

*Aus dem Institut für Umweltmedizin, Wien*

**ZUR ANWENDUNG VON MUTAGENITÄTSTESTS IN DER  
WASSERUNTERSUCHUNG**

**A. SCHNATTINGER**

Agenzien, welche das genetische Material angreifen ohne dieses komplett zu zerstören, werden als genotoxisch bezeichnet. Sie können zu Genmutationen und Chromosomenaberrationen führen. Es gilt als allgemein akzeptiert, daß eine enge Korrelation zwischen Mutagenität und Carcinogenität besteht.

Neben physikalischen Mutagenen (wie ionisierenden Strahlen) können chemische Mutagene in der Untersuchung von Wasserproben relevant sein. Drei Typen von chemischen Mutagenen sind zu unterscheiden:

- Basenanalogue, z.B. Bromuracil, 2-Aminopurin
- basenmodifizierende Substanzen, z.B. salpetrige Säure und Alkylantien
- Inhibitoren der DNA-Synthese, interkallierende Substanzen (Leserastermutagene), z.B. Acridine, Chlorochinon, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, aromatische Amine.

Die Beantwortung der entscheidenden Frage, ob eine Mutation spontan oder als Folge einer Exposition zu einem Mutagen erfolgt, fällt schwer, falls nicht eine überzeugende Korre-

lation zwischen Mutagenexposition und dem mutagenen Effekt im Zielorgan besteht. Diese Korrelation kann jedoch nur für hohe Dosen, wie sie z.B. aus der Arbeitsmedizin bekannt sind oder bei Zytostatikabehandlung, hergestellt werden.

Dies bedeutet für Trinkwasser, daß nur dann ein nachweisbarer Effekt zu erwarten ist, wenn einerseits Mutagene in hoher Konzentration (z.B. anlässlich von Katastrophen oder Sabotageakten) ins Trinkwasser gelangen oder andererseits eine Akkumulation geringer Dosen in der Umgebung (Nahrungskette) oder im Organismus selbst stattgefunden hat.

Soll Trink- oder Oberflächenwasser auf mutagene Substanzen untersucht werden, ist somit meist ein Anreicherungsschritt erforderlich.

Um ein möglichst breites Spektrum an Mutagenen zu erfassen, ist eine Auswahl standardisierter Testsysteme wünschenswert, da verschiedene Organismen unterschiedliche Empfindlichkeit aufweisen. Die zur Verfügung stehenden Testsysteme (ohne Anspruch auf Vollständigkeit) sind verschiedenen Manifestationen genotoxischer Ereignisse zuzuordnen.

#### **1. Aktivierung des Reparatursystems:**

Bakterieller DNA-Reparaturtest (BASLER et al., 1987)

Lambdaphagen-Induktionstest (BROWN et al., 1979)

SOS-Chromotest (QUILLARDET et al., 1982)

#### **2. Änderung des Phänotyps:**

AMES-Test (Salmonella/Mikrosomen-Test) (MARON und AMES, 1983)

Mutagenitätstests mit Hefe (ZIMMERMANN, 1975)

Zelluläre Transformation (EVANS und DI PAOLO, 1981)

3. Nachweis von DNA-Strangbrüchen, Insertionen, Deletionen: Schwesterchromatidenaustausch (SCE-Test) (WOLFF, 1981)  
Alkal. Elution/Rattenhepatozytenmethode (BRADLEY et al., 1982)

Restriktionslängenpolymorphismen in Plasmid-DNA (analog molekularbiologischer Untersuchungen an eukaryontischer DNA, WYMAN und WHITE, 1980).

Da die erwähnten Testsysteme unterschiedlichen Standardisierungsgrad insbesondere in der Untersuchung von Wasserproben erreicht haben, soll für jede Gruppe nur ein ausgereiftes Testsystem dargestellt werden.

**SOS-Chromotest:** Teststamm ist *E.coli* PQ37. DNA-Schädigung bewirkt Spaltung des *lex A*-Repressors durch *rec A* Protease und *sfiA*, ein Gen des bakteriellen SOS-Reparatursystems wird exprimiert. Durch Fusion des *sfiA* Gens mit dem *lac Z* Operon wird gleichzeitig Betagalaktosidase produziert, die mittels Chromogenreaktion (ONPG, X-Gal) darzustellen ist. Der SOS-Chromotest erfaßt ein frühes Stadium der DNA-Schädigung, nachdem sowohl vollständige Reparatur oder aber Mutation oder Zelltod auftreten können.

**AMES-Test (Salmonella/Mikrosomen-Test):** Histidinauxotrophe Mangelmutationen von *Salmonella typhimurium* gewinnen nach Einwirkung primär aktiver oder durch Rattenlebermikrosomen enzymatisch aktivierter Mutagene die Fähigkeit zurück, Histidin im eigenen Stoffwechsel zu synthetisieren. Mit diesem Test können z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, aromatische Amine, heterozyklische Nitroverbindungen, Aflatoxine, nicht jedoch Benzol und Hormone nachgewiesen werden. Der AMES-Test wird bereits in zahlreichen Modifikationen angewendet. Eine der interessantesten ist der Einsatz von Pflanzengewebsextrakten anstelle von

Rattenlebermikrosomen zur Metabolisierung von Promutagenen (PLEWA et al., 1984). Diese Methode erweitert das Spektrum der erfaßten Substanzen, z.B. um die Gruppe der s-Triazin-Herbizide, deren Vorkommen und Nachweis im Grundwasser ein aktuelles Problem darstellt.

#### **SCE-Test (Sister-Chromatide-Exchange-Test):**

Einzelstrangbrüche der DNA können sich durch Austausch von Schwesterchromatiden in Metaphasenchromosomen manifestieren. Unter Einwirkung von Mutagenen steigt die Anzahl der Austäusche an. Die Methode wird in Zellkulturen angewendet, wobei CHO-(Chinesischer Hamster Ovarial-)Zellen oder Lymphozytenkulturen am besten standardisiert sind. Im Nährmedium zur Verfügung gestelltes BrdU(5-Bromdeoxyuridin) wird anstelle von Thymin in die DNA eingebaut und läßt nach 2 Mitosen Unterscheidung der beiden Chromatiden mittels Fluoreszenz-Giemsa Färbung zu.

#### **Vor- und Nachteile der drei Testsysteme:**

Der AMES-Test stellt weiterhin das beststandardisierte und verbreitetste Testsystem dar und ermöglicht so gute Reproduzierbarkeit und in Grenzen auch gewisse Vergleichsmöglichkeiten zwischen Laboratorien. Das Empfindlichkeitspektrum ist gut definiert und somit stellt sich dem Anwender die Frage nach ergänzenden Systemen. Der SOS-Chromotest teilt im wesentlichen das Spektrum der erfaßten Stoffe ohne Metabolisierung mit dem AMES-Test, ist aber für Promutagen, die mikrosomale Aktivierung verlangen (aufgrund der Testanordnung in Flüssigmedium), unempfindlich, während die Anordnung im AMES-Test (Teststamm + Mikrosomen Promutagen in Topagar) länger anhaltende Enzymaktivität zuläßt. Ein Vorteil des SOS-Chromotests ist jedoch die Erhältlichkeit als Testkit sowie seine unkomplizierte

Durchführung. Eine Ergänzung des AMES-Tests hinsichtlich des Spektrums der erfaßten Substanzen stellt der SCE-Test dar. Seine Vorteile liegen vor allem in der Empfindlichkeit gegenüber Insektiziden und Benzol, seine Nachteile in der aufwendigen und fehleranfälligen mikroskopischen Auswertung.

#### **Zur Anwendung an Wasserproben:**

Sollen Mutagenitätstests an Wasserproben durchgeführt werden, stellt sich zunächst die Frage der Anreicherungs- methode. Bewährt in der Praxis hat sich die selektive Anreicherung über Kunstharzsäulen (z.B. XAD4/8) mit anschließender DMSO-Elution (KOOL et al., 1981). Nachteil dieser Methode ist der eventuelle Verlust polarer Mutagene. Methoden, wie Gefriertrocknung oder Ultrafiltration erfassen zwar ein breiteres Stoffspektrum, sind jedoch aufwendiger und haben den Nachteil, daß auch für die Testorganismen akut toxische Stoffe konzentriert werden.

Aufgrund der Spezifität verschiedener Testorganismen, Teststämme oder auch des Einsatzes von metabolisierenden Systemen können aus dem Summenparameter "mutagene Aktivität" Hinweise auf spezifische Stoffe gewonnen werden (SCHNATTINGER, 1986). Als Beispiel soll über Erfahrungen mit der Anwendung des AMES-Tests im Zuge einer Leitungsverunreinigung berichtet werden.

Im Rahmen der Inbetriebnahme einer stillgelegten Rohrleitung wurden Wasserproben auch im AMES-Test mit und ohne Metabolisierung sowie vor und nach Anreicherung untersucht. Äquivalente von 15 35 ml Probenwasser (nach XAD4/8-Anreicherung und DMSO-Extraktion) steigerten die Revertanzahl des Stammes TA 98 ausschließlich nach metabolischer Aktivierung durch Rattenlebermikrosomen. Dieses Ergebnis wies

auf polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) hin, deren dünn-schichtchromatographische Untersuchung positiv verlief:

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

Diese Substanzen sind im AMES-Test mutagen, zusätzlich wurden noch einige nichtmutagene PAH identifiziert. Auffallend ist die Empfindlichkeit des Testsystems gegenüber dem Substanzgemisch (Nachweisgrenze 9 ng/Platte) im Vergleich mit der positiven Kontrolle Benzo(a)pyren (Nachweisgrenze 200 ng/Platte).

Dies deutet entweder auf potenzierende Effekte der Einzelsubstanzen oder auf im genetischen System wirksame aber chemisch unidentifizierte Mutagene hin.

Trotz der genetischen Tests ist das Gesundheitsrisiko mutagener Stoffe extrem schwierig zu bestimmen. Obwohl einige Fortschritte in der Suche nach geeigneten Hilfsmitteln zur Aufdeckung und Quantifizierung von DNA-Schäden zu verzeichnen sind, verbleiben doch große Unsicherheiten bezüglich der Abschätzung gesundheitlicher Gefahren. Daher sollen weitere Anstrengungen unternommen werden, die Kurzzeittests unter Einbeziehung molekularbiologischer Methoden - so zu erweitern, daß sie sich gegenseitig in ihrer Sensibilität besser ergänzen.

### Zusammenfassung

In vitro Kurzzeit-Mutagenitätstests können Hinweise auf das Vorkommen mutagener/karzinogener Substanzen im Wasser geben, noch bevor diese chemisch identifiziert sind. Zu beachten ist jedoch, daß Wechselwirkungen verschiedener Substanzen angezeigt werden. Mit diesen Untersuchungsmethoden können Basenanalogue, basenmodifizierende Substanzen und Leserastermutagene erfaßt werden, wobei für Wasserproben bislang nur einzelne Testsysteme, wie SOS-Chromotest und AMES-Test erprobt sind. Um ein möglichst breites Spektrum an mutagenen Wirkungen zu erfassen, ist die Anwendung und Erprobung zusätzlicher Testsysteme notwendig. In einem Beispiel wird die Anwendung des AMES-Tests im Zuge einer Leitungsverunreinigung mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen beschrieben. Mutagenitätstests können bei Kenntnis ihrer Fehler und Aussagegrenzen einen wertvollen Beitrag zum Schutz der Trinkwasserversorgung leisten, sei es als biologischer Summenparameter oder als Hinweis für die chemische Analyse.

### SUMMARY

#### Aspects of applied mutagenicity testing in water samples

In vitro mutagenicity testing can detect mutagenic/carcinogenic activity in water before chemical identification of single substances can be performed. The activity indicated is due in most cases to the combined effects of variety of substances. Base analogues, base modifying substances and frameshift mutagens can be detected. So far, only a few test systems such as the AMES-test or the SOS-chromotest have been adapted to mutagenicity tests with water samples so that expansion of methods is still necessary to detect a wider range of mutagens. An example discusses the success-

ful application of the AMES-test for detection of PAH in pipe water, and shows that mutagenicity testing can play its role in drinking water investigations.

### Literatur

- BASLER, A., v.d.HUDE,W., SCHEUTWINKEL,M. (1987): Screening of the food additive propionic acid for genotoxic properties.- *Fd.Chem.Toxic.* 25, 287-290.
- BRADLEY, M.O., DYSART, G., FITZSIMMONS,K. et al. (1982): Measurements by filter elution of DNA single and double strand breaks in rat hepatocytes: effects of nitrosamines and gamma irradiation.- *Cancer Res.* 42, 2592-2597.
- BROWN,M., WASSOM,J., MALLING,H. et al. (1979): Literature survey of bacterial, fungal and Drosophila assay systems used in the evaluation of selected compounds for mutagenic activity.- *J.Natl.Cancer Inst.* 62, 841-871.
- EVANS,CH., DI PAOLO,J. (1981): In vitro mammalian cell transformation for identification of carcinogens, cocarcinogens and anticarcinogens. In: Short term tests for chemical carcinogens, Hsg.: STICH,H.F., SAN, R.H.C.- Vlg. Springer, New York.
- KOOL,H.J., VAN KREIJL,C.F., VAN KRAANEN,H.J. et al. (1981):The use of XAD-resins for the detection of mutagenic activity in water.- *Chemosphere* 10, 85-108.
- MARON,D., AMES,B.N. (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test.- *Mutat Res* 113, 173-215.
- PLEWA,J.M., WAGNER,E.D., GENTILE,G.D. et al (1984): An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation.- *Mutat Res* 136, 233-245.
- QUILLARDET,P., HUISMAN,O., D'ARI,R. et al. (1982): SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *E.coli* K 12 to measure genotoxicity.- *PNAS* 79, 5971-5975.
- SCHNATTINGER,A. (1986): Untersuchungen zur mutagenen Aktivität von Trink-, Oberflächen- und Abwässern im Raum Wien.- *Wasser und Abwasser* 30, 125-163.
- WOLFF,S.H. (1981): The sisterchromatid exchange test. In: Short term tests for chemical carcinogens, Hsg. STICH,H.F., SAN R.H.C.- Vlg. Springer, New York.

WYMAN, A.R., WHITE, R. (1980): A highly polymorphic locus  
human DNA.- PNAS 77, 6754-6758.

ZIMMERMANN, F.K. (1975): Procedures used in the induction of  
mitotic recombination and mutation in the yeast *Sac-*  
*charomyces cerevisiae*. Mutat Res 31, 71-86.

Anschrift der Verfasserin: Dr. Andrea SCHNATTINGER, Institut für  
Umweltmedizin, Feidg. 9, A-1080 Wien.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 1989

Band/Volume: [1989](#)

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

Artikel/Article: [Zur Anwendung von Mutagenitätstests in der Wasseruntersuchung  
273-281](#)