

Letale Konzentration von Giften

Einleitung

Neben Giften wirken fast alle Umweltfaktoren letal, wenn sie die Pessima der Toleranzkurven erreichen. Diejenige Dosis des Toxins bzw. Umweltfaktors, bei dem 50% aller Organismen absterben, nennt man mittlere letale Dosis LD₅₀. Die LD₇₅ und LD₉₉ kennzeichnen weitere tödliche Dosen. Entsprechend wird eine 100%ige (absolute) Abtötung als LD₁₀₀ bezeichnet. Die Angabe der Dosis ist vor allem hinsichtlich von Strahlungseinwirkungen angebracht, weil sie den Zeitraum der Einwirkung sowie die Körpermasse des Target-Organismus mit berücksichtigen. Üblich sind ferner konkretere Angaben, wie LT für abtötende Temperaturen oder LC für Konzentrationsangaben. Letztere bezeichnen diejenige Toxinkonzentration, die in der Umgebung der Organismen vorhanden ist und zu einem entsprechenden Absterben der Population führt. Dabei wird von einer kontinuierlichen Präsenz des Toxins ausgegangen und die Körpermasse des Targets nicht berücksichtigt.

Die LC von Toxinen ist abhängig von der akuten Toxizität (Giftigkeit), der Resistenz der Organismen bzw. aller seiner Entwicklungsformen und –stadien sowie weiteren (schädlichen) Umweltfaktoren. Löslichkeit bzw. Verfügbarkeit des Toxins (Absorptionsverhalten, Chelatierung, Mobilisierung) beeinflussen die die vom Organismus aufgenommene Dosis, deren Transport in der Zelle bzw. durch Gewebe und damit letztendlich die Dosis am Wirkungsort (Bei Arzneimitteln würde das unter dem Begriff der Pharmakokinetik zusammengefasst werden.). Deshalb muss die Auswahl der Testbedingungen und Target-Organismen sorgfältig erfolgen, die Übertragbarkeit auf andere Organismen genau geprüft sowie die Verfügbarkeit in der Umwelt ("Umwelttoxizität") genau ermittelt werden.

Eine wichtige technische Frage in diesem Zusammenhang ist die nach dem Parameter der Schädigung. Bei Mikroorganismen wird sehr häufig die Inhibition der Zellteilung (Vermehrungshemmung) als Maß der Letalität eingesetzt. Für größere langlebige Organismen mit ohnehin geringer Reproduktionsrate ist das jedoch ungeeignet. Deshalb wird hier auf spezifische Toxizität gegenüber bestimmten Organen, Organellen oder Funktionen ausgewichen, z. B. die Lebertoxizität, die entweder an Zelllinien oder über die Ausschüttung von Leberenzymen gemessen wird, oder die Schädigung des Photosyntheseapparates bei Pflanzen, die über die maximale Quantenausbeute des Photosystems II oder über Gaswechselaktivitäten (z. B. Sauerstoffproduktionsraten) bestimmt werden. Die Beweglichkeit von Spermien, anderen begeißelten Stadien oder Organismen ist ebenfalls ein geeignetes Toxizitätskriterium.

Toxische Substanzen werden auch mit dem Ziel ausgebracht, hemmend oder tötend auf bestimmte Organismen zu wirken, wobei neben der Persistenz in der Umwelt auch deren Spezifität für die Targetorganismen wichtiges Optimierungsziel sind. Diese Biozide unterscheiden sich vor allem hinsichtlich ihrer Wirkungsweise, Applikationsform und der Nachhaltigkeit der Wirkung (Tab. 1). Im Gegensatz zu Mikrobiziden, die innerhalb von 4 h >99% der Keime abgetötet haben müssen, hemmen Mikrobistatika nur deren Wachstum.

Tab. 1. Auswahl von für Mikroorganismen toxischen Substanzen und ihrer Wirkweise

| Stoffgruppe | Wirkmechanismus | Targets | Nachhaltigkeit |
|-------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| <i>Desinfektionsmittel</i> | | | |
| Aldehyde (Formaldehyd) | Protein denaturierend | Mikroorganismen | kurz bis mittelfristig |
| Quaternäre Ammoniumverbindungen (Benzalkoniumchlorid) | Protein denaturierend | Mikroorganismen | kurzfristig |
| Jod | oxidativ | Mikroorganismen incl. | sehr kurzfristig, |

| | | | |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------|
| | | Viren und Protisten | oberflächlich |
| Wasserstoffperoxid | oxidativ | Mikroorganismen | sehr kurzfristig, oberflächlich |
| <i>Mikrobizide</i> | | | |
| Atrazin | hemmt Photosynthese am D1 Protein | Phototrophe | mittel bis lang |
| Diuron (DCMU) | unterbricht Elektronentransport von PSI zu PSII | Phototrophe | mittel bis lang |
| Cu ²⁺ , SO ₂ | Enzymgifte | v.a. Pilze | langfristig |
| Isothiazolin | nucleophil, hemmt zahlreiche Enzyme vor allem im Zitratzyklus | Mikroorganismen | eher langfristig |
| <i>Mikrobistatika</i> | | | |
| Azole | Zellwandsynthese | Pilze | nur bei anhaltender Einwirkung |
| die ganzen Pilzmittel | Spindelbildung | Pilze | |
| viele Antibiotika (Tetracycline, Makrolide) | Translationshemmer | Bakterien | |

Dosis-Wirkungskurven beschreiben die Toxizität mathematisch und erlauben die Ableitung der oben genannten Konzentrationen bzw. Dosen. Sie haben einen sigmoidalen Kurvenverlauf in der halblogarithmischen Darstellung (halblogarithmisch bedeutet, dass nur x-Achse logarithmisch dargestellt wird). Um Dosis-Wirkungskurven zu berechnen, werden die Daten einer nicht-linearen Regression unterzogen. Es gibt verschiedene Funktionen, die die Dosis-Wirkungskurven beschreiben, z. B. das hier verwendete Hill-Modell.

Aufgaben

1 Herstellung einer geometrischen Toxinverdünnungsreihe

- Maximal 4 Student(inn)en bilden eine Gruppe. Maximal 4 Gruppen je Versuch (=16 Personen).
- Jede Gruppe bekommt ein Gift. Jeder Student setzt sich seine eigenen Proben an und wertet sie aus.
- Verdünnung der Stammlösung in geometrischer Reihe.
- Bewertung der Reproduzierbarkeit der LC₅₀.

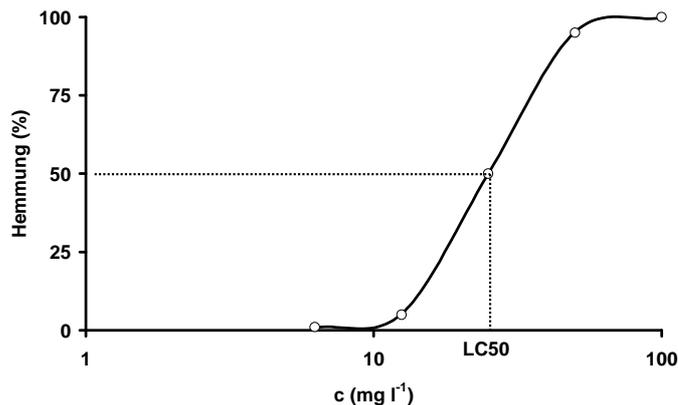
2 Inokulation und Inkubation der Protisten

- Targetorganismen sind (phototrophe) Protisten.
 - der Dinoflagellat *Amphidinium*,
 - die Cryptophyceae *Rhodomonas salina*,
 - die Prymnesiophyceae *Pavlova lutheri*.
 - u.a.
- Inkubation in allen Wirkkonzentrationen unter Standardbedingungen (Raumtemperatur).

3 Bewertung des toxischen Einflusses

- Testparameter ist die Schwimmfähigkeit.
- Berechnung und Darstellung der LC₅₀.

Durchführung



1 Herstellung einer geometrischen Toxinverdünnungsreihe

- Notieren Sie Namen und Konzentration des zugeteilten Giftes.
 - Formaldehyd
 - Wasserstoffperoxid
 - Diuron (DCMU)
 - CuSO₄
 - u.a.

2 Inokulation der Protisten

- Zunächst bestimmen Sie den Anteil unbeweglicher Zellen in gifffreiem Medium c_{StufeK} (0,2 Medium + 0,2 ml Protistensuspension).
- Stufe 1 ist die Stammlösung (0,2 ml), zu der später 0,2 ml Protistensuspension pipettiert wird.
- Inokulation von 0,2 ml Suspension Kultur in jeweils 0,2 ml der unterschiedlichen Wirkkonzentrationen. Mit der kleinsten Wirkkonzentration (Stufe 7) beginnen.
- Nach jeweils 1 min Einwirkzeit einen Tropfen Zellsuspension entnehmen, auf einen Objektträger tropfen, mit Deckglas abdecken.
- Bei 100-200x Vergrößerung so schnell wie möglich den Anteil schwimmunfähiger Zellen auszählen. Gesamtanzahl aller Zellen ca. 100.
- Die nächste Stufe inokulieren und auswerten. Achtung: ggf. verschachtelt arbeiten! Während die erste Stufe ausgezählt wird, inkubieren die nächsten Organismen in der jeweils nächst höheren Wirkkonzentration.
- Berechnung der jeweiligen Wirkkonzentrationen $c_{\text{Wirkkonzx}}$ mit x von Stufe 1 (!) bis Stufe 6 (Gleichung A einsetzen, umstellen und ausrechnen). Da in der Protistensuspension vor der Mischung kein Gift enthalten ist, ist $c_{\text{protist}}=0$.

$$(A) \quad c_{\text{Stufex}} \cdot V_{\text{Stufex}} + c_{\text{Protist}} \cdot V_{\text{Protist}} = c_{\text{Wirkkonzx}} \cdot (V_{\text{Stufex}} + V_{\text{Protist}})$$

3 Auswertung

- Erstellen eines x-y-Diagramms (Abb. 1) mit dem Anteil unbeweglicher Zellen in Abhängigkeit von der Wirkkonzentration (in logarithmischer Skalierung).
- Die Wirkung derjenigen Giftkonzentration, die mit 3 Replikaten bestimmt wurde, mit der Standardabweichung als Fehlerbalken versehen.
- Die Kurvenberechnung erfolgt für 3 Wirkkonzentrationen und die Kontrolle mit dem direkten (Einfach)messwert sowie dem Mittelwert der replizierten Messung.
- Einzeichnen einer Nährungskurve mit einer Kurvenschablone. Abschätzen der LC 50 durch senkrechte Projektion der mittleren Hemmung (50%) auf die x-Achse (Konzentration).

Abb. 1. Hemmung (%) in Abhängigkeit von der Wirkkonzentration (mg l⁻¹). Gestrichelte Linie: Projektion der mittleren Hemmung auf die mittlere Hemmkonzentration LC₅₀.

Zusatzaufgabe für Interessierte:

- Einzeichnen einer Nährungskurve nach iterativer Optimierung.
- Dafür die Tabelle 1 erstellen. Einheiten immer beschriften. Sinnvolle selbsterklärende Abkürzungen wählen!

Tabelle 1 in Excel mit Beispielrechnung

| | A | B | C | D |
|----|-------------------------------|----------------------------------------|----------------------|--------------------------|
| 1 | c_{Wirkkon} z_x | gemessener Anteil unbeweglicher Zellen | Inhibition / Hemmung | Abweichungsquadrate (AQ) |
| 2 | $mg\ l^{-1}$ | % | % | |
| 3 | 6,25 | 1 | Gleichung (C) | Gleichung (E) |
| 4 | 12,5 | 5 | Gleichung (C) | Gleichung (E) |
| 5 | 25 | 50 | Gleichung (C) | Gleichung (E) |
| 6 | 50 | 95 | Gleichung (C) | Gleichung (E) |
| 7 | 100 | 100 | Gleichung (C) | Gleichung (E) |
| 8 | | | | |
| 9 | LC₅₀ | 25 | Summe (SAQ) | Gleichung (F) |
| 10 | H | 4 | | |
| 11 | □ | +B3 | | |
| 12 | □ | +B7 | | |

- In Zelle B11 steht zunächst die minimale Hemmung aus B3.
- In Zelle B12 die maximale Hemmung aus B7 übernehmen.

$$(B) \quad \text{Hemmung} = \delta + \frac{(\alpha - \delta) c^H}{LC_{50}^H + c^H} \quad \square \text{ minimale Hemmung (0\%)}$$

□ maximale Hemmung (100%)
 LC₅₀ mittlere letale Konzentration (50%)
 H Hill-Faktor (Anstieg der Kurve)
 c Toxinkonzentration
 Hemmung (%)

- Umgeschrieben in eine Excelformel sieht die Gleichung für Zelle C3 wie folgt aus (C). Gleichung in C4 bis C7 kopieren.

$$(C) = B\$11 + ((B\$12 - C\$11) * A3^B\$10) / (B\$9^B\$10 + A3^B\$10)$$

- Die \$-Zeichen dienen dem festen Zellbezug in Excel.
- Dafür wird zunächst eine LC₅₀ geschätzt (25) und ein H (4), ggf. aus der Excelgraphik.
- Dann werden die Abweichungsquadrate von A_m und A_s berechnet (D).

$$(D) \quad \text{AQ} = (A_m - A_s)^2 \quad \text{AQ: Abweichungsquadrat}$$

- In Excel sieht die Gleichung für Zelle D3 wie folgt aus:

$$(E) = (B3 - C3)^2$$

- Die Summe der Abweichungsquadrate in Zelle D9 eintragen:

$$(F) = \text{SUMME}(D3:D7)$$

- Dann mit Hilfe der Excel-Solver-Funktion die geschätzte LC₅₀ optimieren. Nach Auswahl des

Solvers in folgende Positionen ein- bzw. angeben:

- Zielzelle: SAQ (Zelle D9)
- Zielwert: Minimum
- veränderbare Zellen: LC₅₀, H, α und δ (Zellen B9:B12)
- ausführen und Ergebnis annehmen.
- Es ergibt sich folgende neue Tabelle 2:

Tabelle 2 in Excel mit Beispielrechnung

| | A | B | C | D |
|----|------------------------|----------------------------------------|----------------------|--------------------------|
| 1 | C _{Wirkkonz} | gemessener Anteil unbeweglicher Zellen | Inhibition / Hemmung | Abweichungsquadrate (AQ) |
| 2 | mg l ⁻¹ | % | % | |
| 3 | 6,25 | 1 | 0,80 | 0,04 |
| 4 | 12,5 | 5 | 5,24 | 0,06 |
| 5 | 25 | 50 | 49,92 | 0,01 |
| 6 | 50 | 95 | 95,23 | 0,05 |
| 7 | 100 | 100 | 99,81 | 0,04 |
| 8 | | | | |
| 9 | LC₅₀ | 25,1 | Summe (SAQ) | 0,20 |
| 10 | H | 4,3 | | |
| 11 | α | 0,55 | | |
| 12 | δ | 100,1 | | |

- Die berechneten Anteile nun als neuen Wertebereich einfügen und als geglättete Kurve formatieren.
- Lage der Kurve muss zwischen den Messwerten hindurchführen (Werte links und rechts der Kurve).
- LC₅₀ als Ergebnis in das Diagramm einschreiben.
- Ergebnisse aller Gruppen/Studenten vergleichen.

Kontrollaufgaben

1. Beurteilen Sie die Genauigkeit und Verlässlichkeit einer Dreifachmessung!
2. Diskutieren Sie die Eignung des Parameters Schwimmfähigkeit a) aus technischer Sicht (Ist er gut feststellbar? Verändert sich die Anzahl unbeweglicher Zellen mit der Zeit?) und b) hinsichtlich seiner Anzeigefähigkeit der Wirkweise des Giftes!
3. In welcher Einheit sollen die LC₅₀ verglichen werden? Warum?
4. Vergleichen Sie die Toxizität der verschiedenen Wirkstoffe aller Gruppen! Stellen Sie dafür die LC₅₀ gegenüber und werten Sie aus!