



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences
Fakultät Life Sciences

Ist Hormesis für die Stimulationen im Algen-Wachstumshemmtest verantwortlich?

Wie kann die Verzögerte Fluoreszenz bei der Klärung der Frage helfen?

Bachelorarbeit im Studiengang Umwelttechnik

Verfasst von

Timo Wagner

Hamburg

30.10.2012

Gutachterinnen:

Prof. Dr. Susanne Heise (Hochschule für Angewandte Wissenschaften, Hamburg)

Prof. Dr. Susanne Töpfke (Hochschule für Angewandte Wissenschaften, Hamburg)

Die vorliegende Bachelorarbeit wurde an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Susanne Heise erstellt.

HAW Hamburg
Fakultät Life Sciences
Lohbrügger Kirchstrasse 65
21033 Hamburg



Ich danke

Prof. Dr. Susanne Heise

Für die wissenschaftliche Begleitung der Arbeit, die zahlreichen wertvollen Anregungen und die konstruktive Kritik.

Prof. Dr. Susanne Töpfke

für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens

Maximilia Kottwitz

für die detaillierte Einführung in die praktische Laborarbeit und die großzügige Unterstützung

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung.....	5
2 Theoretische Grundlagen.....	6
2.1 Absorption der Lichtenergie.....	6
2.2 Herbizide.....	7
2.3 Chlorophyllfluoreszenz.....	8
2.4 Verzögerte Fluoreszenz.....	9
3 Das hormetische Modell.....	12
3.1 Die Hormesis-Diskussion.....	15
3.2 Eigenschaften hormetischer Effekte	16
3.3 Fazit.....	18
4 Der Algen-Wachstumshemmtest.....	19
5 Beispiele für Stimulation aus der Literatur.....	22
5.1 Cedergreen et al., 2007.....	22
5.2 Kamaya et al., 2006.....	23
5.3 Liliana Zalizniak, 2006.....	23
5.4 Wong und Chang, 1988.....	24
5.5 Wong, 2000.....	25
5.6 Zrimec et al., 2007.....	25
5.7 Fazit	26
6 Mögliche Ursachen für die beobachteten Stimulationen	27
6.1 Genauigkeit des Algen-Wachstumshemmtests	27
6.2 Veränderte Wachstumsbedingungen.....	29
6.3 Umverteilung pflanzlicher Ressourcen.....	31
6.4 Resultat.....	32
7 Durch die Prompte Fluoreszenz gemessene Stimulationen.....	33
7.1 Versuch	33
7.2 Variabilität der Prompten Fluoreszenzintensität.....	35
8 Verzögerte Fluoreszenz.....	37
8.1 Charakteristik.....	38
8.2 Verzögerte Fluoreszenz zur Untersuchung der Elektronentransportkette.....	40
8.3 Verwendung der Verzögerten Fluoreszenz als Toxizitätstest.....	43
8.4 Fazit.....	44
9 Zusammenfassung.....	45
Abkürzungsverzeichnis.....	48
Literaturverzeichnis.....	49

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das Z-Schema der Photosynthese	7
Abb. 2: Wirkort von DCMU und Paraquat in der Elektronentransportkette	8
Abb. 3: Anregung eines einzelnen Chlorophyll-Moleküls.....	9
Abb. 4: Aufbau eines Photo-Counting Luminometers.....	11
Abb. 5: Dosis-Wirkungs-Modelle der Toxikologie	12
Abb. 6: Das J-förmige und das invertiert J-förmige Modell der Hormesis.....	14
Abb. 7: Hormetische Dosis-Wirkungs-Kurve mit eingezeichnetem ZEP und Cmax	17
Abb. 8: Häufigkeit stimulierend wirkender Konzentrationsbereiche.....	17
Abb. 9: Hormetische Dosis-Wirkungs-Beziehung von Glyphosat.....	24
Abb. 10: Dosis-Wirkungs-Beziehungen von 2,4-D und Fenitrothion auf die Wachstumsrate.....	24
Abb. 11: Dosis-Wirkungs-Beziehungen von 2,4-D und Fenitrothion auf den Chlorophyll a-Gehalt	25
Abb. 12: Dosis-Wirkungs-Beziehungen von Kupfer auf <i>Desmodesmus subspicatus</i>	26
Abb. 13: Gaußsche Glockenkurve	28
Abb. 14: Verhältnis der Prompten Fluoreszenz gegenüber dem Chlorophyll a-Gehalt	34
Abb. 15: Die Abklingkurven der Verzögerten Fluoreszenz.....	39
Abb. 16: Verhalten der Verzögerten Fluoreszenz	42

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Ökotoxikologie ist die Lehre von schädigenden Effekten durch chemische Verbindungen (und Mikroorganismen) auf Arten, Populationen und Biozönosen. Sie ist eine multidisziplinäre Wissenschaft, welche sich seit ca. 1980 aus der Umweltchemie und Toxikologie heraus entwickelt hat. Durch zahlreiche biologische Testverfahren können die Auswirkungen von Chemikalien auf die belebte Natur untersucht werden (Kruspe, 2012). Eines dieser Testverfahren ist der Algen-Wachstumshemmtest (AWht). Durch ihn können toxische Wirkungen von Schadstoffen als Einzelsubstanz oder in Abwasser und Umweltproben auf Mikroalgen getestet werden. Er ist ein wichtiger Teil der Biomonitoring-Programme (Millington et al., 1988).

In zahlreichen Publikationen (Cedergreen et al., 2007; Wong und Chang, 1988; Zrimec et al., 2007) wurden bei Versuchen im AWht Stimulationen im Niedrigdosisbereich von schädigenden Substanzen beobachtet. Von den Autoren wurden die beobachteten Effekte auf Hormesis zurückgeführt. Dies ist der stimulierende Effekt, welcher durch niedrige Dosen an potentiell giftigen Stoffen hervorgerufen wird (Stebbing, 1982).

Bis heute besteht große Uneinigkeit zu dem Begriff der Hormesis und deren Bedeutung für die Biologie (Calabrese und Baldwin, 2002). Die Annahme, dass das hormetische Modell allgemein gültig und damit auf alle Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Toxikologie übertragbar ist, ist noch nicht eindeutig bewiesen. Jedoch ist das Modell bis heute auch nicht widerlegt (Stebbing, 1982).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit soll die Frage beantwortet werden, ob es sich bei den häufig beobachteten Stimulationen im AWht tatsächlich um hormetische Effekte handeln kann. Dazu werden die in der Literatur beschriebenen Stimulationen genauer betrachtet und diskutiert, ob andere Erklärungen für die beobachteten Effekte verantwortlich sein können.

Anschließend wird das Phänomen der Verzögerte Fluoreszenz (VF) näher beschrieben und diskutiert, wie sie in weiteren Versuchen bei der Klärung dieser Frage helfen könnte.

Durch die in dieser Arbeit angestellten Überlegungen soll eine Einordnung der häufig beobachteten Stimulationen im Niedrigdosisbereich erleichtert werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Absorption der Lichtenergie

Die Photosynthese von Pflanzen geschieht in den Chloroplasten. Der Innenraum der Chloroplasten ist von einer Matrix bzw. Flüssigkeit, dem Stroma, ausgefüllt. In das Stroma sind die Thylakoidmembranen eingebettet (Campbell und Reece, 2010). Dabei handelt es sich um Membranstapel, in denen sich die Lichtsammelkomplexe, auch Antennenkomplexe genannt, befinden. Die Lichtsammelkomplexe setzen sich aus den akzessorischen Pigmenten zusammen, welche das Photosystem I und II (PS I und PS II) bilden. Das Reaktionszentrum der Photosysteme wird jeweils von einem Chlorophyll-a-Dimer (Molekülpaar) gebildet. Das Molekülpaar des PS II wird als P 680 und das Molekülpaar des PS I als P 700 bezeichnet. Durch die Pigmente der Lichtsammelkomplexe wird Licht unterschiedlicher Wellenlänge absorbiert. Die aufgenommene Energie wird in Form von Resonanzschwingungen an die benachbarten Moleküle weitergegeben. Dies geschieht entlang eines Energiegefälles bis zum Reaktionszentrum der beiden Photosysteme. Dort werden die photochemisch aktiven Chlorophyll-a-Dimere in den angeregten Zustand versetzt (Campbell und Reece, 2010).

Das angeregte Chlorophyll a-Molekül des PS-II (P680*) gibt ein Elektron an das Pheophytin (Phaeo) ab. Wasser dient als Elektronendonator für das oxidierte Chlorophyll. Dem Pheophytin folgen in der Elektronentransportkette die zwei Plastochinone Q_A und Q_B . Diese fungieren als Zwei-Elektronen-Schleuse. Das erste Chinon nimmt vom Pheophytin das Elektron auf und gibt es an das zweite Chinon weiter. Nachdem ein zweites Elektron zum ersten und dann zum zweiten Chinon gelangt ist, nimmt dieses aus der Umgebung zwei Protonen auf und wird dadurch zum Hydrochinon. Dieses dissoziiert vom Komplex, diffundiert im unpolaren Membraninneren und überträgt die Elektronen auf den Cytochrom-b6f-Komplex. Der Cytochrom-b6f-Komplex überträgt die Elektronen auf das Plastocyanin (PC), ein lösliches Protein, das anschließend das oxidierte P700 reduziert. Die Elektronen werden entlang der Transportkette auf das lösliche Ferredoxin (Fd) übertragen. Das lösliche Flavoprotein – Ferredoxin-NADP-Reduktase reduziert $NADP^+$ zu NADPH, das dann im Calvin-Zyklus zur Reduktion von CO_2 eingesetzt wird (Taiz und Zeiger, 1999). Der Elektronentransport, der durch das Z-Schema veranschaulicht wird, ist in Abbildung 1 dargestellt.

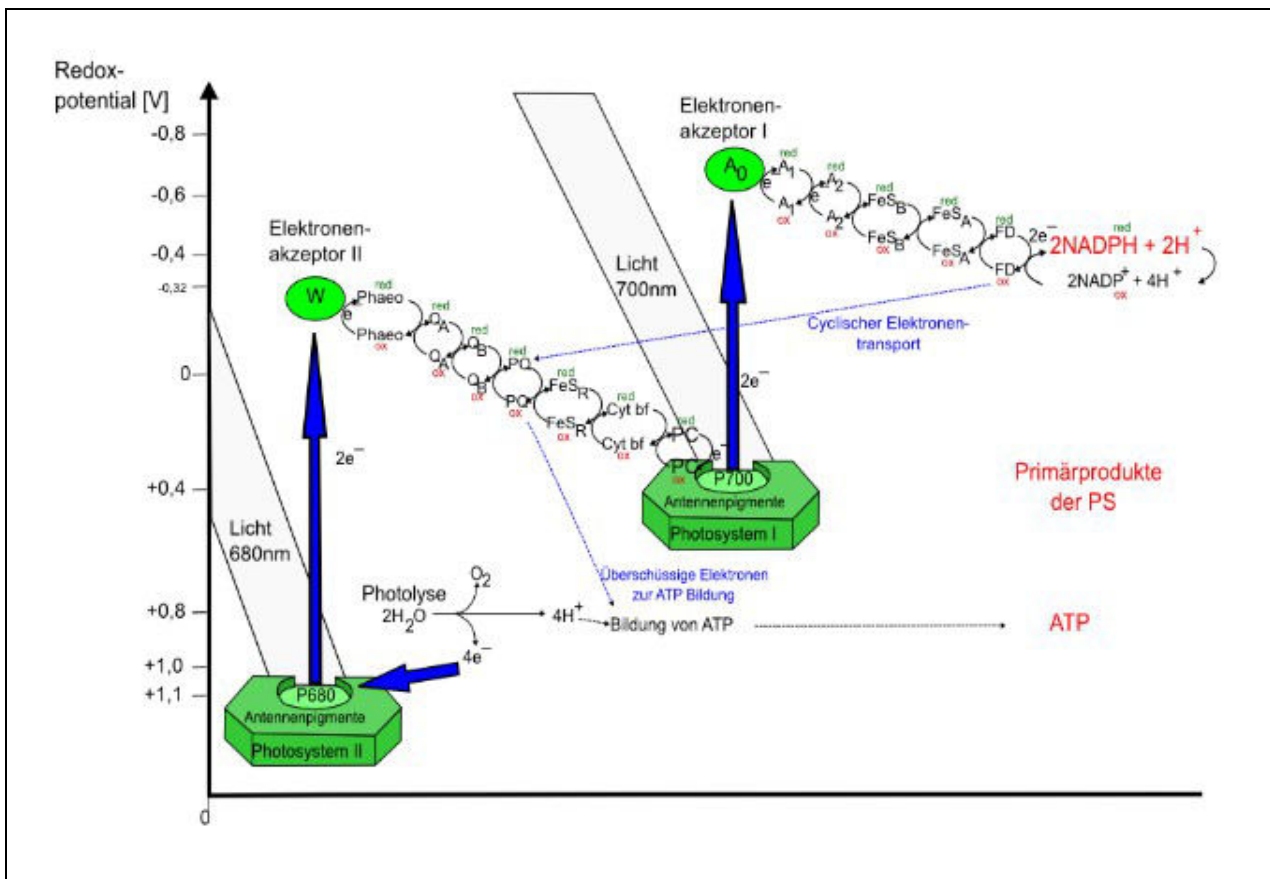


Abb. 1: Das Z-Schema der Photosynthese

(Abbildung aus Lanzo, 2007)

2.2 Herbizide

Eine große Zahl von Herbiziden, ungefähr die Hälfte aller wirtschaftlich wichtigen Verbindungen, wirkt, indem sie den photosynthetischen Elektronenfluss blockiert. Ein großer Teil dieser Stoffe wirkt entweder an der reduzierenden Seite des PS-I (z.B. Paraquat) oder am chinonbindenden Komplex der Elektronentransportkette (z.B. Diuron, auch DCMU genannt). Die Wirkung von Paraquat beruht darauf, dass es Elektronen zwischen dem gebundenen Ferredoxin-Akzeptor und dem NADP abfängt und dann Sauerstoff zu Superoxid (O_2^-) reduziert. Superoxid verursacht starke Schäden an den Chloroplastenkomponenten, insbesondere an den Lipiden.

Herbizide, die am chinonbindenden Komplex wirken, verdrängen die oxidierte Form des Plastochinons Q_B und besetzen die spezifische Chinonbindungstelle. Das Herbizid kann keine Elektronen aufnehmen, so dass diese vom ersten Chinon-Akzeptor, dem Q_A , nicht weitergegeben werden können.

Somit blockiert das Herbizid durch seine Bindung den Elektronentransport und verhindert die Photosynthese (Taiz und Zeiger, 1999).

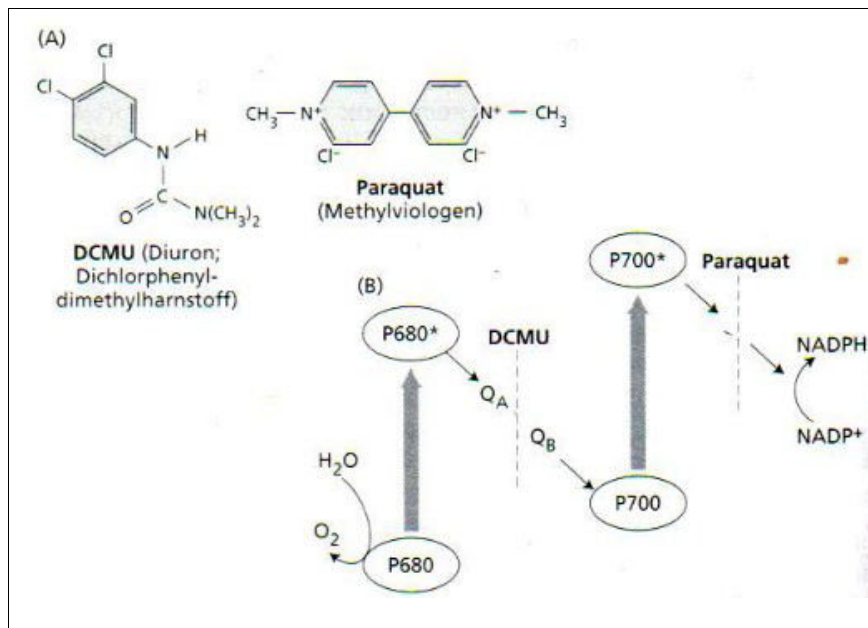


Abb. 2: Wirkort von DCMU und Paraquat in der Elektronentransportkette

(Abbildung aus Taiz und Zeiger, 1999)

2.3 Chlorophyllfluoreszenz

Durch Lichtabsorption wird das Reaktionszentrum des PS II oder des PS I in den angeregten Zustand (P680* oder P700*) gebracht. Beim Rückfall des P680* oder des P700* in den Grundzustand wird die überschüssige Energie in Form von Wärme und Fluoreszenz wieder abgegeben (Taiz und Zeiger, 1999). Die Chlorophyllfluoreszenz sorgt mit der abgegebenen Wärme dafür, dass Energie, die durch den Antennenkomplex gesammelt und nicht verwendet werden konnte, wieder abgeführt wird (Taiz und Zeiger, 1999).

Bei einem funktionierenden Photosyntheseapparat gelangen mehr als 90% der angeregten Elektronen in den Calvin-Zyklus. Ist der Weitertransport jedoch gestört, z.B durch Herbizide, kann die Energie der angeregten Elektronen nicht weiter transportiert werden und wird durch vermehrte Fluoreszenz abgestrahlt (Taiz & Zeiger, 1999).

Man unterscheidet zwischen der Prompten Fluoreszenz (PF) und der Verzögerten Fluoreszenz (VF). Beide werden im PS II im Spektralbereich von 650 nm bis 780 nm emittiert. Die PF erfolgt, wenn das angeregte P680* in den Grundzustand zurückfällt und die Energiedifferenz als Fluoreszenz abgegeben wird. Die VF wird durch den „Rücktransport“ von Elektronen hervorgerufen, die sich bereits in der Elektronentransportkette befanden (Katsumata et al., 2009).

In Abbildung 3 wird die Absorption der Lichtenergie durch das Chlorophyll a-Dimer veranschaulicht.

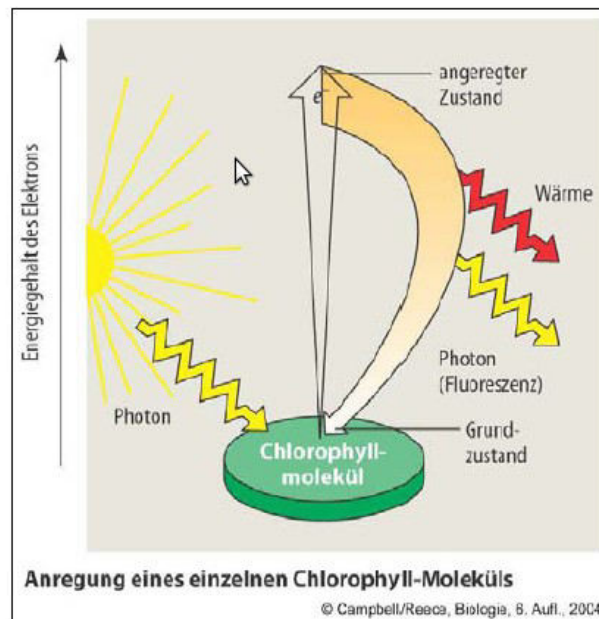


Abb. 3: Anregung eines einzelnen Chlorophyll-Moleküls
(Abbildung aus Campbell und Reece, 2010)

2.4 Verzögerte Fluoreszenz

Die Verzögerte Fluoreszenz (VF) ist eine Begleiterscheinung aus der Rückreaktion der Photosynthese nach der Beleuchtung. Deshalb wird sie auch als nachleuchtende Fluoreszenz bezeichnet (Taiz & Zeiger, 1999). VF ist photostimulierte ultraschwache Lumineszenz (Katsumata et al., 2009) und wird hauptsächlich vom Photosystem-II (PS-II) emittiert. Auch das Photosystem I trägt einen Teil zur Intensität der VF bei, die Lichtemission einer PS II Partikel Suspension ist jedoch 60- bis 90- mal stärker im Vergleich zu einer PS I Suspension (Goltsev et al., 2009).

VF kommt nur in lebenden Pflanzenzellen vor. Sie ist ein Maß für die Photosyntheseaktivität und somit ein Indikator der physiologischen Aktivität von Pflanzenzellen (Tümping und Friedrich, 1999).

Die VF besitzt verschiedene Anwendungsgebiete. Durch zahlreiche physikalische und chemische Faktoren endogenen und exogenen Ursprungs kann die Abklingkurve der VF beeinflusst werden. Da die Intensität der VF an den Zustand der Elektronentransportkette gebunden ist, ist sie in Kombination mit anderen experimentellen Techniken sehr hilfreich, die physiologischen Mechanismen von Schadstoffen besser zu verstehen (Drinovec et al., 2004). Sie ist ein geeignetes Mittel zur quantitativen Untersuchung lichtinduzierter Elektronentransporte und verwandter Prozesse (Goltsev et al., 2009).

Beispielsweise können durch das Analysieren der Abklingkurve Rückschlüsse auf den Wirkort eines

Herbizids getroffen werden und bestimmte Herbizidgruppen durch ihre spezifische Wirkung auf den Photosyntheseapparat selektiert werden (Berden-Zrimec et al., 2007). Die photosynthetisch aktiven Pigmente der verschiedenen Algenklassen weisen unterschiedliche Aktionsspektren auf. Deswegen kann die VF verwendet werden, um die Zusammensetzung von Phytoplankton in Gewässern zu bestimmen (Gerhardt und Bodemer, 2001).

Außerdem kann die VF für ökotoxikologische Schnelltests verwendet werden und stellt somit eine Alternative zum AWht dar. (Katsumata et al., 2009), (Berden-Zrimec et al., 2007), (Katsumata et al., 2006), (Drinovec et al., 2004).

Messung

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten die VF zu messen.

1. Messung der Abklingkurve der VF nach der Beleuchtung.

Die Beleuchtung kann durch einen Lichtimpuls (im ns-Bereich), gewöhnlicherweise durch einen Laser oder durch anhaltende Beleuchtung, erfolgen. Beide Ansätze geben unterschiedliche Ergebnisse.

Als Fluoreszenzdetektor wird ein Photomultiplier, auch Photoelektronenvervielfacher oder engl. Photomultiplier Tube genannt, verwendet. Dies ist eine spezielle Elektronenröhre mit dem Zweck, schwache Lichtsignale (bis hin zu einzelnen Photonen) durch Erzeugung und Verstärkung eines elektrischen Signals zu detektieren. Ein Photomultiplier besteht typischerweise aus einer Photokathode und einem nachgeschalteten Sekundärelektronenvervielfacher in einem evakuierten Glaskolben.

Generell empfiehlt es sich, die VF möglichst schnell nach der Beleuchtung zu messen. Es ist wichtig, dass der Detektor ausschließlich die VF aufzeichnet. Mögliche Störquellen können gestreutes Licht durch die Anregungslichtquelle oder Messung der Prompten Fluoreszenz sein. Solange die Wellenlänge der gemessenen VF nicht die Gleiche ist wie die der Lichtquelle, ist es möglich, einen Filter vor den Detektor zu installieren, der die Wellenlänge des Anregungslichts herausfiltert. Des weiteren muss darauf geachtet werden, dass kein Licht der PF gemessen wird. Wie bereits erwähnt, hält diese bis zu 5ns an. Der Detektor darf erst nach dieser Zeit anfangen, die Kurve aufzuzeichnen. Dies kann elektronisch geschehen, indem der detektierende Photomultiplier ein Gerät mit umschaltbaren Kanälen ist oder mechanisch durch eine Lichtschranke. Wenn das Spektrum des Anregungslichts eine Wellenlänge um die 680nm hat, muss ebenfalls elektronisch durch eine Blende dafür gesorgt

werden, dass kein Licht außer dem der VF gemessen wird. Der Nachteil der Lichtschranke ist, dass sie relativ langsam ist. Der Nachteil der elektronischen Steuerung des Photomultipliers ist, dass sie störende Signale liefern kann (Goltsev et al., 2009).

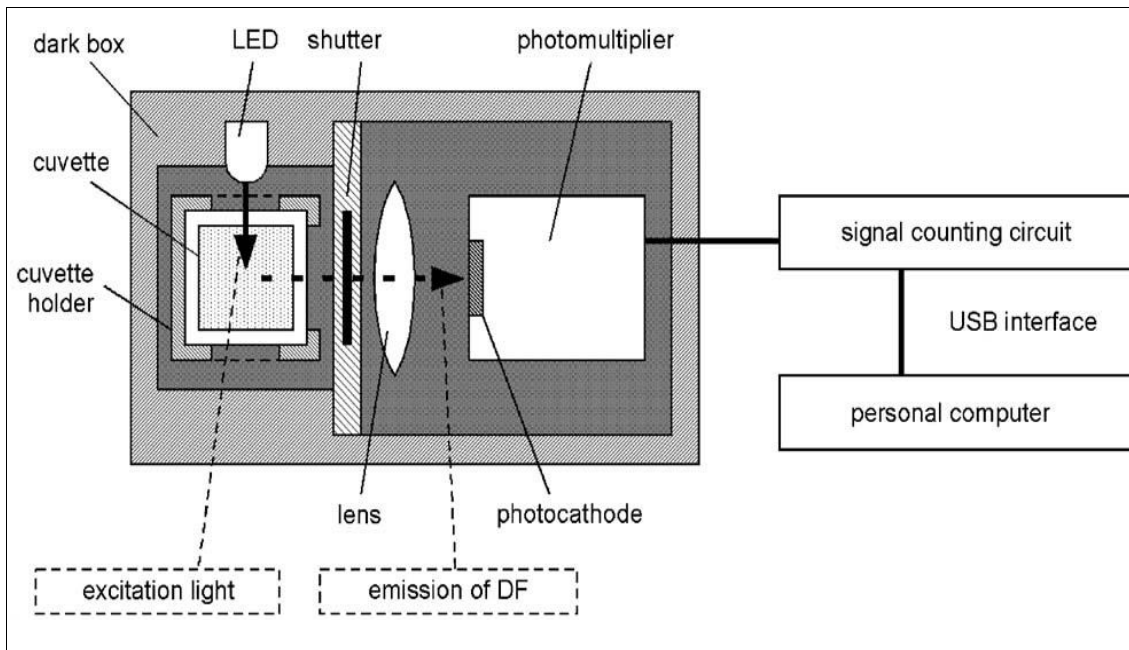


Abb. 4: Aufbau eines Photo-Counting Luminometers

(Abbildung aus Katsumata et al. 2006)

2. Bestimmung der VF durch die Induktionskurve

Die zweite Möglichkeit der Messung der VF ist die Aufzeichnung einer Induktionskurve der VF. Diese wird beim Übergang der dunkeladaptierten zur lichtadaptierten Probe aufgezeichnet. Meistens wird hierzu eine rotierende Scheibe verwendet.

Die vorliegende Arbeit wird sich nur mit der erstgenannten Methode, zur Messung der Abklingkurve, beschäftigen.

3 Das hormetische Modell

Hormesis ist ein Phänomen, der Dosis-Wirkungs-Beziehungen. Es ist dadurch charakterisiert, dass bei geringen Konzentrationen stimulierende und bei größeren Konzentrationen hemmende Wirkungen auftreten (Calabrese und Blain, 2003).

Das Modell der Hormesis ist auf alle möglichen biologischen Organismen übertragbar, Algen, Viren, Bakterien, Pilze, Insekten, Tiere und Menschen. Das Spektrum der hormetischen Wirkungen ist ebenfalls sehr groß, es beinhaltet Wachstum, Lebensdauer, zahlreiche metabolische Parameter, Krankheit (inklusive Krebs), verschiedene Leistungswerte wie kognitive Funktionen, Immunabwehr und andere Wirkungen (Calabrese und Blain, 2005). Nach Calabrese (2002) gibt es in der Toxikologie, abgesehen von dem hormetischen Modell, zwei allgemein anerkannte Modelle der Dosis-Wirkungs-Beziehungen:

- 1) Das lineare Modell ohne einen unteren Grenzwert („linear no-threshold model“): Die Wahrscheinlichkeit eines Effekts nimmt mit größer werdender Konzentration zu, wobei es keinen Grenzwert gibt, unter dem eine Exposition unschädlich wäre. Ein Beispiel für toxische Stoffe, deren Wirkung dem linearen Modell folgt, sind Kanzerogene. Die Wahrscheinlichkeit, an Krebs zu erkranken, steigt mit steigender Konzentration und Expositionszeit (Wacker, 2009).
- 2) Das Grenzwertmodell (engl. threshold model): Unter einer bestimmten Konzentration gibt es keine toxikologisch relevanten Wirkungen (Douglas, 2008). Hier kann die schädliche Wirkung von Alkohol als Beispiel dienen.

Das hormetische Modell und das Grenzwertmodell schließen sich gegenseitig nicht aus. Das Modell der linearen Dosis-Wirkungs-Beziehung ist mit den anderen zwei Modellen jedoch nicht vereinbar (Calabrese, 2002). In Abbildung 5 werden die drei verschiedenen Modelle veranschaulicht.

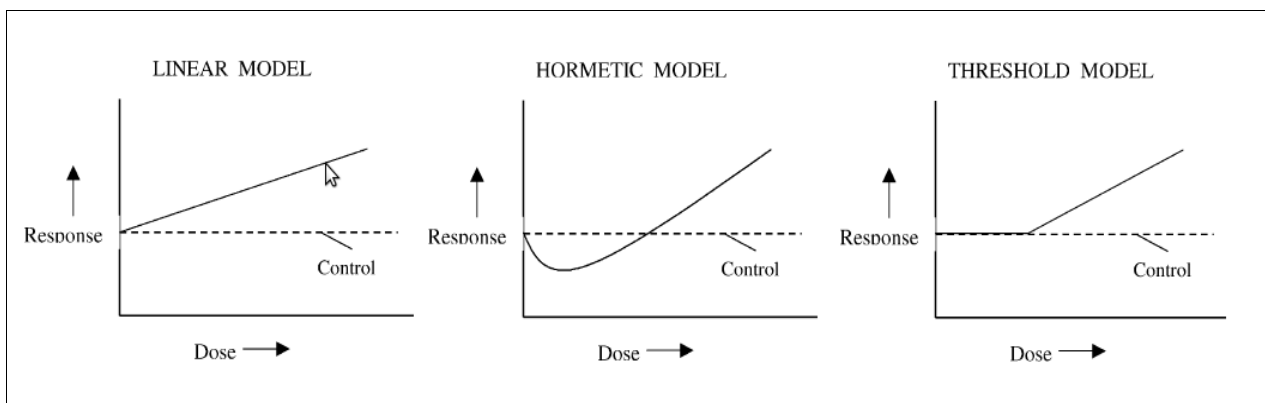


Abb. 5: Dosis-Wirkungs-Modelle der Toxikologie

(Abbildung aus Calabreses, 2002)

Die hormetische Kurve wird auch als β -Kurve bezeichnet (Stebbing, 1982). Sie kann zwei mögliche Formen besitzen. Einmal J- bzw. U-förmig (Abbildung 6 (a)) und einmal invertiert J- bzw. invertiert U-förmig (Abbildung 6 (b)).

Douglas (2008) macht die Aussage, dass es irreführend sei, einen hormetischen Verlauf als U-förmig zu bezeichnen, wie es in der wissenschaftlichen Literatur häufig getan wird. Die stimulierenden Wirkungen bei hormetischen Effekten sind nicht gleich groß wie die hemmenden Wirkungen. Die J-Form verdeutlicht besser, dass die stimulierenden Effekte um einiges schwächer sind als die hemmenden.

Calabrese und Baldwin (2003) definieren den J-förmigen Kurververlauf dadurch, dass Schädigung des Organismus (z.B. durch Krebs) im Niedrigdosisbereich vermindert wird. Bei der invertiert J-förmigen Kurve wird die physiologische Funktionalität gesteigert. Ein Beispiel dafür wäre hormetische Stimulation im AWht.

Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit der invertiert J-förmigen Kurve.

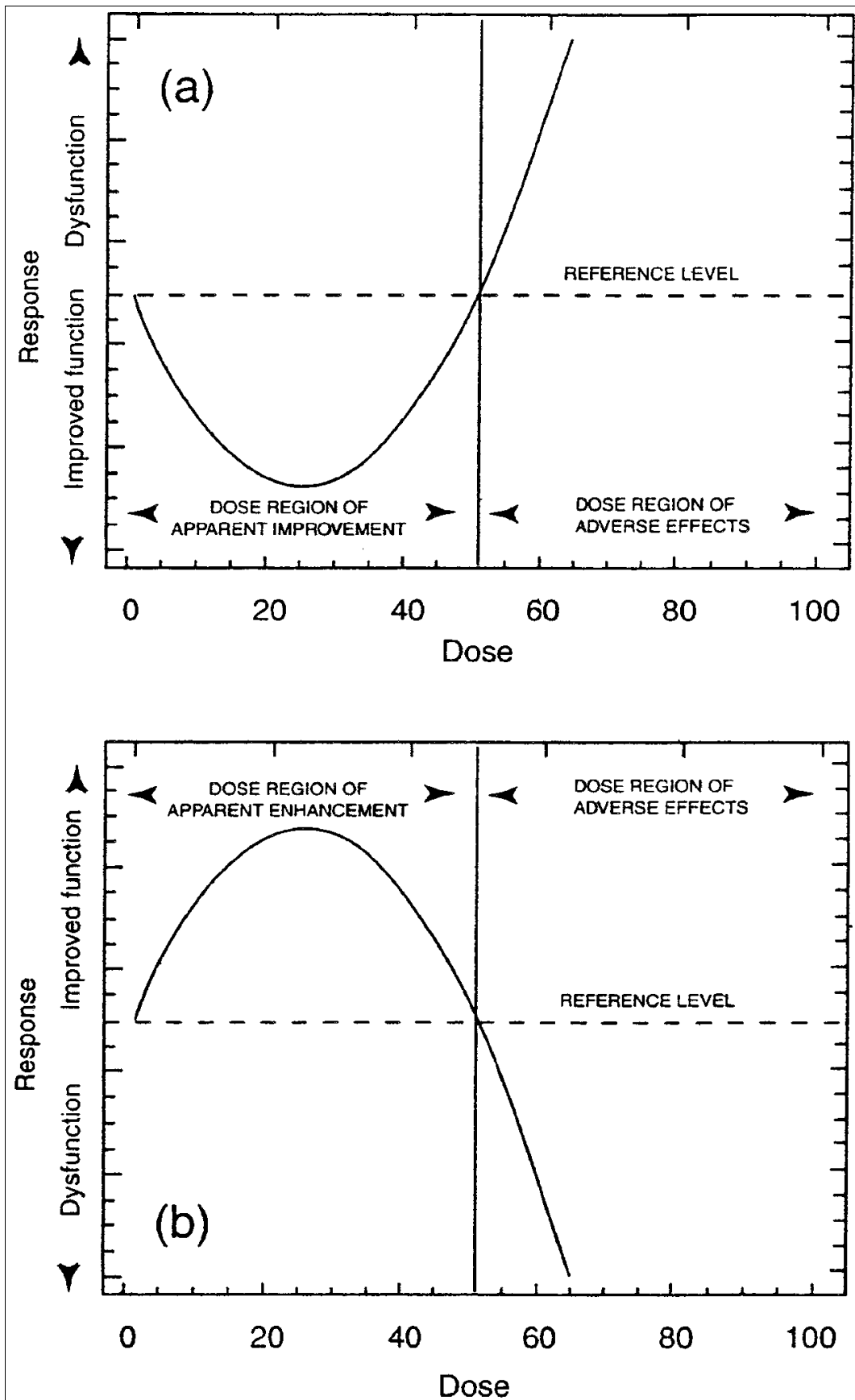


Abb. 6: Das J-förmige (a) und das invertiert J-förmige (b) Modell der Hormesis

(Abbildung aus Calabrese und Baldwin, 2003)

3.1 Die Hormesis-Diskussion

Es wird diskutiert, ob die Hypothese der Hormesis generell bzw. universal geltend und anwendbar ist. In der Studie „Hormesis: the dose-response revolution“ erwähnen Calabrese und Baldwin (2003), dass hormetische Effekte in vielen vertrauenswürdigen Studien beobachtet worden sind und als allgemein gültige Phänomene betrachtet werden können, die unabhängig von chemischen Stoffen oder physikalischen Einflüssen, biologischen Modellen und Messungen der Endpunkte auftreten.

Calabrese und Blain (2005) kritisieren die häufig verwendete Definition zur Toxikologie, die sich nur über den NO(A)EL (no observed adverse effect level) abspielt. Dies ist die höchste Konzentration, bei der noch keine signifikante schädigende Wirkung zu beobachten ist.

Die Ansicht, dass es unter der NO(A)EL-Konzentration keine zu berücksichtigenden Wirkungen gibt, würde hormetischen Effekten prinzipiell keine Bedeutung beimessen (Calabrese und Blain, 2005). Sie fordern, die allgemein anerkannten Theorien des linearen Modells und des Grenzwertmodells zu überdenken und durch das hormetische Modell zu ersetzen.

Sie sagen, dass das allgemeine Modell der Dosis-Wirkungs-Beziehung in der Toxikologie weder linear ansteigend noch auf einen bestimmten Grenzwert beschränkt, sondern J- bzw. invertiert J-förmig sei.

Rozman (2005) behauptet, dass genügend hormetische Effekte beobachtet worden sind, um die Hypothese aufstellen zu können, dass alle chemischen Stoffe in niedrigen Konzentrationen hormetische Effekte hervorrufen. Die Wirkungen seien in einigen Fällen nur zu gering, um sie durch geeignete Messungen bestätigen zu können.

Ein Kritiker der Hormesis- Hypothese ist Douglas. Douglas (2008) hat das hormetische Phänomen auf dem Gebiet der Humanmedizin betrachtet. Wenn man aber, wie Calabrese und Blain (2005), von der Theorie ausgeht, dass das Modell der Hormesis nicht auf bestimmte Teilgebiete beschränkt ist, wäre es möglich, die von ihm erwähnten Kritikpunkte auch auf andere Bereiche wie beispielsweise die Umwelttoxikologie zu übertragen.

Er bezeichnet die Aussage, dass alle Chemikalien hormetische Effekte besitzen als “far from rational”(Douglas, 2008). Er erklärt seine Aussage dadurch, dass Rozman (2005) eine nicht widerlegbare Hypothese geschaffen hat, was eine Antithese zur rationellen Wissenschaft darstellt. Douglas stellt die Hypothese in Frage, dass Hormesis universell gültig ist, da die Beweise für eine derartige Behauptung noch fehlen. Er fordert von den Vertretern der allgemeingültigen Theorie der Hormesis, dass es möglich sein muss, Voraussagen treffen zu können, wann hormetische Effekte zu erwarten sind und wann nicht.

Des Weiteren kritisiert er die verbreitete Annahme, dass hormetische Effekte immer gut für den biologischen Organismus seien, da es dafür keine Beweise gibt (Douglas, 2008).

Trotzdem stimmt Douglas den Studien von Calabrese und Baldwin zu, dass Hormesis nicht auf zufälligen Erscheinungen beruhen kann, da 40 % aller Studien, in denen eine Messung von hormetischen Effekten, durch geeignete Aufzeichnung des Niedrigdosisbereichs möglich war, Hormesis zeigten (Calabrese und Baldwin 2003).

3.2 Eigenschaften hormetischer Effekte

In umfangreiche Literaturstudien, (Calabrese und Blain., 2005; Calabrese und Blain, 2009; Calabrese und Baldwin, 2001) konnten weitreichende Erkenntnisse zu hormetischen Effekten gesammelt werden. In der Studie von Calabrese und Baldwin (2001) wurden 20 000 wissenschaftlichen Artikel, in denen Dosis-Wirkungs-Beziehungen beschrieben wurden ausgewertet. Von diesen Publikationen wurden 350 in die nähere Auswahl genommen da sie die Auslese Kriterien wie beispielsweise eine hinreichend genaue Dokumentation des Niedrigdosisbereichs erfüllten. Von diesen 350 genauer untersuchten Publikationen, zeigten sich bei 40 % hormetische Effekte.

Es wird die Aussage getroffen, dass die Existenz der Hormesis 32-mal wahrscheinlicher ist, als dass es sie nicht gibt .

Bei der β -Kurve wird die hormetische Stimulation durch den prozentualen Anstieg der Wirkungskurve gegenüber der Kontrolle definiert (Calabrese und Baldwin, 2001).

Bei den meisten hormetischen Dosis-Wirkungs-Beziehungen wurde ein stimulierender Effekt von ungefähr 30-60 % beobachtet. Nur in seltenen Fällen ist die Stimulation größer als das Doppelte des Kontrollwertes (Calabrese und Baldwin, 1997; Calabrese und Baldwin, 2001). Dies stellt hohe Anforderungen an die experimentellen Genauigkeiten, damit unter Berücksichtigung der Unsicherheit und der Variabilität der erhobenen Daten echte hormetischen Effekte identifiziert werden können (Calabrese und Baldwin, 2002). Calabrese und Blain (2009) definieren den Zero Equivalent Point (ZEP) als die Konzentration, an der die Wirkungskurve die Kontrolle schneidet. Bei dem hormetischen Modell sind der ZEP und der NO(A)EL identisch. Die Distanz zwischen der Konzentration der maximalen hormetischen Stimulation (C_{\max}) und der Konzentration des ZEP wird durch den Quotienten des ZEP durch C_{\max} angegeben (Cedergreen et al., 2007). In Abbildung 7 wird eine hormetische Dosis-Wirkungs-Kurve mit eingezeichnetem ZEP und C_{\max} gezeigt.

In 70% der Fälle lag der Quotient ZEP/C_{\max} unter 20, in 25% aller Beispiele zwischen 20 und 1000 und nur in einem Prozent der Fälle war der ZEP mehr als 1000 fach so hoch wie C_{\max} (Calabrese, 2002). Diese Verteilung wird in Abbildung 8 veranschaulicht.

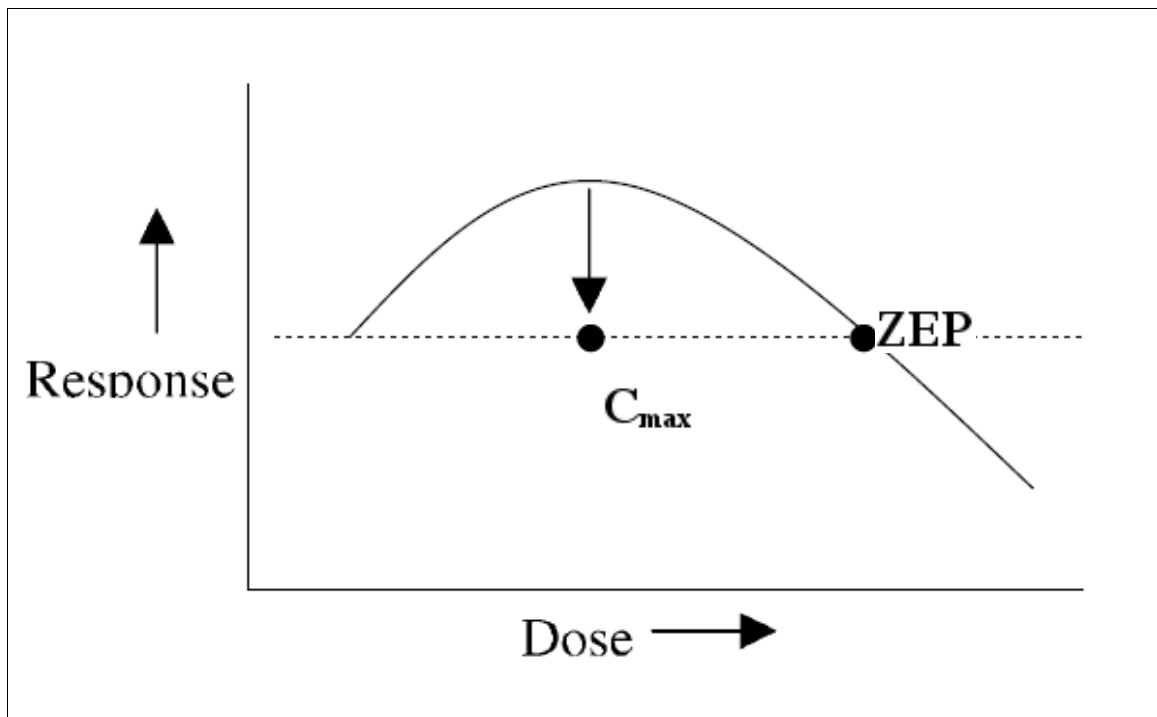


Abb. 7: Hormetische Dosis-Wirkungs-Kurve mit eingezeichnetem ZEP und C_{max}

(bearbeitete Abbildung aus Calabrese und Blain, 2009)

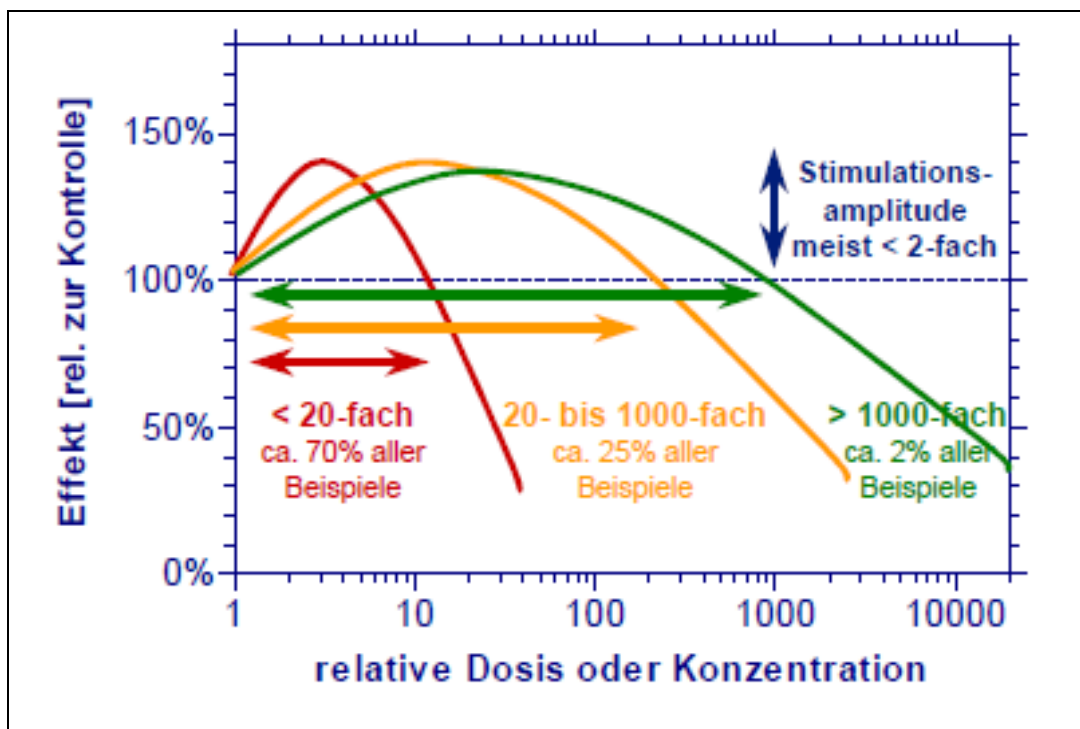


Abb. 8: Häufigkeit stimulierend wirkender Konzentrationsbereiche bei hormetischen Dosis-Wirkungs-Beziehungen. Die relative Konzentration gibt das Verhältnis von ZEP zu C_{max} an.

(Abbildung aus Oehlmann)

3.3 Fazit

In diesem Kapitel wurde der Begriff der Hormesis genauer betrachtet. In der wissenschaftlichen Literatur zeigten sich Beispiele für hormetische Effekte in verschiedenen Teilbereichen wie der Humanmedizin, der Umwelttoxikologie und der Biologie. Hormetische Effekte wurden unter anderem bei Krebs, Wachstum von Pflanzen und Tieren oder bei der Lebensdauer von Organismen beobachtet (Calabrese und Blain, 2005). In den meisten Fällen waren die quantitativen Merkmale wie der maximale stimulierende Effekt oder die Distanz zwischen C_{\max} und dem ZEP miteinander vergleichbar (Calabrese und Baldwin, 1997; Calabrese und Baldwin, 2001; Calabrese, 2002; Calabrese und Blain, 2005).

Trotz der Häufigkeit der beobachteten hormetischen Effekte gibt es noch viel Diskussion um die Hypothese der Hormesis und den zugrunde liegenden toxikologischen Mechanismen (Calabrese und Blain, 2005).

4 Der Algen-Wachstumshemmtest

Mit dem Algen-Wachstumshemmtest (AWht) können toxische Wirkungen von Schadstoffen als Einzelsubstanz oder in Abwasser und Umweltproben auf Mikroalgen untersucht werden. Die Bestimmung der Algentoxizität ist im Rahmen verschiedener Standardverfahren national und international genormt worden (DIN, ISO, OECD, ASTM, EG)(Dorgerloh, 1997). Die einzelnen Standardverfahren unterscheiden sich je nach Normungsinstitution. In Deutschland ist das Verfahren nach der DIN EN ISO 8692 genormt. Die Grundlagen des Tests werden in der DIN Norm wie folgt beschrieben:

Einzellige Algenarten werden über mehrere Generationen in einem definierten Medium kultiviert, das jeweils verschiedene Konzentrationen an Testsubstanz enthält. Die Testansätze werden durch Mischung entsprechender Mengen Wachstumsmedium, Untersuchungsprobe und einem Inokulum exponentiell wachsender Algenzellen hergestellt. Die Testansätze werden über einen Zeitraum von (72 ± 2) h inkubiert, wobei die Zelldichte jedes Testansatzes mindestens alle 24 h gemessen wird.

Die Auswertung des Zellwachstums erfolgt durch die Berechnung der spezifischen Wachstumsrate. Dies ist die proportionale Zunahmerate der Zelldichte je Zeiteinheit.

Die Hemmung wird als Verminderung der Wachstumsrate zu unter identischen Bedingungen gewachsenen Kontrollansätzen bestimmt (DIN EN ISO 8692, 2004).

Durch den AWht kann die Wirkkonzentration E_rC_x einer Substanz auf die Algen bestimmt werden. Dies ist die Konzentration der Untersuchungsprobe, bei der die x-%-Hemmung der Wachstumsrate bezogen auf den Kontrollanstaz gemessen wird. Der E_rC_{50} beschreibt also die Wachstumsrate μ einer Testkonzentration, welche um 50 % kleiner ist als die des Kontrollansatzes. Zur graphischen Darstellung der Wirkkonzentrationen muss die prozentuale Hemmung jedes einzelnen Testgefäßes gegen die Testkonzentration logarithmisch aufgetragen werden (DIN EN ISO 8692, 2004).

Nach der DIN-Norm muss als Grünalge entweder *Desmodesmus subspicatus* oder *Pseudokirchneriella subcapitata* verwendet werden. In der Literatur wird der AWht nach unterschiedlichen Richtlinien und Standard Operation Procedures (SOP) durchgeführt. Aus diesem Grund können die vorgeschriebenen Inkubationszeiten der Testansätze die Wahl der Grünalgen, die Dauer des Tests, der pH-Wert, die Nährstoffkonzentrationen des Wachstumsmediums und andere Parameter variieren.

Die Bestimmung des Algenwachstums kann durch verschiedene Methoden erfolgen: Zellzählung, photometrische Messung der Absorption, ATP-Bestimmung, fluorimetrische und elektronische Messung (Eisentraeger et al., 2003). Es muss darauf geachtet werden, dass das Messverfahren eine ausreichende Empfindlichkeit besitzt. Außerdem muss eine ausreichende Korrelation der Messparameter zur Zelldichte nachgewiesen werden (DIN EN ISO 8692, 2004).

Es ist möglich, den Test auf Mikroplatten mit 24 oder 96 Wells (Probenkammern einer Mikroplatte in denen die Proben untergebracht sind) durchzuführen. Der Vorteil der Mikroplatten ist die große Anzahl an Wells, in denen sich die unterschiedlichen Proben befinden. Dadurch kann eine große Anzahl von Proben bei geringer Probenmenge gemessen werden. Statistische Auswertungen zeigten, dass die Ergebnisse von Wachstumstests, bei denen Einzelsubstanzen getestet wurden, bei Verwendung von 24-Well-, 96-Well-Mikroplatten oder Erlenmeyerkolben nahezu identisch waren (Eisentraeger et al., 2003). Bei der Testung von Umweltproben muss diese Aussage jedoch eingeschränkt werden, da sich schon bei Verwendung von 24- und 96-well Platten deutliche Unterschiede zeigen (Heise, persönliche Kommunikation, 2012). Unterschiedliche Prozesse kommen hierfür in Frage, wie beispielsweise ein unterschiedliches Oberflächen/Volumenverhältnis, eine veränderte Gasaustauschrate, eine unterschiedliche Durchmischung in den Wells etc. Die eigentliche Ursache konnte noch nicht eindeutig identifiziert werden. Die Verwendung von Mikroplatten eignet sich besonders bei der Messung der Prompten Fluoreszenz (Eisentraeger et al., 2003).

Nach der DIN-Norm ist das Wachstumsmedium eine Mischung aus Wasser und Nährstoffen, in der die Algenzellen für die Vorkulturen und die Kontrollansätze angezüchtet werden. Das Medium ist durch Hydrogencarbonat und Kohlenstoffdioxid aus der Luft gepuffert. Es wird mit einer ausreichend niedrigen Zellzahl angeimpft. Dadurch soll bis zum Test ein exponentielles Wachstum gewährleistet werden. Die so hergestellte Vorkultur dient nach einer dreitägigen Inkubationszeit als Inoculum für den Test. Durch Mischen des Inoculums, des Wachstumsmediums und der Untersuchungsprobe werden die Testmedien hergestellt. Die einzelnen Testmedien besitzen unterschiedliche Konzentrationen der Testsubstanz, welche in einer geometrischen Reihe angeordnet sein sollten.

Das Gesamtvolumen, die Konzentration der zugesetzten Nährstofflösung und die Zelldichte müssen in allen Testgefäßen gleich sein. Die Zelldichte muss zu Testbeginn klein genug sein, um ein exponentielles Wachstum zu gewährleisten. Die Testgefäße werden unter gleichmäßiger Dauerbeleuchtung inkubiert. Es muss darauf geachtet werden, dass die Testgefäße ausreichend

gegen Kontamination durch die Umgebungsluft geschützt werden. Alle 24 h wird die Zelldichte in jedem Testgefäß gemessen.

Damit der Test nach der DIN 8692 als gültig angesehen wird, müssen folgende Kriterien erfüllt werden:

- a) Die mittlere Wachstumsrate in den Kontrollen muss mindestens 1,4 pro Tag betragen. Diese Wachstumsrate entspricht einem Anstieg der Zelldichte um den Faktor 67 innerhalb von 72 h.
- b) Der pH-Wert in den Kontrollansätzen darf bezogen auf den pH des Wachstumsmediums im Verlauf des Tests um nicht mehr als 1,5 ansteigen.
- c) Der relative Variationskoeffizient darf in den Kontrollansätzen 5 % nicht überschreiten.

5 Beispiele für Stimulation aus der Literatur

In diesem Kapitel werden Beispiele für Stimulationen im Niedrigdosisbereich näher betrachtet, welche auf Hormesis zurückzuführen sein könnten.

Calabrese und Blain (2009) werteten in ihrer Literaturstudie „Hormesis and plant biology“ 3121 Dosis-Wirkungs-Beziehungen zu Pflanzen aus. Von diesen 3121 Beispielen wurden 4 % zu den Algen und Mikroalgen gezählt. Eine Dosis-Wirkung-Beziehung, zu der ein hormetischer Effekt gezählt wurde, musste im Niedrigdosisbereich eine Stimulation von mindestens 10 % zeigen (10 % bei einer invertiert J-förmigen Kurve. Bei der J-förmigen Kurve genügte eine Verminderung der schädigenden Wirkung von 3 %). Die in dieser Studie bezeichneten hormetischen Effekte bei Pflanzen besaßen die gleichen quantitativen Eigenschaften wie die besprochenen allgemeinen hormetischen Effekte, welche sich auf ganz unterschiedliche Organismen bezogen (Calabrese und Blain, 2005). Die Stimulation lag typischerweise bei 30 - 60 % des Kontrollwertes (siehe Kapitel 3). Calabrese und Blain stellten fest, dass die beobachteten hormetischen Stimulationen unabhängig von den Pflanzenarten, der Wahl der gemessenen Endpunkte und der chemischen oder physikalischen Stressfaktoren auftraten.

Im Folgenden werden aus der Literatur Beispiele für Stimulationen im AWht dargelegt. Anschließend wird diskutiert ob diese auf Hormesis beruhen.

5.1 Cedergreen et al., 2007

In der Arbeit „*the occurrence of hormesis in plants and algae*“ von Cedergreen et al. (2007) wurden 211 Dosis-Wirkungs-Beziehungen aus Experimenten einer vorangegangenen Studie von Cedergreen et al. (2006) ausgewertet. Den Dosis-Wirkungs-Beziehungen lagen AWhts mit der Grünalge *Pseudokirchneriella subcapitata* zugrunde. Dabei wurde die Grünalge in verschiedenen Versuchen neun verschiedenen Herbiziden und einem Fungizid ausgesetzt. Diese waren: Acifluorfen, Diquat, Glyphosat, MCPA, Mecoprop, Mesotrione, Metsulfuronmethyl, Prochloraz, Terbutylazin und Triasulfuron. Die Tests wurden nach den Richtlinien der ISO 8692 (1989) durchgeführt. Die Bestimmung der relativen Wachstumsrate erfolgte durch Messung der *in vitro* Chlorophyllfluoreszenz.

Von den 211 Dosis-Wirkungs-Kurven fehlten bei 144 ausreichende Dokumentationen im Niedrigdosisbereich oder die Vergleichswerte der Kontrollen. Bei 43 der verbleibenden 77 Dosis-Wirkungs-Beziehungen zeigte sich im Niedrigdosisbereich eine Stimulation von mindestens 5 %.

Von diesen 43 Kurven waren 18 genauer beschrieben.

Die durchschnittliche Stimulation der verbliebenen 18 Kurven lag bei 16 %. Die Konzentration der maximalen Stimulation lag durchschnittlich bei 1/32 des ZEP (zero equivalent point). Die beobachteten Stimulationen der 18 Dosis-Wirkungs-Beziehungen wurden von der Autoren auf Hormesis zurückgeführt.

5.2 Kamaya et al., 2006

In der Arbeit von Kamaya et al. (2006) wurde die Grünalge *Pseudokirchneriella subcapitata* dem Stoff 4-Hydroxybenzoesäure ausgesetzt. Dieser Stoff besitzt mit einem E_rC_{50} von 9,9 mmol/L eine relativ geringe Toxizität für *Pseudokirchneriella subcapitata* (Kamaya et al., 2006). Der AWht wurde nach den Richtlinien der US EPA von 1989 durchgeführt. Das Anwachsen der Zellzahl wurde nach 72 und 96 h durch Zellzählung bestimmt. Bei einer Konzentration von ca. 1/20 des ZEP wurde eine maximale Stimulation von 50 % beobachtet.

5.3 Liliana Zalizniak, 2006

In der Dissertation von Liliana Zalizniak (2006) wurden die Wirkungen des Herbizids Glyphosat und des Insektizids Chlorpyrifos in einem 72 h AWht auf die Grünalgen *Pseudokirchneriella subcapitata* und *Chlorella pyrenoidosa* untersucht. Der Test wurde nach den Richtlinien der OECD (1996) durchgeführt. Glyphosat wurde einmal als technisches Produkt und einmal als handelsübliches „Roundup“ verabreicht.

Die Wachstumsrate wurde durch Zellzählung bestimmt. Das technische Glyphosat und das Roundup verursachte bei *Pseudokirchneriella subcapitata* bei einer Konzentration von 1/25 und 1/14 des ZEP eine Stimulation von 20%. In Abbildung 9 ist die Dosis-Wirkungs-Beziehung von Glyphosat auf *Pseudokirchneriella subcapitata* veranschaulicht.

Bei der Grünalge *Chlorella pyrenoidosa* zeigte sich nach der Zugabe von Glyphosat keine Stimulation. Das Insektizid Chlorpyrifos führte bei einer Konzentration von 1/1667 des ZEP bei *Pseudokirchneriella subcapitata* zu einer Stimulation von 40 % und bei *C. Pyrenoidosa* zu einer Stimulation von 20 %.

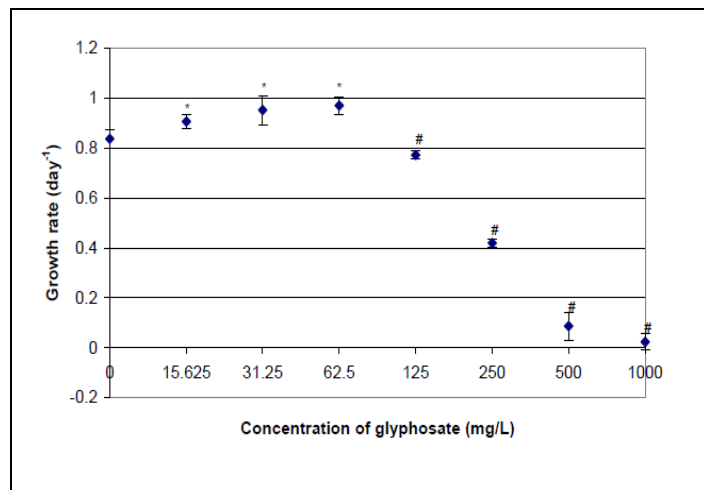


Abb. 9: Hormetische Dosis-Wirkungs-Beziehung von Glyphosat
(Abbildung aus Liliana Zaluzniak, 2006)

5.4 Wong und Chang, 1988

Wong und Chang (1988) testeten die Herbizide 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (kurz 2,4-D) und sechs Organophosphor-Insektiziden auf die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. In einem AWht wurden die Wachstumsraten, durch photometrische Messung der Absorption (Extinktion) und die Zunahme des Chlorophyll a-Gehalts bestimmt.

Die Extinktion und der Chlorophyll a-Gehalt zeigten bei einer 2,4-D-Konzentration von 1 mg/L eine Stimulation von 25 % und 28 %. Durch 1 mg/L des Insektizides Fenitrothion wurde die Extinktion um 38 % und der Chlorophyll a-Gehalt um 12 % gesteigert.

In den Abbildungen 10 und 11 sind die Wirkungen auf die Wachstumsrate und den Chlorophyll a-Gehalt veranschaulicht.

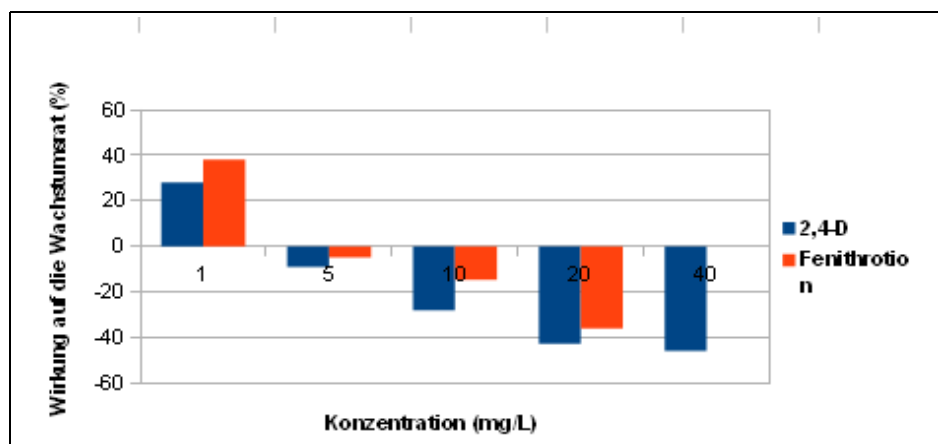


Abb. 10: Dosis-Wirkungs-Beziehungen von 2,4-D und Fenitrothion auf die Wachstumsrate

(Abbildung aus Wong und Chang, 1988)

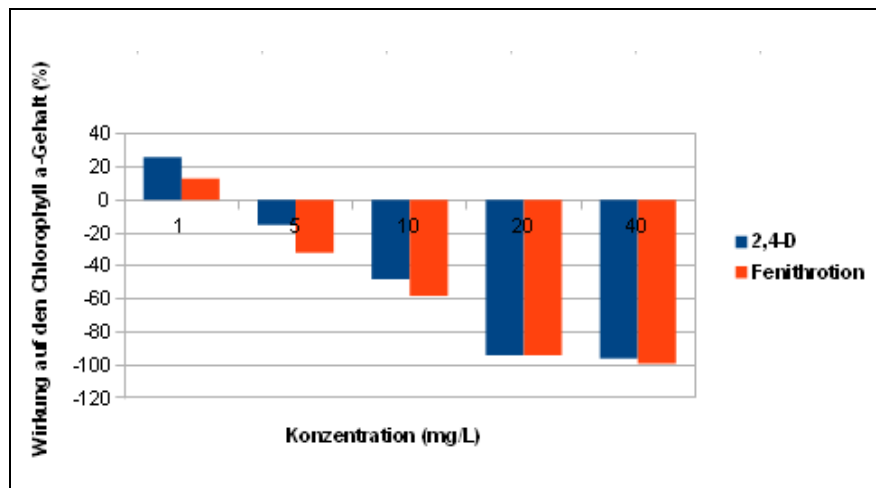


Abb. 11: Dosis-Wirkungs-Beziehungen von 2,4-D und Fenitrothion auf den Chlorophyll a-Gehalt

(Abbildung aus Wong und Chang, 1988)

5.5 Wong, 2000

In der Studie von Wong (2000) wurden die Effekte von 2,4-D, Glyphosat und Paraquat auf das Zellwachstum und den durch Endpunktmessung bestimmten Chlorophyll a-Gehalt, der Grünalge *Scenedesmus quadricauda* getestet. Die Wachstumsrate wurde durch Zellzählung bestimmt. 2,4-D führte bei der Wachstumsrate zu einer Stimulation von 21% und bei dem Chlorophyll a-Gehalt zu einer Stimulation von 14 %. Glyphosat stimulierte die Wachstumsrate um 17 % und den Chlorophyll a-Gehalt um 11 %. Bei Paraquat wurde bei beiden Messmethoden ausschließlich Hemmung beobachtet.

5.6 Zrimec et al., 2007

In der Arbeit von Zrimec et al. (2007) wurde die Wirkung verschiedener Substanzen auf die Grünalge *Desmodesmus subspicatus* getestet. Die Studie diente dazu, den AWht mit dem Toxizitätstest der Verzögerten Fluoreszenz (VF) zu vergleichen. Die Wachstumsrate wurde durch Zellzählung und Messung der optischen Dichte (Extinktion) in einem 72 h AWht bestimmt. Der Test wurde nach den Richtlinien der ISO 8692 (2004) durchgeführt. Parallel zu den Wachstumshemmtests wurde die Wirkung der Substanzen auf *Desmodesmus subspicatus* durch die VF ausgewertet. Kupfer zeigte bei einer Konzentration von 0,02 mg/L eine Stimulation der Zelldichte, der optischen Dichte und der VF. Die Zelldichte wurde um ca. 80 % und die optische Dichte um ca. 50 % stimuliert. Bei der VF zeigte sich eine Stimulation von ca. 70 %. In Abbildung 12 ist die Wirkung Cu in Abhängigkeit der Substanzkonzentrationen auf *Desmodesmus subspicatus* veranschaulicht.

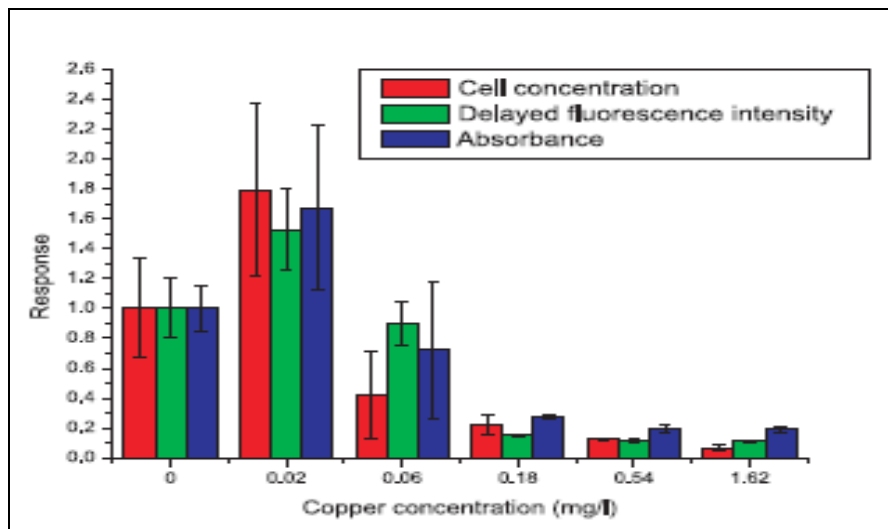


Abb. 12: Dosis-Wirkungs-Beziehungen von Kupfer auf *Desmodesmus subspicatus*.

(Abbildungen aus Zrimec et al., 2007)

5.7 Fazit

Es wurden Beispiele für Stimulationen im AWht gezeigt, welche möglicherweise auf Hormesis zurückgeführt werden könnten. Die Wachstumsraten wurden durch Zellzählung, Messung der Extinktion und Messung des Chlorophyll a-Gehalts bestimmt. Bei fast allen Versuchen wurde die Zellzählung zur Bestimmung der Zelldichte verwendet.

Stimulationen zeigten sich bei allen Messmethoden. Diese betragen in den meisten Fällen über 15 % und maximal 80 %. Die Stimulationen zeigten sich bei unterschiedlichen Stoffgruppen wie Herbiziden, Fungiziden, Insektiziden und Metallen. Bei den ersten drei Beispielen war die Konzentration der maximalen Stimulation (C_{max}) ersichtlich. Diese lag bis auf eine Ausnahme im Bereich zwischen 1/14 bis 1/32 des ZEPs. In einem Fall lag die Konzentration bei 1/1667 des ZEP. Die beobachteten Stimulationen sind mit den in den Studien von Calabrese und Baldwin (1997 und 2001) und Calabrese (2002) beschriebenen hormetischen Stimulationen vergleichbar.

6 Mögliche Ursachen für die beobachteten Stimulationen

Meist wird davon ausgegangen, dass es sich bei Hormesis um vorteilhafte Effekte handelt.

Stebbing (1982) definiert Hormesis als den stimulierenden Effekt, welcher durch niedrige Konzentrationen an potentiell giftigen Stoffen hervorgerufen wird. Die Definition der Hormesis leitet sich aus dem Arndt-Schulz Gesetz ab, das besagt, dass Substanzen, die auf biologische Prozesse hemmend wirken, in nicht giftigen Mengen stimulierende Wirkungen besitzen (Stebbing, 1982).

Mattson (2008) macht die Aussage, dass hormetische Effekte in der Biologie als eine anpassende Reaktion von Organismen auf ein moderates Maß an Stress angesehen werden können.

Überträgt man diese Definitionen auf den AWht, so müssten hormetische Effekte auf echtem Wachstum beruhen, das aufgrund der Zugabe geringer Konzentrationen toxischer Substanzen erzeugt werden würde. Es würde dann auf physiologisch fördernden Effekten beruhen. Alternativ kann es sich auch um ein Phänomen handeln, bei dem zwar die Messung eine Stimulation zeigt, diese jedoch nicht mit einer gutartigen physiologischen Förderung einhergeht. Eine derartige Stimulation könnte dann nicht auf Hormesis zurückgeführt werden.

Diese Arbeit definiert Hormesis im AWht als eine echte Stimulation des Zellwachstums, welche auf physiologisch fördernden Effekten beruht und durch Exposition gegenüber geringen Konzentrationen von Substanzen induziert wird, die bei höheren Konzentrationen hemmend wirken. Im folgenden Abschnitt sollen mögliche Aspekte diskutiert werden, welche eine hormetische Stimulation vortäuschen könnten.

6.1 Genauigkeit des Algen-Wachstumshemmtests

Der Variationskoeffizient ist ein Maß für die Streuung der Parallelen im Test (DIN EN ISO 8692, 2004). Die Streuung resultiert aus den Ungenauigkeiten beim Ansetzen des Tests und aus der natürlichen Variabilität der Wachstumsraten (Heise, persönliche Kommunikation, 2012).

Durch den Variationskoeffizienten wird geprüft, ob die Wachstumsraten der Kontrollproben gleich groß sind. Dadurch soll garantiert werden, dass Stimulation bzw. Hemmung im AWht, auf der Wirkung der getesteten Substanzen beruht und nicht durch natürliche Variabilität des Algenwachstums oder durch Ungenauigkeit beim Ansetzen hervorgerufen wird.

In diesem Abschnitt soll die Frage diskutiert werden, ob bei einem gültigen Test hormetische Effekte im Rahmen der natürlichen Variabilität liegen.

6.1.1 Berechnung des Variationskoeffizienten

Der Variationskoeffizient V ist vom gewählten Maßstab unabhängig und errechnet sich, indem die Standardabweichung s durch den Mittelwert \bar{x} einer Messreihe dividiert wird. (Buchwald et al. Internet). Die Standardabweichung s kann grob als die durchschnittliche Abweichung der Messwerte von ihrem Mittelwert verstanden werden.

In Abbildung 13 ist die Gaußsche Glockenkurve zu sehen. Diese besagt, dass bei Normalverteilung 68,3 % aller Werte im Bereich zwischen $\bar{x} \pm s$, 95,45 % aller Werte im Bereich zwischen $\bar{x} \pm 2s$ und 99,73 % aller Werte im Bereich zwischen $\bar{x} \pm 3s$ liegen (Kühle, 09/10). Nach der DIN ISO 8692 darf der Variationskoeffizient in den Kontrollansätze nicht größer als 5 % sein. Dieser bezieht sich auf die Wachstumsrate. Daraus ergibt sich, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,73 % die einzelnen Wachstumsraten der Kontrollansätze um nicht mehr als 15 % vom Mittelwert abweichen, wenn der Test als gültig betrachtet wird.

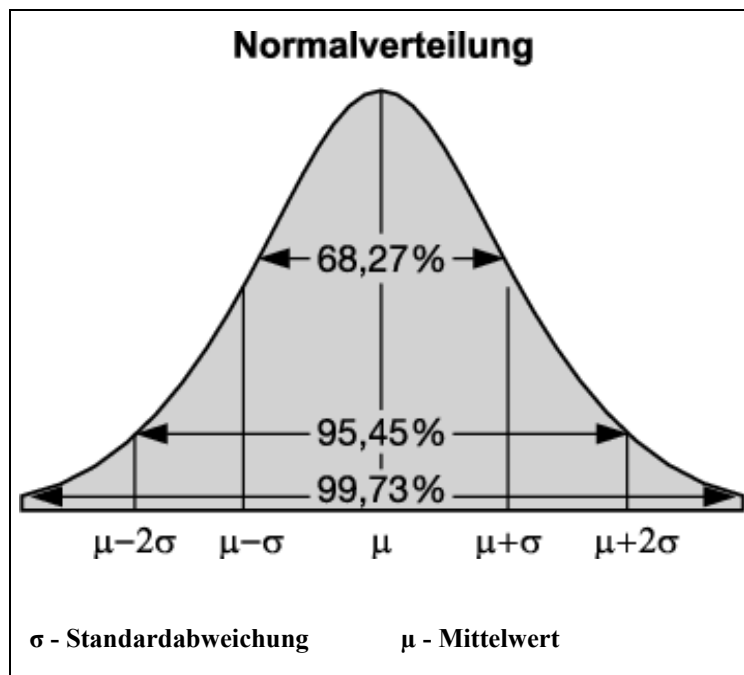


Abb. 13: Gaußsche Glockenkurve

(Abbildung aus Gabler Wirtschaftslexikon, Internet)

6.1.2 Fazit

Nach Calabrese und Blain (2009) liegen die Stimulationen hormetischer Effekte meistens bei 30 bis 60 % des Kontrollwertes und erstrecken sich mit den gleichen quantitativen Merkmalen über die gesamte Pflanzen und Tierwelt. Darunter fallen auch die Algen.

Der Variationskoeffizient darf nach der DIN EN ISO 8692 (2004) höchstens 5 % betragen. Es wurde gezeigt, dass bei einem Variationskoeffizienten von 5 % die Wachstumsraten der einzelnen Kontrollansätze mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,73 % um nicht mehr als 15 % vom bestimmten Mittelwert der Kontrollen abweichen, wenn der Test als gültig betrachtet wird. Da die in Kapitel 5 beschriebenen Studien im Rahmen verschiedener Standardverfahren durchgeführt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass der relative Variationskoeffizient unter 5 % betrug. Da die beobachteten Stimulationen in den meisten Fällen über 15 % lagen, kann davon ausgegangen werden, dass auch unter der Annahme, dass diese Abweichungen bei einem Variationskoeffizienten von 5 % sehr unwahrscheinlich sind, diese nicht auf unterschiedlichen Wachstumsraten der Kontrollen beruhen.

6.2 Veränderte Wachstumsbedingungen

Unter bestimmten Umständen kann es zu ungleichen Wachstumsbedingungen innerhalb einer Probenreihe kommen. So können in manchen Proben die Nährstoff- oder Probensubstanzkonzentrationen variieren. In diesem Abschnitt soll der Einfluss dieser Faktoren diskutiert werden.

6.2.1 Kontamination

Es stellt sich die Frage, ob durch Kontamination der Kontrollen niedrigere Kontrollwerte angezeigt und dadurch falsche Stimulationen gemessen werden können.

Die Verwendung von 24- oder 96-Wellplatten im AWht wurde in Kapitel 2 besprochen. Eisentraeger et al. (2003) beschreibt zwei Aspekte, die bei Mikroplatten zu einer Kontamination der Kontrollen führen können.

1. Während der Wachstumsphase werden die Platten mit einem Deckel bedeckt und zusätzlich mit Parafilm verschlossen. Probensubstanzen mit großer Flüchtigkeit können während der Wachstumsphase verdunsten und andere die Kontrollen kontaminieren (Eisentraeger et al. 2003).
2. Hydrophobe Substanzen können an der Oberfläche der Plattenmaterialien, die beispielsweise aus Polystyrol bestehen, adsorbiert werden. Aus diesem Grund werden für hydrophobe Proben hydrophile, glasähnliche Oberflächen empfohlen. Hierbei muss erwähnt werden, dass hydrophile Substanzen an Glas adsorbiert werden können.

Das Verdunsten der Proben und die Adsorption an die Gefäßwand kann auch bei Versuchen, welche in Erlenmeyerkolben durchgeführt werden, vorkommen (Eisentraeger et al. 2003).

6.2.2 Nährstoffkonzentrationen

Es stellt sich die Frage, ob das Wachstum durch eine gesteigerte Nährstoffkonzentration erhöht werden kann. Eine gesteigerte Nährstoffkonzentration kann beispielsweise durch unabsichtliche Zugabe von Mangelsubstanzen bei Eluatproben, die das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle fördern, entstehen.

Das Wachstumsmedium der ISO 8692 ist, im Gegensatz zur OECD-Norm, darauf ausgelegt, optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen (Heise, persönliche Kommunikation, 2012).

In Versuchen wurde gezeigt, dass sich das Wachstum, in der Kontrolle bei Versuchen, welche nach der ISO 8692 durchgeführt wurden, durch eine entsprechende Erhöhung der Konzentrationen einzelner Nährstoffkomponenten des Mediums nicht erhöhen ließ. Im Falle der Messung von Umweltproben schließt dies jedoch nicht aus, dass bestimmte, nicht im Medium vorgesehene Mikronährstoffe möglicherweise in zu testenden Wasser- oder Eluatproben zugeführt werden und ein erhöhtes Wachstum in den Probenansätzen im Vergleich zur Kontrolle ermöglichen.

6.2.3 Fazit

Bei Versuchen, welche nach der ISO 8692 durchgeführt werden, und keine Umweltproben sondern Einzelsubstanztests umfassen, kann durch erhöhte Nährstoffbedingungen keine erhöhte Wachstumsrate vorgetäuscht werden.

Eine Kontamination der Kontrollen ist in Einzelfällen theoretisch möglich. Nach Eisentraeger et al. (2003) kann es besonders bei Tests mit Mikroplatten zu unbeabsichtigten Kontaminationen

kommen. Wenn allerdings die Kontrollen durch die angrenzenden Proben negativ beeinflusst würden, würde dies auch auf die Proben selbst zutreffen. D.h. solange unterschiedliche Proben nicht auf der gleichen Platte sind, würde zwar eine Kontamination und damit Hemmung in der Kontrolle selbst nicht ausgeschlossen werden, wohl aber dass diese Hemmung höher ist, als sie durch die eigentlichen Proben erfolgt. Somit würde kein Stimulationseffekt eintreten (Heise, persönliche Kommunikation, 2012)

Als Fazit kann gesagt werden, dass unterschiedliche Wachstumsbedingungen in Kontrolle und Probe nicht für die beobachteten Stimulationen verantwortlich gemacht werden können.

6.3 Umverteilung pflanzlicher Ressourcen

Unter Stresssituationen kann es bei Pflanzen zu einer Umverteilung pflanzlicher Ressourcen kommen (Cedergreen et al. 2007). Brain et al. (2005) zeigten am Beispiel der aquatischen Pflanze *Ähriges Tausendblatt*, dass Pflanzen auf Stresssituationen mit einem ungleichen Wachstum reagieren können. Durch die Zugabe von Tetracyclinen wuchsen die Pflanzen mehr in die Höhe, während das Trockengewicht und die Wurzellänge abnahmen.

Wie zu Beginn des Kapitels beschrieben, handelt es sich bei Hormesis um echte Stimulation, welche auf physiologisch fördernden Effekten beruht. Cedergreen et al. (2007) machen die Aussage, dass hormetisches Pflanzenwachstum mit physiologischen Veränderungen wie einer Steigerung der Photosyntheserate einhergeht. Am Beispiel des *Ährigen Tausendblatts* ging die gesteigerte Pflanzenhöhe nicht mit einer gesteigerten Photosyntheserate einher. Die Stimulation beruhte lediglich auf einer Umverteilung pflanzlicher Ressourcen und kann deshalb nicht auf Hormesis zurückgeführt werden (Cedergreen et al. 2007).

Daher ist es wichtig, die gesamte Fitness eines Organismus zu betrachten, bevor eine beobachtete Stimulation auf Hormesis zurück geführt wird (Cedergreen et al. 2007).

In Kapitel 2 wurden mehrere Methoden zur Bestimmung des Algenwachstums erwähnt. In fast allen beschriebenen Beispielen wurde die Zellzählung zur Bestimmung der Wachstumsrate verwendet. Cedergreen et al., (2007) machen die Aussage, dass eine gesteigerte Anzahl an Algenzellen ein sicherer Indikator für echte Stimulation darstellt und nicht auf eine Umverteilung pflanzlicher Ressourcen zurückzuführen ist. Auch die *in vitro* Fluoreszenzmessung kann als geeignete Methode zur Bestimmung der Wachstumsraten angesehen werden (Slovacek und Hannan, 1977); (DIN EN ISO 8692, 2004;).

Demnach kann davon ausgegangen werden, dass eine Umverteilung pflanzlicher Ressourcen nicht für die beobachteten Stimulationen verantwortlich ist.

6.4 Resultat

Aus unterschiedlichen und voneinander unabhängigen Studien wurden mehrere Stimulationen im Niedrigdosisbereich gezeigt. Mit Ausnahme von Berden-Zrimec et al. (2007)(die keine Aussage zu den Stimulationen traf), führten alle Autoren dieser Arbeiten die beobachteten Stimulationen auf Hormesis zurück. Die diskutierten Aspekte ergaben keine Anhaltspunkte, die Anlass geben würden, diesen Schlussfolgerungen zu widersprechen.

7 Durch die Prompte Fluoreszenz gemessene Stimulationen

Die *in vivo* Fluoreszenzmessung ist eine weitere Methode, mit der das Wachstum im AWht gemessen wird. *In vivo* ist lateinisch und bedeutet im Lebendigen. *In vivo* Fluoreszenz kann als Prompte oder Verzögerte Fluoreszenz gemessen werden (Tümping und Fredrich, 1999).

Als Endpunkt im Algenwachstumshemmtest wird das Wachstum nach 72 Stunden oder die Wachstumsrate während dieser Expositionszeit bestimmt. Als Maß hierfür wird die Prompte Fluoreszenz (PF) genutzt (DIN EN ISO 8692, Eisentraeger et al. 2003).

Die Messung der PF ermöglicht eine schnelle Bestimmung des Chlorophyllgehalts, ohne die Proben zu verbrauchen oder zu verunreinigen. Sie kann als Biomasse- oder Wachstumsindikator verwendet werden (Slovacek und Hannan, 1977).

Die Messung der PF besitzt jedoch einen Nachteil. Das Signal variiert mit dem Zustand des PS II, welches wiederum von der Anregungsbeleuchtung und der physiologischen Funktionalität der Elektronentransportkette abhängig ist (Mayer et al., 1997). Wird der Elektronentransport unterbrochen, kommt es zu einem Elektronenstau, was wiederum einen Anstieg der Prompten Fluoreszenz zur Folge hat (Slovacek und Hannan, 1977). Durch Zugabe von Elektronenblockern, wie z.B. DCMU, wird die Fluoreszenzintensität maximal. Die Messung der Fluoreszenz, welche nicht mehr an die Funktionalität des Photosyntheseapparates gebunden ist, wird als *in vitro* Messung bezeichnet (Slovacek und Hannan, 1977).

7.1 Versuch

In der Studie von Slovacek und Hannan (1977) wurde bei der Grünalge *Chlorella pyrenoidosa* das Verhältnis der Fluoreszenzantwort zum Chlorophyll a-Gehalt getestet. *Chlorella pyrenoidosa* wurde in einem Wachstumstest unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ausgesetzt. Es gab Proben, welche optimalen Wachstumsbedingungen ausgesetzt wurden und andere in denen die Nährstoffe, oder Spurenelemente reduziert wurden oder Quecksilberchlorid (HgCl_2) zugegeben wurde. Die Chlorophyll a- und die Fluoreszenzmessung erfolgte mehrere Male während des Tests. Die Chlorophyll a-Konzentration pro Liter wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bestimmt. Für die Fluoreszenzmessung wurden die Zellsuspensionen verdünnt. Anschließend wurde zu einem Teil der Proben DCMU gegeben, um die maximale Fluorezenzantwort zu erhalten. Die

Fluoreszenz der anderen Proben wurde ohne die Zugabe von DCMU gemessen. Abbildung 14 veranschaulicht die Fluoreszenzantwort von *Chlorella pyrenoidosa* in Abhängigkeit des Chlorophyll a-Gehalts.

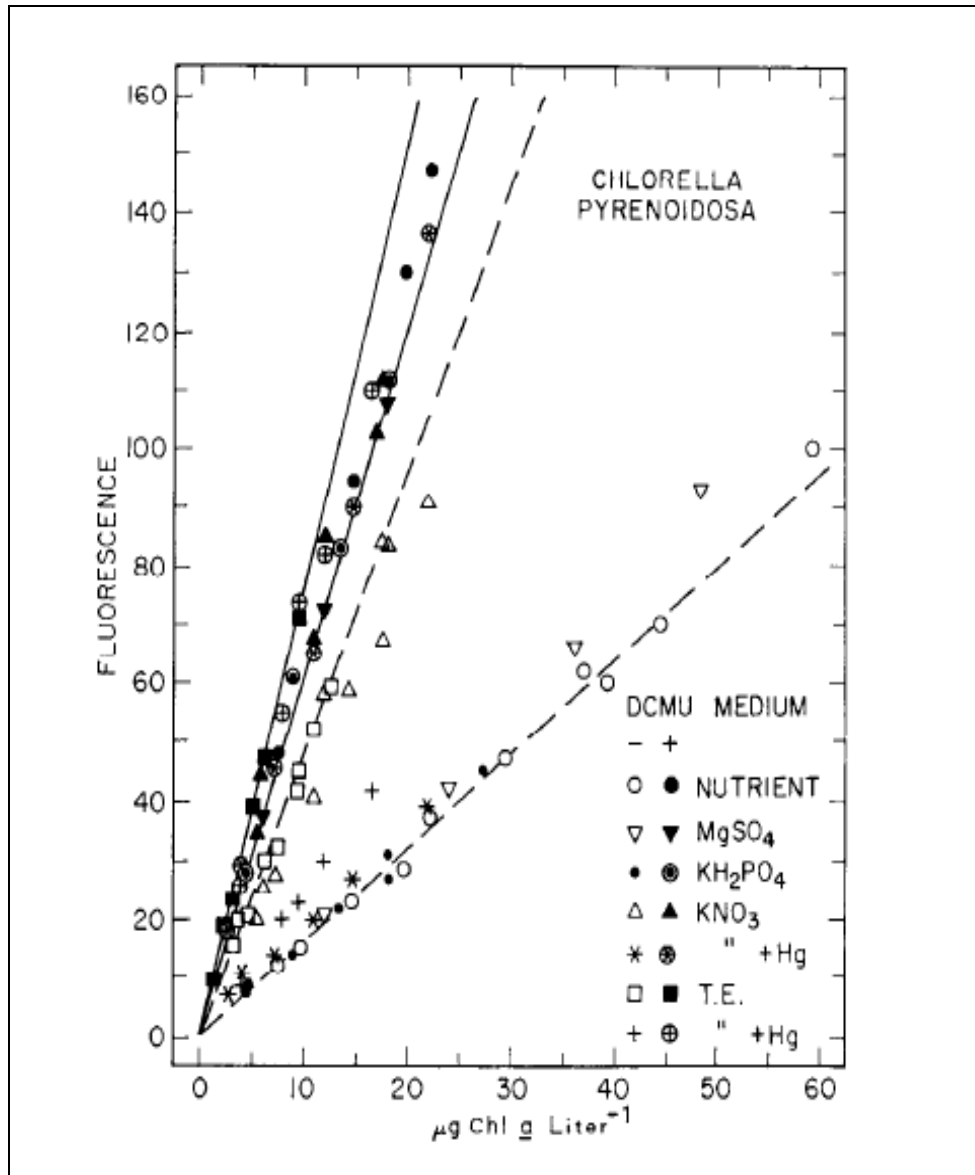


Abb. 14: Verhältnis der Prompten Fluoreszenz gegenüber dem Chlorophyll a-Gehalt unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen:

Die ausgefüllten Symbole repräsentieren Proben, zu welchen unmittelbar vor der Messung DCMU gegeben wurde. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Grenzen der gesteigerten Fluoreszenzemissionen.

Die leeren Symbole repräsentieren Proben ohne DCMU. Die gestrichelten Linien repräsentieren die diesbezüglichen Grenzen.

Die verschiedenen geometrischen Symbole repräsentieren die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen, denen die Proben ausgesetzt wurden: „Nutrient“ (Nährstoffe), steht für optimale Nährstoffbedingungen ohne Hg⁺; Die Symbole für MgSO₄, KH₂PO₄, KNO₃, KH₂PO₄ und T.E. (Trace Elements = Spurenelemente) weisen auf einen Mangel der jeweiligen Nährstoffe hin.

Die Symbole für Hg⁺ weisen auf die Zugabe von von HgCl₂ hin, dabei stehen die Sternchen für die Zugabe von Hg⁺ bei Mangel an Nitrat und die Plussymbole für die Zugabe an Hg⁺ bei Mangel an Spurenelementen.

(Abbildung aus Slovacek und Hannan, 1977)

Ergebnis der Proben ohne DCMU-Zugabe: Proben mit optimalen Wachstumsbedingungen oder mit Phosphat- oder Magnesiummangel ergaben die niedrigste Fluoreszenzantwort pro Mengeneinheit Chlorophyll a (siehe Abb. 16, untere gestrichelte Linie). Die Proben in denen ein Mangel an Nitrat oder Spurenelementen herrschte, ergaben eine dreimal so große Fluoreszenzantwort im Verhältnis zum Chlorophyll a-Gehalt.

Ergebnis der Proben mit DCMU-Zugabe: Zwischen den Proben, welche reduzierten und optimalen Wachstumsbedingungen ausgesetzt waren, wurde eine Variabilität von nur $\pm 10 \%$ der Fluoreszenzemission pro Chlorophyllgehalt gemessen.

Die Studie zeigte, dass die Intensität der PF von dem physiologischen Zustand der Algen abhängig ist und das Verhältnis PF zu Chlorophyll a-Gehalt in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen variiert.

7.2 Variabilität der Prompten Fluoreszenzintensität

Es zeigte sich, dass bei der Messung der PF erhöhte Intensitäten gemessen werden können, welche nicht auf einen gesteigerten Chlorophyllgehalt, sondern auf eine defekte Elektronentransportkette zurückzuführen sind. Trotzdem beschrieben Eisentraeger et al. (2003) die Nutzung der PF im AWht als geeignete Methode zur Bestimmung des Algenwachstums, da sie eine genaue Bestimmung der Algenkonzentration ermöglicht und deshalb die Gültigkeitskriterien der DIN ISO 8692 (1989) erfüllt. Slovacek und Hannan (1977) meinen allerdings, dass es sinnvoll ist, die Genauigkeit dieser *in vivo* Fluoreszenzmessung zu kennen, da die photochemische Rate und die Faktoren, die diese beeinflussen, im Allgemeinen nicht bekannt sind.

Zur Beantwortung der Frage, ob die gesteigerte PF eine nicht vorhandene Stimulation vortäuschen kann, müsste geklärt werden, ob Schadstoffe im Niedrigdosisbereich zu einer verstärkten Fluoreszenzantwort führen können, ohne dass gleichzeitig das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle signifikant verändert werden würde. Wenn das Wachstum gegenüber der Kontrolle nicht verändert wird, gleichzeitig aber die Intensität der PF ansteigt, wird eine verstärkte Photosyntheseleistung vorgetäuscht, welche nicht auf einer gesteigerten Wachstumsrate sondern auf einer Modifikation des Elektronentransportes beruht.

In der Arbeit von Slovacek und Hannan (1977) wurde die Aussage getroffen, dass bei Messung der *in vitro* Fluoreszenz das beschriebene Problem nicht auftritt:

Dabei wird durch Vergiften der Kontrollen und Proben vor der Fluoreszenzmessung das Verhältnis von Chlorophyll a-Konzentration zu PF maximal und damit konstant. Somit sind die gemessenen Intensitäten nicht mehr vom Zustand des physiologischen Mechanismus abhängig. Eine weitere Möglichkeit, mit der das beschriebene Problem gelöst werden kann, bietet die VF.

Im folgenden Kapitel soll diskutiert werden, wie die VF bei der Klärung helfen kann, wann eine gesteigerte Intensität der PF auf echtes Wachstum und wann auf einen geschädigten physiologischen Mechanismus zurückgeführt werden kann.

8 Verzögerte Fluoreszenz

Die VF wird auch als Lumineszenz, verzögerte Lichtemission und verzögerte Lumineszenz bezeichnet. Es ist das Leuchten von photosynthetischem Material nach der Beleuchtung (Jurisinic, 1986). Es wurde die Frage gestellt, ob bei der Messung der PF im AWht Stimulationen gemessen werden können, welche nicht auf einer echten Wachstumssteigerung, sondern auf einer Manipulation des Elektronentransports beruhen. Im diesem Kapitel soll die VF näher beschrieben werden und diskutiert werden, wie sie helfen kann, gesteigerte Intensitäten der PF zu analysieren. Dadurch würde sie bei der Klärung der Frage helfen, wann eine erhöhte Intensität der PF im AWht, auf Hormesis und wann auf Beschädigung des physiologischen Mechanismus zurückzuführen ist. Dafür werden die folgenden beiden Anwendungsmöglichkeiten besprochen:

1. Verwendung der VF zur Untersuchung von Veränderungen in der Elektronentransportkette

Es soll diskutiert werden, wie mit Hilfe der VF der physiologische Zustand der Elektronentransportkette untersucht werden kann, um damit Hinweise auf den Ursprung einer erhöhten Intensität der PF zu geben.

2. Verwendung der VF als zweite unabhängige Methode zur Bestimmung der Substanzwirkungen auf die Algen

Nach Calabrese und Baldwin (2003) ist Hormesis ein Phänomen, das unabhängig von Messmethoden auftritt. Eine Forderung an die Theorie der Hormesis ist, dass die Effekte wiederholbar sein müssen (Douglas, 2008). Demnach sollten sich Stimulationen im AWht ,welche auf Hormesis zurückgeführt werden, durch andere Testmethoden verifizieren lassen. Es soll diskutiert werden, ob die VF für einen Algentoxizitätstest angewendet werden kann.

8.1 Charakteristik

VF kommt nur in lebenden Pflanzenzellen vor. Es ist ein Maß für die Photosyntheseaktivität und somit ein Indikator der physiologischen Aktivität von Pflanzenzellen (Tümping und Friedrich, 1999).

Geschädigte Pflanzenzellen besitzen im Vergleich zu gesunden Zellen eine kleinere Fläche unter der Abklingkurve im Intensitäts-Zeit-Diagramm (Katsumata et al., 2006; Berden-Zrimec et al., 2007).

Die Messung der VF ist geeignet, um die Biomasse und die Bioaktivität von Algen zu bestimmen (Tümping und Friedrich, 1999).

Die PF und die VF besitzen das gleiche Lichtspektrum, unterscheiden sich jedoch in der Entstehung und sind zeitlich voneinander getrennt. Die VF, die auch Rekombinationsfluoreszenz genannt wird, wird durch Elektronen hervorgerufen, die sich bereits in der Elektronentransportkette befanden. Im Gegensatz dazu beruht die Prompte Fluoreszenz auf dem Rückfall angeregter Chlorophyllmoleküle vor der Ladungstrennung im P680* (Katsumata et al., 2009).

Die Emission der Prompten Fluoreszenz endet wenige Nanosekunden nach der Beleuchtung, wohingegen die VF weitaus länger anhält. Diese kann einige Minuten nach der Beleuchtung noch gemessen werden (Katsumata et al., 2009). Die Intensität der VF beträgt weniger als 1 % der PF (Katsumata et al., 2006).

8.1.1 Die Abklingkurve

Das Abklingen der Intensitätskurve geschieht innerhalb unterschiedlicher Zeitbereiche: Nanosekunden, Mikrosekunden, Millisekunden, Sekunden und sogar im Stundenbereich. Gemessen wird die VF bis zu einigen Minuten nach der Beleuchtung (Goltsev et al., 2009).

Die VF besitzt einen monotonen Abfall der Lichtintensität in den ersten Sekunden, manchmal gefolgt von einem kurzzeitigen Peak (Berden-Zrimec et al., 2007).

Die Abklingkurve der VF hängt von der Verteilung der Elektronen und der Barrieren innerhalb der Elektronentransportkette und der Ladung der Thylakoidmembran ab. Deshalb ist die VF von verschiedenen Faktoren beeinflussbar, wie z.B. der Exposition gegenüber Herbiziden (Gerhardt und Bodemer, 2001). In Abbildung 15 sind die Abklingkurven von vergifteten und nicht vergifteten Algen in einem halblogarithmischen Diagramm dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Intensität durch die Zugabe des Herbizids stark gemindert wird.

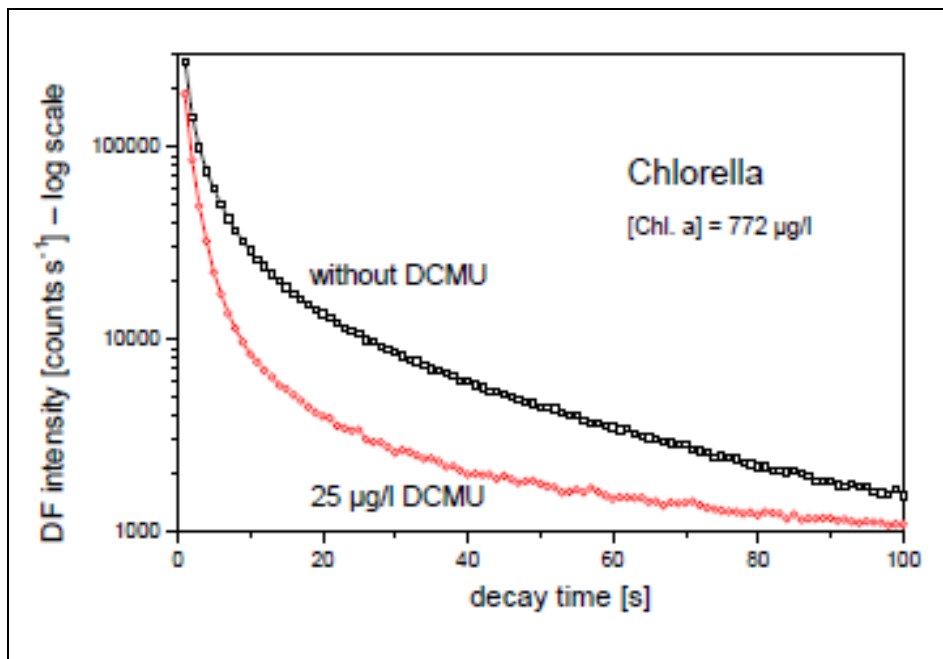


Abb. 15: Die Abklingkurven der Verzögerten Fluoreszenz mit und ohne DCMU. Die schwarze Kurve zeigt die VF von *Pseudokirchneriella subcapitata* ohne, die rote Kurve mit der Zugabe an DCMU.

(Abbildung aus Gerhardt und Bodemer, 2001)

8.1.2 Physiologischer Mechanismus

Die VF existiert, weil jeder photosynthetische Elektronentransport reversibel ist. Es ist das Fluoreszenzerggebnis einer Ladungsrekombination im Reaktionszentrum P680 während der Dunkeladaption nach der Lichtabsorption. Die Wellenlänge liegt bei 680 - 740 nm (Gerhardt und Bodemer, 2001).

Die Absorption eines Lichtquantums führt zu einer Anregung des Chlorophyllmoleküls, einem Energietransfer zum P680 und einer Ladungstrennung im PS II (Goltsev et al., 2009). Wie bereits erwähnt, findet auch im PSI eine Ladungstrennung statt. Die Intensität der VF ist jedoch hauptsächlich vom PSII abhängig (Goltsev et al., 2009).

Bei der Ladungstrennung im PS-II nimmt das Pheophytin ein Elektron auf, dadurch kann sich das Ladungspaar $P680^+Pheo^-$ bilden.

Wird die Elektronentransportkette nicht unterbrochen, so wird das vom Pheophytin aufgenommene Elektron an das Chinon Q_A weitergegeben. Zu diesem Zeitpunkt ist bereits ein Teil der absorbierten Energie durch Wärme und Fluoreszenz abgegeben worden. Es handelt sich nun um eine stabile Ladungstrennung. Ab hier werden die getrennten Ladungszustände auch als metastabile Stadien (engl. meta-state) bezeichnet. Wird die Transportkette nicht unterbrochen, wandert das Elektron in der Elektronentransportkette weiter, was dazu führt, dass weitere metastabile Stadien induziert und

wieder aufgelöst werden. Jeder einzelne Elektronentransfer dieser Kette ist reversibel (Lambrev und Goltsev, 2004).

Sobald die Beleuchtung endet, wird das P680 nicht mehr in den angeregten Zustand gehoben. Nun können die Elektronen aus der Transportkette zurück zum Oxidationszentrum P680 fließen, was zu einem angeregten Reaktionszentrum (P680*) führt. Der Rückfall des P680* in seinen Grundzustand führt zur Fluoreszenzemission. In der Elektronentransportkette gibt es viele verschiedene Metastadien. Die in diesen Zuständen gespeicherte Energie ist für die Intensität der VF verantwortlich. Desto weiter diese vom P680 entfernt sind, desto geringer ist die Intensität und desto langanhaltender die VF.

Die VF unterliegt einer komplexen Zeitfunktion mit unterschiedlichen Zeitbereichen (Goltsev et al., 2009).

8.2 Verzögerte Fluoreszenz zur Untersuchung der Elektronentransportkette

Wie bereits erwähnt, ist die VF an einen funktionierenden Photosyntheseapparat gebunden. Dabei nimmt die integrierte Intensität der VF, dies ist die Fläche unter der Abklingkurve, mit zunehmender Schädigung ab. Durch zahlreiche physikalische und chemische Faktoren endogenen und exogenen Ursprungs kann die Abklingkurve der VF beeinflusst werden. Jedes Quantum der VF sagt etwas über die Reaktionen innerhalb des Photosyntheseapparates aus. Durch diese Eigenschaften ist die VF ein empfindlicher Indikator für viele Reaktionen, die in der Photosynthese ablaufen und ist in Kombination mit anderen experimentellen Techniken sehr hilfreich, die physiologischen Mechanismen von Toxinen besser zu verstehen (Drinovec et al., 2004).

Desweiteren eignet sich die VF zur Bestimmung der Biomasse von Algen. Dadurch kann sie zur Bestimmung der Wachstumsrate im AWht verwendet werden (Gerhardt und Bodemer, 2001; Tümping und Friedriech, 1990)

8.2.1 Veränderung der Abklingkurve durch Elektronenblocker

In der Studie von Katsumata et al. (2006) wurde die Wirkung von Simazin (CAT) und 3,5-Dichlorphenol (3,5-DCP) auf die Grünalge *Pseudokirchneriella subcapitata* getestet. CAT ist ein Herbizid, das den Elektronentransport vom PS II zum PS I blockiert, während 3,5-DCP die Atmung hemmt (Katsumata et al., 2006). Die Mikroalgen wurden den Substanzen 15 min lang ausgesetzt.

Anschließend wurden die Abklingkurven der VF im Zeitintervall von 0,1 s bis 50 s aufgezeichnet. Bei der Auswertung der Kurven wurde das Zeitintervall von 0,1 s bis 50 s einmal als gesamtes betrachtet, und einmal in zwei Zeitbereiche aufgeteilt. Diese waren von 0,1 s – 0,5 s (DFI₁ - Delayed Fluorescence Intensity 1) und von 0,5 s – 50 s (DFI₂ - Delayed Fluorescence Intensity 2).

In Abbildung 16 ist das Abklingverhalten der VF von *Pseudokirchneriella subcapitata* gegenüber 3,5-DCP und CAT veranschaulicht.

Es zeigte sich, dass die Intensitätskurven von CAT und 3,5-DCP unterschiedlich abklingen. Bei CAT nahm die Intensität der VF im Intervall DFI₁ mit zunehmender Konzentration zu. Im Zeitbereich DFI₂ sank die Intensität der VF mit steigender Herbizidkonzentration. Bei 3,5-DCP nahm die Intensität der VF über den gesamten Zeitbereich ab.

Katsumata et al. (2006) erklären das unterschiedliche Abklingverhalten dadurch, dass CAT den Elektronentransport zwischen Q_A und Q_B blockiert. Dadurch wird der Elektronenfluss um das PS II erhöht, wodurch es zu einer vermehrten Ladungsrekombination kommt, was wiederum mit einer erhöhten Emission der VF verbunden ist. Es wird die Folgerung gezogen, dass die VF im Zeitbereich von 0,1 bis 0,5 s durch Elektronen im PS II induziert wird, während für die VF von 0,5 bis 50 s Ladungstrennungen des PS I verantwortlich sind. Der Versuch von Katsumata et al. (2006) zeigte außerdem, dass die integrierten Intensitäten (DFI₁ und DFI₂ addiert) der Versuche mit CAT und 3,5-DCP zu Dosis-Wirkungs-Beziehungen führten, welche mit denen eines parallel durchgeführten 72 h AWht vergleichbar waren.

Ein Versuch zur VF, der unter Anleitung von Heise (2012) an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften (HAW) durchgeführt wurde, bestätigte die Beobachtung von Katsumata et al. (2006), dass die VF durch die Zugabe von Elektronenblockern während des ersten Zeitintervalls (bei Katsumata 0,1 – 0,5 s) erhöht werden kann. Die Grünalge *Pseudokirchneriella subcapitata* wurde dem Herbizid DCMU ausgesetzt. Wie CAT blockiert DCMU den Elektronentransport zwischen Q_A und Q_B (Taiz und Zeiger, 1999). Die Fluoreszenz wurde mit einer Verzögerungszeit von 20 µs gemessen.

Bereits nach einer Expositionszeit von einer Minute trat eine Signalerhöhung im Vergleich zur Kontrolle ein. Diese gesteigerte Intensität der VF könnte, wie von Katsumata et al. (2006) beschrieben, auf einem gesteigerten Elektronenfluss um das PS II beruhen, welchem die Blockierung des Elektronentransports zwischen Q_A und Q_B zugrunde liegt.

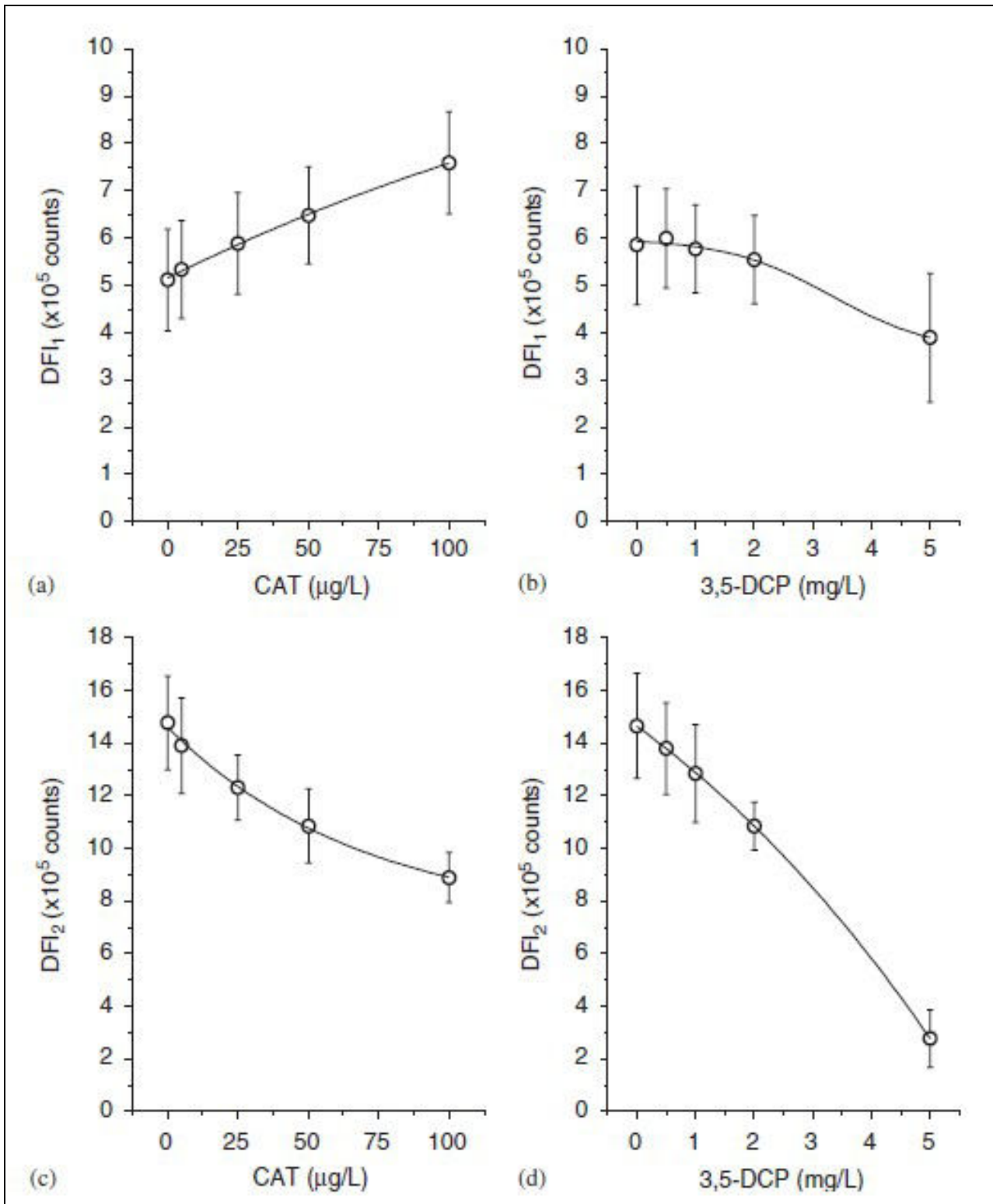


Abb. 16: Verhalten der Verzögerten Fluoreszenz bei CAT und 3,5 DCP. a) und b) zeigen jeweils den Zeitbereich DF₁ von 0,1 bis 0,5 s, während c) und d) jeweils den Zeitbereich DF₂ von 0,5 s – 50 s veranschaulichen.

(Abbildung aus Katsumata et al. 2006)

8.2.2 Methode

Es wurde gezeigt, dass bei dem Herbizide CAT die Intensität der VF gegenüber der Kontrolle innerhalb der ersten hundertstel Sekunden (DFI_1) anstieg, im Zeitintervall DFI_2 jedoch stark abfiel, wobei die Stimulation der Anfangsphase der VF keinen Einfluss auf gesamte Fläche unter der Abklingkurve (also DFI_1 und DFI_2 addiert) hatte. Diese nahm mit steigender Konzentration gegenüber ihrer Kontrollintensität ab.

Demzufolge müsste sich eine gesteigerte Intensität der PF, welche auf der Wirkung von Elektronentransport hemmenden Herbiziden beruht, durch die Betrachtung der Abklingkurve der VF erkennen lassen.

Mit folgender Vorgehensweise könnte die VF helfen, durch PF gemessene Stimulationen im AWht zu untersuchen:

Wie bereits erwähnt eignet sich die VF zur Bestimmung der Biomasse im AWht. Demnach könnte im AWht parallel zur PF die Abklingkurve VF aufgezeichnet werden. Es wäre denkbar, die Abklingkurve im gleichen Zeitbereich wie Katsumata et al. (2006) aufzuzeichnen. Wie bereits geschildert, lag dieser bei 0,1 s bis 50 s. Bei der Auswertung des AWhts würde eine erhöhte Intensität der PF gegenüber der Kontrolle nur dann echtes Wachstum bedeuten, wenn die integrierte Intensität der VF, also die gesamte Fläche unter der Abklingkurve, ebenfalls eine Steigerung gegenüber ihrer Kontrollintensität zeigen würde. Ein gesteigertes Signal der PF, mit einer gleichzeitigen Abnahme der VF, würde auf einen defekten physiologischen Mechanismus schließen lassen.

8.3 Verwendung der Verzögerten Fluoreszenz als Toxizitätstest

In einigen Studien wurde die Verwendung der VF als Toxizitätstest untersucht (Berden-Zrimec et al., 2007; Katsumata et al., 2006; 2009). Bei diesen Studien wurde die Methode der VF mit dem AWht verglichen.

Ein grundlegender Unterschied der beiden Verfahren ist die Zeit, die für einen Test benötigt wird. 72 h ist eine lange Zeit, vor allem wenn die Ergebnisse des Versuches für ein weiteres Vorgehen entscheidend sind. Hierbei ist die Methode der VF von Vorteil. Die Zeit, die bis zur Messung vergeht, ist nur von der Expositionszeit der Schadstoffe abhängig. In den erwähnten Studien variierte die Expositionszeit von 30 min bis zu 24 h. Es stellte sich heraus, dass sich bei bestimmten

Substanzen (z.B. Cd_2^+ und Cu_2^+) erst bei längerer Expositionszeit (mehr als 30 min) Wirkungen zeigten.

In den Studien von Berden-Zrimec et al. (2007) und Katsumata et al., (2006; 2009) war die Empfindlichkeit des VF-Tests mit der Empfindlichkeit des AWhts vergleichbar oder sogar höher. Dies galt sowohl für Schadstoffe, welche mit dem Photosystem interagierten, als auch für Stoffe wie beispielsweise Kaliumdichromat, 3,5-DCP oder Cu.

In allen drei Publikationen wurde die Aussage gemacht, dass der VF-Test geeignet ist, um Wirkungen von Substanzen auf Grünalgen zu testen.

Für die Anwendung dieses Testverfahrens zur Überprüfung von Stimulationen im AWht ist es wichtig zu erwähnen, dass in der Studie von Berden-Zrimec et al., (2007) Stimulationen im Niedrigdosisbereich, welche auf Hormesis zurückzuführen sind, sowohl im AWht als auch bei der VF auftraten.

8.4 Fazit

Sowohl die PF als auch die VF gelten als geeignet, zur Bestimmung des Zellwachstums im AWht (Eisentraeger et al., 2003; Gerhardt und Bodemer, 2001; Tümping und Friedriech, 1990). Es wurde jedoch erläutert, dass bei der Messung der PF im AWht Stimulationen gemessen werden können, welche nicht auf echtem Wachstum sondern auf Manipulation der Elektronentransportkette zurückgeführt werden können.

In dieser Arbeit wurden zwei Vorschläge erläutert, wie die VF helfen könnte Stimulation im AWht zu untersuchen, um Rückschlüsse ziehen zu können, ob eine erhöhte Intensität der PF auf echtem Wachstum beruht.

Bei der Nutzung der VF zur Untersuchung der Elektronentransportkette ist die Eigenschaft der VF entscheidend, dass sich der stimulierende Effekt, der bei der PF und der Anfangsphase der VF zu messen ist, bei der Integration der gesamten Abklingkurve der VF (beispielsweise im Zeitbereich von 0.1 bis 50 s) nicht mehr ausprägt.

Nach der in Kapitel 8.2.2 beschriebenen Methode würde Stimulation im Niedrigdosisbereich des AWhts, welche durch die PF gemessen wurde, nur dann auf echtes Wachstum schließen lassen, wenn auch die VF auf ein größeres Algenwachstum schließen lässt.

Neben dieser Anwendung zeigte sich, dass die VF für die Anwendung als Algentoxizitätstest, insbesondere zur Detektion von PSII-interagierenden Schadstoffen, geeignet ist. Dadurch können Dosis-Wirkungs-Beziehungen des AWht mit einem zweiten, schnell durchführbaren Test verglichen werden und gemessene hormetische Stimulationen verifiziert bzw. in Frage gestellt werden.

9 Zusammenfassung

Hormesis ist der in der Toxikologie verwendete Begriff zur Bezeichnung von Zwei-Phasen-Dosis-Wirkungs-Beziehungen, diese sind dadurch charakterisiert, dass bei niedrigen Konzentrationen stimulierende oder vorteilhafte Effekte und bei hohen Konzentrationen hemmende Effekte auftreten. Bis heute gibt es viel Verwirrung um den Begriff der Hormesis und deren Bedeutung für die Biologie. Die Annahme, dass das hormetische Modell allgemein gültig und damit auf alle Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Toxikologie übertragbar ist, ist bis heute noch nicht eindeutig bewiesen. Jedoch ist das Modell bis heute auch nicht widerlegt. Für eine Anwendung des hormetischen Modells in der Wissenschaft ist es nötig, eindeutige Aussagen treffen zu können, wann und wo Hormesis zu erwarten ist. Dies setzt voraus, dass hormetische Effekte eindeutig als solche identifiziert werden können. Es muss klar sein, ob Stimulationen im Niedrigdosisbereich hormetischen Ursprung haben oder nicht.

Der Algen-Wachstumshemmtest (AWht) ist ein Test, mit dem toxische Wirkungen von Schadstoffen als Einzelsubstanz oder in Abwasser und Umweltproben auf Mikroalgen getestet werden.

In zahlreichen Literaturstudien wurde über Stimulationen im AWht berichtet, welche von den Autoren auf Hormesis zurückgeführt wurden. Diese Arbeit definiert Hormesis im AWht als eine echte Stimulation des Zellwachstums, welche auf physiologisch fördernden Effekten beruht und durch Exposition gegenüber geringen Konzentrationen von Substanzen induziert wird, die bei höheren Konzentrationen hemmend wirken.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Frage, ob es sich bei den beobachteten Stimulationen tatsächlich um Hormesis handelt, oder ob andere Ursachen für die beobachteten Effekte verantwortlich sind. Zur Beantwortung dieser Frage wurden verschiedene, in der Literatur beschriebene Stimulationen im AWht genauer betrachtet. Anschließend wurde diskutiert, ob eine ungenügende Genauigkeit des Awhts, veränderte Wachstumsbedingungen oder eine Umverteilung pflanzlicher Ressourcen für die Stimulationen verantwortlich gemacht werden können.

Die diskutierten Aspekte ergaben keine Anhaltspunkte, die Anlass geben würden, die in der Literatur beobachteten Stimulationen nicht auf Hormesis zurückzuführen.

Dabei ist es wichtig anzumerken, dass die Wachstumsraten bei fast allen Studien durch Zellzählung bestimmt wurden. Diese gilt als sichere Methode zur Bestimmung von echtem Wachstum.

Zusätzlich zur Zellzählung wurde in manchen Studien das Wachstum durch die *in vitro* Fluoreszenzmessung oder die photometrische Messung der Absorption (Messung der Extinktion)

bestimmt. Auch diese können als geeignete Methoden zur Bestimmung der Wachstumsraten angesehen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Verwendung der Prompten Fluoreszenz (PF) als Wachstumsindikator im AWht genauer betrachtet. Da das Verhältnis der PF zum Chlorophyll a-Gehalt vom physiologischen Zustand der Zellen abhängt, wobei die Intensität mit der Schädigung des Photosyntheseapparates ansteigt, wurde die Frage gestellt, ob Schadstoffe im Niedrigdosisbereich zu einer verstärkten Fluoreszenzantwort führen können, ohne dass gleichzeitig das Algenwachstum signifikant verändert wird. Wenn sich das Wachstum gegenüber der Kontrolle nicht verändert, gleichzeitig aber die Intensität der PF ansteigt wird eine verstärkte Photosyntheseleistung vorgetäuscht, welche nicht auf einer größeren Wachstumsrate sondern auf einer Modifikation des Elektronentransportes beruht. Dadurch könnte Hormesis vorgetäuscht werden.

Diese Fragestellung konnte ohne konkrete Laborstudien jedoch nicht abschließend geklärt werden. Es wurde diskutiert, wie die Verzögerten Fluoreszenz (VF), dies ist das gegenüber der Anregung verzögerte Leuchten von photosynthetischem Material, in weiteren Versuchen bei der Klärung dieser Frage helfen könnte.

Die VF ist an einen funktionierenden Photosyntheseapparat gebunden. Dabei nimmt die integrierte Intensität der VF, dies ist die Fläche unter der Abklingkurve, mit zunehmender Schädigung ab.

Da sich die VF zur Bestimmung der Biomasse von Algen eignet, kann sie zur Bestimmung der Wachstumsrate im AWht verwendet werden

Es wurde gezeigt, dass mit Hilfe der VF der physiologische Zustand der Elektronentransportkette der Algen untersucht werden kann und dadurch Rückschlüsse auf die Ursache von gesteigerten Signalen der PF im AWht gezogen werden können.

Zur Untersuchung der PF im AWht müsste parallel zur Messung der PF die Abklingkurve der VF (nach der Wachstumsphase) aufgezeichnet werden. Bei der Bestimmung der Intensität der VF ist es wichtig, die gesamte Abklingkurve und nicht nur einen Teil zu integrieren, da auch die VF innerhalb der ersten hundertstel Sekunden durch Elektronenblocker wie beispielsweise Diuron (DCMU) oder Simazin (CAT) gesteigert werden kann.

Bei der Auswertung des AWhts würde eine erhöhte Intensität der PF gegenüber der Kontrolle nur dann echtes Wachstum bedeuten, wenn die integrierte Intensität der VF ebenfalls eine Steigerung zeigen würde. Ein gesteigertes Signal der PF mit einer gleichzeitigen Abnahme der VF, integriert über einen Zeitraum von 0,1 bis 0,5 Sekunden, lässt auf einen defekten physiologischen Mechanismus schließen.

Besonders deutlich lässt sich durch Betrachtung der Abklingkurve der VF, Manipulation der

Elektronentransportkette durch Herbizide, wie DCMU oder CAT erkennen, da der Kurvenverlauf gegenüber der Kontrolle innerhalb der ersten hundertstel Sekunden ansteigt, danach jedoch stark abfällt, wobei die Integration der gesamten Intensität der VF, also der gesamten Fläche unter der Abklingkurve, mit steigender Konzentration abnimmt. Dieser Kurvenverlauf beruht auf einer Blockierung des Elektronentransports zwischen Q_A und Q_B , wodurch der Elektronenfluss um das PS II, in den ersten hundertstel Sekunden, erhöht wird.

Es zeigte sich, dass die VF geeignet ist, um erhöhte Intensitäten der PF im AWht auf echtes Wachstum und damit Hormesis oder auf Schädigung des physiologischen Mechanismus zurückzuführen.

Als zweite Möglichkeit ist es denkbar, die VF als Toxizitätstest anzuwenden. Die Methode dieses Tests unterscheidet sich grundlegend vom AWht. Die Zeit, die für diesen Test benötigt wird, ist hauptsächlich von der Expositionszeit der Algen gegenüber den Substanzen abhängig. Diese variierte in den betrachteten Studien von 30 Minuten bis zu 24 h.

Die Dosis-Wirkungs-Beziehungen, welche man durch diesen Test erhält sind mit denen des AWhts vergleichbar. Dadurch können Stimulationen im Niedrigdosisbereich des AWht mit einem zweiten, unabhängigen und schnell durchführbaren Test verglichen werden.

Mit dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die in der Literatur häufig beobachteten Stimulationen im AWht, welche durch Zellzählung, *in vitro* Fluoreszenzmessung oder photometrischen Messung der Absorption ermittelt wurden, auf Hormesis zurück geführt werden können. Allerdings müsste in weiteren Studien und dem direkten Vergleich mit VF-Messungen geklärt werden, ob und wann durch die Messung der PF, Stimulationen im AWht nur vorgetäuscht werden.

Abkürzungsverzeichnisverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
AWht	Algen-Wachstumshemmtest
C_{max}	maximale hormetische Stimulation
CAT	Simazin
DFI ₁	Intensität der VF im Zeitbereich von 0,1 – 0,5 s
DFI ₂	Intensität der VF im Zeitbereich von 0,5 s – 50
DCMU	Diuron
E_rC_x	Konzentration der Untersuchungsprobe, bei der die x-%-Hemmung der Wachstumsrate bezogen auf den Kontrollanstaz gemessen wird
HAW	Hochschule für Angewandte Wissenschaften in Hamburg
NO(A)EL	no observed adverse effect level (Die maximale Konzentration, bei der noch kein schädigender Effekt gemessen wurde)
PF	Prompte Fluoreszenz
P680	Photosynthesereaktionszentrum-II im nicht-angeregten Zustand
P680*	angeregtes Photosynthesereaktionszentrum-II
PS II	Photosystem II
SOP	Standard Operation Procedures
VF	Verzögerte Fluoreszenz
ZEP	zero equivalent point (Konzentration, an der die Wirkungskurve die Kontrolle schneidet)

Literaturverzeichnis

Berden-Zrimec, M., Drinovec, L., Zrimec, A., & Tišler, T. (2007). Delayed fluorescence in algal growth inhibition tests. *Central European Journal of Biology*, 2(2), 169–181.

Brain, P., & Cousens, R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29(2), 93–96.

Buchwald, F., Lüdmann, M., & Lüdmann, D. (n.d.). Ilearning Statistik.
<http://paux.com/w/statistik/s.66-standardabweichung-streuung>.

Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2002). Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology*, 21(2), 91–97.

Calabrese, Edward J. (2002). Hormesis: changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 511(3), 181–189.

Calabrese, Edward J., & Baldwin, L. A. (2003). Hormesis: the dose-response revolution. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 43, 175–197.

Calabrese, Edward J., & Blain, R. (2005). The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. *Toxicology and applied pharmacology*, 202(3), 289–301.

Calabrese, Edward J. (2005). Paradigm lost, paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environmental Pollution*, 138(3), 378–411.

Calabrese, Edward J. (2008). Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(7), 1451–1474.

Calabrese, Edward J., & Baldwin, L. A. (1997). The Dose Determines the Stimulation (and Poison): Development of A Chemical Hormesis Database. *International Journal of Toxicology*, 16(6), 545–559.

Calabrese, Edward J., & Baldwin, L. A. (2001). The Frequency of U-Shaped Dose Responses in the Toxicological Literature. *Toxicological Sciences*, 62(2), 330–338.

Calabrese, Edward J., & Blain, R. B. (2009). Hormesis and plant biology. *Environmental Pollution*, 157(1), 42–48.

Campbell, N. A., & Reece, J. B. ([20]10). *Biologie*.

Cedergreen, N., Streibig, J. C., Kudsk, P., Mathiassen, S. K., & Duke, S. O. (2007). The occurrence of hormesis in plants and algae. *Dose-response*, 5(2), 150–162.

Cedergreen, Nina, Kamper, A., & Streibig, J. C. (2006). Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants. *Aquatic Toxicology*, 78(3), 243–252.

DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (2004). DIN EN ISO 8692:2004. Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae.

Dorgerloh, M. (1997). Labor-Algentest: Bedeutung der toxikologischen Endpunkte. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, 9(4), 222–224.

Douglas, H. (2008). Science, hormesis and regulation. *Human & experimental toxicology*, 27(8), 603–607.

Drinovec, L., Drobne, D., Jerman, I., & Zrimec, A. (2004). Delayed Fluorescence of *Lemna minor*: A Biomarker of the Effects of Copper, Cadmium, and Zinc. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(5), 896–902.

Eisentraeger, A., Dott, W., Klein, J., & Hahn, S. (2003). Comparative studies on algal toxicity testing using fluorometric microplate and Erlenmeyer flask growth-inhibition assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54(3), 346–354.

Gabler. (n.d.). Gabler Wirtschaftslexikon. <http://wirtschaftslexikon.gabler.de>.

Gerhardt, V., & Bodemer, U. (2001). Delayed Fluorescence: An in vivo method for electron transport studies and on-line applications in limnology.

Goltsev, V., Zaharieva, I., Chernev, P., & Strasser, R. (2009). Delayed fluorescence in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 101(2), 217–232.

International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. (1989). ISO 8692, 1989. Water Quality—Freshwater Algal Growth Inhibition Test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.

Jörg Oehlmann. (2006). Nicht-monotone Dosis- Wirkungsbeziehungen: Ein Paradigmenwechsel in der Ökotoxikologie?

Kamaya, Y., Tsuboi, S., Takada, T., & Suzuki, K. (2006). Growth Stimulation and Inhibition Effects of 4-Hydroxybenzoic Acid and Some Related Compounds on the Freshwater Green Alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(4), 537–541.

Katsumata, M., Koike, T., Kazumura, K., Takeuchi, A., & Sugaya, Y. (2009). Utility of Delayed Fluorescence as Endpoint for Rapid Estimation of Effect Concentration on the Green Alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(4), 484–487.

Katsumata, M., Koike, T., Nishikawa, M., Kazumura, K., & Tsuchiya, H. (2006). Rapid ecotoxicological bioassay using delayed fluorescence in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Water Research*, 40(18), 3393–3400.

Kruspe, R. (2012). Ökotoxikologische Analysen. *IDUS Biologisch Analytisches Umweltlabor GmbH*.

Kühle, H. (2009, 2010). *Vorlesung Messtechnik für UT und MT*. Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg.

Lambrev, P., & Goltsev, D. V. (2004). Delayed Fluorescence as a Screening Tool. http://www.bio21.bas.bg/ibf/lambrev/df/theory_df.htm.

Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 1–7.

Mayer, P., Cuhel, R., & Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 31(10), 2525–2531.

Millington, L. A., Goulding, K. H., & Adams, N. (1988). The influence of growth medium composition on the toxicity of chemicals to algae. *Water Research*, 22(12), 1593–1597.

OECD. (1996). Alga, growth inhibition test. OECD Guideline for testing of chemicals.

Oehlmann, Jörg. (n.d.). *Nicht-monotone Dosis- Wirkungsbeziehungen: Ein Paradigmenwechsel in der Ökotoxikologie?* Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Fachbereich Biowissenschaften, Institut für Ökologie, Evolution und Diversität.

Rozman, K. K. (2005). Hormesis and risk assessment. *Human & Experimental Toxicology*, 24(5), 255–257.

Slovacek, R. E., & Hannan, P. J. (1977). In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll a. *Limnology and Oceanography*, 22(5), 919–925.

Stebbing, A. R. D. (1982). Hormesis — The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of The Total Environment*, 22(3), 213–234.

Taiz, L., & Zeiger, E. (1999). *Physiologie der Pflanzen* (1st ed.).

Tümping, W. von, & Friedrich, G. (1999). *Methoden der biologischen Wasseruntersuchung, Bd.2, Biologische Gewässeruntersuchung* (1st ed.). Spektrum Akademischer Verlag.

Wacker, C. D. (2009). *Vorlesung Umwelttoxikologie*. Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg

Wong, P. K. (2000). Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere*, 41(1-2), 177–182.

Wong, P. K., & Chang, L. (1988). The effects of 2,4-D herbicide and organophosphorus insecticides on growth, photosynthesis, and chlorophyll a synthesis of *Chlamydomonas reinhardtii* (mt +). *Environmental Pollution*, 55(3), 179–189.

Zalizniak, L. (2006). *The effects of selected agricultural chemicals on freshwater microalgae and cladocerans in laboratory studies, with particular emphasis on hormesis*. School of Applied Sciences.