

Beurteilung der Toxizität luftgetragener Stoffe am Arbeitsplatz mittels Leuchtbakterientest

Teil 2: Kritische Bilanz

M. Steinhausen, H. Brüggemann-Priesshoff, T. Gehrke, M. Kießling, E. Nies

Zusammenfassung Zur Beurteilung von Arbeitsplatz-Atmosphären wurde ein Testverfahren etabliert, mit dem Luftschadstoffe in eine flüssige (ethanolische) Phase überführt und auf ihre akute Gesamtoxizität untersucht werden können. Dazu werden Leuchtbakterien als Biosensoren eingesetzt. Der vorliegende Beitrag stellt beispielhaft die Testergebnisse für drei organische Stoffe unter Laborbedingungen (Prüfgase) ebenso vor wie die Reaktion der Leuchtbakterien auf gesammelte Dämpfe und Aerosole aus Bitumen bei der Heißverarbeitung an Baustellen. Es folgt ein Vergleich von Kenngrößen der akut toxischen Wirkung, die Schadstoffe einerseits im Leuchtbakterientest und andererseits in Tierversuchen aufweisen. Im Fokus stehen dabei flüchtige organische Verbindungen, die häufig z. B. in Lösungsmitteldämpfen an Arbeitsplätzen anzutreffen sind. Schließlich wird der prognostische Wert der gemessenen Effektstärken im Leuchtbakterientest im Hinblick auf die menschliche Gesundheit kritisch diskutiert.

Assessment of the toxicity of airborne substances at the workplace by means of the luminescent bacteria test – Part 2: Critical review

Abstract To assess workplace atmospheres a test method has become established in which air contaminants are converted into a liquid (ethanolic) phase and can be investigated for their acute overall toxicity. Luminescent bacteria are used to this end as biosensors. By way of example, the present paper presents the test results for three organic substances under laboratory conditions (test gases) as well as the reaction of luminescent bacteria to collected bitumen vapours and aerosols during hot processing in residential construction work. This is followed by a comparison of the characteristic quantities of the acute toxic effect shown by the contaminants in the luminescent bacteria test on the one hand and in animal tests on the other. The focus here is on volatile organic compounds which are frequently encountered at workplaces in, for example, solvent vapours. Finally, the predicted value of the measured effect strengths in the luminescent bacteria test is critically discussed with respect to human health.

1 Einleitung

Eine Methode zur Abschätzung der akuten Gesamtoxizität von Wasser- oder Bodenproben im Rahmen der Umweltüberwachung ist der DIN-zertifizierte Leuchtbakterientest.

Dr. rer. nat. Marco Steinhausen, Dipl.-Geoökol. Heike Brüggemann-Priesshoff, Dr. rer. nat. Eberhard Nies, Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA), Sankt Augustin.

Dipl.-Biol. Dipl.-Chem. Thomas Gehrke, Ministerium für Arbeit, Soziales, Frauen und Familie des Landes Brandenburg, Potsdam.

Dr. rer. nat. Manfred Kießling, Dresden.

Dieser bakterielle In-vitro-Toxizitätstest wird standardmäßig in wässrigem Milieu durchgeführt. An Arbeitsplätzen fallen gefährliche Stoffe dagegen vielfach gas- oder dampfförmig an. Daher entwickelte das Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA) ein Verfahren, mit dem Luftschadstoffe auf Probenträgern aufkonzentriert und mittels eines Thermodesorbers mit Kryofokussierung in eine ethanolische Lösung überführt werden können. Dies ermöglicht die nachfolgende Untersuchung der akuten Toxizität der aus den Luftproben isolierten Gefahrstoffe in flüssiger Phase mithilfe des Leuchtbakterientests. Die Anwendbarkeit konnte bereits vor einigen Jahren in einer ersten Publikation exemplarisch für drei Modellstoffe (Toluol, Xylol, eingeschränkt auch für Ethylacetat) gezeigt werden [1].

In der Zwischenzeit wurden weitere organische Verbindungen im Labormaßstab getestet und die Methode im Feldversuch an einem Arbeitsplatz erprobt. Die Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt.

2 Methodenbeschreibung

Die Bestimmung der Gesamtoxizität von Luftproben erfolgt in drei Teilabschnitten [1]:

- Probenahme der Stoffe bzw. der Stoffgemische auf Probenträgern,
- Aufarbeitung durch Thermodesorption mit Kryofokussierung,
- Bestimmung der Hemmwirkung aus der ethanolischen Lösung der gesammelten Substanzen im Leuchtbakterientest.

2.1 Probenahme

Mithilfe einer speziellen Probenahmepumpe (SG4000ex, Fa. GSA Messgerätebau, Neuss) wird die Probeluft mit einem konstanten Volumenstrom durch den Probenträger gesaugt, wobei sich die luftgetragenen Schadstoffe durch Sorption auf der Sammelphase des Probenträgers anreichern. Die verwendeten Probenträger (Air Toxics™ Tubes, Fa. Perkin-Elmer, Überlingen) bestehen aus einem Zwei-Bett-System mit modifizierter Aktivkohle und Kohlenstoff-Molekularsieb (Carbotrap/Carboxen 1008; [2]). Es ist möglich, dem Air-Toxics™-Probenträger einen Feststofffilter vorzuschalten [3]. Die damit gesammelten Substanzen können gesondert aufgearbeitet und untersucht werden.

Die Beaufschlagung der Probenahmeröhrchen erfolgte an der Prüfgasstrecke des IFA, die es gestattet, homogene Prüfgase mit genau definierter Konzentration, Temperatur und Luftfeuchte herzustellen. Mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie und Flammenionisationsdetektor werden die eingestellten Prüfgaskonzentrationen online kontrolliert [4]. Außerdem wurden Luftproben an einem realen Arbeitsplatz gezogen. Dies fand im Rahmen der „Humanstudie Bitumen“ [5] statt.

Tabelle 1. Leuchtintensitätshemmungen der Prüfgasproben (PGS: Prüfgasstrecke).

Schadstoff	Luftkonzentration PGS in ppm	Leuchtintensitätshemmungen in %		
		t = 5 min	t = 15 min	t = 30 min
Heptan	0,97	20,7	17,4	14,4
	2,55	47,4	40,3	36,2
	4,13	64,2	56,2	51,3
1-Heptanol	20,5	44,0	40,2	38,3
	30,7	58,9	56,3	55,1
Cyclohexanon	25,4	41,4	37,8	37,0
	37,9	48,4	45,1	43,9

2.2 Aufarbeitung

Die Freisetzung der auf der Sammelphase des Probenträgers abgeschiedenen Stoffe erfolgt mit einem Thermodesorber mit Kryofokussierung (Automatic Thermal Desorption System ATD 400 mit Air-Monitoring-Kältefalle; beides Fa. PerkinElmer, Überlingen [6; 7]): Durch das 15-minütige Erhitzen der Air-Toxics™-Probenträger auf 350 °C desorbieren die Substanzen in einen Helium-Trägergasstrom und werden in der Kältefalle bei - 30 °C zurückgehalten. Bei dem nachfolgenden schlagartigen Aufheizen der Kältefalle auf 350 °C verdampfen sie in den Trägergasstrom und werden in 2 ml Ethanol aufgefangen (Waschflaschenprinzip: Das Trägergas perlt durch die Flüssigkeit). Die Untersuchung dieser ethanolischen Lösungen auf ihre Toxizität erfolgt anschließend mithilfe des Leuchtbakterientests.

2.3 Leuchtbakterientest

Das marine Bakterium *Aliivibrio fischeri* (früher auch als *Vibrio fischeri* oder *Photobacterium phosphoreum* bezeichnet) zeigt als Nebenprodukt des Energiestoffwechsels eine Biolumineszenz („kaltes Leuchten“), deren Intensitätsmaximum bei einer Wellenlänge von 490 nm liegt. Schadstoffe stören diesen Prozess und führen zu einer Verringerung der Leuchtintensität, die als Indikator für die akut toxische Wirkung¹⁾ dieser Substanzen angesehen werden kann [8 bis 10]. Auf dieser Basis erfolgte die Untersuchung der Testlösungen in einem Einheitsverfahren (Microtox Test®), das durch die Norm DIN EN ISO 11348-3 geregelt ist [11]. Dabei wird das Ausgangsleuchten von jeweils 500 µl Bakteriensuspension pro Probe in einer Küvette luminometrisch (Microtox®-Luminometer Model 500, Fa. Azur Environmental, Carlsbad, USA) gemessen. Anschließend versetzt man diese Testansätze mit den zu untersuchenden Prüflösungen. Diese werden dadurch erhalten, dass 10 µl der bei der Probenaufarbeitung gewonnenen ethanolischen Schadstofflösungen zu 490 µl Kochsalzlösung (2 %) gegeben werden. Als Negativkontrolle fungiert reines Ethanol anstelle der ethanolischen Schadstofflösung. Es resultieren also jeweils Ansätze von 1 ml Prüflösung, deren Leuchtintensität nach 5, 15 und 30 min bestimmt wird. Sowohl die Kontrollen als auch die Proben werden in Dreifachbestimmung gemessen.

3 Messergebnisse

3.1 Ergebnisse mit definierten Luftproben (Prüfgasproben)

3.1.1 Leuchtbakterientest

Im Folgenden werden beispielhaft Versuche mit den Stoffen Heptan, 1-Heptanol und Cyclohexanon vorgestellt, die ein-

zeln in definierten Konzentrationen unter Laborbedingungen beprobt wurden.

Tabelle 1 gibt die Leuchtintensitätshemmungen von Luftproben wieder, die nach der oben beschriebenen Methode (vgl. Abschn. 2) aus dem Zyklus von Probenahme (40 l; 2-stündige Probenahme mit einem Volumenstrom von 0,333 l/min) an der Prüfgasstrecke (PGS), Thermodesorption und Leuchtbakterientest untersucht wurden (Prüfgasproben). Es handelt sich dabei um die Mittelwerte der Messwerte aus der Aufarbeitung von je drei Air-Toxics™-Probenträgern pro Luftschadstoffkonzentration. Für alle drei Testsubstanzen ist bei gegebener Konzentration eine Abnahme der Leuchtintensitätshemmung mit der Zeit zu festzustellen (5 min → 15 min → 30 min). Dieser Effekt ist auch von vielen anderen Stoffen bekannt. Der umgekehrte Fall, also die Zunahme der Leuchtintensitätshemmung mit der Einwirkdauer in der Küvette, wurde allerdings ebenfalls berichtet (vgl. [12]).

3.1.2 Wiederfindungsraten

Unter den hier beschriebenen definierten Versuchsbedingungen entspricht die gemessene Hemmwirkung einer Prüfgasprobe eindeutig einer Konzentration des jeweiligen

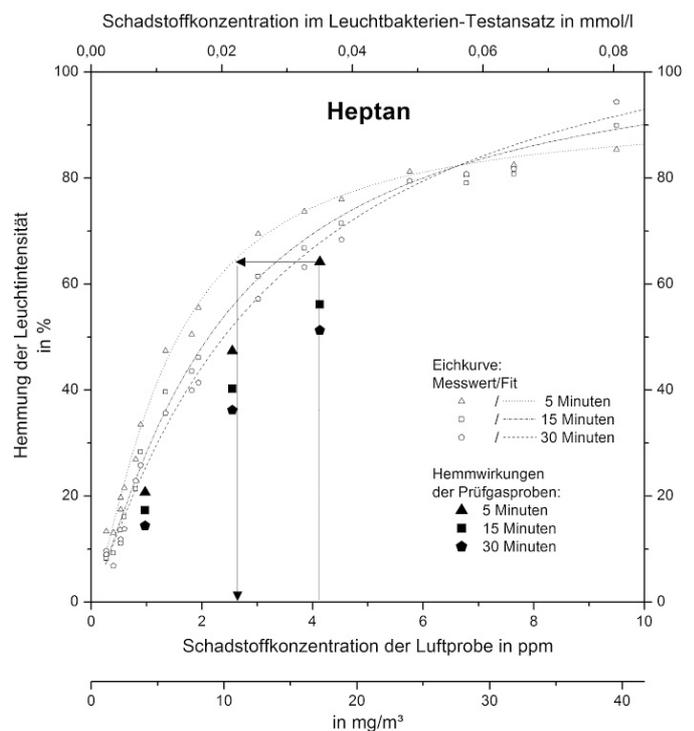


Bild 1. Eichkurven der Leuchtintensitätshemmung von Heptan im Leuchtbakterientest und Hemmwirkungen von Prüfgasproben.

¹⁾ Darüber hinaus existieren auch Varianten des Tests, mit denen auf chronisch toxische sowie auf mutagene und promutagene Wirkungen von Stoffen geprüft werden kann.

Stoffes in der zugehörigen Prüflösung. Über die Hemmwirkung einer Probe kann also auf die Konzentration der Testsubstanz geschlossen werden, wenn deren Dosis-Wirkungs-Beziehung bekannt ist.

In den **Bildern 1 bis 3** sind die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Testsubstanzen dargestellt. Sie wurden ermittelt, indem analog zu den Prüfgasproben ethanolische Eichlösungen mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Stoffes dem Leuchtbakterientest zugeführt wurden (vgl. Abschn. 2.5). Die Hemmwirkungen sind gegen die Konzentrationen in mmol/l aufgetragen, die jeweils in den 1-ml-Prüflösungsansätzen vorlagen (obere x-Achse). Die oberen x-Achsen wurden jeweils so skaliert, dass an den unteren x-Achsen die (theoretischen) Schadstoff-Luftkonzentrationen (in mg/m³ und ppm) abzulesen sind, die bei einem kompletten Testdurchlauf (Probenahme an der Prüfgasstrecke, Thermodesorption und Leuchtbakterientest, wie in Abschn. 2 beschrieben) mit 100 %iger Wiederfindung in die entsprechenden Prüflösungskonzentrationen münden würden. Die Dosis-Wirkungs-Beziehungen (Eichkurve/Fit: gestrichelte Kurven) wurden durch die Anpassung der Messwerte an eine mathematische Funktion (Hill-Funktion) ermittelt. Ebenfalls dargestellt sind in jedem Diagramm die Hemmwirkungen der Prüfgasproben (aus Tabelle 1), grafisch aufgetragen gegen die bei den jeweiligen Versuchen an der Prüfgasstrecke eingestellten Luftkonzentrationen in ppm und mg/m³ (untere x-Achsen). Bedingt durch Substanzverluste bei der Aufarbeitung weisen sie erwartungsgemäß niedrigere Werte auf als für die gleichen Konzentrationen bei den Eichmessungen, die den Hemmwirkungen einer theoretischen maximalen Wiederfindung von 100 % entsprechen.

Die Wiederfindungsraten der Prüfgasproben können nun wie folgt ermittelt werden: Für die Hemmwirkungen der Prüfgasproben werden auf der zugehörigen Eichkurve die

Schadstoffkonzentrationen in ppm abgelesen (vgl. beispielhafte Pfeile in Bild 1). Aus dem Verhältnis dieser Werte (Mittelwerte entsprechend den Messungen nach 5, 15 und 30 min) zu den bei den Probenahmen an der Prüfgasstrecke eingestellten Luftkonzentrationen errechnet sich die Wiederfindungsrate des jeweiligen Versuchs²⁾. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 2** zusammengefasst.

Die Wiederfindungsraten liegen zwischen 71 und 90 % bei 1-Heptanol und Cyclohexanon. Heptan weist eine deutlich geringere Wiederfindung auf. Für diesen Stoff mussten aufgrund seiner starken Hemmwirkung Luftkonzentrationen gewählt werden, die etwa eine Zehnerpotenz niedriger liegen.

3.2 Ergebnisse mit realen Arbeitsplatz-Luftproben (manueller Gussasphalteinbau)

Als schnell härtende Alternative zu beispielsweise Zementestrich kommt Gussasphalt als Fußbodenbelag zur Anwendung. Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus verschiedenen Füllstoffen (z. B. Sand, Splitt) mit 6,5 bis 8 % Bitumen. Bitumen besteht überwiegend aus hochmolekularen aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen. Gussasphalt wird mit einer Temperatur von bis zu 250 °C neben anderen Einsatzorten auch manuell in Innenräume eingebaut, sodass die Arbeiter gegenüber Dämpfen und Aerosolen exponiert sind.

Im Rahmen der „Humanstudie Bitumen“ [5], einem Forschungsprojekt zur chemisch-irritativen und/oder genotoxischen Wirkung von Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen, wurden Luftproben während des manuellen Einbaus von Gussasphalt³⁾ in zwei Fertig-Einfamilienhäuser genommen.

²⁾ Die Konzentrationen im Leuchtbakterientest (obere x-Skala) sind direkt proportional zu den Luftkonzentrationen (untere x-Skala).

³⁾ Manueller Einbau: Transport des Gussasphalts in Eimern in das Gebäudeinnere, Ausschütten, Verteilen und Ausstreichen mit Kellen und Brettern.

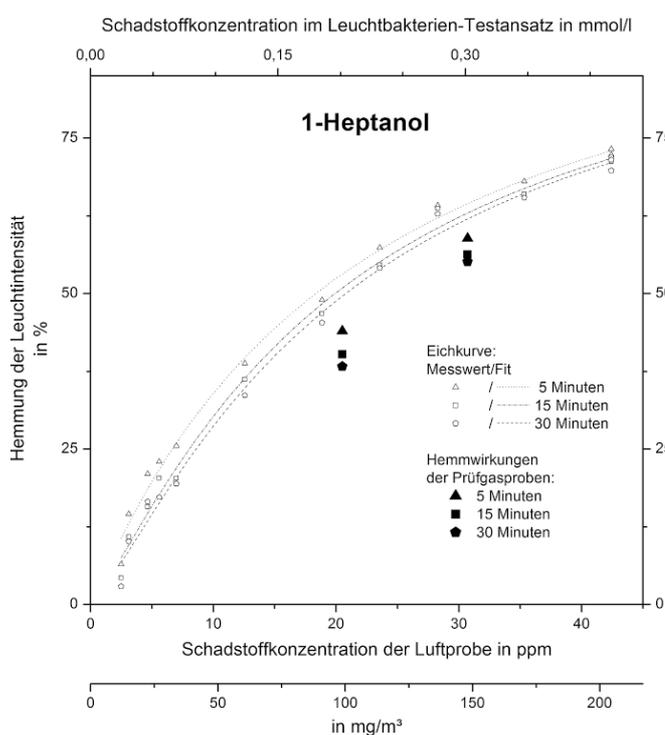


Bild 2. Eichkurven der Leuchtintensitätshemmung von 1-Heptanol im Leuchtbakterientest und Hemmwirkungen von Prüfgasproben.

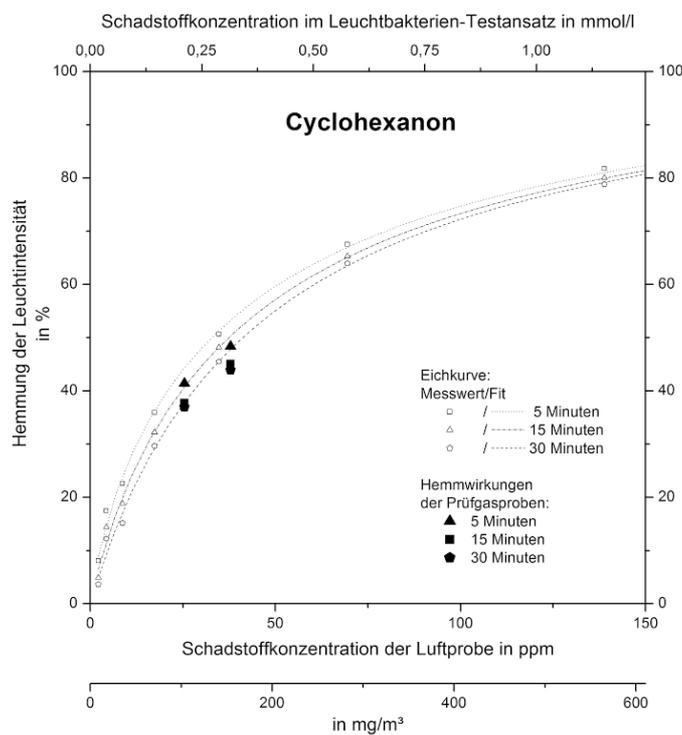


Bild 3. Eichkurven der Leuchtintensitätshemmung von Cyclohexanon im Leuchtbakterientest und Hemmwirkungen von Prüfgasproben.

Tabelle 2. Messergebnisse nach Probenahme (Beaufschlagung von Air-Toxics™-Probenträgern mit verschiedenen Noxen an der Prüfgasstrecke, PGS), Thermodesorption (Überführung in Ethanol) und Leuchtbakterienanalytik (Testung der ethanolischen Lösungen) mit den zugehörigen Wiederfindungsraten (ermittelt mithilfe der Eichkurven; vgl. Bilder 1 bis 3).

Schadstoff	Luftkonzentrationen in ppm					Wiederfindungsrate in %
	PGS	Leuchtbakterientest				
		t = 5 min	t = 15 min	t = 30 min	Mittelwert	
Heptan	1,0	0,6	0,6	0,5	0,6	60
	2,6	1,5	1,6	1,6	1,5	60
	4,1	2,6	2,6	2,5	2,6	62
1-Heptanol	20,5	14,9	14,5	14,3	14,6	71
	30,7	25,2	24,6	25,0	24,9	81
Cyclohexanon	25,4	22,7	21,9	24,0	22,9	90
	37,9	30,1	30,6	32,7	31,1	82

3.2.1 Leuchtbakterientest

Die Probenahme erfolgte stationär, aber möglichst nahe am Ort des Ausbringens und Verteilens von Gussasphalt auf dem Fußboden (etwa in Kopfhöhe des knienden Arbeiters), wobei mit zwei verschiedenen Volumenströmen (0,333 und 0,666 l/min) jeweils drei Probenträger beaufschlagt wurden. Die Probenahmedauer an den beiden Baustellen variierte aufgrund unterschiedlicher Einbauzeiten. Bild 4 zeigt die Hemmwirkungen der Luftproben (für t = 15 min), nachdem sie mittels der Leuchtbakterienanalytik (vgl. Abschn. 2) untersucht wurden.

Für beide Messreihen ist eine Abhängigkeit der Leuchtintensitätshemmung von dem jeweiligen Probeluftvolumen zu erkennen. Eine Modellierung der Dosis-Wirkungs-Beziehung ist schon aufgrund der geringen Probenzahlen wenig sinnvoll. Erschwerend ist zusätzlich die Tatsache, dass der beobachtete Effekt auf der Kombinationswirkung von unterschiedlichen Inhaltsstoffen der Bitumendämpfe und -aerosole beruht. Zu einer vorsichtigen Abschätzung der unterschiedlichen Expositionen an den beiden Baustellen können jedoch die Messwerte herangezogen werden, die Leuchtintensitätshemmungen in vergleichbaren Größenordnungen aufweisen. Dies ist bei den Messungen B1-V2 und B2-V1 (Bild 4) der Fall. Bildet man bei diesen Messungen den Quotienten aus Hemmwirkung und Probenluftvolumen als relatives Maß der Schadstoffkonzentration, so ergibt sich im Mittel der jeweils drei Luftproben für Baustelle 2 eine etwa 3,4-fach höhere Belastung.

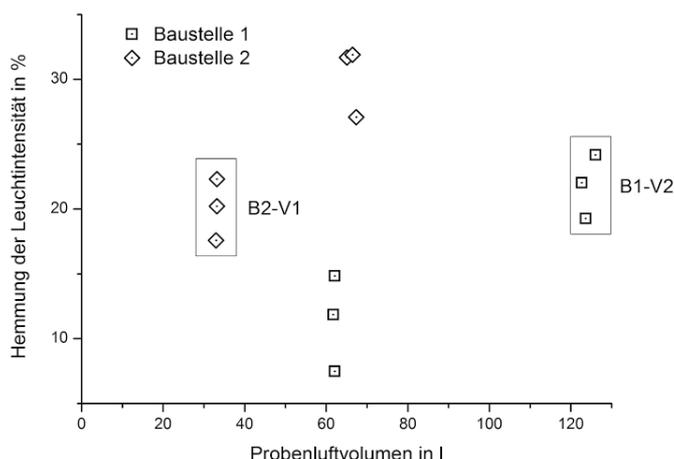


Bild 4. Leuchtintensitätshemmungen von Luftproben zweier Gussasphalt-Baustellen.

3.2.2 Chemisch-analytische Expositionsermittlung

Parallel zur Erprobung der Leuchtbakterienanalytik auf den oben beschriebenen Baustellen erfolgte eine Probenahme im Rahmen des Messsystems Gefährdungsermittlung der Unfallversicherungsträger (MGU, ehemals BGMG). Die dabei erhaltenen Messergebnisse aus dem chemisch-analytischen Labor werden in der IFA-Expositionsdatenbank MEGA dokumentiert und archiviert [13]. Expositionswerte für Dämpfe und Aerosole aus Gussasphalt bei der Heißverarbeitung wurden gemittelt aus jeweils vier Luftproben zu 1,7 mg/m⁵ (Baustelle 1) und 4,4 mg/m⁵ (Baustelle 2) bestimmt. Damit weist Baustelle 2 eine etwa 2,6-fach höhere Belastung auf. Die Messwerte für Bitumen resultieren aus der infrarotspektroskopischen Bestimmung der Intensität der C-H-Streckschwingungen der Probe im aliphatischen Bereich (2 800 bis 3 000 cm⁻¹), die Konzentrationsberechnung erfolgt durch Vergleich mit einem definierten Standard [14].

4 Relevanz von Leuchtbakterien-Testergebnissen: Kenngrößenvergleich

Ein wichtiger Prüfstein bei der Validierung des Leuchtbakterientests mit aufgearbeiteten Arbeitsplatz-Luftproben ist die Frage der Übertragbarkeit der im akuten Microtox®-Assay erhaltenen Ergebnisse auf exponierte Menschen am Arbeitsplatz. Anhand ausgewählter organischer Stoffklassen sollen im Folgenden Überlegungen zum prognostischen Wert der gemessenen Leuchtbakterien-Reaktionen für mögliche Auswirkungen des untersuchten Stoffs oder Stoffgemischs auf die menschliche Gesundheit angestellt werden. Zu diesem Zweck erfolgt eine Gegenüberstellung sogenannter EC₅₀- und LD₅₀-Werte von überwiegend leicht flüchtigen organischen Verbindungen verschiedener Stoffklassen (Abschn. 4.3).

Ein EC₅₀-Wert ist eine für Vergleichszwecke gebräuchliche Kenngröße des Leuchtbakterientests. Darunter versteht man die Schadstoffkonzentration, die zu einer Hemmung der Leuchtintensität im Vergleich zu den Kontrollproben um 50 % führt (entsprechendes gilt für andere EC-Werte, wie z. B. EC₂₀-Werte). Als analoges Maß der Humantoxizität eines Stoffes können demgegenüber die in Versuchen an Wirbeltieren ermittelten LD₅₀-Werte⁴⁾ dienen, welche die akut wirkende Dosis repräsentieren, die den Tod von 50 % eines Versuchstierkollektivs verursacht. Eine gute Korrelation der Zahlenwerte dieser beiden Kenngrößen könnte als

⁴⁾ LD: Letale Dosis

Hinweis darauf angesehen werden, dass es möglich ist, aus der Hemmwirkung im Leuchtbakterientest zumindest auf die akute Gefährlichkeit von Schadstoffen an Arbeitsplätzen zu schließen.

In den folgenden Abschnitten werden zunächst aus der Literatur entnommene EC₅₀- (4.1) und LD₅₀-Werte (4.2) als Struktur-Wirkungs-Beziehungen beschrieben. Eine Korrelationsanalyse der Kenngrößen von Stoffklassen, deren EC₅₀- und LD₅₀-Werte als Wertepaare in ausreichender Zahl vorliegen, folgt in Abschn. 4.3.

4.1 EC₅₀-Struktur-Wirkungs-Beziehungen

4.1.1 Aliphatische Verbindungen

EC₅₀-Werte organischer Verbindungen⁵⁾ (in mmol/l in der Testlösung; gemessen nach 30 min) von homologen Reihen verschiedener Stoffklassen (unverzweigte, aliphatische Verbindungen) in Form einer Auftragung gegen ihre Kohlenstoff-Kettenlänge zeigt **Bild 5** (EC₅₀-Werte nach [12; 15 bis 18]). Die sekundäre Größenachse bezeichnet die äquivalenten Luftkonzentrationen in ppm (mit 40 l Probenluftvolumen und Aufarbeitung der Probe wie in Kap. 2 beschrieben).

Alle homologen Reihen zeigen bis auf wenige Abweichungen einzelner Stoffe mit wachsender Kettenlänge zunehmende Toxizität (erkennbar an der Abnahme des EC₅₀-Wertes). Die unterschiedliche Ausprägung dieses Trends kann dazu führen, dass sich bei einem Vergleich der einzelnen homologen Reihen die relative Toxizität der Verbindungsklassen bei Substanzen gleicher C-Kettenlänge zueinander umkehrt: So sind kurzkettige 2-Ketone weniger toxisch als kurzkettige Aldehyde, dagegen weisen 2-Ketone mit mehr als 10 C-Atomen höhere Leuchtintensitätshemmungen als die entsprechenden Aldehyde auf.

Der überwiegende Anteil der in Bild 5 dargestellten Verbindungen zeigt akut toxisch wirkende Konzentrationen der Testlösungen zwischen 0,01 und 10 mmol/l. Weniger belastend auf *Aliivibrio fischeri* wirken sich z. B. primäre Alkohole und 2-Ketone mit bis zu vier C-Atomen aus. Mit zunehmender Kettenlänge (und damit zunehmender Molekülmasse bzw. -größe) entwickeln sich beide homologen Reihen im betrachteten Testsystem dann aber sukzessive zu extrem toxischen Verbindungen, deren Wirkstärke um über fünf Größenordnungen zunimmt (EC₅₀-Werte: 120 mmol/l für Aceton, 0,02 mmol/l für 2-Tridecanon). 1-Dodecanol hat mit $2 \cdot 10^{-4}$ mmol/l den niedrigsten EC₅₀-Wert der dargestellten Substanzen. Carbonsäuren zeigen dagegen die geringste Abhängigkeit der Leuchtintensitätshemmung von der Kohlenstoff-Kettenlänge.

4.1.2 Aromatische Verbindungen

Beispiele der Leuchtbakterien-Toxizitätswerte von aromatischen Verbindungen zeigt **Bild 6** (EC₅₀-Werte nach [12]). Auch für diese Verbindungsklasse lässt sich eine Abhängigkeit der Hemmung der Leuchtintensität von der Molekülgröße ausmachen (Pfeil 1). Weiterhin schlagen sich die Art der Substituenten (Pfeil 2) und des Substitutionsmusters (Pfeil 3) in der Toxizität nieder. Der Einfluss des Substitutionsmusters könnte jedoch auch mit der Variation der Molekülgröße erklärt werden. Von den hier vorgestellten Stoffen zeigt Fluorbenzol die geringste Wirkstärke, Benzo[a]pyren erweist sich als toxischste Verbindung mit etwa 1000-fach stärkerer Potenz. Die EC₅₀-Werte der meisten Stoffe ordnen

⁵⁾ Bei Vorliegen mehrerer Literaturwerte wurden die Werte arithmetisch gemittelt.

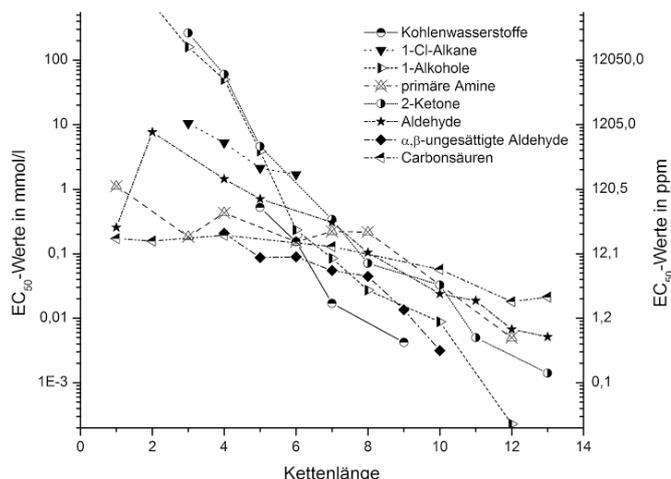


Bild 5. EC₅₀-Werte von homologen Reihen organischer Verbindungen verschiedener Stoffklassen (unverzweigte, aliphatische Verbindungen) in Abhängigkeit von der Kettenlänge.

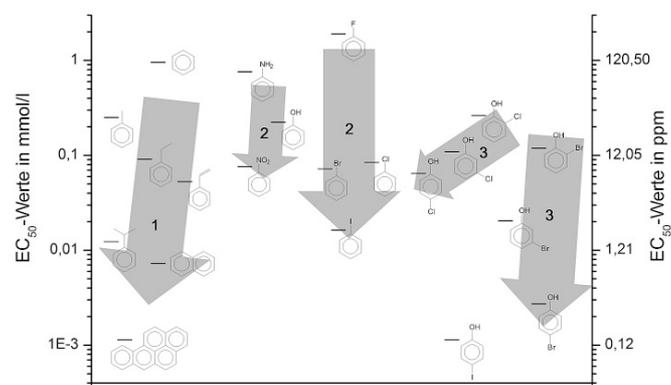


Bild 6. Auswahl von EC₅₀-Werten einiger aromatischer Verbindungen.

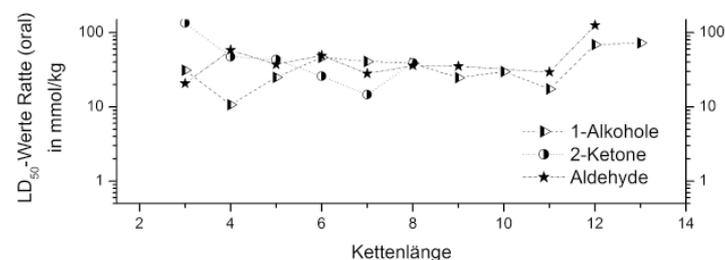


Bild 7. LD₅₀-Werte (Ratte, oral) von homologen Reihen organischer Verbindungen verschiedener Stoffklassen (unverzweigte, aliphatische Verbindungen) in Abhängigkeit von der Kettenlänge.

sich in einem Bereich von 0,01 bis 1 mmol/l (in der Testlösung) ein.

4.2 LD₅₀-Struktur-Wirkungs-Beziehungen

LD₅₀-Werte zu den in Kap. 4 behandelten Schadstoffen liegen nur für die orale Applikation an Ratten in ausreichender Zahl vor. Sie wurden der Hazardous Substances Data Bank (HSDB) [19] entnommen und werden analog zu den EC₅₀-Werten in Abschn. 4.1 grafisch dargestellt.

4.2.1 Aliphatische Verbindungen

In **Bild 7** sind die LD₅₀-Werte (Ratte, oral) der homologen Reihen der 1-Alkohole, 2-Ketone und Aldehyde von unver-

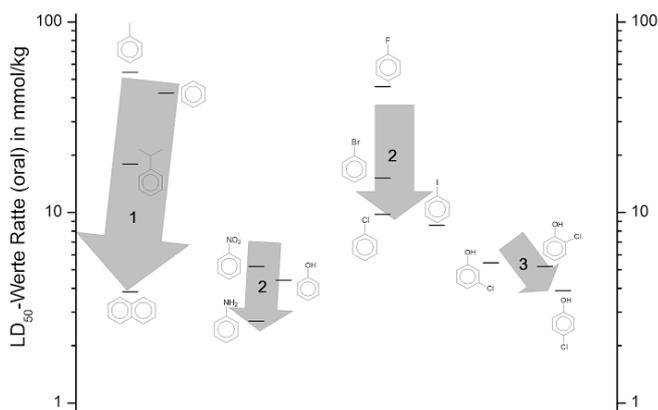


Bild 8. Auswahl von LD₅₀-Werten (Ratte, oral) einiger aromatischer Verbindungen.

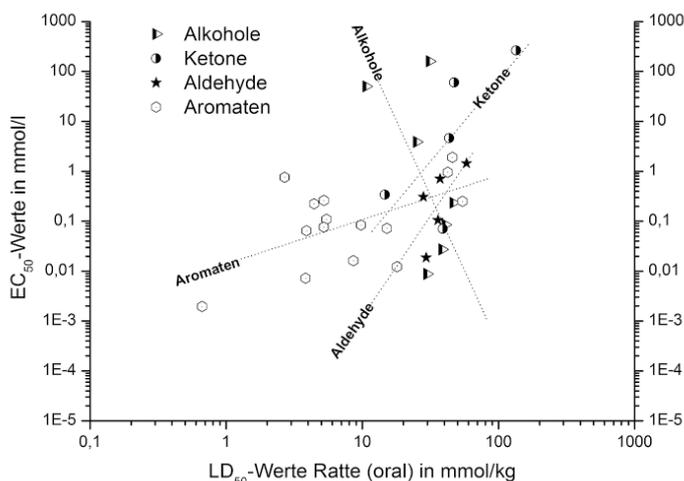


Bild 9. Korrelation von EC₅₀-Werten mit LD₅₀-Werten (Ratte, oral).

zweiten Kohlenwasserstoffen dargestellt. Im Vergleich zu den entsprechenden EC₅₀-Daten zeigen sie keine ausgeprägte Neigung der Toxizitätszunahme mit wachsender Kettenlänge. Die Spreizung der Wirkstärke erstreckt sich nur über etwa eine Zehnerpotenz im Unterschied zu den entsprechenden EC₅₀-Werten, die sich über einen deutlich größeren Bereich ausdehnen (vgl. Abschn. 4.1.1).

4.2.2 Aromatische Verbindungen

Bild 8 zeigt die LD₅₀-Werte der aromatischen Verbindungen entsprechend Abschn. 4.1.2, sofern sie zu ermitteln waren. Die LD₅₀-Werte der betrachteten Stoffe liegen zwischen 0,5 und 60 mmol/kg, sodass die Spreizung ihrer letalen Dosen geringer ausfällt als die der EC₅₀-Konzentrationen (vgl. Abschn. 4.1.1 und 4.1.2). Einflüsse von Molekülgröße, Substituent und Substitutionsmuster sind zu erkennen.

4.3 Korrelation von EC₅₀- und LD₅₀-Werten

Eine Korrelation der Microtox®-Toxizitätsdaten mit den LD₅₀-Werten (Ratte oral) in doppelt logarithmischer Skalierung liefert Bild 9.

Lineare Anpassungen der Beziehungen zwischen EC₅₀- und LD₅₀-Werten der einzelnen Stoffklassen in der Form

$$\log EC_{50} = A \cdot \log LD_{50} + B$$

sind als gestrichelten Linien eingezeichnet mit r/n (r_p = Korrelationskoeffizient (Pearson), n = Anzahl der Datensätze) für Alkohole (-0,72/8), Ketone (0,75/5), Aldehyde (0,69/5) und Aromaten (0,34/14). Die Korrelationsanalyse für den gesamten Datensatz (nicht eingezeichnet) liefert $r_p = 0,23$ mit $n = 32$. Die Signifikanzniveaus aller Korrelationen liegen oberhalb von 10 % und sind folglich mit einer hohen Irrtumswahrscheinlichkeit behaftet. Dies gilt nicht im Falle der Alkohole, die aber eine nicht plausible negative Korrelation liefern⁶⁾.

Für viele Stoffklassen, wie z. B. für Carbonsäuren oder die im Leuchtbakterientest stark toxisch wirkenden Kohlenwasserstoffe, liegen nicht genügend LD₅₀-Werte vor.

5 Zusammenfassung und Diskussion

5.1 Leuchtbakterientest mit Luftproben

Die Eignung der beschriebenen Methode (Kap. 2) zur Beurteilung der Gefährdung an Arbeitsplätzen durch Luftschadstoffe wurde mit drei Stoffen aus verschiedenen Stoffklassen (Kohlenwasserstoffe, Alkohole, Ketone) gezeigt. Dabei konnten ähnlich gute Ergebnisse erzielt werden wie zuvor schon für zwei Aromaten (Toluol, Xylol) [1].

Die Wiederfindungsraten lagen dabei zwischen 60 und 90 %, wobei möglicherweise durch Optimierung des mit Ethanol gefüllten Absorbers (handelsübliche 2-Milliliter-Mikroreaktionsgefäße) eine Steigerung erzielt werden könnte. Durch eine Verschlingung des Gefäßes kann eine längere Kontaktzeit des Gases mit der flüssigen Phase erreicht und die Absorption der Luftschadstoffe in der flüssigen Phase verbessert werden. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 1 ppm oder niedriger, vorausgesetzt der Schadstoff weist im Leuchtbakterientest in diesem Konzentrationsbereich eine entsprechende Hemmwirkung auf.

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erlangen, muss die thermische Stabilität der zu untersuchenden Stoffe vorausgesetzt werden können. Versuche mit Tetrachlorethen (Ergebnisse hier nicht dargestellt) führten rechnerisch nach der oben beschriebenen Methode zu Wiederfindungsraten von bis zu 150 %. Es ist davon auszugehen, dass im Zuge der Thermodesorption bei 350 °C eine Zersetzung von Tetrachlorethen einsetzt und zur Entstehung einer deutlich toxischeren Substanz führt. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass bei niedrigeren Desorptionstemperaturen (Probenahmeröhrchen und Kältefalle) zwischen 200 und 300 °C Hemmwirkungen resultieren, die einer Wiederfindung von gleichbleibend ca. 70 % entsprechen. Für schwer flüchtige Substanzen, deren Bestimmung mit dieser Testmethodik ebenfalls angestrebt war, ist unter derartigen Bedingungen allerdings eine unvollständige Freisetzung vom Probenträger zu erwarten.

Bei einem Feldversuch erfolgte der Einsatz der Leuchtbakterienanalytik an einem realen Arbeitsplatz während des Einbaus von Gussasphalt in Innenräumen. Die im Leuchtbakterientest ermittelten Befunde von zwei Baustellen korrelieren recht gut mit den chemisch-analytischen Konzentrationsbestimmungen des MGU-Messsystems: Beide Methoden weisen Baustelle 2 als den erheblich stärker exponierten Arbeitsplatz aus.

⁶⁾ beidseitiger Signifikanztest

5.2 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen

Die Relevanz des Leuchtbakterientests für den Menschen am Arbeitsplatz wird durch zwei Umstände begrenzt:

- Es handelt sich um einen akuten Toxizitätstest.
- Der Indikatororganismus ist ein Bakterium.

Selbst wenn man unberücksichtigt lässt, dass der Arbeitsschutz primär die chronische Exposition gegen Gefahrstoffe in den Blick nimmt – MAK-Werte beziehen sich auf „wiederholte und langfristige, in der Regel täglich achtstündige Exposition“ [20] – zeigt schon der Vergleich von Leuchtbakterien-EC₅₀- mit Wirbeltier-LD₅₀-Werten für homologe Reihen organischer Chemikalien erhebliche Diskrepanzen. Einige Beispiele finden sich im Abschn. 4.3. Umfangreiche Untersuchungen anderer Autoren zur interspezies-Variabilität [21; 22], die die akute Toxizität von Stoffen in Form der Microtox®-EC₅₀-Werte mit Maus/Ratte-LD₅₀-Werten vergleichen, ergaben unterschiedlich gute Korrelationen in Abhängigkeit von der Form der Applikation. Die Art der Säugetierspezies zur LD₅₀-Ermittlung hat nur einen geringen Einfluss. Die stärksten Korrelationen ergeben sich bei intravenöser Applikation (r/n : 0,73/54 und 0,68/165 für Ratte und Maus), weniger gute Modelle errechnen sich für intraperitoneale (r/n : 0,48/195 und 0,45/378 für Ratte und Maus) und orale (r/n : 0,55/471 und 0,55/344 für Ratte und Maus) Verabreichung der Testsubstanzen. Diese vergleichsweise guten Ergebnisse mögen zunächst überraschen. Sie lassen sich aber dadurch erklären, dass bei der unsystematischen Auswahl der Datensätze relativ reaktionsträge lipophile Stoffe offenbar unterrepräsentiert waren. Auch wurden bei der weiterführenden Auswertung, die Datensätze der Versuche an Mäusen und Ratten zusammenfasst, beispielsweise *n*-Hexan, Hexansäure oder 1-Dodecanol als Ausreißer von den Berechnungen ausgeschlossen [22]. Rückt man jedoch gerade diese Stoffgruppe in den Mittelpunkt der Betrachtungen (vgl. Abschn. 4.3), dann wird deutlich, dass eine Übertragbarkeit der Ergebnisse des Leuchtbakterientests auf Säugetiertoxizitätsdaten zumindest bei den vorliegenden Daten nicht gegeben ist.

Besonders interessant im vorliegenden Kontext wäre die Betrachtung inhalativer LC₅₀-Werte, die aber nur in sehr unzureichendem Maße zur Verfügung stehen. Legt man die zahlreichen verfügbaren oralen LD₅₀-Werte für die Ratte (in mmol/kg Körpergewicht) zugrunde und bildet den Quotienten mit den jeweiligen Leuchtbakterien-EC₅₀-Werten (in mmol/l Testsubstanz), variieren stoffbezogen die Ergebnisse um mehrere Zehnerpotenzen (Bild 9). Für homologe Reihen innerhalb einer Stoffklasse kann sich der EC₅₀-Wert schon bei der Zunahme der Kettenlänge um ein C-Atom vervielfachen (vgl. Abschn. 4.1.1, Bild 5).

Derart große relative Unterschiede gegenüber den Leuchtbakterien-EC₅₀-Werten lassen sich sicher nicht durch Zweifelhaftheiten von LD₅₀-Werten aus Tierversuchen begründen. Es springt ins Auge, dass z. B. für Säugetiere einschließlich des Menschen eher harmlose Stoffe wie Heptan oder 1-Octanol im Leuchtbakterientest eine höhere Toxizität aufweisen als etwa das als akut toxisch eingestufte Nitrobenzol (Kategorie 3: Einatmen, Hautkontakt, Verschlucken⁷⁾).

Bakterien sind als Bioindikatoren leicht zu handhaben, vermehren sich rasch und ihre Verwendung in der Toxikologie wirft keine ethischen Probleme auf. Evolutionsgeschichtlich trennt sie aber ein enormer Abstand vom Menschen. Es be-

⁷⁾ Nach: Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen.

darf keiner näheren Erläuterung, dass sich eine spezifische Organtoxizität mit einem prokaryotischen Einzeller kaum abbilden lässt.

Auch wenn die Wirkmechanismen, die zur Hemmung der bakteriellen Lumineszenz führen, noch nicht komplett verstanden sind, dürfte in vielen Fällen ein durch die Noxe induzierter Mangel an Adenosintriphosphat (ATP) für die Unterbrechung des energieabhängigen Leuchtprozesses verantwortlich sein. Im Gegensatz zu eukaryotischen Organismen, bei denen die Atmungskettenenzyme im Mitochondrium lokalisiert sind, findet bei Bakterien die ATP-Synthese (oxidative Phosphorylierung) in der Zytoplasmamembran statt. Verbindungen, die nach Überwindung der (bei gramnegativen Bakterien wie *Aliivibrio fischeri* relativ dünnen) Zellwand diese Membran in ihrer Funktion beeinträchtigen, scheinen deshalb die Leuchtintensität stark zu beeinflussen. Möglicherweise ist dazu eine komplette Diffusion der Moleküle in die Zelle hinein nicht notwendig.

Dies gilt in besonderer Weise für lipophile Stoffe (z. B. viele Lösungsmittel), die von einigen Autoren als unpolar narotisch bezeichnet werden ([15; 23 bis 25], vgl. **Tabelle 3**). Sie sind chemisch wenig aktiv, d. h. sie reagieren nicht direkt mit Zellkomponenten. Ihre Wirkung wird durch ihre Akkumulation in den Biomembranen hervorgerufen, deren physikalisch-chemischen Eigenschaften sich dadurch reversibel verändern. Dominierender Faktor hierfür ist die Größe (des Kohlenwasserstoffanteils) im organischen Molekül. Die Toxizität dieser Substanzen korreliert daher oft gut mit dem 1-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (K_{ow}), der ein Maß für die Lipidlöslichkeit von Stoffen ist. Substanzen, die überraschend aus diesem Konzept herausfallen, werden anscheinend im Stoffwechselprozess einer Degradation unterzogen, deren Metaboliten abweichende Wirkmechanismen aufweisen.

Das in **Tabelle 3** wiedergegebene Klassifikationsschema wurde anhand von Fischtoxizitäts-Daten entwickelt. Tatsächlich spielen lipophile Substanzen in der Ökotoxikologie wegen ihrer potenziellen Anreicherung in biologischem Material eine besondere Rolle. Für bestimmte regulatorische Zwecke kann der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient anstelle eines im Fischtest ermittelten Biokonzentrationsfaktors zur Abschätzung des Bioakkumulationspotenzials herangezogen werden.

Für den Menschen sind beispielsweise aliphatische Kohlenwasserstoffe nur gering toxisch. Weisen sie eine funktionelle Gruppe auf, sinkt die Humantoxizität ab einer bestimmten Kettenlänge im Regelfall wieder. Zur Illustration sei die bekannte Richardsonsche Regel erwähnt, die besagt, dass die narotische Wirkung von aliphatischen *n*-Alkoholen bei Säugetieren bis zum Hexanol zunimmt, bei steigender Kettenlänge aber wieder abfällt. Bei Säugern reduziert sich auch das toxikologisch im Vordergrund stehende Reizpotenzial acyclischer aliphatischer Monoaldehyde mit steigender Kettenlänge.

Eine gute Übereinstimmung der Microtox®-Ergebnisse mit den Daten aus der chemischen Analytik wurde im Praxistest mit Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen bei der Heißverarbeitung erzielt. Dies lässt sich leicht erklären mit der hohen Empfindlichkeit der Leuchtbakterien gegenüber lipophilen langkettigen aliphatischen Kohlenwasserstoffen, die den Hauptbestandteil des Bitumens im Gussasphalt darstellen. Die Beurteilung der Belastung von Arbeitsplätzen gegenüber Bitumen im MGU folgt einem vergleichbaren Prinzip,

Tabelle 3. Ökotoxikologische Wirkstoffklassen nach [21], ADP: Adenosindiphosphat, ATP: Adenosintriphosphat, DDT: Dichlordiphenyltrichlorethan.

Klasse	möglicher Mechanismus	Bemerkung	Beispiele
unpolar narkotisch	physikalische Wechselwirkung mit Membrankomponenten (Lipiden oder Proteinen)	reversibel, variiert mit K_{OW}	1-Octanol 1,2-Dichlorbenzol 2-Butanon
polar narkotisch	wahrscheinlich eine Mischung von physikalischen Mechanismen	reversibel, variiert mit K_{OW}	Phenol 4-Acetylpyridin 2-Chloranilin
reaktive Toxizität	Reaktionen mit häufig auftretenden biochemischen Strukturen, Blockade von Enzymen durch kovalente Bindung	nicht reversibel, variiert vor allem mit elektronischen Eigenschaften	Aldehyde Isocyanate Epoxide Aziridine
spezifisch wirkende Chemikalien	Blockade spezifischer Enzyme durch besonders hohe Affinität	kaum reversibel, variiert mit sterischen und elektronischen Eigenschaften	organische Phosphorsäureester DDT
Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung	Zerstörung des elektrochemischen Gradienten durch Protonentransport, Wechselwirkung mit ADP/ATP-Transportern	teilweise reversibel, variiert z. B. mit K_{OW} oder Acidität/Basizität	2,4-Dinitrophenol Pentachlorophenol 2,3,4,5-Tetrachloranilin

indem IR-spektroskopisch die Intensität der C-H-Schwingungen als Maß der Luftkonzentration von aliphatischen Molekülteilen ermittelt wird. In beiden Fällen dienen demnach die Kohlenwasserstoffanteile in den Bitumenemissionen und -aerosolen gewissermaßen als Leitkomponente.

6 Fazit

Die hier beschriebene Methodik bestimmt die akute Toxizität von luftgetragenen Schadstoffen mithilfe des Leuchtbakterientests. Wie schon in Teil 1 [1] dokumentiert, ist es möglich, flüchtige organische Arbeitsstoffe mit befriedigenden Wiederfindungsraten so aufzuarbeiten, dass sie im Leuchtbakterientest eingesetzt werden können.

Es muss allerdings festgestellt werden, dass die Anwendbarkeit nur unter bestimmten Voraussetzungen gegeben ist. Chronische oder mutagene Wirkungen sind durch den Leuchtbakterientest in dieser Form ohnehin nicht abzubilden. Zur Erfassung dieser Endpunkte werden eigene Tests mit *Aliivibrio fischeri* kommerziell angeboten, die aber nicht Gegenstand der vorliegenden Veröffentlichung sind.

Zwar ist der Test zur Bestimmung der Luftkonzentrationen von Einzelkomponenten geeignet, stößt jedoch zur Abschätzung der akuten Humantoxizität von Substanzgemischen an seine Grenzen. Besonders störend wirkt sich die disproportional hohe Empfindlichkeit der Leuchtbakterien gegenüber

lipophilen organischen Verbindungen aus, die häufig in Lösungsmitteldämpfen an Arbeitsplätzen anzutreffen sind. Diese dominanten Effekte im bakteriellen Testsystem können leicht dazu führen, dass besonders bei Vorliegen komplexer Stoffgemische z. B. auf den Menschen irritativ wirkende Substanzen nicht adäquat erfasst werden.

Bei der toxikologischen Beurteilung von Arbeitsplatzatmosphären müssen also Unzulänglichkeiten des akuten Microtox®-Tests berücksichtigt werden. Es ist daher zu überlegen, das beschriebene Verfahren, Arbeitsplatz-Luftproben in ethanolische Lösungen zu überführen, unter Verwendung anderer, geeigneterer Bioindikatoren zu erproben. Im Rahmen der ökotoxikologischen Bewertung von Abwässern, für die der Leuchtbakterientest entwickelt wurde, ist dessen besondere Empfindlichkeit gegenüber fettlöslichen Substanzen möglicherweise von Vorteil, da sich diese in wässrigem Milieu schlecht lösen und aus ökotoxikologischer Sicht die Lipophilie ein wichtiger Parameter für die Abschätzung der Bioakkumulierbarkeit ist.

Danksagung

Die Autoren danken Herrn Dr. Jörg Klasmeier, Universität Osnabrück, für seine fachlichen Hinweise und hilfreichen Anregungen.

Literatur

- [1] Brüggemann-Priesshoff, H.; Gehrke, T.; Pflaumbaum, W.; Nies, E.: Beurteilung der Toxizität luftgetragener Stoffe am Arbeitsplatz mittels Leuchtbakterientest. Teil 1: Verfahrensentwicklung. Gefahrstoffe – Reinhalt. Luft 62 (2002) Nr. 5, S. 191-196.
- [2] Helmig, D.; Balsley, B.; Davis, K.; Kuck, L. R.; Jensen, M.; Bognar, J. et al.: Vertical profiling and determination of landscape fluxes of biogenic nonmethane hydrocarbons within the planetary boundary layer in the Peruvian Amazon. J. Geophys. Res. 103 (1998) Nr. D19, S. 25519-25532.
- [3] BGIA-Probenahmegeräte und Probenahmeverfahren. Geräte zur Probenahme von Stoffen, die gleichzeitig partikel- und dampfförmig vorliegen. Kennzahl 3040. In: BGIA-Arbeitsmappe Messung von Gefahrstoffen. 34. Lfg. IV/05. Hrsg.: Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA), Sankt Augustin. Berlin: Erich Schmidt – Losebl.-Ausg. 1989. www.bgia-arbeitsmappedigital.de/3040

- [4] Buchwald, K.-E.; Siekmann, H.; Fastnacht, M.: Eignung von Prüfröhrchen-Messeinrichtungen zur Gefahrstoffmessung an Arbeitsplätzen. Gefahrstoffe – Reinhalt. Luft 61 (2001) Nr. 5, S. 187-200.
- [5] Projektkoordination: Raulf-Heimsoth, M., Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IPA), Bochum (Publikationen in Vorbereitung).
- [6] Woolfenden, E.: The thermal desorption alternative. Today's Chemist at Work 7 (1998) Nr. 3, S. 17-22.
- [7] Glover, J. H.: Thermal desorption in industrial hygiene and environmental analysis. South Godstone: Spantech Publisher 1991.
- [8] Kalnowski, G.; Kaufmann, M.; Vietzen, W.; Zettler, B.; Ziesmann, A.: Lumineszenz, Wachstum und Atmung als Endprodukte toxischer Wirkung bei *Photobacterium phosphoreum*. In: Steinhäuser, K. G.; Hansen, P.-D.: Biologische Testverfahren – Beiträge zu den Biotest-Statusseminaren 1989 und 1992. S. 675-677. Stuttgart: Gustav Fischer 1992.
- [9] Krebs, F.: Der Leuchtbakterientest für die Wassergesetzgebung. In: Steinhäuser, K. G.; Hansen, P.-D.: Biologische Testverfahren – Beiträge zu den Biotest-Statusseminaren 1989 und 1992, S. 591-624. Stuttgart: Gustav Fischer 1992.
- [10] Link, M.: Zum physiologischen Hintergrund des Leuchtbakterientests. In: Steinhäuser, K. G.; Hansen, P.-D.: Biologische Testverfahren – Beiträge zu den Biotest-Statusseminaren 1989 und 1992. S. 625-632. Stuttgart: Gustav Fischer 1992.
- [11] DIN EN ISO 11348-3: Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest) – Teil 3: Verfahren mit gefriergetrockneten Bakterien. Berlin: Beuth 2009.
- [12] Kaiser, K. L. E.; Devillers, J.: Ecotoxicity of chemicals to *Photobacterium phosphoreum*. Handbooks of ecotoxicological data. Vol 2. Yverdon, Schweiz: Gordon and Breach Science 1994.
- [13] Gabriel, S.; Koppisch, D.; Range, D.: The MGU – a monitoring system for the collection and documentation of valid workplace exposure data. Gefahrstoffe – Reinhalt. Luft 70 (2010) Nr. 1/2, S. 43-49.
- [14] Messverfahren für Gefahrstoffe (Analyseverfahren). Bitumen. Kennzahl 6305. In: BGIA-Arbeitsmappe Messung von Gefahrstoffen. 40. Lfg. IV/08. Hrsg.: Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA), Sankt Augustin. Berlin: Erich Schmidt – Losebl.-Ausg. 1989. www.bgia-arbeitsmappedigital.de/6305
- [15] Cronin, M. T. D.; Schultz, W.: Structure-toxicity relationships for three mechanisms of action of toxicity to *Vibrio fischeri*. Ecotoxicol. Environm. Saf. 39 (1998), S. 65-69.
- [16] Bláha, L.; Damborsky, J.; Nemeč, M.: QSAR for acute toxicity of saturated and unsaturated halogenated aliphatic compounds. Chemosphere 36 (1998) Nr. 6, S. 1345-1365.
- [17] Chen, H.-F.; Shane, S. Q. H.: Ketone EC₅₀ values in the Microtox Test. Ecotoxicol. Environm. Saf. 30 (1995), S. 120-123.
- [18] Chin, C. C.; Shane, S. Q. H.: Microtox EC₅₀ values for drinking water by-products produced by ozonolysis. Ecotoxicol. Environm. Saf. 23 (1992), S. 355-363.
- [19] TOXNET – Databases on toxicology, hazardous chemicals, environmental health, and toxic releases. Hrsg.: National Library of Medicine, Rockville, Maryland, USA. <http://toxnet.nlm.nih.gov>
- [20] MAK- und BAT-Werte-Liste 2010. Mitteilung 46 der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Weinheim: Wiley-VCH 2010.
- [21] Fort, F. L.: Correlation of Microtox EC₅₀ with mouse LD₅₀. In Vitro Toxicol. 5 (1992), S. 73-82.
- [22] Kaiser, K. L. E.; McKinnon, M. B.; Fort, F. L.: Interspecies toxicity correlations of rat, mouse and *Photobacterium phosphoreum*. Environm. Toxicol. Chem. 13 (1994), S. 1599-1606.
- [23] Cronin, M. T. D.; Schultz, T. W.: Validation of *Vibrio fischeri* acute toxicity data: mechanism of action-based QSARs for non-polar narcotics and polar narcotic phenols. Sci. Total Environm. 204 (1997), S. 75-88.
- [24] Sixt, S.; Altschuh, J.; Brüggemann, R.: Quantitative structure-activity relationships for 80 chlorinated compounds using quantum chemical descriptors. Chemosphere 30 (1995), S. 2397-2414.
- [25] Sixt, S.: Methoden zur Abschätzung umweltrelevanter physikalisch-chemischer und ökotoxikologischer Eigenschaften organischer Substanzen aus der Molekülstruktur. München: Herbert Utz 1998.