



Hochschule Neubrandenburg  
University of Applied Sciences

**Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften**

**Studiengang Lebensmitteltechnologie**

# **Untersuchung des mutagenen Potentials von Alkylphosphat Ionic Liquids**

## **Diplomarbeit**

Verfasser: Eva Berthold

Betreuer: Prof. Dr. Karl Steffens

Prof. Dr. Mark Rüschen gen. Klaas

URN: [urn:nbn:de:gbv:519-thesis-2009-0236-3](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:gbv:519-thesis-2009-0236-3)

Neubrandenburg, der 30.06.2009

## Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	2
Chemisches Abkürzungsverzeichnis.....	3
1. Einleitung.....	4
2. Wissenschaftliche Grundlagen.....	5
2.1 Definition von Ionic Liquids.....	5
2.1.1 Eigenschaften der Ionic Liquids.....	5
2.1.2 Verwendung von Ionic Liquids.....	5
2.2 Mutation.....	6
2.2.1 Formen der Mutation.....	6
2.2.2 Methoden zur Untersuchung von Mutationen.....	8
2.3 Beschreibung der verwendeten <i>Salmonella</i> -Stämme.....	9
2.3.1 Mutationen im Histidin Stoffwechsel.....	11
2.3.2 Rfa-Mutation .....	12
2.4 Ampicillinresistenz.....	12
2.5 Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlen.....	14
2.6 Reverse Mutation Test ("Ames Test").....	15
3. Material und Methoden.....	18
3.1 Bezug von Chemikalien und Teststämmen.....	18
3.2 Kultivierung der Teststämmen.....	19
3.3 Methoden zur Feststellung des Genotyps der Teststämmen (UV-Licht Test, Kristallviolett Test, Ampicillinresistenz) .....	19
3.3.1 UvrB-Mutation.....	19
3.3.2 Ampicillinresistenz.....	20
3.3.3 Rfa-Mutation.....	20
3.3.4 Bestimmung der Mutationsraten (spontan vs. induziert mit mutagenen Stoffen).....	21
3.3.4.1 <i>Salmonella typhimurium</i> (TA 98).....	21
3.3.4.2 <i>Salmonella typhimurium</i> (TA 100).....	23
3.3.5 Bestimmung des mutagenen Potenzials von Alkylphosphat Ionic Liquids (Spot-Test).....	25

4.	Ergebnisse.....	27
4.1	Kultivierung der Teststämme und Ampicillinresistenz.....	27
4.2	UvrB-Mutation.....	28
4.3	Rfa-Mutation.....	29
4.4	Bestimmung der Mutationsraten (spontan vs. induziert mit mutagenen Stoffen).....	30
4.4.1	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA 98).....	30
4.4.2	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA 100).....	31
4.5	Bestimmung des mutagenen Potenzials von Alkylphosphat Ionic Liquids (Spot-Test).....	32
4.5.1	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA 98).....	32
4.5.2	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA 100).....	34
5.	Diskussion.....	37
5.1	Kultivierung der Teststämme und Ampicillinresistenz.....	37
5.2	UvrB-Mutation.....	37
5.3	Rfa-Mutation.....	39
5.4	Bestimmung der Mutationsraten (spontan vs. induziert mit mutagenen Stoffen).....	39
5.4.1	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA 98).....	40
5.4.1	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA 100).....	40
5.5	Bestimmung des mutagenen Potenzials von Alkylphosphat Ionic Liquids (Spot-Test).....	41
5.5.1	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA 98).....	41
5.5.2	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA 100).....	41
6.	Zusammenfassung.....	43
	Abbildungsverzeichnis.....	44
	Tabellenverzeichnis.....	45
	Glossar.....	46
	Literaturverzeichnis.....	48
	Anhang.....	50
	A. Benötigte Lösungen/Reagenzien.....	50
	B. Nährbouillon.....	51
	C. Agar.....	52

**Abstract**

The main concern of this thesis was the study of Ionic Liquids especially to consider if there is a field of concentration of Ionic Liquids which is neither germicidal nor mutagenic. Six Ionic Liquids were used. Furthermore three *Salmonella* test strain of subspecies *typhimurium* (the origin type and the mutants TA 98 and TA 100) were examined under laboratory conditions.

The genotype of the test strains was categorized in the lab. For this purpose the strains were examined of presence of R-factor plasmid pK101: *uvrB*, *rfa* and *his* mutation. Furthermore the mutation rate (spontaneous and induced) of *Salmonella-typhimurium* was determined with mutagenic substances, until the investigations of the mutagenic potential of alkylphosphat Ionic Liquids (spot test) is occurred.

After analyzing the laboratory tests results there were no indications for fields of concentration in which Ionic Liquids are neither germicidal nor mutagenic. Nevertheless a germicidal and/or mutagenical effect of the used Ionic Liquids can not be excluded. For convincing results more laboratory experiment are indispensable.

## Abkürzungsverzeichnis

bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCUG	Culture Collection, University of Göteborg
cm	Zentimeter
d	Durchmesser
dest.	destilliertes
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
°C	Grad Celsius
d. h.	das heißt
h	Stunden
KbE	Kolonie bildende Einheiten
l	Länge
min.	Minuten
mM	Millimol
Mut.	Mutation
n. a.	nicht aus zählbar
NB-Agar	Nutrient broth-Agar-Platten
NB-Bouillon	Nutrient broth-Nährbouillon
nm	Nanometer
o. g.	oben genannte
§(§):	Paragraph(en)
sog.	sogenannte
Temp.	Temperatur
W	Watt
µl	Mikroliter
zit. n.	zitiert nach

**Chemisches Abkürzungsverzeichnis**

H <sub>2</sub> O	Wasser
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-Kaliumhydrogenphosphat
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MMS	Methyl-Methansulfonat
NaCl	Natriumchlorid
NaH(NH <sub>4</sub> )PO <sub>4</sub>	Natrium-Ammonium-Phosphat
Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :	di-Natriumhydrogenphosphat

## 1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem mutagenen Potenzial von Alkylphosphat Ionic Liquids. Generell könnten Ionic Liquids zukünftig in der sog. „Green Chemistry“ relevant werden. Hierfür müssen sie jedoch bestimmten Anforderungen gerecht werden. Ein deutlicher Vorteil der Ionic Liquids ist ihre Nicht-Volatilität. Auf der anderen Seite konnten das mutagene Potenzial und die Umweltverträglichkeit noch nicht ausreichend untersucht werden. Die Möglichkeiten von langfristig negativen Umweltauswirkungen sind daher noch nicht auszuschließen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung, ob Konzentrationsbereiche von Ionic Liquids existieren, in denen sie nicht keimabtötend oder mutagen wirken. Im Laborversuch wurden hierfür drei *Salmonella*-Stämme Stresssituationen (UV-Licht Test, Kristallviolett Test, Ampicillinresistenz, Bestimmung des mutagenen Potenzials) ausgesetzt. Aufgrund der hohen Anzahl verschiedener Ionic Liquids wurden für diese Arbeit sechs ([EMIM] [Et<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]; [BOIMJ] [Bu<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]; [EMIM] [Me<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]; [MMIM] [Me<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]; [EOIM] [Cl<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]; [OMIM] [Me<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]) herangezogen und auf die Zielstellung hin untersucht.

## **2. Wissenschaftliche Grundlagen**

### **2.1 Definition von Ionic Liquids**

Unter Ionic Liquids oder auch ionische Flüssigkeiten versteht man flüssige Salze. Das bedeutet jedoch nicht, dass die Salze in einem Lösungsmittel wie z. B. Wasser vorkommen. Es handelt sich bei den Ionic Liquids ausschließlich um Ionen, die bei Temperaturen unter 100 °C in flüssiger Form vorliegen. Im Gegensatz zu den korrosiven hochviskosen Salzschnmelzen sind Ionic Liquids im Allgemeinen niedriger viskos (Kuhlmann, 2007).

#### **2.1.1 Eigenschaften der Ionic Liquids**

Ionic Liquids weisen einige Eigenschaften auf, die sie für die Wissenschaft und Industrie interessant machen. Sie sind thermisch stabil, haben eine hohe chemische Stabilität, eine hohe Oberflächenspannung, weisen ein breites thermisches Fenster auf (150 °C bis >400 °C), sind elektrisch leitfähig, nicht entzündlich und haben einen sehr niedrigen Dampfdruck. Sowohl der Schmelzpunkt als auch die Viskosität können durch die funktionellen Gruppen variiert werden. Dank des Nicht-Volatilitäts-Charakters erhöhen sie ebenfalls die Arbeitssicherheit. Die Löslichkeit in Wasser oder organischen Lösungsmitteln kann über die Seitenketten des Kations und Wahl des geeigneten Anions verändern (Wasserscheid, 2004).

#### **2.1.2 Verwendung von Ionic Liquids**

Ionic Liquids sind auf Grund ihrer variablen Eigenschaften vielseitig einsetzbar. Die Zweige der Wissenschaft und Technik finden immer neue Gebiete, auf denen Ionic Liquids theoretisch nutzbar sind. In der Biotechnologie können sie für die Synthese von Polymeren eingesetzt werden.

Durch ihren geringen Dampfdruck eignen sie sich für verschiedene chemische Vorgänge wie Trennverfahren, z. B. Extraktivdestillationen. Die Mehrzahl ionischer Flüssigkeiten können als polares Lösungsmittel verwendet werden. Da viele Ionic Liquids weder mit Wasser noch mit anderen organischen Lösungsmitteln mischbar sind, können sie nach den Reaktionen extrahiert und somit wiederholt verwendet werden. Sie sind sie z. B. auch als Lösungsmittel für die Karl-



Fischer-Titration einsetzbar oder als Wärmespeichermedium. Dank der elektrischen Leitfähigkeit können sie auch als Elektrolytmaterial für Farbstoffsolarzellen eingesetzt werden (Wasserscheid, 2004). Weiterhin sind sie in der Elektrochemie, für Biokatalysen, in der Technik oder bei Prozess- und Arbeitsmaschinen einsetzbar (Kuhlmann, 2007).

## **2.2 Mutation**

Unter Mutationen versteht man im Allgemeinen Veränderungen von genetischen Informationen in der DNA. Mutationen treten in der Natur nicht sehr häufig auf, da ansonsten die Weitergabe der Erbinformationen von Generation zu Generation nicht gewährleistet wären. Auf der anderen Seite sind Mutationen im Zuge der Evolution von großer Bedeutung. Diese ermöglichen die Anpassung einer Art an bestimmte Umwelteinflüsse und sorgen für Unterschiede zwischen Organismen einer Art. Mutation ist möglich, da die DNA ein labiles Makromolekül ist. Um ständig auftretende Mutationen, die auch zum Aussterben einer Art führen könnten, zu vermeiden, hat die Zelle im Zuge der Evolution schon früh entsprechende Reparaturmechanismen entwickelt. Diese können Schäden in der DNA ausgleichen, was zu einem erträglichen Maß an Mutationen führt (Knippers, 2001).

In der Wissenschaft spricht man bei der Mutation von chemischen oder physikalischen Änderungen des genetischen Materials einer Zelle oder eines Organismus. Von chemischen Veränderungen spricht man bei der Substitution eines Nukleotids gegen ein anderes. Das führt zu einem Kopierfehler (Basenpaarungsfehler) der DNA. Auch eine Dimierisierung benachbarter Basen zählt zu den chemischen Mutationen. Dabei wird das genaue kopieren der DNA verhindert. Kommt es zum Bruch oder Verlust von Teilen des DNA-Moleküls bzw. zur Umlagerung des Moleküls, so sind dies physikalische Mutationen.

Nicht alle Mutationen führen zu einer phänotypischen Veränderung. Hier ist dann von „stillen Mutationen“ die Rede. (Hiller, 1999).

### **2.2.1 Formen der Mutation**

Traditionell werden die Mutationen nach Genom- und Chromosomen-Mutationen unterschieden.

Chromosomen-Mutationen werden wie folgt charakterisiert:

- Translokation: Hierbei verlagern sich Chromosomenstücke vom ursprünglichen Platz auf eine andere Stelle desselben Chromosoms oder auf ein anderes Chromosom.
- Deletion: Von dieser Form spricht man, wenn Abschnitte eines Chromosoms verloren gehen.
- Inseration: Bei der Inseration werden DNA-Stücke in das jeweilige Chromosom eingebaut.
- Inversion: Die Inversion beschreibt die Verdrehung eines Chromosomenabschnittes.

Bei den Chromosomen-Mutationen handelt es sich um strukturverändernde Mutationen an Chromosomen, die mehrere Gene betreffen. Genom-Mutationen dagegen führen eine Veränderung der Chromosomenzahl des Genoms mit sich. Das bedeutet, dass sich ein Vielfaches der Chromosomensätze bildet oder, dass die Anzahl mehrere Chromosomensätze vermehrt wird (Fritsche, 2002).

Im Folgenden werden die wichtigsten Genom-Mutationen kurz erläutert. Sie werden in folgende Gruppen unterteilt.

- Punktmutation durch Substitution: In dieser Form findet ein Austausch von Basen statt. Hierbei kann eine „Missense-Mutation“ (sinnverändernde Mutation) auftreten, wodurch eine andere Aminosäure auftritt. Die zweite Variante ist die „Nonsense-Mutation“ (sinnentstellende Mutation), wobei es zur Kodierung eines Stopp-Codon kommt. Durch diesen wird die Translation abgebrochen.
- Deletionsmutation durch Deletion: Es kommt zum Verlust einer oder mehrerer Basen, wodurch wiederum eine Leserasterverschiebung stattfinden kann. Diese wird auch als Frameshift oder Rasterschub bezeichnet.
- Insertionsmutation durch Insertion: Auch bei dieser Mutation handelt es sich um eine Leserasterverschiebung (solange keine Triplets eingefügt werden). Der Unterschied zur Deletionsmutation besteht darin, dass Sequenzen in die DNA eingebaut werden.
- Duplikationsmutation durch Duplikation: Es handelt sich dabei um die Verdopplung eines bestimmten Chromosomenabschnittes und wird auch als Genduplikation bezeichnet. Sie entsteht z. B. durch ungleiches „Cross-Over“ zwischen homologen Chromosomen oder Schwesterchromatiden. Dabei kann es zum Verlust einzelner Informationen kommen (Henning, 1998).

### 2.2.2 Methoden zur Untersuchung von Mutationen

Im folgenden Abschnitt werden einige Methoden zur Untersuchung von Mutanten genannt und kurz beschrieben. Auf Grund des Ziels dieser Arbeit werden jedoch nicht alle Verfahren erwähnt, da dies den Rahmen sprengen würde.

In den 40er und 50er Jahren wurden zwei Testsysteme ausgearbeitet, die Aufschluss über das Auftreten und den Zeitpunkt von Mutationen geben sollten. Durch diese Verfahren können spontan auftretende Mutationen festgestellt werden. Man kennt dabei den Fluktuationstest (S. Luria und M. Delbrück) und den Replika-Plattierungs-Test (Joshua und Ester Lederberg).

„Der Fluktuationstest geht von der Überlegung aus, dass bei einer Verteilung der Zellen einer Ausgangskultur von Bakterien auf eine große Anzahl von Subkulturen und anschließendem Wachstum neuentstehende Mutationen in einem selektierbaren Gen sichtbar werden lassen.“ (zit. n. Henning, 1998) Dies beruht auf der Überlegung, dass die Anzahl mutagener Bakterien in jeder Subkultur einen spezifischen Titer aufweist, der davon anhängig ist, zu welcher Zeit des Bakteriumswachstums die Mutation auftritt. Ist der Mutationstiter hoch, ist die Mutation bereits früh aufgetreten. Ist die Mutation erst später aufgetreten, so ist der Titer niedrig. Darauf begründet sich auch der Name „Fluktuationstest“. Zur Untersuchung wird von jeder Subkultur ein Teil auf Platten aufgebracht. Für den ursprünglichen Versuch wurden die Bakteriophagen T1 zum Infizieren der Bakterien verwendet. Die Überlegungen gingen dahin, dass auf allen Platten dieselbe Anzahl an Mutanten auftritt, wenn die Mutation durch die Phagen induziert wird. Nach Auswertung der Ergebnisse wurde jedoch festgestellt, dass sich die Mutantenzahl auf den Platten unterschied. Somit konnten spontane Mutationen nachgewiesen werden.

Beim Replika-Plattierungs-Test werden Kolonien auf einer Platte zum wachsen gebracht. Dabei darf die Koloniedichte nur so groß sein, dass einzelne Kolonien entnommen werden können. Anschließend werden diese auf zwei andere Platten übertragen. Dabei enthält eine Platte denselben Agar wie die Ausgangsplatte, während die zweite Platte mit einer zusätzlichen Substanz angereichert wurde, z. B. Antibiotika. Auf der angereicherten Platte können nur Bakterien wachsen, welche eine Resistenz gegen das Antibiotika ausgebildet haben. Es wird deutlich, dass in diesem Verfahren keine Mutanten erzeugt, sondern lediglich bestehende Mutanten festgestellt werden (Henning, 1998).

Des Weiteren können auch Färbeverfahren zur Identifizierung von Mutanten eingesetzt werden, z. B. die lacI-Gen-Untersuchung. Dabei wird die Mutation im lacI-Gen untersucht. Unter Verwendung des Farbstoffes X-Gal färben sich die Mutanten blau. Dies trifft jedoch nicht für den Wildtyp zu.

Eine andere Variante ist der Nachweis von Mutanten des Phosphatase-Gens. Für diese Untersuchung wird eine Replikaplatte mit 4-Nitrophenyl-phosphat eingesprüht. Mutanten bleiben hierbei farblos, während der Wildtyp eine gelbe Farbe annimmt, da er in der Lage ist, das 4-Nitrophenyl-phosphat zu spalten (Knippers, 2001).

Beim Ames-Test (Bruce Ames) handelt es sich um ein Verfahren, welches mit verschiedenen Mutanten arbeitet. Dabei wird der Wildtyp den Mutanten gegenüber gestellt. In dieser Untersuchung werden nicht spontan auftretende Mutationen, sondern das mutagene Potenzial von Substanzen untersucht. Es handelt sich um ein sehr empfindliches Verfahren, welches mit Mutanten arbeitet, die einen Defekt im his-Gen, UvrB-Gen und Rfa-Gen aufweisen. Es ist eine Untersuchungsmethode, die schnell und kostengünstig durchgeführt werden kann (Fuchs, 2007). Genaueres zu dem Verfahren wird im späteren Verlauf der vorliegenden Arbeit beschrieben.

### **2.3 Beschreibung der verwendeten *Salmonella*-Stämme**

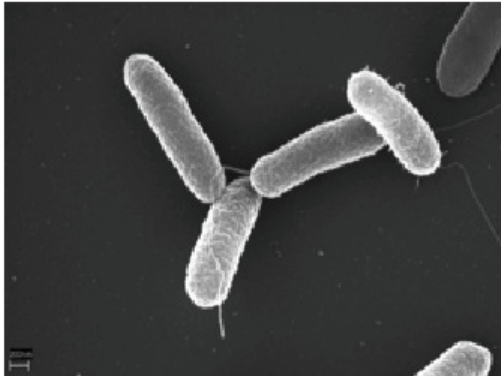
Salmonellen ( $d = 0,7$  bis  $1,5 \mu\text{m}$ ,  $l =$  etwa  $2$  bis  $5 \mu\text{m}$ ) gehören zu den gramnegativen Bakterien. Sie sind der Familie der Enterobacteriaceae zugeordnet, peritrich begeißelt, vorwiegend aktiv beweglich, fakultativ anaerob und können keine Sporen bilden.

Salmonellen werden nicht wie andere Bakterien in Arten sondern in Serotypen eingeteilt. Nach dem Kaufmann-White-Schema werden ca. 2.000 Serotypen beschrieben, die durch ihre O- und H-Antigene klassifiziert sind.

Da sich sowohl Menschen als auch Tiere an Salmonellen anstecken können und diese dann untereinander übertragen, werden sie als Zoonosen bezeichnet. Es ist dabei zu beachten, dass sie auch auf Lebensmittel übertragbar sind. Daher sind Salmonellenerkrankungen nach dem Infektionsschutzgesetz (§§ 6, 7 IfSG) in Deutschland meldepflichtig (Singleton, 1995).

Bei gesunden Menschen, die keiner Risikogruppe (Säuglinge, Kleinkinder, alte Menschen, HIV-Patienten, immungeschwächten Patienten) angehören, kann *Salmonella typhimurium* Durchfallerkrankungen hervorrufen, die meist ohne Einsatz von Antibiotika von allein abklingen (Munk, 2000).

In der folgenden Abbildung werden *Salmonella typhimurium* dargestellt.



**Abbildung 1:** *Salmonella typhimurium*

(Quelle: [http://de.wikipedia.org/wiki/Salmonellen#Epidemiologische\\_Gruppen](http://de.wikipedia.org/wiki/Salmonellen#Epidemiologische_Gruppen). Brinkmann, 2009)

Salmonellen sind außerhalb von menschlichen bzw. tierischen Körpern wochenlang überlebensfähig und in getrocknetem Kot sogar länger als 2,5 Jahre. Direkte UV-Strahlung beschleunigt das Absterben der Erreger, ebenso wie Hitzeeinwirkungen (55 °C = 1 h, 60 °C = 0,5 h). Aus diesem Grund werden Lebensmittel zumeist für mind. 10 min bei 75 °C (Kerntemperatur) erwärmt, um Lebensmittelvergiftungen durch Salmonellen auszuschließen. Auch saure Medien führen zum raschen Absterben ebenso wie Desinfektionsmittel.

Da *Salmonella typhimurium* in der Lage ist Histidin für sich zu synthetisieren, ist dieser Stamm besonders gut geeignet, um das mutagene Potenzial von Substanzen zu ermitteln. Zu diesem Zweck wird der Wildtyp und mind. ein Histidin-auxotropher Mutant beim Ames-Test eingesetzt. Auf diesem Weg lassen sich schnelle und kostengünstige Rückschlüsse auf das mutagene Potenzial der zu untersuchenden Substanz ziehen. Ist eine Substanz mutagen, so wird im Verlauf der Untersuchung der Histidin-auxotrophe Mutant zum Wildtyp-Phänotyp rückmutieren (Munk, 2000).

Zu den gebräuchlichsten Histidin-auxotrophen Mutanten gehören die Stämme TA 98 und TA 100, die neben dem Wildtyp bei den Untersuchungen zur Bestimmung des mutagenen Potenzials

eingesetzt werden. *Salmonella typhimurium* TA 98 und TA 100 sind nicht mehr in der Lage Histidin selbst zu synthetisieren. Sie weisen eine hohe UV- und Kristallviolett-Empfindlichkeit auf und sind resistent gegenüber Ampicillin (Steinbüchel, 2003).

### 2.3.1 Mutationen im Histidin Stoffwechsel

Der TA 98 wurde durch eine Rasterschub-Mutation verändert, welche auch als Leserasterverschiebung bzw. Frameshift bezeichnet wird. Es handelt sich dabei um eine besondere Form der Mutation, wobei sich das Leseraster von Genen auf der DNA verschiebt. Durch den Verlust bzw. das Einschleusen zusätzlicher Basen kommt es zu sog. Nonsense-Proteinen. Somit ist der Stamm nicht mehr in der Lage die Histidin-Biosynthese fortzuführen und wird zu einem Histidin-auxotrophen Mutanten. Speziell bei diesem Stamm wurde der Code des Arginin von CGG auf GGC verändert. Dies bringt eine Veränderung des genetischen Codes mit sich, der im Leucin endet. Der Code für Leucin des Wildtyps besteht aus dem Triplet CTG, der des Mutanten TGA. TGA ist ein Nonsense-Protein und führt zum Abbruch der Translation. Der TA 98 kann in der Histidin-Biosynthese das Histidin nur bis zum L-Histidinol synthetisieren. Durch die Mutation wurde das Enzym Histidinol-Dehydrogenase deaktiviert. Dadurch kann der Stamm zwar die Vorstufe des L-Histidin synthetisieren, jedoch kann der letzte Schritt nicht vom TA 98 durchgeführt werden. Der Stamm kann kein Histidin selbst herstellen und ist darauf angewiesen dieses aus der Umgebung aufzunehmen (Hiller, 1999).

Bei dem TA 100 handelt es sich um eine „base substitution mutation“ oder auch Missens-Mutation. Dabei werden einzelne Basen ausgetauscht und eine andere Aminosäure synthetisiert. Der TA 100 wurde am His-G-46 verändert und synthetisiert durch die Mutation Prolin anstelle von Leucin (wie der Wildtyp). Deshalb kann das Histidin nicht synthetisiert werden, da die entsprechende Aminosäure der Zelle nicht mehr zur Verfügung steht. Damit ist der Stamm darauf angewiesen Histidin aus der Umgebung aufzunehmen, da er nun nicht mehr in der Lage ist dieses selbst zu synthetisieren. Bei dem TA 100 hat die Mutation den Defekt des Enzyms Phosphoribosyl-ATP-Pyrophosphohydrolase (EC2.42.17) zur Folge. Dieses Enzym greift bereits sehr früh in der Histidinsynthese. Somit kann der Stamm lediglich den ersten Schritt der Synthese selbstständig vornehmen. Durch die Deaktivierung des Enzyms ist TA 100 jedoch nicht in der Lage das Histidin weiter zu synthetisieren (Hiller, 1999).

### 2.3.2 Rfa-Mutation

Bei der rfa-Mutation wird das entsprechende Gen durch Mutation verändert. Somit wird die Zelle permeabel und ist nicht mehr virulent. Dadurch erhöht sich der leichtere Zugang hydrophober Testsubstanzen in die Zelle. Dort können die Substanzen ihre mutagene oder bakterizide Wirkung entfalten. Innerhalb der Zellhülle werden die Biosynthesevorgänge der hydrophilen Polysaccharidketten gestört. Somit wird die Empfindlichkeit gegenüber Kristallviolett herauf- und gegenüber Ampenicillin herabgesetzt (Steinbüchel, 2003).

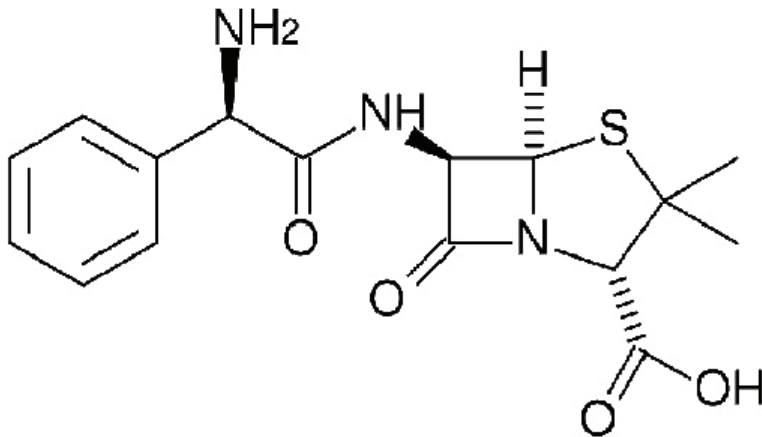
### 2.4 Ampicillinresistenz

Seit Alexander Fleming 1928 durch einen Zufall die bakterizide Wirkung von *Penicillium notatum* entdeckte und den bakterienabtötenden Stoff Penicillin nannte, hat die Bedeutung von Penicillin und dessen Derivaten stark zugenommen. Obwohl Fleming feststellte, dass Penicillin sich nicht negativ auf den menschlichen Organismus auswirkte, sondern lediglich auf grampositive Bakterien, setzte er Penicillin nicht im medizinischen Bereich ein.

Howard W. Florey beschäftigte sich 1938 mit der chemischen Struktur des Penicillins, wobei dieser das therapeutische Potenzial erkannte. 1945 erhielten Fleming und Florey für ihre herausragende Arbeit den Nobelpreis. Erst durch den Einsatz wirkungsvoller Antibiotika konnten viele Infektionskrankheiten geheilt und auftretende Epidemien bekämpft werden (Steinbüchel, 2003).

Bei Ampicillin handelt es sich um ein Breitbandantibiotikum. Diese Antibiotika können gegen Infektionen aller Art eingesetzt werden. Es ist ein halbsynthetisches Derivat des Penicillins, welches durch die polare Aminogruppe, sowohl gegen grampositive also auch gramnegative Bakterien einsetzbar ist (Hiller, 1999).

In der folgenden Abbildung wurde die Strukturformel des Ampicillin dargestellt.



**Abbildung 2: Strukturformel des Ampicillin**

(Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Ampicillin>., Anonymus2, 2009)

Ampicillin gehört zu den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Damit tritt seine bakterizide Wirkung während der Zellteilung auf und blockiert die Ausbildung einer neuen Zellwand. In diesem Prozess der Zellteilung wird das Enzym der D-Alanin-Transpeptidase durch die Anlagerung des  $\beta$ -Lactamrings irreversibel blockiert. Unter Ringöffnung binden sich die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika kovalent an die Aminosäure Serin im aktiven Zentrum der D-Alanin-Transpeptidase und die Zellwand kann nicht vollständig ausgebildet werden. Die somit unvollständige Neusynthese der Zellwand bewirkt eine Teilungsunfähigkeit und führt zum Absterben der Zellen. Menschliche Zellen werden in der Zellteilungsphase jedoch nicht von dem Antibiotikum behindert, da sie keine Zellwand sondern eine Zellmembran besitzen (Mascaretti, 2003).

Das Plasmid pKM101 sorgt für eine Empfindlichkeitssenkung der Teststämme gegenüber Ampicillin. Bei dem Plasmid handelt es sich um ein Ampicillin-Resistenzgen, welches zusätzlich zwei Gene kodiert, die zur Verstärkung der „mismatch-Reparatur“ beitragen. Die „mismatch-Reparatur“ neigt zu Fehlern, was die Ampicillinempfindlichkeit herabsetzt (Steinbüchel, 2003).



## 2.5 Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlen

Die UV- oder auch ultraviolette Strahlung ist ein Bestandteil der Sonnenstrahlen. Im ultravioletten Bereich (200 – 380 nm) ist die Strahlung für vegetative Mikrobenzellen schädlich. Erreicht die UV-Strahlung einen Wert von 260 nm so wird diese von Nukleinsäuren absorbiert und es kommt dabei zur Dimerisierung von benachbarten Thyminmolekülen. Hierbei handelt es sich um einen letalen Effekt, wobei die DNA-Replikation verhindert wird. Dies trifft jedoch nicht auf Sporen zu, da diese für die UV-Strahlung weitgehend undurchlässig sind (Fritsche, 2002).

Aufgrund der keimtötenden Wirkung der UV-Strahlung wird diese in vielen Laboratorien zur Teilkeimabtötung eingesetzt. Bei der Bestrahlung spielen die Oberflächen (Oberflächenstruktur) und die Zeit eine wesentliche Rolle. Da Bakterien empfindlicher auf diese Sterilisation reagieren als Pilzsporen, muss die Bestrahlungszeit auf letztere ausgerichtet sein. Auch kleinste Unebenheiten in der Oberflächenstruktur wirken sich negativ auf die Keimabtötung aus.

Als charakteristische UV-Schäden werden kovalente Verknüpfungen von zwei Thyminresten über einen Cyclobutanring gesehen. In selteneren Fällen tritt eine Verknüpfung zweier Pyrimidine auf, wobei ein Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon-Photoprodukt entsteht. Durch diese Veränderung wird die DNA-Struktur verzehrt. Dies verhindert die Replikation. Aufgrund der vorhandenen Reparaturmechanismen der Zelle können diese Basenveränderungen jedoch behoben werden. In seltenen Fällen treten Mutanten auf, wenn es zu fehlerhaften Reparaturen der Strukturverzerrungen kommt (Fuchs, 2007).

Die Cyclobutanringe führen zur Lösung der Basenpaarungen am komplementären Strang der DNA. Durch die Dimere wird eine Veränderung der Konformation der Doppelhelix hervorgerufen. Nach dem Einbau von Adenin gegenüber dem ersten Thymin des Dimers kommt es durch das replikationsgebundene Reparatursystem zur Exzision des Adenins. Durch die DNA-Polymerase wird ein weiteres Adenin eingefügt. Da die Polymerase das Dimer jedoch nicht durchbrechen kann, kommt es zur Unterbrechung der DNA-Synthese. Zellen verfügen jedoch über Reparaturmechanismen, die in der Lage sind, die Thymindimere zu entfernen. Ein Teil der Mechanismen führt zur vollständigen Korrektur der DNA-Sequenz und tritt unmittelbar nach der Induktion von Dimeren auf. Zwei dieser Mechanismen sind die Photoreaktivierung und die Exzisionsreparatur.

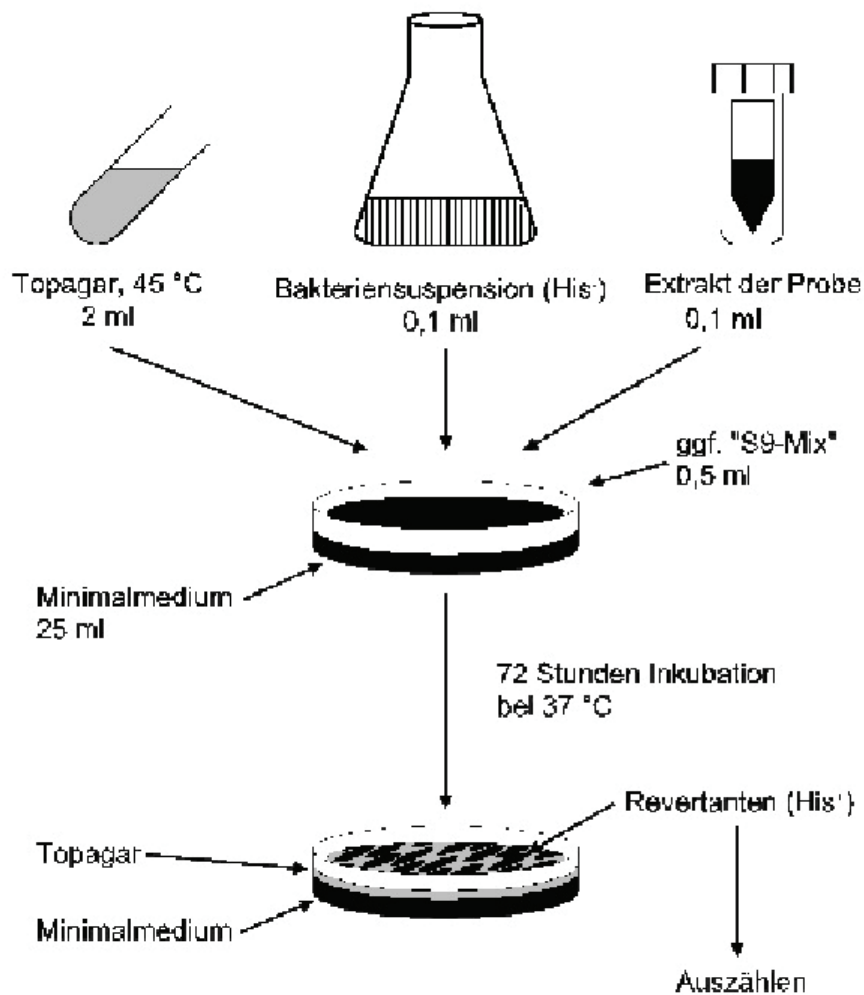
Bei der Photoreaktivierung ist das PR-Enzym in der Lage, zunächst die Dimere an sich zu binden. Nach Lichteinstrahlung kann es die Cyclobutanbindungen auflösen und stellt die normalen Basenpaare durch Wasserstoffbrückenbindungen wieder her. Das Photoreaktivierungsenzym ist sowohl in Eukaryotenzellen als auch in Prokaryotenzellen zu finden. Die Exzisionsreparatur wurde bei der Untersuchung von UV-empfindlichen *E. coli* entdeckt. Bei diesem Reparaturmechanismus ist für die Reparatur von Dimeren kein Sonnenlicht erforderlich. Das Uvr-System (Gensystem zur Reparatur von UV-Schäden der Zelle) umfasst drei Gene: *uvrA*, *uvrB* und *uvrC*. „Die Gene *uvrA* und *uvrB* kodieren für Proteine, die einen Proteinkomplex mit endonukleolytischer Aktivität (Ultraviolett-endo I) bilden, das Gen *uvrC* liefert ein Protein mit nicht genau bekannten Hilfsfunktionen.“ (zit. n. Henning, 1998) Eine hohe UV-Empfindlichkeit wird durch die Mutation der Gene hervorgerufen (Henning, 1998).

## **2.6 Reverse Mutation Test ("Ames Test")**

Beim Ames-Test handelt es sich um ein von der „Organisation for Economic Co-operation and Development“ (OECD) anerkanntes Testverfahren zur Bestimmung des mutagenen Potenzials von Chemikalien. Das Verfahren wurde nach seinem Erfinder Bruce Ames benannt, der es in den 1970er Jahren entwickelte.

In diesem Verfahren wird die potenziell mutagene Substanz mit einer Bakterienkultur gemischt und mit einem Rattenleberextrakt (S9-Mix) inkubiert. Nicht-mutagene Substanzen werden durch den S9-Mix in mutagen wirkende umgewandelt. S9 findet in diesem Verfahren Einsatz, da erst durch die oxidativen Prozesse in der Leber viele Verbindungen mutagen für Säuger werden. Die Bakterienkulturen sind sogenannte Auxotrophien, die durch Mutation bestimmte Substanzen nicht mehr selbst synthetisieren können. In den meisten Fällen werden für die Untersuchung *S. typhimurium*-Stämme (Histidinauxotrophien), und *E. coli*-Stämme (Tryptophanauxotrophien) (Hiller, 1999).

In der folgenden Abbildung wird das Verfahren des Ames-Testes schematisch dargestellt.



**Abbildung 3: schematischer Versuchsaufbau**

(Quelle: [www.bifa.de/userfiles/images/BioSchemaAmes.gif](http://www.bifa.de/userfiles/images/BioSchemaAmes.gif), Anonymus1, 2009 )

An Hand des schematischen Versuchsaufbaus zeigt sich die einfache Handhabung des Ames-Testes. Es wird deutlich, dass es sich hierbei um ein Verfahren handelt, welches mit wenig Aufwand und bereits nach kurzer Zeit Ergebnisse liefert.

Auxotrophien entstehen nicht bei diesem Verfahren, sondern werden lediglich eingesetzt. Es können jedoch im Verlauf der Untersuchung Revertanten auftreten. Die Anzahl der aufgetretenen Revertanten im Verhältnis zu den Auxotrophien (der Kontrollplatten) geben Aufschluss über das mutagene Potenzial der zu prüfenden Substanz. Es handelt sich um ein sehr empfindliches Verfahren, das sich durch eine leichte Handhabung und eine schnelle Auswertung auszeichnet. Durch die Sensibilität kann der Ames-Test doch nur als Vorversuch angesehen werden. Das zeigt sich besonders im Vergleich mit Tier- und Fütterungsversuchen, die über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden, dafür jedoch auch wesentlich teurer sind. Obwohl viele Tierversuche durch den Ames-Test gespart werden können, bleiben diese weiterhin erforderlich. Durch

das Testverfahren kann ein mutagenes Potenzial nachgewiesen werden, welches bei den Tierversuchen jedoch noch nicht erkennbar ist. Die Ursache dafür ist mit der Sensibilität des Ames-Testes zu begründen.

Neben dem Ames-Test selbst werden die Stämme zudem noch auf andere Mutationsmerkmale hin untersucht. Dazu gehören die Ampicillinunempfindlichkeit, die Empfindlichkeit gegenüber Kristallviolett und Ultra-violettem Licht sowie spontan auftretende und induzierte Revertanten (Fuchs, 2007).

### 3. Material und Methoden

Die Herstellung aller verwendeten Nährmedien, Agar und Testsubstanzen, werden im Anhang genauer erläutert. Im folgenden Abschnitt wird lediglich aufgezeigt, woher die verwendeten Bestandteile, Ionic Liquids und Teststämme, bezogen wurden.

#### 3.1 Bezug von Chemikalien und Teststämmen

- Agar Agar: AppliChem, Darmstadt
- Ampicillin-trihydrat: Sigma Aldrich, Steinheim
- 2-Aminofluorene: Fluka Chemie GmbH, Steinheim
- Caso-Bouillon: Institute für Immunpräparate und Nährmedien GmbH, Berlin
- Citronensäuremonohydrat: Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- D(+)-Biotin: Fluka Chemie GmbH, Steinheim
- D-Glucose (wasserfrei): Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- di-Kaliumhydrogenphosphat: AppliChem, Darmstadt
- di-Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat: Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Ionic Liquids: Sovent Innovation GmbH, Köln
- Kristallviolett: Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- L-Histidin: Sigma Aldrich, Steinheim
- Magnesiumsulfat: Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Methyl-Methansulfonat: Fluka Chemie GmbH, Steinheim
- Natrium-Ammonium-Phosphat: Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Natriumchlorid: Institute für Immunpräparate und Nährmedien GmbH, Berlin
- Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat: AppliChem, Darmstadt
- Nutrient broth-Agar: Oxoid, Basingstoke Hampshire England
- Nährmedien
- Nutrient broth-Bouillon: Oxoid, Basingstoke Hampshire England
- *Salmonella typhimurium* (TA 98, TA 100): CCUG, Göteborg Schweden
- *Salmonella typhimurium* (Wildtyp): DSMZ, Braunschweig

### 3.2 Kultivierung der Teststämme

Materialien für den Versuch:

- Teststämme tiefgekühlt (*S. typhimurium* TA 98, TA 100, Wildtyp)
- sterile Holzspatel
- 3 \* Agar-Platten (Vollmedium)

Die Vollmedium-Platten (Nutrient broth) wurden wie vom Hersteller angegeben vorbereitet. Die Teststämme wurden bei – 80 °C gelagert. Bevor sie für die Untersuchung eingesetzt werden konnten, wurden sie mit einem sterilen Holzstäbchen auf den Nutrient broth-Agar-Platten ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden konnte das Koloniewachstum auf den Platten überprüft werden. Die kultivierten Kolonien wurden für den täglichen Gebrauch bei 4 °C für 2 Monate gelagert.

### 3.3 Methoden zur Feststellung des Genotyps der Teststämme: (UV-Licht Test, Kristallviolett Test, Ampicillinresistenz)

Im folgenden Abschnitt wird die Bestimmung des Genotyps der Teststämme beschrieben.

#### 3.3.1 UvrB-Mutation

Materialien für den Versuch:

- 3 \* NB-Boullion (25 ml)
- Teststämme (*S. typhimurium* TA 98, TA 100, Wildtyp)
- 7 \* Nutrient broth-Agar-Platten
- Impföse
- Alufolie (abdecken der halben Platten)
- UV-Lampe (15 W)
- Stoppuhr

Es wurde je eine Kolonie (Wildtyp, TA 98, TA 100) von den Wachstumsplatten entnommen. Mit den Kolonien wurden jeweils 25 ml der Nutrient broth-Nährbouillon beimpft. Die Bouillon wurde ca. 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die Übernachtskulturen wurden mit der Impföse in parallelen Linien auf die Nutrient broth-Agar-Platten ausgestrichen. Eine Seite der Platte wurde jeweils vor der Bestrahlung mit Alufolie abgedeckt. Es wurden 7 Platten auf diese Weise vorbereitet und anschließend mit UV-Licht bestrahlt. Dabei wurden unterschiedliche Bestrahlungszeiten eingehalten: 10 sec., 15 sec., 20 sec., 25 sec., 30 sec., 35 sec. und 40 sec. Der Abstand Platte – 15 W Lampe betrug 11 cm.

Nach der Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37 °C konnten die Platten ausgewertet werden.

### **3.3.2 Ampicillinresistenz**

Materialien für den Versuch:

- 3 \* Glucose-Minimal-Platten mit Ampicillin
- Teststämme (*S. typhimurium* TA 98, TA 100, Wildtyp)
- Impföse

Im Rahmen der Untersuchung wurden drei Glucose-Minimalmediumplatten (mit Ampicillin versetzt) gegossen. Nachdem der Agar ausgehärtet war, konnten die Platten mittels Impföse ausgestrichen werden. Die Auswertung erfolgte nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C.

### **3.3.3 Rfa-Mutation**

Materialien für den Versuch:

- 3\* NB- Boullion (25 ml)
- Teststämme (*S. typhimurium* TA 98, TA 100, Wildtyp)
- 6 \* Top-Agar (2 ml), im Reagenzglas sterilisiert
- 6 \* Nutrient broth-Agar-Platten
- Kristallviolettlösung (1 mg/ ml; 0,1 mg/ ml)
- Pinzette (platzieren des Filterpapiers)

- Pipette (0,1 ml, 10 µl)
- Steriles Filterpapier (d = 0,5 cm)

Am Vortag des Versuches wurden Filterpapierplättchen mit einem Durchmesser von 0,5 cm vorbereitet. Außerdem wurde Top-Agar hergestellt und in Reagenzgläser mit je 2 ml gefüllte. Anschließend wurden der Top-Agar und das Filterpapier für 20 min bei 121 °C sterilisiert. Die Übernachtskulturen der Teststämme wurden mit NB-Bouillon angesetzt und bei 37 °C bebrütet. Es wurden 2 Kristallviolettlösungen (1 mg/ml; 0,1 mg/ml) hergestellt.

Für diese Versuchsreihe wurden Nutrient broth-Agar-Platten verwendet. Die Platten wurden im Vorfeld gegossen und bei 4 °C gelagert. Um Kondenswasser zu vermeiden, welches den Versuch beeinflussen könnte, wurden die Platten am Versuchstag für ca. 30 Minuten bei 50 °C getrocknet.

0,1 ml der Kulturen wurden zum Top-Agar gegeben und mit dem Rüttler gemischt. Dieses Gemisch wurde anschließend gleichmäßig auf den Agar-Platten verteilt. Nach einer kurzen Trocknungszeit des Top-Agars wurde das Filterpapier in der Mitte platziert. Es wurden zwei Testreihen angefertigt. Bei der einen wurden 10 µl der 1 mg/ml Kristallviolettlösung auf das Filterpapier gegeben und bei der anderen wurde die 10 µl der 0,1 mg/ml Kristallviolettlösung verwendet.

Nachdem die Platten bei 37 °C für 48 h bebrütet wurden, konnten sie ausgewertet werden.

### **3.3.4 Bestimmung der Mutationsraten (spontan vs. induziert mit mutagenen Stoffen)**

#### **3.3.4.1 *Salmonella typhimurium* (TA 98)**

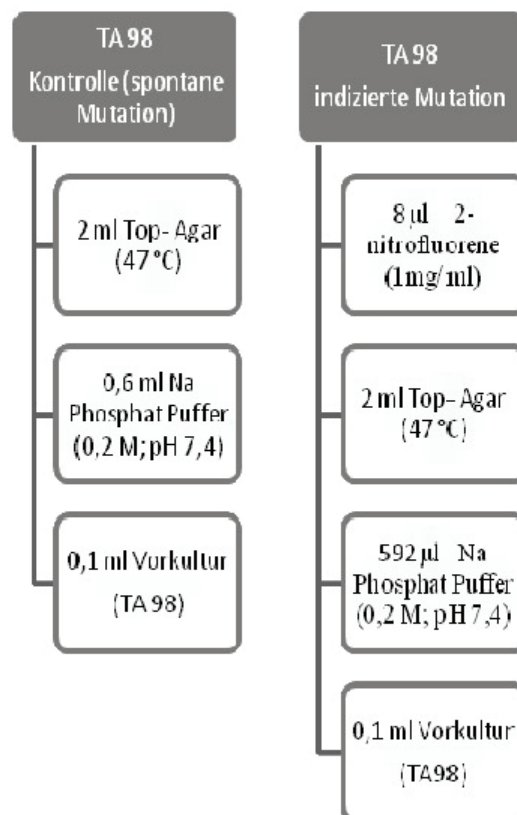
Materialien für den Versuch:

- Carso-Bouillon (25 ml)
- Teststamm (*S. typhimurium* TA 98)
- 6 \* Top- Agar (2 ml)
- ca. 2 ml Na Phosphat Puffer (0,2 M; pH 7,4)
- 6 Agar-Platten (Histidin-Minimalmedium)
- Testchemikalie (2-nitofluorene)



- 6 Reagenzgläser (steril)
- Rüttler
- Wasserbad (temperieren des Top-Agars und Puffers)
- Pipetten (0,6 ml, 2 ml, 100  $\mu$ l, 1  $\mu$ l, 5  $\mu$ l)

In der folgenden Grafik wird der Versuchsplan zur Bestimmung der Mutationsrate an Hand des Stammes TA 98 dargestellt. Es handelt sich dabei um eine vereinfachte Darstellung zum leichteren Verständnis des Versuchsablaufes.



**Abbildung 4: Versuchsablauf zur Bestimmung der Mutationsrate (TA 98)**

Für den Versuchsablauf wurde am Vortag mit Carso-Bouillon eine Vorkultur (12 Stunden, 37 °C) angesetzt. Am Tag des Ansatzes wurden die Agar-Platten (Minimalmedium) für ca. 30 min bei 50 °C getrocknet. Es wurden für die spontane und die induzierte Mutation jeweils 3 Platten vorbereitet.

Bei diesem Versuch kommt es auf eine schnelle Arbeitsweise an, da sonst der Top-Agar zu stark abkühlt und aushärtet, was das Gießen zum Ende des Versuches unmöglich macht. Wie in der Abbildung ersichtlich, wurde bei der Kontrolle zunächst der Top-Agar in die sterilen Reagenz-

gläser gegeben. Nach Zugabe des Na Phosphat Puffers wurde die Mischung mit der Vorkultur angeimpft. Nach jedem Arbeitsschritt wurde das Reagenzglas mittels Rüttler gleichmäßig gemischt. Am Ende wurde die „Top-Agar-Mischung“ vorsichtig auf die Agar-Platte gegeben und gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert.

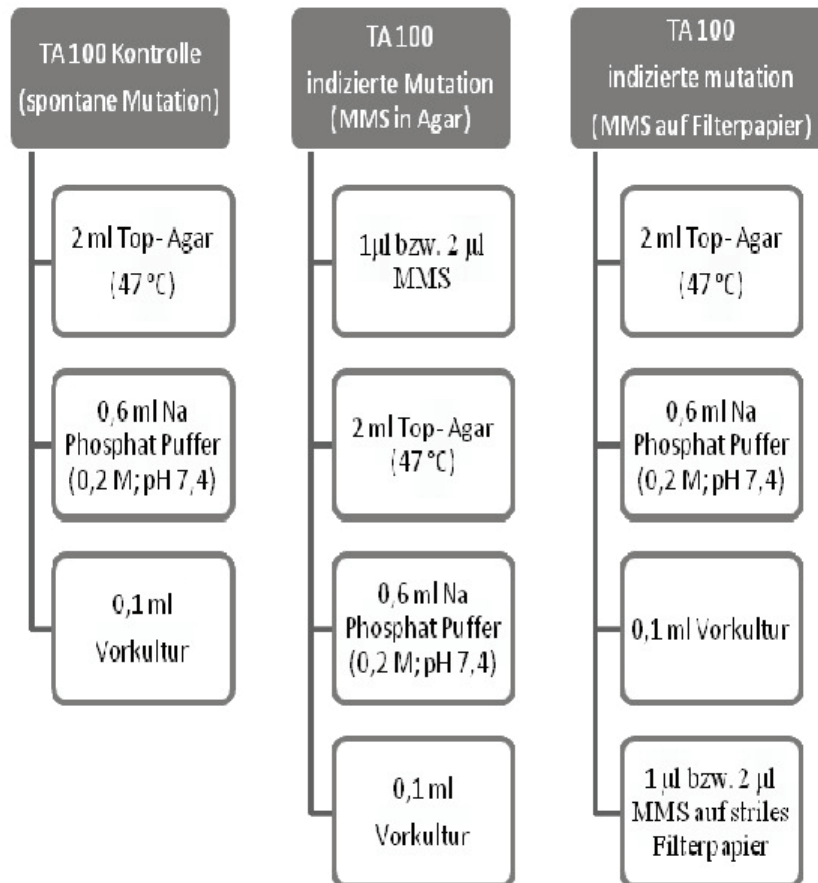
Der Ablauf der indizierten Mutation unterschied sich nicht von dem der Kontrollreihe. Lediglich die Chemikalie 2-nitrofluorene fehlte im Top-Agar. Die Auswertung erfolgte nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C.

### 3.3.4.2 *Salmonella typhimurium* (TA 100)

Materialien für den Versuch:

- Carso-Boullion (25 ml)
- Teststamm (*S. typhimurium* TA 100)
- 6 \* Top-Agar (2 ml)
- ca. 2 ml Na Phosphat Puffer (0,2 M; pH 7,4)
- 6 Agar-Platten (Histidin-Minimalmedium)
- Testchemikalie (MMS)
- 6 Reagenzgläser (steril)
- Rüttler
- Wasserbad (temperieren des Top-Agars und Puffers)
- Pipetten (0,6 ml, 2 ml, 100 µl, 1 µl, 5 µl)
- Pinzetten (platzieren des Filterpapiers)
- 2 \* steriles Filterpapier (d = 0,5 cm)

In der Abbildung „Versuchsablauf zur Bestimmung der Mutationsrate (TA 100)“ soll die Versuchsabfolge veranschaulicht werden. Es handelt sich dabei jedoch nur um eine vereinfachte Darstellung.



**Abbildung 5: Versuchsablauf zur Bestimmung der Mutationsrate (TA 100)**

Diese Untersuchung wurde in drei Teile gegliedert, wobei jeweils eine Doppelbestimmung vorgenommen wurde. Die Untersuchung der Mutationsrate von TA 98 und TA 100 wurden an einem Tag durchgeführt. So konnten die Vorkulturen für beide Versuche genutzt und die Agar-Platten (Minimalmedium) beider Experimente getrocknet werden.

Im ersten Teil wurden 2 Platten für die induzierte Mutation (MMS in Agar) vorbereitet. Dazu wurde 1 µl der mutationsauslösenden Chemikalie MMS in das sterile Reagenzglas gegeben. Anschließend kamen der Top-Agar, der Na Phosphat Puffer und die Vorkultur dazu. Nach jedem Arbeitsschritt wurde das Reagenzglas auf dem Rüttler gut gemischt. Nachdem alle Komponenten gut vermengt waren, wurde der „Top-Agar-Mix“ auf die Agar-Platten gegeben und gleichmäßig verteilt.

Für die Kontrolluntersuchung und die induzierte Mutation (MMS auf Filterpapier) wurden 4 sterile Reagenzgläser zuerst mit dem Top-Agar gefüllt. Anschließend wurden der Puffer und die Vorkultur zugefügt und nach jedem Schritt gemischt. Die „Top-Agar-Mischung“ wurde auf den Agar-Platten gleichmäßig verteilt. Zwei der Platten wurden als Kontrolle verwendet. Auf die

anderen beiden Platten wurde mittig ein steriles Filterpapier (d = 0,5 cm) gegeben. Anschließend wurde 2 µl MMS auf das Filterpapier gegeben. Alle Platten wurden für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend ausgewertet.

### 3.3.5 Bestimmung des mutagenen Potenzials von Alkylphosphat Ionic Liquids (Spot-Test)

Materialien für den Versuch:

- 2 \* Carso-Bouillon (25 ml)
- Teststämme (*S. typhimurium* TA 98, TA 100)
- 26 \* Top-Agar (2 ml)
- ca. 16 ml Na Phosphat Puffer (0,2 M; pH 7,4)
- 26 Agar-Platten (Histidin-Minimalmedium)
- Ionic Liquids ([EMIM] [Et<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]; [BOIMJ] [Bu<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]; [EMIM] [Me<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]; [MMIM] [Me<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]; [EOIM] [Cl<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]; [OMIM] [Me<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>])
- 26 Reagenzgläser (steril)
- Rüttler
- Wasserbad (temperieren des Top-Agars und Puffers)
- Pipetten (0,6 ml, 2 ml, 100 µl, 1 µl, 5 µl)
- Pinzetten (platzieren des Filterpapiers)
- 26 \* steriles Filterpapier (d = 0,5 cm)

Für diese Untersuchung wurde eine Übernachtskultur von den *Salmonella typhimurium*-Stämmen TA 98 und TA 100 mit Carso-Bouillon (ca. 12 h, 37 °C) angesetzt. Die Minimalmedium-Agar-Platten wurden am Ansatztag getrocknet (ca. 30 min, 50 °C).

Es wurden 2 ml Top-Agar in ein steriles Reagenzglas gegeben. Hinzu kamen 0,6 ml des Na Phosphat Puffers (0,2 M, pH 7,4). Mittels Rüttler wurde der Agar mit dem Puffer gut gemischt, bevor 0,1 ml der Vorkultur dazugegeben wurde. Nach erneutem Mischen wurde der Top-Agar auf die getrockneten Agar-Platten gleichmäßig verteilt und abgekühlt. Im letzten Arbeitsschritt wurden mit einer Pinzette sterile Filterplättchen in die Mitte der Platten gegeben.

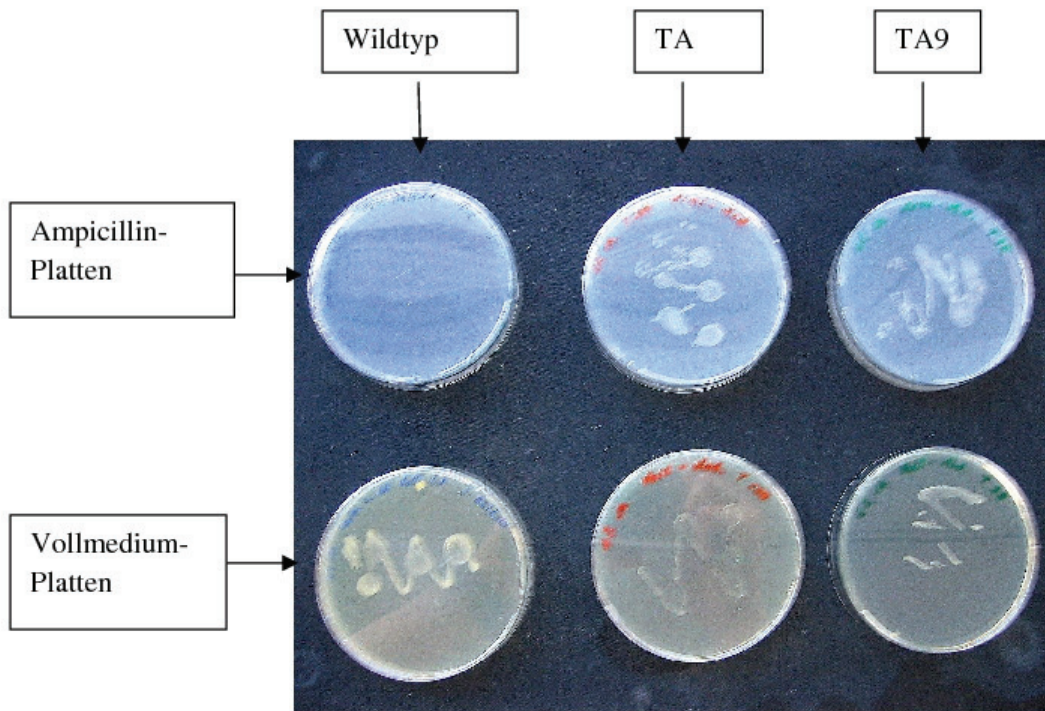
Es wurden für jeden Stamm zwei Testreihen durchgeführt, die sich durch die Konzentration der Ionic Liquids unterschied. Mit einer Pipette wurde 1 µl bzw. 5 µl der Ionic Liquids auf das Fil-

terpapier gegeben. Für beide Stämme (TA 98, TA 100) wurden je eine Kontrolleplatte vorbereitet. Dabei wurde lediglich der letzte Arbeitsschritt mit dem Filterpapier weg gelassen. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C erfolgte die Auswertung.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Kultivierung der Teststämme und Ampicillinresistenz

Zur besseren Auswertung der Versuche wurden die Platten zur Kultivierung der Teststämme mit den Platten der Ampicillinresistenz verglichen.

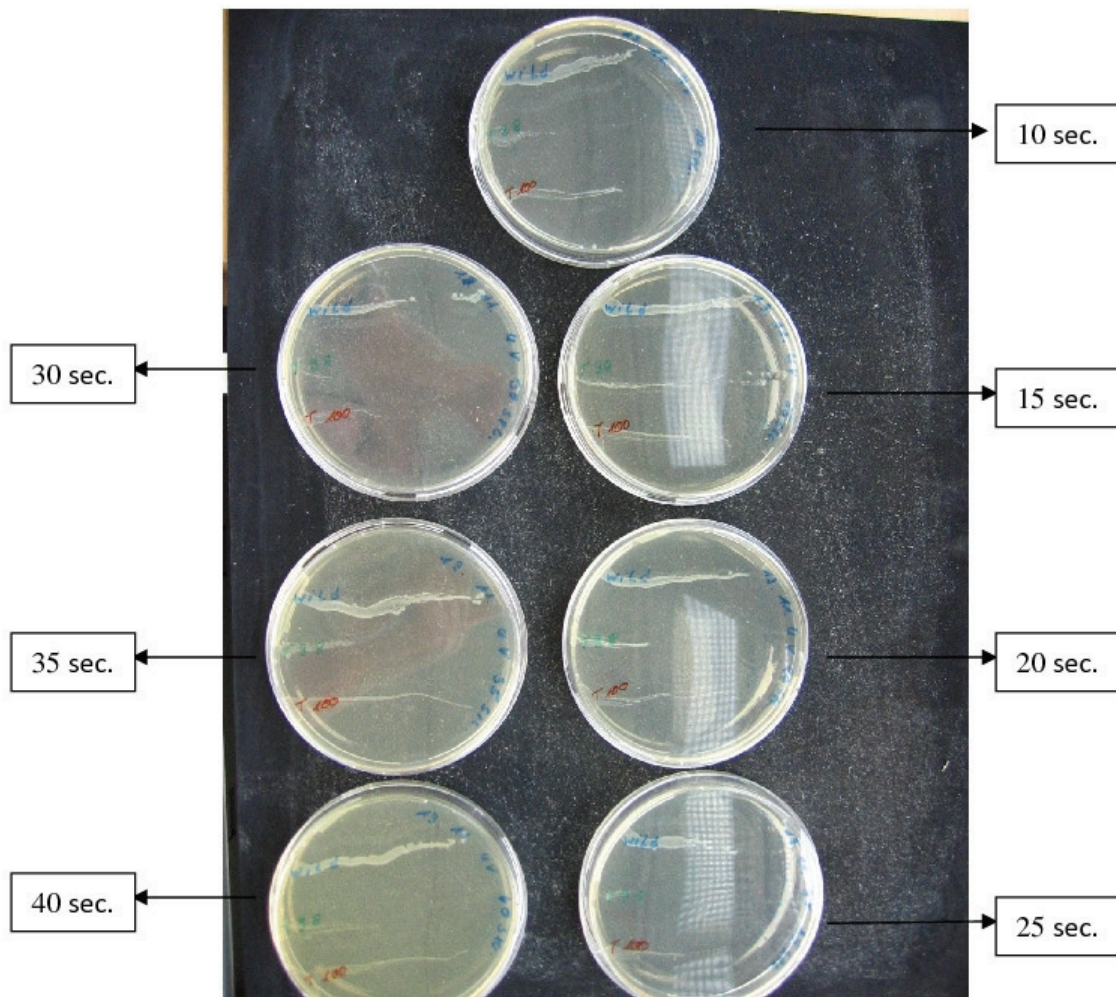


**Abbildung 6: kultivierte Teststämme im Vergleich zu den Ergebnissen der Ampicillinresistenz**

In der Abbildung „kultivierte Teststämme im Vergleich zu den Ergebnissen der Ampicillinresistenz“ sind oben die Platten zur Bestimmung der Ampicillinresistenz dargestellt, unten sind die Vollmediumplatten sichtbar. Es ist deutlich erkennbar, dass auf allen Vollmediumplatten die Kulturen gewachsen sind. Auf den Ampicillin-Platten sind hingegen nur die Mutanten TA 98 und TA 100 gewachsen. Der Wildtyp konnte unter Anwesenheit von Ampicillin nicht wachsen.

## 4.2 UvrB-Mutation

Die Ergebnisse des UvrB-Testes sind in Abbildung 7 dargestellt. Hierbei wurde zuerst der Wildtyp auf die Platten ausgestrichen. Zusätzlich wurden die Mutanten TA 98 (in der Abbildung grün beschriftet) und TA 100 (rot) auf die Platten gegeben.

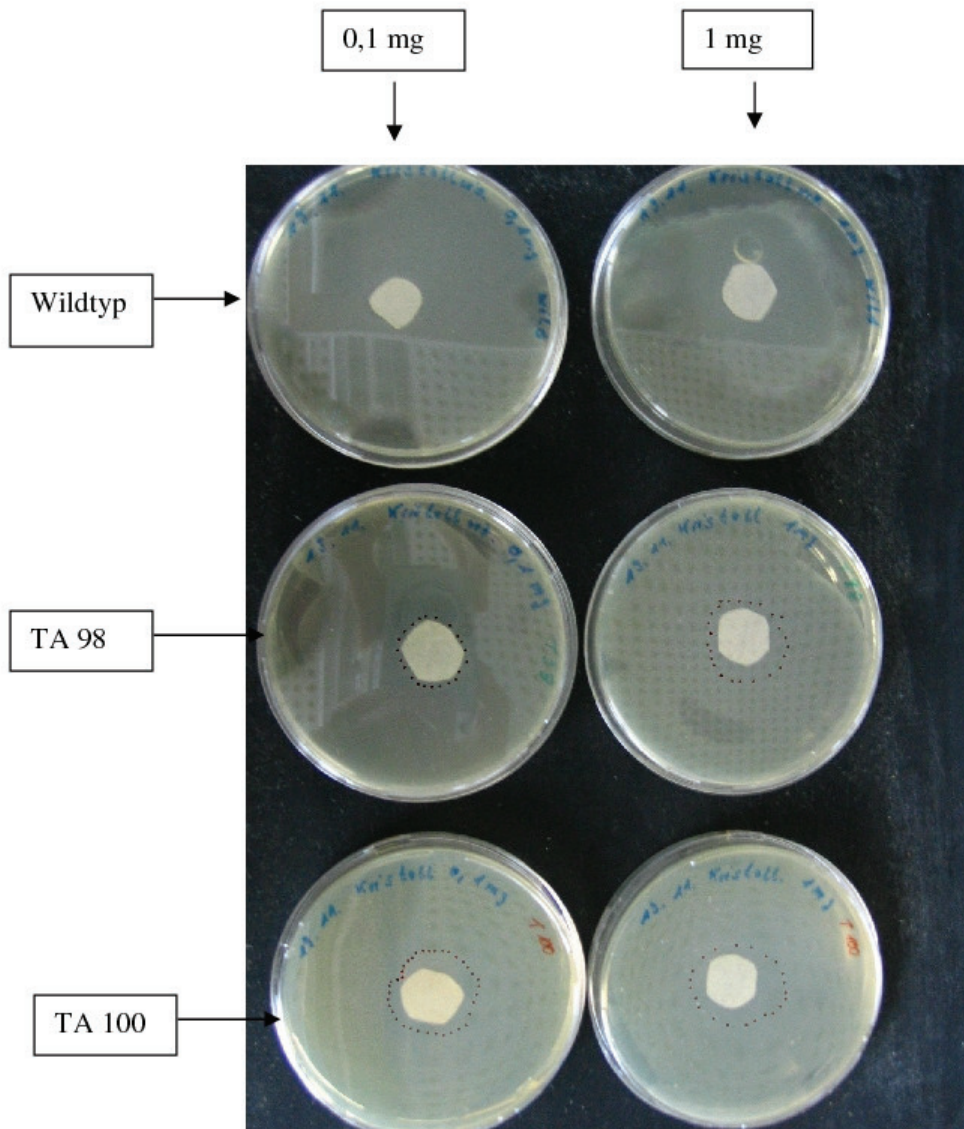


**Abbildung 7: Ergebnisse UvrB-Mutation**

Auf allen Platten ist der Wildtyp gewachsen, unabhängig davon, ob er dem UV-Licht ausgesetzt war oder nicht. Der Mutant TA 98 ist nur im Bereich, welcher mit Alufolie abgedeckt war, gewachsen. Ausnahme bildet hierbei die Platte, die mit 15 sec. bestrahlt wurde. Der Mutant TA 100 ist bei den Bestrahlungszeiten 10, 35 und 40 sec. über die gesamte Platte gewachsen. Bei den restlichen Platten ist TA 100 nur im UV-freien Bereich gewachsen.

### 4.3 Rfa-Mutation

Für diese Untersuchung wurden zwei Kristallviolettlösungen verwendet, gegenüber gestellt und verglichen. In der folgenden Abbildung wurden die klaren Höfe mit einer gepunkteten Linie nachgezeichnet, um diese deutlicher darzustellen.



**Abbildung 8: Ergebnisse der Rfa-Mutation**

Beim Wildtyp konnten keine klaren Höfe festgestellt werden. Auf den Platten mit den Mutanten TA 98 und TA 100 sind Hemmhöfe zu erkennen. In der Verdünnung mit 1 mg sind die Höfe deutlicher ausgebildet als bei Kristallviolettlösung mit 0,1 mg. Besonders deutlich wird dieses Ergebnis bei dem Stamm TA 98 sichtbar.



#### 4.4 Bestimmung der Mutationsraten (spontan vs. induziert mit mutagenen Stoffen)

##### 4.4.1 *Salmonella typhimurium* (TA 98)

Auf der folgenden Abbildung sind die Platten zur Bestimmung der Mutationsrate des Stammes TA 98 zu sehen. Auf der rechten Seite sind die Ergebnisse der spontanen Mutation, links die der induzierten Mutation zum Vergleich abgebildet.

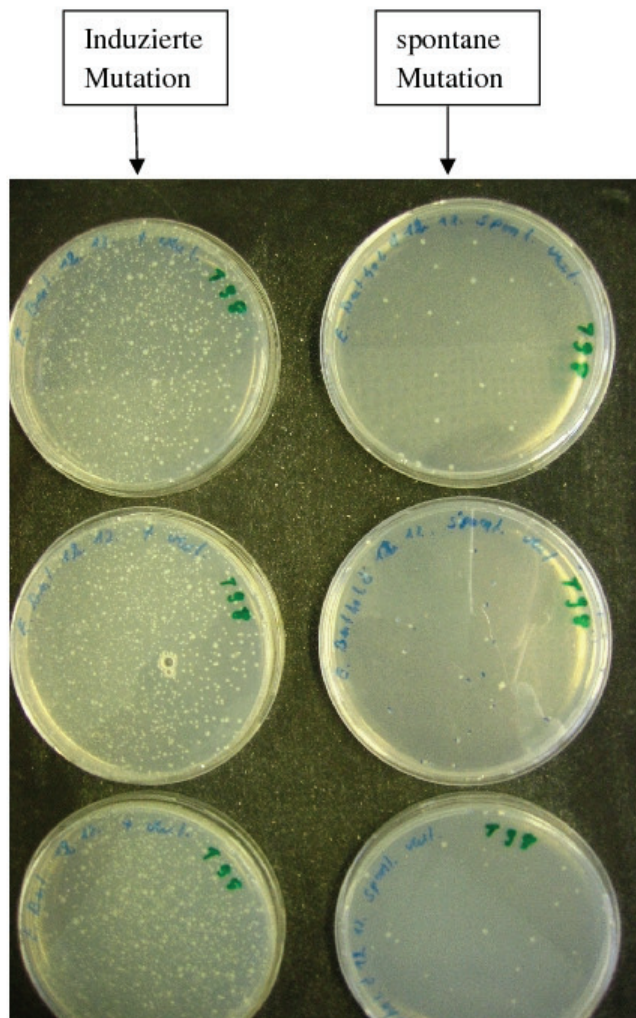


Abbildung 9: Ergebnis Bestimmung Mutationsrate mit 2-nitofluorene

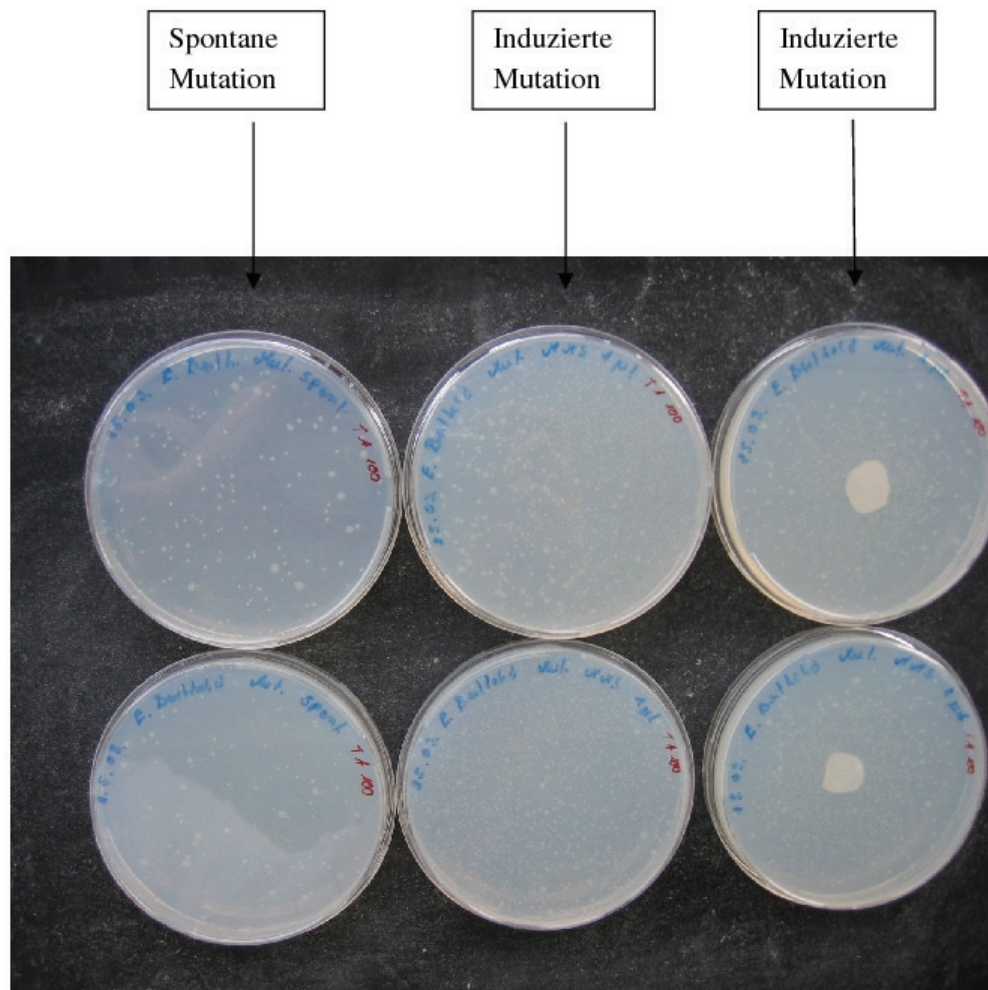
Die verwendete Chemikalie sorgte für eine hohe Rückmutationsrate des *Salmonella*-Stammes TA 98. Bei der spontanen Mutation sind kaum Revertanten zu erkennen. Genauere Ergebnisse dieses Versuches sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

**Tabelle 1: Ergebnisse Bestimmung der Mutationsrate TA 98 (2-nitorfluoren)**

Platte	Induzierte Mutation	spontane Mutation
1	n. a.	15 KbE
2	n. a.	15 KbE
3	n. a.	25 KbE

#### 4.4.2 *Salmonella typhimurium* (TA 100)

Auf der Abbildung 10 wurden die Platten zum besseren Vergleich nebeneinander dargestellt. Links sind die Platten der spontanen Mutation, in der Mitte die Platten der induzierten Mutation, bei der die Chemikalie MMS in den Top-Agar gegeben wurde, zu sehen. Auf den rechten Platten sind die Ergebnisse der induzierten Mutation zu erkennen, bei denen ebenfalls die Chemikalie MMS auf das Filterpapier gegeben wurde.



**Abbildung 10: Ergebnisse der Bestimmung der Mutationsrate mit MMS**

Auf den Platten der spontanen Mutation sind deutlich Revertanten zu erkennen, welche über die gesamten Platten verteilt sind. Die genauen Kolonienzahlen sind in der folgenden Tabelle ablesbar.

**Tabelle 2: Bestimmung der Mutationsrate TA 100 (MMS)**

<b>Platte</b>	<b>Spontane Mut.</b>	<b>Induzierte Mut. (in Agar)</b>	<b>Induzierte Mut. (auf Filterpapier)</b>
1	115 KbE	1536 KbE	8704 KbE (nahe Filterpapier)
2	98 KbE	3646 KbE	7936 KbE (nahe Filterpapier)

Bei beiden Untersuchungen der induzierten Mutation ist ein deutlicher Anstieg der Rückmutation zu erkennen. Bei den Platten, auf denen die Chemikalie MMS in den Top-Agar gegeben wurde, wuchsen Revertanten auf der gesamten Oberfläche. Auf den Platten, bei denen MMS auf das Filterpapier gegeben wurde, treten vermehrt Revertanten nahe dem Filterpapier auf. Auffallend ist, dass zum Rand hin die Revertanzahl abnimmt.

#### **4.5 Bestimmung des mutagenen Potenzials von Alkylphosphat Ionic Liquids (Spot-Test)**

##### **4.5.1 *Salmonella typhimurium* (TA 98)**

Da die Nährbouillon mit der Impföse angeimpft und dabei nicht nur eine Kolonie von den Platten entnommen wurde, lässt sich keine genaue Aussage über die Zellzahl innerhalb der Nährlösung treffen.

Die folgende Tabelle schlüsselt die Beschriftungen auf den Platten auf. Sie ist anwendbar für die gesamte Versuchsreihe zur Bestimmung des mutagenen Potenzials von Alkylphosphat Ionic Liquids (Spot-Test).

(Die Beschriftung der Platten diene lediglich der Orientierung und leichteren Auswertbarkeit des Versuches und ist willkürlich subjektiv gewählt.)

Tabelle 3: Plattenbeschriftung (Spot-Test)

Bezeichnung auf Platten		Erläuterung	
L <sub>1</sub> 1	L <sub>1</sub> 5	L <sub>1</sub> = [EMIM] [Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	L <sub>1</sub> 1 = 1 µl / L <sub>1</sub> 5 = 5 µl
L <sub>2</sub> 1	L <sub>2</sub> 5	L <sub>2</sub> = [BOIMJ] [Bu <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	L <sub>2</sub> 1 = 1 µl / L <sub>2</sub> 5 = 5 µl
L <sub>3</sub> 1	L <sub>3</sub> 5	L <sub>3</sub> = [EMIM] [Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	L <sub>3</sub> 1 = 1 µl / L <sub>3</sub> 5 = 5 µl
L <sub>4</sub> 1	L <sub>4</sub> 5	L <sub>4</sub> = [MMIM] [Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	L <sub>4</sub> 1 = 1 µl / L <sub>4</sub> 5 = 5 µl
L <sub>5</sub> 1	L <sub>5</sub> 5	L <sub>5</sub> = [EOIM] [Cl <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	L <sub>5</sub> 1 = 1 µl / L <sub>5</sub> 5 = 5 µl
L <sub>6</sub> 1	L <sub>6</sub> 5	L <sub>6</sub> = [OMIM] [Me <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	L <sub>6</sub> 1 = 1 µl / L <sub>6</sub> 5 = 5 µl

In den Abbildungen 11 und 12 wurden die Ergebnisse des Spot-Testes für TA 98 dargestellt. Bei den Platten L<sub>2</sub>, L<sub>5</sub> und L<sub>6</sub> haben sich klare Höfe gebildet. Zur deutlicheren Darstellung wurden diese blau umrandet. Die Hemmhöfe sind in allen Versuchen mit den zuvor genannten Ionic Liquids aufgetreten.

Bei der Konzentration von 1 µl betrug der Umfang der klaren Höfe ca. 0,5 cm, bei der Konzentration von 5 µl ca. 1,5 cm. Direkt am Hemmhof sind keine Kolonien gewachsen. Außerhalb der klaren Höfe wuchsen die Kolonien gleichmäßig auf der Platte. Auch auf den Platten, auf denen keine Hemmhöfe vorhanden sind, sind die Kolonien gleichmäßig gewachsen. Die Anzahl der Kolonien wird in Tabelle 4 dargestellt.

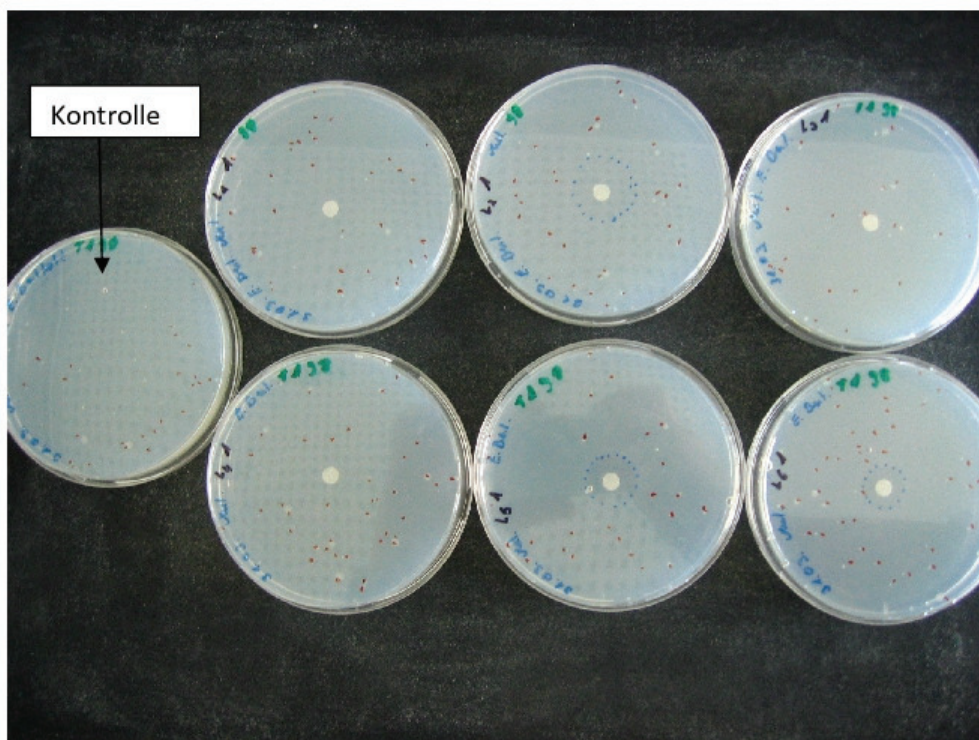


Abbildung 11: Ergebnis Spot-Test (TA 98) 1 µl

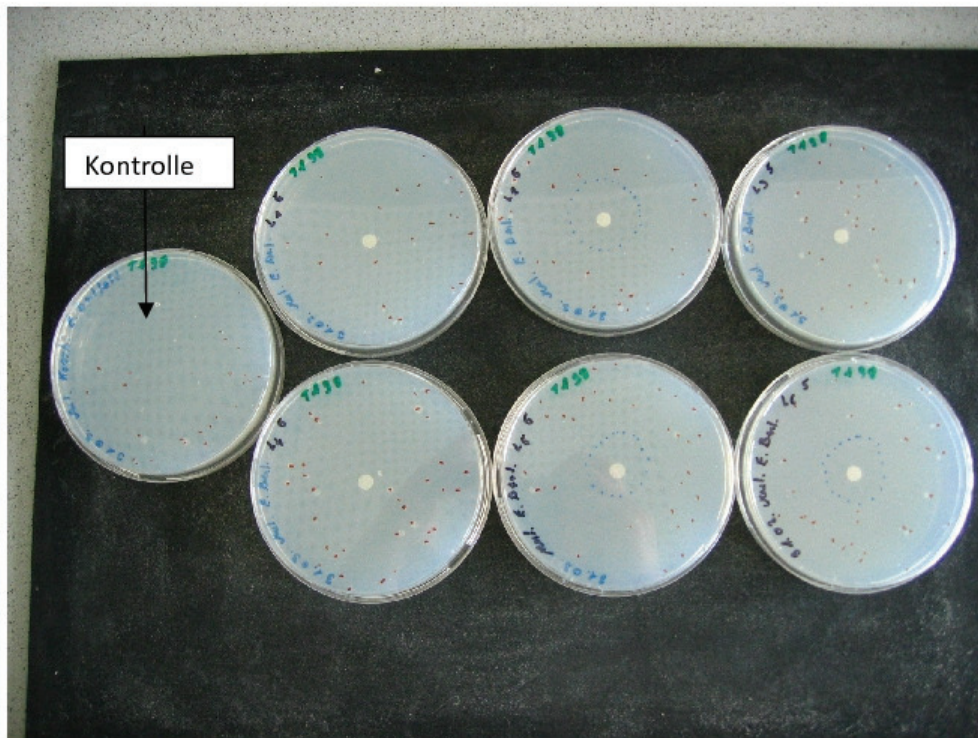


Abbildung 12: Ergebnis Spot-Test (TA 98) 5 µl

Tabelle 4: Ergebnisse Spot-Test (TA 98)

Konzentration	Kontrolle	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	L <sub>5</sub>	L <sub>6</sub>
1 µl	30 KbE	32 KbE	28 KbE	20 KbE	39 KbE	26 KbE	46 KbE
5 µl	30 KbE	21 KbE	25 KbE	37 KbE	34 KbE	28 KbE	27 KbE

#### 4.5.2 *Salmonella typhimurium* (TA 100)

In den Abbildungen 13 und 14 sind die Ergebnisse des Spot-Testes (TA 100) dargestellt. Bei den Platten L<sub>2</sub>, L<sub>5</sub> und L<sub>6</sub> wurden klare Höfe festgestellt. Diese wurden wieder durch eine blaue Linie herausgearbeitet. Die Ergebnisse der gewachsenen Kolonien sind in der Tabelle 5 ersichtlich.

Die Kolonien sind gleichmäßig auf den Platten gewachsen. Wie bei den Platten des Spot-Testes TA 98 haben sich bei den Ionic Liquids [BOIMJ] [Bu<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]; [EOIM] [Cl<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]; [OMIM] [Me<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>] klare Höfe gebildet. Diese hatten je nach Konzentration einen unterschiedlichen Umfang (1 µl = 0,5 cm; 5 µl = 1,5 cm). Direkt auf den klaren Höfen sind keine Kolonien gewachsen. Außerhalb der Hemmhöfe sind die Kolonien gleichmäßig bis an den Rand der Platten verteilt. Es

waren keine Bereiche erkennbar, in denen ein sprunghafter Anstieg oder Abfall der Revertanten aufgetreten ist. In der letzten Tabelle dieser Versuchsreihe sind die Koloniezahlen der einzelnen Platten zu sehen.

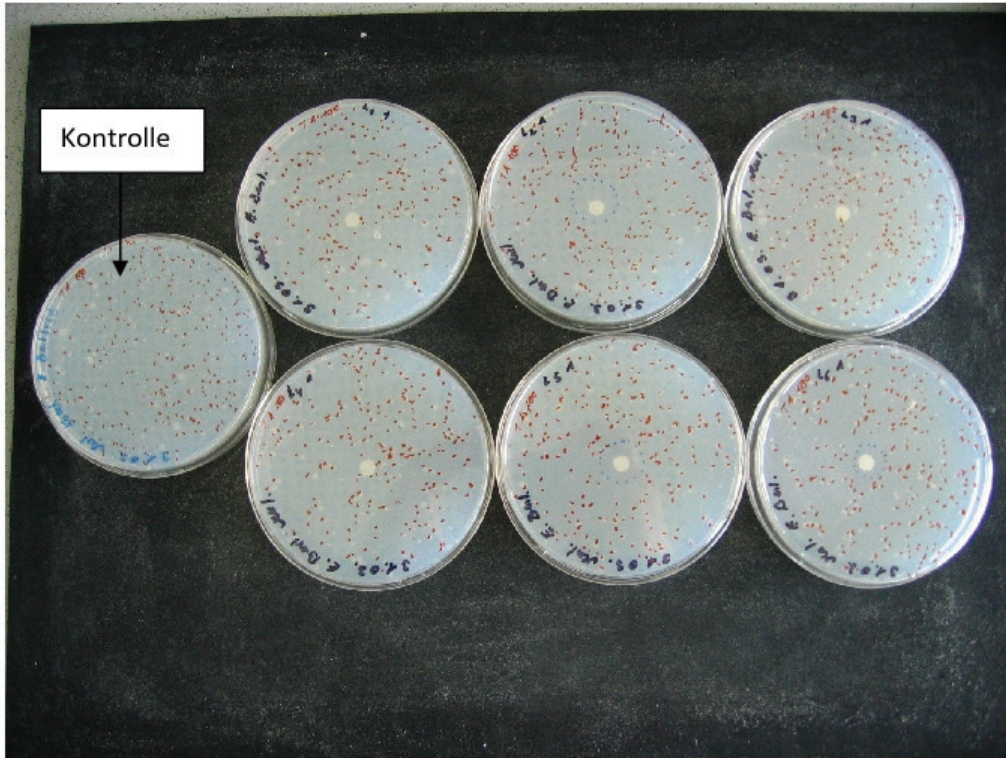


Abbildung 13: Ergebnis Spot- Test (TA 100) 1 µl

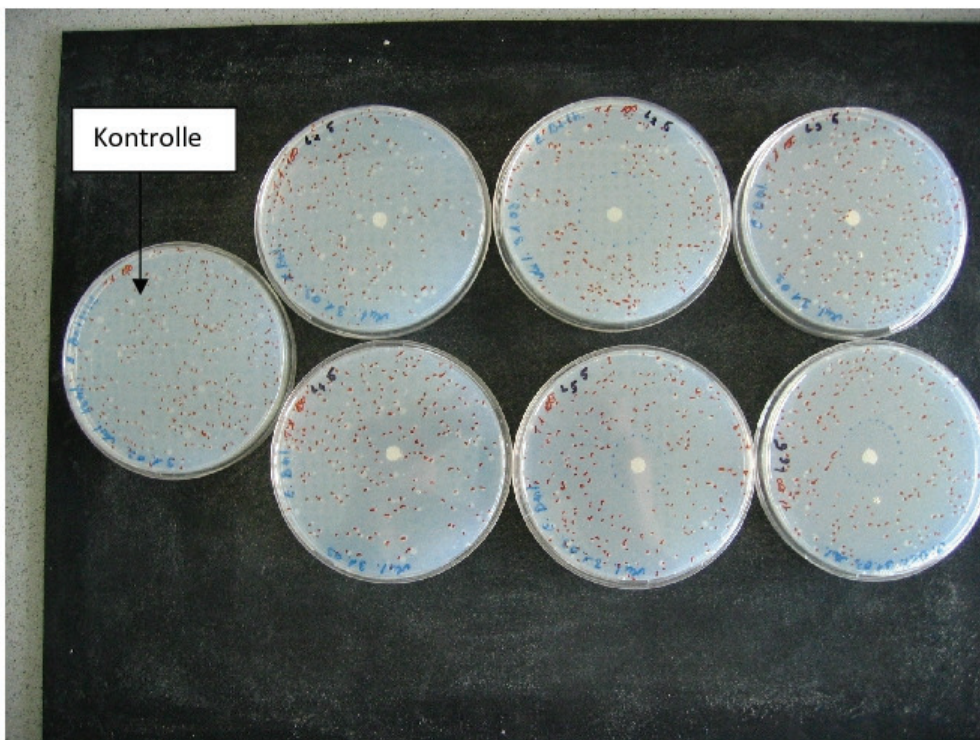


Abbildung 14: Ergebnis Spot- Test (TA 100) 5 µl

**Tabelle 5: Ergebnisse Spot- Test (TA 100)**

<b>Konzentration</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>L<sub>1</sub></b>	<b>L<sub>2</sub></b>	<b>L<sub>3</sub></b>	<b>L<sub>4</sub></b>	<b>L<sub>5</sub></b>	<b>L<sub>6</sub></b>
<b>1 µl</b>	112 KbE	194 KbE	206 KbE	239 KbE	204 KbE	200 KbE	207 KbE
<b>5 µl</b>	112 KbE	212 KbE	211 KbE	265 KbE	216 KbE	212 KbE	190 KbE

## 5. Diskussion

### 5.1 Kultivierung der Teststämme und Ampicillinresistenz

An Hand der Ergebnisse ist klar zu erkennen, dass alle *Salmonella*-Stämme wie zu erwarten auf dem Vollmedium gewachsen sind. Auch die Histidin-Mutanten TA 98 und TA 100 konnten auf dem Agar deutlich wachsen, da diesem in der Herstellung Histidin beigefügt wurde. Die Menge an Histidin war den Mutanten somit zum Wachstum ausreichend.

Die Platten der Kultivierung mit dem Vollmedium wurden den Ampicillinplatten gegenüber gestellt, um die Ergebnisse zu verdeutlichen. Durch die Gegenüberstellung der Platten ist besonders gut zu erkennen, dass der Wildtyp auf den mit Ampicillin versehenen Platten nicht wachsen konnte. Ursache hierfür ist die Wirkung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, zu denen Ampicillin gehört. Die bakterizide Wirkung während der Zellteilung hat die Ausbildung einer neuen Zellwand blockiert und somit zum Absterben der Zellen geführt.

Die Mutanten TA 98 und TA 100, denen das Plasmid pKM101 genetisch zugesetzt wurde, haben wie erwartet resistent auf das Antibiotikum reagiert. Die beiden durch das Plasmid zusätzlich kodierten Gene der fehlerhaften „mismatch-Reparatur“ haben für die Ampicillinresistenz gesorgt.

Die Ergebnisse der beiden Versuche deckten sich mit den aus der Literatur entstandenen Erwartungen (Ames, 1998; Steinbüttel, 2003).

### 5.2 UvrB-Mutation

Laut Literatur (Ames, 1982) sollten die Platten 8 sec. mit einem Abstand von 33 cm unter einer UV-Lampe (15 W) bestrahlt werden. Im ersten Versuchsdurchlauf wurden die Platten nach diesen Anweisungen bestrahlt. Nach der Inkubationszeit konnten jedoch nicht die erwarteten Ergebnisse festgestellt werden. Der Mutant TA 100 ist entgegen der Erwartungen auch unter UV-Einstrahlung gewachsen. Das kann eventuell mit der verwendeten UV-Lampe erklärt werden. Die Lampen weisen mit der Zeit Verschleißerscheinungen auf, die durch verschiedene Faktoren wie z. B. die Einschalthäufigkeit und jeweilige Betriebsdauer verursacht werden. Unter diesem



Gesichtspunkt wurde der Versuchsaufbau zur Fehlerbestimmung modifiziert. Es wurden 7 Platten für den Versuch vorbereitet, die jeweils unterschiedlich lange bestrahlt wurden. Auch der Abstand der Platten wurde von 33 cm auf 11 cm verringert. Nach der Inkubationszeit der Platten konnten die erwarteten Ergebnisse festgestellt werden.

Wie erwartet, ist auf allen Platten der Wildtyp trotz UV-Stress gewachsen. Da bei dem Wildtyp das Uvr-System noch intakt ist, konnten die durch die UV-Strahlen verursachten Schäden von der Zelle repariert werden. Somit war das Wachstum des Wildtyps gewährleistet.

Der Mutant TA 100 ist entgegen der Erwartungen bei den Bestrahlungszeiten 10, 35 und 40 sec. über die gesamte Platte gewachsen. Es könnte sein, dass die Bestrahlungszeit von 10 sec. noch nicht ausreichend war, um bei dem Stamm DNA-Schäden hervorzurufen. Auf den restlichen Platten ist TA 100 nur im UV-freien Bereich gewachsen. Zu einer Rückmutation des Stammes kann es bei den Bestrahlungszeiten über 30 sec. gekommen sein. Um diese Überlegung zu bestätigen oder zu widerlegen, müssten weitere Untersuchungen an diesem Stamm durchgeführt werden. Da TA 100 auf den restlichen Platten (15, 20, 25 und 30 sec.) nur im UV-freien Bereich gewachsen ist, wurde davon ausgegangen, dass bei dem Stamm der genetische Defekt vorlag und er somit für die folgenden Untersuchungen weiter genutzt werden konnte.

Der Mutant TA 98 konnte erwartungsgemäß nur im UV-freien Bereich, welcher mit Alufolie abgedeckt war, wachsen. Die Platte, die mit 15 sec. bestrahlt wurde, bildet hierbei die Ausnahme. Da TA 98 nur auf dieser Platte komplett gewachsen ist, wurde diese Platte für den TA 98 als Ausreißer gesehen. Es ist möglich, dass im Versuchsablauf Fehler aufgetreten sind, z. B. das Ausstreichen der falschen Kultur. Da der Stamm *Salmonella typhimurium* TA 98 jedoch auf den übrigen Platten das erwünschte Verhalten gezeigt hat, kann davon ausgegangen werden, dass das UvrB-Gen defekt ist. Somit konnte der Stamm die durch die UV-Strahlen verursachten Schäden in der DNA-Struktur nicht beheben (Ames, 1982; Henning, 1998).

### 5.3 Rfa-Mutation

Bei der Rfa-Mutation wurde der Defekt des Rfa-Gens untersucht. Durch diesen Gendefekt wird die Zellwand permeabel und ermöglicht einen leichteren Zugang hydrophober Substanzen in die Zelle. Die Zellen weisen somit eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Kristallviolett auf, da dies die Biosynthese der hydrophilen Polysaccharidketten stört.

Bei dieser Untersuchung wurden die *Salmonella typhimurium*-Stämme TA 98, TA 100 und der Wildtyp verwendet. Da das Rfa-Gen des Wildtyps nicht mutiert ist, reagiert er auf die Kristallviolettlösung weniger empfindlich als die Mutanten TA 98 und TA 100. Beim Wildtyp konnten, wie erwartet, keine klaren Höfe erkannt werden.

Bei den Mutanten, deren Zellwand für das Kristallviolett zugänglicher gemacht wurde, konnten bei beiden Verdünnungen Hemmhöfe festgestellt werden. Bei dem Stamm TA 98 war der Unterschied zwischen den Verdünnungen 1 mg und 0,1 mg besonders deutlich. Der Hemmhof bei der Kristallviolettlösung mit 0,1 mg war nicht so ausgeprägt wie der klare Hof der höheren Konzentration. Damit konnte deutlich gemacht werden, dass das Rfa-Gen des Mutanten defekt war. Auch bei dem TA 100 konnte dies festgestellt werden. Nach dem Vergleich mit den Ergebnissen von Ames Arbeit (1982) wurde der Versuch als erfolgreich betrachtet.

### 5.4 Bestimmung der Mutationsraten (spontan vs. induziert mit mutagenen Stoffen)

Diese Versuchsreihe diente der Festlegung der Revertanzahl unter Einfluss von Chemikalien, deren mutagene Wirkung bekannt ist. Somit können nach Abschluss der Laborversuche die Ergebnisse verglichen und ausgewertet werden. Im Verlauf der Auswertung können auf diesem Wege Rückschlüsse gezogen werden, ob die Ionic Liquids Bereiche aufweisen, in denen sie weder mutagen noch bakterizid wirken. Die Wahl der verwendeten Chemikalien wurde nach der Arbeit von Bruce N. Ames von 1982 getroffen.

#### **5.4.1 *Salmonella typhimurium* (TA 98)**

Auf der Abbildung 9 ist sehr gut zu erkennen, dass die Chemikalie im Vergleich zur Kontrolle für eine hohe Revertanzenzahl gesorgt hat. Bei der Kontrolle bewegten sich die Koloniezahlen zwischen 15 und 25 KbE je Platte. Durch die mutagene Wirkung der Chemikalie 2-nitrofluorene konnte eine hohe Anzahl der *Salmonella* trotz Histidinmangel wachsen, was darauf schließen lässt, dass es erwartungsgemäß zur Rückmutation der betroffenen Kolonien gekommen ist.

#### **5.4.2 *Salmonella typhimurium* (TA 100)**

Die Versuchsreihe sollte zur Bestimmung der Revertanzenzahl unter Verwendung von MMS dienen. Zur gleichen Zeit wurde überprüft, ob Unterschiede der Ergebnisse auftreten, wenn die Chemikalie nicht dem Top-Agar zugegeben wird, sondern auf ein steriles Filterpapier, da der Verdacht bestand, dass einige Ionic Liquids eine bakterizide Wirkung aufweisen.

An Hand der Tabelle 2 wurde deutlich, dass die Verwendung des sterilen Filterpapiers keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen, bei denen die Chemikalie in den Top-Agar gegeben wurde, ergaben. Der Unterschied zwischen den Platten bestand lediglich in der Verteilung der Kolonien. Nahe dem Filterpapier traten viele kleine Kolonien auf. Zum Rand der Platten hin wurde die Koloniendichte geringer. Jedoch wurden die Kolonien größer. Dies lässt sich über die Diffusion des MMS in die Umgebung (Agar) erklären. Nahe dem Filterpapier diffundierte die Chemikalie in höheren Konzentrationen in den Agar als z. B. am Rand der Platte. Somit konnte für den Spot-Test im weiteren Teil der Arbeit die Verwendung des Filterpapiers als ausreichend anerkannt werden. Des weiteren ergaben die Ergebnisse wie erwartet eine hohe Anzahl an Revertanten unter Verwendung von MMS. Vergleichend mit der Literatur kann man daher sagen, dass die Ergebnisse wie erwartet aufgetreten sind (Ames, 1982; Süßmuth, 1999).

## 5.5 Bestimmung des mutagenen Potenzials von Alkylphosphat Ionic Liquids (Spot-Test)

### 5.5.1 *Salmonella typhimurium* (TA 98)

Bei den Platten L<sub>2</sub>, L<sub>5</sub> und L<sub>6</sub> haben sich klare Höfe gebildet, was auf eine bakterizide Wirkung schließen lässt. Je nach Konzentration von 1 µl bzw. 5 µl waren diese größer. Bei der Konzentration von 1 µl betrug die Ausbreitung der Hemmhöfe vom Filterpapier ausgehend ca. 0,5 cm. Bei der Konzentration von 5 µl betrug sie ca. 1,5 cm. Innerhalb der klaren Höfe sind keine Kolonien gewachsen, was auf eine keimabtötende Wirkung der Ionic Liquids zurückzuführen wäre. Außerhalb der Hemmhöfe konnten keine Bereiche festgestellt werden, in denen sich die Koloniedichte verändert hat. Das lässt den Schluss zu, dass diese Ionic Liquids keine Konzentrationsbereiche aufweisen, in denen sie ein anderes Wachstum der Mikroorganismen hervorrufen. D.h. es waren keine Bereiche nachweisbar, in denen die Ionic Liquids weder bakterizid noch mutagen wirkten.

Auch auf den Platten der anderen Ionic Liquids sind die Kolonien gleichmäßig über die Fläche der Platten gewachsen. Somit kann man auch bei diesen Proben davon ausgehen, dass es keine bestimmten Konzentrationsbereiche gibt, in denen sie ein bakterizides aber nicht mutagenes Potenzial aufweisen.

Im Vergleich der Platten mit Ionic Liquids zur Kontrollplatte konnte kein sprunghafter Anstieg des Koloniewachstums verzeichnet werden. Auf der Kontrollplatte waren  $3 \cdot 10^1$  Kolonie zu erkennen. Auf den Platten mit den Ionic Liquids lagen die Koloniezahlen zwischen  $2,1 \cdot 10^1$  und  $4,6 \cdot 10^1$  KbE.

### 5.5.2 *Salmonella typhimurium* (TA 100)

Ebenso wie beim Versuch mit *Salmonella typhimurium* TA 98 hatten sich auf den Platten L<sub>2</sub>, L<sub>5</sub> und L<sub>6</sub> klare Höfe gebildet. Auch bei dem Stamm TA 100 verhielten sich die Hemmhofgrößen proportional zu den verwendeten Konzentrationen der Ionic Liquids. Es konnte bei allen Platten ein gleichmäßig verteiltes Wachstum der Kolonien festgestellt werden. Somit kann auch für diesen Stamm ausgeschlossen werden, dass es Bereiche gibt, in denen die verwendeten Ionic Liquids eine bakterizide aber nicht mutagene Wirkung aufweisen. Auf der Kontrolle des Stammes

wurden  $1,1 \cdot 10^2$  KbE gezählt. Auf den anderen Platten lagen die Koloniezahlen zwischen  $1,1 \cdot 10^2$  und  $2,3 \cdot 10^2$ .

Nach Durchführung und Auswertung der Ergebnisse kann man unter Berücksichtigung der Zielstellung sagen, dass in dieser Arbeit keine Hinweise gefunden wurden, die Rückschlüsse darauf zulassen, dass die verwendeten Ionic Liquids Konzentrationsbereiche aufweisen, in denen sie bakterizid aber nicht mutagen wirken. Die Ionic Liquids, die für die Versuche mit den Nummern 2, 5 und 6 versehen wurden, scheinen jedoch eine keimabtötende Wirkung aufzuweisen. Um genauere Aussagen darüber treffen zu können, müssten diese jedoch weiteren Untersuchungen unterzogen werden.

## 6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Untersuchung von Ionic Liquids. Ziel war es dabei herauszustellen, ob Konzentrationsbereiche existieren, in denen Ionic Liquids weder keimabtötend noch mutagen wirken. Für diese Untersuchung wurden drei *Salmonella*-Stämme der Gattung *typhimurium* verwendet. Als Grundlage der Laborversuche dienten der Wildtyp und die beiden Mutanten TA 98 sowie TA 100.

Es wurden die sechs folgenden Ionic Liquids auf die o. g. Zielstellung hin untersucht.

- [EMIM] [Et<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]
- [BOIMJ] [Bu<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]
- [EMIM] [Me<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]
- [MMIM] [Me<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]
- [EOIM] [Cl<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]
- [OMIM] [Me<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>]

Im Labor wurde der Genotyp der Teststämme bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Stämme auf UV- und Kristallvioletttempfindlichkeit und Ampicillinresistenz untersucht. Weiterhin wurde die Mutationsrate (spontan und induziert) der *Salmonella typhimurium* mit mutagenen Stoffen bestimmt, bevor die Untersuchung des mutagenen Potenzials von Alkylphosphat Ionic Liquids (Spot-Test) erfolgte.

Nach Auswertung der Laborergebnisse konnten keine Beweise gefunden werden, die darauf hinweisen, dass es Konzentrationsbereiche gibt, in denen die Ionic Liquids weder keimabtötend noch mutagen wirken. Dennoch kann eine keimabtötende und/oder mutagene Wirkung der im vorliegenden Versuch verwendeten Ionic Liquids nicht ausgeschlossen werden. Für aussagekräftige Ergebnisse sind weitere Tests unabdingbar.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel des Ampicillin (2009).....	10
Abbildung 2: schematischer Versuchsaufbau ( <a href="http://www.bifa.de/userfiles/images/BioSchemaAmes.gif">http://www.bifa.de/userfiles/images/BioSchemaAmes.gif</a> , 2009).....	13
Abbildung 3: <i>Salmonella typhimurium</i> (Quelle: <a href="http://de.wikipedia.org/wiki/Salmonellen#Epidemiologische_Gruppen">http://de.wikipedia.org/wiki/Salmonellen#Epidemiologische_Gruppen</a> . Brinkmann, 2009).....	16
Abbildung 4:Versuchsablauf zur Bestimmung der Mutationsrate (TA98).....	22
Abbildung 5: Versuchsablauf zur Bestimmung der Mutationsrate (TA 100).....	24
Abbildung 6: kultivierte Teststämme im Vergleich zu den Ergebnissen der Ampicillinresistenz.....	27
Abbildung 7: Ergebnisse UvrB-Mutation.....	28
Abbildung 8: Ergebnisse der Rfa-Mutation.....	29
Abbildung 9: Ergebnis Bestimmung Mutationsrate mit 2-nitofluorene.....	30
Abbildung 10: Ergebnisse der Bestimmung der Mutationsrate mit MMS.....	31
Abbildung 11: Ergebnis Spot-Test (TA98) 1 µl.....	33
Abbildung 12: Ergebnis Spot-Test (TA 98) 5 µl.....	34
Abbildung 13: Ergebnis Spot-Test (TA 100) 1 µl.....	35
Abbildung 14: Ergebnis Spot-Test (TA 100) 5 µl.....	35

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Ergebnisse Bestimmung der Mutationsrate TA 98 (2-nitorfluoren).....	31
Tabelle 2: Bestimmung der Mutationsrate TA 100 (MMS).....	31
Tabelle 3: Plattenbeschriftung (Spot-Test).....	33
Tabelle 4: Ergebnisse Spot-Test (TA 98).....	34
Tabelle 56: Ergebnisse Spot Test (TA 100).....	36



## Glossar

Auxotrophien:	(auch Mangelmutanten genannt), sind Organismen die bestimmte essentielle Substanzen nicht mehr selbst synthetisieren können, meist eine Folge von Mutation
bakterizide:	keimabtötend
$\beta$ -Lactam-Antibiotika:	eine Gruppe von Antibiotika, welche einen viergliedrigen Lactam-Ring aufweisen; sie stören die Zellwandsynthese während der Zellteilung
Chromatid:	Teil eines Chromosoms
Cross-Over:	Stückaustausch von väterlichen und mütterlichen Chromosomen, während der Meiose
Dimerisierung:	eine Sonderform der Polymerisation, Zusammenlagerung zweier Monomere (auch Atome oder Moleküle)
Exzision:	lat. <i>Excidere</i> = (her)aushauen, -schneiden, abhauen
homologe Chromosomen:	gleiche Chromosomen (enthalten die gleichen Gene)
kanzerogen:	krebserregend
Konformation:	räumliche Anordnung (bei organischen Molekülen)
letal:	(lat. <i>letum</i> = Tod bzw. <i>letal</i> = tödlich); somit als tödlich zu verstehen
Meiose:	(griech.: <i>meiono</i> = vermindern, verkleinern) eine Sonderform der Zellkernteilung, da die Anzahl der Chromosomen reduziert wird

OECD:	(eng. Organisation for Economic Co-operation and Development) Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
Phänotypisch:	Erscheinungsbild (Summe aller Merkmale eines Organismus)
PR-Enzym:	Photoreaktivierungsenzym
Reverse Mutation Test:	"Ames Test"
Revertanten:	( lat. <i>Revertere</i> = zurückkehren, umkehren); beschreibt Mutanten, die durch bestimmte Vorgänge rückmutiert wurden
Rfa-Mutation:	Mutation des rfa-Gens
S9- Mix:	Rattenleberextrakt, dessen Enzyme die Metabolisierung in der Leber simulieren
Substitution:	(lat.: <i>substituere</i> = ersetzen); beschreibt den Austausch von Basen in einer Nukleinsäuresequenz
Übernachtskultur:	Vorkultur
Uvr:	(eng. <i>Uvr</i> = UV repair)
UvrB-Mutations-Test:	UV-Empfindlichkeits-Test
Volatilität:	Maß für die Flüchtigkeit bzw. Neigung zur Flüchtigkeit von Stoffen (z. B. Chemikalien) in die Luft

## Literaturverzeichnis

Ames, B. N.; Maron, D. M.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Berkley: Biochemistry Department, University of Carlifornia, 1982

Anonymus1: [www.bifa.de/userfiles/images/BioSchemaAmes.gif](http://www.bifa.de/userfiles/images/BioSchemaAmes.gif). 12.06.2009

Anonymus2: <http://de.wikipedia.org/wiki/Ampicillin>. 13. 03 2007; 24.06.2009

Brinkmann, V.: [http://de.wikipedia.org/wiki/Salmonellen#Epidemiologische\\_Groupen](http://de.wikipedia.org/wiki/Salmonellen#Epidemiologische_Groupen). Berlin, Germany: Max Planck Institute for Infection Biology, 25.06. 2009; 26.06. 2009

Fuchs, G.: Allgemeine Mikrobiologie. 8. Vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag, 2007

Fritsche,W.: Mikrobiologie. 3. überarbeitete Auflage Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002

Henning, W.: Genetik. 2. Auflage Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1998

Hiller, K.; Lindequist, U.; Melzing, M.F.: Lexikon der Biochemie. 1. Auflage München: Spektrum Akademischer Verlag, 1999

Knippers, R.: Molekulare Genetik. 8. Neubearbeitete Auflage Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag, 2001

Kuhlmann, E.: Entwicklung von Extraktions- und Absorptionssystemen auf Basis ionischer Flüssigkeiten für die Entschwefelung von Kohlenwasserstoffen. Erlangen-Nürnberg: Der Technischen Fakultät der Universität, 2007 [http://www.opus.ub.uni-erlangen.de/opus/volltexte/2008/930/pdf/Dissertation\\_Esther\\_Kuhlmann.pdf](http://www.opus.ub.uni-erlangen.de/opus/volltexte/2008/930/pdf/Dissertation_Esther_Kuhlmann.pdf)

Munk, K.; Eikmanns, M.; Fischer, R.; Jahn, D.; Nethe-Jaencheen, R.: Grundstudium Biologie Mikrobiologie. 1 Auflage Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2000

Oreste, A.M.: *Bacteria versus Antibacterial Agents An Integrated Approach*. Washington, DC: ASM Press, 2003

Singelton, P.: *Einführung in die Bakteriologie*. 2. Auflage Wiesbaden: Quelle & Meyer Verlag, 1995

Steinbüchel, A.; Oppermann-Sanio, F.B.: *Mikrobiologisches Praktikum Versuche und Theorie*. 1. Auflage Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2003

Süßmuth, R.; Eberspächer, J.; Haag, R.; Springer, W.: *Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum*. 2 völlig überarbeitete Auflage Stuttgart New York: Thieme Verlag, 1999

Wasserscheid, P.; Welton, T.: *Ionic Liquids in Synthesis*. 2nd Reprint Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2004

## Anhang

### A. Benötigte Lösungen/Reagenzien

VB(25)-Salz-Lösung:

- 67 ml dest. H<sub>2</sub>O (erwärmt auf 50 °C)
- 0,24 g MgSO<sub>4</sub> (wasserfrei)
- 5 g Citronensäure-Monohydrat
- 25 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 8,75 g NaH(NH<sub>4</sub>)PO<sub>4</sub> \* 4 H<sub>2</sub>O

Die trockenen Bestandteile nach und nach im Wasser lösen und anschließend auf 100 ml auffüllen. Die Lösung wird bei 121 °C für 20 min. sterilisiert.

40%-Glucose-Lösung:

- 40 g Glucose (wasserfrei)
- Ca. 65 ml dest. H<sub>2</sub>O

Die Bestandteile mischen, auf 100 ml auffüllen und bei 121 °C für 20 min. sterilisieren

Histidin-Lösung:

- 150 mg L-Histidin (99%)
- 40 ml dest. H<sub>2</sub>O

Das Histidin mit den dest. H<sub>2</sub>O mischen, abfüllen und 20 min. bei 121 °C sterilisieren.

Biotin-Lösung:

- 12,2 mg D(+)- Biotin
- 100 ml dest. H<sub>2</sub>O

Das Biotin mit den dest. H<sub>2</sub>O mischen, abfüllen und 20 min. bei 121 °C sterilisieren

Ampicillin-Lösung:

- 320 mg Ampicillin-Dreihydrat
- 49,2 ml dest. H<sub>2</sub>O
- 0,8 ml 0,1 N NaCl

Die Bestandteile Mischen und abfüllen, nicht sterilisieren.

**Histidin-Biotin-Lösung:**

- 100 ml dest H<sub>2</sub>O
- 7,8 mg L-Histidin (0,5 mM)
- 12,2 mg Biotin (0,5 mM)

Bestandteile mischen und bei 121 °C für 20 min sterilisieren

**Kristallviolettlösung(I):**

- 0,1 mg Kristallviolett
- 100 ml dest. H<sub>2</sub>O

Bestandteile vorsichtig mischen und abfüllen, nicht sterilisieren

**Kristallviolettlösung(II):**

- 1 mg Kristallviolett
- 100 ml dest. H<sub>2</sub>O

Bestandteile vorsichtig mischen und abfüllen, nicht sterilisieren

**0,2 M Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,4):**

- 13,8 g Na H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O (0,2 M)
- 14,2 g Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> (0,2 M)
- 500 ml dest. H<sub>2</sub>O

Die Bestandteile mischen, pH-Wert überprüfen und anschließend bei 121 °C für 20 min. sterilisieren.

**B. Nährbouillon****Caso-Bouillon:**

Nach Hersteller: 30 g je Liter, anschließend 20 min. bei 121 °C sterilisieren.

Es empfiehlt sich 3 g Agar auf 100 ml zu verwenden und diese vor den sterilisieren in 4 \* 25 ml abzufüllen.

**Nutrient Broth-Bouillon:**

- 640 mg Nutrient Broth
- 400 mg NaCl

- dest. H<sub>2</sub>O

Nutrient Broth und NaCl in ein Becherglas geben, mit dest. H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen. Die Bouillon in 4 \* 25 ml teilen und bei 121 °C für 20 min. sterilisieren.

### **C. Agar**

Top-Agar:

- 600 mg Agar-Agar
- 500 mg NaCl
- dest. H<sub>2</sub>O

Agar-Agar und NaCl in ein Becherglas geben und unter rühren (Rührfischchen) mit dest. H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen. Anschließend abfüllen (250 ml-Flasche) und bei 121 °C für 20 min. sterilisieren. Anschließend 10 ml der Histidin-Biotin-Lösung (je 0,5 mM) zufügen.

Vollmedium:

- 8 ml VB(25X)-Salz-Lösung (steril)
- 3 g Agar-Agar
- 178 ml dest. H<sub>2</sub>O

Die Bestandteile mischen und in eine 1000 ml-Flasche füllen (Rührfischchen in der Flasche lassen) geben. Die Mischung 20 min. bei 121 °C sterilisieren. Anschließend die folgenden Bestandteile bei einer Temp. von ca. 50 °C zugeben.

- 10 ml Glucose-(40%)-Lösung (steril)
- 2 ml 0,5 mM Histidin-Lösung (steril)
- 1,2 ml Biotin-Lösung (steril)

Alle Bestandteile werden auf dem Magnetrührer nach und nach zugefügt und gut gemischt, bevor der Agar in die Petrischalen gegossen werden kann.

Masterplatten: (Ampicillinresistenz)

- 8 ml VB(25X)-Salz-Lösung (steril)
- 3 g Agar-Agar
- 178 ml dest. H<sub>2</sub>O

Die Bestandteile mischen, in eine 1000 ml-Flasche füllen (Rührfischchen in der Flasche lassen) und 20 min. bei 121 °C sterilisieren. Anschließend die folgenden Bestandteile bei einer Temp. von 50 °C zugeben.

- 10 ml Glucose-(40%)-Lösung (steril)
- 2 ml 0,5 mM Histidin-Lösung (steril)
- 1,2 ml Biotin-Lösung (steril)
- 0,63 ml Ampicillin-Lösung

Nachdem alle Bestandteile auf dem Magnetprüher zugefügt und gut gemischt wurden, kann der Agar in die Petrischalen gegossen werden.

Nutrient-Agar: (Rfa-Mutation, UvrB-Mutation)

- 8 g Nutrient Broth
- 5 g NaCl
- 15 g Agar-Agar
- 1000 ml dest H<sub>2</sub>O

Die Trockenbestandteile in ein Becherglas geben und mit dest. H<sub>2</sub>O, unter rühren auffüllen. Nach dem Abfüllen für 20 min. bei 121 °C sterilisieren.

Minimalmedium für Mutagenitätstest:

- 12 g Agar-Agar
- 728 ml dest. H<sub>2</sub>O

Beide Bestandteile in einer 1-Liter-Flasche mit Rührfischchen 20 min. bei 121 °C sterilisieren. Einen Meßzylinder mit Alufolie abdecken und mit sterilisieren.

Nach der sterilisation auf 50 °C auskühlen lassen und auf dem Magnetprüher die folgenden Reagenzien zufügen.

- 32 ml VB(25) (steril)
- 40 ml 40%Glucose (steril)

Nach gründlichem Mischen Platten gießen (ergibt ca. 30)



**Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. wurden.

Neubrandenburg, 30. 06. 2009

---

Ort, Datum

---

Unterschrift