

Matthias Dürr  
Dr. sc. hum.

## **Mutagenitätstest für Oberflächengewässer – ein optimiertes Testprotokoll und seine praktische Anwendung zur Gewässerbeurteilung**

Geboren am 20.09.1965 in Heidelberg

Diplom der Fachrichtung Chemie am 12.09.1995 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hygiene

Doktorvater: Prof. Dr. Dr. h.c. H.-G. Sonntag

Die prioritär zu reduzierende stoffliche Belastung der Fließgewässer verlagerte sich in jüngster Zeit von der akut toxischen Wirkung der den Sauerstoff- und Nährstoff-Haushalt des Gewässers beeinflussenden Substanzen, hin zu chronisch toxischen Wirkungen einer Vielzahl von in geringen Konzentrationen vorkommenden organischen Stoffen.

Diese lassen sich oftmals durch die chemische Einzelstoffanalytik nicht nachweisen. Zwar können einzelne bekannte Substanzen durch den Einsatz neuer Analysetechniken in geringsten Spuren (häufig bis in den ppt-Bereich) nachgewiesen werden, die Vielzahl unbekannter Substanzen führt jedoch bei einer Gesamtbetrachtung zu einem nicht überschaubaren Chemikalienspektrum in den verschiedenen Gewässern.

Die genaue Kenntnis der Verunreinigungen des Oberflächengewässers und deren biologische Wirksamkeit ist auf Grund der Verwendung von Oberflächenwasser zur Trinkwasseraufbereitung (5,5 Millionen Europäer beziehen aus dem Rhein ihr Trinkwasser) von besonderem Interesse.

Eine mögliche gesundheitsgefährdende Wirkung kann jedoch mittels chemischer Analytik nur anhand identifizierter Stoffe und deren toxikologischen Daten (wenn vorhanden) abgeschätzt werden. Auf Grund der enormen Stoffvielfalt und möglicher Modifikationen durch die Umwelt sowie des apparativen und finanziellen Aufwandes ist die chemische Analytik zum Screening von Umweltproben kein geeignetes Mittel. Hier sind biologische Testsysteme die schnellere und praktikablere Alternative. Es ist daher sinnvoll, biologische Tests anzuwenden, um die Toxizität der Gewässerverunreinigungen in ihrer Gesamtheit zu erfassen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die mutagene Wirkung in nativen (nicht aufkonzentrierten) Wasserproben von Oberflächengewässern mit dem Ames-Test zu erfassen und zu evaluieren. Die Untersuchungen waren Teil des Verbundvorhabens "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Genotoxizitäts-Tests für Oberflächenwasser" gefördert vom Bundesministerium für Forschung und Technik Fördernummer: 02-WU 9562, an dem 14 verschiedene Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Testverfahren beteiligt waren. Die eigenen Untersuchungen gliedern sich in Laborversuche mit bekanntermaßen mutagenen Substanzen und Feldversuche mit Oberflächenwasserproben.

Die Laborversuche dienten der Optimierung des Testprotokolls hinsichtlich der Anwendung an Wasserproben. In der Gesamtbeurteilung führte die Testoptimierung zu einer deutlich verbesserten Sensitivität im Vergleich zu dem Standard-DIN-Protokoll. Die Steigerung der Sensitivität des Testsystems durch die einzelnen Optimierungsschritte zeigt sich z.B. in der Senkung der Nachweisgrenze für Nitrochinolin-N-oxid um den Faktor 250.

In einem vereinfachten Ringversuch zeigte sich, dass auch mit den durchgeführten Optimierungsschritten eine gute Reproduzierbarkeit besteht und eindeutig das mutagene Potential der dotierten Proben ermittelt werden konnte.

Die klassische Auswertung war nicht geeignet, die Mutagenität in den Oberflächenfließgewässern differenziert abzubilden. Die Auswertung mit Signifikanzfaktoren führt ggf. zu falsch-positiv-Ergebnissen und ist für eine qualitative Auswertung nicht geeignet. Dagegen ermöglicht die Auswertung nach Signifikanzniveau die Berücksichtigung der Tagesschwankungen und ist daher vorzuziehen. In jedem Fall sollte eine Bewertung von Oberflächenwasserproben hinsichtlich des Mutagenpotentials die Ergebnisse mehrerer Teststämme umfassen.

Bei den Positiv-Kontrollen lag der optimierte Ames-Test an der Spitze hinsichtlich der Sensitivität im Vergleich zu den anderen im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes eingesetzten Verfahren. Lediglich der umu-Test – ebenfalls ein prokaryontischer Genotoxizitätstest – kann als gleichrangig eingeordnet werden. Eine Ausnahme hierbei bildet jedoch die gänzliche Nicht-Aktivität von N-Nitrosodimethylamin im Ames-Test. Daher ist es notwendig, entsprechend den Erfahrungen in der Arzneimittelprüfung mehrere Testsysteme in einer mehrstufigen Teststrategie zur Anwendung zu bringen.

Bemerkenswert bei den Ergebnissen der nativen Oberflächenwässer ist, dass in allen Teststämmen ohne S9-Mix die Mediane der Proben aus dem Rhein höher liegen als diejenigen aus der Elbe. In den chemischen Untersuchungen des Verbundpartners TZW Karlsruhe und den routinemäßigen Untersuchungen der ARGE-Elbe liegen die Belastungen der Elbe regelmäßig höher, als die des Rheins. Mit S9-Mix ergeben sich nur marginale Unterschiede für TA 100 und TA 7005. In TA 98 liegt der Median der Elbwasserproben höher, als derjenige der Rheinwasserproben. Eine Zuordnung bzw. Korrelation der genotoxischen Aktivität mit chemischen Daten war nicht möglich. Die in den Bioassays ermittelte Aktivität muss von anderen Substanzen bzw. Substanzklassen verursacht sein.

Insgesamt zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Projektpartner. Der Vergleich mit den Ergebnissen der Verbundpartner untermauert die These des ubiquitären Vorkommens von chemischen Genotoxinen. Die gute Sensitivität des optimierten Ames-Tests zeigte sich nicht nur bei den Positivkontrollen, sondern auch bei den Oberflächenwasserproben.

Die mutagene Aktivität der nativen Wasserproben scheint ungeachtet der Herkunft der Probe einer jahreszeitlichen Dynamik zu unterliegen. Diese zeitliche Variabilität konnten in allen Stämmen festgestellt werden. Jedoch muss in Anbetracht der geringen Datendichte diese Interpretation einer jahreszeitlichen Abhängigkeit der Mutagenität mit der entsprechenden Zurückhaltung bis zum Vorliegen weiterer Daten zurückgestellt werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der modifizierte Ames-Test und der Comet-Assay eine geeignete erste Stufe im Rahmen eines Umweltscreenings darstellen. Sie besitzen mit ihrem qualitativen Vorhersagewert einen besonderen Stellenwert dort, wo mit vertretbarem zeitlichen und finanziellen Aufwand eine grobe Klassifizierung von genotoxischen Effekten und eine Abschätzung der damit verbundenen Risiken erfolgen soll.

Diese Tests lassen sich routinemäßig einsetzen und sollten daher Bestandteil der ersten Stufe einer Testbatterie zur Anzeige genotoxischer Substanzen in Oberflächengewässern sein.