

Thema

Toxizitätstest mit Hilfe von Leuchtbakterien

Aufgabe / Prinzip

Es sollen verschiedene Konzentrationen des Standardtoxines Zinksulfat ($\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$) in Wasser nachgewiesen werden. Der in der DIN (38412 L341) beschriebene Leuchtbakterientest ist schnell durchzuführen und kostengünstiger als vergleichbare Wasseruntersuchungen auf Toxine.

Allerdings kann durch diesen Test nicht der Stoff selbst, sondern "nur" seine Toxizität bestimmt werden. Außerdem ist die gemessene Lumineszenz der Bakterien abhängig vom Sauerstoffgehalt und der Temperatur, was bei der Versuchsdurchführung zu beachten ist.

Wir testen im speziellen einerseits den EC_{50} -Wert, d.h. die Konzentration des Toxines, bei der die Leuchtkraft der Bakterien um 50% gesenkt wird und erhalten andererseits für diese Bakterien (*Vibrio fischeri*) Vergleichswerte im Bezug auf andere toxische Stoffe (z.B. Coffein).

Versuchsdurchführung

Herstellen der benötigten Lösungen

1. Für die 2% NaCl-Lsg. (20g NaCl/Liter) lösen wir 4g NaCl in 200ml dH_2O in einem Messbecher auf dem Magnetrührer und stellen anschließend den pH-Wert mittels geeichtem pH-Meter auf 6,8-7,2 ein.
2. Für die Zinksulfatlösung (500mg $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ /Liter) werden 50mg des Feststoffes in 100ml dH_2O in einem Messbecher gelöst.
3. Die Leuchtbakterien werden aus dem Kühlschrank geholt und reaktiviert.

Toxizitätstest

4. Die Testlösung Zinksulfat wird in verschiedenen Stufen (1:5, 1:10, 1:50, 1:100) mit der 2% NaCl-Lsg. verdünnt. Dazu wird folgendermaßen mit Messpipetten vorgegangen:

1:5 ==> 1ml Zinksulfat + 4ml NaCl-Lsg. in ein Kulturröhrchen überführen
1:10 ==> 1ml Zinksulfat + 9ml NaCl-Lsg. in ein Kulturröhrchen überführen
1:50 ==> 1ml Zinksulfat + 49ml NaCl-Lsg. in einen Messbecher überführen
1:100 ==> 1ml Zinksulfat + 99ml NaCl-Lsg. in einen Messbecher überführen

5. Aus der homogenen Bakterienkultur werden je 0,5ml in 5 Küvetten pipettiert und die Leuchtkraft mit dem Luminometer bestimmt und notiert ($=I_0$).
6. Vier der fünf Küvetten wird zusätzlich je eine andere Verdünnung des Testtoxines hinzugefügt (0,5ml pro Küvette). Die fünfte dient als Kontrolle und wird mit 0,5ml 2% NaCl-Lsg. gemischt.
7. Nach 30 Minuten wird erneut die Leuchtkraft der Bakterien in den 5 Küvetten bestimmt und notiert ($=I_{30}$).

Auswertung

Ergebnis der Messungen im Luminometer

I_0

Verdünnung	1:5	1:10	1:50	1:100	Kontrolle
Lumineszenz	76321	77671	77252	76733	76258

Die Ergebnisse weichen zwar geringfügig voneinander ab, dieses ist allerdings vernachlässigbar.

Nach 30 Minuten messen wir folgende Lumineszenzwerte:

I_{30}

Verdünnung	1:5	1:10	1:50	1:100	Kontrolle
Lumineszenz	23530	25078	28182	28595	28747

Zur Verminderung der Lumineszenz (in allen Küvetten) führt hierbei nicht nur der Verdünnungs-, sondern auch der zeitliche Effekt.

Aus der Veränderung der Lumineszenz in der Kontroll-Küvette berechnen wir den Korrekturfaktor:

$$\begin{aligned} \text{KF} &= I_{30} / I_0 \\ &= 28747 / 76258 = 0,3770 \end{aligned}$$

Nun werden die theoretisch unbelasteten Leuchtintensitäten der Ansätze nach 30 Minuten (= I_{c30}) mit Hilfe des Korrekturfaktors und mittels I_0 jeder Probe bestimmt:

$$I_{c30} = I_0 \times \text{KF}$$

Verdünnung	1:5	1:10	1:50	1:100	Kontrolle
I_{c30} (aufgerundet)	28773	29282	29124	28928	28749

Das Ergebnis von I_{c30} für das Kontrollröhrchen weicht etwas vom tatsächlichen Wert (28747) ab, was am Aufrunden des Korrekturfaktors liegt.

Nun kann man mit diesen korrigierten Werten die prozentuale Hemmung der Lumineszenz bezogen auf die Anfangsleuchtkraft berechnen, sprich um wie viel Prozent der (unbelastete) I_{c30} -Wert vom (belasteten) I_{30} -Wert abweicht:

$$\%H_{30} (= \text{prozentuale Hemmung nach 30 Minuten}) = 100 \times (I_{c30} - I_{30}) / I_{c30}$$

Die Werte für I_{c30} und I_{30} werden nun separat für jede Verdünnung in die obige Formel eingesetzt:

Verdünnung	1:5	1:10	1:50	1:100
$\%H_{30}$ (aufgerundet)	18,22	14,36	3,23	1,15

Wie schon zu Anfang erwähnt, ist unser Ziel die Ermittlung des EC_{50} -Wertes. Um diesen zu erhalten, tragen wir die Leuchthemmung in Abhängigkeit von der Konzentration einer toxischen Probe in einer Kurve auf. Um möglichst eine Gerade

zu erhalten, müssen die %H₃₀-Werte zunächst in Gamma-Werte umgeformt werden, was dann eine logarithmische Darstellung erlaubt:
Die Gamma-Werte berechnen wir mit:

$$G_{30} = \%H_{30} / (100 - \%H_{30})$$

Nun setzen wir wieder die entsprechenden %H₃₀-Werte jeder Verdünnung ein und erhalten:

Verdünnung	1:5	1:10	1:50	1:100
Γ ₃₀ (aufgerundet)	0,22	0,17	0,03	0,01

Für die graphische Darstellung (Konzentration des Toxins auf der x-Achse, Gamma-Werte auf der y-Achse) gibt es nun zwei Möglichkeiten:

1. Eine doppelt logarithmische Achseneinteilung, eingesetzt werden die Γ₃₀-Werte und die Konzentrationen des Toxins
2. Eine arithmetische Achseneinteilung, wobei die einzusetzenden Werte logarithmiert werden müssen.

Die Umrechnung der Verdünnungsstufen auf Konzentrationen des Toxins verläuft folgendermaßen:

Stammlösung ZnSO₄: 50mg – 100ml
entspricht: 0,5mg – 1ml

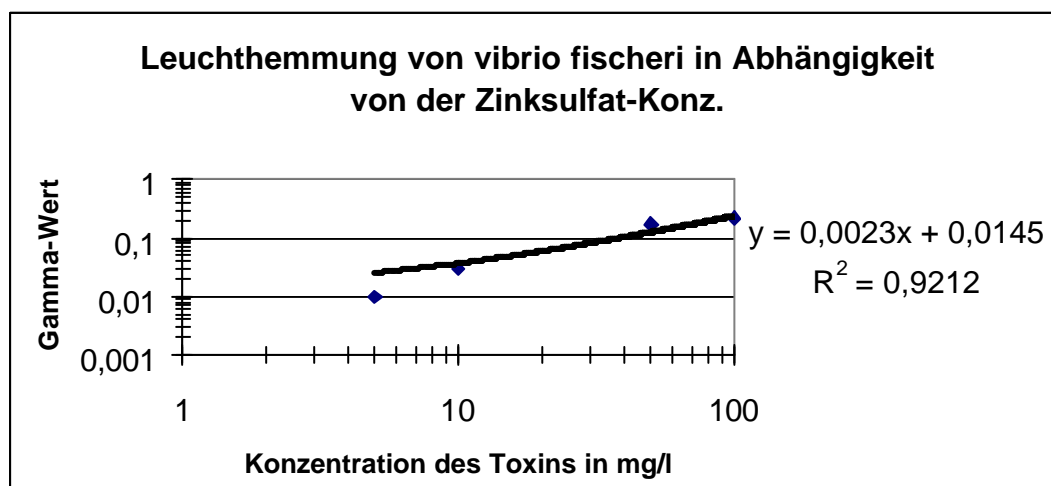
Dies bedeutet für die Verdünnungsstufen:

1:5 ⇒ 0,5mg / 5ml c = 100mg/l
1:10 ⇒ 0,5mg / 10ml c = 50mg/l
1:50 ⇒ 0,5mg / 50ml c = 10mg/l
1:100 ⇒ 0,5mg / 100ml c = 5 mg/l

Graphische Darstellung

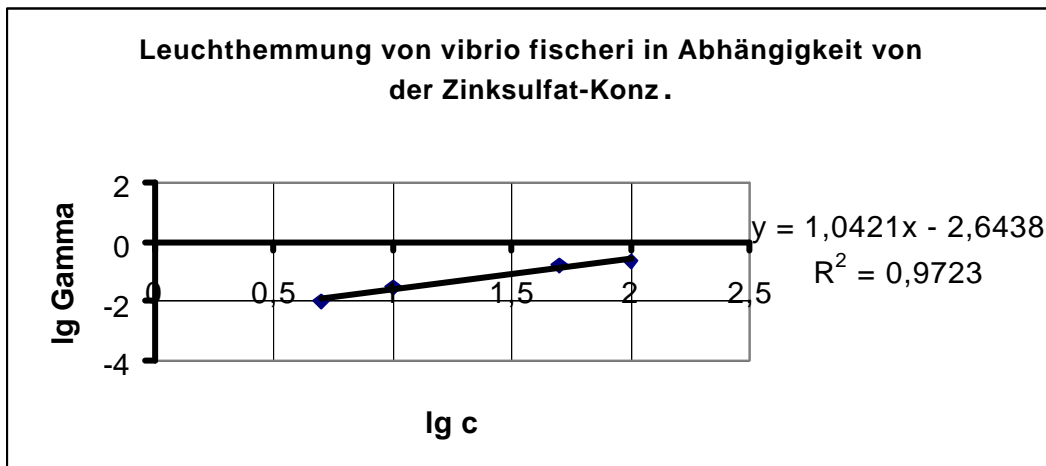
1. Möglichkeit: Logarithmische Achseneinteilung mit den normalen Werten:

x (=c)	y (=Γ ₃₀)
100	0,22
50	0,17
10	0,03
5	0,01



2. Möglichkeit: Arithmetische Achseneinteilung mit logarithmierten Werten für c und Γ_{30} :

x = log (c)	y = log (Γ_{30})
2	-0,65757732
1,69897	-0,76955108
1	-1,52287875
0,69897	-2



Auswertung des Graphen und Bestimmung des EC_{50} -Wertes

Zeichnet man bei beiden Graphen die lineare Trendlinie und berechnet auf Grund dieser die Funktion des Graphen, kommt man zu folgendem Ergebnis:

1. $y = 0,0023x + 0,0145$ $R^2 = 0,9212$
2. $y = 1,0421x - 2,6438$ $R^2 = 0,9723$

Da der Wert für R^2 beim zweiten Graphen (mit arithmetischer Achseneinteilung) näher bei 1 und diese Trendlinie mir somit genauer erscheint, wähle ich dessen Funktion um den EC_{50} -Wert zu bestimmen. Hierzu setzte $\%H_{30} = 50$ in die Gleichung zur Berechnung des Gamma-Wertes ein und erhalte $(50 / 100 - 50 =)$ den Wert 1. Diesen logarithmiere ich ($\log(1) = 0$) und setze ihn als y-Wert in die Funktion des Graphen ein um den x-Wert zu berechnen:

$$0 = 1,0421x - 2,6438$$

$$x = 2,537$$

Durch Entlogarithmieren von x erhalte ich nun die Konzentration der Zinksulfatlösung, bei welcher eine 50% Hemmung der Lumineszenz eintritt: $10^x = 10^{2,537} = 344,5$

Das bedeutet, dass bei einer Konzentration von 344,5 mg/l Zinksulfat in der Lösung die Leuchthemmung bei 50% liegt (= EC_{50}).

Fehlerquellen

- Da wir die in der DIN vorgeschriebene Inkubationstemperatur von 15°C nicht erzeugen konnten, kann es auf Grund dessen zu Veränderungen in der Lumineszenz gekommen sein.
- In unserem Versuchsdurchlauf ergaben sich leider nur Werte für die prozentuale Hemmung bis maximal 18,22% (Verdünnung 1:5). Damit der EC_{50} jedoch glaubhaft erscheint, sollten auch Werte bis über 50% Leuchthemmung gemessen werden, um diesen im Diagramm ablesen zu können.