

**Motilität, ATP-Gehalt und Membranintegrität nativer und kryokonservierter  
Spermatozoen von Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) und Sterlet (*Acipenser  
ruthenus* L.) als Endpunkte zur Bewertung aquatischer Umweltchemikalien**

**Entwicklungsansätze zu neuen ökotoxikologischen Testverfahren als Fertilitätstests und  
Ersatzmethoden zu Tierversuchen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Dietmar Warnecke**

Berlin 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf K. Achazi

2. Gutachter: P.D. Dr. Wolfgang Heger

Tag der Disputation: Freitag, 7. Februar 2003

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
1 Einleitung .....	6
1.1 Problemstellung .....	7
1.1.1 Geeignete Fischarten .....	7
1.1.2 Verfügbarkeit der Spermaproben .....	8
1.1.3 Voraussetzungen für das Testverfahren .....	8
1.1.4 Anforderungen an geeignetes Fischsperma .....	8
1.2 Übersicht Voruntersuchungen .....	9
1.3 Übersicht Hauptuntersuchungen.....	9
1.4 Zeitraum und Ort der Untersuchungen .....	10
1.5 Literaturübersicht .....	11
1.5.1 Fischsperma .....	11
1.5.2 Kryokonservierung .....	13
1.5.3 Videomikrographie.....	15
1.5.4 Ökotoxikologische Ansätze mit Spermien .....	16
2 Material und Methoden .....	19
2.1 Versuchstiere .....	20
2.1.1 Karpfen ( <i>Cyprinus carpio</i> L.).....	20
2.1.2 Sterlet ( <i>Acipenser ruthenus</i> L.).....	21
2.2 Allgemeine Vorgehensweise .....	22
2.2.1 Gewinnung von Ei- und Samenzellen .....	22
2.2.2 Motilitätsanalyse.....	23
2.2.3 Kryokonservierung .....	26
2.2.4 Immobilisierung.....	27
2.3 Teil I: Spezielle Versuche zur Motilität, Kryokonservierung und Befruchtung .....	27
2.3.1 Karpfenspermien .....	27

## Inhaltsverzeichnis

---

2.3.2	Sterletspermien .....	31
2.4	Teil II: Ökotoxikologische Versuche.....	36
2.4.1	Chemikalien und Abwasser .....	36
2.4.2	Endpunkte .....	45
2.5	Statistische Auswertung .....	54
3	Ergebnisse.....	56
3.1	Teil I: Motilität, Kryokonservierung und Befruchtung .....	56
3.1.1	Motilitätseigenschaften von nativen Karpfen- und Sterletspermien .....	56
3.1.2	Immobilisierungsfähigkeit .....	62
3.1.3	Equilibrierung .....	65
3.1.4	Kryokonservierbarkeit .....	68
3.1.5	Befruchtungsfähigkeit .....	76
3.2	Teil II: Ökotoxikologische Versuche.....	79
3.2.1	Phase 1 .....	79
3.2.2	Phase 2 .....	86
3.2.3	Phase 3 .....	92
4	Diskussion .....	103
4.1	Teil I: Motilität, Kryokonservierung und Befruchtung .....	103
4.1.1	Bewertung der Fischarten .....	103
4.1.2	Bewertung der Methoden .....	115
4.1.3	Korrelation Motilität/Fertilität.....	122
4.2	Teil II: Ökotoxikologische Versuche.....	123
4.2.1	Phase 1 .....	123
4.2.2	Phase 2 .....	126
4.2.3	Phase 3 .....	130
4.2.4	Vergleich mit standardisierten aquatischen Testverfahren .....	134
4.2.5	Abschließende Bewertung der Testverfahren .....	139
4.3	Schlussfolgerungen.....	144

## Inhaltsverzeichnis

---

5	Zusammenfassung / Summary .....	147
6	Literaturverzeichnis .....	154

### **Anhang**

Abbildungsverzeichnis .....	I
Tabellenverzeichnis .....	III
Erklärung .....	IV
Lebenslauf .....	V
Publikationsliste .....	VI
Danksagung .....	VII

## Abkürzungsverzeichnis

3,5-DCP	3,5-Dichlorphenol
4-NP	4-Nonylphenol
AOX	Adsorbierbare organisch gebundene Halogene
ATP	Adenosin-5‘Triphosphat
BB	Bis-Benzimid Trihydrochlorid (Hoechst Farbstoff Nr. 33258)
BF	Beat frequency (Kopf-/Schwanzschlagfrequenz)
CASA	Computer assisted sperm analysis (computergestützte Videomikrographie)
ChemG	Chemikaliengesetz
Cro	Crotonaldehyd
DIN	Deutsche Industrie-Norm
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMA	Dimethylacetamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EC	Effektkonzentration (EC50 = Konzentration, die einen 50%igen Effekt hervorruft)
EG	Ethylenglycol
H	Hyperaktive
IM	Immotile
Immo	Immobilisierungslösung
Ini	Initiatorlösung
KL	Kreisläufer
Konz.	Konzentration
Kryo	Kryokonservierung(slösung)
KWB	Konzentrations-Wirkungsbeziehung
LC	Letale Konzentration (LC50 = Konzentration, bei der 50% der Organismen sterben)
LHD	Lateral head displacement (seitliche Kopfauslenkung)
Lin	Linearität
LM	Linear Motile

## Abkürzungsverzeichnis

---

LOEC	Lowest observed effect concentration (niedrigste beobachtete Effektkonzentration)
LoM	Lokal Motile
LN <sub>2</sub>	Liquid Nitrogen (flüssiger Stickstoff)
M	Motile
Mot	Motilitätsrate
MK2	Modifiziertes <i>Kurokura</i> -Medium
MW	Mittelwert
n.e.	nicht ermittelbar
NLM	Nicht-linear Motile
OV	Ovarialflüssigkeit
P <sub>ow</sub>	n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
REM	Rasterelektronenmikroskop
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten
Rot	Rotenon
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spz	Spermatozoen/Spermazellen
TBT	Tributylzinn
TM	Totale Motilität(srate)
TOC	Total organic carbon (gesamter gelöster und partikulärer organischer Kohlenstoff)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UBA	Umweltbundesamt
VCL	Curve line velocity (Geschwindigkeit entlang der tatsächlichen Bahn)
VAP	Averaged path velocity (Geschwindigkeit entlang der gemittelten Bahn)
VK	Variationskoeffizient
VSL	Straight line velocity (Geschwindigkeit entlang der Luftlinie)
WHG	Wasserhaushaltsgesetz