

Studiengang Life Technologies

Vertiefungsrichtung Biotechnologie

Diplom 2009

Jacqueline Leuenberger

Hes·so VALAIS
WALLIS

Rte du Rawyl 47 - 1950 Sion 2

*Evaluation von universellen Toxizitätstests
zur Abklärung der „akuten Giftigkeit“
einer unbekannten (ABC)-Verdachtsprobe*

Dozent

BRUNO SCHNYDER

Experte

MARC AVONDET

HES-HEVS (Sion)



EM000006112763

Sitten, 19. August 2009

BT/2009/76



Diplomarbeit
 | 2009 |

Studiengang
Life Technologies

Anwendungsbereich
Biotechnologie

Verantwortliche/r Dozent/in
Werner Arnold
Werner.Arnold@babs.admin.ch
Dr Bruno Schnyder
Bruno.Schnyder@hevs.ch

Partner
LABOR SPIEZ

HES-SO Wallis
 Route du Rawyl 47
 1950 Sitten

Tel. 027 606 85 11
 Web www.hevs.ch

Evaluation von universellen Toxizitätstests zur Abklärung der „akuten Giftigkeit“ einer unbekannten (ABC) – Verdachtsprobe.

Diplomandin Jacqueline Leuenberger

Ziel des Projekts

Drei biologische Toxizitätstests (vom BAG vorgeschlagen) mit vier verschiedenen Testsubstanzen (Atropin, Dichlorvos, Kaliumdichromat und Ricin) evaluieren um einen Test zu finden, der es erlaubt die Toxizität einer Verdachtsprobe systematisch zu überprüfen.

Methoden / Experimente / Resultate

Um die Toxizität der Testsubstanzen zu bestimmen wurde ein Artemien (Krustentiere) Toxtest, ein Leuchtbakterien Toxtest und ein Zytotoxizitätstest mit BALB-Zellen verwendet. Das Prinzip basiert auf der Mortalität oder Leuchthemmung der Testobjekte in Anwesenheit einer toxischen Substanz.

Die Schwierigkeit einen universellen Toxtest zu finden wurde mit dieser Arbeit bewiesen. Mit keinem der drei Tests war es möglich die Toxizität aller vier Testsubstanzen zu bestimmen. Atropin zeigte auf Artemien und BALB-Zellen keine Wirkung. Auf Leuchtbakterien war der EC_{50} -Wert so hoch (8.9 ± 1.1 g/l), dass es als nicht toxisch eingestuft wurde. Für Ricin wurde eine Wirkung mit einem LD_{50} -Wert von 74.6 ± 5.7 ng/ml nur auf BALB Zellen beobachtet. Dagegen wurden mit Dichlorvos und Kaliumdichromat (Chrom VI) mit allen drei Tests ein Effekt festgestellt. Es wurden bei Artemien folgende LD_{50} -Werte berechnet: 174.6 ± 9.2 mg/l beziehungsweise 26.5 ± 6.4 mg/l. Bei Leuchtbakterien wurden EC_{50} -Werte von 55.3 ± 9.3 mg/l beziehungsweise 3.7 ± 1.2 mg/l erreicht. Am empfindlichsten war der Zytotoxizitätstest mit LD_{50} -Werten von 5.3 ± 1.4 µg/ml für Dichlorvos und 113.3 ± 36.9 ng/ml für Chrom VI. Die Intra- und- Inter-Assay Streuungen waren für biologische Tests akzeptabel und zeigten, dass die drei Tests mit guter Laborpraxis gut reproduzierbar und wiederholbar sind.



Inhaltsverzeichnis

1.	ALLGEMEINE EINLEITUNG.....	2
1.1.	DER MENSCH UND TOXINE.....	2
1.2.	« <i>DOSIS SOLA FECIT VENENUM</i> »	3
1.3.	ZIEL DIESER ARBEIT	3
1.4.	EINIGE DEFINITIONEN	4
1.5.	BESCHREIBUNG UND PRINZIP DER TESTE	5
1.5.1.	BIOLOGISCHER TOXTEST MIT ARTOXKIT™	5
1.5.2.	BIOLOGISCHER TOXTEST MIT LEUCHTBAKTERIEN	6
1.5.3.	ZYTOTOXIZITÄT TEST MIT BALB 3T3 Klon 31 Zellen	8
1.6.	DIE TESTSUBSTANZEN UND IHRE EIGENSCHAFTEN	10
1.6.1.	ATROPIN	10
1.6.2.	DICHLORVOS	12
1.6.3.	KALIUMDICHROMAT	14
1.6.4.	RICIN.....	15
2.	GEBRAUCHSMATERIAL UND VERFAHREN	17
2.1.	GEBRAUCHSMATERIAL	17
2.1.1.	BIOLOGISCHER TOXTEST MIT ARTOXKIT™	17
2.1.2.	BIOLOGISCHER TOXTEST MIT LEUCHTBAKTERIEN	17
2.1.3.	ZYTOTOXIZITÄT TEST MIT BALB 3T3 Klon 31 Zellen	18
2.2.	VERFAHREN	20
2.2.1.	BIOLOGISCHER TOXTEST MIT ARTOXKIT™	20
2.2.2.	BIOLOGISCHER TOXTEST MIT LEUCHTBAKTERIEN	24
2.2.3.	ZYTOTOXIZITÄT TEST MIT BALB 3T3 Klon 31 Zellen	29
2.2.4.	STATISTISCHE BEARBEITUNG DER WERTE.....	37
3.	EXPERIMENTELLER TEIL (RESULTATE)	39
3.1.	BIOLOGISCHER TOXTEST MIT ARTOXKIT™	39
3.1.1.	ATROPIN	39
3.1.2.	DICHLORVOS	40
3.1.3.	KALIUMDICHROMAT	42
3.1.4.	RICIN.....	44
3.2.	BIOLOGISCHER TOXTEST MIT LEUCHTBAKTERIEN	45
3.2.1.	ATROPIN	45
3.2.2.	DICHLORVOS	47
3.2.3.	KALIUMDICHROMAT	49
3.2.4.	RICIN.....	51
3.3.	ZYTOTOXIZITÄT TEST MIT BALB 3T3 Klon 31 Zellen	52
3.3.1.	BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN WACHSTUMSRATE UND DER VERDOPPLUNGSZEIT	52
3.3.2.	ATROPIN	53
3.3.3.	DICHLORVOS	54
3.3.4.	KALIUMDICHROMAT	56
3.3.5.	RICIN.....	58
4.	DISKUSSION	61
4.1.	BIOLOGISCHER TOXTEST MIT ARTOXKIT™	61
4.2.	BIOLOGISCHER TOXTEST MIT LEUCHTBAKTERIEN	63
4.3.	ZYTOTOXIZITÄT TEST MIT BALB 3T3 Klon 31 Zellen	65
5.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	67
6.	DANKESWORT	68
7.	LITERATUR	69



1. Allgemeine Einleitung

1.1. Der Mensch und Toxine

In seiner Entwicklungsgeschichte hat der Mensch gelernt die Natur zu beobachten, um seine Lebenschancen zu erhöhen. Dadurch hat er die ersten Pharmakophagie¹ und Pharmakognosie² Phänomene verstanden und dies auch ohne Kenntnis der genauen Wirkmechanismen der Gifte³. Wie einige Tiere hat er gelernt, gefährliche Gifte zu meiden oder sie zu seinem eigenen Nutzen (für die Jagd, als Rausch oder Heilmittel) einzusetzen. So haben einige Indianer Völker aus Kolumbien schon früher Hautsekrete (Steroidalkaloide) von Fröschen der Familie Dendrobatidae ausgenutzt, um Pfeilgifte für die Jagd herzustellen [3]. Das Potential der Gifte hat der Mensch schon längst verstanden, sei es als Heilmittel oder als Schutzwaffe. Unter Schutzwaffe kommt auch ein neuer Begriff ins Spiel und zwar B-Kampfstoffe, denn wie man sich das vorstellen kann sind nicht nur hoch pathogene Bakterien oder Viren potenzielle Kampfstoffe sondern ebenfalls Toxine⁴. Schon 1925 wurden biologische Kampfstoffe durch die Genfer Konvention geächtet. 47 Jahre später wurde sogar die Entwicklung, Herstellung und Lagerung solcher Waffen weltweit verboten [4]. Jedoch haben solche Vereinbarungen nicht verhindert, dass solche Substanzen für terroristische Anschläge verwendet wurden. Während dem zweiten Weltkrieg wurden Forschungen mit Botulinumtoxin durchgeführt, um dieses als Kampfstoff („Agent X“) zu verwenden [5]. 2001 wurden Anthraxanschläge in den USA ausgeführt. Nach dem Golfkrieg wurden im Irak ca. 10 l konzentrierte Ricin-Lösung gefunden. Diese Tatsachen deuten darauf hin, dass Einzeltäter oder kriminelle Gruppen sich durch nationale Gesetze nicht abschrecken lassen. Dadurch dass einige Toxine (z.B. Ricin) in der Regel leicht verfügbar sind und mit geringem technischen „Know-how“ hergestellt werden können, ist es im Grunde einfach einen solchen Kampfstoff zu bekommen. Jedoch wird es schwieriger diesen zu verbreiten, denn die Stabilität der Substanz bleibt eine Frage. Einige biologische Toxine wie Proteine sind sehr empfindlich und können bei ungeeigneten Bedingungen (pH, T°, UV...) schnell inaktiviert werden [4]. Es ist nicht auszuschliessen, dass beim inhalieren ein Toxin hoch toxisch wirkt aber bei oraler Aufnahme dieses keine Wirkung mehr zeigt.

¹ Bezeichnet die vom Nahrungserwerb unabhängige Aufnahme von chemischen Stoffen durch phytophage, also Pflanzen fressende, Insekten. Die aufgenommenen Stoffe dienen dabei vor allem der eigenen Verteidigung gegen Fressfeinde oder der innerartlichen Kommunikation. [1].

² Wissenschaft, welche sich mit Heilmittel aus biologischem Ursprung befasst [1].

³ Gifte bestehen aus chemischen Verbindungen [2].

⁴ Toxine sind natürliche, von lebenden Organismen (Bakterien, Tiere, Pflanzen usw.) produzierte Substanzen [2].



1.2. « *Dosis sola fecit venenum* »

Unter dem Begriff Toxin versteht man eine biogene Substanz welche auch in geringer Menge eine schädigende Wirkung auf andere Organismen ausüben kann. Es ist nicht mit biogenen Giften zu verwechseln. Dieser Begriff beschreibt ein Gemisch aus verschiedenen Substanzen, die in ihrer Gesamtheit eine toxische Wirkung haben [4]. Toxine werden in einer Gruppe umfasst, welche inhomogen ist. Hier findet man nicht nur ein Toxintyp, sondern eine Vielfalt von Molekülen. Es reicht von niedermolekularen Alkaloidtoxinen mit einem Molekulargewicht von weniger als 150 g/mol bis zu Proteintoxinen mit einem Molekulargewicht von über 150'000 g/mol. Toxine werden nach verschiedenen Kriterien eingeteilt, und zwar auf der Basis des produzierenden Organismus (z.B. Bakterien, Pflanzen...), des Wirkungsprinzips (z.B. Neurotoxin, Hepatotoxin) oder aufgrund der chemischen Struktur (z.B. Protein) [4].

Eine Frage lässt sich stellen: Was kann man eigentlich als toxisch betrachten? Wasser oder Kochsalz können in hohen Mengen nämlich fatal sein, also toxisch wirken. Wie Paracelsus (1493-1541) erwähnt hat, *„Alle Dinge sind Gift, und nichts ohne Gift; allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift ist.“* Da die Dosis ein bestimmender Faktor ist, um die Toxizität einer Substanz anzugeben, müssen Tierversuche herangezogen werden. Dieses Verfahren hat natürlich aus ethischen Gründen einen Nachteil, ist jedoch der sicherste Test. Wie in diesem Bericht weiter erklärt wird, ist es schwierig einen sogenannten „universellen“ Test zu finden, da einige Toxine sehr spezifisch wirken. Mit einem ganzen Organismus (z.B. Ratte) ist die Toxizität einer Substanz einfacher nachzuweisen.

1.3. Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin drei biologische Toxtests mit vier verschiedenen Testsubstanzen zu überprüfen und zu evaluieren. Dieses Projekt wurde vom LABOR SPIEZ und vom BAG (Bundesamt für Gesundheit) vorgeschlagen, um die Toxizität einer unbekannten Probe zu bestimmen. Nachdem eine (ABC)-Verdachtsprobe nach Radioaktivität, Sprengstoff und hoch pathogenen Bakterien überprüft wurde, ist es wichtig die Toxizität zu überprüfen, um jeden Verdacht auszuschliessen. Da Toxine von der Struktur aber auch vom Wirkungsmechanismus sehr verschieden sind, ist es leider nicht möglich einen „universellen“ Toxtest anzuwenden.

Um eine grosse Zahl an Toxinen zu testen, wurden zwölf verschiedene Testsubstanzen vom BAG ausgewählt in der Hoffnung, mit einer oder mehreren von den verschiedenen biologischen Toxtests, ca. 80 % der ausgewählten



Substanzen nachzuweisen. Da die Zeit der Arbeit leider nur drei Monate dauert, ist es nicht möglich alle zwölf Testsubstanzen zutesten. Es wurden aus diesem Grund vier verschiedene Substanzen ausgewählt: Atropin, Kaliumdichromat, Dichlorvos und Ricin. Diese Substanzen haben eine gemeinsame Eigenschaft, sie sind toxisch. Sie unterscheiden sich aber von der Struktur, vom Wirkungsmechanismus und von der Toxizität. Diese Unterschiede sind ein entscheidender Faktor für die Anwendung eines Testes. Da einige Substanzen sehr spezifisch an das Testobjekt binden, hat der Metabolismus und Physiognomie des Organismus einen bestimmenden Einfluss. Bei so einem Verfahren kann der Test negativ sein, obwohl die Substanz hoch toxisch ist. Um ein solcher Fehler zu vermeiden, werden in dieser Arbeit drei verschiedene Tests überprüft. Ein Test mit Krustentieren (Artemien), ein Test mit Bakterien (*Vibrio fischeri*) und der letzte Test mit Maus Zellen (BALB/c).

1.4. Einige Definitionen

Wie bereits erwähnt, werden Toxtests durchgeführt um die Toxizität einer Substanz nachzuweisen. In der Literatur wird oft über LD_{50} , EC_{50} oder IC_{50} – Werte geredet. Alle drei Begriffe zeigen eine Wirkung der Testsubstanz auf 50 % der Testobjekte. Sie unterscheiden sich aber vom Effekt auf das Testobjekt. Handelt es sich um ein Organismus (z.B Ratten oder Artemien) redet man von LD (Letal Dosis). Es heisst, welche Stoffmenge, bezogen auf das Körpergewicht, bei der Hälfte einer Versuchstierpopulation zum Tod führt. Unter EC versteht man die Effektkonzentration und ist mehr bei einzeln Zellen (z.B. Bakterien) anwendbar. IC steht für inhibitorische Konzentration und wird meistens für einzelne Zellen angewendet. Wenn man von IC redet, heisst es nicht, dass das Testobjekt tot ist. Es kann zum Beispiel irgendeine Hemmung sein, welche man messen kann oder eine Konzentration, welche 50 % Mortalitätshemmung ausübt.

Bei allen drei Begriffen ist es jedoch wichtig zu wissen, dass sie von einer Spezies zur anderen sehr unterschiedlich sein können. Die Aufnahme des Giftes ist ein wichtiger Hinweis zur Bestimmung der tödlichen Dosis. Ob es inhaliert, injiziert oder oral Aufgenommen, variiert die Dosis [4].



1.5. Beschreibung und Prinzip der Teste

1.5.1. *Biologischer Toxtest mit ARTOXKIT™*

Bei diesem Test handelt es sich um einen nicht standardisierten biologischen Mortalitätstest, in dem die Wirkung einer toxischen Substanz auf einem vollständigen Organismus nach 24 Stunden Inkubation studiert wird. Dies ermöglicht den LD₅₀-Wert zu bestimmen. Dieser Test wird hauptsächlich für Meerwasserproben verwendet, um die akute Toxizität einer Probe zu bestimmen. Als toxische Substanzen findet man sogenannte Biotoxine, welche von Mikroalgen erzeugt werden oder Schadstoffe, welche zum Beispiel von menschlichen Tätigkeiten verursacht werden. Wie erwähnt, wird der Test mit einem Organismus durchgeführt und zwar mit *Artemia salina*. Dieser Primitive Organismus ist klein (200 – 300 µm) und verlangt wenig Aufwand, was ein Vorteil ist gegenüber grösseren Tieren wie zum Beispiel Ratten. Aus ethischen Gründen kann dies ebenfalls ein Vorteil sein. Diese Tierchen leben in Salzseen oder Lagunen und sind überall zu finden. Jedoch ist diese Spezies in Nordamerika am meisten zu finden. Eine Besonderheit von *Artemia* besteht in seiner Fähigkeit bei ungünstigen Bedingungen überleben zu können. Dank einer guten Osmoseregulierung können sie bei schwankenden Salzkonzentrationen trotzdem überleben. Wenn die Lebensbedingungen nicht mehr vorteilhaft sind (Erhöhung des Salzgehalt bei der Verdunstung von Wasser), ist *Artemia salina* fähig Eier, sogenannte Zysten zu bilden, welche nach Rehydratation kleine Larven (Nauplien) geben (**Bild 1**). Diese Eier sind bei extremen Temperaturen (-250 bis 60 °C) sehr widerstandsfähig und können in diesem Zustand jahrelang überleben. Werden sie jedoch benetzt, kann bei optimaler Temperatur (25 – 30 °C) der Metabolismuszyklus für das Ausschlüpfen der Larven anfangen. In den Zysten befindet sich ein Embryo, das bereits 10 Zellteilungen durchlaufen hat und entwicklungsbiologisch im frühen Gastrula-Stadium steht. Eine optimale Voraussetzung für einen solchen Test, ist die Fähigkeit dieser Tierchen zwei bis drei Tage ohne Fütterung zu überleben, dies dank ihrem Nahrungsvorrat im Dottersack [6]. Man findet zwei verschiedene Spezies, welche sich vom Ursprung unterscheiden. Dieser Unterschied ist ein bestimmender Faktor für ihre Zucht im Labor. Je nach Ursprung, muss die Umgebung dieser Tiere angepasst werden. Man findet nämlich zwei verschiedene Salzseen: mit Natriumchlorid oder Natriumsulfat. Während dieser Arbeit werden jedoch Salzsee (Natriumchlorid) Artemien benutzt. Artemien sind ausschliesslich in der Aquakultur als Fischfutter bekannt oder eben als Testtier für Toxtests.

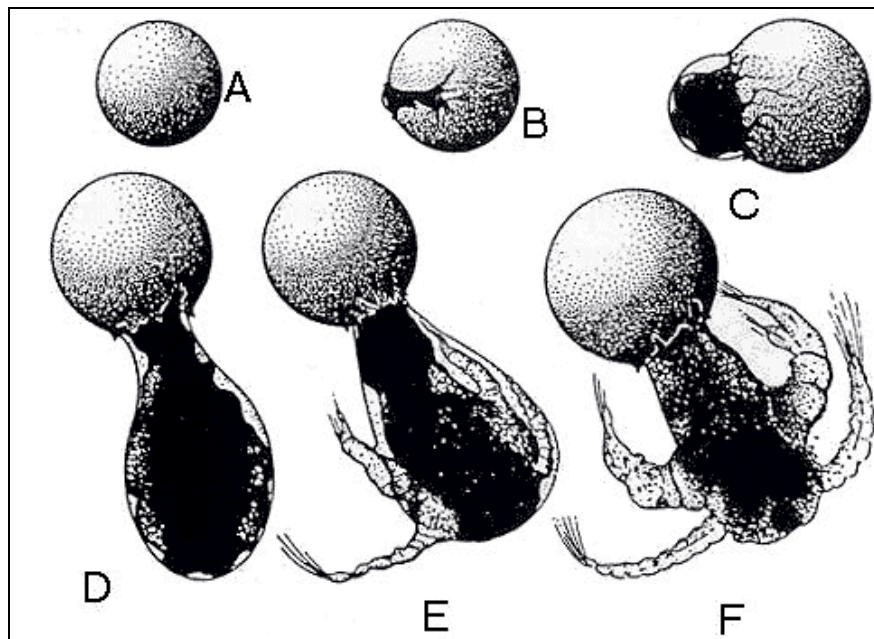


Bild 1: Ausschlüpfen der Nauplie : A und B: Bruch der Zyste. C, D und E: Entwicklung. F: Geburt [7].

1.5.2. Biologischer Toxtest mit Leuchtbakterien

Der Zweite Test wird mit Bakterien (Prokaryoten) durchgeführt. Diese Organismen bestehen aus einer Zelle (Unizellulär), welche weniger komplex sind als Eukaryoten. Da sie keine Glykosilierung und keinen Golgi-Apparat haben, können die Proteine nicht sekretiert werden. Die Bildung von Rezeptoren an der Membranoberfläche ist ebenfalls unterschiedlich wie bei Eukaryoten. Dieser Unterschied hat natürlich einen Einfluss auf die Selektivität und die Spezifität der Testsubstanz. Die Zellwand ist auch ein Resistenz Faktor.

Bei diesem Test werden sogenannte Leuchtbakterien verwendet. Man findet zwei Leuchtbakterien Familien, die Vibrionaceae und die Enterobacteriaceae. Die erste Familie ist das Testobjekt dieses biologischen Tests. Erhältlich in Form eines Kits, werden *Vibrio fischeri* für diesen Test verwendet. Diese Bakterien haben die Fähigkeit Licht zu produzieren und freizusetzen, was man unter Biolumineszenz⁵ bezeichnet. Der Komplex *luxR* - Autoinductor (Acyl Homoserin Lactone (AHL)) bindet sich auf der *Lux Box* welche den *Lux operon* aktiviert [8]. Dadurch wird Luziferin exprimiert (**Bild 2**). Durch eine chemische Reaktion wird Lumineszenz verursacht (**Bild 3**). Kommen

⁵ Biolumineszenz ist die Erstellung und Freisetzung des Lichtes von einem Organismus durch eine chemische Reaktion während der die chemische Energie in Lichtenergie (Kaltes Licht) umgesetzt wird. Mann unterscheidet intrazelluläre und extrazelluläre Biolumineszenz. Einige Organismen wie Bakterien leben in Symbiose in grössere Organismen (Fisch, Muscheln...) im Zweck zur Maskierung, Attraktion, Repulsion oder zur Kommunikation [8].

jedoch die Bakterien in Kontakt mit einer toxischen Substanz, wird das Leuchten gehemmt. Das Leuchten wird mit einem Luminometer in relativer Lichtintensität bei 490 nm gemessen. Bei diesen *in vitro* Test wird also die Wirkung der Testsubstanz über die Freisetzung von Licht der Leuchtbakterien bestimmt. Dank einer Gleichung wird diese Lichtintensität in Prozent Hemmung berechnet, um dadurch den EC_{50} zu bestimmen.

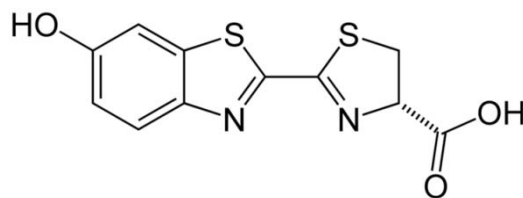


Bild 2 : Bakterien Luziferin [9].

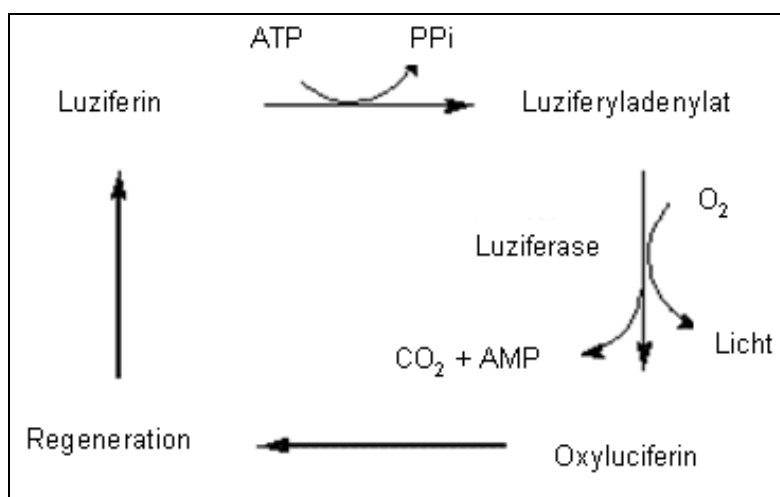


Bild 3 : Reaktionschema von der Biolumineszenz. Als Erstes wird das Luziferin mit Hilfe von ATP in Luziferyladenylat umgesetzt. Dieses Substrat wird mit dem Enzym Luziferase, in Anwesenheit von Sauerstoff oxidiert. Dabei wird Licht bei 490 nm freigesetzt [9].

Die Anwendung der Biolumineszenz wurde für die Bereiche Biochemie, Molekulare Biologie und Biotechnologie entwickelt. Diese Technik wird vorallem in der Forschung oder in der Industrie als Nachweis von Metaboliten, Kontaminanten (z.B. Bakterien) oder toxischen Substanzen (organisch und anorganisch) verwendet [10]. Der Komplex Luziferin – Luziferase kann zum Beispiel für die Dosierung von ATP mit Hilfe der ATPmetrie benutzt werden. Eine andere Anwendung der Biolumineszenz ist für die Bestimmung der Wachstumkinetik einer Bakterienkultur durch die Freisetzung des Lichtes [10]. In dieser Arbeit werden diese Bakterien als Indikator von toxischen Substanzen verwendet.

1.5.3. Zytotoxizität Test mit BALB 3T3 Klon 31 Zellen

Beim dritten und letzten Test handelt es sich um einen kolorimetrischen Test in dem die Zytotoxizität ⁶ der Testsubstanzen überprüft wird. In diesem Verfahren werden Maus-Zellen (BALB/c), bzw. Eukaryoten verwendet. Wie auf LGC Standards-ATCC beschrieben, sind diese Zellen aus dem *Mus musculus* (Maus) Embryo isolierte Fibroblasten (**Bild 4**).

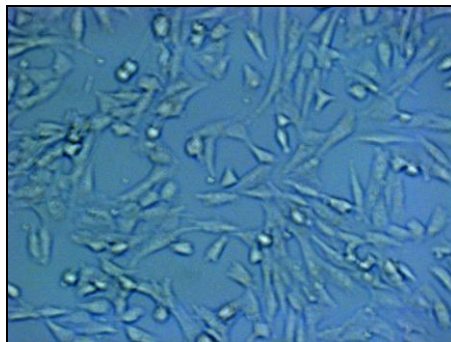


Bild 4: Typische Fibroblasten Form. Hier BALB/c.

Wie schon erwähnt, basiert dieser *in vitro* Test auf der Fähigkeit der Lebenden Zellen das Neutralrot aufzunehmen. Das Neutralrot (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazinchlorid ($C_{15}H_{17}ClN_4$)) ist eine aromatische heterozyklische Substanz mit einem Molekulargewicht von 288.78 g/mol (**Bild 5**). Das Neutralrot kann als pH Indikator (Rot = sauer, Gelb = alkalisch) oder als Vitalfarbstoff⁷ verwendet werden. Dieser leicht kationische Farbstoff gelangt durch nichtionische Diffusion in die Zellen und wird an die anionischen Reste der lysosomalen Matrix gebunden. Sind die Zellen in Folge einer Schadstoffexposition beschädigt, ist die Fähigkeit das Neutralrot aufzunehmen vermindert. Die Zytotoxizität wird durch die Abnahme der aufgenommenen Farbe nach einer Schadstoffexposition in Funktion ihrer Konzentration bestimmt.

⁶ Die Zytotoxizität bezeichnet die Fähigkeit einer chemischen oder biologischen Substanz, die Zellen zu beeinträchtigen oder zu zerstören. Dies kann zum Beispiel durch Zytostatische Medikamente, Viren, Toxine oder Lymphocyten (T oder Natural Killer) verursacht werden [11].

⁷ Ein Vitalfarbstoff ist eine Substanz, welche Zellstrukturen färbt, ohne dabei den Tod der Zelle auszulösen [12]

Die Intensität der Färbung wird photometrisch bei 540 nm gemessen. Die Absorptions-Werte werden dann in Prozent Farbintensität umgewandelt, um den LD₅₀ zu bestimmen.

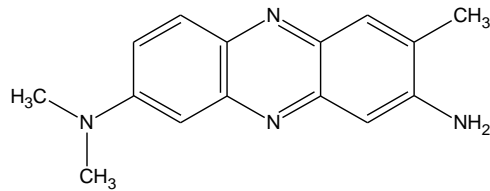


Bild 5 : Neutralrot [13].

Ausser dem Neutralrot Test gibt es verschiedene Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität einer Substanz, wie zum Beispiel den MTT Test in dem man die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase misst. Solche *in vitro* Tests sind natürlich aus ethischen Gründen im Vorteil gegenüber *in vivo* Tests. Solche Zytotoxizitäts Tests werden ebenfalls im *Tissue Engineering* (Transplantationen, Medizinisches Biomaterial...) oder in der Immunologie verwendet [14]. In solchen Bereichen ist es wichtig die Zytotoxizität eines Produktes auszuschliessen, um jede Nachwirkung zu vermeiden.

1.6. Die Testsubstanzen und ihre Eigenschaften

1.6.1. Atropin

Atropin erscheint meist unter Atropinsulfat Monohydrat, welches eine farblose, nadelförmige und geruchlose Substanz ist. Atropin ist ein giftiges Alkaloid, welches in diversen Pflanzen (z.B. *Belladonna* (**Bild 6**), *Datura* oder *Mandragora*) zu finden ist. Es handelt sich um ein Racemat (1:1 Mischung) aus den Isomeren (R)- und (S)-Hyoscyamin, das sich bei der Isolierung durch Racemisierung aus (S)-Hyoscyamin bildet. Dieses linksdrehende Stereoisomer ist verantwortlich für die Wirkungen des Racemats. Atropin ist (wie andere Parasympatholytika) ein kompetitiver Antagonist des Acetylcholin. Es hemmt mit grosser Selektivität die Wirkungen des Acetylcholins an muskarinischen cholinergen Rezeptoren (bei hohen Dosen sogar Nicotinrezeptoren). Muskarinische Rezeptoren⁸ befinden sich an den Effektorzellen des Parasympathikus, an der glatten Muskulatur, im Drüsengewebe, und an neuronalen Zellen des peripheren und zentralen Nervensystems. Dadurch nimmt die Sekretion der Drüsen (Magen, Pankreas, Bronchialdrüsen...) ab, sowie der kontraktile Tonus der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Traktes und des Auges. Ebenfalls nimmt die Herzfrequenz zu. All diese Eigenschaften werden in der Medizin ausgenutzt, wie zum Beispiel bei Bradykardie oder in der Ophthalmologie, um die Pupille zu vergrössern. Atropin wird auch als Antidot gegen neurotoxische Gase (z.B. Tabun oder Sarin) oder Organophosphate (z.B. Dichlorvos) eingesetzt [17]. Die Folge der Wirkung beruht auf eine Umphosphorylierung und Freigabe der Cholinesterase. Dadurch kann das Enzym wieder das Substrat (Acetylcholin) katalysieren [18].



Bild 6 : *Atropa belladonna* [15].

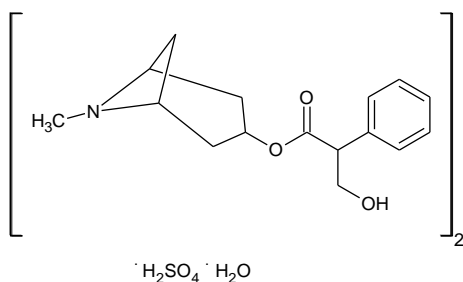
⁸ Muskarinische Rezeptoren sind membranständige Rezeptoren, die im parasympathischen Nervensystem vorkommen und als Substrat den extrazellulären Neurotransmitter Acetylcholin binden. Dadurch wird die Adenylat-Zyklase inhibiert, was eine Abnahme des intrazellulären cAMP (Second Messenger) und die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zur Folge hat. Diese Aktivierung verursacht eine Zunahme von Diacylglycerol und Inositol trisphosphat. Diese zwei Second Messenger können metabolische Wege aktivieren oder inhibieren, welche das Membranpotenzial beeinflussen können [16].



Eigenschaften

Formel: $C_{34}H_{48}N_2O_{10}S \cdot H_2O$

Struktur:



Molekulargewicht: 694.84 g/mol.

Bestellung: Atropin sulfate monohydrate. FLUKA. Nr lot: 1278263. Filling code: 52208066.

Löslichkeit (20 °C in Wasser): 2 g/l. Das Sulfat (Salz) erhöht jedoch die Löslichkeit wegen der ionisierten Form.

Konduktivität: 4427 $\mu S/cm$ bei 23 °C in 20 g/l

Lagerung: Lichtgeschützt und luftdicht sehr vorsichtig bei Raumtemperatur lagern.

Form: Weisses Puder.

Sicherheit: Sehr giftig beim Einatmen und Verschlucken. Handschuhe erforderlich und unter Kapelle arbeiten.

Gefahrensymbole: T+

Akute Toxizität: LD ₅₀ Ratte [19] →	Oral: 500 mg/kg
	Intraperitoneal: 280 mg/kg
	Subkutan: 250 mg/kg
	Intravenös: 73 mg/kg
	Intramuskulär: 920 mg/kg
LD ₅₀ Human →	Nicht öffentlich bekannt

Anmerkung für den Test: Da nur Atropin als toxisch gilt, muss die Masse (Atropinsulfat Monohydrat) durch den Faktor 1.2 geteilt werden. Beispiel: In 12 mg Atropinsulfat Monohydrat befinden sich 10 mg Atropin.



1.6.2. *Dichlorvos*

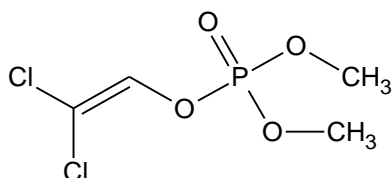
Dichlorvos ist ein Organophosphat, welches jahrelang als Insektizid in der Landwirtschaft, gegen Malaria-Mücke oder als Desinfektionsmittel für Luftfahrzeuge verwendet wurde [20]. In einigen Ländern wie Frankreich wurde diese Substanz verboten. Jedoch kann Dichlorvos in der Schweiz noch in Gewächshauskulturen gegen Läuse und Spinnmilben eingesetzt werden. Für wirbellose Tiere, Fische und Vögel ist Dichlorvos sehr giftig. Die Wirkung von Dichlorvos beruht auf einer schwer reversiblen bzw. irreversiblen Hemmung der Acetylcholinesterase, welche für die Regulierung der Neurotransmission an den Synapsen durch die Zerstörung des Neurotransmitters Acetylcholin sorgen. Die Organophosphate gleichen strukturell dem Acetylcholin und binden an die Acetylcholinesterase. Durch diese Bindung kommt es zu einer Transphosphorylierung des Enzyms. Das gebildete Phosphorylenzym blockiert die Kopplung von Enzym und Acetylcholin und damit die biokatalytische Spaltung durch die Esterase. Daraus resultiert ein Anstieg von Acetylcholin, was in den neuromuskulären Synapsen zu einer depolarisierenden Muskelrelaxation führt und eine Paralyse zur Folge hat. Der Tod tritt infolge einer Hemmung des Atemzentrums ein [21]. Andererseits sind Organophosphate in genetischen Systemen ebenfalls wirksam und zwar besitzen sie eine alkylierende Wirkung. Die Alkyl-Gruppe wird auf die DNA übertragen, was bei Bakterien sowie Säugenzellen zu Genmutationen führen kann [22].



Eigenschaften

Formel: $C_4H_7Cl_2O_4P$

Struktur:



Molekulargewicht: 220.97 g/mol.

Bestellung: Dichlorvos PESTANAL. FLUKA. Nr lot: 8080X.

Löslichkeit (20 °C in Wasser): 8 g/l.

Konduktivität: 6.34 μ S/cm bei 23 °C in 60 mg/l

Dichte: 1.4 g/cm³

Lagerung: Lichtgeschützt und luftdicht sehr vorsichtig bei -20 °C lagern.

Form: Viskose farblose Lösung.

Stabilität: In Reinem Wasser bei 20 °C wird in 61.5 Tage 50 % Dichlorvos hydrolisiert und in einer alkalischen Lösung noch schneller [23]. Diese Eigenschaft kann für die Test Verfahren ein Problem bedeuten da einige von denen drei Tage bei 37 °C dauern.

Sicherheit: Sehr giftig beim Einatmen und Verschlucken. Handschuhe erforderlich und unter Kapelle arbeiten.

Gefahrensymbole: T und Xn.

Akute Toxizität: LD ₅₀ Ratte [24] →	Oral: 56 mg/kg
	Dermal: 107 mg/kg
	Inhalativ: 1 mg/l/1 h
LD ₅₀ Human →	Nicht öffentlich bekannt

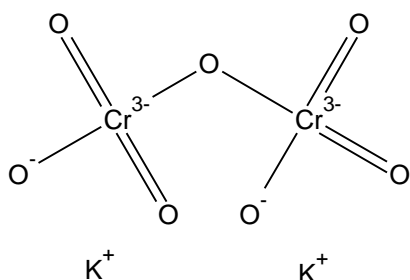
1.6.3. Kaliumdichromat

Kaliumdichromat ist ein Schwermetallsalz, welches sich in einer wässrigen Umgebung in ein Dichromatanion ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) und zwei Kaliumionen (K^+) trennt. Diese Substanz wird im Labor als Oxidationsmittel verwendet, sowie in der Technik für die Herstellung von Chromschwefelsäure. Kaliumdichromat ist eine toxische Substanz und krebserzeugend. Bei Kontakt reizt es die Haut, Atmungsorgane und die Augen. Es können ebenfalls Allergien entstehen. Das hexavalente Chrom ist ein stark oxidierendes Agens, welches Punktmutationen in Bakterien und Hefen, sowie Zellentransformationen bei Hamster Fibroblasten verursachen kann. Es wurde eine Oxidation von Zellkomponenten durch Chrom VI beobachtet, wobei es zu Interaktionen zwischen dem reduzierten Chrom III mit spezifischen Lockstoffen der Zellmembran und der DNA kommt. Die Replikation der DNA wird dadurch blockiert, was eine Hemmung der RNA und Protein-Synthese zur Folge hat [25].

Eigenschaften

Formel: $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Struktur:



Molekulargewicht: 294.18 g/mol.

Bestellung: Kaliumdichromat. FLUKA. Nr lot: 452901. Filling code: 33003421.

Löslichkeit (20 °C in Wasser): 120 g/l.

Konduktivität: 73.9 $\mu\text{S}/\text{cm}$ bei 23 °C in 32 mg/l

Dichte: 2.7 g/cm³

Lagerung: Lichtgeschützt und luftdicht sehr vorsichtig bei Raumtemperatur lagern.

Form: Orangefarbenes Pulver (Kristall).

Sicherheit: Sehr giftig beim Einatmen und Verschlucken. Handschuhe erforderlich und unter Kapelle arbeiten.

Gefahrensymbole: T+ und N.

Akute Toxizität: LD₅₀ Ratte [26] → Oral: 25 mg/kg
Dermal: 1170 mg/kg
Inhalativ: 0.09 mg/l/4 h
LD₅₀ Human → Nicht öffentlich bekannt

Anmerkung für den Test: Da nur das hexavalente Chrom (Chrom VI) als toxisch gilt, muss die Masse durch den Faktor 2.83 geteilt werden. Beispiel: In 283 mg Kaliumdichromat befinden sich 100 mg Cr⁶⁺.

1.6.4. Ricin

Ricin ist ein toxisches Protein (Toxalbumin) aus den Samen von *Ricinus communis* (**Bild 7**), welches ein Molekulargewicht von 60 bis 65 kDa besitzt [27]. Die Ricin Menge, welche sich in den Samen befindet, wird auf 1 bis 5 % geschätzt. Obwohl Ricin mehr als B-Kampfstoff bekannt ist, wurde dieses Toxin ebenfalls in der Forschung als immuntherapeutisches Agens studiert. Ricin gehört zur Gruppe der Ribosomeninaktivierenden Proteine. Ricin ist ein Lektin und Glykoprotein. Es besteht aus zwei Polypeptiden (A- und B-Kette), welche durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die B-Kette ist ein Lektin, welches sich an



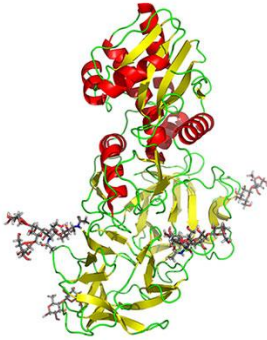
Bild 7 : *Ricinus communis* [15].

die Zelloberfläche, an Galaktose-Reste der Glykoproteine und Glykolipide bindet. Dies ermöglicht das Eindringen der A-Kette in das Zytoplasma. Die A-Kette inhibiert die Protein-Synthese, indem sie ein Adenin der 28S rRNA der 60S Ribosomenuntereinheit entfernt. Dieses irreversible Inaktivieren der eukaryotischen Ribosomen hat zur Folge, dass die Bildung des Initiationskomplexes während der Translationsinitiation beeinträchtigt wird. Die Elongationsfaktoren können sich nicht binden, die Protein-Synthese wird unterbrochen. Es folgen strukturelle und funktionelle Änderungen der Membranen, wie auch der allgemeinen Zellmechanismen, was zur Apoptose führt. Eine A-Kette kann ca. 1500 Ribosomen pro Minute inaktivieren [27].



Eigenschaften

Struktur:



Molekulargewicht: ~ 60'000 g/mol.

Bestellung: Stock Lösung von 1 mg/ml (vorhanden im LABOR SPIEZ)

Lagerung: Lichtgeschützt und luftdicht sehr vorsichtig bei -20 °C lagern.

Sicherheit: Sehr giftig beim Einatmen und Verschlucken. Handschuhe erforderlich und unter Kapelle arbeiten.

Gefahrensymbole: T und Xn.

Akute Toxizität: LD₅₀ Ratte [28] → Oral: 100 µg/kg
Intraperitoneal: 1.5 µg/kg
Intravenös: 2.2 µg/kg
Inhalativ: 0.01 mg/l/ 4 h
LD₅₀ Human [28] → Oral: 300 µg/kg



2. Gebrauchsmaterial und Verfahren

2.1. Gebrauchsmaterial

2.1.1. *Biologischer Toxtest mit ARTOXKIT™*

Kit:

- ARTOXKIT™. MICROBIOTESTS (B). Nr kit: AF009.
- Batch number of cysts: AF/F2006.
- Batch number of concentrated salt solutions: ASPM181008

Geräte/Material:

- Stereolupe, WILD HEERBRUGG 652823
- Inkubator Lab-Therm. ADOLF KUHNER AG (CH). Serien Nr: 81705-23
- Analytische Waage. Type: AT261, DeltaRange. METTLER TOLEDO (CH).
Serien Nr: 1115230488
- Spezielles hausgemachtes Aufzuchtsgefäss und hausgemachtes
System für das Aufkonzentrieren der Nauplien
- 96-Well Mikrotiterplatte

2.1.2. *Biologischer Toxtest mit Leuchtbakterien*

Kit:

- Leuchtbakterien Kit: LCK 480. DRLANGE (CH). Nr lot: 03048

Geräte/Material:

- LUMIStherm. DRLANGE (CH). Type : LTG053. Serien Nr : 1052855
- LUMIStox V4. DRLANGE (CH). Type: LPG321. Serien Nr: 1055755
- Analytische Waage. Type: AT261, DeltaRange. METTLER TOLEDO (CH).
Serien Nr: 1115230488
- Glasküvetten. DRLANGE. Serien Nr: LZP340
- pHMeter. METTLER TOLEDO (CH). Serien Nr: 1227356194



Lösungen:

- 2 % Kochsalzlösung: Natriumchlorid. MERCK (CH). Nr lot: 1.06404.1000
- 1 M HCl und 1 M NaOH. Stock Lösungen

2.1.3. Zytotoxizität Test mit BALB 3T3 Klon 31 Zellen

Geräte:

- Laminar-Flow. SKAN (CH). Serien Nr: 30311538
- Spectrophotometer: SpectromaxPlus 384 MOLECULAR DEVICES (USA). Serien Nr: MN02040
Software: SoftMaxPro V5
- Inkubator: Las. HETTICH LABOAPPARATE (CH).
Serien Nr: 81038
- Mixer: Thermomixer comfort. EPPENDORF (D)
Serien Nr: 5355 09103
- Inkubator. MEMMERT (D). Type: INB200. Serien Nr: E206.0549
- Autoclave: Autoklav Bio-31 Fedegari. VITARIS (CH).
Type: F.VA3/A14. Serien Nr: NB1702AM
- Software: GraphPad Prism 5.01
- Axio Observer Inverses Mikroskop. ZEISS (D).
Serien Nr: 3834000845.
Software: AxioVision Rel. 4.6

Medium/Lösungen:

- DMEM (1x Dulbecco's Modification of Eagle's Medium).
MP BIOMEDICALS, LLC (F). Nr cat: 1233254. Nr lot: R24247
- NCS (Newborn Calf Serum). BIOCHROM AG (D).
Nr cat: S0125. Nr lot: 0913L
- PBS – Dulbecco (1x). BIOCHROM AG (D)
Nr cat: L1825. Nr lot: 0354S
- Penicilline/Streptomycine. BIOCHROM AG (D).
Nr cat: A2212. Nr lot: 0257L



- L-Glutamine 200 mM. BIOCHROM AG (D).
Nr cat: K0282. Nr lot: 0061S
- Trypsin/EDTA Solution. BIOCHROM AG (D).
Nr cat: L2143. Nr lot: 1182L
- Acetone Purum. FLUKA (CH).
Nr cat: 4570. Nr lot: 61180
- Ethanol Absolut P.A. MERCK KGaA (D).
Nr cat: K34782383. Nr lot: 523
- Crystal Violet, ACS reagent, anhydrous dry $\geq 90.0\%$.
SIGMA-ALDRICH (CH). Nr cat: C6158-50G. Nr lot: 054K3719
- Neutral Red Solution. SIGMA-ALDRICH (CH).
Nr cat: N2889. Nr lot: 039K2424

Sonstiges Labomaterial:

- 0.22 μm Filter, GP EXPRESS PLUS Membrane. MILLIPORE (USA)
Nr cat: SCGPUO2RE. Nr lot: R7AN03554
- 96-Well Mikrotiterplatte
- Multi-Chanel Pipette



2.2. Verfahren

2.2.1. *Biologischer Toxtest mit ARTOXKIT™*

Bei diesem Test wurden einige Änderungen vorgenommen. Es wurde festgestellt, dass dieses Kit [29] nicht sehr optimal ist. Als erstes wurde die Aufzucht der Zysten optimiert. Beim Kit findet man nach 24 Stunden Inkubation Nauplien, welche sich in unterschiedlichen Wachstumsstadien befinden (einige sind älter als die anderen). Dies ist für den Test ein wichtiger Faktor. Wenn Nauplien ausschüpfen ist ihr Metabolismus (osmoregulierung) noch nicht ganz entwickelt und aus diesem Grund viel empfindlicher (auf pH) als bei älteren Nauplien. Um dieses Problem aufzuheben, wurden die Zysten in einem speziellen hausgemachten Aufzuchtsgefäss (**Bild 8**) inkubiert, damit die Testtiere im gleichen Entwicklungsstadium sind. Es wurde ebenfalls festgestellt, dass die Nauplien mit dem Kit sehr verdünnt werden und es aus diesem Grund sehr schwierig ist, die Tierchen in die Platte zu bringen ohne dabei die Testsubstanz weiter zu verdünnen. Um dies zu vermeiden wurde ein eigenes System erarbeitet, um die Tierchen zu konzentrieren (**Bild 9**). Damit es möglich ist mehrere Verdünnungsreihen durchzuführen, wurde eine 96 Mikrotiterplatte benutzt anstatt die vom Kit (24-Well). Da es zu lange dauert jeweils 10 Nauplien in jedes Well zu bringen, wurde die Zahl zwischen 10 und 20 Nauplien pro Well festgelegt.

1.Vorbereitung des künstlichen Meerwasser (35 ppm)

- Ein 1 L Messkolben mit 800 ml deionisiertem Wasser füllen. Phiole Nummer 1 (NaCl) dazu geben und rühren bis das Salz aufgelöst ist. Danach Phiole 2 (KCl), 3 (CaCl₂), 4 (MgCl₂), 5 (MgSO₄), 6 (NaHCO₃) und 7 (H₃BO₃) dazu geben (in dieser Sequenz).
- Bis zu der Marke 1000 ml mit deionisiertem Wasser auffüllen und rühren bis die Lösung homogen wird.

Das künstliche Meerwasser wird als Medium für das Schlüpfen der Zysten und als Verdünnungsmedium für die Testsubstanzen verwendet. Diese Lösung sollte im Kühlschrank bei 5 °C aufbewahrt werden.

2. Aufzucht von *Artemia salina*

- 2 Phiolen getrocknete Zysten im Aufzuchtsgefäss (**Bild 8**) ausstreuen. Darauf achten, dass die Klappe auf der Seite geschlossen ist. Das Aufzuchtsgefäss in eine Kristallschale stellen und mit dem künstlichen Meerwasser (bei 25 °C temperiert) bis 5 mm über der Klappe (ca. 400 ml) füllen. Mit dem Deckel schliessen und 24 Stunden bei 25 °C im Dunkeln inkubieren.
- Nach der Inkubation, die Klappe öffnen und direkt mit Licht (ca. 1000 Lux) während 3 Stunden anstrahlen. Die gerade geschlüpften Nauplien können somit vom Aufzuchtsgefäss in die Kristallschale gelagen (vom Licht angezogen) und somit vom Rest der nicht geschlüpften Zysten getrennt werden. Dies ermöglicht ebenfalls, dass die Testtiere im gleichen Entwicklungsstadium sind und der Test somit möglichst reproduzierbar wird.



Bild 8: Aufzuchtsgefäss mit Klappe in der Kristallschale.

3. Aufkonzentrieren der Nauplien

- Damit die Nauplien in der Mikrotiterplatte eingesetzt werden können ohne die Testsubstanzen weiter zu verdünnen, müssen die Tierchen in ca. 1 – 2 ml künstlichem Meerwasser konzentriert sein. Dazu werden zwei Glas-Röhrchen benutzt, welche mit einem Filter (Gasekompresse) getrennt sind. Diese zwei Röhrchen werden zusammen geschraubt damit nur noch eines entsteht.
- Das Röhrchen wird in ein 200 ml Becherglas mit vorgelegtem künstlichen Meerwasser gestellt und das Becherglas in eine Kristallschale (**Bild 9**). Die schwimmenden Nauplien, die sich in der Kristallschale (vom Aufzuchtsgefäss) befinden, werden nun langsam in das Röhrchen gegossen, wobei man die überschüssige Salzlösung einfach über den Becherrand überlaufen lässt. Die Nauplien konzentrieren sich über dem Filter und können leicht daraus pipettiert werden.

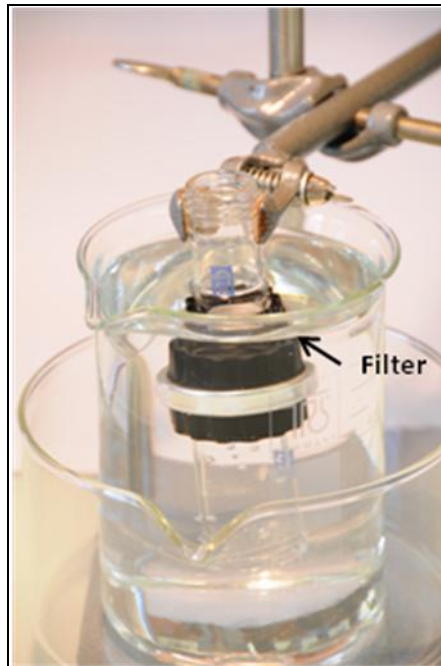


Bild 9: Aufkonzentriersystem für die Nauplien. Der Filter liegt ca. 5 mm unterhalb der Wasseroberfläche, damit die Nauplien konzentriert werden.

4. Pipettieren der Testsubstanzen und der Nauplien in der Mikrotiterplatte

Es wird jeweils eine Platte pro Testsubstanz gebraucht. Die Platten bestehen aus 96 Wells. Es wird jeweils eine 3-fache Bestimmung durchgeführt. Die erste Reihe steht für die Negativkontrolle (NK) in welche 300 µl künstliches Meerwasser in jedes Well gegeben werden. Die weiteren Reihen (Cx) sind für die Verdünnungen vorhanden. Es werden jeweils 300 µl Lösung dazugegeben. In **Bild 10** ist ein Schema der Platte gezeigt. Es können mit bis zu 23 verschiedenen Konzentrationen gearbeitet werden. Jedoch werden im Test nicht alle Wells benutzt.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NK	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁
B	NK	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁
C	NK	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁
D												
E												
F	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀	C ₂₁	C ₂₂	C ₂₃
G	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀	C ₂₁	C ₂₂	C ₂₃
H	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀	C ₂₁	C ₂₂	C ₂₃

Bild 10: Mikrotiterplatte für den Artemien Toxtest. NK = Negativkontrolle, C_x = Verdünnungsreihen.

Mit Hilfe einer Pipette werden ca. 50 µl Nauplien pipettiert und jeweils ca. 10 bis 20 Nauplien in jedes Well gegeben. Dies wird unter der Stereolupe durchgeführt. Beim pipettieren werden die Nauplien so gut wie möglich gezählt, so dass es zwischen 10 – 20 Tierchen sind. Bei diesem Vorgang ist es wichtig eine grosse Spitze zu benutzen, damit die Tierchen beim pipettieren nicht verletzt werden. Die Mikrotiterplatte im Dunkel bei Raumtemperatur während 24 Stunden inkubieren.

5. Verdünnungsreihen der Testsubstanzen

Dieser Test wird mit folgenden Konzentrationen durchgeführt (**Tabelle 1**):

Tabelle 1: Konzentrations- Bereich für den Test Durchgang.

Testsubstanz	Konzentration [mg/l]	Verdünnungstyp
Atropin	10'000; 5'000; 2'500; 1'250; 625; 312 und 156	Geometrisch
Dichlorvos	350; 300; 250; 200; 150; 100; 50; 25 und 12.5	Frei
Kaliumdichromat	300; 200; 150; 100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.12 und 1.56 (Chrom VI)	Frei
Ricin	1'000; 500; 250; 125; 62.5; 31.2 und 15.6	Geometrisch



6. Auszählung der toten Nauplien und Auswertung

Nach 24 Stunden Inkubation werden die toten Nauplien unter dem Mikroskop gezählt. Es wird dann ein Mittelwert sowie die Standardabweichung der Mortalitätsrate von jeder Verdünnung berechnet. Die Konzentrationen, der Mittelwert der Mortalitätsrate und die Standardabweichung werden dann mit der *GraphPad Prism 5* Software als Hill Funktion⁹ (**Anhang IIB/C**) bearbeitet, um den LD₅₀ auszurechnen.

2.2.2. Biologischer Toxtest mit Leuchtbakterien

Dieses Testverfahren basiert auf der Europäischen Norm (ISO 11348-2) für die Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterien) [30].

1. Leuchtbakterien reaktivieren und auf Glasküvetten aufteilen

Der LUMISTox Apparat und den LUMISTherm sollten ca. 30 min vor Beginn des Testes eingeschaltet werden, um die benötigte Temperatur (15 °C) zu erreichen.

- Die Reaktivierungslösung, welche sich im Kit befindet auftauen, kräftig schütteln und auf 15 °C im LUMISTherm temperieren lassen.
- Leuchtbakterien erst unmittelbar vor der Reaktivierung im Wasserbad (Raumtemperatur) auftauen.
- Die aufgetauten Bakterien mit 0.5 ml Reaktivierungslösung resuspendieren und 15 min bei 15 °C im LUMISTherm temperieren.
- Die resuspendierten Bakterien mit der verbliebenen Reaktivierungslösung mischen.
- Zu je 0.5 ml auf Glasküvetten im LUMISTherm in den Positionen B1 bis C10 verteilen und 15 min bei 15 °C temperieren.

Achtung: Beim Pipettieren ist es wichtig keine Luftblasen zu bilden. Sie haben einen Einfluss auf die Lichtintensität und können daher Fehler bei der Messung der relativen Intensität verursachen.

⁹ Eine Hill Funktion ist ein logistisches Mathematisches Model mit vier Parametern in der die Konzentration der Test Substanz in einer Sigmoidalenkurve berechnet wird [30].



2. Testsubstanz vorbereiten

Während die Leuchtbakterien temperieren, die Testsubstanz vorbereiten.

- Als Meeresorganismen benötigen Leuchtbakterien immer einen ausreichenden Salzgehalt in der Umgebung. Deshalb wird jede Testsubstanz mit einer Lösung von 2 % NaCl (w/v) verdünnt.
- Die DIN 38412 L 34/341 für den Leuchtbakterientest fordert die Einstellung von Abwasserproben auf pH 7, um im Test keine Leuchthemmung aufgrund abweichender pH-Werten zu erhalten. Dadurch wird ebenfalls die Testsubstanzen auf diesen pH-Werte gebracht und zwar mit 1 M NaOH oder 1 M HCl.

3. Verdünnungsreihe herstellen

Die Verdünnungsreihen werden in der Reihe A des LUMIS therm bei 15 °C temperiert. Die Reihe A1 steht für den Blank (2 % NaCl Lösung). Es werden mit folgenden Konzentrationen gearbeitet (**Tabelle 2**):

Tabelle 2 : Konzentrations- Bereich für den Test Durchgang.

Testsubstanz	Konzentration [mg/l]	Verdünnungstyp
Atropin	20'000; 10'000; 5'000; 2'500; 1'250; 625; 312 und 156	Geometrisch
Dichlorvos	200; 100; 50; 25; 12.5; 6.25 und 3.125	Geometrisch
Kaliumdichromat	32; 21.3; 16; 10.6; 8; 5.3; 4; 2.6 und 2 (Chrom VI)	DIN
Ricin	100; 50; 25; 12.5; 6.25 und 3.12	Geometrisch

Hinweis: Da die Testsubstanz (Verdünnungsreihe A2-A10) während dem Test nochmals mit Leuchtbakterien gemischt wird, entsteht eine weitere Verdünnung mit dem Faktor 2.

Beim Test müssen mindestens 3 und höchstens 9 Verdünnungsreihen durchgeführt werden. Dies erklärt weshalb nicht für jede Substanz die gleiche Zahl besteht.



4. Voreinstellungen des LUMISTox 300

Folgende Einstellungen werden eingegeben:

- Als Erstes wird auf dem Bildschirm die Option <EC> eingegeben danach die Bakteriencharge <480> für LCK480. Um die Messstrecke zu überprüfen, wird die Referenzkontrolle automatisch nach Anwahl des Messprogrammes durchgeführt. Auf dem Bildschirm wird <Ref.-kontrolle bitte warten> angegeben.
- Bei <Voreinstellungen ändern?> auf <J> drücken und die Anzahl der Verdünnungen mit Hilfe der Tastatur eingeben und mit <ok> bestätigen.
- Bei <Farbkorr.: ja nein> nur für das Kaliumdichromate <ja> eingeben und mit <ok> bestätigen.
- Bei <Vorverdünn.: ja nein> auf <nein> drücken und mit <ok> bestätigen.
- Den Verdünnungs- Typ eingeben: für Kaliumdichromate <DIN> eingeben und für die drei anderen Testsubstanzen <2> eingeben und mit <ok> bestätigen. Auf <Einheit:> die Taste <mg/l> oder <g/l> (für Atropin und Ricin) wählen und mit <ok> bestätigen.
- Anschliessend mit Hilfe der Tastatur die Konzentration eingeben und wieder mit <ok> bestätigen.
- Für <Inkubationszeit 1> 30 Minuten eingeben, für Inkubationszeit 2 und 3, 0 Minuten eingeben und jeweils mit <ok> bestätigen.

5. Messung zur Bestimmung von EC-Werten

1. Io-Messung

- Küvette aus B1 ins Messgerät stellen und Messung mit <Mess> auslösen und den erhaltenen Wert aufschreiben. Küvette entnehmen, nach B1 zurückstellen, 0.5 ml Probe aus A1 zugeben. Dies sollte 30 Sekunden dauern.
- Küvette aus C1 ins Messgerät stellen und Messung mit <Mess> auslösen, Küvette entnehmen, nach C1 zurückstellen 0.5 ml Probe aus A1 zugeben und den Angegebenenwert aufschreiben. Dies sollte 30 Sekunden dauern.
- Entsprechend mit allen Küvetten in den Reihen B und C verfahren. Dabei jeweils die dazugehörige Probe aus der Reihe A zugeben und die Zeitfrequenz (30 Sekunden pro Küvette) einhalten.
- Inkubationszeit abwarten.

2. It-Messung

- Küvette aus B1 ins Messgerät stellen und Messung mit <Mess> auslösen, Küvette entnehmen, nach B1 zurückstellen und den erhaltenen Wert aufschreiben. Dies sollte 30 Sekunden dauern.
- Entsprechend mit den weiteren Küvetten verfahren.



- Nach Messung der letzten Küvette wird das Ergebnis im Display angegeben. Um eine Grafische Darstellung zu bekommen, werden die aufgeschriebenen Werte auf einer Excel Seite übertragen und statistisch bearbeitet. Dies ermöglicht ebenfalls den EC_{20} und EC_{50} zu berechnen.

6. Bearbeitung der Ergebnisse

Wie im **Anhang IIIA/D** zu sehen ist, werden die Konzentration, die I_o -Werte sowie die I_t -Werte jeweils in einer Tabelle übertragen um sie auszuwerten:

- Aus dem gemessenen Leuchtintensitäten (I_o und I_t) wird der Korrekturfaktor (fk) nach **Gleichung (1)** berechnet. Hiermit werden die Ausgangswerte I_o aller Testansätze korrigiert, bevor diese als Bezugswerte zur Bestimmung der, durch die zu untersuchende Probe bedingten, Leuchtintensitätsabnahme verwendet werden können.

$$fk = \frac{I_t}{I_o} \quad (1)$$

Mit: fk : Korrekturfaktor für die Kontaktzeit von 30 Minuten [-]

I_t : Leuchtintensität im Kontrollansatz nach Ablauf der Kontaktzeit von 30 Minuten [Irel]

I_o : Leuchtintensität der Kontrolltestsuspensionen unmittelbar vor der Zugabe der Test Substanz [Irel].

- Den Mittelwert des Korrekturfaktors fk der Kontrollansätze bilden.
- I_c nach **Gleichung (2)** berechnen:

$$I_c = I_o \cdot \bar{fk} \quad (2)$$

Mit: \bar{fk} : Mittelwert von fk [-]

I_c : korrigierter Wert für I_o für Testküvettenansatz unmittelbar vor Zugabe der Probe [Irel]

- Die Hemmwirkung des Testansatzes nach **Gleichung (3)** berechnen:

$$Ht = \frac{I_c - I_t}{I_c} \cdot 100 \quad (3)$$



Mit: H_t : Hemmwirkung des Testansatzes nach Ablauf der Kontaktzeit von 30 Minuten [%]

- Den Mittelwert der Hemmwirkung H_t für jede Verdünnungsstufe in Prozent berechnen.
- Die Abweichung der Einzelwerte der Parallelbestimmung der Hemmwirkung H_t von ihrem Mittelwert bei den Kontrollansätzen in Prozent bestimmen.
- Zur Berechnung von Konzentrationseffekten den Gamma-Wert für jede Verdünnungsstufe nach **Gleichung (4)** berechnen:

$$\Gamma = \frac{H_t}{100 - H_t} \quad (4)$$

Mit: Γ : Gamma-Wert des Testansatzes nach Ablauf der Kontaktzeit von 30 Minuten [-]

Anmerkung: Es werden nur Γ -Wert zwischen 10 % und 90 % zur Berechnung der EC verwendet. Mit Hemmungen zwischen 0 % und 100 % kann der Gamma-Wert nicht berechnet werden. Ausserdem ist eine Hemmung von 0 % und 100 % in der Realität nicht möglich, denn auch wenn die Bakterien inaktiviert sind, kann die Reaktion welche zuständig für die Lumineszenz ist, weiter stattfinden.

Zur Ermittlung des EC-Wertes wird eine lineare Regression (**Anhang IIIA/D**) mit Hilfe der **Gleichung (5)** berechnet:

$$\log \Gamma = b \log C + \log a \quad (5)$$

Mit: C : Konzentration welche einen Konzentrationseffekt zeigt [-]

Mit dieser Gleichung werden die EC-Werte mit ihren entsprechenden Vertrauensbereichen berechnet:

$C = EC_{20}$ bei $\Gamma = 0.25$

$C = EC_{50}$ bei $\Gamma = 1$



Jedoch wird nur der EC_{50} für diese Arbeit berechnet.

Der Test ist gültig wenn:

- der $\bar{f}k$ –Wert für 30 Minuten Inkubationszeit zwischen 0.6 und 1.8 liegt.
- die Abweichung der Parallelbestimmungen von ihrem Mittelwert nicht mehr als 3 % beträgt.

2.2.3. Zytotoxizität Test mit BALB 3T3 Klon 31 Zellen

Dieser Test Verfahren basiert auf der SOP von der *National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM)* [31].

1. Vorbereitung der Medien/Lösungen

Routine Culture Medium:

500 ml DMEM
50 ml NCS
10 ml L-Glutamine

Chemical Dilution Medium:

200 ml DMEM
4 ml L-Glutamine
8 ml Penicilline/Streptomycine

Neutral Red Dilution Medium:

200 ml DMEM
4 ml L-Glutamine
10 ml NCS
4 ml Penicilline/Streptomycine

Neutral Red Desorb:

500 ml EtOH
490 ml H₂O
10 ml Acetone purum

Neutral Red Medium

99.242 ml *Neutral Red Dilution Medium*
0.758 ml *Neutral Red Solution*

Kristallviolet

11 mg Kristallviolet
25 ml H₂O

Achtung: Das *Neutral Red Medium* muss innerhalb einer Stunde vor Beginn des Tests vorbereitet werden. Um kleine Neutralrotkristalle zu verhindern, wird diese Lösung mit einem 0.22 µm Filter filtriert. Dieser Vorgang muss unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Das *Neutral Red Dilution Medium* muss bei 37 °C temperiert sein.



2. Passagieren der BALB 3T3 Klon 31

Die Zellen wurden von der Zellkulturabteilung des LABOR SPIEZ angesetzt. Das Splitten der Zellen wird zwei mal pro Woche durchgeführt (Montags und Freitags) damit sich die Zellen im optimalen Zustand (Konfluenz) für den Test befinden.

Da es für den Test nötig ist, dass die Konfluenz der Zellen bei 50 % liegt, werden verschiedene splitratio durchgeführt. Wie durch verschiedene Tests gezeigt wurde, ist die Farbintensität des Neutralrot zu schwach bei weniger als 50 % Konfluenz und daher die Streuung vergrösst. Liegt im Gegenteil die Konfluenz bei 80 – 100 %, ist die Entwicklungsphase der Zellen für den Test nicht mehr geeignet. Diese müssen in der exponentiellen Phase sein, damit der Test auch gültig ist. Würden sie in der stationären Phase sein, ist nicht sicher, ob die Testsubstanz der Grund der Wirkung ist oder ob der Tod der Zellen natürlich ist. Deshalb ist es wichtig, dass die Zellen bei 50 % Konfluenz liegen.

Die Zellen werden jeweils so gesplittet, dass die Zellzahl für den gewünschten Tag (4 Kulturtage) erreicht wird. Da es schwierig ist bei 50 % Konfluenz zu liegen, wird mit verschiedenen Zellzahlen passagiert. Diese sind in der **Tabelle 3** abgebildet.

Tabelle 3: Zellzahl für 4 Kulturtage

Zellzahl für T75 [Zellen/ml]
$3.15 * 10^5$
$1.5 * 10^5$
$1 * 10^5$

3. Split Verfahren

Vor dem Splitten wird jede Flasche unter dem Mikroskop angeschaut, um die Konfluenz visuell abzuschätzen. Dies kann einen Hinweis für den Splitratio geben.

Alle Lösungen müssen bei 37 °C temperiert sein!

- Die Flasche mit der Kultur (T₇₅) in eine anderen Flasche entleeren.
- 15 ml PBS hinein geben um die Zellen vom restlichen Medium zu waschen. Leicht mischen und entleeren.
- Mit 6 ml Trypsin während 15 Sekunden die Zellen von der Flaschenoberfläche ablösen und entleeren.
Die Zellen liegen noch an der Flaschenoberfläche, um sie zu lösen, die Flasche 2-3 Mal anklopfen.



- Die Zellen mit 7.5 ml Medium resuspendieren.
- 500 µl von dieser Suspension mit 500 µl Kristallviolet* mischen.
- 10 µl von dieser Verdünnung auf einer Zählkammer (Neubauer) bringen und unter dem Mikroskop die Zellen zählen.
- Für die Bestimmung der Zellkonzentration X, wird die **Gleichung (6)** benutzen:

$$X = N \cdot 10^4 \cdot v \quad [\text{Zellen/ml}] \quad (6)$$

Mit: N : Gezählte Zellen
 v : Verdünnungsfaktor (hier $v = 2$)
 X : Zellkonzentration [Zellen/ml]

Die entsprechenden Suspensions Volumen um zu splitten werden mit **Gleichung (7)** berechnet:

$$V_s = \frac{\text{Zellzahl}}{X} \quad (7)$$

Mit: V_s : Suspensionsvolumen [ml]
Zellzahl (aus der **Tabelle 3**)
 X : Zellkonzentration [Zellen/ml]

Diese berechneten Mengen werden jeweils in 40 ml frisches Medium (37 °C temperiert) gebracht und bei 37 °C, 90 % Feuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert.

* Im Protokoll werden die Zellen mit Hilfe des Trypan Blau mikroskopisch gezählt. Da das Licht vom Mikroskop von unten kommt, sind die Zellen mit dem Trypan Blau nicht zuerkennen. Aus diesem Grund wurde es mit Kristall Violet ersetzt.



4. Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate und der Verdopplungszeit

Für die Bestimmung dieser zwei Parameter werden die Zellen nach 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden trypsiniert und ausgezählt (**3. Split Verfahren**). Die verschiedenen Zellzahlen werden logarithmisch verarbeitet und auf einer Graphik in Funktion der Zeit übertragen. Der lineare Bereich der Kurve wird für die Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate benutzt.

Diese Werte werden mit Hilfe der **Gleichung (8)** bearbeitet. Dadurch wird die spezifische Wachstumsrate erhalten:

$$\mu_{\max} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad (8)$$

Mit: μ_{\max} : Spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]
 $X_{2/1}$: Zellzahl [-]
 $t_{2/1}$: Kulturzeit [h]

Aus der **Gleichung (8)** wird dann die Verdopplungszeit berechnet:

$$td = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (9)$$

Mit: td : Verdopplungszeit [h]

5. Vorbereitung der Zellen für den Test

Für den Test ist es wichtig, dass die Zellen ca. 50 % konfluent sind, was eine Zellzahl von ca. $2.7 \cdot 10^5 - 4.6 \cdot 10^5$ Zellen/ml entspricht (**Bild 11**). Als Erstes müssen die Zellen resuspendiert (**3. Split Verfahren**) und gezählt werden. Für den Test muss die Zellzahl ca. bei $3 \cdot 10^4$ Zellen/ml verdünnt werden (**Gleichung (10)**).

$$\text{Verdünnung} = \frac{\text{Zellzahl}}{3 \cdot 10^4} \quad (10)$$

Daraus wird der Anteil Zellsuspension berechnet und der Anteil Medium. Pro Platte werden 6 ml dieser Lösung gebraucht. Nach der Verdünnung werden die Zellen wieder gezählt, um sicher zu sein, dass die Zellkonzentration bei $3 \cdot 10^4$ Zellen/ml liegt.

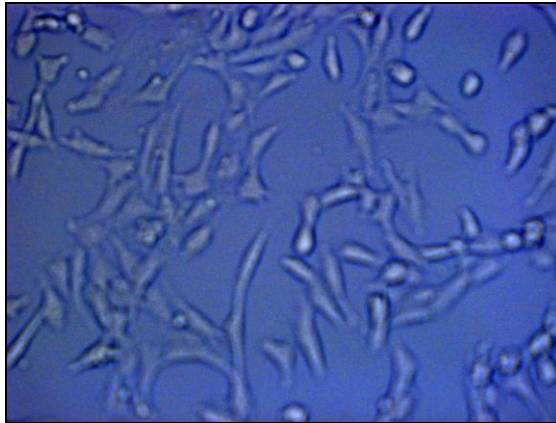


Bild 11 : Notwendige Konfluenz (ca. 50%) für den Test Durchgang.

6. Ansetzen der Zellen in der Mikrotiterplatte (Bild 12)

- 100 µl Medium (37 °C temperiert) werden in den Wells VCb und Cxb pipettiert.
- 100 µl Zellsuspension werden in die Wells VC1/2 und Cx pipettiert.
- Während 24 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubieren.
- Nach 24 Stunden inkubieren, das Medium entfernen (alle Wells) und mit 50 µl frischen temperierten Medium die Wells VCb und VC1/2 neu auffüllen. Die restlichen Wells werden mit der Testsubstanz aufgefüllt (**8. Auftragen der Test Substanz**).



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	VCb	VCb	C ₁ b	C ₂ b	C ₃ b	C ₄ b	C ₅ b	C ₆ b	C ₇ b	C ₈ b	VCb	VCb
B	VCb	VC1	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	VC2	VCb
C	VCb	VC1	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	VC2	VCb
D	VCb	VC1	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	VC2	VCb
E	VCb	VC1	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	VC2	VCb
F	VCb	VC1	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	VC2	VCb
G	VCb	VC1	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	VC2	VCb
H	VCb	VCb	C ₉ b	C ₁₀ b	C ₁₁ b	C ₁₂ b	C ₁₃ b	C ₁₄ b	C ₁₅ b	C ₁₆ b	VCb	VCb

Bild 12 : Schema der 96-wells Platte für den Test. VCb entspricht Medium (blank), Cxb Medium und Testsubstanz (2. Blank), VC1/2 Negativkontrolle (Zellsuspension ohne Testsubstanz) und Cx Zellsuspension mit verschiedenen Konzentrationen an Testsubstanz (1=hoch, 16=tief).

Damit das Auftragen der Lösungen schneller geht, ist es besser mit einer „multi-channel“ Pipette zu arbeiten. Dies vermeidet ebenfalls, dass die Zellen während dem Mediumswechsel austrocknen.

7. Verdünnungen der Testsubstanzen

Die Testsubstanzen werden in einer anderen 96-well Platte vorbereitet und zwar in der gleichen Sequenz wie sie dann auf die Testplatte aufgetragen werden. Die Verdünnungen werden mit dem *Chemical Dilution Medium* durchgeführt damit folgende Konzentrationen wie in **Tabelle 4** entstehen. Der pH-Wert muss gemessen und aufgeschrieben, jedoch nicht verändert werden.



Tabelle 4: Konzentrations- Bereich für den Test Durchgang.

Testsubstanz	Konzentration [ng/ml]	Verdünnungstyp
Atropin	$1.00 \cdot 10^8$; $1.00 \cdot 10^7$; $1.00 \cdot 10^6$; $1.00 \cdot 10^5$; $1.00 \cdot 10^4$; $1.00 \cdot 10^3$; $1.00 \cdot 10^2$ und $1.00 \cdot 10^1$	Logarithmisch
Dichlorvos	$2.27 \cdot 10^6$; $1.13 \cdot 10^6$; $5.67 \cdot 10^5$; $2.84 \cdot 10^5$; $1.42 \cdot 10^5$; $7.09 \cdot 10^4$; $3.55 \cdot 10^4$; $1.78 \cdot 10^4$; $8.86 \cdot 10^3$; $4.43 \cdot 10^3$; $2.21 \cdot 10^3$; $1.11 \cdot 10^3$; $5.54 \cdot 10^2$; $2.77 \cdot 10^2$; $1.38 \cdot 10^2$ und $6.94 \cdot 10^1$	Geometrisch
Kaliumdichromat	$2.65 \cdot 10^4$; $1.33 \cdot 10^4$; $6.63 \cdot 10^3$; $3.31 \cdot 10^3$; $1.66 \cdot 10^3$; $8.28 \cdot 10^2$; $4.14 \cdot 10^2$; $2.07 \cdot 10^2$; $1.04 \cdot 10^2$; $5.18 \cdot 10^1$; $2.59 \cdot 10^1$; $1.29 \cdot 10^1$; $6.47 \cdot 10^0$; $3.23 \cdot 10^0$; $1.62 \cdot 10^0$ und $8.09 \cdot 10^{-1}$ (Chrom VI)	Geometrisch
Ricin	100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.12; 1.56; 0.78; 0.39; 0.195; 0.097; 0.048; 0.024; 0.012; 0.006 und 0.003	Geometrisch

8. Auftragen der Testsubstanz

- In den Wells Cxb und Cx, werden jeweils 50 µl Test Substanz aufgetragen (**Bild 12**). Damit man die Pipettenspitze nicht wechseln muss, wird von der tiefsten zur höchsten Konzentration pippetiert.
- Die Testplatte während 48 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubieren.

Schon nach 46 Stunden Inkubation sollten man die toten Zellen von den lebenden unterscheiden können. Eine Darstellung ist auf den zwei unteren Bildern sichtbar (**13 und 14**). Eine visuelle Beobachtung ist ebenfalls möglich nachdem das Neutralrot aufgetragen wurde. Dies ist mit **Bild 15** abgebildet.

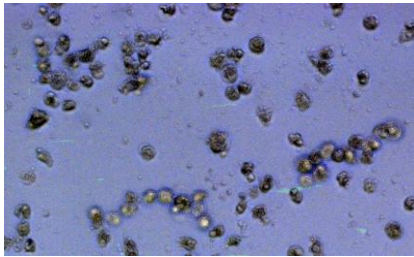


Bild 13 : Tote Zellen nach 46 Stunden Inkubation mit 100 ng/ml Ricin.

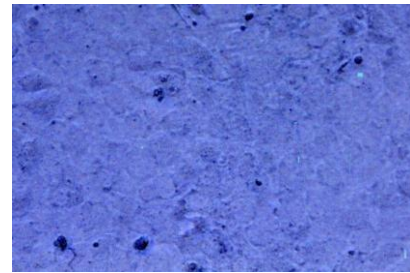


Bild 14 : Lebende Zellen nach 46 Stunden Inkubation mit 0.003 ng/ml Ricin.

9. Auftragung des Neutralrot und Messung der Absorption

- Nach 48 Stunden Inkubationszeit das Medium und die Testsubstanz aus jedem Well entfernen.
- Mit 250 μ l PBS jedes Well spülen und entfernen.
- In jedes Well 250 μ l bei 37 °C temperiertes *Neutral Red Medium* dazugeben und während 3 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubieren.
- Nach dieser Inkubationszeit das *Neutral Red Medium* entfernen und mit 250 μ l PBS jedes Well spülen und entfernen.
- 100 μ l Neutral Red Desorb in jedes Well geben (auch die Blanks!).
- Während 35 min bei 300 rpm mischen.
- Bei 540 nm die Absorption messen.

Falls die Substanz toxisch wirkt, sollte die Färbung der Wells mit der Zunahme der Substanz Konzentration abnehmen, wie auf **Bild 15** zu beobachten ist.

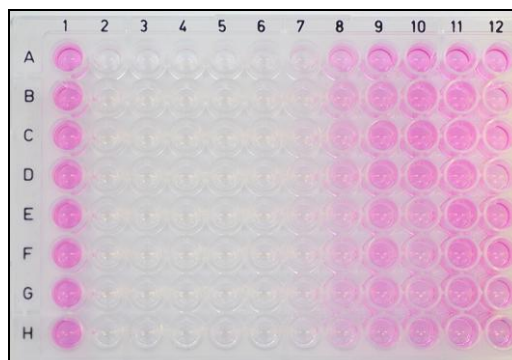


Bild 15 : Testplatte nach der Reaktion mit dem Neutralrot.

Die Werte werden auf Excel importiert um sie zu bearbeiten.



10. Bearbeitung der Werte

Als erstes wird der Mittelwert der VCb ausgerechnet. Um den Test zu validieren, darf der Unterschied zwischen den beiden VCb Mittelwerten (links und rechts von der Platte) nicht höher als 15 % sein. Aus beiden Mittelwerten wird ein effektiver Mittelwert berechnet. Alle Werte von der Negativkontrolle werden mit diesem effektiven Mittelwert korrigiert. Da aber die Vitalität der Zellen interessiert, muss auch der Effekt der Testsubstanz korrigiert werden. Somit werden all die Cx mit den entsprechenden Cxb korrigiert. Als Beispiel, C1 wird mit C1b korrigiert, C2 mit C2b usw.

Bevor die Hill Funktion mit der *GraphPad Prism 5* Software bearbeitet wird, müssen noch die Mittelwerte und die Standardabweichungen der korrigierten Cx berechnet werden.

Die Konzentrationen, der Mittelwert jeder Absorption und die Standardabweichung, können jetzt mit der *GraphPad Prism 5* Software als Hill Funktion bearbeitet werden, um den EC₅₀ auszurechnen. Bei dieser Software wird die Konzentration auf einer logarithmischen Skala verarbeitet und die Absorptionen in Prozenten umgesetzt. Mit einer sigmoidalen nicht-linearen Regression wird dann den LD₅₀ ausgerechnet.

2.2.4. Statistische Bearbeitung der Werte

Ausreissertest nach Dixon:

Da $n < 26$ wird dieser Test verwendet um sicher zu sein, dass kein Ausreisser sich bei den Werten befindet. Für die Signifikanzschwelle α (Fehlerwahrscheinlichkeit, die man annimmt, dass man die Beobachtung eliminiert, die wirklich zur Gesamtheit der Beobachtungen gehört) wird $\alpha = 5 \%$ (für Artemien und Leuchtbakterien Test) und 30 % (für Cytotoxtest) gewählt.

Danach wird r_{jk} berechnet. Wenn $x(n)$ vermutet wird, wird die **Gleichung (11)** angewendet. Wenn $x(1)$ vermutet wird, die **Gleichung (12)**.

$$r_{jk} = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_1} \quad (11)$$

$$r_{jk} = \frac{x_2 - x_1}{x_n - x_1} \quad (12)$$



Die berechneten Werte werden mit Hilfe der zugehörigen Tabelle verglichen [32]:

Wenn $r_{jk} > r_{1-\alpha/2;n}$: Beobachtung gehört nicht zur Gesamtheit.

Wenn $r_{jk} \leq r_{1-\alpha/2;n}$: Beobachtung gehört zur Gesamtheit.

Mit $r_{1-\alpha/2;n} = 0.642$ für $n = 5$ und $\alpha = 5 \%$

Mit $r_{1-\alpha/2;n} = 0.373$ für $n = 5$ und $\alpha = 30 \%$

Variationskoeffizient:

Um die Streuung der Werte um den Mittelwert zu bestimmen wird eine relative Standardabweichung berechnet (**Gleichung (13)**), indem die Standardabweichung durch den Mittelwert dividiert wird. Dieser berechnete Wert gibt dann einen Hinweis über die Wiederholbarkeit des Testes.

$$v[\%] = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (13)$$

In der Analytik von biologischen Proben wird in der Regel ein Variationskoeffizient von ca. 20 % Akzeptiert.

t-Test:

Dieser Test wird für den Vergleich von Mittelwerten mit kleinen Stichprobenumfängen verwendet:

Ho: $\mu_1 = \mu_2$

$$t = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}} \quad (14)$$

Der berechnete Wert (**Gleichung (14)**) wird mit Hilfe der zugehörigen Tabelle verglichen [32]:

Wenn $t < t_{0.95;n_1+n_2-2}$: Ho wird akzeptiert

Vertrauensbereich:

Die Vertrauensbereiche (95 % und 70 %) werden mit Hilfe der *GraphPad Prism 5* Software berechnet.



3. Experimenteller Teil (Resultate)

Wie in der Einleitung erwähnt, kann die Stabilität von Dichlorvos ein problematischer Faktor sein. Obwohl jede Lösung vor dem Testverfahren immer frisch vorbereitet wurde, war es interessant sich zu versichern, dass Dichlorvos bei Raumtemperatur nicht so schnell abgebaut wird. Nach Diskussion mit der Chemieabteilung (Dr. Urs Meier) wurde die Stabilität von Dichlorvos mit der NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) bestimmt. Wie im **Anhang I** zu sehen ist, wird keine entscheidende Zersetzung beobachtet. Das Dichlorvos bleibt unter den Bedingungen nach 36 Stunden mit > 90 % noch rein. Es entsteht also keine Sorge, dass eine eventuelle Zersetzung dieser Substanz einen Einfluss auf die verschiedenen Testverfahren haben könnte.

3.1. Biologischer Toxtest mit ARTOXKIT™

Für jeden Test wurden immer neue Artemien angesetzt. Die Lösungen wurden ebenfalls vor jedem Test neu vorbereitet. Die Arbeitskonditionen waren immer die Gleichen (Punkt **2.2.1**).

3.1.1. Atropin

Mit dieser Testsubstanz wurde keine Wirkung auf die Artemien festgestellt. Alle Tierchen waren nach 24 Stunden noch lebendig. Sie waren sehr angeregt. Als Sicherheit wurde ein zweiter Test durchgeführt. Jedoch wurden die gleichen Ergebnisse observiert. Beim zweiten Test wurden die Artemien sogar 72 Stunden inkubiert, um eine eventuelle Wirkung bei verlängertem Kontakt zu beobachten. Jedoch waren auch da keine toten Artemien zu zählen.

3.1.2. Dichlorvos

Um eine statistische Bearbeitung der Werte zu machen, wurden für diese Testsubstanz fünf Tests ausgeführt (in verschiedenen Farben dargestellt). Wie auf **Bild 16** beobachtet werden kann, wurden die Werte mit Hilfe einer Hill-Funktion in einer Sigmoidalkurve bearbeitet. Die Tierchen waren 24 Stunden alt.

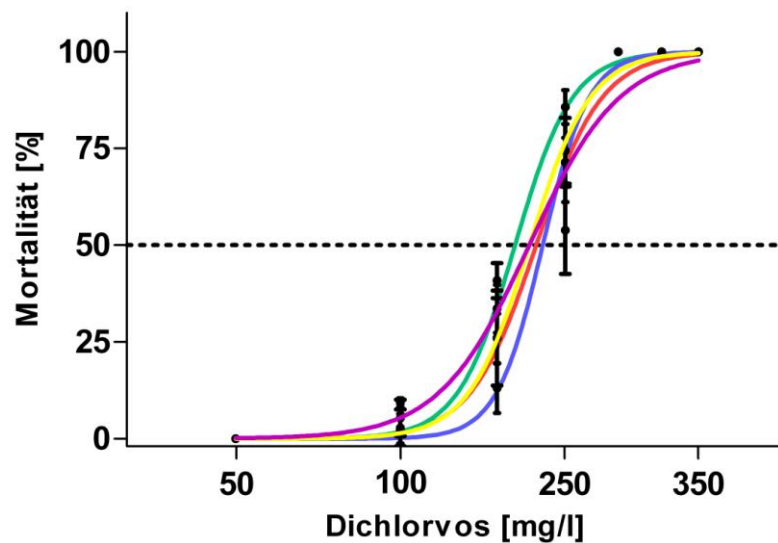


Bild 16 : Mortalitätsrate der Artemien in Funktion der Konzentration an Dichlorvos. Jede Farbe bildet einen Test ab, welcher während fünf Wochen jede Woche durchgeführt wurde. Test 1 (blau), Test 2 (grün), Test 3 (violett), Test 4 (gelb) und Test 5 (rot). Messwerte (•) und Standardabweichungen (I). Die Kurven entsprechen der sigmoidalen Regression. Um die Ergebnisse besser zu beobachten, wurden die Konzentrationen auf der x-Achse logarithmisch dargestellt.

Es ist deutlich zu sehen, dass bei ca. 100 mg/l Dichlorvos ein Teil der Artemien schon durch die Wirkung dieser Substanz beeinflusst werden und bei 250-300 mg/l alle Testtiere nach 24 Stunden tot sind. Die violette Kurve zeigt im Gegenteil zu den vier anderen Kurven nicht die gleiche Streuung (Tiefster und höchster Bereich der Kurve). Mit einem Korrelationskoeffizient von **0.967** könnte dieser 3. Test wiederholt werden, auch wenn der LD₅₀-Wert nah dem Mittelwert steht. Ein neuer Batch von Dichlorvos könnte eine Erklärung für diese Kurve sein. Aus den fünf Tests wurde für jeden Messpunkt der Variationskoeffizient (CV) berechnet (Intra-Assay Streuung) um die Wiederholbarkeit zu überprüfen. Daraus entstand die Grafik von **Bild 17**.

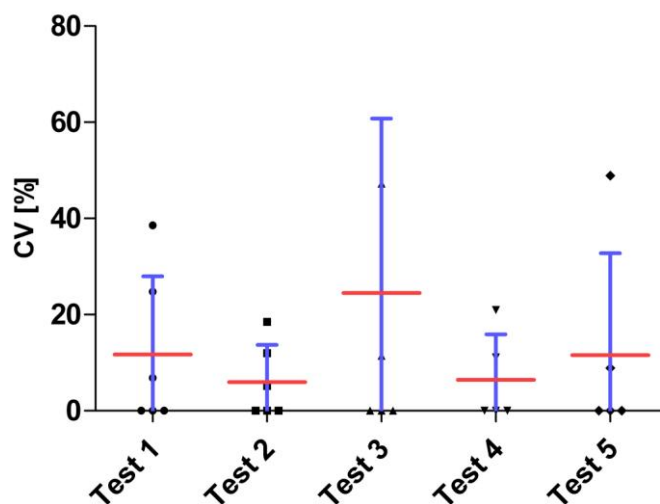


Bild 17: Intra-Assay Streuung der fünf Tests mit Dichlorvos. Punkte = CV % (Variationskoeffizient). Rote horizontale Linie = CV Mittelwert. Blaue vertikale Linie = Streuung der Werte. Ausreisser wurden nicht dargestellt.

Bei den höchsten und tiefsten Konzentrationen ist keine Streuung zu beobachten. Jedoch wird sie dazwischen bemerkbar und gross (Test 3). Im Durchschnitt erreicht die Intra-Assay Streuung einen Wert zwischen ca. **5 %** bis **25 %**.

Mit Hilfe der Hill-Funktion (**Anhang IIB**) wurden folgende LD₅₀-Werte bestimmt (**Tabelle 5**):

Tabelle 5 : LD₅₀-Werte für Dichlorvos auf Artemien.

Test Nr	LD ₅₀ [mg/l]	Vertrauensbereich (95 %)
1 (blau)	181.9	177.6 - 186.3
2 (grün)	161.9	155.1 - 169.0
3 (violet)	176.9	167.3 - 187.1
4 (gelb)	171.9	165.5 - 178.6
5 (rot)	180.5	123.6 - 263.7
Mittelwert	174.6 ± 9.2	
	(8.1 ; 5 ; 95 %)	

Es wurde geprüft ob der kleinste und der grösste Wert ein Ausreisser ist. Dafür wurde der Dixon Test (**Gleichung (11)** und **(12)**) in einem Vertrauensbereich von 95 % verwendet. Das Ergebnis lag für den kleinsten Wert bei **0.5** und bei dem grössten Wert bei **0.1**. Mit der Literatur [32] verglichen, waren diese zwei Werte kleiner als der angegebene Wert (0.642). Es wurde also kein Ausreisser beobachtet. Der kleinste sowie der grösste Wert lagen beide in der Normalverteilung.

Ein Variationskoeffizient (Inter-Assay Streuung) von **4.6 %** wurde mit **Gleichung (13)** berechnet. Da in der biologischen Analytik ein Variationskoeffizient von ca. 20 % akzeptiert, wird diese Streuung um den mittleren Wert gering.

3.1.3. Kaliumdichromat

Bei dieser Substanz wurde ebenfalls eine Hill-Funktion benutzt um den LD_{50} -Wert zu bestimmen. Wie für Dichlorvos wurden fünf Tests durchgeführt (auch in verschiedenen Farben dargestellt) und dies mit 24 Stunden alten Tieren.

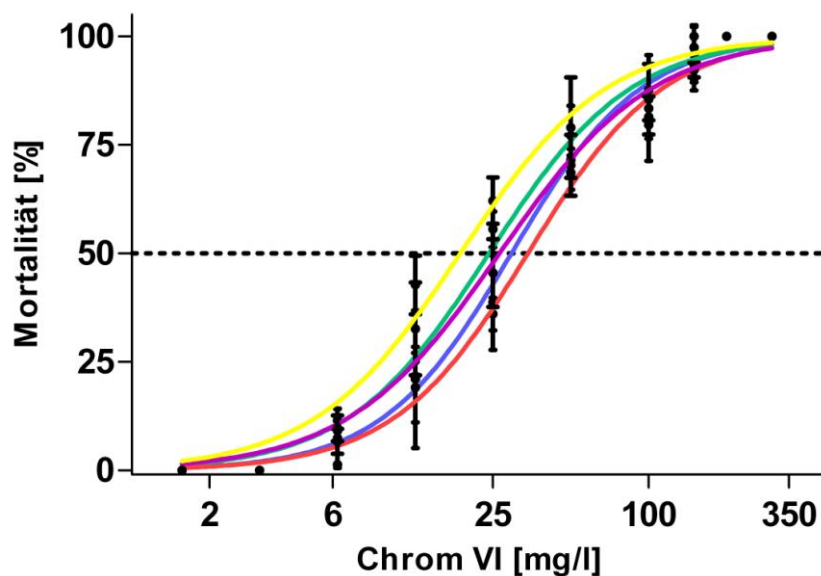


Bild 18 : Mortalitätsrate der Artemien in Funktion der Konzentration an Chrom VI. Jede Farbe bildet einen Test ab, welcher während fünf Wochen jede Woche durchgeführt wurde. Test 1 (blau), Test 2 (grün), Test 3 (violett), Test 4 (gelb) und Test 5 (rot). Messwerte (•) und Standardabweichungen (I). Die Kurven entsprechen der sigmoidalen Regression. Um die Ergebnisse besser zu beobachten, wurden die Konzentrationen auf der x-Achse logarithmisch dargestellt.

Auf **Bild 18** wird beobachtet, dass Kaliumdichromat schon ab einer Konzentration von 6.25 mg/l eine Wirkung auf die Artemien zeigt und sie ab 150 mg/l kaum noch eine Überlebungs-Chance haben.

Wie für Dichlorvos wurde die Intra-Assay Streuung berechnet und auf **Bild 19** dargestellt.

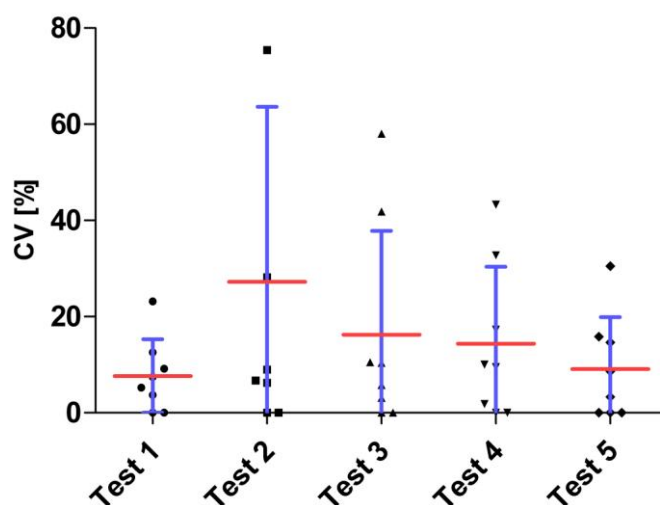


Bild 19: Intra-Assay Streuung der fünf Tests mit Kaliumdichromat. Punkte = CV % (Variationskoeffizient). Rote horizontale Linie = CV Mittelwert. Blaue vertikale Linie = Streuung der Werte. Ausreisser wurden nicht dargestellt.

Die gleiche Beobachtung wie für Dichlorvos wurde gemacht ausser, dass im Durchschnitt die Streuung zwischen ca. 10 % bis 30 % liegt.

Die LD₅₀-Werte wurden mit der Hill-Funktion (**Anhang IIC**) berechnet. Die Ergebnisse sind in der **Tabelle 6** zu sehen.

Tabelle 6 : LD₅₀-Werte für Chrome VI auf Artemien.

Test Nr	LD ₅₀ [mg/l]	Vertrauensbereich (95 %)
1 (blau)	29.4	25.4 – 34.1
2 (grün)	24.1	21.4 – 27.2
3 (violet)	26.4	22.6 – 31.1
4 (gelb)	18.7	15.0 – 23.2
5 (rot)	34.1	29.7 – 39.1
Mittelwert	26.5 ± 6.4 (5.8; 5; 95 %)	

Der Dixon Test (**Gleichung (11)** und **(12)**) deutet darauf hin, dass kein Ausreisser zu beobachten ist. Der kleinste Wert lag bei **0.3** und der grösste Wert bei **0.3** also unterhalb des Grenzwertes von 0.642.



Der Variationskoeffizient (Inter-Assay Streuung) von **21.9 %** zeigt jedoch eine grosse Streuung der Werte um den Mittelwert (**Gleichung (13)**). Auch wenn die zwei Extrem-Werte keine Ausreisser sind, haben sie ein bestimmender Einfluss auf den Variationskoeffizient.

Da diese Testsubstanz als Referenz für den Artemien Test verwendet wird und die nötigen Werte bekannt sind (30.9 mg/l (26.7 – 35.6). Mittelwert (95 %) *Specification Sheet*), wurde einen *t-Test* mit **Gleichung (14)** durchgeführt um die Mittelwerte zu vergleichen. Den Ergebnissen gemäss, stehen die zwei Mittelwerte in einem Vertrauensbereich von **95 %** in der gleichen Gesamtheit.

3.1.4. Ricin

Für Ricin wurden die gleichen Ergebnisse wie bei Atropin festgestellt. Auch hier wurde ein zweiter Test durchgeführt und keine Änderung beobachtet. Im Gegensatz zu Atropin wurde bei diesem zweiten Test die Kontaktzeit nicht verlängert.

3.2. Biologischer Toxtest mit Leuchtbakterien

Für diesen Test wurden die Testsubstanzen jeweils frisch vorbereitet. Jeder Test wurde in einer 2-fachen Bestimmung durchgeführt. Für jedes Experiment wurden neue Bakterien verwendet, die vom gleichen Batch vorhanden waren. Um einen besseren Einblick in die Ergebnisse zu erhalten, wurden die Abbildungen nicht in einem logarithmischen System abgebildet, sondern in effektive Hemmungen und Konzentrationen. Aus diesem Grund sind auch Hemmungen ($< 10\%$) zu beobachten. Details sind auf Anhänge III zu finden. Aus diesen Seiten wurden die Ergebnisse mit **Gleichungen (1), (2), (3), (4) und (5)** berechnet.

3.2.1. Atropin

Um einen visuellen Einblick über die Hemmung der Lumineszenz in Funktion der Konzentration zu bekommen, sind die Ergebnisse für diese Testsubstantz auf **Bild 20** dargestellt.

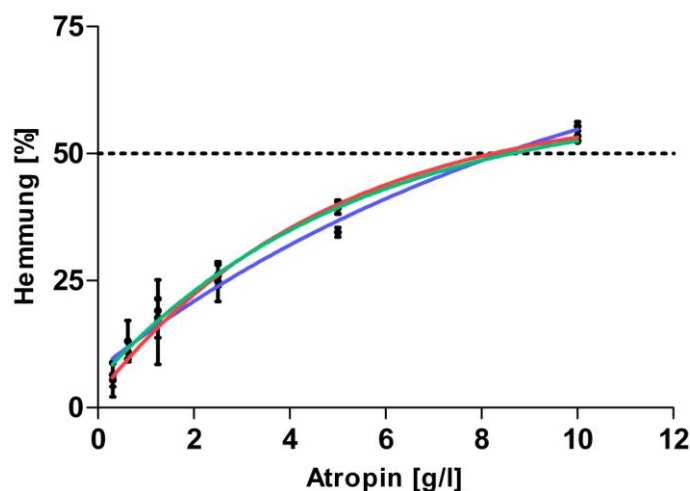


Bild 20 : Leuchthemmung der Bakterien in Funktion der Konzentration an Atropin. Test 1 (blau), Test 2 (rot) und Test 3 (grün). Messwerte (•) und Standardabweichungen (I). Die Kurven entsprechen einer nicht-linearen Regression.

Bei allen drei Tests war es mit 10 g/l unmöglich eine höheren Hemmung ($> 60\%$) zu erreichen. Auch bei hohen Konzentrationen wird keine vollständige Hemmung erreicht. Deshalb wurden auch nur drei Versuche durchgeführt.

Die Wiederholbarkeit des Tests mit Atropin ist auf **Bild 21** zu sehen.

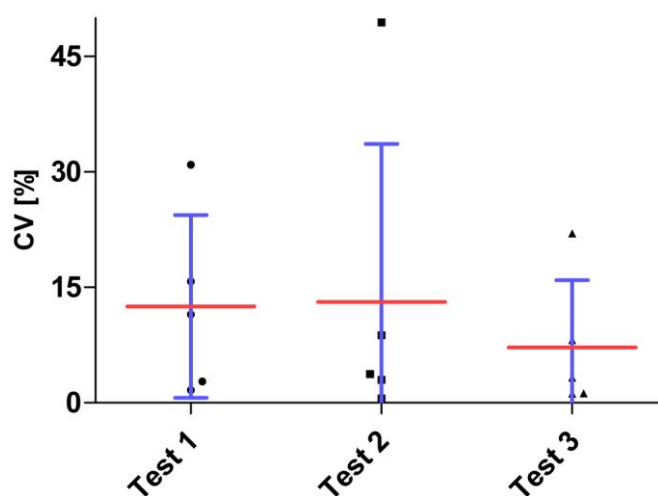


Bild 21: Intra-Assay Streuung der drei Tests mit Atropin. Punkte = CV % (Variationskoeffizient). Rote horizontale Linie = CV Mittelwert. Blaue vertikale Linie = Streuung der Werte.

Im Vergleich zum **Bild 20** sind die Streuungen der Werte bei kleinen Konzentrationen markanter. Im Durchschnitt liegt die Intra-Assay Streuung zwischen ca. 7 % und 13 %.

Wie im **Anhang IIIA** zu sehen ist, wurden die Hemmungswerte sowie die Konzentrationswerte in einem logarithmischen System für die Berechnung der EC_{50} -Werte übertragen (**Gleichung (5)**). Die Ergebnisse sind in **Tabelle 7** dargestellt.

Tabelle 7 : EC_{50} -Werte für Atropin auf Leuchtbakterien.

Test Nr	EC_{50} [g/l]	Vertrauensbereich (95 %)
1 (blau)	9.1	7.6 - 10.6
2 (rot)	8.3	6.8 - 9.8
3 (grün)	9.5	8.0 - 10.9
Mittelwert	8.9 ± 1.1 (0.6 ; 3 ; 95 %)	

Auch wenn eine statistische Bearbeitung von drei Werten wenig Sinn macht, wurde trotzdem ein Variationskoeffizient von 6.7 % mit **Gleichung (13)** berechnet. Die Streuung der Werte steht (wie man es auch grafisch sehen kann) unterhalb der Grenz-Akzeptanz. Der Test wurde als Gültig betrachtet da die drei Korrekturfaktoren unterhalb des Kriteriums lagen. Es wurden für den Test Korrekturfaktoren von 1.26, 1.34 und 1.29 [-] mit **Gleichung (1)** berechnet.

3.2.2. Dichlorvos

Um eine statistische Bearbeitung der Werte durchzuführen, wurden für diese Testsubstanz fünf Versuche ausgeführt.

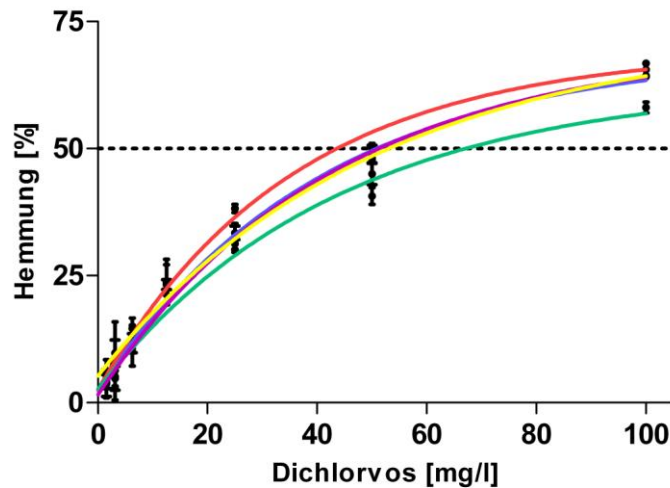


Bild 22: Leuchthemmung der Bakterien in Funktion der Konzentration an Dichlorvos. Test 1 (blau), Test 2 (rot), Test 3 (grün), Test 4 (violett) und Test 5 (gelb). Messwerte (•) und Standardabweichungen (I). Die Kurven entsprechen einer nicht-linearen Regression.

Wie auf **Bild 22** zu sehen ist, liegt die Spannweite ab 25 mg/l zwischen dem 2. Test und den 3. Test bei **ca. 10 %**. Die Streuung der Werte ist grösser als beim vorhergehenden Test mit Atropin. Für Dichlorvos wurde ebenfalls die Intra-Assay Streuung bestimmt (**Bild 23**).

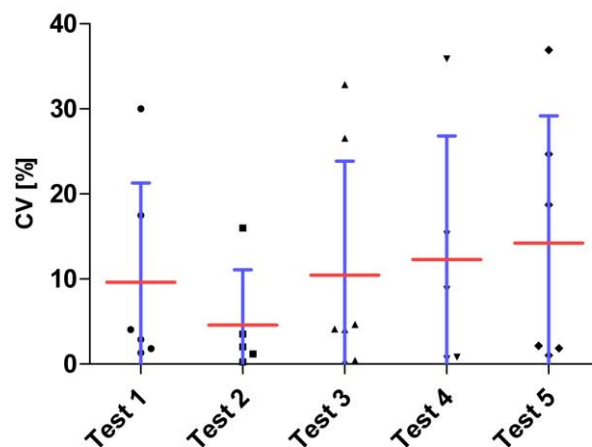


Bild 23: Intra-Assay Streuung der fünf Tests mit Dichlorvos. Punkte = CV % (Variationskoeffizient). Rote horizontale Linie = CV Mittelwert. Blaue vertikale Linie = Streuung der Werte. Ausreisser wurden nicht dargestellt.



Die gleiche Beobachtung wie für Atropin wurde hier gemacht. Die mittlere Intra-Assay Streuung liegt zwischen ca. **5 % bis 15 %**. Bei höheren Konzentrationen an Dichlorvos ist die Streuung klein.

Für die Berechnung der EC_{50} -Werte wurde mit **Gleichung (5)** eine logarithmische Linearisierung durchgeführt (**Anhang IIIB**). Die Ergebnisse sind in **Tabelle 8** dargestellt.

Tabelle 8 : EC_{50} -Werte für Dichlorvos auf Leuchtbakterien.

Test Nr	EC_{50} [mg/l]	Vertrauensbereich (95 %)
1 (blau)	53.6	27.8 - 79.4
2 (rot)	46.4	20.6 - 72.2
3 (grün)	68.5	42.7 - 94.3
4 (violet)	53.7	27.9 - 79.5
5 (gelb)	54.3	28.5 - 80.1
Mittelwert	55.3 ± 9.3 (8.1; 5; 95 %)	

Dem Dixon Test (**Gleichung (11)** und **(12)**) gemäss wurde ein Ausreisser festgestellt. Für den kleineren Wert wurde **0.3** berechnet und für den grösseren Wert (68.5 mg/l) wurde **0.643** berechnet, also knapp an der Grenze. Der neue Mittelwert gibt **52.0 ± 5.5 mg/l (3.7; 4; 95 %)**. Auch die Streuung der Werte wurde mit **Gleichung (13)** bestimmt und befindet sich mit **14.6 %** im Rahmen der 20 %. Der Test wurde als Gültig betrachtet da die fünf Korrekturfaktoren unterhalb des Kriteriums lagen. Es wurden für den Test Korrekturfaktoren von 1.50, 1.15, 1.66, 1.26 und 1.46 [-] mit **Gleichung (1)** berechnet.

3.2.3. Kaliumdichromat

Für diese Testsubstanz wurden drei Versuche durchgeführt, welche grafisch im **Bild 24** dargestellt sind.

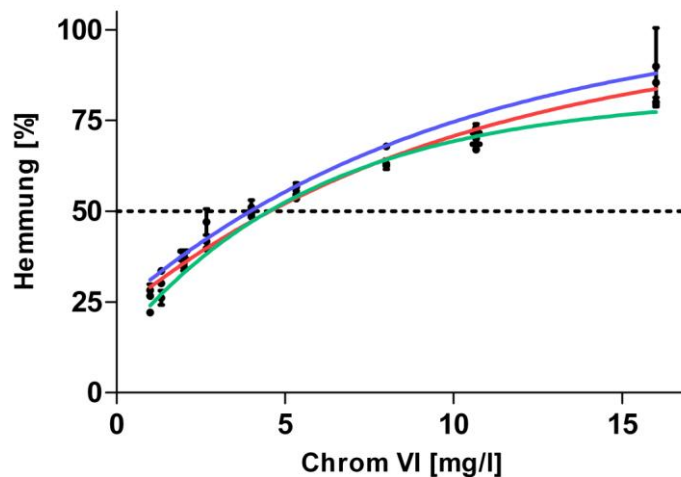


Bild 24: Leuchthemmung der Bakterien in Funktion der Konzentration an Chrom VI. Test 1 (blau), Test 2 (rot) und Test 3 (grün). Messwerte (•) und Standardabweichungen (I). Die Kurven entsprechen einer nicht-linearen Regression.

Im Gegenteil zum vorhergehenden Test mit Dichlorvos scheint die Streuung geringer zu sein. Bei höheren Konzentrationen (ca. 8 mg/l) wird die Spannweite zwischen den 1. Test und den 3. Test etwas grösser so dass man bei 75 % Hemmung schon einen Konzentrations-Unterschied von ca. 3 mg/l.

Die Streuungen der Werte mit Kaliumdichromat sind auf **Bild 25** dargestellt.

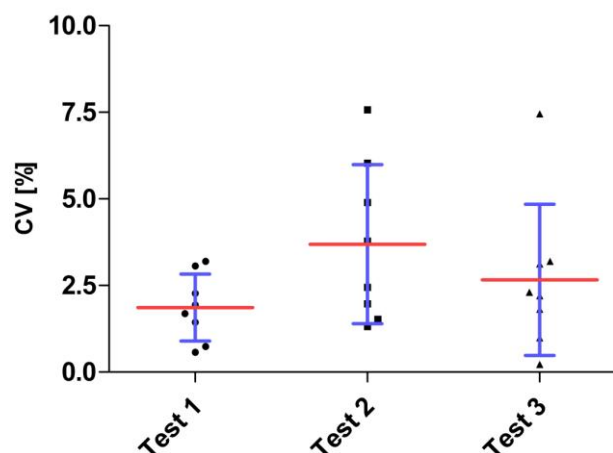


Bild 25: Intra-Assay Streuung der drei Tests mit Chrom VI. Punkte = CV % (Variationskoeffizient). Rote horizontale Linie = CV Mittelwert. Blaue vertikale Linie = Streuung der Werte. Ausreisser wurden nicht dargestellt.



Die geringen Konzentrationen mit denen gearbeitet wurde ergaben kleine Intra-Assay Streuungen. Im Durchschnitt zwischen ca. **2 %** und **4 %**. Die Werte zerstreuen stark.

Wie bei Dichlorvos wurden hier die Funktionen mit **Gleichung (5)** linearisiert (**Anhang IIIC**), um die EC₅₀-Werte zu bestimmen (**Tabelle 9**).

Tabelle 9 : EC₅₀-Werte für Chrome VI auf Leuchtbakterien.

Test Nr	EC ₅₀ [mg/l]	Vertrauensbereich (95 %)
1 (blau)	3.1	0.5 - 5.7
2 (rot)	3.6	1.0 - 6.2
3 (grün)	4.4	1.8 - 7.0
Mittelwert	3.7 ± 1.2 (0.6 ; 3 ; 95 %)	

Ein Variationskoeffizient von **16.2 %** wurde mit **Gleichung (13)** berechnet und deutet darauf hin, dass die Inter-Assay Reproduzierbarkeit akzeptabel ist. Da diese Substanz in diesem Test als Referenz steht, konnten die gemessenen Ergebnisse mit der Literatur [31] verglichen werden. Zwischen den beiden Mittelwerten wurde eine Differenz von ca. **5 %** beobachtet, welche gering ist gegenüber der Toleranz (25 %) die sie voraussetzen. Der Test wurde als Gültig betrachtet da die drei Korrekturfaktoren unterhalb des Kriteriums lagen. Es wurden für den Test Korrekturfaktoren von 1.09, 1.26 und 1.30 [-] mit **Gleichung (1)** berechnet.

3.2.4. Ricin

Wie auf **Bild 26** zu beobachten ist, wurde mit Ricin kein erfolgversprechendes Ergebnis auf eine eventuelle Leuchthemmung festgestellt.

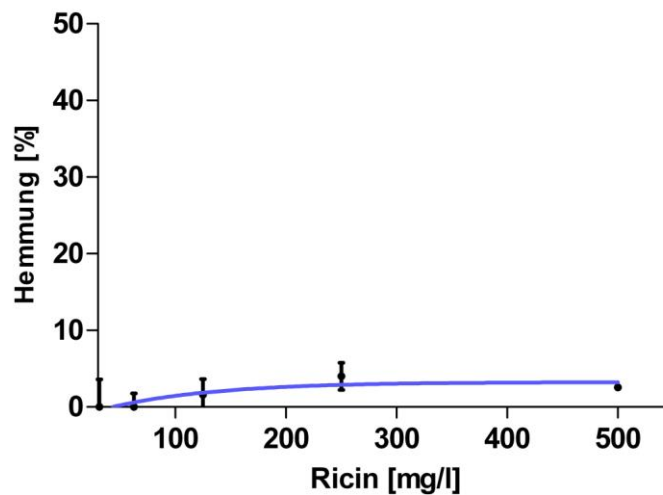


Bild 26 : Leuchthemmung der Bakterien in Funktion der Konzentration an Ricin. Messwerte (•) und Standardabweichungen (I). Die Kurven entsprechen einer nicht-linearen Regression.

Wie zu erwarten war und auf **Bild 26** zu beobachten ist, hat Ricin kein bestimmender Einfluss auf das Leuchten der Bakterien. Die leichte Hemmung von 4-5 % bei 250 mg/l scheint eher die Konsequenz einer Messstörung zu sein. Jedoch wurde mit einem Korrekturfaktor von 1.20 [-] der Test (methodisch gesehen) als Gültig betrachtet.

3.3. Zytotoxizität Test mit BALB 3T3 Klon 31 Zellen

Für diesen Test wurden die Testsubstanzen vor jedem Testdurchgang frisch vorbereitet. Der Zustand der Zellen bzw. die Konfluenz wurde so gut wie möglich bei 50 % gehalten. Jeder Test wurde in einer 3-fachen Bestimmung mit Zellen aus einer neuen Passage durchgeführt. Bei diesem biologischen Test wurde entschieden mit einem 70 % Vertrauensbereich anstatt 95 % zu arbeiten, weil die Streuung der Wert nicht gering war und um die Toleranz etwas zu verkleinern. Als erstes wurden die Wachstumseigenschaften der BALB-Zellen bestimmt.

3.3.1. Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate und der Verdopplungszeit

Während 96 Stunden wurden alle 24 Stunden die Zellen unter dem Mikroskop gezählt, um die spezifische Wachstumsrate, sowie die Verdopplungszeit auszurechnen. Um diese zu bestimmen, wurden Zellen aus der 12. Passage genommen, welche ca. 80 % konfluent waren.

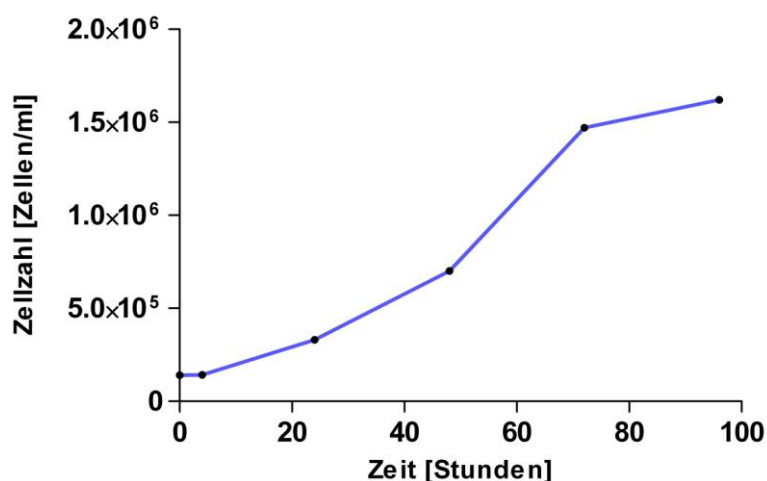


Bild 27 : Wachstumskurve während 96 Stunden Kultur bei 37 °C und 5 % CO₂.



Auf **Bild 27** sieht man eindeutig die drei Wachstumsphasen. Nach 4 Stunden Kultur befinden sich die Zellen noch in der Lag-Phase in welcher die Zellen sich an die Kulturbedingungen anpassen müssen. In dieser Zeit werden neue Verbindungen mit der Flaschenoberfläche hergestellt. Nach 24 Stunden befinden sich die Zellen während 3 Tage in der Wachstumsphase. Danach liegt die Konfluenz der Zellen bei ca. 100 %. Ab diesem Zeitpunkt ist anzunehmen, dass die stationäre Phase anfängt.

Mit Hilfe dieser Kurve und **Gleichungen (8) und (9)** konnte die spezifische Wachstumsrate μ_{\max} und die Verdopplungszeit td bestimmt werden. Diese erreichen **0.032 h⁻¹** und **21.66 h**. Diese Werte entsprechen den Daten aus der SOP [31].

3.3.2. Atropin

Mit dieser Testsubstanz wurde keine Wirkung auf die BALB Zellen festgestellt. Im **Anhang IVA** ist zu erkennen, dass die Absorption mit der Abnahme der Konzentration quasi konstant bleibt. Aus diesem Grund konnte die Absorption nicht in Prozent umgewandelt werden, da die kleinste und die grösste Absorption bei 0 % und 100 % liegen würden. Eine leichte Absorptionsvariation würde eine Wirkung des Atropin zeigen, obwohl keine beobachtet wurde. Man hätte dann ein falscher positiver Test.

3.3.3. Dichlorvos

Mit dieser Testsubstanz wurden drei Tests durchgeführt. Um die LD₅₀-Werte zu bestimmen wurde eine Hill-Funktion benutzt. Mehr Details über den Test sind im **Anhang IVB** erhältlich.

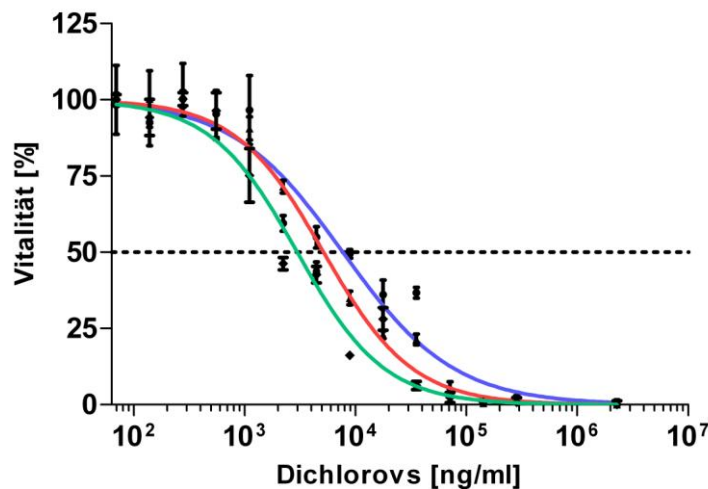


Bild 28: Vitalitätsrate der BALB Zellen in Funktion der Konzentration an Dichlorvos. Jede Farbe bildet einen Test ab. Test 1 (blau), Passage Nr 9, ca. 50 % Konfluenz; Test 2 (rot), Passage Nr 11, > 50 % Konfluenz; Test 3 (grün), Passage Nr 13, > 50 % Konfluenz. Messwerte (•) und Standardabweichungen (I). Die Kurven entsprechen der sigmoidalen Regression. Um die Ergebnisse besser zu beobachten, wurden die Konzentrationen auf der x-Achse logarithmisch dargestellt.

Auf **Bild 28** wird beobachtet, dass ab einer Konzentration von ca. 550 ng/ml Dichlorvos die Zellen anfangen zu sterben. Bei ca. $1.5 \cdot 10^5$ ng/ml sind keine lebenden Zellen mehr zu finden. Ebenfalls wird beobachtet, dass je kleiner die Konzentration wird, desto grösser wird die Standardabweichung.

Aus den fünf Tests wurde für jeden Messpunkt die Intra-Assay Streuung berechnet, um die Wiederholbarkeit zu überprüfen (**Bild 29**).

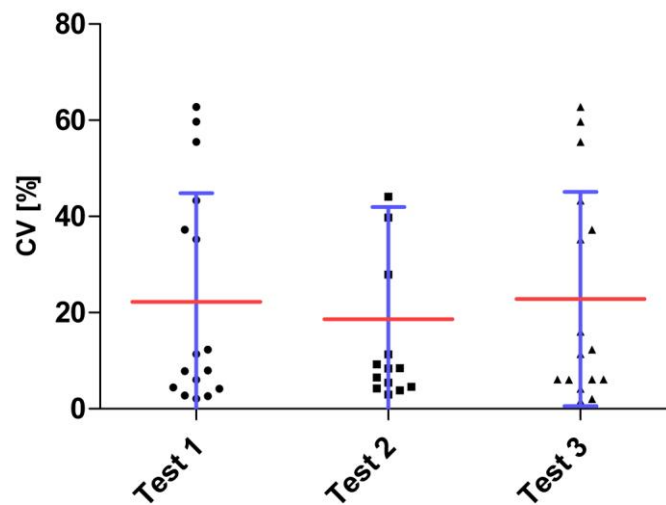


Bild 29: Intra-Assay Streuung der drei Tests mit Dichlorvos. Punkte = CV % (Variationskoeffizient). Rote horizontale Linie = CV Mittelwert. Blaue vertikale Linie = Streuung der Werte. Ausreisser wurden nicht dargestellt.

Bei hohen Konzentrationen wird beobachtet, dass die Streuung der Werte unterhalb von 20 % liegt und, dass die CV- Werte präzise versammelt sind. Mit **Bild 28** verglichen, sieht man dass ab ca. 1000 ng/ml Dichlorvos bis 70 ng/ml diese Streuung steigt und hohe CV-Werte erreicht (bis ca. 60 %). Im Durchschnitt liegt die Intra-Assay Streuung höher als bei den vorhergehenden Test mit den Leuchtbakterien. Sie erreicht ca. **20 %**.

In der **Tabelle 10** wurden folgende LD₅₀-Werte dank der Hill Funktion (**Anhang IVB**) berechnet.

Tabelle 10: LD₅₀-Werte für Dichlorvos auf BALB 3T3 Klon 31 Zellen.

Test Nr	LD ₅₀ [ng/ml]	Vertrauensbereich (70 %)
1 (blau)	7690	6399 - 9241
2 (rot)	5157	4680 - 5682
3 (grün)	2981	2613 - 3401
Mittelwert	5276 ± 1359 (2356; 3; 70 %)	

Ein Variationskoeffizient von **44.6 %** wurde mit **Gleichung (13)** berechnet. Die Streuung ist, wie auch grafisch zu sehen, nicht gering. Jedoch ergibt der Dixon Test keinen Ausreisser. Es ist zu beobachten, dass der LD₅₀-Wert abhängig vom Zustand der Zellen ist. Die Konfluenz ist also ein entscheidender Faktor für die Bestimmung dieses Wertes und ebenfalls für die Reproduzierbarkeit des Testes. Mehr darüber wird in der Diskussion gegeben.

3.3.4. Kaliumdichromat

Mit Kaliumdichromat wurden ebenfalls drei Tests durchgeführt. Um die LD₅₀-Werte zu bestimmen wurde eine Hill-Funktion benutzt. Mehr Details über den Test sind im **Anhang IVC** erhältlich.

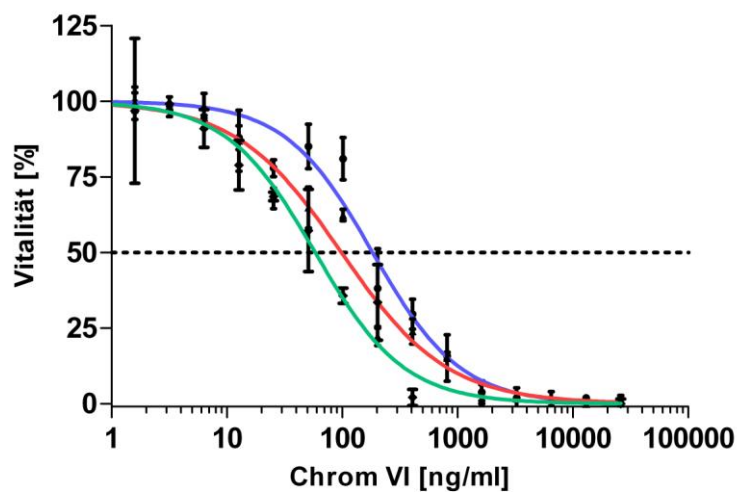


Bild 30: Vitalitätsrate der BALB Zellen in Funktion der Konzentration an Chrom VI. Jede Farbe bildet einen Test ab. Test 1 (blau), Passage Nr 9, ca. 50 % Konfluenz; Test 2 (rot), Passage Nr 11, > 50 % Konfluenz; Test 3 (grün), Passage Nr 13, > 50 % Konfluenz. Messwerte (•) und Standardabweichungen (I). Die Kurven entsprechen der sigmoidalen Regression. Um die Ergebnisse besser zu beobachten, wurden die Konzentrationen auf der x-Achse logarithmisch dargestellt.

Auf **Bild 30** wird beobachtet, dass ab einer Konzentration von ca. 5 ng/ml Chrom VI (ca. 14 ng/ml Kaliumdichromat) die Zellen anfangen zu sterben. Bei ca. 6500 ng/ml sind keine lebenden Zellen mehr zu finden. Wie bei Dichlorvos wird die Standardabweichung im kleinen Konzentrationsbereich grösser. Diese Streuung ist auf **Bild 31** dargestellt.

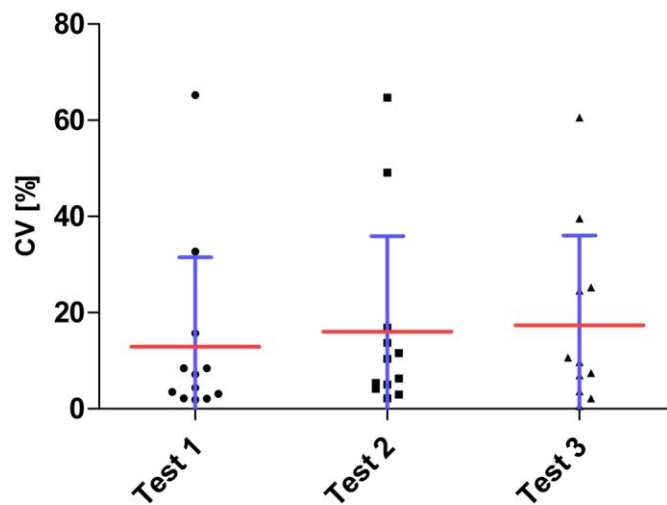


Bild 31: Intra-Assay Streuung der drei Tests mit Chrom VI. Punkte = CV % (Variationskoeffizient). Rote horizontale Linie = CV Mittelwert. Blaue vertikale Linie = Streuung der Werte. Ausreisser wurden nicht dargestellt.

Die gleichen Beobachtungen wie mit Dichlorvos können hier gemacht werden. Bei hohen Konzentrationen (von ca. 1000 ng/ml) liegt die Streuung der Werte unterhalb 20 %, die CV- Werte sind präzise versammelt. Von 1 ng/ml bis 1000 ng/ml werden die Streuungen grösser und erreichen hohe CV-Werte. Im Durchschnitt erreicht die Intra-Assay Streuung ca. 15 %.

In der **Tabelle 11** wurden folgende LD₅₀-Werte dank der Hill Funktion (**Anhang IVC**) berechnet.

Tabelle 11: LD₅₀-Werte für Chrom VI auf BALB 3T3 Klon 31 Zellen.

Test Nr	LD ₅₀ [ng/ml]	Vertrauensbereich (70 %)
1 (blau)	183.4	161.8 - 208.0
2 (rot)	98.4	86.7 - 111.7
3 (grün)	58.2	49.7 - 68.1
Mittelwert	113.3 ± 36.9 (63.9; 3; 70 %)	

Ein Variationskoeffizient von 56.4 % wurde mit **Gleichung (13)** berechnet. Die Streuung ist, wie es auch grafisch zu sehen, nicht gering. Es wurde jedoch keinen Ausreisser berechnet. Wie bei Dichlorvos ist auch hier der LD₅₀-Wert abhängig vom Zustand der Zellen.

3.3.5. Ricin

Da diese Testsubstanz in einem anderen Test (andere Person) zum Nachweis der Toxizität auf Vero-Zellen (Nierenzellen von Meerkatze) verwendet wurde und eine toxische Wirkung zu beobachten war, wurde Ricin bei diesem Test als positive Kontrolle verwendet. Um eine statistische Bearbeitung der Werte durchzuführen, wurden 5 Tests ausgeführt. Die LD₅₀-Werte wurden mit einer Hill-Funktion bestimmt. Mehr Details über den Test sind im **Anhang IVD** erhältlich.

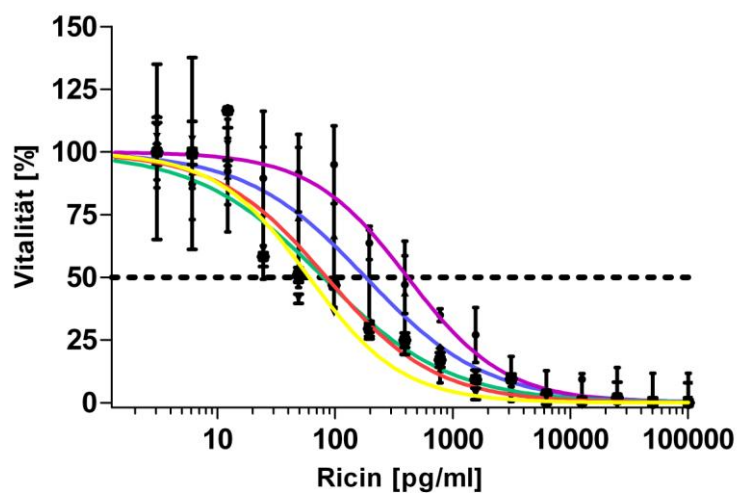


Bild 32: Vitalitätsrate der BALB Zellen in Funktion der Konzentration an Ricin. Jede Farbe bildet einen Test ab. Test 1 (blau), Passage Nr 7, ca. 50 % Konfluenz; Test 2 (rot), Passage Nr 9, ca. 50 % Konfluenz; Test 3 (grün), Passage Nr 11, > 50 % Konfluenz; Test 4 (gelb), Passage Nr 13, > 50 % Konfluenz; Test 5 (violett), Passage Nr 15, ca. 50 % Konfluenz. Messwerte (•) und Standardabweichungen (I). Die Kurven entsprechen der sigmoidalen Regression. Um die Ergebnisse besser zu beobachten, wurden die Konzentrationen auf der x-Achse logarithmisch dargestellt.

Auf **Bild 32** wird beobachtet, dass schon ca. 5 pg/ml Ricin eine Wirkung auf die Fibroblasten zeigt. Ab ca. 3000 pg/ml sind die meisten Zellen schon tot. Man beobachtet für die blaue Kurve (im Gegenteil zu den anderen Kurven) grosse Standardabweichungen. Beim ersten Test (blau) wurde mit einer manuellen Multi-Chanel Pipette gearbeitet, welche für diese empfindliche Methode nicht optimal war. Dies erklärt weshalb die Intra-Assay Streuung gross ist. Die Streuung der Werte für die fünf Tests ist ebenfalls nicht zu vernachlässigen. Obwohl es sich um einen biologischen und sensitiven Test handelt, wäre ein Ausreisser auf den ersten Blick anzunehmen.

Die Intra-Assay Streuung wurde für jeden Test bestimmt. Auf **Bild 33** ist sie grafisch dargestellt.

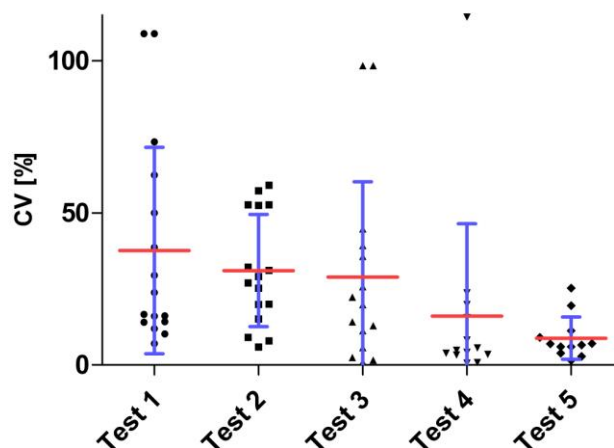


Bild 33: Intra-Assay Streuung der fünf Tests mit Ricin. Punkte = CV % (Variationskoeffizient). Rote horizontale Linie = CV Mittelwert. Blaue vertikale Linie = Streuung der Werte. Ausreisser wurden nicht dargestellt.

Wie für die anderen Testsubstanzen ist die Streuung bei kleineren Konzentrationen grösser. Auf **Bild 33** wird beobachtet, dass einige CV sogar über 100 % erreichen. Diese Werte zeigen, dass dieser Test sehr empfindlich ist und eine leichte Variation (Konzentration) schon einen grossen Fehler ergibt. Bei grösseren Konzentrationen (ca. ab 700 pg/ml) befinden sich die Intra-Assay Streuungen zwischen ca. 0.5 % und 30 %. Im Durchschnitt erreichen sie ca. 10 % bis 40 %. Der Test Nr 5 zeigt interessante Ergebnisse. Die Streuung ist gering, 82 % der CV-Werte liegen dem Mittelwert genau und präzise.

In der **Tabelle 12** wurden folgende LD₅₀-Werte dank der Hill Funktion (**Anhang IVD**) berechnet.

Tabelle 12 : LD₅₀-Werte für Ricin auf BALB 3T3 Klon 31 Zellen.

Test Nr	LD ₅₀ [pg/ml]	Vertrauensbereich (70 %)
1 (blau)	181.6	162.5 - 202.8
2 (rot)	84.5	67.6 - 105.6
3 (grün)	79.2	66.8 - 93.8
4 (gelb)	60.1	49.9 - 72.4
5 (violet)	412.9	364.1 - 468.3
Mittelwert	163.7 ± 65.8 (147.1; 5; 70 %)	



Der Dixon Test (**Gleichung (11)** und **(12)**) zeigt, dass die zwei höchsten Werte (181.6 und 412.9) in einem Vertrauensbereich von 70 % Ausreisser sind. Beide ergaben höhere Werte (**0.655** und **0.799**) als 0.373. Der neue Mittelwert wurde berechnet und erreichte **74.6 ± 5.7 pg/ml (12.83; 3; 70 %)**. Ein Variationskoeffizient (Inter-Assay Streuung) von **17.2 %** wurde mit **Gleichung (13)** bestimmt. Hier wurde ebenfalls festgestellt, dass die Konfluenz der Zellen ein bestimmender Einfluss auf den LD₅₀-Werten hat.



4. Diskussion

4.1. Biologischer Toxtest mit ARTOXKIT™

Bei diesem Test wurde beobachtet, dass das Alkaloid Atropin sowie das Protein Ricin weder bei hohen Konzentrationen noch bei längerer Exposition tödlich auf Artemien wirkt. Da Atropin und Ricin eine sehr spezifische Wirkung auf eukaryotische Zellen haben, würde dies auch für multizellulären Organismus erwartet. Dies war jedoch nicht der Fall. Da es sich um ein primitives Krustentier handelt, ist es nicht auszuschliessen, dass sich die Rezeptoren auf der Zelloberfläche und/oder deren Strukturen sich von Säugetieren unterscheiden. Gemäss den Ergebnissen und der Literatur [17,33], besitzen Artemien eine Acetylcholinesterase-aktivität. Bei Vertebraten und Invertebraten befindet sich der Neurotransmitter Acetylcholin im synaptischen Vesikel (in cholinergen Synapsen). Erreicht ein Aktionspotential die synaptische Endigung strömen Ca^{2+} - Ionen in die Synapse, worauf die Vesikel mit der präsynaptische Membran verschmelzen. Über Exozytose öffnen sich die Vesikel und die Acetylcholin Moleküle (ca. 10'000 pro Vesikel) gelangen in den synaptischen Spalt. Das Acetylcholin bindet an spezifische Rezeptoren (Muskarin, Nicotin), die sich in der postsynaptischen Membran befinden. Dadurch wird diese Membran depolarisiert (Na^{+} - Ionen strömen hinein) und es entsteht ein neues Aktionspotential [34]. Acetylcholin wird innerhalb kurzer Zeit enzymatisch über Acetylcholinesterase abgebaut, so dass das nächste Aktionspotential über die Synapse weitergeleitet werden kann [35]. Da Dichlorvos ein irreversibler Inhibitor der Acetylcholinesterase ist und im Test eine Wirkung beobachtet wurde, kann angenommen werden, dass Artemien Acetylcholinesterase besitzen.

Bei Vertebraten übt Atropin eine Wirkung auf Herzzellen und auf die glatte Muskulatur im Drüsengewebe aus. Jedoch haben die Ergebnisse gezeigt, dass Atropin auf Artemien keinen Effekt hat. Recherchen haben ergeben, dass Acetylcholin in Herzzellen von Arthropoden wie *Artemia* keine Wirkung zeigt. Der Grund dafür sind die Rezeptoren, welche unterschiedlich sind als bei anderen Arten und Acetylcholin dadurch nicht gebunden wird. Entsprechend kann auch Atropin das Binden von Acetylcholin an den muskarinischen Rezeptor nicht hemmen [36]. Als Folge lässt sich mit dem ARTOXKIT keine Wirkung beobachten.

Es wäre interessant diesen Test mit anderen Alkaloiden zu evaluieren, um herauszufinden ob Atropin ein Einzelfall ist oder ob generell die Toxizität von Alkaloiden mit Artemien nicht bestimmt werden kann.

Wie schon erwähnt, ist anzunehmen, dass einige membranständige Rezeptoren von Artemien, von der Struktur anders sein können. Es wäre gut möglich, dass die Glykosilierung bei diesen Tieren anders ist als bei Säugetieren. Dies würde eine Erklärung sein, weshalb Ricin keine Wirkung zeigt. Wie in der Einleitung erwähnt, bindet die



Ricin B-Kette an der Zelloberfläche an Galaktose-Reste der Glykoproteine und Glykolipide. Dadurch wird das Eindringen der Ricin A-Kette in das Zytoplasma ermöglicht. Es wäre also nicht auszuschliessen, dass die Affinität zwischen dem Lektin (B-Kette) und dem Glykoprotein/Glykolipid zu gering ist, weil ein anderer Zucker anstatt Galaktose vorhanden ist, der von der B-Kette nicht erkannt wird. Eine andere Hypothese wäre, dass Artemienzellen dieses Protein gar nicht aufnehmen und deshalb keine Wirkung zeigt. Es scheint also, dass die verwendeten bei den angewendeten Konzentrationen und mit diesem Testverfahren, Atropin und Ricin als nicht toxisch für *Artemia salina* gelten.

Bei Kaliumdichromat wurde festgestellt, dass es im Durchschnitt ca. 6 -7 mal toxischer auf die Artemien wirkt als Dichlorvos (LD₅₀ Chrom VI: 26.5 ± 6.4 mg/l gegen LD₅₀ Dichlorvos: 174.6 ± 9.2 mg/l). Dies deutet darauf hin, dass diese Krebstiere empfindlicher auf Schwermetallsalze reagieren als auf ein Insektizid. Bei einer Konzentration von 50-100 mg/l Kaliumdichromat starben über 75 % der Tiere. Bei entsprechenden Dichlorvos Konzentrationen waren hingegen noch alle Tiere am Leben.

Auch wenn mit diesem Test nur zwei der vier Testsubstanzen eine Wirkung gezeigt haben, waren die Ergebnisse für Kaliumdichromat und Dichlorvos mit einem Variationskoeffizienten von 4.6 % bzw. 21.9 % gut reproduzierbar. Auch die Intra-Assay Streuung mit einem Mittelwert von ca. 15 - 20 % wies für einen biologischen Test auf eine gute Wiederholbarkeit hin. Bei so einem Test muss mit solchen Werten gerechnet werden, denn wie bei Menschen sind auch bei Artemien die individuellen Unterschiede gross. Ausserdem wurden wenig Tiere (10 bis 20 pro Well) für den Test verwendet. Diese geringe Zahl hat einen Einfluss auf die Streuung. Im **Anhang IIB/C** ist zu sehen, dass die Streuungen (Intra-Assay) der Werte um den Mittelwert (berechneten LD₅₀-Werte) nicht mit der Abnahme der Konzentration zunehmen wie es bei anderen Tests der Fall ist. Der Vergleich (*t-Test*) mit der Referenz Substanz (Kaliumdichromat) wurde als gut betrachtet, da die zwei Mittelwerte zu 95 % übereinstimmen. Auch wenn es mit fünf Versuchen heikel ist solche Ergebnisse mit Sicherheit darzustellen, steht die Wahrscheinlichkeit (mit 95 %), einen LD₅₀-Wert innerhalb der Gesamtheit zu bekommen bei 76 % für Dichlorvos und 81 % für Kaliumdichromat. Dies bedeutet, dass bei diesem Testverfahren ca. 20 % der Werte ausserhalb des Vertrauensbereichs liegen und dass in den 20 % die Wahrscheinlichkeit einen Ausreisser zu berechnen grösser ist. Für einen biologischen Test ist die Streuung der Ergebnisse akzeptabel und der Test ist reproduzierbar.

Als Toxtest zum Nachweis von toxischen Substanzen wurde festgestellt, dass dieser Kit nicht optimal ist (wenig reproduzierbar (**Punkt 2.2.1**) und mit einem Preis von ca. 180 CHF pro Kit sehr teuer). Finanziell gesehen, kommt es billiger nur Zysten zu kaufen (ca. 10 CHF für 100 g im Fachhandel) und das künstliche Meerwasser selber vorzubereiten. Da das Verfahren einfach ist, mit kleinen Volumen gearbeitet werden kann, wenig Abfall entsteht, wenig Platz braucht und vor allem keine Tierversucherlaubnis benötigt wird, ist dieser Toxtest



interessant. Andererseits ist der Test sehr langwierig, da erst nach drei Tage eine Aussage über die Toxizität einer Substanz gemacht werden kann.

4.2. Biologischer Toxtest mit Leuchtbakterien

Bei diesem Testverfahren werden die Substanzen mit Bakterien getestet, was zu einigen Beschränkungen führt. Atropin und Ricin binden beide spezifisch an Rezeptoren eukaryotischer Zellen. Bei Atropin handelt es sich um muskarinische Rezeptoren vom Nervensystem. Bakterien sind Einzeller und besitzen kein Nervensystem. Dadurch sind auch keine Synapsen zu finden. Die Experimente mit Atropin zeigten zwar eine Hemmung auf das Leuchten von > 50 %, dies jedoch nur bei sehr hohen Konzentrationen (ca. 8 g/l). In einem Konzentrationsbereich in der Grössenordnung der anderen Substanzen, liess sich keine Hemmung festzustellen. Da die Dosis eine Rolle in der Toxizität spielt und mit einer hoch konzentrierten Salzlösung den gleichen Effekt zu beobachten wäre, ist anzunehmen, dass Atropin für Bakterien nicht als toxisch gilt auch wenn ein EC_{50} -Wert von 8.9 ± 1.1 g/l (0.6; 3; 95 %) bestimmt wurde.

Ricin ist als Toxin für *V. fischeri* vermutlich wirkungslos. Als Gram negative Bakterien besitzen *V. fischeri* sogenannte LPS (Lipopolysaccharide) an der Membranoberfläche, welche selbst toxisch sein können. Glykoproteine an der Membranoberfläche sind bei Bakterien nicht zu finden. Prokaryoten nehmen kleine Moleküle (z.B. Glukose) einfacher auf als Makromoleküle. Diese werden meistens im Periplasma hydrolisiert, so dass nur das Produkt der Reaktion (z.B. Peptide) durch die Zytoplasmatische Membran ins Zytosol gelangt [37]. Dass ein natives Protein wie Ricin aufgenommen wird, ist unwahrscheinlich. Es wird bei ca. 250 mg/l Ricin eine leichte Hemmung (4-5 %) beobachtet, bevor sie wieder abnimmt. Diese leichte Variation ist nicht signifikant und könnte die Folge einer Messstörung sein, wie zum Beispiel eine Variation der Wellenlänge, welche durch die Bindung eines „auxiliär“ Proteins an der Luziferase verursacht werden kann [38].

Wie in der Einleitung erwähnt wirkt Dichlorvos hauptsächlich auf das Enzym Acetylcholinesterase, aber auch auf DNA in dem die Esterphosphorsäure mit der DNA reagiert und Nukleinbasen (z.B Cytosin oder Guanin) methyliert, was wiederum reversible Mutationen verursacht [20, 22]. Die bakterielle DNA Polymerase (Pol I) kann solche Fehler in der DNA reparieren [20]. Jedoch ist anzunehmen, dass sich bei höheren Konzentrationen an Dichlorvos oder andauernder Exposition die Mutationen häufen und von der Polymerase nicht mehr vollständig repariert werden können. Da Bakterien keine Acetylcholinesterase besitzen, wirkt Dichlorvos mutagen. Mit einem EC_{50} -Wert von 52.0 ± 5.5 mg/l (3.7; 4; 95 %) wirkt Dichlorvos ca. 3 mal toxischer auf Bakterien als auf Artemien. Diese Testsubstanz ist aber ca. 14 mal weniger toxisch für die Bakterien als Kaliumdichromat. Die



Methode zeigt eine schwankende Intra-Assay Streuung. Auch wenn man im Durchschnitt eine Intra-Assay Streuung von ca. 10 % erreicht, sind einzelne CV [%] zum Teil über 30 %. Es wurde festgestellt, dass diese Streuungen bei kleineren Konzentrationen grösser sind als bei höheren Konzentrationen. Das heisst, dass die Wiederholbarkeit bei kleinen Konzentrationen geringer ist. Ein Grund dafür könnte die Aktivität der Polymerase sein, welche bei geringen Mengen an Dichlorvos noch fähig ist einige Reparaturen durchzuführen. Diese variieren von einer Küvette zur anderen und führt zu Streuungen. Bei diesem Test wurde ein Ausreisser festgestellt. Es wurde für diesen Test bestimmt, dass man mit 5.2 % Wahrscheinlichkeit einen Ausreisser bekommt. Dies scheint für einen biologischen Test gering. Die Reproduzierbarkeit (Inter-Assay Streuung) mit Dichlorvos liegt mit einem Variationskoeffizient von 14.6 % noch im Rahmen. Die Gültigkeit des Testes wurde ebenfalls bestätigt, da alle Korrekturfaktoren (auch für den Ausreisser) unterhalb des Grenz-Wertes (1.8 [-]) lagen.

Von den vier Testsubstanzen ist Kaliumdichromat für Bakterien am toxischsten. Mit nur 16 mg/l Chrom VI (bzw. 45 mg/l Kaliumdichromat) wurde über 80 % Leuchthemmung erreicht. Die Bakterien reagieren also sehr empfindlich auf Kaliumdichromat bzw. Chrom VI. Dieses stark oxidierende Agens verursacht schon bei geringen Konzentrationen Schäden. Diese Substanz gilt mit einem EC_{50} -Wert von 3.7 ± 1.2 mg/l (0.6; 3; 95 %) als sehr toxisch und zwar 7 mal mehr auf Bakterien als auf Artemien. Methodisch gesehen zeigte der Test mit Kaliumdichromat zufriedenstellende Ergebnisse. Die Intra-Assay Streuung zeigte für den ersten Test geringe Variationen ($0.5 \% < CV < 3 \%$), was für die zwei anderen Testsubstanzen nicht der Fall war. Dort variierten die CV zwischen 0.2 und 7.5 %. Mit den zwei anderen Testsubstanzen (Atropin und Dichlorvos) verglichen, sind diese Variationen noch gering. Jedoch wird auch mit kleineren Konzentrationen gearbeitet und die Wirkung scheint irreversibel zu sein. Die Inter-Assay Streuung mit 16.2 % zeigte eine gute Reproduzierbarkeit des Testes. Dies ist mit der Literatur [31] verglichen nochmals bestätigt. Zwischen den beiden Mittelwerten wird nur eine Differenz von 5 % beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass Laboratorien mit unterschiedlichen Bedingungen (Geräte und Reagenzien) ähnliche Ergebnisse mit guter Reproduzierbarkeit erhalten können. Es wird beobachtet, dass die Spannweite zwischen Test 1 und Test 3 mit der Zunahme der Konzentration immer grösser wird. Der Zustand der Bakterien oder die Testbedingungen könnten eine Erklärung dafür sein.

Von den vier Substanzen waren nur zwei toxisch für Bakterien. Der Toxtest war einfach auszuführen, ging schnell (1½ Stunde) und zeigte eine gute Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit. Da sich Prokaryoten hinsichtlich Stoffwechsel und generellem Aufbau deutlich von eukaryotischen Zellen unterscheiden, lässt sich die Toxizität, von für den Menschen giftigen Stoffen, nicht direkt mit Bakterien messen.



4.3. Zytotoxizität Test mit BALB 3T3 Klon 31 Zellen

Es wurde erwartet, dass dieser Test am sensitivsten ist. Da Säugetierzellen keine Zellwand, wie Bakterien oder Pflanzenzellen besitzen, sind sie viel empfindlicher (pH, Scherkräfte, Temperatur usw.). Diese Eigenschaft deutet darauf hin, dass kleinere Konzentrationen als bei den vorhergehenden Tests verwendet werden sollten, um im gewünschten Bereich (0 – 100 % Letalität) zu liegen. Es wurde in einem Konzentrationsbereich der Größenordnung von Pico- bis Nanogramm pro ml gearbeitet. Bei diesem Test beeinflussen einige Parameter die Ergebnisse stark. Die Arbeitsbedingungen (pH, T°, Kontaminationen usw.), der Zustand der Zellen (bzw. die Konfluenz) sowie die geringen Mengen mit denen gearbeitet wird, sind entscheidende Faktoren. Eine kleine Änderung kann schon zu einer grossen Differenz im Ergebnis führen. Aus diesem Grund wurde die Toleranz für die Auswertung etwas vergrössert und mit einem Vertrauensbereich von 70 % gearbeitet. Wie die Ergebnisse gezeigt haben, scheint es bei einem solchen Test sinnvoller eine qualitative anstatt eine quantitative Bestimmung durchzuführen. Jedoch wurden für diese Arbeit die Ergebnisse so gut wie möglich quantitativ ausgewertet.

Von den vier Testsubstanzen konnte die Toxizität von drei Substanzen bestimmt werden. Da mit Fibroblasten gearbeitet wurde, zeigte das Alkaloid (Atropin), welches auf Nervenzellen spezifisch wirkt hier wie erwartet keine Wirkung. Selbst bei einer Konzentration von 100 g/l wurde keine Wirkung festgestellt. Dass mit Atropin ein solches Ergebnis erhalten wurde war erwartet worden. Jedoch wurde zur Bestätigung trotzdem ein Test durchgeführt.

Da Ricin von einer anderen Person schon auf Vero-Zellen getestet wurde und eine Wirkung zeigte, wurde diese Substanz als Positivkontrolle verwendet. Es wird beobachtet, dass die Intra- und Inter-Assay Streuungen grösser als bei den vorhergehenden Tests waren. Ausser bei Test 5 ergaben sich bei den anderen Tests hohe Intra-Assay Streuungen. Es wurden sogar Streuungen von zum Teil über 100 % berechnet. Dies zeigt wie empfindlich dieser Test ist und dass mit einer 3-fachen Bestimmung Variationen erreicht werden können, die beträchtlichen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Obwohl kontaminationsfrei und präzise gearbeitet wurde, war es schwierig diese hohen Streuungen zu vermeiden. Die Testdurchführung benötigte Erfahrung und Routine. Für den Test müssen einige Pipettierschritte mit kleinen Volumen durchgeführt werden. Dies bedeutet, dass bereits kleinste Fehler zum Schluss eine grosse Wirkung haben. Bei Test 1 wurde eine mittlere Intra-Assay Streuung von ca. 40 % mit einer hohen Variation beobachtet. Mit mehr Routine wurden diese Werte kleiner. Die Streuungen von Test 5 sind gering (Mittelwert ca. 9 %) und 82 % der Werte lagen präzise beim Mittelwert. Jedoch wird er nach dem Dixon Kriterium als Ausreisser betrachtet. Bei einem biologischen Test können die Ergebnisse von einem Assay zum anderen stark variieren. Bei Test 5 waren die Streuungen zwar gering, jedoch lag die Konfluenz der Zellen, wie auch bei Test 1, bei ± 50 %. Zwischen den beiden Tests konnte ein Unterschied von über 50 % (LD_{50} -Werte)



beobachtet werden. Gründe für diese Unterschiede können sein, dass die Zellen nicht aus der gleichen Passage stammten. Für Test 1 wurden die Zellen von der ursprünglichen Ampulle weiter aufgeteilt (gesplitet), was bei Test 5 nicht der Fall war. Diese wurden von der ursprünglichen Ampulle weiter aufgeteilt (gesplitet), kryokonserviert und wieder aufgetaut. Da die Zellen bei so einem Prozess empfindlicher werden, sollte der LD₅₀-Wert eher kleiner sein als grösser. Diese 50 % Konfluenz zu erreichen war nicht einfach und aufgrund der Auswertung sehr subjektiv. Da Test 1 einen kleineren LD₅₀-Wert als Test 5 zeigte, kann es auch sein, dass die Konfluenz (von Test 1) geringer war als für Test 5. Als Folge konnte sich der Zell-Zell- Kontakt nicht gut ausbilden weil die Zelldichte zu gering war. Dadurch wurden die Zellen empfindlicher. Jedoch wurde auch Test 1 als Ausreisser bestimmt. Im Vergleich zu den drei anderen Tests ist es schwierig (mit nur 5 Assays) die Genauigkeit der letalen Dosis abzuschätzen. Die Wahrscheinlichkeit Werte zwischen den beiden Ausreissern (181.6 – 412.9 pg/ml) zu erhalten, liegt bei 40 %. Bei den drei anderen Tests (Test 2, 3 und 4) wurde mit einer höheren Konfluenz (> 50 %) gearbeitet. Für diese drei Tests wurden vergleichbare LD₅₀-Werte ermittelt (Durchschnitt: 74.6 ± 5.7 pg/ml (12.83; 3; 70 %)). Diese Werte waren ebenfalls viel kleiner, als diejenigen aus Test 1 und 5. Die höhere Konfluenz der Zellen kann dafür der Hauptgrund sein. Diese erreichen die stationäre Phase schneller und somit auch die Seneszenz. Die Zellen werden in diesem Zustand empfindlicher. Somit reichte bereits eine kleine Menge an Testsubstanz um die Zellen zu töten. Die Passage spielt hier ebenfalls eine Rolle. Bei den Tests 2, 3 und 4, wurde der LD₅₀-Wert mit der Zunahme der Anzahl Passagen geringer. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen empfindlicher werden mit zunehmendem Splitting.

Diese Beobachtung wurde ebenfalls mit Dichlorvos und Kaliumdichromat gemacht. Es wurde beobachtet, dass die LD₅₀-Werte kleiner werden, wenn die Anzahl den Passagen zunimmt. Wie für Ricin spielt die Konfluenz der Zellen hier ebenfalls eine Rolle. Bei jedem Test, wo die Konfluenz bei ca. 50 % lag, waren die Zellen resistenter als bei höherer Konfluenz. Bei den berechneten LD₅₀-Werten für Dichlorvos und Kaliumdichromat waren keine Ausreisser festzustellen. Jedoch waren die Spannweiten gross (4709 ng/ml für Dichlorvos und 125.2 ng/ml für Kaliumdichromat). Entsprechend betrug die Inter-Assay Streuung für Dichlorvos 44.6 % und 56.4 % für Kaliumdichromat. Wenn für einen biologischen Test 20 % als akzeptabel gelten, so sind diese Werte nicht akzeptabel. Die Intra-Assay Streuungen für Dichlorvos und Kaliumdichromat lagen im Durchschnitt für die drei Tests zwischen ca. 10 und 20 %. Die meisten CV [%] lagen unterhalb von 20 % und nur ein geringer Teil war grösser. Bei hohen Konzentrationen war die statistische Streuung gering. Bei kleinen Konzentrationen wurde eine grössere statistische Streuung beobachtet. Diese Tendenz entspricht einem natürlichen Phänomen und wurde in einem empirischen Model von Horwitz gezeigt [39].

Im Endeffekt wurde festgestellt, dass Ricin über 1'000 mal toxischer für BALB-Zellen ist als das Chrom VI und fast 100'000 mal mehr als Dichlorvos. Bei diesem Cytotox-Test wurden starke Inter-Assay Streuungen beobachtet. Ausserdem wurde festgestellt, dass Ricin ungefähr die gleiche Wirkung auf BALB Zellen (LD₅₀: 60 – 412 pg/ml)



zeigt, wie auf Vero-Zellen (LD_{50} : 50 – 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und damit gut auf Nierenzellen (Meerkatze), sowie auf Fibroblasten (Maus) wirkt.

Mit diesem Test war es möglich drei von vier Testsubstanzen zu überprüfen. Aus diesem Grund ist dieser Test interessant. Nachteile sind jedoch, dass der Test zu lange (3 Tage) dauert für einen schnellen Nachweis. Er ist zudem aufwendig, benötigt Erfahrung und alle Voraussetzungen für eine Zellkulturtechnik. Ausserdem haben kleine Variationen sowie der Zustand der Zellen einen direkten Einfluss auf die Ergebnisse. Die Streuungen sind gross und ermöglichen nur eine Abschätzung über die Toxizität einer Substanz.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass biologische Toxizitätstests grosse Streuungen zeigen und diese schwierig bis unmöglich zu beherrschen sind. Die Reproduzierbarkeit der Tests wurde zwar in dieser Arbeit als akzeptabel bewertet, wäre wahrscheinlich aber anders, wenn die Tests von anderen Personen, mit anderen Materialien und in einem anderen Labor durchgeführt würden. Diese Tests scheinen mehr für eine qualitative Bewertung jedoch weniger für quantitative Untersuchungen geeignet zu sein. Dafür streuen die Werte zu stark. Je nach Verfahren wurden unterschiedliche LD_{50} -Werte erhalten. Für den gleichen Test wurden in der Literatur verschiedene Werte gefunden, welche sich ebenfalls von den hier ermittelten Werten unterscheiden. Das alles deutet darauf hin, dass biologische Tests lediglich eine approximative Bestimmung der LD_{50} erlauben.

Zudem wurde festgestellt wie schwierig es ist einen sogenannten „universellen“ Toxtest zu finden. Aufgrund der völlig verschiedenen Testsubstanzen (Alkaloid, Insektizid, Schwermetallsalz und Protein) war leider keiner der drei Tests fähig alle diese vier Substanzen abzudecken. Das Alkaloid wurde bei keinem der drei Tests erkannt und Ricin nur beim Zytotox Test. Eine Evaluation von den drei Tests mit nur vier Substanzen war heikel. Um mehr davon zu wissen, sollten nach dieser Arbeit weitere Tests mit anderen Substanzen durchgeführt. Da es interessant wäre einen schnellen Test zum Screening einer eventuell toxischen Substanz durchzuführen, würde noch der Leuchtbakterien Test in Frage kommen. Jedoch zeigten auch dort nur zwei Substanzen (Dichlorvos und Kaliumdichromat) eine toxische Wirkung auf die Bakterien. Wenn ein solcher Test für ein Screening eingesetzt wird, wären darüber hinaus zusätzliche Tests nötig. Auf dem Markt sind viele unterschiedliche Toxtest zu finden, mit welchen vielleicht eine grössere Chance besteht verschiedene Toxine zu bestimmen. Diese Problematik wäre natürlich nicht vorhanden, wenn schon Kenntnis über die Art der Substanz in der Probe bestehen würde. In diesen Falle fänden sich ganz spezifische Tests, mit denen der Nachweis der Toxizität auch relativ schnell (ein paar Stunden) möglich wäre (z.B. *Agri-Screen Ticket* für den Nachweis von Pestiziden [40], ELISA für Proteine



usw.). Da die Analytik der Toxine eine Problematik bleibt, wird in der Wissenschaft natürlich viel geforscht. Für Östrogen werden beispielsweise rekombinante Hefen hergestellt, die den Nachweis mit Hilfe von Lumineszenz ermöglichen. Vielleicht wird es eines Tages möglich sein, einen Toxtest zu finden, der universell einsetzbar ist und schnell und sensitiv verschiedene Toxine detektiert. Gegenwärtig gibt es jedoch keine andere Möglichkeit, als Proben mit verschiedenen Tests auf Toxine zu screenen oder im Tiermodell zu untersuchen.

6. Dankeswort

Ich danke Herrn Bruno Schnyder (Dozent), Herrn Marc-André Avondet (Leiter der Toxinologie) und Herrn Werner Arnold (Experte) für Ihre Unterstützung und dem LABOR SPIEZ, dass es ermöglichte diese Diplomarbeit durchzuführen. Für Ihre Hilfe und Unterstützung, einen Dankeschön an Johanna Signer (Zellkultur), Urs Meier (NMR), Oliver Weingart und Reto Zbinden (Tips und Korrektur).



7. Literatur

- [1] **C. Descoins.** « *Introduction à l'écologie chimique* ». DAA Protection des Plantes et Environnement (2007-2008). 9.
- [2] <http://www.labor-spiez.ch/de/the/bs/dethebstox.htm>.
- [3] **D. Mebs.** « *Venins et toxines, sources de médicaments* ». Biofutur 280 (2007). 24 - 26.
- [4] **H. Russmann.** « *Toxine, Biogene Gifte und potenzielle Kampfstoffe* ». Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 11 (2003). 989 - 996.
- [5] **K. C. Moriarty.** « *Toxine botulique: Manuel d'utilisation en esthétique faciale* ». Elsevier (2004). 1 - 135.
- [6] **P. Sorgeloos und G. Persoone.** « *Technological improvements for the cultivation of invertebrates as food for fishes and crustaceans* ». Aquaculture (1975), Vol 6. 303 - 317.
- [7] **J. Dutrieu.** « *Observations biochimiques et physiologiques sur le développement d'Artemia salina* ». Publié par C.N.R.S. (1960). 53 - 121.
- [8] **J. Engebrecht, K. Neilson und M. Silverman.** « *Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from Vibrio fischeri* ». Cell (1983), Vol 32. 773 - 781.
- [9] <http://pedagogie.acmontpellier.fr:8080/disciplines/scphysiques/academie/ABCDORGA/Famille/Produit/LUCIFERINE.gif>.
- [10] **O. Shimomura.** « *Bioluminescence: chemical principles and methods* ». World Scientific (2006). 30 - 41.
- [11] **D. Male, Y. Roitt, J. Brostoff et al.** « *Immunologie* ». 7^{ème} édition, Elsevier Masson (2007). 225 - 227.
- [12] **Sordalab.** Fiche de données de sécurité selon directive 2001/58/CE : Rouge neutre (C.I. 50040).
- [13] http://fr.wikipedia.org/wiki/Rouge_neutre.
- [14] **S.K. Bhatia, A.B. Yetter.** « *Correlation of visual in vitro cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements* ». Cell Biol Toxicol 24 (2008). 315 - 319.
- [15] <http://www.awl.ch/heilpflanzen/index.htm>.
- [16] **H.C. Renckhoff.** « *Der Einfluß von Sphingolipiden und Analoga auf GIRK-Strömestriärer ardiomyozyten* ». Dissertation - Doktorgrades der Medizin (2006). 8 - 16.
- [17] **M.V. Barahona und S. Sanchez-Fortun.** « *Toxicity of carbamates to the brine shrimp Artemia salina and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity* ». Environmental Pollution 104 (1999). 469 - 476.
- [18] **S. Sanchez-Fortun, F. Sanz und M.V. Barahona.** « *Acute toxicity of Several Organophosphorus Insecticides and Protection by cholinergic Antagonists and 2-PAM on Artemia salina Larvae* ». Archives of Environmental Contamination and Toxicology 31 (1996). 391 - 398.
- [19] **SIGMA-ALDRICH (D).** Sicherheitsdatenblatt gemäss 91/155/EWG für Atropin.
- [20] **S. Herbert und Rosenkranz.** « *Preferential Effect of Dichlorvos (Vapona) on Bacteria Deficient in DNA Polymerase* ». Cancer Research 33 (1973). 459 - 459.
- [21] **C.H. Courtney, E.L. Roberson.** « *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* ». HR Adams (1995). 885 - 932.



- [22] **E.D. Booth, E. Jones, B.M. Elliott.** « *Review of the in vitro and in vivo genotoxicity of dichlorvos* ». Regulatory Toxicology and Pharmacology 49 (2007). 316 - 326.
- [23] **C. Ramel, J. Drake und T. Sugimura.** « *An evaluation of the genetic toxicity of dichlorvos* ». Mutation Research 76 (1980). 297 - 309.
- [24] **LEU+GYGAX AG (CH).** Sicherheitsdatenblatt gemäss 91/155/EWG für Dichlorvos.
- [25] **A.G. Levis, M. Buttignol, V. Bianchi et al..** « *Effects of Potassium Dichromate on Nucleic Acid and Protein Syntheses and on Precursor Uptake in BHK Fibroblasts* ». Cancer Research 38 (1978). 110 - 116.
- [26] **MERCK KGaA (D).** Sicherheitsdatenblatt gemäss 91/155/EWG für Kaliumdichromat.
- [27] **J. Audi, M. Belson, M. Patel et al..** « *Ricin Poisoning. A Comprehensive Review* ». JAMA 18(2005), Vol. 294. 2342 - 2351.
- [28] **H. Kupferschmidt.** « *Fact Sheet: Ricin* ». Schweizerisches Toxikologisches Informationszentrum (2003). 3.
- [29] **ARTOXXIT™.** « *Artemia Toxicity Screening Test for Estuarine and Marine Water* ». SOP (2006).
- [30] **EUROPÄISCHE NORM.** « *Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von Vibrio fischeri (Leuchtbakterientest)* ». EN ISO 11348-2 (1998). 31 - 49.
- [31] **National Toxicology Program.** « *In vitro cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing* ». ICCVAM Test Method Evaluation Report (2006).
- [32] **G. Rey, U. Kreuter.** « *Statistik im Laboratorium* ». SLZ (1986). 48 - 52.
- [33] **I. Varo, J.C. Navarro, F. Amate et al..** « *Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to Artemia salina and Artemia parthenogenetica* ». Chemospher 48 (2002). 563 - 569.
- [34] **R.H. Garrett und C.M. Grisham.** « *Biochimie* ». De Boeck Université. 2ème Edition (2000). 1177 - 1184.
- [35] **N.A. Campbell und J.B. Reece.** « *Biologie* ». Spektrum Akademischer Verlag. 6. Auflage (2003). 1224 - 1245.
- [36] **C.L. Prosser.** « *An analysis of the action of acetylcholine on hearts, particularly in arthropods* ». The Biological Bulletin 2 (1942), Vol. 83. 145 - 164.
- [37] **M. Schaechter, G. Medoff, B.I. Eisenstein et al..** « *Microbiologie et pathologie infectieuse* ». De Boeck Université (1999). 41.
- [38] **J. Engebrecht, K. Nealson et M. Silverman.** « *Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from Vibrio fischeri* ». Cell (1983), vol. 32. 773 - 781.
- [39] **M. Thompson.** « *The amazing Horwitz function* ». AMC Technical Brief 17 (2004).
- [40] **Neogen Corporation.** Neogen, AgriScreen and Ticket (1998 – 1999).



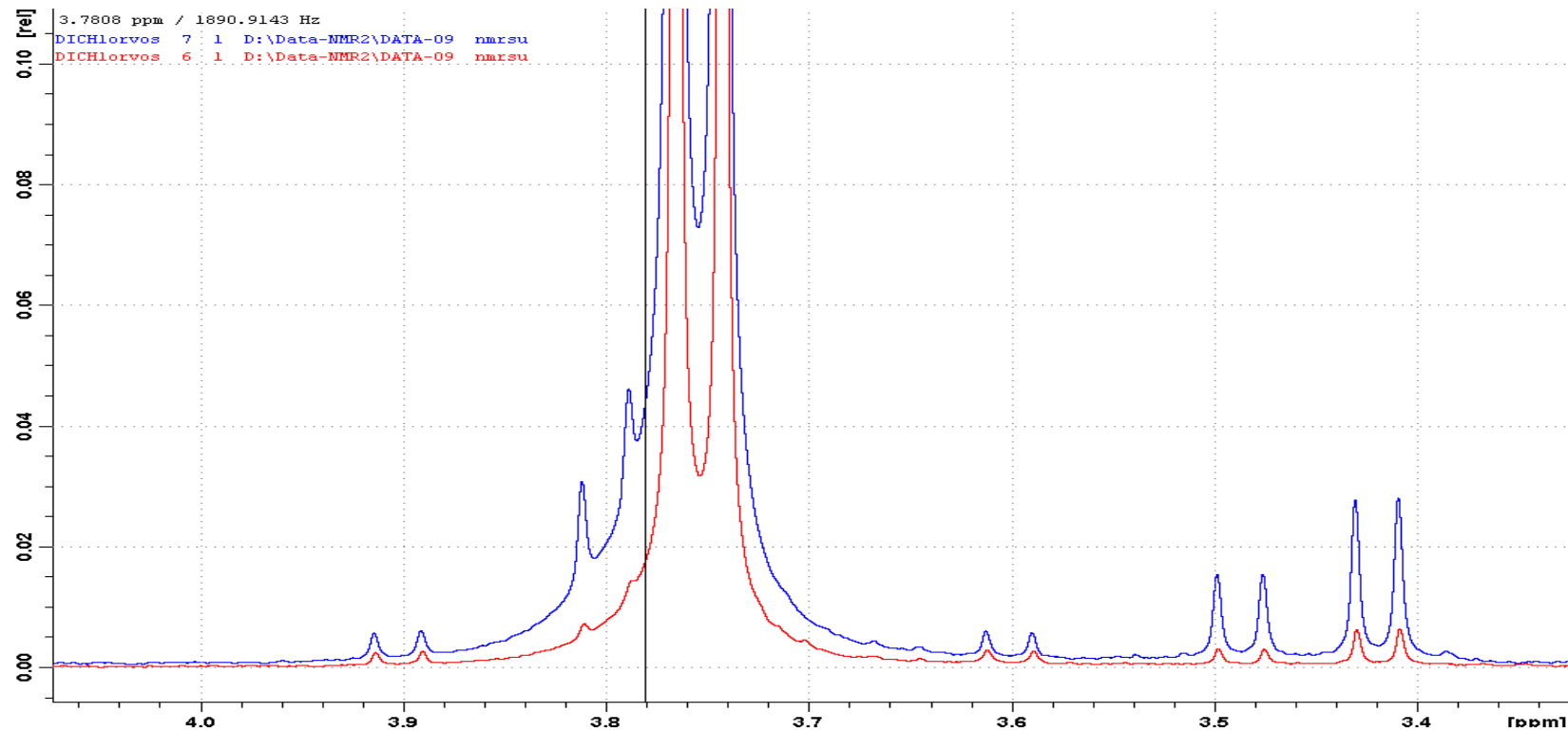
ANHANG

***EVALUATION VON UNIVERSELLEN TOXIZITÄTSTESTS ZUR ABKLÄRUNG DER
„AKUTEN GIFTIGKEIT“ EINER UNBEKANNTEN (ABC)-VERDACHTSPROBE.***

ANHANG – Inhaltsverzeichnis

1.	ANHANG I: STABILITÄT VON DICHLORVOS	3
2.	ANHANG IIA: ARTEMIEN TEST - ATROPIN UND RICIN	4
3.	ANHANG IIB: ARTEMIEN TEST - DICHLORVOS	5
4.	ANHANG IIC: ARTEMIEN TEST – KALIUMDICHROMAT (CHROM VI)	6
5.	ANHANG IIIA: LEUCHTBAKTERIEN TEST - ATROPIN	7
6.	ANHANG IIIB: LEUCHTBAKTERIEN TEST - DICHLORVOS	10
7.	ANHANG IIIC: LEUCHTBAKTERIEN TEST – KALIUMDICHROMAT (CHROM VI)	15
8.	ANHANG IIID: LEUCHTBAKTERIEN TEST - RICIN	18
9.	ANHANG IVA: ZYTOTOXTEST - ATROPIN	19
10.	ANHANG IVB: ZYTOTOXTEST - DICHLORVOS	20
11.	ANHANG IVC: ZYTOTOXTEST – KALIUMDICHROMAT (CHROME VI)	23
12.	ANHANG IVD: ZYTOTOXTEST - RICIN	26

1. Anhang I: Stabilität von Dichlorvos



Ergebnisse von einer NMR Analyse auf Dichlorvos. In rot: Spektrum bei Zeit 0. In blau: nach 36 Stunden. Die höhendifferenz der Pics entspricht nicht der Konzentration von Dichlorvos.

2. Anhang IIa: Artemien Test - Atropin und Ricin

Testsubstanz: Atropin

Konz. [mg/l]	Test Nr1		Test Nr2	
	Mittelwert tote Tiere [%]	Stdabw [%]	Mittelwert tote Tiere [%]	Stdabw [%]
10000	0	0	0	0
5000	0	0	0	0
2500	0	0	0	0
1250	0	0	0	0
625	0	0	0	0
312	0	0	0	0
156	0	0	0	0

Testsubstanz: Ricin

Konz. [mg/l]	Test Nr1		Test Nr2	
	Mittelwert tote Tiere [%]	Stdabw [%]	Mittelwert tote Tiere [%]	Stdabw [%]
1000	0	0	0	0
500	0	0	0	0
250	0	0	0	0
125	0	0	0	0
62.5	0	0	0	0
31.5	0	0	0	0
15.6	0	0	0	0

3. Anhang IIb: Artemien Test - Dichlorvos

Konz. [mg/l]	Test Nr1		Test Nr2		Test Nr3		Test Nr4		Test Nr5	
	Mittelwert tote Tiere [%]	Stdabw [%]	Mittelwert tote Tiere [%]	Stdabw [%]	Mittelwert tote Tiere [%]	Stdabw [%]	Mittelwert tote Tiere [%]	Stdabw [%]	Mittelwert tote Tiere [%]	Stdabw [%]
350	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
300	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
250	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
200	71.42	6.36	65.64	4.47	85.67	4.41	74.40	8.52	53.87	11.31
150	13.04	6.38	25.93	6.42	33.59	6.22	26.00	12.29	40.87	4.54
100	2.63	3.85	2.10	0.81	9.32	1.11	5.37	4.74	2.77	4.79
50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Hill-Funktion

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((\log EC_{50} - X) \cdot HillSlope)})}$$

	Bottom	Top	HillSlope	LD ₅₀	R ²
Test Nr1	0	100	10.26	181.90	0.998
Test Nr2	0	100	8.28	161.90	0.995
Test Nr3	0	100	7.22	176.90	0.967
Test Nr4	0	100	7.83	171.9	0.996
Test Nr5	0	100	4.33	180.50	0.993

4. Anhang IIc: Artemien Test – Kaliumdichromat (Chrom VI)

Konz. [mg/l]	Test Nr1		Test Nr2		Test Nr3		Test Nr4		Test Nr5	
	Mittelwert tote Tiere [%]	Stdabw [%]	Mittelwert tote Tiere [%]	Stdabw [%]	Mittelwert tote Tiere [%]	Stdabw [%]	Mittelwert tote Tiere [%]	Stdabw [%]	Mittelwert tote Tiere [%]	Stdabw [%]
300	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
200	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
150	95.80	6.42	97.44	5.09	90.37	2.80	92.20	1.68	100.00	0.00
100	81.50	5.09	87.64	8.03	79.64	8.36	85.53	8.11	83.40	2.77
50	77.14	6.91	71.48	2.62	68.60	3.95	70.30	7.04	79.02	11.57
25	38.70	10.91	55.55	4.13	36.03	3.74	45.47	7.85	62.13	5.35
12.5	21.00	15.84	25.26	3.18	19.07	7.98	32.63	10.70	42.73	6.77
6.25	7.40	6.85	11.47	2.65	1.34	0.78	6.67	2.89	9.70	2.96
3.125	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1.5625	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Hill-Funktion

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((\log EC_{50} - X) \cdot HillSlope)})}$$

	Bottom	Top	HillSlope	LD ₅₀	R ²
Test Nr1	0	100	1.73	29.45	0.992
Test Nr2	0	100	1.58	24.11	0.995
Test Nr3	0	100	1.47	26.48	0.991
Test Nr4	0	100	1.54	18.67	0.983
Test Nr5	0	100	1.66	34.09	0.993

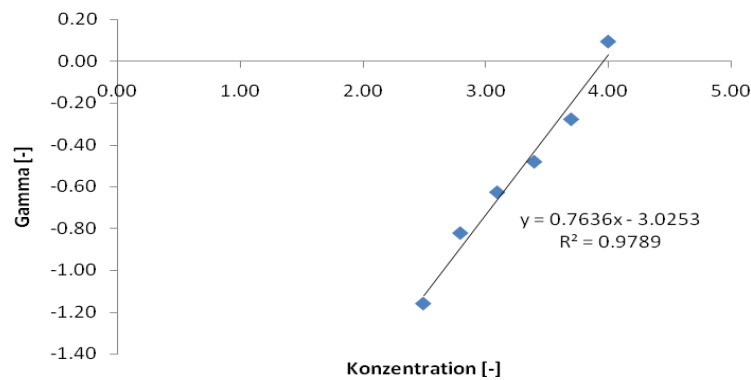
5. Anhang IIIa: Leucht Bakterien Test - Atropin

TEST Nr 1: ATROPIN pH 7.6

Konzentration [mg/l]	G-Wert	Io [Irel]	It [Irel]	Ict [Irel]	% Ht	Mittel % Ht	Gamma [-]	log Gamma	log Konz	SD [%]
K	K	181.40	237.40	228.94	-3.70	0.00	0.00	0.00		0.00
		184.30	224.00	232.60	3.70					
312	128	185.20	214.80	233.73	8.10	6.47	0.07	-1.16	2.49	2.30
		183.20	220.00	231.21	4.85					
625	32	189.40	214.60	239.03	10.22	13.09	0.15	-0.82	2.80	4.05
		196.00	207.90	247.36	15.95					
1250	16	202.00	210.20	254.94	17.55	19.10	0.24	-0.63	3.10	2.19
		200.10	200.40	252.54	20.65					
2500	8	202.00	198.70	254.94	22.06	24.82	0.33	-0.48	3.40	3.91
		203.20	185.70	256.45	27.59					
5000	4	202.50	165.60	255.57	35.20	34.53	0.53	-0.28	3.70	0.95
		212.30	177.20	267.94	33.86					
10000	2	210.30	116.70	265.41	56.03	55.39	1.24	0.09	4.00	0.91
		214.50	122.50	270.71	54.75					

fk 1:	1.31
fk 2:	1.22
Mittel fk:	1.26

EC ₅₀ :	9159.91mg/l
EC ₂₀ :	1491.15 mg/l

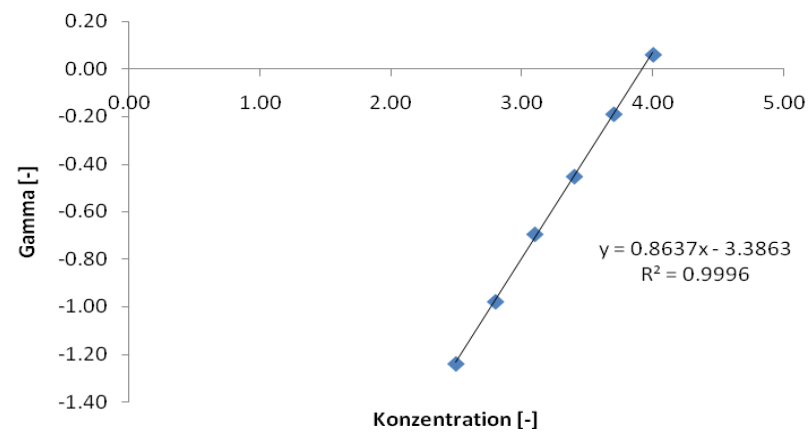


TEST Nr 2: Atropin pH 7.2

Konzentration [mg/l]	G-Wert	lo [Irel]	It [Irel]	Ict [Irel]	% Ht	Mittel % Ht	Gamma [-]	log Gamma	log Konz	SD [%]
K	K	330.30	434.60	441.56	1.58	0.00	0.00	0.00		0.00
		333.30	452.60	445.57	-1.58					
312	64	330.70	407.70	442.10	7.78	5.46	0.06	-1.24	2.49	3.28
		344.20	445.70	460.15	3.14					
625	32	330.40	398.50	441.70	9.78	9.53	0.11	-0.98	2.80	0.35
		343.50	416.60	459.21	9.28					
1250	16	326.00	388.10	435.81	10.95	16.83	0.20	-0.69	3.10	8.32
		371.10	383.40	496.11	22.72					
2500	8	359.80	347.50	481.00	27.75	26.14	0.35	-0.45	3.40	2.29
		364.50	367.80	487.28	24.52					
5000	4	364.00	299.50	486.62	38.45	39.28	0.65	-0.19	3.70	1.17
		389.70	312.00	520.97	40.11					
10000	2	359.20	222.30	480.20	53.71	53.49	1.15	0.06	4.00	0.31
		375.20	234.40	501.59	53.27					

fk 1:	1.32
fk 2:	1.36
Mittel	
fk:	1.34

EC ₅₀ :	8330.86 mg/l
EC ₂₀ :	1673.47 mg/l

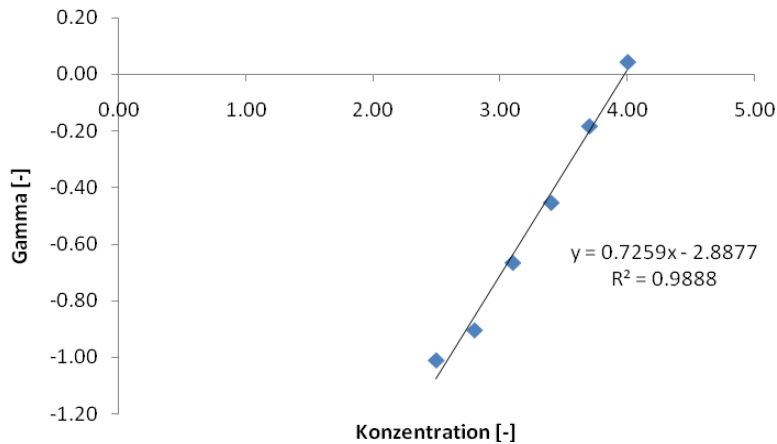


TEST Nr 3: Atropin pH 7.5

Konzentration [mg/l]	G-Wert	lo [Irel]	It [Irel]	Ict [Irel]	% Ht	Mittel % Ht	Gamma [-]	log Gamma	log Konz	SD [%]
K	K	525.50	678.60	677.33	-0.19	0.00	0.00	0.00		0.00
		512.40	659.20	660.44	0.19					
312	64	497.80	583.10	641.62	9.12	8.86	0.10	-1.01	2.49	0.37
		507.00	597.30	653.48	8.60					
625	32	493.40	565.10	635.95	11.14	11.05	0.12	-0.91	2.80	0.13
		502.30	576.50	647.42	10.95					
1250	16	503.80	552.30	649.36	14.95	17.70	0.22	-0.67	3.10	3.90
		522.60	535.80	673.59	20.46					
2500	8	503.20	489.90	648.58	24.47	25.96	0.35	-0.46	3.40	2.11
		526.30	492.10	678.36	27.46					
5000	4	537.60	412.60	692.92	40.46	39.54	0.65	-0.18	3.70	1.30
		533.40	422.00	687.51	38.62					
10000	2	521.00	322.40	671.53	51.99	52.45	1.10	0.04	4.00	0.65
		537.60	326.30	692.92	52.91					

fk 1:	1.29
fk 2:	1.29
Mittel fk:	1.29

EC ₅₀ :	9508.15 mg/l
EC ₂₀ :	1408.3 mg/l



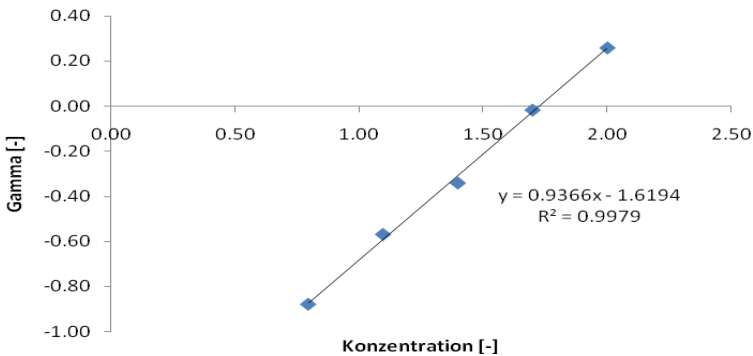
6. Anhang IIIb: Leuchtbakterien Test - Dichlorvos

TEST Nr 1: Dichlorvos pH 6.5

Konzentration [mg/l]	G-Wert	lo [Irel]	It [Irel]	Ict [Irel]	% Ht	Mittel % Ht	Gamma [-]	log Gamma	log Konz	SD [%]
K	K	230.40	295.90	294.36	-0.52	0.00	0.00	0.00		0.00
		229.20	291.30	292.83	0.52					
1.56	128	221.00	276.70	282.35	2.00	3.88	0.04	-1.39	0.19	2.65
		224.40	270.20	286.70	5.75					
3.12	64	199.90	237.40	255.40	7.05	5.14	0.05	-1.27	0.49	2.70
		205.20	253.70	262.17	3.23					
6.25	32	203.30	232.80	259.74	10.37	11.70	0.13	-0.88	0.80	1.87
		213.90	237.70	273.28	13.02					
12.5	16	204.50	206.20	261.27	21.08	21.26	0.27	-0.57	1.10	0.25
		213.50	214.30	272.77	21.44					
25	8	205.10	181.20	262.04	30.85	31.30	0.46	-0.34	1.40	0.63
		205.60	179.30	262.68	31.74					
50	4	209.30	133.30	267.40	50.15	48.94	0.96	-0.02	1.70	1.72
		210.50	140.60	268.94	47.72					
100	2	206.40	94.30	263.70	64.24	64.36	1.81	0.26	2.00	0.17
		210.70	95.60	269.19	64.49					

fk 1:	1.28
fk 2:	1.27
Mittel fk:	1.28

EC ₅₀ :	53.58 mg/l
EC ₂₀ :	12.19 mg/l

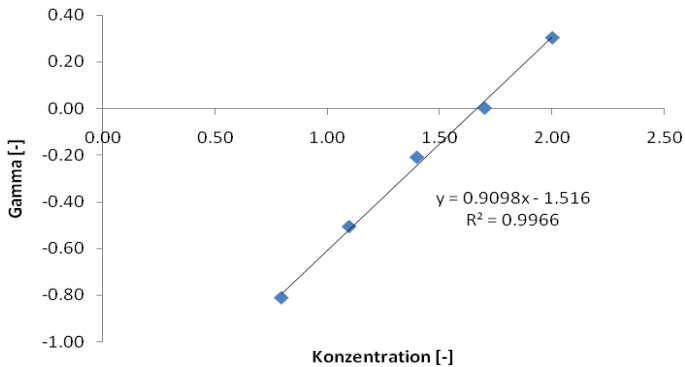


TEST Nr 2: Dichlorvos pH 7.8

Konzentration [mg/l]	G-Wert	lo [Irel]	It [Irel]	Ict [Irel]	% Ht	Mittel % Ht	Gamma [-]	log Gamma	log Konz	SD [%]
K	K	111.50	178.80	185.39	3.55	0.00	0.00	0.00		0.00
		109.60	188.70	182.23	-3.55					
1.56	128	110.80	174.10	184.22	5.49	4.36	0.05	-1.34	0.19	1.61
		110.50	177.80	183.72	3.22					
3.12	64	116.10	187.70	193.03	2.76	8.21	0.09	-1.05	0.49	7.70
		121.40	174.30	201.85	13.65					
6.25	32	120.20	177.80	199.85	11.03	13.37	0.15	-0.81	0.80	3.30
		120.80	169.30	200.85	15.71					
12.5	16	138.50	168.30	230.28	26.91	23.76	0.31	-0.51	1.10	4.45
		126.60	167.10	210.49	20.61					
25	8	128.90	131.20	214.32	38.78	38.20	0.62	-0.21	1.40	0.82
		132.10	137.00	219.64	37.62					
50	4	135.60	111.00	225.46	50.77	50.12	1.00	0.00	1.70	0.92
		135.80	114.10	225.79	49.47					
100	2	160.30	87.20	266.52	67.28	66.80	2.01	0.30	2.00	0.68
		149.30	83.60	248.23	66.32					

fk 1:	1.60
fk 2:	1.72
Mittel fk:	1.66

EC ₅₀ :	46.36 mg/l
EC ₂₀ :	10.04 mg/l

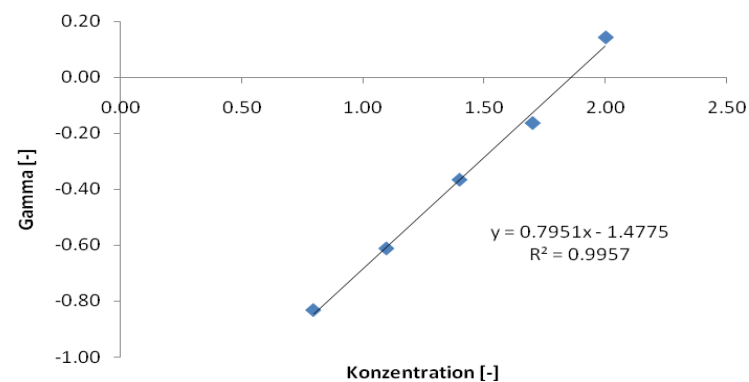


TEST Nr 3: Dichlorvos pH 7.3

Konzentration [mg/l]	G-Wert	lo [Irel]	It [Irel]	Ict [Irel]	% Ht	Mittel % Ht	Gamma [-]	log Gamma	log Konz	SD [%]
K	K	495.10	712.40	744.43	4.30	0.00	0.00	0.00		0.00
		461.40	723.60	693.75	-4.30					
1.56	128	482.10	712.00	724.88	1.78	3.70	0.04	-1.42	0.19	2.72
		492.20	698.40	740.06	5.63					
3.12	64	482.10	698.00	724.88	3.71	4.75	0.05	-1.30	0.49	1.47
		493.40	698.90	741.87	5.79					
6.25	32	507.80	653.20	763.52	14.45	12.86	0.15	-0.83	0.80	2.25
		484.70	646.70	728.79	11.26					
12.5	16	508.50	611.10	764.57	20.07	19.67	0.24	-0.61	1.10	0.57
		499.60	606.50	751.19	19.26					
25	8	509.60	537.80	766.23	29.81	30.10	0.43	-0.37	1.40	0.40
		517.70	541.90	778.41	30.38					
50	4	511.00	446.80	768.33	41.85	40.68	0.69	-0.16	1.70	1.65
		503.20	457.60	756.60	39.52					
100	2	524.20	336.20	788.18	57.34	58.09	1.39	0.14	2.00	1.06
		522.30	323.20	785.32	58.84					

fk 1:	1.44
fk 2:	1.57
Mittel fk:	1.50

EC₅₀:	68.49 mg/l
EC₂₀:	14.15 mg/l

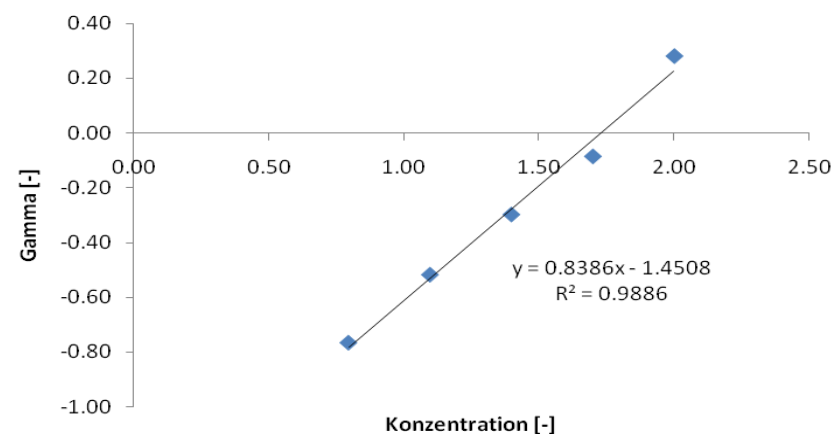


TEST Nr 4: Dichlorvos pH 6.2

Konzentration [mg/l]	G-Wert	lo [Irel]	It [Irel]	Ict [Irel]	% Ht	Mittel % Ht	Gamma [-]	log Gamma	log Konz	SD [%]
K	K	518.50	657.50	655.42	-0.32	0.00	0.00	0.00		0.00
		534.10	673.00	675.14	0.32					
1.56	128	537.10	657.20	678.93	3.20	4.17	0.04	-1.36	0.19	1.37
		558.60	669.80	706.11	5.14					
3.12	64	555.70	646.80	702.44	7.92	9.75	0.11	-0.97	0.49	2.59
		582.90	651.50	736.83	11.58					
6.25	32	587.00	634.00	742.01	14.56	14.60	0.17	-0.77	0.80	0.06
		577.90	623.50	730.51	14.65					
12.5	16	577.50	555.40	730.00	23.92	23.24	0.30	-0.52	1.10	0.96
		584.00	571.70	738.22	22.56					
25	8	601.40	498.80	760.21	34.39	33.43	0.50	-0.30	1.40	1.35
		603.00	514.70	762.24	32.47					
50	4	582.30	415.70	736.07	43.52	45.01	0.82	-0.09	1.70	2.10
		604.60	408.90	764.26	46.50					
100	2	592.70	256.90	749.22	65.71	65.54	1.90	0.28	2.00	0.25
		616.00	269.70	778.67	65.36					

fk 1:	1.27
fk 2:	1.26
Mittel fk:	1.26

EC₅₀:	53.70 mg/l
EC₂₀:	10.28mg/l

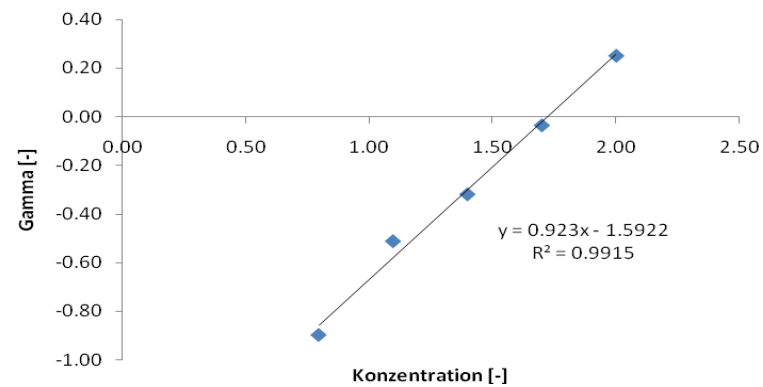


TEST Nr 5: Dichlorvos pH 6.9

Konzentration [mg/l]	G-Wert	Io [Irel]	It [Irel]	Ict [Irel]	% Ht	Mittel % Ht	Gamma [-]	log Gamma	log Konz	SD [%]
K	K	449.10	515.60	517.46	0.36	0.00	0.00	0.00	-	0.00
		441.90	511.00	509.17	-0.36					
1.56	128	458.50	517.40	528.29	2.06	4.72	0.05	-1.31	0.19	3.75
		484.50	517.10	558.25	7.37					
3.12	64	469.30	519.20	540.74	3.98	6.36	0.07	-1.17	0.49	3.36
		480.90	505.70	554.10	8.74					
6.25	32	481.60	508.40	554.91	8.38	11.23	0.13	-0.90	0.80	4.03
		510.80	505.70	588.56	14.08					
12.5	16	493.50	449.20	568.62	21.00	23.54	0.31	-0.51	1.10	3.59
		505.00	430.10	581.87	26.08					
25	8	494.80	396.60	570.12	30.44	32.45	0.48	-0.32	1.40	2.85
		507.80	383.40	585.10	34.47					
50	4	520.20	309.80	599.39	48.31	48.04	0.92	-0.03	1.70	0.39
		512.70	308.60	590.74	47.76					
100	2	523.40	217.90	603.07	63.87	64.15	1.79	0.25	2.00	0.40
		550.20	225.50	633.95	64.43					

fk 1:	1.15
fk 2:	1.16
Mittel fk:	1.15

EC ₅₀ :	54.27 mg/l
EC ₂₀ :	11.47 mg/l



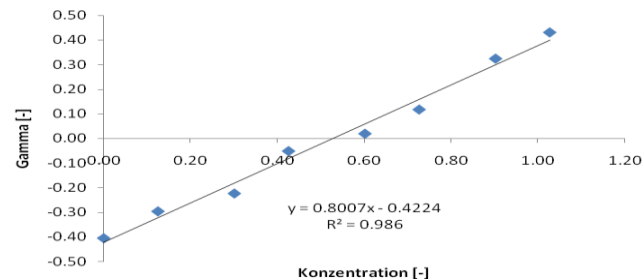
7. Anhang IIIc: Leuchtbakterien Test – Kaliumdichromat (Chrom VI)

TEST Nr 1: Chrom VI pH 7.8

Konzentration [mg/l]	G-Wert	lo [Irel]	It [Irel]	Ict [Irel]	% Ht	Mittel % Ht	Gamma [-]	log Gamma	log Konz	SD [%]
K	K	1032.00	1128.00	1129.63	0.14	0.00	0.00	0.00		0.00
		1050.00	1151.00	1149.34	-0.14					
1.00	32	1045.00	807.50	1143.86	29.41	28.20	0.39	-0.41	0.00	1.70
		1014.00	810.30	1109.93	27.00					
1.33	24	1052.00	771.80	1151.53	32.98	33.56	0.51	-0.30	0.12	0.82
		1056.00	761.30	1155.90	34.14					
2.00	16	1047.00	702.80	1146.05	38.68	37.39	0.60	-0.22	0.30	1.83
		1006.00	703.70	1101.17	36.10					
2.67	12	1057.00	642.00	1157.00	44.51	47.03	0.89	-0.05	0.43	3.56
		1067.00	589.20	1167.95	49.55					
4.00	8	1047.00	544.80	1146.05	52.46	51.10	1.05	0.02	0.60	1.93
		1015.00	558.40	1111.03	49.74					
5.33	6	1030.00	479.10	1127.45	57.51	56.71	1.31	0.12	0.73	1.12
		1008.00	486.40	1103.36	55.92					
8.00	4	1025.00	367.90	1121.97	67.21	67.84	2.11	0.32	0.90	0.89
		1073.00	370.30	1174.51	68.47					
10.67	3	1100.00	316.20	1204.07	73.74	72.95	2.70	0.43	1.03	1.11
		1081.00	329.30	1183.27	72.17					
16.00	2	10305.00	294.60	11279.92	97.39	89.91	8.91	0.95	1.20	10.58
		1569	301.8	1717.438	82.4273					

fk 1:	1.09
fk 2:	1.10
Mittel fk:	1.09

EC₅₀:	3.11 mg/l
EC₂₀:	0.76 mg/l

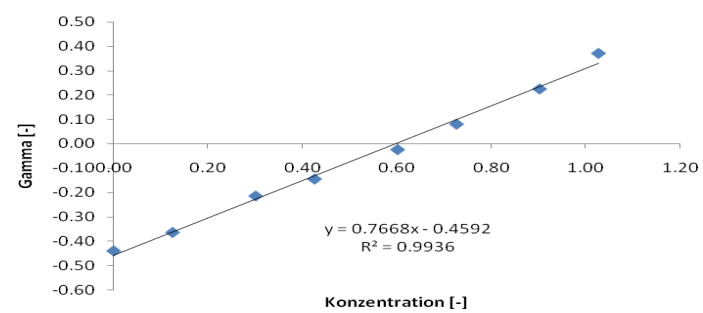


TEST Nr 2: Chrom VI pH 6.8

Konzentration [mg/l]	G-Wert	Io [Irel]	It [Irel]	Ict [Irel]	% Ht	Mittel % Ht	Gamma [-]	log Gamma	log Konz	SD [%]
K	K	636.70	811.60	802.07	-1.19	0.00	0.00	0.00		0.00
		645.90	804.00	813.66	1.19					
1.00	32	626.70	574.70	789.48	27.20	26.60	0.36	-0.44	0.00	0.85
		628.40	585.80	791.62	26.00					
1.33	24	621.40	549.60	782.80	29.79	30.15	0.43	-0.36	0.12	0.51
		638.00	558.50	803.71	30.51					
2.00	16	636.60	505.00	801.95	37.03	37.85	0.61	-0.22	0.30	1.16
		634.20	490.00	798.92	38.67					
2.67	12	639.40	473.30	805.48	41.24	41.66	0.71	-0.15	0.43	0.60
		650.30	474.40	819.21	42.09					
4.00	8	631.90	404.40	796.03	49.20	48.53	0.94	-0.03	0.60	0.94
		641.40	421.20	807.99	47.87					
5.33	6	643.50	370.20	810.64	54.33	54.55	1.20	0.08	0.73	0.31
		655.20	373.30	825.38	54.77					
8.00	4	646.00	301.80	813.79	62.91	62.59	1.67	0.22	0.90	0.46
		651.70	309.80	820.97	62.26					
10.67	3	656.50	256.80	827.02	68.95	70.07	2.34	0.37	1.03	1.59
		664.30	241.00	836.84	71.20					
16.00	2	658.80	125.90	829.91	84.83	85.42	5.86	0.77	1.20	0.83
		667.10	117.60	840.37	86.01					

fk 1:	1.27
fk 2:	1.24
Mittel fk:	1.26

EC ₅₀ :	3.63 mg/l
EC ₂₀ :	0.78 mg/l

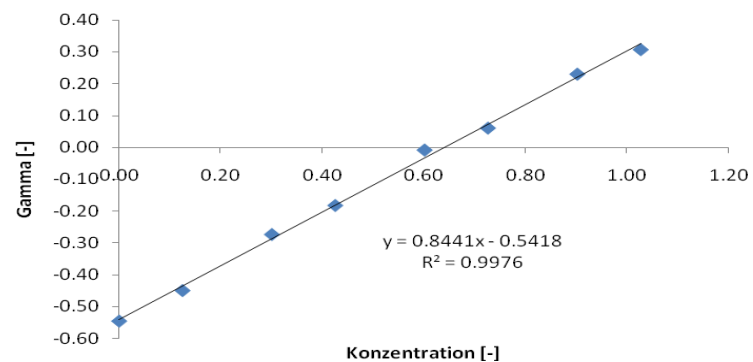


TEST Nr 3: Chrom VI pH 7.3

Konzentration [mg/l]	G-Wert	Io [Irel]	It [Irel]	Ict [Irel]	% Ht	Mittel % Ht	Gamma [-]	log Gamma	log Konz	SD [%]
K	K	463.90	592.30	601.49	1.53	0.00	0.00	0.00		0.00
		455.40	599.50	590.47	-1.53					
1.00	32	465.80	473.40	603.96	21.62	22.11	0.28	-0.55	0.00	0.69
		472.00	473.70	612.00	22.60					
1.33	24	457.60	446.30	593.33	24.78	26.16	0.35	-0.45	0.12	1.95
		485.40	456.10	629.37	27.53					
2.00	16	492.90	422.20	639.10	33.94	34.73	0.53	-0.27	0.30	1.11
		494.90	413.80	641.69	35.51					
2.67	12	511.30	396.80	662.95	40.15	39.64	0.66	-0.18	0.43	0.72
		509.30	402.00	660.36	39.12					
4.00	8	505.30	325.40	655.17	50.33	49.53	0.98	-0.01	0.60	1.14
		505.70	336.20	655.69	48.73					
5.33	6	500.30	302.20	648.69	53.41	53.50	1.15	0.06	0.73	0.12
		524.00	315.40	679.42	53.58					
8.00	4	506.10	249.40	656.21	61.99	62.98	1.70	0.23	0.90	1.39
		521.70	243.80	676.44	63.96					
10.67	3	532.30	224.40	690.18	67.49	67.02	2.03	0.31	1.03	0.66
		542.10	235.10	702.89	66.55					
16.00	2	543.90	187.10	705.22	73.47	73.71	2.80	0.45	1.20	0.34
		547.60	185.00	710.02	73.94					

fk 1:	1.28
fk 2:	1.32
Mittel fk:	1.30

EC₅₀:	4.42 mg/l
EC₂₀:	0.83 mg/l



8. Anhang IIId: Leuchtbakterien Test - Ricin

TEST Nr 1: Ricin pH 7.1

Konzentration [mg/l]	G-Wert	lo [Irel]	It [Irel]	Ict [Irel]	% Ht	Mittel % Ht	Gamma [-]	log Gamma	log Konz	SD [%]
K	K	297.8	335	356.59	6.05	0.00	0.00	0.00	-	0.00
		263.8	335	315.88	-6.05					
31.2	32	254.3	332	304.50	-9.03	-6.49	-0.06	-	1.49	3.60
		287.4	357.7	344.14	-3.94					
62.5	16	259.8	333.6	311.09	-7.24	-5.98	-0.06	-	1.80	1.78
		271.4	340.3	324.98	-4.72					
125	8	291.1	337.9	348.57	3.06	1.61	0.02	-1.79	2.10	2.05
		280.4	335.2	335.75	0.16					
250	4	294.3	342.7	352.40	2.75	4.01	0.04	-1.38	2.40	1.77
		304.3	345.2	364.37	5.26					
500	2	290.4	339.2	347.73	2.45	2.55	0.03	-1.58	2.70	0.14
		301.9	351.9	361.50	2.65					

fk 1:	1.12
fk 2:	1.27
Mittel fk:	1.20

9. Anhang IVa: Zytotoxtest - Atropin

Test: Atropin Nr 1
Split: 9
pH: 8 - 19

Abs OD540

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.041	0.041	0.040	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.040	0.041	0.042	0.041
B	0.040	0.165	0.041	0.041	0.042	0.042	0.043	0.042	0.042	0.041	0.193	0.041
C	0.042	0.242	0.042	0.042	0.043	0.043	0.043	0.041	0.043	0.042	0.171	0.042
D	0.042	0.199	0.042	0.041	0.042	0.041	0.042	0.042	0.042	0.042	0.186	0.041
E	0.042	0.193	0.041	0.042	0.041	0.041	0.041	0.037	0.043	0.078	0.165	0.041
F	0.040	0.171	0.040	0.043	0.042	0.038	0.042	0.041	0.040	0.076	0.224	0.041
G	0.044	0.186	0.041	0.041	0.042	0.038	0.042	0.040	0.041	0.076	0.199	0.044
H	0.043	0.044	0.043	0.042	0.047	0.041	0.042	0.041	0.042	0.041	0.042	0.052

Durchschnitt Blanks (links): 0.042
 Durchschnitt Blanks (rechts): 0.043
 Differenz: 0.001
 Total Durchschnitt: 0.042

Durchschnitt VC1 (links): 0.193
 Durchschnitt VC2 (rechts): 0.190
 Total Durchschnitt: 0.191
 Differenz VC1 [%]: 0.770
 Differenz VC2 [%]: -0.782

Abs OD540 Korrigiert

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.041	0.041	0.040	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.040	0.041	0.042	0.041
B	0.040	0.165	0.000	0.000	0.001	0.000	0.002	0.002	0.002	-0.002	0.193	0.041
C	0.042	0.242	0.001	0.001	0.002	0.001	0.003	0.001	0.003	-0.001	0.171	0.042
D	0.042	0.199	0.001	0.000	0.001	0.000	0.002	0.002	0.002	-0.001	0.186	0.041
E	0.042	0.193	-0.002	-0.005	0.000	0.000	-0.001	-0.006	0.002	0.036	0.165	0.041
F	0.040	0.171	-0.002	-0.004	0.001	-0.004	0.000	-0.001	-0.001	0.034	0.224	0.041
G	0.044	0.186	-0.001	-0.006	0.001	-0.004	0.000	-0.002	0.000	0.034	0.199	0.044
H	0.043	0.044	0.043	0.042	0.047	0.041	0.042	0.041	0.042	0.041	0.042	0.052

10. Anhang IVb: Zytotoxtest - Dichlorvos

Test: Dichlorvos Nr 1
Split: 9
pH: 9 - 10

Abs OD540

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.041	0.041	0.040	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.040	0.041	0.042	0.041
0.040	0.068	0.041	0.041	0.042	0.042	0.043	0.042	0.053	0.054	0.163	0.041
0.042	0.182	0.042	0.042	0.043	0.043	0.043	0.044	0.054	0.053	0.134	0.042
0.042	0.158	0.042	0.041	0.042	0.041	0.042	0.042	0.054	0.056	0.133	0.041
0.042	0.193	0.061	0.062	0.068	0.071	0.073	0.077	0.073	0.078	0.165	0.041
0.040	0.171	0.060	0.064	0.069	0.078	0.078	0.077	0.077	0.076	0.124	0.041
0.044	0.186	0.061	0.062	0.070	0.078	0.077	0.078	0.078	0.076	0.199	0.044
0.043	0.044	0.043	0.042	0.047	0.041	0.042	0.041	0.042	0.041	0.042	0.052

Durchschnitt Blanks (links):	0.042	Durchschnitt VC1 (links):	0.160
Durchschnitt Blanks (rechts):	0.043	Durchschnitt VC2 (rechts):	0.153
Differenz:	0.001	Total Durchschnitt:	0.156
Total Durchschnitt:	0.042	Differenz VC1 [%]:	2.084
		Differenz VC2 [%]:	-2.175

Abs OD540 Korrigiert

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
-0.001	-0.001	-0.002	-0.001	-0.001	-0.002	-0.001	-0.002	-0.002	-0.002	0.000	-0.001
-0.002	0.025	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.002	0.013	0.013	0.121	-0.001
-0.001	0.139	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.003	0.014	0.012	0.091	0.000
-0.001	0.116	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.002	0.014	0.015	0.091	-0.002
0.000	0.150	0.018	0.019	0.021	0.030	0.031	0.036	0.030	0.037	0.123	-0.002
-0.002	0.129	0.018	0.022	0.022	0.037	0.036	0.035	0.035	0.036	0.082	-0.001
0.001	0.144	0.019	0.020	0.023	0.037	0.036	0.037	0.035	0.036	0.156	0.002
0.000	0.002	0.000	0.000	0.005	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	-0.001	0.000	0.010

[ng/ml]	ODmean	ODstd	%mean	%std
2270000	0.000967	0.000577	0	1.651144
1135000	0.0004	0.000173	-1.62059	0.495343
567500	0.000933	0.000586	-0.09533	1.67573
283750	0.0013	0.000721	0.953288	2.062279
141875	0.0013	0.000458	0.953288	1.310557
70937.5	0.002033	0.000757	3.050523	2.165457
35468.75	0.0138	0.000608	36.70162	1.73959
17734.38	0.0136	0.00167	36.12965	4.776917
8867.188	0.018267	0.000503	49.4757	1.439434
4433.594	0.020167	0.001222	54.90945	3.494812
2216.797	0.021767	0.000902	59.48524	2.57917
1108.398	0.034767	0.003955	96.66351	11.31125
554.1992	0.0343	0.002696	95.32889	7.711044
277.0996	0.036033	0.000945	100.286	2.703041
138.5498	0.033333	0.00265	92.56435	7.579102
69.2749	0.035933	0.000751	100	2.146484

Bottom	Top	LD ₅₀	HillSlope	R ²
100	0	7690	0.869	0.964

Test: Dichlorvos Nr 2
Split: 11
pH: 9 - 10

Abs OD540

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.042	0.041	0.043	0.043	0.043	0.044	0.042	0.041	0.042	0.042	0.042	0.042
B	0.046	0.348	0.043	0.043	0.042	0.040	0.044	0.045	0.067	0.066	0.409	0.041
C	0.040	0.354	0.041	0.042	0.040	0.041	0.043	0.049	0.064	0.068	0.408	0.041
D	0.045	0.318	0.044	0.041	0.041	0.042	0.042	0.047	0.064	0.067	0.393	0.041
E	0.048	0.355	0.084	0.093	0.124	0.139	0.146	0.152	0.145	0.143	0.408	0.041
F	0.043	0.391	0.079	0.089	0.122	0.150	0.150	0.158	0.155	0.167	0.407	0.042
G	0.041	0.466	0.079	0.092	0.115	0.137	0.146	0.156	0.160	0.158	0.448	0.042
H	0.041	0.042	0.042	0.042	0.041	0.042	0.047	0.041	0.043	0.046	0.043	0.041

Durchschnitt Blanks (links):0.043

Durchschnitt Blanks (rechts):0.042

Differenz:0.001

Total Durchschnitt:0.042

Durchschnitt VC1 (links):0.372

Durchschnitt VC2 (rechts):0.412

Total Durchschnitt:0.392

Differenz VC1 [%]:-5.428

Differenz VC2 [%]:4.897

Abs OD540 Korrigiert

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.000	-0.001	0.000	0.001	0.001	0.002	0.000	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	0.000
B	0.004	0.306	0.000	0.000	-0.001	-0.004	0.001	0.004	0.026	0.024	0.367	-0.001
C	-0.002	0.311	-0.002	-0.001	-0.003	-0.003	0.000	0.008	0.022	0.027	0.366	-0.002
D	0.003	0.275	0.001	-0.002	-0.002	-0.002	-0.001	0.006	0.023	0.025	0.351	-0.002
E	0.005	0.313	0.041	0.051	0.082	0.097	0.100	0.110	0.103	0.097	0.365	-0.001
F	0.001	0.349	0.037	0.048	0.081	0.108	0.103	0.117	0.112	0.122	0.365	-0.001
G	-0.002	0.423	0.037	0.050	0.074	0.095	0.099	0.115	0.117	0.112	0.406	0.000
H	-0.001	0.000	0.000	-0.001	-0.001	-0.001	0.004	-0.001	0.000	0.003	0.001	-0.001

[ng/ml]	ODmean	ODstd	%mean	%std
2270000	-0.00023	0.001405	0	1.270121
1135000	-0.00103	0.000874	-0.72333	0.789954
567500	-0.0023	0.001015	-1.8686	0.917621
283750	-0.00323	0.000902	-2.71248	0.815416
141875	0.000267	0.00105	0.45208	0.949726
70937.5	0.0058	0.002307	5.455093	2.085454
35468.75	0.023433	0.001973	21.39843	1.784044
17734.38	0.025133	0.001365	22.9355	1.234213
8867.188	0.038433	0.002491	34.96082	2.251942
4433.594	0.049667	0.001888	45.11754	1.706764
2216.797	0.078833	0.004706	71.48885	2.10302
1108.398	0.099967	0.006974	90.59675	3.797829
554.1992	0.100567	0.002155	91.13924	4.173851
277.0996	0.114	0.003219	103.2851	8.657928
138.5498	0.110667	0.00742	100.2713	9.267227
69.2749	0.110367	0.012491	100	11.29343

Bottom	Top	LD50	HillsSlope	R²
100	0	5157	1.088	0.988

Test: Dichlorvos Nr 3
Split: 13
pH: 9 - 10

Abs OD540

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.041	0.041	0.040	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.040	0.041	0.042	0.041
B	0.040	0.068	0.041	0.041	0.042	0.042	0.043	0.042	0.043	0.054	0.163	0.041
C	0.042	0.182	0.042	0.042	0.043	0.043	0.043	0.044	0.044	0.053	0.134	0.042
D	0.042	0.158	0.042	0.041	0.042	0.041	0.042	0.042	0.044	0.056	0.133	0.041
E	0.042	0.193	0.051	0.062	0.068	0.071	0.083	0.087	0.083	0.088	0.165	0.041
F	0.040	0.171	0.050	0.064	0.069	0.078	0.088	0.087	0.087	0.086	0.124	0.041
G	0.044	0.186	0.051	0.062	0.070	0.078	0.087	0.088	0.088	0.086	0.199	0.044
H	0.043	0.044	0.043	0.042	0.047	0.041	0.042	0.041	0.042	0.041	0.042	0.052

Durchschnitt Blanks (links): 0.042
 Durchschnitt Blanks (rechts): 0.043
 Differenz: 0.001
 Total Durchschnitt: 0.042

Durchschnitt VC1 (links): 0.160
 Durchschnitt VC2 (rechts): 0.153
 Total Durchschnitt: 0.156
 Differenz VC1 [%]: 2.084
 Differenz VC2 [%]: -2.175

Abs OD540 Korrigiert

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-0.001	-0.001	-0.002	-0.001	-0.001	-0.002	-0.001	-0.002	-0.002	-0.002	0.000	-0.001
B	-0.002	0.025	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.002	0.003	0.013	0.121	-0.001
C	-0.001	0.139	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.003	0.004	0.012	0.091	0.000
D	-0.001	0.116	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.002	0.004	0.015	0.091	-0.002
E	0.000	0.150	0.008	0.019	0.021	0.030	0.041	0.046	0.040	0.047	0.123	-0.002
F	-0.002	0.129	0.008	0.022	0.022	0.037	0.046	0.045	0.045	0.046	0.082	-0.001
G	0.001	0.144	0.009	0.020	0.023	0.037	0.046	0.047	0.045	0.046	0.156	0.002
H	0.000	0.002	0.000	0.000	0.005	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	-0.001	0.000	0.010

[ng/ml]	ODmean	ODstd	%mean	%std
2270000	0.000967	0.000577	0	1.283951
1135000	0.0004	0.000173	-1.26019	0.385185
567500	0.000933	0.000586	-0.07413	1.30307
283750	0.0013	0.000721	0.741289	1.603654
141875	0.0013	0.000458	0.741289	1.019106
70937.5	0.002033	0.000757	2.372126	1.683887
35468.75	0.0038	0.000608	6.300963	1.352726
17734.38	0.0136	0.00167	28.09488	3.714594
8867.188	0.008267	0.000503	16.23425	1.119324
4433.594	0.020167	0.001222	42.6983	2.717613
2216.797	0.021767	0.000902	46.25648	2.005596
1108.398	0.034767	0.003955	75.16679	8.795769
554.1992	0.0443	0.002696	96.36768	5.996208
277.0996	0.046033	0.000945	100.2224	2.101921
138.5498	0.043333	0.00265	94.21794	5.8936
69.2749	0.045933	0.000751	100	1.669136

Bottom	Top	LD ₅₀	HillSlope	R ²
100	0	2981	1.107	0.976

11. Anhang IVc: Zytotoxtest – Kaliumdichromat (chrome VI)

Test: Kaliumdichromat Nr 1
Split: 9
pH: 8 - 9

Abs OD540

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.042	0.041	0.041	0.041	0.040	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.042	0.041
B	0.042	0.232	0.041	0.042	0.042	0.043	0.045	0.048	0.051	0.063	0.298	0.042
C	0.042	0.321	0.042	0.042	0.042	0.043	0.042	0.049	0.054	0.054	0.162	0.043
D	0.042	0.309	0.042	0.042	0.041	0.043	0.044	0.048	0.055	0.054	0.246	0.041
E	0.041	0.196	0.078	0.077	0.073	0.077	0.080	0.080	0.084	0.083	0.226	0.043
F	0.042	0.227	0.074	0.072	0.074	0.079	0.079	0.082	0.082	0.082	0.182	0.042
G	0.042	0.248	0.072	0.078	0.075	0.080	0.080	0.081	0.085	0.081	0.271	0.042
H	0.041	0.042	0.042	0.041	0.042	0.043	0.042	0.042	0.043	0.042	0.043	0.042

Durchschnitt Blanks (links):	0.042	Durchschnitt VC1 (links):	0.255
Durchschnitt Blanks (rechts):	0.042	Durchschnitt VC2 (rechts):	0.231
Differenz:	0.000	Total Durchschnitt:	0.243
Total Durchschnitt:	0.042	Differenz VC1 [%]:	4.803
		Differenz VC2 [%]:	-5.313

Abs OD540 Korrigiert

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.000	-0.001	-0.001	-0.001	-0.002	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	0.000	0.000
B	0.000	0.190	0.000	0.001	0.002	0.001	0.004	0.007	0.010	0.022	0.256	0.000
C	0.000	0.279	0.001	0.002	0.001	0.002	0.001	0.008	0.013	0.013	0.120	0.001
D	0.000	0.267	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.007	0.014	0.013	0.204	-0.001
E	-0.001	0.154	0.036	0.035	0.031	0.034	0.038	0.038	0.040	0.041	0.184	0.001
F	0.000	0.185	0.032	0.031	0.032	0.036	0.037	0.040	0.039	0.041	0.140	0.000
G	0.000	0.206	0.031	0.037	0.033	0.037	0.038	0.039	0.041	0.040	0.229	0.000
H	-0.001	0.000	0.000	-0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000

[ng/ml]	ODmean	ODstd	%mean	%std
26000	0.0008	0.000361	0	0.910492
13000	0.001533	0.000289	1.851851	0.728977
6500	0.001267	0.000416	1.178452	1.051346
3250	0.001567	0.000252	1.936028	0.635508
1625	0.0023	0.0015	3.787879	3.787879
812.5	0.007033	0.000503	15.74074	1.271016
406.25	0.012533	0.001966	29.62963	4.963474
203.125	0.0159	0.005197	38.13132	13.12403
101.5625	0.032867	0.002761	80.97644	6.972313
50.78125	0.034467	0.002914	85.01684	7.359421
25.39063	0.031633	0.001106	77.86195	2.793037
12.69531	0.035633	0.001553	87.96297	3.922958
6.347656	0.037733	0.000814	93.26599	2.056702
3.173828	0.0392	0.000819	96.9697	2.067009
1.586914	0.040233	0.001258	99.57912	3.177544
0.793457	0.0404	0.000755	100	1.906525

Bottom	Top	LD ₅₀	HillSlope	R ²
100	0	183.4	1.146	0.978

Test: Kaliumdichromat Nr 2
Split: 11
pH: 8 - 9

Abs OD540

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.044	0.042	0.042	0.042	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.042	0.042	0.041
B	0.042	0.202	0.041	0.041	0.041	0.040	0.042	0.052	0.054	0.053	0.215	0.041
C	0.045	0.184	0.043	0.042	0.042	0.042	0.043	0.047	0.050	0.051	0.164	0.042
D	0.043	0.232	0.043	0.043	0.043	0.044	0.045	0.045	0.052	0.054	0.233	0.049
E	0.046	0.206	0.072	0.078	0.080	0.081	0.091	0.089	0.086	0.091	0.216	0.042
F	0.046	0.248	0.072	0.076	0.078	0.090	0.087	0.088	0.091	0.090	0.208	0.041
G	0.044	0.269	0.071	0.072	0.081	0.083	0.089	0.087	0.088	0.086	0.255	0.045
H	0.041	0.044	0.042	0.045	0.048	0.044	0.044	0.042	0.042	0.043	0.044	0.041

Durchschnitt Blanks (links):	0.044	Durchschnitt VC1 (links):	0.223
Durchschnitt Blanks (rechts):	0.043	Durchschnitt VC2 (rechts):	0.215
Differenz:	0.001	Total Durchschnitt:	0.219
Total Durchschnitt:	0.043	Differenz VC1 [%]:	1.846
		Differenz VC2 [%]:	-1.917

Abs OD540 Korrigiert

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.001	-0.001	-0.001	-0.002	-0.002	-0.002	-0.002	-0.002	-0.003	-0.001	-0.001	-0.002
B	-0.001	0.159	-0.001	-0.001	0.000	-0.001	0.001	0.011	0.013	0.011	0.172	-0.002
C	0.002	0.141	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.006	0.009	0.009	0.121	-0.001
D	0.000	0.188	0.001	0.001	0.002	0.003	0.003	0.004	0.011	0.012	0.190	0.006
E	0.003	0.162	0.029	0.033	0.032	0.037	0.048	0.047	0.044	0.049	0.172	-0.002
F	0.003	0.205	0.030	0.031	0.030	0.046	0.044	0.046	0.049	0.047	0.165	-0.002
G	0.001	0.226	0.028	0.027	0.033	0.038	0.046	0.045	0.046	0.043	0.212	0.002
H	-0.002	0.001	-0.001	0.002	0.005	0.001	0.000	-0.001	-0.001	-0.001	0.001	-0.002

[ng/ml]	ODmean	ODstd	%mean	%std
26000	0.000233	0.00125	0	2.708303
13000	0.0002	0.000954	-0.0722	2.066294
6500	0.000967	0.001106	1.588449	2.395763
3250	0.001	0.00167	1.660651	3.618041
1625	0.0019	0.001229	3.610109	2.661706
812.5	0.0072	0.003537	15.09025	7.66126
406.25	0.011267	0.001904	23.89892	4.123117
203.125	0.010567	0.00145	22.38267	3.141415
101.5625	0.029033	0.000862	62.38267	1.867512
50.78125	0.030167	0.003134	64.83755	6.788925
25.39063	0.031567	0.001595	67.87004	3.454407
12.69531	0.040367	0.004658	86.93141	10.08868
6.347656	0.0457	0.0019	98.48375	4.115524
3.173828	0.046067	0.001007	99.27798	2.180458
1.586914	0.0461	0.002464	99.35019	5.336609
0.793457	0.0464	0.002914	100	6.311394

Bottom	Top	LD ₅₀	HillSlope	R ²
100	0	98.4	0.946	0.982

Test: Kaliumdichromat Nr 3
Split: 13
pH: 8 - 9

Abs OD540

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.049	0.041	0.045	0.043	0.052	0.042	0.045	0.054	0.049	0.043	0.044	0.042
B	0.042	0.266	0.043	0.041	0.049	0.041	0.040	0.045	0.048	0.053	0.262	0.043
C	0.047	0.314	0.045	0.042	0.042	0.040	0.043	0.046	0.050	0.066	0.289	0.044
D	0.043	0.309	0.043	0.041	0.041	0.040	0.044	0.045	0.050	0.062	0.338	0.046
E	0.044	0.290	0.064	0.065	0.080	0.080	0.092	0.092	0.096	0.096	0.318	0.044
F	0.041	0.288	0.063	0.078	0.081	0.085	0.094	0.096	0.095	0.097	0.328	0.053
G	0.042	0.281	0.066	0.079	0.081	0.089	0.099	0.096	0.098	0.110	0.335	0.044
H	0.045	0.043	0.045	0.043	0.043	0.041	0.045	0.040	0.043	0.046	0.042	0.044

Durchschnitt Blanks (links): 0.0437
 Durchschnitt Blanks (rechts): 0.04435
 Differenz: 0.05%
 Total Durchschnitt: 0.04403

Durchschnitt VC1 (links): 0.2913
 Durchschnitt VC2 (rechts): 0.31163
 Total Durchschnitt: 0.30147
 Differenz VC1 [%]: -3.4901
 Differenz VC2 [%]: 3.26238

Abs OD540 Korrigiert

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.004	-0.003	0.000	-0.001	0.008	-0.001	0.000	0.009	0.005	-0.001	-0.000	-0.002
B	-0.002	0.222	-0.001	-0.001	-0.003	-0.001	-0.004	-0.008	-0.001	0.010	0.217	-0.001
C	0.003	0.270	-0.000	-0.000	-0.010	-0.002	-0.002	-0.008	0.001	0.023	0.244	-0.000
D	-0.001	0.264	-0.001	-0.002	-0.011	-0.002	-0.001	-0.008	0.000	0.019	0.294	0.002
E	-0.000	0.245	0.018	0.022	0.036	0.038	0.047	0.052	0.053	0.050	0.273	-0.000
F	-0.002	0.243	0.017	0.035	0.038	0.043	0.049	0.056	0.052	0.050	0.284	0.008
G	-0.002	0.236	0.020	0.036	0.037	0.047	0.054	0.056	0.054	0.064	0.291	-0.000
H	0.001	-0.000	0.001	-0.001	-0.001	-0.002	0.000	-0.003	-0.001	0.001	-0.002	-0.000

[ng/ml]	ODmean	ODstd	%mean	%std
26000	-0.00103	0.00086	0	1.52993
13000	-0.00167	0.00091	-1.12386	1.61016
6500	-0.0087	0.00446	-13.6046	7.92199
3250	-0.00187	0.00076	-1.47877	1.34364
1625	-0.00263	0.00159	-2.83923	2.82997
812.5	-0.00843	0.00031	-13.1314	0.54212
406.25	0.00013	0.00151	2.07027	2.68729
203.125	0.01783	0.00706	33.4792	12.5256
101.563	0.01907	0.00142	35.6678	2.5179
50.7813	0.03123	0.00768	57.2578	13.6238
25.3906	0.03757	0.0008	68.4964	1.42331
12.6953	0.0434	0.00461	78.8478	8.1859
6.34766	0.05023	0.00352	90.9736	6.23947
3.17383	0.05482	0.00227	99.1128	0.53236
1.58691	0.05353	0.00135	96.8177	23.9569
0.79346	0.05532	0.00813	100	9.49381

Bottom	Top	LD ₅₀	HillSlope	R ²
100	0	98.4	0.946	0.982

12. Anhang IVd: Zytotoxtest - Ricin

Test: Ricin Nr 1
Split: 7
pH: 8 - 9

Abs OD540

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.043	0.054	0.041	0.042	0.042	0.048	0.045	0.041	0.041	0.042	0.042	0.043
B	0.042	0.126	0.114	0.061	0.059	0.058	0.059	0.075	0.065	0.075	0.116	0.043
C	0.047	0.138	0.125	0.069	0.069	0.069	0.069	0.067	0.068	0.081	0.173	0.042
D	0.045	0.135	0.119	0.075	0.075	0.071	0.074	0.072	0.072	0.076	0.132	0.042
E	0.041	0.114	0.091	0.119	0.107	0.120	0.108	0.121	0.105	0.126	0.137	0.041
F	0.041	0.104	0.108	0.099	0.109	0.099	0.118	0.135	0.113	0.127	0.107	0.045
G	0.047	0.136	0.115	0.117	0.137	0.133	0.139	0.148	0.121	0.138	0.143	0.042
H	0.042	0.043	0.043	0.042	0.042	0.043	0.042	0.042	0.043	0.043	0.042	0.042

Durchschnitt Blanks (links): 0.044
Durchschnitt Blanks (rechts): 0.042
Differenz: 0.002
Total Durchschnitt: 0.043

Durchschnitt VC1 (links): 0.126
Durchschnitt VC2 (rechts): 0.135
Total Durchschnitt: 0.130
Differenz VC1 [%]: -3.652
Differenz VC2 [%]: 3.403

Abs OD540 Korrigiert

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.000	0.011	-0.002	-0.001	-0.001	0.005	0.002	-0.002	-0.002	-0.002	-0.002	0.000
B	-0.001	0.065	0.053	0.006	0.005	0.002	0.004	0.024	0.018	0.019	0.062	-0.001
C	0.004	0.077	0.064	0.014	0.015	0.013	0.014	0.016	0.021	0.025	0.119	-0.001
D	0.001	0.074	0.058	0.020	0.021	0.015	0.019	0.021	0.019	0.020	0.078	-0.002
E	-0.002	0.053	0.026	0.051	0.056	0.047	0.045	0.054	0.073	0.069	0.083	-0.002
F	-0.002	0.043	0.043	0.031	0.035	0.049	0.055	0.068	0.065	0.070	0.053	0.002
G	0.003	0.075	0.050	0.049	0.069	0.077	0.076	0.081	0.068	0.081	0.089	-0.001
H	-0.002	0.000	0.000	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	-0.001	-0.002	-0.001

[pg/ml]	ODmean	ODstd	%mean	%std
50000	0.014	0.001229	0	2.041223
25000	0.010	0.001464	2.008561	6.228992
12500	0.012	0.00138	0.724399	0.603566
6250	0.020	0.00105	3.457359	0.356162
3125	0.019	0.002759	9.483042	1.045407
1562.5	0.021	0.002654	9.153769	1.575354
781.25	0.040	0.008293	17.05631	2.967289
390.625	0.044	0.008273	24.89298	2.950251
195.3125	0.053	0.009457	29.46987	3.083403
97.65625	0.058	0.011332	46.78959	0.700817
48.82813	0.059	0.010834	51.16891	2.800945
24.41406	0.068	0.009084	58.24827	1.387638
12.20703	0.069	0.014862	116.4965	1.110283
6.103516	0.073	0.019498	99.4073	38.20596
3.051758	0.073	0.011345	100	34.93471

Bottom	Top	LD ₅₀	HillSlope	R ²
100	0	181.6	0.846	0.986

Test: Ricin Nr 2
Split: 9
pH: 8 - 9

Abs OD540

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.040	0.041	0.037	0.040	0.039	0.041	0.040	0.040	0.041	0.039	0.040	0.040
B	0.042	0.128	0.044	0.043	0.046	0.044	0.047	0.049	0.062	0.203	0.128	0.039
C	0.040	0.181	0.043	0.046	0.048	0.046	0.052	0.054	0.078	0.081	0.181	0.040
D	0.040	0.144	0.046	0.045	0.045	0.045	0.048	0.051	0.066	0.070	0.144	0.039
E	0.040	0.159	0.092	0.093	0.077	0.074	0.083	0.088	0.076	0.440	0.159	0.042
F	0.040	0.125	0.077	0.074	0.059	0.061	0.067	0.052	0.055	0.512	0.125	0.041
G	0.041	0.100	0.074	0.094	0.057	0.056	0.054	0.056	0.058	0.109	0.100	0.041
H	0.041	0.041	0.042	0.042	0.040	0.040	0.040	0.041	0.040	0.041	0.041	0.042

Durchschnitt Blanks (links):0.041

Durchschnitt Blanks (rechts):0.040

Differenz:0.000

Total Durchschnitt:0.040

Durchschnitt VC1 (links):0.139

Durchschnitt VC2 (rechts):0.139

Total Durchschnitt:0.139

Differenz VC1 [%]:0.000

Differenz VC2 [%]:0.000

Abs OD540 Korrigiert

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.000	0.000	-0.003	0.000	-0.001	0.001	0.000	-0.001	0.001	-0.001	-0.001	-0.001
B	0.001	0.065	0.053	0.006	0.005	0.002	0.004	0.024	0.018	0.019	0.062	-0.001
C	0.000	0.077	0.064	0.014	0.015	0.013	0.014	0.016	0.021	0.025	0.119	0.000
D	-0.001	0.074	0.058	0.020	0.021	0.015	0.019	0.021	0.019	0.020	0.078	-0.001
E	0.000	0.053	0.026	0.051	0.056	0.047	0.045	0.054	0.073	0.069	0.083	0.002
F	-0.001	0.043	0.043	0.031	0.035	0.049	0.055	0.068	0.065	0.070	0.053	0.000
G	0.000	0.075	0.050	0.049	0.069	0.077	0.076	0.081	0.068	0.081	0.089	0.001
H	0.001	0.000	0.002	0.002	-0.001	-0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001

[pg/ml]	ODmean	ODstd	%mean	%std
50000	0.007	0.008083	0	11.70628
25000	0.005	0.007	0.566666	13.47151
12500	0.007	0.007638	0	11.66667
6250	0.004	0.004041	0	12.72938
3125	0.008	0.001528	11.66667	6.735753
1562.5	0.012	0.003215	10	2.545876
781.25	0.027	0.012342	13.33333	5.357584
390.625	0.036	0.011015	43.9	20.57057
195.3125	0.039	0.017156	50.56667	18.35857
97.65625	0.045	0.016773	66.66666	28.59359
48.82813	0.024	0.015822	73.9	27.95498
24.41406	0.024	0.013503	75.56667	26.36988
12.20703	0.028	0.004041	90.56667	22.50515
6.103516	0.025	0.006658	92.23333	6.735748
3.051758	0.023	0.003764	100	11.09721

Bottom	Top	LD50	HillSlope	R²
100	0	84.51	0.937	0.942

Test: Ricin Nr 3
Split: 11
pH: 8 - 9

Abs OD540

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.041	0.041	0.043	0.042	0.041	0.043	0.041	0.042	0.042	0.040	0.043	0.041
B	0.043	0.295	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.052	0.052	0.063	0.373	0.042
C	0.041	0.321	0.044	0.041	0.041	0.042	0.043	0.052	0.054	0.062	0.344	0.041
D	0.042	0.312	0.042	0.043	0.043	0.043	0.043	0.052	0.052	0.062	0.339	0.040
E	0.040	0.294	0.070	0.071	0.090	0.095	0.100	0.158	0.162	0.163	0.356	0.042
F	0.041	0.301	0.063	0.075	0.087	0.091	0.097	0.156	0.162	0.164	0.338	0.045
G	0.042	0.324	0.064	0.072	0.089	0.090	0.098	0.095	0.097	0.103	0.382	0.041
H	0.041	0.042	0.043	0.040	0.041	0.043	0.041	0.043	0.043	0.041	0.041	0.042

Durchschnitt Blanks (links): 0.041
 Durchschnitt Blanks (rechts): 0.042
 Differenz: 0.000
 Total Durchschnitt: 0.042

Durchschnitt VC1 (links): 0.308
 Durchschnitt VC2 (rechts): 0.355
 Total Durchschnitt: 0.331
 Differenz VC1 [%]: -7.746
 Differenz VC2 [%]: 6.707

Abs OD540 Korrigiert

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-0.001	0.000	0.001	0.000	-0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	-0.001	0.001	0.000
B	0.001	0.253	0.001	0.001	0.002	0.000	0.001	0.010	0.010	0.022	0.331	0.001
C	-0.001	0.279	0.001	0.000	0.000	-0.001	0.001	0.010	0.012	0.022	0.302	-0.001
D	0.000	0.271	0.000	0.001	0.002	0.001	0.002	0.010	0.010	0.022	0.298	-0.001
E	-0.001	0.252	0.027	0.031	0.049	0.053	0.058	0.116	0.119	0.122	0.314	0.000
F	0.000	0.259	0.020	0.035	0.047	0.049	0.055	0.113	0.120	0.123	0.296	0.003
G	0.000	0.282	0.021	0.032	0.048	0.048	0.057	0.053	0.054	0.062	0.340	-0.001
H	-0.001	0.000	0.002	-0.002	-0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	-0.001	0.000	0.000

[pg/ml]	ODmean	ODstd	%mean	%std
50000	0.000567	0.000839	0.067477	1.114893
25000	0.001267	0.000929	0.775979	0.254718
12500	-3.3E-05	0.000611	-0.53981	0.884301
6250	0.0014	0.000361	0.910931	1.620487
3125	0.0103	1E-04	9.919029	1.626796
1562.5	0.010833	0.001021	10.45884	2.602875
781.25	0.021933	0.000321	21.69366	1.236862
390.625	0.022467	0.003614	22.23347	0.872641
195.3125	0.032667	0.002325	32.55736	0.267788
97.65625	0.047933	0.001266	48.00945	2.025131
48.82813	0.0496	0.002666	49.69636	1.742344
24.41406	0.056867	0.001405	57.05128	2.795795
12.20703	0.0938	0.035616	94.4332	0.563538
6.103516	0.097533	0.037788	98.21188	3.270866
3.051758	0.102467	0.03479	103.2051	8.518272

Bottom	Top	LD ₅₀	HillSlope	R ²
100	0	79.16	0.811	0.968

Test: Ricin Nr 4
Split: 13
pH: 8 - 9

Abs OD540

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.040	0.043	0.041	0.042	0.043	0.041	0.040	0.041	0.043	0.041	0.042	0.044
B	0.041	0.318	0.058	0.041	0.041	0.040	0.048	0.041	0.052	0.061	0.343	0.040
C	0.044	0.309	0.043	0.040	0.045	0.042	0.049	0.042	0.052	0.064	0.319	0.046
D	0.042	0.293	0.041	0.041	0.043	0.045	0.049	0.040	0.057	0.061	0.312	0.044
E	0.042	0.328	0.077	0.078	0.093	0.097	0.099	0.161	0.177	0.159	0.319	0.041
F	0.042	0.277	0.071	0.081	0.091	0.091	0.138	0.173	0.167	0.176	0.303	0.043
G	0.045	0.247	0.074	0.081	0.090	0.099	0.118	0.159	0.161	0.167	0.351	0.045
H	0.041	0.043	0.043	0.042	0.044	0.042	0.043	0.041	0.043	0.041	0.044	0.044

Durchschnitt Blanks (links):	0.042	Durchschnitt VC1 (links):	0.295
Durchschnitt Blanks (rechts):	0.043	Durchschnitt VC2 (rechts):	0.324
Differenz:	0.001	Total Durchschnitt:	0.310
Total Durchschnitt:	0.043	Differenz VC1 [%]:	-4.956
		Differenz VC2 [%]:	4.509

Abs OD540 Korrigiert

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-0.002	0.000	-0.002	0.000	0.001	-0.002	-0.003	-0.001	0.001	-0.002	-0.001	0.001
B	-0.002	0.275	0.017	-0.001	-0.002	-0.001	0.008	0.000	0.009	0.020	0.300	-0.003
C	0.001	0.266	0.002	-0.002	0.001	0.001	0.008	0.001	0.008	0.023	0.276	0.003
D	-0.001	0.250	0.000	-0.001	0.000	0.004	0.009	-0.001	0.014	0.020	0.269	0.001
E	-0.001	0.286	0.034	0.036	0.049	0.054	0.056	0.120	0.134	0.118	0.276	-0.002
F	0.000	0.234	0.029	0.040	0.047	0.048	0.095	0.132	0.124	0.136	0.260	0.000
G	0.002	0.204	0.032	0.040	0.046	0.057	0.075	0.118	0.118	0.127	0.309	0.002
H	-0.001	0.000	0.000	-0.001	0.001	0.000	0.000	-0.002	0.000	-0.002	0.001	0.001

[pg/ml]	ODmean	ODstd	%mean	%std
50000	-0.00157	0.000306	-6.87023	0.269088
25000	-0.00043	0.001823	-5.87199	1.605697
12500	0.0013	0.002307	-4.34527	2.031573
6250	0.0084	0.0005	1.908396	0.440399
3125	-0.0003	0.001153	-5.75455	1.015786
1562.5	0.0102	0.003208	3.493834	2.266809
781.25	0.0211	0.00148	13.09453	1.303463
390.625	0.0316	0.002706	22.34292	3.133135
195.3125	0.038533	0.001935	28.44979	3.069344
97.65625	0.047067	0.00132	35.96593	1.162968
48.82813	0.053233	0.004398	41.39752	1.835644
24.41406	0.075533	0.019502	61.03932	0.970215
12.20703	0.1233	0.007373	103.1121	6.494057
6.103516	0.1254	0.008205	104.9618	7.227379
3.051758	0.126767	0.008751	106.1656	7.708038

Bottom	Top	LD ₅₀	HillSlope	R ²
100	0	60.1	1.094	0.957

Test: Ricin Nr 5
Split: 15
pH: 8 - 9

Abs OD540

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.043	0.054	0.041	0.042	0.042	0.048	0.045	0.041	0.041	0.042	0.042	0.043
B	0.042	0.134	0.041	0.041	0.041	0.041	0.043	0.043	0.061	0.075	0.114	0.043
C	0.047	0.150	0.045	0.042	0.042	0.043	0.044	0.046	0.066	0.066	0.120	0.042
D	0.045	0.119	0.041	0.042	0.041	0.041	0.042	0.044	0.052	0.064	0.123	0.042
E	0.041	0.129	0.082	0.088	0.097	0.094	0.090	0.099	0.089	0.111	0.126	0.041
F	0.041	0.102	0.071	0.083	0.115	0.113	0.120	0.113	0.104	0.104	0.113	0.045
G	0.047	0.118	0.069	0.080	0.099	0.099	0.090	0.097	0.106	0.106	0.128	0.042
H	0.042	0.043	0.043	0.042	0.042	0.043	0.042	0.042	0.043	0.043	0.042	0.042

Durchschnitt Blanks (links):0.044

Durchschnitt Blanks (rechts):0.042

Differenz:0.002

Total Durchschnitt:0.043

Durchschnitt VC1 (links):0.125

Durchschnitt VC2 (rechts):0.121

Total Durchschnitt:0.123

Differenz VC1 [%]:1.869

Differenz VC2 [%]:-1.942

Abs OD540 Korrigiert

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.000	0.011	-0.002	-0.001	-0.001	0.005	0.002	-0.002	-0.002	-0.002	-0.002	0.000
B	-0.001	0.091	0.000	-0.002	-0.001	-0.007	-0.002	0.001	0.020	0.034	0.071	-0.001
C	0.004	0.107	0.004	0.000	0.000	-0.006	-0.001	0.005	0.024	0.024	0.077	-0.001
D	0.001	0.076	0.000	-0.001	-0.002	-0.007	-0.003	0.003	0.011	0.022	0.080	-0.002
E	-0.002	0.085	0.039	0.046	0.055	0.051	0.048	0.057	0.046	0.068	0.082	-0.002
F	-0.002	0.059	0.028	0.041	0.073	0.070	0.078	0.071	0.061	0.061	0.070	0.002
G	0.003	0.074	0.026	0.038	0.057	0.057	0.048	0.055	0.063	0.063	0.084	-0.001
H	-0.002	0.000	0.000	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	-0.001	-0.002	-0.001

[pg/ml]	ODmean	ODstd	%mean	%std
50000	0.000833	0.000907	0	1.417777
25000	0.000967	0.000709	0.208334	1.108531
12500	0.006833	0.000814	9.375001	1.272583
6250	0.0022	0.0011	2.135417	1.71875
3125	0.003067	0.001914	3.489584	2.9906
1562.5	0.018133	0.007016	27.03125	10.9624
781.25	0.026667	0.006199	34.8698	2.541164
390.625	0.030963	0.007367	47.07813	11.51129
195.3125	0.0416	0.004257	63.69792	6.651184
97.65625	0.0616	0.009934	94.94792	15.52154
48.82813	0.0594	0.009902	91.51042	15.47112
24.41406	0.058086	0.017123	89.4573	26.75524
12.20703	0.06087	0.008507	92.2448	13.29142
6.103516	0.056733	0.009122	87.34375	14.25248
3.051758	0.0641	0.003764	100	14.25248

Bottom	Top	LD50	HillSlope	R²
100	0	412.9	1.052	0.979