

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Wirkung toxischer Stoffe auf die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Stamm 70449 (diploid) und Stamm MP1 (haploid). Dieser einzellige, eukaryontische Organismus gehört in die Gruppe der Schlauchpilze (*Ascomycetes*).

Ein erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Sensibilität des Tests zu erhöhen. Dazu wurden die beiden Hefestämme miteinander verglichen. Es zeigte sich, daß die haploide Hefe eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit aufweist als die diploide Hefe. Dieser Sachverhalt kann sich günstig auf eine Verkürzung der Versuchsdauer auswirken. Im Gegensatz dazu stehen das größere Zell- und Populationsvolumen der diploiden Hefe. Die Veränderungen dieser Parameter unter Toxineinfluß sind deshalb bei der diploiden Hefe deutlicher zu sehen als bei der haploiden Hefe. Zusätzlich brachten die Messungen der haploiden Hefe mit der kleinen Kapillare des Partikelzählgerätes gerätebedingte Probleme mit sich; eine Verstopfung der Kapillare beeinträchtigte die Meßergebnisse. Der Einsatz der haploiden Hefe konnte die Nachweisgrenze des Versuchssystems weder senken noch präzisieren. So wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nur noch mit dem diploiden Hefestamm *S. cerevisiae* 70449 gearbeitet.

Die zu testenden Substanzen wurden in Ethanol und/oder Wasser gelöst und in ansteigender Konzentration zu den Hefekulturen in flüssigem Nährmedium (Würze-Bouillon, Merck) hinzugefügt. Die Kulturen wurden in einem Schüttelwasserbad bei 25 °C und 120 U/min. kultiviert. Die Messung der Zellzahl, des Zelldurchmessers und des Zellvolumens wurde mit einem Partikelzählgerät (CASY®) nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubationszeit durchgeführt. Weitere Parameter, wie das Populationsvolumen und die Wachstumshemmung, wurden berechnet. Eine wichtige zu ermittelnde Größe war die IC_{50} (mittlere inhibitorische Konzentration) der Toxine.

Schon bei geringen Acetonkonzentrationen trat eine starke Wachstumshemmung der Hefen auf. Aus diesem Grunde fiel die Wahl des Lösungsmittels

für die lipophilen Toxine auf Ethanol. Bei dessen Einsatz sollte der wachstumshemmende Einfluß des Ethanols auf die Hefe berücksichtigt werden.

Die Sensibilität des Testsystems war nach 24 Stunden Kulturdauer größer als nach 48 Stunden. Am ersten Meßzeitpunkt war die Wachstumshemmung der Hefekulturen bei der höchsten getesteten Toxinkonzentration größer, und die Hemmwirkung setzte eher ein als am zweiten Meßzeitpunkt. Die nach 24 Stunden ermittelten IC_{50} -Werte lagen niedriger als die nach 48 Stunden berechneten.

Folgende lebertoxische Chemikalien wurden getestet: Benzolsulfonamid ($IC_{50} = 788 \mu\text{g/ml}$ nach 24 h; $IC_{50} = 1190 \mu\text{g/ml}$ nach 48 h), Toluol ($IC_{50} = 2,2 \text{ mg/ml}$, Zellzahl nach 24 h; $IC_{50} = 2,1 \text{ mg/ml}$, Populationsvolumen nach 24 h), Phenanthren ($IC_{50} = 6,67 \mu\text{g/ml}$ nach 24 h), Tetrachlorkohlenstoff ($IC_{50} = 2,7 \text{ mg/ml}$ nach 24 h; $IC_{50} = 5,2 \text{ mg/ml}$ nach 48 h) und Phthalsäure ($IC_{50} = 1,1 \text{ mg/ml}$ nach 24 h). Die getesteten lebertoxischen Chemikalien bewirkten im Konzentrationsbereich der LD_{50} einen linearen Abfall der Zellzahl, des Zelldurchmessers und des Zellvolumens der Hefekulturen. Die in den Versuchen ermittelten IC_{50} -Werte wurden mit aus der Literatur entnommenen LD_{50} -Daten für Säugetiere bzw. für den Menschen und den Daten anderer Ersatzmethoden verglichen. Die IC_{50} -Werte korrelieren gut mit den Daten aus der Literatur.

Die Vor- und Nachteile des Testsystems wurden diskutiert. Es konnte demonstriert werden, daß es sich bei dem Hefetest um eine einfach zu handhabende, preiswerte, gut reproduzierbare und aussagekräftige Ersatzmethode zum Tierversuch handelt. Mit seiner Hilfe kann die erste Abschätzung der Basistoxizität von Stoffen vorgenommen werden.

Sabine Nitz

An alternative method for the determination of the toxicity of substances by the use of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, strain 70449 (diploid) and strain MP1 (haploid) with the cell counter and analyser system CASY®.

This thesis examined the effect of toxic chemicals on yeast *Saccharomyces cerevisiae*, strain 70449 (diploid) and strain MP1 (haploid). This single cellular, eucaryotic organism belongs to the group of *Ascomycetes*.

The first objective of the thesis was to increase the sensitivity of the test system. Therefore the two yeast strains were compared. It turned out that the haploid yeast has a higher growth velocity than the diploid yeast. This behavior might decrease the time required for one test. A disadvantage is the smaller cell- and population volume compared to the diploid yeast. The change of these distinctive marks under the influence of toxicals is easier to determine for the diploid yeast. During the measurement of the haploid yeast also some problems related to the smaller capillary of the cell counter appeared; the blockage of the capillary falsified the results. The use of the haploid yeast did not lead to a lower or more precise determination limit. Thus only the diploid yeast *S. cerevisiae*, strain 70449 was used for further experiments.

The tested chemicals were solubilised in increasing concentration in ethanol and/or water. The solution was added to the yeast-cultures in their liquid nutrient solution (Merck). The cultures were grown in erlenmeyerflasks as batch-cultures in a waterbath at 25 °C with constant shaking (120 rpm). The number of cells, the cell diameter and the cell volume were determined after 24 and 48 hours of incubation time by the use of CASY®. Other parameters like the population volume and the inhibition of growth were calculated. A very important parameter was the IC₅₀ (average inhibitoric concentration) of the toxins.

Even very low acetone concentrations caused a strong inhibition of growth. For this reason ethanol was used as a solvent for the lipophil toxins. But also the

small inhibition of growth caused by the ethanol should be taken into account when it is used.

The test system was more sensitive after 24 hours than after 48 hours. For the highest tested toxin concentration the inhibition of growth was higher after 24 hours. Also the influence of the toxin appeared at a lower concentration. The calculated IC_{50} values were lower after 24 hours than after 48 hours.

The following hepatotoxic chemicals were tested: benzenesulfanilamide ($IC_{50} = 788 \mu\text{g/ml}$ after 24 h; $IC_{50} = 1190 \mu\text{g/ml}$ after 48 h), toluene ($IC_{50} = 2,2 \text{ mg/ml}$ cell number after 24 h; $IC_{50} = 2,1 \text{ mg/ml}$ population volume after 24 h), phenathrene ($IC_{50} = 6,67 \mu\text{g/ml}$ after 24 h), carbon tetrachloride ($IC_{50} = 2,7 \text{ mg/ml}$ after 24 h; $IC_{50} = 5,2 \text{ mg/ml}$ after 48 h) and phthalic acid ($IC_{50} = 1,1 \text{ mg/ml}$ after 24 h). The tested hepatotoxic chemicals in the concentration range LD_{50} caused a linear decrease of the number of cells, the cell diameter and the cell volume of the yeast cultures. The experimentally determined IC_{50} values were compared with other toxicity tests and the LD_{50} values of mammals or humans found in literature. The results of the yeast test match with the values in the literature.

The advantages and disadvantages of this test system are discussed. It is obvious that the yeast test is a rather simple, inexpensive, well reproducible and meaningful replacement of the animal experiment. This test system should be suitable to estimate the basic toxicity of chemicals.