



Prüfung der akuten Toxizität von Stoffen mit Bakterien

J. Hartung

Institut für Tierhygiene und Tierschutz
der Tierärztlichen Hochschule Hannover,
Bünteweg 17p, D-3000 Hannover 71

Zusammenfassung

Es werden zwei bakterielle Testverfahren (Batch-Mikrokalorimetrie an *E. coli* und der Microtox(R)-Test mit *P. phosphoreum*) auf ihre Eignung zur Prüfung der akuten Toxizität von Stoffen untersucht.

Am Beispiel von Spurenstoffen der Stallluft wird gezeigt, daß es möglich ist, mit Hilfe einfacher bakterieller "Screening"-Modelle eine Beurteilung der akuten Toxizität von Stoffen vorzunehmen. Der Modellwert der an den Bakterien erhobenen Befunde für höher entwickelte Organismen, einschließlich Wirbeltieren, wird durch Vergleich mit Befunden aus der Literatur rechnerisch geprüft. Beim Vergleich wird festgestellt, daß die Befunde in der Rangfolge und in der Abstufung der Dosen in der Tendenz übereinstimmen. Die Zusammenhänge werden durch Korrelations- und Signifikanzberechnungen belegt. Die Streubreite der Befunde läßt es sinnvoll erscheinen, mehrere Kurzzeittests mit verschiedenen Testorganismen im Sinne einer "Testbatterie" für solche Abschätzungen vorzusehen.

Mit bakteriellen Kurzzeittests durchgeführte Untersuchungen vermögen zwar das direkte Experiment am Tier nicht völlig zu ersetzen, ermöglichen jedoch eine Einschätzung des Belastungspotentials von Stoffen und können somit dazu beitragen, den notwendigen Umfang der Untersuchungen mit Tieren zu reduzieren.

Summary: Testing the acute toxicity of chemicals using bacteria

Two bacterial tests are used to screen the acute toxicity of 8 compounds which are known as pollutants in the air of stables. The procedures applied were batch-microcalorimetry (*E. coli*) and the Microtox(R)-test (*P. phosphoreum*).

It is shown that both bacterial "screening models" are suitable to evaluate the acute toxicity of the compounds tested. The test results are

compared to results from other toxicity tests using higher developed organisms; additionally the comparison included compounds from the literature. It is found that the results from the different test systems are significantly correlated as far as linear correlation and as rank correlation are concerned. The range of the results supports the suggestion to apply two or more short-term tests involving different test organisms in a "test battery".

Bacterial short-term assays may not completely replace experiments involving animals but they allow an estimation of the toxic potential of substances which have not yet been tested and may thus reduce the necessary amount of experiments with animals.

1. Einleitung

Jährlich wird eine Vielzahl chemischer Stoffe produziert und in die Umwelt abgegeben. Es wird geschätzt, daß mehr als 2 Millionen chemische Komponenten existieren, und daß jedes Jahr etwa 250 000 neue Verbindungen formuliert werden, von denen etwa 500 in die Herstellung gehen (1). Die Weltproduktion an organischen Verbindungen beläuft sich auf etwa 300 Millionen Tonnen im Jahr (2).

Chemisch-analytische Untersuchungen allein geben keine ausreichende Auskunft über die biologische Wirkung dieser Stoffe, weder hinsichtlich ihrer akuten Toxizität noch hinsichtlich möglicher Potenzierungs- und Summationseffekte oder antagonistischer und synergistischer Wirkungen bei gleichzeitiger Anwesenheit mehrerer Substanzen. Es werden daher vermehrt biologische Tests benötigt, wobei besonderes Interesse an Kenntnissen über die unmittelbare Toxizität dieser Stoffe im Sinne der Vergiftung von Mensch, Tier und Pflanze besteht. Zunehmende Aufmerksamkeit wird auch Stoffen entgegengebracht, die gentoxische, mutagene oder kanzerogene Eigenschaften besitzen.

Die traditionelle Form der akuten Toxizitätsprüfung ist der LD 50-Test am Tier, insbesondere am Säugetier. Dieser eindeutig erscheinende Zahlenwert ist jedoch hinsichtlich seiner Aussagekraft seit längerer Zeit umstritten, da es sich in Wirklichkeit um einen weit gespreizten Bereich handelt, innerhalb dessen der wahre Wert liegt (3), und die Genauigkeit eines absoluten Meßwertes lediglich vorgetäuscht wird (4).

Auch aus Gründen des Tierschutzes muß der LD 50-Test in seiner klassischen Form mit großen Tierzahlen sehr kritisch beurteilt werden. Darüberhinaus sind Versuche an und mit Tieren aufwendig und relativ schwierig zu standardisieren. Es erscheint daher sinnvoll, auch einfachere Testorganismen für Stoffprüfungen einzusetzen, die sicherer definierbar sind und zu besser reproduzierbaren Befunden führen. Relativ einfache Testobjekte sind Bakterien.

2. Kurze Übersicht häufig benutzter bakterieller Kurzzeittests

Bei Prüfsystemen, die mit Bakterien arbeiten, wird vorrangig in flüssigen Medien das Auftreten einer nachteiligen Wirkung durch eine Prüfsubstanz im Vergleich zu unbelasteten Kulturen ermittelt. Prüfsubstanzen, die bereits in kleinen Konzentrationen eine nachteilige Wirkung hervorrufen, werden als biologisch belastender eingestuft als solche, die dazu eine relativ höhere Konzentration erfordern (5). Neben der Rangfolge dieser Grenzkonzentrationen wird auch der quantitativen Abstufung eine bewertende Bedeutung zugeordnet.

Bakterielle Tests beruhen i.d.R. auf Messungen der Hemmung

- der Vermehrung und des Wachstums, z.B. (6), (7), (4),
- der Sauerstoffaufnahme, z.B. (8), (9), (10) und
- der Beweglichkeit, z.B. (11), (12), (4).

Die dabei benutzten Bakterienarten gehören überwiegend zu den Genera *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Citrobacter* und *Spirillum* (13).

In jüngerer Zeit sind zwei Methoden entwickelt worden, mit denen zum einen

- die Wärmebildung von Bakterienkulturen und zum anderen
- die Biolumineszenz von Bakterien wie *Photobacterium phosphoreum* oder *Photobacterium (Vibrio) fischeri* unter Schadstoffbelastung gemessen und bewertet werden kann.

Zur Messung der Wärmebildung, der Mikrokolorimetrie, werden Mikrokolorimeter verschiedener Bauart benutzt (14). Bei solchen Untersuchungen werden die Testorganismen nur in geringem Umfange apparatebedingten und versuchstechnischen Belastungen ausgesetzt. Ein weiterer Vorteil besteht in der Möglichkeit der kontinuierlichen Aufzeichnung der mit der Wärmebildung einer Bakterienkultur in Zusammenhang stehenden Stoffwechselschritte. Die Bewertung des Einflusses einer Prüfsubstanz erfolgt stets im Vergleich zum unbelasteten Prüfansatz. Die Länge der Untersuchungsdauer für den Einzelversuch liegt je nach Fragestellung und Verfahrensablauf zwischen zehn Minuten und 24 Stunden. Zur Untersuchung an Mikroorganismen mit der Mikrokolorimetrie gibt es eine Reihe von Übersichten, z.B. (15), (16), (17), (18).

Der Biolumineszenz-Test mit *Photobacterium phosphoreum* ist unter der Bezeichnung Microtox(R)-Test eingeführt worden (19). Die Testbakterien sind gebrauchsfertig als Lyophilisat erhältlich (20). Unter Normalbedingungen produzieren die Bakterien kontinuierlich Licht, welches mit einem Photometer quantitativ gemessen werden kann. Wirkt eine Prüfsubstanz nachteilig auf die Bakterien ein, so nimmt die Lichtproduktion ab. Zur Bestimmung einer nachteiligen Wirkung wird die "effective concentration 50" (EC50) bei einer Kontaktzeit von 15 min empfohlen (21). Die "EC50" ist diejenige Konzentration, bei der innerhalb der gewählten Versuchszeit von z.B. 15 min die Lichtemission der Testkultur um 50 % gegenüber der Kontrolle abnimmt. Für die Durchführung einer kompletten Analyse wird meist nicht mehr als eine Stunde benötigt. Zwar ist das zur Testdurchführung vertriebene Meßgerät ("toxicity-analyzer") relativ teuer, jedoch sind die Testgesamtkosten im Vergleich zum Fishtest gering (22).

Die Empfindlichkeit des Microtox(R)-Test ist gut. Gegenüber mehreren anderen mikrobiologischen Tests, wie dem Beweglichkeitstest mit *Spirillum volutans*, dem Wachstumshemmtest mit *Pseudomonas putida*, dem Test auf Hemmung der Atmung von Belebtschlamm und dem Test auf Hemmung der Belebtschlammdehydrogenase, wird angegeben, daß der Microtox(R)-Test überwiegend empfindlicher reagiert (23), (24),(25). In einer Untersuchung von BULICH (26) erwies sich der

Microtox(R)-Test auch als empfindlicher als der Gewebezellkultur-Toxizitätstest. Stark von den übrigen Befunden abweichende Angaben werden z.B. von MALLAK u. BRUNKER (27) für Phenol und von McFETERS et al. (28) für Formaldehyd gemacht. Die hohe Empfindlichkeit des Microtox(R)-Test bezieht sich jedoch nicht auf alle Prüfsubstanzen. In einigen Fällen zeigen der Fischtest (29) und Tests mit anderen Bakterienspezies (23) oder mit Algen (28) eine deutlich höhere Empfindlichkeit.

3. Eigene Untersuchungen

Die hier untersuchten Spurenstoffe kommen als Verunreinigungen sowohl in Gewässern als auch in der Luft von Tierhaltungen vor. Von den 136 in der Stallluft nachgewiesenen Fremdstoffen (5) werden hier modellhaft fünf bzw. acht Stoffe mit den beiden bakteriellen Tests geprüft. Bei der Auswahl der Prüfsubstanzen wurden neben stark wirkenden Stoffen (z.B. Formaldehyd, Phenol) auch solche benutzt, die eine weniger starke Wirkung erwarten ließen (z.B. Aceton). Sechs der untersuchten Stoffe sind in der MAK-Wert-Liste der gesundheitsgefährdenden Stoffe aufgeführt (30). Alle acht Stoffe gelten als Fremdgase der Stallluft, von denen angenommen wird, daß sie an der nachteiligen Wirkung stark mit Fremdgasen angereicherter Luft auf den Respirationstrakt der Tiere beteiligt sind. Von den in der Stallluft nachgewiesenen Stoffen liegen in der Literatur bislang für 10 Stoffe Befunde im Microtox(R)-Test als EC₅₀(15min)-Werte vor (5).

3.1 Vergleich der mit dem Microtox(R)-Test (MTT) und dem Batch-Mikrokalorimeter (BMK) erhobenen Befunde

Im BMK und MTT wurden Aceton, Buttersäure, Dimethylamin, Formaldehyd und Phenol geprüft, im MTT zusätzlich noch Butanol, m-Kresol und p-Kresol.

Tab. 1: Vergleich der mit dem Batch-Mikrokalorimeter (BMK) und dem Microtox(R)-Test (MTT) erhaltenen wirksamen Konzentrationen bei der Prüfung von 5 Stoffen

Prüf- substanzen	BMK		MTT	
	Dmin mg/l	Rang	EC50(15min) mg/l	Rang
Aceton	3949	5	14985	5
Buttersäure ^a	1198	4	1498	4
Dimethylamin ^a	879	3	640	3
Formaldehyd	4,2	1	7,5	1
Phenol	214	2	43	2

a neutralisiert

Die Tabelle 1 vergleicht die mit dem MTT und dem BMK erhaltenen Befunde. Für den MTT wird die EC50(15min), für das BMK die minimal wirksame Dosis (Dmin) auf der Basis des Parameters dP benutzt. Der Parameter dP gibt die zeitliche Differenz zwischen dem Gipfel des ersten und des zweiten Wärmebildungspeaks im Thermogramm (Wärmezeitkurve) von *Escherichia coli* an; nähere Erläuterungen siehe bei (5). Werden die erhaltenen Ergebnisse direkt mit Hilfe der linearen Regression verglichen, so beträgt der Korrelationskoeffizient bei den fünf Prüfsubstanzen $r = 0,98$ ($p < 0,01$).

Im einzelnen erweist sich der MTT beim Dimethylamin und insbesondere beim Phenol als empfindlicher. Das BMK ist beim Aceton erheblich, beim Formaldehyd deutlich und bei der Buttersäure erkennbar empfindlicher. Werden die Prüfsubstanzen nach ihrer Wirkung geordnet, so ist die Reihenfolge der Wirksamkeit dieser fünf Substanzen in beiden Prüfverfahren gleich.

Die Befunde zeigen, daß die benutzten Verfahren - zumindest für die hier geprüften Stoffe - in der Rangfolge vergleichbare Ergebnisse

liefern, wenn auch die Empfindlichkeit im Einzelfall deutlich verschieden sein kann. Bemerkenswert ist die hohe Empfindlichkeit des BMK, zumal *E. coli* als ein gegen Umwelteinflüsse eher widerstandsfähiger Keim gilt (31).

3.2 Vergleich der eigenen Microtox(R)-Test-Befunde (MTT) mit Befunden aus anderen Kurzzeittests

Für die hier untersuchten acht stalluftrelevanten Substanzen wird in Tabelle 2 ein Befundvergleich gegeben, der die Tests an *Pseudomonas putida*, *Daphnia magna*, Goldorfe und der Ratte einschließt. Um die Ratte direkt in den Vergleich einbeziehen zu können, wurden die in mg/kg vorliegenden Angaben in Anlehnung an ALTHAUS (32) in eine orale Aufnahme über die täglich aufgenommene Wassermenge umgerechnet. Die rechnerisch erhaltene Prüfsubstanzmenge ist in mg/l angegeben. Für diesen Vergleich wurden aus den eigenen Befunden nur die des MTT herangezogen, da bereits weiter oben gezeigt wurde, daß die Befunde für die fünf im BMK geprüften Stoffe mit denen im MTT vergleichbar sind. Außerdem bilden die acht Substanzen eine breitere Basis für Vergleiche mit anderen Prüfsystemen.

Der direkte Vergleich mit Hilfe der linearen Korrelation ergibt für die Beziehung zwischen den Befunden im Microtox(R)-Test und in den übrigen Tests auf dem 99 % Niveau für alle Vergleiche hohe Korrelationskoeffizienten von mindestens 0,909. Sie zeigen, daß zumindest für die hier geprüften Stoffe eine Abschätzung der Wirkung an einfachen Systemen wie Bakterien Hinweise auch für die Wirkungsabschätzung gegenüber höher entwickelten Organismen geben kann.

Diese Tendenz zeigt sich auch beim Vergleich der Rangfolge. So sind, wie die letzte Zeile auf Tabelle 2 ausweist, über die Rangkorrelation auf dem 95 %-Niveau signifikante Beziehungen zwischen MTT und *P. putida*, Goldorfe und Ratte vorhanden. Die Beziehung MTT - Goldorfe bestätigt Literaturberichte über Korrelationen zwischen MTT und verschiedenen Fischttests (33),(34),(35).

Tab. 2: Vergleich der eigenen Microtox(R)-Test-Befunde mit Befunden aus anderen Kurzzeittests anderer Untersucher. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Prüfsubstanzen	MTT ^a EC50(15min) mg/l	Ps. putida ^b TKG mg/l	D. magna ^c EC50 mg/l	Goldorfe ^{d,e} LC50(48h) mg/l	Ratte ^f LD50 oral Wasser mg/l
Aceton	14985	1700	10001	9403	78000
Butanol	2364	650	1880	1485	6300
Buttersäure	1498 ^g	875 ^g	1950 ^g	365 ^m	23500 ^m
Dimethylamin	640 ^g	-	-	-	5900 ^m
Formaldehyd	7,4	14	42	79	6400
Kresol, m-	8,0	53	25	18	1900
Kresol, p-	1,6	-	-	18 ^e	1700
Phenol	43,0	64	12	20	3312
Lineare Korrelation (Basis: MTT)					
r =		0,909**	0,995**	0,998**	0,973**
n =		6	6	7	8
Rangkorrelation (Basis: MTT)					
r =		0,943*	0,714	0,875*	0,714*
n =		6	6	7	8

- a (5) f (50), modifiziert für Wasseraufnahme einer Standardratte
b (6) von 0,2 kg: 125 ml/kg = 25 ml/Ratte/d
c (47) g neutralisiert
d (48) m keine Angabe zum pH-Wert
e (49)

Zu der mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,714$ ($p < 0,05$) bewerteten Beziehung zwischen dem MTT und dem Warmblüter Ratte muß darauf hingewiesen werden, daß solche Beziehungen bei der geringen Zahl von Prüfsubstanzen mit Zurückhaltung beurteilt werden müssen, da sowohl der Testorganismus als auch die Expositionsbedingungen und -wege grundverschieden sind. Allerdings meine ich, daß man aufgrund dieser Befunde guten Anlaß hat, solche Beziehungen nachdrücklicher als bisher zu suchen und unvoreingenommen zu prüfen. Um dies zu erleichtern, wird vorgeschlagen, bei solchen Untersuchungen, besonders bei Kurzzeittests, eine Prüfsubstanz, zum Beispiel Phenol, als Standard regelmäßig mitzuführen. Phenol ist eine der am häufigsten untersuchten Prüfsubstanzen und wird zum Beispiel auch von PARKER u. PRIBYL (36) als geeignete Standardsubstanz betrachtet.

3.3 Erweiterung des Befundvergleichs auf stalluftrelevante Stoffe

Wegen der geringen Befundzahlen und der damit verbundenen Unsicherheit solcher Vergleichsberechnungen wurden alle in der Literatur verfügbaren Befunde mit den Testsystemen MTT, *Daphnia magna*, Goldorfe und Ratte in einen erweiterten rechnerischen Vergleich einbezogen. Dabei wurde sich wiederum auf die aus der Stalluftanalytik bekannten 136 Spurenstoffe beschränkt.

Von diesen Fremdstoffen liegen in den Testsystemen zwischen 32 (Testorganismus Ratte) und 9 (MTT) Befunde vor. Werden diese Befunde in ähnlicher Weise wie in Tabelle 2 rechnerisch verglichen, so ergeben sich die in Tabelle 3 dargestellten Beziehungen zwischen den Photobakterien (MTT), *Daphnia magna*, dem Fisch Goldorfe und dem Warmblüter Ratte. Die Höhe der Korrelationskoeffizienten ist durch Pfeile markiert. In allen Fällen bestehen hochsignifikante Beziehungen ($p < 0,01$) zwischen den Tests sowohl in der linearen Regression als auch in der Rangkorrelation.

Die Aufstellung zeigt, daß Stoffe, die nachteilig auf die Lumineszenz der Photobakterien wirken, mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf

Tab. 3: Korrelationskoeffizienten für die Beziehungen zwischen den Befunden im MTT (*P. phosphoreum*) und 4 weiteren Kurzzeittests mit *Pseudomonas putida*, *Daphnia magna*, Goldorfe und Ratte. n = Anzahl der Befunde. LR = lineare Korrelation. RK = Rangkorrelation. ** = $p \leq 0,01$.

Test	n =	Höhe der Korrelationskoeffizienten	Test
MTT	10	LR <--0,93**----->	D. magna
	10	RK <--0,90**----->	
	9	LR <--0,92**----->	Goldorfe
	9	RK <--0,85**----->	
	10	LR <--0,85**----->	Ratte
	10	RK <--0,83**----->	
D. magna	29	LR <--0,93**----->	Goldorfe
	29	RK <--0,47**----->	
	32	LR <--0,89**----->	Ratte
	32	RK <--0,49**----->	
Goldorfe	31	LR <--0,56**----->	Ratte
	31	RK <--0,45**----->	

D. magna, die Goldorfe und die Ratte nachteilig wirken. Hohe Übereinstimmungen werden auch zwischen *Daphnia* und Goldorfe sowie *Daphnia* und Ratte in der linearen Regression angezeigt, hingegen ist die Rangkorrelation mit einem deutlich niedrigeren Korrelationskoeffizienten versehen. Die Übereinstimmungen zwischen den Befunden an Goldorfe und Ratte liegen bei $r = 0,5$ ($p < 0,01$).

3. 4 Vergleich der Befunde im Microtox(R)-Test mit den MAK-Werten

Einen anderen Ansatzpunkt zum Vergleich der eigenen Befunde mit für luftgetragene Stoffe relevanten Werten bietet die MAK-Wert-Liste (30). Die maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK-Wert) von Gasen, Dämpfen und flüchtigen Schwebstoffen kennzeichnet diejenige Konzentration, bei der während der 8 h Exposition eines normalen Arbeitstages keine nachteiligen Wirkungen auf den Organismus des

Arbeitenden zu erwarten sind. Obwohl MAK-Werte und EC50-Werte auf grundsätzlich verschiedenen Wegen erarbeitet worden sind, und auch die Ergebnisse quantitativ stark voneinander abweichen, erscheint ein Rangvergleich sinnvoll möglich. In Tabelle 4 sind die bei der Untersuchung von 6 Prüfsubstanzen mit dem MTT erhaltenen EC50-Werte den maximal zulässigen Arbeitsplatzkonzentrationen dieser Stoffe in Luft gegenübergestellt. Zur Erleichterung des Vergleichs von Befunden aus Wasser und aus Luft wurde die Einheit mol benutzt.

Bei dem Vergleich zwischen den im Wasser erhobenen Befunden und den Werten aus der MAK-Liste sind folgende Einschränkungen zu bedenken. Die mit dem MTT, dem BMK oder einem anderen Prüfverfahren erhaltenen Befunde kennzeichnen diejenige Konzentration der eingesetzten Prüfsubstanz, die unter den definierten Versuchs- und Auswertbedingungen eine bestimmte, quantitativ bewertete Wirkung am Testorganismus hervorruft. Der MAK-Wert wird dagegen von einer Sachverständigen-Kommission auf der Basis der vorliegenden

Tab. 4: Vergleich der Microtox(R)-Test-Befunde EC50(15min) mit der maximalen Arbeitsplatzkonzentration (MAK-Wert) für 6 Prüfsubstanzen

Prüfsubstanzen	Microtox(R)-Test ^a		MAK-Werte ^b	
	EC50(15min)			
	Wasser mmol/l	Rang	Konzentrationen in Luft µmol/l	Rang
Aceton	258,4	6	41,3	6
Butanol	31,9	5	4,1	5
Dimethylamin	14,2	4	0,4	4
Formaldehyd	0,25	2	0,04	1
m-Kresol	0,07	1	0,2	2,5
Phenol	0,46	3	0,2	2,5

a (5)

b (37)

Kenntnisse auf dem Wege der einvernehmlichen Übereinkunft unter Berücksichtigung eines angemessenen Sicherheitszuschlages festgelegt. Der MAK-Wert berücksichtigt nicht nur die akute Wirkung, sondern auch chronische Wirkungen und Akkumulierungen.

Zu sechs der hier untersuchten Substanzen finden sich Angaben in der MAK-Wert-Liste. Aber nur für die Grenzwerte der Substanzen Aceton und Formaldehyd (37) sowie neuerdings auch für Ammoniak (38) liegt eine von der Kommission erstellte Begründung vor. Für Dimethylamin könnten hilfsweise wegen der engen chemischen Verwandtschaft die Begründungen für Methylamin und Trimethylamin herangezogen werden. Der derzeitige MAK-Wert von 10 ppm für Methylamin gilt aber als unzureichend begründet (39), und der Vorschlag für Trimethylamin von 1 ppm scheint wesentlich an der Geruchsbelästigung orientiert zu sein (40).

Für die Festlegung von MAK-Werten ist nicht immer die niedrigste Konzentration, bei der gerade eine Wirkung beobachtet werden kann, maßgebend. So wird ein MAK-Wert von 1000 ml/m³ für Aceton als vertretbar angesehen, obwohl Schleimhautreizungen bei dieser Konzentration nicht ausgeschlossen werden können. Die Festlegung der MAK-Werte erfolgt somit nicht nach einheitlichen Kriterien, wodurch ein Vergleich mit anderen Methoden zusätzlich erschwert wird.

Die Beziehung zwischen den Rangplätzen der an Bakterien im MTT erhaltenen Befunde und den entsprechenden MAK-Werten weist einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,900$ ($p < 0,05$) auf. Werden die Prüfsubstanzen nach ihrer Wirksamkeit geordnet, so zeigt sich, daß Formaldehyd, m-Kresol und Phenol zu den wirksamen Stoffen zählen, während Dimethylamin nur mäßig und Butanol und Aceton nur gering wirksam sind.

Die gute Korrelation zwischen MTT-Befunden und MAK-Werten kann aber auch vom Charakter der Stoffe mitbestimmt werden. Alle 5 Prüfsubstanzen haben ähnliche allgemein wirkende Eigenschaften. Ihre Wirkung auf Bakterien beruht wesentlich auf der Membranaktivität und der Fähigkeit zur Eiweißdenaturierung. Spezifisch wirkende

Substanzen wie z.B. Herbizide werden eine ungleich stärkere Wirkung auf Algen als auf Bakterien oder Fische haben. Für die Prüfung bekannter Stoffe ist daher die Zusammenfassung in chemisch verwandten Gruppen durchaus sinnvoll, wie dies bei der Wirkungsabschätzung mit struktur-wirkungs-analytischen Methoden auch geschieht.

4. Diskussion

Die beiden in der Untersuchung benutzten Prüfsysteme MTT und BMK erweisen sich als in der Rangfolge vergleichbar empfindlich, obwohl erhebliche stoffspezifische Unterschiede beobachtet werden. Dies ist vermutlich nicht nur auf die unterschiedliche Technik, sondern auch auf die Verwendung unterschiedlicher Testorganismen zurückzuführen (23),(28). Wegen seiner raschen Durchführbarkeit erscheint der Microtox(R)-Test für Screening-Zwecke besonders geeignet. Daneben verdient meines Erachtens die Mikrokolorimetrie aufgrund der hohen Empfindlichkeit und der direkt von der Wärmeabgabe (Energienstoffwechsel) der Testbakterien abgeleiteten Aussage künftig mehr Beachtung.

Hinsichtlich der Frage, inwieweit bakterielle Testsysteme einen Beitrag zur Einschätzung der Belastung auch höher organisierter Organismen durch nachteilige Stoffe zu leisten vermögen, kann auf Grund der Korrelationskoeffizientenvergleiche festgestellt werden, daß die bakteriellen Prüfsysteme sowohl mit *Daphnia magna* als auch mit der Goldorfe und der Ratte hochsignifikante Beziehungen aufweisen. Die bei der geringen Zahl von Prüfsubstanzen aus den eigenen Untersuchungen erhaltene Tendenz (Tabelle 2) wird durch die erweiterte Untersuchung (Tabelle 3) bestätigt. Die Vergleiche zeigen, daß es möglich ist, bei der Frage nach der biologischen Wirkung von Prüfsubstanzen auf Tiere, sich durch einfache Testsysteme, zum Beispiel solche, die mit Bakterien arbeiten, im Sinne eines "Screening" ein orientierendes Bild über die Rangfolge und über die Größenordnung der wirksamen Stoffkonzentration zu verschaffen. Die Befunde stützen in ihrer Tendenz die Ansicht von BERKOWITZ (41), daß die grundsätzlichen, lebenserhaltenden biochemischen Prozesse bei höheren und

niederen Organismen gleich sind, und daß die nachteiligen Substanzen in ähnlicher Weise in diese Prozesse eingreifen. So ist es verständlich, daß z.B. aquatische Organismen auch für Säuger und auch für den Menschen als Modelle hilfreich sein können (42).

Die Tabellen 2 und 3 zeigen darüberhinaus jedoch auch, daß nicht alle Prüfverfahren in gleicher Weise gegenüber nachteiligen Stoffen reagieren. Diese Streubreite der Befunde bestärkt den in der Literatur gemachten Vorschlag, daß es sinnvoll ist, zwei oder besser mehrere Kurzzeittests mit verschiedenen Testorganismen im Sinne einer *Testbatterie* (21),(43),(44) einzusetzen, mit der die potentiell nachteiligen Stoffe sicherer hinsichtlich ihrer Belastung/Gefährdung für andere Lebewesen eingeschätzt werden können.

Das Beispiel des Vergleichs der MTT-Befunde mit den MAK-Werten zeigt, daß auch solche Vergleiche vorurteilsfrei gesucht werden sollten. Es erweist sich hier ein Mangel an hinreichend erprobten Methoden, mit denen die Wirkung luftgetragener Stoffe auf Bakterien direkt dargestellt werden kann (45),(19). Möglicherweise bieten Oberflächenkulturen von *P. phosphoreum* künftig eine Chance, die Wirkung luftgetragener Stoffe anhand der Biolumineszenz direkt zu beurteilen (46).

Bakterielle Prüfsysteme sind sicherlich derzeit nicht in allen Bereichen gleichermaßen einsetzbar. Sie bieten sich vor allem in solchen Fällen an, in denen die akute Wirkung hoher Stoffdosen auf lebende Strukturen untersucht werden soll. Der Versuch am Tier könnte dann auf die unumgängliche Prüfung der Wirkung niedriger Dosen beschränkt bleiben und die Verwendung von Versuchstieren auf diese Weise vermindert werden. Unbestritten ist, daß für die akute Toxizitätsprüfung im Kurzzeittest bakterielle Prüfsysteme gegenüber der Wirkungsprüfung direkt am Tier folgende Vorteile haben:

1. Sie sind einfacher und besser standardisierbar.
2. Sie sind nur von einer begrenzten Zahl von Sekundärfaktoren abhängig; störende Interaktionen mit dem Gesamtorganismus werden vermieden.
3. Sie erfordern einen geringen materiellen Aufwand.
4. Sie sind rasch durchführbar.
5. Sie verursachen gegenüber dem herkömmlichen Tiermodell keine Schmerzen und Leiden für das Untersuchungsobjekt.

Die vorgestellten Untersuchungen mit den beiden Bakterientests lassen erkennen, daß solche Testansätze - trotz einer Reihe von Einschränkungen und Bedenken - zur Abschätzung der akuten Toxizität von Stoffen geeignet sind und Hinweise auch für höher entwickelte Organismen geben können. Dies trifft zumindest für die begrenzte Zahl der hier geprüften Stoffe zu. Dieser ermutigende Ansatz sollte künftig nachdrücklicher als bisher verfolgt werden.

5. Literaturverzeichnis

- (1) DRAGGAN, S. u. J.M. GIDDINGS (1978): Testing toxic substances for protection of the environment. *Sci. Total Environm.* 9, 63-74
- (2) SCHMIDT-BLEEK, F. u. P. WAGENKNECHT (1979): Das Problem der Umweltschadstoffe vor der Verabschiedung eines Chemikaliengesetzes in der Bundesrepublik Deutschland. *Chemosphere* 8, 583-721
- (3) BA, R., P. GÜNZEL, D. HENSCHLER, J. KÖNIG et al. (1983): LD50 im Vergleich zur akuten Toxizität. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 33, 81-83
- (4) LENZ, P.M. (1988): Entwicklung eines bakteriellen Toxizitätstests zur Abschätzung der akuten Toxizität von Umweltkontaminanten. *Diss. nat. Hohenheim*
- (5) HARTUNG, J. (1988): Zur Einschätzung der biologischen Wirkung von Spurengasen der Stallluft mit Hilfe von zwei bakteriellen Kurzzeittests. *VDI Verlag, Reihe 15, Nr. 56, 192 S.*
- (6) BRINGMANN, G., u. R. KÜHN (1980): Comparison of the toxicity thresholds of water pollutants to bacteria, algae, and protozoa in the cell multiplication inhibition test. *Water Res.* 14, 231-241

- (7) TREVORS, J.T. (1986): Bacterial growth and activity as indicators of toxicity. In: G. BITTON u. B.J. DUTKA (Hrsg.): Toxicity testing using microorganisms, Vol. I. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, S. 9-25
- (8) ROBRA, K.H. (1976): Bewertung toxischer Wasserinhaltsstoffe aus ihrer Inhibitwirkung auf die Substratoxydation von *Pseudomonas* Stamm Berlin mit Hilfe polarographischer Sauerstoffmessungen. gwf-wasser/abwasser 117, 80-86
- (9) KREBS, F. (1983): Toxizitätstest mit gefriergetrockneten Leuchtbakterien Gewässerschutz, Wasser, Abwasser. 63, 173-230
- (10) KING, E.F. u. B.J. DUTKA (1986): Respirometric techniques. In: G. BITTON u. B.J. DUTKA (Hrsg.): Toxicity testing using microorganisms, Vol. I. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, S. 75-113
- (11) BENECKE, G. (1980): Entwicklung eines biologischen Schnelltestverfahrens zur Signalisierung algentoxischer Substanzen unter besonderer Berücksichtigung von Herbiziden und Darstellung von gewässerrelevanten Einsatzmöglichkeiten des Verfahrens. Institut für Wasserforschung GmbH Dortmund und der Hydrolog. Abteilung der Dortmunder Stadtwerke AG, Nr. 33, 326 S.
- (12) GOATCHER, L.J., A.A. QURESHI u. I.D. GAUDET (1984): Evaluation and refinement of the Spirillum volutans test for use in toxicity screening. In: D. LIU u. B.J. DUTKA (Hrsg.): Toxicity screening procedures using bacterial systems. Marcel Dekker, New York, Basel, S. 89-108
- (13) BITTON, G., u. B.J. DUTKA (1986): Toxicity testing using microorganisms, Volume I. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA
- (14) WADSÖ, I. (1986): Bio-calorimetry. Trends Biotech. 4, 45-51
- (15) LAMPRECHT, I., u. B. SCHAARSCHMIDT (1977): Application of calorimetry in life sciences. Walter de Gruyter, Berlin
- (16) BEEZER, A.E. (1980): Biological Microcalorimetry. Academic Press, London, New York
- (17) JOLICOEUR, C., u. A. BEAUBIEN (1986): Microcalorimetric studies of microbial metabolism and inhibition: Bases for in vitro toxicity evaluation. In: G. BITTON u. B.J. DUTKA (Hrsg.): Toxicity Testing using Microorganisms, Vol. I. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, S. 115-151
- (18) HARTUNG, I. (1986): Zur Einschätzung der biologischen Wirkung nachteiliger Stoffe auf *E. coli* mit der Flow-Mikrokalorimetrie. I. Flow-mikrokalorimetrische Testsysteme mit Mikroorganismen für Antibiotika und Chemikalien. Zbl.Bakt.Hyg.B 183, 36-46
- (19) BULICH, A.A. (1986): Bioluminescence assay. In: G. BITTON u. B.J. DUTKA (Hrsg.): Toxicity testing using microorganisms, Vol. I. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, S. 57-74
- (20) BECKMAN (1980): Microtox Model 2055 Toxicity Analyzer System. Beckman Instruments Inc., Carlsbad, Calif. U.S., Bulletin 6984
- (21) DUTKA B.J., u. K.K. KWAN (1982): Application of four bacterial screening procedures to assess changes in the toxicity of chemicals in mixtures. Environm. Pollut. (Series A) 29, 125-134
- (22) QURESHI, A.A., K.W. FLOOD, S.R. THOMPSON et al. (1982): Comparison of a luminescent bacterial test with other bio- assays for determining toxicity of pure compounds and complex effluents. In: J.G. PEARSON, R.B. FOSTER u. W.E. BISHOP (Hrsg.): Aquatic toxicology and hazard assessment: Fifth

- Conference. ASTM STP 766. Amer. Soc. Test. and Mat., Philadelphia, Pa., S. 179-195
- (23) DUTKA, B. J., u. K. K. KWAN (1984): Studies on a synthetic activated sludge toxicity screening procedure with comparison to three microbial toxicity tests. In: D. LIU u. B. J. DUTKA (Hrsg.): Toxicity screening procedures using bacterial systems. Marcel Dekker, New York, Basel, S. 125-138
 - (24) DUTKA, B.J., N. NYHOLM u. J. PETERSEN (1983): Comparison of several microbiol. toxicity screening tests. Water Res. 17, 1363-1368
 - (25) COLEMAN, R.N., u. A.A. QURESHI (1985): Microtox(R) and *Spirillum volutans* tests for assessing toxicity of environmental samples. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 35, 443-451
 - (26) BULICH, A. A. (1984): Microtox - a bacterial toxicity test with several environmental applications. In: D. LIU u. B. J. DUTKA (Hrsg.): Toxicity screening procedures using bacterial systems. Marcel Dekker, New York, Basel, S. 55-64
 - (27) MALLAK, FP, u. R.L. BRUNKER (1984): Determination of the toxicity of selected metalworking fluid preservatives by use of the microtox system and an in vitro enzyme assay. In: D. LIU u. B.J. DUTKA (Hrsg.): Toxicity screening procedures using bacterial systems. Marcel Dekker, New York, Basel, S. 65-76
 - (28) McFETERS, G.A., P.J. BOND, S.B. OLSON u. YI. TSCHAN (1983): A comparison of microbial bioassays for the detection of aquatic toxicants. Water Res. 17, 1757-1762
 - (29) INDORATO, A.M., K.B. SNYDER u. P.J. USINOWICZ (1984): Toxicity screening using Microtox(R) analyzer. In: D. LIU u. B.J. DUTKA (Hrsg.): Toxicity screening procedures using bacterial systems. Marcel Dekker, New York, S. 37-53
 - (30) Deutsche Forschungsgemeinschaft/DFG (1986): Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen/MAK-Werte und biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Mitteilung der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe; 22. Deutsche Forschungsgemeinschaft/DFG, Bonn Verlag Chemie, Weinheim
 - (31) LEE, W.H., u. H. RIEMANN (1971): The inhibition and destruction of Enterobacteriaceae of pathogenic and public health significance. In: W.B. HUGO (Hrsg.): Inhibition and destruction of the microbial cell. Academic Press, London, New York, S. 399-418
 - (32) ALTHAUS, H. (1976): Wirkungskonzentration (gesundheits-) schädigender bzw. toxischer Stoffe in Wasser für Niedere Wasserorganismen sowie kalt und warmblütige Wirbeltiere einschlie ßlich des Menschen bei oraler Aufnahme des Wassers oder Kontakt mit dem Wasser. Bericht des Hygiene-Instituts des Ruhrgebiets, Gelsenkirchen, Januar 1976.
 - (33) KREBS, F (1985): Ökotoxikologische Bewertung von Abwässern und Umweltchemikalien. Forschungsbericht (Vorhaben 102 05 115). Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz
 - (34) LEBACK, M.E., A.D. ANDERSON, G.M. DeGRAEVE et al. (1981): Comparison of bacterial luminescence and fish bioassay for fossil-fuel process waters and phenolic constituents. In: D.R. BRANSON u. K.L. DICKSON (Hrsg.): Aquatic toxicology and hazard assessment: Fourth Conference, ASTM STP 737. Amer. Soc. Test. and Mat., Philadelphia, Pa., S. 348-356

- (35) CURTIS, C., A. LIMA, S.I. LOZANO u. G.D. VEITH (1982): Evaluation of a bacterial bioluminescence bioassay as a method for predicting acute toxicity of organic chemicals to fish. In: J.G. PEARSON, R.B. FOSTER (Hrsg.): Aquatic toxicology and hazard assessment: 5th Conf. ASTM STP 766. Amer. Soc. Test. and Mat., Philadelphia, Pa., S. 170-178
- (36) PARKER, C.E., u. J. PRIBYL, jr. (1984): Assessment of bacterial ATP response as a measurement of aquatic toxicity. In: D. LIU u. B.J. DUTKA (Hrsg.): Toxicity screening procedures using bacterial systems. Marcel Dekker, New York, Basel, S. 283-293
- (37) HENSCHLER, D. (1971): Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. Aceton und Formaldehyd. Verlag Chemie, Weinheim
- (38) HENSCHLER, D. (1986): Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. Ammoniak. Verlag Chemie, Weinheim
- (39) HENSCHLER, D. (1984): Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. Methyamin. Verlag Chemie, Weinheim
- (40) HENSCHLER, D. (1983): Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. Trimethylamin. Verlag Chemie, Weinheim
- (41) BERKOWITZ, D. (1979): Potential uses of bacterial in toxicology. Vet. Human Toxicol. 21, 422-426
- (42) COUCH, J.A. (1982): Aquatic animals as indicators of environmental exposures. J. Environ. Sci. Health, A17(4), 473-476
- (43) CAIRNS, J. (1984 a): Are single species toxicity tests alone adequate for estimating environmental hazard? Environ. Monitoring Assess. 4, 259-273
- (44) DE ZWART, u. W. SLOOFF (1983): The microtox as an alternative assay in the acute toxicity assessment of water pollutants. Aquatic Toxicol. 4, 129-138
- (45) DRUETT, H.A., u. K.R. MAY (1968): Unstable germicidal pollutant in rural air. Nature 220, 395-396
- (46) HARTUNG, J. (1989): Prüfung von luftverunreinigenden Stoffen mit Hilfe von Leuchtbakterien. In: 18. Kongr.Dtsch.Vetmed.Ges.(DVG), Bad Nauheim, Ber. p. 381-389
- (47) BRINGMANN, G., u. R. KÜHN (1982): Ergebnisse der Schädigung wassergefährdender Stoffe gegen Daphnia magna in einem weiterentwickelten standardisierten Testverfahren. Z. Wasser Abwasser Forsch. 15, 1-6
- (48) JUHNKE, I., u. D. LÜDEMANN (1978): Ergebnisse der Untersuchung von 200 chemischen Verbindungen auf akute Fischtoxizität im Goldorfentest. Z. Wasser Abwasser Forsch. 11, 161-164
- (49) HOMMEL, G. (1987): Handbuch der gefährlichen Güter. Springer Verlag Berlin, New York, 6. u. 7. Lieferung
- (50) National Inst. for Occupat. Safety and Health/NIOSH (1978): Registry of Toxic Effects of Chemical Substances. 4676 Columbia Park Way Cincinnati, Ohio 45226

WART, PETER – ICH TESTE RASCH,
OB DIR REINGEHEN KÖNNEN...

