

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)Teil 4: Bestimmung des erbgutverändernden Potentials mit dem
Salmonella-Mikrosomen-Test (Ames Test) (T 4)**DIN****38415-4**

ICS 13.060.50

German standard methods for the examination of water, waste water and sludge — Sub-animal testing (group T) — Part 4: Determination of the genotoxic potential using the Salmonella microsome test (Ames Test) (T 4)

Méthodes normalisées allemandes pour l'analyse des eaux, des eaux résiduaires et des boues — Tests sous-animaux (groupe T) — Partie 4: Détermination du potentiel genotoxique utilisant le test Salmonella microsome (Test Ames) (T 4)

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.

Zu DIN 38415 „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)“ gehören weitere Teile. Eine Übersicht der Gruppen A bis T der „Deutschen Einheitsverfahren“ enthält Anhang D.

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

Einleitung

Als Testorganismen werden die histidin-defizienten Bakterienstämme *Salmonella typhimurium* TA100 und TA98 verwendet¹⁾.

Die Bakterien werden unter festgelegten Bedingungen verschiedenen Konzentrationen des Testguts exponiert. Dabei können gentoxische Stoffe, in Abhängigkeit von ihrer Dosierung, Mutationen im hisG46-Gen (TA100) bzw. im hisD3052-Gen (TA98) induzieren, wodurch sich die spontanen Mutantenzahlen der Testorganismen erhöhen. Es wird die nach 48 h auftretende Wirkung des Testguts auf das Bakteriengenom bestimmt.

¹⁾ Zu beziehen z. B. durch:

Bruce Ames Lab., 401 Baker Wall, CF 94720 Alameda/USA, Fax: ++5106437935.

Fortsetzung Seite 2 bis 26

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

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung des erbgutverändernden Potentials von Wasser und Abwasser fest. Bei der testbedingt notwendigen Sterilfiltration können gentoxische Substanzen zurückgehalten werden.

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 12331

Laborgeräte aus Glas — Becher

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 12696

Laborgeräte aus Glas — Meßpipetten für völligen Ablauf, Klasse A und Klasse B

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 EN 285

Sterilisatoren — Dampf-Sterilisatoren — Groß-Sterilisatoren; Deutsche Fassung EN 285 : 1996

DIN ISO 1773

Laborgeräte aus Glas — Erlenmeyer-, Rund- und Stehkolben, enghalsig

3 Definitionen

Für die Anwendung dieser Norm gelten die folgenden Definitionen:

3.1 Revertanzahl; Mutantenzahl

Anzahl der Revertanten (Mutanten) (als sichtbare Kolonien) je Petrischale von etwa 9 cm Plattendurchmesser nach Ablauf der Versuchszeit.

3.2 G-Wert

Ganzzahliges Volumenverhältnis einer Mischung von Abwasser mit Verdünnungswasser, Inokulum, Weichagar und S9-Mix (siehe 3.13) bzw. Puffer. Das kleinstmögliche Verdünnungsverhältnis beträgt verfahrensbedingt 1 : 2,6. Daher ist definitionsgemäß der kleinste G-Wert bei der Untersuchung einer unverdünnten Probe $G = 3$.

3.3 Konzentrations-Wirkungsbeziehung

Abnahme der Mutantenzahl mit steigender Verdünnung des Testguts.

3.4 G_{EA} -Wert

Hier: Kleinster Wert von G des Testansatzes, bei dem unter den Bedingungen dieses Verfahrens noch keine Zunahme der Mutantenzahl festgestellt wird. Werden mit den Stämmen TA98 und TA100 mit und ohne Zusatz von S9-Mix (siehe 3.13) unterschiedliche G_{EA} -Werte bestimmt, so ist der höchste dieser G_{EA} -Werte maßgebend.

3.5 Dauerkultur

Kultur zur Bewahrung und Sicherung der Eigenschaften des *Salmonella typhimurium*-Teststammes TA100 oder TA98 im betreffenden Laboratorium und die Kultur zur Bereitstellung des Inokulums für den Testansatz.

3.6 Inokulum; Impfmateri al

Zum Animpfen einer Kultur verwendete Bakteriensuspension und zum Animpfen eines Testansatzes verwendete exponentiell wachsende Vorkultur [DIN 38415-3 : 1996-12].

3.7 Nährmedium

Wäßrige Lösung von Nährstoffen, die für das Bakterienwachstum notwendig sind [DIN 38415-3 : 1996-12].

3.8 Übernacht-Kultur

Hier: Mischung aus Inokulum und Nährmedium, die 18 h bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ in einem Kulturgefäß bebrütet wird.

3.9 Nährbodenplatte, Agarplatte

Verfestigte, wäßrige Mischung aus Nährstoffen und Agar in Petrischalen.

3.10 Weichagar (en: Softagar)

Wäßrige Mischung aus Agar, Natriumchlorid, Histidin, Biotin und entmineralisiertem Wasser.

3.11 S9-Fraktion

Überstand eines bei 9 000 g zentrifugierten Gewebehomogenates, das aus Lebern adulter männlicher Ratten, die mit einem geeigneten Mittel zur Enzyminduktion vorbehandelt wurden, unter Verwendung einer 0,15-mol/l-Kaliumchlorid-Lösung hergestellt wird.

3.12 Cofaktorenlösung

Wäßrige Lösung von chemischen Stoffen, die für die Funktionsfähigkeit der Enzyme der S9-Fraktion erforderlich sind.

3.13 S9-Mix

Mischung aus S9-Fraktion und Cofaktorenlösung.

3.14 Titerbestimmung

Verfahren zur Bestimmung der Keimdichte der im Versuchsansatz verwendeten Bakteriensuspension und zur Bestimmung der Toxizität des Testguts.

3.15 Testgut

Hier: Zu untersuchende Probe jeweils nach Abschluß aller Vorbereitungsmaßnahmen, wie z. B. Zentrifugation oder Sterilfiltration.

3.16 Testansatz

Hier: Mischung aus Testgut, Verdünnungswasser, Bakteriensuspension, Weichagar und gegebenenfalls S9-Mix.

3.17 Negativ-Kontrollansatz

Hier: Mischung aus Verdünnungswasser, Bakteriensuspension, Weichagar und gegebenenfalls S9-Mix.

3.18 Positiv-Kontrollansatz

Hier: Mischung aus in geeignetem Vehikel gelösten Mutagenen, Verdünnungswasser, Bakteriensuspension, Weichagar und gegebenenfalls S9-Mix.

3.19 Induktionsdifferenz I

Differenz aus dem Mittelwert der Revertantenzahlen von mit Testgut behandelten Platten und dem Mittelwert der Revertantenzahl von dem korrespondierenden Negativ-Kontrollansatz.

3.20 Hintergrundwachstum

Rasenbildung durch Mikrokolonien nicht mutierter Bakterien auf Nährbodenplatten mit Weichagar zur Mutantenbestimmung.

4 Grundlagen des Verfahrens

Anhand des Vergleichs der Mutantenzahlen auf Negativ-Kontrollplatten und auf den mit Testgut behandelten Platten wird die mögliche mutagene Wirkung des Testguts erkannt.

Als Bewertungsmaß gilt die niedrigste unwirksame Verdünnung des Testguts.

ANMERKUNG: Als gentoxisch wird eine Probe betrachtet, wenn bei mindestens einem der zwei verwendeten Stämme mit oder ohne Zugabe von S9-Mix eine für den Stamm festgelegte Zunahme der Mutantenzahl induziert wird und eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung gegeben ist.

5 Störungen

Wirkt das Testgut stark bakterientoxisch, so führt dies zu einer Hemmung des Bakterienwachstums und zu einer Verminderung der Revertantenzahl im Vergleich zum jeweiligen Negativ-Kontrollansatz.

Im Extremfall kann die Anzahl der überlebenden Bakterien so stark reduziert werden, daß die geringe im Weichagar enthaltene Histidinmenge dazu ausreicht, daß überlebende, aber nicht mutierte Bakterien zu sichtbaren Kolonien auswachsen, wodurch ein mutagener Effekt vorgetäuscht wird.

6 Bezeichnung

Bezeichnung des Verfahrens zur Bestimmung des erbgutverändernden Potentials mit dem Salmonella-Mikrosomen-Test (Ames Test) (T 4):

Verfahren DIN 38415 — T 4

7 Allgemeine technische Anforderungen

7.1 Qualifikation des Prüflabors

Ein Labor wird dann als qualifiziert für die Durchführung des Tests betrachtet, wenn ausreichende Untersuchungen zur Beherrschung des Prüfsystems durchgeführt wurden, d. h. mehrere unabhängige Versuche, die — unter Einbeziehung von Negativ-Kontrollansätzen und zahlreichen Standardmutagenen einschließlich der unter 8.19 genannten Positiv-Kontrollsubstanzen — zeigen, daß sich die Ergebnisse im erwarteten Rahmen bewegen und eindeutig reproduzieren lassen.

7.2 Geräte

- Schüttelapparatur, temperierbar, um Bakterien in Suspension zu kultivieren;
- Brutschrank, z. B. nach DIN 58945-1;
- pH-Meßgerät;
- Dampfsterilisator, z. B. nach DIN EN 285;
- Trockensterilisator;
- Reagenzglasstände aus Metall für 2 × 6, 4 × 6, 4 × 12 Röhrchen;

- Rotationsmischer;
- Bechergläser, Nennvolumen 100 ml, 250 ml, z. B. Becher DIN 12331 — H 100;
- Meßkolben, Nennvolumen 25 ml, 250 ml, 500 ml, z. B. Meßkolben DIN 12664 — MS A 25;
- Wasserbad;
- Magnetrührer;
- Meßzylinder, Nennvolumen 100 ml, 250 ml, z. B. Meßzylinder DIN 12680 — MH 100;
- Polypropenröhrchen mit Verschuß, Nennvolumen 5 ml für Lagerkulturen;
- Polypropenröhrchen mit Verschuß, Nennvolumen 10 ml, für die Positivkontrollansätze;
- Impföse;
- Membranfiltrationsgeräte mit Membranfilter, Porenweite 0,45 µm oder 0,22 µm;
- Drygalski-Spatel;
- Gefrierschrank (regelbar auf mindestens -70°C);
- Gefrierschrank (regelbar auf mindestens -20°C);
- Erlenmeyerkolben, Nennvolumen 50 ml, 100 ml, 250 ml, z. B. nach DIN ISO 1773;
- Thermometer, z. B. Thermometer DIN 12775 — E 0,5/0/50;
- Kolonienzählgerät (optional);
- Meßpipetten, Nennvolumen 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, z. B. Pipette DIN 12696 — MPAV 1-001; oder Dispenser
- Standflaschen, Nennvolumen 250 ml, 1 000 ml, z. B. Standflasche DIN 12036 — E 250;
- Petrischalen (Einwegscheiden aus Polystyrol) mit Lüftungsnocken, Durchmesser etwa 94 mm, Höhe etwa 16 mm, die nicht mit mutagenen Sterilisierungsmitteln (z. B. Ethylenoxid) kontaminiert sind.

8 Reagenzien, Lösungen, Medien

8.1 Allgemeines

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

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

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

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

8.4 Dimethylsulfoxid (DMSO), C_2H_6OS

8.5 Nährbouillon (en: Nutrient Broth)

Für die Herstellung der Nährbouillon können zwei Zusammensetzungen verwendet werden:

- 3 g Fleischextrakt
 - 5 g Pepton
 - 5 g Natriumchlorid, NaCl
- oder
- 10 g Fleischextrakt
 - 10 g Pepton
 - 5 g Natriumchlorid, NaCl

ANMERKUNG: Fleischextrakt und Pepton werden im Handel in unterschiedlicher Qualität angeboten. Es sollten die unter²⁾ zu erfragenden Produkte verwendet werden.

Die Bestandteile in 1 l Wasser (siehe 8.1) unter Rühren und Erwärmen lösen, auf einen pH-Wert von $7,4 \pm 0,2$ einstellen, gegebenenfalls in kleinere Portionen aufteilen und autoklavieren. Die Lösung zur weiteren Verwendung bis zu einem Monat bei $(4 \pm 2)^\circ C$ aufbewahren.

Beide Zusammensetzungen werden auch im Handel angeboten²⁾. Die Verwendung von Fertigprodukten ist zur besseren Standardisierung unbedingt vorteilhaft. Sollte das Fertigprodukt kein Natriumchlorid enthalten, je 1 l Nährbouillon 5 g Natriumchlorid zufügen.

8.6 Ampicillin-Lösung

80 mg Ampicillin in 10 ml einer 0,02 mol/l sterilen Natriumhydroxid-Lösung bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen lösen.

8.7 Nährbouillon mit Ampicillin

Zu der autoklavierten Nährbouillon (siehe 8.5) 3,15 ml Ampicillin-Lösung (siehe 8.6) unter sterilen Bedingungen zugeben und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahren.

8.8 Natriumhydrogenphosphat-Pufferlösung

Es werden folgende Lösungen angesetzt:

Lösung 1:

- 13,8 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, in 1 000 ml Wasser lösen.

Lösung 2:

- 14,2 g Dinatriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4 , in 1 000 ml Wasser lösen.

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

So viel Lösung 1 zu Lösung 2 unter Rühren (z. B. mit dem Magnetrührer) zufügen, bis ein pH-Wert von 7,4 erreicht und eingehalten wird. Zur Sterilisation autoklavieren.

8.9 Cofaktorenlösung

In 70 ml Natriumhydrogenphosphat-Pufferlösung (siehe 8.8) folgende Substanzen lösen und anschließend steriltfiltrieren:

162,6 mg Magnesiumchlorid-Hexahydrat, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

246,0 mg Kaliumchlorid, KCl

179,1 mg Glucose-6-phosphat, Dinatriumsalz, G6P

315,0 mg Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, Dinatriumsalz, NADP

Ein Volumen von 70 ml Cofaktorenlösung ist ausreichend für 100 ml S9-Mix und etwa 200 Platten.

8.10 S9-Mix

Am Versuchstag die benötigte Menge S9-Fraktion frisch bereiten oder bei Raumtemperatur auftauen.

ANMERKUNG: S9-Fraktion ist im Handel erhältlich²⁾. Anwender, die über Voraussetzungen zur Präparation von S9-Fraktion verfügen, finden Hinweise hierzu in Anhang A.

Unmittelbar nach dem Auftauen der S9-Fraktion zur Herstellung von jeweils 100 ml S9-Mix 10 ml S9-Fraktion, 70 ml Cofaktorenlösung (siehe 8.9) und 20 ml 0,15 mol/l Kaliumchlorid-Lösung (siehe 8.20) unter sterilen Bedingungen sorgfältig mischen.

Dieses Gemisch während des gesamten Versuchs kühlen (z. B. in einem Scheidetrichter mit Doppelwand, in der sich Eiswasser befindet). Nach Versuchsende nicht verbrauchten S9-Mix verwerfen.

8.11 Vogel-Bonner-E-Medium (50fach konzentriert)

Je Liter herzustellendes Medium 670 ml Wasser vorlegen und unter Rühren darin die folgenden Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge lösen. Vor Zugabe der nächsten Substanz jeweils vollständiges Lösen abwarten.

a) 5 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$;

b) 100 g Citronensäure-Monohydrat, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;

c) 500 g Dikaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4 wasserfrei;

d) 175 g Natriumammoniumhydrogenphosphat-Tetrahydrat,
 $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$.

Nach dem Lösen mit Wasser (siehe 8.1) auf 1 l auffüllen.

Werden Substanzen mit abweichendem Wassergehalt verwendet, so ist entsprechend umzurechnen.

Das Medium portionieren und bei Raumtemperatur aufbewahren.

²⁾ Siehe Seite 7