

## 2.2.4 Immobilisierung

Im Seminalplasma sind Fischspermien immotil. Neben der hohen Viskosität des Plasmas bei geringem Flüssigkeitsanteil wird die Immobilisierung, wie bereits beschrieben, durch den pH-Wert, die Osmolarität und durch erhöhte Konzentrationen an einzelnen Ionen erreicht. Bei marinen Fischen ist die Osmolarität des Seminalplasmas gegenüber dem Außenmedium erniedrigt. Durch Verdünnung mit dem Meerwasser und damit verbundener Hyperosmolarität wird die Spermienmotilität ausgelöst. Bei limnischen Arten sind meist hypoosmotische Verhältnisse zur Aktivierung nötig. Bei Karpfen ist die hohe Osmolarität des Seminalplasmas für die Unbeweglichkeit der Spermien verantwortlich. Bei den meisten anderen Süßwasserarten ist es das  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Verhältnis. Im Seminalplasma von Regenbogenforellen liegt die  $\text{K}^+$ -Konzentration zwischen 10 und 40 mM. Bei Sterletsperma reicht schon 1/10 dieser Konzentration aus, um die Immotilität zu gewährleisten (s.u.).

Die natürlichen Mechanismen der Spermienimmobilisierung können eingesetzt werden, um Fischspermien auch nach Verdünnung für einen bestimmten Zeitraum in der unbeweglichen Phase zu belassen und erst danach zu aktivieren. Diese Vorgehensweise ist im Hinblick auf den angestrebten Fertilitätstest von großer Bedeutung. In der Immobilisierungslösung kann das Testgut (Substanzen, Abwasser) gelöst und verdünnt werden. Dadurch kann eine längere Inkubationszeit mit einem Testgut gewährleistet werden, als durch den Zeitraum der eigentlichen Bewegungsphase vorgegeben.

## 2.3 Teil I: Spezielle Versuche zur Motilität, Kryokonservierung und Befruchtung

### 2.3.1 Karpfenspermien

Folgende Lösungen sind in den Versuchen mit nativem und kryokonserviertem/aufgetautem Karpfensperma (Abbildung 7) hauptsächlich verwendet worden:

#### Lösungen zur Immobilisierung:

- **Immo1:** 200 mM KCl; 30 mM Tris; pH 8,0 (RT; 398 mosM)
- **ImmoS:** 200 mM KCl; 200 mM Sucrose; 30 mM Tris, pH 8,0 (RT; 791 mosM)

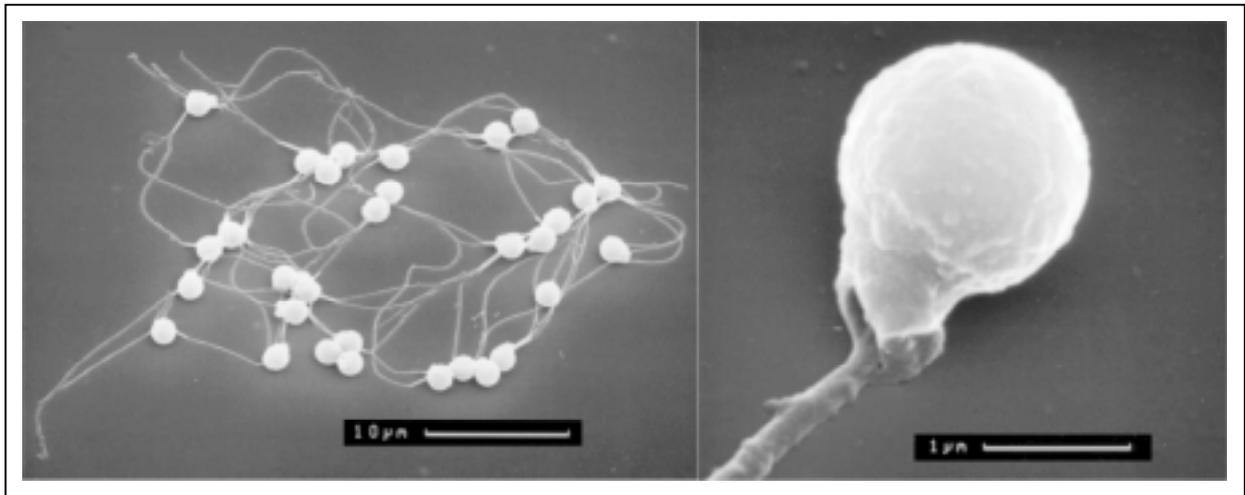
#### Lösungen zur Aktivierung (Initiation):

- **Ini4:** 30 mM Tris; pH 8,0 bei Raumtemperatur (RT; 43 mosM)
- **Ini4Ca:** 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 30 mM Tris; pH 8,0 (RT; 73 mosM)

#### Lösungen für die Befruchtungsversuche:

- **ImmoF:** 133 mM NaCl; 200 mM Sucrose; 30 mM Tris, pH 8,0 (RT; 526 mosM)

- **Woynarovich-Lsg.:** 4 g/l NaCl; 3 g/l Harnstoff (nach Woynarovich, 1962)



Quelle REM-Aufnahmen: R. Stenzel, FU Berlin, Fachbereich Geowissenschaften, Geomorphologisches Laboratorium

**Abbildung 7: REM-Aufnahmen von kryokonservierten Karpfenspermien**

### **2.3.1.1 Native Karpfenspermaproben**

Da Karpfensperma in der Regel eine hohe Zelldichte (ca.  $20 \cdot 10^9$  Spermazellen (Spz) pro ml) aufweist, wurde es mit einer Gesamtverdünnungsrate von 1:100 aktiviert. Karpfenspermien können durch hohe Osmolalitäten ( $> 300$  mosM/kg) für einige Stunden immobilisiert und dann aktiviert werden. Die Aktivierung wurde in der Regel durch eine Vorverdünnung in Immobilisierungslösung (1:5–1:50) vorgenommen, und die Motilität anschließend durch Verdünnung mit Initiatorlösung (1:2–1:20) ausgelöst. Später wurde Ini4 mit Calcium-Zusatz (= Ini4Ca) eingesetzt.

Die Auswahl von Initiatorlösung 4 (Ini4) als Aktivierungslösung und der Immobilisierungslösung 1 (Immo1) beruht auf Arbeiten von Redondo-Müller et al. (1991). Sie zeigten, dass die Aktivierbarkeit von nativem Karpfensperma guter Qualität (ca. 100% motile Spermien) bei bis zu zehnstündiger Verdünnung/Immobilisierung in kalter KCl-Lösung (50–200 mM) und anschließender Aktivierung mit Ini4 ohne Qualitätsverlust aufrecht erhalten werden kann. Die Motilitätsrate von Sperma, welches vor dem Versuch eine mindere Qualität (ca. 50% motile Spermien) aufwies, konnte nach etwa vierstündiger Immobilisierung sogar auf 100% verbessert werden.

### **2.3.1.2 Messtemperaturen**

Die Auswirkung unterschiedlicher Messtemperaturen auf die Spermienmotilität wurde am Beispiel von Karpfenspermien untersucht. Hierzu wurde die Motilität bei drei verschiedenen Kühltschtemperaturen (10°C, 16°C und 28°C) bestimmt. Zu jeder Temperatur wurden fünf Replikate gemessen (Ergebnisse: S. 60).

### **2.3.1.3 Immobilisierung der Karpfenspermien**

Um die oben beschriebenen Auswirkungen einer längeren Immobilisierung auf Karpfensperma minderer Qualität zu überprüfen, wurden eine Spermamischprobe von drei Männchen (durchschnittliche Motilitätsrate < 10%) über einen Zeitraum von 5 h in Immo1 inkubiert (1:40). Im Abstand von 30 Minuten wurde mit Ini4 (1:2,5) aktiviert und die Motilität gemessen. Die Motilitätsrate der nicht-inkubierten Proben wurde als Kontrolle vor und nach dem Immobilisierungsversuch erfasst, wobei die gleiche zweistufige Verdünnungsmethode mit Immobilisierung (1:40) und Aktivierung (1:2,5), allerdings direkt nacheinander, angewendet wurde.

### **2.3.1.4 Kryokonservierung von Karpfensperma**

#### **2.3.1.4.1 Vorgehensweise**

Karpfensperma von guter Qualität wurde in der Regel von verschiedenen Männchen gemischt und mit Profil I, II oder III eingefroren. Für die Toxizitätstests wurden Spermproben verwendet, die ausschließlich mit Profil III eingefroren worden waren (s. Tabelle 3). Alle Proben wurden durch Eintauchen für 3–5 s in ein Wasserbad bei  $40\pm 1^\circ\text{C}$  aufgetaut (nach Cognie et al., 1989).

#### **2.3.1.4.2 Wichtige für Karpfensperma verwendete Kryomittel**

Wie bereits in der Einleitung auf S. 13 unter Punkt 1.5.2 (Kryokonservierung) beschrieben, wurden verschiedene der in der Literatur beschriebenen Kryomittel (Kryomedien/-protektiva) getestet. DMSO, Glycerin, Ethylenglycol, Methanol und einige andere Kryoprotektiva erwiesen sich dabei als für Karpfensperma wenig geeignet. Die Motilitätsraten der unter den gegebenen Bedingungen mit diesen Kryomitteln eingefrorenen Karpfenspermien lagen in der Regel nach dem Auftauen bei unter 10%.

Das Kryoprotektivum, das sich als am besten geeignet durchsetzte, war DMA in Endkonzentrationen von 15–20%. Es wurde in Verbindung mit dem Immobilisierungsmedium Immo1 bzw. zusammen mit dem

nach Magyary et al. (1996a) modifizierten Kurokura-Medium (MK2; Kurokura et al., 1984) eingesetzt. Der Zusatz von Sucrose bzw. Trehalose zum Medium in Konzentrationen von 100–300 mM wurde ebenfalls getestet. Das Mischungsverhältnis von Sperma zu Kryomittel betrug 1:6 (1 Teil Sperma + 5 Teile Kryomittel), die Equilibrierzeit ca. 5 min (Zusammensetzung der wichtigsten Kryomittel: Tabelle 4). Das Kryomedium MK2 hatte folgende Zusammensetzung:

- MK2: 3,6 g/l NaCl; 10 g/l KCl; 0,22 g/l CaCl<sub>2</sub>; 0,08 g/l MgCl<sub>2</sub>; 0,2 g/l NaHCO<sub>3</sub>; pH 8,0 (378 mosM)

**Tabelle 4: Zusammensetzung der wichtigsten mit Karpfensperma verwendeten Kryomittel**

Kryomittel	Medium/Zusatz	Anteil Medium [%]	Anteil DMA [%]
Kryo1	MK2	85	15
Kryo2	MK2 + 100 mM Sucrose	85	15
Kryo3	MK2 + 200 mM Sucrose	85	15
Kryo4	MK2 + 300 mM Sucrose	85	15
Kryo5	Immo1	90	10
Kryo6	Immo1	85	15
Kryo7	Immo1	80	20
Kryo8	Immo1	75	25
Kryo9	MK2 + 200 mM Trehalose	85	15
Kryo10	MK2 + 200 mM Trehalose	80	20
Kryo11	MK2 + 200 mM Trehalose	75	25

### 2.3.1.5 Karpfen-Befruchtungsversuche

Befruchtungsversuche wurden mit nativen und kryokonservierten/aufgetauten Spermaproben vorgenommen. Hierzu wurden je 2 Weibchen in zwei 200-l-Becken bei 22±2°C gehältert. Die Tiere wurden mit einer Dosis von 4–5 mg/kg hypophysiert. 10% der Gesamtdosis wurden 24 h und die restlichen 90% ca. 10 h vor dem Abstreifen injiziert. Von drei Weibchen konnten Eier gewonnen werden. Nach einer mikroskopischen Begutachtung der Eiqualität (Aussehen, Anteil opaker Eier) wurden die Eier lediglich eines Tieres für die Befruchtungsversuche ausgewählt. Die Befruchtung erfolgte in fünf

verschiedenen Ansätzen mit nativen (Kontrollansatz), kryomittel-equilibrierten (Ansatz 2), kryokonservierten (Ansatz 3 und 5) und kryokonservierten/gewaschenen Spermaproben (Ansatz 4). Details zu den Ansätzen, der Motilität der Proben und die Befruchtungsergebnisse sind im Ergebnisteil in Tabelle 11 auf S. 77 zusammengefasst. Das Spermium wurde je nach Ausgangskonzentration mit der Immobilisierungslösung auf  $1 \cdot 10^8$  Spz/ml verdünnt, so dass sich ein nach Magyary et al. (1996b) optimales Verhältnis von ca.  $1 \cdot 10^5$  Spz/Ei ergab. Da  $K^+$ -Konzentrationen über 5 mM auf Karpfeneier toxisch wirken können (Saad & Billard, 1987), wurde an Stelle der üblicherweise verwendeten  $K^+$ -haltigen Lösungen Immo1 bzw. ImmoS die  $Na^+$ -haltige ImmoF eingesetzt. Je Ansatz wurde 1 g Eier (ca. 1000 Stück) mit 1 ml verdünntem Spermium verrührt. Nach einer Minute wurden die Spermazellen mit 10 ml Ini4Ca aktiviert. Nach einer weiteren Minute wurden 100 ml Woynarovich-Lösung (Woynarovich, 1962) hinzu gegeben und der Ansatz für eine Stunde ruhig stehen gelassen. Danach wurden je Ansatz 3-mal ca. 100 Eier auf Glasschälchen mit 100–150 ml temperiertem (ca. 20°C) Frischwasser verteilt. Wasserwechsel wurde täglich einmal vorgenommen. Alle Schälchen wurden bis zum Schlupf täglich kontrolliert. Anormal entwickelte und tote Eier wurden registriert und entfernt.

### 2.3.2 Sterletspermien

#### 2.3.2.1 Native Sterletspermiproben

Zur Aktivierung der Bewegung bei frisch abgestreiften Spermien wurde in der ersten Projektphase eine Initiatorlösung (Ini) nach Gallis et al. (1991) eingesetzt. Später wurde der Lösung Calcium (IniCa) zugesetzt, da es die Motilitätsphase deutlich verlängert (s. Abbildung 9 auf S. 60). Das Mischungsverhältnis von Spermien/Initiatorlösung betrug je nach Qualität und Konzentration des Spermiums zwischen 1:2 und 1:10 (v/v).

#### Lösungen:

- **Ini:** 25 mM NaCl; 10 mM Tris; pH 8,5 (RT)
- **IniCa:** 20 mM NaCl; 10 mM  $CaCl_2$ ; 10 mM Tris; pH 8,5 (RT)

#### 2.3.2.2 Immobilisierung von Sterletspermien

Im Hinblick auf die Verwendung in einem Substanztest wurden Versuche zur Immobilisierung von nativen und kryokonservierten/aufgetauten Spermien durchgeführt. Ziel war es, die Spermien für einige Zeit in der Lösung zu immobilisieren und danach zu aktivieren.

Lösungen:

- **ImmoA:** 20 mM NaCl; 1 mM KCl; 10 mM Tris; pH 8,5 (RT)
- **ImmoB:** 20 mM NaCl; 1,25 mM KCl; 10 mM Tris; pH 8,5 (RT)
- **ImmoC:** 20 mM NaCl; 0,63 mM KCl; 10 mM Tris; pH 8,5 (RT)
- **ImmoD:** 20 mM NaCl; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,25 mM KCl; 10 mM Tris; pH 8,5 (RT)

*2.3.2.2.1 Native Sterletspermien*

Eine Mischprobe wurde sowohl im Eisbad (4 Parallelansätze) als auch bei Raumtemperatur (RT, drei Parallelen) im Verhältnis 1:2 mit ImmoA inkubiert. In Abständen wurde die Aktivierbarkeit der Proben durch Initiation mit IniCa (1:2,5) überprüft. Die Eisbad-Proben wurden auch nach einem bzw. zwei Tagen gemessen. Zum Vergleich wurde die gleiche, nicht-inkubierte und auf Eis gelagerte Spermaprobe verwendet, die aus Vergleichsgründen mit der gleichen zweistufigen Verdünnungsmethode aktiviert wurde.

*2.3.2.2.2 Kryokonservierte/aufgetaute Sterletspermien*

Hierzu wurden drei Wiederholungsmessungen mit drei verschiedenen Immobilisierungslösungen (ImmoB, C und D) durchgeführt, die sich etwas in der Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-, und Ca<sup>2+</sup>-Konzentration unterschieden. Die Verdünnungsrate betrug 1:2. Verwendet wurden Spermien, die ca. 10 Monate zuvor mit KryoC oder KryoE und Gefrierprofil II tiefgefroren worden waren. Nach dem Auftauen wurden die Spermien sofort mit den Immobilisierungslösungen inkubiert. Die Aktivierbarkeit wurde nach 30, 60 und 90min überprüft. Dabei wurden die Spermien durch 1:2-Verdünnung mit IniCa aktiviert. Zum Vergleich wurde die Motilität der auf Eis aufbewahrten und nicht-immobilisierten Spermien vor und nach den Versuchen ermittelt.

*2.3.2.3 Equilibrierung (Sterletsperma)*

*2.3.2.3.1 Variation der Equilibrierdauer*

Um den Effekt der Equilibrierdauer mit Kryomitteln auf die Fischspermien zu überprüfen, wurde exemplarisch ein Kryomittel (KryoE, s. Tabelle 5) ausgewählt. Es wurden zwei voneinander unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Zu Beginn der Versuche wurde die Motilität von nativem

Sperma ohne den Zusatz des Kryomittels gemessen. Danach wurden Spermien und Kryomittel gemischt (1:2), im Abstand von 5 Minuten aktiviert (1:2 mit IniCa) und die Motilitätsraten aufgezeichnet. Nach 60 Minuten wurden die Versuche jeweils beendet. Zur Auswertung wurden die Ergebnisse aus beiden Versuchsreihen gemittelt.

### *2.3.2.3.2 Variation der Kryomittel*

Eine frische Spermaprobe wurde für 10–22 min (Mittelwert der 4 Replikate: ca. 15 min) mit drei verschiedenen Kryomitteln (KryoB, KryoC und KryoD, s. Tabelle 5) equilibriert (Verdünnung: 1:2). Anschließend wurden die Spermien mit IniCa (1:3) aktiviert und die Motilität gemessen.

### **2.3.2.4 Kryokonservierung von Sterletsperma**

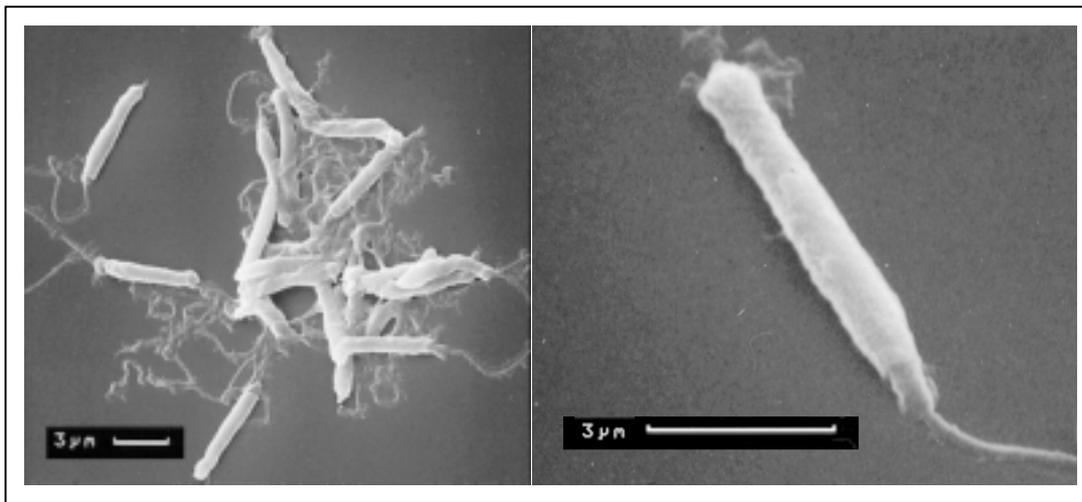
#### *2.3.2.4.1 Vorgehensweise*

Für die Kryokonservierung wurde zunächst die Qualität der frischen Spermaproben begutachtet. Proben von minderer Qualität (Anfangsmotilität < 70%) wurden nicht verwendet. Sofern mehrere Proben von sehr guter Qualität (Motilität > 90%) zur Verfügung standen, wurden diese zu einer Mischprobe zusammengefasst. Die ausgewählte Probe wurde im Verhältnis von 1:2 (1Teil Sperma und + 1 Teil Kryomittel) mit dem Kryomittel versetzt und mit den Gefrierprofilen I, II oder III (s. Tabelle 3 auf S. 26) eingefroren.

Aufgetaut wurden die Spermaproben durch Eintauchen (3–5 s) in ein temperiertes Wasserbad ( $40\pm 1^\circ\text{C}$ , nach Cognie et al., 1989). Danach wurde das Sperma unverdünnt bis zur Messung im Eisbad aufbewahrt. Aktiviert wurden die aufgetauten Sterletspermien (Abbildung 8) mit den beschriebenen Initiatorlösungen im Verhältnis 1:2 bis 1:5.

#### *2.3.2.4.2 Wichtige für Sterletsperma verwendete Kryomittel*

Tabelle 5 enthält die wichtigsten Kryomittel und ihre Zusammensetzung. Als Kryoverdünner wurde in der Regel die Initiatorlösung „Ini“, als Kryoprotektivum Ethylenglycol (EG) in Konzentrationen zwischen 15–20% verwendet. Andere Kryoprotektiva wie DMSO, DMA, Propylenglykol und andere hatten sich in den Vorversuchen als weniger geeignet gezeigt. Der Einfluss von Sucrose als Zusatz zum Verdünner wurde in Konzentrationen von 10–300 mM bei zwei verschiedenen Gefrierprofilen getestet.



Quelle REM-Aufnahmen: R. Stenzel, FU Berlin, Fachbereich Geowissenschaften, Geomorphologisches Laboratorium

**Abbildung 8: REM-Aufnahmen von kryokonservierten Sterletspermien**

**Tabelle 5: Zusammensetzung der wichtigsten mit Sterletsperma verwendeten Kryomittel**

Kryomittel	Anteil Verdünner (Ini) [%]	Anteil EG [%]	Zusätze
KryoA	75	25	-
KryoB	70	30	-
KryoC	60	40	-
KryoD	50	50	-
KryoE	65	35	-
KryoF	65	35	10% OV <sup>1</sup>

<sup>1</sup> OV = Ovarialflüssigkeit vom Sterlet-Weibchen

#### 2.3.2.4.3 Auftauprofile (Sterletsperma)

Zur Ermittlung der optimalen Auftaugeschwindigkeit wurden mit einer Gefriervariante (1:2 mit KryoF, Profil II) Auftauexperimente am Beispiel des Sterletspermias unternommen. Hierfür wurden die Pailletten unter folgenden Bedingungen aufgetaut:

- Im Einfriergerät von -80°C bis 2°C mit 10°C/min (durchschnittliche Auftaurate ca. 20°C/min)
- Im Kühlbrutschrank bei 2°C für 5 min (ca. 40°C/min)
- Im Kühlbrutschrank bei 10°C für 2 min (ca. 100°C/min)

- Im Wasserbad bei 20°C für 10 s (ca. 1320°C/min)
- Im Wasserbad bei 40°C für 5 s (ca. 2880°C/min)
- Im Wasserbad bei 40°C für 3 s (ca. 4800°C/min)

Pro Variante wurden drei Pailletten aufgetaut und von jeder Paillette drei Parallelen gemessen.

### ***2.3.2.5 Sterlet-Befruchtungsversuche***

In Zusammenarbeit mit Dr. Jähnichen vom Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei (IGB, Berlin-Friedrichshagen) und Mitarbeitern des Teichwirtschaftlichen Beispielsbetrieb Wöllershof wurden Befruchtungsversuche mit frischen und kryokonservierten/aufgetauten Spermaproben durchgeführt.

Es wurden verschiedene Befruchtungsvarianten erprobt, wobei jede Variante aus drei Parallelansätzen bestand. Die Befruchtung wurde in Kunststoffschalen mit je etwa 1000 Eiern durchgeführt. Um den Einfluss der Spermiedichte zu überprüfen, wurde die exakte Spermienkonzentration in jeder Probe bestimmt. Das Verhältnis von Spermien zu Eiern ( $1 \cdot 10^3$  und  $1 \cdot 10^6$  Spz/Ei) wurde durch den Zusatz der entsprechenden Menge ImmoA zu den Spermaproben variiert (genaue Angaben zu den verschiedenen Ansätzen sind Tabelle 12 im Ergebnisteil, S. 78 zu entnehmen). Nach dem Durchmischen von Eiern und Sperma wurden die Spermien durch Zugabe von 20 ml frischem Teichwasser aktiviert. Zwei Minuten nach der Befruchtung wurden je Ansatz 3-mal ca. 100 Eier in Glasschalen zur Erbrütung überführt. Die Schalen waren ständig mit 1–2 cm belüftetem Teichwasser (Wasserstandshöhe) gefüllt, wobei täglich zweimal ein Wasserwechsel durchgeführt wurde und verpilzte Eier entnommen wurden. Die Beobachtung der Entwicklung und die Auswertung der Ergebnisse wurden von Dr. Jähnichen direkt vor Ort vorgenommen.