

Es wurde ein System zur Erfassung der akuten Toxizität verschiedener Chemikalien ausgearbeitet, um die Anzahl von Tierversuchen zu reduzieren. Ziel war es, ein standardisiertes Testverfahren mit *Saccharomyces cerevisiae*, Stamm 70449, als Testorganismus zu entwickeln. Diese Spezies ist ein diploider, heterotropher Eukaryont. Als Nährmedium wurde die Würze-Bouillon der Fa. Merkt (Art. Nr. 5449) gewählt. Die Anzucht erfolgte in Erlenmeyerkolben als Batch-Kultur bei $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in einem Schüttelwasserbad bei konstanter Schüttelfrequenz (120/min.).

Mit einem Partikelanalysegerät (CASY[®], Fa. Schärfe) wurden die Populationsvolumina und die Zelldichten von Hefekulturen bestimmt. Desweiteren wurden die Größenverteilungen der Populationen durch Messungen der Volumina von bis zu 40.000 Zellen pro Kultur ermittelt. Auch die Veränderungen der mittleren Zelldurchmesser der Hefepopulationen durch Toxine und Kulturalter wurden erfaßt.

Da die Kulturen bei gleichen Zelldichten unterschiedliche Populationsvolumina aufwiesen, wurden diese Parameter mit den optischen Dichten identischer Kulturen verglichen. Dabei stellte sich heraus, daß die Populationsvolumina einen deutlich besseren Korrelationskoeffizienten ($r = 0,996$) zu den optischen Dichten besaßen als die Zelldichten ($r = 0,819$).

Chemikalien wurden in der Würze-Bouillon gelöst. Das Wachstum toxinhaltiger Kulturen wurde mit dem von Kontrollpopulationen verglichen. Dabei wurde festgestellt, daß die Kulturdauer Einfluß auf die relative Größe des Wachstumsunterschiedes hat. Die standardisierte Differenz zwischen dem Wachstum der Kontrollpopulationen und dem der toxinhaltigen Kulturen wurde zur Eichung des Systems herangezogen.

Das Wachstum wurde zum einen als Veränderung der Zelldichte und zum anderen als Zunahme des Populationsvolumens betrachtet. Als Maß für die toxische Wirkung der Chemikalien wurde die Konzentration ermittelt, bei welcher das Wachstum toxinhaltiger Kulturen im Vergleich zu Kontrollkulturen eine halbmaximale Hemmung zeigte (IC50). Diese Daten wurden mit aus der Literatur entnommenen LD50-Werten für Säugetiere und den Daten anderer Ersatzmethoden verglichen.

Die Hefe erwies sich unter diesen Bedingungen als gut geeigneter, leicht handhabbarer Testorganismus. Der Test ist schnell durchführbar und lieferte durch die hohen erfaßten Zellzahlen leicht reproduzierbare, statistisch gut abgesicherte Ergebnisse. Durch die elektronischen Messungen mit anschließender elektronischer Auswertung wird die Interpretation der Ergebnisse erleichtert. Mit diesem Verfahren können lichtempfindliche, farbige und Trübungen hervorrufoende Stoffen getestet werden.

Die ermittelten Unterschiede der toxischen Wirkungen der Chemikalien auf Hefen und auf Säugetiere machen weitere Untersuchungen nötig.

Dieses Verfahren kann als screening System zur Erfassung der akuten, auf basalen Stoffwechselforgängen beruhenden Toxizität genutzt werden, und so zur Reduktion von Tierversuchen beitragen.

6.1 SUMMARY

Development of a test for acute toxicity with *Saccharomyces cerevisiae* as test organism.

Konrad Dams

A system is suggested to evaluate the toxicity of chemicals using *Saccharomyces cerevisiae*, strain 70449, as test organism. The aim was to get a standardized test for acute toxic hazards. This yeast is a diploid, heterotrophic eucaryont. It was cultured in a fluid medium Merck (No. 5449). *S. cerevisiae* grew in Erlenmeyer flasks as batch cultures in a waterbath at $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ with constant shaking (120 rpm). Under these culture conditions there was no sporulation, thus the biological properties of the yeast did not change.

With a cell analyser (CASY[®], firma Schärfe) population volumes and cell densities of yeast cultures were measured. Furthermore the cell size distributions within the populations was determined by volumetric measurements up to 40,000 cells per sample. The effects on the average cell diameters of the yeast populations caused by chemicals and the time period for culturing were studied and discussed.

Yeast cultures revealed different population volumes at equal cell densities, these data were compared with the optical densities of the identical cultures. A main result was, that the optical densities correlated far better with population volumes (correlation coefficient $r = 0.996$) than with cell densities ($r = 0.819$).

Chemicals tested were dissolved in the nutrient medium. Growth of cultures was compared with that of toxinless cultures. Time periods for culturing had marked influences on growth parameters. The standardized difference between growth of toxinless and toxin containing cultures was used to calibrate the system.

Growth of cultures was measured in cell density changes and in an increase of population volumes. The toxic effects of the chemicals were evaluated as the concentrations that inhibit the growth of the populations to 50 percent (IC₅₀). The IC₅₀ data were compared with the LD₅₀ data for mammals and with data of other alternative methods.

Under these conditions the yeast appears as a suitable organism that is easy to culture. Collected data are highly reproducible due to the large numbers of measured cells. The electronical measurement and the electronical analyses lead to objective results. Substances which are sensible to light, cause colouring or turbidity can be measured with this test.

Chemicals used in this study revealed different effects on yeast and on mammals, because the LD50 data were not always identical with the IC50 data, thus further investigations are necessary.

It is suggested, that this test could be used as a screening system for acute toxicity on basic cell functions, thus reducing partly the use of animals as tools in research for toxic substances.