

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung
Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)
 Teil 3: Bestimmung des erbgutverändernden Potentials von Wasser
 mit dem umu-Test (T 3)

DIN
38415-3

ICS 13.060.40

Deskriptoren: Wasseruntersuchung, umu-Test, Gehaltsbestimmung, erbgutverändernder Stoff, Testverfahren

German standard methods for the examination of water, waste water and sludge — Sub-animal testing (group T) — Part 3: Determination of the genotype potential of water with the umu-test (T 3)

Méthodes normalisées allemandes pour l'analyse des eaux, des eaux résiduaires et des boues — Tests sous animaux (groupe T) — Partie 3: Détermination de la génotoxicité de l'eau selon l'essai "umu" (T 3)

Vorwort

Diese Norm wurde gemeinsam mit der Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker aufgestellt (siehe Anhang D).

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

Die Anhänge A, B, C und D sind informativ.

Einleitung

Als Testorganismus dient das gentechnisch veränderte Bakterium *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002¹⁾.

Die Bakterien werden unter festgelegten Bedingungen verschiedenen Konzentrationen des Testgutes exponiert. Dabei induzieren Gentoxine, in Abhängigkeit von ihrer Konzentration, das sogenannte umuC-Gen. Das Produkt des umuC-Gens ist an der bakteriellen Mutagenese direkt beteiligt, indem es den Einbau falscher Basen bei der DNA-Neusynthese ermöglicht. Die Induktion des Gens ist somit ein Maß für das mutagene Potential des untersuchten Testguts. Da das umuC-Gen im verwendeten Testorganismus mit dem lacZ-Gen für die β -Galaktosidase gekoppelt ist, wird die Messung der Induktionsrate des umuC-Gens durch die Bestimmung der Galaktosidase-Aktivität möglich.

¹⁾ Zu beziehen bei: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig.

Fortsetzung Seite 2 bis 22

Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

1 Anwendungsbereich

Das Verfahren wird zur Bestimmung des erbgutverändernden Potentials von Wasser angewendet.

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation.

DIN 12036

Laborgeräte aus Glas — Enghals-Standflaschen mit Kegelschliff und Stopfen

DIN 12387

Laborgeräte aus Glas — Erlenmeyerkolben mit Kegelhülse, Kegel 1:10

DIN 12664-1

Laborgeräte aus Glas — Meßkolben mit einer Marke — Meßkolben mit Bördelrand, Kegelhülse und Kegelschliffverbindung

DIN 12680-2

Laborgeräte aus Glas — Meßzylinder — Mit Hauptpunkte-Ringteilung

DIN 12697

Laborgeräte aus Glas — Meßpipetten, schnellablaufend, Wartezeit 15 Sekunden, Klasse AS

DIN 12775

Laborgeräte aus Glas — Laborthermometer, Skalenwerte 0,1 °C, 0,2 °C und 0,5 °C

DIN 58945-1

Brutschränke für mikrobiologische Zwecke — Begriffe, Anforderungen, Anwendung

DIN 58946-2

Sterilisation — Dampf-Sterilisatoren — Groß-Sterilisatoren, Anforderungen

DIN EN ISO 10712 : 1996-02

Wasserbeschaffenheit — *Pseudomonas putida* Wachstumshemmtest (*Pseudomonas*-Zellvermehrungshemmtest) (ISO 10712); Deutsche Fassung EN ISO 10712 : 1995

DIN EN 27027

Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der Trübung (ISO 7027 : 1990); Deutsche Fassung EN 27027 : 1994

3 Definitionen

Für die Anwendung dieser Norm gelten die folgenden Definitionen.

3.1 Zellvermehrung

Zunahme der Zellzahl während der Versuchszeit
(aus: DIN EN ISO 10712 : 1996-02).

3.2 Stammkultur

Kultur einer Bakterienart zur Bewahrung des ursprünglichen Teststammes im Laboratorium und zur Bereitstellung des Impfmateri- als für die Übernacht-Kultur.

3.3 Übernacht-Kultur

Bakterienkultur zur Vermehrung der Testbakterien für die Vorkultur.

3.4 Vorkultur

Bakterienkultur zur Adaption der Testbakterien an die Testbedingungen und zur Anzucht des Inokulums für den Testansatz.

3.5 Inokulum; Impfmateri- als

Zum Animpfen einer Kultur verwendete Bakteriensuspension und zum An- impfen eines Testansatzes verwendete exponentiell wachsende Vorkultur.

3.6 Konzentrations-Wirkungsbeziehung

Zunahme der β -Galaktosidase-Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration des Testguts.

3.7 Nährmedium

Wäßrige Lösung von Nährstoffen, die für das Bakterienwachstum notwendig sind.

3.8 Testgut

Die zu untersuchende Probe, jeweils nach Abschluß aller Vorbereitungsmaß- nahmen, wie z. B. Zentrifugation, Filtration, Homogenisierung, pH-Wert-Einstel- lung, Messung der elektrischen Leitfähigkeit.

3.9 Verdünnungsansatz

Mischung aus Testgut und Verdünnungswasser (Wasser nach Abschnitt 10) in verschiedenen Volumenverhältnissen.

3.10 Testansatz

Mischung aus Nährmedium, Inokulum und Verdünnungsansatz.

3.11 Negativkontrollansatz

— Leerwertansatz (Nährmedium ohne Bakterien);

- Negativkontrollansatz für Wasserproben (Nährmedium, Inokulum und Wasser nach Abschnitt 10);
- Negativkontrollansatz für die Positivkontrollansätze (Nährmedium, Inokulum und Lösemittel).

3.12 Positivkontrollansatz

- Nährmedium, Inokulum und in Lösemittel gelöster, gut untersuchter genotoxischer Stoff, z. B. 4-Nitroquinolin-N-oxid oder 2-Aminoanthracen mit metabolischer Aktivierung durch S9 (siehe Anhang A.2) (Überstand eines Gewebehomogenats aus Rattenleber nach Zentrifugation bei 9 000 g)²⁾ (Referenzansatz).

3.13 Verdünnungsstufe $G^3)$

Das Volumenverhältnis einer Mischung der Wasserprobe mit Verdünnungswasser im Testansatz nach Zugabe von Inokulum und Nährmedium. Die testbedingt kleinstmögliche Verdünnung (ohne Zusatz von Verdünnungswasser) ist 1:1,5. Sie wird $G = 1,5$ genannt.

BEISPIEL:

Wird eine Wasserprobe mit dem siebenfachen Volumen an Verdünnungswasser auf insgesamt das achtfache Volumen verdünnt, so ist die Verdünnungsstufe nach Zugabe von Inokulum und Nährmedium $G = 12$.

3.14 G_{EU} -Wert

Kleinster Wert von G des Testansatzes, in dem unter den Bedingungen dieses Verfahrens eine Induktionsrate $< 1,5$ gemessen wird. Werden bei Zusatz von S9 unterschiedliche Induktionsraten gemessen, so ist der höhere der beiden G_{EU} -Werte maßgebend.

4 Grundlage des Verfahrens

Aus dem Vergleich der spontanen Aktivierung des umuC-Gens mit der durch Einwirkung des Testguts induzierten Rate ergibt sich ein Maß für die Gen-toxizität bzw. das erbgutverändernde Potential des untersuchten Materials nach einer definierten Einwirkungszeit.

5 Störungen

Ungelöste Stoffe können das Testergebnis verfälschen und/oder die Reproduzierbarkeit beeinträchtigen.

²⁾ Über Bezugsquellen gibt Auskunft: Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., 10772 Berlin

³⁾ Früher: Verdünnungsfaktor

Beträgt die elektrische Leitfähigkeit einer nativen (unverdünnten) Probe mehr als 3 500 mS/m, so kann dies unter Umständen ebenfalls das Testergebnis beeinträchtigen. Z. B. kann bei einer Salzkonzentration von > 30 g/l NaCl bzw. > 40 g/l Na₂SO₄ in der Probe der erforderliche Wachstumsfaktor von 0,5 nicht erreicht werden.

Bei stark gefärbtem und/oder trübem Abwasser können bei der photometrischen Messung Lichtverluste durch Absorption eintreten. Gegebenenfalls ist ein unbeimpfter Leerwertansatz mit Abwasser (Blindwert) ebenfalls zu untersuchen. Enthält eine Probe in erheblichem Maße zytotoxische Komponenten, führt dies zu einer Hemmung der Zellteilung bzw. zum Absterben der Zellen, was niedrigere Wachstumsfaktoren zur Folge hat.

6 Bezeichnung

Bezeichnung des Verfahrens zur Bestimmung des erbgutverändernden Potentials von Wasser mit dem umu-Test (T 3):

Verfahren DIN 38415 – T 3

7 Testorganismus

Salmonella typhimurium ist ein gram-negatives, fakultativ anaerobes Bakterium aus der Familie der Enterobacteriaceae.

Ausgangsstamm ist der für den Ames-Test*) verwendete Stamm Salmonella typhimurium TA1535 mit einigen für einen sensitiven Gentoxizitätstest wichtigen Eigenschaften:

- Das verwendete Bakterium trägt ein modifiziertes Genom. Es besitzt ein Excisions-Reparaturdefizit (uvrB), eine unvollständige Zellwand (rfa), die für viele Stoffe gut permeabel ist, und kein chromosomales lacZ-Gen.
- Gegenüber dem Ausgangsstamm trägt der Testorganismus noch das Plasmid pSK1002 mit dem umuC-lacZ-Gen und ein Gen für Ampicillin-resistenz.

Dieser Salmonellenstamm trägt die Bezeichnung TA1535/pSK1002¹⁾.

Er läßt sich wegen seiner Ampicillinresistenz gut selektionieren.

Das Vorgehen zum Prüfen der Merkmale des Genotyps ist in Anhang B angegeben.

8 Stammkulturansatz und seine Aufbewahrung

Die Bakterien des Stammes Salmonella typhimurium TA1535/pSK1002¹⁾ werden in 150 µl Nährmedium mit einem 10%igen Anteil von Dimethylsulfoxid (DMSO) oder 20% Glyzerin (in diesem Fall entfällt der Waschschrift nach 12.1) in 2-ml-Ampullen bei mindestens –80°C aufbewahrt. Zur Herstellung einer Übernacht-Kultur (nach 3.3) werden die Bakterien nur **einer** Ampulle benutzt.

*) Norm in Vorbereitung

¹⁾ Siehe Seite 1

9 Geräte

- Standflaschen, Nennvolumen 250 und 500 ml,
z. B. Standflasche DIN 12036 – E 250
- Meßpipetten, Nennvolumen 1, 10, 25 ml,
z. B. Pipette DIN 12697 – MPAS 1-001
- Mehrkanalpipetten (8-Kanal), Volumen 5 bis 50 µl, 50 bis 200 µl, 50 bis 300 µl
- Reservoirs zum Beschicken der Mehrkanalpipetten (Volumen 17 bzw. 34 ml)
- Meßzylinder, Nennvolumen 500 und 1 000 ml,
z. B. Meßzylinder DIN 12680 – MH 500
- Meßkolben, Nennvolumen 500 ml,
z. B. Kolben DIN 12664 – MS A 500
- Kulturgefäße, Erlenmeyerkolben, Nennvolumen 100 ml,
z. B. Kolben DIN 12387 – E 100
- Aufbewahrungsampullen, 2 ml (Kryo-Röhrchen)
- Thermometer, z. B. Thermometer DIN 12775 – E 0,5/0/50
- Schüttelapparatur, beheizbar, um Bakterien in Suspension zu halten und zu kultivieren
- pH-Meßgerät
- Brutschrank, z. B. nach DIN 58945-1
- Mikrotestplatten-Inkubator für 28 °C
- Schüttler für Mikrotestplatten
- Dampfsterilisator, z. B. nach DIN 58946-2
- Zentrifuge
- 96 well-Mikrotestplatten mit flachem transparentem Boden (Füllvolumen je Vertiefung 380 µl)²⁾
- Photometer
- Photometer für Mikrotestplatten (Mikrotestplatten-Lesegerät), möglichst mit Auswerteeinheit
- UV-Lampe
- Leitfähigkeitsmeßgerät

10 Reagenzien

Als Reagenzien werden, soweit möglich, solche des Reinheitsgrades “zur Analyse” verwendet. Sämtliche Lösungen werden mit bidestilliertem Wasser oder Wasser gleichen Reinheitsgrades hergestellt.

²⁾ Siehe Seite 4

10.1 Salzsäure, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$

10.2 Natriumhydroxid-Lösung, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$

ANMERKUNG: Zur Einstellung des pH-Wertes müssen gegebenenfalls schwächer oder stärker konzentrierte Lösungen verwendet werden.

10.3 Dimethylsulfoxid (DMSO), $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}_4$

10.4 Nährmedium (TGA-Medium: Trypton, Glucose, Ampicillin)

— 10 g Bacto Trypton²⁾, 5 g Natriumchlorid (NaCl) und 11,9 g HEPES in Wasser lösen, den pH-Wert auf $7,0 \pm 0,2$ einstellen, mit Wasser auf 500 ml auffüllen und 20 min bei 121°C autoklavieren.

— 2 g D(+)-Glukose (wasserfrei) in 500 ml Wasser lösen und mit geeigneten Mitteln sterilisieren.

Nach dem Autoklavieren sind beide Ansätze im Volumenverhältnis 1:1 zu mischen.

— 50 mg Ampicillin (Natriumsalz) zu 1000 ml abgekühltem Medium unter sterilen Bedingungen hinzufügen.

Wird die Lösung nicht am gleichen Tag verbraucht, darf sie portioniert bei -20°C bis zu 4 Wochen aufbewahrt werden.

10.5 Nährmedium 10fach konzentriert (10fach-TGA)

Das Nährmedium ist bei $+4^\circ\text{C}$ 14 Tage haltbar.

10.5.1 Für die Inkubation ohne S9

— 10 g Bacto Trypton, 5 g Natriumchlorid (NaCl) und 11,9 g HEPES in 50 ml Wasser lösen, den pH-Wert auf $7,0 \pm 0,2$ einstellen.

— 2 g Glukose in 50 ml Wasser lösen.

— Beide Lösungen getrennt 20 min bei 121°C autoklavieren, danach unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen zusammengeben und mischen.

— Je 100 ml der Mischung 50 mg Ampicillin unter sterilen Bedingungen hinzufügen.

10.5.2 Für die Inkubation mit S9

— 10 g Bacto Trypton, 5 g Natriumchlorid (NaCl), 2,46 g Kaliumchlorid (KCl), 1,63 g Magnesiumchlorid-hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) und 11,9 g HEPES in 50 ml Wasser lösen, den pH-Wert auf $7,0 \pm 0,2$ einstellen.

— 2 g Glukose in 50 ml Wasser lösen.

— Beide Lösungen getrennt 20 min bei 121°C autoklavieren, danach unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen zusammengeben und mischen.

— Je 100 ml der Mischung 50 mg Ampicillin unter sterilen Bedingungen hinzufügen.

²⁾ Siehe Seite 4