

Der umu-Genotoxizitätstest – Anwendungspotenziale und Automatisierbarkeit

Adolf Eisentraeger, Aachen; adolf.eisentraeger@post.rwth-aachen.de
Corinna Brinkmann, Aachen; corinna.brinkmann@post.rwth-aachen.de

Abstract

Genotoxische Substanzen stellen einen ökotoxikologischen und humantoxikologischen Risikofaktor dar. Ihre Quantifizierung mittels instrumenteller Analytik hat nur eine begrenzte Aussagekraft, weil nur ausgewählte Stoffe quantifiziert werden und deren Bioverfügbarkeit nicht berücksichtigt wird. Daher wurden wirkungsbezogene biologische Testverfahren wie der bakterielle umu-Genotoxizitätstest entwickelt, validiert und standardisiert. Dieser Test ist innerhalb eines Arbeitstages in Mikrotitrationsplatten durchführbar und komplett automatisierbar. Sein Anwendungsbereich reicht von der Testung von Abwasserproben über die Testung des wässrig extrahierbaren Potenzials von Feststoffproben bis hin zur Bewertung von Bauprodukten. Zur Interpretation der Messdaten wird empfohlen, den Test immer durch eine angepasste chemische Analytik in Frage kommender Schadstoffe zu ergänzen.

Hintergrund

Wirkungsbezogene Untersuchungen mit biologischen Testverfahren werden mittlerweile in der Ökotoxikologie routinemäßig zur Gefährdungsabschätzung von Chemikalien und Umweltproben eingesetzt. Sie ergänzen dabei die mittels chemisch-analytischer Methoden erhaltenen Informationen über die Konzentrationen von einzelnen Schadstoffen oder von Summenparametern wie dem DOC-Gehalt. Unbestritten ist, dass die Quantifizierung von Stoffkonzentrationen nur sehr bedingt Aussagen zu ökotoxischen und toxischen Effekten zulässt, da mit der instrumentellen Analytik nur bestimmte Substanzen erfasst werden, nach denen aktiv gesucht wird. Darüber hinaus werden Kombinationswirkungen nicht erfasst, und die Bioverfügbarkeit der Schadstoffe bei den Extraktionen für chemisch-analytische Untersuchungen wird nicht oder nur sehr eingeschränkt berücksichtigt.

Aus all diesen Gründen sind biologische Testverfahren entwickelt, umfassend validiert und standardisiert worden. Limitierend für die praktische Umsetzung der Verfahren ist die je nach Anwendungsbereich unterschiedliche Integration dieser Testverfahren in die Gesetzgebung. So sind ökotoxikologische und toxikologische Methoden die Basis der Chemikalienbewertung in der anstehenden Umsetzung der EU-Richtlinie REACH und der Bewertung des wassergefährdenden Potenzials von Chemikalien [Bundesministerium für Umwelt, 1999]. In Deutschland sind sie ein wesentlicher Bestandteil von Abwasseruntersuchungen [anonymus, 2002]. In die neue Bundesbodenschutzverordnung sind sie dagegen nicht explizit eingebunden worden.

Genomschädigende Wirkungen von Schadstoffen stellen einen der wichtigsten toxikologischen und ökotoxikologischen

Endpunkte dar. Daher wurden verschiedene biologische Testverfahren mit unterschiedlichen genetischen Endpunkten zur Erfassung des genotoxischen Potenzials von Umweltproben oder Chemikalien entwickelt. Dabei wurde von einem Zusammenhang zwischen der primären Schädigung der DNA und dem möglichen Auftreten von Tumoren ausgegangen, weshalb die Untersuchung von DNA-Schäden als Screeningverfahren zur Detektion möglicher genotoxischer Wirkung etabliert ist.

Grundlage des umu-Tests

Eines dieser Verfahren, das einen sehr breiten Anwendungsbereich hat, ist der umu-Genotoxizitätstest, bei dem der Teststamm TA 1535/pSK1002 von *Salmonella choleraesuis subsp. chol.* (früher: *Salmonella typhimurium*) zum Einsatz kommt. Der zunächst von Oda et al. [1985] entwickelte umu-Genotoxizitätstest wurde von Reifferscheid et al. [1991] auf Mikroplatten übertragen. In einer Mikroplattenversion ist dieser Test auch für die Testung von Wasser und Abwasserproben standardisiert [ISO 13829, 2000]. Bakterien verfügen über verschiedene Reparatursysteme zur Behebung von DNA-Schäden. Bei massiven Schädigungen der DNA treten fast immer einzelsträngige DNA-Abschnitte auf. Diese induzieren das aus mindestens zwölf Genen bestehende „SOS-Reparatursystem“. Ein Gen (umuC) dieses Reparaturmechanismus wird auf dem Wege gentechnischer Veränderung mit dem lacZ-Gen, welches für die Bildung des Enzyms β -Galaktosidase in der Zelle verantwortlich ist, gekoppelt. Kommt es nun durch Einwirkung einer erbgutschädigenden Substanz zur Aktivierung des SOS-Reparatursystems, erfolgt aufgrund dieser Kopplung gleichzeitig mit der Expression des umuC-Gens die Expression des lacZ-Gens und damit die Bildung von β -Galaktosidase, deren Freisetzung über die photometrische Quantifizierung der Gelbfärbung als Testkriterium für den Nachweis des genotoxischen Potenzials der Substanz herangezogen wird.

Testanforderungen

Der umu-Test wird mit einem nicht-pathogenen, gentechnisch veränderten Bakterium durchgeführt. Daher wird ein S1-Laborbereich benötigt. Der Test wird in wässriger Suspension in 96-Well-Mikrotitrationsplatten und nicht, wie der Ames-Test [ISO 16420, 2005], in Petrischalen angesetzt. Grundsätzlich können daher nur wasserlösliche Substanzen bzw. Proben mit diesem Testverfahren charakterisiert werden. Für die Testung von Proben mit schlecht wasserlöslichen Bestandteilen kann Dimethylsulfoxid in einer Konzentration von maximal 4% als Lösungsvermittler eingesetzt werden. Zytotoxische Effekte werden erfasst, indem die optische Dichte der Probensuspension und damit das Bakterienwachstum

parallel vor und nach der Inkubation bestimmt wird. Kritisch diskutiert wird jedoch, ob bei Vorliegen moderater zytotoxischer Effekte genotoxische Effekte überschätzt werden [Baun et al., 1999]. Da der Test in Mikroplatten mit einem Ansatzvolumen von 300 µL pro Well bei drei Parallelansätzen durchgeführt wird, werden nur geringe Proben volumina benötigt. Sehr vorteilhaft ist, dass der umu-Test vollständig an einem Arbeitstag durchgeführt und ausgewertet werden kann. Darüber hinaus ist der Test komplett automatisierbar.

Anwendungsbereiche

Der umu-Test ist nicht Bestandteil der nach REACH vorgeschriebenen Untersuchungen von Chemikalien. Dennoch ist er wegen seines sehr breiten Anwendungsbereichs sehr interessant: Der Test ist in die Abwasserverordnung eingebunden [anonymus, 2002]. Als ein SOS-Reparaturtest wird er zur Charakterisierung von Oberflächenwässern genutzt [Ohe et al., 2004]. Als Ergebnis eines BMBF-Projekts zum Thema „Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Genotoxizitätstests für Oberflächenwasser“ ist er neben dem Ames-Test und dem Comet Assay Bestandteil des „Minimalpakets zur 1. Stufe der Genotoxizitätsprüfung“ [anonymus, 2000]. Für die Erfassung des wässrig extrahierbaren genotoxischen Potentials von Böden und Bodenmaterialien wird der Test routinemäßig genutzt [Rila und Eisentraeger, 2003; Eisentraeger et al., in press]. Dabei wird er nur in speziellen Fällen durch den Ames-Test ergänzt [Eisentraeger et al., 2004a]. In die Richtlinien zur ökotoxikologischen Bewertung von Böden und Bodenmaterialien ist er fest eingebunden [ISO 15799, 2003; ISO/DIS 17616, 2006]. Der dabei verfolgte Ansatz wurde in letzter Zeit auch auf die Charakterisierung von Abfällen [EN 14735, 2005] und Bauprodukten [anonymus, 2005] übertragen. Schließlich wird der umu-Test auch zur Charakterisierung von Sedimenten und Grundwasserproben herangezogen [Reifferscheid und v. Oepen, 2002]. In Grundlagenuntersuchungen konnte auch die Eignung des umu-Test als Screeningtest zur Kontrolle verschiedener Chargen während der Produktion von Schmierfluiden aufgezeigt werden [Eisentraeger und Brinkmann, 2006].

Der umu-Test sollte dabei immer ergänzt werden durch eine angepasste Analytik der jeweils in Frage kommenden Umweltschadstoffe. Nur dadurch können die Messdaten erklärt und das genotoxische Potenzial reduziert werden.

Automatisierbarkeit

Durch eine Automatisierung des Tests können für die Routinetestung Zeit und Kosten gespart werden. Proben können tagsüber aufbereitet und über Nacht getestet werden. Nach Zugabe der Testkultur und aller weiteren Chemikalien und Lösungen wird der automatisierte Test gestartet und bedarf keiner weiteren manuellen Kontrolle. Die Anweisungen und Gültigkeitskriterien der ISO 13829 können dabei eingehalten werden. Die Abb. 1 zeigt eine Aufsicht der eingesetzten Pipettierplattform.

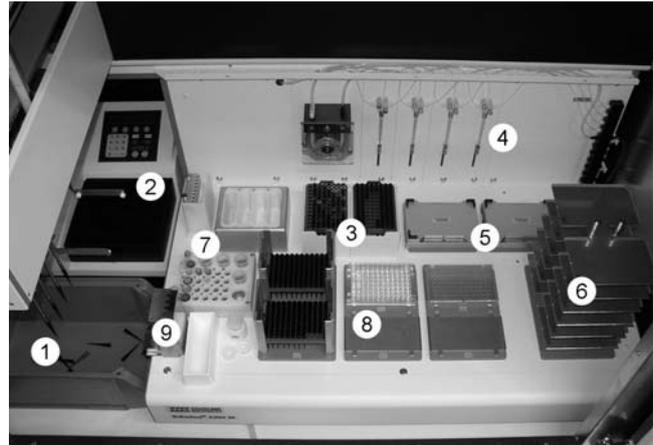


Abb. 1: Vollautomatisierter umu-Test nach ISO 13829 [2000]. Die Automatenplattform ist mit einem Mikrotiterplattenphotometer (BIO-TEK™ ELx808) (2), zwei Variomag® telescake Schüttlern (H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim) (5), vier Pipettenhaltern (1), zwei Staplern für 12 Mikrotiterplatten (6) und einer Inkubationshaube mit Temperaturregelung (noctua GmbH, Mössingen) ausgerüstet (nicht dargestellt) [Eisentraeger et al., 2004b]

Die RoboSeq™ 4204 SE-Plattform (MWG AG, Ebersberg) ist in eine Inkubationshaube (noctua GmbH, Mössingen) eingebaut, die eine gleichbleibende Temperierung während des Tests gewährleistet. Der Automat ist mit vier Haltern für Wechselspitzen (1) ausgerüstet, die ein schnelles, präzises Pipettieren erlauben. Die genaue Aufnahme der Flüssigkeiten ermöglichen die Mikrokolbenspritzen (4) an der hinteren Wand der Haube. Die photometrische Messungen der optischen Dichte der A- und B-Platten und der Gelbfärbung in den C-Platten erfolgt ebenfalls automatisch. Vergleichende Untersuchungen des manuellen und des automatisierten Tests haben sehr gute Übereinstimmung gezeigt mit der Einschränkung, dass im automatisierten Test flüchtige Substanzen wie z.B. Ethanol bislang nicht untersucht werden können, da die Mikroplatten vom Automaten nicht mit Folie abgeklebt werden können.

Selbstverständlich kann der Test auch mit Plattformen anderer Hersteller automatisiert werden. Voraussetzung für eine adäquate technische Umsetzung ist jedoch, dass die beteiligten Techniker alle methodischen biologischen Aspekte des umu-Tests im Detail verstanden haben. Unter anderem ist auf eine hinreichend genaue Temperierung, auf die exakte Pipettierung und auf das passende Zeitmanagement zu achten, um ausreichend hohe Enzymaktivitäten und Reproduzierbarkeiten zu erhalten.

Literatur:

- anonymus. 2000. Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Genotoxizitätstests für Oberflächenwasser". Hrsg.: Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Projektträger Wassertechnologie und Entsorgung (PtWT+E), Außenstelle Dresden, Hallwachsstr. 3, 01069 Dresden.
- anonymus. 2002. Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwässer in Gewässer, Bundesgesetzblatt I Nr. 28 vom 22.6.2004, 1108.
- anonymus. 2005. Merkblatt zur „Bewertung der Auswirkungen von Bauprodukten auf Boden und Grundwasser“. Schriften des Deutschen Instituts für Bautechnik. Hrsg.: Deutsches Institut für Bautechnik – BIBt – Anstalt des öffentlichen Rechts, Kolonnenstr. 30L, 10829 Berlin.
- Baun A, Andersen J S, Nyholm N. 1999. Correcting for toxic inhibition in quantification of genotoxic response in the umuC test. *Mutat Res* 441, 171-180.
- Bundesministerium für Umwelt 1999. Allgemeine Verwaltungsvorschrift zum Wasserhaushaltsgesetz über die Einstufung wassergefährdender Stoffe in Wassergefährdungsklassen (VwVwS). *Bundesanzeiger* 51 (98a), 17. Mai 1999.
- Eisentraeger A, Brinkmann C, Michel K, Hahn S, Huettner M, Weber G. 2004b. Development of automated high-throughput ecotoxicity and genotoxicity test systems and fields of application. *Water Sci Technol* 50, 109-114.
- Eisentraeger A, Brinkmann C. 2006. Anwendung und Automation des umu-Genotoxizitätstest zur Identifizierung von Schadstoffen in Umweltproben sowie Chemikalien und Produkten. Kurzreferate der Jahrestagung der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der GCDh: Quo vadis Umweltforschung? Von der "end of pipe"-Strategie zur Nachhaltigkeit. 4.-6.10.2006, Halle (Saale), 115.
- Eisentraeger A, Reifferscheid G, Dardenne F, Blust R, Schofer A. (in press). Hazard characterisation and identification of a former ammunition site using microarrays, bioassays and chemical analysis. *Environ Toxicol Chem*.
- Eisentraeger A, Rila JP, Hund-Rinke K, Roembke J. 2004a. Proposal of a testing strategy and assessment criteria for the ecotoxicological assessment of soil or soil materials. *J Soils & Sediments* 4, 123-128.
- Europäisches Komitee für Normung (CEC). Charakterisierung von Abfällen – Herstellung von Abfallproben für ökotoxikologische Untersuchungen. EN 14735. 2005. Brüssel, Belgien.
- International Organization for Standardization. Soil quality - Guidance on the choice and evaluation of bioassays for ecotoxicological characterization of soils and soil materials. ISO 15799. 2003. Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization. Soil quality - Guidance on the choice and evaluation of bioassays for ecotoxicological characterization of soils and soil materials. ISO/DIS 17616. 2006. Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization. Water quality - Determination of the genotoxicity of the water and waste water using the umu test. ISO 13829. 2000. Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization. Water quality - Determination of the genotoxicity of water and waste water – Salmonella/microsome test (Ames test). ISO 16240. 2005. Geneva, Switzerland.
- Oda Y, Nakamura S, Oki I, Kato T, Shinagawa K. 1985. Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat Res* 147, 219-229.
- Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. 2004. Mutagens in surface water: a review. *Mutat Res* 567, 109-149.
- Reifferscheid G, Heil J, Oda Y, Zahn RK. 1991. A microplate version of the SOS/umu-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples. *Mutat Res* 253, 215-222.
- Reifferscheid, G and v. Oepen B. 2002. Genotoxicity and Mutagenicity of Suspended Particulate Matter of River Water and Waste Water Samples, Analysis, Toxicity and Biodegradation of Organic Pollutants in Groundwater from Contaminated Land, Landfills and Sediments, *The Scientific World* 2, 1036-1039.
- Rila JP, Eisentraeger A. 2003. Application of bioassays for risk characterisation and remediation control of soils polluted with nitroaromatics and PAHs. *Water Air Soil Pollut* 148, 223-242.

Korrespondenzadresse

PD Dr.-Ing. Adolf Eisentraeger
Institut für Hygiene und Umweltmedizin
Universitätsklinikum Aachen, AÖR
Medizinische Fakultät der RWTH Aachen
Pauwelsstrasse 30,
D-52074 Aachen,
Tel: 0241/80-88292, Fax: 0241 80-82477,
www.hygiene.rwth-aachen.de