

Herrn Univ.-Prof.Dipl.-Ing.Dr. R. LIEPOLT zum 80. Geburtstag gewidmet.

UNTERSUCHUNGEN ZUR MUTAGENEN AKTIVITÄT VON TRINK-, OBERFLÄCHEN- UND ABWÄSSERN IM RAUM WIEN

A. SCHNATTINGER

1. Einleitung und Problemstellung

Angesichts der Informationsflut über der Gesundheit drohende Gefahren durch Umweltgifte, die auch mit dem Trinkwasser aufgenommen werden können, steht die interessierte Öffentlichkeit zwischen Angst als einem Gefühl unbestimmter Lebensbedrohung bzw. resignativem Gleichmut auf der einen und Negation tatsächlicher Probleme auf der anderen Seite. Diesen zutiefst emotionalen Haltungen steht jedoch die Tatsache eines Defizits an rational überprüfbaren wissenschaftlichen Erkenntnissen zur Toxikologie von Wasserinhaltsstoffen gegenüber.

Abgesehen von unidentifizierten Inhaltsstoffen sind selbst chemisch identifizierte Substanzen hinsichtlich ihrer biologischen Wirksamkeit schwierig einzuschätzen, da für die Lösung des folgenden Problemkreises bisher erst Ansätze bestehen:

Mit modernen Analysenverfahren können Konzentrationen im Wasser nachgewiesen werden, über deren Wirkungen bei Langzeitaufnahme keine gesicherten Ergebnisse vorliegen.

Wasser verändert die Pharmakokinetik von Substanzen und Stoffkombinationen, wobei im besonderen über Kombinationswirkungen zu wenig Kenntnisse existieren.

Die Aufnahme von Fremdstoffen aus dem Wasser muß zwar im Zusammenhang mit der Aufnahme aus anderen Medien beurteilt werden, die Übertragung von Toxizitätsdaten, die an Lebensmitteln oder Luft erstellt wurden, ist aber kaum möglich.

Aus diesen Besonderheiten des Wassers wird die Forderung abgeleitet, die Toxikologie der über das Trinkwasser vermittelten Substanzen als eigenes Teilgebiet zu entwickeln (DOBBERKAU et al., 1982)

Im Hinblick auf die langfristige Aufnahme geringer Konzentrationen von "Schadstoffen", steht die Frage nach chronischer Toxizität, Cancerogenität und Mutagenität im Vordergrund.

Der Einsatz konventioneller Langzeittierstudien zur Klärung dieses umfangreichen Fragenkomplexes ist weder technisch noch ökonomisch durchführbar, während die Extrapolation von tierexperimentellen Ergebnissen nach hohen Dosierungen auf Langzeitwirkungen niederer Konzentrationen fragwürdig erscheint.

Die somatische Mutationstheorie des Krebses, die besagt, daß der Mechanismus der Cancerogenese mit einer bleibenden Veränderung am Erbgut einer Körperzelle einsetzt, hat zu verbreitetem Einsatz der in den letzten Jahren entwickelten Bakterienmutagenitätstests geführt. Allerdings werden mit Bakterien als Testorganismen ausschließlich Genmutationen nachgewiesen, so daß in der Substanzprüfung auch eukaryotische Tests, im besonderen mit Säugetierzellen, zur Erfassung sowohl von Chromosomen- als auch von Genommutationen verwendet werden. In der Praxis ist jedoch die

Durchführung sämtlicher von der Theorie her begründbarer Testverfahren für die Prüfung von komplexen Substanzgemischen, wie sie im Wasser vorliegen, bis heute noch weitgehend unausgeschöpft. Daher sollte zunächst ein Testsystem ausgewählt werden, das standardisierbar und aussagekräftig ist.

Der Salmonella /Mikrosomen-Test nach AMES et al. (1975) hat sich in der Prüfung von Einzelsubstanzen, bei guter Korrelation zu Cancerogenitätsstudien, als einfach, billig und empfindlich erwiesen.

Bei Untersuchung des komplexen Substrats Wasser ist zu beachten, daß für den AMES-Test wirksame Konzentrationen erst durch Einsatz von Anreicherungsverfahren erreicht werden, falls Verunreinigungen im Mikrogramm- und Submikrogrammbereich pro Liter Wasser vorliegen.

In den letzten Jahren sind einige Untersuchungen zur mutagenen Aktivität von Wässern, vor allem in den USA, Niederlanden und der Bundesrepublik Deutschland (SONNEBORN, 1981) angestellt worden.

VAN KREIJL et al. (1980) und KOOL et al. (1981 a) untersuchten Wasserproben aus Rhein und Maas nach 200- bis 1000facher Anreicherung mittels Amberliten, mit positiven Ergebnissen in Abhängigkeit vom Verunreinigungsgrad. KOOL et al. (1981 b, c) fanden in vier von sechs untersuchten niederländischen Städten Mutagenität im Trinkwasser.

GLATZ et al. (1978) fanden in 200 l Proben von elf Städten in den USA mutagene Aktivität, TYE (1982) erhielt positive Resultate mit aufbereitetem Flußwasser in Coventry (U.K.) Vereinzelt existieren bereits unterstützende Resultate

aus Zelltransformationstests mit Säugetierzellen, wie von GRUENER und LOCKWOOD (1980), die mit gefriergetrockneten Trinkwasserproben aus New Orleans in Zellkulturen (Chinesischer Hamster V79) mutagene Effekte auslösten.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich jedoch lediglich mit dem Einsatz des AMES-Tests zur Kontrolle der Wiener Wasserversorgung und -entsorgung, unter besonderer Berücksichtigung der Donau, die sowohl als Uferfiltrat für die Trinkwassergewinnung genutzt wird, als auch als Vorfluter für zahlreiche Abwassereinleitungen dient. Die Untersuchungen sind Teil einer Dissertation (SCHNATTINGER, 1984)

Die Wasserversorgung der Stadt Wien erfolgt aus den beiden Hochquellenwasserleitungen sowie den Grundwasserwerken Nußdorf und Untere Lobau, wobei letztere etwa ein Drittel des Tagesbedarfes von 415.000 m³ decken. Die Qualität des in den Grundwasserwerken entnommenen Uferfiltrats ist unmittelbar von der Qualität des Donauwassers abhängig. Es interessiert daher vor allem, ob eine Beeinflussung der aus Uferfiltrat alimentierten Brunnen durch allenfalls im Donauwasser vorhandene mutagen-cancerogene Substanzen stattfindet.

Zur Klärung dieser Frage wurden von auf Abb. bezeichneten Punkten Proben gezogen.

2. Material und Methoden

2.1. Entnahmestellen

2.1.1. Donau

Str.km 1933, rechtsufrig vor dem Grundwasserwerk Nußdorf

Str.km 1917, rechtsufrig (Rohrbrücke der ÖMV), unterhalb der Einmündung des Donaukanals, des Alberner Hafens sowie der Abwässer der Raffinerie Schwechat.

Str.km 1916, linksufrig vor dem Brunnen Alter Kreuzgrund des Grundwasserwerkes Untere Lobau, an der Mündung des Ölhafens.

2.1.2. Donaukanal

vor Einmündung der Hauptkläranlage Wien-Simmering
nach Einmündung der Hauptkläranlage Wien-Simmering

2.1.3. Wienfluß

unterhalb Schönbrunner Schloßbrücke

2.1.4 Hauptkläranlage Wien-Simmering

Ablauf

2.1.5. Kläranlage Blumental

Ablauf

2.1.6. Grundwasserwerk Untere Lobau

HFB Alter Kreuzgrund
HFB Gänshaufen
HFB Groß-Rohrwörth
HFB Schüttelau I und II

2.1.7 Grundwasserwerk Nußdorf

Brunnen I und II

2.1.8. I. und II. Hochquelle

2.1.9 Leitungswasser 8. und 22. Bezirk

2.2. Probenvorbereitung

Proben von 5 bis 40 l wurden in sterilen Glasflaschen entnommen und am selben Tag verarbeitet.

Die Anreicherung erfolgte auf Amberliten (Kunsthharze) der Type XAD 4 und XAD 8 im Mischungsverhältnis 1 : 1. Diese Kunsthharzmischung hat sich nach Untersuchungen von VAN ROSSUM und WEBB (1978) für die Extraktion von organischen Wasserunreinigungen als geeignet erwiesen. Die Kunsthharzkörner werden durch aufeinanderfolgende Elution in Methanol, Dimethylether, Acetonitril und Methanol gereinigt und unter Methanol bei Zimmertemperatur bis zur Verwendung aufbewahrt. 10 Kubikzentimeter des Kunsthharzgemisches werden in Glassäulen mit 15 mm Durchmesser gepackt und mit einer Abfolge von Methanol, Aceton, Methanol, Dimethylsulfoxid (DMSO) und destilliertem Wasser gewaschen. Die Wasserprobe wird von einem Druckvorratsgefäß mit 40 l Fassungsvermögen mittels Stickstoff über ein Druckfiltrationsgerät mit zwei Membranfiltern mit Porengrößen von 8 µm und 0,45 µm und anschließend über die Kunsthharzsäule geleitet. Die Fließgeschwindigkeit beträgt 40 ml/min. Nach Durchlaufen des Wassers wird die Säule mit 10 bzw. 20 ml DMSO eluiert, was einem bzw. zwei Volumina des Kunsthharzbettes entspricht. Die ersten Milliliter des Eluates werden verworfen, da sie noch Wasser enthalten. Das DMSO-Eluat wird anschließend durch ein Teflonfilter mit 0,2 µm Porengröße sterilfiltriert und bis zur Verarbeitung bei -30 °C aufbewahrt.

2.3. AMES-Test

(AMES et al, 1973 a, AMES et al., 1973 b, MC CANN und AMES, 1975, AMES et al., 1975, MARON und AMES, 1983)

2.3.1. Testprinzip

In diesem mikrobiellen Kurzzeit-Mutagenitätstest werden Mutanten des Enterobakteriums *Salmonella typhimurium* LT 2 als Teststämme verwendet. Im Gegensatz zu den Wildstämmen fehlt diesen histidinauxotrophen Mangelmutanten aufgrund von Gendefekten die Möglichkeit, die Aminosäure Histidin zu synthetisieren. Sie können daher auf histidinarmen Nährmedien keine Kolonien bilden. Die Teststämme werden auf histidinarmen festen Nährböden mit einer Substanz bzw. Substanzgemischen in einer Weichagarschicht ausgegossen und 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die mutagene Aktivität einer Substanz führt zur Wiedergewinnung der Fähigkeit zur Histidinproduktion und damit zu Koloniebildung auf histidinarmen Nährmedien. Eine dosisabhängige Steigerung der Koloniezahl bedeutet nach Vergleichen mit negativen Kontrollplatten, die nur eine geringe Anzahl spontaner Revertanten aufweisen mutagene Aktivität der Substanz bzw. des Substanzgemisches. Um auch solche Substanzen zu erfassen, die erst die Säugetierzelle zur aktiven mutagenen Form metabolisiert, werden Rattenleberpräparationen gemeinsam mit Salz- und Cofaktorenlösungen zugesetzt (S 9 Mix) Diese bei 9.000 g gewonnenen Rattenlebermikrosomen enthalten das endoplasmatische Retikulum mit den Ribosomen, an welchem die Mischfunktions-oxidasen lokalisiert sind, die für Um- und Abbau körperfremder Substanzen hauptverantwortlich sind. Die Prüfung von Substanzen und Substanzgemischen muß mit und ohne Zusatz von Lebermikrosomen erfolgen, da sowohl Aktivierungs- als auch Deaktivierungsvorgänge von den Lebermikrosomen vollzogen werden.

2.3.2. Teststämme

Die von AMES isolierten Mangelmutanten sind in jeweils einem Gen des Histidinoperons geschädigt.

Eingesetzt wurden die Stämme TA 98 und TA 100.

TA 98:

Dieser Stamm enthält die his D 3052 Leserastermutation. Das Gen D codiert die Histidinol-Dehydrogenase. Die Leserastermutation ist in diesem Fall eine -1 Deletion gegenüber dem Wildstamm.

Diese Leserastermutation ist vor allem empfindlich gegenüber polycyclischen Mutagenen, z.B. 2-Nitroso-Fluoren, 4-Nitrochinolin-N-oxid aber auch gegenüber N-Methyl-N-nitro-N-nitroso-Guanidin (MNNG) sowie diversen Acridin-derivaten (ICR-Verbindungen) und polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, durch deren Einwirkung die Histidinol-Dehydrogenase ihre Funktion aufnimmt.

TA 100:

Der Teststamm besitzt die Mutation his G 46, die eine "missense" Mutation darstellt, d.h. in das vom Abschnitt G codierte Enzym werden eine oder mehrere falsche Aminosäuren eingebaut. Die Rückmutation erfolgt durch alkylierende Substanzen, die Basenpaarsubstitutionen hervorrufen, wie Diethylsulfat, Natriumazid und MNNG (N-Methyl-N-nitro-N-nitroso-Guanidin). Sechs Basenpaare können bei Rückmutation ausgetauscht werden, wobei angenommen wird, daß die meisten, wenn nicht alle sechs möglichen Basenpaarsubstitutionen mit diesem Stamm erfaßt werden.

Beide Stämme besitzen ein Ampicillinresistenz verursachendes Plasmid, den R-Faktor pKM 101, der in TA 98 die Sensitivität gegenüber Mutagenen steigert bzw. in TA 100 zusätzlich den Nachweis bestimmter Leserastermutagene er-

möglichst. Anwesenheit des R-Faktors hat erhöhte Aktivität des zu Irrtum neigenden SOS-Reparatursystems zur Folge, dem diese Reaktionen zugeschrieben werden.

2.3.3. Untersuchungsgang

Je 10 ml Nutrient Broth werden mit dem entsprechenden Teststamm beimpft und über Nacht bei 37 °C auf einer Schüttelmaschine bebrütet (max. 16 Stunden). Verflüssigter Top Agar wird unter Zusatz von 0,5 mM Biotin-Histidin-Lösung (10 ml auf 100 ml Top Agar) in 3 ml Portionen in Eprovetten abgefüllt und im Wasserbad auf 45 °C gehalten. Pro Röhrchen werden 0,1 ml der Nutrient Broth Kultur, die Probe (0,1 0,4 ml des Eluats) bzw. Kontrolle und nach Bedarf 0,5 ml des S 9 - Mix zugesetzt.

Nach sorgfältigem Mischen wird der Top Agar auf Minimal-Glucose-Agar ausgegossen und durch Rotation verteilt. Mischen, Ausgießen und Verteilen soll innerhalb von 20 Sekunden erfolgen, um eine glatte Agaroberfläche zu erhalten. Nach Erhärten der Agarschicht werden die Platten bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert. Die Zugabe von Histidinspuren in den Top Agar ist notwendig, um minimales Wachstum der histidinauxotrophen Teststämme zu ermöglichen. Dieses Wachstum ist als dünner Hintergrundrasen im Top Agar bereits nach dem ersten Tag der Inkubation sichtbar. Nach 48 Stunden werden die Kolonien, die sich von diesem Hintergrundrasen abheben, gezählt.

Zusätzlich überprüfen mitgeführte Kontrollen die Eigenschaften der Teststämme und des S 9 Mix:

negative Kontrollen: 0,2 ml DMSO

positive Kontrollen: 4-Nitrochinolin-N-oxid (4 NCHNO)
ohne S 9 Mix

Aflatoxin B 1 mit S 9 Mix

2-Aminofluoren mit S 9 Mix

Sowohl Proben als auch Kontrollen werden 3- bis 5fach pro Untersuchung angesetzt.

2.3.4. Auswertungskriterien

Von MARON und AMES (1983) wird als Kriterium für positive Resultate reproduzierbar dosisabhängiges Ansteigen der histidinprototrophen Kolonien definiert.

Für die eigene Arbeit wurden drei Auswertungskriterien gesetzt:

Dosis-Wirkungsbeziehung: Dosisabhängiges Ansteigen der histidinunabhängigen Kolonien muß in zwei aufeinanderfolgenden Dosisstufen gegeben sein.

Die Revertantenzahl der Dosis mit höchster Wirkung muß mindestens 50 % über jener der Kontrolle liegen.

Die Ergebnisse der Proben müssen sich im Student t-Test, bei einseitiger Fragestellung signifikant von denen der Kontrolle unterscheiden.

3. Ergebnisse

3.1. Oberflächengewässer

Nach 1000facher Anreicherung lösten einige Proben Steigerungen der Revertantenzahl aus, wobei TA 98 empfindlicher reagierte als TA 100.

Es fiel dabei auf, daß in der Mehrzahl der Fälle die mutagene Aktivität ohne Zusatz metabolisierender Lebermikrosomen auftrat und durch Zugabe derselben vermindert oder aufgehoben wurde. Lediglich bei zwei Proben war dieses Verhältnis umgekehrt und zwar bei den Entnahmestellen Donau-Rohrbrücke und Wienfluß-Schönbrunner Schloßbrücke (Tab. 4, 7)

Welche Einzelsubstanzen, abgesehen von synergistischen Effekten, Mutagenität auslösen, ist eine zur Zeit nur in Ansätzen gelöste Frage.

Spezifität von Anreicherungsverfahren, Teststämmen sowie Metabolisierung können jedoch wertvolle Hinweise geben. Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, die sowohl rezent als Stoffwechselprodukte von Wasserorganismen als auch als Bestandteil von Mineralölprodukten und Verbrennungsrückständen vorkommen, können schon im Mikrogrammbereich mutagene Aktivität (nach Metabolisierung) entfalten.

Ein Anteil der Wasserkonzentrate verschiedener Entnahmestellen wurde einer dünnenschichtchromatographischen Untersuchung auf diese Stoffgruppe unterzogen.

Anhand der mitgeführten Standards waren am Entnahmepunkt Donau-Rohrbrücke Fluoranthen, Benzo(k)fluoranthen, Benzo(b)fluoranthen und Benzo(a)pyren in einer Gesamtmenge von ca. 1 µg/ml enthalten. Vergleichsweise lag im Konzentrat der Probe Donau-Alter Kreuzgrund die Summe der polycyclischen Aromaten im Bereich von wenigen ng/ml.

Unter Berücksichtigung der Lokalisation der Entnahmestellen und im Zusammenhang mit der Belastung mit aliphatischen Kohlenwasserstoffen, ist anzunehmen, daß die nachgewiesenen Aromaten eher aus Mineralölprodukten als aus rezent biogenem Abbau stammen.

Der mutagenen Aktivität ohne Metabolisierung, wie sie z. B. bei der Entnahmestelle Donau-Alter Kreuzgrund, Str.km 1916 (Tab. 3) in TA 98 und TA 100 auftritt, konnte bisher keine verursachende Substanzgruppe zugeordnet werden und ist daher Gegenstand weiterer Untersuchungen. Es können dafür, abgesehen von synergistischen Effekten, z.B. Azofarbstoffe, Fungizide (Captan) oder Nitro-Aromaten verantwortlich sein.

3.2. Abwasser

In den Abläufen der Kläranlagen Wien Simmering und Blumental ließ sich nach 100- bzw. 500facher Anreicherung mutagene Aktivität nachweisen, wobei Zusatz von metabolisierenden Leberenzymen den mutagenen Effekt aufhob oder verminderte, was auf einen detoxifizierenden Effekt der Leberenzyme hinzuweisen scheint (Tab. 8, 9)

3.3. Trinkwasser

Proben aus den zentralen Wiener Trinkwasserversorgungsanlagen wiesen bei keiner der Untersuchungen, weder im direkten Test noch nach 2000facher Anreicherung, mutagene Aktivität auf.

Auch die Untersuchung von Leitungswasser, entnommen im Laboratorium, verlief immer negativ, auch wenn der Konzentrationsfaktor auf 4000fach gesteigert wurde.

Im Untersuchungszeitraum ereignete sich jedoch ein besonders interessanter Fall einer Leitungsverunreinigung, zu deren Untersuchung der AMES-Test eingesetzt wurde:

Im Zuge der Inbetriebnahme einer für einige Zeit stillgelegten Rohrleitung wurden Entnahmen an einem Feuerhydranten durchgeführt.

Im direkten Einsatz von 1 und 2 ml der Probe war keine mutagene Aktivität feststellbar, während nach 100facher Anreicherung, Äquivalente von 15 bis 35 ml die Revertantenzahl des Stammes TA 98, nach metabolischer Aktivierung, dosisabhängig steigerten (Tab. 10)

Die gleichzeitige Untersuchung auf polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe ergab:

Benzo(a)anthrazen	200 ng/l
Benzo(b)fluoranthen	20 ng/l
Benzo(a)pyren	20 ng/l
Benz(ghi)perylen und Indenopyren	10 ng/l

Diese Substanzen sind im AMES-Test mutagen. Zusätzlich waren auch einige nichtmutagene PCA's in der Probe (z.B. Fluoranthen) sowie unidentifizierte, über deren biologische Aktivität somit nichts bekannt war. Die Gesamtmenge der identifizierten Mutagene betrug 250 ng/l und damit nur rund 9 ng als höchste Dosis/Platte. Die Nachweisgrenze für reines Benzo(a)pyren lag in diesem Versuch bei 200 ng/Platte, bei der Prüfung des Substanzgemisches reagierten die Teststämme jedoch bereits auf ein Zwanzigstel dieser Menge.

Für dieses Phänomen bieten sich zwei Erklärungen an:

Ein Teil der unidentifizierten PCA's wirkt ebenfalls mutagen.

Die Kombinationswirkung der Substanzen ist nicht additiv sondern potenzierend.

Tatsache ist, daß der AMES-Test in diesem Fall bereits bei relativ geringer Anreicherung ansprach und wesentlich empfindlicher reagierte als der chemische Befund erwarten ließ. Der Test eignet sich somit besonders zur Überwachung und Beurteilung von Leitungsverunreinigungen.

Ursache der Abgabe von polycyclischen Aromaten können z. B. Teerbeschichtungen sein, die zwar an der Außenwand des Rohres aufgebracht sind, jedoch aufgrund außenliegender Gummidichtungen an den Stoßfugen vom Leitungswasser benetzt werden (RYVARDEN, 1982) Der Einsatz des AMES-Tests, zusätzlich zur chemischen Beurteilung von Migrationsversuchen bei Materialprüfungen, wäre sinnvoll.

4. Diskussion

Die Anwendbarkeit und Aussage des AMES-Tests für die Prüfung von Wasserproben ist eng verbunden mit dem Problem der Anreicherung und Konzentrierung von Wasserproben, d.h. vom mengenmäßigen Einsatz je Platte, der von 1 ml (unkonzentriert) bis zu Äquivalenten von 200 l je Platte in der Literatur beschrieben wird. Es erscheint klar, daß in stark verschmutzten Wasserproben ein mutagener Effekt wahrscheinlicher ist, als in wenig verschmutzten oder reinen. Bei ersteren wird daher zur Feststellung von Mutagenität Anreicherung in geringerem Maß erforderlich sein als bei letzteren.

Daraus ergibt sich das Problem der Beeinflussung des Versuchsergebnisses durch Variationen des Testansatzes. Die Frage, bis zu welchem Anreicherungsfaktor mutagene Aktivität in Wasserproben gesundheitliche Relevanz besitzt, bleibt offen und wird zu den übrigen Aussageunsicherheiten des AMES-Tests bezüglich humantoxikologischer Bedeutung (falsch-positive und -negative Ergebnisse, Variabilität) gestellt. Es ist aber anzunehmen, daß die gesundheitliche Relevanz mit der Höhe der den positiven Effekt auslösenden Anreicherungsmenge abnimmt.

Zieht man in Betracht, daß erhöhte Mutagenität nur in 1 1000 konzentrierten Proben von abwasserbelastetem Oberflächenwasser auftritt, während in unkonzentrierten Proben dieses Wassers, ebensowenig wie in den durch Uferfiltrat alimentierten Brunnen mutagene Aktivität und polycyclische Aromaten zu eruieren waren, ist davon auszugehen, daß die in den Oberflächenwasserkonzentrationen nachgewiesene Mutagenität in der vorliegenden Situation keine gesundheitliche Bedeutung besitzt.

Trotz aller angeführten Bedenken bei Interpretation von

als mutagen befundenen Wasserproben hinsichtlich einer Gesundheitsgefährdung ist der Einsatz von Mutagenitätstests zur Untersuchung von Trink-, Roh-, Oberflächen- und Abwasser angezeigt.

Die Bedeutung eines derartigen Tests in der Beurteilung von Wässern liegt vor allem in den folgenden Aussagen:

Hinweise auf Belastung des Wassers mit mutagenen Stoffen sowie auf Summations- und Potenzierungseffekte.

Aufspürung spezifischer Verunreinigungsquellen zur Beseitigung derselben.

Hinweise für die analytische Identifizierung durch Einschränkung der mutagen wirkenden Stoffgruppen aufgrund der Spezifität der Teststämme (Basenpaarsubstitution oder Leserastermutation), des Ansprechens mit oder ohne Zusatz von Lebermikrosomen sowie der verwendeten Extraktionsverfahren (Polarität, Lipophilie)

Biologischer Indikator für Effizienz von Kläranlagen sowie Trinkwasseraufbereitung.

Die Anzahl der positiven Befunde mit der industriellen Belastung eines Gewässers, so daß diese *Salmonella typhimurium*-Stämme als "artifizielle Industrieabwasserindikatororganismen" bezeichnet werden könnten.

Mit dem Auftreten toxischer Wirkung auf die Teststämme muß allerdings ebenso gerachtet werden, wie mit hemmender Wirkung auf die enzymatische Metabolisierung durch S 9 -Mix.

Diese Vorgänge, sowie Antagonismen diverser Wasserinhaltsstoffe in den Bakterien können zur Maskierung mutagener Substanzen in den Wasserproben führen.

Die chemische Analytik allein reicht jedenfalls zur befriedigenden toxikologischen Überwachung und Beurteilung von Wässern nicht aus, da in chemischen Untersuchungen nur gefunden wird, was konkret gesucht wird und Untersuchungen auf "alle" relevanten Verbindungen nur theoretisch gefordert werden können, praktisch aber weder vertretbar noch möglich sind.

Der Mutagenitätstest nach AMES kann, in Verbindung mit anderen biologischen Testverfahren (RYVARDEN, 1984), Hinweise auf folgende Stoffgruppen geben:

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, z. B. Benz(a)pyren, Benz(b)fluoranthren usw.

Aromatische Stickstoffverbindungen, z. B. 2-Amino-fluoren, Nitro- und Aminotoluole, Nitrobenzole, 3,5-Dinitroanilin usw.

Pestizide:

Organophosphorinsektizide, z.B. Dichlorvos

Benzimidazolfungizide

Captanfungizide

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-1,4-Dioxin (TCDD) als Verunreinigung von 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure -Herbiziden (2,4,5-T)

Mycotoxine, B. Aflatoxin B 1

Begnügt man sich aber aus praktischen Erwägungen mit einer beschränkten Anzahl chemischer Parameter, droht die Gefahr von schwerwiegenden Versäumnissen in einer Zeit, in der die schadlose Beseitigung zahlloser industrieller Abfallprodukte noch nicht beherrscht wird.

Der Salmonella/Mikrosomen-Test nach AMES kann jedenfalls

einen wichtigen Beitrag zu der hygienischen Beurteilung von Trink-, Oberflächen- und Abwasser leisten.

Zusammenfassung

Weder für identifizierte noch für die Summe unidentifizierter Wasserverunreinigungen liegen bisher ausreichende Daten über deren chronische Toxizität, Mutagenität und Cancergenität vor.

Die Theorie, daß der Mechanismus der Cancerogenese eine somatische Mutation einschließt, hat zum verbreiteten Einsatz bakterieller Mutagenitätstests geführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Salmonella/Mikrosomen-Test nach AMES zur Untersuchung von Wiener Trink-, Oberflächen- und Abwasser eingesetzt.

Testprinzip ist Rückmutation histidinauxotropher *Salmonella typhimurium* LT 2 zu Histidinprototrophie in Kombination mit metabolisierenden Rattenlebermikrosomen. Konzentration der Wasserproben erfolgte auf XAD 4/8 Amberliten-

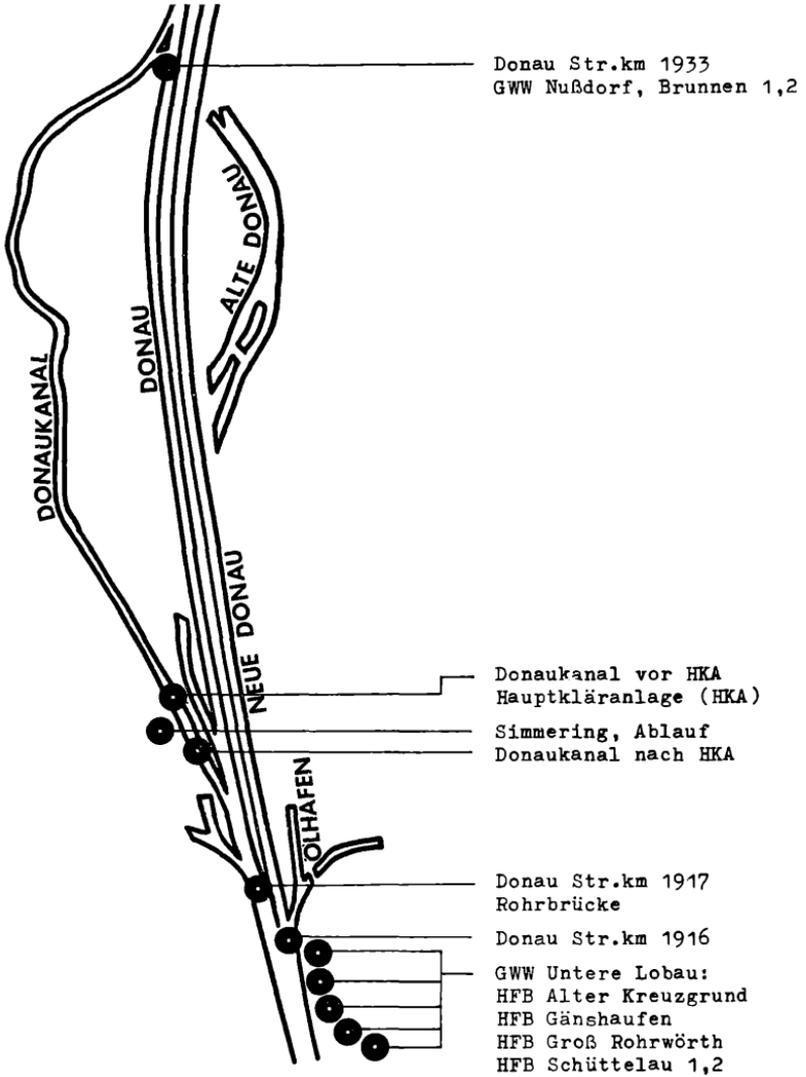
Oberflächen- und Abwasserextrakte wirkten in Abhängigkeit von Anreicherungsfaktoren und Belastungsgrad mutagen, wobei bei einigen Proben die Aktivität auf polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe zurückzuführen war, die wahrscheinlich eine Verschmutzung mit Mineralölprodukten anzeigen. Trinkwasser wies jedoch auch nach 2000facher Anreicherung keine mutagene Aktivität auf. Im Falle einer Leitungsverunreinigung durch Teerprodukte hat sich der Test als empfindlich erwiesen.

Bei kombiniertem Einsatz mit anderen Biotests kann der Salmonella/Mikrosomen-Test zu möglichst lückenloser Überwachung der Trinkwasserversorgung bezüglich Verunreinigungen

mit humantoxischen Substanzen dienen. Angesichts dieser Eigenschaften stellt der AMES-Test, bei Kenntnis seiner Fehlermöglichkeiten und Aussagegrenzen, eine wertvolle Bereicherung des Instrumentariums zur hygienisch-toxikologischen Beurteilung der Wasserqualität dar.

Abb. 1:

Entnahmestelle im Donaubereich



Tab. 1:Medien: (AMES et al., 1975)

Nährboullion: Oxoid Nutrient Broth Nr. 2

Minimal-Glucose-Agar:

1,5 % Bacto-Difco Agar in VOGEL-BONNER-Medium "E" mit
2 % Glucose

Bacto Agar 15,0 g

Glucose 20,0 g

Aqua dest. 900 ml

100 ml VOGEL-BONNER-Medium "E" (10x)

MgSO₄ 7 H₂O 2,0 gZitronensäure.H₂O 20,0 gK₂HPO₄ (anhydr.) 100,0 gNaNH₃HPO₄ 4 H₂O 35,0 g

mit Aqua dest. auf 1 l

bringen.

Top-Agar Bacto Agar 6,0 g

NaCl 5,0 g

Aqua dest. 1000,0 g

0,5 mM Histidin-Biotin-Lösung 100 ml pro Liter Agar

S 9 Mix (Zutaten je ml):

S 9-Fraktion 0,1 ml

MgCl₂ (0,4 M) 0,02 ml

KCl (1,65 M) 0,02 ml

Glucose-6-Phosphat
(1 M) 0,005 ml

NADP (0,1 M) 0,04 ml

Phosphatpuffer
pH 7,4 0,5 ml

Aqua dest. auf 1,0 ml auffüllen.

Herstellung der S 9-Fraktion aus Rattenleberhomogenat
nach Arochlorinduktion.

Tab. 2 a:

Entnahmestelle/Stamm	Dosis µl/Pl	S 9 mix	Revertanten/Platte (R/P)	\bar{X}	R/P
Donau Nußdorf /TA 98	100	22	27	27	6
Anreicherung 1000 1	200	42	33	40	6
(20/10/20)	400	32	26	29	4
	100	38	39	38	5
	200	46	41	39	6
	400	38	33	38	3
negative Kontrolle	200	16	20	20	3
DMSO	200	32	34	30	3
positive Kontrolle	µg/Pl				
4-NCHNO	0,3	351	376	349	+ 28
Aflatoxin B 1	0,2	424	312	364	+ 56

Tab. 2 b:

Entnahmestelle/Stamm	Dosis µl/P1	S 9 - mix	Revertanten/Platte (R/P)	\bar{X}	R/P				
<u>Donau Nußdorf / TA 100</u>	100		200	190	200	172	166	186	± 16
Anreicherung 1000	200		162	202	190	178	150	176	± 21
(20/10/20)	400		172	181	189	128	153	165	± 24
	100	+	176	170	150	186	191	174	± 18
	200		155	164	205	212	171	181	± 26
	400		153	180	203	197	184	183	± 19
negative Kontrolle	200		123	129	129	142	137	132	± 7
DMSO	200		145	147	124	138	130	137	± 10
positive Kontrolle	µg/P1								
4-NCHNO	0,5		844	724	708			759	± 74
Aflatoxin B 1	0,2	+	600	604	716			640	± 66

Tab. 3 a:

Entnahmestelle/Stamm	Dosis µl/P1	S 9 mix	Revertanten/Platte (R/P)	\bar{X}	R/P
Donau vor Kreuzgrund TA 98	100	18	18	18	± 1
Anreicherung 1000 (20/10/20)	200	15	27	22	± 8
	400	35	36	36	± 2
	100	14	22	21	± 5
	200	17	12	18	± 4
	400	23	29	26	± 4
negative Kontrolle DMSO	200	17	21	17	± 3
	200	17	23	22	± 7
positive Kontrolle 4-NCHNO	µg/P1 0,3	298	270	297	± 27
Aflatoxin B 1	0,2	392	464	445	± 47

Tab. 3 b:

Entnahmestelle/Stamm	Dosis µl/P1	S 9 mix	Revertanten/Platte (R/P)	\bar{X}	R/P
<u>Donau vor Kreuzgrund</u>					
<u>TA 100</u>	100	115	187	152	102
Anreicherung 1000	200	193	132	156	170
(20/10/20)	400	242	258	232	240
	100	200	248	222	258
	200	163	154	150	210
	400	98	138	114	148
negative Kontrolle	200	98	111	128	114
DMSO	200	156	156	178	144
positive Kontrolle	µg/P1				
4-NCHNO	0,3	412	498	384	
Aflatoxin B 1	0,2	480	542	618	
				139 ± 38	
				163 ± 26	
				243 ± 11	
				232 ± 26	
				169 ± 28	
				125 ± 23	
				117 ± 15	
				153 ± 18	
				431 ± 59	
				547 ± 69	

Tab. 4 a:

Entnahmestelle/Stamm	Dosis µl/P1	S 9 mix	Revertanten/Platte (R/P)	\bar{X}	R/P
Donau Rohrbrücke/TA 98	100		23 18 23 24 17	21	3
Anreicherung 1000 (20/10/20)	200		20 20 20 30 25	24	4
	400		21 29 34 26 28	28	5
	100		32 33 30 29 25	30	3
	200		25 30 31 31 29	29	2
	400		47 43 43 48 39	44	4
negative Kontrolle	200		15 20 17 16 21	18	3
DMSO	200	+	28 22 25 23 25	25	2
positive Kontrolle 4-NCHNO	µg/P1 0,5		416 444 512 498 488	472	40
Aflatoxin B 1	0,2		396 364 322 378 298	352	41

Tab. 4 b:

Entnahmestelle/Stamm	Dosis µl/Pl	S 9 mix	Revertanten/Platte (R/P)	\bar{x}	R/P
<u>Donau Rohrbrücke/TA 100</u>	100		184 162 156 110 126	148	± 30
Anreicherung 1000 l (20/10/20)	200		222 168 172 174 152	178	± 26
	400		156 135 194 182 180	169	± 24
	100		147 156 170 118 111	140	± 25
	200		145 126 184 144 136	147	± 22
	400		134 159 147 126 128	139	± 14
negative Kontrolle	200		172 158 145 128 123	145	± 20
DMSO	200		115 144 125 184 122	138	± 28
positive Kontrolle 4-NCHNO	µg/Pl 0,5		612 724 736 682 764	704	± 59
Aflatoxin B 1	0,2		496 328 384 360 472	408	± 73

Tab. 5 a:

Entnahmestelle/Stamm	Dosis µl/Pl	S 9 mix	Revertanten/Platte (R/P)	\bar{X}	R/P
<u>Donaukanal vor Einmün-</u> <u>dung der HKA / TA 98</u>	100		28 31 25 28 22	27	3
Anreicherung 1000 l (20/10/20)	200		28 29 22 26 19	25	4
	400		20 21 24 25 25	23	2
	100	+	34 22 21 23 21	24	6
	200		27 34 25 28 28	28	3
	400		30 34 26 32 32	31	3
negative Kontrolle	200		21 17 20 20 25	21	3
DMSO	200	+	21 20 26 22 22	22	2
positive Kontrolle	µg/Pl				
4-NCHNO	0,5		624 644 684 692 608	650	37
Aflatoxin B 1	0,2	+	400 424 448 496 516	457	49

Tab. 5 b:

Entnahmestelle/Stamm	Dosis µl/Pl	S 9 - mix	Revertanten/Platte (R/P)	\bar{x}	R/P
<u>Donaukanal vor Einmün-</u> <u>dung der HKA / TA 100</u>	100		136 136 158 150 192	154	+ 23
Anreicherung 1000 1 (20/10/20)	200		196 184 134 202 178	179	+ 27
	400		126 162 190 130 146	151	+ 26
	100		152 182 120 170 172	159	+ 24
	200		214 160 160 142 156	166	+ 27
	400		152 162 140 166 112	146	+ 22
negative Kontrolle	200		196 124 208 172 160	172	+ 33
DMSO	200		176 144 168 188 128	161	+ 24
positive Kontrolle	µg/Pl				
4-NCHNO	0,5		812 996 892	900	+ 92
Aflatoxin B 1	0,2		792 704 768	755	+ 45

Tab. 6 a:

Entnahmestelle/Stamm	Dosis µl/P1	S 9 mix	Revertanten/Platte (R/P)	\bar{x}	R/P
<u>Donaukanal nach Einmün-</u> <u>dung der HKA / TA 98</u>	100		29	32	7
Anreicherung 1000	200		31	32	8
(10/10/10)	400		34	36	5
	100		30	32	7
	200		21	29	9
	400		28	33	6
negative Kontrolle	200		18	21	3
DMSO	200		29	29	4
positive Kontrolle	µg/P1		504	563	45
4-NCHNO	0,3		586	624	29
2 Aminofluoren	30		664	624	29

Tab. 6 b:

Entnahmestelle/Stamm	Dosis µl/Pl	S 9 mix	Revertanten/Platte (R/P)	\bar{X}	R/P	
<u>Donaukanal nach Einmün-</u> <u>dung der HKA / TA 100</u>	100		584	560	548	553 ± 27
Anreicherung 1000 l (10/10/10)	400		544	640	592	606 ± 48
	100	+	348	384	344	353 ± 21
	400		366	368	459	398 ± 43
negative Kontrolle	200		260	268	224	248 ± 20
DMSO	200		288	236	232	259 ± 29
positive Kontrolle 4-NCHNO	µg/Pl 0,3		732	712	796	732 ± 46
2 Aminofluoren	30		680	764	708	698 ± 52

Tab. 7:

Entnahmestelle/Stamm	Dosis µl/Pl	S 9 mix	Revertanten/Platte (R/P)	\bar{X}	R/P
Wienfluß unterhalb Schön- brunner Schloßbrücke TA 98	100		20 18 21 30 28	23 ±	5
Anreicherung 1000 (10/10/10)	200		30 23 18 25 26	24 ±	4
	400		23 18 25 26 20	22 ±	3
	100		33 25 31 28 30	29 ±	3
	200	+	32 30 36 33 28	32 ±	3
	400		39 42 42 44 48	43 ±	3
negative Kontrolle	200		18 23 28 21 26	23 ±	4
DMSO	200		30 26 21 28 23	26 ±	4
positive Kontrolle 4-NCHNO	µg/Pl 0,3		360 398 324 420 372	375 ±	37
Aflatoxin B 1	0,2		544 524 480 396 448	480 ±	62

Tab. 8 a:

Entnahmestelle/Stamm	Dosis µl/Pl	S 9 - mix	Revertanten/Platte (R/P)	\bar{X}	R/P
Hauptkläranlage Wien- Simmering, Ablauf/TA 100	100		304 392 248 318 310	314	+ 51
Anreicherung 500 1	200		432 368 376 396 368	388	+ 27
(10/10/20)	400		424 416 536 502 432	462	+ 54
	100		316 352 280 290 340	316	+ 31
	200		384 336 368 398 304	358	+ 38
	400	+	240 240 328 316 244	274	+ 44
negative Kontrolle	200		230 198 226 246 252	230	+ 21
DMSO	200		218 226 204 258 210	223	+ 21
positive Kontrolle	µg/Pl				
4-NCHNO	0,5		900 1112 1008	1007	+106
2 Aminofluoren	50	>	2000	2000	

Tab. 8 b:

Entnahmestelle/Stamm	Dosis µl/Pl	S 9 mix	Revertanten/Platte (R/P)	\bar{X}	R/P		
Hauptkläranlage Wien- Simmering, Ablauf/TA 98	100		20	20	21	26	22 ± 2
Anreicherung 500 l (10/10/20)	200		28	28	26	31	28 ± 2
	400		28	37	36	33	33 ± 4
	100	+	31	19	32	29	23 ± 5
	200	+	38	28	37	41	37 ± 6
	400	+	22	29	29	35	29 ± 5
negative Kontrolle	200		13	21	19	25	21 ± 3
DMSO	200		29	28	31	29	30 ± 3
positive Kontrolle 4-NCHNO	µg/Pl 0,5		848	932	964		915 ± 60
2 Aminofluoren	50		1140	1064	1184		1129 ± 61

Tab. 9 a:

Entnahmestelle/Stamm	Dosis µl/Pl	S 9 mix	Revertanten/Platte (R/P)	\bar{X}	R/P
<u>Kläranlage Blumental,</u> <u>Ablauf/TA 98</u>	100	24	30 25 23 19	24	4
Anreicherung 500 1 (5/10/10)	200	44	44 43 38 31	40	6
	100	25	39 33 28 31	31	5
	200	42	29 35 27 30	33	6
negative Kontrolle	200	21	13 23 19 25	21	3
DMSO	200	28	29 35 31 29	30	3
positive Kontrolle	µg/Pl	422	396 378 476 426	420	37
4-NCHNO	0,5	752	660 788 880 784	773	79
2 Aminofluoren	50				

Tab. 9 b:

Entnahmestelle/Stamm	Dosis µl/Pl	S 9 mix	Revertanten/Platte (R/P)	\bar{X}	R/P
Kläranlage Blumental, Ablauf/ TA 100	100		286 265 289 213 226	256	+ 35
Anreicherung 500 1 (5/10/10)	200		337 338 375 388 297	347	+ 36
	100		302 268 279 255 244	270	+ 22
	200	+	254 296 253 276 270	270	+ 18
negative Kontrolle	200		230 198 226 246 252	230	+ 21
DMSO	200	+	218 226 204 258 210	223	+ 21
positive Kontrolle 4-NCHNO	µg/Pl 0,5		846 720 792 782 804	789	+ 46
2 Aminofluoren	50		824 856 848 920 840	858	+ 37

Tab. 10:

Entnahmestelle/Stamm	Dosis µl/Pl	S 9 - mix	Revertanten/Platte (R/P)	\bar{X}	R/P
<u>Leitungsverunreinigung</u>					
<u>TA 98</u>	150	17	11	31	27
Anreicherung 100	200	20	26	21	19
(1/5/10)	350	24	20	18	16
	150	48	44	32	53
	200	48	49	59	46
	350	43	48	57	73
negative Kontrolle	200	19	23	20	20
DMSO	200	37	17	20	21
positive Kontrolle	µg/Pl				
Benzo-a-pyren	1	202	202	212	156
				193	± 25

SUMMARY

Investigations on the mutagenic activity of drinking water, freshwater and sewage Water

The present investigation uses the Salmonella/microsome-test according to AMES for the evaluation of freshwater, drinking-water and sewage. The principle of the test is the back-mutation of histidine-auxotrophic strains of *Salmonella typhimurium* LT 2 to the histidin-prototrophic stage in combination with metabolically rat-liver microsomes. Water samples were concentrated with XAD 4/8 amberlites. Depending on the grade of pollution and the degree of concentration, fresh- and sewage-water extracts proved to be mutagenic (Tab. 2 4 and 6 9) The activity of some of the samples seemed to depend on polycyclic aromatic hydrocarbons, which probably indicated pollution from mineral oils. Drinking-water had no mutagenic effect even after enrichment by a factor of 2000. This test is very sensitive for the detection of contamination with mineral-oils (Tab. 10) The Salmonella/microsome-test is therefore, in combination with other biotests, a suitable technique to control toxic substances in drinking-water supplies.

Literatur

- AMES, B.N., DURSTON, W.E., YAMASAKI, E. et al (1973): Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection.- Proc Nat Acad Sci USA 70/8, 2281-2285 (b)
- AMES, B.N., LEE, F.D., DURSTON, W.E. (1973): An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens.- Proc Nat Acad Sci USA 70/3, 782-286 (a)
- AMES, B.N., MC CANN, J., YAMASAKI, E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian-microsome mutagenicity test.- Mutat Res 31, 347-364.

- DOBBERKAU, H.J., HÖRING, H., STROBEL, K. (1982): Stand und Tendenzen der hygienisch-toxikologischen Wasserforschung.- 23. Arbeitstagung der IAD, Wien, 1982, 175-185.
- GLATZ, B.A., CHRISWELL, C.D., ARGUELLO, M.D. et al (1978): Examination of drinking water for mutagenic activity.- JAWWA 465-468.
- GRUENER, N., LOCKWOOD, M. (1980): Mutagenic activity in drinking water.- Am j publ hlth 70, 276-278.
- KOOL, H.J., KREIJL, C.F. van, KRANEN, H.J. van, et al. (1981) The use of XAD-resins for the detection of mutagenic activity in water. I. Studies with surface water.- Chemosphere 10, 85-98 (a)
II. Studies with drinking water.- Chemosphere 10, 99-108 (b)
- (1981): Toxicity assessment of organic compounds in drinking water in the Netherlands.- The Sci. of the Tot. Environment 18, 135-153 (c)
- MARON, D., AMES, B.N. (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test.- Mutat Res 113, 173-215.
- MC CANN, J., AMES, B.N. (1975) A simple method for detecting environmental carcinogens as mutagens.- Ann NY Ac Sci 271, 5-13.
- RYVARDEN, G. (1982) Hygienisch bedenkliche Inhaltsstoffe in der Wasserverteilung.- Veröff. der Vorträge des ÖVGW-Symp. "Güteprobleme in der Wasserversorgung", 1-12; Hsg. ÖVGW.
- (1984): Trinkwasserüberwachung durch biologische Alarmsysteme. Veröffentl. d. Vorträge der "Tagung für Siedlungs- und Industrierwasserwirtschaft", Baden 1984.- Schr. d. ÖWWV, H. 61, 105-133.
- SCHNATTINGER, A. (1984) Der Salmonella/Mikrosomen-Test (Mutagenitätstest nach AMES) im Rahmen der hygienischen Beurteilung der Wiener Wasserversorgung und -entsorgung.- Diss. an der Form. u. Naturw. Fakultät d. Univ. Wien.
- SONNEBORN, M. (1981) Erfassung und Bewertung mutagener Stoffe in Wässern. Fachtagung des Inst. f. Wasser-, Boden- und Lufthygiene d. Bundesgesundheitsamtes Berlin, Juni 1980.- WABOLU-Ber. 1/1981.
- TYE, R.J. (1982): A review of some possible hazards of desinfection.- In: Viruses and disinfection of water and

- wastewater; Eds.: Butler, M., Medlen, A.R., Moris, R.-
Proc Int Symp Univ Surrey, Guildford, 402-431.
- VAN KREIJL, C.F., KOOL, H.J., VRIES, M.de, et al. (1980):
Mutagenic activity in the river Rhine and Meuse in
the Netherlands.- The Sci. of the Tot. Environment 15,
137-147
- VAN ROSSUM, P., WEBB, R.G. (1972): Isolation of organic
water pollutants by XAD resins and carbon.- J Chrom
150, 381-392.

Anschrift des Verfassers: Mag.Dr.rer.nat. Andrea SCHNATTINGER, Hygienisch-bakteriologische Untersuchungsanstalt des Gesundheitsamtes der Stadt Wien, Feldgasse 9,
A-1080 Wien.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Wasser und Abwasser](#)

Jahr/Year: 1986

Band/Volume: [1986](#)

Autor(en)/Author(s): Schnattinger A.

Artikel/Article: [Untersuchungen zur Mutagenen Aktivität von Trink-, Oberflächen- und Abwässern im Raum Wien 125-163](#)