

# **Abschlussbericht**

Für die Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU)

## **Weiterentwicklung des Ames-Fluktuations- und Ames- μRAMOS-Tests zur optimierten und reproduzierbareren Mutagenitätserfassung (optAMES)**

Projektleitung: Prof. Dr.-Ing. Jochen Büchs (Koordination)  
RWTH Aachen  
Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (AVT.BioVT)  
Forckenbeckstraße 51  
52074 Aachen

Prof. Dr. Henner Hollert  
Goethe Universität Frankfurt (GU)  
Institut für Ökologie, Evolution und Diversität  
Max-von-Laue-Str. 13  
60438 Frankfurt am Main

Projektbearbeitung: Eva Forsten, M.Sc.  
Prof. Dr.-Ing. Jochen Büchs  
Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

Dr. Andreas Schiwy  
Prof. Dr. Henner Hollert  
Institut für Ökologie, Evolution und Diversität

Andreas Schulte  
Dr. Clemens Lattermann  
Kuhner Shaker GmbH  
Kaiserstraße 100  
52134 Herzogenrath

Aktenzeichen: AZ 35473/01

Berichtszeitraum: 15.05.2020 – 30.06.2022

Aachen, September 2022

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



Az	35473/01	Referat	32	Fördersumme	285.732 Euro
----	----------	---------	----	-------------	--------------

**Antragstitel** Weiterentwicklung des Ames-Fluktuations- und Ames- $\mu$ RAMOS-Tests zur optimierten und reproduzierbareren Mutagenitätserfassung (optAMES)

**Stichworte**

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
<b>18 Monate</b>	<b>15.05.2020</b>	<b>30.06.2022 (inkl. Verl.)</b>	<b>1</b>

Zwischenberichte	15.03.2021
------------------	------------

<b>Bewilligungsempfänger</b>	Aachener Verfahrenstechnik	Tel	0241 80-24633
	Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (AVT.BioVT)	Fax	0214 80-22580
	RWTH Aachen University	Projektleitung	
	Forckenbeckstraße 51	Prof. Dr.-Ing. Jochen Büchs	
52074 Aachen	Bearbeiter		
		Eva Forsten	

**Kooperationspartner**

Goethe Universität Frankfurt  
Institut für Ökologie, Evolution und Diversität  
Max-von-Laue-Str. 13  
60438 Frankfurt am Main

Kuhner Shaker GmbH  
Kaiserstraße 100  
52134 Herzogenrath

### **Zielsetzung und Anlass des Vorhabens**

Ziel des Projektes ist es, umweltwissenschaftliche und bioverfahrenstechnische Fachkenntnisse zu kombinieren, um die Empfindlichkeit, die Reproduzierbarkeit und den Durchsatz des Ames- $\mu$ RAMOS-Tests zu verbessern. Die Empfindlichkeit wurde bereits im vorangegangenen Ames-RAMOS-Projekt (AZ 32654/0) durch die Verwendung der RAMOS-Technologie erhöht. Die Reproduzierbarkeit soll weiter durch geeignete Anpassung der Testprotokolle optimiert werden. Die erarbeiteten Erkenntnisse im Bereich der Reproduzierbarkeit sollen weiterhin auf den an der Goethe Universität durchgeführten Fluktuationstest übertragen und der Fachöffentlichkeit verfügbar gemacht werden. Zuletzt soll der Durchsatz des Tests durch die Maßstabsübertragung von einer 48-Well Prototyp-Anlage auf eine zu kommerzialisierende 96-Well Anlage erfolgen. Für die leichtere Handhabung soll darüber hinaus eine automatisierte, computergestützte Auswertemethodik entwickelt werden.

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

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit des an der Goethe Universität (GU) durchgeführten Fluktuationstests wurde die Vorkulturführung auf ein Minimalmedium umgestellt. Hierzu wurden mit der RAMOS-Technologie an der AVT.BioVT Protokolle zur Durchführung der Vorkultur sowie das Minimalmedium zur Verfügung gestellt. Die Reproduzierbarkeit des Ames- $\mu$ RAMOS-Tests sollte weiterhin durch Vergleich und Charakterisierung verschiedener Teststamm-Chargen verbessert werden: die Goethe Universität erhielt von einigen Partnerlaboren Stämme und schickte diese zur Sequenzierung ein. An der AVT.BioVT wurde mittels der RAMOS-Technologie das Wachstumsverhalten der gesammelten Stämme charakterisiert. Die Kuhner Shaker GmbH arbeitete an der Anpassung und Fertigung einer optimierten 96-Well Anlage, insbesondere an einer verbesserten Abdichtung und Feuchtereulation der Messkammer. Währenddessen wurde der AVT.BioVT zunächst ein alter Anlagenprototyp zur Verfügung gestellt. Eine 96-Well Mikrotiterplatte wurde evaluiert und die Wachstumsbedingungen in dieser charakterisiert. Insbesondere eine mögliche Probenadsorption an den Mikrotiterplattenwänden musste hier überprüft werden. Im Anschluss wurde der Ames- $\mu$ RAMOS-Test mit einem der beiden Teststämme in den 96-Well Maßstab übertragen. Eine semi-automatisierte Auswertung wurde in MATLAB implementiert.

## **Ergebnisse und Diskussion**

Das an der AVT.BioVT optimierte Minimalmedium konnte erfolgreich an der GU etabliert werden. Diese Art der Kulturführung zeigte positive Effekte auf die Reproduzierbarkeit des Ames-Fluktuationstests. Die Ergebnisse auf Minimalmedium zeigten eine geringere Streuung als die vergleichbaren Untersuchungen auf Komplexmedium. Zugleich half die definierte und kontrollierte Erstellung der Kryokulturen, reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Weiterhin verbesserte eine Anpassung der Vorkulturführung bezüglich des Inokulationsvolumens die Reproduzierbarkeit: neu wird mit 200 µL an Bakterien für die Vorkultur angeimpft. Als weitere Optimierung wurde die Zugabe von 2 mg/mL Histidin ins Exposuremedium implementiert, da es die Sensitivität des Tests verbessert.

Bakterienchargen der Ames-Teststämme wurden bei verschiedenen Laboren gesammelt und für eine Sequenzierung genutzt. Aus den Sequenzierungsdaten wurden die phylogenetischen Profile für die Stämme TA98 und TA100 erstellt. Hier zeigten die beiden Stämme TA98 und TA100 bei 133 Genen Unterschiede zum Referenzstamm oder zu einander. Die 133 Kandidaten-Gene wurden für eine Rekonstruktion des Stoffwechsels auf der Genomebene verwendet. Der Stamm TA100 zeigte eine breitere metabolische Kapazität als TA98. Eine Erklärung für die Wachstumsunterschiede innerhalb der Stämme konnte nicht gefunden werden.

Bei der Charakterisierung der Stammchargen in der RAMOS-Kolbenanlage fielen in Bezug auf die maximale Wachstumsrate größere Unterschiede auf: es wurden maximale Wachstumsraten im Bereich von 0,52 1/h bis hin zu 0,72 1/h bestimmt.

An der AVT.BioVT wurde eine geeignete 96-Well MTP für den Transfer des Tests evaluiert (RipPlate round). Ein Test der MTP auf Probenabsorption über eine Vergleichsmessung in vorbehandelten und nicht vorbehandelten Wells fiel negativ aus. Darüber hinaus fiel auf, dass im Vergleich mit den Positivkontrollen die Negativkontrollen im 96-Well Maßstab eine erhöhte Standardabweichung gegenüber dem 48-Well Maßstab aufwiesen. In diesem Kontext wurde die Abhängigkeit der Standardabweichung der OTR von der eingesetzten Zelldichte/dem Füllvolumen bzw. daraus resultierenden absoluten Zellzahl evaluiert. Final wurde im 96-Well Maßstab eine Startzelldichte von 90 FAU für den Teststamm TA100 festgelegt und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für den Stamm TA100 so entscheidend verbessert.

Die automatisierte Auswertung der Daten in MATLAB berechnet die Wachstumsraten der Teststämme und der im Test entstandenen Revertanten aus den OTR-Daten. Darüber hinaus liest die Applikation die Höhe des OTR-Peaks auf Histidin und den Zeitpunkt, zu dem ein OTR-Schwellenwert von 3,5 bzw. 4 mmol/L/h erreicht ist, über einen exponentiellen Fit der OTR-Daten aus.

Innerhalb der Bearbeitungszeit konnten fünf Mutagene durch die AVT.BioVT untersucht werden, die mit beiden Teststämmen korrekt als mutagen identifiziert wurden. Über die reine Detektion von Mutagenität hinaus ermöglicht der Ames-µRAMOS-Tests, die Aktivität des S9-Enzymmixes zu überprüfen, sodass falsch negative Ergebnisse als solche erkannt werden.

## **Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation**

In der Öffentlichkeitsarbeit kam es im Verlauf des Projekts zu großen Einschränkungen. Durch pandemiebedingte Verzögerungen im Projekt sowie Einschränkungen der Lieferketten wurden erst spät die erforderlichen Forschungsziele erreicht. Dadurch war im Projekt nicht ausreichend Zeit, um die angestrebte Dissemination zu erreichen. Es ist weiterhin geplant, die Ergebnisse auf Tagungen und in Form von Publikationen zu veröffentlichen. Im Rahmen des Norman Netzwerks werden die Ergebnisse bei dem nächsten Norman General Assembly Meetings disseminiert werden. Ein Teil der Ergebnisse konnte bereits auf der EUROTOX Tagung 2021 und der ICT Tagung 2022 präsentiert werden.

## **Fazit**

Die optimierte Vorkulturführung konnte von der AVT.BioVT an die GU transferiert werden und zeigte einen positiven Einfluss auf die Reproduzierbarkeit des Fluktuationstests. Es wurde eine Sammlung der Teststammchargen von Partnerlaboren angelegt, die sich sowohl im Genom als auch in ihren Wachstumseigenschaften der Chargen unterschieden. Der Test wurde von der AVT.BioVT mit beiden Teststämmen in den neuen Maßstab übertragen. Eine Validierung des Ames-µRAMOS-Tests mit literaturbekannten Chemikalien wurde begonnen und war bisher sowohl mit als auch ohne Verwendung von S9-Enzymmix erfolgreich.

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abbildungsverzeichnis.....	4
Tabellenverzeichnis.....	6
1 Einleitung .....	7
1.1 Anlass und Zielsetzung des Forschungsvorhabens .....	7
1.2 Ames-Test .....	7
1.3 RAMOS- und $\mu$ RAMOS-Technologie .....	8
1.4 Ames- $\mu$ RAMOS-Test .....	9
1.5 Projektbearbeitung.....	10
2 Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden.....	12
2.1 Durchführung des Ames-Fluktuationstests.....	12
2.1.1 Vorkulturführung.....	12
2.1.2 Testvorbereitungen .....	12
2.1.3 Einstellen der Formazine Attenuation Units (FAU) .....	12
2.1.4 Testung .....	12
2.1.5 Belegung der 384-Well-Platten.....	13
2.2 Durchführung des Ames- $\mu$ RAMOS-Tests .....	13
2.2.1 Vorkulturführung.....	13
2.2.2 Exposition .....	14
2.3 Bestimmung der Wachstumsraten .....	15
2.3.1 Wachstumsdichtebestimmung (GU) .....	15
2.3.2 Wachstumsratenbestimmung mittels RAMOS-Anlage.....	15
2.4 Bestimmung der Ausbeutekoeffizienten.....	15
3 Ergebnisse und Diskussion .....	17
3.1 Charakterisierung der Ames-Teststämme (Modul 1).....	17

3.1.1	Stammchargen-Wachstumsuntersuchungen an der Goethe-Universität (Zuarbeit Modul 1a).....	17
3.1.2	Sequenzierung verschiedener Chargen der Ames-Teststämme (Modul 1a).....	27
3.1.3	Charakterisierung der Ames-Teststämme in der RAMOS-Anlage (Modul 1b).....	29
3.2	Transfer des Ames- $\mu$ RAMOS-Test auf eine zu kommerzialisierende 96-Well $\mu$ RAMOS-Anlage .....	34
3.2.1	Anfertigung einer 96-Well- $\mu$ RAMOS-Anlage (Modul 2a).....	34
3.2.2	Transfer des Ames- $\mu$ RAMOS-Tests (Modul 2b) .....	36
3.2.3	Entwicklung einer automatisierten Mutagenitätsbewertung im neuen Ames- $\mu$ RAMOS-Test (Modul 2c) .....	43
3.2.4	Untersuchung bekannter und schwacher Mutagene (Modul 2d).....	46
3.1	Optimierung des Ames-Fluktuationstests zur Generierung reproduzierbarer Ergebnisse (Modul 3).....	49
3.1.1	Adaptierung der neuen Vorkulturführung (Modul 3a).....	49
3.1.2	Ringstudie (Modul 3b) .....	50
4	Öffentlichkeitsarbeit.....	50
5	Fazit und Ausblick .....	51
6	Literatur .....	52

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Belegung der 384-Well-Platte mit einem Probenansatz. NK=Negativkontrolle, PK=Positivkontrolle, V=Verdünnungsstufen .....	13
Abbildung 3.1: Spontan-Revertanten (Negativkontrolle) der TA98 Stammchargen nach Animpfvolumen.....	19
Abbildung 3.2: Ergebnisse der Positivkontrolle mit und ohne Histidin im Exposuremedium..	20
Abbildung 3.3: Positivkontrollwerte zweier Teststämme im Vergleich .....	20
Abbildung 3.4: Positivkontrollwerte ausgewählter TA 98 Stämme.....	21
Abbildung 3.5: Positivkontrollwerte für TA 100 abhängig vom Animpfvolumen .....	22
Abbildung 3.6: Positivkontrollwerte für TA100 BFG, FGU und UBA.....	22
Abbildung 3.7: Positivkontrollwerte für den Stamm TA 100 RWTH.....	23
Abbildung 3.8: Positivkontrollwerte für TA 100 AK Oehl., RWTH, BFG, FGU .....	24
Abbildung 3.9 Performance des TA 98 AK Oehl. auf Minimalmedium nach supplementierter Histidinmenge .....	26
Abbildung 3.10 Performance des TA 100 AK Oehl. auf Minimalmedium .....	26
Abbildung 3.11 Darstellung der Stoffwechselwege der Stämme TA98 und TA100 im Vergleich zu den Referenzen <i>S. typhimurium</i> LT2 und <i>S. tudu</i> .....	28
Abbildung 3.12 OTR-Verlauf für <i>S. typhimurium</i> TA 98 auf Oxoid Nutrient Broth #2, Kryocharge „Hydrotox Xenometrix“.....	30
Abbildung 3.13: OTR-Verlauf für <i>S. typhimurium</i> TA 100 auf Ames-Minimalmedium, Kryocharge „ICCR“.....	31
Abbildung 3.14: Ausbeutekoeffizienten auf Histidin und Glucose für Teststamm TA 100, Charge „ICCR“ .....	32
Abbildung 3.15: Maximale Wachstumsraten der Stammchargen TA 100 .....	33
Abbildung 3.16: Maximale Wachstumsraten der Stammchargen TA 98 .....	34
Abbildung 3.17 $\mu$ -TOM 96-well Anlage: (1) Schnellverschluss, (2) Deckel mit Sensorik, (3) dichtes Gehäuse, (4) Mikrotiterplatte, (5), (6) .....	35
Abbildung 3.18 Variable MTP-Aufnahme.....	35
Abbildung 3.19: Neue Dichtung .....	36
Abbildung 3.20: Ames- $\mu$ RAMOS-Test mit TA 100 und 600 $\mu$ L Füllvolumen .....	37
Abbildung 3.21: Einfluss des Füllvolumens auf die Testergebnisse .....	38
Abbildung 3.22: Einfluss der Zelldichte bei konstantem Histidinmenge pro Zelle-Verhältnis .	40
Abbildung 3.23: Einfluss der initialen Zelldichte bei gleicher initialer Histidinkonzentration ...	41
Abbildung 3.24: Vergleich der Testbedingungen anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve.....	42

Abbildung 3.25: Automatisiert erfasste Charakteristika der Online-Daten (Schema).....	43
Abbildung 3.26: Vergleich verschiedener Auslesemethoden .....	44
Abbildung 3.27: Standardabweichung des ausgelesenen Zeitpunkts (B) der Negativkontrolle .....	45
Abbildung 3.28: Dosis-Wirkungs-Kurve für 4-Nitroquinolin-N-oxid .....	47
Abbildung 3.29: Dosis-Wirkungs-Kurve für N-Nitroso-N-ethylurea (ENU) .....	47
Abbildung 3.30: Dosis-Wirkungs-Kurve für 2-Aminoanthracen (TA 98).....	48
Abbildung 3.31: Dosis-Wirkungs-Kurve für 2-Nitrofluoren (TA 98) .....	49

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1. Modulplan .....	10
Tabelle 3.1: Optische Dichten der Stämme TA 98 und TA100 nach Wachstum auf Komplexmedium.....	18
Tabelle 3.2 Wachstumsergebnisse (3 ausgewählter) Teststämme TA98 und TA100 im Minimalmedium .....	25
Tabelle 3.3: Übersicht der an der AVT.BioVT vermessenen Stammchargen .....	29



# 1 Einleitung

## 1.1 Anlass und Zielsetzung des Forschungsvorhabens

Ziel des Projektes ist es, umweltwissenschaftliche und bioverfahrenstechnische Fachkenntnisse zu kombinieren, um die Empfindlichkeit, die Reproduzierbarkeit und den Durchsatz des im vorhergegangenen Projekt (AZ 32654/01) entwickelten Ames- $\mu$ RAMOS-Tests [1] zu verbessern. Die Empfindlichkeit wurde bereits erhöht [2]. Die Reproduzierbarkeit soll weiter durch geeignete Anpassung der Testprotokolle optimiert werden. Die erarbeiteten Erkenntnisse im Bereich der Reproduzierbarkeit sollen weiterhin auf den an der Goethe Universität durchgeführten Fluktuationstest übertragen und der Fachöffentlichkeit verfügbar gemacht werden. Zuletzt soll der Durchsatz des Tests durch die Maßstabsübertragung von einer 48-Well Prototyp-Anlage auf eine zu kommerzialisierende 96-Well Anlage erfolgen. Für die leichtere Handhabung soll darüber hinaus eine automatisierte, computergestützte Auswertemethodik entwickelt werden.

## 1.2 Ames-Test

Der nach seinem Erfinder Bruce Ames benannte Ames-Test ist ein bereits in den siebziger Jahren entwickelter *in vitro* Mutagenitätstest [3, 4]. Im Test werden Histidin-auxotrophe *Salmonella typhimurium* Stämme auf Minimalmedium kultiviert, das eine geringe, definierte Menge Histidin enthält [5]. In Anwesenheit einer mutagenen Substanz mutieren die Histidin-auxotrophen Bakterien mit erhöhter Wahrscheinlichkeit zurück zur Prototrophie und können so auch nach Verbrauch des Histidins im Medium weiterwachsen. Die rückmutierten und somit prototrophen Bakterien werden auch als Revertanten bezeichnet.

Im ursprünglichen Ames-Test sind Revertanten als Kolonien auf Minimalagarplatten zählbar [3, 6]. Um die mutagenen Eigenschaften einer unbekanntem Substanz einzuschätzen, muss die Koloniezahl pro Agarplatte in Anwesenheit einer Negativkontrolle (z.B. Lösemittel oder Wasser) mit der Koloniezahl in Anwesenheit der Testsubstanz verglichen werden. Eine alternative Form des Ames-Tests stellt der Ames-Fluktuationstest nach der ISO-Guideline 11350 dar. Dieser wird in 24- und 384-Well-Mikrotiterplatten als Flüssigkultur durchgeführt [7–9]. Die Bestimmung von Revertantenwachstum erfolgt beim Fluktuationstest über einen pH-Indikator im Medium: bei Wachstum säuert sich das Medium an und ein Farbumschlag von violett auf gelb wird sichtbar. Analog zur Koloniezahl im Ames-Test auf Agarplatten wird beim Fluktuationstest die Anzahl der gelben Wells in einer 384-Well-Platte ausgewertet.

Um mithilfe des Ames-Tests verschiedene Mutagenitäten detektieren zu können, werden verschiedene Teststämme eingesetzt: alle diese Stämme haben gemeinsam, dass ihr Histidin-Operon durch eine Mutation nicht mehr funktional ist. Der Stamm TA 98 besitzt beispielsweise eine Frameshift-Mutation (*hisD3052*), der Stamm TA 100 dagegen eine Basenaustauschmutation (Punktmutation, *hisG46*) [5]. Eine Rückmutation zur Prototrophie wird somit von Mutagenen mit entsprechendem Wirkungsmechanismus induziert. Für eine erhöhte Sensitivität besitzen beide Stämme das R-Faktor-Plasmid, das für eine höhere Fehlerrate in der DNA-Reparatur verantwortlich ist [4]. Weitere in den Stämmen enthaltene Mutationen sind ein verändertes *rfa*-Gen, welches eine durchlässigere Lipopolysaccharidschicht zur Folge hat, sowie die *uvrB*-Mutation, die weitere DNA-Reparaturmechanismen einschränkt [3].

Da den eingesetzten Teststämmen die Möglichkeit zur metabolischen Umsetzung der Testchemikalien wie in einer Säugerleber fehlt, werden möglicherweise mutagene Abbauprodukte getesteter Chemikalien nicht mitbewertet. Um diese Lücke zu schließen, werden metabolische Aktivierungssysteme wie z.B. S9 aus Rattenleber dem Test zugegeben. Die im S9 enthaltenen Enzyme bauen Testchemikalien während des Ames-Tests ab, sodass auch die Abbauprodukte überprüft werden. Somit muss jeder Ansatz doppelt – einmal mit, einmal ohne metabolische Aktivierung – getestet werden [10–12].

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

Die RAMOS-Technologie wurde am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (AVT.BioVT) entwickelt. Hiermit kann die Sauerstofftransferrate (*oxygen transfer rate*, OTR) sowie die Kohlendioxidtransferrate (*carbon dioxide transfer rate*, CTR) präzise gemessen und quasi-kontinuierlich online verfolgt werden. Sowohl OTR, CTR als auch der aus beiden berechnete respiratorische Quotient (RQ) geben Aufschluss über den Zustand sowie die aktuell aktiven Stoffwechselwege einer Kultur. Auf diese Art können definierte, ständig durchmischte und sauerstoffunlimitierte Kultivierungsbedingungen für submers kultivierte Bakterien sichergestellt werden. Insbesondere die OTR korreliert bei aeroben Mikroorganismen mit der metabolischen Aktivität der Biomasse und gibt so wertvolle Informationen über das Wachstumsverhalten der Kultur.

Die sogenannten RAMOS-Kolben verfügen über die Standard-Geometrie eines Erlenmeyerkolbens in der unteren Hälfte des Kolbens. Durch diese weisen sie vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften zu gewöhnlichen Schüttelkolben auf. Die obere Hälfte des

Kolbens verfügt über Anschlüsse für Zu- und Abluft, die für den Ablauf der Messung benötigt werden [13].

Die Messung der OTR und CTR erfolgt in zwei grundlegenden Phasen: zunächst wird in der Spülphase der normale Gasaustausch eines Wattestopfens simuliert. Dazu wird Luft mit einem solchen Volumenstrom durch den Kolben geleitet, dass sich die gleichen Gaskonzentrationen wie in einem gewöhnlichen Schüttelkolben ergeben. Im Anschluss erfolgt eine fünf- oder zehnminütige Stopp-Phase: während dieser sind die Ventile geschlossen und es findet kein Gasaustausch statt. Über den Sauerstoffsensor kann nun das Absinken des Sauerstoffpartialdrucks ( $pO_2$ ) im Kopfraum des Kolbens gemessen werden. Zusätzlich steigt über die Bildung von  $CO_2$  der Gesamtdruck im Kopfraum des RAMOS-Kolbens an, während er gleichzeitig über den Verbrauch von  $O_2$  sinkt. Dies kann durch einen Differentialdrucksensor erfasst werden. Aus dem Absinken des  $pO_2$  und der Gesamtdruckänderung können nun OTR, CTR und RQ berechnet werden [14].

Die  $\mu$ RAMOS-Anlage ist eine an Mikrotiterplatten angepasste Variante der oben vorgestellten Kolben-Anlage. Flitsch et al. übertrugen 2016 das System auf den 48-Well-Maßstab, in dem ein 6-fach höherer Durchsatz als bisher möglich ist [15]. Durch den kleineren Maßstab bedingt, wurden Luft Ein- und Auslass mit einer mikrofluidischen Ventiltechnologie gestaltet. Anders als in der Kolbenanlage befindet sich die Sensorik nicht direkt auf der geschüttelten Mikrotiterplatte. Stattdessen wird das Signal über Glasfasern und einen optischen Multiplexer an einen neben dem Schüttler positionierten optischen Sauerstoffsensor weitergeleitet und dort vermessen. Somit ist eine CTR- und damit RQ-Messung in der Mikrotiterplatte nicht mehr möglich (nur OTR-Messung).

Die Anpassung und der Aufbau einer für 96-Well Mikrotiterplatten geeigneten Anlage [16] zur Bestimmung des OTR wird in Kapitel 3.2.1 beschrieben.

#### **1.4 Ames- $\mu$ RAMOS-Test**

Im Rahmen des vorhergegangenen Ames-RAMOS-Projektes (AZ 32654/01) wurde der Ames-Fluktuationstest bereits in die  $\mu$ RAMOS-Technologie (48-Well Anlage, Prototyp) überführt. Im Ames- $\mu$ RAMOS-Test fällt die Aufteilung in Expositions- und Inkubationsphase weg, sodass nur ein Arbeitsschritt von der Vorkultur zum Test selbst stattfindet. Die kontinuierliche OTR-Messung erlaubt wesentliche Rückschlüsse auf die Atmungsaktivität der Bakterien und ist somit aussagekräftiger als der Fluktuationstest, der Mutagenität über eine reine Endpunktmessung beurteilt. Anstatt der Kolonienzahl pro Agarplatte oder der Zahl an gelben Wells wird die Mutagenität im Ames- $\mu$ RAMOS-Test über die Zeit bis zum sichtbaren Wachstum rückmutierter Bakterien beurteilt, die durch einen Anstieg im OTR-Signal sichtbar

ist. Der qualitative Verlauf gibt darüber hinaus Aufschluss über mögliche zytotoxische Effekte der Testsubstanz [1, 2].

Durch vorgenommene Optimierungsschritte im Bereich des verwendeten Minimalmediums und einer angepassten Vorkulturführung ist der Ames- $\mu$ RAMOS-Test darüber hinaus um einiges reproduzierbarer als der Fluktuationstest. Außerdem spart er gegenüber dem Fluktuationstest Arbeitsschritte und Einmalmaterialien ein und ist somit eine ressourcenschonende Alternative zu bisherigen Standards.

## 1.5 Projektbearbeitung

Die Arbeit an der Optimierung des Ames-RAMOS- und Fluktuationstests war laut Projektplan in 3 Module strukturiert (exklusive Modul 4 Publikation und Wissenstransfer), wie in Tabelle 1.1 dargestellt.

**Tabelle 1.1. Modulplan**

<b>Arbeitspaket</b>	<b>Anmerkung</b>
<b>Modul 1: Charakterisierung der Ames-Teststämme</b>	
Sequenzierung	Abgeschlossen
Charakterisierung der Ames-Teststämme in der ( $\mu$ )RAMOS-Anlage	Abgeschlossen
Implementierung von aussagekräftigen Qualitätskontrollen	Abgeschlossen
<b>Modul 2: Transfer des Ames-<math>\mu</math>RAMOS-Tests von einer 48-Well auf eine 96-Well <math>\mu</math>RAMOS-Anlage</b>	
Anfertigung einer 96-Well $\mu$ RAMOS-Anlage	Abgeschlossen
Transfer des Ames- $\mu$ RAMOS-Tests	Abgeschlossen
Entwicklung einer automatisierten Mutagenitätsbewertung	Abgeschlossen
Untersuchung bekannter und schwacher Mutagene	Abgeschlossen
<b>Modul 3: Optimierung des Ames-Fluktuationstests zur Generierung reproduzierbarer Ergebnisse</b>	
Vorkulturführung	Abgeschlossen
Ringstudie	Begonnen
<b>Modul 4: Wissenstransfer</b>	
Vorbereitung der Implementierung in Normen mit Expertengremium	Nicht abgeschlossen
Workshop	Nicht abgeschlossen
Publikationen	Begonnen

Bedingt durch die Corona-Pandemie wurde die Projektdurchführung an der GU verzögert. Eine detaillierte Beschreibung der Einschränkungen wurden bereits im Verlängerungsantrag (6-monatige kostenneutrale Verlängerung) dargestellt. Zu diesen Einschränkungen gehörten Laborschließungen, eine Home-Office-Pflicht und stark eingeschränkte sowie verzögerte Lieferkapazitäten an Laborartikeln, wodurch die Arbeiten am Projekt stark beeinflusst wurden. Insbesondere die Arbeiten an Modul 1 (Sequenzierung) und auch die Implementierung der angepassten Vorkulturführung waren hier betroffen.

Innerhalb der Bearbeitungszeit konnten nur fünf Mutagene durch die AVT.BioVT untersucht werden (Modul 2d). Die Verzögerung im Zeitplan entstand in erster Linie durch Lieferschwierigkeiten/Lieferzeiten von Chemikalien und Verbrauchsmaterialien über teils Wochen bis Monate; hier sind unter anderem die verwendeten Mikrotiterplatten zu nennen. Da der Ames- $\mu$ RAMOS Test bereits auf einen Mikrotiterplattentyp festgelegt worden war, war ein kurzfristiger Wechsel zu Produkten eines anderen Herstellers nicht möglich. Ein Waschen und Autoklavieren bereits verwendeter Platten führte zu Verzug des Materials am Plattenfuß, sodass dieser nicht mehr in die Halterung der 96-Well Anlage passte.

Die geplante Ringstudie mit dem Projektpartner Hydrotox konnte nicht im geplanten Zeitraum beauftragt werden, sondern wurde erst im Rahmen der kostenneutralen Verlängerung durchgeführt. Dies geschah auf Grund der Verzögerungen im Modul 1, da die GU zunächst die Implementierung der angepassten Vorkulturführung etablieren musste, um aufbauend auf dem entwickelten Protokoll Hydrotox zu beauftragen. Anschließend ergaben sich dann beim Auftragnehmer Hydrotox Lieferschwierigkeiten, wodurch die finalen Ergebnisse der Ringstudie erst nach Abgabe des Abschlussberichts nachgereicht werden.

Im Modul 4 kam es im Verlauf des Projekts zu den größten Einschränkungen. Hierbei wurde auf Grund der oben beschriebenen Verzögerungen im Projekt erst spät die erforderlichen Ziele erreicht. Dadurch war im Projekt nicht mehr ausreichend Zeit, um die angestrebte Dissemination zu erreichen. Wir planen die letzten Ergebnisse auszuwerten und sie anschließend auf Tagungen und in Form von Publikationen zu veröffentlichen. Hierbei sollen besonders die Laboratorien angesprochen werden, die ihre Bakterienstämme zur Verfügung gestellt haben. Im Rahmen des Norman Netzwerks werden die Ergebnisse bei dem nächsten Norman General Assembly Meetings disseminiert werden.

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

### **2.1 Durchführung des Ames-Fluktuationstests**

#### **2.1.1 Vorkulturführung**

Die Durchführung des Ames-Fluktuationstests erfolgte nach ISO 11350. Zur Erstellung der Übernachtskultur (ÜNK) wurden 20 ml Wachstumsmedium (selbst hergestellt aus Nutrient Broth No. 2 oder kommerziell erworben bei Trinova, Art. Nr: M26-505.300), 20 µL Ampicillin-Lösung und 20 µL oder 200 µL der zu testenden Bakterien-Stammkultur unter sterilen Bedingungen in einen Kolben gegeben, welcher mit einem sterilen Wattestopfen verschlossen wurde. Es folgten 8,5 h Inkubation bei 37 °C und 150 rpm.

#### **2.1.2 Testvorbereitungen**

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

#### **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. Die Messung wurde in 24-Wellplatten durchgeführt. Es wurde ein Blank-Well mit ÜNK-Medium, und je ein Well mit dem 1:10 verdünnten Bakterienstamm vermessen. Die gemessene optische Dichte wurde in die korrespondierenden Formazine Attenuation Units (FAU) umgerechnet und daraus das benötigte Volumen des Exposuremediums und der ÜNK ermittelt. Es erfolgte eine Kontrolle der eingestellten FAU über eine erneute Messung, diesmal mit Exposuremedium als Blank. Für TA 98 wird eine FAU von  $180 \pm 10$ , für TA 100 von  $45 \pm 5$  benötigt.

#### **2.1.4 Testung**

Beide Bakterienstämme TA98 und TA100 wurden mit den oben beschriebenen Kontrollen belastet. Dazu wurden 490 µL Bakterienkultur mit 10 µL Probe belastet, um ein finales Volumen von 500 µl in 24-Wellplatten zu erreichen. Anschließend wurden die Ansätze bei 37 °C und 150 rpm für 100 min inkubiert. Nach den 100 min wurden in jedes der Bakterienansätze 2,5 ml Reversionsindikatormedium hinzugegeben.

### 2.1.5 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 (vgl. 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 enthalten.

## 2.2 Durchführung des Ames- $\mu$ RAMOS-Tests

### 2.2.1 Vorkulturführung

Zur Generierung der erforderlichen Bakterienzahl für den Ames-Test wird eine ÜNK in der RAMOS-Kolbenanlage durchgeführt. Hierzu werden 20 mL mod. Ames-Exposure-Medium (20 mg/L Histidin; entsprechend dem optimierten Medium aus [2]) frisch in einem 250 mL RAMOS-Kolben angemischt, mit Ampicillin versetzt und mit 200  $\mu$ L einer Kryokultur inokuliert.

Der Kolben wird zunächst in die auf 12°C temperierte Schüttlerhaube eingesetzt und befestigt. Mithilfe einer Schüttlersteuerung wird die Kultivierung automatisch ca. 12 h vor dem Startzeitpunkt der Exposition gestartet, indem die Temperatur auf 30°C angehoben und die Schüttelfrequenz auf 250 rpm bei einem Schütteldurchmesser von 50 mm gestellt wird.

Sobald der vollständige Verbrauch des vorgelegten Histidins als Zweitsubstratlimitierung [13] in der OTR sichtbar wird, kann die Vorkultur abgebrochen und der Kolben entnommen werden.

### 2.2.2 Exposition

Zur Vorbereitung der Exposition wird 1,2x konzentriertes mod. Ames-Exposure-Medium [2] frisch angesetzt und mit 5 mg/L Histidin supplementiert. Für einen vollständigen Test wird S9-Enzymmix, wie in ISO 11350 beschrieben, angesetzt.

Die optische Dichte (OD) der Vorkultur wird mit einem Photometer bei 595 nm bestimmt. Alle OD-Messungen erfolgen mit drei technischen Replikaten. Es wird so verdünnt, dass die Messwerte zwischen 0,1 und 0,3 liegen. Die OD wird über eine Kalibrierung in Formazine Attenuation Units (FAU) umgerechnet und daraus das benötigte Kulturvolumen für die Inokulation des Mediums bestimmt. Für TA 98 wird eine FAU von  $180 \pm 10$ , für TA 100 von  $45 \pm 5$  eingestellt und durch eine erneute OD-Messung bestätigt. Im neuen 96-Well Maßstab wird die Zelldichte für den Stamm TA 100 abweichend auf  $90 \text{ FAU} \pm 5$  eingestellt.

Anfertigung der Mastermixe: Zum inokulierten Medium wird im Verhältnis 1:50 die zu testenden Chemikalienverdünnungen oder die Arbeitslösung der Kontrolle, d.h. reines DMSO oder Nitrofurantoin (NF) für TA 100, 2-Nitrofluoren (2-NF) für TA 98 bzw. 2-Aminoanthracen für beide Stämme bei Verwendung von S9 zugegeben. Die Hälfte der Ansätze wird darüber hinaus nach ISO 11350 mit dem vorbereiteten S9-Enzymmix versetzt.

Bei Durchführung des Ames-RAMOS-Tests im 250 mL-Schüttelkolben wird ein Kolben je mit 20 mL Mastermix befüllt, die Kolben in die RAMOS-Anlage eingesetzt und über 48 h bei 30°C, 250 rpm und 50 mm Schütteldurchmesser geschüttelt.

Bei Durchführung des Tests in der  $\mu$ RAMOS-Anlage (48-Well Maßstab) wird pro Well einer 48-Well RoundPlate je 2,4 mL Mastermix eingefüllt. Dabei werden je drei Wells mit dem gleichen Mastermix versehen. Anschließend wird die Platte mit einer Gas-permeablen AeraSeal-Folie verschlossen und in die 48-Well  $\mu$ RAMOS-Anlage eingesetzt. Sie wird über 48 h bei 30°C, 700 rpm und 3 mm Schütteldurchmesser geschüttelt.

Bei Durchführung des Tests in der  $\mu$ RAMOS-Anlage (96-Well Maßstab) wird pro Well einer 96-Well DeepWellPlate (round) je 1 mL Mastermix eingefüllt, dabei werden mindestens drei Wells mit dem gleichen Mastermix versehen. Anschließend wird die Platte mit AeraSeal-Folie verschlossen und in die 96-Well  $\mu$ RAMOS-Anlage eingesetzt. Sie wird über 48 h bei 30°C, 1000 rpm und 3 mm Schütteldurchmesser geschüttelt.

Die Auswertung erfolgt im Anschluss rein über die online-Daten der OTR. Die Zeitpunkte, zu denen nach dem initialen Anwachsen auf Histidin das Wachstum der Revertanten OTR-Werte von 4 mmol/L/h für TA 100 erreicht bzw. 3,5 mmol/L/h für TA 98 erreicht sind, werden



ausgelesen. Mit diesen Werten bzw. der Differenz zur Negativkontrolle kann die Mutagenität der Testsubstanz beurteilt werden [1, 2].

## **2.3 Bestimmung der Wachstumsraten**

### **2.3.1 Wachstumsdichtebestimmung (GU)**

Um das Wachstum der unterschiedlichen Bakterienstämme zu vergleichen, wurde die Vorkulturführung wie in Schritt 2.1.1. beschrieben durchgeführt. Dazu wurden mehrere Bakterienstämme mit der gleichen Bezeichnung TA98 und TA100 kultiviert. Diese Stämme stammten von den Kooperationspartnern Hydrotox, AVT.BioVT, wie auch weiteren Laboren, die sich bereit erklärt haben, an der Untersuchung teilzunehmen. Nach einer Inkubation von 8,5 h bei 37°C wurde die bakterielle Dichte wie 2.1.3 beschrieben bestimmt.

### **2.3.2 Wachstumsratenbestimmung mittels RAMOS-Anlage**

Für die Bestimmung der maximalen Wachstumsraten wurden Kultivierung aller Stammchargen in der RAMOS-Anlage durchgeführt. Analog zur Vorkulturführung für den Fluktuationstest wurden in einem 250 mL Erlenmeyerkolben zunächst 20 mL Oxoid Nutrient Broth #2 mit Ampicillin versetzt und mit 20 µL einer Kryokultur inokuliert. Nach einmaliger Verwendung wurde die Kryokultur verworfen, um Kontaminationen und Revertantenbildung vorzubeugen. Die Kultivierung auf Komplexmedium erfolgte über 8 h bei 37°C, 250 rpm und 50 mm Schütteldurchmesser in der RAMOS-Anlage. Für die Bestimmung der Wachstumsrate auf Minimalmedium wurden 20 mL steriles mod. Ames-Exposure-Minimalmedium (4,3 g/L Glucose, 20 mg/L Histidin) in einen sterilen 250 mL RAMOS-Kolben gefüllt, mit 200 µL Inokulum aus der Vorkultur versetzt und bei 30°C, 250 rpm und 50 mm Schütteldurchmesser kultiviert. Die Dauer der RAMOS-Messzyklen betrug 20 Minuten, sodass drei OTR-Messwerte pro Stunde aufgenommen werden konnten.

Die maximale Wachstumsrate wurde wie von Stöckmann et al. beschrieben durch exponentiellen Fit der OTR-Messwerte während der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt [17].

## **2.4 Bestimmung der Ausbeutekoeffizienten**

Die Bestimmung der Ausbeutekoeffizienten auf Glucose und Histidin erfolgte in drei technischen Replikaten. Wie in Abschnitt 1.7 beschrieben, wurden 20 mL mod. Ames-Exposure-Medium (4,3 g/L Glucose, 20 mg/L Histidin) im 250 mL RAMOS-Kolben mit 200 µL Inokulum einer Kryokultur versetzt und bei 30°C, 250 rpm und 50 mm Schütteldurchmesser kultiviert. Die Wachstumsphasen der Kultur wurden über das Online-OTR-Signal verfolgt. Der

vollständige Verbrauch des vorgelegten Histidins wurde durch das plötzliche Abfallen der OTR angezeigt; unmittelbar darauf wurde die Kultivierung abgebrochen.

Für die Bestimmung des Ausbeutekoeffizienten ( $Y_{x/s}$ ) auf Glucose wurden je drei HPLC-Proben des sterilen, vorgelegten Mediums (Anfangskonzentration) und des Kulturüberstandes nach Abbruch (Endkonzentration) vermessen. Die verbrauchte Glucosemenge wurde durch Subtraktion der End- von der Anfangskonzentration bestimmt.

Für die Berechnung des Ausbeutekoeffizienten auf Histidin wurde der durch das OTR-Signal angezeigte vollständige Verbrauch des eingesetzten Histidins angenommen.

Für die Biotrockenmassebestimmung wurden 5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße 48 h bei 80°C vorgetrocknet, im Exsikkator abgekühlt und leer ausgewogen. Nach Abbruch der RAMOS-Kultivierung wurden in den vorbereiteten Gefäßen je 5 mL Kulturbrühe 10 min / RT / 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet für 48 h bei 80°C getrocknet. Nach dem Auskühlen im Exsikkator wurde das Gefäß ausgewogen und das entsprechende Leergewicht abgezogen. Anschließend wurde durch Division durch das Probenvolumen die Biotrockenmassekonzentration [g/L] berechnet.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Charakterisierung der Ames-Teststämme (Modul 1)

Im Projekt Ames-RAMOS (AZ 32654/01) waren bereits Unterschiede der Wachstumskinetiken zwischen Chargen der kommerziell erworbenen Teststämme *S. typhimurium* TA 98 und TA 100 aufgefallen. Ziel dieses Moduls sollte sein, diese Unterschiede an genetischen Faktoren festzumachen. Hierzu erfolgte entsprechend des optAmes-Projektantrags eine Sequenzierung verschiedener Bakterienchargen. Um eine Verbindung zu den jeweiligen Wachstumskinetiken ziehen zu können, wurden die Stammchargen darüber hinaus in der RAMOS-Anlage vermessen.

#### 3.1.1 Stammchargen-Wachstumsuntersuchungen an der Goethe-Universität (Zuarbeit Modul 1a)

Für die Wachstumsuntersuchung wurden TA98 und TA100 Ames Bakterienstämme aus unterschiedlichen Bezugsquellen verwendet. Diese wurden wie unter 2.1.1 beschrieben sowohl in einem Komplexmedium als auch in einem Minimalmedium kultiviert. Es zeigten sich Unterschiede in der Wachstumsrate und somit der nach 8,5 h erhaltenen FAU. Hierbei konnte ein Teil der Unterschiede zunächst auf eine undefinierte FAU, die zur Erstellung der Kryos genutzt wurde, zurückgeführt werden. Es wurde zwar für die jeweiligen Bakterienchargen vermerkt, dass sie aus einer Kultur im exponentiellen Wachstum erstellt worden sind. Allerdings wurde die FAU für die jeweiligen Kryos nicht genannt. Aus diesem Grund wurden aus den erhaltenen Kryos zunächst Bakterienchargen mit einer hohen Dichte im Komplexmedium erstellt und anschließend wurden die Bakterien in mindestens einer FAU von 1800 eingefrorenen. Diese definierten Kryos wurden für die weiteren Untersuchungen genutzt und ebenfalls mit den Projektpartner AVT.BioVT und dem Dienstleister Hydrotox geteilt.

Zunächst wurden die neu erstellten Kryos in unterschiedlichen Animpfdichten von 20 µL und 200 µL im Komplexmedium kultiviert und für einen Ames-Test mit der jeweiligen Negativ-, Lösungsmittel- und der Positivkontrolle genutzt. Die Ergebnisse zeigen Chargenunterschiede bei den Stämmen in Bezug auf die erreichbare Bakteriendichte nach 8,5 h. Des Weiteren zeigen die Stämme unterschiedliche Sensitivitäten in Bezug auf die Konzentration der jeweiligen Positivkontrolle.

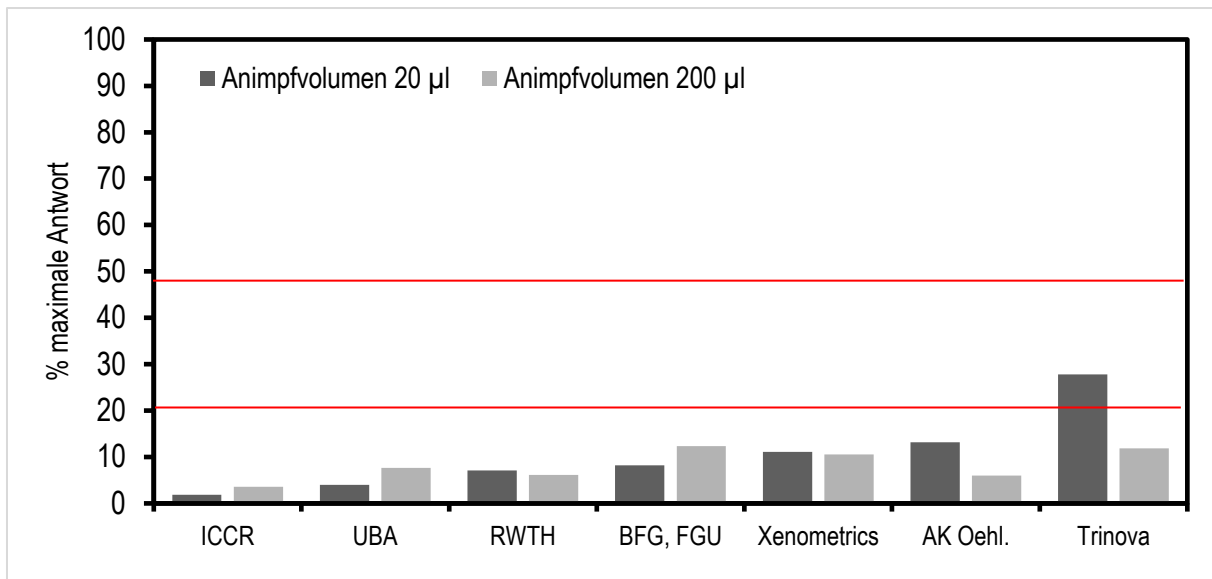
Beim Vergleich der beiden Stämme TA98 und TA100 konnte, wie zu erwarten, ein unterschiedliches Verhalten der Bakterien in Bezug auf die Wachstumsrate beobachtet werden. Zunächst wurde festgestellt, dass bei einer Animpfdichte von 20 µL die Varianz in den jeweiligen Experimenten der beiden Stämme höher war. Das bedeutet, dass die erhaltenen

optischen Dichten (FAU) in den drei Replikaten stärker zueinander abwichen als im Ansatz mit 200 µL Animpfvolumen. Zugleich konnte festgestellt werden, dass bei einem Animpfvolumen von 200 µL insgesamt ein höheres Wachstum nach der Inkubationszeit beobachtet wurde. Bei einer Betrachtung der fünf TA98 Stämme war die finale FAU 1,07-fach höher bei einer Inokulation mit 200 µl im Vergleich zu einer Inokulation mit 20 µL (Daten nicht gezeigt). Im Fall von den fünf verschiedenen TA100 Stämmen war dies noch deutlicher. Hier war das Wachstum 1,13-fach höher bei einem Animpfvolumen von 200 µL (Daten nicht gezeigt). Über alle Stämme hinweg (fünf TA 98 und fünf TA100) lag das mittlere maximal erreichbare Wachstum bei ca. 2800 FAU unabhängig davon, ob es der Stamm TA98 oder der Stamm TA100 war (Tabelle 3.1). Die Wachstumsunterschiede innerhalb der Stämme TA98 und TA100 lagen im Bereich von 562 FAU und 766 FAU.

**Tabelle 3.1: Optische Dichten der Stämme TA 98 und TA100 nach Wachstum auf Komplexmedium**

TA98 im Komplexmedium			
	Mittelwert [FAU]	Standardabweichung	Variationskoeffizient
Trinova	2242	164	7
ICCR	2371	563	24
UBA	2437	108	4
Xenometrics	2510	84	3
BFG, FGU	2601	248	10
RWTH	2700	318	12
AK Oehl.	2804	281	10
TA100 im Komplexmedium			
	Mittelwert [FAU]	Standardabweichung	Variationskoeffizient
BFG, FGU	2036	690	34
ICCR	2470	451	18
Xenometrics	2511	235	9
Trinova	2614	181	7
RWTH	2650	149	6
AK Oehl.	2669	123	5
UBA	2802	78	3

Im nächsten Schritt wurden die Ergebnisse der Wachstumsversuche in Relation zu den Ergebnissen des Ames Fluktuationstests mit den jeweiligen Referenzsubstanzen gebracht. Hierbei wurde der Einfluss des Übertrags von Histidin aus der Vorkultur, wie in Kauffmann et al. 2020 berichtet [1, 2]., auf die Versuchsergebnisse betrachtet. Hierfür wurden Tests durchgeführt, bei denen das Exposuremedium entgegen der ISO Vorschrift kein Histidin enthielt. Im Referenzansatz wurde, wie in der ISO 11350 Vorschrift vorgegeben, 1 mg/mL Histidin dem Exposuremedium hinzugegeben.

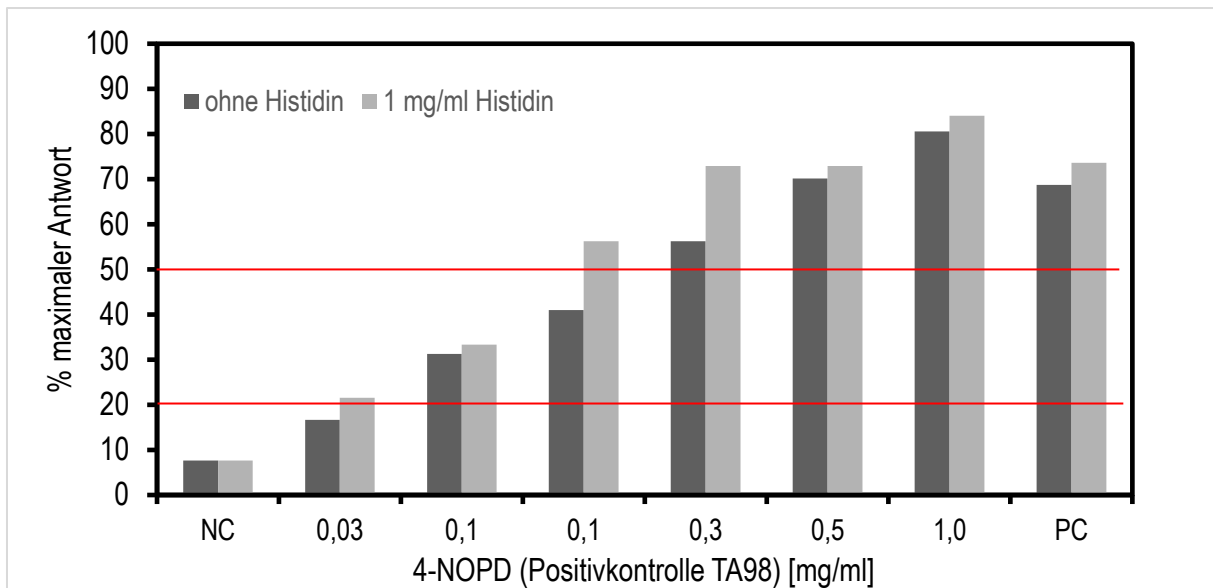


**Abbildung 3.1: Spontan-Revertanten (Negativkontrolle) der TA98 Stammchargen nach Animpfvolumen**

Darstellung der Spontan-Revertanten in den jeweiligen TA98 Stämme in % maximaler Antwort des Testsystems in Abhängigkeit von Animpfvolumen (20 µL in hellgrau und 200 µL in dunkelgrau) bei der Negativkontrolle.

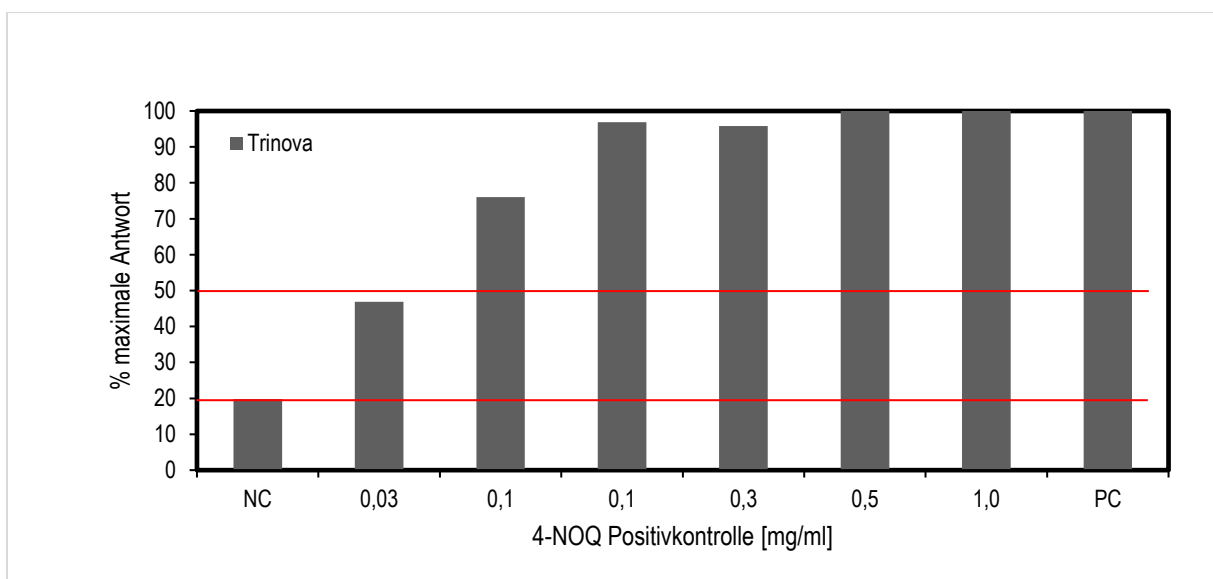
Die Ergebnisse der Untersuchungen mit den jeweiligen Referenzsubstanzen zeigten für die fünf Teststämme des TA98, dass das geringe Animpfvolumen von 20 µL eine Erhöhung der Spontanrevertanten zur Folge hat (cf. Abbildung 3.1). Die Zugabe von 1 mg/mL Histidin wirkte sich auf die Sensitivität des Teststamms aus. So zeigten die Teststämme, die Histidin im Exposuremedium enthielten, schon bei niedrigerer Konzentration der Referenzsubstanz eine Zunahme der Revertanten (Abbildung 3.2).

Der Trinova-Teststamm, der in Tabelle 3.1 die geringste FAU in der Vorkultur zeigte (2242 FAU), war auch im Ames Fluktuationstest ein Stamm, der viele Spontan-Revertanten zeigte. Die hohe Anzahl (>20,8 %) an Spontan-Revertanten wurden in den Ansätzen mit der Lösungsmittelkontrolle bei einem Animpfvolumen von 20 µL beobachtet (cf. Abbildung 3.1), wodurch die Untersuchungen meist invalide waren. Im Ansatz mit 200 µL zeigte der Stamm eine hohe Sensitivität gegenüber der entsprechenden Positivkontrolle. So konnte schon in niedrigen Konzentrationsbereichen eine starke Zunahme der Revertanten beobachtet werden (cf. Abbildung 3.3). Allerdings war der Test erneut invalide, da zu viele Spontanrevertanten in der Negativkontrolle vorkamen. Insgesamt zeigte der TA98 Trinova Stamm eine hohe Variabilität.



**Abbildung 3.2: Ergebnisse der Positivkontrolle mit und ohne Histidin im Exposuremedium**

Prozent der maximalen Antwort des TA98 Stamm von AK Oehl. in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration der Positivkontrolle 4-NOPD ohne und mit Zugabe von 1 mg/mL Histidin im Exposuremedium.



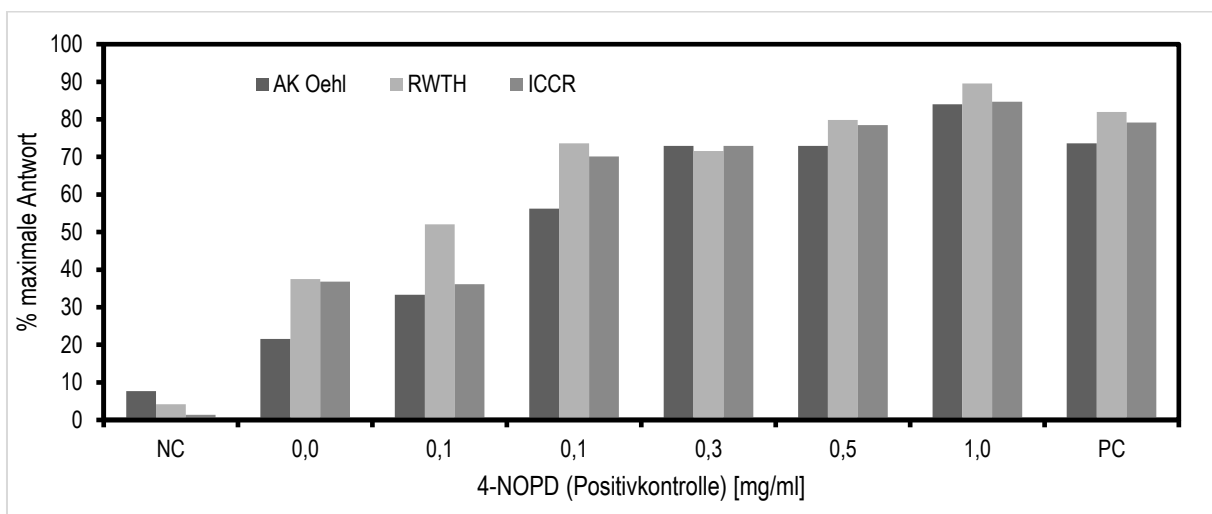
**Abbildung 3.3: Positivkontrollwerte zweier Teststämme im Vergleich**

Darstellung der % maximalen Antwort der Teststämme TA98 RWTH und TA98 Trinova auf die Belastung mit der Positivkontrolle 4-NPOQ

Im Falle des am besten wachsenden Teststamms (AK Oehl., 2804 FAU) wurde bei einem Animpfvolumen von 20 µl beobachtet, dass die Spontan-Revertanten stark zunahmen (Werte

>20,8 %), was dazu führte, dass der Test invalide war (Daten nicht gezeigt). Daraus wurde geschlossen, dass bei einem geringen Animpfvolumen die Population der Bakterien nicht besonders homogen ist und so wenige Spontan-Revertanten einen größeren Anteil an der Gesamtpopulation erhalten können. Dieses zufällige Ereignis ist bei einem kleinen Animpfvolumen begünstigt. Beim Animpfvolumen von 200  $\mu\text{L}$  wurde seltener eine Zunahme der Spontanrevertanten (<20,8 %) beobachtet.

Nach ausführlicher Datenanalyse wurden TA98 Teststämme ausgewählt, die eine niedrige Spontan-Revertanzahl im Animpfvolumen von 200  $\mu\text{L}$  zeigten und ebenfalls sensitiv auf die Positivkontrolle reagierten. Mit diesen Kriterien wurden die Stämme AK Oehl., RWTH und ICCR für die weitere Untersuchungen im Minimalmedium ausgewählt.

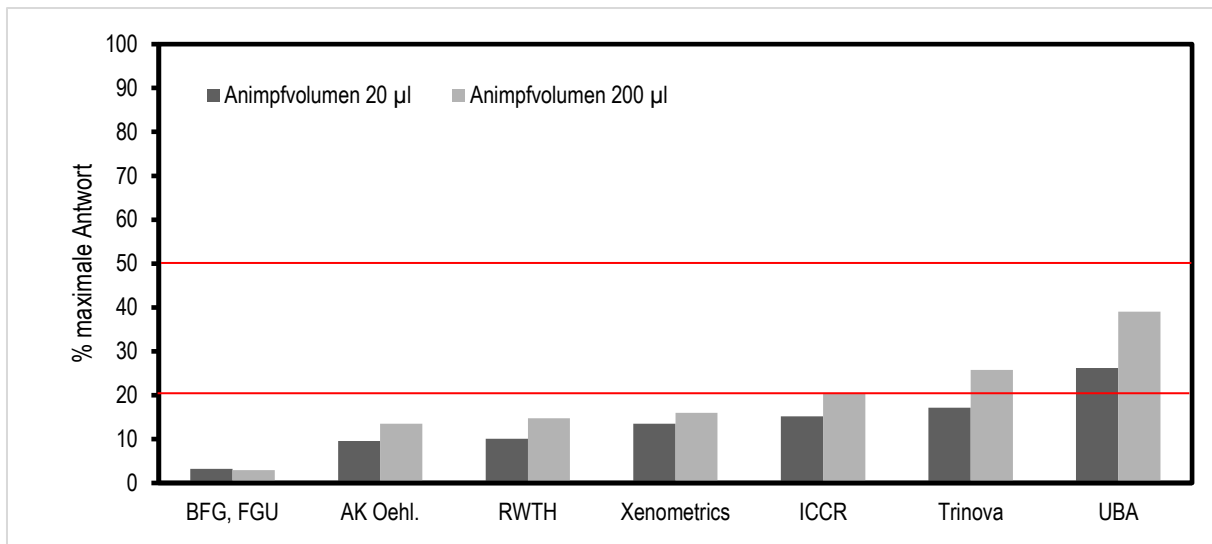


**Abbildung 3.4: Positivkontrollwerte ausgewählter TA 98 Stämme**

Ausgewählte TA 98 Stämme dargestellt mit % maximale Antwort auf die Positivkontrolle 4-NOPD.

Für die Teststämme des TA100 zeigten die Ergebnisse einen umgekehrten Zusammenhang zwischen dem Animpfvolumen und der Anzahl an Spontan-Revertanten (cf. Abbildung 3.4). In dieser Untersuchung korrelierte das höhere Volumen von 200  $\mu\text{L}$  mit einer höheren Anzahl an Spontan-Revertanten in der Negativkontrolle.

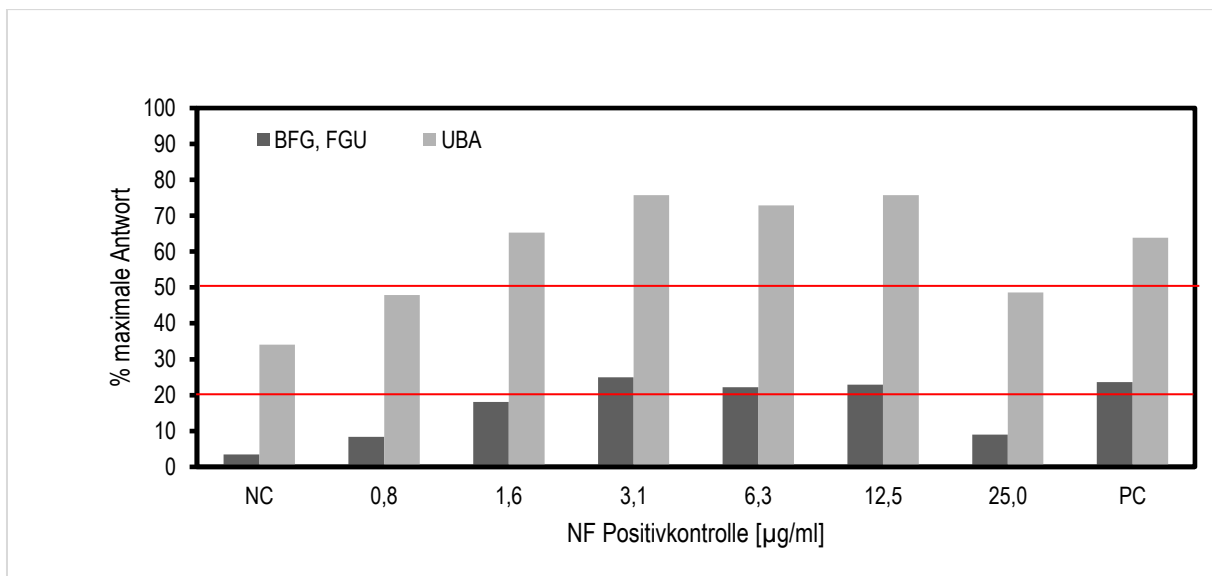
Der Teststamm mit dem geringsten Wachstum im Komplexmedium (BFG, FGU, 2036 FAU) zeigte einen niedrigen Anteil (<20,8 %) an Spontan-Revertanten, wodurch die Untersuchungen in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle valide waren. Jedoch zeigte der BFG-Stamm nur eine geringe Reaktion auf die Positivkontrolle und es wurden maximal 54 % Revertanten beobachtet. Meist war die Revertanzahl gering und der Test war bezogen auf die Positivkontrolle invalide.



**Abbildung 3.5: Positivkontrollwerte für TA 100 abhängig vom Animpfvolumen**

Darstellung der % der maximalen Antwort im Ames Test mit den Teststämmen TA100 unter Berücksichtigung des Animpfvolumens von 20 µL oder 200 µL.

Im Gegensatz dazu zeigte der Stamm mit dem höchsten Wachstum (UBA 2802 FAU) eine erhöhte Anzahl (> 20,8 %) von Spontan-Revertanten in der Lösungsmittelkontrolle und war dadurch in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle invalide. Dieser Stamm zeigte jedoch eine sensitive Reaktion auf die Positivkontrolle und es wurde bei einer geringen Konzentration der Positivkontrolle (1,6 mg/ml NF) >50 % der maximalen Antwort angezeigt (cf. Abbildung 3.5).

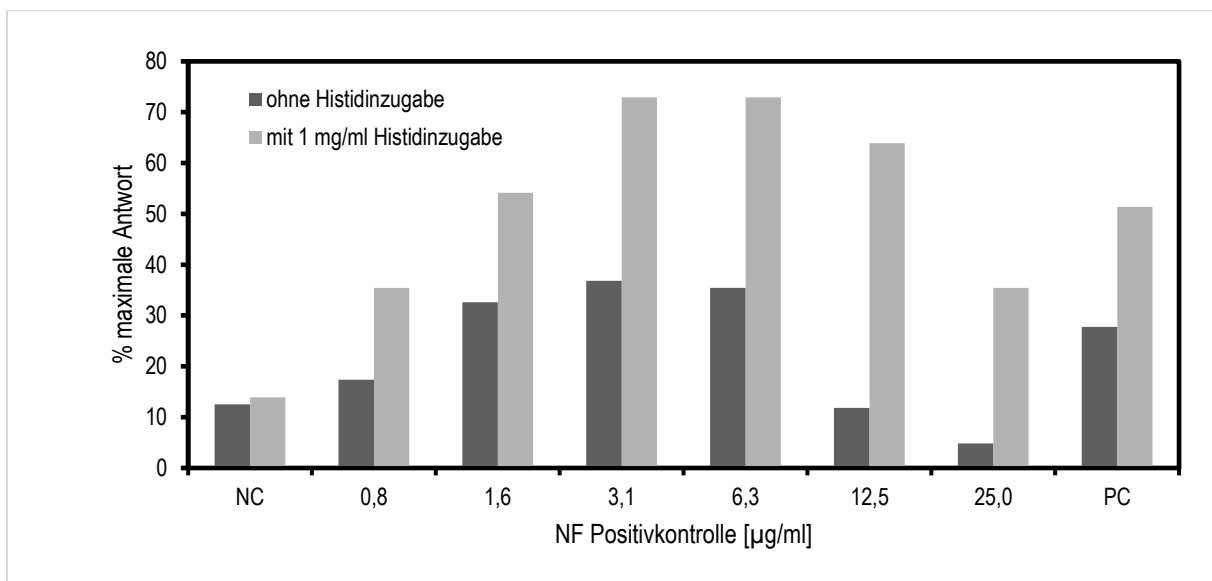


**Abbildung 3.6: Positivkontrollwerte für TA100 BFG, FGU und UBA**

Darstellung der % der maximalen Antwort der Teststämmen TA100 BFG, FGU und TA100 UBA auf die entsprechende Positivkontrolle.



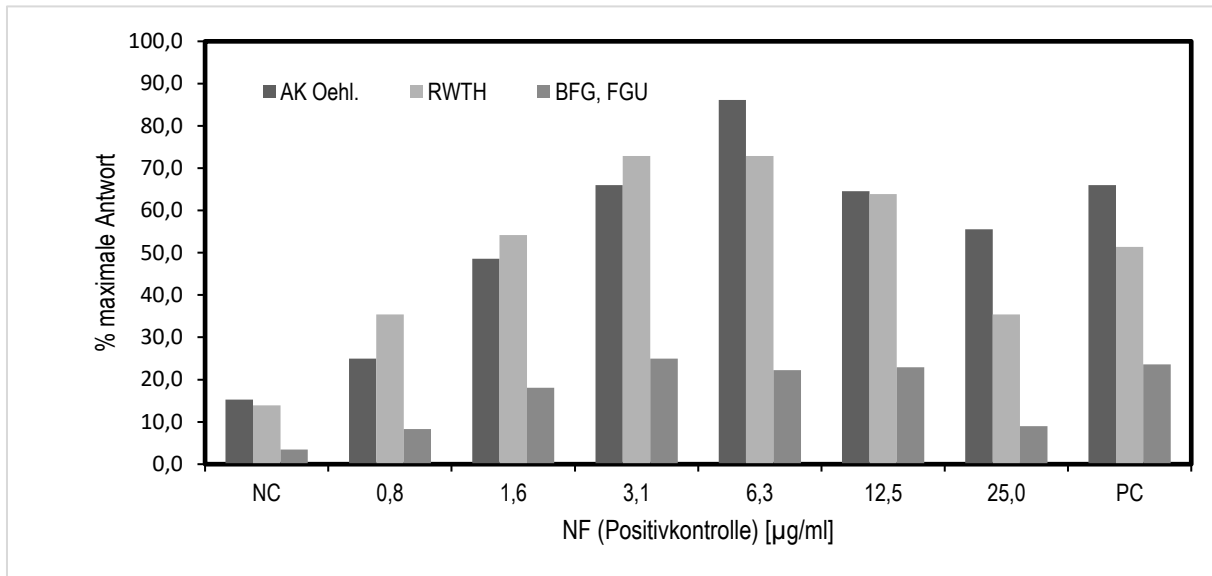
Es wurde hier ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Zugabe von Histidin ins Exposuremedium und der Sensitivität des Testsystems aufgezeigt. Nach Zugabe reagierte der Stamm nochmal zusätzlich sensitiver und war in Bezug auf die Positivkontrolle valide. Diese Beobachtung war für den RWTH-Stamm noch ausgeprägter (Abbildung 3.7). Ohne Zugabe von Histidin reagierte der RWTH-Stamm nicht ausreichend auf die Positivkontrolle und die Revertanzahl war <52 %. Erst nach Zugabe von Histidin war der Test valide. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Positivkontrollsubstanz Nitrofurantoin in den höchsten Konzentrationen zytotoxisch wirkt. Ein Zusammenhang zwischen dem Animpfvolumen und den Testergebnissen für die fünf Stämme des TA100 war nicht erkennbar (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.7: Positivkontrollwerte für den Stamm TA 100 RWTH**

Reaktion des Teststammes TA100 RWTH dargestellt als % der maximalen Antwort auf die Positivkontrolle NF ohne und mit Zugabe von 1 mg/ml Histidin im Exposuremedium.

Die Datenanalyse der TA100 Teststämme zeigte, dass die Stämme AK Oehl. und RWTH für weitere Untersuchungen geeignet sind. Zusätzlich wurde der Stamm BFG, FGU für die weitere Untersuchungen im Minimalmedium als Vergleichselement genutzt (cf. Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8: Positivkontrollwerte für TA 100 AK Oehl., RWTH, BFG, FGU**

Vergleichende Darstellung der % maximalen Antwort der TA100 Stämme AK Oehl., RWTH und BFG, FGU auf die Positivkontrolle NF.

Im nächsten Schritt wurden die ausgewählten Stämme an die Kulturführung im Minimalmedium adaptiert. Dazu wurde zunächst in Kooperation mit der RWTH der Zeitpunkt bestimmt, an dem die Stämme im Minimalmedium ihr maximales Wachstum auf Histidin erreichen. Hierzu wurden die RAMOS-Anlage und das Kultivierungsprotokoll nach Kauffmann et al 2020 genutzt. In den Untersuchungen wurde eine optimale Kultivierungsdauer von 11,7 h bei einer parallelen Kultivierung der ausgewählten TA98 und TA100 Stämme bestimmt. In einer Kulturführung auf Minimalmedium (bei 30°C und 250 rpm) erreichten dabei alle Stämme zu diesem Zeitpunkt ihr maximales Wachstum und zugleich war das Histidin im Minimalmedium verbraucht. Unter diesen Bedingungen wurden jeweils drei ausgewählte Teststämme kultiviert und im Testdesign wurde die Histidin-Menge im Exposuremedium mit 1 mg/mL (entspricht ISO 11350), 2 mg/mL und 5 mg/mL variiert.

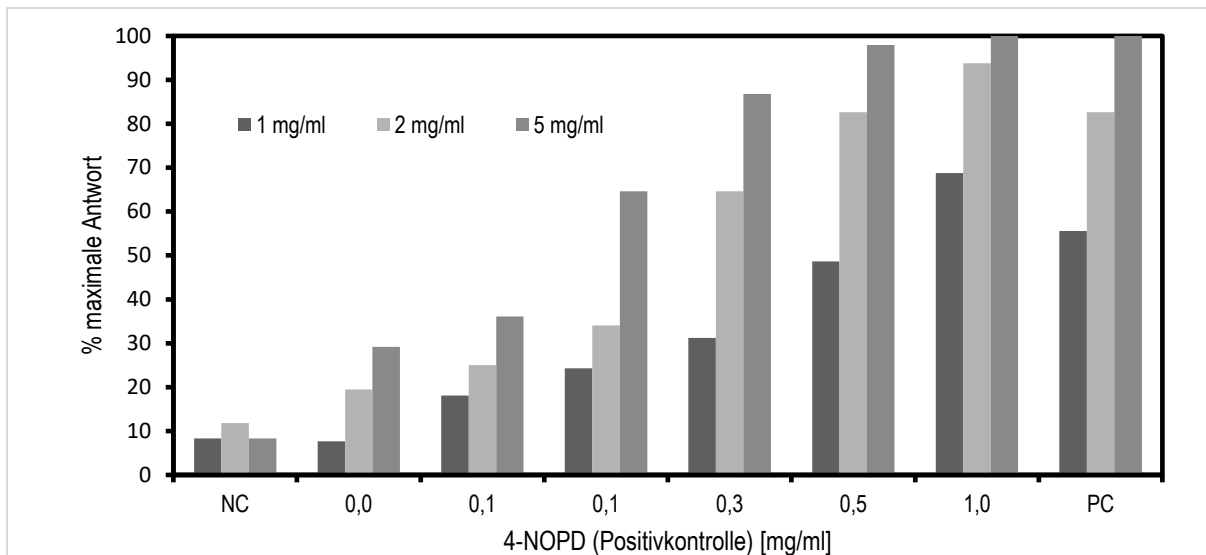
Die Wachstumsergebnisse (cf. Tabelle 3.2) zeigten für den TA98 AK Oehl. Stamm ein vergleichbares Wachstum (2762 FAU) wie im Komplexmedium. Die Stämme der RWTH und ICCR zeigten eine um 15 % (2268 FAU vs. 2700 FAU) bzw. um 9 % (2159 FAU vs. 2371 FAU) erniedrigte FAU im Minimalmedium im Vergleich zum Komplexmedium. Die ausgewählten Teststämme TA100 zeigten für die Stämme AK Oehl. und RWTH vergleichbare Ergebnisse im Minimalmedium (2340 FAU und 2216 FAU) wie im Komplexmedium (2669 FAU und 2650 FAU). Im Gegensatz dazu zeigte der TA100 Teststamm der BFG, FGU im Minimalmedium nur ein geringes Wachstum von 558 FAU im Vergleich zu 2036 FAU im Komplex-Medium. Eine

mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte sein, dass für den Stamm TA100 BFG, FGU gewisse Nährstoffkomponenten fehlen könnten.

**Tabelle 3.2 Wachstumsergebnisse (3 ausgewählter) Teststämme TA98 und TA100 im Minimalmedium**

TA98 im Minimalmedium			
	Mittelwert [FAU]	Standardabweichung	Variationskoeffizient
ICCR	2159	483	22
RWTH	2268	172	8
AK Oehl.	2762	479	17
TA100 im Minimalmedium			
	Mittelwert [FAU]	Standardabweichung	Variationskoeffizient
BFG, FGU	558	69	12
RWTH	2216	62	3
AK Oehl.	2340	168	7

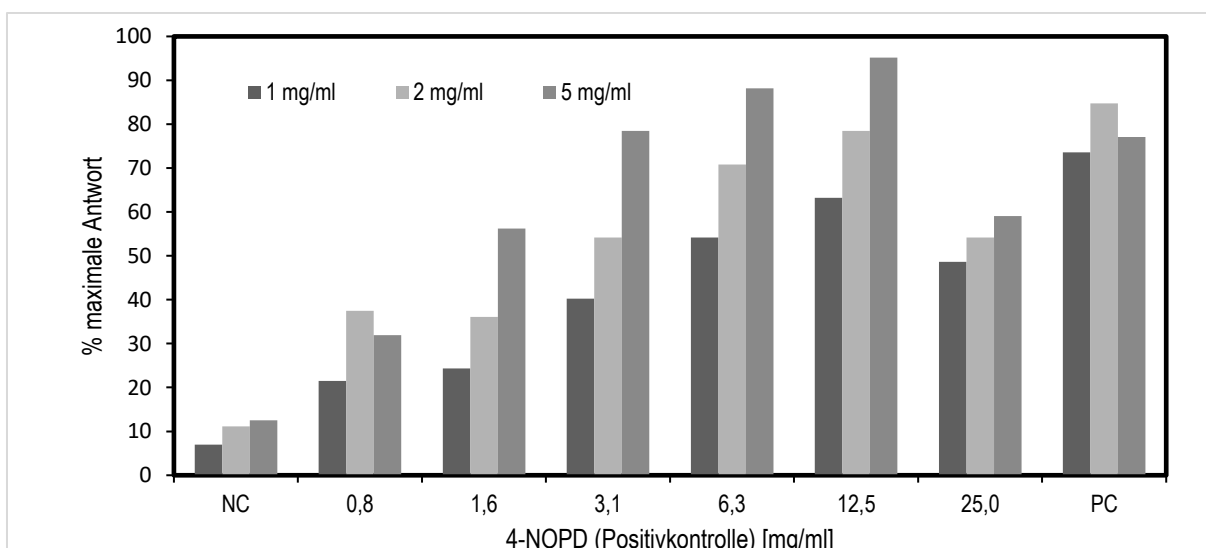
Die Teststämme TA98, die schon auf Komplexmedium im Exposuremedium mit Histidin zuverlässigere Ergebnisse erzeugt hatten, zeigten auch bei Vorkulturführung im Minimalmedium einen entsprechenden Trend. Hier war besonders bei der Belastung mit der Positivkontrolle die Reproduzierbarkeit erhöht. Dies war zu erwarten, da hier durch die Kultur auf Minimalmedium und den entsprechenden Stopp erst nach 11,7 h kein Histidin aus der Vorkultur übertragen wird. Somit ist die Zugabe des Histidins zum Exposuremedium anders als beim Komplexmedium notwendig. Zugleich zeigte sich eine Korrelation, dass die Zellen sensitiver auf die Positivkontrolle mit erhöhter Histidin-Konzentration im Exposuremedium reagieren. Hier ist die Dosis-Wirkungskurve der Positivkontrolle immer weiter nach links verschoben, so dass immer niedrigere Konzentration an Positivkontrolle zu einer Erhöhung der Revertanten führten. Exemplarisch ist die Abhängigkeit von Histidin im Exposuremedium für den Stamm TA98 AK Oehl. in Abbildung 3.9 dargestellt.



**Abbildung 3.9 Performance des TA 98 AK Oehl. auf Minimalmedium nach supplementierter Histidinmenge**

Die Empfindlichkeit des TA98 AK Oehl. abhängig von der zugegebenen Histidinmenge (1,2 oder 5 mg/mL).

Die Ergebnisse der ausgewählten TA100 Stämme zeigen ähnliche Ergebnisse wie die Untersuchungen mit dem TA98 Stamm. Ein Trend zu einer höheren Reproduzierbarkeit durch die Verwendung des Minimalmediums ist erkennbar. Zugleich zeigen die Experimente, dass die Sensitivität der Teststämme bei höheren >2 mg/mL Histidin-Konzentrationen verbessert wird und schon niedrigere Konzentrationen der Positivkontrolle zu einer Erhöhung der Revertanzahl führt. Exemplarisch ist die Abhängigkeit von Histidin im Exposuremedium für den Stamm TA100 AK Oehl. in Abbildung 3.10 dargestellt.



**Abbildung 3.10 Performance des TA 100 AK Oehl. auf Minimalmedium**

Die Empfindlichkeit des TA100 AK Oehl. abhängig von der zugegebenen Histidinmenge (1,2 oder 5 mg/mL).

Die Histidin-Konzentration von 1 mg/mL war für die Stamm TA100 AK Oehl. nicht ausreichend, um eine höhere Revertanzahl als 83,3 % bzw. 73 % zu erreichen. Dies ist allerdings nicht kritisch, da ein Test bei mindestens 52 % der maximalen Antwort valide ist. Die Histidin-Konzentrationen von 2 und 5 mg/mL erlaubten Revertanzahlen >95 %. Für den Teststamm TA100 wurde eine Zytotoxizität der Positivkontrolle bei höheren Substanz-Konzentrationen beobachtet, was den Ergebnissen der Untersuchungen auf Komplexmedium entspricht.

Zusammenfassend zeigte sich, dass beide Teststämme TA98 und TA100 mit 200 µL Animpfvolumen und 2 mg/mL Histidin im Exposuremedium erfolgreich an eine Kultur im Minimalmedium adaptiert werden konnten. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde die Firma Hydrotox GmbH beauftragt, mit dem Ziel die Vergleichbarkeit der Methodik auf Komplexmedium und die verbesserte Kulturführung auf Minimalmedium in einem Ringversuch zu demonstrieren.

### **3.1.2 Sequenzierung verschiedener Chargen der Ames-Teststämme (Modul 1a)**

Die Extraktion der genomischen DNA zeigte gute Ergebnisse und alle Qualitätskriterien wurden erfüllt, so dass die Proben geeignet waren für die weitere Analyse. Für die Sequenzierung wurden die Proben in Kooperation mit dem TBG in Frankfurt analysiert. Die erhaltenen Daten zeigten eine gute Datenqualität und wurden anschließend in Kooperation mit dem Arbeitskreis angewandte Bioinformatik an der GU analysiert.

Es zeigte sich zunächst, dass sich die Stämme TA100 und TA98 grundsätzlich in ihrer Genomlänge unterscheiden. Der Stamm TA98 zeigte im Mittel eine Genomlänge von 4.796,801 Basen und der Stamm TA100 eine von 4.875,140 Basen. Somit war das Genom des Stamms TA100 78.338 Basen länger. Eine Vorhersage der enthaltenen Gene zeigte für den Stamm TA98 4.801 und für den Stamm TA100 4.882 Zuordnungen. Die Differenz zwischen den beiden Stämmen lag bei 80 Genen. Um auszuschließen, dass diese Differenz auf die Datenlage zurückzuführen ist, wurde eine Analyse zur Vollständigkeit des Genoms eines jeden Stamms durchgeführt. Hierbei zeigten alle Proben eine Vollständigkeit von mindestens 98,2 % und die Differenz zwischen den Stämmen betrug maximal 0,4 % was ca. 20 Genen entspricht. Somit können die Unterschiede zwischen den beiden Stämmen nicht durch die Datenqualität erklärt werden.

Aufbauend auf diesen Daten wurden die phylogenetischen Profile für die Stämme TA98 und TA100 erstellt. Hier zeigten die beiden Stämme TA98 und TA100 bei 133 Genen Unterschiede zum Referenzstamm oder zu einander. In einem weiteren Schritt wurden die 133 Kandidaten-

Gene für eine Rekonstruktion des Stoffwechsels auf der Genomebene verwendet. Hierbei wurden besonders die Bereiche offenbar, in denen sich die jeweiligen Stämme TA98 und TA100 unterschieden. Die Ergebnisse der Rekonstruktion sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Hierbei zeigten die Stämme zueinander genetische Unterschiede und der Stamm TA100 zeigte eine breitere metabolische Kapazität. Eine Erklärung für die Wachstumsunterschiede innerhalb der Stämme konnte nicht gefunden werden.

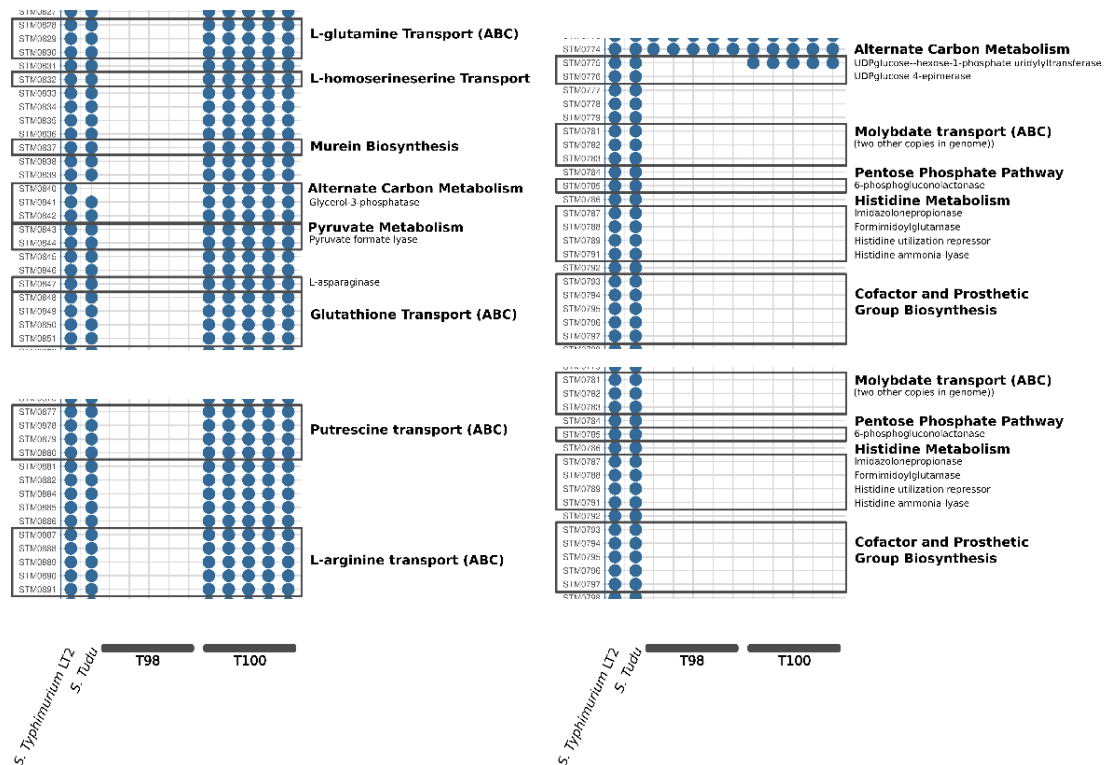


Abbildung 3.11 Darstellung der Stoffwechselwege der Stämme TA98 und TA100 im Vergleich zu den Referenzen *S. typhimurium* LT2 und *S. tudu*

### 3.1.3 Charakterisierung der Ames-Teststämme in der RAMOS-Anlage (Modul 1b)

Die Stammchargen aus Tabelle 3.3 wurden an der GU gesammelt, die Kryokulturen dort hergestellt, auf Trockeneis an die AVT.BioVT geliefert und anschließend bei -80 °C gelagert. Nach einmaliger Verwendung wurde die restliche Kryokultur verworfen, um Kontaminationen vorzubeugen und die Kühlkette nicht zu unterbrechen.

**Tabelle 3.3: Übersicht der an der AVT.BioVT vermessenen Stammchargen**

Stamm	Benennung	Organisation/Quelle	Herstellungsdatum
TA98	AK Oehl.	AK Oehlmann	2021
TA98	Trinova	Trinova	2021
TA98	UBA	Hydrotox	2012
TA98	Xenometrix	Hydrotox	2020
TA98	ICCR	ICCR Roßdorf	2021
TA98	BFG, FGU	FGU, E3T	2021
TA98	RWTH	RWTH, AVT.BioVT	2018
TA100	BFG, FGU	FGU, E3T	2021
TA100	AK Oehl.	AK Oehlmann	2012
TA100	Trinova	Trinova	2021
TA100	UBA	Hydrotox	2012
TA100	Xenometrix	Hydrotox	2020
TA100	ICCR	ICCR Roßdorf	2021
TA100	RWTH	RWTH, AVT.BioVT	2021

Abbildung 3.12 zeigt den Verlauf der OTR für die *S. typhimurium* TA98-Charge des Herstellers Xenometrix. Er wird zur Durchführung des Ames-Tests vom Dienstleister Hydrotox genutzt. Es wurden drei biologische Replikate für 8 h auf Oxoid Nutrient Broth #2 in der RAMOS-Anlage kultiviert (vgl. Kapitel 2.3.2). Die am 26.04.2021 vermessenen Replikate sind gegenüber dem Replikat vom 10.05.2021 um 0,33 h nach vorne verschoben dargestellt. Es wurde ein identischer OTR- Verlauf festgestellt.

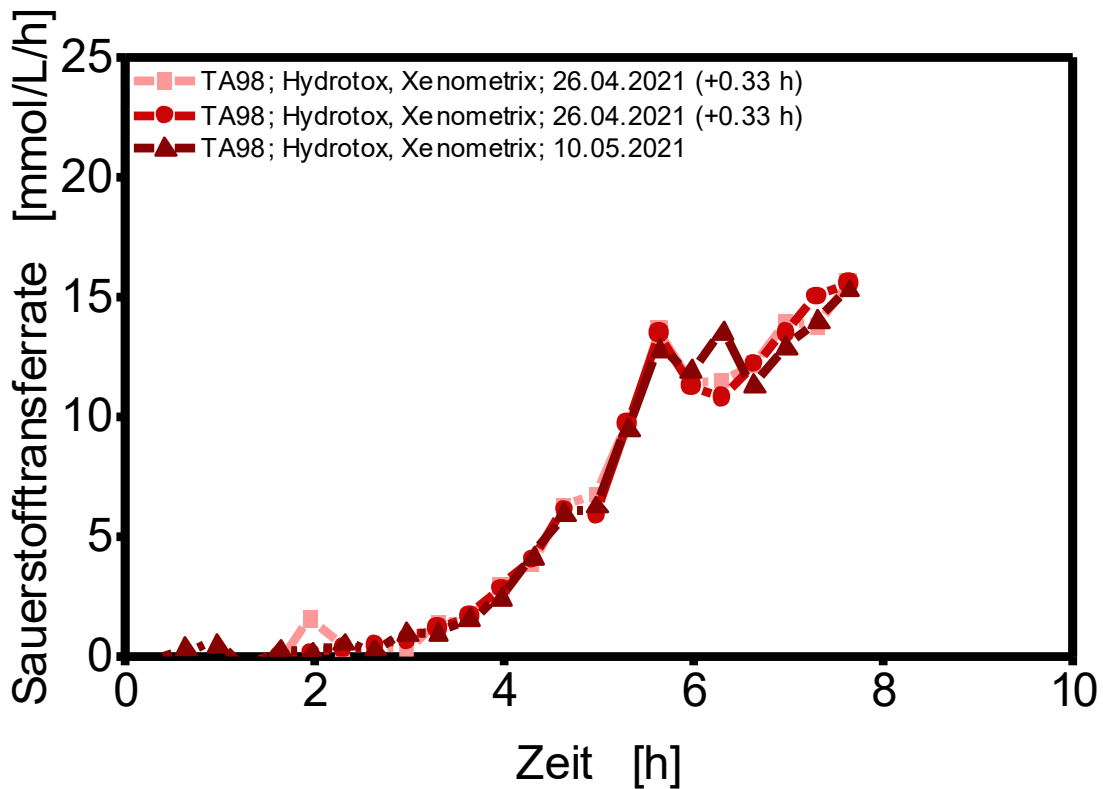


Abbildung 3.12 OTR-Verlauf für *S. typhimurium* TA 98 auf Oxoid Nutrient Broth #2, Kryocharge „Hydrotox Xenometrix“

*S. typhimurium* auf Oxoid Nutrient Broth #2 (unbekannter Histidingehalt), Inokulum 20  $\mu$ L aus Kryo, 20 mL in 250 mL RAMOS-Kolben, 250 rpm, 50 mm Schütteldurchmesser, 37 °C. Versuchsdurchführung am 26.04.2021 und 10.05.2021.

Nach einer lag-Phase von etwa 2 h ist in allen drei Replikaten exponentielles Wachstum am exponentiellen Anstieg der OTR erkennbar. Die OTR-Peaks bzw. Plateaus nach 4,7, 5,7 sowie 6,1 h weisen auf diauxisches Wachstum hin: nach dem Verbrauch einer (unbekannten) Medienkomponente kommt es zum kurzen Einbruch der OTR, bis die Stoffwechsellumstellung auf die nächst-präferierte Medienkomponente erfolgt ist. Für eine reproduzierbare Bestimmung der maximalen Wachstumsrate sollte der Verbrauch einzelner Medienbestandteile keinen Einfluss haben. Daher wurden für alle getesteten Stammchargen die OTR-Daten für die Wachstumsratenberechnung nur bis zum ersten OTR-Peak (hier nach 4,5 h) berücksichtigt.



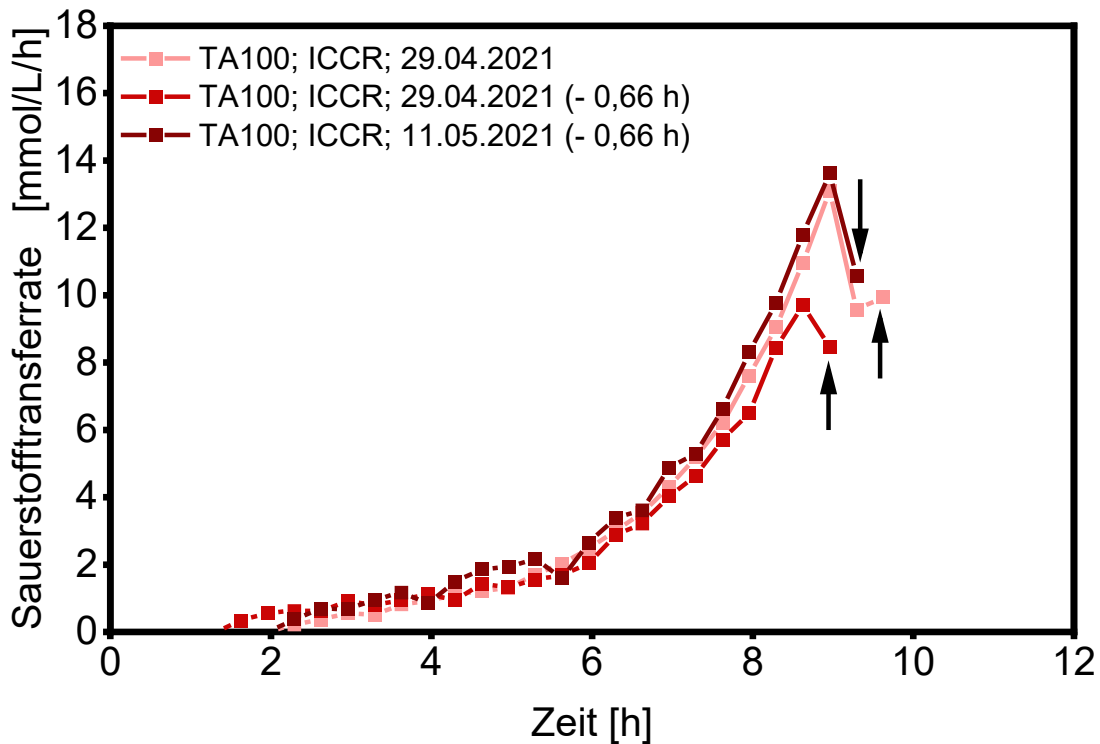
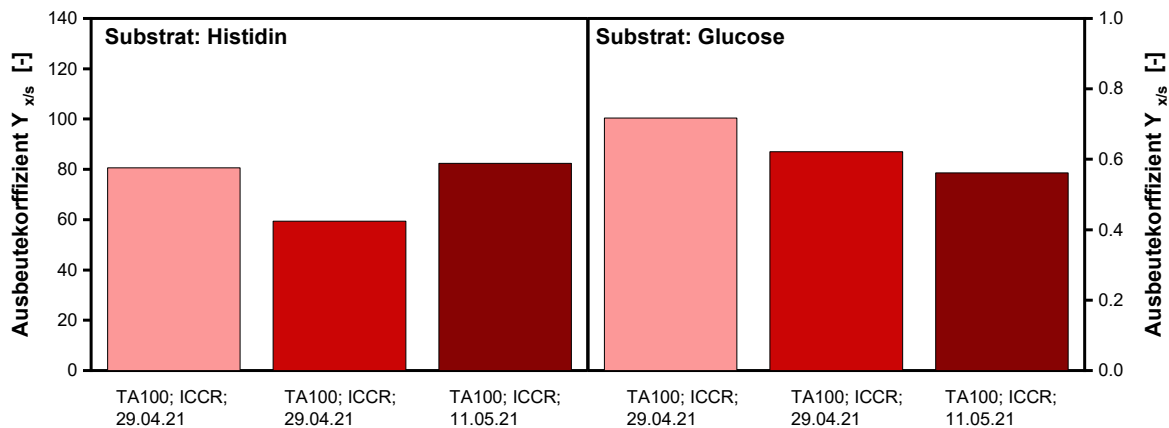


Abbildung 3.13: OTR-Verlauf für *S. typhimurium* TA 100 auf Ames-Minimalmedium, Kryocharge „ICCR“

*S. typhimurium* auf Ames-Minimalmedium (20 g/L Histidin), Inokulum 200  $\mu$ L aus Komplexvorkultur, 20 mL in 250 mL RAMOS-Kolben, 250 rpm, 50 mm Schütteldurchmesser, 30 °C. Versuchsdurchführung am 29.04.2021 und 11.05.2021.

Ein beispielhafter OTR-Verlauf auf Ames-Minimalmedium ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Da es sich hier um ein definiertes Medium handelt, findet Wachstum ausschließlich auf der Kohlenstoffquelle Glucose statt. Dementsprechend sind innerhalb der ersten 8 h keine OTR-Peaks zu erkennen, da es zu keinerlei Stoffwechselumstellung kommt. Nach etwa 9 h ist das vorgelegte Histidin aufgebraucht und die Atmung der Histidin-auxotrophen Bakterien bricht ein. Die schwarzen Pfeile zeigen jeweils die Probenahme an, aus der schließlich Glucose- und Histidinausbeutekoeffizienten bestimmt wurden (vgl. Kapitel 2.4). Für die Berechnung der maximalen Wachstumsrate wurden die Daten vollständig bis zum OTR-Peak einbezogen.



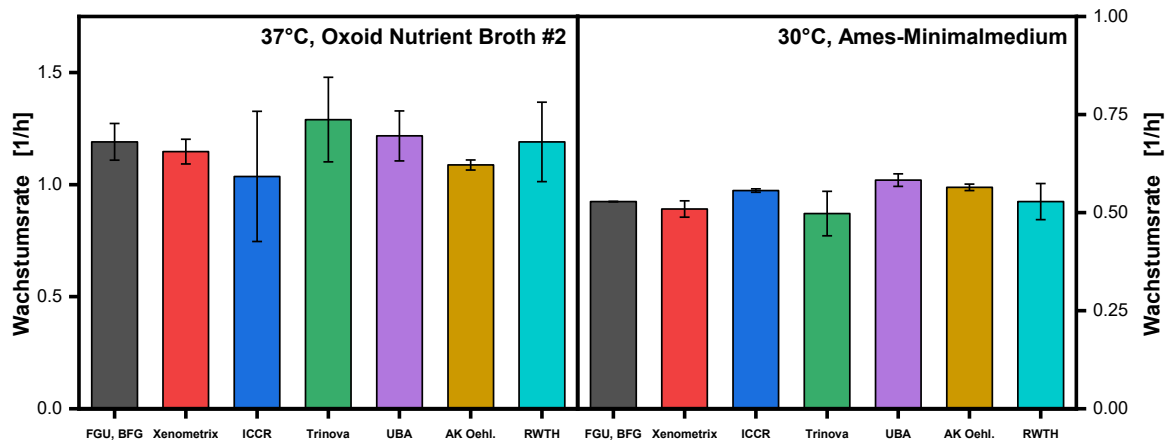
**Abbildung 3.14: Ausbeutekoeffizienten auf Histidin und Glucose für Teststamm TA 100, Charge „ICCR“**

*S. typhimurium* auf Ames-Minimalmedium (20 g/L Histidin), Inokulum 200  $\mu$ L aus Komplexvorkultur, 20 mL in 250 mL RAMOS-Kolben, 250 rpm, 50 mm Schütteldurchmesser, 30 °C. Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse, HPLC-Messung der verbrauchten Glucose. Versuchsdurchführung am 29.04.2021 und 11.05.2021.

Die Glucose- und Histidinausbeutekoeffizienten für die oben gezeigte Stammcharge „ICCR“ des Teststammes TA100 wurden in biologischen Triplikaten bestimmt (Abbildung 3.14). Die Ausbeutekoeffizienten auf Histidin lagen zwischen 60 und 80 g Biomasse/ g Histidin, während die gemessenen Ausbeutekoeffizienten auf Glucose zwischen 0,58 und 0,72 g/g lagen. Bereits kleine Unterschiede der Standzeiten vor dem Abzentrifugieren für BTM-Probe (Biomassebestimmung) und HPLC-Probe (Glucosebestimmung) führten zu großen Abweichungen und ließen sich durch die manuelle Probenverarbeitung nicht vollständig vermeiden. So konnten die Ausbeutekoeffizienten nicht genau genug bestimmt werden, um für einen tatsächlichen Vergleich der unterschiedlichen Stammchargen herangezogen zu werden. Auch die Höhe des bestimmten Ausbeutekoeffizienten von 0,72 g/g ist nicht realistisch, sodass es sich um ein Messartefakt handeln muss. Die hohen Abweichungen durch kleinste Unterschiede in der Laborroutine wiederum können auch bei der Durchführung des Ames-RAMOS-Tests auftreten.

Deutlich reproduzierbarer konnte die Bestimmung der maximalen Wachstumsraten erfolgen. Für alle vermessenen Stammchargen TA 100 sind Mittelwerte und Standardabweichungen der drei biologischen Replikat in Abbildung 3.15 aufgetragen. Mit den verwendeten Bedingungen sollte die Vorkulturführung des Fluktuationstests (Oxid Nutrient Broth #2, links) mit der des Ames-RAMOS-Tests (Ames-Minimalmedium, rechts) verglichen werden. Insbesondere auf Oxid Nutrient Broth #2 sind zwischen den Stammchargen Unterschiede in der maximalen Wachstumsrate von bis zu 12% erkennbar (1,1 1/h („ICCR“) bis hin zu 1,25 1/h („Trinova“)). Auf Ames-Minimalmedium hingegen konnten Unterschiede von maximal 9%

gemessen werden, hier lag die niedrigste gemessene Wachstumsrate bei 0,48 1/h („Trinova“) und die höchste bei 0,53 1/h („UBA“).

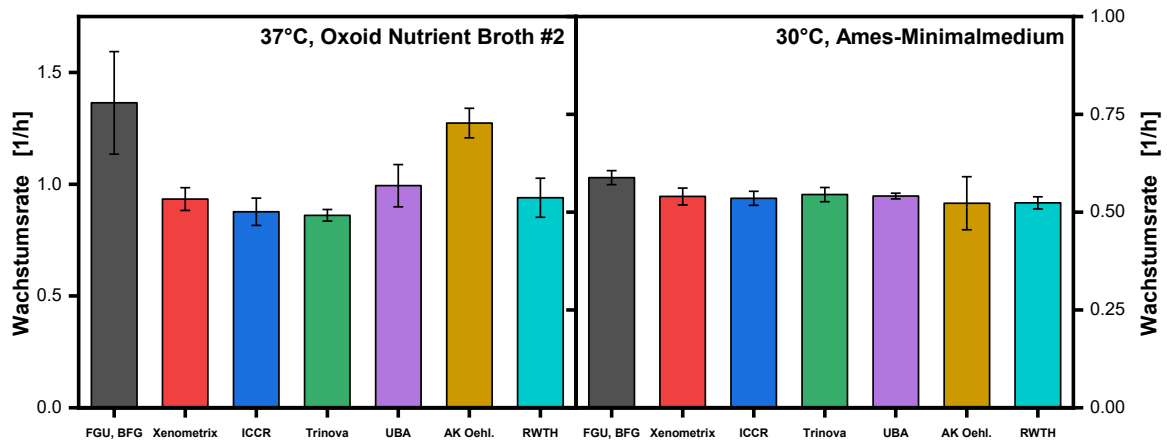


**Abbildung 3.15: Maximale Wachstumsraten der Stammchargen TA 100**

Links: *S. typhimurium* TA 100 auf Oxoid Nutrient Broth #2 (unbekannter Histidingehalt), Inokulum 20 µL aus Kryo, 20 mL in 250 mL RAMOS-Kolben, 250 rpm, 50 mm Schütteldurchmesser, 37 °C. Rechts: *S. typhimurium* TA 100 auf Minimalmedium. Ames-Minimalmedium (20 g/L Histidin), Inokulum 200 µL aus Komplexvorkultur, 20 mL in 250 mL RAMOS-Kolben, 250 rpm, 50 mm Schütteldurchmesser, 30 °C.

Insgesamt legt Abbildung 3.15 (rechts) nahe, dass die Vorkulturführung des Ames-RAMOS-Tests auf Minimalmedium bei 30°C reproduzierbarer zwischen den Chargen und in Bezug auf biologische Replikate weniger fehlerbehaftet als die Vorkulturführung auf Komplexmedium bei 37°C ist. Im Laufe der Versuchsreihen stellte sich außerdem heraus, dass das kommerziell erhältliche Oxoid Nutrient Broth #2 weit vor Mindesthaltbarkeitsdatum degeneriert bzw. instabil ist und weit weniger Wachstum ermöglicht. Hier bietet das definierte Ames-Minimalmedium einen klaren Vorteil, da es über Monate stabil bleibt.

Ein deutlicheres Ergebnis zeigen die maximalen Wachstumsraten der TA 98 Stammchargen (Abbildung 3.16). Während es auf Oxoid Nutrient Broth #2 Abweichungen von 1,45 1/h bis hin zu 0,8 1/h gab, lagen alle Wachstumsraten auf Ames-Minimalmedium reproduzierbar zwischen 0,53 1/h und 0,48 1/h. Die Vorkulturführung auf Minimalmedium wird daher auch für den Fluktuationstest empfohlen.



**Abbildung 3.16: Maximale Wachstumsraten der Stammchargen TA 98**

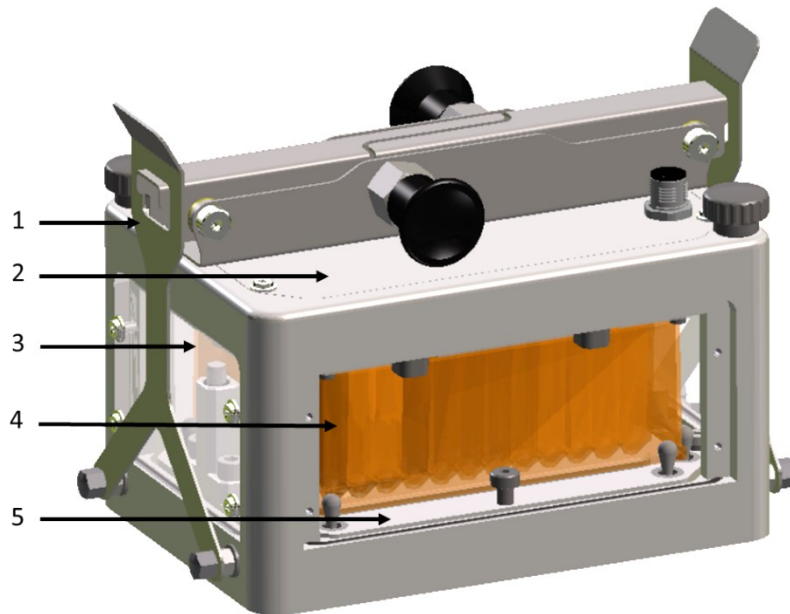
Links: *S. typhimurium* TA 100 auf Oxoid Nutrient Broth #2 (unbekannter Histidingehalt), Inokulum 20  $\mu$ L aus Kryo, 20 mL in 250 mL RAMOS-Kolben, 250 rpm, 50 mm Schütteldurchmesser, 37 °C. Rechts: *S. typhimurium* TA 100 auf Minimalmedium. Ames-Minimalmedium (20 g/L Histidin), Inokulum 200  $\mu$ L aus Komplexvorkultur, 20 mL in 250 mL RAMOS-Kolben, 250 rpm, 50 mm Schütteldurchmesser, 30 °C.

## 3.2 Transfer des Ames- $\mu$ RAMOS-Test auf eine zu kommerzialisierende 96-Well $\mu$ RAMOS-Anlage

### 3.2.1 Anfertigung einer 96-Well- $\mu$ RAMOS-Anlage (Modul 2a)

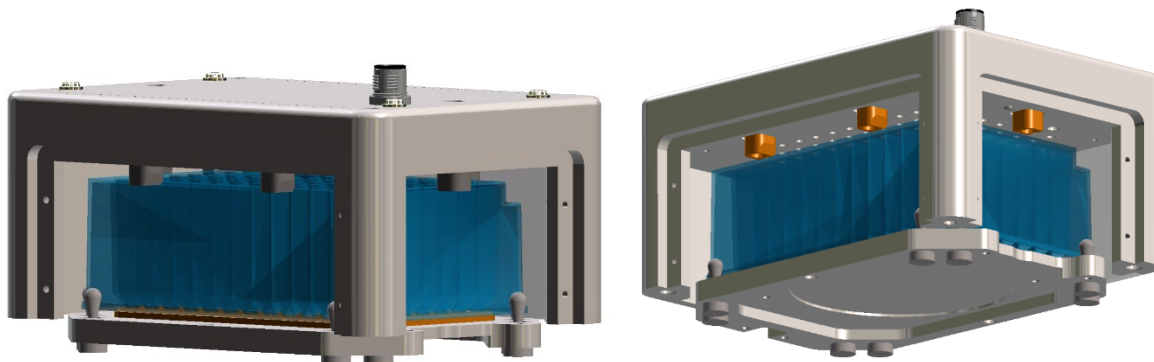
Zu Projektbeginn war der Ames-Fluktuationstest bereits erfolgreich auf die  $\mu$ RAMOS Technologie (48-Well) überführt worden. Die zu kommerzialisierende 96-Well Anlage kann hingegen in 96 individuellen Wells die OTR bestimmen [16].

Zu Beginn des Projekts stand ein 96-Well Prototyp zur Verfügung, welcher zunächst durch die AVT.BioVT genutzt werden konnte. Zeitgleich wurde der Aufbau der Anlage an die Bedürfnisse des Ames-Fluktuationstests angepasst (Abbildung 3.17), um für das Projekt zur Verfügung gestellt zu werden. Zur Well-aufgelösten OTR-Messung wird eine Mikrotiterplatte (4) in ein belüftetes Gehäuse (3) gesetzt und dieses mit einer Schnellverriegelung verschlossen (1). In regelmäßigen Zeitabständen wird die Mikrotiterplatte mittels eines Hubtisches (6) angehoben und gegen eine Dichtung im Deckel gedrückt. Die Dichtung schließt jedes individuelle Well luftdicht ab. 96 Sauerstoffsensoren im Deckel der Anlage (2) messen dann den Sauerstoffverbrauch in jedem Well. Daraus wird schließlich die OTR berechnet. Anschließend wird der Hubtisch wieder abgesenkt, um die Wells zu belüften. Um den Ames  $\mu$ RAMOS-Test in die zu kommerzialisierende 96-Well Anlage zu überführen, wird zurzeit ein überarbeiteter Prototyp angefertigt. Dieser wurde gegenüber den Vorgängerversionen auf die Bedürfnisse des Ames- $\mu$ RAMOS-Tests angepasst.



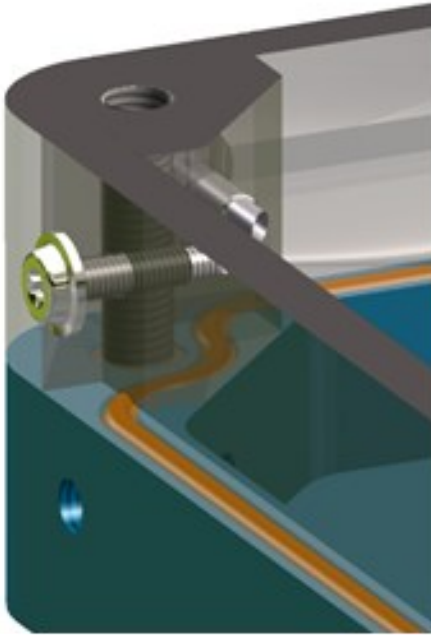
**Abbildung 3.17  $\mu$ -TOM 96-well Anlage: (1) Schnellverschluss, (2) Deckel mit Sensorik, (3) dichtes Gehäuse, (4) Mikrotiterplatte, (5), (6)**

Da die optimale Mikrotiterplatte (MTP) für den Ames- $\mu$ RAMOS-Test noch nicht final spezifiziert ist, wurde eine variable MTP-Aufnahme konstruiert, die an beliebige DeepWell-MTPs angepasst werden kann (vgl. Abbildung 3.18). Aus demselben Grund wurden auch die MTP Führungen am Anlagendeckel variabel gestaltet. So kann eine Zentrierung der MTP unter der Sensorik gewährleistet werden (orange hervorgehoben).



**Abbildung 3.18 Variable MTP-Aufnahme**

Die Unterscheidung der Mutagenität verschiedener Substanzen anhand der OTR stellt hohe Anforderungen an die Genauigkeit der Messtechnik. Als kritischer Faktor für die Genauigkeit hat sich die Luftfeuchtigkeit in der Messkammer herausgestellt. Die Luftfeuchtigkeit im



**Abbildung 3.19: Neue Dichtung**

Messraum sollte sich während der gesamten Kultivierung möglichst nicht verändern, da Änderungen der Feuchte auch mit Änderungen des Sauerstoffpartialdrucks einhergehen. Dies wiederum wirkt sich störend auf die OTR Messung aus.

Daher wird die neue 96-Well Anlage mit befeuchteter Luft und einem Gehäuse mit optimierter Luftdichtigkeit betrieben (vgl. Abbildung 3.19). Eine O-Ring Dichtung wurde so eingefügt, dass eine lückenlose Abdichtung gewährleistet wird. Notwendige Durchgangsbohrungen in der Gehäusehülle werden mit Gewindedichtung verschlossen.

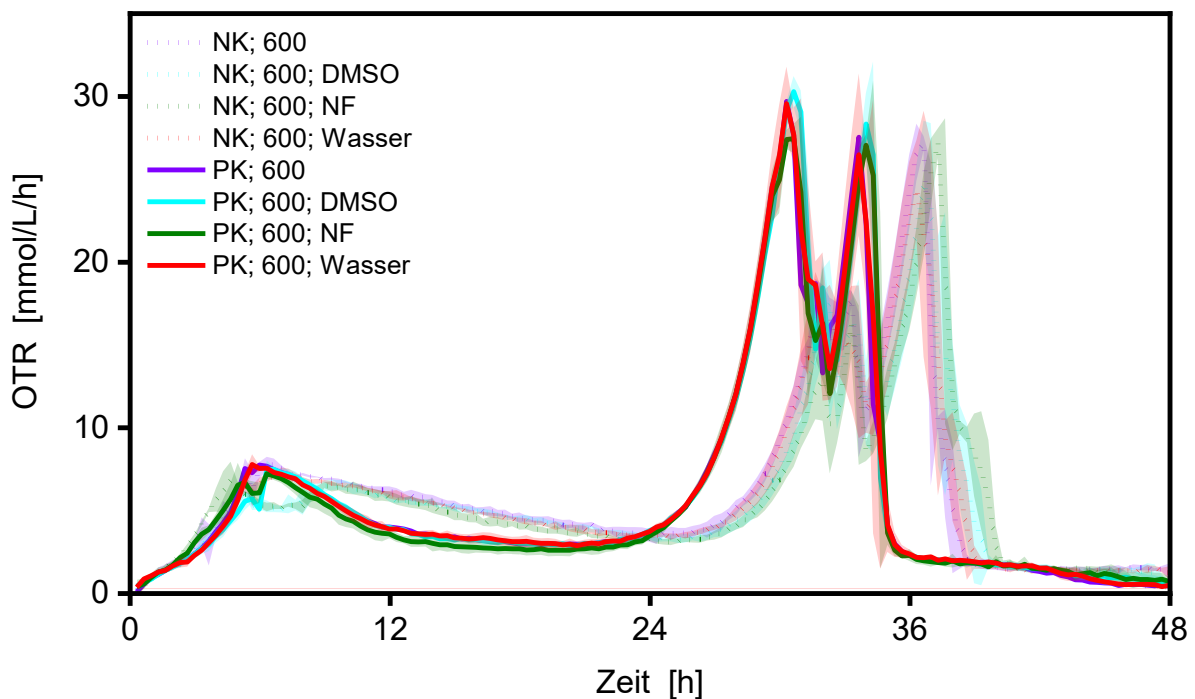
### **3.2.2 Transfer des Ames- $\mu$ RAMOS-Tests (Modul 2b)**

Nachdem der Ames- $\mu$ RAMOS-Test in der 48-Well Anlage reproduziert werden konnte, sollten im nächsten Schritt die Grundlagen zur Übertragung in den 96-Well Maßstab gelegt werden. Hierzu wurde an der AVT.BioVT zunächst eine 96-Well Mikrotiterplatte (MTP) mit runden Wells evaluiert und die Versuchsbedingungen in dieser charakterisiert.

Im Rahmen der Charakterisierung sollte zuerst überprüft werden, ob durch das steigende Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis möglicherweise erhöhte Probenabsorption an den Wänden der 96-Well MTP erfolgt. Um dies zu messen, wurden Wells einer sterilen 96-Well MTP bei Versuchsbedingungen (30°C, 350 rpm, 50 mm Schütteldurchmesser) mit Testlösungen über Nacht inkubiert: entweder mit Wasser, DMSO oder Nitrofurantoin (NF, gelöst in DMSO). Es wurde die Annahme getroffen, dass im Fall von Probenadsorption die Oberfläche der Wells nun mit NF gesättigt sein sollte. Zur Kontrolle wurde ein Viertel der Wells nicht mit Flüssigkeit vorbelegt. Am Folgetag wurde die 96-Well MTP entleert und unter sterilen Bedingungen getrocknet. In der getrockneten 96-Well MTP wurde analog zum bisherigen Protokoll ein Ames- $\mu$ RAMOS-Test mit DMSO als Negativkontrolle (NK) und NF als Positivkontrolle (PK) durchgeführt. Es wurden jeweils drei Füllvolumina von 600  $\mu$ L, 800  $\mu$ L und 1000  $\mu$ L pro Well in Quadruplikaten getestet.

Abbildung 3.20 stellt exemplarisch den OTR-Verlauf aller Ansätze mit 600  $\mu$ L Füllvolumen dar. Ähnlich zum Ames- $\mu$ RAMOS-Test in der 48-Well Anlage ist auch hier die zytotoxische Wirkung der Positivkontrollsubstanz NF im OTR-Verlauf sichtbar: statt einem geraden Abfall der OTR

bildet sich hier eine Art „Hängebauch“ aus. Das durch ein Ansteigen der OTR sichtbare Wachstum der Revertanten in zuerst der Positiv- (durchgezogen) und einige Stunden später der Negativkontrolle (gestrichelt) ist zeitlich deutlich gegeneinander versetzt. Somit ist bereits eine gute Testauflösung (Abstand zwischen Positiv- und Negativkontrolle) erkennbar. Der Verlauf aller OTR-Kurven ist nahezu gleich, unabhängig davon, ob die Wells mit Wasser (rot), DMSO (türkis), NF (grün) oder nicht (violett) vorab inkubiert waren. Bei Probenabsorption an den Welloberflächen wären hier Unterschiede im OTR-Verlauf zu erwarten gewesen: absorbiertes NF wäre der Testlösung entzogen worden und hätte in einer geringeren NF-Konzentration resultiert, die zu einer geringeren induzierten Mutationsrate geführt hätte. Somit wäre ein früheres Anwachsen der Revertanten zu erwarten gewesen. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass es in der 96-Well MTP nicht zu einer im Test relevanten Probenabsorption kommt.



**Abbildung 3.20: Ames- $\mu$ RAMOS-Test mit TA 100 und 600  $\mu$ L Füllvolumen**

*S. typhimurium* TA 100 in 1,2x mod. Ames-Exposure-Medium (5 mg/L Histidin) bei 30°C. Animpfdichte 45 FAU, 600  $\mu$ L Füllvolumen in 96-DeepWell RipPlate (round), 350 rpm, 50 mm Schütteldurchmesser. NK: Negativkontrolle DMSO (gestrichelt), PK: Positivkontrolle Nitrofurantoin (durchgezogen). MTP vorab inkubiert mit DMSO, Wasser, NF / Kontrolle: nicht inkubiert. n = 4.

Auffällig im Hinblick auf die Genauigkeit ist allerdings der Unterschied zwischen der Standardabweichung der Positiv- und Negativkontrollen. Alle Negativkontrollen weisen eine höhere Streuung auf. Die Abweichung innerhalb der Replikate ist also für die Bestimmung der natürlichen, nicht induzierten Mutationsrate größer, als für die durch ein Mutagen induzierte Mutationsrate. Es waren weitere Untersuchungen notwendig, um die Ursache – z.B. eine

schlechtere statistische Normalverteilung durch geringere Zellzahl – zu verstehen und nach Möglichkeit zu beheben.

### 3.2.2.1 Einfluss des Füllvolumens auf die Testergebnisse

In Abbildung 3.21 ist der Verlauf des Ames-RAMOS-Tests unter Verwendung von drei Füllvolumina dargestellt. In allen Fällen konnte der bekannte OTR-Verlauf aus dem 48-Well Maßstab reproduziert werden.

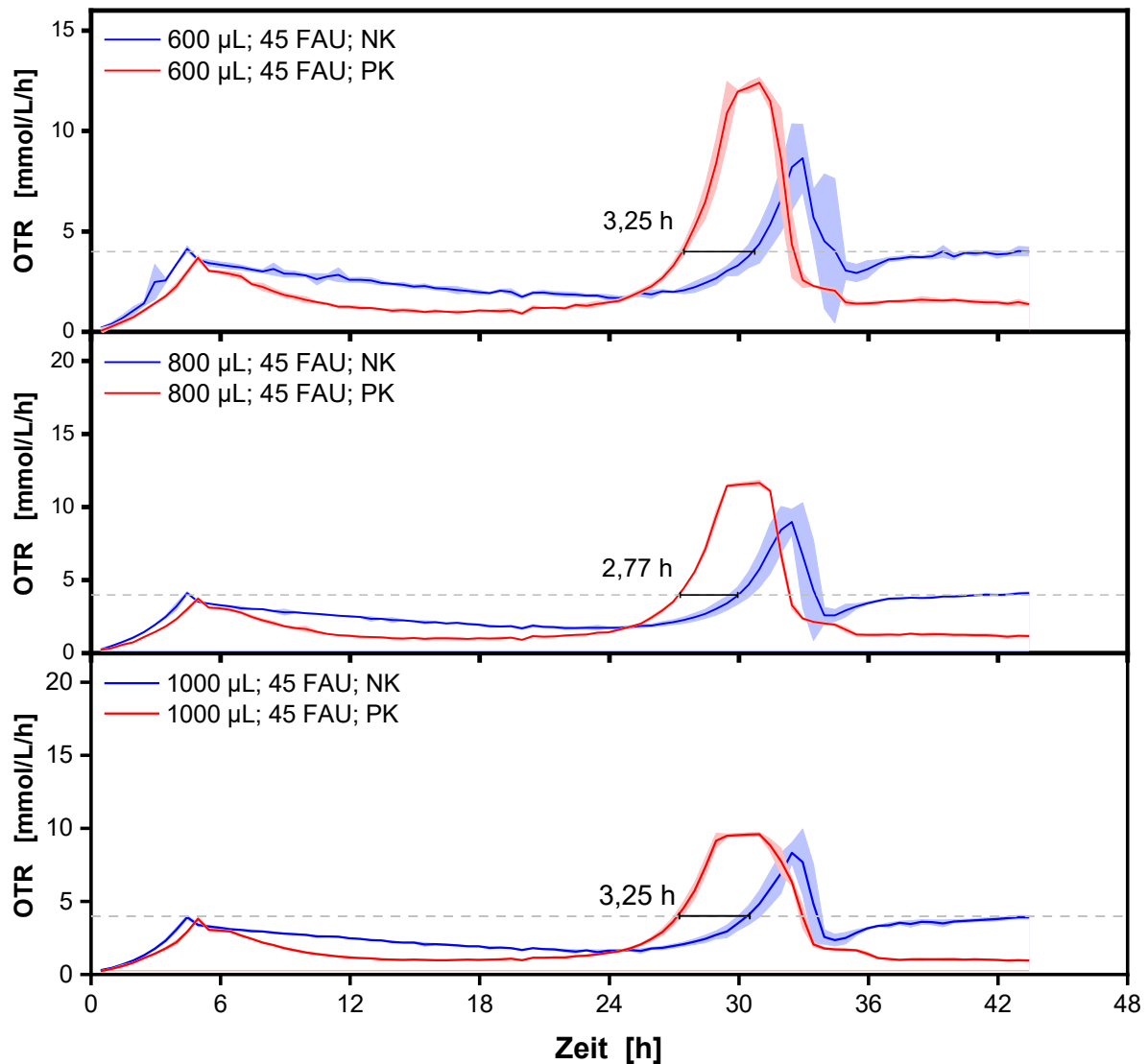


Abbildung 3.21: Einfluss des Füllvolumens auf die Testergebnisse

*Salmonella typhimurium* TA 100, T = 30 °C, n = 1000 rpm,  $d_0 = 3$  mm,  $V_L = 600 / 800 / 1000$  µL in 96-Well DeepWellPlate (round), Vorkultur: Optimiertes Minimalmedium mit 20 mg/L Histidin, 200 µL Inokulum aus Kryo, Exposition: Optimiertes Minimalmedium mit 5 mg/L Histidin,  $OD_0 = 45$  FAU. Negativkontrolle (NK) DMSO, Positivkontrolle (PK) Nitrofurantoin, n = 4.

Die Auftrennung von Positiv- (rot, PK) und Negativkontrolle (blau, NK) lag zwischen 3,25 h und 2,77 h, ohne erkennbare Korrelation zum Füllvolumen pro Well. Im Vergleich zum etablierten



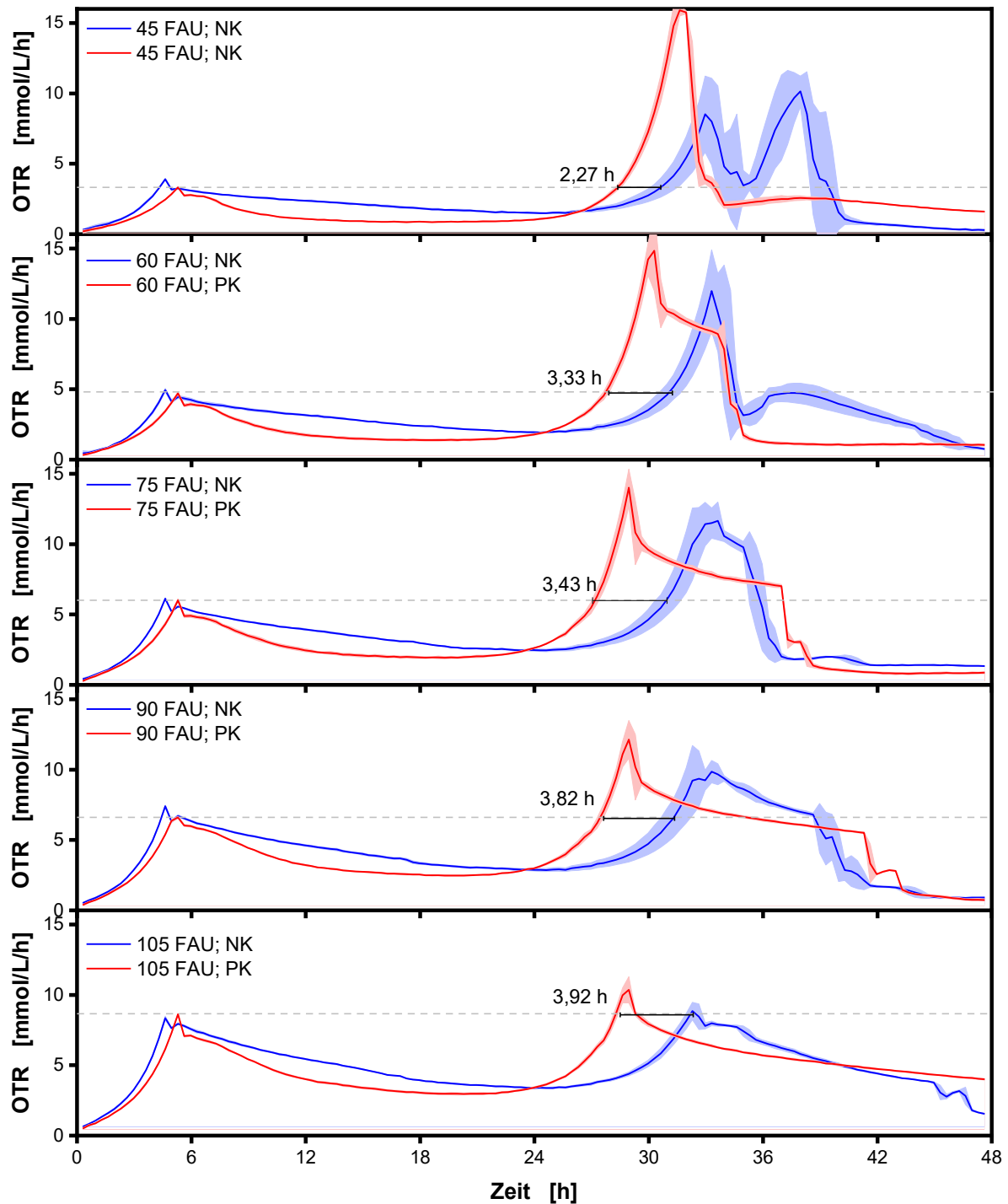
Ames- $\mu$ RAMOS-Test [1] wiesen insbesondere die OTR-Werte der Negativkontrollen erhöhte Standardabweichungen zum Zeitpunkt des Erreichens von 4 mmol/L/h auf ( $\sigma_t = 0,95$  h für 600  $\mu$ L,  $\sigma_t = 0,88$  h für 800  $\mu$ L,  $\sigma_t = 0,66$  h für 1000  $\mu$ L). Da die geringste Standardabweichung beim höchstmöglichen Füllvolumen erreicht wurde, wurde dieses für den Ames-RAMOS-Test im 96-Well Maßstab auf 1000  $\mu$ L festgelegt.

### 3.2.2.2 Einfluss der initialen Zelldichte und Histidin-Menge auf die Testergebnisse

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, inwiefern die initiale Zelldichte (bislang 45 FAU) Einfluss auf Standardabweichung der OTR sowie die zeitliche Auftrennung von Positiv- und Negativkontrolle hat. Folgende Annahme wurde getroffen: Zu Beginn des Ames-Tests begrenzt das vorgelegte Histidin das Anwachsen der Histidin-auxotrophen Bakterienzellen, somit auch die Anzahl der möglichen Zellteilungen. Um diese Anzahl konstant zu halten, muss die Menge des vorgelegten Histidins proportional zur eingesetzten initialen Zelldichte erhöht werden. Für die bisherige Standard-Zelldichte 45 FAU wird der Test mit 5 mg/L Histidin durchgeführt, dementsprechend wurden für 60 FAU 6,67 mg/L, für 75 FAU 8,33 mg/L, für 90 FAU 10 mg/L und für 105 FAU 11,66 mg/L Histidin zugesetzt. Die Konzentrationen der Positiv- und Negativkontrollen dagegen wurden nicht verändert.

Abbildung 3.22 zeigt die OTR-Verläufe der verglichenen initialen Zelldichten. Für alle Zelldichten war nach 4,6 h ein erster OTR-Peak zunächst für die Negativkontrolle (blau), kurz darauf nach 5,3 h auch für die Positivkontrolle (rot) zu sehen. Zu diesem Zeitpunkt war das vorgelegte Histidin in allen Ansätzen aufgebraucht und die Bakterien wechselten von exponentiellem Wachstum in reinen Erhaltungsstoffwechsel. Das zeitgleiche Erreichen des ersten OTR-Peaks für alle Ansätze der jeweiligen Kontrollen bestätigt die oben beschriebene Annahme: in allen Ansätzen war die gleiche Anzahl an Zellteilungen gegeben. Da die Höhe der OTR bei exponentiellem Wachstum direkt von der Anzahl der wachsenden Bakterienzellen abhängig ist, wurden die geringsten OTR-Werte (3,8 mmol/L/h) für den Ansatz mit 45 FAU gemessen; der Ansatz mit 105 FAU wies mit 8,5 mmol/L/h entsprechend den höchsten OTR-Wert am ersten Peak auf. Die unterschiedlichen Höhen der OTR-Peaks führten im zeitlichen Verlauf zu entsprechend unterschiedlichen OTR-Grundniveaus bis zum (sichtbaren) Anstieg der OTR durch das Anwachsen der Histidin-prototrophen Revertanten.

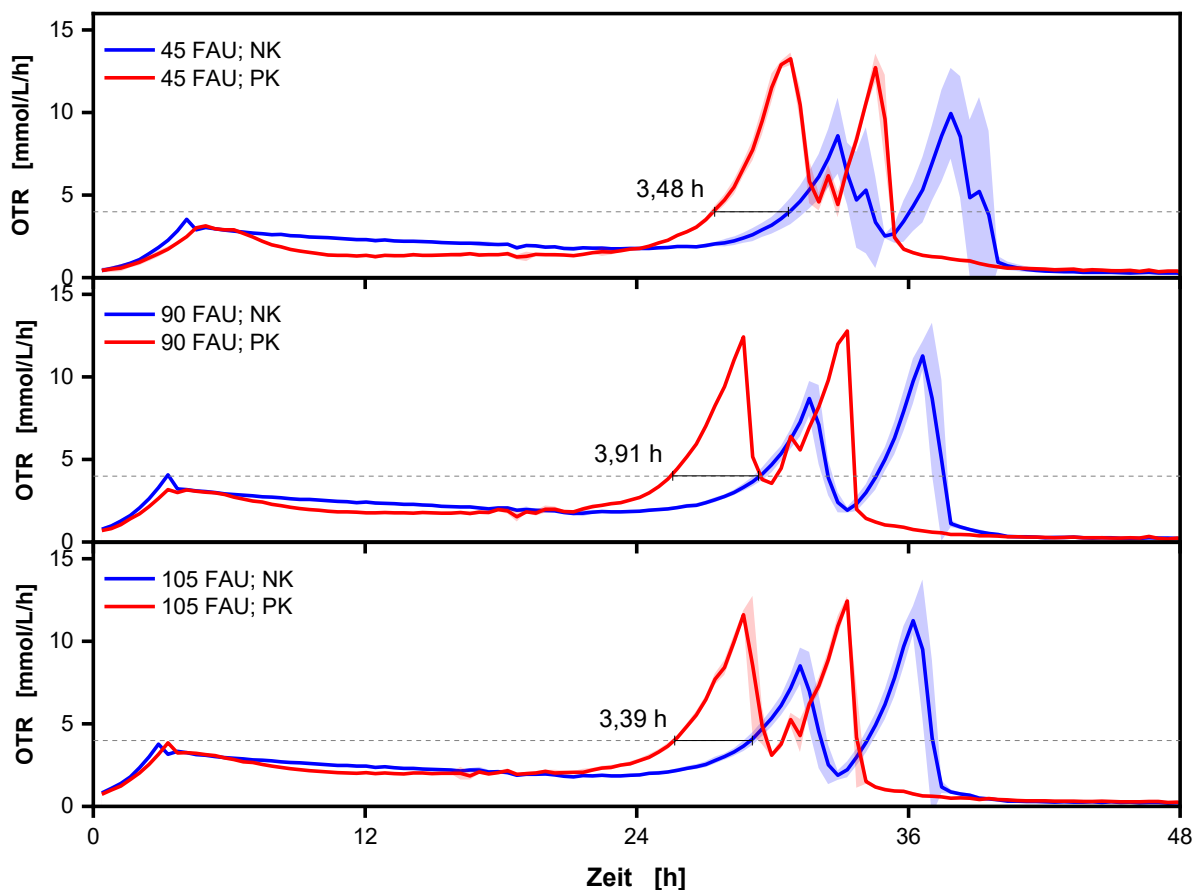
Die erreichte Auflösung zwischen Positivkontrolle und Negativkontrolle stieg von  $\Delta t = 2,7$  h für 45 FAU bis hin zu 3,9 h für 105 FAU stetig an. Die Standardabweichungen dagegen sanken mit erhöhter initialer Zelldichte.



**Abbildung 3.22: Einfluss der Zelldichte bei konstantem Histidinmenge pro Zelle-Verhältnis**

*Salmonella typhimurium* TA 100, T = 30 °C, n = 1000 rpm,  $d_0 = 3$  mm,  $V_L = 1$  mL in 96-Well DeepWellPlate (round), Vorkultur: Optimiertes Minimalmedium mit 20 mg/L Histidin, 200  $\mu$ L Inokulum aus Kryo, Exposition: Optimiertes Minimalmedium mit 5 mg/L Histidin pro 45 FAU,  $OD_0 = 45 / 60 / 75 / 90 / 105$  FAU. Negativkontrolle (NK) DMSO, Positivkontrolle (PK) Nitrofurantoin.

Um nun den Einfluss der Zelldichte von dem des Histidins zu trennen, wurden bei konstanter Histidin-Konzentration von 5 mg/L noch einmal 45 FAU, 90 FAU und 105 FAU initiale Zelldichte für jeweils Positiv- und Negativkontrolle getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.23 dargestellt.



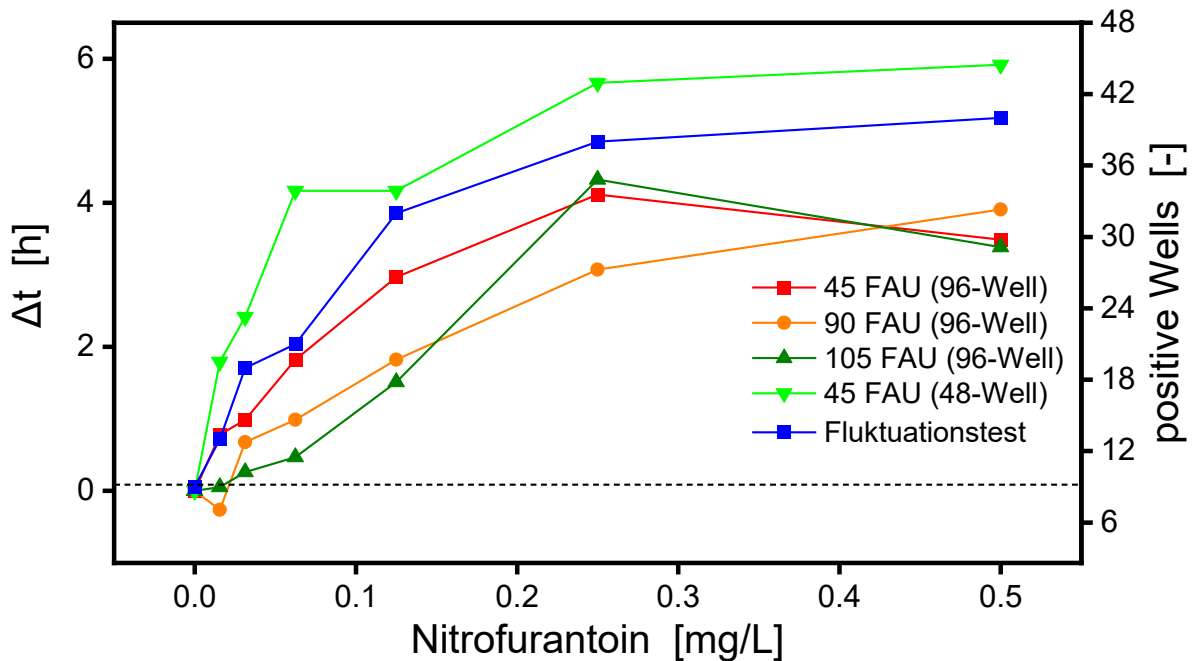
**Abbildung 3.23: Einfluss der initialen Zelldichte bei gleicher initialer Histidinkonzentration**

*Salmonella typhimurium* TA 100, T = 30 °C, n = 1000 rpm,  $d_0 = 3$  mm,  $V_L = 1$  mL in 96-Well DeepWellPlate (round), Vorkultur: Optimiertes Minimalmedium mit 20 mg/L Histidin, 200  $\mu$ L Inokulum aus Kryo, Exposition: Optimiertes Minimalmedium mit 5 mg/L Histidin,  $OD_0 = 45 / 90 / 105$  FAU. Negativkontrolle (NK) DMSO, Positivkontrolle (PK) Nitrofurantoin.

Die Auflösung zwischen Positiv- (PK) und Negativkontrolle (NK) korrelierte nicht erkennbar mit der initialen Zelldichte und lag zwischen 3,39 h und 3,91 h. Deutlicher sank dagegen die Standardabweichung, mit der der Zeitpunkt des erreichten Schwellenwertes 4 mmol/L/h ausgelesen wurde. Von  $\sigma = 0,80$  h für die Negativkontrolle des 45 FAU-Ansatzes sank die Standardabweichung auf  $\sigma = 0,39$  h für 90 FAU und  $\sigma = 0,39$  h für 105 FAU. Gleiches galt für die Standardabweichung der Positivkontrollen, für 45 FAU betrug sie  $\sigma = 0,24$  h, während sie für 105 FAU um etwa die Hälfte geringer bei  $\sigma = 0,14$  h lag. Wie unter 3.2.2 angemerkt, wird hier der Einfluss der Stichprobengüte/Normalverteilung innerhalb der Zellen in einem

gemessenen Well sichtbar. Die Stichprobengüte steigt mit absoluter Anzahl der transferierten Zellen, somit sinkt bei steigender FAU die Standardabweichung.

Der Transfer des Tests wurde durch die Anfertigung einer Dosis-Wirkungs-Kurve abgeschlossen. Die Kurve wurde für alle drei zuvor in Betracht gezogenen initialen Zelldichten aufgenommen (Abbildung 3.24). Als Referenz sind außerdem die Ergebnisse des Fluktuationstests (blau, rechte Achse) und der bereits etablierten 48-Well Anlage (hellgrün) aufgetragen.



**Abbildung 3.24: Vergleich der Testbedingungen anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve**

*Salmonella typhimurium* TA 100, T = 30 °C, n = 1000 rpm, d<sub>0</sub> = 3 mm, V<sub>L</sub> = 1 mL in 96-Well DeepWellPlate (round) bzw. 2,4 mL in 48-Well RoundPlate, 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 / 90 / 105 FAU. Negativkontrolle (NK) DMSO, Testsubstanz Nitrofurantoin.

Alle getesteten initialen Zelldichten detektieren einen konzentrationsabhängigen Anstieg von  $\Delta t$ , erkennen Nitrofurantoin also als mutagene Substanz. Die absolute Testauflösung  $\Delta t$  ist in der 48-Well Anlage am höchsten, in der 96-Well Anlage mit 45 FAU (rot) etwas niedriger und sinkt dann mit steigender initialer Zelldichte. Da der Fehler der aus der OTR bestimmten  $\Delta t$ -Werte mit sinkender Zelldichte aber anstieg (vgl. Abbildung 3.22 und Abbildung 3.26), galt es, ein Optimum mit möglichst hoher Auflösung, aber möglichst geringem Fehler zu finden. Daher wurde eine initiale Zelldichte von 90 FAU für alle weiteren Versuche festgelegt.

Für den zweiten Teststamm TA 98 wurden die mit TA 100 ermittelten Bedingungen (Mikrotiterplatte, 3 mm Schütteldurchmesser, 1000 rpm, 1000 µL Füllvolumen, 5 mg/L Histidin)

übernommen. Eine weitere Steigerung der initialen Zelldichte von TA 98 über die bereits bestehenden 180 FAU wurde nicht vorgenommen. Grund dafür ist, dass bei Testung von Umweltproben der Testansatz durch die Wasserprobe zehnfach verdünnt wird und dementsprechend vor Zugabe der Probe zehnfach konzentriert angesetzt werden muss. Da durch die Vorkulturführung nur zwischen 1700 und 2000 FAU erreicht werden, wäre bei noch höherer initialer FAU eine zukünftige Wassertestung nicht mehr möglich.

### 3.2.3 Entwicklung einer automatisierten Mutagenitätsbewertung im neuen Ames- $\mu$ RAMOS-Test (Modul 2c)

Ziel dieses Arbeitspaketes ist es, durch automatisierte Datenverarbeitung den Arbeitsaufwand der Testauswertung stark zu senken und damit die Möglichkeit zu schaffen, den neuen Ames- $\mu$ RAMOS-Test auch im Hochdurchsatz anzuwenden.

Hierzu wurde an der AVT.BioVT eine geeignete MATLAB-Applikation erstellt. Diese importiert automatisch die erzeugten Versuchsdaten aus allen in Frage kommenden Laborgeräten. Nach Einlesen der zugehörigen 48-Well- oder 96-Well-Plattenbelegung berechnet die Software automatisch Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate.

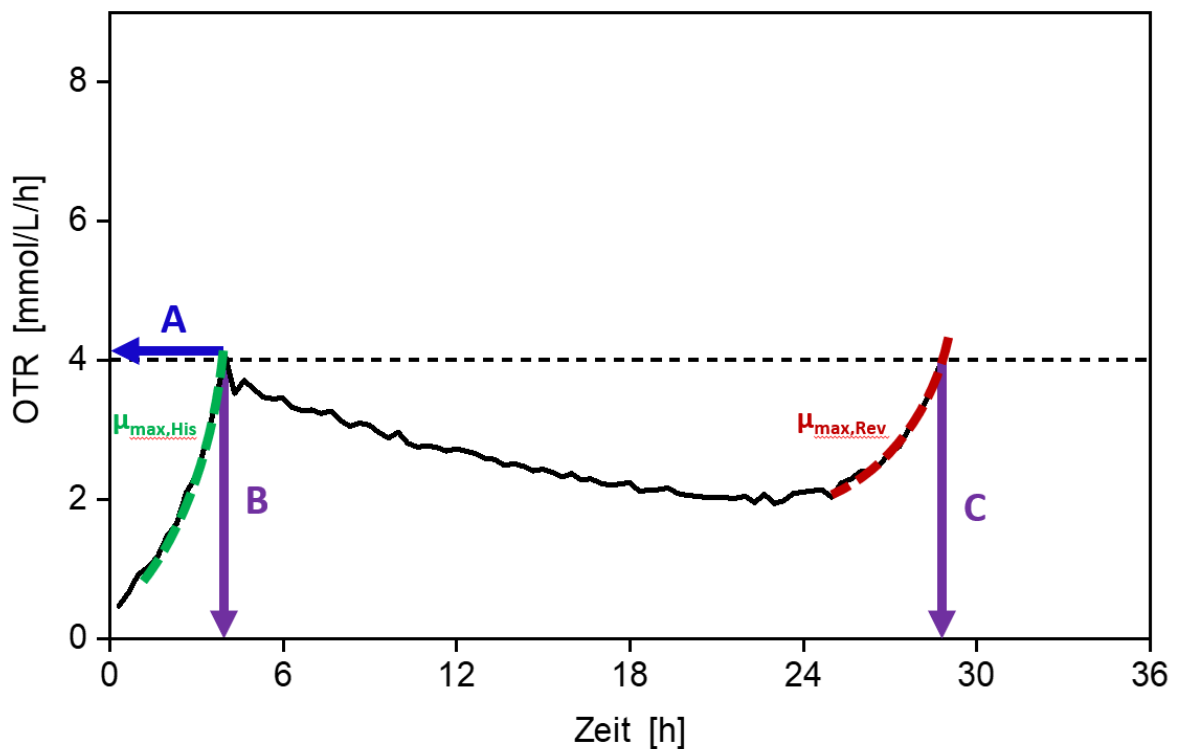
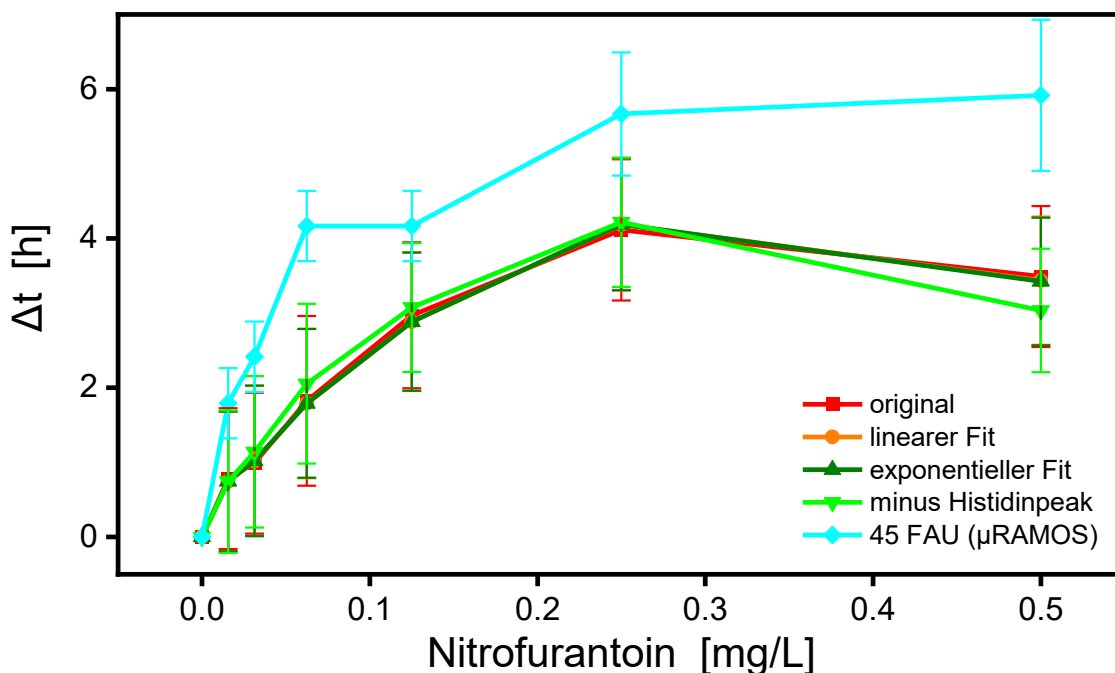


Abbildung 3.25: Automatisiert erfasste Charakteristika der Online-Daten (Schema)

In einem zweiten Schritt wurde die bisherige Auswertung der OTR-Daten der MATLAB-Applikation hinzugefügt. So werden wie in Abbildung 3.25 dargestellt vier entscheidende Charakteristika automatisiert erfasst und ausgegeben: zunächst wird über einen exponentiellen Fit automatisiert die Wachstumsrate der Bakterien auf Histidin bestimmt. Die Höhe (A) und der Zeitpunkt (B) des OTR-Peaks auf Histidin zu Beginn der Exposition wird ausgelesen, genau wie der Zeitpunkt (C), in dem ein Schwellenwert (3,5 bzw. 4 mmol/L/h) überschritten wird. Zuletzt wird automatisiert die Wachstumsrate der Revertanten berechnet.

Verschiedene Auswertungsmöglichkeiten zur Bestimmung des Zeitpunktes (C) wurden verglichen. Das Ansteigen der OTR war bisher anhand des Erreichens des ersten OTR-Werts über dem Schwellenwert bestimmt worden. Da die Messintervalle der ( $\mu$ )RAMOS-Anlage 20 min betragen, konnte bei knappem Unterschreiten des Schwellenwertes eine „Verspätung“ des ausgelesenen Zeitpunktes um bis zu 20 min zu den anderen Replikaten entstehen. Für eine höhere Genauigkeit wurden lineare und exponentielle Fits angelegt, um den Zeitpunkt auch innerhalb der Messintervalle zu bestimmen. Um zytotoxische Einflüsse der Testsubstanz zu kompensieren, wurde zusätzlich eine Referenzierung auf den Zeitpunkt des Histidinpeaks (B) statt zuvor  $t = 0$  h evaluiert. In Abbildung 3.26 sind diese Varianten für die Daten aus Abbildung 3.24 bei 45 FAU initialer Zelldichte aufgetragen.

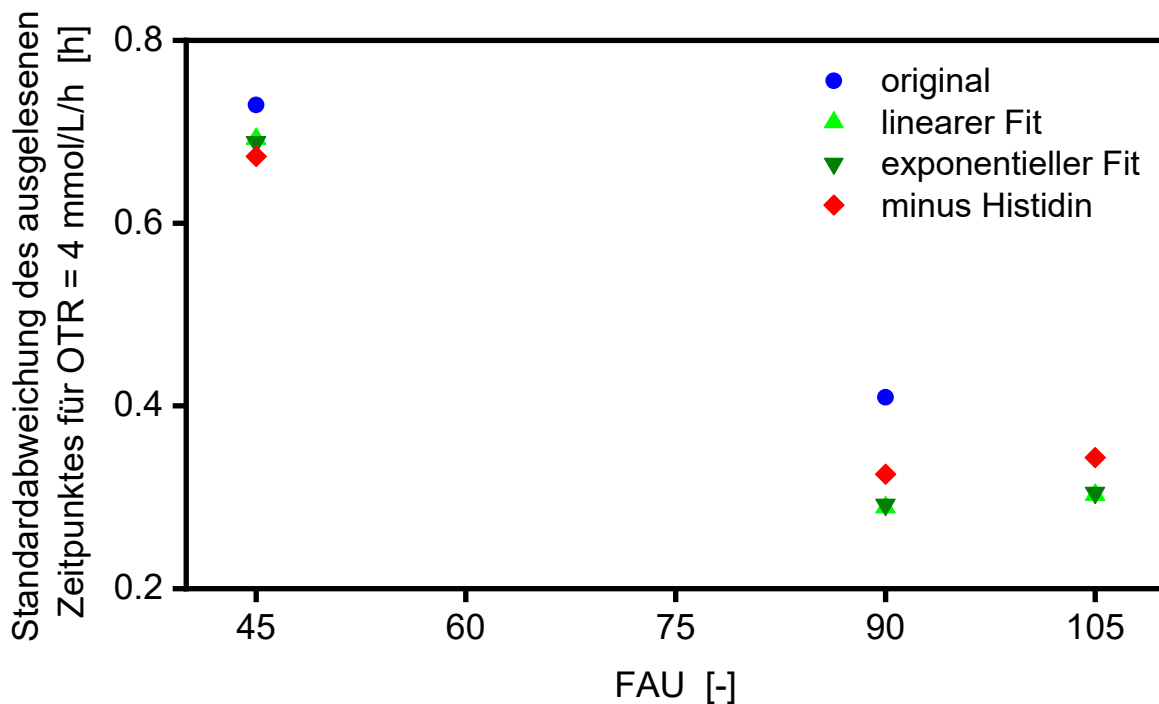


**Abbildung 3.26: Vergleich verschiedener Auslesemethoden**

*Salmonella typhimurium* TA 100,  $T = 30$  °C,  $n = 1000$  rpm,  $d_0 = 3$  mm,  $V_L = 1$  mL in 96-Well DeepWellPlate (round) bzw. 2,4 mL in 48-Well RoundPlate, 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. Negativkontrolle (NK) DMSO, Testsubstanz Nitrofurantoin.  $n = 4$ .

Wie sich zeigte, hatte auch ein genaueres Auslesen der Zeitpunkte keinen qualitativen Einfluss auf den Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve. Statt den Effekt zytotoxischer Probensubstanzen in der Berechnung zu kompensieren, zeigt die Auswertevariante mit Bezug auf Histidinpeak einen noch größeren Abfall von  $\Delta t$  bei der höchsten Nitrofurantoin-Konzentration.

Der größte Unterschied zwischen den Auslesevarianten zeigte sich in der Standardabweichung zwischen den Replikaten. Da für das Erstellen der Dosis-Wirkungs-Kurve der zeitliche Abstand zur Negativkontrolle berücksichtigt wird, geht der Fehler, mit dem die ausgelesenen Werte behaftet sind, gleich doppelt ein: einmal für die Negativkontrolle, einmal für die Testsubstanz. Nach Gaußscher Fehlerfortpflanzung werden die Standardabweichungen aufaddiert, um die Standardabweichung des aufgetragenen Wertes  $\Delta t$  zu erhalten. In Abbildung 3.27 sind die Standardabweichungen der Negativkontrollen bei drei unterschiedlichen initialen Zelldichten aufgetragen.



**Abbildung 3.27: Standardabweichung des ausgelesenen Zeitpunkts (B) der Negativkontrolle**

*Salmonella typhimurium* TA 100, T = 30 °C, n = 1000 rpm,  $d_0 = 3$  mm,  $V_L = 1$  mL in 96-Well DeepWellPlate (round), Vorkultur: Optimiertes Minimalmedium mit 20 mg/L Histidin, 200  $\mu$ L Inokulum aus Kryo, Exposition: Optimiertes Minimalmedium mit 5 mg/L Histidin,  $OD_0 = 45 / 90 / 105$  FAU. Negativkontrolle (NK) DMSO, n = 8.

Es wurden je 8 Replikate vermessen und die Daten mit den oben beschriebenen Strategien ausgewertet. Für jede Zelldichte lieferte die Auswertung mittels exponentiellem Fit die geringste Standardabweichung, während die bisherige Auslesemethode (original) die höchste Standardabweichung ergab. Insgesamt lag die Standardabweichung für die 45 FAU-

Negativkontrolle fast doppelt so hoch, wie die Standardabweichung für 90 bzw. 105 FAU. Dies war entscheidend für die Wahl von 90 FAU als Standardbedingung für die folgenden Untersuchungen bekannter und schwacher Mutagene.

### **3.2.4 Untersuchung bekannter und schwacher Mutagene (Modul 2d)**

Nach erfolgreichem Transfer des Ames-RAMOS-Tests in die 96-Well  $\mu$ RAMOS-Anlage sollte der Ames- $\mu$ RAMOS-Test anhand starker und schwacher Mutagene validiert werden. Es war vorgesehen, die gleichen Mutagene wie in Modul 3b (Ringstudie) zu verwenden; da zum Zeitpunkt der Validierung die Ringstudie noch nicht vorbereitet war, wurden bekannte Mutagene aus [18] verwendet. Innerhalb der Bearbeitungszeit der AVT.BioVT (bis Dezember 2021) wurden so 4-Nitroquinolin-N-oxid (NQO), N-Nitroso-N-ethylurea (ENU), 2-Aminoanthracen, 2-Nitrofluoren sowie das bereits in Abbildung 3.24 gezeigte Nitrofurantoin untersucht. Die größte Herausforderung bestand in der Wahl geeigneter Testkonzentrationen. Während im Fluktuationstest nach der Exposition noch einmal mit Nährmedium verdünnt wird, werden im Ames-( $\mu$ )RAMOS-Test die Teststämme durchgehend mit den Testkonzentrationen der getesteten Substanzen kultiviert. Insbesondere bei höheren Konzentrationen kommt es so schnell zu wachstumshemmenden und zytotoxischen Effekten, die dazu führen, dass ein erneutes Anwachsen der Revertanten erst nach der Negativkontrolle detektiert werden kann ( $\Delta t$  negativ). Literaturangaben über verwendete Testkonzentrationen zum Fluktuationstest konnten daher nicht uneingeschränkt verwendet werden. Dies führte zu erhöhtem zeitlichem Aufwand durch die notwendigen Iterationen. Langfristig stellen die geringeren Testkonzentrationen jedoch einen Vorteil dar, da weniger Ressourcen verbraucht werden (nachhaltig), weniger Probensubstanz nötig ist (geringere Kosten) und entsprechend geringere Entsorgungskosten anfallen.

In Abbildung 3.28 sind die mit beiden Teststämmen aufgenommenen Dosis-Wirkungs-Kurven für NQO, ein bekanntes Mutagen, dargestellt. Im niedrigen Konzentrationsbereich ist ein dosisabhängiger Anstieg von  $\Delta t$  erkennbar. Mit beiden Teststämmen wird NQO also als positiv (mutagen) beurteilt. Im höheren Konzentrationsbereich fällt  $\Delta t$  bis in den negativen Bereich ab. Die Testkonzentration von NQO müsste daher noch weiter verringert werden, um die Effekte zu vermeiden. Der Ames- $\mu$ RAMOS-Test detektierte NQO trotzdem korrekt als mutagene Substanz.



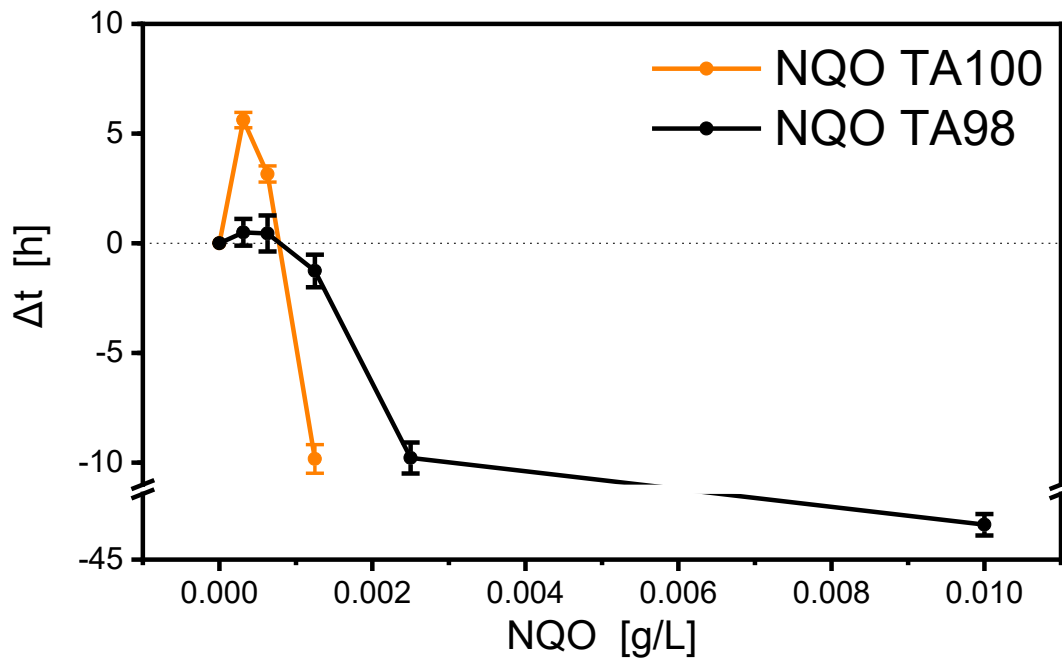


Abbildung 3.28: Dosis-Wirkungs-Kurve für 4-Nitroquinolin-N-oxid

*Salmonella typhimurium* TA 100 und TA 98, T = 30 °C, n = 1000 rpm, d<sub>0</sub> = 3 mm, V<sub>L</sub> = 1 mL in 96-Well DeepWellPlate (round) bzw. 2,4 mL in 48-Well RoundPlate, 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> = 90 bzw. 180 FAU. Negativkontrolle (NK) DMSO, n = 3.

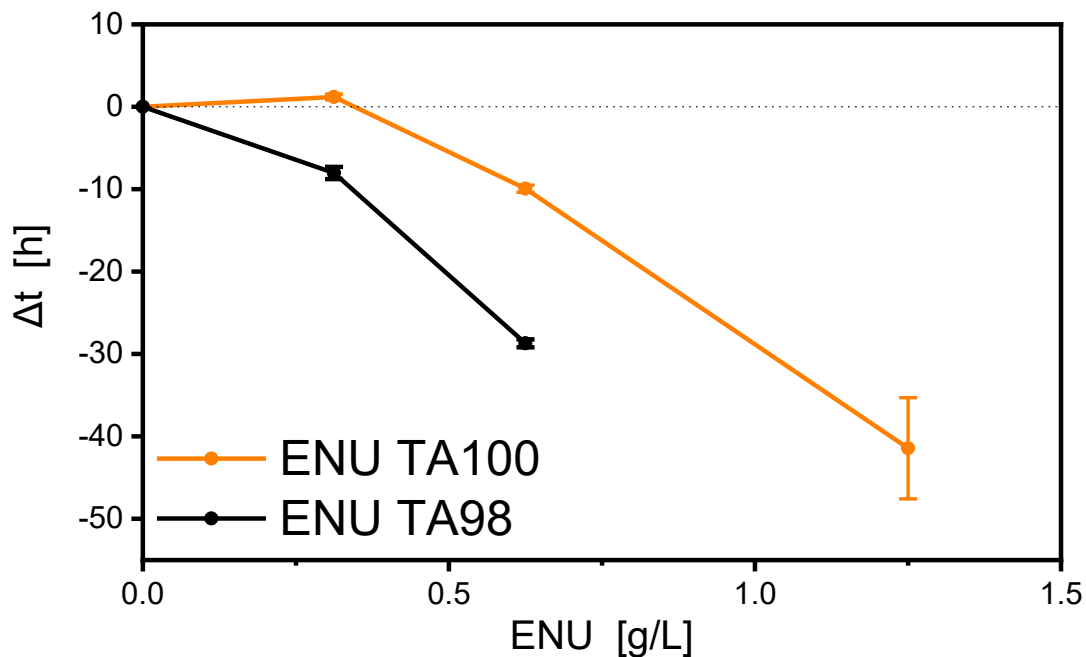
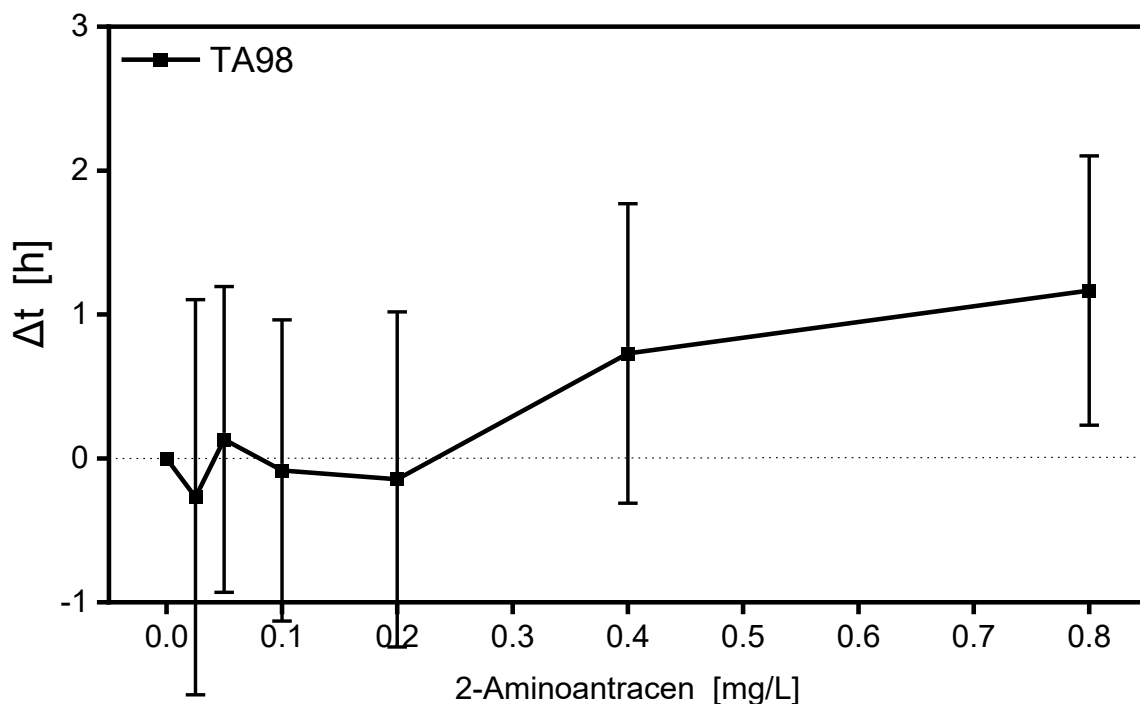


Abbildung 3.29: Dosis-Wirkungs-Kurve für N-Nitroso-N-ethylurea (ENU)

*Salmonella typhimurium* TA 100 und TA 98, T = 30 °C, n = 1000 rpm, d<sub>0</sub> = 3 mm, V<sub>L</sub> = 1 mL in 96-Well DeepWellPlate (round) bzw. 2,4 mL in 48-Well RoundPlate, 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> = 90 bzw. 180 FAU. Negativkontrolle (NK) DMSO, n = 3.

Abbildung 3.29 zeigt die aufgenommenen Dosis-Wirkungs-Kurven für ENU. Für die niedrigste getestete Konzentration von 0,3125 g/L konnte mit dem Teststamm TA 100 ein Ansteigen von  $\Delta t$  detektiert werden. Alle weiteren Konzentrationen führten zu wachstumshemmenden Effekten ( $\Delta t$  negativ). Bis zum Ende des Bearbeitungszeitraumes konnte für ENU das passende Messfenster nicht gefunden werden. In der nächsten Iteration sollten Konzentrationen von unter 0,3125 g/L getestet werden. Der positive Wert für TA 100 legt nahe, dass für geringere Konzentrationen eine dosisabhängige Änderung von  $\Delta t$  detektiert werden könnte.

Abbildung 3.30 zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurve für 2-Aminoanthracen unter Verwendung von S9-Enzymmix. Für die bekannt positive Substanz 2-Aminoanthracen konnte ein klarer, wenn auch geringer Anstieg von  $\Delta t$  mit ansteigender Konzentration gemessen werden. Eine Validierung erfolgte also für diese Substanz. Der geringe Anstieg der Dosis-Wirkungs-Kurve lag in der schlechten Enzymaktivität des verwendeten S9-Mixes begründet; eine frische Lieferung von S9 erreichte die AVT.BioVT mit Verzögerung, sodass innerhalb der Bearbeitungszeit keine neue Dosis-Wirkungs-Kurve aufgenommen werden konnte.



**Abbildung 3.30: Dosis-Wirkungs-Kurve für 2-Aminoanthracen (TA 98)**

*Salmonella typhimurium* TA 98, T = 30 °C, n = 1000 rpm,  $d_0$  = 3 mm,  $V_L$  = 1 mL in 96-Well DeepWellPlate (round) bzw. 2,4 mL in 48-Well RoundPlate, Vorkultur: Optimiertes Minimalmedium mit 20 mg/L Histidin, 200  $\mu$ L Inokulum aus Kryo, Exposition: Optimiertes Minimalmedium mit 5 mg/L Histidin,  $OD_0$  = 180 FAU. Negativkontrolle (NK) DMSO, Test mit S9, n = 3.

Zuletzt wurde für 2-Nitrofluoren (bekannt mutagen) eine Dosis-Wirkungs-Kurve aufgenommen. Sie ist dargestellt in Abbildung 3.31. Es ist klar ein dosisabhängiger Anstieg von  $\Delta t$  über eine Spanne von 4 h sichtbar. 2-Nitrofluoren wird also mit dem Ames- $\mu$ RAMOS-Test korrekt als mutagen erkannt.

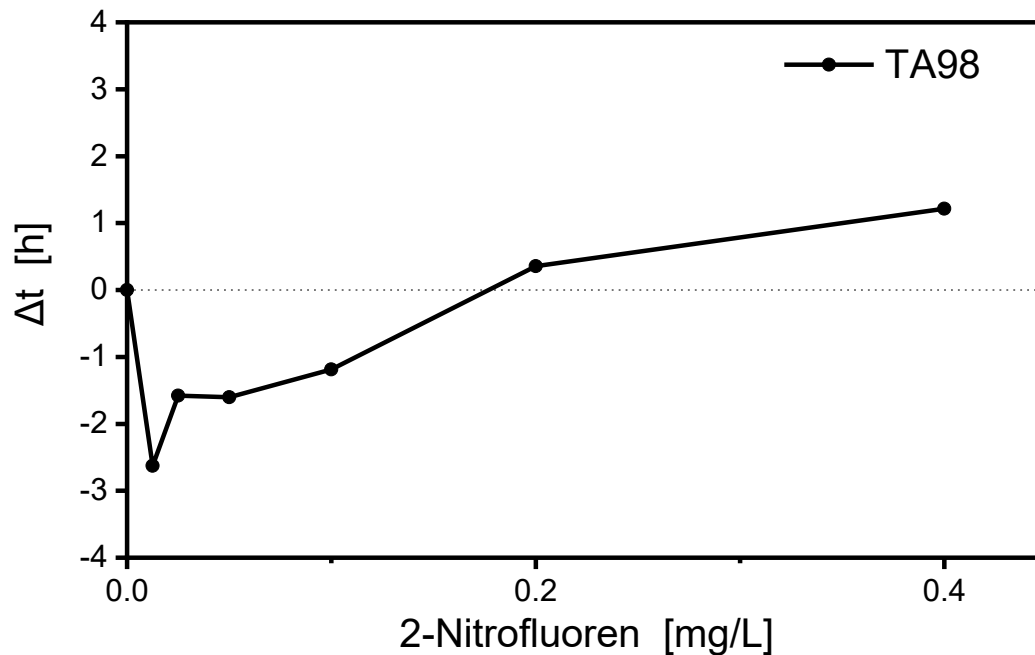


Abbildung 3.31: Dosis-Wirkungs-Kurve für 2-Nitrofluoren (TA 98)

*Salmonella typhimurium* TA 98, T = 30 °C, n = 1000 rpm,  $d_0 = 3$  mm,  $V_L = 1$  mL in 96-Well DeepWellPlate (round) bzw. 2,4 mL in 48-Well RoundPlate, Vorkultur: Optimiertes Minimalmedium mit 20 mg/L Histidin, 200  $\mu$ L Inokulum aus Kryo, Exposition: Optimiertes Minimalmedium mit 5 mg/L Histidin,  $OD_0 = 180$  FAU. Negativkontrolle (NK) DMSO, n = 12.

### 3.1 Optimierung des Ames-Fluktuationstests zur Generierung reproduzierbarer Ergebnisse (Modul 3)

#### 3.1.1 Adaptierung der neuen Vorkulturführung (Modul 3a)

Eine optimierte Kulturführung im Minimalmedium konnte erfolgreich an der GU etabliert werden. Diese Art der Kulturführung zeigte positive Effekte auf die Reproduzierbarkeit des Ames-Fluktuationstests. Die Ergebnisse auf Minimalmedium zeigten eine geringere Streuung als die vergleichbaren Untersuchungen auf Komplexmedium. Zugleich half die definierte und kontrollierte Erstellung der Kryokulturen, reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Weiterhin verbesserte eine Anpassung der Vorkulturführung bezüglich des Inokulationsvolumens die

Reproduzierbarkeit: neu wird mit 200 µL an Bakterien für die Vorkultur angeimpft. Als weitere Optimierung wurde die Zugabe von 2 mg/mL Histidin ins Exposuremedium implementiert, da es die Sensitivität des Tests verbessert.

### **3.1.2 Ringstudie (Modul 3b)**

Die gemeinsamen Optimierungen der AVT.BioVT und der GU führten zu einem verbesserten Ames-Fluktuationstest im Minimalmedium. Um diese Optimierungen zu validieren, wurde zum Ende der Projektlaufzeitverlängerung die Firma Hydrotex beauftragt, eine Vergleichsstudie durchzuführen. Auf Grund von Verzögerungen wird die Studie erst nach Ende der Projektlaufzeitverlängerung fertiggestellt. Die Ergebnisse werden dem Projektträger zugestellt.

## **4 Öffentlichkeitsarbeit**

Im Bereich der Publikationen wird gemeinsam mindestens die Veröffentlichung der Chargencharakterisierung aus Modul 1 sowie des final auf die 96-Well Anlage übertragenen Tests angestrebt. Aufgrund der kurzen Dauer des Projektes kann allerdings erst nach Ende der Laufzeit mit einer Veröffentlichung gerechnet werden.

### Konferenzen

E.C. Forsten, K. Kauffmann, A. Schiwy, H. Hollert, J. Büchs. Batch-to-batch variation of Ames test results for *S. typhimurium* TA 98 and TA 100 correlates with growth kinetics. *Toxicology Letters, Volume 350, Supplement, 2021* (Abstract und Posterbeitrag auf der Eurotox-Konferenz 2021).

E.C. Forsten, K. Kauffmann, A. Schiwy, H. Hollert, J. Büchs. Streamlining the Ames mutagenicity test by online monitoring of the oxygen transfer rate in 96-well microplate scale. *Toxicology Letters, Volume 368, Supplement, 2022* (Abstract und Posterbeitrag auf der ICT-Konferenz 2022).

## 5 Fazit und Ausblick

Ziel des in diesem Abschlussbericht beschriebenen Projektes ist es, den Ames- $\mu$ RAMOS-Test von einer 48-Well Prototyp-Anlage auf eine zu kommerzialisierende 96-Well Anlage zu übertragen und eine geeignete automatisierte Datenauswertung zu entwickeln.

Im Bereich der Stammcharakterisierung wurden **Teststämme und Chargen von Seiten der Goethe-Universität gesammelt und eine Sequenzierung durchgeführt**. Außerdem wurden **die Bakterienchargen in der RAMOS-Anlage an der AVT.BioVT vermessen**. Es wurde ein Zusammenhang zwischen hoher Wachstumsrate und hohen Negativkontrollwerten im Fluktuationstest festgestellt. Teile dieses Arbeitspaketes wurden bereits als Posterbeitrag auf der Eurotox 2021 vorgestellt. Die bisherigen Sequenzierungsarbeiten konnten keinen Aufschluss über die metabolischen Unterschiede der Stämme geben. In Zusammenarbeit mit der AK Ebersberger an der GU sind Untersuchungen auf RNA-Ebene geplant, um die Wachstumsunterschiede aufzuklären. Die Ergebnisse der Untersuchungen werden in eine Publikation einfließen, welche auch mit den Laboren geteilt werden, die der GU ihre Bakterienstämme zur Verfügung gestellt haben.

Die optimierte Kulturführung des Ames-Fluktuationstests auf Minimalmedium ist nun ein fester Bestandteil der Experimente an der GU. Es werden im nächsten Schritt die Ergebnisse der Untersuchungen auf Minimalmedium durch den Dienstleister Hydrotox GmbH erwartet. Die Ergebnisse werden jedoch leider auf Grund von weiteren Verzögerungen (Materiallieferschwierigkeiten) außerhalb des Berichtszeitraum liegen. Sie werden ebenfalls in eine gemeinsame Publikation einfließen.

Die 96-Well Anlage wurde von der Kuhner Shaker GmbH bereits auf die Bedürfnisse des Ames- $\mu$ RAMOS-Tests angepasst. Da die finale Mikrotiterplatte für die Testdurchführung zum Zeitpunkt der Fertigung noch nicht feststand, wurde eine flexible Aufnahme konzipiert, die die Vermessung der Sauerstofftransferrate in unterschiedlichen 96-Well Mikrotiterplatten ermöglicht. **Die 96-Well Anlage wurde angefertigt und wird seit Anfang April für den Ames- $\mu$ RAMOS-Test genutzt.**

Innerhalb der Projektlaufzeit konnte **der Test von der AVT.BioVT mit beiden Teststämmen in den neuen Maßstab übertragen** werden. Der Einfluss des Mikrotiterplattenmaterials, des Füllvolumens, der initialen Zelldichte und der Histidin-Konzentration auf Trennschärfe und Reproduzierbarkeit wurde untersucht. Durch eine Verdopplung der initialen Zelldichte auf 90 FAU wurde die **Reproduzierbarkeit** der Ergebnisse für den **Stamm TA 100 entscheidend verbessert**.

**Eine computergestützte, automatisierte Datenauswertung konnte erfolgreich in MATLAB implementiert werden.** Das bestehende Programm kann jederzeit um weitere, sinnvoll erscheinende Module erweitert werden.

Eine **Validierung des Ames- $\mu$ RAMOS-Tests** wurde begonnen und war bisher sowohl mit als auch ohne Verwendung von S9-Enzymmix erfolgreich. Mit beiden Teststämmen konnten literaturbekannte mutagene Chemikalien korrekt als solche identifiziert werden. Darüber hinaus ermöglicht der Ames- $\mu$ RAMOS-Tests, die Aktivität des S9-Enzymmixes zu überprüfen, sodass falsch negative Ergebnisse erkannt werden.

## 6 Literatur

- [1] K. Kauffmann, L. Gremm, J. Brendt, A. Schiwy, K. Bluhm, H. Hollert, J. Büchs, *The Science of the total environment* **2020**, 726, 137862.  
DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.137862.
- [2] K. Kauffmann, F. Werner, A. Deitert, J. Finklenburg, J. Brendt, A. Schiwy, H. Hollert, J. Büchs, *The Science of the total environment* **2020**, 717, 137168.  
DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.137168.
- [3] D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutation research* **1983**, 113 (3-4), 173 – 215.  
DOI: 10.1016/0165-1161(83)90010-9.
- [4] J. McCann, N. E. Spingarn, J. Kabori, B. N. Ames, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1975**, 72 (3), 979 – 983.  
DOI: 10.1073/pnas.72.3.979.
- [5] B. N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki, *Mutation research* **1975**, 31 (6), 347 – 364.  
DOI: 10.1016/0165-1161(75)90046-1.
- [6] B. N. Ames, F. D. Lee, W. E. Durston, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1973**, 70 (3), 782 – 786.  
DOI: 10.1073/pnas.70.3.782.
- [7] S. Pérez, G. Reifferscheid, P. Eichhorn, D. Barceló, *Environmental toxicology and chemistry* **2003**, 22 (11), 2576 – 2584. DOI: 10.1897/02-416.
- [8] C. E. Wheelock, J. L. Miller, M. J. Miller, S. J. Gee, G. Shan, B. D. Hammock, *Environmental toxicology and chemistry* **2004**, 23 (11), 2699 – 2708. DOI: 10.1897/03-544.
- [9] D. Gatehouse, *Mutation research* **1978**, 53 (3), 289 – 296. DOI: 10.1016/0165-1161(78)90001-8.

- [10] A. Schmoldt, H. F. Bente, R. Frühling, *Archives of toxicology* **1974**, 32 (2), 69 – 81.  
DOI: 10.1007/BF00316228.
- [11] A. P. Alvares, D. R. Bickers, A. Kappas, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1973**, 70 (5), 1321 – 1325.  
DOI: 10.1073/pnas.70.5.1321.
- [12] D. J. Ecobichon, A. M. Comeau, *Chemico-Biological Interactions* **1974**, 9 (5), 341 – 350. DOI: 10.1016/0009-2797(74)90129-X.
- [13] T. Anderlei, J. Büchs, *Biochemical Engineering Journal* **2001**, 7 (2), 157 – 162.  
DOI: 10.1016/S1369-703X(00)00116-9.
- [14] T. Anderlei, W. Zang, M. Papaspyrou, J. Büchs, *Biochemical Engineering Journal* **2004**, 17 (3), 187 – 194. DOI: 10.1016/S1369-703X(03)00181-5.
- [15] D. Flitsch, S. Krabbe, T. Ladner, M. Beckers, J. Schilling, S. Mahr, U. Conrath, W. K. Schomburg, J. Büchs, *Journal of biological engineering* **2016**, 10, 14.  
DOI: 10.1186/s13036-016-0034-3.
- [16] R. Dinger, C. Lattermann, D. Flitsch, J. P. Fischer, U. Kosfeld, J. Büchs, *Biotechnology and bioengineering* **2022**, 119 (3), 881 – 894. DOI: 10.1002/bit.28022.
- [17] C. Stöckmann, U. Maier, T. Anderlei, C. Knocke, G. Gellissen, J. Büchs, *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **2003**, 30 (10), 613 – 622.  
DOI: 10.1007/s10295-003-0090-9.
- [18] D. Kirkland, P. Kasper, H.-J. Martus, L. Müller, J. van Benthem, F. Madia, R. Corvi, *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis* **2016**, 795, 7 – 30. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2015.10.006.