oder tierischen Körper erbgutschädigend werden, wird zur Simulation dieser Stoffwechselprozesse Rattenleberhomogenat („S9-Fraktion“) bei einer Hälfte des Testansatzes zugegeben.

Rasterschub-Mutationen (frameshift mutations): Leserasterverschiebung	
Ausgangssequenz der mRNA:	GCA CGA CUU UAC CCC GGA UAA
zugehörige Aminosäure:	Ala Arg Leu Tyr Pro Gly Stop
<u>Deletion:</u>	GCA GAC UUU ACC CCG GAU AA
	Ala Asp Phe Thr Pro Asp
<u>Insertion:</u>	GCA ACG ACU UUA CCC CGG AUA A
	Ala Thr Thr Leu Pro Arg Ile

Abb. 1: Beispiele für Rasterschub-Mutationen: Geht eine Base verloren (Deletion) bzw. wird eine Base hinzugefügt (Insertion), kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters: Die veränderte mRNA codiert für andere Aminosäuren im Vergleich zur Ausgangssequenz.

Basenaustausch-Mutationen (Substitutionen)	
Ausgangssequenz der mRNA:	GCA CGA CUU UAC CCC GGA UAA
	Ala Arg Leu Tyr Pro Gly Stop
Stille Mutation (silent mutation):	GCA CGC CUU UAC CCC GGA UAA
	Ala Arg Leu Tyr Pro Gly Stop
Sinn verändernde Mutation (missense mutation):	GCA GGA CUU UAC CCC GGA UAA
	Ala Gly Leu Tyr Pro Gly Stop
Sinn entstellende Mutation (nonsense mutation):	GCA UGA CUU UAC CCC GGA UAA
	Ala Stop

Abb. 2: Beispiele für Substitutions-Mutationen: Wird eine Base gegen eine andere ausgetauscht, kann dies unterschiedliche Auswirkungen haben: Bei einer stillen Mutation ist keine Veränderung in der Abfolge der Aminosäuren zu erkennen, bei einer Sinn verändernden Mutation wird eine falsche Aminosäure eingebaut, bei einer Sinn entstellenden Mutation kommt es zum Abbruch der Translation.

Mit dem Ames-Test werden irreversible und vererbare DNA-Schädigungen nachgewiesen. Im Vergleich dazu zeigt der umu-Test durch Anspringen des Notreparatursystems primäre DNA-Schäden an, die reversibel oder irreversibel sein können.

3 Material und Methoden

3.1 Teststämme und Positivkontrollsubstanzen

Die Teststämme des Ames-Fluktuationstests *Salmonella* TA98 und TA100 wurden von der Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) bezogen. Die Stämme wurden in Flüssig-Kulturmedium vermehrt und Aliquote bei -75 °C gelagert (s. 4.2.1).

Als Positivkontrollsubstanzen dienten 4-Nitro-o-phenylendiamin (4-NOPD) für TA98 ohne metabolische Aktivierung, Nitrofurantoin (NF) für TA100 ohne metabolische Aktivierung sowie 2-Aminoanthracen (2-AA) für TA98 und TA100 nach metabolischer Aktivierung.

3.2 Erstellung einer Eichkurve

Die Testkulturen von TA98 und TA100 mussten auf bestimmte Zelldichten eingestellt werden, bevor sie im Ames-Fluktuationstest verwendet werden konnten. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgt über eine Trübungsmessung. Die Trübungswerte sind im Normentwurf vorgeschrieben und liegen bei 180 bzw. 45 FAU (Formazine Attenuation Units). Daher wurde eine Eichkurve mit einer Formazin-Standardlösung (DIN EN ISO 7027) erstellt (s. Abb. 4).

3.3 Probenvorbereitung

In der Regel wurden behandelte Industrieabwasserproben untersucht. Die Probenahme erfolgte durch die Wasserwirtschaftsverwaltung. 125 ml Probe wurden in 250 ml-Glasflaschen abgefüllt, sofort nach der Probenahme durch Tiefgefrieren konserviert und bei -20 °C bis zu ca. zwei Monaten gelagert. Am Tag vor der Untersuchung wurden am späten Nachmittag zwei Proben aus dem Gefrierschrank entnommen und über Nacht im Kühlschranks aufgetaut. Waren Teile der Proben am nächsten Morgen noch gefroren, wurden die Flaschen in ein Wasserbad (Raumtemperatur) gestellt. Nach dem vollständigen Auftauen wurde die Probe durch Schütteln homogenisiert und ein Aliquot (ca. 40 ml) in ein Becherglas überführt. Im Aliquot wurde der pH-Wert der Probe mit 1 n NaOH bzw. 1 n HCl auf $7,2 \pm 0,2$ eingestellt. Anschließend erfolgte die sterile Filtration mit Hilfe von Einwegspritzen und Membranfiltern (Porengröße: 0,45 µm). Von der so aufbereiteten Probe (Filtrat) wurde eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt. Im Jahr 2009 wurde das Filtrat mit sterilem destilliertem Wasser schrittweise 1:2 verdünnt (jeweils 10 ml Probe bzw. Probenverdünnung + 10 ml Wasser in 50 ml-Glasflaschen). Daraus ergaben sich die Verdünnungsstufen 1:2 bis 1:32. Da im Testansatz noch 10 % Bakterien und 10 % Medium (20 % des Endvolumens) zugegeben wurden, resultierten daraus schließlich Proben-Verdünnungsstufen von 1:1,25 bis 1:40 (s. Tab. 1).

Ende 2009 wurde in der Testvorschrift festgelegt, dass die Verdünnungsstufen im Testansatz – und nicht bei der Probenvorbereitung – 1:2 bis 1:32 betragen sollten. Daher wurden die Verdünnungsstufen im Jahr 2010 angepasst (s. Tab. 2). Es wurde zunächst eine 1:1,6-Verdünnung hergestellt (15 ml Probe + 9 ml Wasser), danach wurde wieder jeweils 1:2 verdünnt (jeweils 10 ml Probenverdünnung + 10 ml Wasser).

Tab. 1: Verdünnungsstufen im Ames-Fluktuationstest im Jahr 2009

Bezeichnung	Verdünnungen		
	Verdünnung bei der Probenvorbereitung	Verdünnung durch Medium + Inokulum	Verdünnung im Testansatz
V0	unverdünnt	1:1,25	1:1,25
V1	1:2	1:1,25	1:2,5
V2	1:4	1:1,25	1:5
V3	1:8	1:1,25	1:10
V4	1:16	1:1,25	1:20
V5	1:32	1:1,25	1:40

Tab. 2: Verdünnungsstufen im Ames-Fluktuationstest im Jahr 2010

Bezeichnung	Verdünnungen		
	Verdünnung bei der Probenvorbereitung	Verdünnung durch Medium + Inokulum	Verdünnung im Testansatz
V0	unverdünnt	1:1,25	1:1,25
V1	1:1,6	1:1,25	1:2
V2	1:3,2	1:1,25	1:4
V3	1:6,4	1:1,25	1:8
V4	1:12,8	1:1,25	1:16
V5	1:25,6	1:1,25	1:32

3.4 Testdurchführung zur Untersuchung von Wasserproben

Am Vorabend des Tests wurden je 20 ml Wachstumsmedium (mit Ampicillin) mit je 20 µl Teststamm (TA98 bzw. TA100) beimpft. Die Teststamm-Aliquote wurden bei -75 °C gelagert und nur einmal verwendet. Das beimpfte Medium wurde dann in ein Wasserbad gestellt, das mit Hilfe einer Zeitschaltuhr 6 bis 8 h vor Testbeginn eingeschaltet wurde (Bebrütung unter Schütteln bei 37 °C).

Da es während des Tests keine Leerlaufzeiten gab, mussten vor Testbeginn alle Materialien bereitgestellt, die Platten beschriftet, sowie die Verdünnungen und alle Lösungen hergestellt werden. Die Verdünnungen der Positivkontroll-Substanzen und der S9-Mix (s. 2.) wurden an jedem Testtag frisch angesetzt. Die Chemikalien wurden in Aliquoten bei -75 °C (S9-Fraktion) bzw. -20 °C (Stammlösungen der Positivkontrollen) gelagert und in der Regel nur einmal, höchstens aber zweimal, aufgetaut.

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß dem Entwurf ISO 11350. Die Probenverdünnungen, Positiv- und Negativkontrollen wurden in die Vertiefungen einer 24-Well-Platte pipettiert (drei Parallelen pro Platte). Dann wurde das histidinhaltige Expositionsmedium (10fach konzentriert) und das Inoku-

lum mit der jeweiligen auf den vorgegebenen Trübungswert (s. 3.2) eingestellten Bakterienkonzentration zugegeben. Das Expositionsmedium enthält Histidin in einer sehr geringen Konzentration. Diese Konzentration ermöglicht lediglich ein bis zwei Replikationszyklen bei nicht rückmutierten Bakterien. Für beide Teststämme wurden je zwei gleiche Platten hergestellt, wobei zu einer zusätzlich S9-Mix gegeben wurde. Nach 100 min Bebrütung unter Schütteln bei 37 °C wurde histidinfreies Reversionsindikatormedium hinzugefügt, das den pH-Indikatorfarbstoff Bromkresolpurpur enthielt. Anschließend wurde der Inhalt einer 24-Well-Platte auf drei 384-Well-Platten verteilt, wobei aus einer Vertiefung auf der 24-Well-Platte 48 Vertiefungen der 384-Well-Platte mit je 50 µl befüllt werden konnten. Nach 48 h Bebrütung bei 37 °C wurde gezählt, wie viele von je 48 Vertiefungen sich verfärbt hatten. Der Farbumschlag von violett nach gelb zeigt an, dass sich die ursprünglich auxotrophen Testbakterien in histidinfreiem Nährmedium vermehrt haben, also eine Rückmutation zur Histidin-Prototrophie erfolgt ist. Ausgewertet wurde ohne technisches Hilfsmittel. Die Vertiefungen mit Revertantenwachstum waren jedoch durch ihre Gelbfärbung deutlich von den violetten Vertiefungen zu unterscheiden, so dass eine visuelle Auswertung ohne Problem möglich war (s. Abb. 3). Eine Probe ist positiv, d.h. mutagen, wenn die Anzahl der Vertiefungen mit Revertantenwachstum in einer oder mehreren Verdünnungsstufen bei mindestens einem Teststamm mit oder ohne S9-Mix signifikant ansteigt. Ob die Unterschiede zwischen der Probe bzw. den Verdünnungen und der Negativkontrolle signifikant sind, muss mit statistischen Methoden überprüft werden. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Tox-Rat®. Als Ergebnis wird der D_{min} -Wert angegeben. Dieser Wert gibt diejenige Verdünnungsstufe (den reziproken Wert der jeweiligen Verdünnung) an, bei der keine gentoxische Wirkung der Probe feststellbar ist. Eine Ames-negative Probe hat also einen D_{min} -Wert von 1,25, da die niedrigste im Test eingesetzte Verdünnung 1:1,25 beträgt. Ist die höchste Verdünnung im Standard-Testansatz (1:32 bzw. 1:40-Verdünnung) noch positiv, ergibt sich ein D_{min} -Wert von > 32 bzw. > 40. Ein Testteil (TA98 sowie TA100 jeweils ohne und mit S9) ist allerdings nur gültig, wenn alle Validitätskriterien erfüllt sind: Die Anzahl der Vertiefungen mit Revertantenwachstum (Mittelwerte der Parallelen) darf in der Negativkontrolle höchstens 10 (von 48), in der Positivkontrolle muss sie mindestens 25 (von 48) betragen.

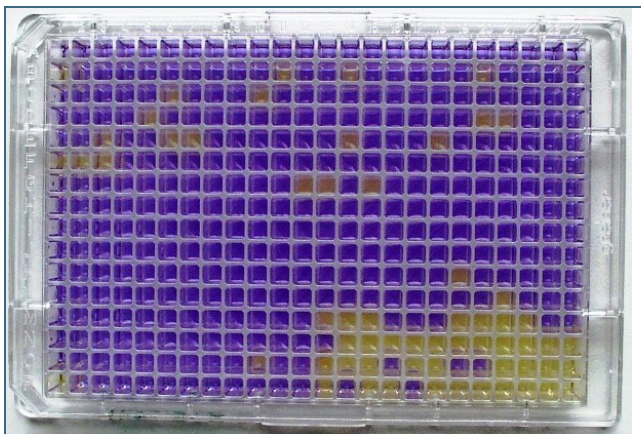


Abb. 3:
Ames-Fluktuationstest:
384-Well-Platte nach 48 h
Bebrütung (Endergebnis).
Revertantenwachstum
wird durch einen Farbum-
schlag nach gelb ange-
zeigt.

Zytotoxische Proben können zu falsch negativen Ergebnissen führen, weil gentoxische Wirkungen aufgrund der Zytotoxizität verdeckt werden. Daher ist im Ames-Fluktuationstest eine Bestimmung der Toxizität gegenüber den eingesetzten Bakterien vorgesehen. Diese wird nur mit dem Teststamm TA98 durchgeführt, da die Bakterienkonzentration bei TA100 zu gering für aussagekräftige Trübungsmesswerte ist. Der Teststamm TA100 wird in relativ niedriger Konzentration eingesetzt, da Spontanrevertanten recht häufig auftreten und bei höheren Konzentrationen die Gültigkeitskriterien bzgl. der Spontanrevertantenzahl oft nicht eingehalten werden könnten. Mit einem Mikrotiterplatten-Reader (zunächst: Genios®, Tecan; ab Herbst 2009: Infinite® M 200, Tecan) wurde die Trübung in den Vertiefungen der 24-Well-Platte zu den Zeitpunkten t_0 (vor Bebrütung) und t_{100} (nach 100 min

Bebrütung) gemessen. Zytotoxische Wirkungen erkennt man durch verringertes Wachstum der Bakterien in den Verdünnungsstufen der Probe im Vergleich zur Negativkontrolle.

Mit dem Ames-Fluktuationstest können nicht nur Wasserproben untersucht werden. Der Test kann auch für die Substanzprüfung eingesetzt werden. Das Verfahren für die Substanztestung wird in Anhang G der ISO-Norm beschrieben. Pro Vertiefung werden 20 µl in DMSO gelöste Substanz bzw. Verdünnungen zugegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Eichkurve zur Umrechnung der optischen Dichte in Trübungswerte

Nach Erstellung der Eichkurve (s. Abb. 4) konnte die am Hitachi-Spectrophotometer U-2000 angezeigte optische Dichte (OD) bei 595 nm in Trübungswerte (Formazine Attenuation Units, FAU) umgerechnet werden.

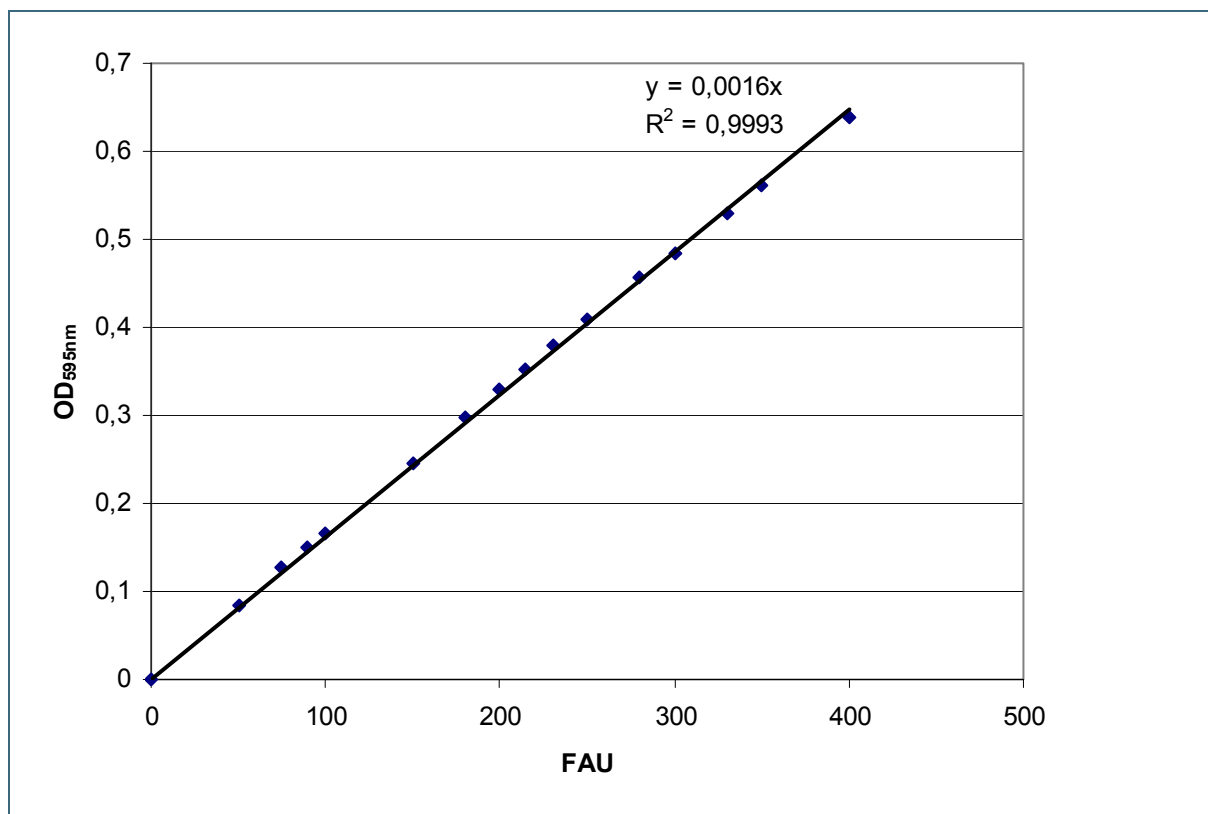


Abb. 4: Eichkurve Trübungsmessung (Hitachi-Spectrophotometer U-2000)

4.2 Probleme bei der Etablierung des Ames-Fluktuationstests

4.2.1 Teststamm TA100

Die Teststämme TA98 und TA100 wurden dem LfU von der BfG im Oktober 2008 zunächst auf festem Nährmedium (Agarplatten) zur Verfügung gestellt. Es wurden daraus Arbeitskulturen hergestellt und der Genotyp der Stämme überprüft, wie in Anhang B und C des Normentwurfs beschrieben. Aliquote Teile der Arbeitskulturen wurden mit Glycerin versetzt (Endkonzentration: 17 %) und bei -75 °C eingefroren.

Mit diesen Kulturen erfolgte die Etablierung der Testvorschrift, wobei unterschiedliche Konzentrationen der Positivkontrollsubstanzen als Proben eingesetzt wurden. Die Platten von TA98 zeigten bei den Referenzsubstanzen die erwarteten Zahlen von Vertiefungen mit Revertantenwachstum, auf den TA100-Platten waren jedoch keine Revertanten aufgetreten.

Daher wurde von der BfG eine weitere TA100-Kultur bezogen, diesmal in Flüssigmedium auf Trockenis. Daraus wurden wiederum Arbeitskulturen nach Anhang B des Normentwurfs hergestellt. Der Ames-Fluktuationstest mit dieser neuen Arbeitskultur ergab die erwarteten Ergebnisse bei den Positivkontrollen (≥ 25 Vertiefungen mit Revertantenwachstum). Der Test war allerdings ungültig, da die Kriterien für die Negativkontrollen (≤ 10 Vertiefungen mit Revertantenwachstum) nicht eingehalten wurden. Daraufhin wurde eine weitere neue Charge an Arbeitskulturen wie folgt angesetzt. Aus der Flüssigkultur der BfG, die in der Zwischenzeit bei -75 °C gelagert wurde, wurde eine Übernacht-Flüssigkultur angesetzt und Aliquote davon am nächsten Morgen eingefroren. Die eine Hälfte der Kultur wurde vor dem Einfrieren mit Glycerin (Endkonzentration: 20 %), die andere Hälfte mit Dimethylsulfoxid (DMSO, Endkonzentration: 10 %) versetzt. Außerdem wurden verschiedene Kryoröhrchen sowie Eppendorf-Gefäße zum Einfrieren getestet. Es konnten in den folgenden Experimenten bzgl. der Anzahl von Vertiefungen mit Revertantenwachstum in der Negativkontrolle keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Aliquoten festgestellt werden. Zu hohe Revertantenzahlen der Negativkontrolle führten allerdings in unregelmäßigen Abständen immer wieder zur Überschreitung des Validitätskriteriums und damit zu ungültigen Testteilen (z. B. Testteil TA100 ohne S9-Zugabe oder TA100 mit S9-Zugabe). Da dies offensichtlich nicht auf die Herstellung und das Einfrieren der Arbeitskulturen zurückzuführen war, wurden weitere Versuche durchgeführt. Hier wurden z. B. die Wachstumszeit der Übernachtskultur und die Bakteriendichte, mit der sie in den Test eingesetzt wurde, variiert. Aber auch hier war kein Einfluss auf die Revertantenzahlen in der Negativkontrolle zu erkennen. Nach einigen Wochen trat das Problem der ungültigen Testteile bei TA100 jedoch nur noch sehr selten auf.

4.2.2 Teststamm TA98

Nachdem im ersten halben Jahr des Projekts die Testteile mit TA98 völlig unproblematisch verlaufen waren, konnte ab April 2009 das Gültigkeitskriterium für die Positivkontrolle beim Testteil TA98 mit S9-Mix (≥ 25 Vertiefungen mit Revertantenwachstum) häufig nicht erfüllt werden. Zunächst wurden neue Aliquote der Arbeitskulturen von TA98, dann neue Stammlösungsaliquote der Positivkontrolle (2-Aminoanthracen) hergestellt, was jedoch beides keinen Erfolg zeigte. Erst nachdem eine neue Charge 2-AA beschafft und daraus eine Stammlösung hergestellt wurde, lag die Zahl der Vertiefungen mit Revertantenwachstum in der Positivkontrolle wieder konstant weit über 25.

4.2.3 Zytotoxizitätsmessung

Bei den Trübungsmessungen zur Bestimmung der Zytotoxizität der Proben fiel von Anfang an auf, dass die mit dem Mikrotiterplatten-Reader Genios® der Fa. Tecan ermittelten Werte in der linken unteren Ecke der 24-Well-Platte niedriger waren als ihre Parallelwerte weiter rechts, obwohl das Messgerät auf das Design der verwendeten Mikrotiterplatten voreingestellt war. Auf Anraten der Herstellerfirma des Messgeräts wurde das verwendete Mikrotiterplatten-Modell (Greiner bio-one 662102) eingescannt. Dies führte jedoch nur zu einer minimalen Verbesserung der Messwerte. Alle in diesem Zu-

sammenhang durchgeführten Versuche deuteten darauf hin, dass wirklich eine Fehlmessung des Geräts vorlag. Dass das Bakterienwachstum in der linken unteren Ecke der Mikrotiterplatte tatsächlich geringer war als an anderen Positionen der Platte, konnte aufgrund der Versuchsergebnisse ausgeschlossen werden.

Mit dem neuen Mikrotiterplatten-Reader Infinite® M 200 der Fa. Tecan traten keine Probleme bei der Zytotoxizitätsmessung mehr auf.

4.3 Interner Ringversuch

Für den internen Ringversuch des DIN-Arbeitskreises „Gentoxizität“ im Februar 2009 wurden zwei Proben mit Substanzgemischen ohne Angabe über deren Inhaltsstoffe von der BfG an die teilnehmenden Labore verschickt. Nach der Herstellung der vorgeschriebenen Verdünnungen wurden beide Proben jeweils sowohl nach dem Protokoll für Wassertestung als auch nach dem Protokoll für Substanztestung untersucht. Für den Teststamm TA98 lagen alle Ergebnisse des LfU im erwarteten Bereich. Beim Teststamm TA100 wurden teilweise die Gültigkeitskriterien nicht eingehalten (s. 4.2.1), besonders bei der Wassertestung.

4.4 Internationaler Ringversuch

Im Rahmen der ISO-Normung des Verfahrens wurde im März 2010 ein internationaler Ringversuch durchgeführt. Es beteiligten sich 18 Labore aus sechs Ländern, die jeweils vier Wasserproben und optional zwei Substanzgemische untersuchten. Bei den vier Wasserproben handelte es sich um eine negative Probe (Rheinwasser), zwei Wasserproben, die mit gentoxischen Substanzen dotiert waren, und einen Ablauf einer industriellen Kläranlage. Das LfU nahm erfolgreich am Ringversuch teil. Insgesamt lieferte der Versuch Verfahrenskenndaten hinsichtlich Spezifität und Sensitivität des Ames-Fluktuationstests nach ISO 11350.

4.5 Statistische Ergebnisbestimmung

Für die Entscheidung, ob eine Probe im Ames-Fluktuationstest eine gentoxische Wirkung zeigt oder nicht, sind statistische Tests nötig. Hierbei wird geprüft, ob in der Probe eine signifikante Zunahme der Revertanten gegenüber der Negativkontrolle feststellbar ist. Diese statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms ToxRat®. Für den Ames-Fluktuationstest sind aufgrund des Testdesigns verschiedene Auswerteverfahren möglich, wie z. B. Williams-Test (bzw. Welch-t-Test bei Varianzhomogenität der Daten), Dunnett-Test oder Bonferroni-Chi²-Test. Innerhalb des Projektzeitraums gaben die Statistik-Experten des ToxRat®-Programms und des DIN-Arbeitskreises „Gentoxizität“ wechselnde Empfehlungen bzgl. des am besten geeigneten Tests. Nach Auswertung der großen Datenmenge des internationalen Ringversuchs setzte sich der Williams-Test durch. Allerdings birgt er als starker statistischer Test das Risiko, dass vermehrt falsch positive Ergebnisse auftreten, besonders wenn die Anzahl der Vertiefungen mit Revertantenwachstum („Revertantenzahlen“) in der Negativkontrolle sehr gering ist. Falsch positiven Ergebnissen kann man entgegenwirken, wenn ein Schwellenwert beim Williams-Test miteinbezogen wird. Dieser Schwellenwert (SW) wird aus dem Mittelwert der Revertantenzahlen in den Negativkontrollen aller Experimente (MW (NK_{gesamt})) im jeweiligen Labor, der Standardabweichung der Probe (SD_{Probe}) und der Zahl der Replikate berechnet.

$$SW = MW (NK_{gesamt}) + 2 * SD_{Probe} / \sqrt{\text{Zahl Replikate}_{Probe}}$$

4.6 Untersuchung von Abwasserproben

Nach der Etablierungsphase und der Lösung der in 4.2 geschilderten Probleme wurde mit der Untersuchung von Abwasserproben begonnen. Zunächst wurden alle Proben aus der chemischen Industrie, die im ersten Halbjahr 2009 am LfU im Rahmen der technischen Gewässeraufsicht (Anhang 22 AbwV und SU 80.24) mit dem umu-Test untersucht wurden, parallel dazu auch mit dem Ames-Fluktuationstest getestet. Gegen Ende des Jahres 2009 wurde das Probenspektrum auf andere Industriesparten, Deponiesickerwasser und kommunales Abwasser erweitert. Im Jahr 2010 lag der Schwerpunkt wieder auf der chemischen Industrie, dazu kamen Proben aus der Papierindustrie und Deponiesickerwässer. Tab. 3 zeigt die Anzahl der in den Jahren 2009 und 2010 mit beiden Verfahren untersuchten Proben und die Zahl der Proben, in denen erbgutschädigende Wirkungen nachgewiesen wurden (positive Proben). Insgesamt waren 23 % (32 von 137) der Proben im Ames-Fluktuationstest und 5 % (7 von 133) im umu-Test positiv.

Tab. 3: Anzahl der untersuchten und positiven Proben 2009 und 2010

	Ames-Fluktuationstest		umu-Test	
	n	pos	n	pos
industrielle Kläranlagenabläufe	100	27	100	7
chemische Industrie	69	18	69	7
Papierindustrie	14	9	14	0
andere Branchen	17	0	17	0
Deponiesickerwässer	16	5	12	0
kommunale Kläranlagenabläufe	21	0	21	0
Gesamtzahl	137	32	133	7

Von den 25 nur im Ames-, nicht aber im umu-Test positiven Proben wurden in nur zwei Proben ökotoxikologische Auffälligkeiten mit klassischen Biotests angezeigt (einmal Fischei-, zweimal Algentest).

4.6.1 Proben aus der chemischen Industrie

In den Jahren 2009 und 2010 wurden 69 Abwasserproben aus der chemischen Industrie untersucht. Das erbgutschädigende Potenzial wurde vergleichend sowohl mit dem Ames-Fluktuationstest als auch mit dem umu-Test bestimmt.

4.6.1.1 Bestimmung der Zytotoxizität

Um falsch negative Untersuchungsergebnisse zu vermeiden, wurden alle Proben aus der chemischen Industrie auf zytotoxische Wirkungen überprüft (s. 3.4 und 4.2.3). Wie erwartet nahm die Zytotoxizität vieler Proben mit zunehmender Verdünnung ab. Allerdings gab es auch Proben, die in mehreren Verdünnungsstufen in etwa gleich giftig wirkten oder die mit zunehmender Verdünnung toxischer wurden.

In der ISO-Norm für den Ames-Fluktuationstest ist kein Grenzwert festgelegt, ab dem eine Probe aufgrund zytotoxischer Wirkungen bzgl. Gentoxizität nicht bewertet werden kann. Daher wurde der Grenzwert aus der DIN-Norm für den umu-Test übernommen. Er beträgt 50 %, d. h. es kann bzgl. Gentoxizität keine Aussage getroffen werden, wenn das Wachstum des Bakterien-Teststammes durch

das Testgut im Vergleich zur Negativkontrolle um mehr als 50 % verringert wird. Dies gilt jedoch beim Ames-Fluktuationstest nicht für positive Proben: Ist nämlich in einer oder mehreren Verdünnungsstufen eine signifikante Zunahme von Vertiefungen mit Revertantenwachstum gegenüber der Negativkontrolle feststellbar, obwohl die Zytotoxizitätswerte über 50 % liegen, hat offenbar ein hinreichendes Wachstum stattgefunden und die Probe wird als genotoxisch bewertet. Beim umu-Test ist eine Auswertung bei Zytotoxizitätswerten über 50 % dagegen grundsätzlich nicht möglich.

Im Ames-Fluktuationstest wiesen 7 von 69 Proben (10 %) Zytotoxizitätswerte über 50 % auf (s. Abb. 5), im umu-Test nur zwei Proben (2,9 %; s. Abb. 6). In diesen Zahlen sind Proben, die trotz hoher Zytotoxizität (evtl. nur in einem Teil der Verdünnungsstufen) noch erbgutschädigend wirkten, nicht enthalten. Beide im umu-Test zytotoxischen Proben stammten vom selben Betrieb, im Ames-Test waren zusätzlich Proben aus drei weiteren Betrieben zytotoxisch. Ergebnisse von zytotoxischen Proben werden mit dem Zeichen „≤“ angegeben, d. h. wirkt beispielsweise nur die 1:1,25-Verdünnung zytotoxisch, lautet das Ergebnis „≤ 2“.

4.6.1.2 Ausfällungen

Bei zahlreichen Proben aus der chemischen Industrie wurde festgestellt, dass entweder schon direkt nach Zugabe des Expositionsmediums zum Testgut oder nach 100 min Bebrütungszeit in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte weiße Partikel ausgefallen waren. Meistens trat dieses Phänomen nur in der 1:1,25-, manchmal aber auch noch in der 1:2- und sogar der 1:4-Verdünnung auf. Die Ausfällungen führten dazu, dass keine sinnvolle Trübungsmessung für die Zytotoxizitätsbestimmung durchgeführt werden konnte. Darüber hinaus konnten falsch negative Ergebnisse bzgl. Genotoxizität hier nicht ausgeschlossen werden. Dieses Problem betraf 17 % (12 von 69; s. Abb. 5) der Proben aus der chemischen Industrie. Hinzu kamen noch 7 weitere Proben, bei denen Partikel ausgefallen waren, die allerdings trotzdem genotoxische Wirkung zeigten. Insgesamt stammten diese 19 Proben von sieben verschiedenen Betrieben.

4.6.1.3 Ergebnisse des Ames-Fluktuationstests im Vergleich zum umu-Test

Mit dem Ames-Fluktuationstest wurde in 18 der 69 Proben (26 %) aus der chemischen Industrie ein erbgutschädigendes Potenzial festgestellt (s. Abb. 5), mit dem umu-Test dagegen nur in 7 von 69 (10 %; s. Abb. 6). Weiterhin fiel auf, dass beim Ames-Fluktuationstest ca. 28 % der Proben nicht zweifelsfrei auswertbar waren, zum einen aufgrund von hoher Zytotoxizität (s. 4.6.1.1), zum anderen aufgrund des Ausfallens von Partikeln im Test (s. 4.6.1.2).

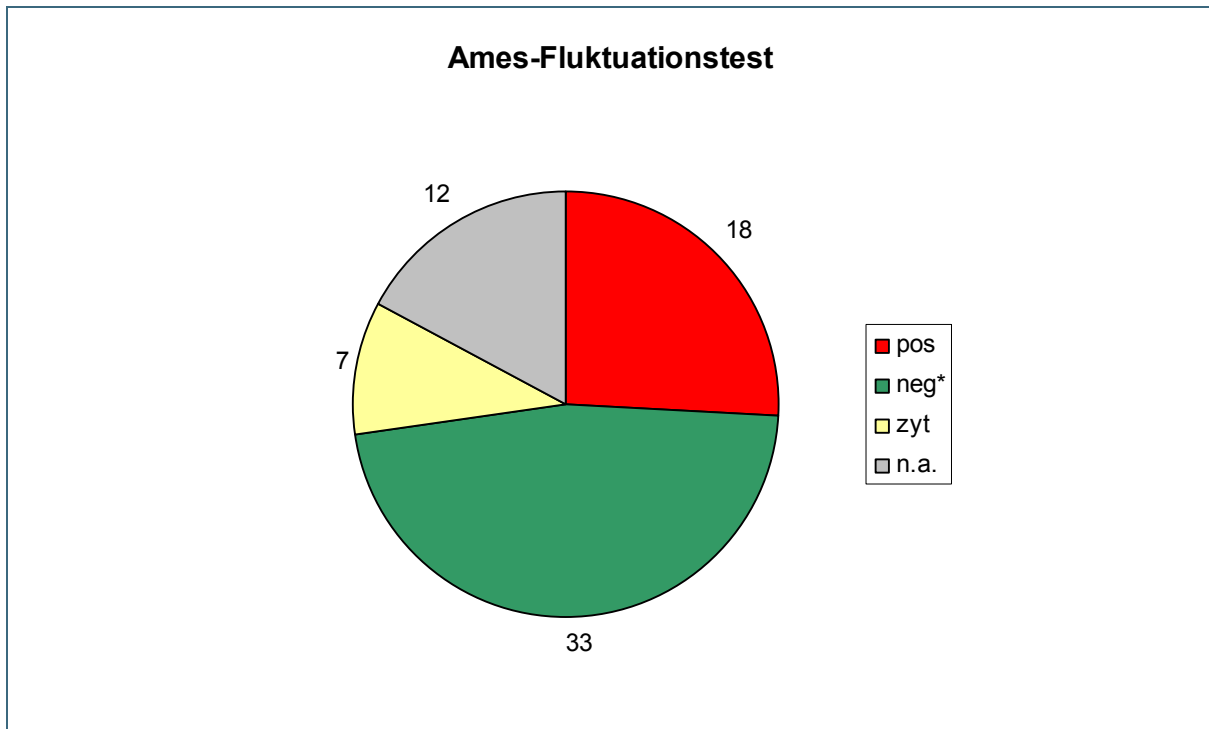


Abb. 5: Ergebnisse des Ames-Fluktuationstests, Proben aus der chemischen Industrie, 2009 + 2010 (pos: Anzahl Proben mit erbgutschädigendem Potenzial; neg: Anzahl Proben ohne erbgutschädigendes Potenzial; zyt: Anzahl Proben mit Zytotoxizitätswerten über 50 %; n.a.: nicht auswertbar aufgrund von Ausfällungen; *: Im ersten Halbjahr 2009 war keine aussagekräftige Zytotoxizitätsbestimmung aufgrund Fehlmessungen des Geräts (s. 4.2.3) möglich. Daher könnten hier einige wenige Proben mit Zytotoxizitätswerten über 50 % enthalten sein.)

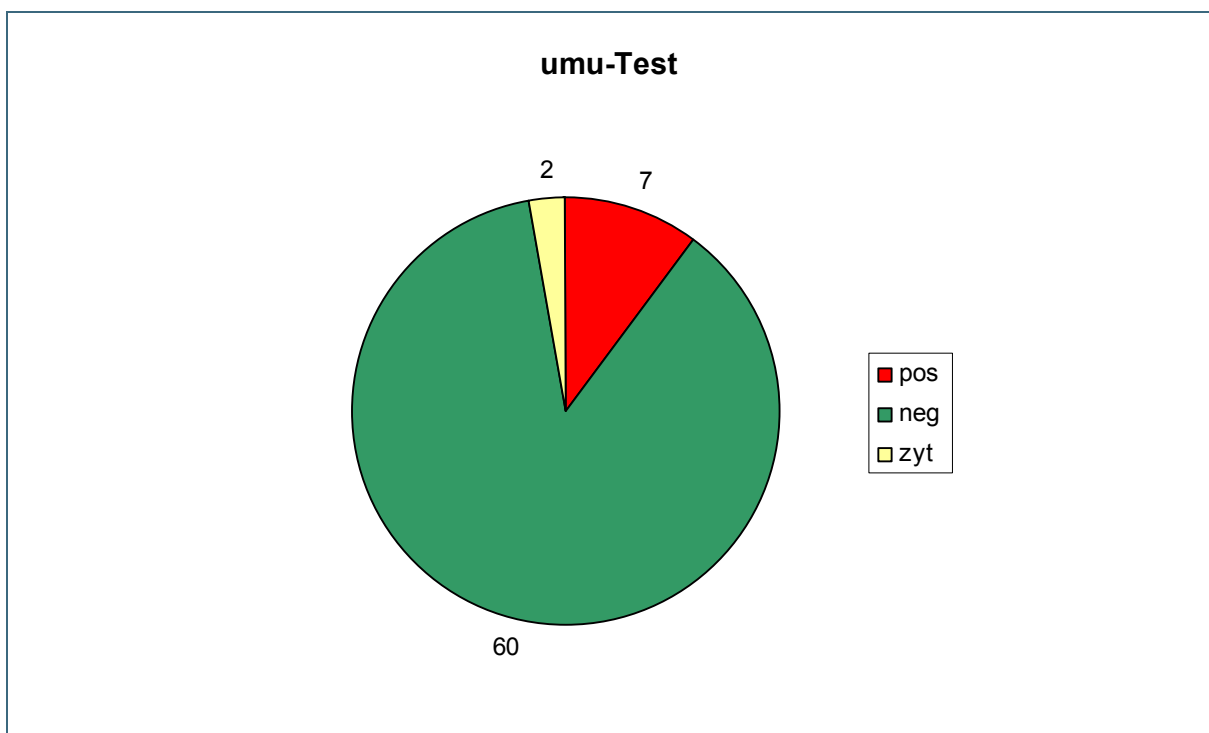


Abb. 6: Ergebnisse des umu-Tests, Proben aus der chemischen Industrie, 2009 + 2010 (pos: Anzahl Proben erbgutschädigendem Potenzial; neg: Anzahl Proben ohne erbgutschädigendes Potenzial; zyt: Anzahl Proben mit Zytotoxizitätswerten über 50 %)

4.6.1.4 Proben mit erbgutschädigendem Potenzial

Übersicht

Alle sieben im umu-Test gentoxischen Proben waren auch im Ames-Fluktuationstest positiv. Diese stammten von nur zwei verschiedenen Betrieben (s. Tab. 4). Von einem dieser Betriebe wurde das gereinigte Abwasser direkt in ein Gewässer eingeleitet (Betrieb A). Das Abwasser des zweiten Betriebs wurde einer kommunalen Kläranlage zugeführt (Betrieb I, Indirekteinleiter).

Tab. 4: Gentoxische Proben aus der chemischen Industrie 2009 und 2010

	Ames-Fluktuationstest	umu-Test
Anzahl der gentoxischen Proben insgesamt	18	7
Anzahl der Betriebe	7	2
Anzahl der gentoxischen Proben/ Direkteinleiter	15	4
Anzahl der Betriebe	6	1

Im Ames-Fluktuationstest erwiesen sich die Kläranlagenabläufe von fünf weiteren Betrieben als erbgutschädigend. Bei 4 dieser 5 Betriebe trat in den Jahren 2009 und 2010 nur einmal ein positives Ergebnis auf, beim fünften (Betrieb B) wiederholten sich die positiven Befunde.

In Tabelle 5 sind die quantitativen Ergebnisse der in beiden Tests positiven Proben zur Veranschaulichung dargestellt. Der G_{EU} -Wert des umu-Tests entspricht wie der D_{min} -Wert des Ames-Tests der Verdünnungsstufe, bei der keine gentoxische Wirkung mehr nachweisbar ist.

Probe	D_{min} -Wert (Ames)	G_{EU} -Wert (umu)
1 (I)	2,5	6
2 (I)	> 40	96
3 (I)	64	96
4 (A)	5	24
5 (A)	5	3
6 (A)	> 40	12
7 (A)	20	6

Tab. 5: Ergebnisse der in beiden Tests positiven Proben (Abwasser chemische Industrie)

(I): Betrieb I; (A): Betrieb A

Elf Proben zeigten nur im Ames-Fluktuationstest erbgutschädigende Wirkung, nicht aber im umu-Test. Tabelle 6 fasst die Ergebnisse dieser Proben zusammen.

Probe	D _{min} -Wert (Ames)	positiver Testteil
8	10	TA100 +S9
9	10	TA100 +S9
10	> 40	TA100 +S9
11	5	TA100 -S9
12	40	TA100 +S9
13 (B)	5	TA98 -S9 und +S9
14	> 40	TA100 +S9
15 (B)	4	TA98 -S9 und +S9
16	2	TA100 +S9
17 (B)	> 32	TA98 -S9 und +S9
18	4	TA100 +S9

Tab. 6:
Ergebnisse der nur im Ames-
Fluktuationstest positiven Proben (Ab-
wasser chemische Industrie)

(B): Betrieb B

Betrieb A

Nachdem im Jahr 2008 im Kläranlagenablauf von Betrieb A (Direkteinleiter, chemische Industrie) die Mindestanforderungen nach AbwV für den umu-Test und andere Biotests mehrfach nicht eingehalten worden waren, verpflichtete sich der Betreiber, einen Aktivkohlefilter zur weitergehenden Abwasserreinigung zu installieren. Mit dem umu-Test wurden daraufhin in den Jahren 2009 und 2010 im Ablauf des Filters keine gentoxischen Wirkungen mehr nachgewiesen (s. Tab. 7). Der Ames-Fluktuationstest zeigte dagegen in 3 von 9 Proben weiterhin erbgutschädigendes Potenzial an, eine weitere Probe war aufgrund hoher Zytotoxizität nicht auswertbar. Auch im Algentest kam es in zwei der weitergehend gereinigten Ablaufproben zu Auffälligkeiten (s. Tab. 7).

Betrieb B

In den Jahren 2009 und 2010 wurden in 3 von 5 Ablaufproben von Betrieb B (Direkteinleiter, chemische Industrie) mit Hilfe des Ames-Fluktuationstest erbgutschädigende Wirkungen nachgewiesen (TA98 ohne und mit S9), nicht jedoch mit dem umu-Test. Allerdings ergab die Überprüfung von Ergebnissen des umu-Tests aus vorangegangenen Jahren vereinzelte Auffälligkeiten.

Der Betreiber wurde aufgefordert zu klären, welche Stoffe im Produktionsprozess gentoxische Wirkungen hervorrufen könnten. Der Verdacht fiel auf Phosphorsäure, die in Form eines kommerziell erhältlichen Recyclingprodukts eingesetzt wurde.

Sowohl diese Phosphorsäure als auch Abwasserteilströme wurden daraufhin mit Ames- und umu-Test untersucht. Obwohl die Phosphorsäure auch nach Neutralisation stark zytotoxisch wirkte, wurden trotzdem erbgutschädigende Wirkungen mit dem Ames-Fluktuationstest nachgewiesen. Mit dem umu-Test wurden hier keine gentoxischen Effekte detektiert, dagegen erwies sich ein Abwasserteilstrom als erbgutschädigend.

Die chemische Analyse ergab, dass die Phosphorsäure massiv mit organischen Stoffen verunreinigt war. Neben dem mengenmäßig dominierenden Anilin (mind. 1,5 mg/l), wurden Chloraniline (ca. 0,5 mg/l), Methylanilin (ca. 0,4 mg/l) sowie weitere Aniline, Amine und andere Substanzen gefunden. In zwei der drei Abwasserteilströme wurden ebenfalls Aniline und Amine (im µg/l-Bereich) nachgewiesen.

Aufgrund der Testergebnisse stellte der Betreiber die Verwendung der recycelten Phosphorsäure ein.

Tab. 7: Untersuchungsergebnisse Betrieb A

Probe		vor Aktivkohlefilter	nach Aktivkohlefilter
Jan. 09	D _{min} -Wert (Ames)	5	1,25
	G _{EU} -Wert (umu)	3	1,5
März 09	D _{min} -Wert (Ames)	> 40	1,25
	G _{EU} -Wert (umu)	12	1,5
April 09	D _{min} -Wert (Ames)	10	> 40*
	G _{EU} -Wert (umu)	1,5	1,5
Mai 09	D _{min} -Wert (Ames)	n. u.	40
	G _{EU} -Wert (umu)	n. u.	1,5
Sept. 09	D _{min} -Wert (Ames)	1,25	1,25
	G _{EU} -Wert (umu)	1,5	1,5
Nov. 09	D _{min} -Wert (Ames)	1,25	1,25
	G _{EU} -Wert (umu)	1,5	1,5
Febr. 10	D _{min} -Wert (Ames)	zyt.	1,25
	G _{EU} -Wert (umu)	1,5	1,5
April 10	D _{min} -Wert (Ames)	zyt.	zyt.*
	G _{EU} -Wert (umu)	1,5	1,5
Sept. 10	D _{min} -Wert (Ames)	4	2
	G _{EU} -Wert (umu)	1,5	1,5

n. u.: nicht untersucht

*: hier auch Nichteinhaltung der Mindestanforderungen beim Algentest

4.6.2 Proben aus der Papierindustrie

Im Jahr 2010 lag ein Schwerpunkt der SU 80.24 „Untersuchung von Abflüssen aus Betrieben unterschiedlicher Industriesparten auf ihre Toxizität gegenüber Daphnien, Algen, Leuchtbakterien und höheren Wasserpflanzen“ der technischen Gewässeraufsicht auf der Branche „Papierindustrie“. Insgesamt wurden in den Jahren 2009 und 2010 14 Kläranlagenabläufe aus der Papierindustrie zusätzlich mit beiden Gentoxizitätsverfahren getestet. Im umu-Test waren alle Proben negativ, im Ames-Fluktuationstest dagegen 64 % (9 von 14) positiv. Bei 7 der 9 untersuchten Betriebe wies mindestens eine Probe erbgutschädigendes Potenzial auf. Bei allen 9 positiven Proben war der Testteil TA100 mit S9 positiv, bei 4 von ihnen zusätzlich TA100 ohne S9. Bei 2 dieser 4 Proben waren außerdem die Testteile TA98 ohne und mit S9 positiv.

Dass Proben aufgrund von hohen Zytotoxizitätswerten oder dem Ausfallen von Partikeln nicht zweifelsfrei ausgewertet werden konnten, war hier im Gegensatz zu Proben aus der chemischen Industrie nicht festzustellen. Allerdings war die Auswertung der Mikrotiterplatten häufig problematisch, da viele Vertiefungen nur schwach gelblich oder lediglich etwas trüb erschienen. Die Vermutung, dass sich in diesen Vertiefungen trotzdem Rückmutanten befanden, konnte durch das Überimpfen auf Minimalagarplatten (Vogel-Bonner-Platten, DIN 38415-4: konventioneller Ames-Test) ohne und mit Histidin bestätigt werden. Die Bakterien wuchsen auch auf histidinfreien Platten, es handelte sich also tatsächlich um Rückmutanten. Bakterien aus nicht trüben, violetten Vertiefungen wuchsen dagegen nur auf Platten mit Histidin.

4.6.3 Proben aus anderen Industriezweigen

In 17 Proben aus anderen Industriezweigen (Erdöl, Metallverarbeitung, Lederherstellung) wurden weder mit dem Ames- noch mit dem umu-Test erbgutschädigende Wirkungen nachgewiesen.

4.6.4 Proben aus kommunalen Kläranlagen

In 21 Ablaufproben aus sechs kommunalen Kläranlagen waren mit beiden Verfahren keine gentoxischen Wirkungen detektierbar. Diese sechs Anlagen wurden ausgewählt, da sie entweder mit einer weitergehenden Reinigungsstufe (UV-Bestrahlung, Membranfiltration bzw. Ultraschall-Ozonierung) ausgestattet waren (fünf Anlagen) oder Industrieabwasser mit gentoxischem Potenzial eingeleitet wurde (eine Anlage, s. 4.6.1.4). Von den Kläranlagen mit weitergehender Reinigung wurden Proben vor und nach der letzten Stufe entnommen.

4.7 Untersuchung von Deponiesickerwässern

5 von 16 (31 %) Deponiesickerwässer zeigten erbgutschädigendes Potenzial im Ames-Fluktuationstest, wogegen alle 12 im umu-Test untersuchten Sickerwässer unauffällig waren. Auch bei den Sickerwässern trat das Problem auf, dass manche Proben nicht eindeutig auswertbar waren. Zum einen fielen gelegentlich Partikel aus, zum anderen war der Umschlag des Indikatorfarbstoffes nach gelb bei einigen Vertiefungen nur schwach ausgeprägt.

5 Diskussion

5.1 Probleme mit den Teststämmen und der Zytotoxizitätsmessung

Beim Teststamm TA100 war die Zahl der Revertanten in der Negativkontrolle am Anfang des Projekts häufig zu hoch (> 10 von 48), sodass die Gültigkeitskriterien des Normentwurfs nicht eingehalten wurden (s. 4.2.1). Der Einfluss verschiedener Faktoren, z. B. Dauer der Bebrütung vor Testbeginn (6 bis 10 h), Bakteriendichte im Test und Einfrieren der Arbeitskulturen in Glycerin oder DMSO, konnte experimentell ausgeschlossen werden. Als einzige Erklärungsmöglichkeit blieb, dass in der Etablierungsphase die Bebrütungszeit von 100 min manchmal überschritten wurde. Mit zunehmender Erfahrung konnten jedoch die Arbeitsschritte optimiert und in der vorgegebenen Zeit durchgeführt werden. Allerdings wurden die Gültigkeitskriterien auch bei genau eingehaltener Bebrütungszeit nicht immer erfüllt. In diesen Fällen musste der Test wiederholt werden. Vom Stamm TA100 ist bekannt, dass eine hohe Zahl von Spontanrevertanten auftreten kann (de Serres und Shelby 1979).

Bei TA98 mit S9-Mix wurden die Gültigkeitskriterien für die Positivkontrolle in einigen Tests nicht erfüllt (s. 4.2.2). Für 2-Aminoanthracen ist auf der Verpackung kein Haltbarkeitsdatum angegeben. Die ältere Charge war ca. zwei Jahre alt. Sie wurde jedoch im Kühlschrank aufbewahrt anstatt, wie auf der Verpackung angegeben, bei Raumtemperatur. Vielleicht hatte sie Feuchtigkeit aufgenommen, was zu einer geringeren Konzentration in der Stammlösung geführt haben könnte. Mit einer neuen Charge der Positivkontrollsubstanz traten keine Probleme mehr auf.

Mit dem Mikrotiterplatten-Reader Genios® (Fa. Tecan) war keine zuverlässige Trübungsmessung zur Bestimmung der Zytotoxizität der Proben möglich (s. 4.2.3). Dies änderte sich auch nicht, nachdem Einstellungen am Gerät angepasst wurden. Daher konnten erst die Messungen mit dem neuen Gerät Infinite® M 200 für die Auswertung verwendet werden (s. Abb. 5).

5.2 Statistische Auswertung des Ames-Fluktuationstests

Die Durchführung des Ames-Fluktuationstests in Mikrotiterplatten mit 384 Vertiefungen und drei Parallelansätzen erlaubt eine sinnvolle statistische Auswertung. Mit dem Williams-Test wird unter Einbeziehung eines Schwellenwertes zur Verhinderung falsch positiver Ergebnisse (s. 4.5) geprüft, ob in der Probe eine signifikante Zunahme der Revertanten gegenüber der Negativkontrolle feststellbar ist. Das mit Hilfe eines Computerprogramms errechnete statistische Ergebnis muss durch eine abschließende fachliche Beurteilung auf seine Plausibilität hin überprüft werden. Wird beispielsweise nur für die 1:8-Verdünnung, nicht aber für die stärker und schwächer verdünnten Ansätze ein statistisch signifikantes Ergebnis bestimmt, ist dies in der Regel nicht plausibel und wird nicht gewertet. Würden jedoch für die Verdünnungsstufen bis 1:4 erhöhte Zytotoxizitätswerte gemessen, handelte es sich durchaus um ein plausibles Ergebnis, da in den Verdünnungsstufen 1:1,25, 1:2 und 1:4 die Gentoxizität von der Zytotoxizität überlagert sein könnte.

5.3 Vergleich zwischen umu- und Ames-Fluktuationstest

Es wurden Abwasserproben aus der chemischen Industrie, der Papierindustrie und anderen Industriezweigen, aus kommunalen Kläranlagen sowie Deponiesickerwässer untersucht. Der Ames-Fluktuationstest erwies sich als wesentlich sensitiver als der umu-Test. Mit Hilfe des ersteren wurden 23 % der Proben als gentoxisch eingestuft, mit letzterem nur 5 %. Fluktuationstests gelten allgemein als sehr sensitiv (Green und Bridges 1977). Speziell zum Ames-Fluktuationstest gibt es allerdings bisher sehr wenige Daten und diese sind aufgrund der unterschiedlichen Durchführungsprotokolle nicht unbedingt vergleichbar. Manche Autoren fanden eine höhere Sensitivität des Ames-Fluktuationstests

im Vergleich zum SOS-Chromotest (Giller et al. 1997; Jolibois und Guerbet 2005). Bei der Untersuchung von 71 Chemikalien wurden mit dem konventionellen Ames-Test und dem Ames-Fluktuationstest (bzw. Ames II-Test) äquivalente Ergebnisse erzielt (Kamber et al. 2009).

Für den Ames-Fluktuationstest ist der Arbeits- und Zeitaufwand größer als für den umu-Test. Beim umu-Test liegen die Ergebnisse innerhalb eines Tages vor, beim Ames-Test können sie erst nach einer Bebrütungszeit von zwei Tagen abgelesen werden. Außerdem zeigte sich, dass beim Ames-Fluktuationstest mehr Ergebnisse aufgrund von Zytotoxizität und Ausfällungen nicht eindeutig ausgewertet werden konnten als beim umu-Test (s. 5.3.4).

5.3.1 Kommunale Kläranlagen

Die Abläufe von kommunalen Kläranlagen wiesen sowohl vor als auch nach weitergehender Abwasserreinigung in beiden Tests kein gentoxisches Potenzial auf (s. 4.6.4). Deshalb kann hier zu einer möglichen Reduzierung erbgutschädigender Wirkungen bzw. zu einer evtl. Neubildung gentoxischer Stoffe („Desinfektionsnebenprodukte“) durch UV-Bestrahlung oder Ozonierung keine Aussage getroffen werden.

5.3.2 Deponiesickerwässer

Mehr als 30 % der untersuchten Deponiesickerwässer waren im Ames-Test positiv, im umu-Test waren alle Resultate negativ (s. 4.7). Gentoxische Effekte von Sickerwässern wurden schon häufig beschrieben, sie wurden beispielsweise mit Comet Assay oder Micronucleus-Test detektiert (Li et al. 2008; Bortolotto et al. 2009). Aus Konzentraten von Sickerwässern gelang der Nachweis erbgutschädigender Wirkungen auch mit dem konventionellen Ames-Test (Omura et al. 1992) und mit dem umu-Test (Baun et al. 2004), mit letzterem allerdings nur in einem von zehn untersuchten Konzentraten.

5.3.3 Papierindustrie

Mit dem Ames-Fluktuationstest wurden in fast zwei Dritteln der Proben aus der Papierindustrie erbgutschädigende Wirkungen nachgewiesen, wogegen im umu-Test keine Auffälligkeiten feststellbar waren (s. 4.6.2). Auch Gartiser et al. (2009) fanden in 20 Abwasserproben aus der Papierindustrie mit Hilfe des umu-Tests keine gentoxischen Wirkungen. Es ist jedoch bekannt, dass Abwässer aus der Papier- und Zellstoffindustrie eine Vielzahl von Stoffen mit erbgutschädigendem Potenzial enthalten können (Nestmann et al. 1980; Claxton et al. 1998; Hewitt und Marvin 2005). In der vorliegenden Arbeit spiegelt sich die Vielzahl der mutagenen Stoffe in den Papierabwässern darin wieder, dass sowohl für den Teststamm TA98 als auch für den Stamm TA100 – jeweils ohne und mit metabolischer Aktivierung durch die S9-Fraktion – positive Ergebnisse erzielt wurden. Rao et al. (1994) detektierten mutagene Wirkungen mit einem Ames-Fluktuationstest in Abläufen aus der Papierindustrie. Es war allerdings ein Testansatz mit über 10 ml Testgut nötig, um positive Ergebnisse zu erhalten. Bei der in der vorliegenden Studie verwendeten Version des Ames-Fluktuationstests reichten 400 µl Testgut für positive Ergebnisse.

Bei der Untersuchung von Proben aus der Papierindustrie färbten sich manche Vertiefungen mit Revertantenwachstum nicht eindeutig gelb. Normalerweise bewirkt die pH-Wert-Erhöhung im Medium, die durch die Stoffwechselaktivität während des Bakterienwachstums zustande kommt, einen Farbumschlag von violett nach gelb. Schwache bis keine Färbung trotz sichtbarem Bakterienwachstum könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich zu viele Puffersubstanzen im Testgut befanden und sich daher die pH-Werte in den Vertiefungen trotz Bakterienwachstum nicht wesentlich änderten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der standardisierte Ames-Fluktuationstest (ISO 11350) bei Abwässern aus der Papierindustrie erfolgreich und weitgehend ohne analytische Störungen eingesetzt werden kann, um gentoxische Wirkungen zu detektieren.

5.3.4 Chemische Industrie

28 % der Ergebnisse des Ames-Fluktuationstests für Proben aus der chemischen Industrie waren hinsichtlich Gentoxizität nicht eindeutig auswertbar, da die Zytotoxizitätswerte über 50 % lagen oder Partikel in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten ausgefallen waren. Der für den umu-Test eingesetzte *Salmonella*-Stamm erwies sich bezüglich der Überlebensfähigkeit als stabiler als die Ames-Stämme, da bei nur ca. 3 % der Proben die Zytotoxizität im umu-Test erhöht war. Probleme mit Ausfällungen traten im umu-Test nicht auf. Grund dafür könnte sein, dass das Testmedium des umu-Tests statt eines Phosphatpuffers HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure) enthält. Beim Ames-Fluktuationstest bilden sich vermutlich aus Inhaltsstoffen des Testguts und Phosphaten des Testmediums unlösliche Verbindungen. Es sollte daher überprüft werden, ob auch im Testmedium des Ames-Fluktuationstests HEPES oder eine andere Puffersubstanz eingesetzt werden kann.

Auch für Proben aus der chemischen Industrie war der Ames-Fluktuationstest mit 26 % positiven Proben wesentlich sensitiver als der umu-Test (10 %). Vergleicht man die G_{EU-} und die D_{min} -Werte der in beiden Tests positiven Proben, ist kein eindeutiger Trend zu erkennen. Zum Teil liegen die G_{EU-} , zum Teil die D_{min} -Werte höher (s. Tab. 5). Eine direkte Übereinstimmung der Testergebnisse ist hier auch nicht zu erwarten, da die mit dem jeweiligen Verfahren erfassten Wirkmechanismen unterschiedlich sind.

Im Kläranlagenablauf eines direkteinleitenden Betriebs (Betrieb A, s. 4.6.1.4) wurden sowohl mit dem umu- als auch mit dem Ames-Fluktuationstest erbgutschädigende Wirkungen detektiert, auch beim Algen- und Fischeitest wurden die Mindestanforderungen an die Giftigkeit nach AbwV nicht eingehalten. Der Betreiber entschloss sich deshalb, einen Aktivkohlefilter zur weitergehenden Abwasserreinigung zu installieren. Obwohl alle Proben daraufhin im umu-Test unauffällig waren, zeigten sich im Ames-Fluktuationstest teilweise gentoxische Wirkungen. Auch beim Algentest kam es zweimal zu Auffälligkeiten (s. Tab. 7). Durch den Aktivkohlefilter wurden offenbar nicht alle toxischen Substanzen während der gesamten Zeitdauer zurückgehalten.

Mit dem Ames-Fluktuationstest erwiesen sich die Abläufe von fünf weiteren Direkteinleitern als gentoxisch. Bei vier dieser fünf Betriebe trat im Untersuchungszeitraum 2009 und 2010 nur ein positives Ergebnis auf. Daher wurden bisher keine Maßnahmen eingeleitet. Bei diesen Betrieben werden auch im Jahr 2011 beide Gentoxizitätstests durchgeführt, um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um einmalige positive Ergebnisse handelte. Bei Betrieb B (s. 4.6.1.4) wiederholten sich die positiven Ergebnisse im Ames-Fluktuationstest. Grund dafür war sehr wahrscheinlich eine mit Anilinen und Aminen verunreinigte Recycling-Phosphorsäure, die im Produktionsprozess eingesetzt wurde. Aromatische Amino- und Nitroverbindungen können Rasterschub-Mutationen auslösen (s. 2), was sich hier in positiven Testergebnissen mit dem Stamm TA98 widerspiegelt (s. Tab. 6). Der Betreiber verzichtet seit Ende 2010 auf den Einsatz der verunreinigten Säure. Im Jahr 2011 werden dennoch auch bei diesem Betrieb beide Gentoxizitätstests durchgeführt.

6 Schlussfolgerungen

Mit dem neu etablierten Ames-Fluktuationstest wurden in wesentlich mehr Kläranlagenabläufen von Industriebetrieben und in Deponiesickerwässern erbgutschädigende Wirkungen nachgewiesen als mit dem bisher ausschließlich durchgeführten umu-Test. Es könnte daher sinnvoll sein, diesen Test aufgrund seiner höheren Sensitivität dauerhaft in das Spektrum der Biotests in der Abwasserüberwachung aufzunehmen, um den Gewässerschutz zu verbessern.

Da manche Testergebnisse nicht zweifelsfrei ausgewertet werden können, ist eine Anpassung der Testvorschrift bzgl. des Testmediums notwendig.

7 Zusammenfassung

Über (industrielle) Kläranlagenabläufe können erbgutschädigende Stoffe in Oberflächengewässer gelangen. Diese stellen eine Gefahr für Mensch und Umwelt dar. Daher werden Kläranlagenabläufe von bestimmten Industriebetrieben mit Hilfe von Gentoxizitätstests untersucht. Bisher wurde ausschließlich der umu-Test (DIN 38412-3) eingesetzt, der als alleiniges Verfahren im Vollzug der Abwasserüberwachung nach AbwV verankert ist. In der vorliegenden Arbeit wurde ein weiterer Test, der Ames-Fluktuationstest, etabliert, und die Ergebnisse mit denen des umu-Tests hinsichtlich Wirkungsspektrum und Sensitivität verglichen.

Der Arbeitsaufwand für den Ames-Fluktuationstest erwies sich als höher als der für den umu-Test. Außerdem erhält man Ergebnisse bei ersterem erst nach zwei Tagen, wogegen sie bei letzterem innerhalb eines Arbeitstags vorliegen. Die Untersuchung von fast 140 Wasserproben ergab jedoch, dass der Ames-Fluktuationstest wesentlich sensitiver ist. Insgesamt zeigten im Ames-Test 23 %, im umu-Test nur 5 % der untersuchten Proben erbgutschädigende Wirkungen. Die im umu-Test positiven Proben stammten ausschließlich aus der chemischen Industrie, beim neuen Test kamen positive Resultate bei Proben aus der Papierindustrie und bei Deponiesickerwässern hinzu. Betrachtet man nur die Proben aus der chemischen Industrie, waren im Ames-Fluktuationstest 26 % und im umu-Test 10 % positiv. Der Anteil an positiven Proben im Ames-Test war bei den Deponiesickerwässern (31 %) und bei den Kläranlagenabläufen aus der Papierindustrie (64 %) noch höher. In kommunalen Kläranlagenabläufen und Proben aus anderen Industriezweigen wurde dagegen mit beiden Verfahren kein gentoxisches Potenzial nachgewiesen. Zytotoxizität kann in beiden Tests erbgutschädigende Wirkungen überlagern. Dieser Effekt ist beim Ames-Test stärker ausgeprägt. Für einige Proben war das im Ames-Fluktuationstest verwendete Testmedium nicht geeignet, da unlösliche Verbindungen ausfielen. Die Zusammensetzung des Mediums sollte daher überprüft und ggf. die Puffersubstanz geändert werden.

Aufgrund der Standardisierung (ISO 11350), der Sensitivität und der Eignung für die Matrix Abwasser erfüllt der Ames-Fluktuationstests die Voraussetzungen, um das Spektrum der Biotests in der Abwasserüberwachung zu ergänzen. Besonders die Untersuchung von Kläranlagenabläufen aus speziellen Branchen, wie z. B. der Papierindustrie und der chemischen Industrie, sowie von Deponiesickerwässern erscheint sinnvoll.

8 Literatur

- Ames BN, Lee FD, Durstun WE (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Nat Acad Sci USA* 70(3): 782-786.
- Baun A, Ledin A, Reitzel LA, Bjerg PL, Christensen TH (2004): Xenobiotic organic compounds in leachates from ten Danish MSW landfills - chemical analysis and toxicity tests. *Water Res* 38(18): 3845-3858.
- Bortolotto T, Bertoldo JB, da Silveira FZ, Defaveri TM, Silvano J, Pich CT (2009): Evaluation of the toxic and genotoxic potential of landfill leachates using bioassays. *Environ Toxicol Phar* 28(2): 288-293.
- Bridges BA (1980). The fluctuation test. *Arch Toxicol* 46(1-2): 41-44.
- Claxton LD, Houk VS, Hughes TJ (1998): Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat Res - Rev Mutat* 410(3): 237-243.
- de Serres FJ, Shelby MD (1979). Recommendations on data production and analysis using the *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 64: 159-165.
- Gartiser S, Hafner C, Hercher C, Kronenberger-Schäfer K (2009): Bewertung von Direkteinleitern mit Biotests. Teil 1: Abwasser in der Papierindustrie. *Korrespondenz Abwasser, Abfall* 56: 915-920.
- Giller S, Le Curieux F, Erb F, Marzin D (1997). Comparative genotoxicity of halogenated acetic acids found in drinking water. *Mutagenesis* 12(5): 321-328.
- Green MHL, Bridges BA (1977). Fluctuation tests for mutagenicity. *Mutat Res* 46(3): 220.
- Hewitt LM, Marvin CH (2005): Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents. *Mutat Res - Rev Mutat* 589(3): 208-232.
- Jolibois B, Guerbet M (2005). Evaluation of industrial, hospital and domestic wastewater genotoxicity with the *Salmonella* fluctuation test and the SOS chromotest. *Mutat Res* 565(2): 151-162.
- Kamber M, Flückiger-Isler S, Engelhardt G, Jaeckh R, Zeiger E (2009). Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity. *Mutagenesis* 24(4): 359-366.
- Kopf W, Pluta HJ (2009). Standardised biological test methods for measuring toxicity of effluents and receiving waters in the Danube River Basin (DRB). *Danube News* 20(11): 5-7.
- Li G, Yun Y, Li H, Sang N (2008): Effect of landfill leachate on cell cycle, micronucleus, and sister chromatid exchange in *Triticum aestivum*. *J Hazard Mater* 155(1-2): 10-16.
- Nestmann ER, Lee EGH, Matula TI, Douglas GR, Mueller JC (1980): Mutagenicity of constituents identified in pulp and paper mill effluents using the *Salmonella*/mammalian-microsome assay. *Mutat Res - Genet Tox* 79(3): 203-212.
- Omura M, Inamasu T, Ishinishi N (1992): Mutagenic activity of the leachate of municipal solid waste landfill. *Mutat Res - Genet Tox* 298(2): 125-129.

Perez S, Reifferscheid G, Eichhorn P, Barcelo D (2003). Assessment of the mutagenic potency of sewage sludges contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons by an Ames fluctuation assay. *Environ Toxicol Chem* 22(11): 2576-2584.

Rao SS, Burnison BK, Rokosh DA, Taylor CM (1994): Mutagenicity and toxicity assessment of pulp mill effluent. *Chemosphere* 28(10): 1859-1870.

Reifferscheid G, von Oepen B (2002). Genotoxicity and mutagenicity of suspended particulate matter of river water and waste water samples. *Scientific World Journal* 2: 1036-1039.

