

# Abschlussbericht

Für die Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU)

## **Ames-RAMOS-Test – Neue Entwicklung eines vereinfachten, robusteren und aussagefähigeren Mutagenitäts-Biotests**

Bewilligungsempfänger: Prof. Dr.-Ing. Jochen Büchs  
RWTH Aachen, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik  
Forckenbeckstraße 51  
52074 Aachen

Kooperationspartner: Prof. Dr. Henner Hollert  
RWTH Aachen, Institut für Umweltforschung  
Worringerweg 1  
52074 Aachen

Dr. Petra Stahlschmidt-Allner  
GOBIO GmbH  
Scheidertalstraße 69a  
65326 Aarbergen/Kettenbach

Projektbearbeitung: M. Sc. Kira Kauffmann  
Prof. Dr.-Ing. Jochen Büchs  
Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

M. Sc. Julia Brendt  
Dr. Andreas Schiwy  
Dr. Kerstin Bluhm  
Prof. Dr. Henner Hollert  
Institut für Umweltforschung

M. Sc. Bastian Hölzel  
Dr. Petra Stahlschmidt-Allner  
GOBIO GmbH

Aktenzeichen: AZ 32654/01

Berichtszeitraum: 01.05.2016 – 30.04.2019

Aachen, Juli 2019

**Projektkennblatt**  
der  
**Deutschen Bundesstiftung Umwelt**



|    |       |         |    |             |           |
|----|-------|---------|----|-------------|-----------|
| Az | 32654 | Referat | 32 | Fördersumme | 304.836 € |
|----|-------|---------|----|-------------|-----------|

**Antragstitel** **Ames-RAMOS-Test – Neue Entwicklung eines vereinfachten, robusteren und aussagefähigeren Mutagenitäts-Biotests**

**Stichworte**

|                  |                   |             |                 |
|------------------|-------------------|-------------|-----------------|
| Laufzeit         | Projektbeginn     | Projektende | Projektphase(n) |
| <b>36 Monate</b> | <b>01.05.2016</b> |             |                 |

|                  |            |            |  |
|------------------|------------|------------|--|
| Zwischenberichte | 30.04.2017 | 30.04.2018 |  |
|------------------|------------|------------|--|

|                              |                                    |                             |               |
|------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------|
| <b>Bewilligungsempfänger</b> | RWTH Aachen                        | Tel                         | 0241 80 24633 |
|                              | Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik | Fax                         | 0241 80 22635 |
|                              | Forckenbeckstraße 51               | Projektleitung              |               |
|                              | 52074 Aachen                       | Prof. Dr.-Ing. Jochen Büchs |               |
|                              |                                    | Bearbeiter                  |               |
|                              |                                    | Kira Kauffmann              |               |

**Kooperationspartner** Prof. Dr. Henner Hollert, RWTH Aachen, Institut für Umweltforschung  
Worringerweg 1, 52074 Aachen

Dr. Petra Stahlschmidt-Allner, GOBIO GmbH  
Scheidetalstraße 69a, 65326 Aarbergen/Kettenbach

### **Zielsetzung und Anlaß des Vorhabens**

Der Ames-Test wird weltweit zur Mutagenitätsbestimmung von Einzelsubstanzen und Umweltproben eingesetzt. So fordert ihn beispielsweise die europäische Chemikalienverordnung REACH. Er basiert auf der Rückmutation histidinauxotropher *Salmonella typhimurium* Stämme, welche daraufhin auf einem Histidin-Mangelmedium wachsen können. Die etablierten Ames-Testsysteme (Agarplattentest und Fluktuationstest) sind durch einen relativ großen Arbeitsaufwand, erhöhte Abfallmengen sowie einem relativ geringen Informationsgehalt gekennzeichnet. Durch den Einsatz der RAMOS-Technologie (Respiration Activity Monitoring System) soll der Ames-Test vereinfacht, optimiert und robuster gestaltet werden (Ames-RAMOS-Test). So sollen mutagene, die Umwelt belastende Substanzen genauer evaluiert werden können. Zusätzlich werden Materialeinsatz und Arbeitsaufwand weiter reduziert. Zum Material zählt auch das eingesetzte Rattenleber-Homogenat S9, welches in Tierversuchen hergestellt wird, um den Säugermetabolismus abzubilden.

### **Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden**

Die Entwicklung des Ames-RAMOS-Tests gliederte sich in 3 Module. In Modul 1 wurde die RAMOS-Technologie für die Durchführung des Ames-Tests evaluiert und adaptiert. Hierfür wurde die RAMOS-Anlage im Schüttelkolbenmaßstab genutzt, da diese bereits etabliert ist und Anpassungen schnell vorgenommen werden konnten. Das Ziel war es, die grundsätzliche Durchführbarkeit des Ames-RAMOS-Tests aufzuzeigen, sowie die Testdurchführung an die RAMOS-Anlage anzupassen. Es sollte die Vergleichbarkeit bezüglich Negativ- und Positivkontrollansätzen zum Ames-Fluktuationstest aufgezeigt werden. In Modul 2 sollte der Transfer des Ames-Tests auf die RAMOS-Technologie in Mikrotiterplatten (48 Wells) erfolgen. Das Ziel war eine Erhöhung der gleichzeitig zu untersuchenden Probenanzahl sowie eine Reduktion des Probenvolumens um den Materialeinsatz und somit auch die Umweltbelastung zu verringern. Im anschließenden Modul 3 sollten bekannte Mutagene und Umweltproben mit dem Ames-RAMOS-Test untersucht und mit den Ergebnissen im Ames-Fluktuationstest verglichen werden. Hier sollten auch Vergleiche zu Ergebnissen aus weiteren Testsystemen mit einem genotoxischen Endpunkt wie dem umu-Chromotest und Mikrokerntest gezogen werden.

## **Ergebnisse und Diskussion**

Im ersten Projektteil wurde die RAMOS-Technologie für die Durchführung des Ames-Tests evaluiert und adaptiert. Hierfür wurde die Kolben-RAMOS-Anlage genutzt. Es wurden die Versuchsbedingungen zwischen den verschiedenen Projektpartnern verglichen und angepasst. Das Prinzip des Ames-RAMOS-Tests konnte nachgewiesen werden. So konnte auf einem Histidin-Mangelmedium ein schnellerer Anstieg der Atmungsaktivität bei mutagenen Proben festgestellt werden. Dies liegt an der erhöhten Anzahl an rückmutierten Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle, in der lediglich spontane Mutationen entstehen. Der Einfluss des Histidintransfers aus der Vorkultur konnte als ein möglicher Faktor für die interexperimentelle Variabilität des Ames-Tests ausgemacht werden. Dieser Aspekt wurde zusätzlich zum eigentlichen Projektplan untersucht, da nur so ein reproduzierbarer Ames-RAMOS-Test zu gewährleisten war. Hierfür wurde eine Vorkultur auf optimiertem Minimalmedium mit Histidinlimitierung etabliert, sodass kein Übertrag von Histidin auf die eigentliche Expositionsphase stattfinden konnte. Hierdurch konnten reproduzierbarere Bedingungen geschaffen werden.

Weiterhin konnten Unterschiede in den Testergebnissen bei Nutzung verschiedener Bakterienchargen des gleichen Herstellers festgestellt werden. Als Grund für die Unterschiede konnte die maximale Wachstumsrate ausgemacht werden. Dies zeigte sich auch in Experimenten mit herabgesetzter Temperatur. Es wurde eine Kultivierungstemperatur von 30°C als optimal festgestellt. Neben den Unterschieden in den verschiedenen Bakterienchargen, wurden Unterschiede zwischen den zwei genutzten Stämmen festgestellt. Diese Unterschiede können nicht allein durch die bekannten Mutationen im Histidinoperon erklärt werden. Es fand ein erfolgreicher Transfer der Ames-RAMOS-Tests von der Kolben- auf die 48-Well Mikrotiterplatten-RAMOS-Anlage statt. Hierbei wurde ein Füllvolumen von 2,4 mL/Well als optimal für die Messergebnisse festgestellt. Um Proben- und S9-Menge zu reduzieren, sollte trotzdem über eine Volumenreduzierung nachgedacht werden. Es konnten erfolgreich Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen aufgenommen werden. Der Einsatz von S9-Mix war ebenfalls erfolgreich. Es konnte der Einfluss cytotoxischer Proben auf die Atmungsaktivität der Zellen dargestellt werden. In Zukunft können somit über den Verlauf der Atmungsaktivität cytotoxische Proben identifiziert werden. Es müssen in Zukunft nun noch Mischungseffekte auf die Ergebnisse des Ames-RAMOS-Tests untersucht werden.

Zur Validierung des Ames-RAMOS-Tests waren im Fluktuationstest, Mikrokerntest und umu-Chromotest valide Proben sowie Umweltgemische zu finden. Hierfür wurden potenzielle Proben getestet. Es wurden aus der vorhandenen Liste gezielt mutagene, promutagene, sowie Substanzen mit reduziertem Potential durch S9-Einsatz ausgewählt und in der RAMOS-Anlage getestet. Eine generelle Vergleichbarkeit der Ergebnisse aller Testsysteme mit dem Ames-RAMOS-Test konnte gezeigt werden.

## **Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation**

Die Ergebnisse wurden auf der Tagung der European Society of Biochemical Engineering Sciences in Lissabon im Jahr 2018, der SETAC Tagung in Rom im Jahr 2018, sowie auf der European Environmental Mutagenesis and Genomics Society Tagung in Rennes im Jahr 2019 vorgestellt.

## **Fazit**

Ziel des hier dargestellten Projektes war es, den Ames-Test auf die RAMOS-Technologie zu adaptieren, um den optimierten und aussagefähigeren Ames-RAMOS-Test zu entwickeln. Durch Aufnahme der Atmungsaktivität der genutzten *Salmonella typhimurium* Kulturen kann über die Zeiten bis zum sichtbaren Anwachsen der Kulturen auf die Mutagenität einer Probe geschlossen werden. Im Gegensatz zum Ames-Fluktuationstest sowie zum Ames Agarplatten-Test entsteht ein deutlicher Mehrgewinn an Informationen. Somit können umweltschädigende Substanzen genauer untersucht und evaluiert werden. Es entfällt außerdem der Übergang von der Expositionsphase in eine Inkubationsphase (notwendig beim Ames-Fluktuationstest), welcher mit einem erhöhten Arbeitsaufwand verbunden ist. Ebenso kommt es zu Materialeinsparungen. Für eine Einbringung der Ames-RAMOS-Tests in bestehende Normen muss jedoch eine noch umfangreichere Validierung durchgeführt werden. Außerdem sollten Verfahren entwickelt werden, mit denen eine gleichbleibende Bakterienchargen-Qualität gewährleistet wird. Hierfür sind noch weiterreichende Untersuchungen der Chargenunterschiede notwendig.

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Inhaltsverzeichnis.....                                     | 4  |
| Abbildungsverzeichnis.....                                  | 6  |
| 1 Einleitung.....   | 9  |
| 1.1 Anlass und Zielsetzung des Forschungsvorhabens.....     | 9  |
| 1.2 Ames-Test.....  | 9  |
| 1.3 RAMOS- und $\mu$ RAMOS-Technologie.....                 | 10 |
| 1.4 Ames-RAMOS-Test.....                                    | 11 |
| 1.5 Umu-Chromotest.....                                     | 12 |
| 1.6 Mikrokerntest (selbstsignalgebend).....                 | 12 |
| 1.7 RAPD Analyse.....                                       | 13 |
| 1.8 Projektbearbeitung.....                                 | 13 |
| 2 Material und Methoden.....                                | 14 |
| 2.1 Durchführung des Ames-Fluktuationstests.....            | 14 |
| 2.1.1 Übernachtkultur.....                                  | 14 |
| 2.1.2 Testvorbereitungen.....                               | 15 |
| 2.1.3 Einstellen der Formazine Attenuation Units (FAU)..... | 15 |
| 2.1.4 Testung mit Cytotoxizität.....                        | 15 |
| 2.1.5 Testung ohne Cytotoxizität.....                       | 16 |
| 2.1.6 Belegung der 384-Well-Platten.....                    | 16 |
| 2.2 Durchführung des Ames-RAMOS-Tests.....                  | 16 |
| 2.3 Durchführung des Umu-Chromotests.....                   | 17 |
| 2.3.1 Übernachtkultur.....                                  | 18 |
| 2.3.2 Testvorbereitung.....                                 | 18 |
| 2.3.3 Messung.....  | 19 |
| 2.4 Mikrokerntest.....                                      | 20 |
| 2.4.1 Testvorbereitung.....                                 | 20 |
| 2.4.2 Messung.....  | 21 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.5   | RAPD Analyse .....  | 22 |
| 2.5.1 | DNA Extraktion .....  | 22 |
| 2.5.2 | PCR.....  | 23 |
| 2.6   | Trübungsmessung .....   | 23 |
| 3     | Ergebnisse und Diskussion .....   | 23 |
| 3.1   | Evaluierung und Adaptation der RAMOS-Technologie zur Durchführung des Ames-Tests 23                             |    |
| 3.1.1 | Optimierung der Vorkulturführung .....  | 23 |
| 3.1.2 | Validierung der initialen Versuchsbedingungen .....   | 25 |
| 3.1.3 | Testung von Positivkontrollen .....   | 29 |
| 3.1.4 | Überprüfung von Einflüssen auf das Bakterienwachstum .....  | 31 |
| 3.2   | Einfluss des Histidinübertrags aus der Vorkultur .....  | 33 |
| 3.3   | Einfluss verschiedener Bakterienchargen auf die Testergebnisse .....  | 37 |
| 3.4   | Transfer auf die Mikrotiterplatten-RAMOS-Anlage .....   | 39 |
| 3.5   | Testung von bekannten Mutagenen und Umweltproben .....  | 43 |
| 3.5.1 | Generierung von Vergleichsdaten mittels Fluktuationstest, umuC-Test und Mikroerntest (selbstsignalgebend) ..... | 43 |
| 3.5.2 | Testung bekannter Mutagene und Umweltproben in der $\mu$ RAMOS-Anlage....                                       | 45 |
| 3.5.3 | Überprüfung cytotoxischer Effekte in der $\mu$ RAMOS-Anlage .....   | 47 |
| 3.6   | Publikationen und Wissenstransfer .....   | 48 |
| 4     | Zusammenfassung und Ausblick .....  | 50 |
|       | Literatur .....   | 52 |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 2-1: Belegung der 384-Well-Platte mit einem Probenansatz.....  | 16 |
| Abbildung 2-2 Pipettierschema umuC-Test .....  | 19 |
| Abbildung 2-3 Sichtbare Ergebnisse des umu-Tests. ....   | 20 |
| Abbildung 2-4 Belegscheina einer 96-Well-Mikrotiterplatte im KCB Mikrokerntest.....  | 21 |
| Abbildung 2-5: Visualisierung des cytogenetischen Zustands: (a) Interphasekern, (b) Anaphasekern, (c) Asymmetrische Kernteilung, (d) Entstehung von Aneuploidie, (e) Mikrokern, (f) Karyorhexis..... | 22 |
| Abbildung 3-1: OTR-Verlauf der Vorkultur des Ames-Tests.....   | 24 |
| Abbildung 3-2: Vergleich der erreichten optischen Dichten (in FAU) für verschiedene Vorkulturbedingungen. ....   | 25 |
| Abbildung 3-3: OTR-Verlauf einer Negativkontrolle des Stammes TA 98 in der Expositionsphase. ....  | 26 |
| Abbildung 3-4: OTR-Verlauf einer Negativkontrolle des Stammes TA 100 in der Expositionsphase. ....   | 27 |
| Abbildung 3-5: OTR-Verlauf von Negativkontrollen des Stammes TA 100 in der Expositionsphase mit verschiedenen Animpfdichten. ....  | 28 |
| Abbildung 3-6: OTR-Verlauf von Negativ- und Positivkontrolle des Stammes TA 98 in der Expositionsphase. ....   | 30 |
| Abbildung 3-7: OTR-Verlauf von Negativ- und Positivkontrolle des Stammes TA 100 in der Expositionsphase. ....  | 31 |
| Abbildung 3-8: Vergleich der Mittelwerte der Wachstumsfaktoren in den unterschiedlichen Verdünnungen (G-Stufen) der 5 Grundwasserproben .....  | 32 |
| Abbildung 3-9: Korrelation der Induktionsrate und des Wachstumsfaktors der 5 Grundwasserproben.....  | 33 |
| Abbildung 3-10: Abhängigkeit der Lag-Zeit vom Animpfverhältnis. ....   | 34 |
| Abbildung 3-11 Induktions- und Wachstumsraten im <i>umu</i> -Test mit und ohne S9 nach mechanischer Belastung. ....  | 36 |
| Abbildung 3-12: Negativkontrollen zwei verschiedener TA 100 Chargen im Fluktuationstest. ....  | 37 |
| Abbildung 3-13: Trübungsmessungen bzw. Wachstumsraten dreier im Ames-Test verwendeter Bakterienchargen über 135 Minuten. ....  | 38 |
| Abbildung 3-14: RAPD Analyse der drei Bakterienchargen mittels Endpunkt-PCR und Gelelektrophorese .....  | 38 |

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 3-15: OTR-Verlauf der Negativkontrolle in der $\mu$ RAMOS-Anlage mit unterschiedlichen Füllvolumina..... | 40 |
| Abbildung 3-16: OTR-Verlauf Konzentrations-Wirkungs-Kurve Nitrofurantoin. ....                                     | 41 |
| Abbildung 3-17: Konzentrations-Wirkungs-Kurve Nitrofurantoin: Vergleich mit Fluktuationstest. ....                 | 42 |
| Abbildung 3-18: Konzentrations-Wirkungs-Kurve aus dem Fluktuationstest mit 2-Nitrofluorene mit TA 98.....          | 43 |
| Abbildung 3-19: Konzentrations-Wirkungs-Kurve aus dem Mikrokerntest mit Aflatoxin B1. ...                          | 45 |
| Abbildung 3-20: OTR-Verlauf <i>S. typhimurium</i> TA 100: Einfluss einer cytotoxischen Probe: Nitrofurantoin.....  | 47 |
| Abbildung 3-21: OTR-Verlauf <i>S. typhimurium</i> TA 100: Einfluss einer cytotoxischen Probe: Tetrazyklin.....     | 48 |

## **Tabellenverzeichnis:**

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Modulplan. ....   | 14 |
| Tabelle 2: Ergebnisse der 5 Grundwasserproben nach metabolischer Aktivierung im umuC-Test .....  | 32 |
| Tabelle 3: Ergebnisse der 8 nativen Proben im umuC-Test.....   | 44 |
| Tabelle 4: Bewertung der Mutagenität der Auswahlsubstanzen im Fluktuationstest, umuC-Test und Mikrokerntest (selbstsignalgebend) .....                               | 45 |
| Tabelle 5: Bewertung der Mutagenität der 5 Auswahlsubstanzen im Fluktuationstest, umuC-Test Mikrokerntest (selbstsignalgebend) und Ames $\mu$ RAMOS Test (Rot) ..... | 46 |



# 1 Einleitung

## 1.1 Anlass und Zielsetzung des Forschungsvorhabens

Der Ames-Test wird weltweit zur Mutagenitätsbestimmung von Einzelsubstanzen und Umweltproben eingesetzt. So fordert ihn beispielsweise die europäische Chemikalienverordnung REACH.

Ein Testverfahren auf Agarplatten ist durch die OECD standardisiert; ein Testverfahren in Mikrotiterplatten (Ames-Fluktuationstest) ist durch die ISO standardisiert. Auch wenn der Ames-Fluktuationstest gegenüber dem konventionellen Ames-Test auf Agarplatten einige Vorteile, wie einen geringeren Arbeitsaufwand und eine reduzierte Abfallmenge bietet, so ist auch dieses Testsystem durch einen relativ großen Arbeitsaufwand, erhöhte Abfallmengen sowie einem relativ geringem Informationsgehalt gekennzeichnet. Durch den Einsatz der vom Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (RWTH Aachen) entwickelten RAMOS-Technologie (Respiration Activity MONitoring System) sollte der Ames-Test vereinfacht, optimiert und robuster gestaltet werden. Durch die präzise Messung der Sauerstofftransferrate (OTR) der submersen mikrobiellen Kulturen ist eine genaue Aussage über den respiratorischen Zustand der Kultur möglich. Zusätzlich werden Materialeinsatz und Arbeitsaufwand weiter reduziert. Zum Material zählt auch das eingesetzte Rattenleber-Homogenat S9, welches in Tierversuchen hergestellt wird, um den Säugermetabolismus abzubilden. Nach einer Übertragung des Ames-Test in eine Schüttelkolben-RAMOS-Anlage, sollte der Test weiter auf eine 48-Well Mikrotiterplatten-RAMOS-Anlage ( $\mu$ RAMOS) übertragen werden, um einen neuen Hochdurchsatz Ames-RAMOS-Test zu etablieren.

## 1.2 Ames-Test

Bereits in den siebziger Jahren wurde von Bruce Ames und seinen Mitarbeitern der Ames-Mutagenitäts-Test auf Agar-Platten entwickelt<sup>1,2</sup>. Dieser *in vitro* Test beruht auf der Rückmutation von Histidin-Mangelmutanten des Bakteriums *Salmonella typhimurium*<sup>3</sup>. Unter der Wirkung von mutagenen Substanzen erfolgt bei einer Mangelmutante eine Rückmutation hin zur Prototrophie. Diese Rückmutation zeigt sich innerhalb des herkömmlichen Ames-Tests auf Minimalagar-Platten durch die Bildung von Kolonien. Der Ames-Test kann allerdings auch als Fluktuationstest in 24- und 384-Well-Platten in Flüssigkultur durchgeführt werden<sup>4-7</sup>. Im Ames-Fluktuationstest, welcher nach der ISO-Guideline 11350 durchgeführt wird, wird statt der Kolonienzahl das Bakterienwachstum in Flüssigkultur als Endpunkt betrachtet. In diesem Testverfahren säuert sich das Medium durch den stattfindenden Nährstoffverbrauch der rückmutierten Bakterien an. Dies wird durch einen pH-Indikator (Natrium-Bromkresolpurpur) sichtbar gemacht. Es erfolgt ein Farbumschlag von Violett zu Gelb. Durch das

Bakterienwachstum wird somit die mutagene Wirkung von Substanzen oder Umweltproben angezeigt.

Um möglichst viele Informationen zu erhalten, werden mehrere Teststämme mit unterschiedlichen Spezifitäten gegenüber Mutagenen eingesetzt. Der Stamm TA 98 besitzt eine Rasterschubmutation (Frameshift-Mutation, *hisD3052*), beim Stamm TA 100 liegt eine Basenaustauschmutation (*hisG46*) vor<sup>3</sup>. Zusätzlich besitzen beide Stämme folgende Eigenschaften, die relevant für das Testsystem sind: Neben einem R-Faktor-Plasmid (*pKM101*), welcher die Empfindlichkeit auf Mutagene erhöht<sup>2</sup> (mit einer Ampicillin-Resistenz und dem *mucAB* Operon, welches eine SOS-Antwort auf größere DNA-Schäden kodiert und eine DNA-Reparatur mit erhöhter Fehlerrate zur Folge hat) besitzen beide eingesetzten Teststämme verschiedene weitere Mutationen. Zum einen liegt eine Mutation im *rfa*-Gen vor. Dadurch kommt es zu einem partiellen Verlust der Lipopolysaccharid-Schicht, welcher dazu führt, dass die Permeabilität für größere Moleküle durch die Bakterienzellwand erhöht wird<sup>1,8</sup>. Weiterhin ist eine Deletionsmutation vorhanden, welche die Fähigkeit einschränkt DNA-Schäden zu reparieren, die durch UV-Licht sowie bestimmte Mutagene ausgelöst werden. Diese Mutation (*uvrB*) beeinflusst auch die Biotin-Synthese<sup>1,8</sup>, sodass die Zugabe von Biotin im Testmedium notwendig wird.

Da die Bakterien über kein eigenes metabolisierendes Enzymsystem verfügen, welches der Säugerleber ähnelt, ist der Einsatz von einem metabolischen Aktivierungssystem nötig um Informationen über eine mögliche Promutagenität einer Substanz zu erhalten. Ein solches Säuger-Metabolisierungssystem ist in diesem Fall das S9, welches aus Rattenlebern in anzeigepflichtigen Tierversuchen gewonnen wird<sup>9-13</sup>.

Innerhalb des Instituts für Umweltforschung der RWTH Aachen wurden schon mehrere Studien mit dem Ames-Fluktuationstest verfasst, wie beispielsweise Heger et al (2012)<sup>14</sup>. Unter anderem nahm das Institut für Umweltforschung der RWTH wie auch die GOBIO GmbH an einer Ringstudie mit dem Ames-Fluktuationstest im Kontext der ISO-Validierung teil<sup>15</sup>.

### 1.3 RAMOS- und $\mu$ RAMOS-Technologie

Ziel des Projektes war es, den Ames-Test auf die RAMOS-Technologie zu übertragen. Hierfür wurde der Test erst auf die Kolben-RAMOS-Technologie und im Weiteren auf die  $\mu$ RAMOS-Technologie übertragen. RAMOS steht hierbei für Respiration Activity Monitoring System. Das System ermittelt online die Sauerstofftransferrate (OTR), Kohlendioxidtransferrate und den Respirationsquotienten ohne die Kultivierung zu beeinflussen<sup>16</sup>. Mit Hilfe der OTR kann der physiologische Zustand einer aerob kultivierten Kultur ermittelt werden. RAMOS-Kolben sind so konstruiert, dass sie die gleichen Hydrodynamiken und Gaszusammensetzungen im Kopfraum wie Standard-Erlenmeyerkolben besitzen. Die Kolben besitzen sowohl ein Einlass-

als auch ein Auslassventil mit Sterilfiltern sowie einen Sauerstoffsensor, welcher den Sauerstoffpartialdruck im Kopfraum des Kolbens misst. Im Verlauf der Kultivierung wird ein definierter Messzyklus kontinuierlich wiederholt: Während der Spülphase wird Gas einer definierten Zusammensetzung durch den Kolben geleitet. Zu Beginn der Messphase werden die Ventile geschlossen, sodass der Sauerstoffpartialdruck aufgrund der respiratorischen Aktivität der Organismen im Kopfraum des Kolbens abnimmt. Aus der Abnahme des Sauerstoffpartialdrucks kann nun die OTR berechnet werden. Durch das Öffnen der Ventile wird erneut die Spülphase eingeleitet<sup>17</sup>. In einer RAMOS-Anlage können acht Kolben parallel vermessen werden.

Die Kolben-RAMOS-Technologie wurde von Flitsch et al.<sup>18</sup> in den  $\mu\text{L}$ -Maßstab übertragen. Hier werden Standard 48-Well Mikrotiterplatten verwendet, sodass ein 6-fach höherer Durchsatz als bisher möglich ist. Aufgrund des kleineren Maßstabs wurde eine spezielle Ventil- und Sensortechnologie entwickelt. Hierbei gibt es pro Well jeweils ein Ein- und Auslassventil, welche alle durch einen einzigen Massendurchflussregler kontrolliert werden. Die Anlage ist auf einem orbitalen Schüttler mit einem Schütteldurchmesser von 3 mm befestigt. Der Sauerstoffgehalt in der Gasphase wird von einem optischen Sauerstoffsensor gemessen, welcher das Signal durch eine Glasfaser an ein Sauerstoffmessgerät weiterleitet (keine CTR- oder RQ-Messung). Acht Messinstrumente messen alle 48 Wells aus. Dies wird durch einen Multiplexer verwirklicht. Versuche zum Vergleich der beiden RAMOS-Technologien zeigten eine sehr gute Übereinstimmung der gemessenen OTR-Werte<sup>18</sup>.

#### 1.4 Ames-RAMOS-Test

Im Rahmen dieses Projektes sollte der Ames-Test für die  $\mu\text{RAMOS}$ -Technologie adaptiert werden. In einer RAMOS-Anlage werden die Zellen, im Gegensatz zum Ames-Fluktuationstest, aktiv durchmischt, sodass eine homogene Suspensionskultur entsteht (Ames-Fluktuationstest: Statische, sauerstofflimitierte Kultur). Hierdurch, sowie durch die Möglichkeit das Bakterienwachstum online zu verfolgen, bietet die RAMOS-Technologie Chancen für einen verbesserten Ames-Test. Das OTR-Signal lässt Rückschlüsse auf den aktuellen respiratorischen Zustand einer Kultur zu, sodass das Verhalten der Bakterien im Ames-Test besser als bisher charakterisiert werden kann. Die Mutagenität einer Probe sollte durch die Zeit bis zum Anwachsen der Kultur nach Verbrauch des Histidins im Medium analysiert werden. Befinden sich in einer Kultur mehr rückmutierte Zellen, die ohne Histidin wachsen können, so wird die OTR hier schneller ansteigen und die Anwachs-Zeit kürzer sein als in einer Kultur mit weniger Revertanten. Durch Benutzung von 48-Well Mikrotiterplatten bei der  $\mu\text{RAMOS}$ -Technologie (Ames-Fluktuationstest: 24-Well Mikrotiterplatten) wird außerdem eine Volumeneinsparung pro Replikat erreicht. Durch den Wegfall der „Vereinzelung“ in 384-

Well Mikrotiterplatten (wie im Ames-Fluktuationstest) wird außerdem Arbeitszeit sowie weiteres Verbrauchsmaterial wie z.B. Pipettenspitzen eingespart.

### 1.5 Umu-Chromotest

Der umu-Chromotest ist ein standardisiertes auf Mikroorganismen basierendes Genotoxizitäts-Testverfahren (ISO 13829 und DIN 38415-T3). Als Testorganismus für den Umu-Chromotest dient das gentechnisch veränderte Bakterium *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK 1002. Dieser Stamm hat einige für einen sensitiven Genotoxizitätstest wichtige Eigenschaften:

- Das verwendete Bakterium trägt ein modifiziertes Genom. Es ist excisions-reparaturdefizient (uvrB), besitzt eine unvollständige Zellwand (rfa), die für viele Stoffe permeabel ist und kein chromosomales lacZ-Gen. Es teilt diese Eigenschaften mit den beiden *Salmonella typhimurium* Stämmen TA 98 und TA 100, die im Ames-Test eingesetzt werden.
- Gegenüber dem Ausgangsstamm trägt der Testorganismus das Plasmid pSK1002 mit dem umuC-lacZ-Gen und ein Gen für Ampicillin-Resistenz.

In Gegenwart von genotoxischen Substanzen wird die DNA geschädigt und es tritt Einzelstrang-DNA auf. Diese binden an RecA, ein Protein, das im Komplex mit Einzelstrang-DNA die Proteolyse von Transkriptionsblockern des umuC-Gens (Reparaturgen) katalysiert und somit die Transkription des Gens freigibt. In der transgenen Variante wird parallel zum zelleigenen umuC-Gen die Transkription von  $\beta$ -Galaktosidase induziert, die auf Plasmid 101 an die regulatorischen Sequenzen des umuC- Gens gekoppelt ist.

Die katalytische Aktivität der Galaktosidase stellt somit ein Maß für das Auftreten von Einzelstrang-DNA in der Zelle dar und ist somit ein Maß für das genotoxische Potential von Substanzen und Umweltproben. Dieses Verfahren sollte im Projekt vergleichend zum Ames-Test eingesetzt werden.

### 1.6 Mikrokerntest (selbstsignalgebend)

Der Mikrokerntest nach DIN EN ISO 21427-2 und OECD 487 ist ein auf Eukaryontenzellen basierender Genotoxizitätstest, der über Klastogene auch chromosomenvermittelte aneuploidieerzeugende Wirkungen (Aneugene) erfasst. Die GOBIO GmbH nutzt eine Variante des Mikrokerntests, bei der an Stelle von immortalisierten Zellen „gesunde“ Stammzellen aus dem Karpfengehirn genutzt werden. Es konnte im Vorfeld eine Zelllinie etabliert werden, die konstitutiv ein Histon-2B-eGFP-Fusionsprotein exprimiert. Diese genetische Veränderung bewirkt, dass die nuklearen Strukturen, unter anderem auch Mikrokerne, ein starkes

Fluoreszenzsignal zeigen. Auch dieses Verfahren sollte im Projekt vergleichend zum Ames-Test eingesetzt werden.

### 1.7 **RAPD Analyse**

Die RAPD Analyse (randomly amplified polymorphic DNA) ist eine abgewandelte Form der PCR und wird mit mehreren Primern mit einer Länge von 9-10 Basenpaaren durchgeführt. Auf Grund der kurzen Länge der Primer gibt es je nach untersuchtem Genom mehrere zufällige Bindungsstellen für die Primer und damit einhergehend mehrere Amplikons pro Primer mit unterschiedlichen Längen. Durch die zufälligen unterschiedlichen Bindungsstellen der Primer und die verschiedenen entstandenen Amplikons entstehen je nach Organismus unterschiedliche Bandenmuster, welche untereinander verglichen werden können.

### 1.8 **Projektbearbeitung**

Die Entwicklung des Ames-RAMOS-Tests gliederte sich laut Projektplan in 3 Module (zuzüglich Modul 4: Publikation und Wissenstransfer). Diese sind in Tabelle 1 dargestellt.

In Modul 1 wurde die RAMOS-Technologie für die Durchführung des Ames-Tests evaluiert und adaptiert. Hierfür wurde die Kolben-RAMOS-Anlage genutzt, da diese bereits etabliert ist und Anpassungen schnell vorgenommen werden konnten. Das Ziel war es, die grundsätzliche Durchführbarkeit des Ames-RAMOS-Tests aufzuzeigen, sowie die Testdurchführung an die RAMOS-Anlage anzupassen. Es sollte die Vergleichbarkeit bezüglich Negativ- und Positivkontrollansätzen zum Ames-Fluktuationstest aufgezeigt werden. Im Laufe der Projektbearbeitung wurden Mängel am ursprünglichen Ames-Test festgestellt, die zu unvorhergesehenen zusätzlichen Arbeitspaketen geführt haben. Diese sind ebenfalls in der Tabelle aufgelistet.

Im Modul 2 sollte der Transfer des Ames-Tests auf die  $\mu$ RAMOS-Technologie (48-Well) erfolgen. Das Ziel war eine Erhöhung der gleichzeitig zu untersuchenden Probenanzahl sowie eine Reduktion des Probenvolumens.

Im anschließenden 3. Modul sollten bekannte Mutagene und Umweltproben mit dem Ames-RAMOS-Test untersucht und mit den Ergebnissen im Ames-Fluktuationstest verglichen werden. Hier sollten auch Vergleiche zu Ergebnissen aus weiteren Testsystemen mit einem genotoxischen Endpunkt wie dem umu-Chromotest und Mikrokerntest gezogen werden.

**Tabelle 1: Modulplan.**

zusätzliche Arbeitspakete sind in Rot gekennzeichnet.

| Arbeitspaket  | Bemerkung  |
|---|--|
| Modul 1 Evaluierung und Adaptation der RAMOS-Technologie zur Durchführung des Ames-Tests                |  |
| Validierung der initialen Versuchsbedingungen   | Erfolgreich abgeschlossen                                  |
| Testung von Positivkontrollen und Überprüfung zytotoxischer Effekte                                     | Erfolgreich abgeschlossen                                  |
| Optimierung der Vorkulturführung  | Erfolgreich abgeschlossen                                  |
| Überprüfung von Einflüssen auf das Bakterienwachstum  | Erfolgreich abgeschlossen                                  |
| Untersuchung und Eliminierung des Einflusses von Histidin (unvorhergesehenes zusätzliches Arbeitspaket) | Erfolgreich abgeschlossen                                  |
| Untersuchung Bakterienchargen-Unterschiede (unvorhergesehenes zusätzliches Arbeitspaket)                | Erfolgreich abgeschlossen                                  |
| Modul 2 Transfer auf die Mirotiterplatten-RAMOS-Anlage  |  |
| Skalierung der RAMOS-Methode  | Erfolgreich abgeschlossen                                  |
| Experimentelle Applikation  | Erfolgreich abgeschlossen                                  |
| Modul 3 Testung von bekannten Mutagenen und Umweltproben  |  |
| Untersuchung bekannter Mutagene   | Erfolgreich abgeschlossen                                  |
| Überprüfung von Mischungseffekten   | Nicht abgeschlossen  |
| Untersuchung von Umweltproben   | Erfolgreich abgeschlossen                                  |
| Finale Bewertung und Vergleichbarkeit   | Erfolgreich abgeschlossen                                  |
| Modul 4 Publikation und Wissenstransfer   |  |
| Publikation und Wissenstransfer   | Teilweise abgeschlossen, weitere Veröffentlichungen folgen |

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Durchführung des Ames-Fluktuationstests

Der gesamte Ames-Fluktuationstest wurde nach ISO 11350 Norm durchgeführt mit den dort genannten Medienzusammensetzungen, Kontrollen und Inkubationszeiten.

#### 2.1.1 Übernachtkultur

Zur Erstellung der Übernachtkultur (ÜNK) wurden 20 ml Wachstumsmedium, 20 µl Ampicillin-Lösung und 20 µl der zu testenden Bakterien-Stammkultur unter sterilen Bedingungen in einen Schikane-Kolben gegeben, welcher mit einem sterilen Wattestopfen verschlossen wurde. Im Rahmen des Projekts wurde dieser Prozess auf die oben beschriebene Vorgehensweise

optimiert. Vorher erfolgte der Verschluss mit Alufolie. Es folgten 8 h Inkubation bei 37 °C und 150 rpm.

### 2.1.2 Testvorbereitungen

Jede Probe wurde für vier verschiedene Ansätze vorbereitet. Die Ansätze teilen sich auf die zwei Teststämme TA 98 und TA 100 und zwei Expositionsarten auf. Die Expositionsarten werden unterteilt in einen Ansatz ohne Lebermetabolismus und nach metabolischer Aktivierung durch den S9-Mix. Mit dem Teststamm TA 98 kann zusätzlich eine Untersuchung auf eine Cytotoxizität der Probe durchgeführt werden. Dazu wird eine Absorptionmessung zu Beginn der Exposition und nach 100 min bei 595 nm durchgeführt um die Bakteriendichte zu bestimmen. Im Vergleich zur Negativkontrolle kann so die Cytotoxizität beurteilt werden.

Die Positivkontrollen wurden in sechs Konzentrationsschritten vorbereitet um eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erhalten. Die höchste Konzentration wurde in fünf Schritten jeweils 1:2 verdünnt. Für jeden Stamm (TA 98 und TA 100) und jede Behandlung (mit oder ohne S9) wurde eine eigene Negativ- (NK) sowie Positivkontrolle (PK) angelegt. Die Negativkontrollen bestanden aus reinem DMSO, die Positivkontrollen aus in DMSO gelöstem 2-Aminoanthracen (TA 98 und TA 100, jeweils mit S9), Nitrofurantoin (TA 100 ohne S9) und 4-Nitro-*o*-phenylendiamin (TA 98 ohne S9).

### 2.1.3 Einstellen der Formazine Attenuation Units (FAU)

Die optische Dichte (OD) der Übernachtskultur wurde mit Hilfe eines Photometers bei 595 nm nach der ISO 11350 Norm eingestellt. Dazu wurden drei Küvetten benötigt: eine Blank-Küvette mit Expositions-Medium (ISO 11350), und je eine Küvette mit dem 1:10 verdünnten Bakterienstamm. Die gemessene optische Dichte wurde in die FAU umgerechnet und daraus das benötigte Volumen des Expositions-Mediums und der ÜNK ermittelt. Es erfolgte eine Kontrolle der eingestellten FAU über eine erneute Messung. Für TA 98 wird eine FAU von  $180 \pm 10$ , für TA 100 von  $45 \pm 5$  benötigt.

### 2.1.4 Testung mit Cytotoxizität

Beim Stamm TA 98 kann neben dem Ames-Test noch überprüft werden, ob durch die Testsubstanz cytotoxische Effekte auftreten. Für TA 100 ist dies nicht möglich, da die eingestellte Bakteriendichte zu gering ist, um mit den vorhandenen Methoden detektiert zu werden. Die Vorgehensweise für den Stamm TA 98 sah wie folgt aus: Die Bakterien wurden in eine 24-Well-Platte überführt. Pro Well wurden 980 µl der Kultur benötigt. Jede 24-Well-Platte wurde einzeln vorbereitet. 20 µl der vorbereiteten Probe wurden in die 24-Well-Platte überführt, gegebenenfalls wurde der S9-Mix zugefügt (34 µl S9-Mix), die optische Dichte wurde nach der Zugabe, genannt Zeitpunkt  $t=0$ , gemessen. Es folgte die Inkubation für genau 100 min und eine erneute Messung der optischen Dichte. Aus der Differenz der optischen

Dichte und durch einen Abgleich mit der Negativkontrolle kann so die Cytotoxizität bestimmt werden.

Nach der Messung wurden 500 µl (ohne S9) bzw. 515 µl (mit S9) aus jedem Well abgenommen und verworfen. Dann wurden 2,5 ml Reversions-Indikator-Medium pro Well zugegeben und das Testverfahren wie die Testung ohne Cytotoxizität fortgeführt.

### 2.1.5 Testung ohne Cytotoxizität

Analog zum Stamm TA 98 wurde die Testung von Stamm TA 100 durchgeführt, jedoch ohne die zuvor erwähnte Messung der optischen Dichte bei 595 nm. Es wurden außerdem lediglich 490 µl Bakterienkultur, 10 µl Probe und gegebenenfalls 17 µl S9 verwendet.

### 2.1.6 Belegung der 384-Well-Platten

Nach Zugabe des Reversions-Indikator-Mediums wurden aus jeder 24-Well-Platte mit Hilfe einer 8-Kanal-Mehrfachpipette nach folgendem Layout (siehe Abbildung 2-1) drei 384-Well-Platten hergestellt. Pro Probe entstehen so drei technische Replikate. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 48 h.

|    |    |    |    |    |    |
|----|----|----|----|----|----|
| NK | V3 | NK | •  | NK | •  |
|    |    |    | •  |    | •  |
| V6 | V2 | V6 | •  | V6 | •  |
|    |    |    | •  |    | •  |
| V5 | V1 | •  | V1 | •  | V1 |
|    |    | •  |    | •  |    |
| V4 | PK | •  | PK | •  | PK |
|    |    | •  |    | •  |    |

**Abbildung 2-1: Belegung der 384-Well-Platte mit einem Probenansatz.**

NK=Negativkontrolle, PK=Positivkontrolle, V=Verdünnungsstufen

Die Auswertung erfolgte anhand der Zählung von Wells mit revertierten Bakterien. Diese sind leicht an der Gelbfärbung (durch pH-Abfall) zu erkennen. Ein Test gilt als valide, wenn innerhalb der Negativkontrolle eine Revertanzahl von  $0 < X \leq 10$  (bei insgesamt 48 Wells) vorliegt und in der Positivkontrolle  $\geq 25$  Wells revertierte Bakterien vorhanden sind.

## 2.2 Durchführung des Ames-RAMOS-Tests

Der Ames-RAMOS-Test wurde im Schüttelkolbenmaßstab in der RAMOS-Anlage und im Mikrotiterplattenmaßstab (48-Well) in der µRAMOS-Anlage durchgeführt. Die Vorkultur wurde entweder ebenso wie im Ames-Fluktuationstest in Wachstumsmedium mit Zugabe von Ampicillin (nach ISO 11350), oder abweichend zum Ames-Fluktuationstest, in optimiertem Minimalmedium mit Zugabe von Ampicillin und 20 mg/L Histidin in der RAMOS-Anlage



durchgeführt. Im Gegensatz zum Ames-Fluktuationstest wurden 250 mL Kolben mit 20 mL Füllvolumen genutzt. Es wurde entsprechend mit 20 (Wachstumsmedium) bzw. 200 µL (optimiertes Minimalmedium) Inokulum aus einem Kryovial angeimpft. Die Kultivierung fand bei 37 oder 30°C und 250 rpm (Schütteldurchmesser: 50 mm) statt. Die Kultivierung wurde nach 7.5-8 h (Wachstumsmedium) oder Eintritt der Histidinlimitierung (optimiertes Minimalmedium) abgebrochen. Die Vorkultur wurde zu Ende der Kultivierungszeit beprobt.

Im Gegensatz zum Ames-Fluktuationstest wird nach der 100-minütigen Expositionsphase keine Verdünnung mit Reversions-Indikatormedium durchgeführt, sondern im ursprünglichen Medium ohne weitere Verdünnung der Probe weiterkultiviert. Hierzu wurde zunächst das auch im Fluktuationstest verwendete Expositionsmedium genutzt. Im weiteren Verlauf wurde dann auf ein Medium gewechselt, welches in seiner Zusammensetzung und den Mediumskonzentrationen an das Reversions-Indikatormedium angelehnt ist. Die Abweichung liegt in einem Verzicht des pH-Indikators Bromkresolpurpur. Zusätzlich wurde jedoch 0,001 g/L Histidin hinzugefügt, sodass dessen Konzentration der im Expositionsmedium entspricht. Dieses Medium wird im folgenden Minimalmedium genannt. Dieses Minimalmedium wurde im weiteren Projektverlauf optimiert. So wurde eine zusätzliche Spurenelementlösung hinzugegeben sowie die MgSO<sub>4</sub>-Konzentration erhöht. Für die Hauptkultur beinhaltete dieses Medium zusätzlich 5 mg/L Histidin.

Nach Abbruch der Vorkultur wurden die Zellen entsprechend der ISO 11350 Norm mit Minimalmedium verdünnt (Stamm TA 98: 180 ± 10 FAU, Stamm TA 100: 45 ± 5 FAU) und zusammen mit den Proben (in DMSO gelöst) in die RAMOS-Kolben (10 oder 20 mL) oder 48-Well Mikrotiterplatten (800-2400 µL) gegeben. Bei Mehrfachansätzen wurde immer ein Mastermix angesetzt, der auf die verschiedenen Kolben oder Wells aufgeteilt wurde. Es wurde bei 37 oder 30°C und 250 rpm (Schütteldurchmesser: 50 mm, RAMOS-Anlage) oder 700 rpm (Schütteldurchmesser: 3 mm, µRAMOS-Anlage) kultiviert. Die Kulturen wurden für etwa 48 h kultiviert. Es wurden Proben zu Beginn als auch zu Ende der Exposition (0 h und 48 h) gezogen.

Abweichungen vom hier beschriebenen Vorgehen werden in den einzelnen Ergebniskapiteln beschrieben.

### **2.3 Durchführung des Umu-Chromotests**

Der Umu-Chromotest wurde nach DIN EN ISO 38415-T3 in der GOBIO GmbH durchgeführt und bestimmt das erbgutverändernde Potential von wässrigen Lösungen.

### 2.3.1 Übernachtkultur

Zur der in einer Ampulle befindlichen aufgetauten Stammkultur wurden 1 ml Nährmedium unter sterilen Bedingungen hinzugegeben, bevor 0,5 ml dieser Suspension in einen bereits mit 20 ml Nährmedium befüllten sterilen Erlenmeyerkolben überführt wurden. Die Kultur wurde über maximal 12 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

### 2.3.2 Testvorbereitung

Proben, sofern sie eingefroren waren, wurden aufgetaut und auf eine Temperatur von  $20 \pm 2$  °C gebracht bevor der pH-Wert und die Leitfähigkeit gemessen und der pH-Wert auf  $7,0 \pm 0,2$  eingestellt wurde. Der umuC-Test erfolgt in einer 96-Well Platte. Dafür werden die Proben in unterschiedlichen Verdünnungen als Triplikate gemäß dem Pipettierschema in Abbildung 2-2 pipettiert. Bei Testung höherer Verdünnungen einer Probe kann auf andere Proben verzichtet werden, wodurch die Probe über mehrere Reihen verdünnt werden kann. In Analogie zum Ames Test wurde das Verfahren in zwei Varianten mit und ohne metabolischer Aktivierung durchgeführt. Zusätzlich wurden für jeden Ansatz Triplikate der Lösemittelkontrolle (DMSO) und der Positivkontrolle (4-NQO ohne S9 & 2-AA mit S9) angesetzt, sowie eine Reihe mit Negativkontrollen und sechs Wells ohne Testorganismen als Leerwert (vgl.

Abbildung 2-2).

Die Übernachtkultur wurde nach maximal 12 Stunden 1:10 mit Nährmedium unter sterilen Bedingungen verdünnt und für maximal 1,5 Stunden weiter bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Trübung der Bakteriensuspension wurde nach dieser Inkubationsphase bei 600 nm photometrisch bestimmt und auf 340-350 FAU eingestellt bevor sie in den Test eingesetzt wurde.

|          | 1     | 2     | 3     | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10   | 11   | 12   |
|----------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| <b>A</b> | P1    | P1    | P1    | P1  | P1  | P1  | P1  | P1  | P1  | P1   | P1   | P1   |
|          | 1:1,5 | 1:1,5 | 1:1,5 | 1:3 | 1:3 | 1:3 | 1:6 | 1:6 | 1:6 | 1:12 | 1:12 | 1:12 |
| <b>B</b> | P2    | P2    | P2    | P2  | P2  | P2  | P2  | P2  | P2  | P2   | P2   | P2   |
|          | 1:1,5 | 1:1,5 | 1:1,5 | 1:3 | 1:3 | 1:3 | 1:6 | 1:6 | 1:6 | 1:12 | 1:12 | 1:12 |
| <b>C</b> | P3    | P3    | P3    | P3  | P3  | P3  | P3  | P3  | P3  | P3   | P3   | P3   |
|          | 1:1,5 | 1:1,5 | 1:1,5 | 1:3 | 1:3 | 1:3 | 1:6 | 1:6 | 1:6 | 1:12 | 1:12 | 1:12 |
| <b>D</b> | P4    | P4    | P4    | P4  | P4  | P4  | P4  | P4  | P4  | P4   | P4   | P4   |
|          | 1:1,5 | 1:1,5 | 1:1,5 | 1:3 | 1:3 | 1:3 | 1:6 | 1:6 | 1:6 | 1:12 | 1:12 | 1:12 |
| <b>E</b> | P5    | P5    | P5    | P5  | P5  | P5  | P5  | P5  | P5  | P5   | P5   | P5   |
|          | 1:1,5 | 1:1,5 | 1:1,5 | 1:3 | 1:3 | 1:3 | 1:6 | 1:6 | 1:6 | 1:12 | 1:12 | 1:12 |
| <b>F</b> | P6    | P6    | P6    | P6  | P6  | P6  | P6  | P6  | P6  | P6   | P6   | P6   |
|          | 1:1,5 | 1:1,5 | 1:1,5 | 1:3 | 1:3 | 1:3 | 1:6 | 1:6 | 1:6 | 1:12 | 1:12 | 1:12 |
| <b>G</b> | K     | K     | K     | K   | K   | K   | K   | K   | K   | K    | K    | K    |
| <b>H</b> | +K    | +K    | +K    | -K  | -K  | -K  | L   | L   | L   | L    | L    | L    |

**Abbildung 2-2 Pipettierschema umuC-Test**

P1-6: Probennummer und jeweilige Verdünnung (1:x), K: Negativkontrollansatz für Wasserproben, +K: Positivkontrollansätze (2-AA oder 4-NQO in DMSO), -K: Negativkontrollansatz für die Positivkontrollansätze (Lösemittel-Kontrollansatz), L: Leerwert

### 2.3.3 Messung

Nach Ablauf dieser Inkubationsphase wurde die Trübung bzw. das Bakterienwachstum photometrisch bei 600 nm gemessen. Eine weitere 96-Well Platte wurde mit 2-Mercaptoethanol versetztem Puffer beschickt bevor erneut 30 µL jeder Vertiefung der zweiten Platte übergehoben wurden und das Substrat o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid hinzugefügt wurde. Die letzte Inkubationsphase fand bei 28 °C für 30 min statt. Vor der photometrischen Bestimmung der Galactosidase-Aktivität bei 420 nm wurde ein Stopp-Reagenz zum Deaktivieren der Enzymaktivität hinzugegeben. Da das *umuC*-Gen im verwendeten Testorganismus mit dem *lacZ*-Gen für die β-Galaktosidase gekoppelt ist, wird die Messung der Induktionsrate des *umuC*-Gens durch die Bestimmung der Galaktosidase-Aktivität möglich (Abbildung 2-3). Die Induktion des *umuC*-Gens ist ein Maß für das mutagene Potential des untersuchten Testguts.



**Abbildung 2-3 Sichtbare Ergebnisse des umu-Tests.**

Starke Färbung der Positivkontrollen (Lupenvergrößerung) auf Grund von Einzelstrang-DNA

Zur Prüfung, ob es möglich ist im Ames Fluktuationstest den Eintrag von Histidin aus der Vorkultur in die Expositionskultur durch Waschen der Zellen (zentrifugieren und resuspendieren) zu reduzieren, wurden umuC-Test Bakterien, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, vor der Durchführung des Testes zentrifugiert und/oder durch vortexen suspendiert. So sollte geprüft werden, ob die mechanische Belastung der Zellen ein erhöhtes Auftreten von Einzelstrang-DNA und damit eine Erhöhung der Mutationsrate auslöst.

## 2.4 Mikrokerntest

Der Mikrokerntest wurde nach DIN EN ISO 21427-2 und der OECD Richtlinie 487 in der GOBIO GmbH und an der RWTH Aachen durchgeführt und bestimmt das erbgutverändernde Potential von wässrigen Lösungen.

### 2.4.1 Testvorbereitung

Zur Testvorbereitung wurden tiefgefrorene Zellen oder Zellen aus der fortlaufenden Kultur verwendet und nach einem Standardverfahren auf die inneren 60 Wells einer 96-Well Platte übertragen. Die Exposition der Testkultur begann sobald die adherente Zellkultur einen Konfluenzgrad von 40-50 % erreicht hatte. Das Testgut wurde in aufsteigenden Konzentrationen unter Verwendung von Lösungsvermittlern in Standardzellkulturmedien eingebracht (vgl.

Abbildung 2-4). Vorkultur und Expositionskultur erfolgten unter Umgebungstemperaturen und CO<sup>2</sup>-Partialdrücken.

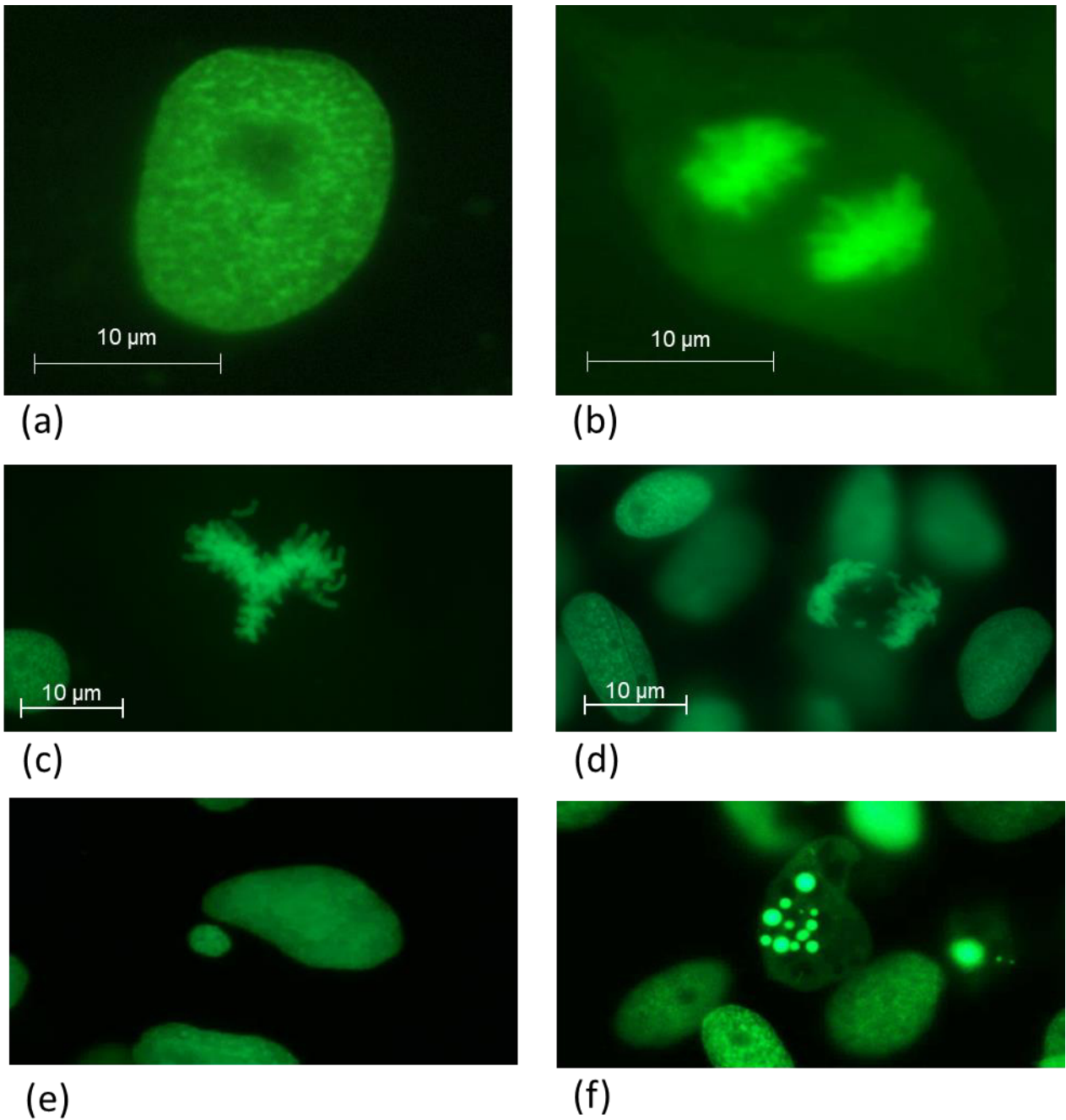
|   | 1 | 2 | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| A |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| B |   | K | LK | P1 | P1 | P2 | P2 | P3 | P3 | P4 | P4 |    |
| C |   | K | LK | P1 | P1 | P2 | P2 | P3 | P3 | P4 | P4 |    |
| D |   | K | LK | P1 | P1 | P2 | P2 | P3 | P3 | P4 | P4 |    |
| E |   | K | LK | P1 | P1 | P2 | P2 | P3 | P3 | P4 | P4 |    |
| F |   | K | LK | P1 | P1 | P2 | P2 | P3 | P3 | P4 | P4 |    |
| G |   | K | LK | P1 | P1 | P2 | P2 | P3 | P3 | P4 | P4 |    |
| H |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

**Abbildung 2-4 Belegscheema einer 96-Well-Mikrotiterplatte im KCB Mikrokerntest**

K: Negativkontrolle, LK: Lösemittelkontrolle, P1-4: Verdünnung der Probe

#### 2.4.2 Messung

Auf Grund der selbstsignalgebenden Eigenschaften der transgenen Variante der Zellen ist der cytogenetische Status der Zellen ohne weitere Vorbehandlung direkt mittels eines Inversmikroskops sichtbar (Abbildung 2-5). Die Auswertung erfolgte mittels eines live-imaging Readers (Cytation 3) und automatisierter Bildauswertung (Gen5 Software). Die Validitätskriterien des Standardverfahrens wie Mindestanzahl der Zellen (mind. 2000 ausgewertete Zellen) und statistisch signifikante Erhöhung mindestens einer Testkonzentration gegenüber der Kontrolle wurden geprüft. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SigmaPlot (Version 13).



**Abbildung 2-5: Visualisierung des cytogenetischen Zustands: (a) Interphasekern, (b) Anaphasekern, (c) Asymmetrische Kernteilung, (d) Entstehung von Aneuploidie, (e) Mikrokern, (f) Karyorrhexis**

## 2.5 RAPD Analyse

### 2.5.1 DNA Extraktion

Die DNA-Extraktion der Bakterienchargen erfolgte mittels DNAzol™ Reagent gemäß des Protokolls des Herstellers.

## 2.5.2 PCR

Die RAPD Analyse wurde gemäß Baratto et al. (19) mit den Primern P1254, 784, 23L, OPA-4 und OPB-15 durchgeführt. Die RAPD Analyse ist eine abgewandelte Form der PCR und gleicht ihr in den grundlegenden Schritten wie Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Die PCR der Bakterienchargen und den fünf Primern erfolgte mit den folgenden Schritten:

- 4 Zyklen für je 4 Min bei 94 °C, 37 °C und 72 °C
- 35 Zyklen mit 30 Sec bei 94 °C, 1 Min bei 37 °C und 2 Min bei 72 °C
- Finaler Elongationsschritt für 10 Min bei 72 °C

Im Anschluss wurde eine Gelelektrophorese mit den Proben durchgeführt und die Bandenmuster auf den Gelen wurden miteinander verglichen, ausgewertet und als Photographien dokumentiert.

## 2.6 Trübungsmessung

Die Trübungsmessung erfolgte gemäß DIN EN ISO 7027 in einer 96-Well Platte.

# 3 Ergebnisse und Diskussion

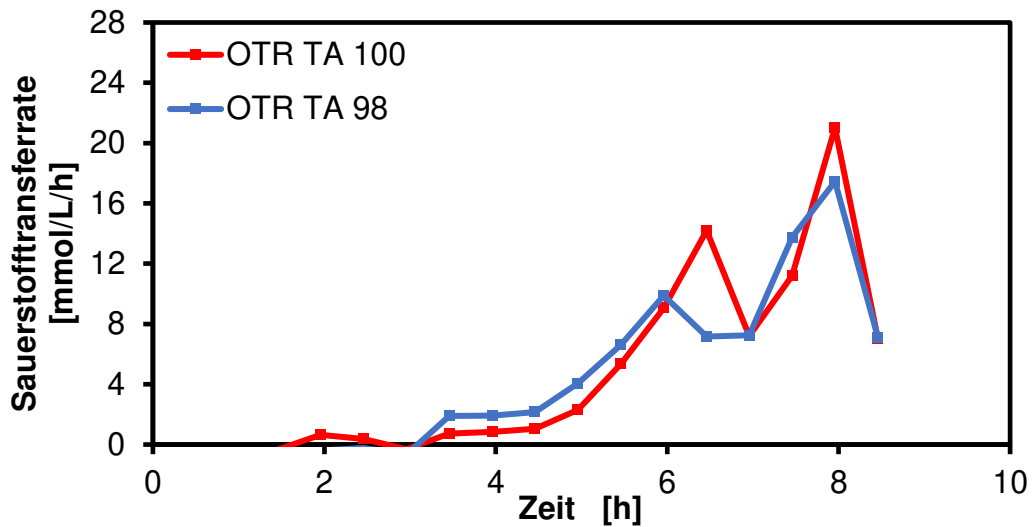
## 3.1 Evaluierung und Adaptation der RAMOS-Technologie zur Durchführung des Ames-Tests

### 3.1.1 Optimierung der Vorkulturführung

Bevor mit der Validierung und Optimierung des eigentlichen Ames-RAMOS-Tests begonnen wurde, wurde die Vorkulturführung untersucht und optimiert. Ziel war eine sauerstoffunlimitierte und somit reproduzierbare Vorkulturführung in der RAMOS-Anlage.

Hierfür wurde zunächst am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik eine Vorkultur mit 10 mL Füllvolumen in einem Standard-RAMOS-Kolben (250 mL Kolbenvolumen) bei 350 rpm (Schütteldurchmesser: 50 mm) und 37 °C durchgeführt. Der OTR-Verlauf über die Zeit einer solchen Vorkultur ist für beide Stämme in Abbildung 3-1 dargestellt. Nach etwa 4 h fängt die OTR an zu steigen (indiziert Wachstum) und erreicht nach etwa 6 Stunden ein erstes Maximum. Anschließend fällt sie wieder um dann erneut auf ein zweites Maximum zu steigen.

Die Existenz zweier OTR-Peaks lässt auf eine Diauxie schließen. Dies bedeutet, dass vermutlich zwei Kohlenstoffquellen in dem komplexen Wachstumsmedium vorhanden sind, welche nacheinander von den Bakterien verstoffwechselt werden. An den OTR-Kurven lässt sich außerdem erkennen, dass keine Sauerstofflimitierung vorliegt. Diese würde sich in einer konstanten OTR über einen längeren Zeitraum ausdrücken, wenn die maximale Sauerstoffaufnahme-Kapazität des Systems erreicht ist.



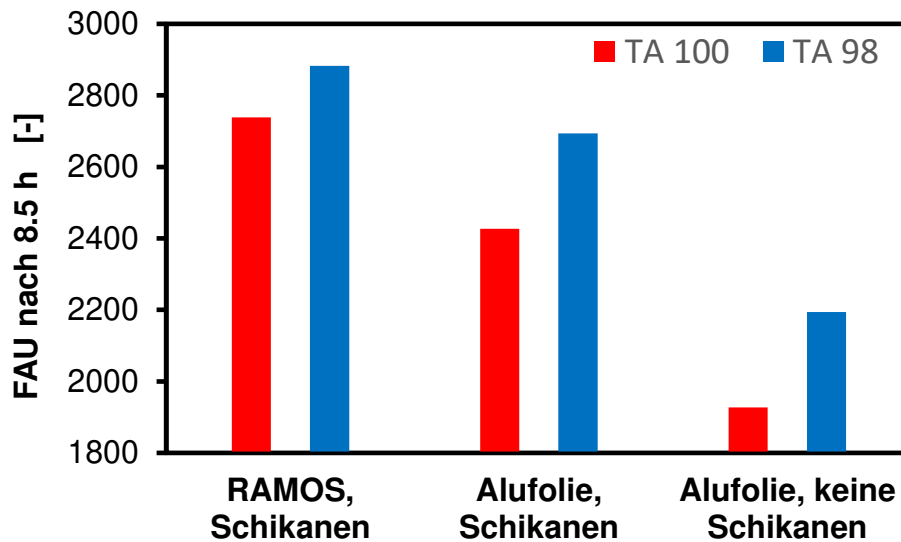
**Abbildung 3-1: OTR-Verlauf der Vorkultur des Ames-Tests.**

*Salmonella typhimurium* TA 98/TA 100, T = 37 °C, n = 350 rpm, d<sub>0</sub> = 50 mm, Wachstumsmedium, V<sub>K</sub> = 250 mL, V<sub>L</sub> = 10 mL, 10 µL Inokulum aus Kryo

Im weiteren Verlauf des Projektes wurde die Drehzahl auf 250 rpm reduziert und das Füllvolumen auf 20 mL erhöht, da hier ebenso sauerstoffunlimitierte Bedingungen herrschten.

Es wurde die sauerstoffunlimitierte Vorkulturführung mit der Vorkulturführung am Institut für Umweltforschung verglichen, welche nach den Vorgaben der ISO 11350 durchgeführt wurde. Hierfür wurden jeweils 20 mL Kulturbrühe in 100 mL Kolben mit oder ohne Schikanen bei 150 rpm (Schütteldurchmesser 25 mm) für etwa 8,5 h bei 37 °C kultiviert. Es wurde Alufolie als Sterilbarriere genutzt. Zur Aufnahme der OTR unter diesen Vorkulturbedingungen wurde in einer speziellen RAMOS-Anlage kultiviert, in der die genannten Parameter nachgestellt werden konnten (Variation der Kultivierungsgefäße). Der einzige Unterschied bestand in der Sterilbarriere, welche durch die Begasung der RAMOS-Anlage, der eines Wattestopfens entsprach. Bei Aufnahme der OTR unter diesen Bedingungen konnte keine Sauerstofflimitierung festgestellt werden, sodass die OTR-Kurve vergleichbar mit der der vorherigen Kultivierung war. Diese Kultivierung wurde in Bezug auf die erreichte End-OD nach 8,5 h mit der Kultivierung am Institut für Umweltforschung für Kolben mit und ohne Schikanen verglichen. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 3-2 dargestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass die ODs nach 8,5 h für beide Stämme bei den Kultivierungen mit Schikanekolben geringer ausfallen als bei den RAMOS-Kultivierungen. Für die Kultivierungen mit Kolben ohne Schikanen sinkt dieser Wert erneut.





**Abbildung 3-2: Vergleich der erreichten optischen Dichten (in FAU) für verschiedene Vorkulturbedingungen.**

*Salmonella typhimurium* TA 98/TA 100, T = 37 °C, n = 150 rpm, d<sub>0</sub> = 25 mm, Wachstumsmedium, V<sub>K</sub> = 100 mL, V<sub>L</sub> = 20 mL, 20 µL Inokulum aus Kryo

Aufgrund der geringeren End-ODs nach gleicher Kultivierungszeit kann auf eine Sauerstofflimitierung in den Kolben mit Alufolie als Sterilbarriere geschlossen werden. Deshalb wurden im Folgenden auch am Institut für Umweltforschung Wattestopfen als Sterilbarriere genutzt. Zudem wurden einheitlich Kolben mit Schikanen verwendet. Mit diesen Änderungen werden vergleichbare ODs zu den Ergebnissen in der RAMOS-Anlage erreicht, sodass nun von einer sauerstoffunlimitierten und somit gut reproduzierbaren Vorkulturführung ausgegangen werden kann.

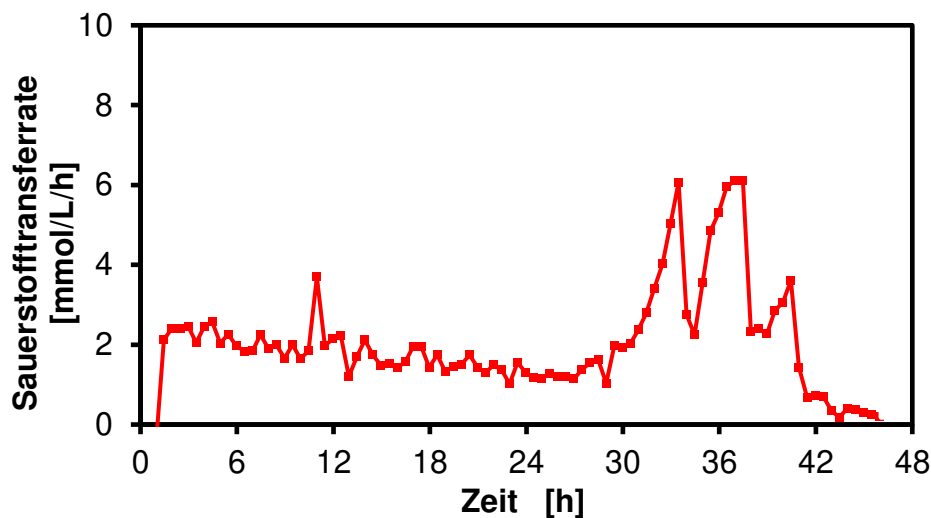
**Schlussfolgerung:** Die hier gewonnenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Vorkulturführung für den Ames-Test in der ISO 11350 nicht ausreichend definiert ist, um eine reproduzierbare Vorkulturführung zu erreichen.

### 3.1.2 Validierung der initialen Versuchsbedingungen

Nachdem die Vorkulturführung optimiert und vereinheitlicht wurde, wurde in einem nächsten Schritt der Zeitraum für bakterielles Wachstum im Expositionsmedium untersucht.

Es galt herauszufinden wie lange ein Anwachsen der spontan rückmutierten Bakterien ohne Zugabe von mutagenen Substanzen dauert und ob die Nährstoffkonzentrationen im genutzten Expositionsmedium für diesen Inkubationszeitraum ausreichen. Das Wachstum nach Verbrauch des Histidins im Medium ist auf durch Spontanmutationen rückmutierte Bakterien zurückzuführen. Durch zusätzliche induzierte rückmutierte Bakterien sollten geringere Anwachs-Zeiten nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Kultivierung des Bakteriums *Salmonella typhimurium* TA 98 sind in Abbildung 3-3 dargestellt.



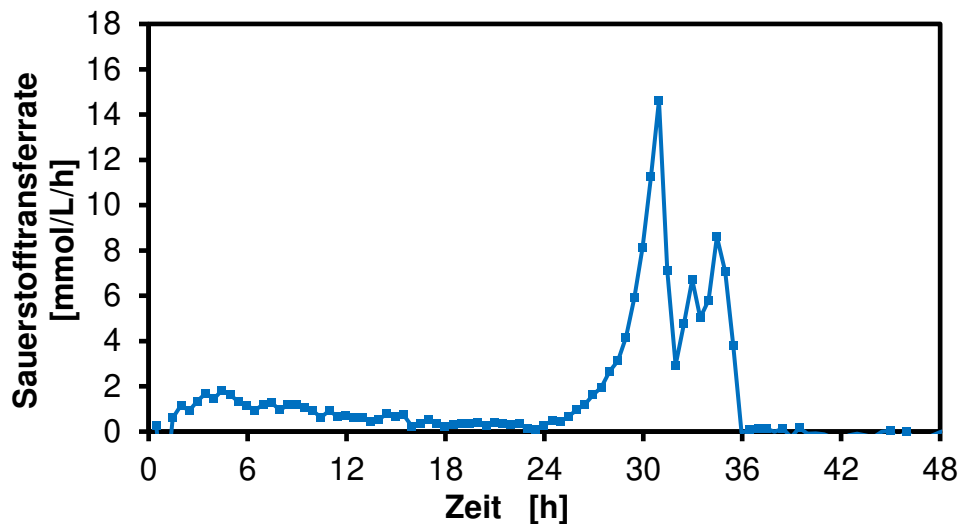
**Abbildung 3-3: OTR-Verlauf einer Negativkontrolle des Stammes TA 98 in der Expositionsphase.**

*Salmonella typhimurium* TA 98, T = 37 °C, n = 250 rpm, d<sub>0</sub> = 50 mm, Vorkultur: Wachstumsmedium V<sub>K</sub> = 250 mL, V<sub>L</sub> = 10 mL, 10 µL Inokulum aus Kryo, Exposition: Expositionsmedium, V<sub>K</sub> = 250 mL, V<sub>L</sub> = 10 mL, OD<sub>0</sub> = 173 FAU

Es ist ein initialer Anstieg der OTR auf etwa 3 mmol/L/h zu erkennen bevor die OTR bis etwa 30 h eine stetige Abnahme zeigt. Dies ist auf die Zweitsubstratlimitierung durch Histidin zurückzuführen. Dies bedeutet, dass in den ersten 3 h Wachstum aufgrund des noch vorhandenen Histidins stattfindet, bevor die Zellen zwar noch respiratorisch aktiv sind, aber nicht mehr wachsen. Ab 30 h fängt die OTR wieder an zu steigen und erreicht jeweils ein Maximum nach 33 und 36 h. Dies ist der endgültigen Metabolisierung von Glucose und im weiteren Verlauf von Citrat durch histidinprototrophe Zellen (rückmutiert durch spontane Mutationen → Revertanten) geschuldet.

Es ist zu erkennen, dass mit der typischen Animpfdichte von 180 FAU für den Stamm TA 98 ein Zeitrahmen von 48 h nicht überschritten wird. Es ist außerdem ein klares Wachstum von Revertanten nach 30 h zu erkennen, sodass die Medienkonzentrationen generell für den benötigten Inkubationszeitraum ausreichen.

Die Ergebnisse der Kultivierung des Bakteriums *Salmonella typhimurium* TA 100 sind in Abbildung 3-4 dargestellt.



**Abbildung 3-4: OTR-Verlauf einer Negativkontrolle des Stammes TA 100 in der Expositionsphase.**

*Salmonella typhimurium* TA 100, T = 37 °C, n = 250 rpm, d<sub>0</sub> = 50 mm, Vorkultur: Wachstumsmedium V<sub>K</sub> = 250 mL, V<sub>L</sub> = 10 mL, 10 µL Inokulum aus Kryo, Exposition: Expositionsmedium, V<sub>K</sub> = 250 mL, V<sub>L</sub> = 10 mL, OD<sub>0</sub> = 40 FAU

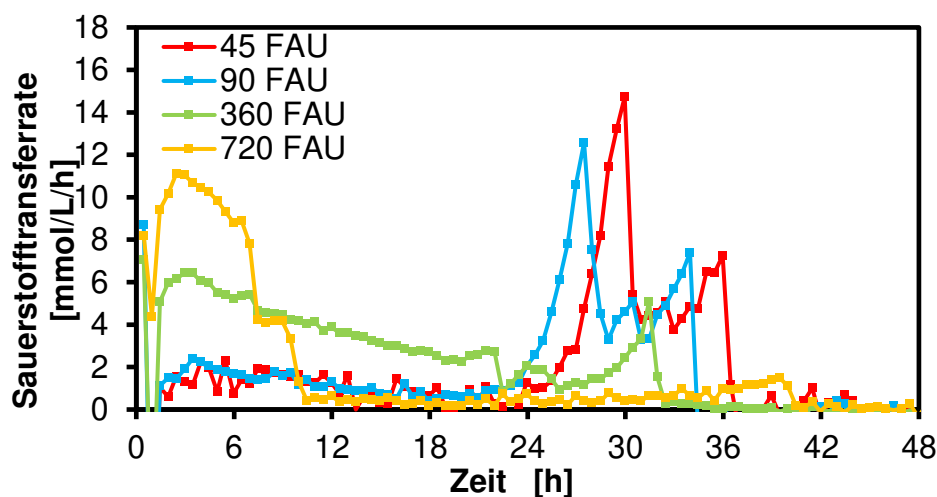
Es ist ein ähnlicher OTR-Verlauf wie für den Stamm TA 98 zu erkennen. Auch hier ist ein initiales Wachstum auf Histidin festzustellen. Dies fällt jedoch deutlich geringer als beim Stamm TA 98 aus. Hierbei ist zu beachten, dass der Stamm aufgrund seiner höheren Mutationsrate deutlich geringer angeimpft wurde. Durch das verringerte initiale Wachstum ist der OTR-Peak nach etwa 30 h mit etwa 15 mmol/L/h deutlich ausgeprägter, da zu diesem Zeitpunkt noch mehr Glucose vorliegt. Auch hier kann im Folgenden ein zweiter kleinerer OTR-Peak beobachtet werden, der auf die Metabolisierung von Citrat zurückzuführen ist.

Es ist zu erkennen, dass mit der typischen Animpfdichte von 45 FAU für den Stamm TA 100 ein Zeitrahmen von 48 h für das Wachstum der Negativkontrolle nicht überschritten wird. Es ist außerdem ein unlimitiertes Wachstum nach 24 h zu erkennen, sodass die Medienkonzentrationen generell für den benötigten Inkubationszeitraum ausreichen.

Im Folgenden wurde trotz des unlimitierten Wachstums in Expositionsmedium, ein weiterer Negativkontrollansatz in Minimalmedium mit Histidin durchgeführt (Konzentrationen wie in Reversions-Indikator-Medium, siehe Kapitel 2.2). Durch diesen Vergleich sollte sichergestellt werden, dass die Nährstoffkonzentrationen im Expositionsmedium tatsächlich ein optimales Wachstum unterstützen, insbesondere in Bezug auf die reduzierte Biotinkonzentration im Expositionsmedium. Es wurde, wie im Expositionsmedium, 0,001 g/L Histidin hinzugefügt, jedoch der pH-Indikator weggelassen. Die Ergebnisse hierzu zeigten, dass vor allem für den Stamm TA 100 eine verlängerte Wachstumsphase auf Citrat vorlag. Somit war Biotin zuvor vermutlich in einer zu geringen Konzentration vorhanden. Um den Zellen alle notwendigen Nährstoffe zu geben, wurde deshalb für alle weiteren Kultivierungen das Minimalmedium mit Histidin genutzt.

Bei allen hier gezeigten Kultivierungen lag der pH-Wert am Ende der 48 h dauernden Expositionsphase bei über 7, sodass hier nicht der im Fluktuationstest übliche pH-Abfall vorliegt. Dies liegt vermutlich an den sauerstoffunlimitierten Bedingungen.

In einem weiteren Arbeitspaket wurden die initialen Bakteriendichten in der Expositionsphase variiert, um die optimale Bakteriendichte für eine sinnvolle Durchführung des Ames-Tests zu ermitteln. In Abbildung 3-5 sind die OTR-Kurven der Negativkontrollen des Stammes TA 100 für vier verschiedene Animpfdichten dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit zunehmender Start-OD auch das initiale Wachstum zunimmt. Es ist eine deutliche Zweitsubstratlimitierung aufgrund des Histidinmangels nach etwa 3 h zu erkennen. Je mehr initiales Wachstum auftritt, desto eher bricht die OTR-Kurve ein. Lediglich bei 45 und 90 FAU sind zwei OTR-Peaks aufgrund von Revertantenwachstum zu erkennen (Glucose- und Citratpeak). Hier ist bei einer Start-OD von 90 FAU ein früheres Revertantenwachstum zu beobachten. Bei dem Ansatz mit 360 FAU ist lediglich ein weiterer OTR-Peak und bei 720 FAU kein weiterer OTR-Peak zu erkennen.



**Abbildung 3-5: OTR-Verlauf von Negativkontrollen des Stammes TA 100 in der Expositionsphase mit verschiedenen Animpfdichten.**

*Salmonella typhimurium* TA 100, T = 37 °C, n = 250 rpm, d<sub>0</sub> = 50 mm, Vorkultur: Wachstumsmedium V<sub>K</sub> = 250 mL, V<sub>L</sub> = 10 mL, 10 µL Inokulum aus Kryo, Exposition: Minimalmedium + Histidin, V<sub>K</sub> = 250 mL, V<sub>L</sub> = 10 mL.

**Schlussfolgerung:** Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die höheren Inokula jeweils auch mehr Medium aus der Vorkultur hinübergetragen wird, welches als Komplexmedium auch Histidin enthält. Durch die höhere Histidinkonzentration kann ein verstärktes initiales Wachstum stattfinden, bevor eine Limitierung eintritt. Hierdurch können über einen längeren Zeitraum Spontanmutationen entstehen, sodass bei einer höheren Start-OD auch eine verkürzte Anwachs-Zeit für rückmutierte Zellen vorzufinden ist. Bei den Ansätzen mit 360 und 720 FAU wird die komplette Glucose schon während des Wachstums auf Histidin verbraucht, sodass die rückmutierten Zellen diese nicht mehr metabolisieren

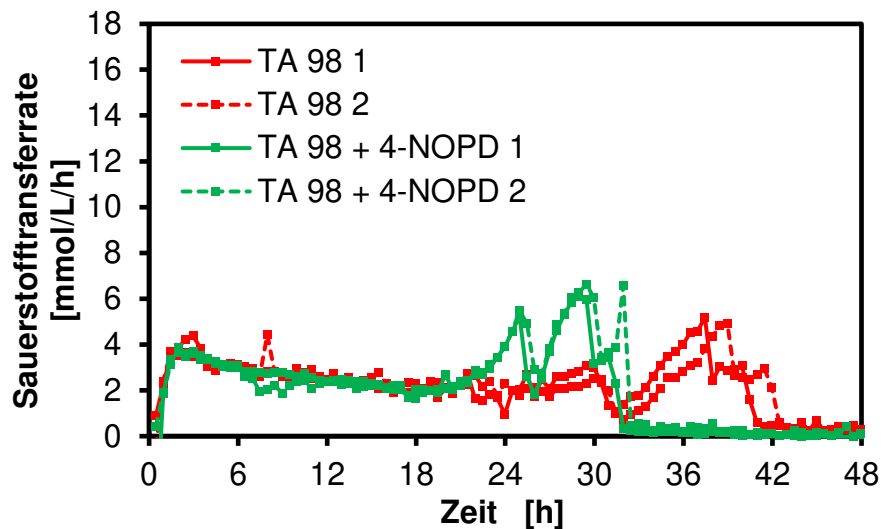
können. Beim Ansatz mit 720 FAU wird außerdem zusätzlich das Citrat durch das initiale Wachstum metabolisiert (kein weiterer Peak nach initialem Wachstum). Da diese Effekte beim Stamm TA 98 durch die von vornherein höhere Animpfdichte größer sind, würde hier eine weitere Erhöhung der Animpfdichte zunächst keinen Erfolg bringen.

Grundsätzlich zeigen die ursprünglichen Animpfdichten laut ISO 11350 gute Ergebnisse, sodass mit diesen weitergearbeitet wurde. Eine weitere Reduzierung der Animpfdichten würde eine längere Lag-Zeit der Negativkontrollen hervorrufen, sodass der Test verlängert würde, während eine Erhöhung der Animpfdichte einen stärkeren Histidinübertrag aus der Vorkultur zur Folge hätte. Dieses Problem wird in Kapitel 3.2 weiter erörtert.

### 3.1.3 **Testung von Positivkontrollen**

Im weiteren Verlauf des Projektes wurden nun erstmals Negativ- und Positivkontrollen (siehe Kapitel 2) des Ames-Tests in der RAMOS-Anlage untersucht. Hierfür wurde mit der optimierten Vorkulturführung und dem Minimalmedium mit Histidin in der Expositionsphase gearbeitet. Es werden im Folgenden Doppelansätze gezeigt, um die Varianz der Ansätze einordnen zu können.

In Abbildung 3-6 ist der OTR-Verlauf von Negativ- und Positivkontrolle des Stammes TA 98 in der Expositionsphase dargestellt. Es ist bei beiden Ansätzen ein initiales Wachstum auf dem noch vorhandenen Histidin zu erkennen. Für die Negativkontrolle ähnelt der Verlauf dem der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Kultivierung einer Negativkontrolle. Es ist lediglich ein leicht verstärktes initiales Wachstum sowie ein demzufolge verringerter OTR-Peak aufgrund des Glucoseverbrauchs der aufkommenden revertierten Zellen zu erkennen. Die OTR-Kurven der Positivkontrolle laufen zu Beginn parallel zu denen der Negativkontrolle. Nach 18 h fängt die OTR-Kurve jedoch wieder zu steigen an und erreicht nach 25 h etwa 5 h vor der Negativkontrolle ihre maximale OTR aufgrund des Glucosekonsums. Die Kurven des Doppelansatzes zeigen untereinander nur minimale Abweichungen, sodass von einer guten Reproduzierbarkeit gesprochen werden kann. Die Anwachs-Zeit der Negativkontrolle ist hier geringer als zuvor. Die Gründe hierfür sind in Kapitel 3.2 dargestellt.

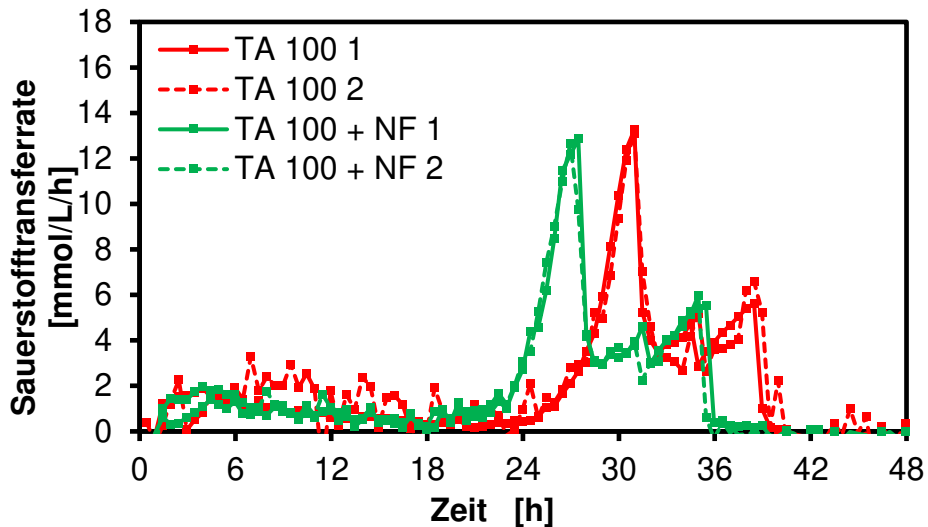


**Abbildung 3-6: OTR-Verlauf von Negativ- und Positivkontrolle des Stammes TA 98 in der Expositionsphase.** *Salmonella typhimurium* TA 100, T = 37 °C, n = 250 rpm, d<sub>0</sub> = 50 mm, Vorkultur: Wachstumsmedium V<sub>K</sub> = 250 mL, V<sub>L</sub> = 20 mL, 20 µL Inokulum aus Kryo, Exposition: Minimalmedium + Histidin, V<sub>K</sub> = 250 mL, V<sub>L</sub> = 20 mL, OD<sub>0</sub> = 168 FAU

Die Kurven von Positiv- und Negativkontrolle unterscheiden sich demnach signifikant voneinander. Durch Zugabe einer mutagenen Substanz entstehen während des initialen Wachstums auf Histidin mehr rückmutierte Bakterien, sodass die folgende Zeit bis zum exponentiellen Anstieg der OTR deutlich verkürzt ist. Über diesen Unterschied in den Anwachs-Zeiten kann nun in Zukunft auf die Mutagenität einer Probe geschlossen werden.

In Abbildung 3-7 ist der OTR-Verlauf von Negativ- und Positivkontrolle des Stammes TA 100 in der Expositionsphase dargestellt.

Es ist auch hier bei beiden Ansätzen ein initiales Wachstum auf dem noch vorhandenen Histidin zu erkennen. Dieses fällt aufgrund der oben beschriebenen Gründe jedoch geringer als für den Stamm TA 98 aus. Die OTR-Kurven der Positivkontrolle laufen auch hier bis zu 18 h parallel zu denen der Negativkontrolle. Nach 18 h steigt die OTR-Kurve wieder und erreicht nach 27 h etwa 4 h vor der Negativkontrolle ihren maximalen OTR aufgrund des Glucosekonsums. Auch hier liegen die Kurven des Doppelansatzes sehr gut übereinander.



**Abbildung 3-7: OTR-Verlauf von Negativ- und Positivkontrolle des Stammes TA 100 in der Expositionsphase.**

*Salmonella typhimurium* TA 100, T = 37 °C, n = 250 rpm, d<sub>0</sub> = 50 mm, Vorkultur: Wachstumsmedium V<sub>K</sub> = 250 mL, V<sub>L</sub> = 10 mL, 10 µL Inokulum aus Kryo, Exposition: Minimalmedium + Histidin, V<sub>K</sub> = 250 mL, V<sub>L</sub> = 10 mL, OD<sub>0</sub> = 42 FAU

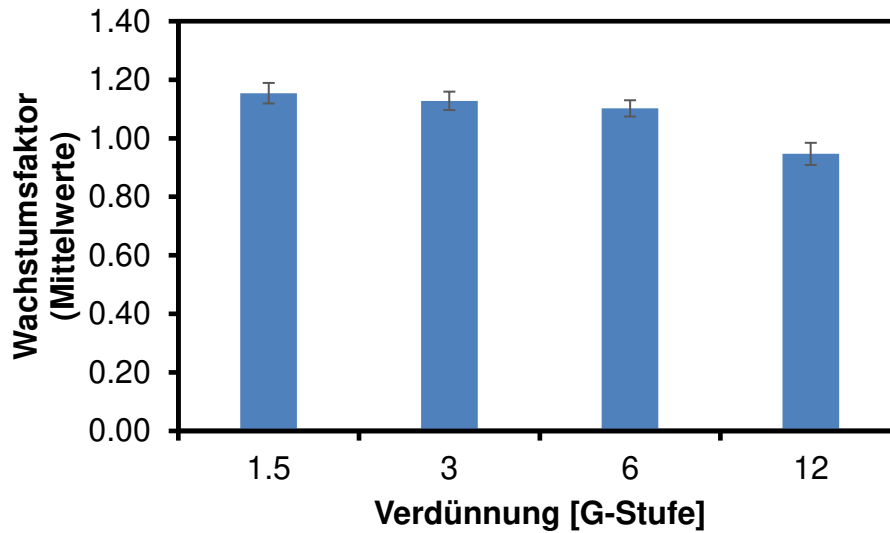
Die Kurven von Positiv- und Negativkontrolle unterscheiden sich demnach auch hier signifikant voneinander. Durch Zugabe einer mutagenen Substanz entstehen während des initialen Wachstums auf Histidin mehr rückmutierte Bakterien, sodass die Zeit bis zum exponentiellen Anstieg der OTR deutlich verkürzt ist. Über diesen Zeitunterschied kann auch für diesen Stamm in Zukunft auf die Mutagenität einer Probe geschlossen werden.

**Schlussfolgerung:** Die Mutagenitätsbestimmung im Ames-RAMOS-Test kann über den Zeitversatz des OTR-Anstieges, ausgelöst durch Revertantenwachstum, vorgenommen werden. Je mutagener eine Substanz ist, desto mehr Revertanten entstehen während des initialen Wachstums auf Histidin. Je mehr Revertanten vorhanden sind, desto eher ist ihr exponentielles Wachstum in einem OTR-Anstieg sichtbar.

### 3.1.4 Überprüfung von Einflüssen auf das Bakterienwachstum

Es wurde der Einfluss einer Ampicillinzugabe während der Hauptkultur und von Lichteinfall während der Kultivierung untersucht. Beide Parameter haben keinen Einfluss auf die Kultivierung.

Die Notwendigkeit der Betrachtung des Wachstumsverhaltens der Testorganismen hat sich jedoch bei Gentoxizitätsuntersuchungen von Grundwasserproben mit unbekannter Belastung aus dem Bereich der Altlastenbewertung gezeigt. Hier zeigte sich, dass durch die metabolische Aktivierung der Wasserinhaltsstoffe das Wachstum der Bakterien während des umuC-Tests beeinflusst wurde. Mit zunehmender Verdünnung der Probe nahm der Wachstumsfaktor der Testorganismen ab (Abbildung 3-8).



**Abbildung 3-8: Vergleich der Mittelwerte der Wachstumsfaktoren in den unterschiedlichen Verdünnungen (G-Stufen) der 5 Grundwasserproben**

Gleichzeitig zeigte sich ein Anstieg der Induktionsrate als Maß für das Auftreten von Einzelstrang DNA in der Zelle.

**Tabelle 2: Ergebnisse der 5 Grundwasserproben nach metabolischer Aktivierung im umuC-Test**

| Probe   | Verdünnung | Induktionsrate | Wachstumsrate |
|---------|------------|----------------|---------------|
| Probe 1 | 1:1,5      | 0,81           | 1,20          |
|         | 1:3        | 0,88           | 1,15          |
|         | 1:6        | 0,98           | 1,11          |
|         | 1:12       | 1,29           | 0,97          |
| Probe 2 | 1:1,5      | 0,84           | 1,16          |
|         | 1:3        | 0,98           | 1,14          |
|         | 1:6        | 1,04           | 1,13          |
|         | 1:12       | 1,27           | 1,00          |
| Probe 3 | 1:1,5      | 0,86           | 1,15          |
|         | 1:3        | 0,93           | 1,12          |
|         | 1:6        | 1,12           | 1,10          |
|         | 1:12       | 1,36           | 0,94          |
| Probe 4 | 1:1,5      | 0,84           | 1,16          |
|         | 1:3        | 0,96           | 1,15          |
|         | 1:6        | 1,11           | 1,06          |
|         | 1:12       | 1,30           | 0,92          |
| Probe 5 | 1:1,5      | 0,82           | 1,10          |



|  |      |      |      |
|--|------|------|------|
|  | 1:3  | 0,95 | 1,08 |
|  | 1:6  | 0,97 | 1,11 |
|  | 1:12 | 1,38 | 0,91 |

Dieses Maß für Genotoxizität spiegelt bekanntlich gleichfalls die Mutagenität der Probe wieder. Die Analyse zeigt, dass somit eine Umkehr der Dosis-Wirkungsbeziehung aufgetreten ist, die sich vermutlich nur durch die höhere Zellzahl in den schwächer verdünnten Ansätzen erklären lässt (Abbildung 3-9). Hier zeigt sich erneut die Notwendigkeit das Wachstumsverhalten mit großer Sorgfalt zu charakterisieren, da der Einfluss auf die Erfassung der Genotoxizität erheblich ist.

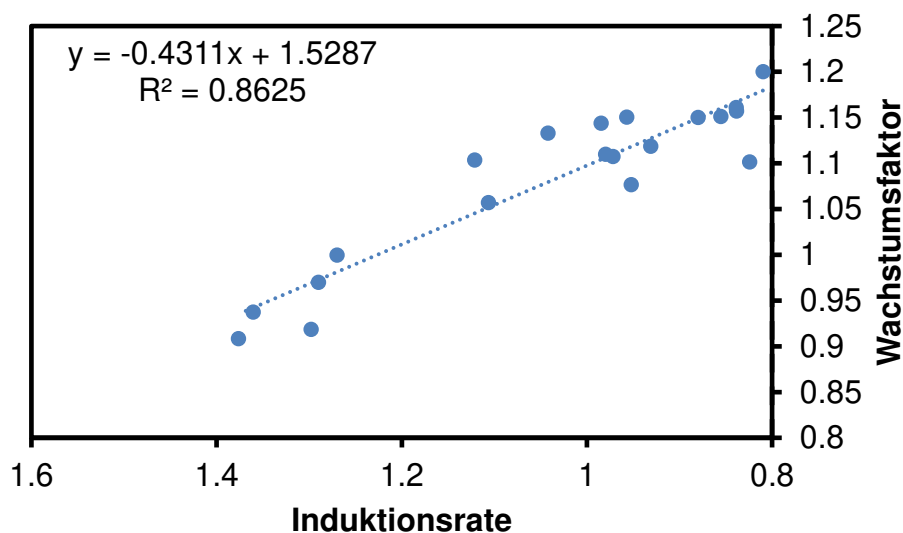
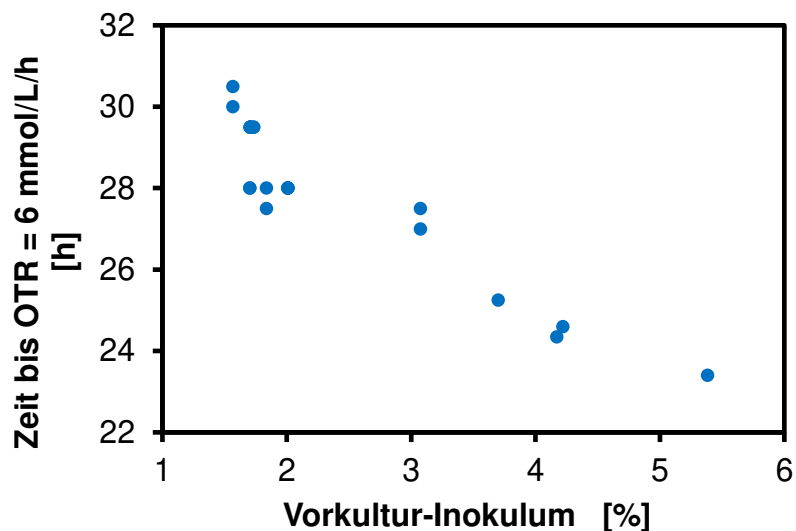


Abbildung 3-9: Korrelation der Induktionsrate und des Wachstumsfaktors der 5 Grundwasserproben

### 3.2 Einfluss des Histidinübertrags aus der Vorkultur

Wie bereits zuvor diskutiert, hat der Übertrag des Histidins aus dem Komplexmedium der Vorkultur Einfluss auf das Ausmaß des initialen Wachstums der noch nicht rückmutierten Zellen. Je mehr Wachstum auf dem initial vorliegenden Histidin stattfinden kann, desto mehr Zellen mutieren zu einer Histidinunabhängigkeit zurück. Dies wiederum hat einen Einfluss auf die Zeit bis zum sichtbaren Wachstum der rückmutierten Zellen. Da mit möglichst reproduzierbaren Bedingungen gearbeitet werden soll, sollte dieser Einflussfaktor in Zukunft minimiert werden. Dies wurde in einem im ursprünglichen Antrag noch nicht vorgesehenen Arbeitspaket durchgeführt, ohne dieses ein erfolgreicher Abschluss des Projektes jedoch nicht möglich war.

Um den Effekt des Histidinübertrags sicher vom Effekt der erhöhten Start-OD abzugrenzen, wurde der im Folgenden dargestellte Versuch mit dem Stamm TA 100 durchgeführt. Es wurden zwei Standard-Vorkulturen auf Wachstumsmedium durchgeführt und in der späten exponentiellen Phase nach etwa 8 h abgebrochen. Der Inhalt eines Schüttelkolbens wurde abzentrifugiert und dessen Überstand zum Verdünnen des Inhalts des anderen Schüttelkolbens genutzt. So entstanden Vorkulturen mit unterschiedlichen End-ODs. Alle Zellen befanden sich hierbei jedoch im gleichen metabolischen Zustand. Je nach End-OD musste unterschiedlich viel Inokulum zum Einstellen der Start-OD genutzt werden. Die Zeiten bis zum OTR-Anstieg aufgrund des Revertantenwachstums für die Negativkontrollen des Stammes TA 100 sind in Abbildung 3-10 dargestellt. Es ist eine deutliche Abnahme der Zeiten mit steigendem Vorkultur-Inokulum zu beobachten.



**Abbildung 3-10: Abhängigkeit der Lag-Zeit vom Animpfverhältnis.**

*Salmonella typhimurium* TA 100; T = 37 °C, n = 250/350 rpm, d<sub>0</sub> = 50 mm Vorkultur: Wachstumsmedium, V<sub>K</sub> = 250 mL, V<sub>L</sub> = 20 mL, 20 µL Inokulum aus Kryo, Exposition: Minimalmedium + Histidin, OD<sub>0</sub> = ca. 45 FAU.

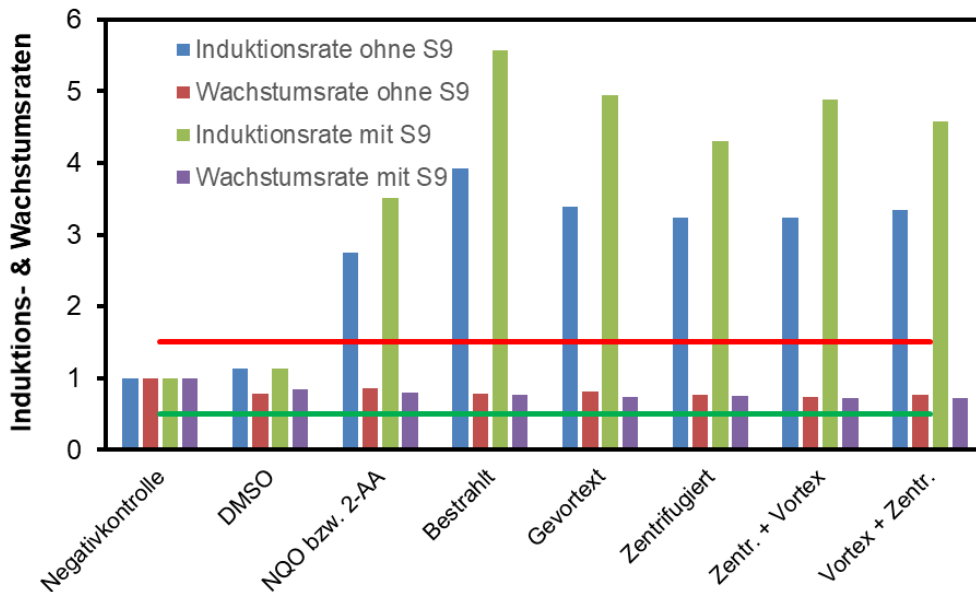
**Schlussfolgerung:** Die Ergebnisse stützten die zuvor aufgestellte These, dass die Menge an Histidinübertrag aus der Vorkultur verantwortlich für unterschiedlich lange Zeiten bis zum OTR-Anstieg, also eine unterschiedliche Anzahl an rückmutierten Bakterien, ist und dies nicht auf die variierten Start-ODs zurückzuführen ist.

Der Ames-RAMOS-Test soll unter möglichst reproduzierbaren Bedingungen ablaufen, um eine Vergleichbarkeit der Testergebnisse gewährleisten zu können.

Um einen Histidinübertrag aus der Vorkultur in die Expositionsphase zu verhindern, wurden zwei Strategien verfolgt. Zunächst wurde die standardisierte Vorkultur vor Verdünnung mit Minimalmedium zentrifugiert und mit PBS-Puffer gewaschen, um Restbestände des Komplexmediums zu entfernen. Es wurden für beide Stämme Negativ- und Positivkontrollen

untersucht. Es konnte eine Verringerung des initialen Wachstums und eine Verlängerung der Zeit bis zum Anwachsen der Revertanten im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt werden, sodass Histidin in der Expositionsphase vermutlich in geringerer Konzentration vorlag. Es lag auch hier, wie schon zuvor beobachtet, ein Unterschied von 4-5 h zwischen den jeweiligen Positiv- und Negativkontrollen (Daten nicht gezeigt). Es konnte jedoch bei dieser Testdurchführung nicht gewährleistet werden, dass tatsächlich alles Histidin aus der Vorkultur entfernt wurde und nur mit den 0,001 g/L Histidin des Minimalmediums gearbeitet wurde. Es war vermutlich immer noch Rest-Histidin in den Zellen vorhanden. Außerdem können, je nach Gründlichkeit des Waschens und Abnehmens des Überstands, Reste vom Medium am Zellpellet „kleben“ bleiben. Versuche bei der GOBIO GmbH zeigten außerdem, dass eine mechanische Belastung den Zellen stark schadet. Die umuC-Testbakterien wurden in der exponentiellen Wachstumsphase kurz vor Start des Tests unterschiedlichen Belastungen ausgesetzt. Ein Teil der Bakterienkultur wurde für 20 s mit UV-Licht bestrahlt (30 cm Entfernung), ein anderer Teil wurde für 30 s gevortext (höchste Stufe) und wiederum ein anderer Teil wurde für 5 min bei ~833 g zentrifugiert. Des Weiteren wurden zwei weitere Teile der Bakterienkultur zuerst zentrifugiert und im Anschluss gevortext bzw. zuerst gevortext und dann zentrifugiert.

Abbildung 3-11 zeigt, dass mechanischer Stress einen erheblichen Einfluss auf das Vorkommen von Einzelstrang DNA hat (Nachweis durch umuC-Test). Mit den Reparaturereignissen in der Zelle steigt auch die Zahl der fehlerhaften Reparaturen und damit einhergehend die Mutationsrate. Daraus ergibt sich, dass eine mechanische Entfernung von Histidin aus dem Nährmedium im Ames-Test keine Option darstellt, da mit einem starken Anstieg von Spontanmutationen zu rechnen ist. Aus den oben genannten Gründen wurde in Zukunft auf ein Abzentrifugieren der Vorkultur verzichtet. Alternativ wurde eine Vorkultur auf Minimalmedium mit einer definierten Menge an Histidin etabliert. So kann eine Histidinlimitierung zu Ende der Vorkultur erreicht werden, sodass kein Histidin in die Expositionsphase übertragen wird. Bei direkter Kultivierung der Bakterien auf Minimalmedium wurde festgestellt, dass dem Minimalmedium wichtige Nährstoffe für ein unlimitiertes Wachstum fehlen. Durch die Zugabe von Spurenelementen konnte ein exponentielles Wachstum erreicht werden und die Zugabe von erhöhten Konzentrationen von Magnesiumsulfat führte zu einer Verringerung der Lag-Phase. Beide Nährstoffzusätze wurden ab hier standardisiert dem Medium hinzugefügt (optimiertes Minimalmedium).



**Abbildung 3-11 Induktions- und Wachstumsraten im *umu*-Test mit und ohne S9 nach mechanischer Belastung.**

Vergleich der Induktions- und Wachstumsraten von Negativkontrollen, DMSO (Lösemittelkontrolle) sowie der Positivkontrollen 4-NQO (ohne S9) und 2-AA (mit S9) mit der mechanischen Belastung der Bakterien in Form von zentrifugieren, vortexen, vortexen und zentrifugieren (in beiden Reihenfolgen) sowie der Bestrahlung mit UV-Licht. Wachstumsraten von < 0,50 (grüne Linie) indizieren eine zytotoxischen Wirkung. Die Toxizitätsschwelle bei der von einem signifikanten genotoxischen - / mutagenen Effekt auszugehen ist liegt beim 1,5 fachen der Kontrollrate (rote Linie)

**Schlussfolgerung:** Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in ISO-Norm zum Fluktuationstest genannten Medium nicht genug Nährstoffe für ein optimales Wachstum von *S. typhimurium* vorhanden sind. Vermutlich werden Nährstoffe aus der auf Komplexmedium stattfindenden Vorkultur in die Expositionsphase übertragen.

Im Anschluss wurde die Histidinmenge in der Vorkultur auf 20 mg/L reduziert um eine deutlich ausgeprägte Zweitsubstratlimitierung zu erreichen, in der die Vorkultur abgebrochen werden kann ohne einen Histidinübertrag in die Expositionsphase zu erzeugen. Das optimierte Minimalmedium wurde auch für die Exposition eingesetzt. Für den Ames-RAMOS-Test wurde eine standardisierte Histidinkonzentration von 0,005 g/L festgelegt, da hiermit eine ausreichend hohe Trenneffizienz erreicht wird.

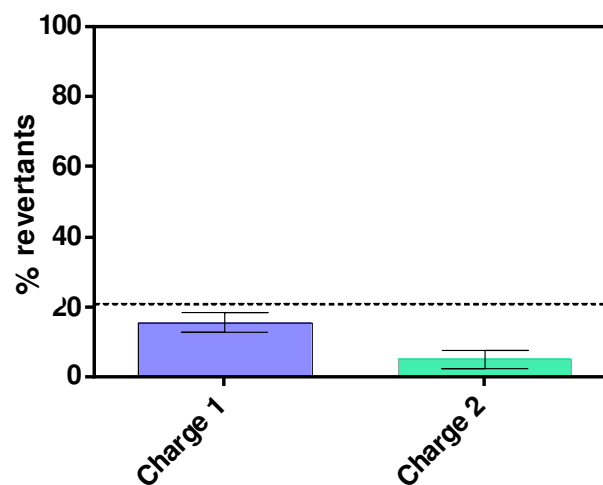
Im Ames-Fluktuationstest wurde die optimierte Medienzusammensetzung übernommen und mit diesem Medium und der histidinfreien Übernachtkultur ein Ames-Fluktuationstest durchgeführt. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C und 150 rpm für 100 min. Durch Zugabe des Reversions-Indikator-Mediums wurde die Inkubation beendet und die Bakteriensuspension anschließend auf die 384-Well-Platten überführt und für 48 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Zählung der Wells mit Revertanten. Für jedes der 3 biologischen Replikate wurden 3

interne Replikate der Positiv- und Negativkontrolle angefertigt. Es zeigte sich, dass im definierten Medium zwar die Validitätskriterien nicht mehr eingehalten werden und diese dann angepasst werden müssen, die Varianz zwischen den verschiedenen Stichproben allerdings sehr gering ist.

Beim Stamm TA 98 konnte durch weitere Experimente gezeigt werden, dass die in der ISO 11350 genannte Positivkontrolle 4-NOPD in den genannten Konzentrationen keine zuverlässigen Ergebnisse liefert. Dies liegt vermutlich an einer durch eine Vorkulturführung auf optimierten Minimalmedium verstärkte Cytotoxizität.

### 3.3 Einfluss verschiedener Bakterienchargen auf die Testergebnisse

Nachdem die Vorkulturführung optimiert und der Einfluss des Histidins eliminiert wurde, wurden in einem nächsten Schritt zwei verschiedene Kryochargen des Stammes TA 100 miteinander verglichen. Beide Chargen stammten vom selben Anbieter (Vertrieb: Trinova GmbH, Deutschland; Hersteller: Moltox, USA) und ihre Ergebnisse im Fluktuationstest lagen innerhalb der Validitätskriterien. Jedoch konnten beim Vergleich der beiden Stämme im Ames-Fluktuationstest deutliche Abweichung festgestellt werden. Dies ist in Abbildung 3-12 dargestellt.



**Abbildung 3-12: Negativkontrollen zwei verschiedener TA 100 Chargen im Fluktuationstest.**

Revertierte Wells in Prozent.

Dies konnte auch in der RAMOS-Anlage nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Durch Aufnahme der OTR ist es, im Gegensatz zum konventionellen Ames-Test, möglich die maximalen Wachstumsraten der Organismen zu bestimmen. Hierbei fiel auf, dass die Charge mit der schnelleren Wachstumsrate (1.02/h) eine kleinere Trennung zwischen Positiv- und Negativkontrolle aufzeigt als die Charge mit einer langsameren Wachstumsrate (0.75/h). Die Wachstumsraten wurden durch Offline-Messungen der GOBIO GmbH bestätigt (Abbildung

3-13). Des Weiteren wurden RAPD-Analysen der drei Chargen durchgeführt, ein Schnellverfahren zum Vergleich von DNA mittels zufällig amplifizierten Sequenzen, die jedoch keine Unterschiede im Bandenmuster erkennen ließen. Einzig unterschiedliche Intensitäten der Banden zwischen den drei Bakterienchargen sind vereinzelt erkennbar (Abbildung 3-14). Eine quantitative Analyse der DNA-Sequenzen sowie auch der Genexpression (cDNA) ist erst nach Ende des Projektes erfolgter Anschaffung einer qPCR möglich.

Nach der Vorkultur konnten durch Ausplattieren auf Minimalagar mehr Spontanmutanten bei der Charge mit der schnelleren Wachstumsrate festgestellt werden. Dies hat vermutlich auch einen Einfluss auf die Ergebnisse der Exposition.

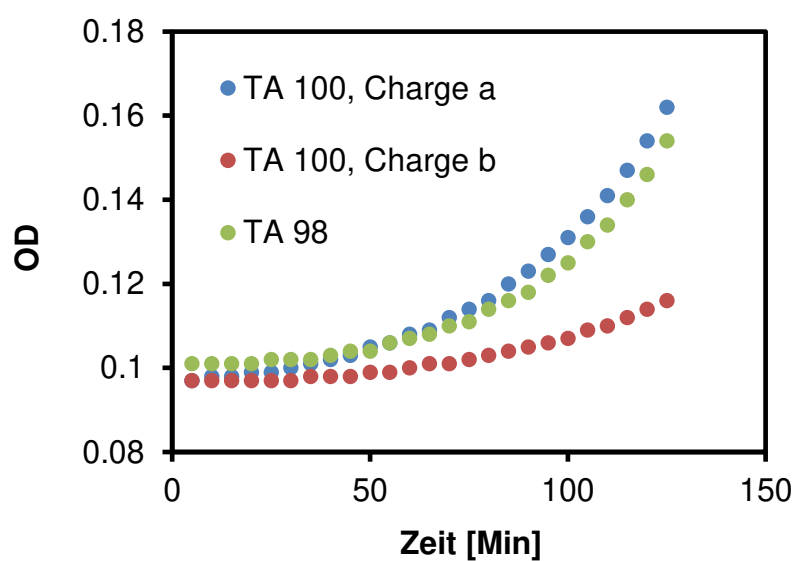


Abbildung 3-13: Trübungsmessungen bzw. Wachstumsraten dreier im Ames-Test verwendeter Bakterienchargen über 135 Minuten.

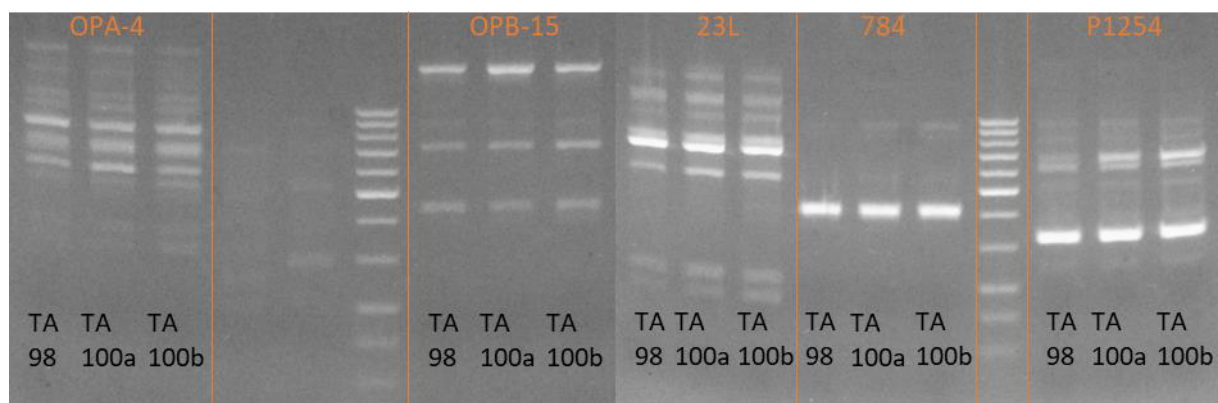


Abbildung 3-14: RAPD Analyse der drei Bakterienchargen mittels Endpunkt-PCR und Gelelektrophorese

Um die Unterschiede in den Kryochargen auf die Wachstumsrate einzugrenzen, wurde im Folgenden die Kultivierungstemperatur auf 30°C herabgesetzt. Durch eine geringere

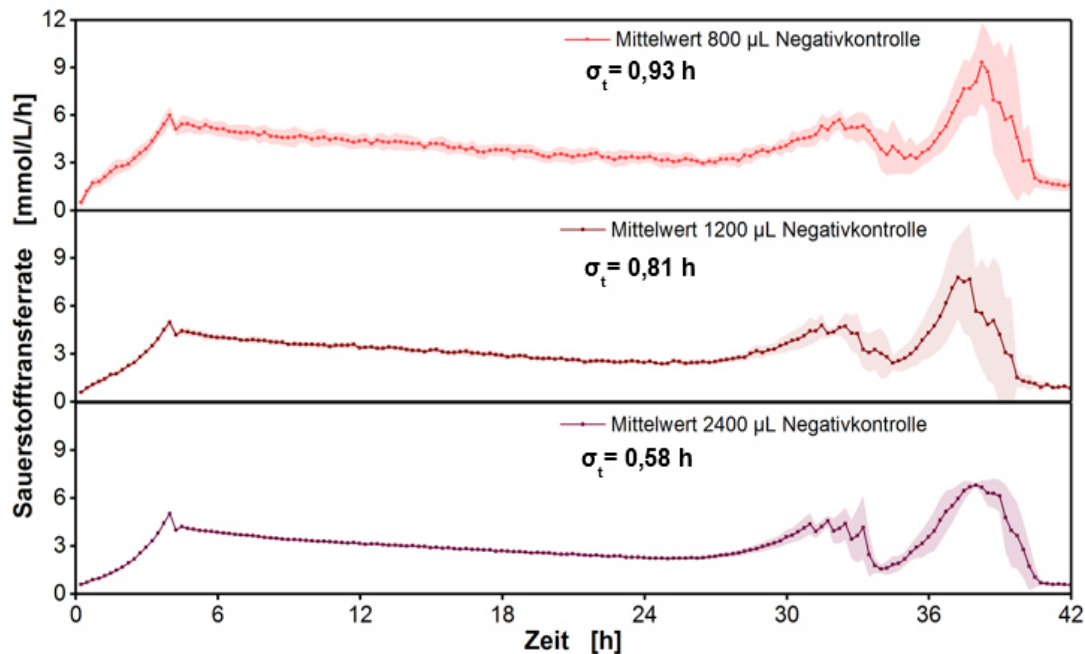
Kultivierungstemperatur nehmen auch die maximale Wachstumsrate und somit auch die Bildung von spontanen Revertanten ab. Es konnte gezeigt werden, dass mit einer geringeren Temperatur auch eine größere Trennung zwischen Positiv- und Negativkontrolle erreicht werden konnte, da so der Anteil der spontanen Revertanten reduziert wird, aber der Anteil durch Substanzen revertierter Bakterien gleichbleibt. Dies unterstützt die These, dass mit herabgesetzter maximaler Wachstumsrate, Substanzen generell als mutagener eingeschätzt werden. Da mit einer Temperatur von 30°C bessere Trenneffizienzen erreicht wurden und somit deutlichere Ergebnisse erzielt werden können, wird in Zukunft der Ames-RAMOS-Test bei 30°C durchgeführt. Um die Unterschiede zwischen den maximalen Wachstumsraten der Bakterienchargen genauer zu untersuchen, müssen weitere Untersuchungen sowohl in der RAMOS-Anlage als auch molekularbiologisch durchgeführt werden. Dies ist im Rahmen des hier dargestellten Projektes nicht mehr möglich.

### 3.4 Transfer auf die Mikrotiterplatten-RAMOS-Anlage

Wie im Projektplan beschrieben, wurde der Ames-RAMOS-Test von der RAMOS- auf die  $\mu$ RAMOS-Anlage (48 Wells) übertragen. Hierdurch kann einerseits das Probenvolumen verringert und andererseits der Durchsatz erhöht werden. Für den Transfer wurde eine Negativkontrolle des Stammes TA 100 genutzt. Wichtige Kriterien beim Anlagen-Transfer waren die grundlegende Vergleichbarkeit der OTR-Kurven, sowie eine niedrige Standardabweichung bei Mehrfachansätzen. Da in der  $\mu$ RAMOS-Anlage grundsätzlich mit deutlich geringeren Füllvolumina gearbeitet wird, sollte zunächst der Einfluss des Füllvolumens genauer untersucht werden. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 3-15 dargestellt. Es ist jeweils der Mittelwert von 8 Parallelansätzen gezeigt.

Die obere OTR-Kurve zeigt eine Kultivierung bei einem Füllvolumen von 800  $\mu$ L. Dies ist das Standardfüllvolumen in der  $\mu$ RAMOS-Anlage. Es ist zu erkennen, dass grundsätzlich der gleiche OTR-Verlauf wie in der Kolben-RAMOS-Anlage vorherrscht. Jedoch ist das Rauschen der Messwerte relativ hoch. Ebenso ist die zeitliche Standardabweichung bei 4 mmol/L/h mit 0,93 h relativ hoch. Die zeitliche Standardabweichung der Kolben-RAMOS-Anlage beträgt 0,23 h. Sowohl das Rauschen als auch die zeitliche Standardabweichung konnten durch eine Erhöhung des Füllvolumens verringert werden (bei 2,4 mL Füllvolumen: 0,58 h zeitliche Abweichung). Das Rauschen wurde durch eine Erhöhung des Signal/Rausch-Verhältnisses verringert. Die zeitliche Standardabweichung wurde durch eine statistisch signifikantere Verteilung der Mutanten reduziert. Die Erhöhung des Füllvolumens steht jedoch im Gegensatz zur gewollten Verringerung des Probenvolumens und somit auch der eingesetzten S9-Menge. Es muss in Zukunft ein Mittelweg gefunden werden, um einerseits eine ausreichend niedrige Standardabweichung und andererseits eine Einsparung des Materials zu erreichen. Dieses Problem besteht jedoch auch analog beim Ames-Fluktuationstest. Es ist zu beachten, dass

mit einer steigenden Füllmenge die maximale OTR des Systems sinkt. Eine Sauerstofflimitierung im hinteren Bereich der Kultivierung ist in diesem Fall jedoch nicht von Relevanz.



**Abbildung 3-15: OTR-Verlauf der Negativkontrolle in der  $\mu$ RAMOS-Anlage mit unterschiedlichen Füllvolumina.**

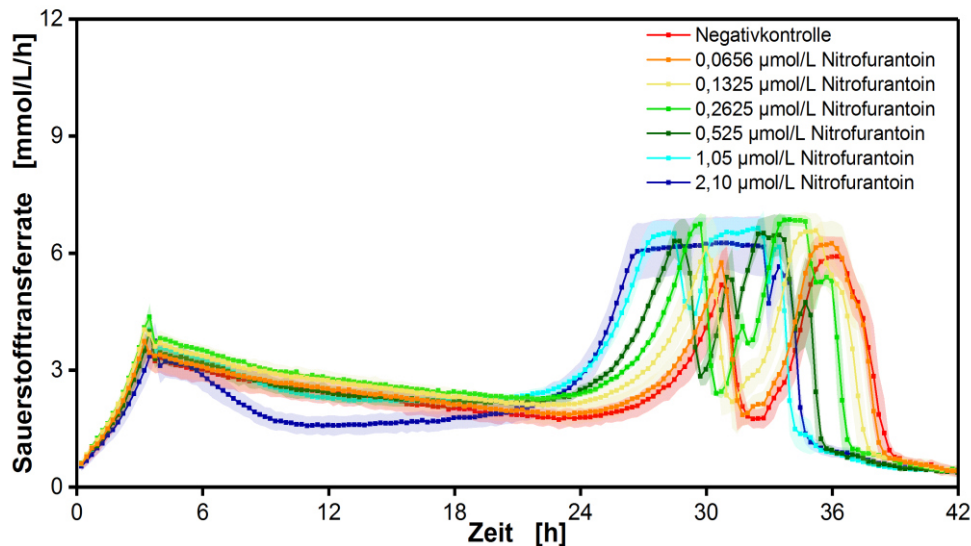
*Salmonella typhimurium* TA 100, T = 30 °C, n = 250/700 rpm,  $d_0 = 50/3$  mm,  $V_K = 250/3,7$  mL,  $V_L = 20$  mL, / var.

Vorkultur: Optimiertes Minimalmedium mit 20 mg/L Histidin, 200  $\mu$ L Inokulum aus Kryo,

Exposition: Optimiertes Minimalmedium mit 5 mg/L Histidin,  $OD_0 = 45$  FAU

Zunächst wurde mit einem Füllvolumen von 2,4 mL weitergearbeitet um die grundsätzliche Einsatzbereitschaft des Systems zu evaluieren. Im Zuge dessen wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mit dem Stamm TA 100 und der Positivkontrolle Nitrofurantoin aufgenommen. Die OTR-Verläufe hierzu sind in Abbildung 3-16 und die daraus gewonnene Konzentrations-Wirkungs-Kurve (4 mmol/L/h-Grenze) in Abbildung 3-17 dargestellt. Die korrespondierenden Standardabweichungen sind zur verbesserten Lesbarkeit der Diagramme als farbige Schatten dargestellt.



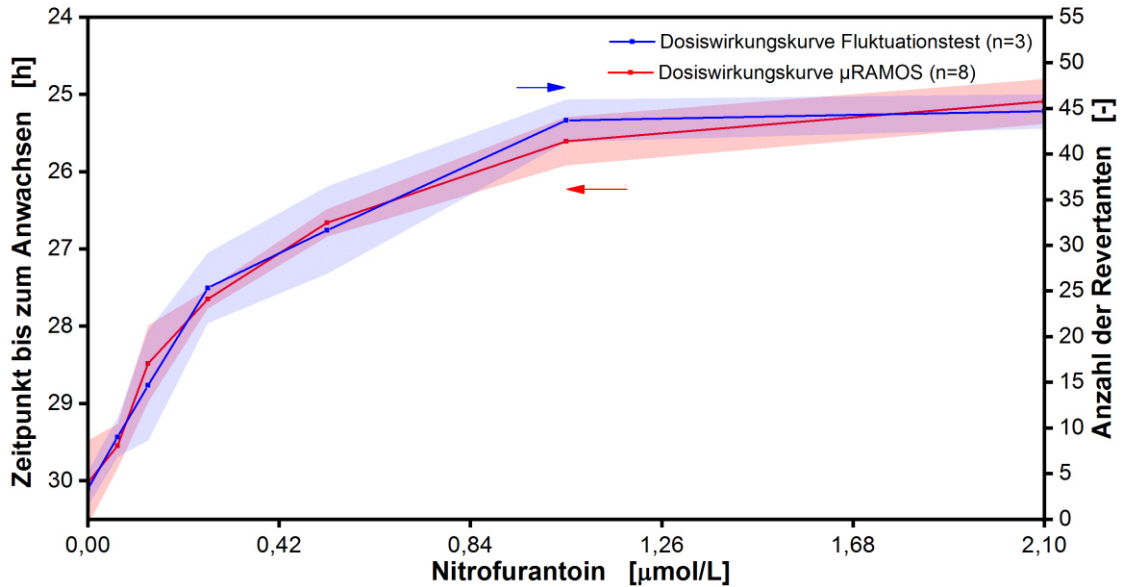


**Abbildung 3-16: OTR-Verlauf Konzentrations-Wirkungs-Kurve Nitrofurantoin.**

*Salmonella typhimurium* TA 100, T = 30 °C, n = 250/700 rpm, d<sub>0</sub> = 50/3 mm, V<sub>K</sub> = 250/3,7 mL, V<sub>L</sub> = 20/2.4 mL, Vorkultur: Optimiertes Minimalmedium mit 20 mg/L Histidin, 200 µL Inokulum aus Kryo, Exposition: Optimiertes Minimalmedium mit 5 mg/L Histidin, OD<sub>0</sub> = 45 FAU

In den OTR-Verläufen lässt sich erkennen, dass mit zunehmender Nitrofurantoinkonzentration die Revertanten immer schneller anwachsen. Bei der höchsten Nitrofurantoinkonzentration ist ein Absinken der OTR während der Histidinlimitierung zu erkennen. Dies deutet auf einen cytotoxischen Effekt hin. Experimente im Fluktuationstest zeigten cytotoxische Effekte des Nitrofurantoins erst bei noch höheren Konzentrationen. Hier wird nur das initiale Wachstum auf Histidin betrachtet. Mit Hilfe der RAMOS-Technologie könnte man hiernach selbst kleinere cytotoxische Effekte erkennen, bei denen zwar noch nicht das initiale Wachstum gestört ist, jedoch bereits ein Einfluss auf die Abschätzung der Mutagenität besteht. Dieser Sachverhalt wird in Kapitel 3.5.3 weiter behandelt..

Wenn man den Zeitpunkt des sichtbaren Anwachsens der Revertanten (OTR-Grenze von 4 mmol/L/h wird überschritten) invers über die Probenkonzentration aufträgt, erhält man eine typische Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Je höher die Mutagenkonzentration ist, desto mehr Revertanten entstehen (je früher steigt die OTR an). Der Verlauf dieser in der µRAMOS-Anlage aufgenommenen Beziehung ist mit dem Verlauf einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve im Fluktuationstest vergleichbar.

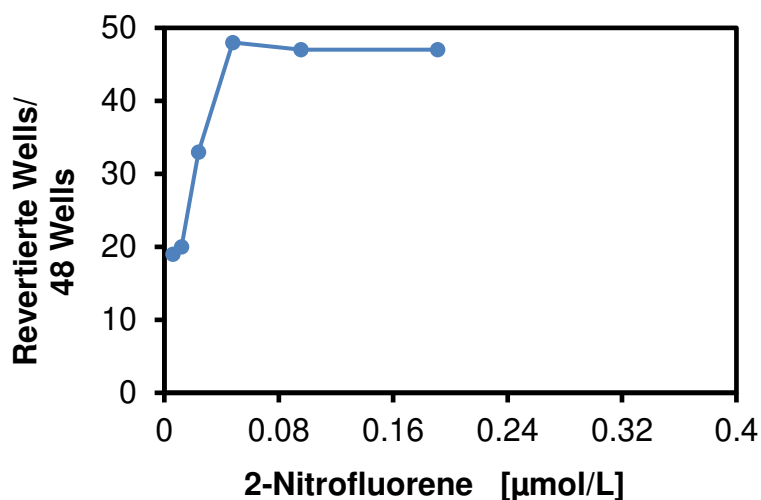


**Abbildung 3-17: Konzentrations-Wirkungs-Kurve Nitrofurantoin: Vergleich mit Fluktuationstest.**

*Salmonella typhimurium* TA 100, T = 30 °C, n = 250/700 rpm, d<sub>0</sub> = 50/3 mm, V<sub>K</sub> = 250/3,7 mL, V<sub>L</sub> = 20/2.4 mL, Vorkultur: Optimiertes Minimalmedium mit 20 mg/L Histidin, 200 µL Inokulum aus Kryo, Exposition: Optimiertes Minimalmedium mit 5 mg/L Histidin, OD<sub>0</sub> = 45 FAU, n = 6, Fluktuationstest laut ISO: n = 3

**Schlussfolgerung:** Mit den hier gezeigten Daten ist die allgemeine Funktionsweise des Ames-RAMOS-Tests mit dem Stamm TA 100 und der Positivkontrolle Nitrofurantoin gezeigt.

Analog wurde eine Validierung der neuen Positivkontrolle 2-Nitrofluorene für den Stamm TA 98 vorgenommen (die in der ISO-Norm beschriebene Positivkontrolle 4-NOPD hat in vorherigen Versuchen einen noch stärkeren cytotoxischen Effekt gezeigt. Diese Eigenschaft ist jedoch in der Erarbeitungsphase des Projekts nicht gewünscht, da hier die Mutagenität der angestrebte Endpunkt ist). Für weitere Versuche wurde eine Positivkontrollkonzentration von 0,190 µmol/L (40,32 µg/L) eingesetzt, da hiermit eine ausreichende Trennung zur Negativkontrolle erreicht wurde. Die Ergebnisse aus dem Fluktuationstest bestätigen dies (siehe Abbildung 3-18). Es zeigte sich ein Anstieg der Wells mit revertierten Bakterien mit steigender Konzentration des 2-Nitrofluorenes bis zur maximal möglichen Anzahl revertierter Wells von 48. Eine weitere Erhöhung der Konzentration war nicht möglich, da hier der Ames Fluktuationstest sein Quantifizierungs-Limit erreicht. Hier zeigt der Ames-RAMOS-Test einen größeren Messbereich.



**Abbildung 3-18: Konzentrations-Wirkungs-Kurve aus dem Fluktuationstest mit 2-Nitrofluorene mit TA 98.**

Im Gegensatz zum Stamm TA 100 konnten bei allen Kultivierungen (auch den Negativkontrollen) mit dem Stamm TA 98 zwei Probleme identifiziert werden. Zum einen reicht die im Medium enthaltene Glucosekonzentration nicht aus um einen aussagekräftigen OTR-Peak zu erzeugen. Des Weiteren ist ein Abfall der OTR während der Histidinlimitierung zu erkennen. Durch eine Erhöhung der Mediumkonzentration auf das 1,2-fache konnte ersteres Problem behoben werden. Als Auslöser für den OTR-Abfall konnte die Zugabe von DMSO (Lösemittel für Proben) identifiziert werden. Die Tatsache, dass DMSO die Kultivierung von TA 98, aber nicht TA 100 beeinflusst, konnte nicht durch die unterschiedlichen Animpfdichten erklärt werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass es mehr genetische Unterschiede zwischen den erworbenen Stämmen geben muss, als nur die unterschiedlichen Mutationen im Histidinoperon. Dies muss ebenso wie die Chargenunterschiede innerhalb eines Stammes weiter untersucht werden. Hierfür sind in diesem Projekt jedoch keine Kapazitäten vorhanden.

### 3.5 Testung von bekannten Mutagenen und Umweltproben

Zur Validierung des bis hierhin optimierten Ames Tests wurden bekannte Mutagene im Ames-Fluktuationstest vermessen und mit den Daten aus der µRAMOS-Anlage verglichen. Hierfür wurde die Replikanzahl in der µRAMOS-Anlage auf drei reduziert.

#### 3.5.1 Generierung von Vergleichsdaten mittels Fluktuationstest, umuC-Test und Mikrokerntest (selbstsignalgebend)

Im Fluktuationstest wurden bekannte Mutagene sowohl mit metabolischer Aktivierung als auch ohne Aktivierung untersucht um eine Vergleichsdatenbank zur Validierung des Ames-RAMOS-Tests zu generieren. Zusätzlich wurden im umu-Chromotest als auch im Ames-

Fluktuationstest 8 native Wasserproben getestet, die durch die GOBIO GmbH gewonnen wurden. Die nativen Wasserproben zeigten im Gegensatz zum umuC-Test im Fluktuationstest keine mutagene Wirksamkeit (siehe Tabelle 3). Dies lässt sich möglicherweise durch ein zu häufiges Auftauen durch den Transportprozess oder durch mögliche cytotoxische Effekte erklären.

**Tabelle 3: Ergebnisse der 8 nativen Proben im umuC-Test**

| Native Probe | Nicht genotoxisch wirksame Verdünnung |
|--------------|---------------------------------------|
| 1            | 1:24                                  |
| 2            | 1:384                                 |
| 3            | 1:96                                  |
| 4            | 1:12                                  |
| 5            | 1:12                                  |
| 6            | 1:48                                  |
| 7            | >1:192                                |
| 8            | 1:24                                  |

Es wurden sowohl Einzelsubstanzen ausgewählt, die keine Mutagenität aufweisen als auch eine stammspezifische Mutagenität. Bei den Substanzen, die eine stammspezifische Mutagenität aufweisen, handelt es sich um 9,10-Dimethylantracene, Isoprene, Methylmethansulfonat, Ethidiumbromid und Benzo[a]pyrene. Die vorliegenden Auswertungen der Einzelsubstanzen (siehe Tabelle 4) aus dem Fluktuationstest, umu-Chromotest und Mikrokerntest (selbstsignalgebend) sollten mit der RAMOS-Technologie überprüft werden. 9,10-Diemethylantracene zeigte bei beiden Stämmen und mit und ohne S9 eine mutagene Wirkung, Isoprene und Methylmethansulfonat hingegen bei keinem Stamm. Ethidiumbromid nur bei TA 98 mit S9 und Benzo[a]pyrene nur bei TA 100 mit S9. Die für den Einsatz von S9 bestimmte Positivkontrolle 2-Aminoanthracene zeigte auch nur bei beiden Stämmen mit S9 ihre Wirksamkeit, die beiden verglichenen Positivkontrollen für TA 100 Nitrofurantoin und 2-Nitrofluorene dagegen unterscheiden sich in ihrer Wirksamkeit. So ist bei 2-Nitrofluorene auch bei TA 98 eine mutagene Wirkung zu erkennen, sowohl ohne als auch mit S9, was darauf hindeutet, dass dieser Stoff durch S9 nicht metabolisiert wird. Bei Nitrofurantoin beschränkt sich die Wirkung lediglich auf TA 100, doch auch hier wird die Substanz nicht metabolisiert und zeigt daher auch bei S9-Einsatz eine mutagene Wirkung. Im Mikrokerntest wurden die in Tabelle 5 genannten Substanzen getestet. Dabei wurden sowohl Modellsubstanzen, die metabolische Aktivierung erfordern (Aflatoxin B1, Benzo[a]pyrene, Cyclophosphamide & 2-Aminoanthracen) als auch ohne metabolische Aktivierung (Ethylmethansulfonat) getestet. Mit

Ausnahme von 2-Aminoanthracen konnte die genotoxische Wirkung nachgewiesen werden. In Abbildung 3-19 sind beispielhaft die Daten zu Aflatoxin B1 dargestellt, die in direkter Kooperation der GOBIO GmbH und der BIO5 der RWTH Aachen in Parallelversuchen erhoben wurden.

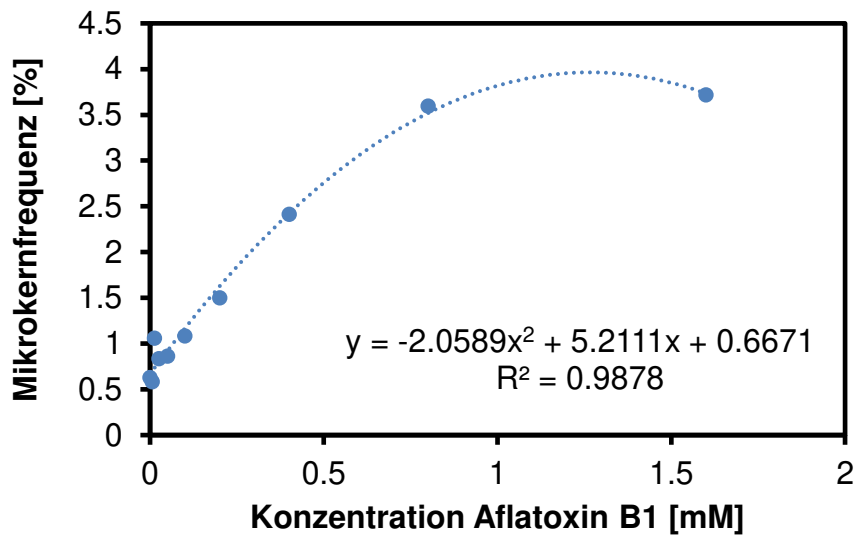


Abbildung 3-19: Konzentrations-Wirkungs-Kurve aus dem Mikrokerntest mit Aflatoxin B1.

Tabelle 4: Bewertung der Mutagenität der Auswahlsubstanzen im Fluktuationstest, umuC-Test und Mikrokerntest (selbstsignalgebend)

mit TA 98 und TA 100 sowohl mit als auch ohne metabolische Aktivierung, + zeigt eine mutagene Wirksamkeit, - keine beobachtete Mutagenität an

|  | TA 98<br>-S9 | TA 98<br>+S9 | TA 100<br>-S9 | TA 100<br>+S9 | TA 1535<br>-/ +S9 | KCB-eGFP<br>-/ +S9 |
|--|--------------|--------------|---------------|---------------|-------------------|--------------------|
| 9,10-Dimethylantracene                       | +            | +            | +             | +             | Nt                | Nt                 |
| Isoprene                                     | -            | -            | -             | -             | Nt                | Nt                 |
| Methylmethansulfonat/<br>Ethylmethansulfonat | -            | -            | +             | -             | + (ohne S9)       | + (ohne S9)        |
| Ethidiumbromid                               | -            | +            | -             | -             | Nt                | (+)                |
| Benzo[a]pyrene                               | -            | -            | -             | +             | Nt                | +                  |
| Nitrofurantoin                               | -            | -            | +             | +             | (+)               | Nt                 |
| 2-Nitrofluorene                              | +            | +            | +             | +             | Nt                | Nt                 |
| 2-Aminoanthracen                             | -            | +            | -             | +             | +                 | -                  |
| Cyclophosphamid                              | -            | +            | -             | +             | (+)               | +                  |
| Aflatoxin B1                                 | -            | +            | -             | +             | Nt                | +                  |

### 3.5.2 Testung bekannter Mutagene und Umweltproben in der $\mu$ RAMOS-Anlage

Es wurden die Substanzen 9,10-Dimethylantracene, Isopren, Methylmethansulfonat, Nitrofurantoin, 2-Nitrofluorene und 2-Aminoanthracen im neu entwickelten Ames-RAMOS-

Test in der  $\mu$ RAMOS-Anlage mit jeweils beiden Stämmen mit und ohne S9-Zusatz untersucht. Aufgrund von Zeitmangel durch die zusätzlich hinzugefügten notwendigen Arbeitspakete konnten nicht alle Substanzen getestet werden.

Die Ergebnisse zu den im Ames- $\mu$ RAMOS-Test untersuchten Substanzen sind vergleichend in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5: Bewertung der Mutagenität der 5 Auswahlsubstanzen im Fluktuationstest, umuC-Test Mikrokerntest (selbstsignalgebend) und Ames  $\mu$ RAMOS Test (Rot)**

mit TA 98 und TA 100 sowohl mit als auch ohne metabolische Aktivierung, + zeigt eine mutagene Wirksamkeit, - keine beobachtete Mutagenität an

|  | TA 98<br>-S9 | TA 98<br>+S9 | TA 100<br>-S9 | TA 100<br>+S9 | TA 1535<br>-/S9 | KCB-eGFP<br>-/S9 |
|--|--------------|--------------|---------------|---------------|-----------------|------------------|
| 9,10-Dimethylantracene                       | +            | +            | + +           | +             | Nt              | Nt               |
| Isoprene                                     | - -          | - -          | - -           | - -           | Nt              | Nt               |
| Methylmethansulfonat/<br>Ethylmethansulfonat | - -          | - -          | + +           | - -           | + (ohne S9)     | + (ohne S9)      |
| Ethidiumbromid                               | -            | +            | -             | -             | Nt              | (+)              |
| Benzo[a]pyrene                               | -            | -            | -             | +             | Nt              | +                |
| Nitrofurantoin                               | - (+)        | - +          | + +           | + +           | (+)             | Nt               |
| 2-Nitrofluorene                              | + +          | + +          | + +           | + (+)         | Nt              | Nt               |
| 2-Aminoanthracen                             | - -          | + +          | - -           | + +           | +               | -                |
| Cyclophosphamid                              | -            | +            | -             | +             | (+)             | +                |
| Aflatoxin B1                                 | -            | +            | -             | +             | Nt              | +                |

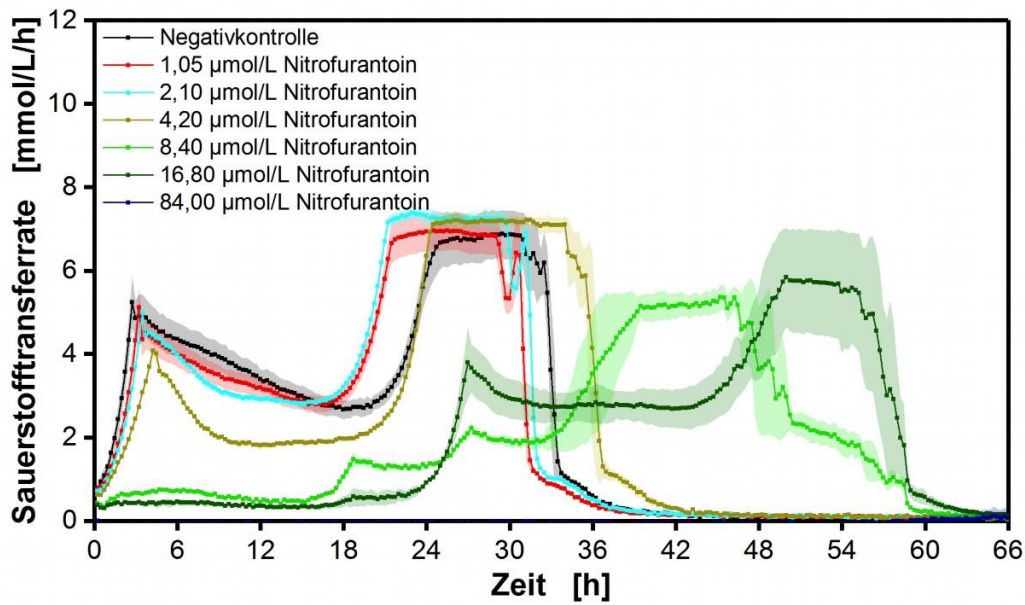
Grundsätzlich zeigt sich eine sehr gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse der etablierten Testverfahren und dem neu entwickelten Ames- $\mu$ RAMOS-Test. Lediglich Nitrofurantoin scheint im Ames  $\mu$ RAMOS-Test auch im Stamm TA 98 mutagen zu sein, während es in den etablierten Testverfahren nicht anspricht. Unter Umständen ist hier der Ames-RAMOS-Test sensitiver.

Zwei der oben beschriebenen Umweltproben wurden ebenso exemplarisch im Ames-RAMOS-Test untersucht (Vorbereitung und Einbringung der Umweltproben in den Test analog zum Fluktuationstest). Wie im Ames-Fluktuationstest zeigten sich auch hier keine mutagenen Effekte.

**Schlussfolgerung:** Die grundsätzliche Durchführbarkeit des Ames-RAMOS-Tests mit Chemikalien und Umweltproben konnte erfolgreich gezeigt werden.

### 3.5.3 Überprüfung cytotoxischer Effekte in der $\mu$ RAMOS-Anlage

Es wurde der Einfluss cytotoxischer Proben auf die Ergebnisse des Ames-RAMOS-Tests untersucht. Die Bestimmung von Cytotoxizität im Fluktuationstest ist in Kapitel 2 beschrieben. Da Nitrofurantoin in höheren Konzentrationen als für die Positivkontrolle empfohlen cytotoxisch ist wurde diese Substanz in höheren Konzentrationen zuerst zur Untersuchung der Cytotoxizität genutzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-20 dargestellt.



**Abbildung 3-20: OTR-Verlauf *S. typhimurium* TA 100: Einfluss einer cytotoxischen Probe: Nitrofurantoin.**

*Salmonella typhimurium* TA 100, T = 30 °C, n = 250 rpm, d<sub>0</sub> = 50 mm, V<sub>K</sub> = 250 mL, V<sub>L</sub> = 20 mL,

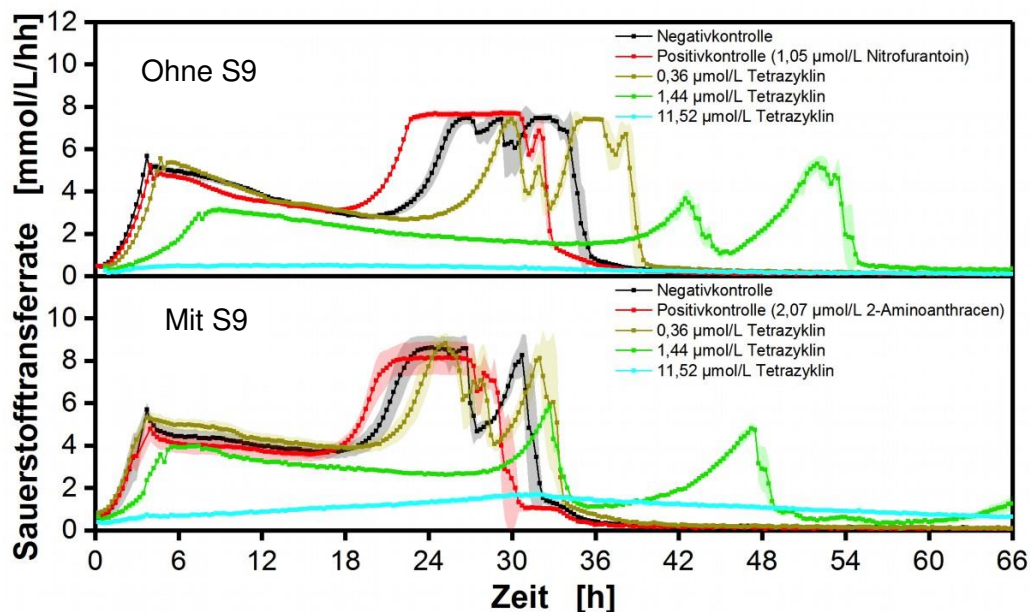
Vorkultur: Optimiertes Minimalmedium mit 20 mg/L Histidin, 200 µL Inokulum aus Kryo,

Exposition: Optimiertes Minimalmedium mit 5 mg/L Histidin, OD<sub>0</sub> = 45 FAU

Je höher konzentriert Nitrofurantoin eingesetzt wird, desto geringer fällt das initiale Wachstum aus. Der gleiche Effekt ist im Fluktuationstest durch die verringerte OD nach der Expositionsphase im Vergleich zur Negativkontrolle erkennbar. Zusätzlich ist jedoch auch erkennbar, dass bevor ein Effekt im initialen Wachstum zu erkennen ist, die OTR trotz höherer Mutagenkonzentration aufgrund des Revertantenwachstums später ansteigt als die Negativkontrolle. Dies ist ebenso auf Cytotoxizität zurückzuführen. Dieser Versuch zeigt, dass die Identifizierung einer cytotoxischen Probe über den OTR-Verlauf erfolgen kann. Während im Fluktuationstest aktiv eine OD-Messung während des initialen Wachstums erfolgen muss, kann der Effekt hier direkt in der OTR abgelesen werden. Die Ergebnisse zeigen auch, dass eine Mutagenität und eine Cytotoxizität sich überlagern können, sodass es zu einer Maskierung der Cytotoxizität kommen kann und eine Mutagenität unterschätzt werden kann.

Um den Effekt der Cytotoxizität losgelöst von dem der Mutagenität zu untersuchen, wurde eine rein cytotoxische Probe (Tetrazyklin) in den Test eingebracht. Die Ergebnisse hierzu sind in

Abbildung 3-21 dargestellt. Hier wurde außerdem der Einfluss von S9 auf die Probencytotoxizität untersucht. Der Einfluss der Cytotoxizität stellt sich wie bei einer Probe die cytotoxisch und mutagen ist (Nitrofurantoin) dar. S9 hat einen mildernden Effekt auf die Cytotoxizität von Tetrazyklin. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass durch die S9-Zugabe auch ein verstärktes Wachstum einer Negativkontrolle zu beobachten ist.



**Abbildung 3-21: OTR-Verlauf *S. typhimurium* TA 100: Einfluss einer cytotoxischen Probe: Tetrazyklin.**

*Salmonella typhimurium* TA 100, T = 30 °C, n = 250 rpm, d<sub>0</sub> = 50 mm, V<sub>K</sub> = 250 mL, V<sub>L</sub> = 20 mL,

Vorkultur: Optimiertes Minimalmedium mit 20 mg/L Histidin, 200 µL Inokulum aus Kryo,

Exposition: Optimiertes Minimalmedium mit 5 mg/L Histidin, OD<sub>0</sub> = 45 FAU

**Schlussfolgerung:** Im Gegensatz zum Ames-Fluktuationstest lässt sich ein cytotoxischer Effekt im Ames-RAMOS-Test deutlich früher erkennen.

### 3.6 Publikationen und Wissenstransfer

#### Konferenzen:

Kauffmann K., Brendt, J., Schiwy, A., Hollert, H., Büchs, J.. Online monitoring of respiration activity helps characterizing and optimizing the Ames mutagenicity test. *European Society of Biochemical Engineering Sciences Lissabon*. 2018 (Vortrag)

Brendt J., Thalmann B., Bluhm K., Kauffmann K., Crawford S., Schiwy A., Büchs J., Hollert H. (2018) Comparison of different rat-liver S9 to an animal-free alternative ewoS9R in the Ames fluctuation assay, *SETAC Europe 28th Annual Meeting, Rome, 2018* (Poster)



Kauffmann K., Brendt, J., Schiwy, A., Hollert, H., Büchs, J.. Online monitoring of respiration activity helps characterizing and optimizing the Ames test. *European Environmental Mutagenesis and Genomics Society Rennes*, 2019. (Poster award)

Akzeptiert:

Kauffmann K., Brendt, J., Schiwy, A., Hollert, H., Büchs, J.. Online Monitoring of Respiration Activity Allows for an Optimized Ames Mutagenicity Test. *Environmental Mutagenesis and Genomics Society Washington D.C.*, 2019 (September).

Fachartikel:

Kauffmann K., Gremm, L., Brendt, J., Schiwy, A., Hollert, H., Büchs, J.. Online monitoring of respiration activity enables dynamic mutagenicity detection in the Ames test. **Under Review:** *Mutation Research- Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*

Kauffmann K., Brendt, J., Schiwy, A., Hollert, H., Büchs, J.. Investigation of histidine transfer from complex preculture to the exposition phase of the Ames test. **In preparation**

Kauffmann K., Brendt, J., Schiwy, A., Hollert, H., Büchs, J.. Validation of the newly developed Ames  $\mu$ RAMOS test. **In preparation**

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel des in diesem Abschlussbericht behandelten Projektes war es, den Ames-Test auf die  $\mu$ RAMOS-Technologie zu adaptieren, um den sogenannten Ames-RAMOS-Test zu entwickeln. Hierdurch kann die OTR der genutzten *Salmonella typhimurium* Kulturen online verfolgt werden und über die Zeiten bis zum sichtbaren Anwachsen der Kulturen (Anstieg der OTR) auf die Mutagenität einer Probe geschlossen werden. Im Gegensatz zum Ames-Fluktuationstest entsteht ein deutlicher Mehrgewinn an Informationen. Es entfällt außerdem der Übergang von der Expositionsphase in die Inkubationsphase, welcher mit einem erhöhten Arbeitsaufwand verbunden ist.

Im ersten Projektteil war es das Ziel, die RAMOS-Technologie für die Durchführung des Ames-Tests zu evaluieren und adaptieren. Hierfür wurde die Kolben-RAMOS-Anlage genutzt, da diese bereits etabliert ist und Anpassungen schnell vorgenommen werden können. Es wurden die Versuchsbedingungen zwischen den verschiedenen Projektpartnern verglichen und angepasst. Das Prinzip des Ames-RAMOS-Tests konnte nachgewiesen werden und der Einfluss des Histidintransfers aus der Vorkultur als ein möglicher Faktor für die interexperimentelle Variabilität des Ames-Tests ausgemacht werden. Dieser Aspekt wurde zusätzlich zum eigentlichen Projektplan untersucht, da nur so ein reproduzierbarer Ames-RAMOS-Test zu gewährleisten war. Hierfür wurde eine Vorkultur auf optimiertem Minimalmedium mit Histidinlimitierung etabliert, sodass kein Übertrag von Histidin auf die Expositionsphase stattfinden konnte. Hierdurch konnten reproduzierbarere Bedingungen geschaffen werden.

Weiterhin konnten Unterschiede in den Testergebnissen bei Nutzung verschiedener Bakterienchargen des gleichen Herstellers festgestellt werden. Als Grund für die Unterschiede konnte die maximale Wachstumsrate ausgemacht werden. Dies zeigte sich auch in Experimenten mit herabgesetzter Temperatur. Es wurde eine Kultivierungstemperatur von 30°C als optimal festgestellt. Neben den Unterschieden in den verschiedenen Bakterienchargen wurde Unterschiede zwischen den zwei benutzten Stämmen festgestellt. Diese Unterschiede können nicht allein durch die bekannten Mutationen im Histidinoperon erklärt werden. Der genetische Unterschied zwischen den *S. typhimurium* Stämmen TA 98 und TA 100 muss somit weiter untersucht werden. Da diese Thematik allerdings nicht Teil des eigentlichen Projekts war, waren für eine detaillierte Untersuchung der Bakterien hier keine Kapazitäten vorhanden.

Es fand ein erfolgreicher Transfer der Ames-RAMOS-Tests von der Kolben- auf die 48-Well Mikrotiterplatten-RAMOS-Anlage statt. Hierbei wurde ein Füllvolumen von 2,4 mL/Well als optimal für die Messergebnisse festgestellt. Um Proben- und S9-Menge zu reduzieren, sollte

trotzdem über eine Volumenreduzierung nachgedacht werden. Es konnten erfolgreich Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen aufgenommen werden. Der Einsatz von S9-Mix war ebenfalls erfolgreich.

Es konnte der Einfluss cytotoxischer Proben auf die OTR-Kurven der Zellen dargestellt werden. In Zukunft können über den Verlauf der OTR cytotoxische Proben identifiziert werden.

In Zukunft müssen nun noch Mischungseffekte auf die Ergebnisse des Ames- $\mu$ RAMOS-Tests untersucht werden.

Zur Validierung des Ames-RAMOS-Tests waren im Fluktuationstest, Mikrokerntest und umu-Chromotest valide Proben sowie Umweltgemische zu finden. Hierfür wurden potenzielle Proben getestet. Es wurden aus der vorhandenen Liste gezielt mutagene, promutagene, sowie Substanzen mit reduziertem Potential durch S9-Einsatz ausgewählt und in der RAMOS-Anlage getestet. Eine generelle Vergleichbarkeit der Ergebnisse aller Testsysteme mit dem Ames-RAMOS-Test konnte gezeigt werden.

## Literatur

1. Maron, D. M. & Ames, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173–215 (1983).
2. McCann, J., Spingarn, N. E., Kabori, J. & Ames, B. N. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 979–983 (1975).
3. Ames, B. N., Mccann, J. & Yamasaki, E. 347 Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test\*. *Mutat. Res.* **31**, 347–364 (1975).
4. Bols, N. C. *et al.* Ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to induce 7-ethoxyresorufin-o-deethylase activity in a trout liver cell line. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **44**, 118–128 (1999).
5. Pérez, S., Reifferscheid, G., Eichhorn, P. & Barceló, D. Assessment of the mutagenic potency of sewage sludges contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons by an Ames sludges for fluctuation assay. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**, 2576–2584 (2003).
6. Wheelock, C. E. *et al.* Development of toxicity identification evaluation procedures for pyrethroid detection using esterase activity. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**, 2699–2708 (2004).
7. Gatehouse, D. Detection of mutagenic derivatives of cyclophosphamide and a variety of other mutagens in a microtitre fluctuation test, without microsomal activation. *Mutat. Res.* **53**, 289–296 (1978).
8. Ames, B. N., Lee, F. D. & Durston, W. E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 782–786 (1973).
9. Alvares, A. P., Bickers, D. R. & Kappas, A. Polychlorinated Biphenyls: A New Type of Inducer of Cytochrome P-448 in the Liver. **70**, 1321–1325 (1973).
10. Czygan, P. *et al.* Microsomal Metabolism of Dimethylnitrosamine and the Cytochrome P-450 Dependency of Its Activation to a Mutagenl. *CANCER Res.* **33**, (2983).
11. Ecobichon, D. J. & Comeau, A. M. Comparative effects of commercial Aroclors on rat liver enzyme activities. *Chem. Biol. Interact.* **9**, 341–350 (1974).
12. Litterst, C. L. & Loon, E. J. Van. Time-Course of Induction of Microsomal Enzymes

Following Treatment with Polychlorinated Biphenyl.

13. Schmoltdt, A., Bente, H. F. & Fröhling, R. Induction of Rat Liver Enzymes by Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in Dependence on the Dose and Chlorine Content\*. *Arch. Toxicol* **32**, 69–81 (1974).
14. Heger, S. *et al.* Biotests for hazard assessment of biofuel fermentation. *Energy Environ. Sci.* **5**, 9778 (2012).
15. Reifferscheid, G. *et al.* Measurement of genotoxicity in wastewater samples with the in vitro micronucleus test—Results of a round-robin study in the context of standardisation according to ISO. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **649**, 15–27 (2008).
16. Anderlei, T., Zang, W., Papaspyrou, M. & Büchs, J. Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochem. Eng. J.* **17**, 187–194 (2004).
17. Anderlei, T. & Büchs, J. Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochem. Eng. J.* **7**, 157–162 (2001).
18. Flitsch, D. *et al.* Respiration activity monitoring system for any individual well of a 48-well microtiter plate. *J. Biol. Eng.* **10**, 14 (2016).