

Wannous, Gifar

Vom Fachbereich VI
Geographie/Geowissenschaften
der Universität Trier
zur Verleihung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation

***Caenorhabditis elegans - Testsysteme für
Freiland und Labor***

Betreuender und Berichterstatter:
Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Paul Müller
Prof. Dr. Christoph Emmerling

Berichterstatter:
Prof. Dr. Thomas Schmitt

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 6. Juli 2010
Erscheinungsort und -jahr: Trier, 2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Ziele der Arbeit	2
2 Kenntnisstand über <i>C. elegans</i> und seine Freilandökologie.....	4
2.1 Übersicht über das Genus <i>Rhabditis</i>	4
2.2 Untergattung <i>CAENORHABDITIS</i> (6 Arten): (Osche 1952)	5
2.3 Bildungsabweichungen als „Realmutationen“ bei <i>Caenorhabditis</i> zur Erklärung des Evolutionsgeschehens	9
2.4 Zur Biologie der monophyletischen Untergattung <i>Caenorhabditis</i>	9
2.5 <i>C. elegans</i> von Erstbeschreibung bis zum Top-Modell.....	11
Systematik	11
Lebenszyklus	12
Anatomie.....	14
2.6 Habitaten von <i>C. elegans</i>	18
3 <i>C. elegans</i> als Modellsysteme im Labor.....	22
3.1 Materialien	23
Testorganismus	23
Chemikalien und Reagenzien	23
Lösungen	25
Verbrauchsmaterialien	28
Geräte	29
3.2 Methoden.....	31
3.2.1 <i>C. elegans</i> Kultur	31
3.2.2 Methoden der Etablierung des Testsystems zur fluorimetrischen Detektion der umweltbedingten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	34
3.2.3 Methoden der Etablierung und Bewertung von Biotests zur akuten Toxizität, Reproduktions- und Wachstumstoxizität mit dem Modellorganismus <i>C.</i> <i>elegans</i> am Beispiel der Toxine Acrylamid, Benzo(a)pyren, Kupfer(II)chlorid und Ethylmethansulfonat.....	49
3.2.4 Methoden zur Wirkung von Atrazin auf die Entwicklung von <i>Caenorhabditis</i> <i>elegans</i>	65
3.3 Ergebnisse.....	69
3.3.1 Ergebnisse der Etablierung des Testsystems zur fluorimetrischen Detektion der umweltbedingten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	69
3.3.2 Ergebnisse der Etablierung und Bewertung von Biotests zur akuten Toxizität, Reproduktions- und Wachstumstoxizität mit dem Modellorganismus <i>C. elegans</i> am Beispiel der Toxine Acrylamid, Benzo(a)pyren, Kupfer(II)chlorid und Ethylmethansulfonat	84
3.3.3 Ergebnisse zur Wirkung von Atrazin auf die Entwicklung von <i>Caenorhabditis elegans</i>	111

3.4	Diskussion	116
3.4.1	Diskussion der Etablierung eines Testsystems zur fluorimetrischen Detektion der umweltbedingten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).....	116
3.4.2	Diskussion der Etablierung und Bewertung von Biotests zur akuten Toxizität, Reproduktions- und Wachstumstoxizität mit dem Modellorganismus <i>C. elegans</i> am Beispiel der Toxine Acrylamid, Benzo(a)pyren, Kupfer(II)chlorid und Ethylmethansulfonat.....	138
3.4.3	Diskussion Zur Wirkung von Atrazin auf die Entwicklung von <i>Caenorhabditis elegans</i>	155
4	Zusammenfassung.....	158
	Literatur	162
	Anhang	A1

Abkürzungsverzeichnis

(+)-anti-BPDE	(+)-anti-BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-oxid
[Cu]	Kupfer(II)-Konzentration
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µg/cm ²	Mikrogramm/Quadratcentimeter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol/l	Mikromol/Liter
2p _x *	antibindendes p-Orbital auf dem zweiten Energieniveau
8-OH-Gua	8-hydroxyguanin
A	Adenin
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
AB, E, MS,C, D	Ursomazellen des <i>C. elegans</i> Embryos
Abb.	Abbildung
age-1	engl.: ageing alteration, <i>C. elegans</i> Gen, kodiert für Phosphoinositid-3-kinase
Ah	Arylhydrocarbon
AHR	Aryl-Hydrocarbon Rezeptoren
AKR	Aldoketoreduktase
AL	Lactat
Aqua deion.	deionisiertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARNT	AHR nuclear transporter
ATP	Adenosintriphosphat
autokl.	autoklaviert
B	Blindwert
B[a]P	Benz[a]pyren
BCNU	Bis-Chlorethyl-Nitrosourea (Handelsname: Carmustin)
BHT	Butylhydroxytoluen
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CaCl ₂	Kalziumchlorid
Cd(II)	Cadmiumdichlorid
CdCl ₂	Cadmiumdichlorid
cDNA	engl.: complementary DNA
cGy	Gray
ChemG	Chemikaliengesetz
ced	engl.:cell death abnormal, <i>C. elegans</i> Gen
clk-1	engl.: Clock (biological timing) abnormality, <i>C. elegans</i> Gen, des für ein Ubichinon-Biosyntheseprotein kodiert
Co Q oder UQ	Coenzym Q = Ubichinon
Cu ²⁺	Kupfer(II)-Ion
CuCl ₂	Kupfer(II)chlorid
CV	Variationskoeffizient
Cycl.	Cyclophosphamid

CYP	Cytochrom P450
d	Tag, Tage
daf-1	engl.: abnormal dauer formation, <i>C. elegans</i> Gen, kodiert für den Zelloberflächenrezeptor daf-1
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCF	Dichlorofluorescein
DCFH	Dichlorofluorescein
DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat
deion.	deionisiert
DETCA	Diethyldithiocarbamatsäure
DHR123	Dihydrorhodamin 123
DIN	Deutsche Industrie Norm
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO2	Dimethylsulfon
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DQ12	Dörentruer Quarzstaub
dsDNA	Doppelstrang-DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E°	Redoxpotential
EC50	engl.: effect concentration; Konzentration der Testsubstanz, die bei 50% der Testorganismen zur Wirkung führt.
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
egl-1	engl.: egg laying defect, <i>C. elegans</i> Gen
Egg-Prep	engl.: Egg-Preparation, bedeutet Präparation der Eier aus den Nematoden
EMS	Ethylmethansulfonat
Exp.	Experiment
Fa32	Hepatomzellen der Ratte
FACS	engl.: Fluorescence Activated Cell Sorting =, Durchflusszytometrie
FADH ₂	reduzierte Form des Flavin-Adenin-Dinukleotid
FapyGua	2, 6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine
G	Guanin
GFP	engl.: green fluorescent protein
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
h	Stunde, Stunden
HepG2	Zelllinie: humane (metabolisch kompetente) Hepatomzellen
HeLa-Zellen	menschliche Epithelzellen eines Gebärmutterhalskrebses
HL60	Zelllinie: humane promyelotische Zellen
HNE	Hydroxynonenal
HRP	engl.: horseradish peroxidase = Meerrettichperoxidase
hsp-16	Gen, das für Hitzeschockprotein 16 kodiert
IGF-1	engl.: insulin like growth factor
isp-1	<i>C. elegans</i> Gen, das für ein Eisen-Schwefel-Protein in der Atmungskette kodiert
KAT	Katalase
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat

L1, L2, L3, L4	Larvenstadien von <i>C. elegans</i>
lacZ	Gen, das für beta-Galactosidase kodiert
LB-Medium	engl.: Luria broth - Medium
LC 50	mittlere letale Konzentration (Konzentration der Testsubstanz, bei der 50 % der Testorganismen im akuten Test sterben)
LD 50	mittlere letale Dosis (Dosis der Testsubstanz, bei der 50% der Testorganismen im akuten Test sterben)
LH	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
LOAEL	engl.: lowest observed adverse effect level
LOEC	engl.: lowest observed effect concentration
Log10	zehnter Logarithmus
LOO.	Peroxyradikal
LOOH	Lipidhydroperoxid
M	molar 1 mol/l
Mb	Megabase, entspricht 1 Mio. Basenpaaren
MD	Menadion
MDA	Malondialdehyd
mDNA	mitochondriale DNA
Me	Metall
mev-1	engl.: abnormal methyl viologen sensitivity, <i>C. elegans</i> Genkomplex kodiert u.a. Succinate Dehydrogenase
mg/l	Milligramm/Liter
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute, Minuten
Mio.	Million, 10 ⁶
mM	millimolar
mmol/l	Millimol/Liter
mol	mol
mol/l	Mol/Liter
MRE	Metall response element
mRNA	engl.: messenger RNA
MT	Metallothionein
MTF	Metalltranskriptionsfaktor
MW oder xq	Mittelwert
N	Stickstoff
n	Wertigkeit
n.d.	nicht definiert, Berechnung nicht möglich oder unzulässig
NADH	reduzierte Form des NADP ⁺ /Nicotinamid-adeninucleotid
NADPH	reduzierte Form des NADP ⁺ /Nicotinamid-adeninucleotid-Phosphat
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
ng	Nanogramm
NG	Nachweisgrenze
NGM	engl.: nematode growth medium
nm	Nanometer
nmol/l	Nanomol/Liter
NOAEL	engl.: no observed adverse effect level
NOEC	engl.: no observed effect concentration

NQO	4-Nitroquinoline-N-Oxid
O ₂ ⁻	Superoxidradikalanion
OD	engl.: optical density = Optische Dicke
OECD	engl.: Organisation for Economic Co-operation and Development
OH [·]	Hydroxylradikal
OP50	E. coli-Stamm mit Uracil-Auxotrophie
P	Urkeimzelle des <i>C. elegans</i> Embryos
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBMC	engl: peripheral blood mononuclear cells periphäre, bedeutet: mononukleare Blutzellen
PC12	Zelllinie: Phäochromocytom der Ratte
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCDD	Polychlorierte Dibenzodioxine
PG	Prüfgröße
pH-Wert	lat.: pondus Hydrogenii, ist definiert über den negativen Zehner-logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
PK	Proteinase K
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
ppb	engl.: parts per billion, 1/10 ⁹ (z. B. µg/kg)
ppm	engl.: parts per million, 1/10 ⁶ (z. B. mg/kg)
PVNO	Polyvinylpyridine-N-Oxid
R, Rh	Rhabditis
R ²	Bestimmtheitsmaß
rel. FI	relative Fluoreszenzintensität
RH123	Rhodamin 123
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	engl.: reactive oxygen species = reaktive Sauerstoffspezies
rpm	engl.: rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SD, STABW	engl.: standard deviation = Standardabweichung
SO	Styrol-Oxid
SOD	Superoxiddismutase
ssDNA	Einzelstrang-DNA
SSF(s)	Strand Scission Factor(s)
SSF(s)*(-1)	Strand Scission Factor(s) mit (-1) multipliziert
SSU rDNA	engl.: small subunit ribosomal DNA
T	Thymin
t _{exl}	Ergebnisse von t-Tests durchgeführt mit dem Softwareprogramm MS Excel
t _{weir}	Ergebnisse von t-Tests durchgeführt nach der Weir-Methode
TBARS	engl.: thiobarbituric acid reactive substances
TiO ₂	Titandioxid
TS	Trockensubstanz
U	engl.: Unit = Einheit
u.a.	unter anderem
UV	UV Ultraviolett, Wellenlänge λ =380 bis 10 nm
UVA	Ultraviolette Strahlung der Wellenlänge 315-380
UVB	Ultraviolette Strahlung der Wellenlänge 280-315
V	Volt
WFR	Wiederfindungsrate

WGK	Wassergefährdungsklasse
X.	freies Radikal
XPF	Xeroderma pigmentosum-Gruppe von Genen
λ	Lambda

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: phylogenetischer Baum von Rhabditis durch DAN Analysen (SSU, LSU rRNA und RNA polymerase II) (nach Blaxter et al., 1998; Fitch & Thomas, 1997).....	5
Abb. 2: stellt die morphologische Merkmale von den Nematoden dar. (nach Sudhaus, W 1976)	6
Abb.3: Cladogramm von <i>Caenorhabditis</i> (ohne <i>R. avicola</i> , <i>R. craspedocerca</i> , und <i>R. genitalis</i>).....	8
Abb. 4: Phylogenetischer Baum von <i>Caenorhabditis</i> Arten (Kiontke et al., 2004).....	8
Abb. 5: Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> bei 25 °C (Blaxter 2003)	13
Abbi. 6: Darstellung der Anatomie eines hermaphroditischen <i>C. elegans</i> (Sitabhra 2004)	15
Abb. 7: Schematische Darstellung eines <i>C. elegans</i> -Männchens (Hupfeld 2002)	16
Abb. 8: Herkunft der bisher nachgewiesenen <i>C. elegans</i> Wilde-Populationen.....	18
Abb. 9: <i>Helix aspersa</i> (Caswell-Chen et al., 2005)	20
Abb. 10: Bestimmung der einzusetzenden Individuenzahl.....	69
Abb. 11: Bestimmung der notwendigen Waschschrte (1).....	70
Abb. 12: Bestimmung der notwendigen Waschschrte (2).....	70
Abb. 13: Einfluss der Anwesenheit einer Nahrungsquelle während der Inkubation von DHR123.....	71
Abb. 14: Einfluss der Anwesenheit einer Nahrungsquelle während der Inkubation von Kupfer(II)	71
Abb. 15: Kupfer(II)-Verdünnungsreihe mit und ohne Zugabe von Bakterien.....	72
Abb. 16: Messung der Kupfer(II)-Verdünnungsreihe zur Etablierung des Testsystems	72
Abb. 17: Kalibrierfunktion der Testmethode.....	73
Abb. 18: Fluoreszenzmikroskopie.....	76
Abb. 19: Ergebnisse des Tests auf akute Toxizität von DHR123 auf <i>C. elegans</i>	77
Abb. 20: Kupferaufnahme in [%]	79
Abb. 21: Kupfergehalte der Testlösungen.....	80
Abb. 22: Kalibriergerade des Lipidperoxidationstests	80

Abb. 23: MDA-Konzentrationen.....	81
Abb. 24: Wellenlängenscan von 400 bis 600 nm	81
Abb. 25: Wellenlängenscan: Ausschnitt von 550 bis 650 nm	82
Abb. 26: Graphische Darstellung der Messergebnisse nach Vorinkubation mit Vitamin C	83
Abb. 27: Letalität durch DMSO in den flüssigen Medien Eggbuffer, K- und S- Medium	84
Abb. 28: Probitanalyse der Ergebnisse der Test auf akute Toxizität vom DMSO in Egg-Buffer, K- und S-Medium	84
Abb. 29: Letalität durch Acrylamid in K-Medium	88
Abb. 30: Probitanalyse der Ergebnisse der Tests auf akute Toxizität nach 24 h.....	88
Abb. 31: Letalität durch Benzo(a)pyren (4 % DMSO) in autoklaviertem Wasser.....	89
Abb. 32: Probitanalyse der Ergebnisse der Tests auf akute Toxizität nach 24 h mit Benzo(a)pyren (4 % DMSO) in autoklaviertem Wasser.....	89
Abb. 33: Letalität durch Kupfer(II)chlorid in K-Medium.....	90
Abb. 34: Probitanalyse der Ergebnisse der Tests auf akute Toxizität nach 24 h mit Kupfer(II)chlorid in K-Medium.....	91
Abb. 35: Letalität durch Ethylmethansulfonat in K-Medium.....	92
Abb. 36: Probitanalyse der Ergebnisse der Tests auf akute Toxizität nach 24 h mit Ethylmethansulfonat in K-Medium.....	92
Abb. 37: Reproduktionshemmung durch Acrylamid (1 % DMSO) in NGM-Agar	93
Abb. 38: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Reproduktionstests mit Acrylamid (1 % DMSO) in NGM-Agar	94
Abb. 39: Reproduktionshemmung durch Benzo(a)pyren (1 % DMSO) in NGM-Agar...	94
Abb. 40: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Reproduktionstests mit Benzo(a)pyren (1 % DMSO) in NGM-Agar	95
Abb. 41: Reproduktionshemmung durch Kupfer(II)chlorid (1 % DMSO) in NGM-Agar	95
Abb. 42: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Reproduktionstests mit Kupfer(II)chlorid (1 % DMSO) in NMG-Agar	96
Abb. 43: Reproduktionshemmung durch Ethylmethansulfonat (1 % DMSO) in NGM- Agar	97
Abb. 44: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Reproduktionstests mit Ethylmethansulfonat (1 % DMSO) in NGM-Agar	97
Abb. 45: Reproduktionshemmung durch Acrylamid in K-Medium.....	98

Abb. 46: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Reproduktionstests mit Acrylamid in K-Medium	98
Abb. 47: Reproduktionshemmung durch Benzo(a)pyren (0,5 % DMSO) in autoklaviertem Wasser	99
Abb. 48: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Reproduktionstests mit Benzo(a)pyren (0,5 % DMSO) in autoklaviertem Wasser	100
Abb. 49: Reproduktionshemmung durch Kupfer(II)chlorid in K-Medium	100
Abb. 50: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Reproduktionstests mit Kupfer(II)chlorid in K-Medium.....	101
Abb. 51: Reproduktionshemmung durch Ethylmethansulfonat in K-Medium	102
Abb. 52: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Reproduktionstests mit Ethylmethansulfonat in K-Medium	102
Abb. 53: Wachstumshemmung durch Acrylamid (1 % DMSO) in NGM-Agar	103
Abb. 54: Wachstumshemmung durch Benzo(a)pyren (1 % DMSO) in NGM-Agar	104
Abb. 55: Wachstumshemmung durch Kupfer(II)chlorid in (1 % DMSO) NGM-Agar ...	105
Abb. 56: Wachstumshemmung durch Ethylmethansulfonat (1 % DMSO) in NGM-Agar	106
Abb. 57: Wachstumshemmung durch Acrylamid in K-Medium.....	107
Abb. 58: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Wachstumstests mit Acrylamid in K-Medium	107
Abb. 59: Wachstumshemmung durch Benzo(a)pyren (0,5 % DMSO) in autoklaviertem Wasser	108
Abb. 60: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Wachstumstests mit Benzo(a)pyren (0,5 % DMSO) in autoklaviertem Wasser.....	109
Abb. 61: Wachstumshemmung durch Kupfer(II)chlorid in K-Medium.....	109
Abb. 62: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Wachstumstests mit Kupfer(II)chlorid in K-Medium	110
Abb. 63: Wachstumshemmung durch Ethylmethansulfonat in K-Medium	110
Abb. 64: : Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Wachstumstests mit Ethylmethansulfonat in K-Medium.....	111
Abb. 65: stellt die Wachstumshemmung in Körperbreite von <i>C. elegans</i> in Abhängigkeit von der Atrazin-Konzentration in Flüssigmedium M9 dar.	112
Abb. 66: stellt die Wachstumshemmung in Körperläng von <i>C. elegans</i> in Abhängigkeit von der Atrazin-Konzentration in Flüssigen Medium M9 dar...	112

Abb. 67: Stellt den Unterschied der Wachstumshemmung von Atrazin in Flüssigmedium auf die Körperlänge und Körperbreite von <i>C. elegans</i> dar...	113
Abb. 68: Stellt die Wachstumshemmung in Körperbreite von <i>C. elegans</i> in Abhängigkeit von der Atrazin-Konzentration im Boden dar.	113
Abb. 69: Stellt die Wachstumshemmung in Körperlänge von <i>C. elegans</i> in Abhängigkeit von der Atrazin-Konzentration im Boden dar.	114
Abb. 70: Stellt den Unterschied der Wachstumshemmung von Atrazin im Boden auf die Körperlänge und Körperbreite von <i>C. elegans</i> dar.	114
Abb. 71: stellt die Reproduktionshemmung von <i>C. elegans</i> in Abhängigkeit von der Atrazin-konzentration im Boden dar.	115

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Habitat, Partnertiere, derzeit bekannte geographische Verteilung und Reproduktionsbiologie der bekannten <i>Caenorhabditis</i> Arten (nach W. Sudhaus, & K. Kiontke 2006).....	19
Tab.2: Habitate von 65 Wildisolationen von <i>C.elegans</i> (CGC) nach Angaben von: W. Sudhaus, & K. Kiontke (2006).....	21
Tab. 3: Eigenschaft von dem Standardboden LUFA Type 2.2	24
Tab. 4: Zusammenstellung der für die ROS-Messung mit DHR ausgearbeiteten Pipettiervorschrift	38
Tab. 5: Versuchsanordnung zum Test auf akute Toxizität von DHR123	44
Tab. 6: Versuchsanordnung zur ROS-Messung mit DHR nach Vorinkubation mit Vitamin C.	48
Tab. 7: Zusammenstellung der für die Bestimmung des am besten geeigneten Mediums ausgearbeiteten. K = Bezeichnung der Konzentration des Testansatzes	50
Tab. 8: Zusammenstellung der zur Bestimmung der am besten geeigneten Lösungsmittelkonzentration ausgearbeiteten Pipettiervorschrift. K = Bezeichnung der Konzentration des Testansatzes	51
Tab. 9: Zusammenstellung der Pipettiervorschrift für die Tests der akuten Toxizität von Acrylamid in flüssigem Medium.....	53
Tab. 10: Zusammenstellung der Pipettiervorschrift für Versuch 1 zu den Tests der akuten Toxizität von Benzo(a)pyren in flüssigem Medium	56
Tab. 11:Zusammenstellung der Pipettiervorschrift für Versuch 2 zu den Tests der akuten Toxizität von Benzo(a)pyren in flüssigem Medium	56
Tab. 12:Zusammenstellung der Pipettiervorschrift für Versuch 3 zu den Tests der akuten Toxizität von Benzo(a)pyren in flüssigem Medium	57
Tab. 13:Zusammenstellung der Pipettiervorschrift für Versuch 4 zu den Tests der akuten Toxizität von Benzo(a)pyren in flüssigem Medium	57
Tab. 14:Zusammenstellung der Pipettiervorschrift für die Tests der akuten Toxizität von Benzo(a)pyren in flüssigem Medium	58
Tab.15: Zusammenstellung der für die Messung der Reproduktionstoxizität ausgearbeiteten Pipettiervorschrift für das zu erstellende Festmedium.....	59

Tab.16: Zusammenstellung der für die Messung der Reproduktionstoxizität ausgearbeiteten Pipettiervorschrift für Tests in Flüssigmedium.....	62
Tab. 17: Stellt den Ansatz des Atrazin-Tests im flüssigen Medium dar	66
Tab. 18: beschreibt den Aufbau des Atrazin-Tests im Boden.....	67
Tab. 19: Stellt die Dichte von Ludox mit den entsprechenden Konzentrationen dar. 68	
Tab. 20: Wiederholgenauigkeit der Methode	74
Tab. 21:Zusammenstellung der Hilfsgrößen zur Berechnung der Nachweisgrenze . 75	
Tab. 22: Fluoreszenzsignalwerte von Negativkontrollen unterschiedlicher Zusammensetzung	76
Tab. 23: Messergebnisse des akuten Toxizitätstests von DHR123.....	77
Tab. 24: Kupferaufnahme durch den Testorganismus.....	78
Tab. 25: Vergleich der gemessenen und eingesetzten absoluten Kupfergehalte	79
Tab. 26: Messergebnisse der ROS-Messung nach Vorinkubation mit Vitamin C	83
Tab. 27: Ergebnisse der Tests auf akute Toxizität mit DMSO	85
Tab. 28: 95 %-Vertrauensbereiche für die LC50-Werte der Akutttests mit DMSO	85
Tab. 29: Verhältnisse der letalen zu den subletalen Endpunkten (Quotienten LC50/EC50)	144
Tab. 30: Verhältnisse der EC50-Werte subletaler Endpunkte	145
Tab. 31: Verhältnisse der LOEC-Werte subletaler Endpunkte	145
Tab. 32: Reihenfolgen der Empfindlichkeiten (LC- bzw. EC50-Werte) bezogen auf molare Einheiten	146
Tab. 33: Steigungen der Konzentrations-Wirkungsbeziehunge.....	146
Tab. 34: EC-Werte von Atrazin in flüssigen Medium auf die Nematoden <i>C. elegans</i> nach 72 h.	157
Tab. 35: EC-Werte von Atrazin im Boden auf die Nematoden <i>C. elegans</i> nach 72 h.	157

1 Einleitung

Biologen und andere Naturwissenschaftler entdecken auch heute noch Ideal-Modelle um biologische Prozesse sichtbarer zu machen (Maher 2009). Dabei werden sie jedoch häufig von "spektakulären Arten" inspiriert. Die Entdeckung von Top-Modellen verläuft jedoch in der Praxis meist völlig anders. Das lässt sich beispielhaft an *Caenorhabditis elegans* darstellen, dessen "wissenschaftliche Karriere" vielen Forschern, die sich heute mit dieser Art beschäftigen meist nicht bekannt ist. Die Aufklärung der biologischen Informationen, die letztlich nur einen mühevollen Detailweg darstellten, steht deshalb zum Anfang dieser Dissertation, auch um deutlich zu machen, welche Grundkenntnisse notwendig sind, bevor ein Top-Modell geboren werden kann.

Natürlich wurden bereits vor Jahrzehnten aus oftmals sehr praktischen Gründen "Modellorganismen" ausgewählt um Physiologische Prozesse oder Wirkmechanismen besser zu verstehen. Das gilt z.B. für die Maus (*Mus musculus*), Taufliegen (u.a. *Drosophila melanogaster*), Nematoden (*Caenorhabditis elegans*), den Zebrafisch (*Danio rerio*), Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) oder das Huhn (*Gallus gallus*). Im Jahr 2008 beschäftigten sich über 50000 Artikel mit dem Modellsystem "Maus" und mehr als 6000 Artikel mit der *Drosophila*.

Spätestens seit der Aufklärung der systematischen Stellung von *C. elegans* (Osche 1952), und seiner Karriere als exzellentes Labortier (S. Brenner 1974), traten Fragen zu seiner Herkunft, Systematik und Freilandökologie in den Hintergrund, was mir auch bestätigt wurde durch Nematoden-Spezialisten (u.a. Dr. Sturhan, Münster), und Bodenbiologen (u.a. Prof. Dr. Emmerling, Trier).

Caenorhabditis elegans ist eine von vielen Wissenschaftlern als Modellsysteme, benutzte Spezies, deren Freilandökologie jedoch bis heute weitgehend unbekannt ist.

Deshalb galten meine Bemühungen auch der Aufklärung der Freilandökologie dieses Nematoden. Von einer anderen Nematodenart (*Pristionchus pacificus*), die ebenfalls als Labor-Modell Karriere machte, (Sommer et al. 2001), war bekannt, dass er u.a. in den Mägen von *Coleopteren* erstmals gefunden wurde.

Während *C. elegans* in vielen Labors der Welt (Baumeister lab, Freiburg Universität, Feree Lab, Oregons Universität und Félix Lab, Institut Jacques Monod, Paris.usw.) als Top-Modell eingesetzt wird, wissen wir über seine Ökologie und seine Einsatzmöglichkeiten als Bioindikator zur Charakterisierung bestimmter Umwelt

zustände noch relativ wenig. Deshalb beschäftigt sich die Dissertation mit der Freilandökologie und der Entwicklung von Biotestverfahren für die Ökotoxikologie.

Im Chemikaliengesetz wird ein Testprogramm aus einer Reihe von toxikologischen Einzelspezies-tests an Organismen aus verschiedenen Trophieebenen aquatischer und terrestrischer Ökosysteme vorgeschrieben. Diese Tests basieren auf OECD-Richtlinien zum Test von Chemikalien oder DIN-Normen. Hierin wurden vielfältige Methoden der Erhebung von Toxizitätspotentialen im Labor entwickelt, um verschiedene Wirkungen (u. a. letale, morphologische und die Fruchtbarkeit schädigende) und Endpunkte (z. B. LC50, EC50, LOAEL, NOAEL) an unterschiedlichen Testorganismen und -organismengruppen (terrestrisch oder aquatisch), verschiedenen Entwicklungsstadien (ganze Lebenszyklen oder empfindliche Frühstadien), nach unterschiedlichen Expositionszeiten (akut, subakut, subchronisch oder chronisch) zu prüfen (Paulus 1998).

Das hier entwickelte Testsystem mit dem Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* untersucht den biochemischen Parameter ROS-Bildung als subletalen Effekt von Substanzen oder Umweltproben nach einmaliger Exposition.

Außerdem wurden neben letalen auch fortpflanzungs- und wachstumshemmende Wirkungen verschiedener Schadstoffe auf *C. elegans* untersucht, welcher als Bewohner sowohl des Boden- als auch des Sedimentporenwassers als Repräsentant aquatischer und terrestrischer Systeme auftritt, so dass Rückschlüsse auf deren Belastung möglich werden (Traunspurger. 1995).

1.1 Ziele der Arbeit

Die Ziele der vorliegenden Arbeit sind:

- Die Freilandökologie von *Caenorhabditis elegans* entdecken, nachdem er weltweit sowohl im Boden als auch auf/in Wirtstiere (u.a. Gastropoden, Pilzkompost ...usw.) nachgewiesen wurde, und sich in vielen Laboren weltweit großer Beliebtheit erfreute.
- Etablierung einige Ökotoxikologische Testsysteme zur Untersuchung der Wirkung von Schadstoffen im subletalen Konzentrationsbereich mit *C. elegans* als Modellorganismus. Dabei soll die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) infolge einer Schadstoffexposition als Summenparameter zur Einschätzung des Toxizitätspotentials einer Substanz oder einer Umweltprobe dienen.

- Einsetzbarkeit klassischer ökotoxikologischer Tests mit dem Modellorganismus *C. elegans* zur Beurteilung toxischer Potentiale von (AcL, BaP, EMS und Atrazin) bewertet werden. AcL, BaP und EMS sind bekanntermaßen mutagen und karzinogen. CuCl₂ findet nach Freeman et al. seit 1998 als Referenzsubstanz bei Biotests mit *C. elegans* Einsatz. Als Parameter zur Einschätzung der schädlichen Effekte dienen hier Letalität, Reproduktion und Wachstum. Die drei Endpunkte werden als Antworten der Testorganismen auf Expositionen gegenüber den vier Schadstoffen herangezogen, sie variieren in ihren Ausmaßen mit der Expositionsdauer und der jeweiligen Konzentration des Schadstoffes.

2 Kenntnisstand über *C. elegans* und seine Freiland-ökologie

2.1 Übersicht über das Genus *Rhabditis*

Der wesentliche Evolutionsschritt der *Rhabditis* gegenüber den anderen Nematoden Gattungen auszeichnet, liegt ähnlich wie bei *Prodontorhabditis* im Bereich der Mundhöhle. Hier entstand im hinteren Bereich des Mundrohrs eine charakteristische „Übergangsstelle“ durch drei kalottenartige Vorwölbungen der verdünnten Cuticula in das Lumen von dorsal und jeweils subventral, die ihrerseits primär durch einen Besatz mit leistenartigen Zähnchen stabilisiert werden. Diese Kalotten werden dem Metastom zugerechnet, woran sich nach hinten ein verdickter Cuticularring anschließt, der eine Differenzierung des Telostoms darstellt. Er bildet den Abschluß der Mundhöhle und Ansatzstelle für die „Oesophagealtuben“ des Pharynx. Der spezifische und durchaus komplexe Bau der Übergangsstelle wird als Synapomorphie von *Rhabditis* angesehen. Diese artenreiche Gattung läßt sich in mehrere distinkte Untergattungen gliedern, die wiederum – bei großer Artenzahl – in einzelne Formengruppen zu unterteilen sind. (Sudhaus, W. 1976).

C. elegans gehört innerhalb der Gattung *Rhabditis* zur Untergattung *Caenorhabditis*. Die artenreiche *Rhabditis* besitzt zwei Stämme. Der erste umfasst die Gattungen *Mesorhabditis*, *Parasitorhabditis*, *Pelodera*, *Teratorhabditis* und einige andere Arten. im zweiten großen Stamm (Eurhabditis) sind die meisten der übrigen *Rhabditis* Gattungen, darunter *Caenorhabditis* und seine verwandten Gruppen *Protorhabditis*, *Prodontorhabditis*, *Diploscapter*, Eurhabditis und noch viele andere Gruppen vereinigt (Abb. 1).

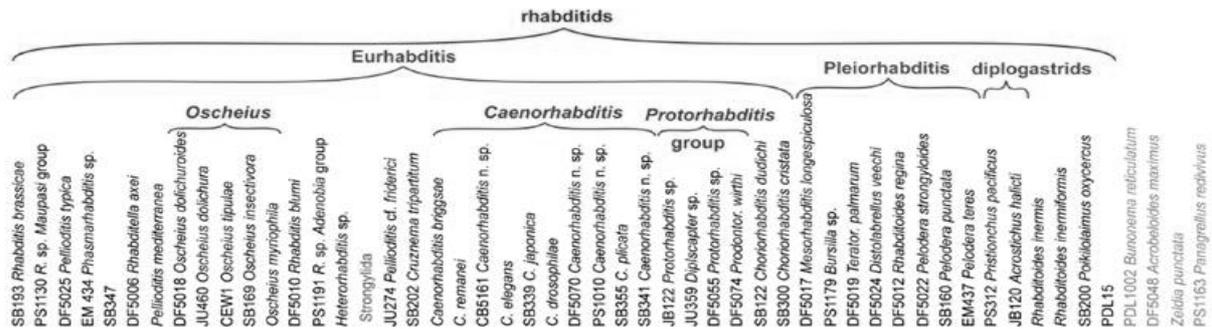


Abb. 1: phylogenetischer Baum von *Rhabditis* durch DAN Analysen (SSU, LSU rRNA und RNA polymerase II) (nach Blaxter et al., 1998; Fitch & Thomas, 1997)

2.2 Untergattung **CAENORHABDITIS** (6 Arten): (Osche 1952)

Erklärung morphologischer Begriffe

In einem allgemeinen Schema von *Rhabditis* Abb. 2 sollen die im folgenden wichtigen Begriffe erklärt werden

- a) Vorderende: li= Lippen (hier abgesetzt) mit Lippenpapillen, mu = Mundrohr, ph = Pharynx (hier Rhabditis), bu 1 = Mittelbulbus, bu 2 = Endbulbus mit Klappenapparat (= K1) und doppeltem Hinterhof (= hi), nv = Nervenring, expo = Exkretionsporus, d = Mitteldarm, go = Gonade mit terminalem Gonadenumschlag.
- b) Mundhöhle mit Übergangsstelle: chei = Cheilostom, pro = Protostom, meta = Metastom mit Metastomstruktur (Zähnen), telo = Telostom (Metastom und Telastom bilden die Übergangsstelle), ma = Pharynxmanschette, die das Mundrohr umgibt, qu = Querleistenstruktur der Pharynxintima.
- c) Metastomklappe mit Dreileistenapparat.
- d) Konischer Weibschenschwanz.
- e) Kuppelförmiger Weibschenschwanz mit Spätzchen: rect = Enddarm, an = After, ph = Phasmidien (Schwanzdrüsen).
- f) Hinterende des Männchens (vintral) mit peloderer (Schwanzumfassender) und proximal geschlossener Bursa. Bursalpapillen in der Anordnung (2/1+3+4), die 6. und 10. (in der Zählung von vorn nach hinten) durchstoßen das Velum nach außen, spic = Spicula (hier distal verwachsen), gub = Gubernaculum, klpa = Kloakal Sinnpapillen, bur = Bursavelum, pa = Bursalpapillen.
- g) Hinterende des Männchens mit leptodera Schwanzform (die Schwanzspitze überragt die Bursa nach hinten) und proximal offener Bursa, Bursalpapillen in der Anordnung (1+2/1+3+2). Bursa „radiär“ gegliedert (nicht alle Papillen in

einer Linie stehend, hier die 1. +4. +8. Sublateral, 2.-3. +5.-7. +9. Subventral).
 Bezeichnungen wie bei (f). (Spicula hier getrennt, Gubernaculum hier distal
 gegabelt).

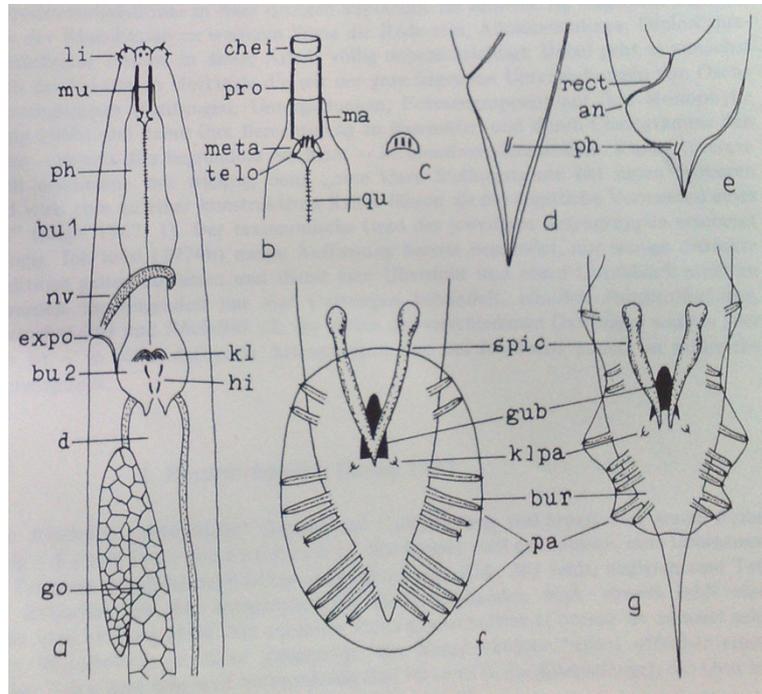


Abb. 2: stellt die morphologische Merkmale von den Nematoden dar. (nach Sudhaus, W 1976)

Caenorhabditis ist eine kleine Untergattung, die vermittelnd zwischen *Mesorhabditis* und *Choriorhabditis* steht. Die Arten sind einander sehr ähnlich, Männchen sind eher selten. Die Lippen sind geschlossen. Die Bursa ist peloder, meist geschlossen, manchmal aber auch offen, mit meist 3 Praeanalpapillen, die Spicula sind getrennt. Der weibliche Schwanz ist konisch und hat unterschiedliche Längen, die Vulva ist stets mittelständig. Die Übergangsstelle trägt 2 weitabgelöste und zapfenartige Zähne. Eine Oesophagusmanschette ist vorhanden.

Deutliche Übergangsstelle mit 2 ins Lumen vorstehenden Zähnen.

1. *Rhabditis (Caenorh.) dolichera* Schneider 1866
2. *Rhabditis (Caenorh.) marina* Bastian 1865
3. *Rhabditis (Caenorh.) debilicauda* Fuchs 1937
4. *Rhabditis (Caenorh.) elegans* Maupas 1900
 Hermaphrodit, Bursa geschlossen, 1. Bulbus deutlich
5. *Rhabditis (Caenorh.) briggsae* Dougherty & Nigon 1949
 Synonym: *Rh. elegans* Dougherty & Calhoun 1948 & 1949
Rh. elegans brevis Nigon 1949

Hermaphrodite Sehr ähnlich *R. perrieri* und *R. elegans*.

6. *Rhabditis (Caenorh.) perrieri* Maupas 1900

Als Autapomorphien von *Caenorhabditis* gelten folgende Merkmale angesehen:

- eine gewisse Zunahme der Körpergröße (603-1850 µm)
- die borstenartige apikale Lippenpapille
- die Ausbildung eines Mittelbulbus
- die mittelständige Vulva
- entsprechend paarige Ovarien, die durch Vergrößerung der proximalen Velumteile weit gehend bzw. ganz geschlossene Bursa.

Als Symplesiomorphien der Arten werden folgende Merkmale angesehen:

- die geregelte Cuticula
- die geschlossenen und nicht abgesetzten Lippen
- der doppelte Hinterhof beim Klappenbulbus
- die pelodere Bursa mit 2 Präklokalpapillen
- die dolchförmigen, getrennten Spicula vor mittleren Länge (27. 52 µm, allein bei *Rh. Plicata* und *Rh. avicola* vergrößert auf 54-92 µm)
- der erste konische Weibchenschwanz
- das H-förmige Exkretionssystem.

Caenorhabditis stellt danach sicher eine natürliche Gruppe dar. Die hierher gehörigen Arten stehen sich sehr nahe (Osche 1952b).

Innerhalb der von *Rh.plicata* abgetrennten *Caenorhabditis*-Gruppen lassen sich zwei Evolutionstendenzen beobachten, die einer Zweigliederung der Gruppe entsprechen Abb.3.

Bei den Arten, *Rh. remanei* und *Rh. elegans* gibt es lediglich Unterschiede in der Fortpflanzungsweise und bei der Verlängerung des Weibchenschwanzes (Sudhaus, W. 1976).

C. remanei und *C. brigssae* sind miteinander eng verwandte. *C. elegans* teilte einen Stamm mit *C. remanei*, *C. brigssae* und *Caenorhabditis n.sp* (hier vertreten durch Stamm CB5161). Eine enge Verwandtschaft mit dieser elegans gruppe ist *C. japonica*, und eine weitere kleine Art Ps 1010, die mit *C. drosophilae* und *C.n.sp.* DF5070 mehr verwandete sein konnte (Kiontke et al., 2004) Abb. 4.

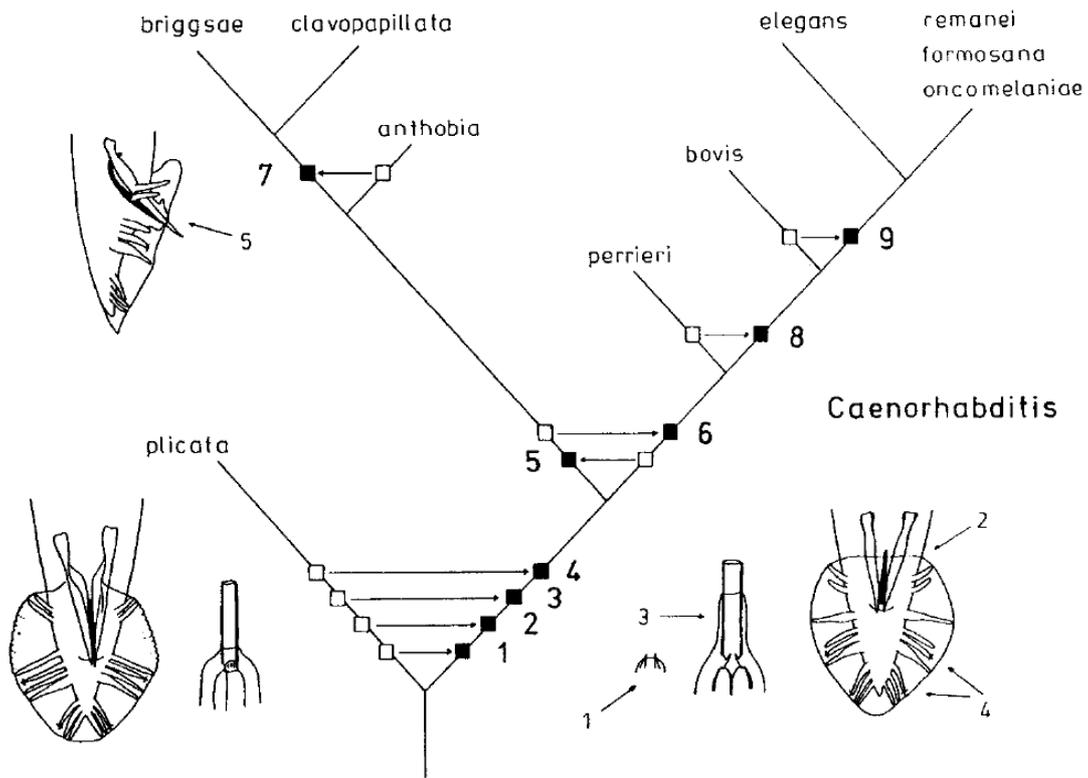


Abb.3: Cladogramm von *Caenorhabditis* (ohne *R. avicola*, *R. craspedocerca*, und *R. genitalis*). Die Ziffern bezeichnen folgende Apomorphien: (1) 2 Metastomzähne, (2) Bursa geschlossen, (3) Manschette um die Halbe Mundhöhle, (4) 5.+7. Papillen nach außen weisend, (5) 3. Papille reduziert (nur 8 Bursalpapillenvorhanden), (6) Papillen -anordnung (2\1+3+3), (7) Papillen verkürzt und verdickt, (8) Weibchenschwanz verlängert, (9) Bursabau und -gliederung einander entsprechend. – unter Verwendungen von Sudhaus (1976b).

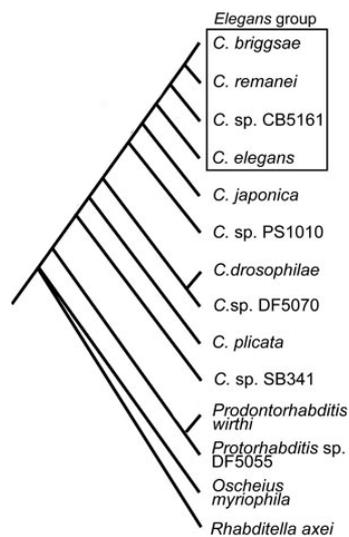


Abb. 4: Phylogenetischer Baum von *Caenorhabditis* Arten (Kiontke et al., 2004)

2.3 Bildungsabweichungen als „Realmutationen“ bei *Caenorhabditis* zur Erklärung des Evolutionsgeschehens

Aberrationen im Bereich der Bursa:

Bei *C. briggsae* mit normalerweise 8 Bursalpapillen in der Anordnung (2|3+3) tritt manchmal eine zusätzliche Papille auf, die als Atavismus der *Caenorhabditis* primitiven Bursagliederung von (2|4+3) entspricht. Bei den Tieren mit einem fehlenden Papillenpaar (was ja für eine ganze Gruppe von Arten um *C. briggsae* charakteristisch ist) kann die nun 3 Papille eine doppelte Endigung aufweisen, was dafür spricht, dass das dritte Papillenpaar nicht einfach ausgefallen ist, sondern mit der 4 Papille verschmolz (Deugherty & Nigon 1949a). Derartige Papillenverschmelzungen sind in der *Rhabditis*-Evolution selten.

Andere festgestellte Papillenaberrationen ergeben kaum aufschluß über die Phylogenie. So wurde das Fehlen der 4 (*C. plicata*, *C. remanei*), der 5, 8 und 8+9 bei (*C. remanei*) festgestellt, ferner konnte die 6 Papille bei *C. plicata* verkürzt sein (Sudhaus, W. 1979). Bei einer „Mikro“-Mutante von *C. briggsae* waren die Papillen schmaler als normal (Nigon & Dougherty 1950).

Bildungsabweichungen des Weibchen-Schwanzes:

Der weibchenschwanz ist bei jungen *C. plicata*-Weibchen konisch und nähert sich bei vollreifen Tieren mehr der „Kuppelform“ (Völk 1950). Ebenso ist bei *C. elegans* der Schwanz bei großen Weibchen plumper und kürzer (Rühm 1956). Bei einigen *C. remanei*-Weibchen wurde der Schwanz abgerundet und erreicht fast Kuppelform nachgewiesen. Bei *C. briggsae* trat eine durch die kulturbedingungen induzierte Schwanzaberration auf, bei der bei 95% der Tiere die Postkloakallippe stark angeschwollen hervortrat (Kisiel et al. 1969).

2.4 Zur Biologie der monophyletischen Untergattung *Caenorhabditis*

Für einige Arten der Gruppe ist Getrenntgeschlechtlichkeit mit einem ungefähr ausgeglichenen Geschlechtsverhältnis belegt (*Rh. formosana*, *Rh. oncomelaniae*, *Rh. plicata*, *Rh. avicola*, *Rh. bovis*, *Rh. genitalis*). Die meisten scheinen sich dagegen als proterandrische Hermaphroditen durch Selbstbefruchtung fortzupflanzen (*Rh. briggsae*, *Rh. craspedocerca*, *Rh. elegans*, *Rh. perrieri*, *Rh. anthobia*, *Rh. clavopapillata*). Mit Übergängen von der einen zur anderen Fortpflanzungsweise ist bei der zum Teil außerordentlich nahen Verwandtschaft, mit dem auftreten von

„Komplementärarten“ zu rechnen. Sicherlich geschah das im Verlauf der Phylogenie des Taxos häufig. Der „Formenstau“ (Osche 1952b) findet hier eine Erklärung. Bei den Hermaphroditen sind Residualmännchen in wechselnder Zahl zu beobachten (z. B. 1♂ auf 140 Zwitter bei *Rh. perrieri*, 1♂ auf 600 Zwitter bei *Rh. elegans*, 1♂ auf 100 Zwitter bei *Rh. briggsae*). Reine Weibchen wurden nicht festgestellt, dafür aber bei *Rh. elegans* als pathologische Abänderungen Männchenzwitter, mit eierproduzierenden Hoden, und Intersexe (Maupas 1900, Nigon 1949a). bei dieser Art nimmt die Zahl der Männchen (von zunächst 2 bis 3 auf 100 Zwitter) in Kultur stetig und bis zum völlig verschwinden ab (Osche 1952a, Rühm 1956). Durch Erhöhung der Temperatur (über 23° C) und damit Abänderung in der Meiose nahm die Zahl der Männchen bei *Rh. briggsae* und *Rh. elegans* zu (Dougherty & Nigon 1949b), ebenso unter ungünstigeren Bedingungen bei *Rh. briggsae*. Desgleichen wurde bei *Rh. briggsae* und *Rh. elegans* eine Zunahme der Männchen nach der Kopulation von Residualmännchen mit Hermaphroditen in der Nachkommenschaft beobachtet, deren Anteil sogar an den bei Gonochoristen üblichen heranreichen konnte (Dougherty & Nigon 1949b, Nigon 1949, Yarwood & Hansen 1969). Die „atavistischen“ Männchen haben also normalerweise Sexualinstinkt und Fortpflanzungsvermögen beibehalten. Zwischen *Rh. elegans* und *Rh. briggsae* kam es sogar zu sexueller Attraktion, nicht aber zur Hybridisation (Nigon & Dougherty 1949).

Die Kopulation erfolgt auf dem Substrat nach dem Bursatyp in λ-Form und Y-form (*Rh. plicata*, *Rh. remanei*), in flüssigem Kulturmedium bei *Rh. remanei* aber nach dem Spiraltyp. Das Begattungssekret ist verschieden mächtig und kann abgestreift werden. Die Eier werden bei manchen Arten auf fortgeschrittenem Furchungsstadium abgelegt (Oviparie: *Rh. plicata*, *Rh. briggsae*, *Rh. formosana*, *Rh. perrieri*), was (teilweise auch bei den genannten Arten) zur Ovoviviparie übergeht. Fast stets ovovivipar bzw. vivipar sind *Rh. anthobia*, *Rh. elegans*, *Rh. remanei*, *Rh. bovis* und *Rh. craspedocerca*. Gelegentlich tritt Aparität ein *Rh. elegans*. die Zahl der in den Uteri sich gleichzeitig entwickelnden Eier ist meist gering und beträgt maximal 4 bis 12 bei *Rh. anthobia*, *Rh. avicola*, *Rh. formosana*, *Rh. genitalis*, *Rh. oncomelaniae*, *Rh. perrieri*, *Rh. briggsae* und *Rh. bovis*. bei *Rh. remanei*, *Rh. elegans* und *Rh. plicata* sind es maximal 17 bis 37. Die Nachkommenzahl pro Weibchen ist allerdings mit über 100 im Durchschnitt bei *Rh. briggsae*, *Rh. elegans* und *Rh. remanei* bzw, im Maximum 240 bis 282 bei *Rh. elegans* bzw. *Rh. remanei* recht bedeutend. Die

Entwicklungsgeschwindigkeit ist rasch. 15 Stunden nach der Befruchtung schlüpfen sie aus den Eiern (*Rh. riggsae*, *Rh. elegans*, *Rh. remanei*) und sind spätestens nach 3 Tagen "adult". Soweit bekannt ist die Generationsdauer für alle Arten (bei 20° C) mit 3 bis 4 Tagen gleich anzugeben. Die Lebensdauer beträgt unter optimalen Bedingungen 12 bis 25 Tage. Kurze Generationsdauern und hohes Nachkommenpotential sind ein wesentlicher Teil der festgestellten Konkurrenzkraft dieser Formen. Von *Rh. plicata*, *Rh. remanei* und *Rh. elegans* wurde ein "Winkverhalten" der Dauerlarven beschrieben, was deren Übertragung durch andere Organismen wahrscheinlich macht. Allergings wurde eine Übertragung nur bei *Rh. plicata* nachgewiesen. Meist handelt es sich um „Kriechwinker“, die nach dem Winken weiterkriechen und an exponierten Stellen zusammenkommen können und zum Teil umfangreiche Türmchen aus Winklarven aufbauen.

2.5 *C. elegans* von Erstbeschreibung bis zum Top-Modell

Systematik

1900 wurde *Caenorhabditis elegans* erstmals von Maupas als *Rhabditis elegans* beschrieben. Günther Osche führte 1952 den neuen Subgenus *Caenorhabditis* ein, in welchen er die Art auch einordnete. Der heute gültige Artname *Caenorhabditis elegans* ergab sich schließlich 1953, als Dougherty einige Subgenera auf Gattungsniveau erhob (Riddle et al. 1997).

Sowohl die Stellung der Nematoden innerhalb der Metazoa als auch ihre Systematik erfuhren seit der Einteilung nach Schneider 1866 über Micoletzki (1922), Chitwood (1933, 1937), Maggenti (1963-1983), Andrassy (1974, 1976) und Lorenzen (1981, 1994) sehr viele Veränderungen und Umstellungen. De Ley & Blaxter beschreiben in ihrem Artikel aus dem Jahre 2002 einen Abriss der Geschichte der Nematodensystematik. Ihre neue vorläufige Klassifikation erstellen sie nicht mehr nur aufgrund von morphologischen Daten sondern zusätzlich aus molekularen Analysen (small subunit rDNA Sequenzen). Hiernach wird das bis 1963 genutzte zweiteilige System aus Secernentea und Adenophorea und ebenso das daraufhin entwickelte dreiteilige – entstanden durch Hinzunahme der Subklassen Chromadoria und Enoplia in die Klasse Adenophorea – ersetzt durch ein neues System. Der Stamm der Nematoda wird unterteilt in die zwei Klassen Enoplia und Chromadorea, wobei letztere nur die Subklasse der Chromadoria, erstgenannte die beiden Subklassen Enoplia und Dorylaimia enthält. Die von Chitwood in den 30er Jahren des vorigen Jahrhunderts

eingeführte und 1958 in Secernentea benannte Klasse wird von De Ley & Blaxter (2002) herabgesetzt in den Rang einer Ordnung und erhält den Namen Rhabditida. Die Rhabditida bestehen aus mehreren Unterklassen (u.a. Tylenchina und Rhabditina) und sind eine von fünf Schwestergruppen, zu denen z.B. auch die Plectida und Chromadorida zählen. Die fundamentale Trennung der enopliden und chromadoriden Linien wird bestätigt durch Untersuchungen der SSU rDNA, diese Ergebnisse zeigen den Stamm der chromadoriden Klade als „Kammähnliche“ Folge monophyletischer Gruppen. Zwischen den beiden Klassen könnte eventuell die bisher noch unbekannte Wurzel des Stammbaums der Nematoden liegen. In der Subordnung der Rhabditina erfolgten – verglichen mit den Veränderungen der Verwandtschaftsbeziehungen anderer Taxa innerhalb der früheren Klasse der Secernentea – nur geringfügige Neuerungen. Die 1984 von Andrassy vorgenommene Ordnung kann mit Ausnahme der Einbeziehung der Strongylida, einer vertebratenparasitischen Nematoden-gruppe (Westerheide & Rieger 1996), in die Unterklasse der Rhabditina (Blaxter et al. 1998) beibehalten werden. Die Klassifikation für *C. elegans* lautet also folgendermaßen:

Domäne:	Eukaryonten
Reich:	Anemalia
Stamm:	Nematoda Potts 1932
Klasse:	Chromadorea Inglis 1983
Unterklasse:	Chromadoria Pearse 1942
Ordnung:	Rhabditida Chitwood 1933
Unterordnung:	Rhabditina Chitwood 1933
Infraordnung:	Rhabditomorpha
Überfamilie:	Rhabditoidea Örley 1880
Familie:	Rhabditidae Örley 1880
Gattung:	<i>Caenorhabditis</i> Dougherty 1953
Art:	<i>Caenorhabditis elegans</i> Maupas 1899, Dougherty 1953

Lebenszyklus

Der Lebenszyklus des Nematoden *C. elegans* zeichnet sich durch eine auffallende Stabilität aus. Abhängig von der Temperatur beträgt die Entwicklung vom Ei bis zum adulten Organismus zwischen 3,5 d bei 20°C und 6 d bei 15°C (Abb. 5).

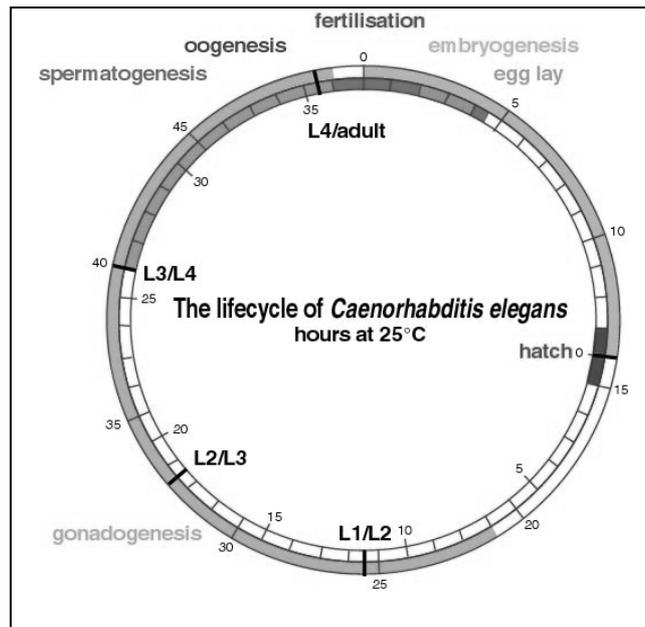


Abb. 5: Lebenszyklus von *C. elegans* bei 25°C (Blaxter 2003)

Durch das Schlüpfen lässt sich der Lebenszyklus in Embryogenese und Larvalentwicklung unterteilen. Bei einer Temperatur von 20°C benötigt die Embryogenese vom Zeitpunkt der Befruchtung ausgehend 12 bis 14 h (Deppe et al. 1978; Wood 1988). Sie kann in zwei Phasen geteilt werden: bis 400 min nach der Befruchtung dauert die Proliferationsphase an, in der fast sämtliche Zellteilungen stattfinden; weitere 400 min bis zum ersten Larvalstadium währt die Morphogenese, in welcher sich aus dem eiförmigen Embryo ein lang-gestreckter Wurm entwickelt (Wood 1988), der dann nach (Schierenberg 1987) 558 Zellen besitzt.

Im späten Juvenilstadium bilden die Hermaphroditen ca. 2000 Samenzellen (Fay 2005), die in der Spermatheka gelagert werden. Mit der Häutung zu adulten Nematoden wird diese Produktion eingestellt, stattdessen werden Eizellen gebildet. Durch Kontraktionen der Eileiter gelangen die Eizellen in die beutelartige Spermatheka, wo sie befruchtet werden, und dann weiter in den Uterus (Riddle et al. 1997). Direkt im Anschluss an die Bildung der Zygote findet eine Folge inäqualer Zellteilungen statt, an deren Ende die 5 Ursomazellen AB, E, MS, C und D sowie die Urkeimzelle P stehen. Aus jeder dieser Gründerzellen entsteht eine Zelllinie mit festgelegter Anzahl an Nachkommen mit invariablem, eindeutig voraussagbarem Zellschicksal (Deppe et al. 1978; Schierenberg 1987; Fay 2005). Die Zellstammbäume der Individuen sind identisch (Schierenberg 1997), wobei 131 Zellen der im Laufe der Embryonalentwicklung entstandenen 1090 somatischen Zellen des Hermaphroditen durch Apoptose sterben (Sommer, 2000) bzw. 148 der 1179 Zellen beim Männchen (Riddle et al. 1997).

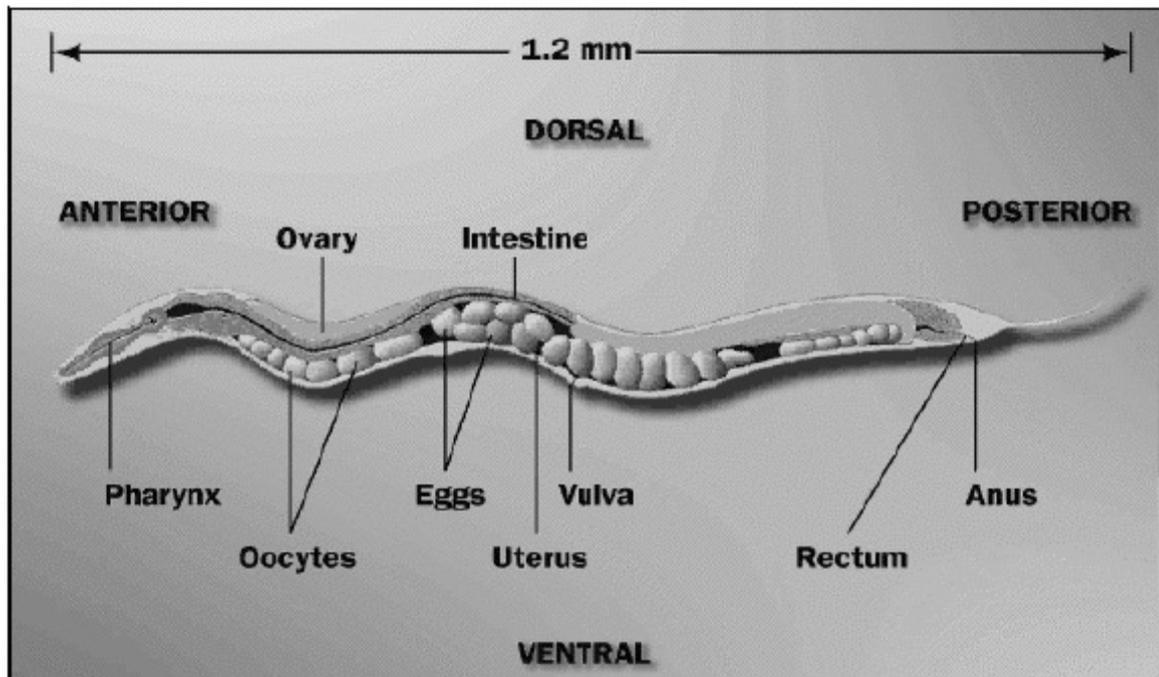
Während der Morphogenese entsteht aus dem Zellverband 14 h nach der Befruchtung das erste Larvalstadium L1. Bis zum Erreichen des Adultstadiums durchläuft *C. elegans* die weiteren drei Larvalstadien L2 bis L4, in welche er durch Häutungen nach 29, 38 und 47 h gelangt. 12 h später ist der Nematode adult (59 h nach der Befruchtung), 10 h hiernach geschlechtsreif und beginnt insgesamt 25 h nach der letzten Häutung mit der Eiablage, womit sich bei 20°C eine Generationszeit von 84 h ergibt (Wood 1988; ASTM 2002). Bei ungünstigen äußeren Bedingungen, wie hoher Populationsdichte und/oder Nahrungsmangel kann *C. elegans*, ebenso wie andere frei lebende Nematoden (Hitchcock et al. 1998), nach der zweiten Häutung ein alternatives Entwicklungsstadium einnehmen (Brenner 1974; Khanna et al. 1997). Bei diesem so genannten Dauerstadium verdichtet sich die Hypodermis, das Wachstum wird eingestellt, der Wurm wird resistenter und kann so bis zu 24 Wochen überleben (Lewis, Fleming 1995). Verbessern sich die Bedingungen, häutet er sich zum vierten Larvenstadium und setzt 10 bis 13 h später seine normale Entwicklung fort (Wood 1988).

Anatomie

Die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Entoderm sind anhand ihrer Hauptprodukte Haut, Muskulatur und Darmtrakt in dem schlauchförmigen, durchsichtigen Körper leicht zu erkennen. Der Körper besteht aus zwei konzentrischen Röhren. Die innere besteht aus dem vom Entoderm gebildeten Darmtrakt, während die äußere flüssigkeitsgefüllte Leibeshöhle nicht vollständig von mesodermalem Gewebe umgeben wird, also ein Pseudocoelom ist, durch dessen internen hydrostatischen Druck die Körperform aufrechterhalten wird. Im Pseudocoelom liegen Nervensystem, Gonaden und Exkretions- und Sekretions-system. Es wird nach außen von der Cuticula und nach innen von den Darmwandzellen begrenzt. Die Cuticula besteht aus mehreren Schichten Kollagen und damit assoziierten Proteinen, die von der darunter liegenden Hypodermis gebildet werden. Unterhalb der Epidermis liegen 4 Muskelstränge, die als Längsbänder aus insgesamt 95 Zellen den Körper durchziehen (Schierenberg & Cassada 1986). Durch abwechselnde Kontraktionen und Relaxationen dieser Muskelstränge bewegt sich der Wurm mit sinoidalen Bewegungen fort (Riddle et al. 1997).

Die vom Darmtrakt gebildete innere Röhre beginnt hinter der Mundöffnung mit dem Pharynx. Durch Pumpbewegungen der Muskulatur werden Bakterien aufgenommen,

im zweiten Pharynxbulbus zermahlen und durch die pharyngeal-intestinale Klappe in den Darm geleitet (White, 1988). Der Darm ist eine sich um 180° drehende Röhre, bestehend aus 20 Zellen, von welchen zuerst 4 und dann jeweils zwei 9 Ringe bilden, und wird vom Ausscheidungsorgan posterior begrenzt Abbi. 6.



Abbi. 6: Darstellung der Anatomie eines hermaphroditischen *C. elegans* (Sitabhra 2004)

C. elegans verfügt über 302 Nervenzellen (Sulston et al. 1983; Dhawan et al. 1999). Diese geringe Anzahl an Neuronen bewirkt ein einfaches und auf wenige Muster beschränktes Verhalten des Wurmes, er frisst ständig und bewegt sich dabei wellenförmig vor oder zurück (Dhawan et al. 2000). Sämtliche synaptischen Verschaltungen zwischen Neuronen und Muskelzellen sind bekannt und erforscht (Thomas 1994). Die Kopfneuronen sind als Geflecht von Zellausläufern ringförmig um den Pharynx angeordnet, von hier gehen alle sensorischen Zellen aus. Diese primitiven Sinnesorgane fungieren als Thermo-, Mechano- und Chemosensoren und lassen *C. elegans* auf externe Reize reagieren. Entlang der Bauch-seite verläuft eine Serie aus Motoneuronen – der Hauptnervenstrang, der den Körper ganz durchzieht und die Körpermuskeln ernährt (Schierenberg & Cassada 1986).

C. elegans kommt in zwei Geschlechtsformen vor; als Hermaphrodit mit 5 Paar Auto- und zwei Geschlechtschromosomen, der genau 959 Zellen besitzt, und als männliches Tier (nur ein Geschlechtschromosom) mit 1031 somatischen Zellen, wie in Abb. 7 dargestellt. Durch Kreuzfertilisation entstehen jeweils zur Hälfte Hermaphroditen und Männchen, durch Selbstbefruchtung zu 99,98 % Hermaphroditen.

Diese paaren sich allerdings nur in seltenen Fällen mit männlichen Tieren, so dass der Anteil der Männchen an einer Laborpopulation ungefähr 0,05 % beträgt. Durch Selbstbefruchtung bringt ein adulter Hermaphrodit 300-350 Nachkommen hervor (Riddle et al. 1997).

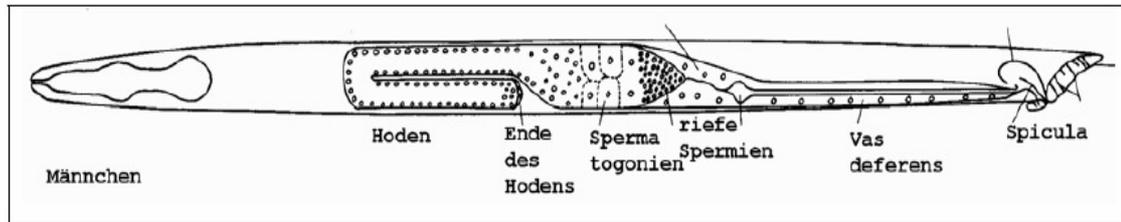


Abb. 7: Schematische Darstellung eines *C. elegans*-Männchens (Hupfeld 2002)

In der einarmigen Gonade der Männchen werden die Spermien gebildet und gelangen über den Samenleiter in die Kloake am Schwanzende. Dort tragen die Männchen die Spikula, ein Kopulationsorgan aus Haut-, Muskel- und Nervenzellen (White, 1988). Dieser hakenförmige Anhang stellt bei der ansonsten gleichartigen anatomischen Grundstruktur der beiden Geschlechter ein sicheres Unterscheidungsmerkmal gegenüber dem spitz zulaufenden Schwanzende des Hermaphroditen dar (Lewis, Fleming 1995). Die männlichen Spermien verdrängen die Spermien des protandrischen Hermaphroditen zur Befruchtung, welche im späten Juvenil-Stadium gebildet werden. Die zwei gebogenen Gonadenschläuche des Hermaphroditen liegen im mittleren Bereich des Pseudocoeloms und enthalten zwei Ovarien und Ovidukte sowie die Spermatheka, in der die Befruchtung stattfindet. Drei bis 10 min später werden die befruchteten Eier in den Uterus weiter befördert (Wood 1988) und schließlich von dort aus durch die in der Mitte des Bauches gelegene Vulva abgelegt (Schierenberg & Cassada 1986).

C. elegans wurde wegen vielen Gründen weltweit in Laboren verbreitet:

- die definierte Zellanzahl birgt gute Versuchsansätze
- das Tier insgesamt als auch die Anzahl der Zellen ist übersichtlich
- trotz des recht simplen Aufbaus lassen sich viele Mechanismen auf andere Arten bis hin zum Menschen übertragen
- durch die Selbst-Befruchtung ist es einfach, homozygote Stämme heranzuziehen, der am meisten verbreitete Stamm ist der N2-Stamm
- die Körperoberfläche ist durchsichtig und macht die Präparation und Manipulation leicht
- seit 1998 ist das Erbgut vollständig sequenziert (erster Metazoa überhaupt)

- Die Entwicklung der einzelnen Zellen ist bereits gut bekannt, alle Zellen sind benannt (z.B. sind Morphologie und synaptische Verknüpfungen aller 302 Neuronen bekannt).

Die Haltung unter Laborbedingungen gestaltet sich recht einfach und kostensparend, eine Agarplatte mit Nährbakterien (z.B. *Escherichia coli*) reicht aus. Im Bedarfsfall können die Würmer beliebig oft bei -80°C eingefroren und selbst nach mehreren Monaten unbeschädigt aufgetaut werden, wo durch die Stammhaltung stark vereinfacht wird.

Die Sequenzierung von *C. elegans* hat gezeigt, dass mindestens 37% der 19.000 exprimierten Proteine von *C. elegans* äquivalente im menschlichen Organismus vorhanden sind. So kann, trotz der großen evolutionären Distanz zwischen Mensch und Nematoden, *C. elegans* als ein gültiges, auch auf den Säugetierwirt übertragbares Modell für infektionsbiologische Studien herangezogen werden. *C. elegans* kann, z.B. beim Screening von Bakterien zur Identifizierung von Virulenzfaktoren, als Vorstufe zum Mausmodell genutzt werden, was besonders aus tierschutzrechtlichen, aber auch aus Kostengründen von Vorteil ist. Die Entwicklung aller Zellen aus der Eizelle ist mittlerweile vollständig aufgeklärt.

Die Besonderheit bei *C. elegans* liegt in einem Phänomen namens "Zellkonstanz". Der adulte *C. elegans* besitzt stets genau 959 Zellen. Spannend jedoch ist, dass diese Entwicklung beim Erreichen des 959-Zell-Stadiums nicht zur Vollendung kommt, sondern, dass das Tier zeitweise über 1090 Zellen verfügt, jedoch 131 Zellen durch Apoptose (programmierter Zelltod) wieder verliert. Dabei steht das Schicksal der meisten Zellen bei der Furchung fest (Mosaikentwicklung). Es finden jedoch auch Ausnahmen zu dieser zellautonomen Entwicklung statt, wenn andere Zellen regulierend auf das Entwicklungsschicksal wirken.

Zellkonstanz kommt nicht nur bei *Caenorhabditis*, sondern auch bei Rädertierchen (*Rotatoria*) und Bärtierchen (*Tardigrada*) vor. Der Vorteil bei *C. elegans* gegenüber den anderen Tierchen liegt in der Tumorvermeidung, da es praktisch zu keinen unkontrollierten Wucherungen kommen kann, wenn die Zellen nicht mehr teilungsfähig sind. Eine Regeneration von zerstörten Zellen ist damit jedoch auch nicht mehr möglich, so dass auch geringe Verletzungen das Ende für das Tier bedeuten können.

2.6 Habitaten von *C. elegans*

C. elegans wurde in unterschiedlichen Habitaten nachgewiesen, Nach Literaturangaben kommt *C. elegans* in Europa (Belgien, Deutschland, Dänemark, Großbritannien, Tschechische Republik, Slowakei, Ungarn, Frankreich, Italien, Litauen, Moldawien, Russland), Asien (Georgia, Usbekistan, Turkmenistan, Kirgisien, Kasachstan, Weißrussland, China), Afrika (Algerien), Nord Amerika (USA) und Australien vor. Abb. 8 stellt die Herkunft der bisher nachgewiesenen *C. elegans* Wildpopulationen dar.

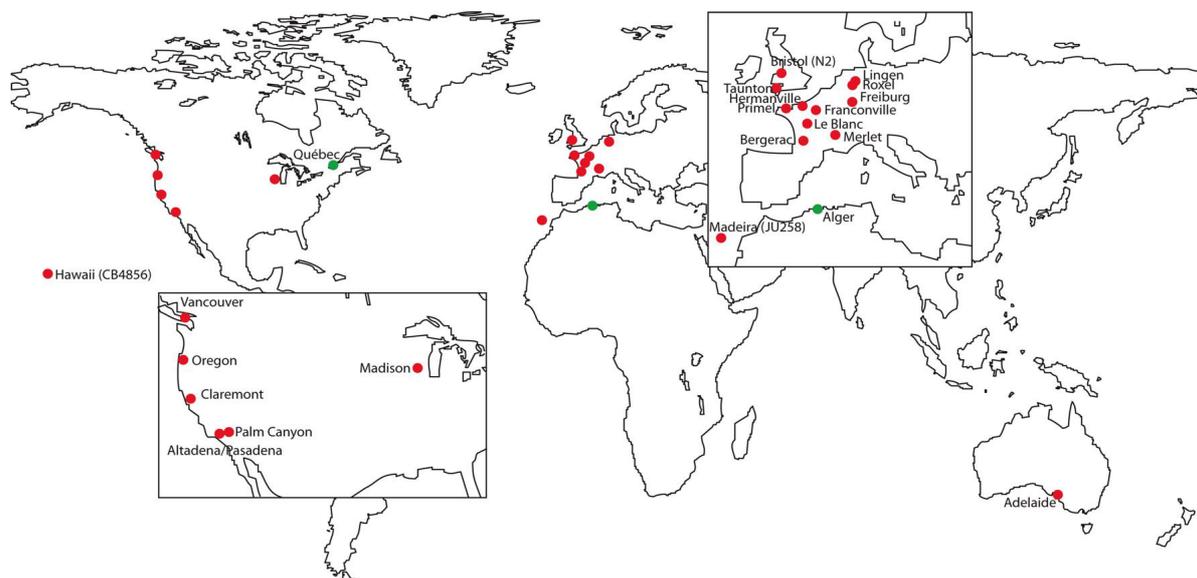


Abb. 8: Herkunft der bisher nachgewiesenen *C. elegans* Wildpopulationen.

Rote Punkte: Herkunft der Wild-Isolate, entweder durch CGC oder <http://www2.ijm.jussieu.fr/worms/index.php>. Grüne Punkte: Plätze von *C. elegans* Isolate, die nicht bewahrt wurden, aus Literatur (u.a. in Algerien Original Isolation von Maupas, 1900) und Québec (Abdul Kader & Côté, 1996).

C. elegans und seine verwandten der Gattung *Caenorhabditis* (*C. briggsae*, *C. remanei*, *CB5161Caenorhabditis n. sp*, *SB339*, *C. japonica*, *C. drosophilae*, *Df5070*, *CB5161Caenorhabditis n. sp*, *PS1010*, *CB5161Caenorhabditis n. sp*, *SB355*, *C. plicata*, *SB341*, *CB5161Caenorhabditis n. sp*) wurden häufig in verschiedenen Wirtstieren gefunden, ohne dass die möglichen Zusammenhänge dargestellt werden. Manche Arten wurden aus Warmblütern isoliert. Eine Art wurde aus einem Krokodil isoliert. *C. avicola* wurde im Darm eines Vögels nachgewiesen; *C. bovis*, *C. clavopapillata* und *C. genitalis* wurden in Säugetiere gefunden. Diese Arten wurden als Parasiten beschrieben.

Ob das auch für *C. bovis* gilt, der zufällig im Ohr eines Zebus gefunden wurde, ist ungeklärt.

In der Tab. 1 ist eine Zusammenfassung über das Habitat und Wirtstiere, die derzeit bekannte geographische Verteilung und des Reproduktionsmodus (gono. =gonochoristic, her. = Hermaphrodit) aller *Caenorhabditis* Arten dargestellt.

Tab. 1: Habitat, Partnertiere, derzeit bekannte geographische Verteilung und Reproduktionsbiologie der bekannten *Caenorhabditis* Arten (nach W. Sudhaus, & K. Kiontke 2006)

Species	Habitat	Associates	Type of association	Geographical distribution	reprod. mode	
<i>C. briggsae</i> *	compost, garden soil, woodland habitats	snails	necromenic?	N.-America, Europe, Hawaii, India, Taiwan, Japan	herm.	
<i>C. n. sp. 5</i> * (JU727, SB378)	soil under tree and in flowerbed	?	?	China	gon.	
<i>C. remanei</i> *	compost, woodland habitats	isopods, snails	phoretic (facultative necromenic?)	N.-America, Germany, Japan	gon.	
<i>C. n. sp. 4</i> * (CB5161, LKC28, SB129, SB280)	compost-like material	?	?	Costa Rica, Guadeloupe, Trinidad, India, Sumatra	gon.	
<i>C. elegans</i> *	compost, garden soil	millipedes, isopods, insects, snails, slugs	phoretic (facultative necromenic?)	N.-Africa, Madeira, Europe, N.-America, Hawaii, Asia, Australia	herm.	
<i>C. japonica</i> *	cadavers and nests of burrower bug	burrower bug <i>Parastrachia japonensis</i>	facultative necromenic	Japan	gon.	
<i>C. perrieri</i>	manure	?	?	N.-Africa	herm.	
<i>C. auriculariae</i>	fungus (<i>Auricularia polytricha</i>) on wood	?	?	Japan	gon.	
<i>C. anthobia</i>	inflorescence of <i>Cyrtandra glabra</i>	?	?	Sumatra	gon.?	
<i>C. avicola</i>	intestine of bird	songbird <i>Rhyacomis fuliginosus</i>	(parasite of songbirds?)	Taiwan	gon.	
?	<i>C. fruticulolae</i>	on vegetables and snails	snail <i>Fruticulicola sieboldiana</i>	phoretic?	Japan	gon.
<i>C. bovis</i>	auditory canal of zebu cattle (and goats)	flies, zebu cattle	phoretic (ectoparasite of cattle?)	E.-Africa	gon.	
<i>C. n. sp. 3</i> * (PS1010, RGD1, RGD2)	galleries of beetles (weevils) in sugar cane and coconut palm trees	palm weevil <i>Rhynchophorus palmarum</i> , sugar cane weevil <i>Metamasius hemipterus</i>	phoretic (necromenic?)	Florida, Trinidad	gon.	
<i>C. drosophilae</i> *	rotting saguaro cactus	<i>Drosophila nigrospiracula</i>	phoretic	Arizona	gon.	
<i>C. n. sp. 2</i> * (DF5070)	rotting opuntia cactus	<i>Drosophila</i> sp.	phoretic	Mediterranean and Canary islands, Madeira	gon.	
?	<i>C. plicata</i> *	carrion	carrion beetles	phoretic	E.-Africa, Germany	gon.
<i>C. sonoreae</i>	old rot of saguaro cactus	?	?	Arizona	gon.	
<i>C. n. sp. 1</i> * (SB341)	fungus growing on tree stump	beetle <i>Cis nitidus</i> ?	?	Germany	gon.	

C. elegans, *C. briggsae*, *C. remanei* wurden in anthropogenen Habitaten wie Kompost, oder Gartenerde gefunden. *C. elegans* und *C. briggsae* wurden im Kompost in Frankreich nachgewiesen (Barrière & Félix, 2005), *C. briggsae* und *C. remanei* im Waldland von Ohio (Baird, 1999). Nach mündlicher Mitteilung durch Herr Dr. W.Sudhaus wurde *C. elegans* und *C. remanei* auch in Kompost in Berlin gefunden. Darüber hinaus konnte *C. briggsae* und *C. remanei* aber auch in ungestörten Wäldern und aus wirbellosen Tieren gesammelt werden (Baird, 1999). Deshalb könnte es sein, dass Waldland das natürliche Habitat von *C. briggsae* und *C. remanei* ist, wo sie auf verfaulten organischen Materialien, die von vielen Schnecken und Asseln besiedelt wurden, konzentriert sind.

C. elegans wurde bisher nicht außerhalb von anthropogenen Habitaten gefunden (Barrière & Félix, 2005, M.-A. Félix pers. comm., S. Baird pers comm.).

Kürzlich wurde *C. elegans* von Patrick Phillips aus einer Schnecke in einen Oberboden in einem Park in Oregon isoliert (CGC).

In Deutschland wurde *C. elegans* auf Saprophagen an den Ufern der Flüsse gefunden (Hirschmann, 1952) und einmal in den Fäkalien einer *Pissodes piceae* (Rühm, 1956), und auf der Schmetterlingsmücke (*Psychoda*) neben dem Abwasser (Sudhaus & Kühne, 1989). *C. elegans* wurde auch auf der Nacktschnecke *Limax tenellus* nachgewiesen (Mengert, 1953).

Die Verbreitung von *C. elegans* zwischen den Kontinenten und seine Verbindung mit den anthropogenen Habitaten zeigen, dass Menschen eine Rolle in der Verbreitung von *C. elegans* weltweit spielen.

C. elegans wurde auch aus der Schnecke *Helix aspersa* Abb. 9 in 50% von den Substraten in Davis, Palo Alto, Berkeley, Orange, County und San Diego Kalifornien isoliert (Baird, Fitch, & Emmons 1994). Interessanterweise ist, *H. aspersa* eine europäische Schnecke ist, die 1850 aus Frankreich nach San Jose, Kalifornien eingeführt wurde (Stearns, R.1900).

C. briggsae wurde bisher nur in Schnecken gefunden, *C. remanei* Larven in Asseln und in Labor auf Milben und Asseln (W. Sudhaus, unveröffentlicht) und als adult Tier in Kompost gefunden. *C. elegans* wurde zusammen mit unterschiedlichen Begleitarten immer wieder beschrieben (Asseln, Tausendfüßler und andere Gliederfüßler, Schnecken, Nacktschnecken und im Labor auf Raubmilben) (Félix et al. 2005).



Abb. 9: *Helix aspersa* (Caswell-Chen et al., 2005)

Arten der Gruppe *elegans* wurden in Begleitung mit Schnecken gefunden. Es könnte sein, dass die Ursprungart der *C. elegans* Gruppe bereits ein Begleiter der *Gastropoden* (Sudhaus & Kiontke, 1996) war. Von deren Habitats gebunden und von ihnen auch verbreitet wurde. Tab.2 stellt die Habitats von 65 Wildisolationen von *C. elegans* (CGC) dar.

Kenntnisstand über *C. elegans* und seine Freiland Ökologie

Tab.2: Habitats von 65 Wildisolierungen von *C.elegans* (CGC) nach Angaben von: W. Sudhaus, & K. Kiontke (2006)

Wildisolierungen von <i>C.elegans</i>	Fundorte
AB1, AB2:	verfaulten Pflanzten auf Gartenboden, Adelaide Australien
AB3, AB4:	Boden in Gärtnerei, Adelaide, Australien
CB3191-97:	Garten in Altadena, CA
CB3191, CB3192, CB3193, CB3194, CB3195, CB3196, CB3197, CB3198-9	Pasadena, CA
CB3198, CB3199, CB4507	Palm Canyon, CA
CB4555	Blumenbett, Pasadena, CA
CB4851	Gartenboden, Bergerac, France
CB4852	mushroom casing material, Taunton, Somerset, England
CB4853-4	Garten, Altadena, CA
CB4853, CB4854, CB4855	Kompost, Palo Alto, CA
CB4856	Ananasfeld, Hawaii
CB4857	verrotter Pilz, Claremont, CA
CB4858	Blumenbeet, Pasadena, CA
CB4932	Pilzbauernhof, nah Taunton, England
DH424	verfallene Bletter unten California Live Oak, El Prieto Canyon, CA
JU258	Garten für Obst und Gemüse, Ribeiro Frio, Madeira
JU262-3	Abfall des Pflanzengarten, Le Blanc, Indre, France
JU262, JU263, KR314	Kompost, Vancouver, Canada
LSJ1	UC Berkeley, CA
MY1	Kompost, Lingen, Germany
MY2-13, MY17-23	Kompost, Roxel, Münster, Germany
MY2, MY3, MY4, MY5, MY6, MY7, MY8, MY9, MY10, MY11, MY12, MY13, MY17, MY18, MY19, MY20, MY21, MY22, MY23, MY14-16	Kompost, Mecklenbeck, Münster, Germany
MY14, MY15, MY16, N2	Pilzkompost nah Bristol, England
PB303	verbunden mit terristischen Asseln, Porcellio scaber, obtained from Ward's Biological Supply
PB306	verbunden mit terrestrischen Asseln, P. scaber, obtained from Connecticut Valley Biological Supply
PX174	organische Bodenoberfläche im Wald, Devil's Lake State Park, Lincoln City, OR
PX176	feuchtes Gras mit Kompost, Eugene, OR
PX178-9	verbunden mit Schnecken, Hendricks Park, Eugene, OR
PX178, PX179, RC301	Kompost im Botanikgarten, Freiburg, Germany
RW7000	Gartenboden, Bergerac, France
TR388-9	Waldboden in Bascom Woods, Madison, WI
TR388, TR389, TR403	Boden in Madison, WI

3 *C. elegans* als Modellsysteme im Labor

In den vergangenen Jahren wurde *C. elegans* zunehmend als Modellorganismus für Toxizitätstests zur Bewertung von terrestrischen und aquatischen Systemen verwendet.

Verschiedene Tests zur Bestimmung der akuten Toxizität wurden vornehmlich mit den Endpunkten Letalität (LC50-Bestimmung), Reproduktionshemmung und Verhaltensänderung (EC50-Bestimmung) entwickelt. (Peredney & Williams 2000; Williams, Anderson et al. 2000; Easton, Guven et al. 2001; Ura, Kai et al. 2002; Boyd & Williams 2003; Dengg & van Meel 2004).

C. elegans wurde bei uns im Biogeographischen Institut, Universität Trier, als Modellsystem für Ökotoxikologische teste und für verschiedene ziele benutzt.

Eine von diesen Zielen der Ökotoxikologische Forschung ist die Etablierung eines ökotoxikologischen Testsystems zur Untersuchung der Wirkung von Schadstoffen im subletalen Konzentrationsbereich mit *C. elegans* als Modellorganismus. Dabei soll die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) infolge einer Schadstoffexposition als Summenparameter zur Einschätzung des Toxizitätspotentials einer Substanz oder einer Umweltprobe dienen.

Diese Arbeit („*Caenorhabditis elegans* als ökotoxikologischer Modellorganismus – Etablierung eines Testsystems zur fluorimetrischen Detektion der umweltbedingten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies ROS“) wurde 2005 abgeschlossen.

Andere Arbeit über die Etablierung und Bewertung von Biotests zur akuten Toxizität, Reproduktions- und Wachstumstoxizität mit dem Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* am Beispiel der Toxine Acrylamid, Benzo(a)pyren, Kupfer(II)chlorid und Ethylmethansulfonat wurde 2006 abgeschlosse. Und noch Andere Ökotoxikologische Forschung („Zur Wirkung von Atrazin auf die Entwicklung von *Caenorhabditis elegans*“) wurde 2006 abgeschlossen.

3.1 Materialien

Testorganismus

Für die Versuche wurden Nematoden der Gattung *C. elegans* (Stamm N2, Wildtyp) vom *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), University of Minnesota, St. Paul, USA verwendet.

Chemikalien und Reagenzien

Folgende Chemikalien wurden während der Datenerhebung benutzt:

Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Acrylamid $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agar Agar-high gel strength	Serva, Heidelberg
Ascorbinsäure (Vitamin C)	VWR, Darmstadt
Atrazin 98.7%	Institute of Organic Industrial Chem.
Benzo(a)pyren $\geq 97\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Butylhydroxytoluen	Sigma, Hannover
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Cholesterol	Serva, Heidelberg
D(+) – Saccharose	Roth, Karlsruhe
Dihydrorhodamin	Sigma, Hannover
Dimethylsulfoxid 99,5% p.a.	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Eisen(II)sulfat p.a.	Merck, Darmstadt
Ethanol 96%, 70%	Roth, Karlsruhe
Ethylmethansulfonat	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kupfer(II)chlorid	Merck, Darmstadt
Kupfer(II)sulfat $\geq 99\%$ p.a.	Merck, Darmstadt
Lipid Peroxidation Assay Kit	Calbiochem, San Diego; Merck, Darmstadt
Ludox Colloidal Silica	
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumhypochlorid, 12% wirksames Cl	Roth, Karlsruhe
Nystatin-Mycostatin 5000, 5060 U/mg	Sigma, Hannover
PSN Antibiotic Mixture	Gibco, Paisley
Salpetersäure 65% p.a.	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37% p.a.	Roth, Karlsruhe
Select Agar	Gibco, Karlsruhe
Select Peptone 140	Gibco, Karlsruhe
Select Yeast Extrakt	Gibco, Karlsruhe
Standarboden LUFA Type Tab. 3	
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Zinksulfat $\geq 99,5$ % p.a.	Merck, Darmstadt

Tab. 3: Eigenschaft von dem Standarboden LUFA Type 2.2

Standard Soil Type	2,2
Batch-No. (Sp=stored; F=field fresh)	Sp2,2,1405
Sampling Date	38446
Org. C in %	$2,29 \pm 0,14$
Praticles<0,02 mm in %	$15,5 \pm 2,4$
pH-value (0,01m CaCl ₂)	$5,7 \pm 0,4$
Cation Exchange Capacity (mva1/100g)	11 ± 1
Particle Sizes according to German DIN (%)	
<0,002 mm	$7,9 \pm 1,0$
0,002 - 0,006 mm	$2,2 \pm 1,6$
0,006 - 0,02 mm	$5,4 \pm 1,7$
0,02 - 0,063 mm	$8,0 \pm 3,0$
0,063 - 0,2 mm	$34,5 \pm 4,3$
0,2 - 0,63 mm	$41,3 \pm 2,9$
0,63 - 2,0 mm	$0,7 \pm 0,1$
Soil Type	schwach lehmiger Sand (S12)
Particle Sizes According to USDA (%)	
<0,002 mm	$7,9 \pm 1,0$
0,002 - 0,05 mm	$14,6 \pm 2,5$
0,05 - 2,0 mm	$77,5 \pm 3,5$
Soil Type	loamy Sand
Water Holding Capacity (g/100g)	$48,4 \pm 3,7$
Weight per Volume (g/1000g ml)	1158 ± 41

Lösungen

Folgende Lösungen wurden zur Durchführung der vorliegenden Studie hergestellt:

Acrylamid-Lösung

M (C_3H_5NO) 71,08 g/mol

Ascorbinsäure (1 mmol/l)

Ascorbinsäure 17,6 mg/ 100 ml Aqua deion.

Benzo(a)pyren-Lösung

M ($C_{20}H_{12}$) 252,315 g/mol

Butylhydroxytoluen (0,5 mmol/l)

BHT 110 mg/ 1 ml Acetonitril

Cholesterol (5 mg/ml)

$C_{27}H_{46}O$ 5 g/l Aqua deion.

Dihydrorhodamin 123 (5 mmol/l)

DHR 123 2,6 mg/ 1,5 ml DMSO

Dimethylsulfoxid-Lösung

M(C_2H_6SO) 78,13 g/mol, Reinheit $\geq 99,5\%$, entspricht 12,7 mol/l

Egg-Buffer nach Christensen et al. (2002)

NaCl 6,896 g/l Aqua deion. (entspricht 118 mmol/l)

KCl 3,578 g/l Aqua deion. (48 mmol/l)

$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ 0,294 g/l Aqua deion. (2 mmol/l)

$MgCl_2 \cdot 2 H_2O$ 0,4066 g/l Aqua deion. (2 mmol/l)

HEPES ($C_8H_{18}N_2O_4S$) 5,958 g/l Aqua deion. (25 mmol/l)

Ethylmethansulfonat (0,5 mmol/l)

M($C_3H_8O_3S$) 124,2 g/mol

EMS-Lösung 0,52 μ l/ 10 ml Aqua deion.

„Freezing“-Lösung (100 ml)

NaCl 0,585 g

KH_2PO_4 0,68 g

Glycerin 30 g

NaOH (1 mol/l) 0,56 ml

$MgSO_4$ (1 mol/l) 30 μ l

Hypochlorit nach Lewis & Fleming (1995)

H₂O_{autokl.} 7 ml

NaOH(5 mol/l) 1 ml

NaOCl (12 %) 2 ml

K-Medium nach Williams & Dusenbery (1990a)

NaCl 2,96 g/l Aqua deion. (51 mmol/l)

KCl 2,36 g/l Aqua deion. (32 mmol/l)

Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (1 mol/l)

KH₂PO₄ 136,09 g/l Aqua deion.

Kalziumchlorid (1 mol/l)

CaCl₂ * 2 H₂O 147,02 g/l Aqua deion.

Kupfer(II)chlorid

M (CuCl₂ (* 2 H₂O)) 170,48 g/mol

LB- (Bakteriekultur-) Agar

NaCl 10 g

Yeast Extrakt 5 g

Peptone 140 10 g

Agar 15 g + 1l Aqua deion

LB- (Bakteriekultur-) Medium

NaCl 10 g

Yeast Extrakt 5 g

Peptone 140 10 g + 1l Aqua deion

M9- Puffer nach Brenner (1974)

KH₂PO₄ 3 g

Na₂HPO₄ * 2 H₂O 7,46 g

NaCl 5 g + 1L Aqua deion

MgSO₄ (1 mol/ l) 1 ml

Magnesiumsulfat (1 mol/l)

MgSO₄ 120 g/l Aqua deion.

246,50 g/l Aqua deion.

Nystatin – Suspension (10 000 U/ml)

Nystatin 98 mg/ 50 ml

NGM-Agar nach Lewis & Fleming (1995)

NaCl	3 g
Peptone	5 g
Agar	14,5 g
H ₂ O deion.	800 ml
KH ₂ PO ₄ (1 mol/l)	25 ml
CaCl ₂ (1 mol/l)	1 ml
MgSO ₄ (1 mol/l)	1 ml
Cholesterol (5 mg/ml)	1 ml
Saccharose (20%)	5 ml
Nystatinsuspension (10000 U/ml)	10 ml + 1l Aqua deion

S-Basalmedium nach Lewis & Fleming (1995)

NaCl	5,9 g
KH ₂ PO ₄ (1 mol/l)	50 ml + Aqua deion. ad 953 ml

S-Medium komplett nach Lewis & Fleming (1995)

Cholesterol (5 mg/ml)	1 ml
Natriumcitrat (1 mol/l)	10 ml
Spurenelemente-Lösung	10 ml
CaCl ₂ (1 mol/l)	3 ml
MgSO ₄ (1 mol/l)	3 ml
Nystatin (10000 U/ml)	10 ml
PSN	10 ml

Saccharose (20 %)

D(+) – Saccharose	200 g/ 1l Aqua deion.
-------------------	-----------------------

Spurenelemente-Lösung nach Lewis & Fleming (1995)

Na ₂ EDTA	1,86 g
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,69 g
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	0,20 g
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,29 g
CuSO ₄	0,016 g + Aqua deion. ad 1 l

Tris-HCl Puffer (100 ml, 20 mmol/l, pH = 7,4)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan 242,2 mg/ 80 ml Aqua deion.
mit konzentrierter HCl pH auf 7,4 einstellen
mit H₂O deion. auf 100 ml auffüllen

Verbrauchsmaterialien

Folgende Materialien wurden bei der Durchführung der Versuche verwendet:

Analysefilter, Blauband (< 2 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Bakterienkulturflasche 250 ml	Schott, Mainz
Bunsenbrenner Labogaz 470	Roth, Karlsruhe
Drigalski- Spatel	Roth, Karlsruhe
Falcon – Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Cellstar, Frickenhausen
Filtereinsatz 50 ml Reaktionsröhrchen, 40 µm, Nylon	BD Biosciences, Heidelberg
Gewebekulturplatte 12-well	Greiner bio-one, Cellstar, Frickenhausen
Gewebekulturplatte 24-well	Nunc, Roskilde
Gewebekulturschalen 9 cm	Greiner bio one, Cellstar
Glasflasche mit Dispenseraufsatz Eurolab 10	Merck, Darmstadt
Glastrichter	
Magnetrührer	
Mikrotiterplatte 96-Well	Greiner bio-one, Cellstar, Frickenhausen
Objektträger für Mikroskopie 26 x 76 mm	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten 230 mm	Roth, Karlsruhe
Petrischalen mit Nocken, 35 mm	Greiner bio-one, Cellstar, Frickenhausen

Pinzette	
Pipetten 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Greiner, Nichiryo
Pipettenspitzen (weiß, gelb, blau)	Eppendorf, Hamburg
Platindraht (durch Erhitzen an Pasteurpipette befestigt)	
Platin-Impföse	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten steril 5, 10 und 25 ml	Greiner bio-one, Cellstar, Frickenhausen
Skalpell	Martor, Solingen
Spiritusbrenner	Roth, Karlsruhe

Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

Atomabsorptionspektrometer Spectra AA – 640	Varian, Darmstadt
Bildanalyse Software ImagePro Plus 5.0	Intas, Göttingen
Binokular Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
Brutschrank 37 °C	Binder, Tuttlingen
Digitalkamera MP Focus 5000	Intas, Göttingen
Elektronische Analysewaage A200 S	Sartorius, Göttingen
Elektronische Analysewaage BP 310 S	Sartorius, Göttingen
Elektronische Analysewaage ISO 9001	Sartorius, Göttingen
Gefäßbeständer	Roth, Karlsruhe
Gefrierschrank -20 °C	Sanyo, Bad Nenndorf
Kühlbrutschrank 15 °C	Memmert, Schwabach
Kühlbrutschrank 20 °C	Heraeus, Hanau
Kühlschrank 4 °C	Privileg, Fürth
Laborautoklav V95	Systemec, Wettenberg

Mikroskop SM – LUX	Leica Mikroskopsystem AG, Solms
Mikrowellengerät (mit selbst eingebautem Probenhalter)	
MS1 Minishaker	IKA Works Inc., Wilmington
MS2 Minishaker	IKA Works Inc., Wilmington
Multifunktionelles Spektrometer „Multidetection Microplate - Synergy“	[Bio-Tek, Bad Friedrichshall]
Multipipette pro	Eppendorf, Hamburg
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Wunstorf
Reagenzglasschüttler MS Minishaker	IKA, Staufen
Rütteltisch	Gesellschaft für Labortechnik GFL, Burgwedel
Software KC4 „Microplate Data Analysis“	Bio-Tek, Bad Friedrichshall
Sterile Arbeitsbank LaminAir	Holten, Allerød, Dänemark
Timer	Roth, Karlsruhe
Tischzentrifuge	Qualitron Inc., Korea
Trockenschrank	Heraeus, Hanau
Überkopfschüttler REAX2	Heidolph, Schwabach
UV/VIS-Photospektrometer 550SE	Perkin-Elmer
Vakuumpumpe	Bio-Rad, Hercules, München
Variomag Elektronikrührer und Heizplatte	H+P Labortechnik
Wipptisch, Rocky 3D Orbitalshaker	Fröbel Labortechnik, Lindau
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Z 320 K	Eppendorf

3.2 Methoden

3.2.1 *C. elegans* Kultur

Herstellung der Nährmedien

Die Kultur der Nematoden erfolgt auf Gewebekulturschalen, die mit NGM-Agar als Nährmedium gefüllt sind. Als Nahrungsquelle für *C. elegans* dient der nicht-pathogene *E. coli*-Stamm OP50. Er weist ein eingeschränktes Wachstum aufgrund einer Uracil-Auxotrophie auf und wird auf speziellen Agarplatten (LB-Agar) kultiviert. Zur Herstellung der Agar-Nährmedien werden die Reagenzien (vgl. Materialien, Lösungen) eingewogen und in deionisiertem Wasser gelöst. Um mögliche Verunreinigung zu vermeiden werden diese Lösungen anschließend autoklaviert und unmittelbar nach der Zugabe zusätzlicher Nährsalze und des Antimykotikums Nystatin noch im erhitzten Zustand (ca. 65°C) in die Gewebekulturschalen gegossen. Nach dem Erkalten kann das ungefähr 0,8 cm tiefe Agargel mit Bakterien beimpft werden.

Bakterienkultur

Die *E. coli* Bakterien werden in Flüssigkultur vorkultiviert, indem mit Hilfe einer Impföse eine Einzelkolonie von der LB- (Bakterienkultur-) Platte in das Bakterienkulturmedium (LB- Medium) überführt wird und die Bakterien im Medium über Nacht in einem Kolben bei 37°C und 150 rpm geschüttelt werden. Mit dieser Lösung werden die NGM-Agarplatten zur Nematodenkultur beimpft. Diese werden wiederum über Nacht bei 37°C inkubiert, so dass sich ein dichter Bakterienrasen bilden kann. Zur Vermeidung von Fremdkontamination werden die Platten unter sterilen Bedingungen gegossen und die flüssige Bakterienkultur in einem wöchentlichen Turnus frisch angesetzt und bei +4°C aufbewahrt.

Kultur von *C. elegans* in Mischpopulation

C. elegans werden auf 9 cm großen Petrischalen gefüllt mit NGM-Agar bei 20°C bzw. 25°C kultiviert. Die Agarplatten werden mit *C. elegans* aus einer aufgetauten Stammkonserve, die nach Zugabe der „Freezing“ - Lösung bei -20°C oder -80°C mehrere Jahre aufbewahrt werden kann, beimpft. Alternativ können kleine Agarblöcke, die aus bereits bewachsenen Agarplatten herausgeschnitten werden, auf die frischen Agarplatten umgesetzt werden. Auf der Agarplatte entwickelt sich

nach mehreren Tagen eine Population unterschiedlicher Entwicklungsstadien (Mischpopulation).

Synchronisation der Population

Hypochlorid - Methode:

Für standardisierte Biotests werden synchronisierte Populationen benötigt, die sich mit Hilfe der Hypochlorid-Methode erzeugen lassen, indem den die Eier aus den adulten Nematoden herauspräpariert werden. Dazu werden die Nematoden mit M9-Puffer von der Platte abgewaschen, in 15 ml Reaktionsröhrchen überführt und bei ca. 170xg eine Minute lang zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Saugpumpe abgezogen und die *C. elegans* erneut in M9-Puffer resuspendiert und wieder zentrifugiert. Diese Behandlung wird zwei- bis dreimal wiederholt, um die Wurmsuspension vollständig von Bakterien zu befreien. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird der Überstand bis auf ein Minimum abgesaugt und dem Wurmpellet wird die Hypochlorid-Lösung zugegeben. Diese Lösung sorgt dafür, dass die Nematoden lysiert werden und die Eier, die durch ihre Eihülle weitestgehend geschützt sind, isoliert werden. Dieser Vorgang wird unter dem Binokular beobachtet, damit die Hypochlorid-Lösung rechtzeitig abgewaschen werden kann, bevor die Eihülle angegriffen wird. Das Auflösen der adulten Nematoden wird durch Zugabe von M9-Puffer gestoppt, die Hypochlorid-Lösung wird anschließend durch fünf bis sechs Waschgänge entfernt. Die so gewonnenen Eier werden über Nacht im Flüssigmedium (M9) geschüttelt und am nächsten Tag als L1-Larven auf frische Agarplatten überführt. Eine derart synchronisierte Population eignet sich für die anschließend durchgeführten Biotests, da so die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Standardisierung der Methode verbessert werden.

Filter - Methode:

Alternativ wurde ein Filteraufsatz, passend auf 50 ml Zentrifugenröhrchen, mit einer Porengröße von ca. 40µm verwendet. Die Mischpopulation wird auch hier mit Hilfe einer Pasteurpipette und M9-Puffer von der Kulturplatte abgewaschen und in drei Waschschritten von den Bakterien befreit. Die Wurmsuspension wird nach dem letzten Waschschriff in M9-Puffer aufgenommen, resuspendiert und durch den Filter in ein neues Zentrifugationsröhrchen gegossen. Der Filter wird anschließend vorsichtig mit 2 ml M9-Puffer nachgespült. Aufgrund der Porengröße des Filters werden in diesem Arbeitsschritt die adulten Nematoden sowie die L4-Larven aus der Mischpopulation entfernt.

Übersetzen von *C. elegans* zur Erhaltung der Stockplatten

Es wurden verschiedene Methoden benutzt, um *C. elegans* von einer NGM-Stockplatte (Agarplatte mit einem Durchmesser von 5 cm, auf der *C. elegans* zur Stockerhaltung aufbewahrt wurde) auf andere Platten zu überführen.

Agarstück-Methode:

Aus einer gut mit *C. elegans* besiedelten Agarplatte wurde mit Hilfe eines sterilen Skalpell ein kleines Agarstück herausgeschnitten und auf eine frisch mit *E. coli* OP50 beimpfte Agarplatte übersetzt, ohne dabei die Oberfläche der neuen Platte zu beschädigen. Je nach gewünschter Anzahl an Würmern auf der neuen Platte, wurde das Agarstück auf dieser belassen oder wieder entfernt.

Wurmhaken-Methode:

Diese Methode wurde vor allem dann angewandt, wenn eine definierte Anzahl von Würmern übersetzt werden sollte. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde jeweils ein Wurm mit dem Wurmhaken aufgenommen und auf eine neue Platte übersetzt. Dazu wurde zunächst auf der Ausgangsplatte ein, dem gewünschten Entwicklungsstadium entsprechender Wurm ausgewählt, die Spitze des Wurmhakens unter Sichtkontrolle langsam gesenkt und der Wurm vorsichtig mit einer schaufelnden Bewegung auf dem Drahtende platziert. Da sich auf einer Platte, auf der die Würmer die Bakterien bereits verstoffwechselt hatten, das Anheben der Würmer sehr schwierig gestaltete, wurde zur Erleichterung dieser Technik zeitweise etwas *E. coli* OP50 mit dem Drahtende aufgenommen und anschließend der Wurm leicht von oben berührt. Dieser blieb an den Bakterien haften und konnte somit leichter übersetzt werden. Um einen am Wurmhaken befindlichen Wurm auf einer frischen Platte abzusetzen, wurde das Drahtende bis auf die Agaroberfläche gesenkt und dort solange gehalten, bis der Wurm nach Möglichkeit selbständig herunterkroch. Im Zweifelsfall wurde er vorsichtig vom Haken heruntergewischt. Der Platindraht des Hakens war am Ende abgeflacht, um Löcher im Agar oder Verletzungen von *C. elegans* zu vermeiden. Beschädigungen der Oberfläche bieten den Würmern die Möglichkeit ins Innere des Agars zu kriechen, von wo aus sie nur noch schwer zu mikroskopieren und zu übersetzen sind. Der Draht wurde nach jedem Übersetzungsvorgang abgeflammt, um eine Kontamination zu verhindern.

Übersetzungsfrequenz:

Die Häufigkeit, mit der die Würmer übersetzt wurden, hing davon ab, bei welcher Temperatur sie gehalten wurden und wofür sie eingesetzt werden sollten. Die

Würmer auf den Stockplatten konnten mehrere Wochen ohne weitere Nahrungszufuhr gehalten werden, bevor sie neu übersetzt wurden. Um ein Austrocknen der Platten zu verhindern, wurden diese mit Parafilm umwickelt und bei 20 °C im Nematodenschrank (Chromatographieschrank 2023, Mini Cold Lab, Fa. Pharmacia) aufbewahrt. Würmer, die für die Eipräparation angezüchtet wurden, mussten alle ein bis zwei Tage transferiert werden, um Platten mit vielen adulten Würmern und Eiern zu erhalten.

3.2.2 Methoden der Etablierung des Testsystems zur fluorimetrischen Detektion der umweltbedingten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

3.2.2.1 Etablierung des Testsystems

Messprinzip und allgemeine Methodik

Zur *in vivo*-Quantifizierung der reaktiven Sauerstoffspezies in *C. elegans* wird ein Testsystem zur fluorimetrischen Messung des intrazellulären ROS-Levels mit Hilfe des fluoreszierenden Oxidationsprodukts von Dihydrorhodamin 123 (DHR123), Rhodamin 123 (RH123), erarbeitet. DHR123 ist ein ROS-Indikator, der vom Testorganismus aus der Testlösung aufgenommen wird und intrazellulär, vor allem von H₂O₂ und OH oxidiert wird, so dass das fluoreszierende RH123 entsteht. Diese Reaktion wird durch zelluläre Peroxidasen und Katalase katalysiert. DHR123 passiert als ungeladenes Molekül die Zellmembran, wird intrazellulär zum positiv geladenen, fluoreszierenden Rhodamin oxidiert und bevorzugt in den Mitochondrien akkumuliert (Gao, Yi et al. 2002). Durch Bestimmung der Fluoreszenzintensität kann der Anteil an oxidierend wirkenden reaktiven Sauerstoffspezies im Gesamtorganismus quantifiziert werden.

Die Testorganismen nehmen den ROS-Indikator und die Testsubstanz während der Inkubationsphase aus der Testlösung auf. Die Aufnahme der Substanzen wird nach acht Stunden durch mehrere Waschschrte gestoppt und die gebildeten ROS fluoresszenzspektrometrisch bestimmt. Zur Durchführung der Messung werden *C. elegans* von der Platte mit (M9-Puffer oder) Leitungswasser abgewaschen und die Bakterien in zwei bis drei Waschgängen aus der Wurmlösung entfernt. Während der Etablierung des Tests wird Kupfer(II)chlorid als Katalysator der ROS-Entstehung eingesetzt und Kupfer(II)-Verdünnungsreihen von 0,001 mmol/l bis 1 mmol/l gemessen. Die Verwendung eines physiologischen Puffers, wie PBS oder des für *C.*

C. elegans häufig verwendetet Puffers M9, als Waschpuffer oder zur Inkubation, ist in Kombination mit Kupfer(II)ionen nicht möglich. Durch die hohe Konzentration an Phosphationen in den Pufferlösungen fällt Kupfer(II)phosphat, ab einer eingesetzten CuCl_2 -Konzentration von 0,1 mmol/l, als blauer Niederschlag aus. Daher wird bei allen Versuchen zur Etablierung des Systems Leitungswasser als Medium und Waschpuffer verwendet, wenn sich Kupfer(II) in der Testlösung befindet. Die entsprechenden Hintergrundwerte des Leitungswassers werden als Blindwerte berücksichtigt.

Vorversuche zur Ausarbeitung und Optimierung der Methode

Einer Reihe von Vorversuchen werden in verschiedenen Variationen getestet, um die Rahmenbedingungen der Versuchsanordnung zu optimieren. Weiterhin soll im Rahmen der Vorversuche die Stabilisierung der Messwerte und damit die Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Messung erreicht werden. Außerdem sollen die Einflüsse der Testbedingungen auf die Steigung der Dosis-Wirkungskurve untersucht werden, um die Empfindlichkeit des Tests zu optimieren.

DHR123 und die Testsubstanz wurden während der Vorversuche nacheinander inkubiert. Das heißt, vor dem eigentlichen Testdurchlauf wurde die benötigte Nematodenanzahl einer Mischpopulation mit 50 $\mu\text{mol/l}$ DHR123 für 14 Stunden in kleinen Gewebekulturschalen vorinkubiert. Während der Messung der Kupfer(II)-Verdünnungsreihe zeigt sich, dass eine synchrone Inkubation von Indikator und Testsubstanz nicht nur die Empfindlichkeit verbessert, sondern auch die Versuchszeit um mehr als die Hälfte verkürzt, so dass dieser Parameter nach Abschluss der Vorversuche verändert und die Indikatorkonzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ auf 25 $\mu\text{mol/l}$ reduziert wird.

Einzusetzende Anzahl der Testorganismen

Zur Bestimmung der optimalen Anzahl in den Testansatz eingesetzter *C. elegans* werden Messungen mit 500, 1000, 3000 und 5000 Individuen pro ml Medium durchgeführt. Die Ansätze werden, nach Vorinkubation mit 50 $\mu\text{mol/l}$ DHR123, für zwei Stunden mit 325 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 inkubiert. Für die Inkubation mit H_2O_2 sind zwei Stunden ausreichend, denn H_2O_2 kann die Zellmembran schnell passieren und intrazellulär wirken. Die hier verwendete Positivkontrolle H_2O_2 erweist sich später als ungeeignet für die Etablierung der Methode mit einer Verdünnungsreihe, denn eine intensive Oxidation des Indikators durch H_2O_2 kann nur durch Zugabe bestimmter

Cofaktoren erreicht werden. Dennoch sind die Ergebnisse zur Angabe der einzusetzenden Nematodenanzahl verwendbar, da hier der Konzentrationsbereich, in dem das Signal messbare Werte erreicht, festgestellt werden kann.

Anzahl der Waschschr

Um die benötigte Anzahl der Waschschr nach der Inkubation zu bestimmen, werden die Messsignale der Testansätze nach unterschiedlich vielen Waschschr bestimmt. Nach der Inkubation von DHR123 und der Testsubstanz wird die Aufnahme durch mehrfache Wiederholung von Zentrifugation, Abnehmen des Überstands und Resuspendierung gestoppt. Jede Wiederholung des Waschvorgangs stellt einen zusätzlichen Stressfaktor für die Testorganismen dar, so dass die Wiederholungen auf das notwendige Minimum reduziert werden müssen. In diesen Vorversuchen werden 3000 Nematoden pro Milliliter Testlösung mit 325 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 (2 h) und 0,5 mmol/l CuCl (8h) mit 50 $\mu\text{mol/l}$ DHR123 sowie 50 $\mu\text{mol/l}$ DHR123 ohne Testsubstanz (14 h) inkubiert. Die Fluoreszenzintensitäten wurden nach 0, 1, 2, 3, 4 und 5 Waschgängen gemessen.

Zugabe von Bakterien als Nahrungsquelle während der Inkubation

Um den Einfluss der An- bzw. Abwesenheit einer Nahrungsquelle während der Inkubation auf das Fluoreszenzsignal zu bestimmen, werden Vorversuche mit und ohne Zugabe der *E.coli*-Kulturlösung durchgeführt und die Ergebnisse verglichen. Der oben beschriebene Versuch zur Bestimmung der Anzahl der Waschschr und die Messung einer verkürzten Kupfer(II)-Verdünnungsreihe werden jeweils mit und ohne Bakterienzugabe durchgeführt. Dazu werden entweder 100 μl Bakterien in LB - Medium oder 100 μl Wasser dem Versuchsansatz zugegeben.

Protokoll der ROS-Messung mit DHR123

Auf Basis der Vorversuche wird das im Folgenden formulierte Versuchsprotokoll erstellt:

In jeden Testansatz werden 3000 Nematoden im L1 bis L3 Stadium pro Milliliter Testlösung, die zuvor mit Hilfe des 40 μm Nylonfilters gewonnen werden, eingesetzt. Die Inkubation mit Testsubstanz und ROS-Indikator DHR123 findet gleichzeitig in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen statt. Dabei wird zuerst das Medium (hier Leitungswasser) in die Reaktionsgefäße vorgelegt und 100 μl Bakteriensuspension aus der Vorkultur als Nahrung hinzugefügt. Dann erfolgt die Zugabe von 5 μl der 5 mmol/l DHR123-Stammlösung, um eine Endkonzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$ bei 1 ml

Gesamtvolumen im Ansatz zu erreichen. Anschließend folgt die Zugabe der Testsubstanz in entsprechender Konzentration. Zuletzt werden die Testorganismen eingesetzt. Die Nematodensuspension wird vorher derart verdünnt, dass sich in dem zu pipettierenden Suspensionsvolumen genau die einzusetzende Individuenanzahl befindet. Dazu werden die Nematoden in einem 15 ml Röhrchen vorsichtig geschwenkt, so dass sich die Suspension homogenisiert. Dann werden zehnmal 1 µl Suspension auf einen Objektträger pipettiert und die enthaltenen Nematoden unter dem Binokular gezählt. Der Mittelwert ergibt die Nematodenzahl pro Mikroliter Suspension, so dass diese entsprechend verdünnt werden kann. Hier wird die Suspension auf 12000 Nematoden pro Milliliter Medium eingestellt, so dass 250 µl Suspension in den Ansatz pipettiert werden, um 3000 Individuen einzusetzen. Als Negativkontrolle werden Wurmsuspension mit Bakterien und reine Wurmsuspension in entsprechender Konzentration sowie ein Testansatz, der Nematoden, Bakterien und Indikator enthält, gewählt. Als Positivkontrolle dient ein Ansatz, der 100 µmol/l Menadion, eine prooxidativ wirkende Substanz, enthält. Die gesamte Versuchsanordnung gibt Tab. 4 wieder.

Die Inkubationszeit beträgt 8 Stunden. Die Reaktionsröhrchen werden bei 20°C, lichtgeschützt in einem Kühlbrutschrank vorsichtig geschüttelt, damit die Suspension homogen bleibt und sich die *C. elegans* nicht am Gefäßboden absetzen. Danach werden die Nematoden in drei Waschschritten vom überschüssigen DHR123 und der Testsubstanz befreit, so dass die Aufnahme gestoppt wird. Um zusätzlichen Stress zu vermeiden und damit die Hintergrundwerte niedrig zu halten, sollte die maximale Umdrehung beim Zentrifugieren 150 x g nicht überschreiten. Das Wurmpellet wird nach dem letzten Waschschrift in 1 ml Medium aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Zur Messung wird eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen verwendet, in die dreimal 200 µl jedes Testansatzes zur Dreifachbestimmung pipettiert werden. Für diesen Schritt ist es besonders wichtig, dass das Wurmpellet gut resuspendiert wurde, so dass die Anzahl der *C. elegans* pro Wells möglichst identisch ist. Die Fluoreszenzmessung wird mit dem multifunktionellen Spektrometer „Multidetector Microplate - Synergy“ der Firma Bio-Tek bei der Anregungswellenlänge 485 nm und Emissionswellenlänge von 528 nm gemessen. Das Messgerät wird über die KC4 „Microplate Data Analysis“ -Software gesteuert. Die Anzahl der *C. elegans* Individuen pro Vertiefung wird nach der Messung bestimmt und die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden auf 1000 pro Vertiefung normiert.

Tab. 4: Zusammenstellung der für die ROS-Messung mit DHR ausgearbeiteten Pipettivorschrift
 Nr. = Nummer des Testansatzes
 DHR123 [$\mu\text{mol/l}$] = DHR123-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$
 Cu(II) [mmol/l] = Kupfer(II)-Konzentration in mmol/l
 Bakterien = Zugabe der Bakterienkulturlösung
 Zugabe der Testorganismen = Zugabe der *C. elegans* bei 36000 Nematoden in 3 ml Suspension
 Ansatz 1-3: Negativkontrollen. Reine Wurmsuspension (1), Wurmsuspension + Bakterien (2),
 Wurmsuspension + Bakterien + DHR123 (3)
 Ansatz 4-10: Kupfer(II)-Verdünnungsreihe
 Ansatz 11: Positivkontrolle, 100 $\mu\text{mol/l}$ MD nach Zugabe von 10 μl einer 1 mmol/l Stammlösung

Nr.	DHR 123 [$\mu\text{mol/l}$]	Cu(II) [mmol/l]	Zugabe DHR123 5 mmol/l	Zugabe H_2O	Zugabe CuCl_2 -Lösung	Bakterien	Zugabe Testorganismen	Gesamt Volumen
1	0	0	0 μl	750 μl	0 μl	0 μl	3000 in 250 μl	1 ml
2	0	0	0 μl	650 μl	0 μl	100 μl	3000 in 250 μl	1 ml
3	25	0	5 μl	645 μl	0 μl	100 μl	3000 in 250 μl	1 ml
4	25	0,001	5 μl	635 μl	10 μl (0,1 mmol/l)	100 μl	3000 in 250 μl	1 ml
5	25	0,005	5 μl	635 μl	10 μl (0,5 mmol/l)	100 μl	3000 in 250 μl	1 ml
6	25	0,01	5 μl	635 μl	10 μl (1 mmol/l)	100 μl	3000 in 250 μl	1 ml
7	25	0,05	5 μl	635 μl	10 μl (5 mmol/l)	100 μl	3000 in 250 μl	1 ml
8	25	0,1	5 μl	635 μl	10 μl (10 mmol/l)	100 μl	3000 in 250 μl	1 ml
9	25	0,5	5 μl	635 μl	10 μl (50 mmol/l)	100 μl	3000 in 250 μl	1 ml
10	25	1	5 μl	635 μl	10 μl (100 mmol/l)	100 μl	3000 in 250 μl	1 ml
11	25	0,1 MD	5 μl	635 μl	10 μl (1 mmol/l)	100 μl	3000 in 250 μl	1 ml

Kenngrößen des Verfahrens

Zur Bestimmung der Verfahrenskenngrößen, die als Qualitätsmerkmal der Testmethode dienen, wird die Messung einer Kupfer(II)-Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 0.001 mmol/l , 0.005 mmol/l , 0.01 mmol/l , 0.05 mmol/l , 0.1 mmol/l , 0.5 mmol/l und 1 mmol/l CuCl_2 nach der in (Protokoll der ROS-Messung mit DHR123) beschriebenen Versuchsanleitung durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde eine CuCl_2 - Leerprobe gemessen, die jeweils den ROS-Indikator DHR123 in einer Konzentration von 25 mmol/l enthielten.

Außerdem werden gleichzeitig mehrere Negativkontrollen gemessen, die jeweils unterschiedliche Bestandteile des Gesamttestansatzes enthielten: reines Medium (hier: Leitungswasser), Medium plus Nematoden in entsprechender Anzahl und Medium plus Nematoden in entsprechender Anzahl plus Bakterien in Kulturlösung.

So können die Einflüsse der einzelnen Bestandteile der Testlösung auf das Gesamtsignal quantifiziert und wenn möglich minimiert werden.

Nach mehrfacher Messung der Verdünnungsreihe unter möglichst identischen Versuchsbedingungen werden die Kenngrößen Richtigkeit, Wiederholgenauigkeit, Nachweisgrenze, Blindwert bzw. Messwert der Probenmatrix sowie die Empfindlichkeit der Methode bestimmt.

Berechnung der Kenngrößen aus den Messdaten:

- *Richtigkeit*

Die Richtigkeit einer Messmethode wird durch das Fehlen von systematischen Fehlern definiert und anhand eines Vergleichs des gemessenen Gehalts mit dem Gehalt einer Referenzprobe überprüft. Stehen keine Standards zur Verfügung, wie es bei der Messung von ROS aufgrund ihrer Reaktivität der Fall ist, kann nach Kromidas, Klinkner et al. (1995) die Richtigkeit der Methode auch mit Hilfe des Aufstockverfahrens und der damit bestimmten Wiederfindungsrate beurteilt werden. Hierzu wird eine Leerprobe sowie dieselbe Probe, die um eine bestimmte Konzentration aufgestockt wird, dem Analyseverfahren unterworfen. Aus den beiden ermittelten Konzentrationen lässt sich die Wiederfindungsrate wie folgt berechnen:

$$WFR = \frac{x_1 - x_0}{\Delta x} \cdot 100\%$$

Dabei ist x_1 der Messwert der aufgestockten Probe und x_0 der Messwert der Leerprobe. Δx entspricht der zugegebenen Konzentration.

Bestimmung der Präzision

Man unterscheidet zwischen Methodenpräzision und Messpräzision. Letztere ist Maß für die Schwankungen der Messwerte, die durch das Analysegerät selbst verursacht werden. Sie kann durch Mehrfachanalysen von Standardproben bestimmt werden. Für die Bewertung des vorliegenden Messverfahrens ist sie allerdings zweitrangig, denn die Streuung der Messwerte beruht im Wesentlichen auf der Testdurchführung und der Vorbereitung der Proben. Diese Schwankungen werden bei der Bestimmung der Methodenpräzision durch mehrfache Durchführung des gesamten Testverfahrens ermittelt. Maß für die Methodenpräzision bzw. Wiederholbarkeit der Messergebnisse ist der Variationskoeffizient (CV) oder gewichtete Standardabweichung der Mehrfachmessung. Dazu wird zunächst der Mittelwert

(MW) der Messergebnisse und deren Standardabweichung (SD) ermittelt. Die gewichtete Standardabweichung CV berechnet sich nach

$$CV = \frac{SD}{MW} \cdot 100\%.$$

Bestimmung der Nachweisgrenze:

Als Nachweisgrenze wird der kleinste Messwert des Gehaltes einer Substanz in der Analyseprobe bezeichnet, für den die vorliegende Analysemethode Signalwerte liefert, die sich mit der gewählten Wahrscheinlichkeit von solchen Signalwerten unterscheiden, deren Gehalt in der Analyseprobe gleich „null“ ist. Die Substanz ist dann nachgewiesen, wenn der gefundene Gehalt im Untersuchungsmaterial größer als die Nachweisgrenze ist (Deutsche Forschungsgemeinschaft 1991). Besitzt eine Probe genau den Gehalt der Nachweisgrenze, so würde der Analyt in 50% aller Messung als „falsch negativ“ nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze ist also die Entscheidungsgrenze für den qualitativen Nachweis des Analyten. Die Erfassungsgrenze ist definiert als die kleinste Konzentration des Analyten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden kann und beträgt in der Regel das Doppelte der Nachweisgrenze. Als Bestimmungsgrenze wird die kleinste Konzentration des Analyten in der Probe bezeichnet, die quantitativ bestimmt werden kann. Sie ergibt sich in erster Näherung aus dem Dreifachen der Nachweisgrenze. Das zugrunde liegende mathematische Modell und die Bestimmungsmethoden werden in der DIN 32645 beschrieben (Kromidas, Klinkner et al. 1995).

Zur Berechnung der Nachweisgrenze müssen Annahmen über die Verteilung der Zufallsabweichungen der Messwerte gemacht werden. In den meisten Fällen ist die Annahme der Normalverteilung akzeptabel. Als weitere mathematische Voraussetzungen gelten die Unabhängigkeit der Messungen sowie die Homogenität der Varianzen für den gesamten Arbeitsbereich. Die Berechnung der Nachweisgrenze erfolgt anhand der Kalibriergeradenmethode auf der Basis der DIN-Vorschrift zur Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze (DIN 32645, 1995). In der Nähe der Nachweisgrenze wird eine Kalibrierung durchgeführt, dabei wird eine Leerprobe mit dem zu bestimmenden Bestandteil aufgestockt (hier: Messung der Kupfer(II)-Verdünnungsreihe). Aus den ermittelten Daten werden die Kalibriergerade und deren Streuungsdaten bestimmt. Die Extrapolation des Prognosestreifens auf die Ordinate ergibt den kritischen Wert der Messgröße:

$$y_{\text{krit}} = a_0 + t_{f,\alpha} \cdot s_{y,x} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{x_q^2}{Q}}$$

y_{krit} = kritischer Wert der Messgröße

a_0 = Ordinatenabschnitt der Kalibriergeraden, entspricht dem theoretischen Leerwert

$t_{f,\alpha}$ = Tabellenwert der Quantile der t-Verteilung für f Freiheitsgrade und Signifikanzniveau α

$$s_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (a_1 \cdot x_i + a_0)]^2}{n-1}}$$

Reststandardabweichung der Messwerte der Kalibrierung

n = Anzahl der Messungen der Kalibriermessungen

x_q = Arithmetisches Mittel der Gehalte aller Kalibrierproben

$$Q = \sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n}$$

x_i = Gehaltsgröße

Der kritische Wert der Messgröße wird in die Kalibrierfunktion $y = a_0 + a_1 x$ eingesetzt und ergibt nach Auflösung gegen x die Nachweisgrenze (NG):

$$x_{NG} = \left(\frac{s_{y,x}}{a_1}\right) \cdot t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{x_q^2}{Q}}$$

a_1 = Steigung der Kalibriergeraden

N = Anzahl der Kalibrierpunkte

Nach Zusammenfassung und Rundung der Konstanten ergibt sich die Nachweisgrenze näherungsweise aus

$$x_{NG} = \frac{4 \cdot s_{y,x}}{a_1}$$

bei definierten Standardbedingungen für Signifikanzniveau $\alpha = 0,01$ sowie $n = 10$ äquidistanten Kalibrierungsschritten einer Einzelbestimmung.

Bestimmung des Messwerts der Probenmatrix bzw. des Blindwerts:

Parallel zur Bestimmung der Kupfer(II)-Verdünnungsreihe werden die Fluoreszenzintensitäten verschiedener Matrixbestandteile der Testlösung in unterschiedlichen Zusammensetzungen bestimmt.

Bestimmung der Empfindlichkeit:

Durch die Messung der Zusatzversuche mit verschiedenen Kupfer(II)-Konzentrationen kann die Kalibrierfunktion bestimmt werden. Die Empfindlichkeit wird durch die Steigung der Kalibriergeraden dargestellt und gibt die Änderung des Signalwerts mit der Änderung der Konzentration wieder. Die Dimension der Empfindlichkeit ist damit die Dimension des Signals (hier: rel. FI = relative Fluoreszenzintensität) dividiert durch die des Gehalts (hier: mmol/l).

Visuelle Auswertung:

Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops mit angeschlossener Digitalkamera und entsprechender Steuerungssoftware werden Aufnahmen einzelner Individuen aus der Testlösung erstellt. Zur Herstellung des Präparats wird ein Tropfen 5%-ige Agarose auf einem Objektträger platziert und mit einem zweiten flach gedrückt. 1 µl der Testlösung wird darauf pipettiert und vorsichtig mit einem Deckglas abgedeckt.

3.2.2.2 Messung der akuten Toxizität von DHR123 für *C. elegans*

Eine akut toxische Wirkung der Indikatorsubstanz selbst auf den Testorganismus kann zu einer Verfälschung des Messergebnisses führen, daher wird die Wirkung des DHR123 auf *C. elegans* mit Hilfe eines Biotests zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien getestet. Das verwendete Testsystem beruht auf einer von Dhawan et al. (2000) und Ura et al. (2002) ausgearbeiteten Testprozedur, die in einigen Parametern modifiziert wurde. Die Nematodenpopulation wird mit Hilfe der Hypochlorid-Methode alterssynchronisiert und nach einem Tag Kultur auf NGM-Agarplatten als L3-Larven in den Biotest eingesetzt.

Die zu testenden Konzentrationen werden zuvor als 100-fach konzentrierte Vorverdünnungen aus der DHR123-Stammlösung (5 mmol/l) hergestellt, so dass eine Zugabe von 2 µl der entsprechenden Verdünnung zum Testansatz, der ein Gesamtvolumen 200 µl besitzt, die entsprechende Testkonzentration ergibt. In einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen werden jeweils ca. 10 *C. elegans* in 10 µl Medium im L3 Stadium eingesetzt und 40 µl K-Medium zugegeben. Nachdem alle Testorganismen in die Platte eingesetzt sind, wird jede Vertiefung mit 150 µl der

entsprechenden Testkonzentration aufgefüllt, so dass das Endvolumen von 200 μl erreicht wird. Dazu werden zuvor 148 μl K-Medium mit 2 μl Vorverdünnung der entsprechenden Konzentration versetzt, damit sich die Testsubstanz vollständig mit dem Testmedium vermischt, bevor sie auf die Testorganismen pipettiert werden. Tab. 5 gibt die Versuchsanordnung wieder.

Da die DHR123-Stammlösung eine Konzentration von lediglich 5 mmol/l besitzt, kann für die höchste zu messende Konzentration (100 $\mu\text{mol/l}$) keine 100-fache Vorverdünnung hergestellt werden. Es werden stattdessen 4 μl der 5 mmol/l Stammlösung in den Testansatz gegeben. Da DHR123 in DMSO gelöst wird, erhöht sich damit die Konzentration des DMSO in diesem Ansatz auf 2%, somit müssen auch in den anderen Ansätzen einschließlich der Lösungsmittelkontrolle die DMSO-Konzentrationen durch Zugabe von 2 μl reinem DMSO angepasst werden. Bei Versuchen in der Arbeitsgruppe zur akuten Toxizität des DMSO bei *C. elegans* ergibt sich für das verwendete K-Medium eine Letalität von 9% gegenüber der Negativkontrolle für eine DMSO-Konzentration von 2%. Eine Lösungsmitteltoxizität im akuten Test wird bis 10% als akzeptabel angenommen.

Von den fünf gemessenen Konzentrationen (1 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$) und der Negativkontrolle werden jeweils 9 Replikate angesetzt, der gesamte Versuch wird drei Mal unabhängig voneinander wiederholt. Als Negativkontrolle dient ein Ansatz, der 196 μl K-Medium und 4 μl DMSO, das Lösungsmittel des DHR123, enthält. Als Positivkontrolle werden 5 $\mu\text{mol/l}$ EMS (Ethylmethansulfonat) in Wasser gelöst verwendet. Die Ansätze werden bei 20 °C im Brutschrank auf einem Horizontalschüttler inkubiert und nach 24 h unter dem Binokular ausgelesen. Dazu werden in jeder Vertiefung alle lebenden und toten Nematoden gezählt. Als positiv für den Endpunkt Letalität gilt jeder Testorganismus, der sich nicht mehr bewegt, eine ausgestreckte Körperform aufweist und auf Kontakt mit einem Platindraht nicht reagiert.

Der Mittelwert der eingesetzten *C. elegans* in den 9 Replikaten gilt als 100%. Sollten weniger oder mehr *C. elegans* als zuvor eingesetzt als Testergebnis gezählt werden, gilt die Summe der gezählten lebenden und toten *C. elegans* als 100%-Wert. Der Prozentanteil der Individuen, bei der die Substanz eine letale Wirkung gezeigt hat, berechnet sich aus dem Mittelwert der gezählten toten Nematoden bezogen auf den Mittelwert der Gesamtanzahl aus 9 Replikaten.

Tab. 5: Versuchsanordnung zum Test auf akute Toxizität von DHR123

Dargestellt ist die Versuchsanordnung nach welcher der Test auf akute Toxizität von DHR123 auf *C. elegans* durchgeführt wird. Für jede Konzentration wurde eine 100-fache Vorverdünnung angesetzt, die zum Erreichen der Testkonzentration 1:100 verdünnt und für 10 Ansätze vorbereitet wird, so dass beim Test nur noch 150 µl der Lösung auf 50 µl *C. elegans* in Suspension pipettiert werden müssen.

K = K-Medium

VV = Vorverdünnung

EMS pos. = Ethylmethansulfonat als Positivkontrolle, 5 µmol/l EMS

	Vorverdünnung	Testkonzentration		Testansatz	
	VV 100-fach	Testkonzentration	10-faches Volumen	<i>C. elegans</i> Suspension in K-Medium	Zugabe entspr. Testkonzentration
Mediumkontrolle		150µl K	1500 µl K	50 µl	+ 150 µl
DMSO-Kontrolle		4 µl DMSO + 146µl K	40 µl DMSO + 1460 µl K	50 µl	+ 150 µl
1 µM	0,1 mmol/l	2µl VV + 2µl DMSO + 146µl K	20 µl VV + 20 µl DMSO + 1460 µl K	50 µl	+ 150 µl
5 µM	0,5 mmol/l	2 µl VV + 2 µ DMSO + 146 µl K	20 µl VV + 20 µ DMSO + 1460 µl K	50 µl	+ 150 µl
10 µM	1 mmol/l	2 µl VV + 2 µ DMSO + 146 µl K	20 µl VV + 20 µ DMSO + 1460 µl K	50 µl	+ 150 µl
50 µM	5 mmol/l	2 µl VV + 2µl DMSO + 146 µl K	20 µl VV + 20 µ DMSO + 1460 µl K	50 µl	+ 150 µl
100 µM	10 mmol/l	4 µl VV + 146 µl K	40 µl VV + 1460 µl K	50 µl	+ 150 µl
EMS pos.	0,5 mmol/l	2 µl VV + 146 µl K	20 µl VV + 1460 µl K	50 µl	+ 150 µl

3.2.2.3 Messung zum Nachweis der Kupferaufnahme durch *C. elegans*

Zur Bestimmung der von *C. elegans* aufgenommenen, d.h. der potentiell wirksamen Kupfermenge werden *C. elegans* in Flüssigkultur mit verschiedenen Kupferkonzentrationen inkubiert und der aufgenommene Kupfergehalt in den Testorganismen sowie der Restkupfergehalt im Testmedium mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) gemessen.

Jeweils ca. 6000 Nematoden pro ml Medium (Leitungswasser) werden in 10 ml Gesamtvolumen der Testlösung 14 Stunden lang mit 0,001 mmol/l, 0,005 mmol/l, 0,01 mmol/l, 0,05 mmol/l, 0,1 mmol/l, 0,5 mmol/l bzw. 1 mmol/l CuCl₂ inkubiert. Als Nahrungsquelle dienen 500 µl *E.coli*-Kulturlösung pro Testansatz. Nach der Inkubationszeit werden die Testorganismen durch Filterung (Filterporengröße 0,2 µm) vom Testmedium getrennt und die klaren Eluate in frischen Probenröhrchen aufgefangen. Die Rückstände werden in den Filtern bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und das Trockengewicht der Proben wird bestimmt. Die Filtrerrückstände einschließlich der Filter sowie die Eluate werden mit

Mikrowellenaufschluss aufgeschlossen. Dazu werden die Proben in Teflongefäße eingewogen und mit 2,5 ml 65% HNO₃ versetzt und die Gefäße anschließend mit einer Berstscheibe aus Metall und einem Teflonschraubdeckel fest verschlossen. Die Zugabe von Wasserstoffperoxid zum Reaktionsgemisch verhindert die Entstehung von Nitrosegasen. Nachdem die Proben ein Temperaturprogramm zum Aufschluss von organischem Material durchlaufen haben (5 min 120 °C, 8 min 150 °C und 20 min 200 °C) werden sie ca. 20 min abgekühlt. Der Aufschluss wird anschließend noch einmal gefiltert, damit möglicherweise noch vorhandene Kleinstpartikel den Probeneinlass am Messgerät nicht verstopfen, und anschließend auf ein definiertes Volumen (hier: 25 ml bzw. 50 ml) mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Die nun folgende Messung wird am Atomabsorptionsspektrometer AA-640 der Firma Varian mit Grafitrohr-Technik durchgeführt. Die Eichgerade wird mit Hilfe von Kupferstandardlösungen der Konzentrationen 5 µg/l, 10 µg/l und 20 µg/l bestimmt. Proben, die über diesen linearen Bereich hinausgehen, werden vor der Messung entsprechend verdünnt. Außerdem wird eine Leerprobe gemessen, diese Lösung enthielt nur die zum Aufschluss verwendeten Reagenzien, Salpetersäure und Wasserstoffperoxid, in den entsprechenden Konzentrationen. Dieser Hintergrundwert wird vom Messwert der Proben subtrahiert.

Das Messprinzip der Atomabsorptionsspektrometrie beruht auf der Resonanzabsorption von Gasen. Eine Hohlkatodenlampe mit dem zu bestimmenden Element als Kathode erzeugt aufgrund einer elektrischen Glimmentladung das Emissionsspektrum des Elements. Im Strahlengang befindet sich die Atomisierungseinheit, hier das Grafitrohr, das die Probe in den Gaszustand versetzt. Die Atome des zu bestimmenden Elements in der Probe absorbieren das Licht im Bereich der Resonanzlinie, so dass die Intensität der Strahlung abgeschwächt wird. Durch den Einsatz eines Monochromators kann nur der Wellenlängenbereich in der Nähe der Resonanzlinie betrachtet werden. Die Intensität wird am nachgeschalteten Detektor registriert. Die Abnahme der Intensität (dI) ist der Konzentration (c) des absorbierenden Elements [mol/l], der Intensität des einfallenden Strahls (I) und der infinitesimal kleinen Weglänge (ds) [cm] durch das absorbierende Medium proportional. Der Proportionalitätsfaktor ist der Extinktionskoeffizient (ϵ) [l/mol*cm], eine stoffspezifische Konstante deren Wert, bei konstanter Temperatur und Schichtdicke, von der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts abhängt ($\epsilon\lambda$). Dieser Zusammenhang wird durch das Lambert – Beer'sche Strahlungsgesetz, das die

Grundlage der Konzentrationsberechnung mittels spektrometrischer Methoden beschrieben. Das Gesetz ist jedoch nur für kleine Konzentrationen exakt, so dass zur Messung höherer Konzentrationen eine Bestimmung per Eichkurve erfolgt.

3.2.2.4 Messungen zur Überprüfung der erarbeiteten Methode

Messung der Lipidperoxidation

Zur Überprüfung der erarbeiteten Testmethode wird ein anderes, etabliertes Verfahren zur Bestimmung von oxidativem Stress unter, mit der ROS-Messung mit DHR, identischen Versuchsbedingungen angewendet.

Als eine der wichtigsten Folgereaktionen, die durch ein Überangebot an reaktiven Sauerstoffspezies eingeleitet wird, gilt die Lipidperoxidation. Es handelt sich dabei um eine radikalische Kettenreaktion, bei der mehrfach ungesättigte Fettsäuren oxidativ zerstört werden. Lipidperoxide und die Nebenprodukte der Reaktion schädigen die Membranen der Zelle durch Oxidation der Phospholipide und führen schließlich zum Verlust der Membranfunktion. Die Lipidperoxidation dient häufig als Indikator für oxidativen Stress in Zellen und Gewebeproben (Khan & Thomas 2004; Mateos, Goya et al. 2004). Durch Messung der stabilen Abbauprodukte der Lipidperoxide, Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxyalenal (HNE), lassen sich die Peroxidationsvorgänge in den Membranen quantifizieren.

Hier wird ein kommerzielles Testkit der Firma Calbiochem zur Bestimmung der Lipidperoxidation verwendet. Die Messung beruht auf der colorimetrischen Bestimmung von MDA und HNE, die durch die Reaktion mit zwei Molekülen N-Methyl-2-Phenylindole ein stabiles Chromophor mit Absorptionsmaximum bei 586 nm bilden. Durch Zugabe von 12 N HCl kann die Reaktion von 4-HNE unterbunden und damit MDA selektiv gemessen werden.

C. elegans wird mit unterschiedlichen Kupfer(II)-Konzentrationen (0 mmol/l, 0,01 mmol/l, 0,5 mmol/l, 1 mmol/l) und 0,1 mmol/l Menadion als Positivkontrolle in 10 ml Gesamtvolumen der Testlösung inkubiert. Als Testmedium dient Leitungswasser, *E. coli*-Kulturlösung wird als Nahrungsquelle zugegeben. Nach der Inkubationszeit von 14 Stunden wird die Testsubstanz durch drei Waschschrte entfernt, das Testmedium durch Tris-HCl Puffer ersetzt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Suspension wird auf ein Minimum reduziert und das Gewebe der Testorganismen anschließend auf Eiswasser mit Ultraschall aufgeschlossen und homogenisiert. Damit es während der Homogenisierung nicht zu weiteren Lipidperoxidationen kommt, die das Messsignal verfälschen und überdecken würden, wird

der Probe zuvor 10 µl/ml einer 0,5 M Butylhydroxytoluen (BHT)-Lösung zugegeben, die antioxidativ wirkt. Das Homogenat wird mit Tris-HCl bis zu einem Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt und anschließend bei 10000 x g zehn Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wird zur MDA-Messung benutzt und während der Vorbereitung ständig auf Eis gekühlt. 200 µl der Proben sowie 200 µl der Standards, die wie in der Versuchsanleitung beschrieben vorbereitet wurden, werden mit 650 µl N-Methyl-2-Phenylindol in Acetonitril vermischt. Durch Zugabe von 150 µl 12 N HCl und Inkubation bei 45°C wird die Reaktion des MDA mit dem Phenylindol katalysiert, so dass nach einer Stunde die Blaufärbung der Proben entsprechend ihrer MDA-Konzentration erkennbar ist. Die Messung erfolgt im multifunktionellen Spektrometer „Multidetection Microplate - Synergy“ der Firma Bio-Tek bei einer Wellenlänge von 586 nm. Das Messgerät wird über die KC4 „Microplate Data Analysis“ -Software gesteuert.

Laut Versuchsanleitung kann der Test nur durchgeführt, wenn die Proteinkonzentration in den Proben zwischen 15 und 60 mg/ml liegt. Zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Teil des Überstands 1:20 verdünnt und die Absorption bei 280 nm bestimmt. Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurde bovines Serum-Albumin (BSA) in den Konzentrationen 100 µg/ml und 1000 µg/ml als Standard gemessen.

ROS-Messung mit DHR123 nach Vorinkubation mit Ascorbinsäure

Ebenfalls zur Überprüfung des Messprinzips wird die Reaktion des Testsystems auf die Zugabe eines antioxidativ wirkenden Stoffes getestet. Dazu wird die ROS-Messung mit DHR123 mit Testorganismen, die mit Ascorbinsäure vorinkubiert wurden, durchgeführt. Vor der Zugabe der Referenzsubstanz Kupfer(II), die die Bildung von Hydroxylradikale katalysiert, werden die Testorganismen mit Ascorbinsäure in unterschiedlichen Konzentrationen (1, 10, 50, 100 µmol/l) in Flüssigmedium inkubiert. Dazu werden ebenfalls 2 ml Reaktionsgefäße verwendet, die Inkubation findet auch hier lichtgeschützt bei 20°C statt und die Inkubationszeit beträgt drei Stunden. Nach der Inkubation der Ascorbinsäure werden die Testansätze bei 150 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert. Dieser Waschvorgang wird zwei Mal wiederholt. Anschließend erfolgt die dreistündige Inkubation von 0,5 mmol/l Kupfer(II) und 25 µmol/l DHR123. Von einer Bakterienzugabe während der Säureinkubation wurde hier abgesehen, da dies bei einer Gesamtinkubationszeit von 6 Stunden nicht unbedingt

notwendig ist und die Bakterien möglicherweise mit der Säure reagieren. Die Versuchsanordnung gibt Tab. 6 wieder.

Nach dreistündiger Inkubation des Kupfer(II) und DHR123 wird die Reaktion wiederum durch drei Waschschriffe gestoppt. Die Testorganismen werden im Anschluss in 1 ml Medium aufgenommen. 200 µl dieser Suspension werden in je drei Vertiefungen einer 96er Mikrotiterplatte pipettiert und am Fluoreszenzspektrometer gemessen.

Tab. 6: Versuchsanordnung zur ROS-Messung mit DHR nach Vorinkubation mit Vitamin C.
Nr. = Nummer des Versuchsanstazes

Nr.	Konzentration Ascorbinsäure	Inkubation	Konzentration Kupfer(II)	Konzentration DHR123	Inkubation
1	0 µmol/l	3 Stunden bei 20°C, lichtgeschützt	0 mmol/l CuCl ₂	25 µmol/l DHR	3 Stunden bei 20°C, lichtgeschützt
2	10 µmol/l		0 mmol/l CuCl ₂	25 µmol/l DHR	
3	0 µmol/l		0,5 mmol/l CuCl ₂	25 µmol/l DHR	
4	1 µmol/l		0,5 mmol/l CuCl ₂	25 µmol/l DHR	
5	10 µmol/l		0,5 mmol/l CuCl ₂	25 µmol/l DHR	
6	50 µmol/l		0,5 mmol/l CuCl ₂	25 µmol/l DHR	
7	100 µmol/l		0,5 mmol/l CuCl ₂	25 µmol/l DHR	

3.2.2.5 Methoden der statistischen Analyse

Mit Ausnahme einiger Messungen im Rahmen der Vorversuche und der Bestimmung der Lipidperoxidation werden alle Messungen mindestens dreimal durchgeführt und jede Konzentration wird pro Messung dreimal bestimmt. Als Messergebnis gilt der Mittelwert der Dreifachbestimmung. Als Basis für weitere Berechnungen werden Mittelwert und Standardabweichung der Messergebnisse bestimmt. In diese Berechnung gehen alle Messergebnisse ein, die nicht durch den zuvor durchgeführten Ausreißertest nach Grubbs als zufällige Abweichungen erkannt werden. Dies ist der Fall, wenn der berechnete Prüfwert größer als der von der Anzahl der Wiederholungsmessungen (n) abhängige kritische Wert des Grubbstests für das Signifikanzniveau $\alpha = 0,1$ (P = 90%) ist.

Die Signifikanz zwischen den Testergebnissen der Testlösungen und den der entsprechenden Negativkontrollen werden mittels Student's t-test ermittelt. Der t-test wird beidseitig unter Annahme einer Normalverteilung durchgeführt. Der berechnete Prüfwert (PG) wird mit den Quantilen der t-Verteilung für $\alpha = 0,05$ der entsprechenden Freiheitsgrade verglichen. PG-Werte kleiner als $t_{\alpha,FG}$ werden als statistisch

signifikant gewertet. Bei der Berechnung des t-tests mit MS Excel werden $PG < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

Die Homogenität der Varianzen wurde mittels F-Test überprüft. Der Quotient zweier Varianzen ($PG < 1$) wird gegen die Quantile der F-Verteilung für $FG_1 = 2$, $FG_2 = 2$ und dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ bzw. $\alpha = 0,025$ getestet. PG-Werte kleiner als t_{α, FG_1, FG_2} werden als statistisch signifikant gewertet.

3.2.3 Methoden der Etablierung und Bewertung von Biotests zur akuten Toxizität, Reproduktions- und Wachstumstoxizität mit dem Modellorganismus *C. elegans* am Beispiel der Toxine Acrylamid, Benzo(a)pyren, Kupfer(II)chlorid und Ethylmethansulfonat

3.2.3.1 Tests auf akute Toxizität in flüssigem Medium

Vorversuche zum geeigneten Medium

Um die in Wasser relativ unlösliche Testsubstanz BaP (ATSDR 1995; Irwin et al. 1997) in einem flüssigen Medium zu lösen, wurde sie zuerst mit dem Lösungsmittel DMSO vermengt (Williams & Dusenbery 1988). Zu testen war, in welchem Medium DMSO bei *C. elegans* die geringste Letalität aufweist.

Zur Durchführung dieser Tests wurden *C. elegans* mit Hilfe der Eggprep-Methode alterssynchronisiert. Zur Auswahl standen die drei verschiedenen Medien Eggbuffer, K- und S-Medium.

In die einzelnen Testkammern einer 96 well-Mikrotiterplatte wurden zunächst zwischen 2 μ l und 10 μ l DMSO vorgelegt. Dann erfolgt die Zugabe von 180 μ l bis 188 μ l des jeweiligen Mediums mit einer 100-1000 μ l-Pipette. Anschließend wurden 10 μ l Wurmsuspension dazu pipettiert, wodurch sich ein Gesamtvolumen von 200 μ l ergab.

Die Wurmsuspension wurde zuvor auf ungefähr 10 Nematoden pro 10 μ l eingestellt. Dazu werden die drei Tage alten Nematoden mit M9-Puffer von ihren Agarplatten in 15 ml-Röhrchen gewaschen und die enthaltene Suspension durch drei Waschschriffe von den *E. coli*-Bakterien gereinigt, da laut OECD-Richtlinien (1984, 1992) und Donkin & Williams (1995) bei 24 h dauernden Tests keine Nahrungsmittelgabe notwendig ist. Die auf 10 ml reduzierte Suspension ist durch leichtes Schwenken des Röhrchens zu homogenisieren. Daraufhin wurden zehnmal 10 μ l davon auf einen Objektträger pipettiert. Nach der unter dem Binokular durchgeführten Auszählung der darin enthaltenen Nematoden wurde der Mittelwert gebildet, welcher die Anzahl der Nematoden in 10 μ l wiedergibt, so dass die gesamte Suspension derart mit M9-

Puffer verdünnt oder nach Zentrifugation reduziert werden konnte, dass in dem einzusetzenden Suspensionsvolumen ca. 10 Nematoden enthalten waren.

Nach Überprüfung der genauen Nematodenanzahl pro Testansatz und der schriftlichen Dokumentation der Ergebnisse wurde die Mikrotiterplatte zur Inkubation über Nacht lichtgeschützt in einen Kühlbrutschrank bei 20 °C gestellt. Die Auswertung des Tests fand 24 h später statt. Wie viele der eingesetzten Nematoden noch lebendig waren, wurde durch visuelle Überprüfung der Bewegung festgestellt. Lag keine Bewegung mehr vor, wurde der Nematode durch vorsichtige Berührung mit einem Platindraht stimuliert (OECD 1984; Williams & Dusenbery 1990; Donkin & Williams 1995; Cressman & Williams 1997; Khanna et al. 1997; Tatara et al. 1997; Freeman et al. 1998; Hitchcock et al. 1997, 1998; Dhawan et al. 1999, 2000; Williams & Anderson 2000; Ura et al. 2002). Als Negativkontrolle wurde nur Medium mit Wurmsuspension eingesetzt. Die gesamte Versuchsanordnung gibt Tab. 7 wieder.

Alle Konzentrationen wurden in dreifacher Ausführung getestet. Um drei unabhängige Tests zu erhalten, wurden sie noch zweimal zu späteren Zeitpunkten wiederholt.

Tab. 7: Zusammenstellung der für die Bestimmung des am besten geeigneten Mediums ausgearbeiteten. K = Bezeichnung der Konzentration des Testansatzes

K	Zugabe DMSO [µl]	Zugabe Medium [µl]	Zugabe Wurm-suspension [µl]	Gesamtvolumen [µl]	DMSO-Konzentration [%]
0	0	190	10	200	0
1	2	188	10	200	1
2	4	186	10	200	2
3	6	184	10	200	3
4	8	182	10	200	4
5	10	180	10	200	5

Vorversuche zur geeigneten Lösungsmittelkonzentration

Bei der Überprüfung der Toxizität von wasserunlöslichen Substanzen fand das Lösungsmittel DMSO Anwendung, dessen Giftigkeit *C. elegans* gegenüber als sehr gering beschrieben wird (Williams & Dusenbery 1988). Um zu bestimmen, in welcher Konzentration DMSO Individuen von *C. elegans* am wenigsten beeinflusst, wurden adulte Nematoden in flüssiges Medium mit DMSO-Konzentrationen von 0,5 bis 5 % gegeben und ihr Verhalten nach 10, 30 und 60 min, 24, 48, 72 und 96 h beobachtet und dokumentiert. Die Beurteilung des Verhaltens erstreckte sich auf Schnelligkeit und Ausmaß der Bewegungen, auf das Vorkommen und die Längen von Pausen

dazwischen sowie auf das selbständige, unstimulierte Ausführen dieser Bewegungen.

Mittels Hypochlorit-Methode alterssynchronisierte *C. elegans* wurden nach drei Tagen als adulte Nematoden zur Durchführung dieses Tests eingesetzt.

In die Testkammern einer 12 well-Gewebekulturplatte wurden zuerst DMSO-Volumina von 10 bis 100 μl mit einer 10-100 μl -Pipette vorgelegt. Dann erfolgte die Zugabe von 1850 bis 1940 μl an K-Medium. Die Beifügung von 50 μl Wurm-suspension mit durchschnittlich 5 enthaltenen Testorganismen führte zu einem Gesamtvolumen von 2000 μl .

Nachdem die Nematoden mit M9-Puffer von ihren Agarplatten in 15 ml-Röhrchen gewaschen wurden, fanden keine weiteren Waschschrte mehr statt, da dieser Test 96 h andauerte, und daher Nahrung in Form von *E. coli*-Bakterien erforderlich war (Donkin & Williams 1995). Von der auf 10 ml reduzierten, durch Schwenken homogenisierten Wurmsuspension wurden zehnmal 50 μl auf einen Objektträger pipettiert. Nach der Auszählung unter dem Binokular und dem Erhalt der Nematodenanzahl in 50 μl durch die anschließende Mittelwertbildung, wurde die gesamte Suspension mit M9-Puffer verdünnt oder durch Zentrifugation reduziert, um im einzusetzenden Suspensionsvolumen ca. 5 Nematoden aufzuweisen.

Nach optischen Überprüfungen und Niederschrift der Anzahlen und des Verhaltens der Nematoden wurde die Gewebekulturplatte abgedeckt zur weiteren Inkubation bei 20°C im Kühlbrutschrank aufbewahrt und nach den jeweiligen Inkubationszeiten ausgewertet. Bewegungslose Nematoden waren dabei durch vorsichtige Berührungen mit einem Platindraht anzuregen.

Die Negativkontrolle bestand lediglich aus Wurmsuspension in Medium ohne Zusatz von DMSO. In Tab. 8 findet sich das Design dieses Versuches.

Tab. 8: Zusammenstellung der zur Bestimmung der am besten geeigneten Lösungsmittelkonzentration ausgearbeiteten Pipettiervorschrift. K = Bezeichnung der Konzentration des Testansatzes

K	Zugabe DMSO [μl]	Zugabe Medium [μl]	Zugabe Wurm-suspension [μl]	Gesamtvolumen [μl]	DMSO-Konzentration [%]
0	0	1950	50	2000	0
1	10	1940	50	2000	0,5
2	20	1930	50	2000	1
3	40	1910	50	2000	2
4	60	1890	50	2000	3
5	80	1870	50	2000	4
6	100	1850	50	2000	5

Versuche zur akuten Toxizität von Acrylamid

Für die Quantifizierung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von AcL in *C. elegans* in Form der LC50 wurden Letalitätstests in flüssigem Medium durchgeführt. Nematoden im L1-Larvalstadium wurden in K-Medium mit verschiedenen AcL-Konzentrationen für eine Dauer von 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit war die Anzahl der noch lebenden Testorganismen aufzuzeichnen.

In diesen Tests zur Messung akuten Toxizität wurden Nematoden einen Tag nach der Alterssynchronisierung durch die Hypochlorit-Methode verwendet. Zunächst wurden 2 µl Testlösung in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit 96 Testkammern pipettiert, die verschiedenen Testlösungen enthalten unterschiedliche Konzentrationen von AcL. Die einzusetzenden AcL-Lösungen müssen wegen der 1:100-Verdünnung durch das Testmedium um den Faktor 100 höher konzentriert sein als die im Test erwünschten Gesamtkonzentrationen. Es folgte die Zugabe von 188 µl K-Medium mit Hilfe einer 100-1000 µl-Pipette, wobei die Lösungen durch wiederholtes Aufziehen und Zurückgeben gut miteinander zu vermischen waren. Mit dem nachfolgenden Zufügen von 10 µl Wurmsuspension addierte sich das Gesamtvolumen eines Testansatzes zu 200 µl.

In 10 µl der hier verwendeten Wurmsuspension sollten sich etwa 5 Testorganismen befinden. Die tags zuvor alterssynchronisierten Nematoden konnten direkt aus den 10 ml Flüssigkultur auf einen Objektträger pipettiert werden. Der Auszählung unter dem Binokular und Mittelwertbildung folgte die Einstellung der Suspension auf 5 Nematoden pro 10 µl.

Die genaue Anzahl der den Testansätzen zugegebenen Individuen von *C. elegans* war mit Hilfe des Mikroskops auszuzählen und schriftlich festzuhalten. Nach Abschluss der Zählungen kamen die Tests für 24 h Inkubationsdauer geschützt vor Licht bei 20°C in den Kühlbrutschrank. Hiernach wurde die Anzahl der noch lebenden Nematoden festgehalten, wobei reglose Nematoden mit einem Platindraht sanft anzustoßen waren, um ihr Überleben feststellen zu können.

Die Negativkontrolle enthielt außer Wurmsuspension und Medium nur reines DMSO als Testlösung, kein Acrylamid. Tab. 9 präsentiert diesen Testaufbau.

Alle Konzentrationen waren in dreifacher Ausführung zu testen. Die Tests wurden zu späteren Zeitpunkten mehrfach wiederholt.

Tab. 9: Zusammenstellung der Pipettiervorschrift für die Tests der akuten Toxizität von Acrylamid in flüssigem Medium.

K = Bezeichnung der Konzentration des Testansatzes

Zugabe Testlsg. [μ l] = eingesetztes Volumen der Testlösung (=AcL in DMSO) in μ l

Substanzkonz. [mM] = AcL-Konzentration in der Testlösung in mmol/l

Gesamtkonz. [mM] = AcL-Konzentration im Gesamtvolumen eines Ansatzes in mmol/l

K	Zugabe Testlsg. [μ l]	Zugabe Medium [μ l]	Zugabe Wurm susp. [μ l]	Gesamtvol. [μ l]	DMSO-Konz. [%]	Substanzkonz. [mmol/l]	Gesamtkonz. [mmol/l]
0	2	188	10	200	1	0	0
1	2	188	10	200	1	10	0,1
2	2	188	10	200	1	20	0,2
3	2	188	10	200	1	30	0,3
4	2	188	10	200	1	40	0,4
5	2	188	10	200	1	50	0,5
6	2	188	10	200	1	100	1
7	2	188	10	200	1	150	1,5
8	2	188	10	200	1	200	2
9	2	188	10	200	1	250	2,5
10	2	188	10	200	1	400	4
11	2	188	10	200	1	500	5
12	2	188	10	200	1	600	6
13	2	188	10	200	1	800	8
14	2	188	10	200	1	1000	10
15	2	188	10	200	1	1500	15
16	2	188	10	200	1	2000	20
17	2	188	10	200	1	2500	25
18	2	188	10	200	1	3000	30
19	2	188	10	200	1	3500	35
20	2	188	10	200	1	4000	40
21	2	188	10	200	1	5000	50
22	2	188	10	200	1	6000	60
23	2	188	10	200	1	7000	70

Versuche zur akuten Toxizität von Benzo(a)pyren

Um Tests der akuten Toxizität von BaP in Flüssigmedium auszuführen, musste eine Pipettiervorschrift erarbeitet werden, welche ein Wiederfinden der in den Test eingesetzten Nematoden ermöglichte. Da BaP kaum löslich in Wasser ist, wurde das Lösungsmittel DMSO verwendet. Seine Anwendung wird wegen der geringen Toxizität bereits 1988 von Williams & Dusenbery befürwortet. Zunächst wurden Ansätze mit verschiedenen Gesamtvolumina, Medien und DMSO-Konzentrationen angefertigt. Zu kontrollieren war, ob BaP als Niederschlag ausfiel und ob die Testorganismen in den Ansätzen unter dem Binokular gut zu erkennen waren.

1. Gesamtvolumen = 200 μ l; 2 μ l Testlösung, 188 μ l Medium (K-Medium) und 10 μ l Wurmsuspension; DMSO-Konzentration = 1 %; Ansatz in Mikrotiterplatten mit 96 Testkammern.
2. Gesamtvolumen = 1000 μ l; 10 μ l Testlösung und 990 μ l Medium (K-Medium, PBS und autoklaviertes Leitungswasser); DMSO-Konzentration = 1 %, Ansatz in Gewebekulturplatten mit 24 Testkammern ohne Nematoden.
3. Gesamtvolumen = 2000 μ l; 20 μ l Testlösung, 1970 μ l Medium (K-Medium, PBS und autoklaviertes Leitungswasser) und 10 μ l Wurmsuspension; DMSO-Konzentration = 1 %; Ansatz in Gewebekulturplatten mit 24 Testkammern.
4. Gesamtvolumen = 1000 μ l; 10 μ l Testlösung, 40 μ l DMSO, 940 μ l Medium (Autoklaviertes Leitungswasser) und 10 μ l Wurmsuspension; DMSO-Konzentration = 5 %; Ansatz in Gewebekulturplatten mit 24 Testkammern.
5. Gesamtvolumen = 200 μ l; 2 μ l Testlösung, 6 μ l DMSO, 188 μ l Medium (Autoklaviertes Leitungswasser) und 10 μ l Wurmsuspension; DMSO-Konzentration = 4 %; Ansatz in Mikrotiterplatten mit 96 Testkammern.

Beschreibung des 5. Versuches zur Ermittlung der Pipettivorschrift für die akuten Toxizitätstests mit BaP:

2 μ l der Testlösungen mit Konzentrationen von 0 bis 50 mmol/l BaP in DMSO wurden in die Vertiefungen einer 96 well-Mikrotiterplatte vorgelegt. Damit sich keine Ausfällung ereignete, wurden zusätzlich 6 μ l reines DMSO zugegeben. Durch die Vermischung dieser Lösung mit 182 μ l autoklaviertem Leitungswasser als Medium ergab sich eine Verdünnung um den Faktor 1:100, und es resultierten Gesamtkonzentrationen von 0 bis 500 μ mol/l BaP für die einzelnen Testansätze. 10 μ l Wurmsuspension mit durchschnittlich ca. 5 enthaltenen Testorganismen, alterssynchron im L1-Stadium, wurden dazu pipettiert.

Die am Vortag alterssynchronisierten Nematoden befanden sich in Suspension in M9-Puffer in 15 ml-Röhrchen. Hieraus konnten direkt zehnmal 10 μ l auf einen Objektträger pipettiert und unter dem Binokular ausgezählt werden. Nach der Bildung eines Mittelwertes für die Anzahl der Nematoden in 10 μ l, war dieser durch Verdünnen oder Reduzieren auf ungefähr 5 einzustellen.

Pro Testansatz wurde die genaue Anzahl der eingesetzten *C. elegans* festgestellt und schriftlich festgehalten. Die geschlossene Mikrotiterplatte wurde dann zur Inkubation für 24 h in den auf 20°C eingestellten Kühlbrutschrank gestellt. Am nächsten Tag erfolgten Auszählung der lebenden Nematoden und Dokumentation

der Ergebnisse. Um bei bewegungslosen Testorganismen Überleben zu ermitteln, wurden sie durch Berührungen mit einem Platindraht stimuliert.

In den Negativkontrollen fand sich kein BaP, sondern neben Medium und Wurmsuspension nur reines DMSO als Testlösung. In den (Tab. 10, Tab. 11, Tab. 12, Tab. 13 und Reproduktions- und Wachstumstests auf festem Medium

Durch ein in dieser Studie zu erarbeitendes Testsystem sollen die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen verschiedener Substanzen in *C. elegans* in Form von EC50-Werten quantifiziert werden. Es folgt eine Beschreibung der Methoden zu Ausarbeitung und Optimierung.

Zur Durchführung dieser Tests wurden *C. elegans* mit Hilfe der Eggprep-Methode alterssynchronisiert. Nach der Inkubation in M9-Puffer über Nacht wurden 24 h alte Larven auf Kulturplatten gesetzt, in deren Agar die zu testenden Substanzen enthalten waren. Die längere Testdauer machte *E. coli*-Bakterien auf den Agarplatten als Nahrung nötig.

Um die Testsubstanzen in ein festes Medium zu bringen, wurden sie zuerst in verschiedenen Konzentrationen mit dem Lösungsmittel DMSO vermengt. Diese Testlösungen waren beim Gießen der im Test verwendeten Kulturplatten mit NGM-Agar in erhitztem Zustand zu mischen. 30 µl davon wurden in eine Petrischale mit 35 mm Durchmesser gegeben, bevor 2970 µl NGM-Agar eingefüllt wurden, und die Platte zur Verteilung der Testlösung im Agar geschwenkt werden musste.

Anschließend an ihre Trocknung in der sterilen Arbeitsbank wurden die Testplatten mit einer am Tag zuvor angesetzten Bakteriensuspension beimpft und über Nacht bei 37°C in den Brutschrank gestellt, damit sich ein dichter Bakterienrasen entwickeln konnte. Aus der Wurmsuspension mit den alterssynchronen, einen Tag alten Nematoden wurden mit einer 1-10 µl-Pipette etwa 2 µl entnommen und die darin enthaltenen Testorganismen auf die für den Test vorbereiteten NGM-Agarplatten gegeben. Die Belegung der Testplatten sollte durchschnittlich 5 Individuen erreichen. Danach wurden die Platten abgedeckt und zur Inkubation lichtgeschützt in einen Kühlbrutschrank bei 20°C gestellt.

Tab. 14) werden die jeweiligen Testdesigns gezeigt.

Alle Konzentrationen wurden in dreifacher Ausführung getestet. Test 4 wurde zu späteren Zeitpunkten wiederholt.

Tab. 10: Zusammenstellung der Pipettivorschrift für Versuch 1 zu den Tests der akuten Toxizität von Benzo(a)pyren in flüssigem Medium

Zugabe Testlsg. [μl] = eingesetztes Volumen der Testlösung (=BaP in DMSO) in μl

Substanzkonz. [mmol/l] = BaP-Konzentration in der Testlösung in mmol/l

Gesamtkonz. [$\mu\text{mol/l}$] = BaP-Konzentration im Gesamtvolumen eines Ansatzes in $\mu\text{mol/l}$

K	Zugabe Testlsg. [μl]	Zugabe Medium [μl]	Zugabe Wurm susp. [μl]	Gesamt -vol. [μl]	DMSO-Konz. [%]	Substanzkonz. [mmol/l]	Gesamtkonz. [$\mu\text{mol/l}$]
0	2	188	10	200	1	0	0
1	2	188	10	200	1	1	10
2	2	188	10	200	1	2	20
3	2	188	10	200	1	5	50
4	2	188	10	200	1	8	80
5	2	188	10	200	1	10	100
6	2	188	10	200	1	15	150
7	2	188	10	200	1	20	200
8	2	188	10	200	1	25	250
9	2	188	10	200	1	30	300
10	2	188	10	200	1	35	350
11	2	188	10	200	1	40	400
12	2	188	10	200	1	45	450
13	2	188	10	200	1	50	500

Tab. 11: Zusammenstellung der Pipettivorschrift für Versuch 2 zu den Tests der akuten Toxizität von Benzo(a)pyren in flüssigem Medium

Zugabe Testlsg. [μl] = eingesetztes Volumen der Testlösung (=BaP in DMSO) in μl

Substanzkonz. [mmol/l] = BaP-Konzentration in der Testlösung in mmol/l

Gesamtkonz. [$\mu\text{mol/l}$] = BaP-Konzentration im Gesamtvolumen eines Ansatzes in $\mu\text{mol/l}$

K	Zugabe Testlsg. [μl]	Zugabe Medium [μl]	Zugabe Wurm susp. [μl]	Gesamt -vol. [μl]	DMSO-Konz. [%]	Substanzkonz. [mmol/l]	Gesamtkonz. [$\mu\text{mol/l}$]
0	20	990	0	1000	1	0	0
1	20	990	0	1000	1	5	50
2	20	990	0	1000	1	10	100
3	20	990	0	1000	1	20	200
4	20	990	0	1000	1	30	300
5	20	990	0	1000	1	50	500

Tab. 12: Zusammenstellung der Pipettiervorschrift für Versuch 3 zu den Tests der akuten Toxizität von Benzo(a)pyren in flüssigem Medium

Zugabe Testlsg. [μl] = eingesetztes Volumen der Testlösung (=BaP in DMSO) in μl

Substanzkonz. [mmol/l] = BaP-Konzentration in der Testlösung in mmol/l

Gesamtkonz. [$\mu\text{mol/l}$] = BaP-Konzentration im Gesamtvolumen eines Ansatzes in $\mu\text{mol/l}$

K	Zugabe Testlsg. [μl]	Zugabe Medium [μl]	Zugabe Wurm-susp. [μl]	Gesamt -vol. [μl]	DMSO-Konz. [%]	Substanzkonz. [mmol/l]	Gesamtkonz. [$\mu\text{mol/l}$]
0	20	1970	10	2000	1	0	0
1	20	1970	10	2000	1	5	50
2	20	1970	10	2000	1	10	100
3	20	1970	10	2000	1	20	200
4	20	1970	10	2000	1	30	300
5	20	1970	10	2000	1	50	500

Tab. 13: Zusammenstellung der Pipettiervorschrift für Versuch 4 zu den Tests der akuten Toxizität von Benzo(a)pyren in flüssigem Medium

Zugabe Testlsg. [μl] = eingesetztes Volumen der Testlösung (=BaP in DMSO) in μl

DMSO-Konz. [%] = Konzentration des Lösungsmittels DMSO in Prozent

Substanzkonz. [mmol/l] = BaP-Konzentration in der Testlösung in mmol/l

Gesamtkonz. [$\mu\text{mol/l}$] = BaP-Konzentration im Gesamtvolumen eines Ansatzes in $\mu\text{mol/l}$

K	Zugabe Testlsg. [μl]	Zugabe DMSO [μl]	Zugabe Medium [μl]	Zugabe Wurm-susp. [μl]	Gesamt-vol. [μl]	DMSO-Konz. [%]	Substanzkonz. [mmol/l]	Gesamtkonz. [$\mu\text{mol/l}$]
0	10	40	940	10	1000	5	0	0
1	10	40	940	10	1000	5	5	50
2	10	40	940	10	1000	5	10	100
3	10	40	940	10	1000	5	20	200
4	10	40	940	10	1000	5	30	300
5	10	40	940	10	1000	5	50	500

3.2.3.2 Reproduktions- und Wachstumstests auf festem Medium

Durch ein in dieser Studie zu erarbeitendes Testsystem sollen die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen verschiedener Substanzen in *C. elegans* in Form von EC50-Werten quantifiziert werden. Es folgt eine Beschreibung der Methoden zu Ausarbeitung und Optimierung.

Zur Durchführung dieser Tests wurden *C. elegans* mit Hilfe der Eggprep-Methode alterssynchronisiert. Nach der Inkubation in M9-Puffer über Nacht wurden 24 h alte Larven auf Kulturplatten gesetzt, in deren Agar die zu testenden Substanzen enthalten waren. Die längere Testdauer machte *E. coli*-Bakterien auf den Agarplatten als Nahrung nötig.

Um die Testsubstanzen in ein festes Medium zu bringen, wurden sie zuerst in verschiedenen Konzentrationen mit dem Lösungsmittel DMSO vermischt. Diese

Testlösungen waren beim Gießen der im Test verwendeten Kulturplatten mit NGM-Agar in erhitztem Zustand zu mischen. 30 µl davon wurden in eine Petrischale mit 35 mm Durchmesser gegeben, bevor 2970 µl NGM-Agar eingefüllt wurden, und die Platte zur Verteilung der Testlösung im Agar geschwenkt werden musste.

Anschließend an ihre Trocknung in der sterilen Arbeitsbank wurden die Testplatten mit einer am Tag zuvor angesetzten Bakteriensuspension beimpft und über Nacht bei 37°C in den Brutschrank gestellt, damit sich ein dichter Bakterienrasen entwickeln konnte. Aus der Wurmsuspension mit den alterssynchonen, einen Tag alten Nematoden wurden mit einer 1-10 µl-Pipette etwa 2 µl entnommen und die darin enthaltenen Testorganismen auf die für den Test vorbereiteten NGM-Agarplatten gegeben. Die Belegung der Testplatten sollte durchschnittlich 5 Individuen erreichen. Danach wurden die Platten abgedeckt und zur Inkubation lichtgeschützt in einen Kühlbrutschrank bei 20°C gestellt.

Tab. 14: Zusammenstellung der Pipettiervorschrift für die Tests der akuten Toxizität von Benzo(a)pyren in flüssigem Medium

Zugabe Testlsg. [µl] = eingesetztes Volumen der Testlösung (=BaP in DMSO) in µl

DMSO-Konz. [%] = Konzentration des Lösungsmittels DMSO in Prozent

Substanzkonz. [mmol/l] = BaP-Konzentration in der Testlösung in mmol/l

Gesamtkonz. [µmol/l] = BaP-Konzentration im Gesamtvolumen eines Ansatzes in µmol/l

K	Zugabe Testlsg. [µl]	Zugabe DMSO [µl]	Zugabe Medium [µl]	Zugabe Wurm-susp. [µl]	Gesamt-vol. [µl]	DMSO-Konz. [%]	Substanz-konz. [mmol/l]	Gesamt-konz. [µmol/l]
0	2	6	182	10	200	4	0	0
1	2	6	182	10	200	4	0,01	0,1
2	2	6	182	10	200	4	0,05	0,5
3	2	6	182	10	200	4	0,1	1
4	2	6	182	10	200	4	0,2	2
5	2	6	182	10	200	4	0,5	5
6	2	6	182	10	200	4	1	10
7	2	6	182	10	200	4	1,5	15
8	2	6	182	10	200	4	2	20
9	2	6	182	10	200	4	3	30
10	2	6	182	10	200	4	5	50
11	2	6	182	10	200	4	10	100
12	2	6	182	10	200	4	20	200
13	2	6	182	10	200	4	30	300
14	2	6	182	10	200	4	50	500

Die Größe der Nematoden wurde dokumentiert, auch die Anzahl ihre nachkommen nach einer Inkubationszeit von 72 h aufgeschrieben.

Alle Konzentrationen wurden in dreifacher Ausführung getestet. Im NGM-Agar der Negativkontrollen war keine Testsubstanz, sondern nur reines DMSO beinhaltet.

In Tab.15 ist der gesamte Aufbau dieser Testreihen einzusehen.

Tab.15: Zusammenstellung der für die Messung der Reproduktionstoxizität ausgearbeiteten Pipettiervorschrift für das zu erstellende Festmedium.

Zugabe Testlsg. [μ l] = eingesetztes Volumen der Testsubstanz gelöst in DMSO in μ l

Gesamtvolumen [μ l] = Gesamtvolumen (Medium + Testsubstanz) pro Testansatz

Substanzkonz. [mmol/l] = Konzentration der jeweiligen Substanz in der Testlösung in mmol/l

Gesamtkonz. [μ mol/l] = Konzentration der jeweiligen Substanz im Gesamtvolumen in μ mol/l

Ø Nematodenanzahl = durchschnittliche Anzahl Testorganismen pro Testplatte

K	Zugabe Testlsg. [μ l]	Zugabe NGM-Agar [μ l]	Gesamtvolumen [μ l]	Substanzkonz. [mmol/l]	Gesamtkonz. [μ mol/l]	DMSO-Konz. [%]	Ø Nematodenanzahl
0	30	2970	3000	0	0	1	5
ACRYLAMID							
1	30	2970	3000	1	10	1	5
2	30	2970	3000	5	50	1	5
3	30	2970	3000	10	100	1	5
4	30	2970	3000	100	1000	1	5
5	30	2970	3000	1000	10000	1	5
6	30	2970	3000	2500	25000	1	5
7	30	2970	3000	10000	100000	1	5
BENZO(A)PYREN							
1	30	2970	3000	0,01	0,1	1	5
2	30	2970	3000	0,05	0,5	1	5
3	30	2970	3000	0,1	1	1	5
4	30	2970	3000	1	10	1	5
5	30	2970	3000	5	50	1	5
6	30	2970	3000	10	100	1	5
7	30	2970	3000	100	1000	1	5
KUPFER(II)CHLORID							
1	30	2970	3000	0,1	1	1	5
2	30	2970	3000	0,5	5	1	5
3	30	2970	3000	1	10	1	5
4	30	2970	3000	10	100	1	5
5	30	2970	3000	100	1000	1	5
6	30	2970	3000	1000	10000	1	5
7	30	2970	3000	10000	100000	1	5
ETHYLMETHANSULFONAT							
1	30	2970	3000	1	10	1	5
2	30	2970	3000	5	50	1	5
3	30	2970	3000	10	100	1	5
4	30	2970	3000	100	1000	1	5
5	30	2970	3000	1000	10000	1	5
6	30	2970	3000	9420	94200	1	5

3.2.3.3 Reproduktions- und Wachstumstests in flüssigen Medien

Eine Quantifizierung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung verschiedener Substanzen in *C. elegans* in Form von EC50-Werten kann auch über die Bestimmung der Reproduktionstoxizität nach Inkubation in flüssigem Medium erreicht werden. Es folgt eine Schilderung der in der Bearbeitung genutzten Methoden.

Bei den Tests wurden alterssynchrone Larven im L1-Stadium einen Tag nach der Behandlung mit Hypochlorit in 1 ml Flüssigmedium eingesetzt, welches mit den zu testenden Substanzen versehen war. Die Testsubstanzen wurden in den interessierenden Konzentrationen mit autoklaviertem Leitungswasser bzw. DMSO als Lösungsmittel vermischt. Als Medium dienten Suspensionen von K-Medium bzw.

autoklaviertem Leitungswasser und *E. coli*-Bakterien des OP50-Stammes als Nahrungsquelle, da die Inkubationsdauer drei Tage betrug und daher eine Nahrungsquelle erforderlich ist (Donkin & Williams 1995; Hitchcoch et al . 1997, 1998).

Damit genügend Bakterien vorhanden waren, wurde die optische Dichte der Suspension auf 2 eingestellt. Die genutzte Bakteriensuspension wurde unter dem Abzug in sterilen Bedingungen um den Faktor 1:20 verdünnt (50 µl Bakteriensuspension + 950 µl Aqua deion. wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert). Bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm war zunächst das Spektrophotometer mit Hilfe von Aqua deion. zu auto-referenzieren, daraufhin konnte die OD der verdünnten Suspension bestimmt werden. Der wahre Wert y der OD der Suspension ergibt sich aus der Multiplikation des Messwertes x mit dem Verdünnungsfaktor 20. Für das benötigte Volumen Bakteriensuspension wird der Sollwert der OD durch den tatsächlichen Wert y geteilt und - einem einfachen Dreisatz entsprechend - mit dem benötigten Volumen Medium multipliziert:

$$x * 20 = y \quad \Rightarrow \quad V_{\text{Bakteriensuspension}} = \left(\frac{2,00}{y} \right) * V_{\text{Medium}}$$

Das Volumen des Mediums berechnet sich aus der pro Testansatz verwendeten Menge Nährmedium (940 bzw. 945 µl) multipliziert mit den Anzahlen der Wiederholungen (= 3) und der verschiedenen Ansätze von Kontrollen und Testkonzentrationen:

$$V_{\text{Medium}} = 940 \text{ bzw. } 945 \text{ µl} * 3 * \# (\text{Kontrollen} + \text{Konzentrationen})$$

Das jeweils benötigte Volumen Bakteriensuspension aus (1) wurde in der sterilen Arbeitsbank abgemessen, in verschließbare 15 ml-Röhrchen gefüllt und für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands mit der Vakuumpumpe konnte das Pellet in dem nach (2) berechneten Volumen der verschiedenen Medien resuspendiert werden.

In die Testkammern einer 24 well-Gewebekulturplatte wurden 50 µl Wurmsuspension mit etwa 24 h alten Nematoden vorgelegt, die vorher unter dem Binokular ausgezählt und durch Verdünnen oder Reduzieren auf etwa 10 bis 20 Individuen pro 50 µl eingestellt wurden, was nun ebenfalls unter dem Mikroskop nachgeprüft wurde. Als nächstes wurde die jeweils gebrauchte Menge Nährmedium (= Medium-Bakterien-Suspension) zugegeben (940 bzw. 945 µl). Mit der Beimengung von 10 bzw. 5 µl Testlösung ergab sich ein Volumen von 1000 µl pro Testsansatz.

Die Platten wurden dann verschlossen und zur Inkubation für drei Tage lichtgeschützt im Kühlbrutschrank bei 20°C untergebracht. Damit eine optimale Verteilung der Substanzen gewährleistet werden konnte, wurden diese Testplatten jeden Tag mindestens zweimal für eine Dauer von 10 bis 15 min auf eine kleine Rüttelplatte gestellt. Von einer drei Tage andauernden Vermischung durch den Minishaker MS1 wurde abgesehen, nachdem die Ergebnisse einer gesamten Testreihe infolge übermäßiger Erwärmung durch dieses Gerät verfälscht wurden.

Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden die Versuchstiere aus jeder Testkammer in 2 ml-Reaktionsgefäße pipettiert, zentrifugiert und reduziert, mit M9 gewaschen und auf 35 mm-Agarplatten mit OP50 gesetzt. Von diesen Kulturplatten waren einzelne Exemplare der nunmehr adulten *C. elegans* mit ungefähr 2 µl M9-Puffer auf OP50-besätes NGM-Agar in den Vertiefungen einer 24 well-Gewebekulturplatte zu transportieren. Unter dem Mikroskop wurde die Länge dieser Testorganismen gemessen und schriftlich festgehalten.

Erst annähernd 24 h später wurde die Anzahl der Nachkommen gezählt (Eier und gegebenenfalls bereits geschlüpfte L1-Larven).

Tests einer jeden Konzentration wurden dreimal angesetzt und durchgeführt. Die Negativkontrollen enthielten nur reines Lösungsmittel (Aqua deion. bzw. DMSO).

Tab.16 demonstriert die Vorgehensweise beim Ansatz der Flüssigttests.

3.2.3.4 Datenbearbeitung und statistische Analyse

Mit Ausnahme der Messungen im Rahmen der Vorversuche zur geeigneten Lösungsmittelkonzentration und zur akuten Toxizität von BaP wurden alle Daten in mindestens drei unabhängigen Experimenten gewonnen, wobei jeder Messpunkt (Konzentration) dreifach bestimmt wurde. Die Rohdaten wurden in Prozentanteile umgewandelt, wobei die Anzahl der eingesetzten Testorganismen bei den Tests auf akute Toxizität die 100 %-Marke festlegten. Die Prozentwerte überlebender Nematoden waren für die jeweilige Konzentrationsstufe zu mitteln, wonach ihre Varianzen und Standardabweichungen berechnet wurden (Sparks 2000).

Bei den Reproduktionstests bestimmt die Nachkommenanzahl der Kontrollansätze die 100 %-Marke. Die Differenz von den Test- auf die Kontrollansätze, wird als Inhibition oder Hemmung bezeichnet. Negative Werte stellen in diesem Zusammenhang eine Vermehrung der Reproduktion gegenüber den Kontrollen dar. Ebenso wurde bei den Wachstumstests verfahren: das Wachstum der Kontrollansätze entspricht 100 %. Unterschiede zwischen Test- und Kontrollansätzen gelten als

Inhibition oder Hemmung. Auch hier kann es negative Werte durch stärkeres Wachstum als in den Kontrollen geben.

Tab.16: Zusammenstellung der für die Messung der Reproduktionstoxizität ausgearbeiteten Pipettiervorschrift für Tests in Flüssigmedium.

Zugabe Nährmedium [μl] = eingesetztes Volumen der Bakterien-Medien-Suspension in μl

Lsg.s.mittel = zur Auflösung der Substanz im Medium eingesetztes Lösungsmittel

Zugabe Testlsg. [μl] = eingesetztes Volumen der Testlösung in μl

Gesamtvol. [μl] = Gesamtvolumen pro Vertiefung in μl

Substanzkonz. [mmol/l] = Konzentration der jeweiligen Substanz in der Testlösung in mmol/l

Gesamtkonz. [$\mu\text{mol/l}$] = Konzentration der jeweiligen Substanz im Gesamtvolumen in $\mu\text{mol/l}$

DMSO-Konz. [%] = Konzentration des Lösungsmittels DMSO im Gesamtvolumen in Prozent

K	Zugabe Wurm-susp. [μl]	Medium	Zugabe Nähr-medium [μl]	Lsg.s-mittel	Zugabe Testlsg. [μl]	Gesamtvol. [μl]	Subst.-konz. [mmol/l]	Gesamtkonz. [$\mu\text{mol/l}$]	DMSO-Konz. [%]
ACRYLAMID									
0	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	0	0	0
1	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	0,01	0,1	0
2	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	0,1	1	0
3	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	1	10	0
4	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	10	100	0
5	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	100	1000	0
6	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	1000	10000	0
7	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	10000	100000	0
BENZO(A)PYREN									
0	50	H ₂ O _{autokl.}	945	DMSO	5	1000	0	0	0,5
1	50	H ₂ O _{autokl.}	945	DMSO	5	1000	0,00001	0,00005	0,5
2	50	H ₂ O _{autokl.}	945	DMSO	5	1000	0,0001	0,0005	0,5
3	50	H ₂ O _{autokl.}	945	DMSO	5	1000	0,001	0,005	0,5
4	50	H ₂ O _{autokl.}	945	DMSO	5	1000	0,01	0,05	0,5
5	50	H ₂ O _{autokl.}	945	DMSO	5	1000	0,1	0,5	0,5
6	50	H ₂ O _{autokl.}	945	DMSO	5	1000	1	5	0,5
7	50	H ₂ O _{autokl.}	945	DMSO	5	1000	10	50	0,5
KUPFER(II)CHLORID									
0	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	0	0	0
1	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	0,001	0,01	0
2	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	0,01	0,1	0
3	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	0,1	1	0
4	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	1	10	0
5	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	10	100	0
6	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	100	1000	0
ETHYLMETHANSULFONAT									
0	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	0	0	0
1	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	0,000005	0,00005	0
2	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	0,00005	0,0005	0
3	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	0,0005	0,005	0
4	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	0,005	0,05	0
5	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	0,05	0,5	0
6	50	K-Medium	940	H ₂ O _{autokl.}	10	1000	0,5	5	0

Mit dem rm-Test nach Grubbs wurden nun Ausreißer auf dem Signifikanzniveau $P = 95\%$ ermittelt und entfernt. Hierzu wurden für die Prozentwerte jeder Testkonzentration Prüfgrößen errechnet nach:

$$\text{Prüfgröße (PG) 1} = \frac{\text{Mittelwert} - x_1}{\text{Standardabweichung}}$$

wobei x_1 den jeweiligen prozentualen Messwert meint, und Mittelwert und Standardabweichung für seine Konzentrationsstufe stehen. Überschritt eine PG den Wert der rm-Tabelle an der Stelle, welche der Anzahl der Wiederholungsmessungen n dieser

Testkonzentration und dem Signifikanzniveau $P \geq 95\%$ entspricht, so ist der der PG entsprechende Messwert ein Ausreißer. Nach seiner Entfernung mussten alle Werte neu berechnet und auf weitere Ausreißer überprüft werden (Krüger 2001, Butte 2003, Sachs 2004).

Daraufhin wurde die Substanzwirkung (Letalität, Reproduktions- sowie Wachstumshemmung) gegen die verursachenden Konzentrationen aufgetragen. Dieses Diagramm der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung wies meist schon eine typische sigmoidale Form auf.

Zur Absicherung der Wahl der Weiterbearbeitung können die kumulativen Effekte (Letalitäten bzw. Inhibitionen) betrachtet werden. Sie sind zu

$$\Sigma (\text{Effekt}) = \frac{(-x_2 + x_{3 \text{ bis } n})}{x_2} * 100 \text{ zu berechnen,}$$

wobei mit Σ (Effekt) der kumulative Effekt, mit x_2 der erste von Null verschiedene Mittelwert einer Wirkung und mit $x_{3 \text{ bis } n}$ alle auf diesen folgenden Mittelwerte von Testkonzentrationen verstanden werden. Es sollten sich hier annähernd sigmoidale Kurvenverläufe mit einem fast linearen Anstieg der mittleren Konzentrationen von 16 bis 84 % ergeben.

Um die Berechnung der LC50s bzw. EC50s zu ermöglichen, wurden aus den prozentualen Messwerten über Proportionen (Division durch den Faktor 100) die Probits, Quantile der Normalverteilung, berechnet. Als arithmetisches Mittel gilt hierbei der Wert 5 und als Standardabweichung gilt 1.

Durch logarithmische Regressionen wurden die gesetzmäßigen Beschreibungen der Abhängigkeiten der beiden Variablen Konzentration x und Probit y in Funktionsgleichungen der Form

$$y = a * \ln(x) + b$$

erhalten, wobei a und b Regressionskoeffizienten und -konstante darstellen.

Der Probit 5 entspricht genau der gesuchten Konzentration, bei der 50 % der eingesetzten Testorganismen einen Effekt (Letalität oder Hemmung) zeigen. Sie liess sich durch Umformen der Regressionsgleichungen berechnen zu

$$EC50 = \exp\left(\frac{5 - b}{a}\right).$$

Die Güte der Regressionsmodelle wird durch das Bestimmtheitsmaß R^2 ausgedrückt (Finney 1977; Sparks 2000).

Der 95 %-Vertrauensbereich für LC- (bzw. EC-)50-Werte berechnet sich gemäß Williams & Dusenbery (1988, 1990) nach Litchfield und Wilcoxon (1949) folgendermaßen:

$$\text{Obere Grenze} = \frac{\text{LC50}}{f\text{LC50}} \text{ und untere Grenze} = (\text{LC50}) * f\text{LC50, wobei } f\text{LC50} = S \left(\frac{2,77}{\sqrt{n}} \right),$$

$$\text{mit } S = \frac{\left\{ \left(\frac{\text{LC84}}{\text{LC50}} \right) + \left(\frac{\text{LC50}}{\text{LC16}} \right) \right\}}{2} \text{ (entspricht der Steigung der Regressionslinie),}$$

und n = Anzahl der Nematoden zwischen LC16 und LC84.

Kann keine EC50 berechnet werden, lässt sich der Einfluss der Chemikalie mit den sogenannten No- bzw. Lowest-Observed (Adverse) Effect Levels beschreiben und vergleichen. Erstere bezeichnet die höchste Testkonzentration bei welcher noch keine (nach teilige) Wirkung auf die Testorganismen zu beobachten ist, zweitere folgt direkt auf die NO(A)EL, sie bezeichnet die kleinste Konzentration, bei welcher (schädliche) Auswirkungen erkennbar sind (OECD 1983, 1992, 1995, 1998, 2000; Sparks 2000).

Die Homogenität der Varianzen wurde mit F-Tests überprüft. Die Quotienten zweier Varianzen ($PG < 1$) werden gegen die Quantile der F-Verteilung für die entsprechenden Freiheitsgrade und Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ bzw. $\alpha = 0,025$ getestet. PG-Werte kleiner $t_{\alpha, FG1, FG2}$ sind als statistisch signifikant zu werten. Mit dem Student'sc-hen t-Test wurde die Signifikanz zwischen Ergebnissen der Negativkontrollen und denen der Testkonzentrationen ermittelt, er wurde beidseitig und unter Annahme einer Normalverteilung durchgeführt. Der berechnete Prüfwert war mit den Quantilen der t-Verteilung für $\alpha = 0,05$ und den entsprechenden Freiheitsgraden zu vergleichen. Prüfgröße kleiner $t_{\alpha, FG}$ sind als statistisch signifikant zu werten (Sparks 2000). Bei der Berechnung des t-Tests mit MS Excel werden $PG < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

Wegen einiger unplausibler Ergebnisse erfolgte die Überprüfung der Ergebnisse durch die bei Vorliegen nicht homogener Varianzen gültige Methode nach Weir: die Nullhypothese $\mu_1 = \mu_2$ kann nicht abgelehnt werden, wenn für Stichprobenumfänge von $n_1 \geq 3$ und $n_2 \geq 3$ eine

$$\text{Prüfgröße PG} = \frac{|MW_1 - MW_2|}{\sqrt{\left(\frac{(n_1 - 1) * s_1^2 + (n_2 - 1) * s_2^2}{n_1 + n_2 - 4} \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right] \right)}} \geq 2$$

ist, die Indizes λ_1 und λ_2 beziehen sich hierbei auf die jeweils miteinander zu vergleichenden Testkonzentrationen (Sachs 2004).

3.2.4 Methoden zur Wirkung von Atrazin auf die Entwicklung von *Caenorhabditis elegans*

3.2.4.1 Tests auf akute Toxizität von Atrazin in flüssigem Medium

Reproduktions- und Wachstumstests in flüssigem Medium

Um die in Wasser relativ unlösliche Testsubstanz (ATSDR 1995; Irwin et al. 1997) in einem flüssigen Medium zu lösen, wurde sie zuerst mit dem Lösungsmittel DMSO vermischt (Williams & Dusenbery 1988). Eine Stammlösung von Atrazin-DMSO wurde mit 20g/l Atrazin-Konzentration angesetzt. Diese Stammlösung wurde mit DMSO verdünnt, um Endkonzentrationen von (50, 100, 150, 200 mg/l) zu erhalten. Von anderen Tests (3.3.2.1) wurde herausgefunden, dass die DMSO weniger als 5% in jedem Testansatz haben muss.

In diesem Test wurden 2 μ l Testlösungen mit Konzentrationen von 50, 100, 150 und 200 mg/l Atrazin in DMSO in die Vertiefungen einer 96 well-Mikrotiterplatte vorgelegt, 10 μ l Wurm suspension mit durchschnittlich ca. 10 enthaltenen Testorganismen, alterssynchron im L1-Stadium, wurden dazu pipettiert, 188 μ l M9-Puffer und 10 μ l *E. coli*-Bakterienlösung des OP50-Stammes als Nahrungsquelle wurden in jedem Testansatz hinzugefügt. Da die Inkubationsdauer drei Tage betrug, ist eine Nahrungsquelle erforderlich (Donkin & Williams 1995; Hitchcock et al. 1997, 1998).

Damit genügend Bakterien vorhanden waren, wurde die optische Dichte der Suspension auf 2 eingestellt (vgl. 3.2.3.3).

Alle Konzentrationen wurden in dreifacher Ausführung getestet.

In den Negativkontrollen fand sich kein Atrazin, sondern 188 μ l M9-Puffer, 10 μ l Wurm suspension, 10 μ l Bakterienlösung, und nur 2 μ l reines DMSO als Testlösung. Eine andere Art Negativkontrolle wurde auch angesetzt, diese beinhaltete kein Atrazin oder DMSO, sondern nur 190 μ l M9-Puffer als Testlösung, 10 μ l Wurm suspension, 10 μ l Bakterienlösung.

Die Platten wurden dann verschlossen und zur Inkubation für drei Tage lichtgeschützt im Kühlbrutschrank bei 20 °C untergebracht.

Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden die Versuchstiere aus jeder Testkammer in 2 ml-Reaktionsgefäße pipettiert, zentrifugiert und reduziert, mit M9 gewaschen und auf 35 mm-Agarplatten mit OP50 gesetzt.

Auf einem Objektträger unter einem Mikroskop wurden Länge, Breite und Eibildung dieser Testorganismen überprüft und schriftlich festgehalten.

Tab. 17 stellt den Ansatz des Atrazin-Tests im flüssigen Medium dar.

Tab. 17: Stellt den Ansatz des Atrazin-Tests im flüssigen Medium dar

	Vol	1	2	3	4	5	6
Atrazin-konz	mg/l	0	0	50	100	150	200
DMSO	µl	0	2	0	0	0	0
DMSO+Atrazin	µl	0	0	2	2	2	2
Würmerlösung	µl	10	10	10	10	10	10
Bakterienlösung	µl	10	10	10	10	10	10
M9 Lösung	µl	190	188	188	188	188	188
Endvolumen	µl	210	210	210	210	210	210

3.2.4.2 Tests auf akute Toxizität in festem Medium (Boden)

Dieser Test wurde nach dem Protokoll (Nematoden Bioassay Protocol for Soil Toxicity Screening, Peredney, 2004) durchgeführt.

Vorbereitung des festen Mediums

Der Standardboden (LUFA Typ 2.2) wurde in diesem Test als Fest-Medium verwendet.

Um das Trockengewicht zu erreichen, wurde der untersuchte Boden für 24 Stunden in einen vorher auf 110 Grad Celsius aufgeheizten Trockenschrank gestellt. Nach dem Abkühlen auf 50 bis 60 °C zum völligen Erkalten wurde der Boden in den mit Phosphorpentoxid oder Kieselgel gefüllten Exsikkator gestellt. Nach einer Abkühlzeit von einer 1/2 bis einer 1 Stunde wurde die Probe im verschlossenen Zustand bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Die Testsubstanz wurde mit dem Standardboden (Trockengewicht) gemischt, um einen Stamm-Boden von 5 g/kg TS Atrazin-Konzentrationen zu erhalten,

Der Stamm-Boden wurde mit Standardboden verdünnt, um die entsprechenden Atrazin-Konzentrationen (0,100, 200, 300, 500 mg/kg) zu bekommen.

Reproduktions- und Wachstumstests in festem Medium

Durch ein in dieser Studie zu erarbeitendes Testsystem sollen die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen des Atrazin in *C. elegans* in Form von EC50-Werten quantifiziert werden. Es folgt eine Beschreibung der Methoden zu Ausarbeitung und Optimierung.

Zur Durchführung dieser Tests wurden *C. elegans* mit Hilfe der Eggprep-Methode alterssynchronisiert. Nach der Inkubation in M9-Puffer über Nacht, wurden 24 h alte Larven in 18 einzelnen 35 mm-Petrischalen gesetzt, in jede Schale wurden 2,3 g Boden (Trockengewicht) eingefügt, die die Testsubstanz mit den entsprechenden Konzentrationen (100, 200, 300, 500 mg/kg) enthielt. Die 72-stündige Testdauer machte *E. coli*-Bakterien auf den Agarplatten als Nahrung nötig.

Aus der Wurmsuspension mit den alterssynchronen, einen Tag alten Nematoden, wurden 500 µl entnommen und die darin enthalten Testorganismen in den für den Test vorbereiteten Boden gegeben. Die Belegung der Wurmsuspension sollte durchschnittlich 100 Individuen erreichen.

Dazu wurde 50 µl Bakterienlösung (*E. coli* OP 50) als Nahrungsgrundlage hinzupipettiert. Um die Feuchtigkeit 30% zu erreichen, wurden 150µl Wasser zugefügt und gut gemischt.

Der Referenztest enthält; 233 µl Kupfer(II)Chlorid 2 g/l (200mg/kg), 417µl Wurm-lösung (ca. 100 Individuen), 50µl Bakterienlösung und 2.33 g Standardboden.

Jeder Testansatz wurde dreifacher durchgeführt. Tab. 18 stellt die Zusammensetzung der Testansätze dar.

Tab. 18: beschreibt den Aufbau des Atrazin-Tests im Boden

Atrazin	Wasser	CuCL ₂	Wurmlösung	Bakterien-lösung	Standard Boden	Boden + Atrazin
Kontrolle	150µl	0	500µl	50µl	2.3g	0
100mg/kg	150µl	0	500µl	50µl	0	2.3 g
200mg/kg	150µl	0	500µl	50µl	0	2.3 g
300mg/kg	150µl	0	500µl	50µl	0	2.3 g
500mg/kg	150µl	0	500µl	50µl	0	2.3 g
Referenz	0	233µl	417µl	50µl	2,33g	0

Anschließend wurden Die Platten zur Inkubation für drei Tage lichtgeschützt im Kühlbrutschrank bei 20 °C untergebracht.

Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurde jede Testkammer mit Ludox (Colloidal Silica Dichte 1,14) gewaschen (Williams & Dusenbery 1988), in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 750 g/s für 2 Minuten zentrifugiert. In diesem Schritt wurden die Testorganismen von dem Boden Isoliert. Nach (Peredney, 2004) sollten die Testorganismen in dem Überstand des Röhrchens (im Ludox) schwimmen. Der Überstand wurde aus dem Röhrchen herauspipettiert und in eine Petrischale überführt.

Auf einem Objektträger unter einem Mikroskop wurden Länge, Breite und Eibildung dieser Testorganismen überprüft und schriftlich festgehalten.

Der Test wird als gültig betrachtet, wenn in der Negativkontrolle über 80% der Nematoden lebendig sind.

Tests auf akute Toxizität mit Ludox Colloidal Silica:

In diesem Test wurde die Dichte, Konzentration und Toxizität von Ludox auf *C.elegans* untersucht.

Ludox Test Durchführung:

Hier wurde 1ml Ludox mit verschiedenen Konzentrationen (verschiedene Dichte) in einer Gewebkultur 24-well hineinpipettiert, danach wurden ca. 10 Testorganismen in jede Vertiefung hineingesetzt. Die Testansätze wurden unter einem Mikroskop überführt, um Reaktion und Letalität der Nematoden zu überprüfen. Als Negativkontrolle wurde M9-Puffer eingesetzt.

Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. stellt die Dichte von Ludox mit den entsprechenden Konzentrationen dar

Tab. 19: Stellt die Dichte von Ludox mit den entsprechenden Konzentrationen dar

	Ludoxkonzentration	Dichte
34µl Ludox+ 966µl Wasser	1%	1.00 g
100µl Ludox+ 900µl Wasser	3%	1.02 g
200µl Ludox+ 800µl Wasser	6%	1.04 g
400µl Ludox+ 600µl Wasser	12%	1.08 g
600µl Ludox+ 400µl Wasser	18%	1.12 g
800µl Ludox+ 200µl Wasser	24%	1.17 g

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Ergebnisse der Etablierung des Testsystems zur fluorimetrischen Detektion der umweltbedingten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

3.3.1.1 Ergebnisse der Versuch zur Ausarbeitung und Etablierung des Testsystems

Ergebnisse der Versuche zur bestimmung der einzusetzenden Zahl an Testorganismen

Die Ergebnisse dieses Vorversuchs sind in Abb. 10 dargestellt und zeigen, dass Ab 3000 Testorganismen in einem Milliliter Testlösung die Fluoreszenzintensitäten Werte über 100 bzw. 250 Einheiten erreichen und sind damit im detektierbaren Bereich.

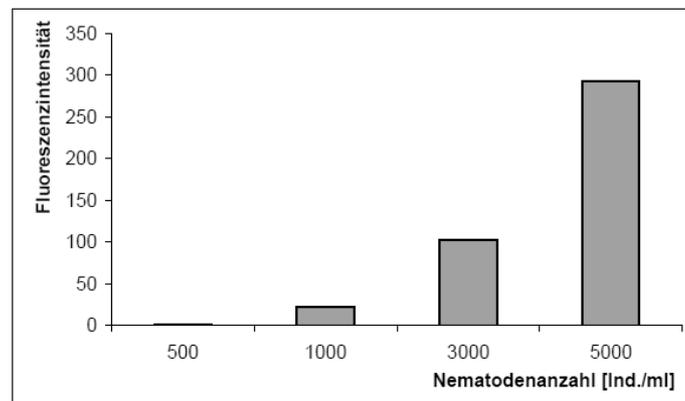


Abb. 10: Bestimmung der einzusetzenden Individuenzahl

Die Abbildung zeigt die Fluoreszenzmesswerte von 500, 1000, 3000 und 5000 Testorganismen nach Vorinkubation mit 50 $\mu\text{mol/l}$ DHR123 und anschließender Inkubation mit 325 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 für 2 Stunden. Die Ergebnisse wurden aus dem Mittelwert der Dreifachbestimmung berechnet.

Ergebnisse der Versuch zur Ermittlung der Benötigten Waschschr

Die Testergebnisse zeigen, dass die Fluoreszenz bereits nach dem ersten Waschgang deutlich abnimmt. Durch den ersten Waschschr wird der Messwert um 85% nach der ROS-Induktion durch Kupfer und um 80% nach ROS-Induktion durch Wasserstoffperoxid reduziert, während alle weiteren Waschschr kaum Einfluss auf die Messwerte haben. Abb. 11 zeigt die Reduktion des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Anzahl der Waschschr und der Art der ROS-Induktion. Aus Abb. 12 ist die leichte Tendenz zur Verstärkung des Fluoreszenzsignals (ca. 30%) nach mehr als 3 Waschschr in der DHR123-Messung ohne Substanzzugabe zu erkennen.

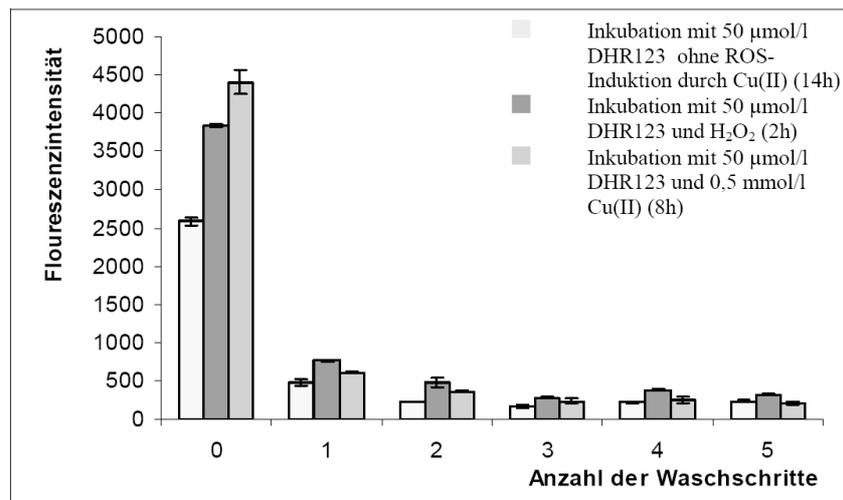


Abb. 11: Bestimmung der notwendigen Waschschr

Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenzintensität nach Inkubation der Testorganismus mit 50 µmol/l DHR mit ROS-Induktion durch Kupfer, Inkubation mit H₂O₂ und ohne ROS-Induktion, jeweils nach 1-5 Waschgängen. Die Daten stellen Mittelwert ± Standardabweichung der Fluoreszenzintensitäten von drei unabhängigen Versuchsdurchführungen dar.

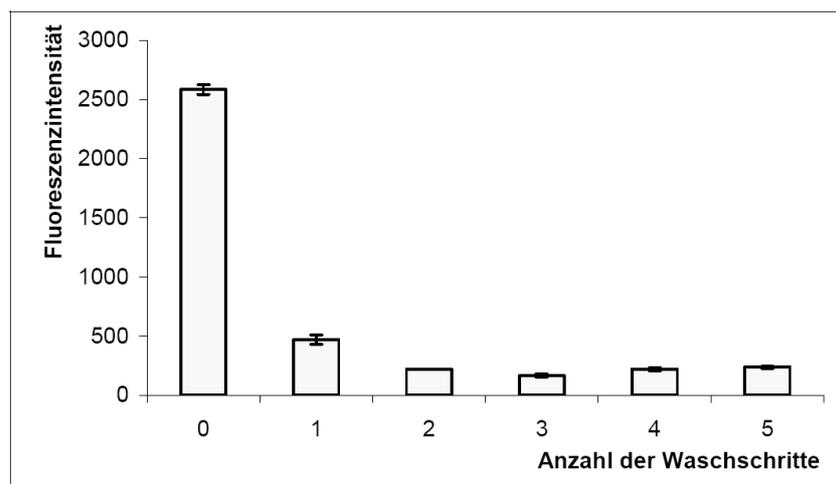


Abb. 12: Bestimmung der notwendigen Waschschr

Die Abbildung zeigt die Fluoreszenzintensität der Testansätze nach Inkubation der Testorganismus mit 50µmol/l DHR123 ohne zusätzliche ROS-Induktion oder Inkubation mit H₂O₂, jeweils nach 1-5 Waschschr

Ergebnisse der Versuche zum Einfluss der Zugabe von Bakterien als Nahrungsquelle

Die in Abb. 13 dargestellten Versuchsergebnisse zeigen, dass sich die Messwerte der Negativkontrolle (50 µmol/l DHR123 ohne zusätzliche Induktion von ROS) bei Anwesenheit einer Nahrungsquelle in Form von Bakteriensuspension deutlich verringern. Während die Signalreduktion bei null Waschschr

Abb. 14 zeigt den Vergleich der beiden Messwerte mit und ohne Bakterienzugabe nach acht Stunden Inkubation mit CuCl_2 . Hier erhöht sich der Messwert bei Anwesenheit von Bakterien als Nahrungsquelle während der Inkubation nach null Waschschritten, nach einem Waschschriff und nach 3 Waschschriffen um ca. 60%.

Auch die Ergebnisse der Messung der Kupfer(II)-Verdünnungsreihe Abb. 15 zeigten, dass bei Zugabe von Bakterien als Nahrungsquelle die Fluoreszenzmesswerte höher sind als ohne Bakterien.

Bei Bestimmung des Einflusses der Bakterienfluoreszenz wurde untersucht, ob sich die Fluoreszenzwerte in Abhängigkeit von der eingesetzten Bakterienkonzentration ändern. es konnte keine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom OD-Wert bzw. der Bakterienkonzentration festgestellt werden.

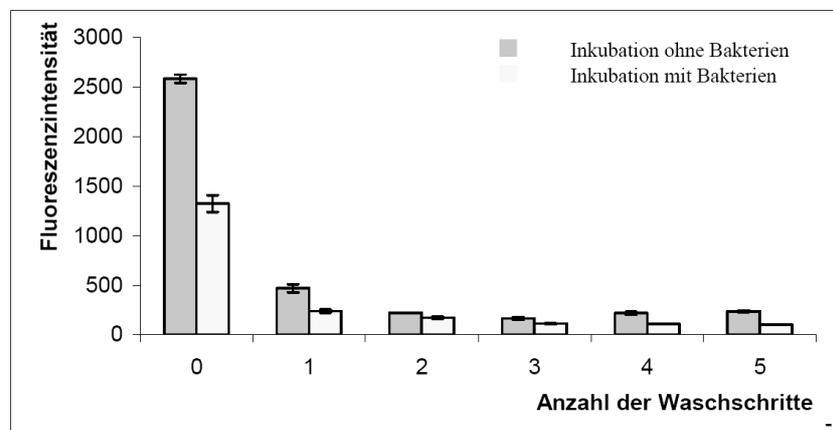


Abb. 13: Einfluss der Anwesenheit einer Nahrungsquelle während der Inkubation von DHR123

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität des Versuchsansatzes, der mit $50\mu\text{mol/l}$ DHR123 inkubiert wird, in Abhängigkeit von der Anzahl der Waschschriffe. Die Inkubation wird jeweils mit und ohne Bakterien als Nahrungsquelle durchgeführt. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung der Fluoreszenzintensitäten von drei unabhängigen Versuchsdurchführungen dar.

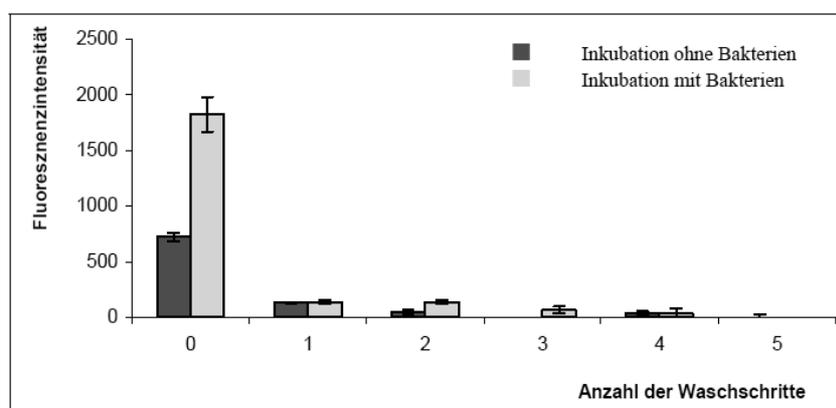


Abb. 14: Einfluss der Anwesenheit einer Nahrungsquelle während der Inkubation von Kupfer(II)

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität des Versuchsansatzes, der mit $50\mu\text{mol/l}$ DHR123 und $0,5\text{ mmol/l}$ Kupfer(II) inkubiert wird in Abhängigkeit von der Anzahl der Waschschriffe. Die Inkubation wird jeweils mit und ohne Bakterien als Nahrungsquelle durchgeführt. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung der Fluoreszenzintensitäten von drei unabhängigen Versuchsdurchführungen dar.

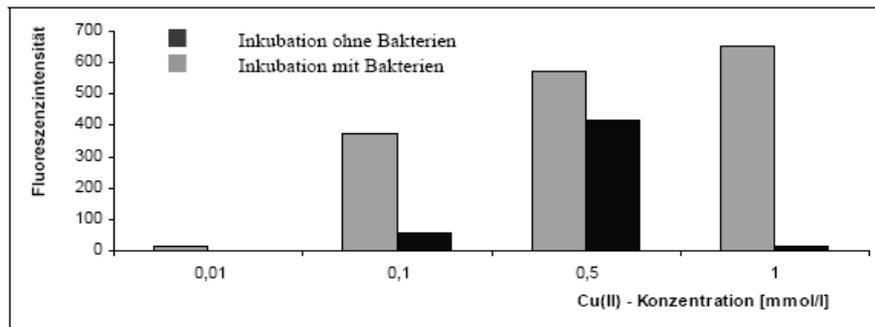


Abb. 15: Kupfer(II)-Verdünnungsreihe mit und ohne Zugabe von Bakterien

Darstellt sind die Fluoreszenzintensitäten von Testansätzen, die mit unterschiedlichen Kupfer(II)-konzentrationen inkubiert werden. Die Inkubation wird jeweils mit und ohne Bakterien durchgeführt. Darstellt sind Messwerte, deren Blindwert (Messwert der Negativkontrolle 50 $\mu\text{mol/l}$ DHR ohne ROS-induktion) bereits abgezogen wurde. Die Ergebnisse wurden aus dem Mittelwert der Dreifachestimmung berechnet.

Ergebnisse der Messung der Kupfer(II)-Verdünnungsreihe (Dosis-Wirkungsbeziehung):

Zum Nachweis der Dosis-Wirkungsbeziehung werden Zusatzversuche durchgeführt. Eine Leerprobe wird mit Kupfer(II)chlorid in aufsteigender Konzentration versetzt. Abb. 16 beschreibt die Dosis-Wirkungsbeziehung der ROS-Bildung durch Kupfer(II) in *C. elegans*.

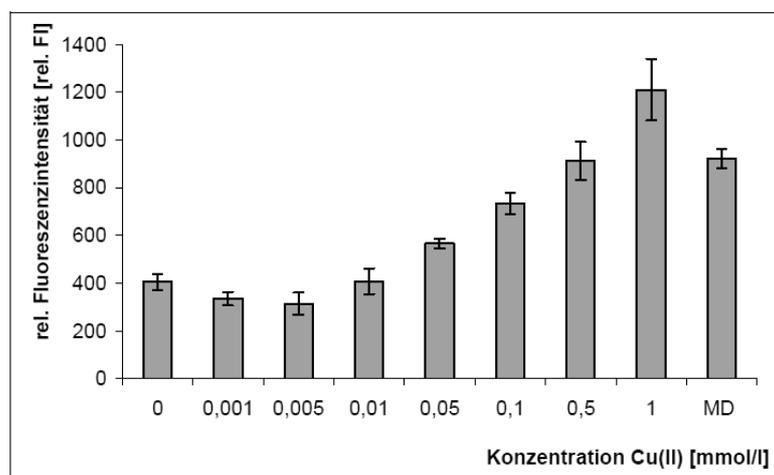


Abb. 16: Messung der Kupfer(II)-Verdünnungsreihe zur Etablierung des Testsystems

Die Abbildung zeigt die relativen Fluoreszenzintensitäten [rel. FI] der Versuchsansätze in Abhängigkeit von der zur ROS-Induktion verwendeten Kupfer(II)-Konzentrationen in [mmol/l] nach acht Stunden Inkubation. Relative Fluoreszenzintensitäten sind die gemessenen Intensitäten des Fluoreszenzsignals der Probe auf 1000 eingesetzte Testorganismen normiert. Die Abbildung beschreibt die Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Testsubstanz Kupfer(II) und der ROS-Bildung nach einmaliger Exposition in *C. elegans*. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung der relativen Fluoreszenzintensitäten von drei unabhängigen Versuchsdurchführungen dar.

MD = Menadion wird in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ als Positivkontrolle gemessen

Die folgende Abb. 17 zeigt die Kalibrierfunktion, die auf der Basis der relativen Fluoreszenzintensitäten [rel. FI] der Kupferverdünnungsreihe erstellt wird.

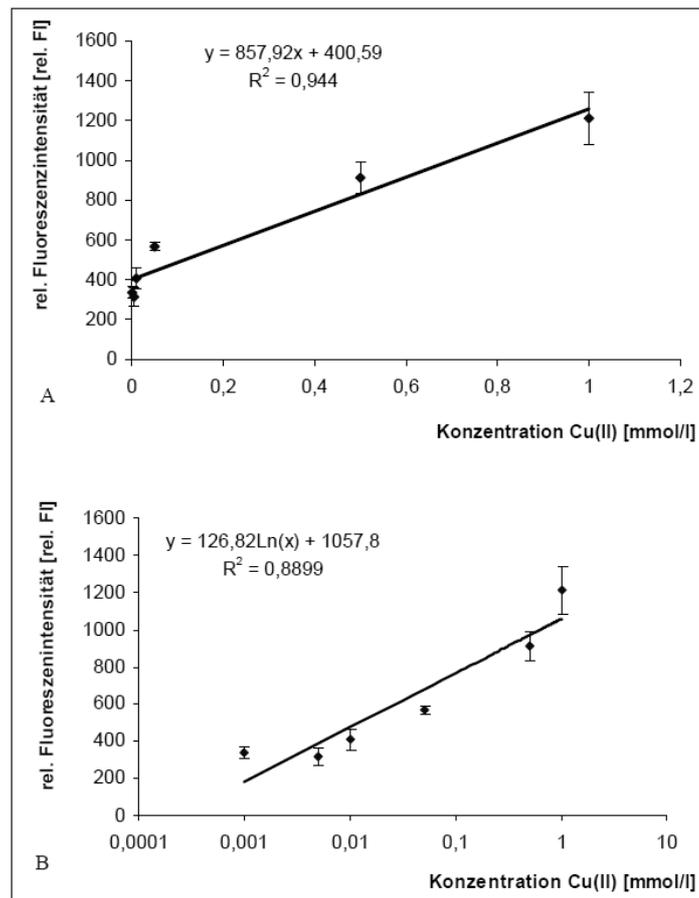


Abb. 17: Kalibrierfunktion der Testmethode

Dargestellt ist die Kalibrierfunktion der Testmethode. Sie wird aus den relativen Fluoreszenzintensitäten [rel. FI] der Versuchsansätze, die mit 0,001 mmol/l, 0,005 mmol/l, 0,05 mmol/l, 0,01 mmol/l, 0,1 mmol/l, 0,5 mmol/l und 1 mmol/l Kupfer(II) zur ROS-Induktion inkubiert werden, konstruiert.

A = lineare Darstellung

B = logarithmische Darstellung

Der Messwert für 0,1 μ mol/l wurde als Ausreißer erkannt und aus den folgenden Berechnungen ausgeschlossen

Ergebnisse der Berechnung der Kenngrößen des Messverfahrens

Anhand der Messergebnisse der Kupfer(II)-Verdünnungsreihe werden folgende Kenngrößen des Messverfahrens ermittelt:

Richtigkeit der Methode:

Zur Berechnung der Richtigkeit werden die Mittelwerte zweier Messungen (Leerprobe und 1 mmol/l) der Kupfer(II)-Verdünnungsreihe verwendet, indem die Konzentrationen anhand der Kalibrierfunktion berechnet werden. Durch Einsetzen der berechneten Konzentrationen in die Formel (vgl. *Kenngrößen des Verfahrens*), wobei diese auf die tatsächlich zugegebene Konzentration bezogen werden, ergibt sich eine Wiederfindungsrate von 94,5% (vgl. Anhang. I-5). Die Bestimmung der Richtigkeit lässt sich nur unter der Voraussetzung einer 1:1 Reaktion des Kupfers bei der ROS-Bildung durchführen. Es wird angenommen, dass genau ein Mol Kupfer(II)

bei der Entstehung von einem Mol Hydroxylradikal umgesetzt wird. Der Verbrauch der weniger reaktiven Radikale H_2O_2 und $\text{O}_2^{\cdot -}$ im Laufe der beiden Reaktionen wird dabei vernachlässigt.

Präzision der Methode:

Da die Messungen der Zusatzversuche mehrfach durchgeführt werden, lässt sich anhand der Mittelwerte und der Standardabweichungen der Messwerte der unterschiedlichen Konzentrationen der durchschnittliche Variationskoeffizient der Messergebnisse berechnen (Tab. 20).

Tab. 20: Wiederholgenauigkeit der Methode

Die Tabelle gibt die Mittelwerte und die Standardabweichungen der dreifach gemessenen Kupferverdünnungsreihe und der Positivkontrolle wieder, woraus die Variationskoeffizienten der Messwerte der Einzelkonzentrationen berechnet werden.

C_{Ausqana} = Kupfer(II)-Konzentration im Testansatz der nach Aufstockung

MW = Mittelwert aus drei relativen Fluoreszenzintensitäten [rel. FI]

SD = Standardabweichung

CV = Variationskoeffizient

MD = Menadion 0,1 mmol/l als Positivkontrolle

C_{Ausqana} [mmol/l]	MW [rel. FI] Exp. 1-3	SD	CV [%]
0	404,8	33,3	8,2
0,001	335,4	28,7	8,5
0,005	314,1	46,7	14,8
0,01	406,9	53,9	13,2
0,05	566,4	20,7	3,6
0,1	734,1	45,9	6,2
0,5	912,8	79,5	8,7
1	1211,2	129,5	10,7
MD	923,3	40,3	4,3

Aus den Variationskoeffizienten der verschiedenen Konzentrationen ergibt sich eine durchschnittliche Wiederholgenauigkeit von 8,7%.

Nachweisgrenze der Methode:

Zur Berechnung der Nachweisgrenze wird Normalverteilung der Daten angenommen. Die Voraussetzung der Unabhängigkeit der Messungen ist erfüllt. Die Homogenität der Varianzen wird mittels F-Test überprüft. Mit einer Wahrscheinlichkeit 95% besteht über den gesamten Arbeitsbereich kein signifikanter Unterschied zwischen den Varianzen, sie gehören also derselben Grundgesamtheit an. Die berechneten Prüfwerte sind in Anhang I-4 zusammengestellt. Die Berechnung der Nachweisgrenze wird mit Hilfe der Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 durchgeführt.

Bestimmung der Hilfsgrößen

Tab. 21: Zusammenstellung der Hilfsgrößen zur Berechnung der Nachweisgrenze

Die Tabelle zeigt die Hilfsgrößen, die zur Berechnung der Nachweisgrenze benötigt werden. Sie ergeben sich aus den Messwerten und den Rahmenbedingungen der Kalibrierung und aus der Kalibrierfunktion selbst. (vgl. Anhang I-5)

Symbol	Bedeutung	Wert
a_0	Ordinatenabschnitt der Kalibriergeraden	400,59
a_1	Steigung der Kalibriergeraden	857,92
$t_{2,0,05}$	Wert der t-Verteilung für Freiheitsgrad 2, Signifikanzniveau 0,05, einseitige Fragestellung	2,9
n	Anzahl der Wiederholungen der Kalibrierung	3
$s_{y,x}$	$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (a_1 \cdot x_i + a_0)]^2}{n-1}}$ Reststandardabweichung der Residuen	135,7
Q	$\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n}$	1,85
N	Anzahl der Kalibrierpunkte	7
x_q^2	Quadrat des arithmetischen Mittels der Gehalte aller Kalibrierproben	0,056

Berechnung der kritischen Messgröße

$$y_{krit} = a_0 + t_{f,\alpha} \cdot s_{y,x} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{x_q^2}{Q}}$$

Nach Einsetzen der Hilfsgrößen in die Formel ergibt sich für y_{krite} in Wert von 528,55. Der kleinste Gehalt des Analyten der mit einer statistischen Sicherheit von 95% nachgewiesen werden kann wird durch Einsetzen des kritischen Messwerts in die nach x aufgelöste Kalibrierfunktion berechnet. Die so bestimmte Nachweisgrenze liegt bei 0,15 mmol/l.

Messwerte der Probenmatrix bzw. Blindwert:

Zur Bestimmung der Matrixmesswerte des Testansatzes werden verschiedene Negativkontrollen unterschiedlicher Zusammensetzung während der Durchführung der Kupfer(II)-Zusatzversuche zusätzlich gemessen und ausgewertet.

Empfindlichkeit der Methode:

Die Steigung der Kalibriergerade und damit die Empfindlichkeit der Methode, die mit Hilfe der Daten der Kupfer(II)-Verdünnungsreihe berechnet wurde, beträgt 857,92 relative Fluoreszenzintensitätseinheiten pro mmol/l Kupfer(II).

Visuelle Auswertung der Fluoreszenzintensität:

Aus Ansätzen verschiedener Konzentrationsstufen wurde 1 µl Testlösung entnommen und für die Fluoreszenzmikroskopie präpariert. Die folgende Abb. 18 zeigt Einzelindividuen aus den Präparaten.

Tab. 22: Fluoreszenzsignalwerte von Negativkontrollen unterschiedlicher Zusammensetzung

H₂O + C.e. = H₂O mit entsprechender Anzahl an *C. elegans*

H₂O + C.e. + B = Bakterien als Nahrungsquelle im Testansatz

DHR123 + 0 Cu(II) = vollständiger Testansatz ohne Testsubstanz

MW = Mittelwert aus drei relativen Fluoreszenzintensitäten

SD = Standardabweichung

CV = Variationskoeffizient

Negativkontrolle	MW Exp. 1-3	SD	CV [%]
H ₂ O	37,7	1,9	0
H ₂ O + C.e.	90,2	8,7	9,6
H ₂ O + C.e. + B	97,7	3,4	3,5
DHR123 + 0 Cu(II)	404,8	33,3	8,2

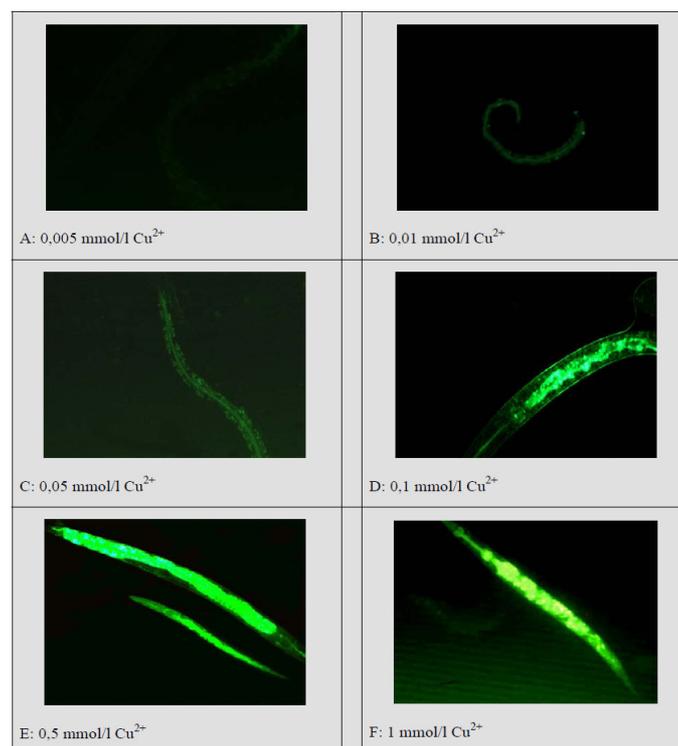


Abb. 18: Fluoreszenzmikroskopie.

Dargestellt sind digitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (A-F) zufällig ausgewählter Individuen (in 40-facher Vergrößerung) aus Versuchsansätzen mit einer DHR123-Konzentration von 25 µmol/l und unterschiedlichen Kupfer(II)-Konzentrationen nach achtstündiger Inkubation. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität mit steigender Kupfer(II)-Konzentration ist visuell deutlich erkennbar.

3.3.1.2 Ergebnisse des akuten Toxizitätstests mit DHR123

Aus Tab. 23 wird ersichtlich, dass sich die Testergebnisse aller gemessenen DHR123-Konzentrationen (1 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$) in der Größenordnung der Negativkontrolle befinden, die nur aus K-Medium und 2% DMSO besteht. Sie unterscheiden sich statistisch nicht signifikant von der Negativkontrolle. Mit einer Wahrscheinlichkeit von $P > 95\%$ unterscheiden sich alle Messergebnisse der getesteten Konzentrationen signifikant von der Positivkontrolle. Ein Messwert (für 100 $\mu\text{mol/l}$) wurde als Ausreißer erkannt und aus der Berechnung ausgeschlossen. Abb. 19 stellt die Testergebnisse graphisch dar.

Tab. 23: Messergebnisse des akuten Toxizitätstests von DHR123

Dargestellt sind die Ergebnisse zur Letalität von *C. elegans* im akuten Toxizitätstest. DHR123 wird in den Konzentrationen 1 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ gelöst in 2% DMSO eingesetzt.

SD = Standardabweichung ;EMS = Ethylmethansulfonat als Positivkontrolle

Testansatz	Letalität [%]	SD
Kontrolle DMSO 2%	3,4	6,7
1 $\mu\text{mol/l}$	2,6	4,9
5 $\mu\text{mol/l}$	2,2	4,1
10 $\mu\text{mol/l}$	3,7	6,8
50 $\mu\text{mol/l}$	3,1	5,3
100 $\mu\text{mol/l}$	3,7	5,3
EMS 0,5 $\mu\text{mol/l}$	49,8	4,2

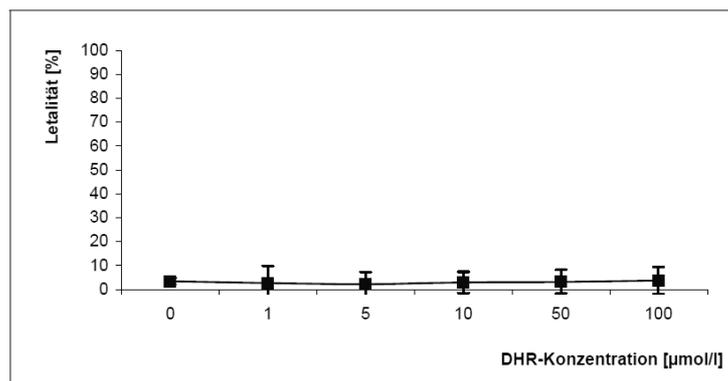


Abb. 19: Ergebnisse des Tests auf akute Toxizität von DHR123 auf *C. elegans*

Dargestellt sind die Ergebnisse zur Letalität im akuten Toxizitätstest. DHR123 wird in den Konzentrationen (1 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, und 100 $\mu\text{mol/l}$) gelöst in 2% DMSO eingesetzt. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchsdurchführungen dar.

3.3.1.3 Ergebnisse der Messungen zur Kupferaufnahme durch *C. elegans* mit AAS

Nach einer 14-stündigen Inkubation der Kupferkonzentrationen der Verdünnungsreihe werden folgende Kupfergehalte in den Testorganismen mittels AAS gemessen.

Aus den Messergebnissen, die mit ¹ gekennzeichnet sind, wurde ein Messwert als Ausreißer identifiziert und aus der Berechnung ausgeschlossen. Die folgende Tab. 24 zeigt die Messergebnisse der AAS-Messung und die zur Berechnung der prozentualen Kupferaufnahme benötigten Größen.

Tab. 24: Kupferaufnahme durch den Testorganismus

Dargestellt ist die Kupferaufnahme von *C. elegans* nach 14-stündiger Inkubation mit Kupferchlorid in den Konzentrationen 0,001 mmol/l, 0,005 mmol/l, 0,01 mmol/l, 0,05 mmol/l, 0,1 mmol/l, 0,5 mmol/l und 1 mmol/l berechnet aus drei unabhängigen Versuchen. Für alle getesteten Kupferkonzentrationen werden die Kupfergehalte im Testorganismus mittels AAS bestimmt. Dazu wird jeweils die im Aufschluss gemessene Konzentration in µg/l auf die eingesetzte organische Substanz in mg, die vorher abgewogen wird, bezogen. Die Ausgangskonzentration wird in den absoluten Kupfergehalt der Testlösung umgerechnet und die Kupferaufnahme der Testorganismen in [%] der Inkubation berechnet.

C_{Ausgang} = Kupferkonzentration im Testmedium nach 0 h Inkubation

B = Blindwert. TS = Trockensubstanz

¹ = ein Messwert wurde als Ausreißer erkannt und aus der Berechnung ausgeschlossen

C_{Ausgang} [mmol/l]	[Cu] in µg/L	[Cu] - B in µg/L	Einwaage Test- organismus [mg TS]	Cu-Gehalt µg/mg TS	Initiale Cu- Menge [µg] in 10 ml	Cu-Auf- nahme [%]
0,001	10,95	2,22	2,5	0,06	0,63	23,92 ¹
0,005	15,29	9,58	2,2	0,18	3,17	12,5
0,01	24,27	18,57	2,66	0,32	6,35	10,1
0,05	69,43	63,72	2,38	1,45	31,77	8,34
0,1	153,35	147,64	2,88	2,37	63,55	9,54
0,5	620,27	614,56	1,89	14,69	317,75	7,08
1	2164,5	2160,1	2,04	46,88	635,5	7,31 ¹

Außerdem wurden die Kupferkonzentrationen der Testmedien in drei unabhängigen Messungen bestimmt. Auch aufgrund dieser Werte können Aussagen bezüglich der Kupferaufnahme durch *C. elegans* getroffen werden. Außerdem können durch Vergleich der beiden Messwerte für Medium und Testorganismus mögliche Verluste der Substanz oder Verunreinigungen während der Testprozedur abgeschätzt werden.

Tab. 25 gibt die Differenz zwischen dem gemessenen absoluten Kupfergehalt als Summe aus den Gehalten der Testlösung und der Testorganismen und den tatsächlich zugegebenen Konzentrationen an.

Die folgende Abb. 20 stellt die Werte der Kupferaufnahme in [%] graphisch dar.

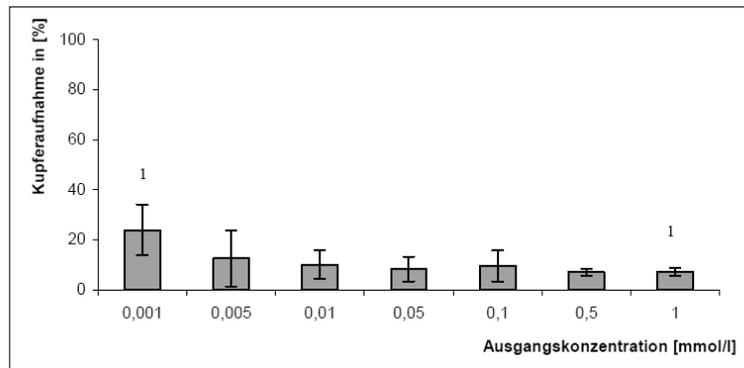


Abb. 20: Kupferaufnahme in [%]

Dargestellt sind die absoluten Kupfergehalte der Testlösung nach Subtraktion des Blindwertes und Berechnung der Kupferaufnahme. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchsdurchführungen dar.

¹ = ein Messwert wurde als Ausreißer erkannt und aus der Berechnung ausgeschlossen

Tab. 25: Vergleich der gemessenen und eingesetzten absoluten Kupfergehalte

Die Tab. stellt die absoluten Kupfergehalte der beiden Aufschlüsse gegenüber. Die Summe der gemessenen Absolutgehalte sollte dem absoluten Ausgangsgehalt an Kupfer entsprechen. Die Differenz (Wiederfindungswert) ist absolut in [μg] und als Prozentwert ($100\% + \text{Differenz} [\%] = \text{Wiederfindungsrate}$) angegeben. Negative Differenzwerte zeigen zu niedrige, positive zu hohe Messwerte an.

¹ = ein Messwert wurde als Ausreißer erkannt und aus der Berechnung ausgeschlossen

C_{Ausgang} [mmol/l]	abs. CU-Gehalt (Testlsg.) - B [μg]	abs. CU-Gehalt (Testorg.) - B [μg]	Gesamt CU-Gehalt [μg] (gemessen)	Gesamt CU-Gehalt [μg] (zugegeben)	Differenz [μg]	Differenz [%]
0,001	0,42	0,15 ¹	0,57	0,63	-0,06	-9,6
0,005	2,52	0,39	2,92	3,17	-0,26	-8,0
0,01	4,94	0,64	5,58	6,355	-0,77	-12,2
0,05	29,61	2,65	32,26	31,77	0,48	1,5
0,1	58,74	6,07	64,81	63,55	1,25	2
0,5	302,91	22,49	325,43	317,75	7,65	2,4
1	594,73	69,71 ¹	664,44	635,5	28,94	4,6

Neben dem Vergleich der tatsächlich gemessenen Konzentrationen als Summe beider Messungen mit dem Ausgangswert zur Bestimmung der Wiederfindungsrate lassen sich auch die Kupferkonzentrationen der Testlösungen nach der Inkubation mit den Ausgangskonzentrationen der Testlösungen vergleichen. Auch diese Werte geben Hinweise die aufgenommene Kupfermenge durch *C. elegans*. Abb. 21 stellt die Differenzen der Kupfergehalte in der Testlösung vor und nach der Inkubation dar.

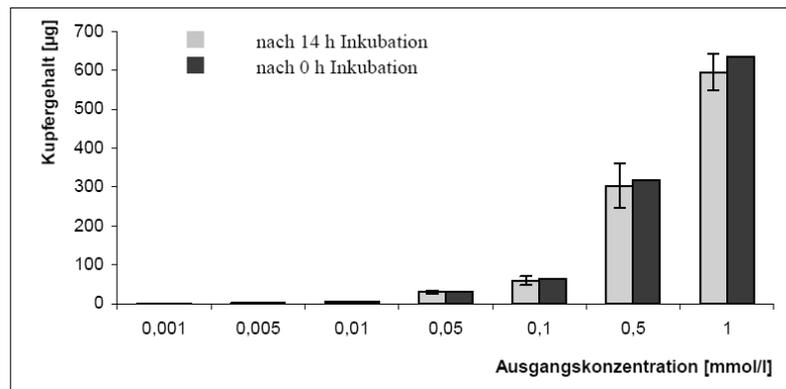


Abb. 21: Kupfergehalte der Testlösungen

Die Abbildung zeigt die absoluten Kupfergehalte der Testlösungen in [µg] nach der Inkubation im Vergleich zu den Kupfergehalten der Testlösungen in [µg] vor der Inkubation in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration von Kupfer [mmol]. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchsdurchführungen dar.

3.3.1.4 Ergebnisse der Messungen zur Überprüfung der erarbeiteten Methode

Ergebnisse der Messung des Lipidperoxidationstests

Zur Berechnung der MDA-Konzentrationen im Gewebe des Testorganismus als Marker für oxidativen Stress wird aus dem im Testkit vorhandenen MDA-Standard eine Standardverdünnungsreihe hergestellt und daraus die Kalibriergerade bestimmt (Abb. 22).

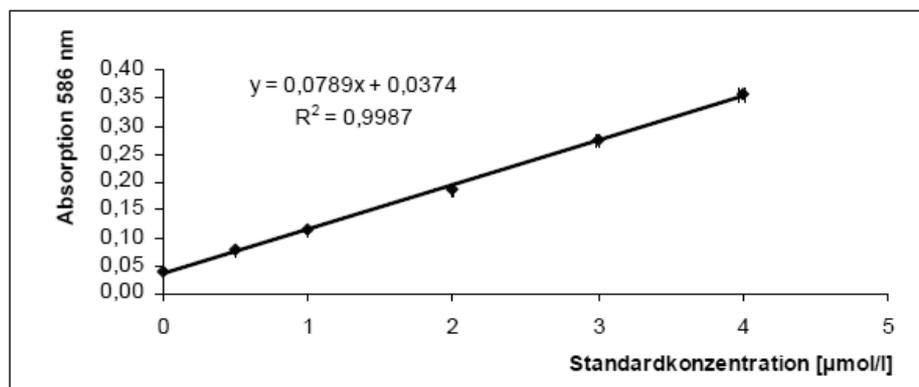


Abb. 22: Kalibriergerade des Lipidperoxidationstests

Dargestellt sind die Absorptionswerte der Standards bei 586 nm in Abhängigkeit von der MDA-Konzentration im Standard in [µmol/l]. Aus den Messwerten wird die Kalibriergerade des Lipidassays erstellt.

Aus den Messergebnissen und den Parametern der Kalibrierung ergeben sich die in der folgenden Abb. 23 dargestellten MDA-Konzentrationen für die zur ROS-Induktion eingesetzten Kupfer(II)-Konzentrationen. Die Proteingehalte der Proben werden anhand ihrer Absorption bei 280 nm bezogen auf eine BSA-Standardverdünnungsreihe berechnet und bewegen sich für alle Proben im geforderten Bereich zwischen 15 und 60 mg/ml.

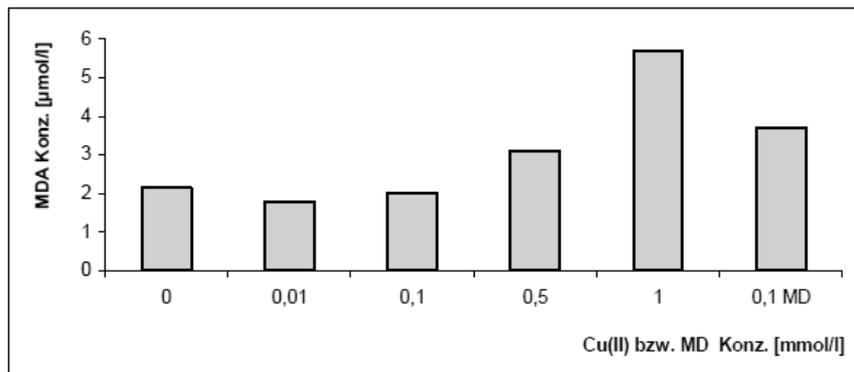


Abb. 23: MDA-Konzentrationen

Dargestellt sind die gemessenen MDA-Konzentrationen in Abhängigkeit von den eingesetzten Kupfer(II)-Konzentrationen. Die Konzentration des MDA wurde aus dem Mittelwert der Dreifachbestimmung berechnet.

Da das aus MDA und N-Methyl-2-Phenylindol gebildete Chromophor sein Absorptionsmaximum bei 586 nm hat, erscheinen die Ansätze je nach MDA-Gehalt mehr oder weniger stark blau gefärbt. Aufgrund einer nicht zu erwartenden Rotfärbung einiger Proben wird eine Absorptionsmessung über alle Wellenlängen in 10 nm Intervallen (Scan) durchgeführt. Die vollständige Datentabelle befindet sich in Anhang II- 3. Die nachstehenden Abb. 24 und Abb. 25 stellen die Absorptionswerte der Messintervalle als Kurve dar. Neben dem Absorptions-maximum bei 586 nm ist ein zweites Maximum, resultierend aus der Rotfärbung der Proben, bei ca. 510 nm zu erkennen.

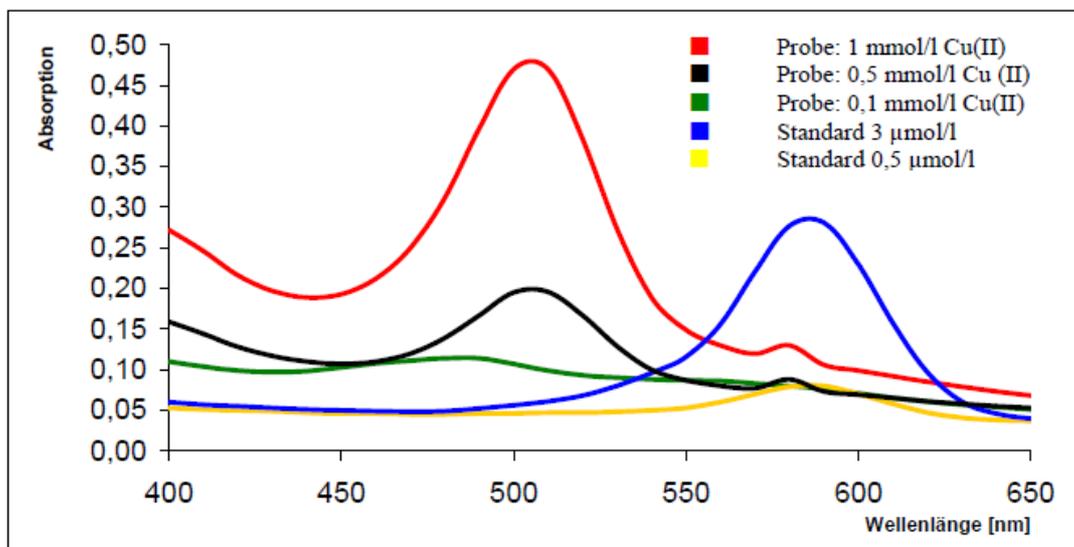


Abb. 24: Wellenlängenscan von 400 bis 600 nm

Die Abbildung zeigt die Absorption der Proben und Standards (0,5 µmol/l und 3 µmol/l MDA) über alle Wellenlängen zwischen 400 und 650 nm im Abstand von je 10 nm. Die dargestellten Proben werden mit 0,1 mmol/l, 0,5 mmol/l und 1 mmol/l Kupfer(II) inkubiert.

Abb. 25 zeigt den Ausschnitt des Spektrums, der für die Konzentrationsbestimmung des MDA relevant ist. Trotz der Störung durch das zusätzliche Maximum bei 510 nm

sind für die Ansätze, die mit 0,5 mmol/l und 1mmol/l Kupfer(II) inkubiert werden, kleinere Maxima bei 586 zu erkennen, während der die Kurve bei 0,01 mmol/l flach verläuft.

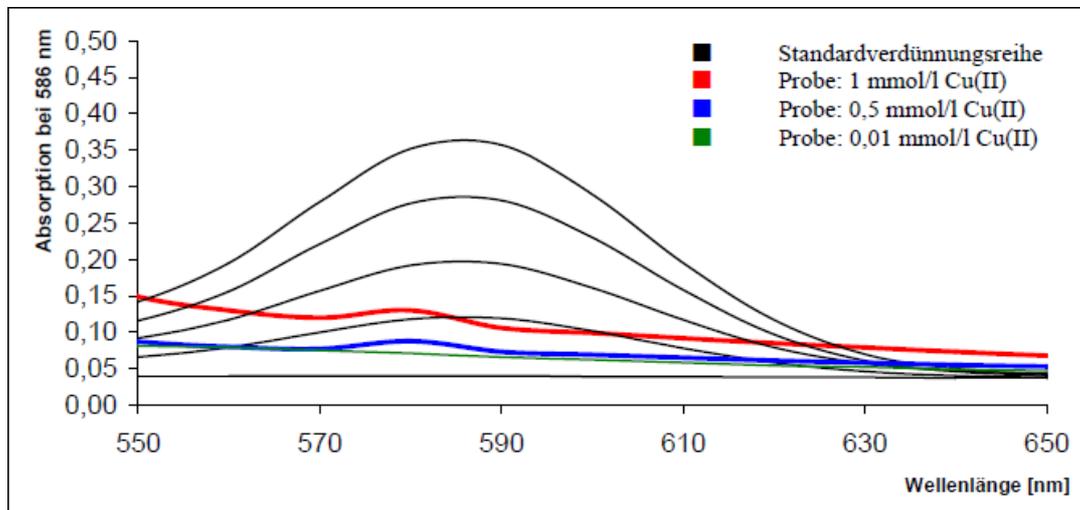


Abb. 25: Wellenlängenscan: Ausschnitt von 550 bis 650 nm

Dargestellt ist die Absorption der Proben (mit 0,01 mmol/l, 0,5 mmol/l und 1 mmol/l Kupfer(II) inkubiert) und Standards über alle Wellenlängen zwischen 550 und 650 nm im Abstand von je 10 nm. Die Standards in den verschiedenen Konzentrationen sind als schwarze dünne Linien dargestellt. Die Absorption der Proben ist farbig dargestellt. Die dargestellten Standardkonzentrationen sind 0 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$, 2 $\mu\text{mol/l}$, 3 $\mu\text{mol/l}$ und 4 $\mu\text{mol/l}$ MDA.

Ergebnisse der ROS-Messung mit DHR123 nach Vorinkubation mit Ascorbinsäure

Tab. 26 zeigt die Messergebnisse zur Untersuchung der Wirkung von Vitamin C auf den Redoxzustand der Zellen von *C. elegans* mit und ohne Inkubation von 0,5 mmol/l Kupfer(II)chlorid. Für diese Messungen werden mehr Nematoden pro Ansatz eingesetzt, um das absolute Fluoreszenzsignal aufgrund der verkürzten Inkubationszeit von DHR123 nicht zu stark abzuschwächen. Nach der Umrechnung der Messwerte in relative Fluoreszenzintensitäten [rel. FI], d.h. absolute Intensität pro 1000 Testorganismen, sind die Messwerte für 0,5 mmol/l Kupfer(II) und 25 $\mu\text{mol/l}$ DHR123 durchschnittlich 28% geringer als nach 8 Stunden DHR123-Inkubation.

Aus der nachstehenden Abb. 26 geht eine signifikante Abnahme in der relativen Fluoreszenzintensität ($p = 0,05$) im Versuchsansatz ohne Kupfer(II)-Zugabe nach Vorinkubation von Vitamin C hervor. Die Ansätze, denen 0,5 mmol/l Kupfer(II)chlorid nach der Inkubation mit Vitamin C zugegeben wurden, zeigen dagegen eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität (ab 10 $\mu\text{mol/l}$ Vitamin C signifikant) in Abhängigkeit der Vitamin C-Konzentration. Prozentual steigt die relative Fluoreszenzintensität nach der Vorinkubation mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Vitamin C um 15%, mit 10

$\mu\text{mol/l}$ um 31%, mit 50 $\mu\text{mol/l}$ um 44% und mit 100 $\mu\text{mol/l}$ um 52%. Die antioxidative Wirkung von Vitamin C zeigt sich in Reduktion des Fluoreszenzsignals um 32% nach Vorinkubation mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Vitamin C ohne Zugabe von Kupfer(II).

Tab. 26: Messergebnisse der ROS-Messung nach Vorinkubation mit Vitamin C

Die Tabelle zeigt die Messergebnisse der ROS-Messung in [rel. FI] nach Vorinkubation mit Vitamin C in den Konzentrationen 1 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$. Die Wirkung von Vitamin C wird mit und ohne anschließende Kupferinkubation (0,5 mmol/l Cu(II)) getestet. Die Messungen werden dreifach und unabhängig voneinander durchgeführt.

MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

CV = Variationskoeffizient

Ascorbinsäure Konzentration	Kupfer(II)-Konzentration	MW Exp. 1-3	SD	CV in %
0 $\mu\text{mol/l}$	0 mmol/l Cu	124,6	28,36	22,76
10 $\mu\text{mol/l}$		84,4	26,63	31,55
0 $\mu\text{mol/l}$	0,5 mmol/l Cu	658,4	9,07	1,38
1 $\mu\text{mol/l}$		753,8	48,72	6,46
10 $\mu\text{mol/l}$		859,3	61,64	7,17
50 $\mu\text{mol/l}$		946,3	66,18	6,99
100 $\mu\text{mol/l}$		997,4	61,65	6,18

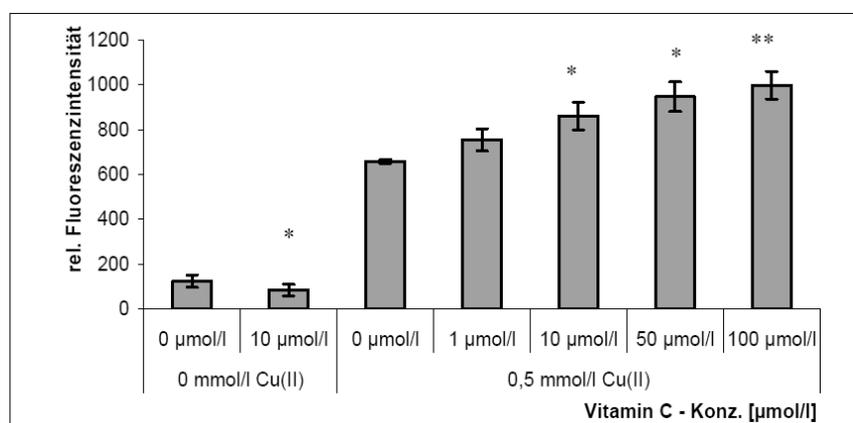


Abb. 26: Graphische Darstellung der Messergebnisse nach Vorinkubation mit Vitamin C

Die Abbildung zeigt die Messwerte in rel. Fluoreszenzintensität [rel. FI] bezogen auf die vorinkubierte Ascorbinsäurekonzentration in [$\mu\text{mol/l}$] und der zur ROS-Induktion verwendeten Kupferkonzentration in [mmol/l]. Die Daten stellen Mittelwerte \bar{x} Standardabweichung der relativen Fluoreszenzintensitäten von drei unabhängigen Versuchsdurchführungen dar. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

Ein Messwert für 0 $\mu\text{mol/l}$ Vitamin C / 0 mmol/l Cu(II) und ein Messwert für 50 $\mu\text{mol/l}$ Vitamin C / 0,5 mmol/l Cu(II) wurde als Ausreißer aus der Berechnung ausgeschlossen.

3.3.2 Ergebnisse der Etablierung und Bewertung von Biotests zur akuten Toxizität, Reproduktions- und Wachstumstoxizität mit dem Modellorganismus *C. elegans* am Beispiel der Toxine Acrylamid, Benzo(a)pyren, Kupfer(II)chlorid und Ethylmethansulfonat

3.3.2.1 Versuche zur akuten Toxizität

Akute Toxizitätstests mit DMSO in verschiedenen Medien

Bei allen getesteten Konzentrationen von DMSO starben in K-Medium weniger als 25 % der eingesetzten Nematoden, während in Eggbuffer und S-Medium schon bei einem dreiprozentigen Gehalt an DMSO mehr als 25 % tot aufgefunden wurden. Ersichtlich macht diesen Sachverhalt Abb. 27

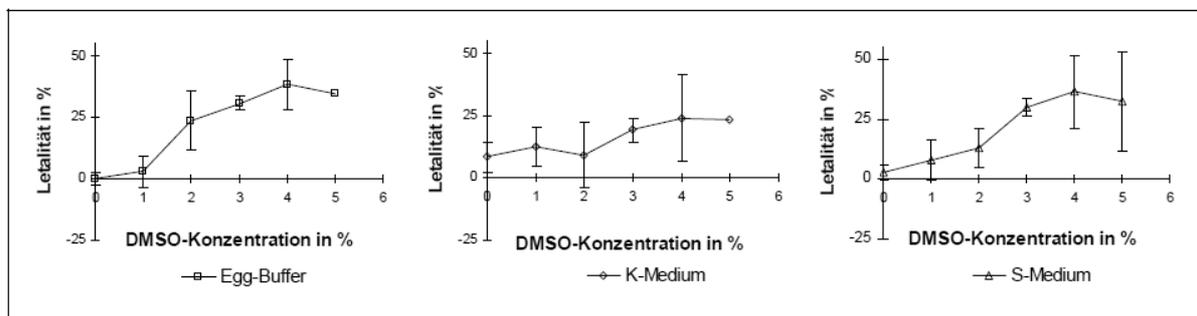


Abb. 27: Letalität durch DMSO in den flüssigen Medien Eggbuffer, K- und S-Medium

Dargestellt ist der Prozentanteil der toten Nematoden in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration im jeweiligen Medium.

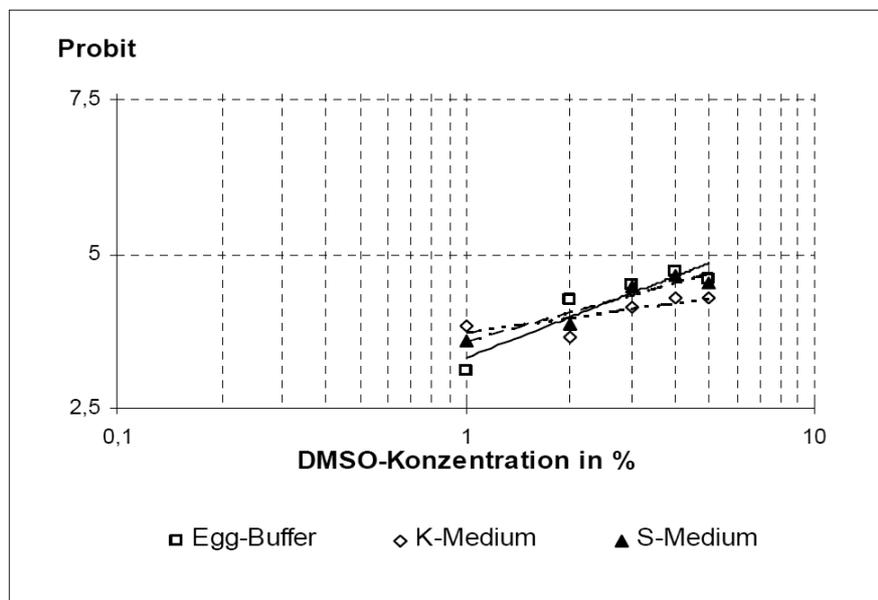


Abb. 28: Probitanalyse der Ergebnisse der Test auf akute Toxizität vom DMSO in Egg-Buffer, K- und S-Medium

In Egg-Buffer gab es signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, t-Test) zur Negativkontrolle bereits ab einer Konzentration von 2 %; ab 4 % DMSO traten hochsignifikante ($p < 0,01$) Differenzen auf. Beim Einsatz von K-Medium unterschied sich nur der

Mittelwert der Konzentrationsstufe 4 % signifikant von dem der Negativkontrolle. Ab dreiprozentigem DMSO-Gehalt wurden die Ergebnisse der Tests mit S-Medium als signifikant unterschiedlich charakterisiert. Die zu den LC50-Werten führende logarithmische Regression wird in Abb. 28 gezeigt.

Die Regressionsgleichungen mit zugehörigen Bestimmtheitsmaßen R^2 und ermittelten LC50-Werten für 24h-expositino befindet sich in Tab. 27.

Bei den Medien Egg-Buffer und S-Medium glückte die Anpassung der Regressionsmodelle. Für K-Medium ergab sich ein nicht so deutlicher Zusammenhang zwischen den Konzentrationen und den werten der Probitanalyse ($R^2 < 0,7$).

In

Tab. 28 werden die Vertrauensbereiche für die berechneten LC50-Werte eines jeden Mediums sowohl in prozentualer als auch in molarer DMSO-Konzentration aufgeführt.

Tab. 27: Ergebnisse der Tests auf akute Toxizität mit DMSO

	Regressionsgleichung	R^2	24 h-LC50	24 h-LC50
Egg-Buffer	$y = 0,955 \ln(x) + 5,2885$	0,8715	5,80%	0,73 mol/l
K-Medium	$y = 0,344 \ln(x) + 4,4248$	0,6297	12,90%	1,56 mol/l
S-medium	$y = 0,688 \ln(x) + 4,9863$	0,8971	8,03%	1,02 mol/l

Tab. 28: 95 %-Vertrauensbereiche für die LC50-Werte der Akuttests mit DMSO

	von	bis	von	bis
Egg-Buffer	5,79%	5,85%	0,73 mol/l	0,74 mol/l
K-Medium	11,79%	12,81%	1,49 mol/l	1,62 mol/l
S-medium	7,71%	8,37%	0,97 mol/l	1,06 mol/l

Verhalten der Nematoden bei verschiedenen DMSO-Konzentrationen

Mit diesem Versuch sollte ermittelt werden, in welcher Konzentration des Lösungsmittels DMSO Individuen von *C. elegans* hinsichtlich ihrer Bewegung beeinflusst werden.

Bis zum Ende der Untersuchungsdauer starben 4 Nematoden (57 % der eingesetzten) bei dreiprozentigem, drei (43 %) bei 4-prozentigem und 4 (50 %) bei 5-prozentigem DMSO-Gehalt.

Die Schnelligkeit der Bewegungen nahm sowohl mit steigender DMSO-Konzentration ab als auch mit der Testdauer. Im Laufe der Untersuchungsdauer wurden nur die Nematoden in der Negativkontrolle nicht langsamer.

Die Bewegungen wurden mit steigender Dosis des Lösungsmittels immer kleiner. 48 Stunden nach dem Testansatz bewegte sich keiner der Nematoden mehr von der Stelle, nur in der Negativkontrolle und dem Ansatz mit 0,5-prozentigem Gehalt an DMSO kam es später wieder zu Vorwärtsbewegungen.

ieder zu Vorwärtsbewegungen.

In den beiden höheren Konzentrationen (4 und 5 % DMSO) begannen *C. elegans* direkt nach dem Ansetzen der Tests (10 bis 30 min) mit Pausen zwischen den Bewegungen. Nach einer Stunde folgten die Organismen, die dem einprozentigen Ansatz ausgesetzt waren, nach einem Tag diejenigen der Negativkontrolle, der 0,5- und zweiprozentigen Lösungen und nach einem weiteren Tag erst diejenigen der Lösung mit der dreiprozentigen DMSO-Gehalt. Die Bewegungspausen waren drei Tage nach Beginn des Versuches am längsten und verkürzten sich gegen Untersuchungsende auf weniger als eine Minute.

Stimulationen waren schon nach einem Tag bei den Nematoden der Negativkontrolle, der ein- und 4-prozentigen Ansätze notwendig; bei einem halben, 2 und 5 % trat Bewegungslosigkeit nach 48 Stunden, bei 3 % erst nach 72 h auf. Selbständige Bewegungen gab es am Ende der Untersuchungen noch in der Negativkontrolle und wieder in den Lösungen mit Konzentrationen von 0,5 und 3 % DMSO.

Versuche zur akuten Toxizität von Benzo(a)pyren

Es wurden Ansätze mit verschiedenen Gesamtvolumina, Medien und DMSO-Konzentrationen in geometrischen Reihen angefertigt und kontrolliert, ob BaP als Niederschlag ausfiel. Da dies bedeutete, dass die Testorganismen die Testsubstanz gar nicht aufnehmen können und zudem eine Wiederfindung der in die Tests eingesetzten Nematoden beinahe nicht möglich war, wurden Modifikationen des Gesamtvolumens, der eingesetzten Medien und DMSO-Konzentrationen vorgenommen. BaP fiel aus in:

- K-Medium im Gesamtvolumen von 200 µl mit einprozentigem DMSO-Gehalt,
- K-Medium, PBS und autoklaviertem Leitungswasser im Gesamtvolumen von 1000 µl mit einprozentigem DMSO-Gehalt,
- K-Medium, PBS und autoklaviertem Leitungswasser im Gesamtvolumen von 2000 µl mit einprozentigem DMSO-Gehalt, bei letzterem allerdings in sehr geringerem Ausmaß; so dass auch die Testorganismen gut zu erkennen sind. Autoklaviertes Leitungswasser wird daher als Medium festgesetzt.

Da einzelne Individuen von *C. elegans* in dem großen Gesamtvolumen von 2000 μl wegen der Größe der Testkammer auch ohne ausgefallenes BaP nur sehr schwer unter dem Mikroskop aufzufinden waren, wurden ein geringeres Volumen und eine höhere Konzentration des Lösungsmittels DMSO ausgewählt.

- Bei 5-prozentigem DMSO-Gehalt fiel (fast) nichts vom eingesetzten BaP aus, aber 1000 μl als Volumen waren immer noch zu viel, die Ober- und Bodenfläche der Vertiefung, in der die Testorganismen exponiert wurden, blieb die gleiche. Ferner wurde eine geringere Lösungsmittelkonzentration angestrebt.
- Ein Gesamtvolumen von 200 μl wurde mit autoklaviertem Wasser als Medium angesetzt; mit einer Lösungsmittelkonzentration von 4 % traten geringfügige BaP-Niederschläge nur noch bei Konzentrationen von 100 $\mu\text{mol/l}$ und darüber auf. Diese Vorgehensweise wurde als akzeptabel für die akuten Toxizitätstests mit BaP angesehen.

3.3.2.2 Akuten Toxizitätstest

Akute Toxizitätstests mit Acrylamid

Die Abb. 29 zeigt die Ergebnisse der akuten Toxizitätstests mit AcL in K-Medium, welche sich aus den durchschnittlich 8-mal ($n = 2 - 27$) wiederholten Ansätzen einzelner Konzentrationen nach der Entfernung von 5 Ausreißern auf dem Niveau $P \geq 95\%$ herleiten. Ab einer Konzentration von 50 mmol/l überlebte keiner der eingesetzten Testorganismen.

Die höchste Konzentration ohne nachteilige Effekte auf die Versuchstiere (= NOEC) lag bei 2,5 mmol/l, dies bestätigte ein hochsignifikanter Mittelwertsanstieg zwischen den beiden Konzentrationen 2,5 und 5 mmol/l. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Negativkontrolle fanden sich in den AcL-Konzentrationen ab 5 mmol/l (= LOEC), hochsignifikante ($p < 0,01$) ab 15 mmol/l. Zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen ergaben sich weitere statistisch erfassbare Mittelwertsanstiege bei 15 und 20 mmol/l sowie bei 40 und 50 mmol/l. Alternative Berechnungen nach der Weir-Methode bestätigten diese Ergebnisse.

Die LC₅₀ für den 24 h-Akutttest mit AcL in K-Medium beträgt nach Auflösung der Regressionsgleichung 25,22 mmol/l, der 95 %-Vertrauensbereich erstreckt sich von 24,92 bis 25,53 mmol/l. Der Zusammenhang zwischen den verschiedenen Konzentrationen und entsprechenden Probitwerten ist in Abb. 30 dargestellt. Die

Regressionsgleichung, seine mathematische Beschreibung, befindet sich oberhalb der Regressionsgerade zusammen mit dem Bestimmtheitsmaß. Dieses bescheinigt der Modellanpassung mit $R^2 = 0,9406$ eine hervorragende Güte.

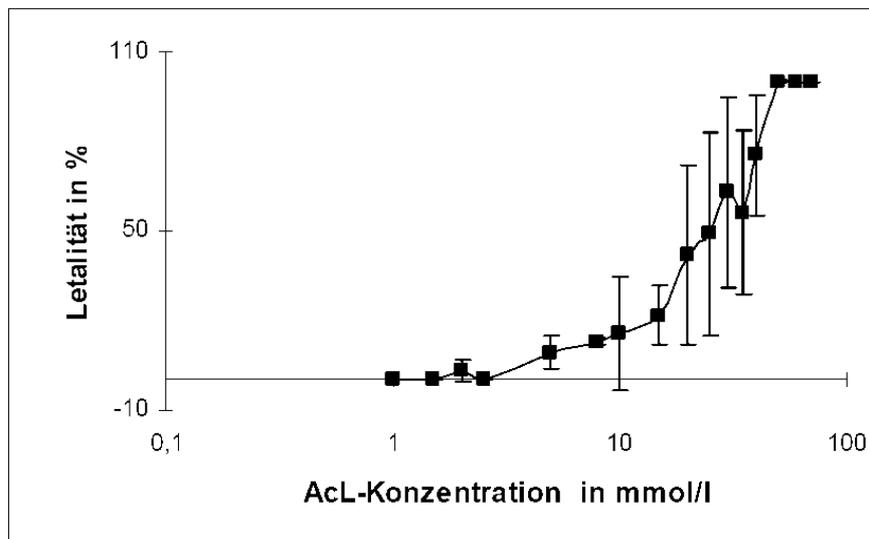


Abb. 29: Letalität durch Acrylamid in K-Medium

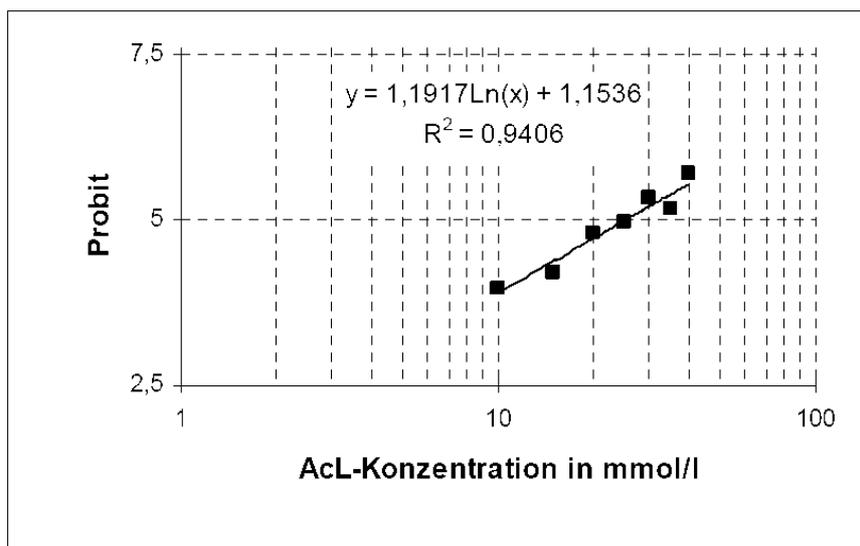


Abb. 30: Probitanalyse der Ergebnisse der Tests auf akute Toxizität nach 24 h mit Acrylamid in K-Medium

Akute Toxizitätstests mit Benzo(a)Pyren und 4 % DMSO

Die rm-Tests nach Grubbs entdeckten in den durchschnittlich 6-mal ($n = 1-17$) durchgeführten Tests zwei hochsignifikante und einen signifikanten Ausreißer (bei 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ bzw. in der Kontrolle), welche von weiteren Berechnungen ausgeschlossen wurden. Die übrigen Testergebnisse aller gemessenen Konzentrationen von BaP präsentiert Abb. 31. Keine der getesteten Konzentrationen an BaP bewirkte eine 100-prozentige Sterblichkeit bei den Nematoden.

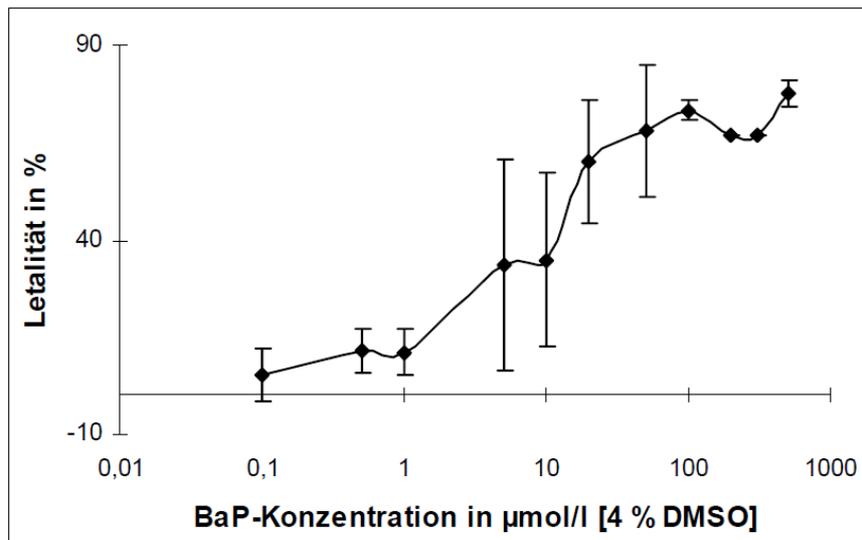


Abb. 31: Letalität durch Benzo(a)pyren (4 % DMSO) in autoklaviertem Wasser

Die Konzentration von 0,1 µmol/l befindet sich in der Größenordnung der Negativkontrolle, sie entspricht der NOEC. Ab der nächst höheren Konzentration (0,5 µmol/l = LOEC) treten Differenzen auf dem Signifikanzniveau $P \geq 99 \%$ auf. Die verschiedenen Konzentrationsstufen differieren zwischen 1 und 5 µmol/l, sowie zwischen 10 und 20 µmol/l.

Die nach Weir durchgeführten t-Tests erbringen entsprechende Ergebnisse.

Abb. 32 zeigt die Resultate der Testansätze mit BaP als Probitanalyse; eingezeichnet ist das daran angepasste Regressionsmodell mit -gleichung und zugehörigem Bestimmtheitsmaß. Nach diesem mit $R^2 = 0,9376$ ausgezeichneten Modell berechnet sich die LC50 für die akute Toxizität von BaP in den hier durchgeführten Tests zu 26,76 µmol/l mit einem 95 %-Vertrauensbereich von 23,64 bis 30,29 µmol/l.

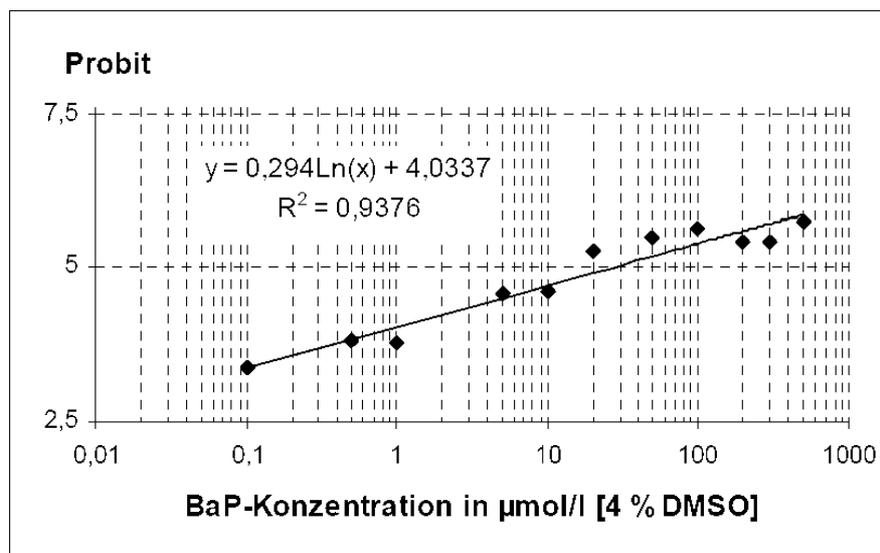


Abb. 32: Probitanalyse der Ergebnisse der Tests auf akute Toxizität nach 24 h mit Benzo(a)pyren (4 % DMSO) in autoklaviertem Wasser

Akute Toxizitätstests mit Kupfer(II)chlorid

In den Tests der akuten Toxizität von CuCl_2 gab es keine Ausreißer, die Testergebnisse der gemessenen Konzentrationen werden in Abb. 33 präsentiert. Der allmähliche Anstieg der Kurve mit den anwachsenden Konzentrationen an Cu^{2+} -Ionen veranschaulicht die Beziehung zwischen den eingesetzten Testkonzentrationen und den von ihnen ausgeübten Wirkungen.

Kein Individuum von *C. elegans* überlebte die 24-stündige Exponierung gegenüber den Kupfer-Konzentrationen 7,26 und 12,1 mmol/l.

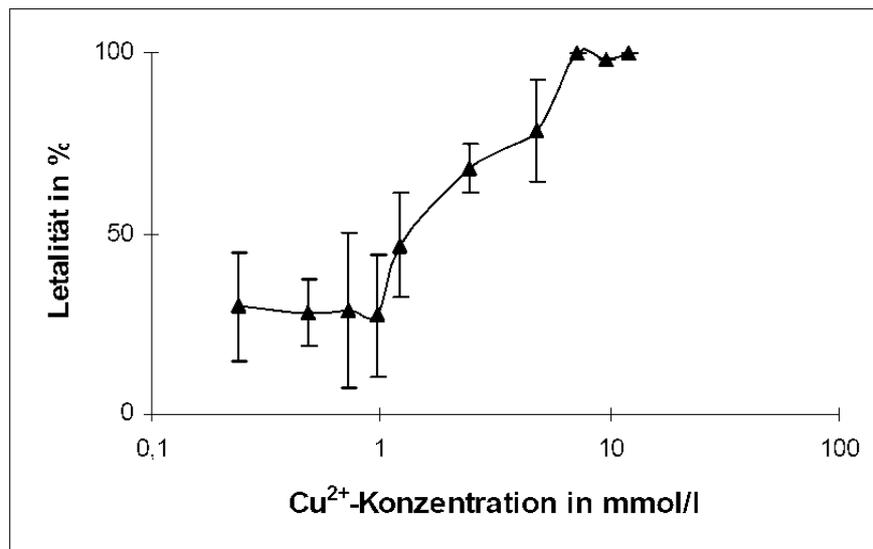


Abb. 33: Letalität durch Kupfer(II)chlorid in K-Medium

Zwischen der Negativkontrolle und den ersten 5 Konzentrationen bis einschließlich der NOEC von 0,968 mmol/l bestehen keine Unterschiede. Ab 1,21 mmol/l (= LOEC) sind Mittelwertsdifferenzen auf dem Signifikanzniveau $P \geq 95\%$ zu finden. Die Überprüfung durch t-Tests nach Weir findet zwar signifikante Differenzen bereits ab der ersten getesteten Konzentrationsstufe, da die Prüfgrößen jedoch bei 0,968 den kleinsten Wert aufweisen, muss hier die Ähnlichkeit am größten sein. Also kann diese Konzentration als NOEC bezeichnet werden.

Abb. 34 demonstriert den Verlauf der Probitanalyse und der Regressionsgerade, welche die Regressionsgleichung als Berechnungsgrundlage für die LC50 von CuCl_2 in K-Medium liefert. Mithilfe des durch das Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9465$ sehr gut angepassten Modells ergibt sich eine LC50 von 1,582 mmol/l, der entsprechende 95 %-Vertrauensbereich reicht von der Untergrenze von 1,579 bis zur Obergrenze von 1,585 mmol/l.

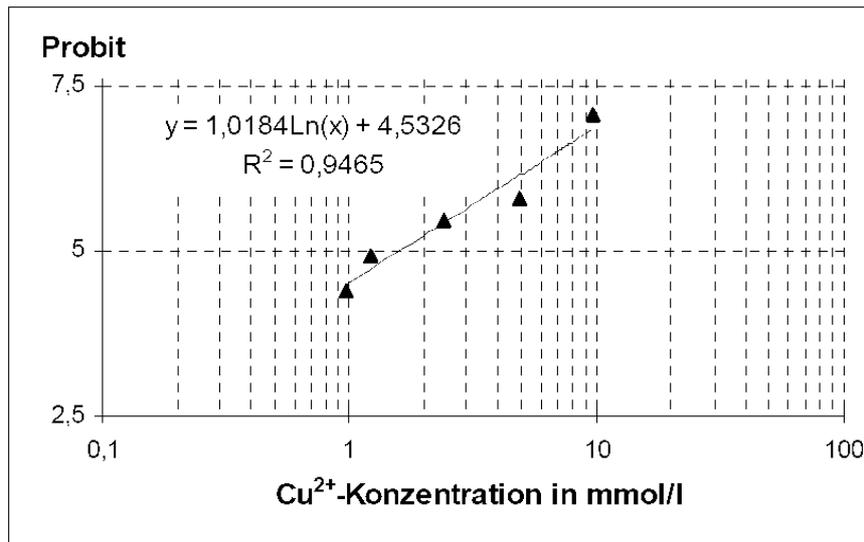


Abb. 34: Probitanalyse der Ergebnisse der Tests auf akute Toxizität nach 24 h mit Kupfer(II)chlorid in K-Medium

Akute Toxizitätstests mit Ethylmethansulfonat

Die Ergebnisse der Testansätze zur Ermittlung der akuten Toxizität von EMS wurden vom Ausreißertest nach Grubbs geprüft, welcher zwei Werte als Ausreißer klassifizierte: einen signifikanten bei 8 $\mu\text{mol/l}$ und einen hochsignifikanten bei 10 $\mu\text{mol/l}$. Die restlichen Resultate sind in Abb. 35 graphisch dargestellt. Bereits ab 15 $\mu\text{mol/l}$ starben alle in den Test eingesetzten Organismen.

In der Konzentration 2 $\mu\text{mol/l}$ (= NOEC) verursachte EMS laut den durchgeführten t-Tests noch keine merklichen Schädigungen an den eingesetzten *C. elegans*. Ab der LOEC 4 $\mu\text{mol/l}$ unterscheidet sich jedoch der Mittelwert der Negativkontrolle von denen aller weiteren Konzentrationen auf dem Signifikanzniveau $P \geq 99\%$.

Ferner wurden signifikante ($p < 0,05$) Anstiege der Mittelwerte von 2 auf 4 $\mu\text{mol/l}$ und von 4 auf 6 $\mu\text{mol/l}$ aufgedeckt.

Abb. 36 vermittelt einen Einblick in die Abhängigkeit zwischen den Resultaten der Probitanalyse und den Konzentrationen, welche durch das logarithmische Regressionsmodell angenähert wiedergegeben wird.

Nach der Gleichung des außerordentlich passenden Regressionsmodells ($R^2 = 0,9784$) beläuft sich die LC50 für die akute Toxizität von EMS in K-Medium auf 5,22 $\mu\text{mol/l}$, und der Vertrauensbereich auf dem 95 %-Niveau geht von 4,87 bis 5,59 $\mu\text{mol/l}$.

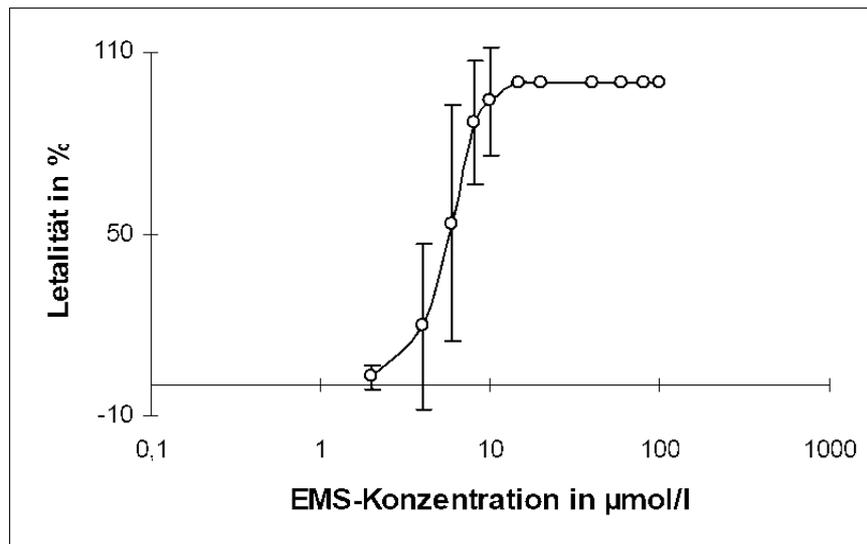


Abb. 35: Letalität durch Ethylmethansulfonat in K-Medium

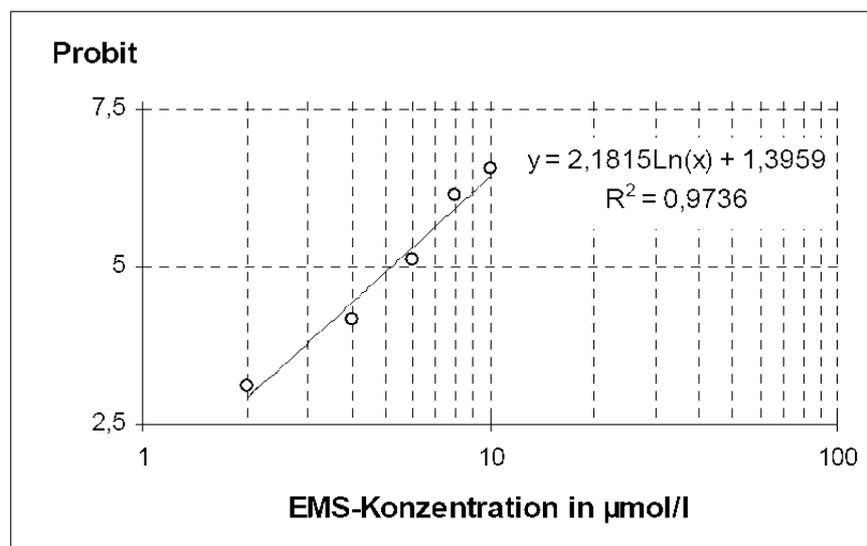


Abb. 36: Probitanalyse der Ergebnisse der Tests auf akute Toxizität nach 24 h mit Ethylmethansulfonat in K-Medium

3.3.2.3 Tests auf Reproduktions und Wachstumshemmung

Reproduktionstoxizität auf festem Medium

- Reproduktionstests mit Acrylamid (1 % DMSO) in NGM-Agar

Die Ergebnisse der Reproduktionstests mit AcL in NGM-Agar offenbart Abb. 37. Die aufgeführten Mittelwerte wurden nach Ausreißertests aus ein bis 5 Ansätzen verschiedenen Konzentration errechnet. In keiner Konzentrationsstufe wich ein Wert signifikant von den anderen ab. Eine 100-prozentige Hemmung der Fortpflanzung innerhalb der Testdauer wurde ab der Konzentration von 25 mmol/l erreicht.

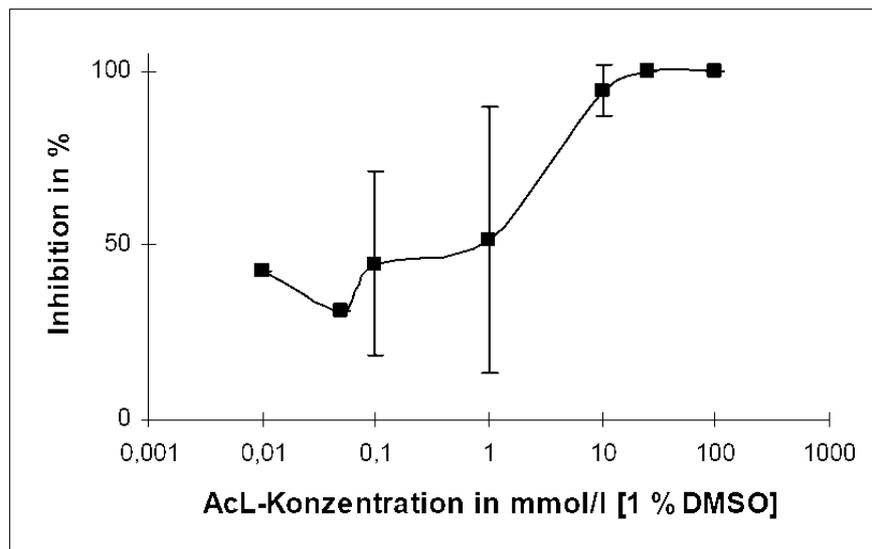


Abb. 37: Reproduktionshemmung durch Acrylamid (1 % DMSO) in NGM-Agar

Da schon ab der ersten getesteten Konzentration von 0,01 mmol/l AcL Unterschiede zwischen der Negativkontrolle und den anderen Konzentrationsstufen vorlagen, ist eine genaue NOEC nicht festzustellen, sie liegt unterhalb der getesteten Konzentrationen ($< 0,01$ mmol/l). Ab der LOEC von 0,01 mmol/l bis 0,05 mmol/l existieren signifikante ($p < 0,05$) und ab 0,1 mmol/l hochsignifikante ($p < 0,01$) Abstände zwischen den Mittelwerten. Zwischen den einzelnen Konzentrationen bestehen keine weiteren signifikanten Differenzen.

Bei der vorliegenden Varianzeninhomogenität bekräftigten die Tests nach der Weir-Methode diese Resultate.

Die Beziehung zwischen den Konzentrationen und den Probitanalysenwerten ist in Abb. 38 als Regressionsmodell graphisch dargestellt. Ihm nach wird die 72 h-EC50 für Reproduktionstests mit AcL zu 115,7 $\mu\text{mol/l}$ berechnet, 87,5 bis 153,1 $\mu\text{mol/l}$ entsprechen den Grenzen des 95 %-Vertrauensbereiches. Das Modell besitzt mit $R^2 = 0,7209$ noch eine solide Güte.

- Reproduktionstests mit Benzo(a)pyren (1 % DMSO) in NGM-Agar

Der rm-Test nach Grubbs fand keine Ausreißer bei diesen Tests. Die Ergebnisse aller gemessenen Konzentrationen von BaP werden in Abb. 39 präsentiert.

Es zeigt sich, dass bei der letzten untersuchten Konzentrationsstufe von 1000 $\mu\text{mol/l}$ nach 3 d noch gar keine Fortpflanzung stattfand.

Die Testkonzentrationen 0,1 und 0,5 $\mu\text{mol/l}$ sind signifikant ($p < 0,05$) verschieden von der Negativkontrolle, während ab 1 $\mu\text{mol/l}$ die Unterschiede bereits hochsignifikant sind ($p < 0,01$). Somit lässt sich wiederum keine genaue NOEC bestimmen, sie liegt unter der ersten getesteten Konzentrationsstufe 0,1 $\mu\text{mol/l}$ (= LOEC). Die

Mittelwerte der Konzentrationen 50 und 100 $\mu\text{mol/l}$ differieren auf dem Signifikanzniveau $P \geq 95\%$. Bei unterschiedlichen Varianzen ($p < 0,05$) bestätigten die Alternativberechnungen nach Weir diese Resultate.

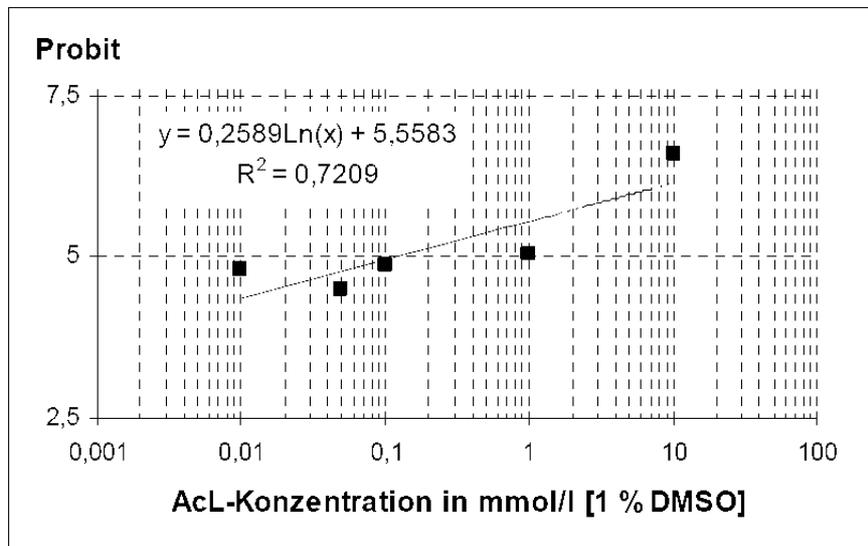


Abb. 38: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Reproduktionstests mit Acrylamid (1 % DMSO) in NGM-Agar

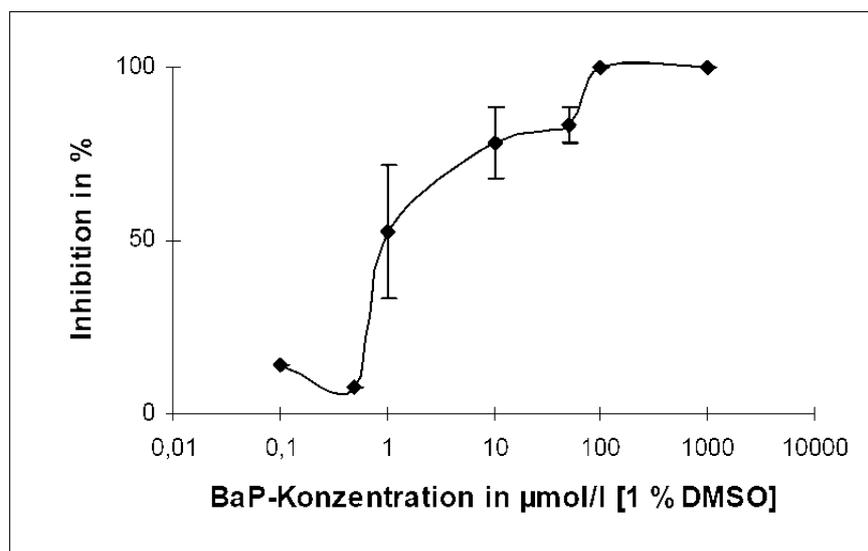


Abb. 39: Reproduktionshemmung durch Benzo(a)pyren (1 % DMSO) in NGM-Agar

Abb. 40 zeigt das Regressionsmodell, mit dessen Hilfe die 72 h-EC50 ermittelt wird. Sie beträgt 1,86 $\mu\text{mol/l}$ und besitzt einen 95 %-Vertrauensbereich von 1,63 bis 2,13 $\mu\text{mol/l}$. Mit dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,8283$ ist die Anpassung des Modells gut abgesichert.

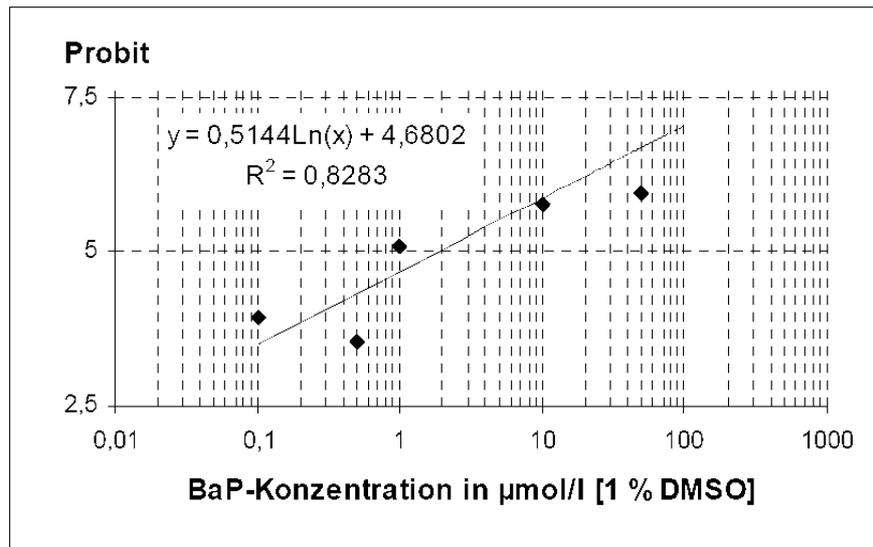


Abb. 40: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Reproduktionstests mit Benzo(a)pyren (1 % DMSO) in NGM-Agar

- Reproduktionstests mit Kupfer(II)chlorid (1 % DMSO) in NGM-Agar

In keiner Konzentrationsstufe wich ein Wert so weit vom Gruppenmittel ab, dass er im Ausreißer-Test signifikant ($P \geq 95\%$) auffiel. Die Testergebnisse aller gemessenen Konzentrationen von CuCl_2 werden in Abb. 41 vorgestellt. Nach 3 d war in der Konzentration von 100 mmol/l Reproduktion noch nicht zu beobachten.

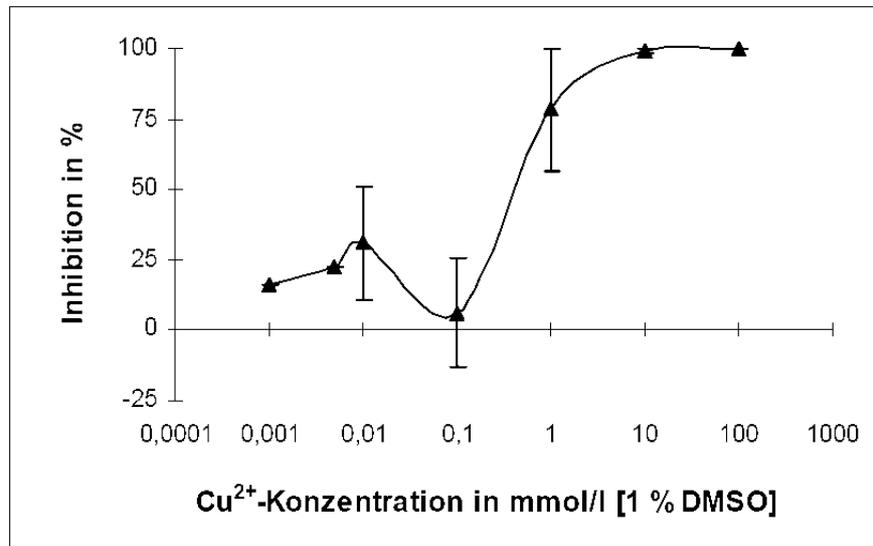


Abb. 41: Reproduktionshemmung durch Kupfer(II)chlorid (1 % DMSO) in NGM-Agar

Die Konzentrationen bis 0,1 mmol/l (= NOEC) hatten keine nachteiligen Auswirkungen auf die Reproduktion der Testorganismen. Dahingegen zeigen sich hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,01$) zwischen dem Kontrollmittel und den Mittelwerten der LOEC 1 mmol/l, den Konzentrationen 10 und 100 mmol/l. Vergleiche zwischen einzelnen Konzentrationsstufen bringen die signifikante Differenz ($p < 0,05$) zwischen 0,1 und 1 mmol/l zu Tage.

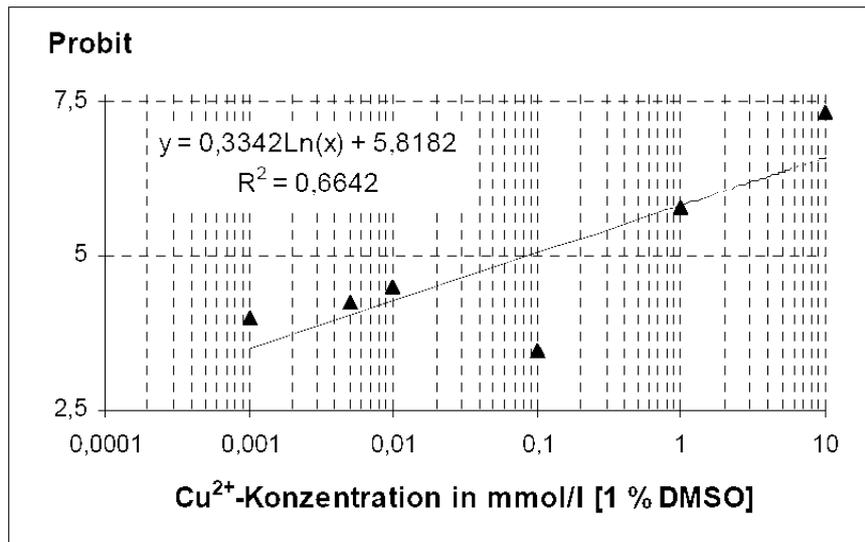


Abb. 42: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Reproduktionstests mit Kupfer(II)chlorid (1 % DMSO) in NMG-Agar

Die EC50 für 72 h liegt nach Auflösung der Regressionsgleichung hier bei 86,45 $\mu\text{mol/l}$ CuCl_2 , sie weist einen weiten 95 %-Vertrauensbereich von 69,11 bis 108,13 $\mu\text{mol/l}$ auf. Die Regression wird vom Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,6642$ als nur mäßig gut bezeugt und in Abb. 42 zusammen mit der Kurve der Probitwerte eingezeichnet.

Reproduktionstests mit Ethylmethansulfonat (1 % DMSO) in NGM-Agar

Nach Ermittlung und Entfernung eines signifikanten Ausreißers (76 % Inhibition bei 0,1 mmol/l) stellen sich die Resultate wie in Abb. 43 dar.

Gut zu erkennen ist die komplette Unterdrückung der Reproduktion während der Testdauer in der Konzentrationsstufe 94,2 mmol/l.

Die NOEC stimmt mit der niedrigsten geprüften Konzentrationsstufe überein. Die durchgeführten t-Tests finden Unterschiede der Mittelwerte zur Negativkontrolle auf dem 95 %-Signifikanzniveau ab der LOEC 0,05 mmol/l, hochsignifikant ($P \geq 99\%$) wird die Differenz erst in der höchsten kontrollierten Konzentration. Zwischen den einzelnen Konzentrationen werden keine signifikanten Anstiege der Mittelwerte festgestellt.

Abb. 44 gibt die Verteilung der Probitwerte und den Verlauf des besonders gut daran angepassten Regressionsmodells ($R^2 = 0,9575$) wieder. Die EC50 für die Reproduktions-toxizität von EMS in NGM-Agar lässt sich zu 339 $\mu\text{mol/l}$ berechnen. Ihr Vertrauensbereich auf dem 95 %-Niveau befindet sich zwischen 257,3 und 447,2 $\mu\text{mol/l}$.

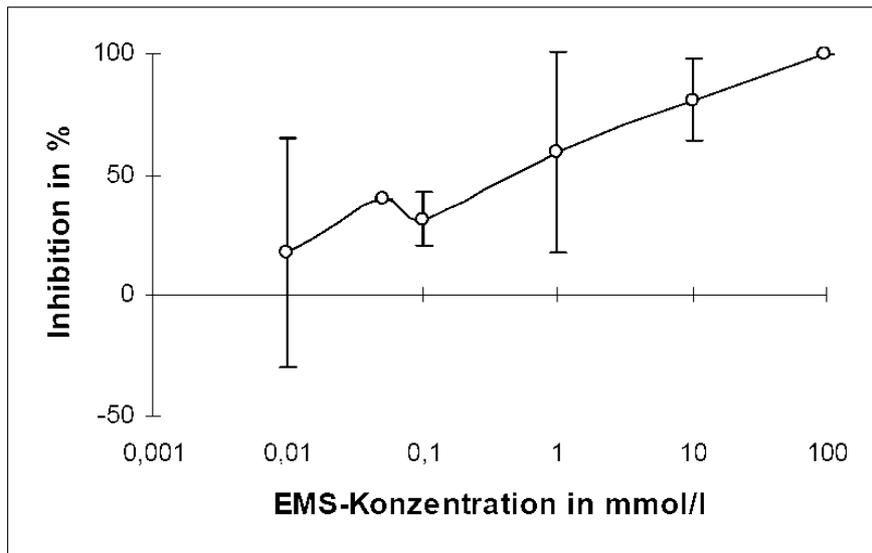


Abb. 43: Reproduktionshemmung durch Ethylmethansulfonat (1 % DMSO) in NGM-Agar

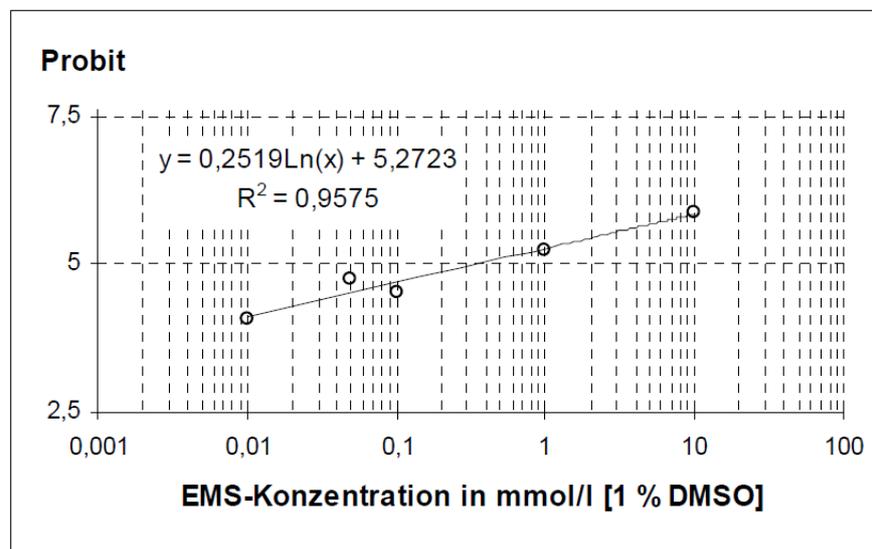


Abb. 44: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Reproduktionstests mit Ethylmethansulfonat (1 % DMSO) in NGM-Agar

Reproduktionstoxizität in flüssigen Medien

- Reproduktionstests mit Acrylamid in Flüssigmedium

In Abb. 45 werden die Messwerte der 3 d-Reproduktionstests mit AcL in K-Medium vorgestellt. Sie wurden aus mehrmals wiederholten Ansätzen ($n = 8$ bzw. 3) einzelner Konzentrationen berechnet, nachdem im rm -Test nach Grubbs kein Ausreißer aufgefallen war.

Die Fortpflanzung wurde durch keine der untersuchten Konzentrationen an Acrylamid so verlangsamt, dass sie im Zeitrahmen des Tests völlig ausblieb.

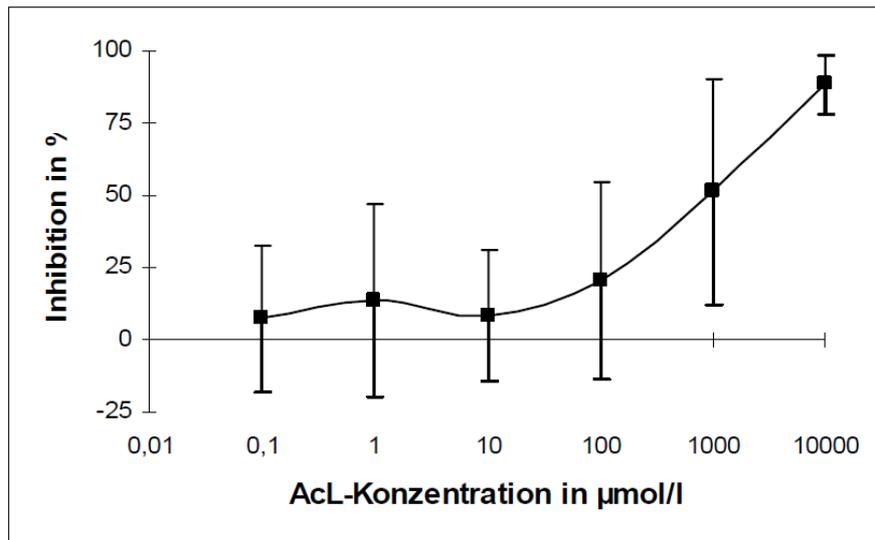


Abb. 45: Reproduktionshemmung durch Acrylamid in K-Medium

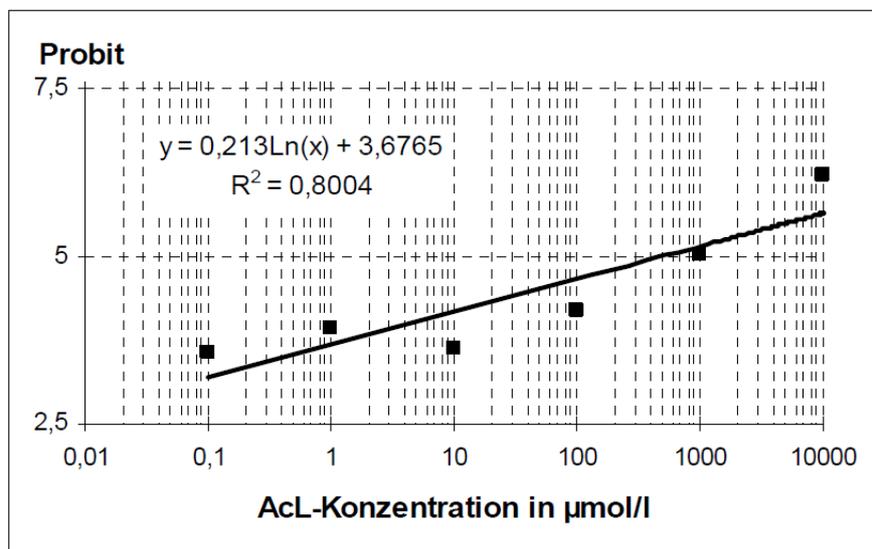


Abb. 46: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Reproduktionstests mit Acrylamid in K-Medium

Bis zur NOEC mit 100 µmol/l verursachte AcL keine merkliche Hemmung der Reproduktion. Von der Negativkontrolle mit Wasser statt Testlösung unterscheiden sich erst die zwei höchsten untersuchten Konzentrationen 1000 (= LOEC) und 10000 µmol/l, sie weisen hochsignifikante ($p < 0,01$) Unterschiede auf. Zwischen den einzelnen Testkonzentrationen ergeben sich keine Mittelwertdifferenzen. Da durchgehend Varianzhomogenität vorliegt, ist die Bestimmung nach der Methode von Weir für die Kontrolle nicht von Nutzen.

In Abb. 46 ist das Regressionsmodell eingetragen, mit welchem die EC50 für 3 d-Reproduktionstests mit AcL in K-Medium zu 499,5 µmol/l bestimmt wird. Die untere Grenze ihres 95 %-Vertrauensbereiches liegt bei 334,4 und die obere bei 746,1 µmol/l. Dem Regressionsmodell wird mit $R^2 = 0,8004$ eine gute Anpassung attestiert.

- Reproduktionstests mit Benzo(a)pyren (0,5 % DMSO) in Flüssigmedium

Abb. 47 ist die Ergebnisdarstellung der Reproduktionstests mit BaP in autoklaviertem Wasser. Es wurden 4 Werte entfernt, da der Ausreißer-Test sie als solche auf dem Signifikanzniveau $P \geq 95 \%$ identifizierte. In den beiden größten Testkonzentrationen 5000 und 50000 nmol/l sind 100-prozentige Hemmungen der Reproduktion festzustellen.

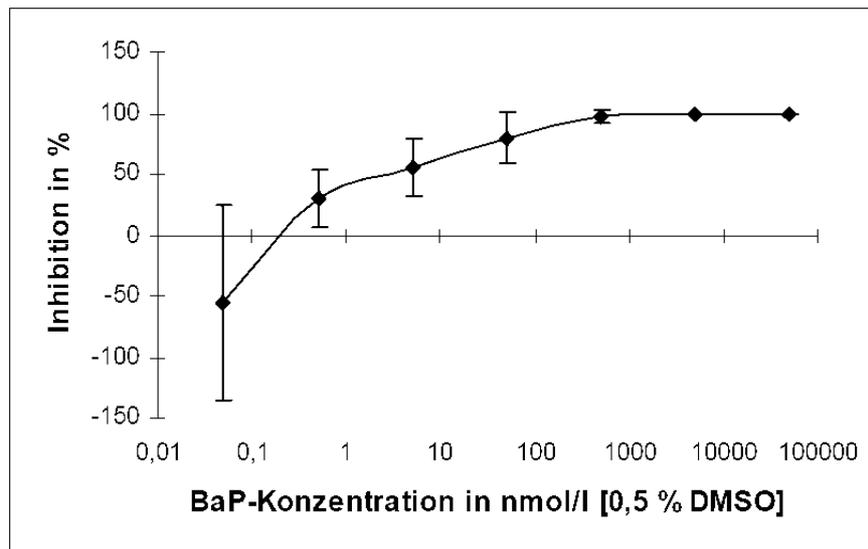


Abb. 47: Reproduktionshemmung durch Benzo(a)pyren (0,5 % DMSO) in autoklaviertem Wasser

Die NOEC 0,05 nmol/l liegt in der Größenordnung der nur mit DMSO angesetzten Negativkontrolle. Zu dieser tun sich ab der LOEC von 0,5 nmol/l signifikante Unterschiede auf, während alle weiteren Konzentrationsstufen auf dem Signifikanzniveau $P \geq 99 \%$ davon differieren.

Zu diesen Ergebnissen führte die Mittelung der Resultate der verschiedenen Methoden, t-Tests durchzuführen. Bestätigt wird der Sachverhalt von einer visuellen Überprüfung des Graphen in Abb. 47.

Abb. 48 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen Konzentrationen und Probitanalyse graphisch und mit der Regressionsgleichung auch mathematisch. Das mit $R^2 = 0,9827$ nahezu perfekt angepasste Regressionsmodell setzt die 72 h-EC50 von BaP bei 2,89 nmol/l fest. Der Vertrauensbereich auf dem Niveau von 95 % reicht von 1,91 bis zu 4,37 nmol/l.

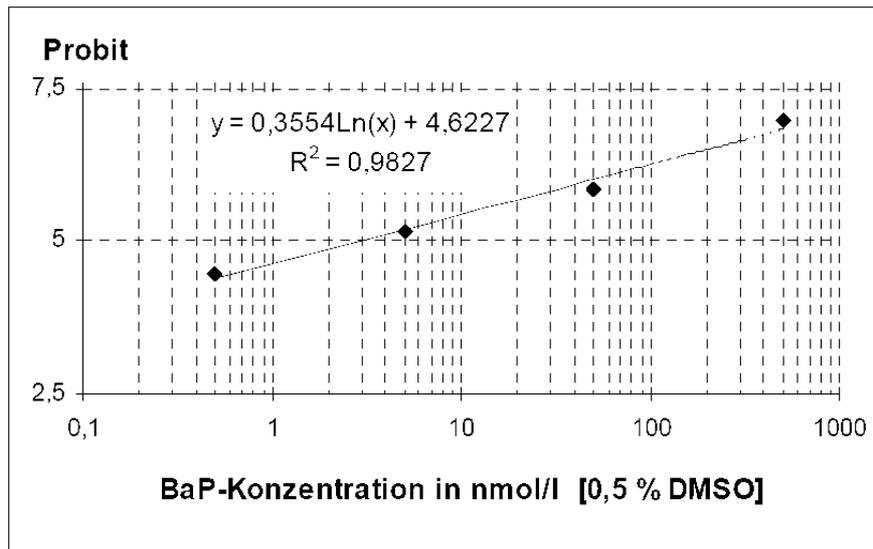


Abb. 48: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Reproduktionstests mit Benzo(a)pyren (0,5 % DMSO) in autoklaviertem Wasser

- Reproduktionstests mit Kupfer(II)chlorid in Flüssigmedium

Der rm-Test nach Grubbs spürte einen Ausreißer in diesen Testreihen auf (80-prozentige Reproduktionssteigerung durch 0,05 $\mu\text{mol Cu}^{2+}$ -Ionen pro l). Die Mittelwerte der restlichen Testergebnisse aller untersuchten Konzentrationen von CuCl_2 werden in Abb. 49 vorgestellt.

Die Fortpflanzung der Nematoden wurde bei 0,1 $\mu\text{mol/l}$ verstärkt und dann mit den steigenden Konzentrationen gehemmt, bis sie bei 50 und 1000 $\mu\text{mol/l}$ innerhalb der dreitägigen Testdauer noch nicht stattfand.

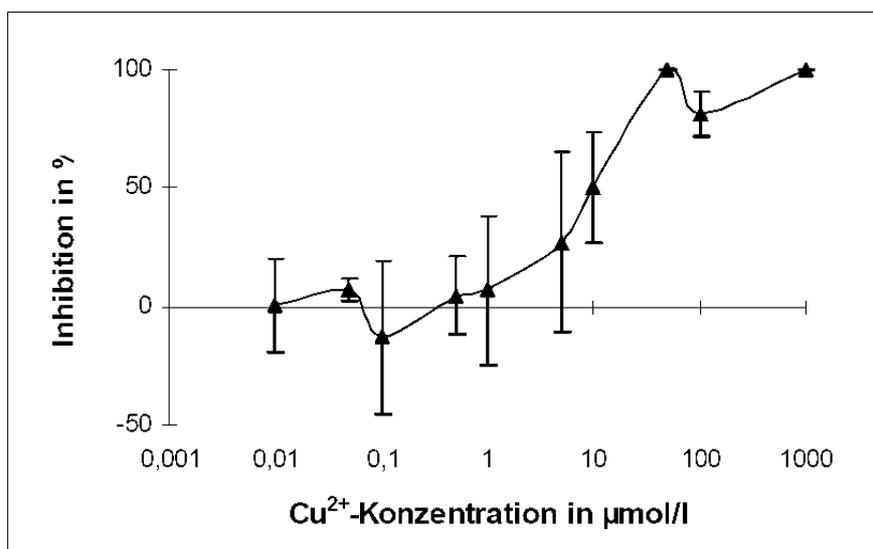


Abb. 49: Reproduktionshemmung durch Kupfer(II)chlorid in K-Medium

Die ersten 6 Konzentrationsstufen unterscheiden sich nicht von der Negativkontrolle. Erst ab 10 $\mu\text{mol/l}$ treten Unterschiede auf, sofort auf dem Signifikanzniveau von $P \geq 99\%$.

Die zusätzlichen Überprüfungen nach der Methode von Weir erbringen signifikante Mittelwertsdifferenzen schon zwischen der Negativkontrolle und den drei Konzentrationen von 0,5 bis 5 $\mu\text{mol/l}$. Des Weiteren steigen hiernach auch die Mittelwerte von 0,05 auf 0,1 $\mu\text{mol/l}$, von 10 auf 50 $\mu\text{mol/l}$ sowie von 50 auf 100 $\mu\text{mol/l}$ um signifikante Beträge an.

Die Kombination der verschiedenen t-Tests führt zu einer auch in Abb. 48 klar erkennbaren NOEC von 1 $\mu\text{mol/l}$, woraus eine LOEC von 5 $\mu\text{mol/l}$ folgt.

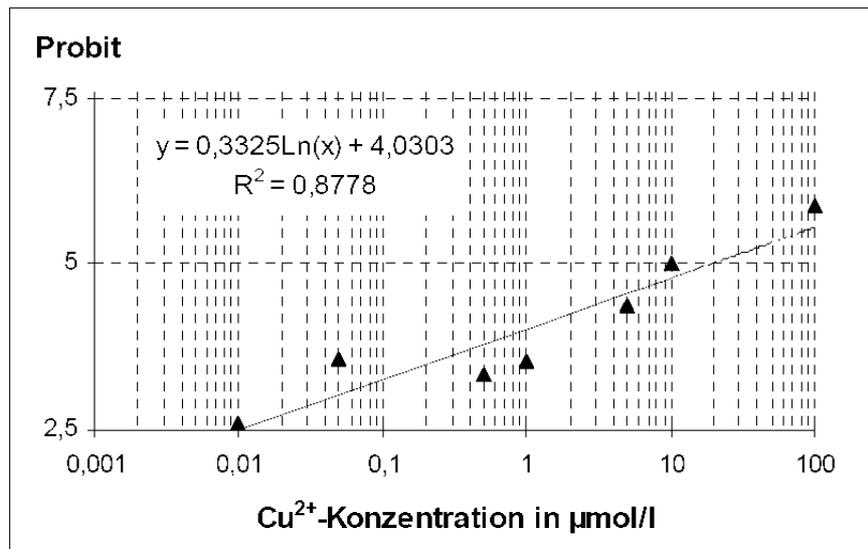


Abb. 50: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Reproduktionstests mit Kupfer(II)chlorid in K-Medium

Abb. 50 illustriert die Lage der Ergebnisse der Probitanalyse zum daran angepassten Regressionsmodell, dem mit $R^2 = 0,8778$ eine hohe Güte vom Bestimmtheitsmaß bescheinigt wird. Die 72 h-EC50 für CuCl_2 errechnet sich zu 18,47 $\mu\text{mol/l}$. Die Grenzen ihres 95 %-Vertrauensbereiches liegen bei 13,78 und 24,78 $\mu\text{mol/l}$.

- Reproduktionstests mit Ethylmethansulfonat in Flüssigmedium

Der Ausreißertest nach Grubbs identifizierte keinen Wert als signifikanten Ausreißer. Die Mittelwerte der Testdaten finden sich in Abb. 51. Die untersuchten Konzentrationen von EMS bewirkten Hemmungen von maximal 70 %.

Der t-Test machte nur einen signifikanten Unterschied zwischen der Negativkontrolle und 500 nmol/l aus.

Dieses Resultat bestätigte die durch vorliegende Varianzeninhomogenität berechnete Überprüfung mit der Weir-Methode nicht, es befinden sich zwischen der Kontrolle und allen anderen Testkonzentrationen signifikante Differenzen, was eine visuelle

Überprüfung bekräftigen kann. Also existiert eine NOEC unterhalb der LOEC von 0,05 nmol/l.

Einzelne Konzentrationsstufen unterscheiden sich nicht voneinander.

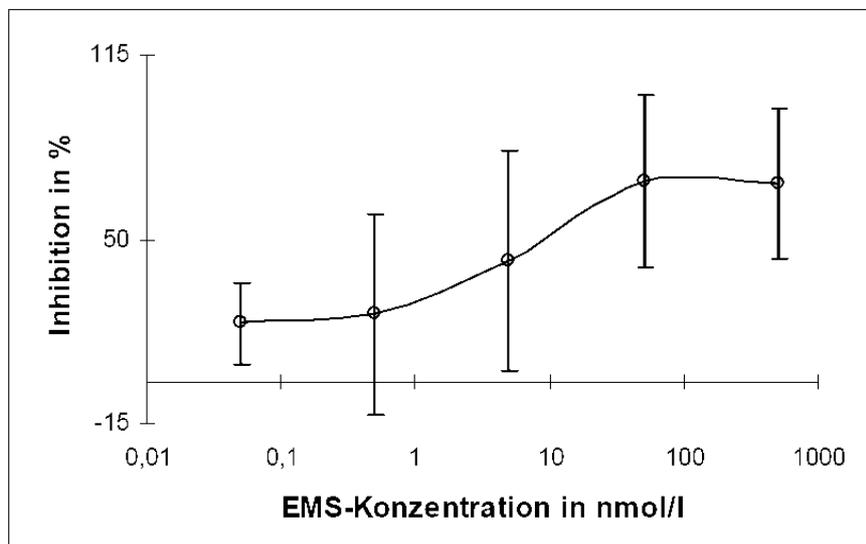


Abb. 51: Reproduktionshemmung durch Ethylmethansulfonat in K-Medium

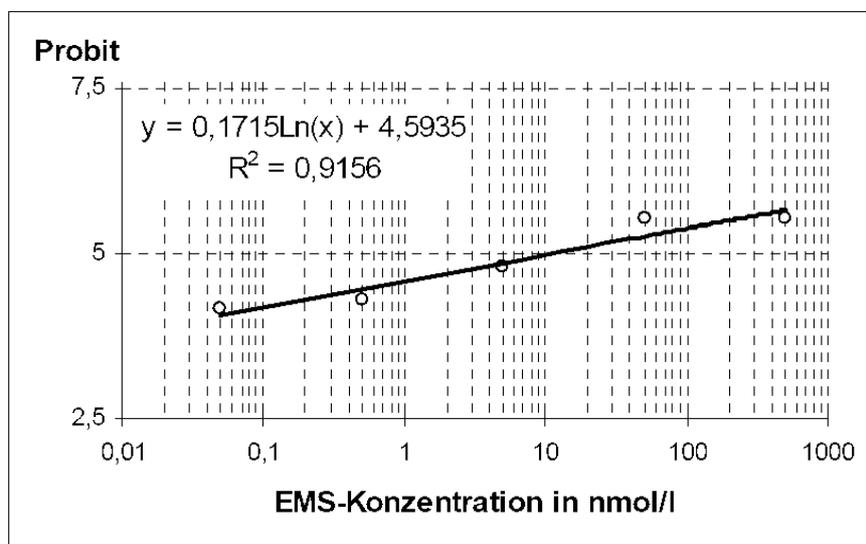


Abb. 52: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Reproduktionstests mit Ethylmethansulfonat in K-Medium

Das in Abb. 52 gezeigte Regressionsmodell ermöglicht die Ermittlung der EC50 der Hemmwirkung von EMS nach 3 d Exposition zu 10,70 nmol/l mit einem weit gespannten 95 %-Vertrauensbereich von 5,17 bis 22,16 $\mu\text{mol/l}$. Sein Bestimmtheitsmaß von 0,9156 weist der Anpassung eine beträchtliche Güte zu.

Wachstumshemmung auf festem Medium

- Wachstum bei Reproduktionstests mit Acrylamid (1 % DMSO) in NGM-Agar

Die Abb. 53 zeigt die gemessenen Größen der 3 d alten Nematoden bei den Reproduktionstests mit AcL in NGM-Agar als festem Medium. Der Ausreißertest nach Grubbs entdeckte keine von den Gruppenmitteln signifikant abweichenden Werte.

Die Testkonzentrationen verursachten maximal eine ungefähr 20-prozentige Hemmung des Nematodenwachstums.

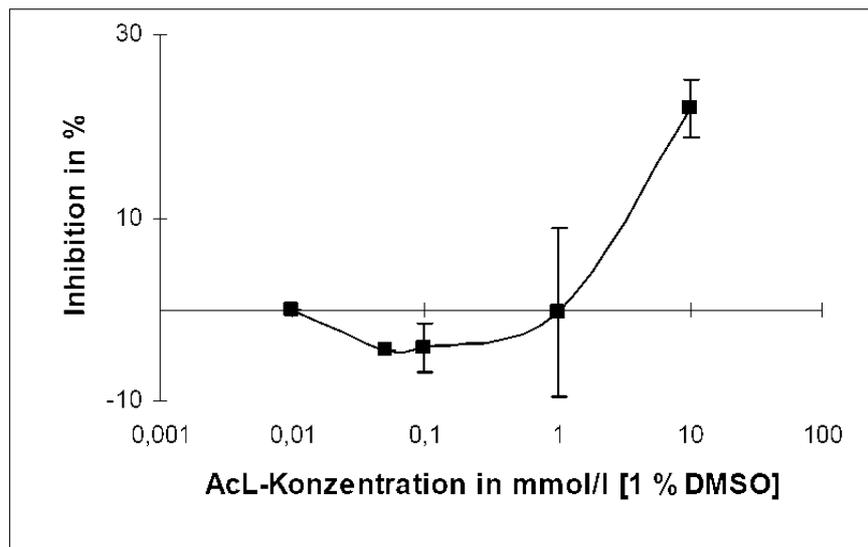


Abb. 53: Wachstumshemmung durch Acrylamid (1 % DMSO) in NGM-Agar

Einen hochsignifikanten Mittelwertanstieg ($p < 0,01$) zwischen Negativkontrolle und Testkonzentrationen erkennen die t-Tests erst ab 10 mmol/l, was der LOEC entspricht. Unterhalb der LOEC befindet sich bei 1 mmol/l die NOEC. Alle weiteren gefundenen signifikanten Unterschiede (zwischen der Kontrolle und 0,05 sowie 0,1 mmol/l) rühren von der fördernden Wirkung her, die AcL in diesen Tests auf das Nematodenwachstum ausübt.

Die Testkonzentrationen bis zur NOEC bewirkten keine Hemmung des Wachstums, was sich in negativen Daten niederschlägt. Die logarithmische Transformation jedoch ist nur mit positiven Werten möglich, also sobald eine Wachstumshemmung eintritt. Dies war nur bei einer einzigen Testkonzentration, nämlich der LOEC der Fall, weswegen Regression, zugehörige Gleichung und Bestimmtheitsmaß entfallen. Die Probitanalyse erbringt mit 4,225 nur ein Resultat und lässt daher auf eine 72 h-EC50 (dem Probit 5 entsprechend) für die wachstumshemmende Wirkung von AcL oberhalb von 10 mmol/l schließen.

- Wachstum bei Reproduktionstests mit Benzo(a)pyren (1 % DMSO) in NGM-Agar
Die Testergebnisse aller gemessenen Konzentrationen von BaP werden in Form von Mittelwerten in Abb. 54 präsentiert. Es fehlt kein Wert, da sich mit dem rm-Test ein nur wahrscheinlicher Ausreißer aufdecken liess, der unterhalb des Signifikanzniveaus 95 % liegt. Die maximal erreichte Inhibition des Wachstums lag ein wenig über 20 %.

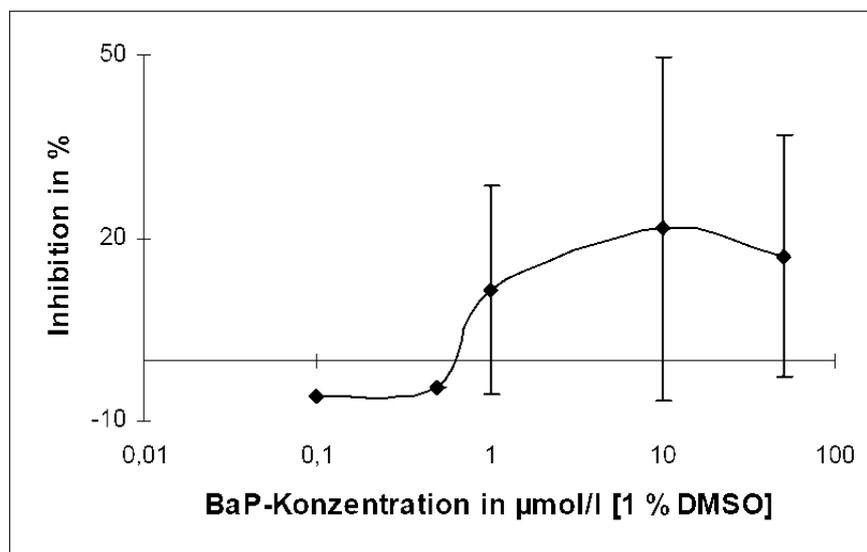


Abb. 54: Wachstumshemmung durch Benzo(a)pyren (1 % DMSO) in NGM-Agar

Auch hier verstärkte die Testsubstanz zunächst das Wachstum, die Mittelwerte der Testkonzentrationen sinken daher ins Negative, was die t-Tests bei 0,1 und 0,5 $\mu\text{mol/l}$ aufdecken. Ebenso finden beide t-Tests den durch höhere Testkonzentrationen (10 und 50 $\mu\text{mol/l}$) verursachten signifikanten Mittelwertanstieg zu dem der Negativkontrolle. Somit kommt die Konzentration 10 $\mu\text{mol/l}$ der LOEC gleich, die darunter liegende Konzentrationsstufe 1 $\mu\text{mol/l}$ beschreibt die NOEC.

Die genaue Bestimmung einer EC50 für die Auswirkungen verschiedener Konzentrationen von BaP bei dreitägiger Exponierung ist nicht möglich. Es liegen lediglich drei Testkonzentrationen vor, die einen hemmenden Effekt auf das Wachstum der Nematoden ausüben, und die Schadwirkung der höchsten Testkonzentration ist schwächer als die der davor liegenden, die Konzentrations-Wirkungs-Kurve sinkt am Ende ab. Ein logarithmisches Regressionsmodell ist nicht anzupassen.

Die Probitanalyse weist allerdings darauf hin, dass die 72 h-EC50 für Wachstumshemmung durch BaP über 5 $\mu\text{mol/l}$ liegen muss.

- Wachstum bei Reproduktionstests mit Kupfer(II)chlorid (1 % DMSO) in NGM-Agar
Die Mittelung ausnahmslos aller Daten der Testkonzentrationen von CuCl_2 ergibt die Konzentrations-Wirkungs-Kurve in Abb. 55. Eine ungefähr 20-prozentige Hemmung des Nematodenwachstums wurde durch die höchste Konzentrationsstufe bei den Testorganismen bewirkt.

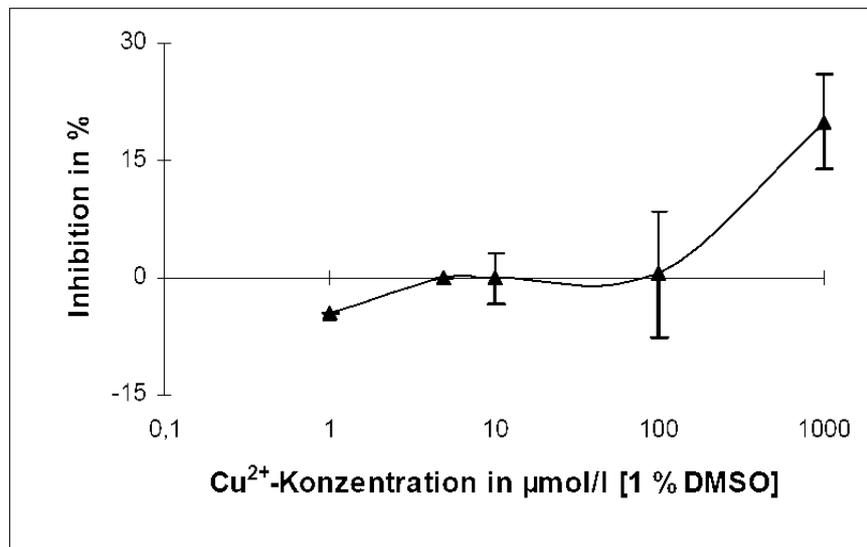


Abb. 55: Wachstumshemmung durch Kupfer(II)chlorid in (1 % DMSO) NGM-Agar

Durch die t-Tests wird das Anwachsen des Mittelwerts der höchsten Testkonzentration von 1000 $\mu\text{mol/l}$ gegenüber dem der Kontrolle auf dem Signifikanzniveau $P \geq 95 \%$ entdeckt. Somit ergeben sich NOEC und LOEC zu 100 bzw. 1000 $\mu\text{mol/l}$. Die kleinste getestete Konzentration löste verstärktes Wachstum bei *C. elegans* aus, was im hochsignifikanten Absinken des Mittelwerts gegenüber der Kontrolle Ausdruck findet.

Da nur NOEC und LOEC positive Werte der Inhibition verursachen, ist die statistische Aussagekraft einer derart berechneten EC_{50} sehr beschränkt. Mit größerer Sicherheit ist vorauszusagen, dass sich die 72 h- EC_{50} für Wachstum hindernde Effekte von CuCl_2 oberhalb der LOEC (Probit = 4,154) von 1000 $\mu\text{mol/l}$ befindet.

- Wachstum bei Reproduktionstests mit Ethylmethansulfonat (1 % DMSO) in NGM-Agar

Der rm-Test nach Grubbbs spürte nur einen wahrscheinlichen ($P < 95 \%$) Ausreißer auf, der nicht entfernt wurde. Alle Messergebnisse der 3 d-Tests mit EMS und ihre Darstellung werden in Abb. 56 ersichtlich. Die maximale Hemmung des Nematodenwachstums liegt bei 25 %.

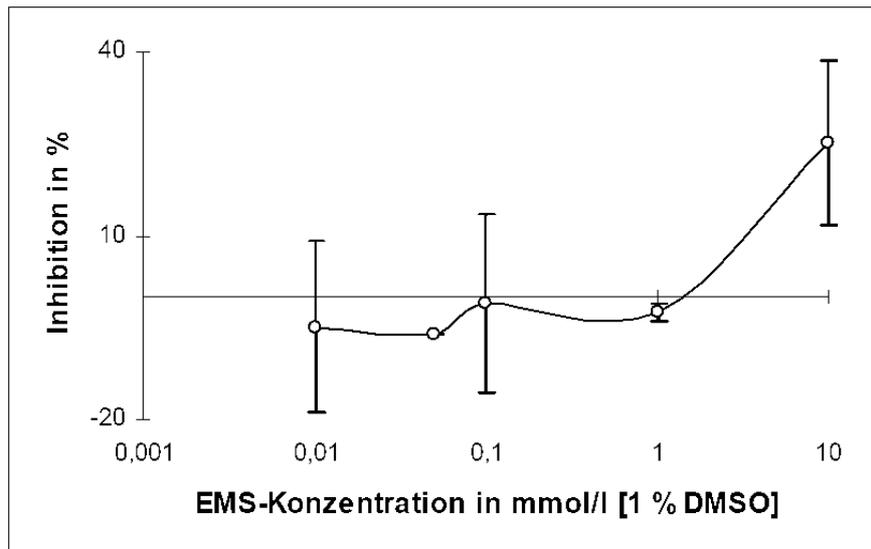


Abb. 56: Wachstumshemmung durch Ethylmethansulfonat (1 % DMSO) in NGM-Agar

Das anfänglich geförderte Wachstum der Versuchstiere schlägt sich im hochsignifikanten Mittelwertsunterschied zwischen Kontrolle und Testkonzentration 0,05 mmol/l nieder. Die LOEC wird von den t-Tests als signifikanter Anstieg bei 10 mmol/l aufgefunden, was die NOEC auf 1 mmol/l festlegt.

Eine genaue EC50 ist wegen der Verstärkung des Wachstums bei fast allen Testkonzentrationen nicht berechenbar. Bei der höchsten Konzentrationsstufe beträgt der Probit 4,372, was die Folgerung zulässt, dass die 72 h-EC50 für nachteilige Auswirkungen von EMS auf das Wachstum von *C. elegans* oberhalb von 10 mmol/l einzuordnen ist.

Wachstumshemmung in flüssigen Medien

- Wachstum bei 72 h-Tests mit Acrylamid in Flüssigmedium

In Abb. 57 finden sich die Ergebnisse der Größenmessungen der Nematoden bei den Reproduktionstests nach dreitägiger Exposition mit AcL in flüssigem K-Medium als Mittelwerte der verschiedenen überprüften Konzentrationen. Die als signifikante ($p < 0,05$) Ausreißer identifizierten Werte 5 und 13 bei den Testkonzentrationen 100 bzw. 1000 $\mu\text{mol/l}$ wurden zuvor entfernt. Die Testsubstanz verursachte maximal eine Wachstumshemmung von etwa 32 %.

Die Negativkontrolle unterscheidet sich signifikant von den beiden Konzentrationen 0,1 (Verstärkung) und 10 $\mu\text{mol/l}$ (= LOEC), hochsignifikante Differenzen auf einem Niveau von $P \geq 99\%$ existieren ab der Testkonzentration 100 $\mu\text{mol/l}$. Bis einschließlich 1 $\mu\text{mol/l}$ ergaben sich keine nachteiligen Auswirkungen auf das Wachstum der Testorganismen, diese Testkonzentration ist die NOEC.

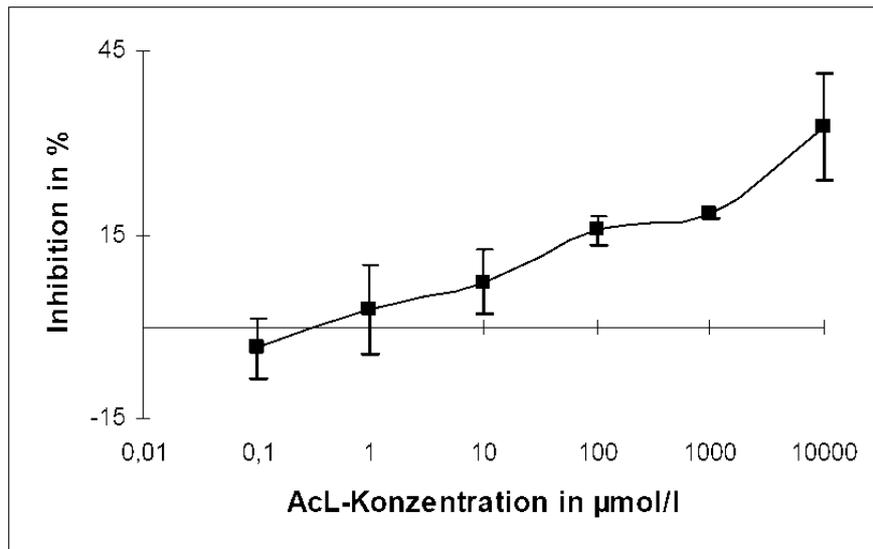


Abb. 57: Wachstumshemmung durch Acrylamid in K-Medium

Mithilfe des sehr gut angepassten Regressionsmodelles, dessen Gleichung und Bestimmtheitsmaß sich neben den Resultaten der Probitanalyse in Abb. 58 zeigen, lässt sich die 72 h-EC50 der wachstumshinderlichen Effekte von AcL zu 205,69 mmol/l berechnen inner-halb eines relativ großen 95 %-Vertrauensbereiches von 195,97 bis zu 399,3 mmol/l.

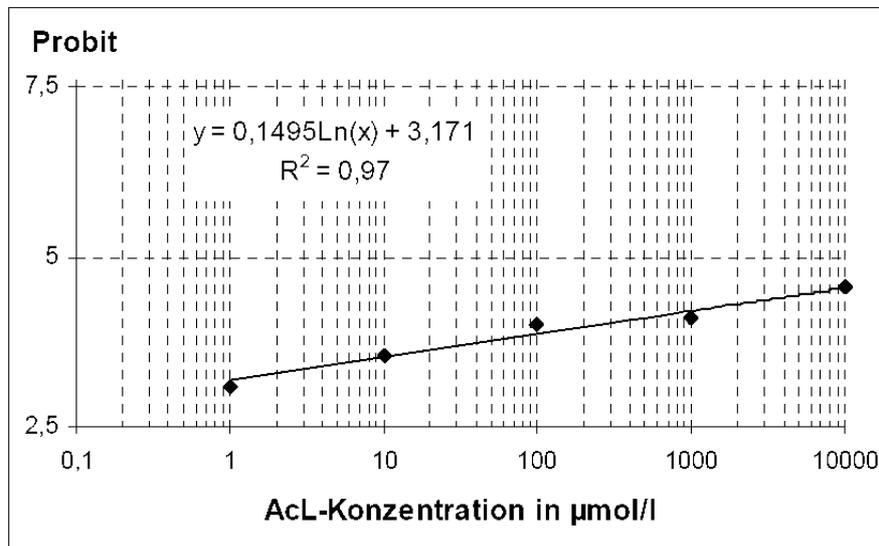


Abb. 58: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Wachstumstests mit Acrylamid in K-Medium

- Wachstum bei 72 h-Tests mit Benzo(a)pyren (0,5 % DMSO) in Flüssigmedium

Abb. 59 präsentiert die gemittelten Ergebnisse der Testkonzentrationen von BaP. In diesen Testreihen spürte der rm-Test nach Grubbs viele Ausreißer auf, die von weiteren statistischen Bearbeitungsschritten auszuschließen waren: auf dem Signifikanzniveau $P \geq 95 \%$ 4 Werte und auf dem Niveau $P \geq 99 \%$ zwei, wobei die Testkonzentrationen 500 und 5000 nmol/l besonders auffallen, da beide zwei

Ausreißer enthalten. Die höchste getestete BaP-Konzentration bewirkte eine Wachstumshemmung von ca. 60 %.

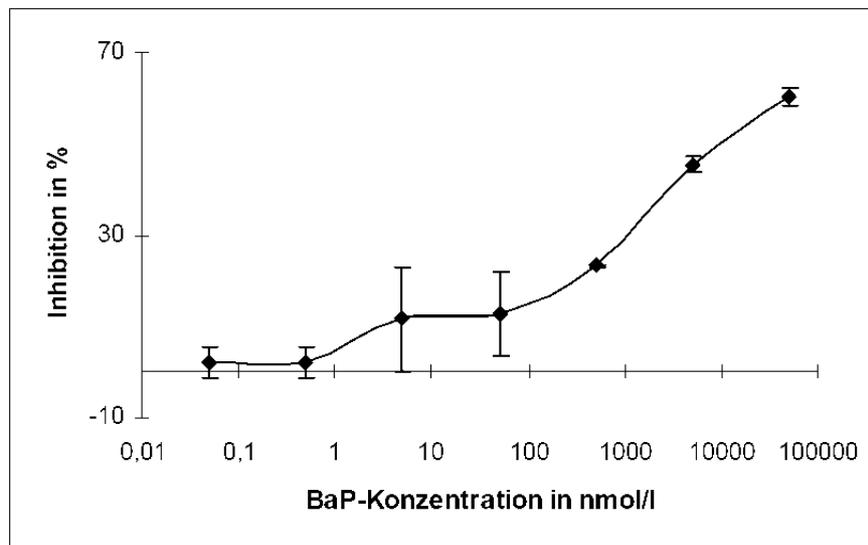


Abb. 59: Wachstumshemmung durch Benzo(a)pyren (0,5 % DMSO) in autoklaviertem Wasser

Die durch verschiedene Methoden von t-Tests angestellten Mittelwertvergleiche erbringen exakt dasselbe Ergebnis. Bis zur NOEC von 50 nmol/l treten keinerlei signifikante Unterschiede auf, ab der LOEC von 500 nmol/l sind die Mittelwertunterschiede zur Negativkontrolle signifikant ($p < 0,05$).

Das Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9629$ attestiert der Anpassung des in Abb. 60 dargestellten Regressionsmodells eine auffallend gute Qualität. Diesem logarithmischen Modell nach beträgt die Konzentration von BaP, bei der 50 % der eingesetzten Testorganismen nach 3 d Exposition eine Hemmung ihres Längenwachstums erfahren, $15,5 \mu\text{mol/l}$ (=72 h-EC50). Die Grenzen ihres 95 %-Vertrauensbereiches reichen von 8,19 bis $29,38 \mu\text{mol/l}$.

- Wachstum bei 72 h-Tests mit Kupfer(II)chlorid in Flüssigmedium

In der CuCl_2 -Konzentration von $50 \mu\text{mol/l}$ fand der Grubbs-Test einen auf dem Niveau $P \geq 95 \%$ signifikanten Ausreißer mit dem Wert 7. Nach seiner Elimination erfolgte eine Mittelwertbildung in den restlichen Konzentrationsstufen, welche in Abb. 61 mit ihren Standardabweichungen wiedergegeben sind. Die 100-prozentige Inhibition bei der Konzentration $1000 \mu\text{mol/l}$ kommt durch Absterben und daraus resultierendem Nicht-Wiederauffinden der Testorganismen zustande. Die nächst geringere Testkonzentration zeichnet verantwortlich für eine annähernd 70-prozentige Wachstumshemmung.

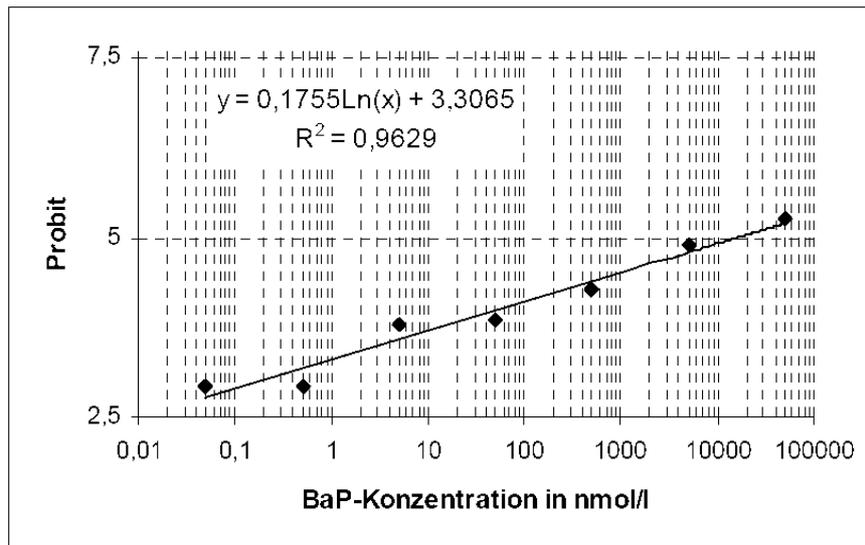


Abb. 60: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Wachstumstests mit Benzo(a)pyren (0,5 % DMSO) in autoklaviertem Wasser

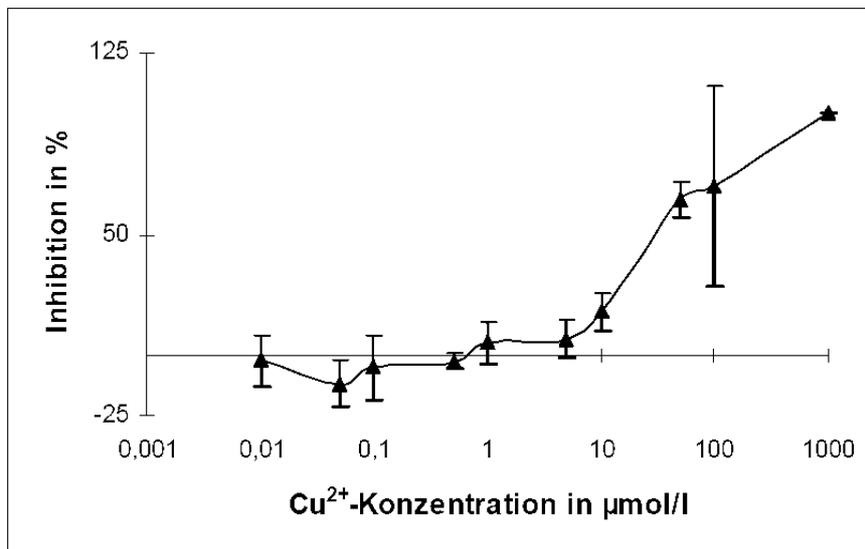


Abb. 61: Wachstumshemmung durch Kupfer(II)chlorid in K-Medium

Die durch t-Tests aufgedeckten signifikanten Mittelwertunterschiede ($p < 0,05$) zwischen der Negativkontrolle und 0,05 sowie 0,1 $\mu\text{mol/l}$ sind auf Verstärkung des Nematodenwachstums zurückzuführen. Die Konzentrationsstufe 0,5 $\mu\text{mol/l}$ weist keine Differenz zur Kontrolle auf, sie entspricht der NOEC. Ab der LOEC von 1 $\mu\text{mol/l}$ ergeben sich signifikante, ab 10 $\mu\text{mol/l}$ hochsignifikante ($p < 0,01$) Mittelwertanstiege. Das Regressionsmodell wird vom Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9126$ als äußerst gut bewertet. Die Berechnungen erbringen eine 72 h-EC50 von 40,23 $\mu\text{mol/l}$ für durch CuCl_2 entstehende Hinderungen des Längenwachstums. Die Grenzen des zugehörigen Vertrauensbereiches auf dem 95 %-Niveau befinden sich bei 33,25 und 48,67 $\mu\text{mol/l}$. Tatsächliche Konzentrations-Wirkungs-Beziehung und angepasstes Modell lassen sich in Abb. 62 betrachten.

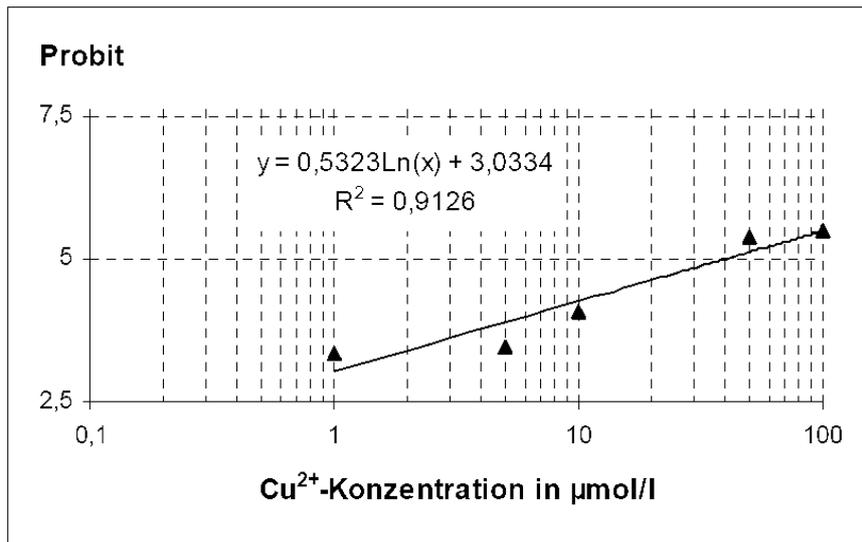


Abb. 62: Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Wachstumstests mit Kupfer(II)chlorid in K-Medium

- Wachstum bei 72 h-Tests mit Ethylmethansulfonat in Flüssigmedium

Nachdem der Ausreißertest weder hoch-, noch signifikante Differenzen auffinden konnte, wurden die Ergebnisse der Tests mit EMS gemittelt, ihre Standardabweichungen berechnet und zusammen in Abb. 63 dargestellt, worin weiter erkennbar ist, dass die maximale Hemmung des Nematodenwachstums knapp 30 % ausmacht.

Der t-Test mit Excel deckt signifikante Unterschiede zwischen der Negativkontrolle und den Konzentrationen ab der LOEC 5 nmol/l auf ($p < 0,05$), damit fällt die NOEC auf 0,5 nmol/l. Die Methode nach Weir dagegen zeigt von Anfang an signifikante Unterschiede zum Mittelwert der Kontrolle auf, was einer LOEC von 0,05 nmol/l entspricht und einer nicht weiter spezifizierbaren NOEC unterhalb von 0,05 nmol/l.

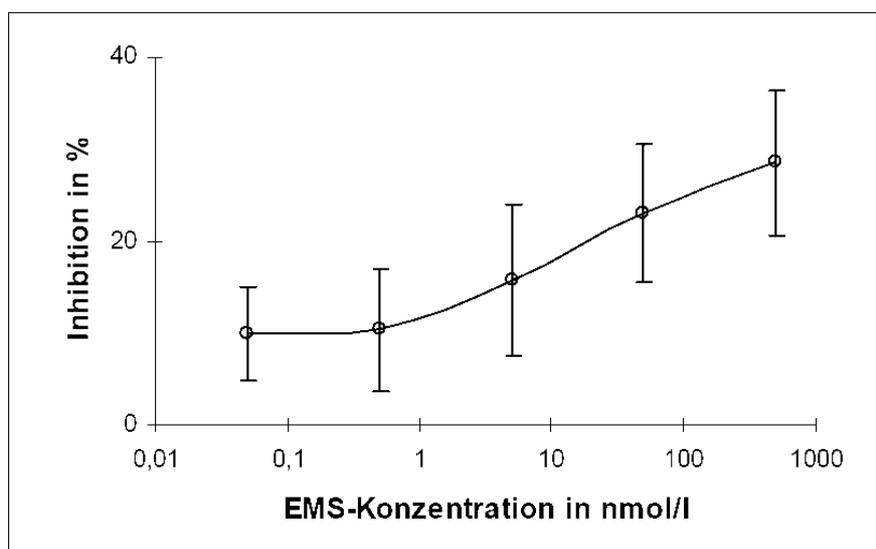


Abb. 63: Wachstumshemmung durch Ethylmethansulfonat in K-Medium

Die 72 h-EC50 für die wachstumshemmende Wirkung von EMS in K-Medium kann zu 437,8 $\mu\text{mol/l}$ berechnet werden. Hier ist der 95 %-Vertrauensbereich extrem breit, seine untere Grenze liegt bei 158,6 und seine obere bei 1208,6 $\mu\text{mol/l}$. Das verwendete Modell bekommt vom Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9575$ eine große Aussagekraft bescheinigt. Die Probitanalyseergebnisse in Abhängigkeit von den Testkonzentrationen und das daran angepasste Regressionsmodell sind in Abb. 64 zu finden.

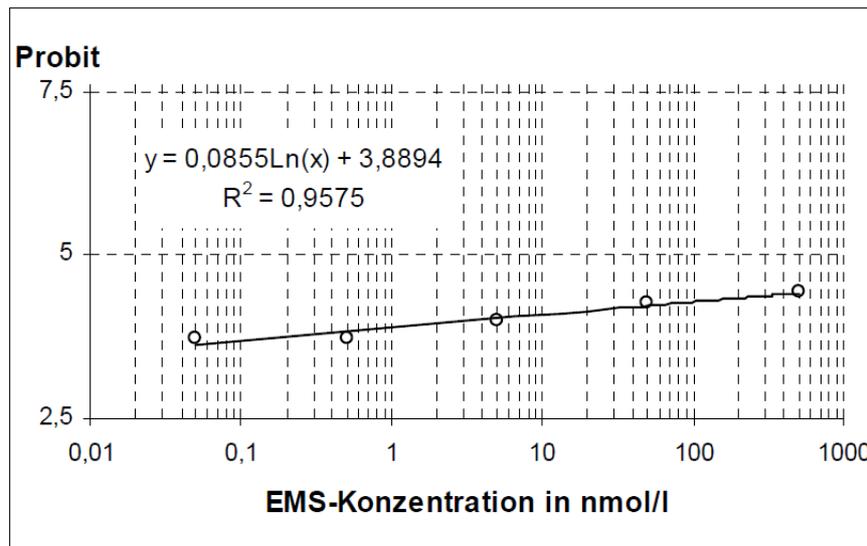


Abb. 64: : Probitanalyse der Ergebnisse der 3 d-Wachstumstests mit Ethylmethansulfonat in K-Medium

3.3.3 Ergebnisse zur Wirkung von Atrazin auf die Entwicklung von *Caenorhabditis elegans*

3.3.3.1 Akute Toxizitätstests mit Atrazin in Flüssigmedium

Reproduktions- und Wachstumstests in flüssigmedium

- Wachstum:

Nach einem 72-stündigen Atrazin-Test im flüssigen Medium wurden die Länge und Breite der Testorganismen unter einem Mikroskop gemessen. Die Messergebnisse zeigten, dass Atrazin das Wachstum (Körperbreite und Körperlänge) von *C. elegans* mäßig hemmt. Im Vergleich mit der Körperlänge ist die Körperbreite ein Parameter, der die Fitness des Wachstums charakterisiert. Abb. 65 und Abb. 66 stellten die Wachstumshemmung in Körperbreite und Körperlänge von *C. elegans* in Abhängigkeit von der Atrazin-Konzentration in Flüssigmedium M9 dar.

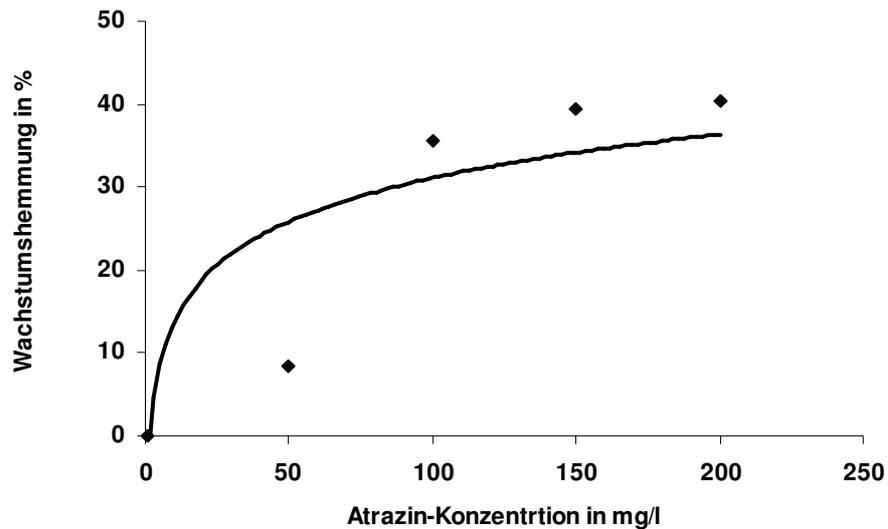


Abb. 65: stellt die Wachstumshemmung in Körperbreite von *C. elegans* in Abhängigkeit von der Atrazin-Konzentration in Flüssigmedium M9 dar.

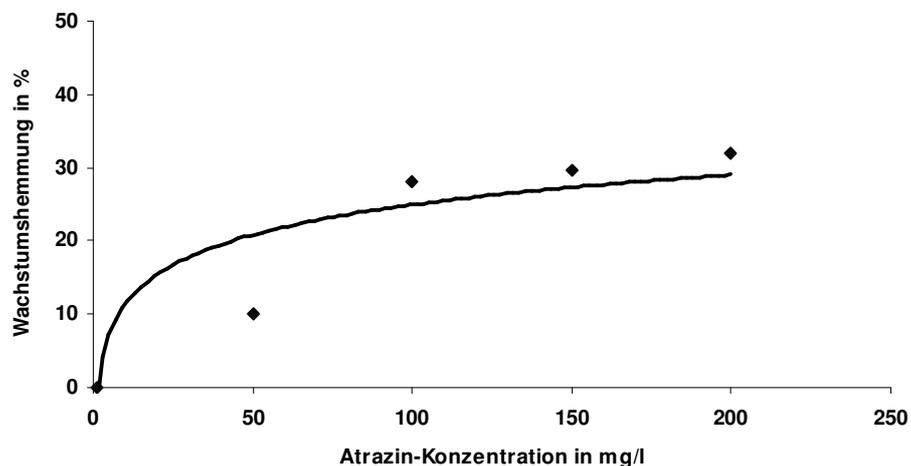


Abb. 66: stellt die Wachstumshemmung in Körperlänge von *C. elegans* in Abhängigkeit von der Atrazin-Konzentration in Flüssigen Medium M9 dar.

Die Wirkkonzentration von Atrazin im flüssigen Medium wurde nach der „Predicted“ Kurve hochgerechnet. Die berechnete NOEC für die Körperlänge von Atrazin in flüssigem Medium wurde zu 1,4 mg/l und für die Körperbreite zu 1,6 mg/l bestimmt. Die EC10 lässt sich bis zu 7,9 mg/l für die Körperlänge und bis zu 6,1 mg/l für die Körperbreite berechnen. EC50 verrechnet sich zu 1220 mg/l für die Körperlänge und zu 7014 mg/l für die Körperbreite.

Die Wirkung von Atrazin auf die Körperbreite in den höheren Konzentrationen (ab 100 mg/l) ist etwas stärker als auf die Körperlänge Abb. 67.

Reproduktion:

Nach der Inkubation mit Atrazin in flüssigem Medium wurden die 72 h alten Testorganismen auf frische NGM-Agarplatten gesetzt. Unter dem Mikroskop wurde die Eibildung überprüft.

Es zeigte sich, dass bei allen untersuchten Konzentrationsstufen nach 72 h noch gar keine Fortpflanzung stattfand. Lediglich wurde in der Negativkontrolle Eibildung festgestellt.

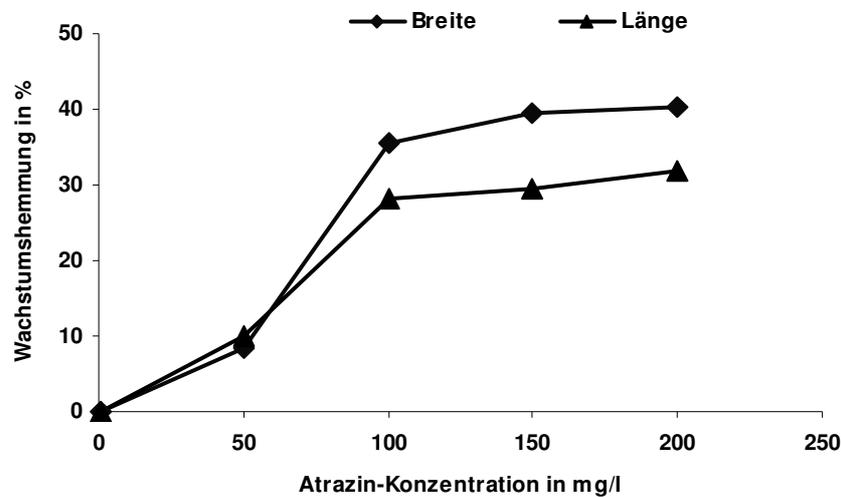


Abb. 67: Stellt den Unterschied der Wachstumshemmung von Atrazin in Flüssigmedium auf die Körperlänge und Körperbreite von *C. elegans* dar.

3.3.3.2 akuten Toxizität von Atrazin in festen Medium

Reproduktions- und Wachstumstests nach 72-stündiger Inkubation

- Wachstum:

Nach einem 72-stündigen Atrazin-Test im festen Medium wurden die Länge und Breite der Testorganismen unter einem Mikroskop gemessen. Die Messergebnisse zeigten, dass Atrazin das Wachstum (Körperbreite und Körperlänge) von *C. elegans* mäßig hemmt. Abb. 68 und Abb. 69 stellten die Wachstumshemmung in Körperbreite und Körperlänge von *C. elegans* in Abhängigkeit von der Atrazin-Konzentration in festem Medium (Boden) dar.

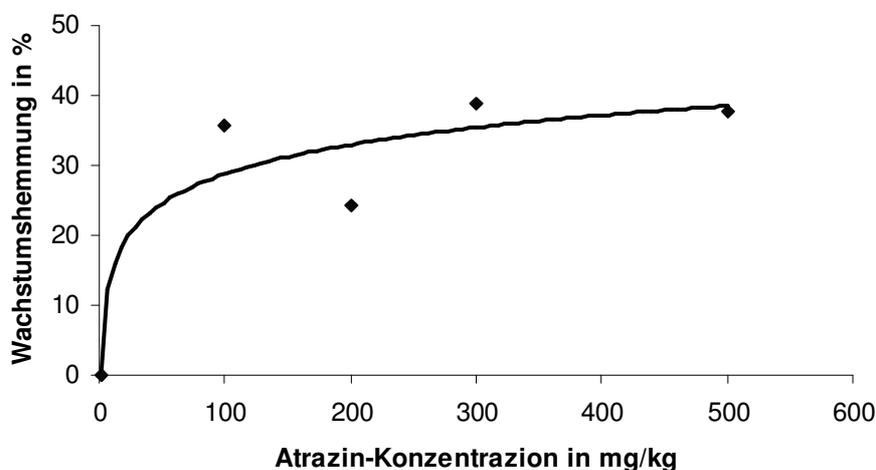


Abb. 68: Stellt die Wachstumshemmung in Körperbreite von *C. elegans* in Abhängigkeit von der Atrazin-Konzentration im Boden dar.

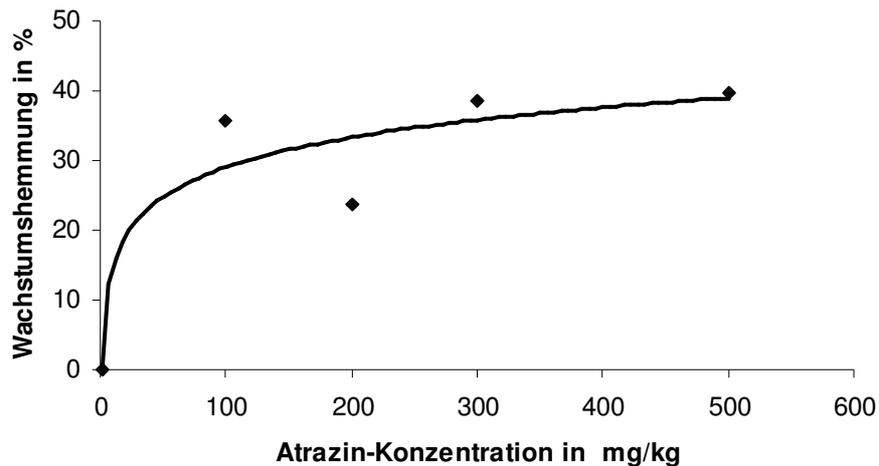


Abb. 69: Stellt die Wachstumshemmung in Körperlänge von *C. elegans* in Abhängigkeit von der Atrazin-Konzentration im Boden dar.

Die Wirkkonzentration von Atrazin im festen Medium (Boden) wurde nach der „Predicted“ Kurve hochgerechnet. Die berechnete NOEC für die Körperlänge von Atrazin im festen Medium wurde zu 0,9 mg/kg und für die Körperbreite zu 0,8 mg/kg bestimmt. Die EC10 lässt sich bis zu 4,6 mg/kg für die Körperlänge und zu 4,5 mg/kg für die Körperbreite berechnen. EC50 verrechnet sich zu 2960,8 mg/kg für die Körperlänge und zu 3299,8 mg/kg für die Körperbreite.

Die Wirkung von Atrazin auf die Körperlänge bei den höheren Konzentrationen (ab 500 mg/kg) ist etwas stärker als auf die Körperbreite (Abb. 70).

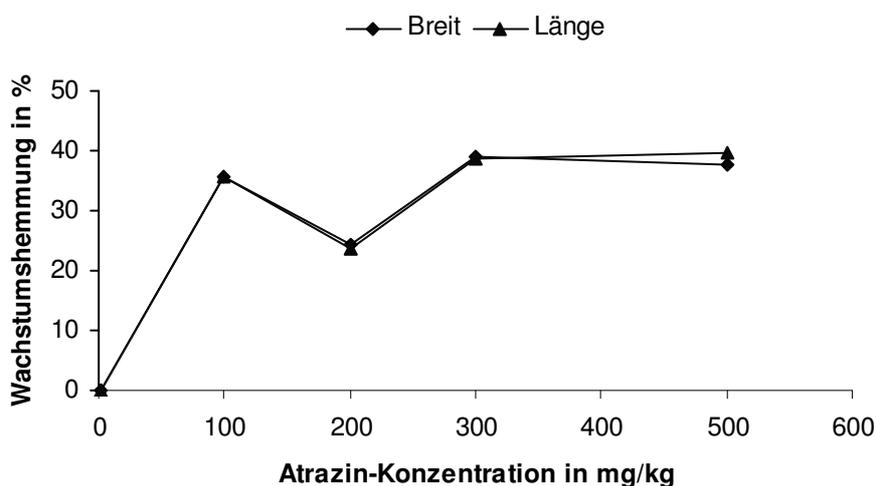


Abb. 70: Stellt den Unterschied der Wachstumshemmung von Atrazin im Boden auf die Körperlänge und Körperbreite von *C. elegans* dar.

Reproduktion:

Nach 72-stündiger Inkubation mit Atrazin im festen Medium wurden die Testorganismen auf frische NGM-Agarplatten gesetzt. Unter dem Mikroskop wurde die

Testorganismen auf frische NGM-Agarplatten gesetzt. Unter dem Mikroskop wurde die Eibildung überprüft.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Reproduktionshemmung mit den Steigenden Atrazin-Konzentrationen in Abhängigkeit steht (Abb. 71).

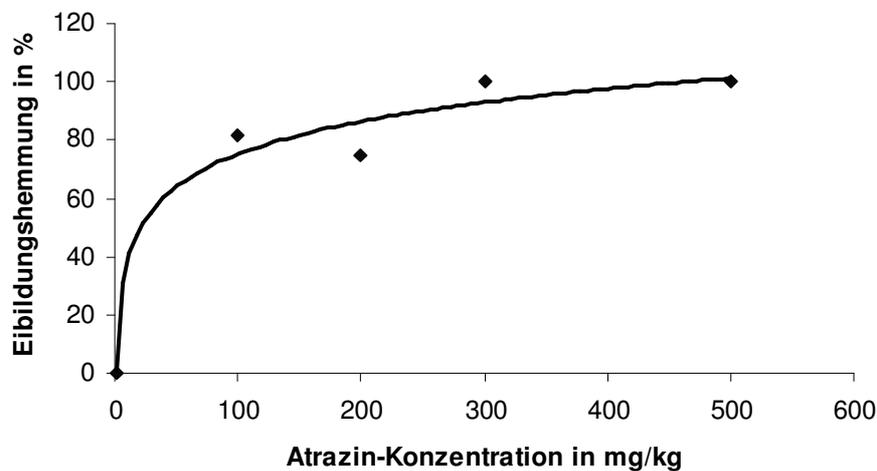


Abb. 71: stellt die Reproduktionshemmung von *C.elegans* in Abhängigkeit von der Atrazin-konzentration im Boden dar.

Die NOEC für Reproduktionstests mit Atrazin im festen Medium wird bei 0.9 mg/kg bestimmt.

Die EC10 wird bei 1.8 mg/kg bestimmt. Die EC50 lässt sich bis zu 23.5 mg/kg berechnen.

3.3.3.3 Testbedingungen

Akuter Toxizitätstests mit Ludox Colloidal Silica auf *C.elegans*

Mit diesem Versuch wurde der Einfluss der verschiedenen Ludox-Konzentrationen auf *C. elegans* ermittelt.

30 Minuten nach dem Beginn des Versuchs waren die Testorganismen in allen Ansätze mit (1, 3, 6, 12, 18, 24%) Ludox-Konzentration bereits tot. Durch diese toxische Wirkung wurde Ludox Colloidal Silica in der vorliegenden Arbeit nicht mehr verwendet.

3.4 Diskussion

3.4.1 Diskussion der Etablierung eines Testsystems zur fluorimetrischen Detektion der umweltbedingten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

3.4.1.1 Realisierung eines ökotoxikologischen Testverfahrens

Problemstellung und Vorgehensweise

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein ökotoxikologisches Testsystem zur Beurteilung des Toxizitätspotentials von Umweltchemikalien oder einer Umweltprobe mit dem Modellorganismus *C. elegans* zu entwickeln.

Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies als Summenparameter dient als Marker für umweltchemikalienbedingten oxidativen Stress. Der Nachweis der ROS gelingt mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin 123, der durch intrazelluläre Oxidation durch ROS aus der farblosen Indikatorsubstanz Dihydrorhodamin 123 entsteht, wodurch die Redoxbedingungen in den Zellen des Testorganismus angezeigt werden.

Als Marker von oxidativem Stress dient häufig der Nachweis der Aktivität von Schutzmechanismen, wie Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase und Glutathionreduktase (Zielinski & Portner 2000; Lushchak, Lushchak et al. 2001; Sierts-Herrmann 2003). Der Nachweis von bereits entstandenen Zellschädigungen durch ROS, wie die Lipidperoxidation durch Messung von Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal (4-HNE) wird ebenfalls angewandt (Erdelmeier, Gerard-Monnier et al. 1998). Des Weiteren werden Messungen von 8-Hydroxyguanosin in genomischer DNA, Messung der Proteinoxidation und Messungen von endogenen Antioxidantien, wie Ascorbinsäure, α -Tocopherol, Gesamtglutathion, Ubiquinol und Cystein als Marker für oxidativen Stress eingesetzt (Liu, Yeo et al. 2000).

Mit Hilfe des in dieser Arbeit vorgestellten Testsystems sollen die intrazellulär gebildeten ROS direkt mit Hilfe eines Indikators im Testorganismus detektiert werden, ohne die Reaktion der Zelle zur oxidativen Stressabwehr oder die bereits eingetretene Schädigungen durch ROS zu messen. Die Messung von ROS in *C. elegans* soll in Ergänzung der klassischen Biotestsysteme mit *C. elegans*, eine unkomplizierte und einfache Erfassung des oxidativen Stress, der einen Parameter in der Gesamtwirkung eines Schadstoffgemischs darstellt, ermöglichen und als „Screeningtest“ einen Effekt im subletalen Konzentrationsbereich greifbar machen.

Zur Entwicklung der Testmethode wurden Vorversuche durchgeführt, die die Rahmenbedingungen für die Testdurchführung festlegen und die Methodik auf den verwendeten Testorganismus abstimmen. Zur Bestimmung der Kennwerte des Verfahrens mit Hilfe des Eichkurvenverfahrens nach DIN 32645 werden Zusatzversuch durchgeführt, wobei den Testansätzen Kupfer(II), das die Produktion des hochreaktiven Hydroxylradikals katalysiert, in aufsteigenden Konzentrationen zugegeben wird. Diese Versuchsanordnung wird mehrfach in kurzen Zeitabständen unabhängig voneinander wiederholt. Als grundsätzliche Voraussetzung für die Durchführbarkeit der Methode wird die Unbedenklichkeit der Indikatorsubstanz DHR123 für die Testorganismen und die Aufnahme der Referenzsubstanz Kupfer(II) durch *C. elegans* getestet. Um die Wirkung der Referenzsubstanz und damit den Messparameter ROS zu bestätigen, wird eine klassische Methode zur Identifikation von oxidativem Stress angewendet. Mit einem kommerziell erhältlichen Testkit wurde die Lipidperoxidation im Gewebehomogenat des Testorganismus nach der Inkubation mit verschiedenen Kupfer(II)-Konzentrationen bestimmt. Abschließend wurde der Effekt von Ascorbinsäure als Antioxidants auf den Redoxstatus in den Zellen von *C. elegans* beobachtet.

Relevanz des Testparameters ROS in der Ökotoxikologie

Zur Beurteilung der Toxizität einer Umweltprobe muss ein integrierter Ansatz das Toxizitätspotential des Schadstoffgemischs als Funktion des Effekts auf den Gesamtorganismus bestimmen. Es bietet sich daher die Messung eines Summenparameters, wie die verstärkte ROS-Bildung als zelluläre Antwort auf exogene Stressoren an, mit dessen Hilfe auch Effekte von Konzentration im subletalen Wirkungsbereich detektiert werden können. Die Konzentration der reaktiven Sauerstoffspezies im Organismus wird durch eine Vielzahl von Chemikalien und Umweltbedingungen erhöht, die den oxidativen Stress durch Steigerung der ROS-Produktion oder durch Hemmung der Schutzmechanismen bedingen.

Oxidativer Stress, der durch Substanzen oder Substanzgemische in einer Probe bedingt wird, ist eine der Wirkungen, die mit einem biologischen Testsystem innerhalb einer Testbatterie nachgewiesen werden. Oxidativer Stress wird als ein sehr grundlegender biochemischer Parameter angesehen (Reineke 2003), über den Umweltchemikalien in Organismen beeinträchtigende Wirkungen vermitteln, da eine

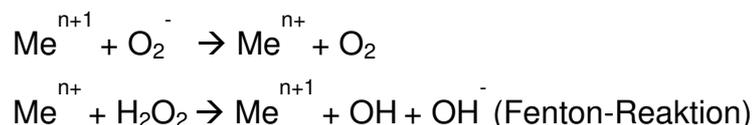
Vielzahl von zellulären Strukturen oxidativ geschädigt werden, die die Basis unterschiedlichster pathologischer Effekte sein können.

3.4.1.2 Induktion der reaktiven Sauerstoffspezies

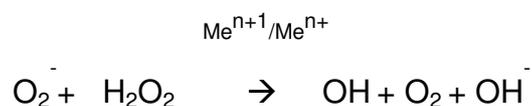
Induktion der reaktiven Sauerstoffspezies durch Kupfer(II)

In der vorliegenden Arbeit wird das Redoxpotential in den Zellen von *C. elegans* durch Inkubation der Testorganismen mit Kupfer(II)chlorid erhöht. Die Nematoden nehmen während einer Inkubationszeit von acht Stunden Kupfer(II) aus dem flüssigen Testmedium auf.

Kupfer ist ein essentielles Übergangsmetall, das wichtige Aufgaben als Cofaktor in biologischen Prozessen aufgrund seiner katalytischen und strukturellen Eigenschaften übernimmt (Gaetke & Chow 2003). Es kommt in einer reduzierten und in einer oxidierten Form vor. Auf Zellebene steht die Toxizität des Kupfers stets mit oxidativer Schädigung von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren in Zusammenhang, so dass die zellschädigende Wirkung des Kupfers auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zurückgeführt wird. Kupfer(II) katalysiert die Entstehung hochreaktiver Hydroxylradikale in biologischen Systemen (Kehrer 2000). Die so genannte Haber-Weiss-Reaktion ist der wichtigste Mechanismus zur metallinduzierten Generierung von ROS und stellt die Schlüsselreaktion in der Sauerstofftoxizität dar:



Gesamtreaktion:



Als Katalysatoren der Haber-Weiss-Reaktion können verschiedene Übergangsmetalle dienen. Me kann für Eisen oder Kupfer und seltener für Kobalt, Nickel, Vanadium oder Chrom stehen (Leonard, Harris et al. 2004).

Die Reaktionskinetik der Haber-Weiss-Reaktion ist thermodynamisch ungünstig, die Reaktion besitzt eine Geschwindigkeitskonstante von nahezu Null. Daher werden Übergangsmetalle als Katalysatoren benötigt, ohne die die Reaktion nicht stattfinden würde (Theophanides & Anastassopoulou 2002).

Durch ihr hohes Redoxpotential von circa +2,3 V reagieren die so entstandenen Hydroxylradikale im biologischen System unspezifisch mit fast jeder Art von Molekülen und zellulären Strukturen. Die meist nur diffusionslimitierten Reaktionen von Hydroxylradikalen mit Biomolekülen besitzen eine Reaktionskonstante von 10^8 bis $10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Da die Halbwertszeit von Hydroxylradikalen nur 10^{-10} Sekunden beträgt, liegt der Ort ihrer Reaktion sehr nah an dem ihrer Entstehung (Buettner und Jurkiewicz 1996b).

Neben der direkten Induktion von ROS durch Kupfer(II) als Katalysator der Haber-Weiss-Reaktion, wirkt Kupfer(II) mittels eines weiteren Mechanismus verstärkend auf den oxidativen Stress im Organismus. Mattie und Freedman (2004) zeigen mit Hilfe von Glutathionmessungen in COS-7-Zellen nach 24 Stunden Inkubation von $400 \mu\text{mol/l}$ Kupfer(II)sulfat, dass sich der Gesamtglutathiongehalt der Zellen signifikant verringert. Die Verringerung des interzellulären Glutathiongehalts wird auch nach Einwirkung anderer Xenobiotika nachgewiesen (Fukino, Hirai et al. 1986; Tabatabaie & Floyd 1996).

Ein entscheidender Vorteil der Verwendung von Kupfer(II) zur Induktion der ROS ist die Tatsache, dass die Kupfer(II)-Ionen nicht mit DHR123 reagieren, sondern erst in der Zelle als Katalysator zur Erhöhung des Redoxpotentials führen und damit eine mögliche unspezifische Oxidation des DHR123 durch die ROS-Induktion verhindert wird.

Antioxidative Wirkung von Kupfer(II)

Neben den zuvor genannten Effekten von Kupfer(II) kann die Präsenz des Metalls auch andere Wirkungen auf den Redoxstatus der Zelle bzw. des Organismus ausüben. Die Ergebnisse der Messung der Kupfer(II)-Verdünnungsreihe zeigen deutlich, dass sich die gemessenen Fluoreszenzsignale für Kupfer(II)-Konzentrationen von $0,001$ und $0,005 \text{ mmol/l}$ unter dem der Negativkontrolle befinden. Diese Ergebnisse deuten auf antioxidative Effekte des Kupfers in niedrigen Konzentrationen hin.

In seiner Funktion als Cofaktor verschiedener biochemischer Reaktionen ist Kupfer am Aufbau vieler wichtiger Enzyme beteiligt, dazu zählen Cytochrom c-Oxidase, Tyrosinase, p-Hydroxyphenylpyruvat-Hydrolase und Cu/Zn-Superoxiddismutase (Gaetke & Chow 2003).

Superoxiddismutase katalysiert die Disproportionierung des Superoxidradikals, das konstitutiv während des aeroben Metabolismus gebildet wird, zu Sauerstoff und

Wasserstoffperoxid. Auf diese Weise werden die Superoxidradikale, die als Reduktionsmittel zur Entstehung von Cu(I) während der Haber-Weiss-Reaktion wirken, aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt, so dass unter der Voraussetzung der Abwesenheit anderer Reduktionsmittel in hoher Konzentration, die Bildung von Hydroxylradikalen reduziert wird.

Laut Klotz, Kröncke et al. (2003) ist die antioxidative Rolle des Kupfers nicht nur auf das direkte Abfangen der reaktiven Spezies beschränkt. Metallionen aktivieren Signalkaskaden, die Zellen vor Apoptose schützen, welche durch oxidativen Stress induziert wurde. Cu(II)-Ionen aktivieren in Abhängigkeit von zusätzlicher ROS-Produktion in Säugerzellen den anti-apoptotischen PI3K/Akt Signalweg. Auf diese Weise ist die Signalkaskade bereits aktiviert, bevor sich das zelluläre ROS-Niveau erhöht.

Außerdem induzieren Metalle wie z.B. Kupfer die Expression von Metallothioneinen (MT), dabei handelt es sich um cysteinreiche Enzyme, die die Metalle komplexieren und dadurch detoxifizieren. In Säugerzellen wird die metallinduzierbare MT-Transkription durch Interaktionen zwischen Metalltranskriptionsfaktoren (MTF) und Metallresponseelementen (MRE) reguliert. MRE sind regulatorische Elemente in der Promotorregion der meisten Metallothioneine. MTF binden an die MRE zur Induktion der Genexpression (Mattie & Freedman 2004). Superoxiddismutase (Blum & Fridovich 1983) und Metallothioneine (Swain, Keusekotten et al. 2004) wurden auch in *C. elegans* nachgewiesen, so dass diese beiden genannten Mechanismen als Ursache für die erkannten antioxidativen Effekte des Kupfers auf *C. elegans* denkbar sind.

3.4.1.3 DHR123 als Fluoreszenzindikator zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies

Zur fluorimetrischen Messung reaktiver Sauerstoffspezies finden verschiedene redoxsensitive Indikatoren Verwendung (Hempel, Buettner et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde der ROS-Indikator Dihydrorhodamin 123 zum Nachweis der intrazellulär gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies verwendet. Es handelt sich um das ungeladene Reduktionsprodukt des kationischen Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin 123.

Das farblose DHR123 passiert die Zellmembran durch Diffusion und wird durch ROS in der Zelle zum grünfluoreszierenden Rhodamin 123 oxidiert, das in den Mitochondrien akkumuliert wird. Bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm zeigt

Rhodamin 123 sein Emissionsmaximum bei 530 nm. Aufgrund seiner Eigenschaft, in intakten Mitochondrien zu akkumulieren, wird Rhodamin 123 in Färbeversuchen als selektiver Marker für den Zustand isolierter Mitochondrien und Mitochondrien in lebenden Zellen verwendet (O'Connor, Vargas et al. 1988).

Emmendörffer, Hecht et al. (1990) beschreiben erstmals eine Methode zur Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies in humanen und murinen Phagozyten mit DHR123 als ROS-Indikator. Die während des „respiratory burst“ gebildeten ROS werden in DHR123markierten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Im Gegensatz zu Emmendörffer, Hecht et al. (1990), die die DHR123-Inkubation erst 10 min nach der Induktion der ROS starten, werden in der vorliegenden Arbeit beide Substanzen gleichzeitig zugegeben. *C. elegans* nimmt die Substanzen langsamer als kultivierte Zellen auf, so dass die Inkubationszeit mehrere Stunden beträgt. Aufgrund der Reaktivität der induzierten Hydroxylradikale würde DHR123 bei einer nicht synchronen Inkubation nicht oxidiert werden, da die ROS bereits mit anderen Zellbestandteilen reagiert hätten.

Die Reaktion von DHR123 mit H_2O_2 läuft sehr langsam ab, die Reaktionsgeschwindigkeit konnte durch Zugabe von Peroxidase gesteigert werden. Royall und Ischiropoulos (1993) konnten ebenfalls nachweisen, dass die Oxidation des DHR123 durch sekundäre ROS-abhängige Reaktionen mit Cofaktoren wie Cytochrom c und Eisen(II) verstärkt wird. Hempel, Buettner et al. (1999) steigerten die Reaktivität von DHR123 und H_2O_2 durch Zugabe von Glutathionperoxidase, HR-Peroxidase, Eisen(II), Katalase und Eisen(III) mit Ascorbat. Nach Meinung der Autoren sind die Reaktionen, die zur Oxidation des DHR123 führen, sehr vielfältig und komplex, so dass durch den Indikator nicht nur eine spezifische oxidierende Spezies in der Zelle detektiert werden kann. Folglich dient DHR123 als Detektor für eine Reihe oxidierender Reaktion, die durch intrazellulären oxidativen Stress gesteigert werden können. Wrona, Patel et al. (2005) zeigen, dass DHR123 auch durch Hydroxyl-, Karbonat- und Stickstoffdioxidradikale oxidiert werden können. Sie geben aber gleichzeitig zu bedenken, dass die Oxidation des Markers nicht nur von der Bildungsrate der ROS und der Reaktionsgeschwindigkeit der ROS mit DHR123 abhängt, sondern auch von der Konzentration der zellulären Antioxidantien und der Geschwindigkeitskonstante ihrer Reaktion mit der reaktiven Spezies sowie der Konzentration des DHR123 im relevanten Zellorganell. Die relative Reaktivität des ROS gegenüber dem Marker oder, konkurrierend dazu, mit dem Antioxidants ist

abhängig von der Konzentration des jeweiligen ROS, des Marker und des Antioxidants sowie den Geschwindigkeitskonstanten der entsprechenden Reaktionen. Diese variablen Einflussfaktoren erschweren die Detektion der ROS in lebenden Systemen und können für die Unterschiede in den detektierbaren reaktiven Spezies in verschiedenen Zellarten verantwortlich sein. So messen Hempel, Buettner et al. (1999) in humanen Endothelzellen der Umbilicalvene eine gesteigerte Fluoreszenz nach Zugabe von Wasserstoffperoxid und Eisen(II), die auf einer Hydroxylradikalbildung durch die Haber-Weiss-Reaktion beruht. Im Gegensatz dazu können Winston, Moore et al. (1996) in Hämozyten von *Mytilus edulis* keine gesteigerte Rhodaminfluoreszenz aufgrund des Einflusses von Hydroxylradikalen feststellen.

DHR123 kann die Zellmembran passieren, wird in den Fluoreszenzfarbstoff RH123 durch oxidierende Spezies umgewandelt und akkumuliert in den Mitochondrien. Mit Hilfe des durchgeführten akuten Toxizitätstest konnte ebenfalls die akute Toxizität von DHR123 auf den Testorganismus *C. elegans* ausgeschlossen werden.

DHR123 wird als Stammlösung 5 mmol/l angelöst und sofort in kleinere Volumen, die für ca. drei Versuche ausreichend sind, aliquo-tiert. Die Aliquote werden in 1,5 ml Reaktionsröhrchen mit Alufolie vor Licht geschützt und bei -20°C aufbewahrt und erst kurz vor dem Gebrauch wieder aufgetaut. So konnte eine Au-tooxidation des DHR123 durch Luftsauerstoff weitestgehend ausgeschlossen werden.

3.4.1.4 Entwicklung des Testsystems und Optimierung der Versuchsbedingungen

Messbedingungen und Durchführung

Nach Auswertung der Ergebnisse der Vorversuche werden die im Folgenden beschriebenen Messbedingungen festgelegt, und darauf aufbauend, die in (*Protokoll der ROS-Messung mit DHR123*) dargestellte Versuchsdurchführung erarbeitet.

Die optimale Anzahl der eingesetzten Testorganismen wird durch Vorversuche auf 3000 pro Versuchsansatz festgelegt, da von dieser Anzahl ein ausreichend hohes Messsignal ausgeht. Zusätzliche Belastungen des Testorganismus sollten während der Testdurchführung möglichst minimiert werden, damit Temperaturstress oder die Krafteinwirkung bei der Zentrifugation die Messsignale nicht überlagern. Nach der Inkubation wird das überschüssige DHR123, das außerhalb der Zelle befindliche RH123 und die Testsubstanz bzw. die Probe durch Zentrifugation vom Testorganismus getrennt. Es ist wichtig, die Inkubation vollständig zu stoppen,

jedoch bedeutet jeder zusätzliche Waschschrift auch zusätzlichen Stress, der die Wirkung der Substanz oder der Probe möglicherweise maskieren kann. Bereits nach dem dritten Waschschrift ist eine leichte Erhöhung der Fluoreszenz zu erkennen. Die Anzahl der Waschschriffe im Test wird auf drei festgelegt, da hier das überschüssige DHR123 bereits abgewaschen und die Absorption der Testsubstanz gestoppt wurde. Das Messsignal bleibt zwischen Schritt zwei und drei stabil, erst ab Schritt vier ist eine Steigerung des Messwerts um 33% zu erkennen. Die maximale Zentrifugationsgeschwindigkeit während der Waschschriffe wird, ebenfalls zur Stressvermeidung, auf 150 x g eingeschränkt.

Während des Tests wird eine *E. coli*-Suspension als Nahrungsquelle zugegeben. Im Vorversuch wird erkannt, dass die Hintergrundsignale der Negativkontrolle reduziert und die Messsignale bei der Inkubation von 0,5 mmol/l CuCl₂ gesteigert werden, wenn Bakterien in Flüssigkultur zugegeben werden. Dies führt zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit der Messmethode und ist auf die verbesserte Resorption der Testsubstanz durch die gleichzeitige Nahrungsaufnahme und eine Verminderung der Stressbelastung durch die fehlende Nahrungsquelle zurückzuführen.

Das Fluoreszenzsignal der verwendeten Medien selbst ist minimal, sie nehmen demnach keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Die Zugabe von 1µmol/l DHR123 zu reinem Medium führt zu einer Signalerhöhung um das Vierfache, was die Oxidation von DHR123 durch Luftsauerstoff belegt. Auch das außerhalb der Zelle oder des Organismus oxidierte DHR123 kann die Zellmembran passieren und als RH123 in den Mitochondrien akkumuliert werden, so dass die Messergebnisse möglicherweise verfälscht werden. Daher ist es wichtig die DHR123-Stammlösung sofort einzufrieren und sie erst kurz vor dem Gebrauch lichtgeschützt aufzutauen. Trotz dieser Maßnahmen wird dennoch ein geringer Teil des DHR123 autooxidiert, so dass es zu erhöhten Blindwerten im Versuch kommen kann. Eine weitere wichtige Ursache der relativ hohen Messwerte der Leerproben ist die Tatsache, dass ROS auch unter normalen Bedingungen und durch die gesamte Testprozedur verstärkt im Organismus gebildet werden können. Auch diese sind in der Lage DHR123 zu oxidieren, so dass Messwerte nur im Vergleich zur Negativkontrolle bewertet werden können.

Einfluss des ROS-Indikators

Damit DHR123 als Fluoreszenzindikator für die ROS-Produktion eingesetzt werden kann, müssen mögliche negative Auswirkungen der Indikatorsubstanz selbst auf den

Testorganismus ausgeschlossen werden. Dies wird mittels eines Tests zu Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien auf *C. elegans* im aquatischen Medium untersucht. Bei keiner der gemessenen Konzentrationen (bis maximal 100 $\mu\text{mol/l}$) wird nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden akute Toxizität festgestellt. Da die Inkubationszeit von acht bzw. 14 Stunden und die Konzentration von 25 bzw. 50 $\mu\text{mol/l}$ in den Versuchen nicht überschritten wird, ist mit einer Beeinflussung des Testorganismus durch die Indikatorsubstanz DHR123 nicht zu rechnen.

Aufnahme der Testsubstanz

Die Grundvoraussetzung für die Wirkung der Substanz ist ihre Aufnahme durch den Testorganismus innerhalb der Inkubationszeit. Dies wird anhand der Referenzsubstanz Kupfer(II), das zur Induktion der ROS im Rahmen der Testetablierung genutzt wird, überprüft, indem der Kupfergehalt der Testlösung und der Testorganismen mittels AAS gemessen wird. Durchschnittlich werden 11,2% des Kupfers aus der Testlösung während der 14-stündigen Inkubationszeit aufgenommen. Das aufgenommene Kupfer bezogen auf das Gewicht der eingesetzten Nematoden als Trockensubstanz, nimmt entsprechend der Anfangskonzentration in der Testlösung zu. Bezogen auf die zugegebene Kupfermenge verringert sich die aufgenommene Kupfermenge prozentual mit steigender Konzentration der Testlösung von 24% bei 0,001 mmol/l bis auf 7% bei 0,5 und 1 mmol/l. Anderson, Boyd et al. (2001) berechnen in Versuchen mit *C. elegans* zur Beurteilung subletaler Endpunkte EC50-Werte von 61 $\mu\text{mol/l}$ für die Hemmung der Bewegung, 49 $\mu\text{mol/l}$ für Reduktion der Nahrungsaufnahme, 56 $\mu\text{mol/l}$ für Wachstumsverminderung und 39 $\mu\text{mol/l}$ für Reproduktionshemmung nach 24-stündiger Inkubation von Kupfer(II) in flüssigem Medium. EC50-Vergleichswerte für Blei zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zu den Kupfer(II)-Werten. Die Autoren führen die gemessenen Effektkonzentrationen der beiden Metalle auf eine Verringerung der Nahrungsaufnahme als Folge der Metallexposition und nicht auf die Wirkung der Metalle selbst zurück. Nach Reduktion der Inkubationszeit auf vier Stunden zeigten Kupfer und Blei Unterschiede in den Endpunkten Wachstum und Nahrungsaufnahme, da der Einfluss des Nahrungsmangels durch die kurze Inkubationszeit minimiert wird. Die Verminderung der Nahrungsaufnahme, die durch die Pumpbewegung des Pharynx gesteuert wird, führt demnach konzentrationsabhängig zu einer prozentualen Verringerung der Aufnahme der Referenzsubstanz. Jones, Stringham et al. 1996 spekulieren, dass die Veränderung der Pumpbewegung des Pharynx als erste

Verteidigungslinie gegen die Aufnahme eines Giftstoffs dient. Eine Substanzaufnahme über die Cuticula von *C. elegans* ist nicht anzunehmen, da diese aus mehreren verdichteten Lagen collagenartiger Proteine besteht, was sie sehr widerstandsfähig und undurchlässig macht. Da der LD50-Wert von Kupfer für *C. elegans* bei ca. 1 mmol/l liegt (Anderson, Boyd et al. 2001; Boyd & Williams 2003), was der maximalen Testkonzentration der vorliegenden Arbeit entspricht, ist eine verminderte Vitalität der Testpopulation und damit die verminderte Aufnahmefähigkeit auch für niedrigere Konzentrationen durchaus denkbar.

Neben dem Kupfergehalt der Testorganismen wurde auch der Kupfergehalt der Testlösung nach 14 Stunden Inkubationszeit bestimmt. Die Kupfergehalte der beiden Aufschlüsse werden addiert und mit der zugegebenen Gesamtkupfermenge verglichen. Die Wiederfindungsraten der niedrigen Konzentrationen (0,001, 0,005 und 0,01 mmol/l) liegen bei durchschnittlich 90%, die der Konzentrationen von 0,05 bis 1 mmol/l bei durchschnittlich 103%. Substanzverluste können während der Inkubation, der Probenvorbereitung oder während des Aufschlussverfahrens durch Adsorption an den Gefäßwänden oder durch Filterung des Aufschlusses auftreten. Kontaminationen können durch verunreinigte Gefäße oder Filter zustande kommen. Da Leitungswasser als Medium verwendet wurde, sind die Messwerte des reinen Mediums leicht erhöht. Für Wasser wurde eine durchschnittliche Kupferkonzentration von 14,9 µg/l gemessen.

Außerdem wurden die Differenzen der Kupfergehalte der Testlösungen vor und nach 14 Stunden Inkubation bestimmt. Aufgrund von Adsorption und Aufnahme durch den Testorganismus verringern sich die Testkonzentrationen im Laufe des Experiments. Ein Versuchsaufbau dieser Art wird als statisches Dosierungsverfahren bezeichnet und eignet sich nur für schwerflüchtige und stabile Substanzen. Laut Fent (1997) lassen sich diese statischen Verfahren verbessern, indem die Prüfsubstanz periodisch neu in die Versuchsgefäße gegeben wird, so dass die Expositionskonzentration konstant gehalten wird. Dazu muss allerdings die zeitliche Veränderung der Konzentration genau bekannt sein.

Kennwerte des Messverfahrens

In Anlehnung an das Eurachem Handbuch zur Methodvalidierung (1998) definiert das Umweltbundesamt in einer Leitlinie zur Methodvalidierung (2005) diese als eine systematische Bewertung und Inkraftsetzung eines Analyseverfahrens. Weiter beschreibt die Leitlinie die Validierung als die Bestätigung durch Untersuchung und

Bereitstellung eines Nachweises, so dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden. Ziel der Validierung ist es demnach, nachzuweisen, dass das Verfahren in der täglichen Praxis die Anforderungen der vorgesehenen analytischen Anwendung erfüllt.

In dieser Arbeit werden die Verfahrenskenndaten Richtigkeit, Präzision, Nachweisgrenze, Empfindlichkeit der Methode sowie die Blindwerte der Probenmatrix näher betrachtet.

Zur Etablierung der Messmethode wird der Effekt von Kupfer(II) in unterschiedlichen Konzentrationen gemessen. Durch die Wirkung des Kupfers als Katalysator einer Reaktion, deren Produkt das Hydroxylradikal darstellt (Haber-Weiss-Reaktion), kann die Bildung dieses stark oxidierend wirkenden Radikals und damit die Fluoreszenzintensität durch steigende Kupfer(II)-Konzentrationen erhöht werden. So ist es möglich, durch mehrfache Messung dieser Ansätze verschiedene Kenngrößen der Messmethode zu berechnen.

Aufgrund der Instabilität und Reaktivität der ROS kann die Richtigkeit des Verfahrens nicht aus dem Vergleich der Messergebnisse mit Referenzproben bestimmt werden. Stattdessen wird die Wiederfindungsrate aus den Aufstockversuchen berechnet, sie beträgt 94,5%. Diese Wiederfindungsrate kann für die Anwendung des Testsystems als Screeningverfahren in der Toxizitätsbeurteilung als gut bewertet werden.

Zur Bestimmung der Messpräzision wird der Variationskoeffizient der Wiederholungsmessungen bestimmt. Dieser beträgt als Mittelwert der Variationskoeffizienten der einzelnen Konzentrationen 8,7%. Eine akzeptable Methodenpräzision ist abhängig von der Komplexität der Probenvorbereitung, der Probenmatrix und der Konzentration des Analyten. CV-Werte von 5% (Kromidas, Klinkner et al. 1995) bis maximal 10% sind für die Wiederholpräzision im Bereich der Umweltanalytik akzeptabel.

Bei der Ermittlung der Nachweisgrenze können verschiedene Probleme und Unsicherheiten auftreten. Reaktive Sauerstoffspezies werden in lebenden Zellen auf natürliche Weise, d.h. ohne absichtliche Induktion während der Testprozedur gebildet, so dass sie auch in der unbehandelten Leerprobe zu gewissen Anteilen bereits enthalten sind. Daher ist es wichtig, zusätzliche Stressfaktoren, die zur ROS-Bildung führen können, wie Zentrifugation, Temperaturwechsel oder Lichteinstrahlung, soweit wie möglich zu minimieren. Dem wird durch die lichtgeschützte Inkubation bei konstant 20°C und der Begrenzung der Zentrifugationsgeschwindigkeit auf 150 x g Rechnung getragen.

Der Anteil an reaktiven Sauerstoffspezies, die ohne Induktion durch Kupfer(II) gebildet werden, ändert sich in gewissen Grenzen bei verschiedenen Testdurchläufen. Der Mittelwert der Blindwerte von 404,85 [rel. FI] wird mit einer Standardabweichung von $\pm 33,3$ angegeben. Die Streuung resultiert aus unterschiedlicher Zusammensetzung der Testpopulation bezüglich der Entwicklungsstadien und Unterschieden in der allgemeinen Fitness der Population. Varianzinhomogenitäten der gemessenen Daten konnten nach Anwendung des F-Tests zwar ausgeschlossen werden, jedoch können hohe Blindwerte als eine Ursache für die relativ hohe Nachweisgrenze des Testsystems (0,15 mmol/l) angeführt werden.

Darüber hinaus hat die vergleichsweise starke Streuung der Messergebnisse Einfluss auf die Grenze der Nachweisbarkeit, denn die Reststandardabweichung der Analysenergebnisse geht als multiplikativer Term in die Berechnung ein. Ebenso wie bei den Schwankungen der Blindwerte, deren Streuung sich bis in die aufgestockten Proben fortpflanzt, ist die ungenaue Alterssynchronisation der Testpopulation ursächlich. Die Filterung der Nematodensuspension lässt keine größere Genauigkeit zu, denn die Porengröße des Filters lässt die Larvenstadien L1 bis L3 passieren. Die Anwendung der Hypochlorid-Methode würde jedoch zusätzliche Stressbelastung für die Testorganismen, Verlängerung der Versuchsdauer und einen erheblichen Individuenverlust bedeuten. Eine schonende Isolierung eines einzelnen Larvenstadiums könnte durch Filterkaskaden mit Filtern unterschiedlicher Porengröße erreicht werden. Dabei wäre die Isolierung des L3-Stadiums sinnvoll, da hier die Katalaseaktivität am niedrigsten (Taub, Lau et al. 1999) und die Sensitivität des Testorganismus gegenüber ROS-Einwirkung am höchsten ist. Auch die allgemeine Fitness der Population, die vor allem vom Ernährungszustand und der Besiedlungsdichte der Nematodenkultur abhängt, kann zu Veränderungen der Messergebnisse führen.

Weiterhin können sich Variationen der Messwerte durch die unterschiedliche Anzahl eingesetzter Testorganismen ergeben. Die optimale Anzahl der Testorganismen pro Ansatz beträgt 3000. Eine derart genaue Dosierung der Nematoden in Suspension, beim Einsetzen in den Test oder zur Dreifachbestimmung, ist jedoch unrealistisch. Daher werden die Messwerte auf 1000 eingesetzte Testorganismen normiert. Dazu müssen die Nematoden in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte im Anschluss an die Messung gezählt werden. Die Testlösung wird gut durchmischt und stichprobenartig werden dreimal 5 μ l entnommen, die unter dem Binokular gezählt und auf 200 μ l

Gesamtvolumen der Vertiefung hochgerechnet werden. Trotz größtmöglicher Genauigkeit bei der manuellen Zählung der Individuen können, aufgrund der Stichprobenartigkeit der Bestimmung Fehler auftreten, die ebenfalls eine Ursache für die Streuung der Messergebnisse sein können.

Neben den Leerproben, die den Indikator DHR123 enthalten, werden weitere Ansätze mit abnehmendem Gehalt an Bestandteilen der Gesamttestlösung gemessen. Reines Medium (Leitungswasser) hat mit durchschnittlich 37 Fluoreszenzintensitätseinheiten kaum Einfluss auf die Messwerte der Proben. Die Signalintensitäten für Ansätze, die Testorganismen und Medium bzw. Testorganismen, Medium und Bakterienkulturlösung enthielten, liegen durchschnittlichen bei 90 bzw. 98 Einheiten. Diese wurden als Matrixmesswerte von den Probenmesswerten abgezogen.

3.4.1.5 Überprüfung der Messmethode

Anwendung einer klassischen Methode zur Messung der Folgen von oxidativem Stress

Die bedeutendste Folgereaktion kupferinduzierter Hydroxylradikale mit Biomolekülen ist die Peroxidation von Membranlipiden. Beim Prozess der Lipidperoxidation handelt es sich um eine Kettenreaktion.

Als wichtigste Folgen der Peroxidation der Membranlipide können Ionenkanäle beeinflusst und Membrantransportproteine oder Enzyme inaktiviert werden. Ferner vergrößert sich die Permeabilität der Lipiddoppelschicht, so dass die Homöostase der Zellen verändert wird (Kehrer 2000). Neben den Membranlipiden sind auch andere Substanzen peroxidationsempfindlich, z.B. Retinol (Vitamin A) oder Lipoproteine.

Die Messung der Lipidperoxidation ist ein klassischer Parameter zur Beurteilung des oxidativen Stress. Dabei werden Folgeprodukte der Peroxidation detektiert. Es handelt sich also um eine Messung der bereits entstandenen oxidativen Schäden am biologischen System. Im Verlauf der Kettenreaktion entstehen verschiedene messbare Abbauprodukte der Lipidperoxide, wie Ethan, n-Pentan und Malondialdehyd (MDA).

Zur Bestätigung der entwickelten Testmethode wird die Konzentration von Malondialdehyd im Gewebehomogenat von *C. elegans* nach der Inkubation verschiedener Kupfer(II)-Konzentrationen und Menadion mit einem kommerziellen Kit zur Bestimmung der Lipidperoxidation gemessen. Der Messparameter ROS kann

durch die klassische Methode zum Nachweis von oxidativem Stress bestätigt werden. Steigende MDA-Konzentrationen können in Abhängigkeit von der Konzentration des zugegebenen ROS-Bildners für 0,5 mmol/l und 1 mmol/l Kupfer sowie für die Positivkontrolle 0,1 mmol/l Menadion nachgewiesen werden. Für den niedrigeren Dosisbereich kann kein positiver Nachweis erbracht werden, da die Empfindlichkeit des Tests durch ein zusätzliches Extinktionsmaximum bei ca. 510 nm begrenzt wird (vgl. 3.3.1.4). Die Absorptionsmaxima (bei 586 und 510 nm) überschneiden sich zum Teil um mehr als 5%, so dass ein Einfluss des zweiten Maximums auf die Nachweisbarkeit in niedrigeren Konzentrationsbereichen anzunehmen ist.

Neben der Messung von MDA kann mit identischer Versuchsanordnung auch 4-HNE, ein weiteres Abbauprodukt der Lipidperoxide gemessen werden. Erdelmeier, Gerard-Monnier et al. (1998) beschreiben für die ebenfalls säureinduzierte Reaktion von 4-HNE mit N-methyl-2-phenylindole die Bildung eines zusätzlichen Chromophors mit Absorptionsmaximum bei 505 nm, dass keine lineare Funktion der Aldehydkonzentration darstellt. Die Reaktion von 4-HNE mit dem Phenylindol läuft nur durch Säureinduktion mit Methansulfonsäure ab, so dass MDA durch Induktion mit Salzsäure (12 N) selektiv bestimmt werden kann. Da in der vorliegenden Arbeit Salzsäure verwendet wurde, kann die Störfärbung nicht auf die Reaktion des 4-HNE zurückgeführt werden.

Um die Ursache der unbeabsichtigten Färbung der Proben zu klären, werden verschiedene Bestandteile der Testlösung einzeln und in unterschiedlichen Kombinationen mit 12 N Salzsäure versetzt und über Nacht bei RT inkubiert. Die visuelle Auswertung der Versuchsansätze zeigt eine deutliche Rotfärbung in den Ansätzen, die Bakterienkulturlösung und Säure enthalten. In den Ansätzen, die nur Testorganismen oder LB-Medium ohne Bakterien enthalten, bleibt die Lösung farblos. Die Störfärbung wird in den Ansätzen mit Bakterien stärker, wenn Kupfer(II) (0,5 mmol/l) zugeben wird.

Die Störfärbung ist demzufolge auf eine Reaktion der *E. coli* Bakterien mit Säure zurückzuführen, die möglicherweise durch Inkubation von *C. elegans* mit dem ROS-Bildner ohne Zugabe von Bakterien als Nahrungsquelle oder einer intensiveren Entfernung der Bakterien nach der Inkubation reduziert werden kann. Diese Testvariationen werden in dieser Arbeit wegen des begrenzten zeitlichen Rahmens nicht durchgeführt. Die Anwendung des Testkits für *C. elegans* erscheint jedoch problematisch, da die Inkubation der Testorganismen mit Kupfer(II) über Nacht eine

Zugabe von Bakterienlösung als Nahrung erfordert und zusätzliche Waschschriffe die Stressbelastung des Testorganismus steigern würden.

Test auf antioxidative Wirkung von Ascorbinsäure

Wie die Ergebnisse der ROS-Messung nach Vorinkubation mit Vitamin C zeigen, wirkt dieses auf *C. elegans* ohne Verstärkung der ROS-Bildung durch Kupfer(II), wie erwartet antioxidativ. Wie bereits ausgeführt werden in dem Testansatz, der kein Kupfer(II) enthält, ebenfalls reaktive Sauerstoffspezies detektiert, da diese durch Einwirken von Stressfaktoren im Laufe der Testprozedur oder durch Sauerstoffmangel während der Inkubation entstehen können. Die gebildeten ROS werden zum Teil abgefangen. Neben den primären antioxidativen Schutzsystemen der Zelle, Superoxiddismutase, Katalase und Peroxidasen, die die Reaktion der reaktiven Spezies zu Wasser und Sauerstoff katalysieren, trägt die sekundäre Abwehr, durch so genannte Radikalfänger wie Ascorbinsäure oder auch α -Tocopherol (Vitamin E), zum Schutz der zellulären Strukturen vor oxidativer Schädigung bei. Als starkes Reduktionsmittel ($E = + 282 \text{ mV}$) gibt Vitamin C ein Elektron leicht ab, so dass ein Semidehydroascorbatradikal (Monodehydroascorbat) entsteht. Dieses Radikal ist relativ stabil und entsprechend reaktionsträge, da sich das ungepaarte Elektron mesomeriestabilisiert in einem delokalisierten π -System befindet. Durch Abgabe eines zweiten Elektrons entsteht Dehydroascorbat.

Ascorbinsäure schützt Zellen vor oxidativem Stress indem es reaktive Sauerstoffspezies fängt oder andere Antioxidantien regeneriert. Allerdings kann Ascorbinsäure in bestimmten Fällen auch als Prooxidants wirken. Die ROS-Messung in *C. elegans* weist auf eine Verstärkung des Oxidationspotentials im Organismus entsprechend der Konzentration der Ascorbinsäure bis $100 \mu\text{mol/l}$ während der Vorinkubation hin. Dieser prooxidante Effekt des Vitamin C hängt mit der Inkubation der ROS mit Hilfe von Kupfer(II) zusammen. Redoxaktive Übergangsmetalle wie Kupfer oder Eisen katalysieren die Haber – Weiss-Reaktion, deren Produkt das hochreaktive und daher toxische Hydroxylradikal darstellt (vgl. 3.4.1.2). Die reduzierten Metalle geben ein Elektron ab und führen damit zur Reduktion von Wasserstoffperoxid zum Hydroxylradikal und Hydroxylion. Die Metalle können durch Superoxidradikalanionen oder durch andere reduzierende Agenzien rückreduziert werden. Dazu eignet sich Ascorbinsäure als starkes Reduktionsmittel besonders gut und steigert damit die Bildung von Hydroxylradikalen. Da die reaktiven Sauerstoffspezies in dieser Arbeit durch Kupfer(II) induziert werden, wirkt Ascorbinsäure im Versuch mit *C. elegans*

nicht antioxidativ, sondern verstärkt die Bildung der ROS und damit die Oxidation des ROS-Markers DHR123.

Der Punkt, an dem sich die anti- und die prooxidanten Effekte von Ascorbinsäure ausgleichen, hängt von der Art und der Konzentration der katalysierenden Metalle ab (Buettner und Jurkiewicz 1996a). Die Kupfer(II)-Konzentration wurde im Versuch zur Wirkung von Vitamin C auf die ROS-Bildung in *C. elegans* mit 0,5 mmol/l CuCl₂ relativ hoch gewählt; Metalle können schon ab einer Konzentration von 0,1 bis 10 µmol/l als Katalysator der Ascorbinsäureoxidation wirken. Relativ dazu sind die Ascorbinsäurekonzentrationen (1 bis 100 µmol/l) niedrig, wodurch die prooxidante Wirkung überwiegt.

Die erhobenen Daten zeigen im Literaturvergleich gute Übereinstimmung mit Testergebnissen aus einfachen *in vitro* Experimenten, die von Buettner und Jurkiewicz (1996a) sowie Carr und Frei (1999) zusammenfassend beschrieben werden. Asplund, Jansson et al. (2002) messen eine erhöhte Hydroxylradikalbildung mit Kumarin-3-carboxylsäure, einem Hydroxylradikalmarker, in Trinkwasser aus Kupferleitungen nach Zugabe von Vitamin C aus Nahrungsergänzungsmitteln und weisen gleichzeitig eine erhöhte klastogene Wirkung der Wasserproben nach, die mit der Erhöhung der Radikalbildung korreliert. Die Autoren führen die ROS-Produktion auf den Redoxzyklus des Kupfers zurück, der durch Ascorbinsäure als Reduktionsmittel angetrieben wird.

In *C. elegans* wird Ascorbinsäure als antioxidativ wirkende Substanz eingesetzt. Laut Strayer, Wu et al. (2003) beispielsweise, führt die Behandlung mit Vitamin C in einem transgenen *C. elegans*-Stamm (CL2070) zu einer Verringerung der endogenen ROS-Konzentration um 31%. Allerdings sind vergleichbare Studien mit *C. elegans* zur Untersuchung der Wirkung von Vitamin C in Kombination mit Metallen aus der Literatur nicht bekannt.

Die Übereinstimmung der Daten der ROS-Messung nach Vorinkubation mit Vitamin C in *C. elegans* mit einfachen *in vitro* Testsystemen kann im einfachsten Fall damit erklärt werden, dass die Ascorbinsäure nach der Vorinkubation nicht vollständig abgewaschen wurde, so dass die Oxidation der Ascorbinsäure durch Kupfer(II) im Testmedium erfolgte und nicht, wie erwartet, im Testorganismus selbst. In diesem Fall käme die Versuchsanordnung der vorliegenden Arbeit der in einfachen *in vitro* Systemen (Buettner und Jurkiewicz 1996a; Asplund, Jansson et al. 2002) sehr nahe.

3.4.1.6 ROS als biologische Effektmarker

Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Umweltchemikalien

Das Wirkungsspektrum vieler Umweltchemikalien beinhaltet unter anderem die verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die oxidative Schädigungen von Nucleinsäuremolekülen, Lipiden und Proteinen verursachen können, sofern die Kapazität der antioxidativen Schutzmechanismen der Zelle überschritten wird. Dabei kann der oxidative Stress nicht nur durch die Induktion einer gesteigerten ROS-Produktion verursacht werden, sondern auch auf der Hemmung der antioxidativen Schutzmechanismen durch Einwirkung von Umweltchemikalien beruhen. Die komplexe Zusammensetzung mehr oder weniger stark belasteter Umweltproben bedingen nicht voraussagbare synergistische oder antagonistische Wirkungen der Probenbestandteile auf den Redoxzustand in den Zellen des exponierten Organismus in Abhängigkeit der Aktivität der antioxidativen Schutzmechanismen. Ergibt sich in der Bilanz eine erhöhte Konzentration der oxidierend wirkenden Substanzen, führt der umweltchemikalienbedingte oxidative Stress zur Schädigung zellulärer Strukturen.

Der wichtigste Mechanismus der Generierung von ROS durch Xenobiotika ist der Redoxzyklus der Chinone oder chinoider Verbindungen. Chinone unterliegen einer Ein-Elektronen-Reduktion, wobei ein Semichinonradikal entsteht. Durch Aufnahme eines weiteren Elektrons entsteht ein Hydrochinon (trans-Diol) oder ein Katechol (ortho-Diol), die in bestimmten Fällen durch Autooxidation oder enzymatisch zum radikalischen Semichinon oxidiert werden können. Verschiedene Enzymsysteme sind in der Lage solche Ein-Elektronenübergänge zu katalysieren, dazu gehören die NADPH:Cytochrom-c Reduktase, die NADPH:Cytochrom-b5 Reduktase, die NADPH:Cytochrom-p450 Reduktase, die Xanthinoxidase und die Aldehydoxidase. NAD(P)H:Quinone Oxidoreduktase katalysiert die Zwei-Elektronen-Übertragung und übt somit eine Schutzfunktion gegenüber der Bildung der radikalischen Zwischenstufe aus. Die Semichinonradikale sind in der Lage ein Elektron auf ein Sauerstoffmolekül zu übertragen, das dadurch zum Superoxidradikal reduziert wird, während das entsprechende Chinonmolekül reoxidiert und damit regeneriert wird. Der Redoxzyklus erzeugt kontinuierlich Superoxidradikale, die durch Superoxid-dismutase zu Wasserstoffperoxid und in Anwesenheit von redoxaktiven Metallen zu Hydroxylradikalen reagieren. Auch nichtchinoide Verbindungen, wie Nitroaromate

oder Paraquat, können über einen Redoxzyklus ROS erzeugen (Marquardt und Schäfer 2004).

Viele der wichtigsten umweltrelevanten Schadstoffe, wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und Benzen, Pentachlorphenol (PCP), polychlorierte Biphenyle (PCB) und polychlorierte Dibenzodioxine (PCDD) können über chinoide Metaboliten nach dem beschriebenen Mechanismus oder durch die Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme reaktive Sauerstoffspezies erzeugen.

Bei der metabolischen Aktivierung der PAK durch das Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase System (CYP1A1) entstehen PAK-trans-Dihydrodiole als proximale Kanzerogene. In Folge der zweiten enzymatischen Epoxidierung entstehen PAK-trans-Diolepoxide, die ultimativen Kanzerogene. Eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung reaktiver PAK-Metabolite ist die Reaktion der PAK-trans-Dihydrodiole zu PAK-ortho-Chinonen, die durch Aldoketoreduktase (AKR) katalysiert wird. Der Metabolit von Benzo(a)pyren, B(a)p-diol, beispielsweise reagiert zu Benzo(a)pyren-7,8-dion. Für *in vitro* Modelle, wie HepG2 (humane Hepatomzellen) und primären Hepatozyten der Ratte, wurde die Generierung von PAK-ortho-Chinonen als elektrophile Metabolite, die über einen Redoxzyklus ROS vielfach amplifizieren nachgewiesen (Burczynski & Penning 2000).

Benzen wird in humanen Zellen durch CYP2E1 zu Phenol, Hydrochinon, Katechol und 1,2,4-Benzotriol metabolisiert. Diese Metaboliten akkumulieren im menschlichen Knochenmark, wo sie durch Autooxidation oder Peroxidasen in die entsprechenden Chinone umgewandelt werden und durch Redoxzyklen reaktive Sauerstoffspezies erzeugen. Chinone sind die ultimativen toxischen Metaboliten des Benzens und gelten als Ursache für dessen Hämatotoxizität (Moran, Siegel et al. 1999). Neben der Bildung von ROS durch Redoxzyklen steigert Benzen den oxidativen Stress zusätzlich durch Hemmung des intrazellulären Glutathions und der Generierung der ROS durch die Aktivität des metabolisierenden Enzyms selbst (Yardley-Jones, Anderson et al. 1991). Als weiteres Beispiel für die Hemmung von antioxidativen Schutzmechanismen durch Umweltchemikalien kann Benzaldehyd genannt werden. Die gesteigerte ROS-Konzentration in neuronalen Zellen der Ratte konnte nicht auf eine verstärkte ROS-Bildung, sondern auf die Inaktivierung der Glutathionperoxidase durch Benzaldehyd zurückgeführt werden (Tabatabaie & Floyd 1996). Außerdem sind Benzaldehyd und verwandte aromatische Carbonylverbindungen, wie 4-

Methoxybenzaldehyd oder Acetophenon, in der Lage Kupfer(II) zu reduzieren (Krieger 2000) und damit ROS-Bildung durch Haber-Weiss-Zyklen zu initiieren.

Auch PCB werden durch Cytochrom P450 zu mono- und dihydroxylierten Verbindungen metabolisiert, letztere können weiter zu den entsprechenden Chinonen, durch Autooxidation oder durch die Aktivität von Peroxidasen, oxidiert werden. Srinivasan, Lehmler et al. (2001) wiesen für sechs synthetisch hergestellte PCB-trans-Dihydroxy-Metaboliten (Hydrochinon) Superoxidradikalproduktion sowie DNA-Strangbrüche in Anwesenheit von Kupfer(II) nach. Darüber hinaus konnten sie die Präsenz von ROS direkt durch Inkubation von HL-60 Zellen (humane promyelotische Zellen) mit 2',7'-Dichlorofluorescindiacetat (DCFH-DA) und PCB-Hydrochinonen messen. DCFH-DA ist wie DHR123 ein ROS-Indikator. Er wird durch intrazelluläre Esterasen zu Dichlorofluorescein (DCFH) hydrolysiert, das durch ROS zum fluoreszierenden Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert wird. Die Autoren beschreiben steigende Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von Konzentration und Inkubationszeit der PCB-Metabolite. Darüber hinaus schwächen PCB die Leistung des antioxidativen Schutzsystems. Narayanan, Carter et al. (1998) zeigen die Verstärkung des „respiratory burst“ durch Inhibition der SOD Aktivität durch Arochlor 1242 und PCB47 in neutrophilen Zellen und zellfreien Systemen. Andere Substanzen, die die Aktivität der Schutzenzyme hemmen sind beispielsweise Diethyldithiocarbamatsäure (DETCA), die durch Komplexierung von Cu(II) die SOD Aktivität hemmt oder 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen, das neben der SOD- auch die Katalaseaktivität negativ beeinflusst. Als Inhibitoren, die speziell die Katalaseaktivität hemmen, können Cadmium, 3-Aminotriazol und Natriumazid als Beispiele genannt werden.

Die Toxizität von PCP wird ebenfalls mit dessen chinoiden Abbauprodukten und oxidativem Stress in Verbindung gebracht. Klastogene Wirkungen des PCP in Säugerzellen werden auf den Einfluss der Metabolite Tetrachlorhydrochinon und Tetrachloro-1,4-benzochinon zurückgeführt. Auto- oder enzymgeleitete Oxidation von PCP-Katechol und PCP-Hydrochinon zum entsprechenden Semichinon oder Chinon initiieren die Kaskaden der Redoxzyklen, die für die kontinuierliche ROS-Bildung sorgen (Lin, Nakamura et al. 2001).

Auch in Folge der Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme selbst (vor allem CYP3A4, CYP2B6 und CYP1A1) wurde in humanen Mikrosomen (Puntarulo, Cederbaum 1998) und HepG2-Zellen verstärkte ROS-Freisetzung festgestellt.

Marchand, Barouki et al. (2004) weisen mit Hilfe des ROS-Markers DCFH-DA eine gesteigerte ROS-Bildung in mit 2,3,7,8 TCDD behandelten HepG2 Zellen sowie in Zellen, die durch Infektion mit entsprechenden rekombinaten Adenoviren, verstärkte CYP1A1-Aktivität unabhängig vom Ah-Rezeptor aufweisen, nach. Zellen, mit hohen Konzentrationen von CYP1A1, die durch Mutation in ihrer Aktivität gehemmt waren, zeigten keine erhöhte ROS-Bildung. Dieses Experiment ist Teil einer Studie, in der die Autoren beweisen, dass ROS, die durch die Enzymaktivität gebildet werden, an der Induktion von NAD(P)H:Quinone Oxidoreduktase, die die Entstehung radikalischer Semichinone verhindert, beteiligt sind.

Wie schon durch die Induktion der ROS durch Kupfer(II) gezeigt wurde, können auch Metalle oxidativen Stress verursachen. Redoxaktive Metalle wie Eisen, Vanadium, Chrom, Nickel, Kobalt und Kupfer unterliegen bei der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies demselben Reaktionsmechanismus (Haber-Weiss-Reaktion). Dabei werden Hydroxylradikale durch die Reaktion der Metalle mit Wasserstoffperoxid und Superoxidradikalanionen gebildet. Dadurch wird die Reaktivität und damit die Toxizität der durch die verschiedenen Mechanismen gebildeten ROS aufgrund der katalytischen Wirkung der Metalle verstärkt (Leonard, Harris et al. 2004).

Kim, Ichikawa et al. (2002) testen Chemikalien auf Induktion von Lipidperoxidation als Marker für reaktive Sauerstoffspezies in HepG2 Zellen und nennen folgende Substanzen ohne Angaben der jeweiligen Mechanismen als ROS-Bildner: p-Nonylphenol, 3-Nitrofluoranthen, Tributylchlorid, 2,4-Dinitroanilin, Benzo(e)pyren, Cumen, Tetrachlorethen, N-Nitrosodiethylamin, 2,4,5-Trichlorophenol und Captan. Dierickx (2002) misst den Redoxstatus von Fa32 Zellen (Hepatomzellen der Ratte) direkt mit Hilfe von DCFH-DA als ROS-Marker, um die Anwendbarkeit dieses *in vitro* Systems zur Vorhersage der Humantoxizität auf der Basis eines Vergleichs mit *in vivo* Daten zu prüfen. Von 44 getesteten Chemikalien führten 24 zur Erhöhung der Fluoreszenzintensität des Markers, dazu gehören unter anderem Eisensulfat als stärkster ROS-Bildner der getesteten Substanzen, 1,1,1-Trichlorethan, Phenol, Natriumfluorid, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, Paraquat, Arsentrioxid, Tetrachlorkohlenstoff und Dichlormethan.

Vergleichbarkeit des ökotoxikologischen Modells *C. elegans* mit anderen Modellen

Qualitative und quantitative Unterschiede bei der von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen katalysierten Umwandlung der aufgenommenen Stoffe führen bei gleicher

aufgenommener Dosis zu unterschiedlichen Konzentrationen am Zielorgan und unterschiedlicher Empfindlichkeit (Griem 2002). Daher ist der Fremdstoffmetabolismus des Testorganismus ein wichtiges Kriterium bei der Interpretation von Toxizitätsdaten. Hierfür ist die Cytochrom P-450 Isoenzymfamilie (CYP) ein klassisches Beispiel. Während einige CYP (wie CYP1A-Typ und CYP 2E1) im Laufe der Evolution hoch konserviert wurden, bestehen bei anderen CYP-Formen erhebliche Unterschiede zwischen den taxonomischen Einheiten (Marquardt & Schäfer 2004). Verschiedene Isoformen wurden bei Invertebraten (Cnidaria, Anneliden, Mollusken, Arthropoden, Echinodermaten und Nematoden) in geringeren Konzentrationen als bei Vertebraten gefunden. In Echinodermaten, Crustaceen, Mollusken und Polychaeten wurde bislang kein Ah-(Arylhydrocarbon-) Rezeptor nachgewiesen, der bei Vertebraten eine Voraussetzung für die Induktion der CYP1A-Isoformen ist. Eine mögliche Induktion kann aber auch über andere, primitivere Mechanismen erfolgen. Die Metabolisierung organischer Umweltchemikalien erfolgt in Wirbellosen im Allgemeinen langsamer als die Aufnahme, so dass Fremdstoffe im hohen Maße akkumulieren (Fent 1997).

Nach der Sequenzierung des Genoms von *C. elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium 1998) konnten 83 Gene durch Sequenzvergleich als CYP-Gene identifiziert werden, die zum größten Teil mit den CYP-Familien 1, 2, 17 und 21 der Säugetiere sequenzverwandt sind (Nelson, 1998). Diese nahe Verwandtschaft zwischen den bei Säugern am Metabolismus beteiligten Isoformen und den CYP in *C. elegans* lassen ihre Beteiligung an der Biotransformation von Xenobiotika in *C. elegans* annehmen. Außerdem wurden den Säugern homologe Proteine AHR (aryl hydrocarbon receptor) und ARNT (AHR nuclear transporter) (Powell-Coffmann et al. 1998) und die Induktion der CYP in *C. elegans* durch Xenobiotika in Screeningversuchen nachgewiesen. Menzel et al. (2001) inkubierten *C. elegans* mit PAK (β -Naphthoflavon, Benz(a)pyren, Fluoranthen), PCB52, Pharmaka (Lansoprazol, Phenobarbital, Clofibrat) und dem Pestizid Atrazin und weisen mit „Northern blot“-Experimenten die Regulation von CYP-Genen in *C. elegans* durch Xenobiotika nach. Die Ergebnisse des Screeningtests werden von Menzel et al. (2005) für CYP35A1, A2, A5, und C1, deren verstärkte Expression durch PCB52, Fluoranthen, Atrazin und Lansoprazol nachgewiesen wird, bestätigt.

Wie die Daten der gemessenen Kupfer(II)-Verdünnungsreihe zeigen, stimmen die Ergebnisse für die ROS-Bildung nach Inkubation mit Kupfer(II) gut mit Messwerten

aus *in vitro* Modellen überein, was auf nah verwandte Mechanismen der intrazellulären Redoxprozesse und der antioxidativen Schutzmechanismen zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu den Metallen ist bei der Wirkung von Xenobiotika eine Einschätzung der Vergleichbarkeit mit *in vitro* Modellen ungleich schwieriger, da die ROS-Bildung vieler Umweltchemikalien mit ihrer Biotransformation zusammenhängt. Inwieweit die Ergebnisse von Biotests mit *C. elegans* als Modell zur Testung der Effekte von Xenobiotika an Invertebraten trotz der evolutionären Distanz auch auf Vertebratenmodelle bezogen werden können, kann nach dem derzeitigen Stand der Forschung noch nicht genau abgeschätzt werden.

3.4.1.7 Abschließende Bewertung des Testsystems und Ausblick

C. elegans eignet sich als Modellorganismus für ein biologisches Effektmonitoring der vorgestellten Art aus mehreren Gründen (vgl. 2.5).

Durch den transparenten Körper von *C. elegans* in allen Entwicklungsstadien kann eine fluorimetrische ROS-Messung, wie sie sonst nur an *in vitro* Zellsystemen angewandt wird, am Gesamtorganismus *in vivo* durchgeführt werden.

C. elegans dient als Modell in der Erforschung von Alterungsprozessen, wobei die Schädigung der Zellen durch ROS als ein wichtiger Faktor angesehen wird. Studien in diesem Zusammenhang zeigen, dass *C. elegans* ein repräsentativer Organismus zur Erforschung von Redoxvorgängen in Lebewesen darstellt.

Die Kenndaten der Messmethode, Richtigkeit, Wiederholpräzision und Empfindlichkeit erreichen in Bezug auf die Zielvorgabe, Beurteilung des Toxizitätspotenzials einer Umweltprobe, durchaus akzeptable Werte. Die Blindwerte der ROS-Messung ohne Induktion können durch weitere Verringerung der Stressbelastung und ausreichende Sauerstoffzufuhr während der Testprozedur in gewissen Grenzen weiter minimiert werden. Die Nachweisgrenze der Methode sollte durch weitere Stabilisierung und Standardisierung der Durchführung verbessert werden. In der schonenden Alterssynchronisation der Testpopulation vor dem Test und im exakten Einsetzen identischer Individuenzahlen in den Test liegt noch Spielraum, die Schwankungsbreite der Messergebnisse zu reduzieren.

Substanzen, die durch Haber-Weiss-Redoxzyklen (Metalle und reduzierend wirkende Stoffe) ROS produzieren, Substanzen, die die antioxidativen Schutzsysteme (bei *C. elegans* SOD und KAT) hemmen oder Stoffe, die Einfluss auf die Respirationsrate des Organismus haben tragen zur Veränderung des Redoxzustands der Zellen im Körper von *C. elegans* bei. In wieweit umweltrelevante Schadstoffe, die über

redoxaktive Metabolite oder über ihren Metabolismus selbst ROS bilden, am ROS-Überschuss in *C. elegans* beteiligt sind, kann erst nach Aufklärung der Mechanismen der Biotransformation von Xenobiotika in *C. elegans* geklärt werden.

Nach der bisherigen Testdurchführung mit der Referenzsubstanz Kupfer(II)chlorid zu urteilen, stellt die Messung des Redoxzustands mit DHR123 in *C. elegans* ein geeignetes Testverfahren zur Untersuchung des Toxizitätspotenzials von Umweltchemikalien und Umweltmedien im subletalen Konzentrationsbereich dar. Als letzten Schritt in der Etablierung dieses Testsystems soll in nächster Zukunft die Erprobung der Methode an realem Probenmaterial stattfinden. Dafür kämen beispielsweise wässrige Eluate oder die abfiltrierbare Fraktion aus Klärschlammproben in verschiedenen Belastungs- oder Verdünnungsstufen in Frage. Neben der Einzelwirkung schädlicher Inhaltsstoffe der Probe sowie ihrer additiven oder synergistischen Effekte, können auch Einflüsse der Probe auf die Beschaffenheit des Mediums (pH, Ionengehalt, Sauerstoffgehalt) zu biologischen Schadwirkungen oder zur Beeinflussung des Testorganismus führen. Aus diesem Grund muss die Durchführbarkeit und Praktikabilität der gesamten Methodik an realen Proben evaluiert werden, so dass eine abschließende Bewertung des Testsystems erst nach dem Praxistest zweckmäßig ist.

3.4.2 Diskussion der Etablierung und Bewertung von Biotests zur akuten Toxizität, Reproduktions- und Wachstumstoxizität mit dem Modellorganismus *C. elegans* am Beispiel der Toxine Acrylamid, Benzo(a)pyren, Kupfer(II)chlorid und Ethylmethansulfonat

3.4.2.1 Einsatz ökotoxikologischer Testverfahren

Problemstellung und Vorgehensweise

Diese Arbeit zielt darauf ab, das Toxizitätspotential vier verschiedener bekannter Umweltchemikalien mit dem Nematoden *C. elegans* in unterschiedlichen klassischen, teilweise etablierten Toxizitätstests zu bewerten. Weiterhin soll anhand von Vergleichen mit Daten aus Tests mit anderen Testorganismen beurteilt werden, ob die gewählten Testverfahren mit diesem Modellorganismus hierzu geeignet sind. Als Endpunkte dienen Mortalität, Reproduktions- und Wachstumshemmung des Testorganismus, wobei neben letalen auch subletale Auswirkungen der Schadstoffe erfasst werden.

Mit unterschiedlich aufgebauten Testsystemen wurden die subletalen Effekte sowohl in festem als auch in flüssigem Medium gemessen.

Einordnung der Testparameter in den Forschungsansatz der Ökotoxikologie

Eine rein chemisch-analytische Bewertung der Potentiale von Chemikalien wird als unzureichend betrachtet, alle Auswirkungen auf die Umwelt anzuzeigen. Chemische Analysen geben zwar Aufschlüsse über das Vorkommen von Schadstoffen in Umweltmatrizes, aber keinerlei Informationen über deren Verfügbarkeit, sowie Wirkung-sweisen und eventuelle Wechselwirkungen in verschiedenen Konzentrationen. Ihre tatsächliche Toxizität bleibt unbekannt. Daher sind ökotoxikologische Untersuchungen der Effekte auf das jeweilige Kompartiment bewohnende Biota als sinnvolle Ergänzungen und Alternativen anzusehen (Duft et al. 2002).

Toxikologische Monospezies-Tests werden zu ökotoxikologischen Bewertungen herangezogen, um mit ihrer Hilfe Verhalten und Auswirkungen in Ökosystemen abzuschätzen (Riepert 1998).

Informationen über Konzentrationen und Schadstoffmuster in den verschiedenen Kompartimenten und unterschiedlichen trophischen Ebenen mariner und terrestrischer Ökosysteme liefern klassische Untersuchungen (Biselli, 2001).

Toxische Auswirkungen sind prinzipiell abhängig von den eingesetzten Testspezies und der Art der Substanz, daher müssen zur Einschätzung von Umweltproben mehrere Tests mit verschiedenen toxikologischen Endpunkten und Testorganismen durchgeführt werden. So sind für die jeweiligen Untersuchungsobjekte und Fragestellungen, Biotestbatterien zu entwickeln, wie es zum Beispiel für die Bewertung der Belastungssituation von Böden von Hund-Rinke et al. 2002 gemacht wurde. In diesen werden unterschiedliche Ebenen der biologischen Organisation untersucht, wobei auch verschiedene Trophieebenen einzubeziehen sind (Reineke 2003).

Die Wahl eines Endpunktes für Tests von Umweltchemikalien hängt maßgeblich von der Empfindlichkeit ab. Besonders sensible Endpunkte erlauben eine Detektion von geringeren Konzentrationen oder eine kürzere Versuchsdauer, sie können auch Einsicht in die Wirkungsweisen der Schadstoffe geben (Candido & Jones 1996; Dhawan et al. 2000).

Ergebnisbewertung und Grenzen von Letalitätstests:

Eine orale (bzw. dermale) LD50 ist immer in Zusammenhang mit dem beobachteten toxischen Effekt zu betrachten. Diese relativ grobe Messung ist nur als Referenzwert zum Zweck einer Klassifizierung nützlich und für den Ausdruck des letalen Potentials einer Testsubstanz nach oraler Verabreichung (bzw. dermaler Applikation). Auch ist

stets auf die Tierart zu achten, mit welcher sich die jeweilige LD50 ergab (OECD 1987).

Im Test auf akute Toxizität bei Fischen wird selbige wie in den hier durchgeführten Tests mit den Nematoden durch die mittlere letale Konzentration (LC50) ausgedrückt, sie beschreibt die Konzentration, bei welcher 50 % der Organismen einer Testgruppe innerhalb einer vorgegebenen Dauer versterben (OECD 1992). Ebenso verhält es sich bei den akuten Toxizitätstests mit *Eisenia foetida* in künstlichem Boden oder auf Filterpapier (OECD 1984, 1988).

Akute Toxizität wird im Test mit Daphnien als mittlere effektive Konzentration (EC50) ausgedrückt, bei welcher 50 % der Organismen einer Testgruppe innerhalb 48 h unbeweglich werden (OECD 1984, 1992).

Eine Untersuchung der akuten oralen (bzw. dermalen) Toxizität einer Chemikalie und die Bestimmung ihres LD50-Wertes erbringt eine Schätzung der relativen Toxizität. Die Extrapolation der Ergebnisse von Tieren auf Menschen ist aus verständlichen Gründen nur bis zu einem gewissen, sehr geringen Maße möglich (OECD 1987).

Ergebnisbewertung und Grenzen von Reproduktionstests :

Wegen der relativ geringen Anzahlen von Tieren in den einzelnen Dosisgruppen, der Empfindlichkeit der Endpunkte und der kurzen Studiendauer können Screening-Tests keinen Nachweis erbringen, der ausreichen würde, Effektlosigkeit zu behaupten. Obwohl folglich auch negative Daten keine absolute Sicherheit bieten können, enthalten solche Informationen doch eine größere Sicherheit, wenn tatsächliche Expositionen klar unterhalb den im Test beobachteten NOAELs liegen (OECD 1995).

Studien an einzelnen Generationen von Mäusen oder Ratten wie auch Nematoden können spezifische Gründe und Auswirkungen nicht in allen Fällen erhellen. Die Ergebnisse einer Studie über Reproduktionstoxizität sollten in Zusammenhang mit Ergebnissen von Studien subchronischer, teratogener und anderer Effekte betrachtet werden.

Extrapolationen der Ergebnisse solcher Studien auf Menschen sind nur bis zu einem gewissen Punkt machbar, obwohl auch nützliche Informationen über NOAELs und zulässige menschliche Exposition gewonnen werden können (OECD 1983).

Subletale Veränderungen, wie z. B. Hemmung von Reproduktion oder Wachstum, können als ökologisch relevanter betrachtet werden als die Mortalität (Jonker 2003).

3.4.2.2 Entwicklung der Testsysteme und Optimierung der Bedingungen

Versuche zum Medium

Zur Entwicklung der Tests auf akute Toxizität in flüssigen Medien waren Vorversuche notwendig, um ein passendes Medium zu finden. Die extrem geringe Löslichkeit von BaP in Wasser (nur 0,0038 mg/l bei 25°C) machte die Verwendung des organischen Lösungsmittels DMSO nötig, welches bereits 1988 von Williams und Dusenbery wegen seiner geringen Toxizität auf *C. elegans* vorgeschlagen wurde. Diese Auswirkungen wurden nun in drei verschiedenen Medien getestet, wobei sich das K-Medium nach Donkin & Williams (1995) nicht nur durch seinen Einsatz in mehreren Studien (Donkin & Dusenbery 1933, Anderson et al. 2001, Ura et al. 2002; Boyd & Williams 2003) sondern auch in den hier durchgeführten Tests wegen seiner geringen Toxizität empfahl. Die LC50 von DMSO in K-Medium liegt bei über 12 %, die jeweiligen in Egg-Buffer und S-Medium betragen 5,8 bzw. 8,0 %. Die höheren Steigungswerte der beiden letztgenannten (0,96 bzw. 0,67) verdeutlichen eine stärkere Zunahme der Letalität mit der Konzentration als der flache Anstieg der Sterblichkeit bei K-Medium mit einer Steigung von 0,34.

Versuche zur Lösungsmittelkonzentration

Es war zu testen, welches die höchste noch akzeptable Konzentration von DMSO in K-Medium ist. Die Vorversuche zeigten, dass ein Überleben in bis zu 5-prozentigem DMSO sogar nach 96 h möglich ist. Nach 24 h ergaben sich kaum Änderungen in den Überlebensraten, nur in der dreiprozentigen Lösung wurden nicht alle eingesetzten Organismen aufgefunden. Da es auch nach Literaturangaben bei einem Prozent DMSO-Gehalt keine Bedenken gab (Ura et al. 2002), wurde dies akzeptiert.

Die zunächst wegen der besseren Erkennbarkeit mit drei Tage alten adulten Nematoden durchgeführten 24 h-Tests konnten nach etwas Einarbeitungszeit am Mikroskop bald zeitsparender mit ein Tage alten L1- bis L2-Larven durchgeführt werden, denn in ihrer Empfindlichkeit unterscheiden sich die verschiedenen Entwicklungsstufen von *C. elegans* laut Donkin & Williams (1995) kaum voneinander.

Versuche und Tests zur akuten Toxizität

Die Tests der akuten Toxizität wurden für AcL, CuCl₂ und EMS gemäß den Vorschriften von Freeman et al. (1998) durchgeführt. Statt 12 well-Gewebekulturplatten mit 1 ml Testvolumen wurden 96 well-Gewebekulturplatten mit 200 µl

Testvolumen benutzt, da sich ein Wiederauffinden der Nematoden darin einfacher gestaltete. Jeder Test bestand aus einer Kontrolle ohne Testsubstanz und mindestens 5 verschiedenen Konzentrationsstufen in drei Ansätzen. Zu beachten ist, dass das Falcon-Röhrchen mit der Nematodensuspension vor dem Übertragen der Testorganismen in die Testkammer desöffteren zu schüttel ist, da sonst in den späteren Testansätzen weniger Individuen enthalten waren.

Für die Tests mit BaP waren die optimalen Bedingungen durch Versuche herauszufinden. Wegen seiner Wasserunlöslichkeit wurden größere Modifikationen vorgenommen: die Verwendung eines Lösungsmittels war unabdingbar und statt K-Medium wurde mit autoklaviertem Wasser ein weiteres Medium eingesetzt. Zur besseren Wiederauffindung der Testorganismen wurden 96 well-Gewebekulturplatten verwendet. Damit in diesen kein BaP ausfiel, war eine hohe Lösungsmittelkonzentration von 4 % notwendig. Daher wurde die 24 h-LC50 von BaP in autoklaviertem Wasser mit 4-prozentiger DMSO-Konzentration bestimmt. Dennoch überschritt die Mortalität in keinem der Tests 10 %. Die Löslichkeit von BaP ohne Lösungsmittel wurde selbst in den kleinsten Konzentrationen überschritten, was auch von Ura et al. 2002 festgestellt wurde (24 h-LC50 = 0,05 mg/l).

3.4.2.3 Vergleich der Ergebnisse untereinander

Tests auf akute Toxizität

Bei Anordnung der Substanzen nach der Sensitivität der Toxizitätstests mit *C. elegans* auf Basis der 24 h-LC50-Werte ergibt sich die Reihenfolge EMS > BaP (4 % DMSO) > Cu²⁺ > AcL. Bei NOECs und LOECs sind die Plätze von EMS und BaP gegenüber den LC50s vertauscht, was auf die unterschiedlichen Abstände zwischen den gewählten Testkonzentrationen zurückzuführen sein kann. Kleinere Abstufungen in der Wahl der Konzentrationsreihe wären hier sinnvoll gewesen.

Tests auf Reproduktionshemmung

- Tests auf festen Medien:

Bei der Reproduktionstestung hat sich gegenüber der Abfolge bei den Letalitäts-Tests in flüssigen Medien mit BaP (1 % DMSO) > Cu²⁺ (1 % DMSO) > AcL (1 % DMSO) > EMS (1 % DMSO) nur die Stellung von EMS verändert. Der Mechanismus der Toxizität scheint bei EMS hinsichtlich Reproduktionstoxizität anders zu verlaufen als bei der Letalität, denn bei den 24 h-Letalitätstests in flüssigem K-Medium starben

bereits 50 % der Nematoden bei Konzentrationen von 0,648 mg/l, während hier nach 72 h bei 50 % erst ab 42,1 mg/l Effekte auftreten. Über den rein dermalen Pfad scheint EMS nicht im selben Maße aufgenommen zu werden und verfügbar zu sein wie oral.

- Tests in flüssigen Medien:

EMS ist wiederum vertauscht worden, die Reihenfolge entspricht nun der der NOECs und LOECs bei den 24 h-Letalitätstests (BaP (0,5 % DMSO) > EMS > Cu²⁺ > AcL). Hier überschreitet die 72 h-EC50 bei keiner Substanz die 24 h-LC50.

Tests auf Wachstumshemmung

- Tests auf festen Medien

Bei den Wachstumsmessungen konnte wegen wachstumsfördernder Wirkungen der meisten niedrigen Konzentrationsstufen bei keiner Testsubstanz eine EC50 berechnet werden. An deren Stelle finden Vergleiche auf der Grundlage der NOECs und LOECs statt.

Die Anordnung der Substanzen nach ihren Empfindlichkeiten entspricht mit BaP (1 % DMSO) > Cu²⁺ (1 % DMSO) > AcL (1 % DMSO) > EMS (1 % DMSO) derjenigen bei den Tests der reproduktiven Toxizität auf festen Medien.

- Tests in flüssigen Medien

Wird die 72 h-EC50 bei Tests in flüssigen Medien in g/l berechnet, so folgt aus der Tatsache, dass das wirksame Cu²⁺ mit 63,55 g/mol leichter ist als ein BaP-Molekül mit 252,315 g/mol, eine andere Reihenfolge der Sensitivitäten (Cu²⁺ > BaP (0,5 % DMSO) > EMS > AcL) als bei den molaren Angaben (BaP (0,5 % DMSO) > Cu²⁺ > EMS > AcL). Dadurch würde zum ersten Mal eine andere Reihenfolge als BaP > Cu²⁺ > AcL auftreten.

Die Sortierung der NOECs in mg/l und µmol/l, sowie die der LOECs in µmol/l sieht folgendermaßen aus: EMS > BaP (0,5 % DMSO) > Cu²⁺ > AcL, was sich für die LOECs in mg/l wegen der großen Differenz der Molekulargewichte von BaP und Cu²⁺ ändert. Das fast viermal so schwere BaP scheint später als Cu²⁺ nachteilige Effekte auf das Wachstum auszuüben.

Wegen der geringen Unterschiede sowohl zwischen den 72 h-EC50-Werten als auch zwischen den LOEC-Werten von BaP und Cu²⁺ wird die Reihenfolge weiterhin wie diejenige bei den molaren Einheiten (BaP > Cu²⁺ > AcL) angesehen.

Die Berechnungen der EC50 für die Wachstumshemmung ergeben hier zwei zu diskutierende Werte: sowohl bei AcL als auch bei EMS liegt die 72 h-EC50 über der 24 h-LC50 in K-Medium. Es ist eigentlich nicht zu erwarten, dass oberhalb der für 50 % der Population tödlichen Konzentration nach zwei weiteren Tagen im gleichen Medium eine erst 50-prozentige Hemmung des Wachstums festzustellen ist. Dies kann zum einen an der Testdurchführung liegen. Da nach 72 h Inkubation der anfänglich nicht genau abgezählten 10 bis 20 Individuen natürlich nur überlebende auf die Agarplatten übertragen wurden, hätten in der jeweiligen Konzentration bereits einige Nematoden gestorben sein können. Bei einer großen Anzahl, wie von einer LC50 für eine zwei Tage kürzere Testdauer verursacht, hätte dies jedoch auffallen müssen. Zum anderen liegt es auch an der Tatsache, dass die LC50- und EC50-Werte auf der Grundlage von Testwerten nur berechnet werden.

Verhältnisse der Ergebnisse untereinander

Für weitere Vergleiche wurden verschiedene Verhältnisse gebildet, wozu die Testergebnisse in Form der LC50- und EC50-Werte dividiert wurden.

Die Faktoren zwischen den 24 h-LC50s und den verschiedenen 72 h-EC50s zeigt Tab. 29.

Tab. 29: Verhältnisse der letalen zu den subletalen Endpunkten (Quotienten LC50/EC50)

	AcL	BaP	Cu²⁺	EME
für Reproduktion auf Festmedium	218	14	18	0,02
für Reproduktion auf Flüssigmedium	50	9258	86	488
für wachstum auf Festmedium (LOECs)	0,5	0,05	1,2	0,004
für Wachstum auf Flüssigmedium	0,1	1,7	39,3	0,01

Es ergeben sich keine eindeutigen Muster für die Werte bei den verschiedenen Chemikalien, die Quotienten LC50/EC50 (bzw. LOEC_{letal} / LOEC_{subletal}) sind nicht konstant, weder für einen Endpunkt, noch für ein Medium, noch für eine Chemikalie.

Der Wert 0,02 beim Vergleich von 24 h-LC50 und 72 h-EC50 für Reproduktionshemmung durch EMS auf Festmedium zeigt an, dass die LC50 in flüssigem Medium weit über der EC50 in festem Medium liegt. EMS agiert hier auf dermaleme Wege nicht so nachteilig auf die reproduktive Leistung der Nematoden wie oral verabreicht auf ihr Überleben. Die anderen drei Substanzen bewirken eine schnellere Minderung der Reproduktion auf Festmedium.

Wegen der fehlenden EC50-Werte für das Wachstum auf Festmedium wurden die LOEC-Werte miteinander verglichen. Hierbei ist der letale Endpunkt für AcL, BaP und EMS im flüssigen Medium sensitiver als das Wachstum auf festem, eventuell werden diese Chemikalien dermal weniger gut aufgenommen und sind dementsprechend nicht im selben Maß verfügbar; nur bei Cu²⁺ treten nachteilige Auswirkungen beim Wachstum etwas früher auf. Werte kleiner Null veranschaulichen die bereits oben angesprochene Unplausibilität der beiden EC50s für wachstumshemmende Wirkungen von AcL und EMS in Flüssigmedium.

In Tab. 30 werden die Endpunkte Reproduktion und Wachstum miteinander verglichen. Dazu sind die EC50-Werte der festen Reproduktionstests durch die der flüssigen Reproduktionstests bzw. die EC50-Werte der flüssigen Reproduktionstests durch die der flüssigen Wachstumstests dividiert worden.

Tab. 30: Verhältnisse der EC50-Werte subletaler Endpunkte

	AcL	BaP	Cu ²⁺	EME
Reproduktion fest/flüssig	0,2	644	4,7	31707
Reproduktion flüssig/Wachstums flüssig	0,002	0,0002	0,5	0,00002

AcL richtet demnach dermal aufgenommen mehr Schaden bei der Reproduktion an als oral verabreicht. Bei den restlichen Chemikalien ist die Reproduktion in flüssigem Medium empfindlicher als auf festem.

In flüssigen Medien ist die Reproduktion für alle getesteten Schadstoffe ein sensitiverer Endpunkt als das Wachstum.

Da es bei den 72 h-Tests nicht möglich war, eine EC50 auf Festmedium zu berechnen, werden für die folgenden Vergleiche in Tab. 31 die entsprechenden LOECs herangezogen.

Tab. 31: Verhältnisse der LOEC-Werte subletaler Endpunkte

	AcL	BaP	Cu ²⁺	EME
Wachstum fest/flüssig	1000	20	1000	2000000
Reproduktion fest/Wachstum fest	0,001	0,01	0,001	0,005

Beim Wachstum reagieren die Nematoden auf festem Medium weniger empfindlich als im flüssigen Medium, und das bei allen Konzentrationsstufen der getesteten Schadstoffe.

Wie auch im Flüssigmedium verhält sich die reproduktive Leistung auf dem festen Medium empfindlicher gegenüber den Schadwirkungen der Testsubstanzen als das Wachstum.

Für den Endpunkt Letalität ergibt sich die Reihenfolge EMS > BaP (4 % DMSO) > Cu²⁺ > AcL, was bei keinem der subletalen Endpunkte in dieser Art zu beobachten ist. Nur bei der Letalität rangiert EMS auf dem ersten Platz, bei den Tests auf Reproduktions- und Wachstumshemmung bewirkt BaP die stärksten Effekte. Im Flüssigmedium verändern sich die Empfindlichkeiten zwischen den Endpunkten Reproduktion und Wachstum. Die Reproduktion reagiert hier empfindlicher auf EMS als auf Cu²⁺, während sich dies beim Wachstum umgekehrt verhält. Auf Festmedium bleibt die Reihenfolge der Sensitivitäten für die beiden subletalen Endpunkte gleich (Tab. 32).

Tab. 32: Reihenfolgen der Empfindlichkeiten (LC- bzw. EC50-Werte) bezogen auf molare Einheiten. Bei den Tests auf Letalität war BaP mit 4 % DMSO in autoklaviertem Leitungswasser gelöst. Bei den Tests auf Reproduktions- und Wachstumshemmung auf Festmedium waren alle vier Testsubstanzen mit 1 % DMSO in NGM-Agar gelöst. Bei den Tests auf Reproduktions- und Wachstumshemmung auf Flüssigmedium war BaP mit 0,5 % DMSO in autoklaviertem Leitungswasser gelöst.

Test auf	Reihenfolge der Empfindlichkeiten
Letalität in Flüssigmedium	EMS > BaP > Cu ²⁺ > AcL
Reproduktion auf Festmedium	BaP > Cu ²⁺ > AcL > EMS
Reproduktionshemmung in Flüssigmedium	BaP > EMS > Cu ²⁺ > AcL
Wachstumshemmung auf Festmedium ***	BaP > Cu ²⁺ > AcL > EMS
Wachstumshemmung in Flüssigmedium	Bap > Cu ²⁺ > EMS > AcL

*** NOEC bzw. LOEC-Werte

Die Steigungen der Konzentrations-Wirkungs-Kurven unterscheiden sich bei den verschiedenen Endpunkten. Die berechneten Werte sind in Tab. 33 aufgeführt.

Tab. 33: Steigungen der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen

	AcL	BaP	Cu ²⁺	EME
Letalität in Flüssigmedium	1,2	0,3	1	2,2
Reproduktion in Flüssigmedium	0,2	0,3	0,3	0,2
Wachstum in Flüssigmedium	0,1	0,2	0,5	0,1
Reproduktion auf Festmedium	0,2	0,5	0,3	0,2

Je steiler die Steigung, umso enger ist der Bereich der Toxizität (jeweils nur zwei Größenordnungen bei den Letalitätstests mit AcL und EMS), bei einer flachen

Steigung kann er sich über mehrere Größenordnungen (beispielsweise 5 bei den Wachstumstests mit EMS in Flüssigmedium) erstrecken.

Deutlich unterscheiden sich die Steigungen von AcL, Cu^{2+} und EMS in den subletalen Endpunkten von der des letalen Endpunkts. Nach Dhawan et al. (2000) lässt diese Beobachtung auf verschiedene Mechanismen der Toxizität rückschließen. Für die Tests mit BaP lassen sich keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Steigung zwischen letalen und subletalen Endpunkten ausmachen

3.4.2.4 Vergleich der Ergebnisse mit anderen *C. elegans*-Testdaten

Tests auf akute Toxizität

C. elegans besitzt in den akuten Toxizitätstests nach Ura et al. (2002) eine 24 h-LC50 von 50 μg BaP (1 % DMSO) /l. In den hier durchgeführten Tests beträgt die 24 h-LC50 hingegen 6,75 mg BaP (4 % DMSO) /l, sie liegt also um einen Faktor von etwa 100 höher. Dieser Sachverhalt lässt sich auch nicht mit der höheren DMSO-Konzentration erklären.

Sämtliche verfügbaren Ergebnisse akuter Toxizitätstests mit *C. elegans* in K-Medium ohne Bakterien lassen sich zu einer 24 h-LC50 von 74,12 mg Cu^{2+} /l mitteln (Donkin & Williams 1995; Tataru et al. 1997; Freeman et al. 1998; Dhawan et al. 2000; Boyd & Williams 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Wert von 100,56 (100,38 bis 100,75) mg Cu^{2+} /l gefunden, der mit den Literaturwerten vergleichbar ist.

Die in dieser Arbeit bestimmte LC50 ist identisch mit der von Williams und Dusenbery 1988 für *C. elegans* bestimmten 24 h-LC50 von 100 (79-127) mg Cu^{2+} /l H_2O . Diese LC50 ist mit denen von Säugern (LD50 Ratte = 66 mg/l, LD50 Maus = 89 mg/l und einer mittleren LD50 nicht weiter spezifizierter Säugetiere = 57 mg/l) vergleichbar, was auch für die hier erarbeiteten LC50-Werte gilt.

Tests auf Reproduktionshemmung

Hasegawa et al. (2004) fanden bis 5 mg/l keine schädigende Wirkung von AcL auf die Fruchtbarkeit von *C. elegans*. Erst bei 500 mg AcL/l treten verringerte Nachkommenanzahlen auf. In der vorliegenden Arbeit liegen die Werte für Reproduktion (EC_{50} = 35,54 mg/l; LOEC = 7,1 mg/l) nur eine bis zwei Größenordnungen darunter.

Die von Anderson et al. (2001) bestimmte 72 h- EC_{50} von 39 μmol CuCl_2 /l K-Medium für die hemmende Wirkung auf die Reproduktion von *C. elegans* liegt in der gleichen

Größenordnung wie der leicht höhere Wert aus der vorliegenden Arbeit von 86,45 $\mu\text{mol/l}$.

Für die Reproduktionstoxizität fanden Boyd & Williams (2003) mit 32,1 $\mu\text{mol/l}$ für CuCl_2 einen etwas niedrigeren 72 h-EC50-Wert.

Für diese doch sehr geringen Abweichungen dürften Schwankungen in der Fitness der Nematoden-Population verantwortlich sein.

Des Weiteren kam bei diesen Autoren eine andere Auszählungsweise zur Anwendung. Da sich die Nematoden in Flüssigmedium etwas langsamer entwickeln, wurden nach etwa 21 h außerhalb der Testsubstanz auf unkontaminiertem NGM-Agar alle Nachkommen, also auch die Eier gezählt. In den oben genannten Testverfahren werden nur Nachkommen gewertet, die sich bereits im L1-Larvalstadium oder darüber befinden.

In den Reproduktionstests, die 2003 von Jonker durchgeführt wurden, zeigt sich bei der Inkubation mit Cu^{2+} eine Verbreitung der Eier über einen größeren Bereich, was wohl einer Erhöhung der Fitness dient, und die phänotypische Plastizität als Antwort auf den toxischen Stress darstellen könnte (Jonker 2003). Solche Sachverhalte wurden in der hier vorliegenden Arbeit nicht überprüft.

Tests auf Wachstumshemmung

Bei Hasegawa et al. (2004) bewirkt AcL bis 5 mg/l keinerlei nachteiligen Effekte auf das Wachstum von *C. elegans*, ab 500 mg AcL/l verlangsamt sich das Wachstum, so dass die Körpergrößen kleiner werden. Das Wachstum der Nematoden zeigt hier mit einer LOEC von 0,71 mg/l schon viel früher erste Auswirkungen, seine EC50 (14,6 g/l) aber ist zwei Größenordnungen höher angesiedelt.

Anderson et al. (2001) finden eine 24 h-EC50 von $(56 \pm 7,6)$ $\mu\text{mol CuCl}_2/\text{l}$ K-Medium für die Hemmung des Wachstums von *C. elegans* in Form einer Wachstumsrate. Wegen der Berechnung einer Wachstumsrate und der kürzeren Testdauer ist das Ergebnis nicht direkt mit dem in dieser Arbeit ermittelten Wert (72 h-EC50 = 15,5 $\mu\text{mol CuCl}_2/\text{l}$ K-Medium) vergleichbar. Er differiert um einen Faktor von 3,5.

Bei Williams & Dusenbery (1990) unterscheidet sich der 24 h- vom 72 h-LC50-Wert von CuCl_2 um den Faktor 45. Diese unterschiedlichen Größenordnungen könnten sowohl an den Variationen in der Fitness der *C. elegans*-Population als auch an den Unterschieden in den Messmethoden liegen.

Auch Traunspurger et al. (1997a), Höss et al. (1997, 1999) berechnen Wachstumsraten aus zwei Messungen, einmal vor und einmal nach der Inkubation. Dies ist

notwendig, da sie Nematoden aus Dauerstadien nach drei Tagen auf Agar mit *E. coli*-Bakterien durch zweimaliges Sieben alterssynchronisieren. Eine solche Vorgehensweise ist nicht so genau wie die Alterssynchronisierung durch Behandlung mit Hypochlorit. Daher können in der vorliegenden Arbeit die Größen der Testorganismen vor dem Einsatz in die Testlösungen als gleich angenommen werden. Die Körperlängenmessungen nach Hitzetötung mit anschließender färbender Fixierung der Testorganismen nach Traunspurger et al. (1997a), Höss et al. (1997, 1999) erbringen genauere Ergebnisse, verkomplizieren und verlängern die Testdurchführung jedoch zugleich.

Jonker stellt 2003 fest, dass reproduktive *C. elegans* bei Inkubation mit Cu^{2+} eine erhöhte Länge bei niedrigen Konzentrationen und verringerte Länge bei hohen Konzentrationen aufweisen, wie dies auch in der vorliegenden Arbeit bei allen Testsubstanzen auf festem Medium und zumindest bei AcL und Cu^{2+} in flüssigem Medium geschah. Die Abnahme bei hohen Konzentrationen kann als physiologische Konsequenz der stärkeren Vergiftung interpretiert werden (Jonker 2003).

Verschiedene Endpunkte vergleichende Tests

Tests mit *C. elegans*, die Vergleiche verschiedener Endpunkte mit gleichen Versuchsbedingungen ermöglichen, wurden von Traunspurger et al. (1997a), Dhawan et al. (1999, 2000), Höss et al. (1999), Anderson et al. (2001) unternommen. Die Gruppe um Traunspurger maß Körperlängen und zählte die Eier in den Nematoden sowie die juvenilen Nachkommen nach 72 h Exposition gegenüber von CdCl_2 , wobei sich letzterer als sensitivster Endpunkt herausstellte. Signifikante Effekte bewirkt Cd an der Nachkommenanzahl pro Nematode schon zwei Größenordnungen früher als bei der Letalität (Traunspurger et al. 1997a).

Bei Höss et al. wurde zudem der Prozentanteil schwangerer Nematoden bestimmt, für den sich eine ähnliche Empfindlichkeit wie für die Endpunkte Längenwachstum und Nachkommenanzahl ergab. Die dabei gefundenen LOEC-Werte sind denen chronischer Exposition von Chironomiden gegenüber Cadmium vergleichbar und etwas geringer als die für den Amphipoden *Hyalella azteca* (Höss et al. 1999).

Dhawan et al. (1999) verglichen Bewegungsraten mit Reproduktion und Letalität nach Exposition gegenüber verschiedenen Ethanol-Konzentrationen. Das Ergebnis zeigte, dass die LOEC der Letalität um einen Faktor 10 höher liegt als die der Reproduktionshemmung, welche wiederum mindestens zehnmal unempfindlicher reagiert als die der Bewegungsraten.

Dies bestätigten die im Jahr darauf durchgeführten Tests mit fünf verschiedenen Metallionen nicht. Nur im Falle des Cadmiums ergab sich ein Verhältnis von nahezu 100 (89), bei den restlichen Metallen Zink, Kupfer, Aluminium und Blei lagen die Faktoren zwischen Letalität und Bewegungshemmung unter 30 (Dhawan et al. 2000).

Für die vergleichenden Untersuchungen von Anderson et al. im Jahr 2001 ergeben sich zwischen den subletalen Endpunkten Bewegung, Nahrungsaufnahme, Wachstum und Reproduktion beeinflusst durch verschiedene Metallionen keinerlei Unterschiede, die Reihenfolge der Toxizität war für alle Endpunkte die gleiche.

3.4.2.5 Vergleich der Ergebnisse mit Testdaten anderer Modellorganismen

Im Gegensatz zu den vielen bereits bestehenden Protokollen für Tests auf Mortalität, wie beschrieben in den OECD Richtlinien 401, 402, B.3. 420, B.1.bis, 423, B.1.tris, 207, C.8., 203, C.1. und C.2. deren Dauer sich je nach Verfahren und Testspezies von mindestens 24 h bis zu meist 14 d erstrecken kann, dauert ein akuter Toxizitätstest mit *C. elegans* nur 24 h (Williamd & Dusenbey 1988; Donkin & Dusenbery 1933; Dhawan et al. 2000; Peredney & Williams 2000a, B; Ura et al. 2002). Eine Hemmung der Reproduktion ist in den Tests nach den OECD-Richtlinien 421, 415, B.34. 202 Teil II und C.20. an Nagern und Daphnien innerhalb von 2 bis 10 Wochen feststellbar. Nachteilige Effekte von Testsubstanzen auf die Entwicklung, u. a. in Form des Wachstums untersuchen Tests an Fischen nach den OECD Richtlinien 210 und C.14. in speziesabhängigen Zeiträumen von 28 bis 32 d.

Wegen seines kurzen Lebenszyklus' können ökologisch relevante subletale Endpunkte, wie Wachstum, Entwicklung und Reproduktion von *C. elegans* innerhalb von drei Tagen bewertet werden.

Als sehr problematisch erweist sich der bereits 2000 von Koller et al. diskutierte Mangel an toxikologischen Daten in der Literatur und den verschiedenen Datenbanken. Wie in diesem Artikel wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit viele Testergebnisse ohne Angaben der Endpunkte, der Testdauer, der verwendeten Spezies oder der Versuchsbedingungen gefunden. Auch das seit damals neu eingerichtete Datenbanksystem IUCLID (International Uniform Chemical Information Database) der Europäischen Gemeinschaft ist in dieser Hinsicht keine Ausnahme. Es enthält lediglich Informationen und Toxizitätsdaten von zwei der vier Testsubstanzen, welche meist nur Fische und Nager betreffen und sich auf unterschiedliche

Testzeiträume beziehen. Somit liegen keine gemeinsamen Grundlagen für Vergleiche vor.

Tests auf akute Toxizität

- *Mittelwerte der oralen LD50s für Ratten*

24 h-LD50 = 308 mg AcL/kg KG (ECB ESIS 2000; Madle et al. 2003; The Physical and Theoretical Laboratory Oxford University 2005; Toxnet 2005; U.S. EPA Iris 2005);
LD50 = 50 mg BaP/kg KG (STARS 4.0);

LD50 = 263 mg Cu²⁺/kg KG (Williams & Dusenbery 1988; U.S. NLM NIH 2004; The Physical and Theoretical Laboratory Oxford University 2005; STARS 4.0).

Die Reihenfolge der Empfindlichkeiten bei *C. elegans* entspricht BaP > Cu²⁺ > AcL.

- *Mittelwerte der oralen LD50s für Mäuse*

24 h-LD50 = 107 mg AcL/kg KG (The Physical and Theoretical Laboratory Oxford University 2005; U.S. EPA Iris 2005);

LD50 = 50 mg BaP/kg KG (STARS 4.0);

LD50 = 128 mg Cu²⁺/kg KG (Williams & Dusenbery 1988; ECB ESIS 2000; U.S. NLM NIH 2004; The Physical and Theoretical Laboratory Oxford University 2005; Toxnet 2005);

LD50 = 470 mg EMS/kg KG (U.S. NLM NIH 2004).

Die Reihenfolge der oralen Toxizität bei Mäusen ergibt sich wie folgt: BaP > AcL > Cu²⁺ > EMS. Die Werte für AcL und Cu²⁺ liegen relativ nahe beieinander, was die bei den Nematoden festgestellte Reihenfolge zumindest von BaP > Cu²⁺ > AcL nicht völlig abwegig erscheinen lässt.

Die höhere Toxizität von BaP gegenüber von AcL und Cu²⁺ bei Mäusen stimmt mit der von *C. elegans* überein. Allerdings ist die EMS-Empfindlichkeit bei den Nematoden höher als die aller anderen Substanzen, während sie bei den Nagern auf dem letzten Platz rangiert.

- *Mittelwerte der oralen LD50s für Meerschweinchen*

24 h-LD50 = 150 mg AcL/kg KG (ECB ESIS 2000; U.S. EPA Iris 2005);

24 h-LD50 = 32 mg Cu²⁺/kg KG (Toxnet 2005).

Dass von Cu²⁺ schädlichere orale toxische Effekte hervorgerufen werden als von AcL, bestätigt sich in den Testergebnissen bei Meerschweinchen, wie schon bei Ratten und bei *C. elegans*.

- *Mittelwerte der LC50s für Daphnien*

Daphnia magna: 48 h-LC50 = 129 mg AcL/l (European Commission Joint Research Center 2002; U.S. EPA Iris 2005);

48 h-LC50 = 48 µg Cu²⁺/l (STARS 4.0).

Daphnia pulex: 96 h-LC50 = 5 µg/l für BaP (Irwin et al. 1997; STARS 4.0).

Die Reihenfolge Cu²⁺ > AcL in den akuten Tests mit den Wasserflöhen entspricht der in den *C. elegans*-Tests aufgefundenen. Die zu *D. magna* alternative Spezies *D. pulex* zeigt eine noch höhere Beeinflussung der Überlebensrate durch BaP an, allerdings im Rahmen einer längeren Testdauer, was eine Einreihung dieser Substanz vor Cu²⁺ und AcL nicht zulässt.

- *Mittelwerte der LC50s für Oncorhynchus mykiss*

96 h-LC50 = 135 mg AcL/l (European Commission Joint Research Center 2002; Toxnet 2005; U.S. EPA Iris 2005);

96 h-LC50 = 0,168 µg Cu²⁺/l (Toxnet 2005; STARS 4.0).

Cu²⁺ beeinträchtigt die Überlebensfähigkeit von Regenbogenforellen stärker als AcL, was für diese beiden Substanzen im Nematoden-Test ebenso zutrifft.

- *Mittelwerte der LC50s für Zahnkärpflinge*

14 d-LC50 = 35 mg AcL/l (European Commission Joint Research Center 2002);

24 h-LC50 = 2,45 mg BaP/l (Toxnet 2005).

Selbst bei längerer Exposition vermag AcL nur in höheren Konzentrationen als BaP das Überleben von 50 % der eingesetzten *Poecilia reticulata* zu unterdrücken, was in den in dieser Arbeit durchgeführten 24 h-Letalitätstests auch für *C. elegans* gilt.

- *Mittelwerte der LC50s für Pimephales promelas*

96 h-LC50 = 109 mg AcL/l (ECB ESIS 2000; European Commission Joint Research Center 2002; U.S. EPA Iris 2005);

48 h-LC50 = 5,6 µg BaP/l (STARS 4.0).

Die amerikanische Elritze reagiert empfindlicher auf BaP als auf AcL, wie es auch bei *C. elegans* in den hier durchgeführten akuten Toxizitätstests zu beobachten ist.

- *Mittelwerte der LC50s für Lepomis macrochirus:*

96 h-LC50 = 100 mg AcL/l (European Commission Joint Research Center 2002; Toxnet 2005);

96 h-LC50 = 30 mg Cu²⁺/l (ECB ESIS 2000).

Der Sonnenbarsch *L. macrochirus* reagiert empfindlicher auf Cu^{2+} als auf AcL, diese Reihenfolge stimmt ebenfalls mit der in den Nematoden-Tests festgestellten überein. Leider konnten in der zur Verfügung stehenden Literatur und den verschiedenen Datenbanken nur noch Ergebnisse einzelner Substanztests an unterschiedlichen Tierarten gefunden werden, also keine weiteren vergleichbaren Daten. Auf der Basis der hier zitierten Werte kann dennoch eine gute Übereinstimmung der Einordnung der relativen letalen Wirkungen von BaP, Cu^{2+} und AcL zwischen den Testergebnissen von *C. elegans* und denen für Daphnien, Fischen sowie Säugern (mit Ausnahme der Mäuse) festgestellt werden. Dies bestärkt die gute Eignung und Aussagefähigkeit von akuten Toxizitätstests mit den Nematoden.

Auch Peredney (2004) konstatierte die Tauglichkeit von *C. elegans* als Ergänzung und Alternative, da sich Ergebnisse aus 24 h-Tests mit dem Nematoden als denen des 14 d-Tests mit *E. foetida* vergleichbar erwiesen.

Tests auf Reproduktionshemmung

Zum Vergleich der vorliegenden Testdaten mit solchen aus Tests an anderen Spezies werden die Ergebnisse der Tests in flüssigen Medien gewählt, wenn die anderen Verfahren entweder in flüssigen Medien stattfanden (z. B. Fisch- und Daphnientests nach OECD) oder aber die Testsubstanzen oral verabreicht wurden. Die Tests mit *C. elegans* auf festen Medien entsprechen eher einer dermalen Applikation oder werden zum Vergleich von Tests mit einer Untermischung der Testsubstanzen in Bodenmaterialien herangezogen.

- *Mittelwerte der oralen LOAELs für Ratten*

LOAEL bei Langzeit-Tests (70 bis 80 d) = 4,23 mg AcL/kg KG/d, bei kürzeren Tests (5 bis 15 d) = 17 mg AcL/kg KG/d (Dearfield et al. 1988; ECB ESIS 2000; Dybing & Sanner 2003; Madle et al. 2003; Toxnet 2005; U.S. EPA Iris 2005);

245 d-LOAEL = 1,21 mg Cu^{2+} /kg KG/d , 26 d-LOAEL = 0,95 mg Cu^{2+} /kg KG/d (ECB ESIS 2000; ATSDR 2004);

5 d-LOAEL= 100 mg EMS/kg KG/d (Health Council of the Netherlands 2004).

Somit ergibt sich für die Reproduktionstoxizität an Ratten für diese drei Schadstoffe dieselbe Reihenfolge wie für deren Reproduktionstoxizität an *C. elegans*.

- *Mittelwerte der oralen LOAELs für Mäuse*

28- bis 64 d-LOAEL = 12 mg AcL/kg KG/d, 5 d-LOAEL = 50 mg AcL/kg KG/d (Dearfield et al. 1988; ECB ESIS 2000);

10 d-LOAEL = 160 mg BaP/kg KG/d (ASTDR 1995);

LOAEL = 231 (100 bis 325) mg EMS/kg KG als i. p. Einzelinjektion (Health Council of the Netherlands 2004; Toxnet 2005).

Die Mäuse reagieren besonders empfindlich auf AcL mit einer Verringerung ihrer Reproduktion, BaP benötigt höhere Konzentrationen für Hemmungen ähnlichen Ausmaßes und am geringsten wirksam ist EMS (AcL > BaP > EMS). Diese Reihenfolge weist keine Ähnlichkeiten mit den Nematoden-Tests auf.

Für keine weitere Tierart konnten Daten aus Tests aller oder wenigstens mehrerer der hier geprüften Schadstoffe gefunden werden.

Für Tests auf Hemmung der Reproduktion infolge von Schadstoffeinwirkungen kann *C. elegans* nicht mit Sicherheit als optimaler Testorganismus empfohlen oder verworfen werden. Es wurden viel zu wenige Testergebnisse von den hier ausgewählten Schadstoffen mit anderen Spezies zum Vergleich gefunden. Da sich bereits bei den beiden Säugerarten Ratte und Maus Unterschiede in den Empfindlichkeiten gegenüber den Testsubstanzen ergaben, kann nicht einmal für diese Gruppe einstimmig ein Urteil über eine Eignung des Einsatzes der Nematodentests gefällt werden.

Tests auf Wachstumshemmung

Auch hier sind zum Vergleich von Daten der Tests mit oraler Verabreichung der Testsubstanz oder Tests in flüssigen Medien wieder die Ergebnisse aus den flüssigen Wachstumstests mit *C. elegans* gewählt worden.

Bei den Säugetieren wurden Schadwirkungen der Substanzen nicht direkt mit verringertem Wachstum quantifiziert, sondern mit einer Absenkung von Körpergewicht oder mit Verringerung der Zunahme des Körpergewichts.

- *Mittelwerte der oralen LOAELs für Ratten*

56- bis 90 d-LOAEL = 7,8 mg AcL/kg KG/d (Dearfield et al. 1988; ECB ESIS 2000; U.S. EPA Iris 2005), 5- bis 21 d-LOAEL = 26,9 mg AcL/kg KG/d (ECB ESIS 2000; Toxnet 2005; Yang et al. 2005);

14 d-LOAEL = 196 mg Cu²⁺/kg KG/d, ♀ (ATSDR 2004);

5 d-LOAEL = 150 mg EMS/kg KG/d (Health Council of the Netherlands 2004).

Das Wachstum von Ratten wird am deutlichsten von AcL beeinträchtigt, und selbst EMS hemmt noch stärker als Cu²⁺. Die gefundene Reihenfolge lautet: AcL > EMS >

Cu^{2+} . Sie entspricht nicht den Ergebnissen der Tests mit *C. elegans* ($\text{Cu}^{2+} > \text{EMS} > \text{AcL}$).

Dass die LOAEL für Cu^{2+} aus Versuchen mit weiblichen F344 Ratten kommt, könnte eine Erklärung für die geringe Sensitivität sein. Diese zeigten nämlich verglichen mit der NOAEL von Männchen (26 mg/kg KG/d) eine höhere NOAEL von 93 mg/kg KG/d. Die differierende Stellung von EMS wird damit nicht geklärt.

- *Mittelwerte der oralen LOAELs für Mäuse*

12 d-Test LOAEL = 45 mg AcL/kg KG/d (Toxnet 2005);

19- bis 29 d-LOAEL = 66,7 mg BaP/kg KG/d ♀ (ATSDR 1995);

14 d-NOAEL = 717 mg CuCl_2 /kg KG ♂ (ATSDR 2004).

Bei Wachstumsmessungen von Mäusen zeigt sich folgende Reihenfolge: AcL > BaP > Cu^{2+} . Gegenüber der Reihenfolge bei den Nematoden-Tests schert nur AcL aus, indem es die Körpergewichtszunahme der Mäuse schon bei geringeren Konzentrationen hemmt als BaP und Cu^{2+} .

- *Mittelwerte der EC50s für Algen*

Chlorophyta, Poteriodromonas malhamensis, Scenedesmus obliquus, Selenastrum capricornutum: 72 h-EC50 = 6,3 μg BaP/l (STARS 4.0);

Chlorella stigmatophora, Nitschia closterium, Selenastrum capricornutum, Thalassiosira pseudonana: 3-bis 21 d-EC50 = 29,1 μg CuCl_2 /l (Toxnet 2005).

Die aufgezählten Algen verhalten sich hinsichtlich ihres Wachstums vergleichbar den Nematoden. BaP bewirkt mit 0,025 $\mu\text{mol/l}$ eine stärkere Hemmung des Wachstums als CuCl_2 mit 0,216 $\mu\text{mol/l}$.

Auch für Wachstumstests kann der Einsatz des Nematoden *C. elegans* nicht eindeutig bewertet werden. Dafür verantwortlich ist die Datengrundlage: es mangelt an Vergleichsdaten aus Tests mit anderen Spezies. Weitere Daten können ein klareres Bild für die Einordnungen der unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber den vier Testsubstanzen schaffen.

3.4.3 Diskussion Zur Wirkung von Atrazin auf die Entwicklung von *Caenorhabditis elegans*

Problemstellung und Vorgehensweise

Diese Arbeit zielt darauf ab, das Toxizitätspotential von Atrazin mit dem Nematoden *C. elegans* zu bewerten.

Als Endpunkte dienen Wachstums- und Eibildungshemmung des Testorganismus. Mit unterschiedlich aufgebauten Testsystemen wurden die subletalen Effekte sowohl im Boden als auch in flüssigem Medium gemessen.

3.4.3.1 Entwicklung der Testsysteme und Optimierung der Bedingungen

Versuche zum Ludox Colloidal Silica:

Um die Testorganismen lebendig von dem festen Medium (Boden) zu isolieren sollten die Testkammer mit Ludox Colloidal Silica 1,14 g gewaschen werden und diese Ludox-Dichte sollte eine Ludox-Konzentration von 12% entsprechen (Peredney, 2004).

Unser Versuch zeigte jedoch, dass eine Dichte 1,14g die Ludox-Konzentration von 12% nicht erreicht wurde, sondern schon bei der Dichte von 1,08g.

Alle Ludox-Konzentrationen (1, 3, 6, 12, 18, 24%) wirkten tödlich auf die Nematoden. Deshalb wurde Ludox in den Versuchen nicht mehr verwendet und die Testorganismen wurden ausschließlich mit Wasser gewaschen.

Tests auf Reproduktions- und Wachstumshemmung

Die Reproduktion ist in den Tests der vorliegenden Arbeit zwar ein empfindlicherer Endpunkt als das Wachstum, seine Bestimmung bedeutete aber eine zeitaufwändige Arbeit und eine hohe Zahl von Replikaten, damit eine aussagekräftige statistische Analyse durchgeführt werden konnte. Bereits Traunspurger et al. (1997a) sowie Dhawan et al. (1999) merkten an, dass die Quantifizierung der Reproduktion sehr zeitintensiv, anstrengend und mühsam ist, da jeder einzelne Nachkomme ausgezählt werden muss. Zur Fehlerminimierung wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Mittelwerte aus drei Zählungen gebildet. Höss et al. (1999) empfahlen als stabileren Endpunkt die Anzahl schwangerer Nematoden, da die Anzahl der Eier pro Testorganismus innerhalb einer Behandlungsgruppe stark schwankte.

In Tests mit Bodenproben zeigte das Wachstum nur geringe Schwankungen zwischen verschiedenen Behandlungen mit unterschiedlichen Partikelgrößen oder Gehalten an organischen Stoffen, dies zeichnet es als guten Testendpunkt aus (Traunspurger et al. 1997a, Höss et al. 1997, 1999).

Die Länge lebender Nematoden wurde unter dem Mikroskop bestimmt und in seinen Einheiten festgehalten, daran schloss sich eine prozentuale Auswertung an. Im Gegensatz hierzu nutzten Anderson et al. (2001) ein Computerprogramm zur

Feststellung der Nematoden-Länge und -Breite und bildeten eine Wachstumsrate aus den Veränderungen nach 72 h. Traunspurger et al. (1997a) sowie Höss et al. (1997, 1999) maßen die Körperlängen nach Tötung und färbender Fixierung der Testorganismen, was ebenfalls zu genaueren Ergebnissen führte.

Wachstum und Eibildung in flüssigem Medium:

In diesem Test wurde Atrazin mit DMSO aufgelöst und die Konzentration von DMSO lag bei 2.1%, der Test wurde nach 72 h im Warmschrank bei 20 °C beendet.

Die Ergebnisse des Tests zeigten, dass Atrazin auf das Wachstum sowohl die Körperlänge als auch die Körperbreite der Nematoden beeinflusste, die Wachstumshemmung hängt von der Atrazin-Konzentration ab. Jedoch war die Hemmung auf die Körperbreite stärker als auf die Körperlänge Abb. 67.

Die EC-Werte von Atrazin im flüssigen Medium auf die Nematoden *C. elegans* nach 72 h wurden in Tab. 34 dargestellt.

Tab. 34: EC-Werte von Atrazin in flüssigen Medium auf die Nematoden *C. elegans* nach 72 h.

	NOEC mg/l	Ec10 mg/l	Ec50 mg/l
Körperbreit	1,6	6,1	7014
Körperlänge	1,4	7,9	1220
Reproduktion	-	-	-

Wachstum und Eibildung im Boden:

Die Atrazin-Konzentration im Boden hemmte das Wachstum und die Eibildung der Nematoden. Die Wachstumshemmung auf die Körperlänge war etwas stärker als auf die Körperbreite. Tab. 35 zeigt die EC-Werte von Atrazin im Boden auf die Nematoden *C. elegans* (Körperbreite, Körperlänge, Reproduktion) nach 72 h.

Tab. 35: EC-Werte von Atrazin im Boden auf die Nematoden *C. elegans* nach 72 h.

	NOEC mg/Kg	EC10 mg/Kg	EC50 mg/Kg
Körperbreit	0,8	4,5	3299
Körperlänge	0,9	4,6	2960
Reproduktion	0,9	1,8	23,5

4 Zusammenfassung

Caenorhabditis elegans ist sicherlich eines der am intensivsten untersuchten Tiermodelle. Insbesondere für molekulargenetische, reproduktionsbiologische und viele medizinische Fragestellungen diente und dient *C. elegans* als wichtiges Modellsystem. Umso erstaunlicher ist die Tatsache, dass bisher nur unzureichende Informationen über den Lebenszyklus dieser Art aus dem Freiland vorlagen und ihre systematischen und phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen eine Vielzahl offener Fragen aufwiesen.

Deshalb beschäftigt sich der erste Teil vorliegender Arbeit mit einer Überprüfung der Freilandökologie und Biogeographie des Taxons.

C. elegans wurde nach unseren Untersuchungen in allen Kontinenten nachgewiesen. Dabei ist auffallend, dass die Art aus sehr unterschiedlichen Habitaten isoliert werden konnte, was für eine (auch im Labor bekanntlich nachgewiesene) breite ökologische Valenz spricht.

Auffallend ist allerdings auch die Bindung der Art an Abbauprozesse in unterschiedlichen Ökosystemen. Deshalb kommt sie häufig syntop mit Gastropoden, verschiedenen Arthropoden oder Diplopoden vor, was u.a. auch von FELIX (2005) beschrieben wurde. Nach unseren Untersuchungen spricht vieles dafür, dass auch die Ursprungsart der *C. elegans* Gruppe ein Begleiter von Gastropoden war. Möglicherweise lebte die Art auch in dem Verdauungssystem von Schnecken.

Wir konnten auch zeigen, dass eine Ausbreitung durch Gastropoden häufiger vorkommt. Die Anwesenheit von *C. elegans* in der von Europa nach den Vereinigten Staaten eingeschleppten Weinbergschnecke *Helix aspersa*, stützt diese Annahme. Nach den jetzigen Untersuchungen wissen wir, dass die Art als ubiquitärer Kosmopolit bezeichnet werden kann. Ihre Ursprungsheimat liegt in der Paläarktis. Durch Verschleppung erreichte sie ihr heutiges Areal.

Ein nicht weniger wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung von *C. elegans* als Biotest-System für die Indikation von Chemikalien-Wirkungen. Es gibt mehrere Gründe, die *C. elegans* auch zum geeigneten Modellorganismus für ein Biomonitoring erscheinen lassen.

Seine Genetik ist weitgehend aufgeklärt, ebenso auch viele Funktionen der genauer untersuchten Allele. Er ist im Labor mit einfachen Mitteln, kostengünstig, platzsparend und in großen Zahlen züchtbar.

Eine sichere Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Testbedingungen ist gewährleistet. Die kurze Generationszeit und die schnelle Entwicklung sorgen für eine kurze Testdauer. Wir züchteten *C. elegans* auf Agarplatten, testeten aber auch Flüssigmedien erfolgreich. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Art sowohl für Toxizitätstests in terrestrischen (Boden, Sediment, Luft u.a.) als auch in aquatischen Systemen eingesetzt werden kann.

Im Einzelnen liefert *C. elegans* die im Folgenden beschriebenen Einsichten in von Umweltfaktoren abhängige Wirkzusammenhänge.

Bevor wir die Art im Labor testeten, überprüften wir die gesamte Literatur bezüglich ihres systematischen Status, ihrer Verwandtschaft und ihrer Verbreitung. Dann, darauf aufbauend, entwickelten wir ein ökotoxikologisches Testsystem mit *C. elegans* als Modellorganismus, das durch Messung von umweltbedingten intrazellulär gebildeten ROS im Gesamtorganismus eine Einschätzung der biologischen Aktivität von Chemikalien und Umweltmedien ermöglichen sollte. Als grundlegender biochemischer Parameter ist eine, die Kapazität der antioxidativen Schutzmechanismen übersteigende, ROS-Bildung ursächlich für oxidative Schädigungen der Zelle verantwortlich und damit Basis für zahlreiche pathologische Effekte. Mit Hilfe des ROS-Indikators DHR123, der intrazellulär zum fluoreszierenden RH123 oxidiert wird, kann der Redoxzustand des Organismus *C. elegans* fluorimetrisch erfasst werden.

Nach unserem Versuchsprotokoll wird ROS mit Cu(II) induziert es kann eine Dosis-Wirkungsbeziehung nachgewiesen werden. Eine statistisch signifikante Erhöhung der ROS-Konzentration gegenüber der Negativkontrolle zeigt sich ab den mittleren Cu(II)-Konzentrationen des getesteten Dosisbereichs. Gegenüber der Negativkontrolle reduzierte Werte der niedrigen Cu(II)-Konzentrationen verdeutlichen antioxidative Eigenschaften des Kupfers in Übereinstimmung mit Literaturdaten. Die Aufnahme der Referenzsubstanz Kupfer durch die Testorganismen sowie die Verwendbarkeit des Indikators für *C. elegans* werden nachgewiesen.

In Kombination mit Kupfer(II) wurde eine prooxidative Wirkung von Ascorbinsäure beobachtet. Ohne ROS-Induktion mit Kupfer wirkt Ascorbinsäure in der getesteten Konzentration antioxidativ. Im Lipid-Peroxidationstest wird oxidativer Stress für die höheren Ausgangskonzentrationen sowie für die Positivkontrolle Menadion bestätigt. Aus diesen Resultaten als Bewertungsgrundlage lässt sich folgern, dass sich das erarbeitete Biotestsystem als adäquates Verfahren zur Messung von oxidativem

Stress, als Folge exogener Belastung, einsetzen lässt. Damit leistet es einen Beitrag zur Beurteilung des Toxizitätspotentials von Chemikalien und Umweltproben.

Zur Eignung des Einsatzes von *C. elegans* für Toxizitätstest wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Für diese Tests wurden die unterschiedlichen Endpunkte Letalität, Reproduktions- und Wachstumshemmung durch vier verschiedene Chemikalien mit bekannten toxikologischen Eigenschaften herangezogen. Dabei ergibt sich bezogen auf molare Einheiten eine immer gleich bleibende Reihenfolge der Sensitivitäten gegenüber BaP > Cu²⁺ > AcL, ein Ergebnis welches mit Testergebnissen von anderen Versuchsorganismen zu vergleichen war. Vergleiche zwischen den hier gefundenen Untersuchungsergebnissen und solchen aus der Literatur für Tests der akuten Toxizität durch CuCl₂ mit *C. elegans* erbrachten sehr gute Übereinstimmungen. Für die Tests auf Reproduktionshemmung ergaben sich gute Übereinstimmungen neben CuCl₂ auch für AcL, außerdem erhielten wir gleiche Ergebnisse bei den Untersuchungen der Wachstumshemmung. Sensitivitäten anderer Testspezies gegenüber den untersuchten Chemikalien weisen bei Tests auf akute Toxizität oft eine ähnliche, oder gar gleiche Sortierung hin, was die Tauglichkeit der Nematodentests bestätigt.

Die Wirkung von Atrazin auf die Entwicklung von *C. elegans* wurde auch untersucht. Es wurde festgestellt, dass Atrazin auf Wachstum und Reproduktion von *C. elegans* konzentrationsabhängig toxisch wirkt.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen jedoch, dass das Testsystem *C. elegans* hervorragend geeignet ist, um Chemikalienwirkungen frühzeitig sichtbar zu machen.

Literatur

- **Abdul Kader, N. & Côté, M.G. (1996)**
Isolement, identification et caractérisation de souches québécoises du nématode *Caenorhabditis elegans*. *Fund. app. Nemat.* 19, 381–389.
- **Anderson, G.L., Boyd, W.A. & Williams, P.L. (2001)**
Assessment of Sublethal Endpoints for Toxicity Testing with the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 20, No. 4, pp. 833-838.
- **Andrássy, I. (1984)**
A taxonomic review of the suborder Rhabditina. ORSTOM, Paris: 1 - 241.
- **Asplund, K.U., Jansson, P.J., Lindqvist, C. & Nordstrom, T. (2002)**
Measurement of ascorbic acid (vitamin C) induced hydroxyl radical generation in household drinking water. *Free Radic Res.* 36(12), 1271-1276.
- **ASTM (2002)**
American Society of Testing and Materials: Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity Tests with the Nematode *Caenorhabditis elegans*. E 2172-01. In: *Annual Book of ATSM Standards*, 11.05., ASTM International, 100 Bar Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA, 1606-1616.
- **ATSDR (1995)**
Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf>, 07.06.2004.
- **ATSDR (2004)**
Toxicological Profile for Copper. U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.pdf>, 07.06.2004.
- **Baird, S.E. (1999)**
Natural and experimental association of *Caenorhabditis remanei* with *Trachelipus rathkii* and other terrestrial isopods. *Nematology* 1, 471–475.
- **Baird, S.E., Fitch, D.H.A. & Emmons, S.W. (1994)**
Caenorhabditis vulgaris n. sp. (Nematoda: Rhabditidae): A necromenic associate of pill bugs and snails. *Nematologica* 40, 1–11.
- **Barrière, A. & Félix, M.-A. (2005)**
High local genetic diversity and low outcrossing rate in *Caenorhabditis elegans* natural populations. *Current Biology* 15, 1176–1184.
- **Bastian, H.C. (1865)**
Monograph on the Anguillulidae, or free nematods, marine, land, and fresh-water; with descriptions of 100 new species. – *Trans. Linn. Soc. Lond. Wash.* 25: 73-184.

- **Biselli, S. (2001)**
Entwicklung einer analytischen Methode zum Nachweis von ökotoxikologisch relevanten organischen Problemstoffen in Sedimenten und Biota unter besonderer Berücksichtigung von Irgarol, synthetischen Moschusduftstoffen und deren Transformationsprodukten. Dissertation, Universität Hamburg, 2001. <http://www.sub.uni-hamburg.de/opus/volltexte/2001/499/>, 31.10.2005.
- **Blaxter, M.L (1998)**
Caenorhabditis elegans Is a Nematode. Science 282, 2041-2046.
- **Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T., & Thomas, W.K. (1998)**
A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. Nature 392, 71–75.
- **Blaxter, M.L (2003)**
Lebenszyklus von *C. elegans* bei 25°C.
http://nema.cap.ed.ac.uk/Caenorhabditis/C_elegans_genome_Celeganslifecycle.html, 04.03.2003.
- **Blum, J. & Fridovich, I. (1983)**
Superoxide, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity in two free-living nematode species. Arch Biochem Biophys 222(1): 35-43.
- **Boyd, W.A. & Williams, P.L. (2003)**
Comparison of the sensitivity of three nematode species to copper and their utility in aquatic and soil toxicity tests. Environ Toxicol Chem. 22(11), 2768-74.
- **Brenner, S. (1974)**
The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics 77, 71-94.
- **Buettner, G.R. & Jurkiewicz, B.A. (1996a)**
Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. Radiat Res. 145(5), 532-541.
- **Buettner, G.R. & Jurkiewicz, B.A. (1996b)**
Chemistry and Biochemistry of Ascorbic Acid. In: Antioxidants in Health and Disease. Iowa City.
- **Burczynski, M.E. & Penning, T.M. (2000)**
Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. Cancer Res 60(4): 908-15.
- **Butte, W. (2003)**
Elementare statistische Verfahren zur Datenauswertung, Fachbereich Chemie, Universität Oldenburg. http://www.chemie.uni-oldenburg.de/pc/alshamery/pc1/pc1/teaching/grundpraktikum/pdf_files/_statistische_Verf.pdf, 06.10.2003.

- **Candido, E.P.M. & Jones, D. (1996)**
Transgenic *Caenorhabditis elegans* strains as biosensors. Trends in Biotechnology, Vol. 14, pp. 125-129.
- **Carr, A. & Frei, B. (1999)**
Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? Faseb J 13(9): 1007-1024.
- **Caswell-Chen, E. P., Chen, J., Lewis, E.E., Douhan, G.W., Nadler, S.A. & Carey, J.R., Revising the Standard Wisdom of *C. elegans* Natural History**
Ecology of Longevity. *Sci. Aging Knowl. Environ.* 2005 (40), pe30 (2005).
- **Chitwood, B.G. (1933)**
Notes on nematoden systematic and nomenclature. J. Parasit. 19: 242-243.
- **Christensen, M., Estevez, A., Yin, X., Fox, R., Morrison, R., McDonnell, M., Gleason, C., Miller III, D.M. & Strange, K. (2002)**
A Primary Culture System for Functional Analysis of *C. elegans* Neurons and Muscle Cells. Neuron, 33, 503-514.
- **Cressman, C.P. III & Williams, P.L. (1997)**
Reference Toxicants for Toxicity Testing Using *Caenorhabditis elegans* in Aquatic Media. Environmental Toxicology and Risk Assessment: Modeling and Risk Assessment (Sixth Volume), ASTM STP 1317. In: Dwyer, F.J., Doane, T.R. & Hinman, M.L., Eds., American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA, pp. 518-532.
- **Dearfield, K.L., Abernathy, C.O., Ottley, M.S., Brantner, J.H. & Hayes, P.F. (1988)**
Acrylamide: its Metabolism, Developmental and Reproductive Effects, Genotoxicity, and Carcinogenicity. Mutation Research, Vol. 195, pp. 45-77.
- **De Ley, P. & Blaxter, M. (2002)**
Systematic Position and Phylogeny. In: Lee DL, Ed., The biology of Nematodes, Taylor and Francis, London 1-30.
- **Dengg, M. & van Meel, J.C. (2004)**
Caenorhabditis elegans as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds. J. Pharmacol & Toxicol Methods 50(3), 209-214.
- **Deppe, U., Schierenberg, E., Cole, T., Krieg, C., Schmitt, D., Yoder, B. & von Ehrenstein, G. (1978):**
Cell Lineages of the Embryo of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 75 (1), 376-380.
- **Deutsche Forschungsgemeinschaft (1991)**
Statistische Beurteilung von Analysenverfahren und Analyseergebnissen. In: Rückstands-analytik von Pflanzenschutzmitteln. Band I, Verlag Chemie.

- **Dhawan, R., Dusenbery, D.B. & Williams, P.L. (1999)**
Comparison of Lethality, Reproduction, and Behavior as Toxicological Endpoint in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. J. Toxicology & Environmental Health, Part A, 58, 451-462.
- **Dhawan, R., Dusenbery, D.B. & Williams, P.L. (2000)**
A comparison of metal-induced lethality and behavioral responses in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Environ Toxicol Chem 19(12), 3061-3067.
- **Dierickx, P.J. (2002)**
Formation of reactive oxygen species in rat hepatoma-derived Fa32 cells to predict human toxicity. Toxicol In Vitro 16(6): 725-730.
- **DIN 32645 (1995)**
Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung. Beuth Verlag, Berlin.
- **Donkin, S.G. & Dusenbery, D.B. (1993)**
A Soil Toxicity Test Using the Nematode *Caenorhabditis elegans* and an Effective Method of Recovery. Archives of Environmental Contamination and Toxicity, Vol. 25, pp. 145-151.
- **Donkin, S.G. & Williams, P.L. (1995)**
Influence of Developmental Stage, Salts, and Food Presence On Various End Points Using *Caenorhabditis elegans* for Aquatic Toxicity Testing. Environmental Toxicology and Chemistry 14(12), 2139-2147.
- **Dougherty, E. C. & Calhoun, H.G. (1948)**
Possible significance of free-living nematodes in genetic research. Nature 161, 29.
- **Dougherty, E.C. & Nigon, V. (1949)**
A new species of the free-living nematode genus *Rhabditis* of interest in comparative physiology and genetics. J. Parasitol 35,11.
- **Duft, M., Tillmann, M. & Oehlmann, J. (2002)**
Ökotoxikologische Sedimentkartierung der großen Flüsse Deutschlands. Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Forschungsbericht 299 24 275.
<http://www.umweltbundesamt.org/fpdf-k/2290.pdf>, 26.11.2003.
- **Dybing, E. & Sanner, T. (2003)**
FORUM Risk Assessment of Acrylamide in Foods. Toxicological Sciences Vol. 75, pp. 7-15.
- **ECB ESIS. (2000)**
European chemical Substances Information System.
<http://ecb.jrc.it/esis>, 19.02.2000.
- **Easton, A., Guven, K. & de Pomerai, D.I. (2001)**
Toxicity of the dithiocarbamate fungicide mancozeb to the nontarget soil nematode, *Caenorhabditis elegans*. J.Biochem Mol Toxicol 15(1), 15-25.

- **Emmendorffer, A., Hecht, M., Lohmann-Matthes, M.L. & Roesler, J. (1990)**
A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J Immunol Methods* 131(2): 269-75.
- **Erdelmeier, I., Gerard-Monnier, D., Yadan, J. & Chaudiere, J. (1998)**
Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 11(10): 1184-1194.
- **Eurachem (1998)**
The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Teddington, Eurachem working group (Hrsg.).
- **European Commission Joint Research Centre (2002)**
Acrylamide Summary Risk Assessment Report 2002.
Institute for Health and Consumer Protection, Special Publication I.01.70.
http://ecb.jrc.it/Documents/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/SUMMARY/acrylamidesum011.pdf, 25.11.2002.
- **Fay, D.S. (2005)**
The Cell Cycle and Development: Lessons from *C. elegans*. *Seminars in Cell & Development Biology* 16, 397-406.
- **Fent, K. (1997)**
Ökotoxikologie: Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- **Finney, D.J. (1977)**
Probit Analysis. Reprint der dritten Ausgabe. Cambridge University Press, London, England.
- **Fitch, D.H.A. & Thomas, W.K. (1997)**
Evolution. In *C. elegans* II, D.L. Riddle, T. Blumenthal, B.J. Meyer, & J.R. Priess, eds. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 815–850.
- **Freeman, M.N., Marse, T.J. & Williams, P.L. (1998)**
Establishment of Quality Assurance Procedures for Aquatic Toxicity Testing with the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Seventh Volume, ASTM STP 1333*. In: Little EE, DeLonay, A.J. & Greenbreg, B.M., Eds., American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA, pp. 45-59.
- **Fuchs, G. (1938)**
Neue Parasiten und Halbparasiten bei Borkenkäfern und einige andere Nematoden. I. Teil. *Zool. Jb. Syst.* 70: 291-380.
- **Fukino, H., Hirai, M., Hsueh, Y.M., Moriyasu, S. & Yamane, Y. (1986)**
Mechanism of protection by zinc against mercuric chloride toxicity in rats: effects of zinc and mercury on glutathione metabolism. *J Toxicol Environ Health* 19(1): 75-89.

- **Gaetke, L.M. & Chow, C.K. (2003)**
Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189(1-2): 147-163.
- **Gao, F., Yi, J., Shi, G.Y., Li, H., Shi, X.G. & Tang, X.M. (2002)**
The sensitivity of digestive tract tumor cells to As₂O₃ is associated with the inherent cellular level of reactive oxygen species. *World J.Gastroenterol* 8(1), 36-39.
- **Götz, C. (2006)**
Etablierung und Bewertung von Biotests zur akuten Toxizität, Reproduktions- und Wachstumstoxizität mit dem Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*. Diplomarbeit des Fachbereiches VI der Universität Trier
- **Griem, P., Hassauer, M., Kalberlah, F., Oltmanns, J., Scheibner, J., Schneider, K. & Schumacher-Wolz, U. (2002)**
Quantitative Unterschiede im Fremdstoffmetabolismus zwischen Versuchstier und Mensch. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. Dortmund, Berlin, Dresden.
- **Hasegawa, K., Miwa, S., Tsutsumiuchi, K., Taniguchi, H. & Miwa J (2004)**
Extremely low Dose of Acrylamide Decreases Lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology letters*, Vol. 152, Issue 2, pp. 183-189.
- **Health Council of the Netherlands (2004)**
Ethyl methanesulphonate; Evaluation of the Effects on Reproduction, Recommendation for Classification. The Hague: Health Council of the Netherlands, Committee for Compounds Toxic to Reproduction, publication no. 2004/08OSH. <http://www.gr.nl/pdf.php?ID=1074>, 30.09.2004.
- **Hempel, S.L., Buettner, G.R., O'Malley, Y.Q., Wessels, D.A. & Flaherty, D.M. (1999)**
Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 27(1-2): 146-159.
- **Hirschmann, H. (1952)**
Die Nematoden der Wassergrenze mittelfränkischer Gewässer. *Zool. Jb. Syst.* 81, 313-407.
- **Hitchcock, D.R., Black, M.C. & Williams, P.L. (1997)**
Investigations into Using the Nematode *Caenorhabditis elegans* for Municipal and Industrial Wastewater Toxicity Testing. *Archives of Environmental Contamination and Toxicity*, Vol. 33, pp. 252-260.
- **Hitchcock, D.R., Law, S.E., Wu, J. & Williams, P.L. (1998)**
Determining Toxicity Trends in the Ozonation of Synthetic Dye Wastewaters Using the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicity*, 34, 259-264.

- **Höss, S., Haitzer, M., Traunspurger, W., Gratzner, H., Ahlf, W. & Steinberg, C. (1997)**
Influence of Particle Size Distribution and Content of Organic Matter on the Toxicity of Copper in Sediment Bioassays Using *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). *Water, Air, and Soil Pollution*, Vol. 99, pp. 689-695.
- **Höss, S., Haitzer, M., Traunspurger, W. & Steinberg, C. (1999)**
Growth and Fertility of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) in Unpolluted Freshwater Sediments: Response to Particle Size Distribution and Organic Contents. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 18, No. 12, pp. 2921-2925.
- **Hund-Rinke, K., Kördel, W., Heiden, S. & Erb, R. (2002)**
Ökotoxikologische Testbatterien. Deutsche Bundesstiftung Umwelt, Erich Schmidt Verlag.
- **Hupfeld, M. (2002)**
Schematische Darstellung eines *C. elegans*-Männchen.
<http://www.zum.de/Faecher/Materialien/hupfeld/index.htm?/Faecher/Materialien/hupfeld/Entwicklung/C-elegans/C-elegans-als-tier.html>, 09.11.2006.
- **Irwin et al. (1997)**
Environmental Contaminants Encyclopedia Benzo [A] Pyrene (BaP) Entry.
<http://www.nature.nps.gov/hazardssafety/toxic//benzoapy.pdf>, February 1998.
- **Jones, D., Stringham, E.G., Babich, S.L. & Candido, E.P. (1996)**
Transgenic strains of the nematode *C. elegans* in biomonitoring and toxicology: effects of captan and related compounds on the stress response. *Toxicology* 109(2-3): 119-127.
- **Jonker, M.J. (2003)**
Joint toxic effects on *Caenorhabditis elegans* on the analysis and interpretation of mixture toxicity data. Thesis, Wageningen University and Research Centre.
- **Kehrer, J.P. (2000)**
The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149(1): 43-50.
- **Khan, I.A. & Thomas, P. (2004)**
Vitamin E co-treatment reduces Aroclor 1254-induced impairment of reproductive neuroendocrine function in Atlantic croaker. *Mar Environ Res* 58(2-5): 333-336.
- **Khanna, N., Cressman III, C.P., Tatara, C.P. & Williams, P.L. (1997)**
Tolerance of *Caenorhabditis elegans* to pH, Salinity and Hardness in Aquatic Media. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 32, 110-114.
- **Kim, S.H., Ichikawa, K., Koshiishi, I. & Utsumi, H. (2002)**
Development of rapid in vitro assay for oxidative liver injury and its application to 230 chemicals. *Water Sci Technol* 46(11-12): 337-341.

- **Kiontke, K., Gavin, N.P., Raynes, Y., Roehrig, C., Piano, F. & Fitch, D.H.A. (2004)**
Caenorhabditis phylogeny predicts convergence of hermaphroditism and extensive intron loss. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 9003–9008.
- **Kisiel, M., Nelson, B. & Zucherman, B.M. (1969)**
Influence of a growth factor from bacteria on the morphology of *Caenorhabditis briggsae*. – Nematologica 15,153- 154.
- **Klotz, L.O., Kröncke, K.D., Buchczyk, D.P. & Sies, H. (2003)**
Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. Supplement: 11th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals.
- **Koller, G., Hungerbühler, K. & Fent, K. (2000)**
Data Ranges in Aquatic Toxicity of Chemicals. ESPR – Environmental Science and Pollution Research International, Vol. 7, No. 3, pp. 135-143.
- **Krieger, G. (2000)**
Zyto- und genotoxische Wirkung durch Redoxreaktionen aromatischer Carbonylverbindungen mit Cu(II) in Zellkultur und und PM2 DNA. Dissertation: Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften, Universität Oldenburg.
- **Kromidas, S., Klinkner, R. & Mertens, R. (1995)**
Methodenvalidierung im analytischen Labor. Nachr. Chem. Tech. Lab 43(6): 669-676.
- **Krüger, J. (2001)**
Skript zum Messpraktikum Biostatistik. Universität Trier.
- **Leonard, S.S., Harris, G.K. & Shi, X. (2004)**
Metal-induced oxidative stress and signal transduction. Free Radic Biol Med 37(12): 1921-1942.
- **Lewis, J.A. & Fleming, J.T. (1995)**
Basic Culture Methods. Methods in Cell Biology 48, 3-29.
- **Lichter, J. (2005):**
Caenorhabditis elegans als ökotoxikologischer Modellorganismus- Etablierung eines Testsystems zur fluorimetrischen Detektion der umweltchemikalienbedingten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) am Beispiel von Kupfer. Diplomarbeit des Fachbereiches VI der Universität Trier
- **Lin, P.H. & Nakamura, J. (2001)**
Oxidative damage and direct adducts in calf thymus DNA induced by the pentachlorophenol metabolites, tetrachlorohydroquinone and tetrachloro-1,4-benzoquinone. Carcinogenesis 22(4): 627-34.
- **Liu, J., Yeo, H.C., Overvik-Douki, E. & Hagen, T. (2000)**
Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. J Appl Physiol 89(1): 21-28.

- **Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A. & Hermes-Lima, M. (2001)**
Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280(1): R100-107.
- **Madle, S., Broschinski, L., Mosbach-Schulz, O., Schöning, G. & Schulte, A. (2003)**
Zur aktuellen Risikobewertung von Acrylamid in Lebensmitteln. *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz*, Vol. 46, pp. 405-415.
- **Maher, B. (2009)**
Biology's next top model. *Nature* 458, 695-698.
- **Marchand, A., Barouki, R. & Garlatti, M. (2004)**
Regulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression by CYP1A1 activity. *Mol Pharmacol* 65(4): 1029-1037.
- **Marquardt, H. & Schäfer, S.G. (2004)**
Lehrbuch der Toxikologie. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- **Mattie, M.D. & Freedman, J.H. (2004)**
Copper-inducible transcription: regulation by metal- and oxidative stress-responsive pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 286(2): C293-301.
- **Maupas, E. (1899)**
La mue et l'enkystement chez les nématodes. *Arch. Zool. Exp. Gen.* 7, 563-628.
- **Maupas, E. (1900)**
Modes et formes de reproduction des Nématodes. *Arch, Zool. Exp, Gén.* 8, 463-624.
- **Mateos, R., Goya, L. & Bravo, L. (2004)**
Determination of malondialdehyde by liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative: a marker for oxidative stress in cell cultures of human hepatoma HepG2. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 805(1): 33-39.
- **Mengert, H. (1953):**
Nematoden und Schnecken. *Z. Morph. u. Ökol. Tiere* 41, 311–349.
- **Menzel, R., Bogaert, T. & Achazi, R. (2001)**
A systematic gene expression screen of *Caenorhabditis elegans* cytochrome P450 genes reveals CYP35 as strongly xenobiotic inducible. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 395(2),158-68
- **Menzel, R., Rodel, M., Kulas, J. & Steinberg, C.E. (2005)**
CYP35: Xenobiotically induced gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Arch Biochem Biophys.* 438(1),93-102. Epub 2005 Apr 9.

- **Micoletzki, H. (1922)**
Die freilebenden Erd-Nematoden mit besonderer Berücksichtigung der Steiermark und der Bukowina, zugleich mit einer Revision sämtlicher nicht mariner, freilebende Nematoden in Form von Genus-Beschreibungen und Bestimmungsschlüssel, - Arch. Natug. (1921) A 87(8-9): 1-650.
- **Moran, J.L., Siegel, D. & Ross, D. (1999)**
A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 96(14): 8150-8155.
- **Narayanan, P.K., Carter, W.O., Ganey, P.E., Roth, R.A., Voytik-Harbin, S.L. & Robinso, J.P. (1998)**
Impairment of human neutrophil oxidative burst by polychlorinated biphenyls: inhibition of superoxide dismutase activity. J Leukoc Biol 63(2): 216-224.
- **Nelson, D.R. (1998)**
Metazoan cytochrome P450 evolution. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 121(1-3), 15-22.
- **Nigon, V. (1949)**
Les modalités de la reproduction et le déterminisme du sexe chez quelques nematodes libres. Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim. 11, 1-132.
- **Nigon, V. & Dougherty, E. C. (1950)**
A morphological mutant of *Rhabditis briggsae*, a free-living soil nematode. – J. Hered. (Wash) 41, 103-109.
- **O'Connor, J.E., Vargas, J.L., Kimler, B.F., Hernandez-Yago, J. & Grisolia, S. (1988)**
Use of rhodamine 123 to investigate alterations in mitochondrial activity in isolated mouse liver mitochondria. Biochem Biophys Res Commun 151(1): 568-573.
- **OECD Guideline for Testing of Chemicals (1983)**
One-Generation Reproduction Toxicity Study, No. 415.
- **OECD Guideline for Testing of Chemicals (1984)**
Daphnia sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test, No. 202; Part I: 24 h EC50 Acute Immobilisation Test; Part II: Reproduction Test at least 14 days.
- **OECD Guideline for Testing of Chemicals (1984)**
Earthworm, Acute Toxicity Tests, No. 207.
- **OECD Guideline for Testing of Chemicals (1987)**
Acute Dermal Toxicity, No. 402.
- **OECD Guideline for Testing of Chemicals (1987)**
Acute Oral Toxicity, No. 401.

-
- **OECD Guideline for Testing of Chemicals (1988)**
One-Generation Reproduction Toxicity Test, B.34.
 - **OECD Guideline for Testing of Chemicals (1988)**
Toxicity for Earthworms – Artificial Soil Test, C.8.
 - **OECD Guideline for Testing of Chemicals (1992)**
Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Method, No. 420.
 - **OECD Guideline for Testing of Chemicals (1992)**
Acute Toxicity (Dermal), B.3.
 - **OECD Guideline for Testing of Chemicals (1992)**
Acute Toxicity for Daphnia, C.2.
 - **OECD Guideline for Testing of Chemicals (1992)**
Acute Toxicity for Fish, C.1.
 - **OECD Guideline for Testing of Chemicals (1992)**
Fish, Acute Toxicity Test, No. 203.
 - **OECD Guideline for Testing of Chemicals (1992)**
Fish, Early-life Stage Toxicity Test, No. 210.
 - **OECD Guideline for Testing of Chemicals (1995)**
Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, No. 421.
 - **OECD Guideline for Testing of Chemicals (1996)**
Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, No. 423.
 - **OECD Guideline for Testing of Chemicals (1998)**
Daphnia magna Reproduction Test, No. 211.
 - **OECD Guideline for Testing of Chemicals (2000)**
Fish Juvenile Growth Test, No. 215.
 - **OECD Guideline for Testing of Chemicals (2001)**
Daphnia magna Reproduction Test, C.20.
 - **OECD Guideline for Testing of Chemicals (2001)**
Fish Juvenile Growth Test, C.14.
 - **Osche, G. (1952)**
Systematik und Phylogenie der Gattung Rhabditis (Nematoda). Zool. Jahrb. Abt. Allg. Zool. Physiol. Tiere 81, 190-280.

- **Paulus, M. (1998)**
Bewertungsgrundlagen für das rückstandsorientierte Biomonitoring in der Bundesrepublik Deutschland. Habilitationsschrift: Fachbereich VI: Geographie/ Geowissenschaften, Universität Trier.
- **Peredney, C.L. & Williams, P.L. (2000):**
Utility of *Caenorhabditis elegans* for assessing heavy metal contamination in artificial soil. Arch Environ Contam Toxicol 39(1), 113-118.
- **Peredney, C.L. (2004)**
Nematode Bioassay Protocol for Soil Toxicity Screening. Washington State Department of Ecology, Publication No. 04-09-044.
- **Powell-Coffman, J.A., Bradfield, C.A. & Wood, W.B. (1998):**
Caenorhabditis elegans orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 2844-2849.
- **Puntarulo, S. & Cederbaum, A.I. (1998)**
Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. Free Radic Biol Med 24(7-8): 1324-1330.
- **Reineke, N. (2003)**
Biotestgeleitete Analytik von ökotoxikologisch relevanten organischen Substanzen in Sedimentextrakten von Nord- und Ostsee. Dissertation: Fachbereich Chemie, Universität Hamburg.
<http://www.sub.uni-hamburg.de/opus/volltexte/2004/1155/>, 04.02.2005.
- **Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B. & Priess, J.R., Eds. (1997)**
Caenorhabditis elegans II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 815-850.
- **Riepert, F. (1998)**
Ökotoxikologische Testverfahren für die Prüfung der Bodenqualität am Beispiel aktueller Richtlinien mit Organismen der Bodenfauna. Bodenökologie und Bodengenese, Heft 26 Februar 1998, Tagungsband Mobilität und Wirkung von Schadstoffen in urbanen Böden.
- **Royall, J.A. & Ischiropoulos, H. (1993)**
Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. Arch Biochem Biophys 302(2): 348-355.
- **Rühm, W. (1956):**
Die nematoden der Ipiden. – Parasitol. Schr. 6, 1- 437.
- **Sachs, L. (2004)**
Angewandte Statistik, Springer-Verlag, Berlin.

- **Schierenberg, E. & Cassada R. (1986)**
Der Nematode *Caenorhabditis elegans* – ein entwicklungsbiologischer Modellorganismus. *Biologie in unserer Zeit*, 16. Jahrg, 1, 1-7.
- **Schierenberg, E. (1987)**
Vom Ei zum Organismus – Die Embryonalentwicklung des Nematoden *Caenorhabditis elegans*. *Biologie in unserer Zeit*, 17. Jahrgang, 4, 97-106.
- **Schierenberg, E. (1997)**
Spezifikation des Zellschicksals im frühen Embryo von *Caenorhabditis elegans*. *Naturwissenschaften* 84, 55-64.
- **Schneider, A. (1866)**
Monographie der Nematode. Berlin. pp. 375.
- **Sierts-Herrmann, A. (2003)**
Nachweis von oxidativem Stress in der permanenten Zelllinie Epithelioma papulosum cyprini (EPC) im Zuge der Biotestdirigierten Fraktionierung mariner Sedimentextrakte. Dissertation: Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg.
- **Sitabhra, S. (2004)**
Darstellung der Anatomie eines hermaphroditischen *C. elegans*
<http://www.imsc.res.in/~sitabhra/research/neural/celegans/>, 2004.
- **Sommer, R.J. (2000)**
Caenorhabditis elegans: Ein Wurm für alle Fälle. Publikationen – MPI für Entwicklungsbiologie Tübingen.
http://www.eb.tuebingen.mpg.de/deutsch/pop_wiss_pub/rs_2000.html,
22.11.2005.
- **Sommer, R.J. (2001)**
Towards a microevolutionary approach in evolutionary developmental biology: Biogeography of the nematode genus *Pristionchus* (Diplogastridae). *Zoology-Analysis of Complex Systems* 103, 91-98.
- **Sparks, T. E. (2000)**
Statistics in ecotoxicology. John Wiley and Sons Ltd., Chichester.
- **Srinivasan, A., Lehmler, H.J., Robertson, L.W. & Ludewig, G. (2001)**
Production of DNA strand breaks in vitro and reactive oxygen species in vitro and in HL-60 cells by PCB metabolites. *Toxicol Sci* 60(1): 92-102.
- **STARS 4.0**
Stoffdatenbank für bodenschutz-/umweltrelevante Stoffe. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (Umweltbundesamt), Bundesministerium für Verkehr, Bau- und Wohnungswesen (Oberfinanzdirektion Hannover Landesbauabteilung), Stoller Ingenieurtechnik GmbH Dresden.

- **Strayer, A., Wu, Z., Christen, Y., Link, C.D. & Luo, Y. (2003)**
Expression of the small heat-shock protein Hsp16-2 in *Caenorhabditis elegans* is suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761. *Faseb J* 17(15): 2305-2307.
- **Stringham, E.G. & Candido, E.P.M. (1993)**
Transgenic hsp16-lacZ strains of the soil Nematode *Caenorhabditis elegans* as biological monitors of environmental stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 13, pp. 1211-1220.
- **Sudhaus, W. & Kiontke, K. (1996)**
Phylogeny of Rhabditis subgenus *Caenorhabditis* (Rhabditidae, Nematoda). *J. Zoo. Syst. Evol. Research* 34, 217–233.
- **Sudhaus, W. (1976b)**
Vergleichende Untersuchungen zur Phylogenie, Systematik, Ökologie, Biologie und Ethologie der Rhabditidae (Nematoda). *Zoologica (Stuttgart)* 43, 1-229.
- **Sudhaus, W. & Kühne, R. (1989)**
Nematodes associated with Psychodidae: description of *Rhabditis berolina* sp. n. and redescription of *R. dubia* Bovien, 1937 (Nematoda: Rhabditidae), with biological and ecological notes, and a phylogenetic discussion. *Nematologica* 35, 305-320.
- **Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G. & Thomson, J.N. (1983)**
The Embryonic Cell Lineage of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 100, 64-119.
- **Swain, S.C., Keusekotten, K., Baumeister, R. & Sturzenbaum, S.R. (2004)**
C. elegans metallothioneins: new insights into the phenotypic effects of cadmium toxicosis. *J Mol Biol* 341(4): 951-959.
- **Tabatabaie, T. & Floyd, R.A. (1996)**
Inactivation of glutathione peroxidase by benzaldehyde. *Toxicol Appl Pharmacol* 141(2): 389-93.
- **Tatara CP, Newman MC, McCloskey JT und Williams PL (1997)**
Predicting Relative Metal Toxicity with Ion Characteristics: *Caenorhabditis elegans* LC50. *Aquatic Toxicology*, Vol. 39, pp. 279-290.
- **Taub, J., Lau, J.F., Ma, C., Hahn, J.H., Hoque, R., Rothblatt, J. & Chalfie, M. (1999)**
A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in *C. elegans* daf-C and clk-1 mutants. *Nature* 399(6732): 162-166.

- **The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998)**
Genome sequence of the nematode *Caenorhabditis elegans*. A platform for investigating biology. *Science* 282, 2012-2018
- **Theophanides, T. & Anastassopoulou, J. (2002)**
Copper and carcinogenesis. *Critical Review to Oncology Hematology* 42(2002) 57-64.
- **The Physical and Theoretical Chemistry Laboratory Oxford University (2005)**
Chemical and Other Safety Information.
<http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/AC/acrylamide.html>,
[http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/BE/benzo\(a\)pyrene.html](http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/BE/benzo(a)pyrene.html),
http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/CO/copper_II_chloride.html,
http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/ET/ethyl_methanesulfonate.html, 15.12.2005.
- **Thomas, J. H. (1994)**
The Mind of a Worm. *Science*. 264(5166), 1698-1699.
- **Traunspurger, W., Steinberg, C. & Bongers, T. (1995)**
Nematoden in der ökotoxikologischen Forschung – Plädoyer für eine vernachlässigte, jedoch sehr aussagekräftige Tiergruppe. *UWSF (Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung) – Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie*, Vol. 7, No. 2, pp. 74-83.
- **Traunspurger, W., Haitzer, M., Höss, S., Beier, S., Ahlf, W. & Steinberg, C. (1997a)**
Ecotoxicological Assessment of Aquatic Sediments with *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) – A Method for Testing Liquid Medium and Whole-Sediment Samples. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol 16, No. 2, pp. 245-250.
- **Toxnet (2005)**
Toxicity data. <http://toxnet.nlm.nih.gov>, 29.11.2005.
- **Ura, K., Kai, T., Sakata, S., Iguchi, T. & Arizono, K. (2002)**
Aquatic Acute Toxicity Testing Using the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Health Science* 48(6), 583-586.
- **U.S. EPA iris (2005)**
Integrated Risk Information System. <http://www.epa.gov/iris/subst/0286.htm>, 12.08.2005.
- **U.S. NLM NIH (2004)**
U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health
<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=DBMaint&actionHandle=default&nextPage=jsp/chemidlite/ResultScreen.jsp&TXTSUPERLISTID=007440508>,
<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=DBMaint&actionHandle=default&nextPage=jsp/chemidlite/ResultScreen.jsp&TXTSUPERLISTID=000062500>, 09.09.2004.

- **Völk, J. (1950)**
Die Nematoden der Regenwürmer und aasbesuchenden Käfer.– Zoo. Jb. Syst. 79, 1-70
- **Westerheide, W. & Rieger, R. (1996)**
Spezielle Zoologie, Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- **White, J. (1988)**
The Anatomy. In: Wood WB, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 81-122.
- **Williams, P.L., Anderson, G. L., Johnstone, J. L., Nunn, A. D., Tweedle, M. F., & Wedeking, P. (2000)**
Caenorhabditis elegans as an alternative animal species. J Toxicol Environ Health A 61(8), 641-7.
- **Williams, P.L. & Dusenbery, D.B. (1988)**
Using *Caenorhabditis elegans* to Predict Mammalian Acute Lethality to Metallic Salts. Toxicology and Industrial Health, 4(4), 469-478.
- **Williams, P.L. & Dusenbery, D.B. (1990)**
Aquatic Toxicity Testing Using the Nematode, *Caenorhabditis elegans*. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 9, pp. 1285-1290.
- **Winston, G.W., Moore, M.N., Kirchin, M.A. & Soverchia, C. (1996)**
Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: lysosomal localization and effect of xenobiotics. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 113(2): 221-229.
- **Wood, W.B. (1988)**
The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Monograph 17, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- **Wrona, M. & Patel, K. (2005)**
Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. Free Radic Biol Med 38(2): 262-270.
- **Yang, H., Lee S-H., Jin, Y., Choi J-H., Han, C-H. & Lee M-H (2005)**
Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats. Journal of Veterinary Science (2005), 6(2), 103-109.
- **Yardley-Jones, A., Anderson, D. & Parke, D.V. (1991)**
The toxicity of benzene and its metabolism and molecular pathology in human risk assessment. Br J Ind Med 48(7): 437-444.
- **Yarwood, E.A. & Hansen, E. L. (1969)**
Dauerlarvae of *Caenorhabditis briggsae* in axenic cultur. – J.Nematology. 1, 184-189

- http://www.all-science-fair-projects.com/science_fair_projects_encyclopedia/Caenorhabditis_elegans
September/Oktober 2004

Anhang

Anhang I: Rohdaten der Kupfer(II)-Verdünnungsreihe

I-1 Einzelexperimente

1. Experiment									
		Fluoreszenz			MW	SD	CV	Anzahl Testorganismen	Intensität pro 1000 Testorganismen
Inkubation 8h, 20°C	H2O	36	40	39	38,3	2,08	0,054		
	H2O + C. e.	37	41	41	39,7	2,31	0,058	400	99,17
	H2O+C.e.+B	39	48	50	45,7	5,86	0,128	450	101,48
	DHR123 + 0 Cu	321	323	353	332,3	17,93	0,054	710	468,08
	0,001	298	278	298	291,3	11,55	0,040	720	404,63
	0,005	294	264	267	275,0	16,52	0,060	760	361,84
	0,01	296	291	290	292,3	3,21	0,011	653,3	447,47
	0,05	336	341	332	336,3	4,51	0,013	520	646,79
	0,1	404	404	388	398,7	9,24	0,023	506,3	787,41
	0,5	656	682	674	670,7	13,32	0,020	720	931,48
	1	719	728	703	716,7	12,66	0,018	693	1034,15
	MD 0,1 mmol/l	404	397	519	440,0	68,51	0,156	413,3	1064,60

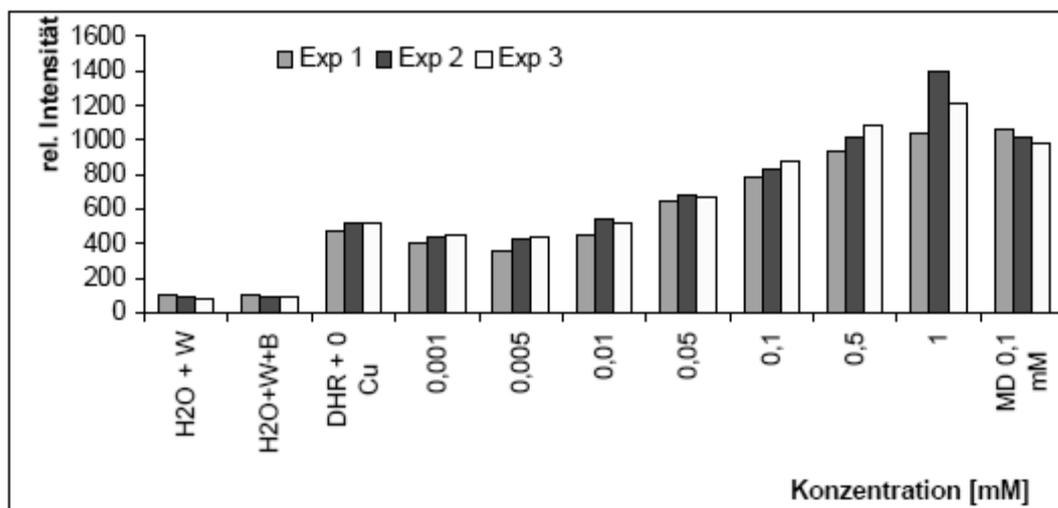
2. Experiment									
		Fluoreszenz			MW	SD	CV	Anzahl Testorganismen	Intensität pro 1000 Testorganismen
Inkubation 8h, 20°C	H2O	36	38	38	37,3	1,15	0,031		
	H2O + C. e.	40	41	41	40,7	0,58	0,014	453,3	89,71
	H2O+C.e.+B	45	47	48	46,7	1,53	0,033	493,3	94,60
	DHR123 + 0 Cu	369	387	380	378,7	9,07	0,024	735	515,19
	0,001	292	282	288	287,3	5,03	0,018	653,3	439,82
	0,005	329	331	323	327,7	4,16	0,013	760	431,14
	0,01	358	334	329	340,3	15,50	0,046	626,6	543,14
	0,05	280	414	369	354,3	68,19	0,192	520	681,41
	0,1	593	574	534	567,0	30,12	0,053	680	833,82
	0,5	726	780	726	744,0	31,18	0,042	733,3	1014,59
	1	1084	1080	1078	1080,7	3,06	0,003	773,3	1397,47
	MD 0,1 mmol/l	397	385	400	394,0	7,94	0,020	386,6	1019,14

3. Experiment									
		Fluoreszenz			MW	SD	CV	Anzahl Testorganismen	Intensität pro 1000 Testorganismen
Inkubation 8h, 20°C	H2O	35	38	40	37,7	2,52	0,067		
	H2O + C. e.	38	42	41	40,3	2,08	0,052	493,3	81,76
	H2O+C.e.+B	42	44	45	43,7	1,53	0,035	450	97,04
	DHR123 + 0 Cu	289	297	295	293,7	4,16	0,014	560	524,40
	0,001	298	287	307	297,3	10,02	0,034	653,3	455,13
	0,005	230	241	237	236,0	5,57	0,024	533,3	442,53
	0,01	300	303	297	300,0	3,00	0,010	573,3	523,29
	0,05	360	378	351	363,0	13,75	0,038	546,6	664,11
	0,1	494	540	470	501,3	35,57	0,071	573,3	874,47
	0,5	625	572	540	579,0	42,93	0,074	533,3	1085,69
	1	579	596	577	584,0	10,44	0,018	480	1216,67
	MD 0,1 mmol/l	370	385	342	365,7	21,83	0,060	373,3	979,55

I-2 Zusammenstellung der Einzelergebnisse nach Subtraktion des Blindwerts

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	MW	SD	CV [%]
0	366,60	420,59	427,36	404,85	33,303	8,226
0,001	303,15	345,22	358,09	335,48	28,732	8,564
0,005	260,36	336,54	345,49	314,13	46,779	14,892
0,01	345,99	448,54	426,25	406,93	53,936	13,254
0,05	545,31	586,81	567,07	566,40	20,756	3,665
0,1	685,93	739,22	777,43	734,19	45,956	6,259
0,5	830,00	919,99	988,65	912,88	79,564	8,716
1	*	1302,87	1119,63	1211,25	129,575	10,698
MD	963,12	924,54	882,51	923,39	40,317	4,366

I-3 Graphische Darstellung der Einzelergebnisse



I-4 Berechnung der Prüfwerte (F-Test)

0 = Leerprobe; 1 = 0,001; 2 = 0,005; 3 = 0,01; 4 = 0,05; 5 = 0,1; 6 = 0,5; 7 = 1

Quotient aus Varianz	Prüfgröße		F-Verteilung für FG(2,2)	
0+1	1,34	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
2+0	1,97	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
3+0	2,62	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
0-4	2,57	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
5+0	1,90	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
6+0	5,71	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
7+0	15,14	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
2+1	2,65	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
3+1	3,52	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
1+4	1,92	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
5+1	2,56	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
6+1	7,67	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
7+1	20,34	<	39	für FG (2,2) $\alpha = 0,025$

3+2	1,33	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
2+4	5,08	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
2+5	1,04	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
6+2	2,89	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
7+2	7,67	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
3+4	6,75	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
3+5	1,38	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
6+3	2,18	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
7+3	5,77	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
5+4	4,90	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
6+4	14,69	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
7+4	38,97	<	39	für FG (2,2) $\alpha = 0,025$
6+5	3,00	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
7+5	7,95	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$
7+6	2,65	<	19	für FG (2,2) $\alpha = 0,05$

I-5 Berechnung der Verfahrenskennwerte

Misswerte:

Ausgangskonzentration in mmol/l	Rel. FI MW	SD	CV [%]
0	404,85	33,303	8,226
0,001	335,48	28,732	8,564
0,005	314,13	46,779	14,892
0,01*	406,93	53,936	13,254
0,05	566,40	20,756	3,665
0,1	734,19	45,956	6,259
0,5	912,88	79,564	8,716
1	1211,25	129,575	10,698
MD 0,1	923,39	40,317	4,366

FI = Fluoreszenzintensität

* = als Ausreißer erkannt und nicht in die Berechnung der linearen Regression einbezogen

Kalibrierfunktion:

$$y = 852,92 x + 400,59$$

Berechnung Richtigkeit:

$$x_1 = 1211,25 \text{ rel. FI}$$

$$x_1 = 1211,25 - 400,59 / 857,92 = 0,95$$

$$x_0 = 404,85 \text{ rel. FI}$$

$$x_0 = 404,85 - 400,59 / 857,92 = 4,96 \cdot 10^{-3}$$

$$\text{WFR}\% = x_1 - x_0 / \Delta x \cdot 100 \%$$

$$\text{WFR}\% = 0,95 - 4,96 \cdot 10^{-3} / 1 \cdot 100\%$$

Berechnung der Reststandardabweichung:

sie beschreibt die Präzision der linearen Regression und ist Maß für die Streuung der Messwerte y_i in y-Richtung um die Regressionsgerade

$$s_{y..x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (a_1 \cdot x_i + a_0)]^2}{n-1}}$$

$$\begin{aligned} & 335,38 - (857,92 \cdot 0,001 + 400,59)^2 + \\ & 314,13 - (857,92 \cdot 0,005 + 400,59)^2 + \\ & 406,93 - (857,92 \cdot 0,01 + 400,59)^2 + \\ & 566,40 - (857,92 \cdot 0,05 + 400,59)^2 + \\ & 912,88 - (857,92 \cdot 0,5 + 400,59)^2 + \\ & 1211,25 - (857,92 \cdot 1 + 400,59)^2 = 36874 \\ & \text{bei } n = 3 \text{ ergibt sich } s_{y..x} = 135,7 \end{aligned}$$

Berechnung der Nachweisgrenze:

$$y_{krit} = a_0 + t_{f,\alpha} \cdot s_{y..x} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{x_g^2}{Q}}$$

$$y_{krit} = 400,59 + 2,3 \cdot 135,7 \sqrt{\frac{1}{7} + \frac{0,056}{1,85}}$$

$$y_{krit} = 528,55$$

$$NG = \frac{528,55 - 400,59}{857,92} = 0,149 \text{ mmol/l}$$

Anhang II: Rohdaten des Lipidperoxidations-Assays

II-1 Rohdaten der Kalibrierung

Standard	Messwert			MW	SD
0	0,039	0,038	0,044	0,040	0,0032
0,5	0,078	0,078	0,079	0,078	0,0006
1	0,117	0,116	0,116	0,116	0,0006
2	0,19	0,187	0,184	0,187	0,0030
3	0,276	0,272	0,274	0,274	0,0020
4	0,35	0,345	0,377	0,357	0,0172

II-2 Rohdaten der MDA-Messung (Lipidperoxidation)

Probe Cu [mM]	Protein-gehalt	Absorption bei 586 nm			MW	Konzentration MDA μM
0	37,9	0,071	0,072	0,071	0,071	2,16
0,01	47,0	0,065	0,064	0,068	0,066	1,80
0,1	46,7	0,069	0,069	0,069	0,069	2,01
0,5	31,1	0,088	0,087	0,084	0,086	3,11
1	44,3	0,16	0,109	0,112	0,127	5,68
0,1 MD	44,2	0,095	0,096	0,097	0,096	3,72

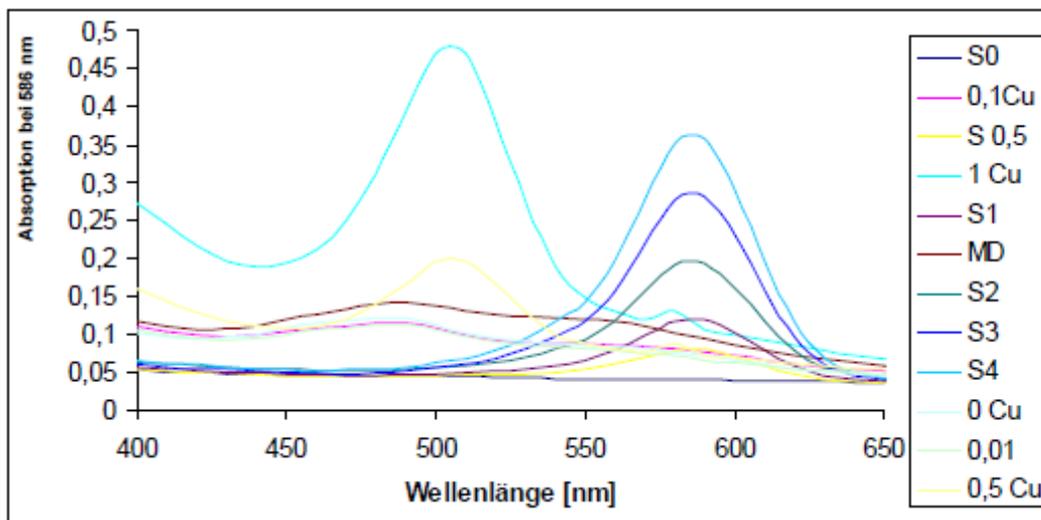
II-3 Rohdaten des Scans über die Wellenlängen 400 nm bis 680 nm

λ	S0	S 0,5	S1	S2	S3	S4	0 Cu	0,01	0,1Cu	0,5 Cu	1 Cu	MD
400	0,053	0,053	0,056	0,063	0,06	0,065	0,102	0,105	0,11	0,159	0,272	0,116
410	0,05	0,051	0,053	0,06	0,057	0,061	0,097	0,099	0,104	0,144	0,246	0,11
420	0,049	0,05	0,051	0,058	0,055	0,06	0,095	0,094	0,099	0,128	0,216	0,106
430	0,048	0,049	0,05	0,056	0,053	0,057	0,096	0,093	0,097	0,117	0,197	0,107
440	0,047	0,047	0,049	0,055	0,051	0,055	0,1	0,095	0,098	0,11	0,189	0,111
450	0,046	0,046	0,047	0,053	0,05	0,053	0,107	0,1	0,103	0,107	0,193	0,119
460	0,045	0,046	0,047	0,052	0,049	0,052	0,114	0,106	0,108	0,11	0,212	0,127
470	0,044	0,045	0,046	0,051	0,048	0,053	0,118	0,109	0,111	0,12	0,25	0,133
480	0,044	0,045	0,046	0,052	0,049	0,054	0,121	0,112	0,114	0,139	0,311	0,139
490	0,044	0,046	0,047	0,054	0,052	0,057	0,121	0,112	0,114	0,167	0,397	0,142
500	0,044	0,046	0,048	0,056	0,056	0,062	0,112	0,105	0,107	0,195	0,47	0,138
510	0,044	0,047	0,049	0,059	0,061	0,068	0,101	0,096	0,099	0,196	0,47	0,131
520	0,043	0,047	0,051	0,063	0,068	0,078	0,094	0,089	0,093	0,167	0,384	0,127
530	0,042	0,048	0,055	0,07	0,08	0,094	0,09	0,085	0,09	0,129	0,273	0,124
540	0,041	0,05	0,059	0,08	0,096	0,116	0,088	0,083	0,088	0,1	0,189	0,122
550	0,04	0,053	0,066	0,092	0,116	0,142	0,086	0,081	0,087	0,087	0,149	0,12
560	0,04	0,06	0,079	0,117	0,156	0,195	0,084	0,079	0,086	0,08	0,13	0,116
570	0,04	0,07	0,1	0,157	0,221	0,279	0,081	0,075	0,083	0,077	0,12	0,11
580	0,04	0,079	0,118	0,192	0,277	0,352	0,077	0,071	0,08	0,088	0,13	0,102

590	0,04	0,08	0,119	0,194	0,281	0,357	0,071	0,066	0,076	0,073	0,106	0,094
600	0,039	0,07	0,102	0,161	0,23	0,289	0,065	0,062	0,071	0,069	0,099	0,086
610	0,039	0,058	0,078	0,117	0,158	0,195	0,06	0,058	0,065	0,065	0,092	0,079
620	0,038	0,047	0,058	0,079	0,097	0,117	0,055	0,054	0,061	0,061	0,085	0,073
630	0,038	0,041	0,046	0,057	0,061	0,07	0,051	0,052	0,057	0,058	0,079	0,067
640	0,037	0,038	0,04	0,047	0,046	0,05	0,048	0,049	0,054	0,055	0,073	0,063
650	0,037	0,037	0,038	0,043	0,04	0,042	0,046	0,047	0,051	0,053	0,068	0,059
660	0,036	0,036	0,037	0,041	0,038	0,04	0,044	0,045	0,049	0,051	0,064	0,056
670	0,036	0,036	0,036	0,041	0,037	0,038	0,042	0,043	0,047	0,049	0,06	0,054
680	0,036	0,035	0,036	0,04	0,036	0,038	0,041	0,042	0,046	0,048	0,058	0,051

S = Standardkonzentration in $\mu\text{mol MDA/l}$; 1 Cu = 1 mmol/l Kupfer(II)chlorid; MD = Positivkontrolle Menadion 0,1 mmol/l; λ = Wellenlänge in nm

II-4 Graphische Darstellung der Scandaten



Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei all denen, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. h.c.mult. Paul Müller für die Überlassung des Forschungsthemas und der Bereitstellung der Forschungsmittel und Räumlichkeiten innerhalb des Instituts.

Ein besonders großes Dankeschön gilt Professor Dr. Thomas Schmitt für seine Betreuung.

Auch Dr. Xiaohua He bin ich zu großem Dank verpflichtet. Sie stand mir mit Rat und Tat zur Seite. Mit ihrer Hilfe konnten Probleme bei Versuchsanordnungen und -durchführungen, sowie bei der Kultur der *C.elegans* beseitigt werden. Außerdem bedanke ich mich sehr bei meinen Kommilitonen Jutta Lichter, Carmen Goetz, Sonja Silber, und Philipp Lisiecki, die mir während meiner praktischen Arbeit eine große Hilfe waren.

Dank schulde ich auch alle meine Kollegen in Biogeographie Institut und meine Freunde Dennis und Osama Shallar für ihre Hilfe mit Meiner Arbeit und mit der Sprache.

Lebenslauf

GIFAR WANNOUS

Geburtstag: 14. Juli 1975
Geburtsort: Damaskus/Syrien

SCHULE: in Damaskus/Syrien

1986-1989 Besuch der „Izz Aldin al-Tannoukhi“- Hauptschule
1989 Erwerb des Hauptschulabschlusszeugnisses

1989-1995 Besuch der „Al-Sa´aade“- Sekundarschule
1995 Erwerb des syrischen Abschlusszeugnisse der allgemeinen
Sekundarschule –Literaturzweig

STUDIUM

1995 Aufnahme des Geographie-Studiums an der Universität
Damaskus/ Syrien

1999 Ende dieser Studiumphase und Erwerb des sog.
Hochschulabschlusses in Geographie mit dem Prädikat (gut)

2004 – 2006 Qualifikationsstudium im Fachbereich Biogeographie und
Bodenkunde an der Universität Trier

07, 2006 Diplom-Biogeographie

10, 2006 – 07, 2010 Doktorand im Fachbereich Biogeographie an der Universität
Trier , Abschluss 2010

 Titel der Dissertation:
*(Caenorhabditis elegans –Testsysteme für Freiland und
Labor)*

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

2001– Januar 2004 Dozent an der Fakultät für Geographie an der Universität
Aleppo/Syrien

Erklärung zur Doktorarbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die Doktorarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken als solche kenntlich gemacht habe. Die Doktorarbeit habe ich bisher keinem anderen Prüfungsamt in gleicher oder vergleichbarer Form vorgelegt. Ebenso wurde sie bisher nicht veröffentlicht.

