

Kostengünstige Untersuchung mutagener Effekte von Textilfarbstoffen – Miniaturisierter Standard Ames Test

Der Mutagenitätstest mit *Salmonella typhimurium* (Ames Test, OECD 471) ist nach REACH ein Standardtest. In einem europäischen Projekt zur „Nachhaltigen Biotechnologie für die Europäische Farbenindustrie“ (Sophied, Integrated Project – FP6-NMP2-CT-2004-505899) wurde ein schneller Mutagenitätstest benötigt, um große Mengen an Proben zu testen, wobei gleichzeitig wenig Probenmaterial vorhanden war. Der Standard Ames Test wurde dazu mit einer miniaturisierten Testversion, dem Mini Ames Test, verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass der Mini Ames Test eine geeignete Methode ist, um auch mit farbigen Proben ein schnelles Screening auf mutagene Eigenschaften durchzuführen. Er braucht weniger Material und Zeit als die Standard Version und ist deshalb sehr kosteneffizient. Nur in Konzentrationen, bei denen ein geringer mutagener Effekt gemessen werden konnte (etwa bei Induktionsfaktor 2), ist der Mini Ames Test möglicherweise weniger empfindlich.

Ismene Jäger, Christoph Hafner
Hydrotox Labor für Ökotoxikologie und Gewässerschutz GmbH, Freiburg i.Br.

Für die Bewertung der Entgiftung des Abwassers im Reinigungsprozess und um die Toxizität von den Farbstoffen selbst sowie von Hilfsmitteln und Chemikalien zu bewerten, müssen verschiedene Untersuchungen wie z.B. Toxizität, Ökotoxizität und biologische Abbaubarkeit durchgeführt werden. Ein weiterer wichtiger Endpunkt ist bei Textilfarbstoffen die Untersuchung mutagener Effekte [2–5]. Mutagene Farbstoffe stellen ein Risiko für die Gesundheit am Arbeitsplatz, für Verbraucher und die Umwelt dar. Besonders Arbeiter können hohen Konzentrationen ausgesetzt sein, wenn sie Mischungen für den Färbeprozess vorbereiten. Die Mutagenität von Chemikalien auf Textilien kann als Hauptursache für kanzerogene Effekte sein. In einem europäischen Forschungsprojekt wurden 281 Textilfarbstoffprodukte untersucht [6–8]. 53 Farbstoffe, waren noch nicht auf Mutagenität untersucht worden. Sie wurden alle im Ames Test mit *Salmonella typhimurium* nach OECD 471 getestet. Die Ergebnisse bestätigten frühere Befunde, dass es Farbstoffprodukte auf dem Markt gibt, die nicht ausreichend getestet sind und mutagene Effekte zeigen.

Die Standard Version des Tests wird in Petrischalen durchgeführt. Zuerst wurde der Mini

Ames Test von Flamand et al. [12] als Screening Test für die Untersuchung von Pharmazeutika beschrieben. In dieser Testversion wird mit 6-well-Platten gearbeitet (siehe Abb.).

Eine Platte pro Stamm und Konzentration reicht aus, anstatt 6 Petrischalen, die im Standard Platten Inkoooperationstest benötigt werden. Im europäischen Projekt „Nachhaltige Biotechnologie für die Europäische Farbenindustrie“ (Sophied, Integrated Project – FP6-NMP2-CT-2004-505899) wurde ein schneller Mutagenitätstest benötigt, um große Mengen an farbigen Proben zu testen wobei gleichzeitig wenig Probenmaterial vorhanden war. Der Standard Ames Test wurde

mit einer miniaturisierten Testversion, dem Mini Ames Test, verglichen um festzustellen ob diese Testsystem auch geeignet ist um farbige Proben zu untersuchen.

Ergebnisse

Vergleichende Untersuchungen von Standard und Mini Ames Test

Der Mini Ames Test und der Standard Ames Test wurden parallel mit 3 mutagenen Kontrollsubstanzen, 2-Aminoanthracen, Nitrofluoren und Natriumazid durchgeführt, um festzustellen ob die Empfindlichkeit des Mini Ames Tests vergleichbar mit der Standard Version ist. Die Ergebnisse waren in beiden Tests vergleichbar. In einigen Fällen zeigte der Mini Ames Test eine geringere Empfindlichkeit. Das bedeutet, dass Proben, die eine geringe Mutagenität im Standard Ames Test zeigen, als falsch negative bewertet werden können (Tab. 1). Deshalb sollten negative Ergebnisse immer mit der Durchführung eines Standard Ames Tests bestätigt werden.

Mutagenitäts Untersuchungen mit Farbstoffen

12 Textilfarbstoffe wurden im Mini Ames Test mit TA98 und TA100 mit und ohne S9 Aktivierung in einer Konzentration von 1000 µg/Platte untersucht (Tab. 2).

5 Farbstoffe, Disperse Blue 1, Direct Blue 1, Direct Black 38, Acid Blue 62 und Acid Red 299, zeigten einen Effekt, der als mutagen im Ames Test zu bewerten ist. Mit einigen ande-

6-well Platte und Petrischale

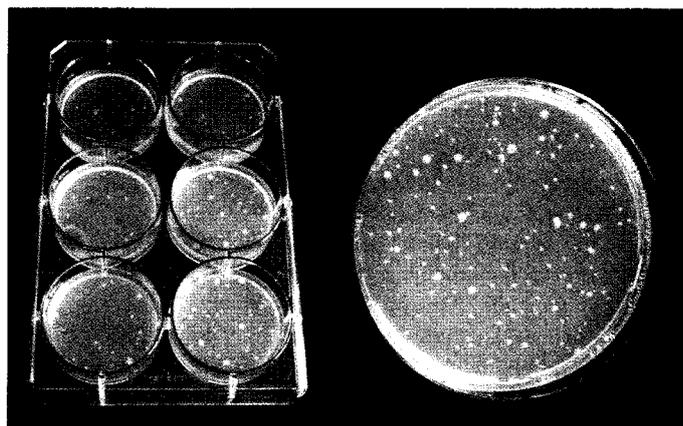


Tabelle 1
Vergleich der Dosis-Wirkungs-Beziehung von positiv Kontrollsubstanzen in der Mini Ames Test Version und im Standard Ames Test

Salmonella typhimurium Stamm TA98 mit S9 Aktivierung

2-AA Konz. µg/well	Mini Ames Test						Standard Ames Test						
	erste Studie			zweite Studie			erste Studie			zweite Studie			
	NR	RSD	IR	NR	RSD	IR	NR	RSD	IR	NR	RSD	IR	
NK	15,3	52,3		6,3	32,9		NK	17,0	20,4		25,5	13,9	
NK-Lösungsmittel	6,3	18,2		4,0	50,0		NK-Lösungsmittel	17,5	20,2		22,0	22,7	
0,4	43,7	19,2	6,9	77,0	15,8	19,3	2,0	176,7	8,5	10,1	298,7	5,0	13,6
0,28	31,0	14,1	4,9	51,0	2,0	12,8	1,4	121,7	8,8	7,0	199,7	6,7	9,1
0,16	18,0	14,7	2,8	25,0	13,9	6,3	0,8	62,0	11,4	3,5	118,3	7,8	5,4
0,08	10,3	27,9	1,6	11,3	22,2	2,8	0,4	38,0	11,2	2,2	63,7	10,5	2,9
0,04	6,0	28,9	0,9	6,3	9,1	1,6	0,2	26,0	5,4	1,5	38,7	18,2	1,8
0,02	4,7	81,1	0,7	7,0	51,5	1,8	0,1	22,0	19,3	1,3	27,5	48,9	1,3

Salmonella typhimurium Stamm TA98 ohne S9 Aktivierung

2-AA Konz. µg/well	Mini Ames Test						Standard Ames Test						
	erste Studie			zweite Studie			erste Studie			zweite Studie			
	NR	RSD	IR	NR	RSD	IR	NR	RSD	IR	NR	RSD	IR	
NK	12,0	16,7		2,7	21,7		NK	14,7	23,9		24,0	41,2	
NK-Lösungsmittel	4,3	48,0		2,0	50,0		NK-Lösungsmittel	16,5	30,0		17,0	23,5	
0,3	24,0	22,0	5,5	16,3	33,7	8,2	1,50	141,0	5,1	8,5	177,3	6,2	10,4
0,2	20,0	5,0	4,6	12,7	38,9	6,3	1,00	88,0	17,8	5,3	125,7	25,9	7,4
0,14	12,7	39,7	2,9	15,7	19,5	7,8	0,70	68,0	16,6	4,1	98,7	15,2	5,8
0,1	8,0	12,5	1,8	4,0	25,0	2,0	0,50	37,5	13,2	2,3	66,3	0,9	3,9
0,05	6,0	16,7	1,4	5,7	50,9	2,8	0,25	36,5	44,6	2,2	39,7	8,1	2,3
0,025	3,0	66,7	0,7	3,7	56,8	1,8	0,125	22,0	19,3	1,3	23,0	30,7	1,4

Salmonella typhimurium Stamm TA100 mit S9 Aktivierung

2-AA Konz. µg/well	Mini Ames Test						Standard Ames Test						
	erste Studie			zweite Studie			erste Studie			zweite Studie			
	NR	RSD	IR	NR	RSD	IR	NR	RSD	IR	NR	RSD	IR	
11,7	40,5		10,7	46,2			NK	67,7	9,4		65,5	11,9	
NK-Lösungsmittel	15,0	11,5		14,7	7,9		NK-Lösungsmittel	64,0	8,8		91,0	11,9	
0,5	86,7	18,3	5,8	112,7	6,5	7,7	2,5	374,7	14,0	5,9	654,0	8,0	7,2
0,4	59,3	6,8	4,0	92,0	4,7	6,3	2,0	264,3	10,8	4,1	480,7	4,0	5,3
0,28	51,7	12,6	3,4	65,3	0,9	4,5	1,4	187,5	12,4	2,9	349,0	4,8	3,8
0,16	31,7	28,5	2,1	36,7	12,6	2,5	0,8	126,5	18,4	2,0	204,0	14,1	2,2
0,08	20,0	32,8	1,3	19,3	18,2	1,3	0,4	108,0	0,0	1,7	127,0	8,5	1,4
0,04	16,3	12,7	1,1	15,0	40,0	1,0	0,2	95,0	7,4	1,5	114,5	16,7	1,3

Salmonella typhimurium Stamm TA100 ohne S9 Aktivierung

2-AA Konz. µg/well	Mini Ames Test						Standard Ames Test						
	erste Studie			zweite Studie			erste Studie			zweite Studie			
	NR	RSD	IR	NR	RSD	IR	NR	RSD	IR	NR	RSD	IR	
NK	5,7	27,0		15,3	18,8		NK	66,7	9,2		78,5	13,5	
NK-Lösungsmittel	12,3	12,4		12,3	54,0		NK-Lösungsmittel	59,5	3,6		74,0	13,7	
0,50	97,0	7,2	7,9	76,3	16,0	6,2	2,5	448,3	18,3	7,5	450,0	13,7	6,1
0,30	52,0	16,8	4,2	52,3	17,2	4,2	2,0	234,0	11,6	3,9	369,3	7,3	5,0
0,10	27,3	11,2	2,2	39,0	29,1	3,2	1,4	142,5	3,5	2,4	186,7	18,0	2,5
0,07	27,0	7,4	2,2	19,3	15,8	1,6	0,8	128,5	11,6	2,2	154,7	9,5	2,1
0,05	22,3	5,2	1,8	19,7	46,1	1,6	0,4	101,0	2,8	1,7	127,0	9,1	1,7
0,01	15,3	7,5	1,2	13,3	45,8	1,1	0,2	77,0	1,8	1,3	78,3	10,3	1,1

2-AA: Aminoanthrazen; NF: Nitrofluoren; NA: Natriumazid; NR: Anzahl der Revertanten (Mittelwert aus n = 3); RSD: relative Standardabweichung vom Mittelwert
 IR: Induktions-Rate, Anzahl der Revertanten pro Probe/Anzahl in der Kontrolle; NK: Negativ Kontrolle; NK-Lösungsmittel: Lösungsmittelkontrolle DMSO
 IR fett: IR ≥ 2, Probe wurde als mutagen bewertet

ren Farbstoffen, wie Acid Blue 62 oder Reac-tive Yellow 81 wurden zytotoxische Effekte beobachtet.
 Um die Ergebnisse zu bestätigen und um si-

cherzustellen, dass Zytotoxizität nicht die mutagenen Effekte maskiert wurden alle Untersuchungen an Farbstoffen in einem Konzentrationsbereich zwischen 2000 und

125 µg pro Platte wiederholt. Die genauere Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung zeigte vergleichbare Resultate wie im ersten Test mit 1000 µg pro Platte. Acid Blue 62

zeigte einen mutagenen Effekt bei 500 und 250 µg pro Platte; Reactive Yellow 81 war nicht mutagen.

Mutagenitätsuntersuchungen mit Abwasserproben

Farbige Modell-Abwasserproben aus verschiedenen biotechnologischen Behandlungsverfahren wurden vor und nach der Reinigung im Mini und im Standard Ames Test untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Mini Ames Test auch geeignet ist um gefärbte Abwasserproben zu bewerten.

Diskussion

Der Mutagenitätstest mit *Salmonella typhimurium* (Ames Test, OECD 471) ist nach REACH ein Standardtest zur Untersuchung mutagener Effekte. Während der Entwicklung neuer Chemikalien ist ein erstes Screening auf Mutagenität entscheidend um Substanzen, die diese Anforderungen nicht erfüllen nicht weiter zu erforschen. Zusätzlich gibt es oft nur kleine Mengen der neu entwickelten Chemikalien oder die Substanzen sind in diesem frühen Stadium sehr teuer.

Bereits früher wurden Versuche beschrieben für "high through-put" Methoden zum Screening mutagener Eigenschaften (z.B. Miniscreen test [17], Ames II Mutagenicity Assay von Xenometrics, Ames Fluktuations Test [18–20]). Flamand et al. [12] beschreiben einen miniaturisierten Ames Platten Inkooperationstest für ein erstes Screening von Punktmutationen bei der Entwicklung neuer Chemikalien. Dieses Protokoll braucht fünfmal weniger Reagenz und wird in 6-well-Platten durchgeführt. Der Test wird für alle *Salmonella* Test Stämme als geeignet beschrieben, auch für die mit geringer Mutationsrate. Snyder [21] gibt an, dass die Übereinstimmung zwischen Standard Ames und Mini Ames Test sehr hoch ist. Der Mini Ames Test wird bereits routinemäßig für das prescreening in der Entwicklung von Arzneimitteln eingesetzt [22].

Es wurde überprüft, ob der Mini Ames Test auch geeignet ist um die Mutagenität von Textilfarbstoffen zu bewerten.

In einer vergleichenden Studie mit Positiv-Kontrollsubstanzen konnte im Standard Ames Test und im Mini Ames Test mit *Salmonella typhimurium* Stämmen TA98 und TA100 gezeigt werden, dass die Ergebnisse vergleichbar sind. Die Mini Ames Version zeigte sich als ein geeignetes Hilfsmittel um Mutagenität von Textilfarbstoffen zu untersuchen. Er ist auch geeignet um andere Chemikalien und Abwasserproben zu untersuchen. Mutagene Substanzen können so schon zu Beginn eines Entwicklungsprozesses identifiziert werden. Da der Mini Ames Test jedoch eine leicht geringere Sensitivität zeigte sollten Proben, die in diesem Test Sys-

Tabelle 2

Im Ames Test untersuchte Farbstoffe, Daten für Stammlösungen von 2.000 mg/l

Name	CAS-No.	Wasserlöslichkeit	pH	cond [µS cm ⁻¹]
Dispersionsfarbstoffe				
Disperse Red 1	2872-52-8	teilweise löslich	5.4	3.6
Disperse Blue 1	2475-45-8	löslich	7.4	540
Disperse Yellow 1	2832-40-8	suspendierbar	6.6	364
Reaktivfarbstoffe				
Reactive Blue 19	2580-78-1	löslich	5.7	860
Reactive Black 5	17059-24-8	löslich	4.8	1513
Reactive Red 4	17681-50-4	löslich	7.2	818
Reactive Yellow 81	59112-78-6	löslich	4.4	1986
Direktfarbstoffe				
Direct Red R	573-58-0	teilweise löslich	9.3	259
Direct Blue 1	2610-05-1	löslich	7.0	624
Direct Black 38	1937-37-7	löslich	8.4	1774
Säurefarbstoffe				
Acid Blue 62	4368-56-3	löslich	5.6	540
Acid Red 299	57741-47-6	löslich	6.8	288

tem nicht mutagen sind zusätzlich im Standard Ames Test untersucht werden.

Der große Vorteil des Mini Ames Tests im Vergleich zur Standard Version ist, dass 5 mal weniger Probevolumen benötigt wird, es wird weniger Verbrauchsmaterial gebraucht und der Zeitaufwand ist deutlich (um etwa 30 %) geringer. Im Standard Ames Test braucht man z.B. für eine Substanz, die in einem Stamm getestet wird 42 Petrischalen. Im Mini Ames Test werden nur sieben 6-well Platten benötigt.

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem Mini Ames Test neu entwickelte Farbstoffe und die Effizienz von Abwasser-Behandlungsprozessen für eine große Probenzahl kostengünstig bewertet werden können. ■

Danksagung

Dieses Projekt wurde von der Europäischen Kommission, 6. Umweltrahmenprogramm, unterstützt (SOPHIED contract NMP2-CT2004-505899).

Literatur

- [1] OECD 471 (1997) OECD guideline for testing of chemicals, Bacterial Reverse Mutation Test
- [2] Knasmüller, S.; Zöhrer, E.; Kainzbauer, E.; Kienzl, H.; Colbert, B.; Lamprecht, G.; Schulte-Hermann, R.: Detection of mutagenic activity in textiles with *Salmonella typhimurium*, Mutation Research 299 (1993) 45–53
- [3] Deutsches Wollforschungsinstitut an der TH Aachen e.V.: Untersuchungen zur Genotoxizität von veredelten Textilien, Abschlussbericht zum AIF-Forschungsvorhaben 9207, 1994
- [4] Jäger, I.; Meyer, G.: Toxizität und Mutagenität von Abwässern der Textilproduktion. Naturschutz und Reaktorsicherheit im Auftrag des Umweltbundesamtes. Forschungsbericht 10206519 des Bundesministeriums für Umwelt. UBA-FB 95-045, 1995
- [5] Jäger, I.; Gartiser, S.; Willmund, R.: Einsatz von Biotestsystemen zum Strommanagement in Textilveredlungsbetrieben, Mellandi Textilberichte 77 (1996) 72–75

- [6] Jäger, I.; Hafner, C.; Schneider, K.: Mutagenicity of different textile dye products in *Salmonella typhimurium* and mouse lymphoma cells, Mutation Research 561 (2004) 35–44
- [7] Jäger, I.; Schneider, K.; Janak, P.; Huet, M.: Mutagenic dyes in textile finishing, Mellandi Textilberichte 86 (2005), E12–E14
- [8] Schneider, K.; Hafner, C.; Jäger, I.: Mutagenicity of textile dye products, Journal of Applied Toxicology 24 (2004) 83–91
- [9] Flamand, N.; Meunier, J.-R.; Meunier, P.-A.; Agapakis-Caussè, C.: Mini mutagenicity test: a miniaturized version of the Ames test used in a prescreening assay for point mutagenesis assessment. Toxicology in Vitro 15 (2001) 105–114
- [10] Brooks, T.M.: The use of a streamlined bacterial mutagenicity assay, the Miniscreen, Mutagenesis 10 (1995) 447–448
- [11] Le Curieux, F.; Gauthier, L.; Erb, F.; Marzin, D.: Use of the SOS chromotest, the Ames fluctuation test and the new micronucleus test to study the genotoxicity of four trihalomethanes, Mutagenesis 10 (1995) 333–341
- [12] Reifferscheid, G.; Oepen, B.: Genotoxicity and mutagenicity of suspended particulate matter of river water and waste water samples, The Scientific World Journal 2 (2002) 1036–1039
- [13] Jolibois, B.; Guerbet, M.; Vassal, S.: Detection of hospital wastewater genotoxicity with the SOS chromotest and Ames fluctuation test, Chemosphere 51 (2003) 539–543
- [14] Snyder, R.: The expanding role of genetic toxicology in drug discovery, Labtech (2004) 46–48 [http://www.touchbriefings.com/pdf/953/Snyder.pdf]
- [15] DTC 2006: Toxicology News No.1 Vol. 1 DTC Health and Environment [http://tox.dhigroup.com/Files/Filer/PDF/Nyhe dsbrev/Toxicology%20News/Toxicology_news_July_2006.pdf]
- [16] Council Regulation (EC) No 440/2008 of 30 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) B.13/14. Mutagenicity: Reverse mutation test using bacteria