

erforderlichen Spermienkonzentration können abgestufte Zusammenhänge zwischen Motilität und Fertilität gemessen werden. Höhere Spermienkonzentrationen können sogar sub-optimale Bedingungen wie mangelhafte Spermien- und Eiqualität (Lubzens et al., 1997) sowie Schadstoffeffekte (Rurangwa et al., 1998) überdecken. Nach Angaben aus diesen beiden Publikationen liegt die für eine optimale Befruchtungsrate mindestens erforderliche Spermienkonzentration bei kryokonservierten Spermien um etwa den Faktor 100 höher als in der jeweiligen Kontrolle mit nativen Spermien.

In Übereinstimmung mit Kime (1999; Kime et al., 2001) kann zusammenfassend behauptet werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen Motilität und Fertilität besteht und nachgewiesen werden kann. Hierzu muss aber, in Abhängigkeit der angewendeten Kryokonservierungs- und Befruchtungsmethoden, das minimal erforderliche Spermien/Ei - Verhältnis für native als auch für aufgetaute Spermien ermittelt werden.

4.2 Teil II: Ökotoxikologische Versuche

4.2.1 Phase 1

Die Versuche der Phase 1 können als erweiterte Vorversuche angesehen werden. Sie dienen dazu, erste Erfahrungen mit dem neuen Testsystem zu machen. Dabei wurden verschiedene Testparameter wie Expositionsdauer und -temperatur variiert. In den Motilitätsversuchen sollten unter der Vielzahl der Messparameter geeignete Endpunkte ausgewählt werden. Wie bereits erwähnt, wurden die inkubierten Spermien nach Ablauf des Tests nicht gewaschen, sondern direkt für die Motilitäts- bzw. Färbemessungen verwendet. Die Ergebnisse sind aufgrund unterschiedlicher Bedingungen weder zwischen diesen beiden Endpunkten noch mit Ergebnissen aus den anderen Entwicklungsphasen direkt vergleichbar.

4.2.1.1 Motilität

Schon nach den ersten Versuchen zeigte sich, dass von den mit Hilfe der CASA gemessenen Motilitätseigenschaften lediglich die Motilitätsrate ein geeigneter und zuverlässiger Toxizitätsendpunkt ist. Hiermit konnten bei den meisten getesteten Substanzen sinnvolle Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen (KWBs) ermittelt werden. Parameter wie die laterale Kopfauslenkung (LHD) oder die Linearität erwiesen sich als wenig geeignet, um die Toxizität einer Chemikalie zu beschreiben, da sie mehr oder weniger konzentrationsunabhängig reagierten. Auch antworteten die Spermien zwar in den meisten Fällen mit einer konzentrationsabhängigen Abnahme ihrer Geschwindigkeit, da der Messwert jedoch definitionsgemäß an motile Zellen gekoppelt ist und daher nicht unter einen Minimalwert sinkt

(30 $\mu\text{m/s}$; vgl. Tabelle 1 und Tabelle 2), können mit diesem Parameter Chemikalienwirkungen nur unzureichend abgebildet werden. Einige ermittelte EC50-Werte deuten außerdem daraufhin, dass dieser Endpunkt unempfindlicher ist als der Endpunkt Motilitätsrate. Zwischen den drei gemessenen Geschwindigkeitsklassen VSL, VAP und VCL gab es keine nennenswerten Unterschiede im Grad der Empfindlichkeit; lediglich das Wertenniveau war entsprechend der Geschwindigkeitsklasse verschoben.

Offen war zunächst noch die Frage, welcher Zeitpunkt nach der Aktivierung der günstigste für eine konzentrationsabhängige Motilitätsmessung ist. Bei Karpfenspermien zeigte sich, dass bei späteren Messzeitpunkten als 30 s nach Aktivierung zu geringe Werte entstanden, um abgesicherte KWBs zu erhalten. Bei Sterletspermien hingegen konnte in den meisten Fällen auch noch nach 150 s eine deutliche Motilität beobachtet werden. Bei zwei- und vierstündiger Inkubation der Sterletspermien mit 3,5-DCP wurden mit zunehmender Motilitätsphase geringere EC50-Werte ermittelt. Nach noch längerer Inkubation (25 h) war dies jedoch nicht mehr der Fall.

Als stabile und empfindliche Größe bei beiden Arten erwies sich der Mittelwert aus den verschiedenen Messzeitpunkten. Er steht für das zeitliche Integral der einzelnen Messwerte und kann dadurch auch Effekte auf die Bewegungsausdauer der Spermien abbilden. Dieser Parameter wurde als Standardparameter für die folgenden Motilitätsmessungen ausgewählt und fortan als Endpunkt „Motilitätsrate“ bezeichnet.

Die Expositionsbedingungen wurden am Ende der Phase 1 auf vier Stunden im Eisbad bei Dunkelheit festgelegt. Letzteres wurde so gewählt, um mögliche Degradationsprozesse durch Lichteinwirkung (z.B. Photooxidation) zu minimieren. Im Eisbad (0–2°C) konnten die Spermien über einen langen Zeitraum mit der Testsubstanz in Kontakt gebracht werden. Motilitätsmessungen waren unter diesen Bedingungen auch nach über einem Tag noch möglich. Bei Raumtemperatur (RT, ca. 21°C) zeigten sich die Spermien bezüglich ihrer Bewegungsfähigkeit relativ instabil. Bereits nach wenigen Stunden verloren die Proben einen Großteil ihrer Motilität, so dass nur wenige Chemikalienversuche mit dem Endpunkt Motilität bei RT durchgeführt wurden. Kürzere Expositionszeiten von z.B. 30 min mit frischen Spermien bei RT sind jedoch möglich, um mit dem Endpunkt Motilität noch sinnvolle KWBs messen zu können. Die geschätzte Empfindlichkeit ist in etwa mit der bei 2–4 h im Eisbad vergleichbar. Kryokonservierte Spermien reagieren jedoch nach dem Auftauen auf warme Temperaturen noch empfindlicher.

Wie am Beispiel von 3,5-DCP aufgezeigt wurde, führt bei Karpfenspermien eine Verdopplung der Expositionszeit von 2 h auf 4 h zu deutlich empfindlicheren Reaktionen bzw. zu niedrigeren EC50-Werten. Bei Sterletspermien war dieser Effekt nicht so deutlich ausgeprägt und manifestierte sich erst nach längerer Expositionsdauer. Um grundsätzliche Unterschiede in der Sensitivität der Spermazellen dieser beiden Spezies festzustellen, ist die Datengrundlage zu gering. Möglicherweise sind die

Karpfenspermien aufgrund ihrer kürzeren Bewegungsdauer und geringeren Kapazität zur Energiebereitstellung etwas empfindlicher.

Der Verlauf der KWBs in den Motilitätsversuchen mit 3,5-DCP war besonders bei den Sterletspermien ungewöhnlich. Bis zu einer Konzentration von ca. 12,5 mg/l nahm zwar die Motilitätsrate erwartungsgemäß in Abhängigkeit von der Konzentration ab, bei höheren Konzentrationen nahm sie jedoch auch wieder konzentrationsabhängig zu. Dieser Effekt wurde bei zwei- und vierstündiger Exposition nachgewiesen, nicht jedoch bei einer Expositionsdauer von 25 Stunden. Ein pH-Wert - Effekt als möglicher Grund ist hier auszuschließen, da ein gepuffertes Medium verwendet und der pH-Wert nachgeprüft wurde. Vorstellbar ist, dass 3,5-DCP in den höheren Konzentrationen ATP-Speicher für den Bewegungsapparat zugänglich gemacht hat. Das Molekül ist polar und membrangängig. Es kann sich in der Zellmembran einlagern und als Protonophor wirken. Das Membranpotential wird gestört und aufgrund des entkoppelnden Effekts in der Mitochondrienmembran kann kein ATP produziert werden. Die Motilitätsrate nimmt ab. Möglicherweise führen aber höhere 3,5-DCP - Konzentrationen durch die zunehmende Destabilisierung der Zellmembran zu einer ATP-Freisetzung aus zellinternen Speichern. Dadurch könnte wieder freies ATP für den Bewegungsapparat der Spermien zur Verfügung stehen. Nach längerer Inkubationszeit mit 3,5-DCP in diesen hohen Konzentrationen kann - möglicherweise aufgrund der fortschreitenden Instabilität der Zelle - dieses ATP nicht mehr genutzt werden, so dass keine Aktivität ausgelöst werden kann.

Auffällig sind auch die häufigen Stimulationseffekte in den unteren Konzentrationsbereichen. Diese Effekte traten sowohl in Phase 1, wie aus den Cd - und 3,5-DCP - Versuchen ersichtlich ist, als auch verstärkt in Phase 2 auf. Als mögliche Ursachen sind auch hier kurzfristige Erhöhungen der intrazellulären ATP-Konzentration durch Freisetzung aus Speichern oder durch Ankurbelung der mitochondrialen Atmungskette denkbar. Eventuell stimulieren auch diese ansonsten giftigen Substanzen in geringen Konzentrationen den Zellstoffwechsel über diverse Rezeptoren. In den Versuchen der Phase 3, in denen die Proben vor der Motilitätsmessung gewaschen wurden, traten kaum noch Stimulationseffekte auf. Dies lässt vermuten, dass möglicherweise die Prozesse und Rezeptoren, die beim Auslösen des Schwanzschlags eine Rolle spielen (vgl. 1.5.1 Fischsperma, S. 13), in diese Aktivierungsvorgänge involviert sind.

4.2.1.2 Membranintegrität

Die Vorteile dieses Endpunkts liegen eindeutig auf der methodischen Seite: Ohne großen Arbeitsaufwand können viele Proben mit großer Wiederholungsanzahl gleichzeitig gemessen werden.

Die Standardabweichungen sind in der Regel relativ klein und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist gut. Es reichen schon wenige Zellen aus, um ein messbares Fluoreszenzsignal zu erhalten.

Wie die Ergebnisse der Phase 1 auch zeigen, ist die Empfindlichkeit des Endpunkts nicht so hoch wie die des Endpunkts Motilitätsrate. Mit wenigen Ausnahmen lagen die ermittelten EC50-Werte deutlich über denen aus den Motilitätsversuchen. Die Ergebnisse für die Spermien der beiden Fischarten wichen hier stärker voneinander ab als dies beim Endpunkt Motilitätsrate der Fall war. Bei den 3,5-DCP - Versuchen waren die Karpfenspermien deutlich empfindlicher als die Sterletspermien. Letztere reagierten wiederum in den Färbeversuchen relativ empfindlich auf Cadmium, aufgetaute Karpfenspermien hingegen überhaupt nicht. Allerdings waren die eingesetzten Sterletspermien im Gegensatz zu den Karpfenspermien schon mindestens einen Tag auf Eis gelagert worden. Möglicherweise spielt auch die Größe des Spermienkopfs eine Rolle. Sterletspermien besitzen aufgrund des deutlich größeren Kopfes eine wesentlich umfangreichere Zellmembran, die zwar eine größere Angriffsfläche bietet, aber auch mehr Bindungsstellen besitzt, um Schadstoffe abzufangen. Aufgrund der geringen Datengrundlage und der schlechten Vergleichbarkeit der Bedingungen ist an dieser Stelle eine abschließende Bewertung der artabhängigen Empfindlichkeit nicht möglich.

Der Vergleich von kryokonservierten und nativen Zellen ergab am Beispiel von 3,5-DCP und Karpfenspermien, dass bei dieser Methode gleiche Ergebnisse bei ungefähr doppelter Expositionszeit der frischen Spermien (Eisbad: 4 h vs. 2 h) zu erwarten sind. Vergleicht man die Expositionstemperaturen miteinander (Eisbad vs. RT), zeigte sich bei Sterletspermien und 3,5-DCP, dass für gleiche EC50-Werte fünf- bis zehnmals längere Expositionszeiten im Eisbad notwendig sind.

Bereits in den Vorversuchen zeigte sich, dass bei der angewendeten Methode Abstriche gemacht werden müssen. Trübe oder gefärbte Lösungen konnten nicht getestet werden, da sie mit dem Fluoreszenzsignal interferieren, es beeinflussen (quenchen) oder überlagern können.

4.2.2 Phase 2

Phase 2 diente der weiteren Standardisierung der Testmethoden. Die Versuche wurden ausschließlich mit nativen Karpfenspermien und bei einheitlichen Expositionsbedingungen (4h/Eisbad, Dunkelheit) durchgeführt. Die Messung des ATP-Gehalts wurde als zusätzlicher Endpunkt eingeführt. Die Neuauswahl der Chemikalien wurde u.a. in Abhängigkeit von der biochemischen Wirkungsweise bestimmt. Neben dem bereits getesteten Cadmium (Cd; anorganisch-unspezifisch) wurden 4-Nonylphenol (4-NP; organisch-unspezifisch, protonophor, entkoppelnd, hormonähnlich), Crotonaldehyd (Cro; reaktiv, adduktbildend, mutagen) und Rotenon (Rot; organisch-spezifisch, Hemmung des mitochondrialen

Elektronentransports) verwendet. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit und zur besseren Absicherung der EC50-Werte wurde jeder Chemikaliertest mehrfach wiederholt.

4.2.2.1 Motilitätsrate

Mit Ausnahme der Rotenon-Versuche wurden mit allen Testsubstanzen gut reproduzierbare EC50-Werte im unteren Milligramm-Bereich (bis ca. 20 mg/l) gemessen. Die Schwankungen der KWBs zwischen den einzelnen Versuchsreihen für eine Substanz waren teilweise recht groß, insgesamt blieben sie jedoch im tolerierbaren Rahmen. Mit Rotenon wurde allerdings ein Variationskoeffizient von über 100% gemessen. Die Wirkung dieser Substanz erstreckte sich über einen erstaunlich weiten Bereich von ca. 1 ng/l bis 100 mg/l, wobei der Verlauf der KWB von Versuchsreihe zu Versuchsreihe etwas anders lag (EC50 der sechs Versuchsreihen zwischen 30 ng/l und 136 µg/l). Bei 10 mg/l konnte in allen Fällen noch eine Restmotilität gemessen werden.

Die Ursachen für diesen breiten Wirkungsbereich sowie für die schlechte Reproduzierbarkeit der KWB ist wahrscheinlich in der Wirkweise und der Löslichkeit der Substanz zu suchen. Da Rotenon bei 20°C nur sehr schlecht in Wasser löslich ist, wurde DMA (2,5%) als Lösevermittler zugesetzt. Aufgrund des breiten Wirkungsspektrums wurden von der Ausgangslösung (100 mg/l) viele Verdünnungsstufen in 1:10er - Schritten durchgeführt. Hierbei kann es von Versuch zu Versuch besonders bei den letzten Verdünnungsschritten zu mehr oder weniger starken Konzentrationsverschiebungen gekommen sein, die sich dann wiederum durch die veränderte Wirkung bei gleicher nominaler Konzentration in einer Verschiebung der KWB manifestiert haben.

Betrachtet man das breite Wirkungsspektrum und die auch in höheren Konzentrationsbereichen immer noch messbare Motilität, ist außerdem anzunehmen, dass die Zell- bzw. Mitochondrienfunktion trotz Schadstoffeinwirkung zumindest teilweise aufrecht erhalten werden kann. Möglicherweise ist die Spermazelle bis zu einem gewissen Grad in der Lage, das Rotenon zu entgiften. So wird in einer aktuellen Publikation berichtet, dass menschliche Spermien eine aktive Cytochrom-P450 - Aromatase besitzen (Aquila et al., 2002). Dieses Enzym sorgt für die Umwandlung von Androgenen in Östrogene und wird von P450-Genen codiert. Unterfamilien dieser Genfamilie sind u.a. für den Ab- und Umbau von Xenobiotika verantwortlich. Die Aromatase wurde auch im Sperma anderer Tiere (z.B. vom Haushahn) nachgewiesen. Möglicherweise sind Gene der Cytochrom-P450 - Genfamilien auch in Fischspermien aktiv.

Der wahrscheinliche Hauptgrund für die ungewöhnliche KWB ist jedoch, dass Rotenon zwar den Enzymkomplex I der Atmungskette (NADH-Dehydrogenase) spezifisch hemmt, der Elektronentransport

entlang der Mitochondrienmembran aber durch die Enzymkomplexe II, III und IV der Atmungskette (eingeschränkt) gewährleistet bleibt. Dadurch kann auch der energieliefernde Protonengradient zwischen Cytosol und Mitochondrienmatrix bis zu einem gewissen Grad aufrechterhalten werden. Höhere Rotenon-Konzentrationen führen wahrscheinlich aufgrund zunehmender anderer toxischer Wirkungen des Moleküls zu einer Destabilisierung der Zell- und Organellfunktionen und schließlich zum Zelltod.

4.2.2.2 ATP-Gehalt

Die nach vierstündiger Inkubation gemessene durchschnittliche ATP-Konzentration in den Kontrollansätzen von $7,7 \pm 1,6$ nM/ 10^8 Spz ($n = 15$) entspricht in etwa den in der Literatur gefundenen Angaben. Etwas ältere Quellen geben zwar oft Einzelwerte für frische Karpfenspermaproben von über 10 nM/ 10^8 Spz an (Perchec et al., 1993; Billard et al., 1995; Perchec et al., 1995), aufgrund der geringeren Anzahl an Messdaten (Zahlen beruhen nur auf wenigen verschiedenen Individuen) und etwas unterschiedlicher Meßmethoden, ist ein Vergleich nur bedingt zulässig. Außerdem erreichten Einzelproben aus der vorliegenden Studie ebenfalls Werte um 12 nM/ 10^8 Spz. Eine etwas neuere Studie von Perchec und Mitarbeitern, die neben dem ATP-Gehalt die Motilität der Karpfenspermien mittels CASA testeten, gibt die gemessene ATP-Konzentration mit Werten um 8–9 nM/ 10^8 Spz an (Perchec Poupard et al., 1998). Berücksichtigt man, dass die Spermatozoen in der vorliegenden Arbeit mehrere Stunden gelagert worden waren bevor die ATP-Messung stattfand, sind die etwas geringeren Werte plausibel.

Eine Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Motilitätsrate bzw. VAP-Geschwindigkeit konnte in den Kontrollansätzen nicht nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass eine Differenz von 2–3 nM/ 10^8 Spz keine Unterschiede in den Motilitätseigenschaften der frisch aktivierten Spermien bewirkt. Durch Schadstoffeinwirkung kann sich dies ändern, wie die hohe Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Motilitätsrate nach Behandlung der Zellen mit 4-Nonylphenol (4-NP) aufzeigte. Dies manifestierte sich auch in den ähnlichen EC50-Werten der beiden Endpunkte (um 20 mg/l). Andererseits konnten mit Cadmium (Cd) und Crotonaldehyd (Cro) überhaupt keine Zusammenhänge zwischen diesen beiden Parametern festgestellt werden, da die Konzentrationsbereiche, in denen eine Wirkung messbar war, stark unterschiedlich lagen. Mit Rotenon (Rot) war zwar eine Korrelation messbar, diese war jedoch aufgrund einiger „Ausreißer“ (hohe Motilitätsrate trotz relativ geringer ATP-Konzentration) und der Tatsache, dass der ATP-Gehalt auch bei sehr hoher Schadstoffeinwirkung nicht ganz auf Null sank, nur schwach ausgeprägt.

Von den ausgewählten Chemikalien reduzierte 4-NP als einzige Testsubstanz - wahrscheinlich aufgrund der entkoppelnden Wirkung als Protonophor - den ATP-Gehalt der Spermien auf Null. Rotenon hatte

durch seine spezifische Wirkung auf die Atmungskette zwar die größte Wirkung auf den ATP-Gehalt (mit 334 µg/l deutlich niedrigster EC50-Mittelwert in den ATP-Versuchen), war aber auch nicht in der Lage, die zellinternen ATP-Speicher bzw. seine Restproduktion komplett zu zerstören. Der im Vergleich zum Endpunkt Motilitätsrate um ca. den Faktor 10 höhere EC50-Wert zeigte, dass sich die Schadstoffwirkung von Rotenon nicht allein auf die Reduzierung der ATP-Speicher und -Quellen beschränkt, sondern besonders den Bewegungsapparat betrifft.

Die unspezifische Wirkung von Cadmium führte neben dem gleichen Effekt bezüglich des Restgehalts an ATP zu etwas höheren EC50-Werten als beim Endpunkt Motilitätsrate (53 mg/l vs. 8,4 mg/l). Fast um den Faktor 1000 höher lag der EC50-Wert beim Endpunkt ATP-Gehalt mit Crotonaldehyd (11,7 g/l). Die reaktive Wirkung dieser Substanz führte offenbar schnell zu einer (möglicherweise externen) Blockade des Bewegungsapparats, wirkte aber aufgrund der geringen Fettlöslichkeit weniger auf den membrangebundenen Stoffwechsel.

Die Reproduzierbarkeit der Werte war insgesamt besser als beim Endpunkt Motilitätsrate. Mit Ausnahme der Rotenon-Versuche, die ähnlich wie in den Testreihen zur Motilität großen Schwankungen unterlagen, wurden niedrige Variationskoeffizienten von unter 15% gemessen.

4.2.2.3 Membranintegrität

Bezüglich der Empfindlichkeit ergab sich bei diesem Endpunkt in dieser Phase der Substanztests ein eher uneinheitliches Bild. So wurde zwar mit 4-NP ein EC50-Wert (1,6 mg/l) ermittelt, der deutlich unter denen der beiden anderen Endpunkte lag (ca. Faktor 10), mit Cadmium konnte jedoch überhaupt keine KWB nachgewiesen werden. Die gemessenen Reaktionen auf die anderen beiden Substanzen sind eher als unempfindlich einzustufen.

Die Versuche mit Crotonaldehyd ergaben einen ähnlich hohen EC50-Wert (10,2 g/l) wie beim Endpunkt ATP-Gehalt. Die geringe permeabilisierende Wirkung ist aufgrund der schwach ausgeprägten Lipophilie (kleiner log P_{ow}) nicht überraschend. Überraschend war jedoch, dass mit Cadmium auch in höchster Konzentration keine DNA-Färbung durch Bis-benzimid stattfand. In Phase 1 war zwar eine Wirkung nur an nativen Sterletspermien ermittelt worden, dass mit kryokonservierten Karpfenspermien hingegen keine Reaktion messbar war, wurde den durch den Einfrier- und Auftauprozess veränderten Zelleigenschaften zugeschrieben. Eventuell reagierten Sterletspermien etwas anders als Karpfenspermien auf eine Cadmium-Exposition, möglicherweise waren aber in der 1. Phase der Toxizitätstests auch Artefakte während der Messung an Sterletspermien aufgetreten. Die molekulare Wirkung von Cadmium beruht im allgemeinen auf der Verdrängung von an Proteinen gebundenen zweiwertigen Metallionen

(z.B. Cu(II) oder Zn(II) an Metallothionein). Wenn die Bindungskapazität der Apoproteine überschritten wird, kommt es zu unspezifischen toxischen Wirkungen in der Zelle (Fent, 1998). Diese toxischen Wirkungen manifestieren sich offensichtlich nicht über die Integrität der Zellmembran bzw. ihre Permeabilisierung.

Die technisch messbare Wirkung von Rotenon beschränkte sich hier im Gegensatz zu den beiden anderen Endpunkten auf die Membran-Destabilisierung und -Permeabilisierung. Dadurch liegt der ermittelte EC50-Wert trotz eines größeren Lösemittelanteils (5% im Vergleich zu 2,5% DMA) auch deutlich höher (Faktor 100–1000). Die unspezifische, permeabilisierende Wirkung von 4-NP führte hingegen in dieser Phase der Testentwicklung zu leichten Sensitivitätsvorteilen beim Endpunkt Membranintegrität gegenüber Motilitätsrate und ATP-Gehalt.

4.2.3 Phase 3

In dieser letzten Phase der ökotoxikologischen Studie wurden neben den Tests mit nativen Zellen auch umfangreiche Versuche mit kryokonservierten Karpfenspermien zu den Endpunkten ATP-Gehalt und Membranintegrität durchgeführt. Die Testdesigns wurde so aneinander angeglichen, dass die Ergebnisse für native und kryokonservierte Zellen vergleichbar sind. Nach der Inkubation mit dem Testgut bzw. vor der Messung der Endpunkte wurden die Zellen gewaschen (abzentrifugiert und resuspendiert), um Effekte auf die Messung durch die Testsubstanzen zu minimieren.

4.2.3.1 Motilitätsrate

Die Sensitivität der Testmethode wurde durch die Einführung des Waschschritts deutlich erhöht: Mit allen vier Testsubstanzen wurden niedrigere EC50-Werte als in Phase 2 ermittelt (Faktor 3 (Cd) – Faktor 400 (Rot)). Dies war eigentlich nicht zu erwarten gewesen, da vermutet wurde, dass die relativ hohen Konzentrationen der Testsubstanzen in den ungewaschenen Ansätzen während der Messung der Motilität zu einer zusätzlichen Beeinträchtigung der Motilitätsrate führen und somit die Empfindlichkeit eher heraufsetzen würden. Dennoch war in Phase 3 bei zunächst gleicher nominaler Konzentrationsreihe eine wesentlich steilere Abnahme der Motilitätsrate gemessen worden.

Eine Erklärung für diesen Effekt lässt sich nur vermuten. Wie berichtet, führte das Zentrifugieren und Resuspendieren der inkubierten Zellen zu einer Abnahme der Motilitätsrate im Vergleich zur Phase 2 um durchschnittlich 12 Prozentpunkte (Messzeitpunkt: 20 s nach Aktivierung) in den Kontrollen. Möglicherweise setzte der Waschprozess die Motilität der Chemikalien-behandelten und empfindlichen

Zellen noch stärker als in den Kontrollen herab, wobei sich dieser Effekt dann mit steigender Konzentration - je nach Substanz mehr oder weniger - potenziert haben könnte.

Im Vergleich zu den beiden anderen Endpunkten lieferte der Endpunkt Motilitätsrate bei allen vier Testsubstanzen die mit Abstand sensitivsten Ergebnisse. Am geringsten fielen die Unterschiede zum ATP-Gehalt und zur Membranintegrität beim 4-NP (max. Faktor 4) aus, am deutlichsten beim Crotonaldehyd (Faktor 100–10.000). Allerdings waren die Schwankungen zwischen den einzelnen Testreihen beim Endpunkt Motilitätsrate am größten. Der durchschnittliche Variationskoeffizient (Phase 2 und 3 zusammen) lag inklusive der Rotenon-Versuche bei etwa 75%; ohne diese stark schwankenden Versuche bei ca. 40%. Letzterer Wert wäre für Ringtest-Verhältnisse zwar akzeptabel, ist aber für Testreihen aus einem Labor zu hoch. Die starken Schwankungen hängen möglicherweise mit den Messkammern zusammen, deren Kontamination durch die Testsubstanzen nicht verhindert werden konnte. Rückstände von Verunreinigungen konnten trotz intensiver Reinigung der Kammern nicht immer ausgeschlossen werden. Abhilfe könnten Einweg-Messkammern schaffen.

4.2.3.2 ATP-Gehalt

Die ATP-Konzentration der frischen Spermien in den Kontrollen verringerte sich im Vergleich zur Phase 2 nur geringfügig durch den Waschprozess. Ähnlich wie beim Endpunkt Motilitätsrate, nur nicht im gleichen Ausmaß, erhöhte sich die Sensitivität des Endpunkts durch den eingeführten Waschschrift (Faktor 2 (Cro) – Faktor 30 (Rot)). Als mögliche Erklärung kann auch hier nur eine konzentrations- und substanzabhängig erhöhte Empfindlichkeit der behandelten und anschließend zentrifugierten Zellen angeführt werden. Die Erhöhung der Sensitivität nach dem Waschen spricht gegen eine zu vermutende Hemmung der an der Messreaktion beteiligten Enzyme (Luziferase) durch die Testsubstanzen.

Mit Ausnahme des Cadmiums wurde der ATP-Gehalt durch die Testsubstanzen in entsprechenden Konzentrationen fast auf Null reduziert. Dies war in Phase 2 nur mit 4-NP der Fall gewesen und lässt sich wiederum durch die Einführung des Waschschrifts erklären. Denkbar ist, dass in Phase 2 freies ATP, welches aus geschädigten Zellen ins Seminalplasma ausgetreten ist, bei der ATP-Messung dann auch nachgewiesen wurde. Dieses freie ATP ist in Phase 3 durch den Waschprozess eliminiert worden und während der Messung nicht mehr vorhanden gewesen. Warum wurde jedoch in Phase 2 kein freies, extrazelluläres ATP in den Versuchen mit 4-NP nachgewiesen? Aufgrund seiner starken protonophoren Wirkung und der Reduzierung der Protonengradienten verhindert 4-NP möglicherweise die Neubildung von ATP. Nach Ablauf der Expositionszeit war dann in den Ansätzen mit hohen 4-NP - Konzentrationen eventuell kein ATP mehr vorhanden, welches aus der Zelle hätte austreten können.

Gegen diese Theorie scheinen die Versuche zum ATP-Gehalt mit aufgetauten und gewaschenen Karpfenspermien zu sprechen. Ähnlich wie in Phase 2 konnte hier mit Cadmium, Crotonaldehyd und Rotenon auch in höchsten Konzentrationen keine totale Reduzierung des ATP-Gehalts erzielt werden. Eine Restkonzentration von $0,1 \text{ nM}/10^8$ Zellen blieb in diesen Fällen immer erhalten. Diese sehr geringe Konzentration konnte jedoch auch bei frischen Spermien der Phase 3 von keiner Substanz unterschritten werden. Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt, ist dieser Wert im Bereich des Messfehlers der Methode anzusiedeln. Berücksichtigt man, dass in der Kontrolle mit $0,75 \text{ nM}/10^8$ Spz nur noch etwa ein Zehntel der ATP-Konzentration der nativen Spermien vorhanden war, wird deutlich, dass der Messfehler bei den aufgetauten Spermien wesentlich stärker ins Gewicht fällt. Zieht man diesen Messfehler vom jeweiligen Ergebnis ab, würden sich die EC50-Werte der aufgetauten Karpfenspermien für Cadmium, Crotonaldehyd und Rotenon nochmals etwas reduzieren.

Die aufgetauten Zellen waren im Vergleich zu den nativen Spermien sensitiver gegenüber den Testsubstanzen. Die EC50-Werte lagen, vor allem unter Berücksichtigung des oben bezüglich des Messfehlers Erwähnten, unter denen für die nativen Spermatozoen ermittelten Zahlen. Dieser Effekt war kaum oder nur gering mit den Substanzen 4-NP, Rotenon und Cadmium ausgeprägt, dafür aber umso stärker mit Crotonaldehyd (ca. Faktor 60). Hierbei ist anzunehmen, dass das eigentlich lipophile Crotonaldehyd durch die kryogeschädigten Membranen in das Innere der Zellen dringen konnte und dort durch seine Reaktivität noch größere Giftigkeit entfalten konnte. Das als internes Kryoprotektivum zugesetzte DMA hat möglicherweise das Eindringen von Crotonaldehyd und Cadmium in die Zelle zusätzlich erleichtert. Da es während der Exposition nur in Konzentrationen von unter 1% vorhanden war, hatte es hingegen auf die Membrangängigkeit von Rotenon (Lösevermittler: 2,5% DMA) und 4-NP (1% DMA) wahrscheinlich keinen Einfluss.

Kolossa & Seibert (1991) berichteten von einer hohen Korrelation ($r = 0,989$) der EC20-Werte des Endpunkts ATP-Gehalt von frischen und kryokonservierten Rinderspermien. Sie hatten fünf verschiedene Substanzen getestet: Antimycin, Digitonin, SDS, Ethanol und DMSO. Dennoch ist anzunehmen, dass mögliche Unterschiede in der Sensitivität von frischen und aufgetauten Zellen weniger auf die Spermienart als vielmehr auf die Behandlung der Spermien und die Wirkungsweisen der Chemikalien zurückzuführen sind.

Obwohl das Messfenster für die KWBs mit ATP-Konzentrationen zwischen $0,1$ und $1,0 \text{ nM}/10^8$ Zellen vergleichsweise klein war und der angesprochene Messfehler sich dadurch stärker auswirkte, konnten die EC50-Werte besser reproduziert werden als mit frischen Zellen. Der durchschnittliche Variationskoeffizient lag bei 25%, wohingegen er bei den frischen Spermien durch die starken Schwankungen in den Rotenon-Versuchen fast 40% betrug (ohne Rotenon: 20%).

4.2.3.3 Membranintegrität

Die Angleichung der Testmethoden führte dazu, dass neben Cadmium auch Rotenon nicht mehr in den Versuchen zur Membranintegrität eingesetzt werden konnte. Nachdem der Lösemittelzusatz (DMA) von 5% auf 2,5% reduziert und der Waschschrift nach Ende der Exposition durchgeführt worden war, konnten mit Rotenon in Konzentrationen bis 200 mg/l keine Wirkungen auf die Membranintegrität ermittelt werden (EC₅₀ in Phase 2: 22 mg/l). Hierbei ist nicht genau zu klären, welche Ursache dafür in Frage kommt. Wahrscheinlich ist jedoch, dass die Anwesenheit von DMA in der Inkubationskonzentration von 2,5% der Phase 2 dazu führte, dass Rotenon eine verstärkte membranpermeabilisierende Wirkung auf die Spermien ausüben konnte. Möglicherweise führte die erhöhte DMA-Konzentration zu einem Anlösen und einer Destabilisierung der Membranen, die es Rotenon erst ermöglichte, konzentrationsabhängig toxische und permeabilisierende Wirkungen zu entfalten und die DNA-Färbung durch Bis-benzimid zu gewährleisten. Bei Inkubationskonzentrationen von 1,25%, wie sie in Phase 3 vorlagen, war der destabilisierende Effekt des DMA eventuell nicht ausreichend, um die Wirkungen des Rotenons zu vermitteln. Ein möglicher Zusammenhang dieses Phänomens mit dem neu-eingeführten Waschschrift scheint hingegen abwegig zu sein.

Mit den beiden verbliebenen Substanzen änderte sich bezüglich der Sensitivität des Endpunkts sowohl im Vergleich zur Phase 2 als auch beim Vergleich nativer und aufgetauter Zellen relativ wenig. Bemerkenswert ist allerdings die Erhöhung des EC₅₀-Wertes für 4-NP von 1,6 mg/l in Phase 2 auf 7,1 mg/l in Phase 3. In fast allen anderen Fällen kam es durch die Einführung des Waschschrifts zu einer Steigerung der Sensitivität - hier ist es umgekehrt. Möglicherweise ist die Anwesenheit von DMA in bestimmten Konzentrationen auch hier der Grund für die Färbung der DNA. Für diese Annahme spricht auch, dass in den Versuchen mit aufgetauten Spermien, in denen wiederum etwas mehr DMA vorhanden war, die EC₅₀ für 4-NP mit 4,7 mg/l niedriger lag. 4-NP ist ähnlich hydrophob wie Rotenon und kann aufgrund der Polarität und der relativ geringen Molekülgröße Membranen leicht passieren. Wie bereits an anderer Stelle vermutet, erleichtert DMA bei diesen hydrophoben und polaren Substanzen konzentrationsabhängig die Membrangängigkeit und führt dadurch zu einer erhöhten Permeabilisierung bzw. toxischen Wirkung der Substanzen. Dies ermöglicht wiederum Bis-benzimid, in die Zelle bzw. in den Zellkern einzudringen und DNA anzufärben. Dass DMA allein für die erhöhte Permeabilisierung bzw. DNA-Färbung verantwortlich sein könnte, wird durch die Kontrollansätze ausgeschlossen, in denen immer die entsprechende Konzentration DMA ohne Schadstoff zugesetzt war.

In den Crotonaldehyd - Tests mit aufgetauten Spermien war eine deutliche Sensitivitätssteigerung gegenüber nativen Zellen zu verzeichnen. Wie beim ATP-Gehalt ist als Grund für diese erhöhte toxische Wirkung zu vermuten, dass das lipophobe und reaktive Crotonaldehyd durch die vom Kryoprozess

geschädigten Membranen leichter in die Zellen eindringen und hier zusätzlichen Schaden ausüben konnte.

Der Endpunkt Membranintegrität hatte mit einem durchschnittlichen Variationskoeffizienten von ca. 20% die vergleichsweise niedrigsten Schwankungen aufzuweisen. Diese gute Reproduzierbarkeit ist durch den Einsatz von Mikrotiterplatten begünstigt worden. Hiermit konnten im Gegensatz zu den beiden anderen Endpunkten viele Parallelmessungen gleichzeitig durchgeführt werden.

4.2.4 Vergleich mit standardisierten aquatischen Testverfahren

In Tabelle 16 sind die EC-Literaturwerte für die vier hier hauptsächlich verwendeten Chemikalien aus den standardisierten aquatischen Testverfahren mit Fischen, Daphnien und Algen sowie aus anderen relevanten Tests aufgeführt. Wenn mehrere Werte unter gleichen Bedingungen zu einem Test vorlagen waren, wurde nur der niedrigste EC-Wert herangezogen. Zum Vergleich sind die aus der vorliegenden Arbeit in Phase 3 der ökotoxikologischen Testung ermittelten Werte nochmals angegeben (grau unterlegt).

Auf den ersten Blick scheinen die ermittelten EC-Werte auf eine im Vergleich zu den anderen Testverfahren geringere Empfindlichkeit der Fischspermien hinzudeuten. Beim Cadmium und beim Nonylphenol liegen die Werte mehr oder weniger deutlich über denen aus den Fisch-, Daphnien- oder Algentests. Gleiches gilt auch beim Crotonaldehyd für die Endpunkte ATP-Gehalt und Membranintegrität. Beim Rotenon hingegen kann zumindest der ATP-Gehalt mit dem Fisch- und Daphnientest mithalten. Hier ist jedoch besonders die enorm hohe Empfindlichkeit des Endpunkts Motilitätsrate hervorzuheben: der EC50-Wert liegt um den Faktor 50–100 niedriger als bei den etablierten Testverfahren und zeigt, wie spezifisch Rotenon auf die Spermien wirkt.

Betrachtet man die Motilitätsrate allein und berücksichtigt, dass die Inkubation mit dem Testgut im Vergleich zu den Fisch-, Daphnien- und Algentests unter ungünstigeren Bedingungen stattgefunden hat (Eisbad gegenüber Raumtemperatur) sowie wesentlich kürzer war (4 h gegenüber 24–96 h), dann ist diesem Endpunkt, zumindest bezüglich dieser vier Substanzen, eine sehr hohe Sensitivität zuzuschreiben. Der Endpunkt Motilitätsrate ist außer beim Rotenon auch beim Crotonaldehyd mindestens ebenso empfindlich wie die Endpunkte der anderen Tests. Wie die Ergebnisse aus Phase 1 mit Cd und 3,5-DCP bei unterschiedlichen Expositionszeiten zeigen, ist bei gleichen Expositionsbedingungen anzunehmen, dass auch mit Cd und 4-NP (ähnliche Wirkweise wie 3,5-DCP) gleiche oder sogar niedrigere EC-Werte als in den Standard-Tests erzielt würden.

Tabelle 16: Einzelstofftests: Vergleich der EC-Werte mit standardisierten Testsystemen

Substanz	Testart	Organismus	Endpunkt	Expositions- bedingungen	EC50 (mg/l)	Quelle ¹
Cadmium	Fisch	<i>O. mykiss</i>	Mortalität	48h/19–21°C	0,15	[1]
	Daphnien	<i>D. magna</i>	Schwimmfähigkeit	48h/18–22°C	0,046	[1]
	Algen	<i>S. subspicatus</i>	Zellvermehrung	48h/21–25°C	0,15	[2]
	RTG2-Zelllinie	<i>O. mykiss</i>	Zelltod	20h/19–21°C	44	[3]
	Fischspermien	<i>C. gariepinus</i>	Geschwindigkeit	24h/Eis	LOEC: 100	[4]
Fischspermien	<i>C. carpio</i>	Motilitätsrate (nativ)	4h/Eis	2,5	[5]	
		ATP-Gehalt (nativ)	4h/Eis	18	[5]	
		ATP-Gehalt (kryo.)	4h/Eis	5,7	[5]	
Nonylphenol	Fisch	<i>O. latipes</i>	Mortalität	48h/19–21°C	0,9	[6]
	Fisch	<i>O. mykiss</i>	Mortalität	96h/19–21°C	0,23–0,92	[7]
	Daphnien	<i>D. magna</i>	Mortalität	48h/18–22°C	0,44	[7]
	Daphnien	<i>D. magna</i>	Schwimmfähigkeit	24h/18–22°C	0,18	[8]
	Algen	<i>S. capricornutum</i>	Zellvermehrung	96h/21–25°C	LOEC: 1,5	[9]
	Einzeller	<i>T. pyriformis</i>	Zellvermehrung	24h/26–28°C	0,46	[10]
Fischspermien	<i>C. carpio</i>	Motilitätsrate (nativ)	4h/Eis	2,3	[5]	
		ATP-Gehalt (nativ)	4h/Eis	3,5	[5]	
		ATP-Gehalt (kryo.)	4h/Eis	2,2	[5]	
		Membranint. (nativ)	4h/Eis	8,6	[5]	
		Membranint. (kryo)	4h/Eis	4,7	[5]	

Fortsetzung Tabelle 16

Substanz	Testart	Organismus	Endpunkt	Expositionsbedingungen	EC50 (mg/l)	Quelle ¹
Crotonaldehyd	Fisch	<i>P. promelas</i>	Mortalität	48h/19–21°C	0,84	[11]
	Fisch	<i>O. mykiss</i>	Mortalität	96h/19–21°C	0,65	[11]
	Daphnien	<i>D. magna</i>	Mortalität	48h/18–22°C	2,0	[7]
	Daphnien	<i>D. magna</i>	Schwimmfähigkeit	24h/18–22°C	3,9	[8]
	Algen	k. A.	Zellvermehrung	72h/21–25°C	0,88	[11]
Fischspermien		<i>C. carpio</i>	Motilitätsrate (nativ)	4h/Eis	0,7	[5]
			ATP-Gehalt (nativ)	4h/Eis	5100	[5]
			ATP-Gehalt (kryo.)	4h/Eis	83	[5]
			Membranint. (nativ)	4h/Eis	7100	[5]
			Membranint. (kryo)	4h/Eis	1300	[5]
Rotenon	Fisch	<i>P. promelas</i>	Mortalität	96h/19–21°C	0,006	[12]
	Fisch	<i>O. mykiss</i>	Mortalität	96h/19–21°C	0,005	[12]
	Daphnien	<i>D. magna</i>	Schwimmfähigkeit	48h/18–22°C	0,008	[12]
Fischspermien		<i>C. carpio</i>	Motilitätsrate (nativ)	4h/Eis	0,00009	[5]
			ATP-Gehalt (nativ)	4h/Eis	0,010	[5]
			ATP-Gehalt (kryo.)	4h/Eis	0,012	[5]

¹ Die Quellenangabe zu den Chemikalien-Informationen befindet sich hinter dem Literaturverzeichnis

Beim Cadmium fallen die vergleichsweise hohen EC50-Werte aus dem RTG2-Zelllinien-Test sowie aus dem Kiemensackwels (Catfish)-Spermientest nach Kime et al. (1996) auf. Bezüglich letzterem ist der deutlich höhere EC50-Wert im Vergleich zur vorliegenden Arbeit zu diskutieren. Es ist nicht genau zu klären, ob die höheren EC-Werte auf eine geringere Empfindlichkeit, auf andere Testbedingungen oder auf den Endpunkt (Geschwindigkeit vs. Motilitätsrate) zurückzuführen sind. Da die hier mit Karpfenspermien angewendeten Expositionsbedingungen jedoch ungünstiger waren (4 h vs. 24 h) und die in Phase 1 mit Cadmium für die VAP-Geschwindigkeit ermittelten EC50-Werte trotz der schlechteren Bedingungen ebenfalls niedriger lagen (37 mg/l vs. > 100 mg/l), ist von einer geringeren Empfindlichkeit der Catfish-Spermien zumindest gegenüber Cadmium auszugehen. Dass dies nicht generelle Gültigkeit

hat, zeigen die Ergebnisse einer aktuellen Studie zur Wirkung von TBT auf Karpfen- und Catfish-Spermien (Rurangwa et al., 2002). Gegenüber dieser Substanz waren letztere bezüglich Motilität und ATP-Gehalt empfindlicher als die Karpfenspermien.

Zieht man die ermittelten EC50-Werte zu den Chemikalien aus Phase 1 (außer Cd auch 3,5-DCP, SDS und Digitonin) heran, können weitere Vergleiche zwischen der Motilitätsrate und den standardisierten Testverfahren sowie zum Zelllinien-Test und zum Testverfahren mit kryokonservierten Rinderspermien angestellt werden. Mit Ausnahme von SDS, dessen Wirkung auf die Motilitätsrate nur einmal mit Sterletspermien getestet wurde, ist die Empfindlichkeit der Fischespermien auch mit diesen Substanzen auf einem ähnlichen Niveau oder höher. Beim 3,5-DCP lag der EC50-Wert für die Motilitätsrate von Karpfenspermien mit 2,8 mg/l (4 h / Eis) auf gleichem Niveau wie im Fisch- (3,5 mg/l; Smith et al., 1994) bzw. Daphnientest (2,1 mg/l; Devillers et al., 1987) und deutlich niedriger als beim Zelllinien-Test (21 mg/l; Brauer et al., 1997). Beim Digitonin zeigte der Endpunkt Motilitätsrate von frischen Sterletspermien mit einem EC50-Wert von 22 mg/l (2 h / RT) eine ähnliche Empfindlichkeit wie die Motilität von kryokonservierten Rinderspermien (EC20: ca. 10 mg/l (1 h / 37°C); Kolossa & Seibert, 1991).

Das toxikologische Modell mit kryokonservierten Rinderspermien wurde bereits Ende der 1980er Jahre entwickelt und in den 1990er Jahren in einem Forschungsvorhaben des Umweltbundsamtes mit 44 Chemikalien auf Eignung zum Nachweis der Umweltgefährlichkeit von Stoffen überprüft (Nehring et al., 1994). Zum Einfrieren wurden die frischen Spermien über 5 Stunden mit einem Kryomedium bestehend aus 11%iger Laktoselösung (80%) und Eidotter (20%) equilibriert. Kurz vor dem Einfrieren wurde Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 4% zugesetzt. Nach dem Auftauen bei 37°C und Verdünnung mit einem Inkubationsmedium (69 mM Glucose, 78 mM Na-Citrat, pH 7,0) wurden Motilitätsraten von 30–60% gemessen. Die so aufgetauten Spermien wurden mit den Chemikalien für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Motilität mit einem CASA-System bestimmt. Dabei erwies sich die Spermengeschwindigkeit gegenüber den anderen getesteten Parametern (Anteil motiler und linear motiler Zellen, Membranintegrität) als der empfindlichste Endpunkt. Im Vergleich zu standardisierten Testsystemen mit Fischen, Daphnien, Algen, Einzellern und Hefen zeigten die Rinderspermien ein besonderes Schadstoffverhalten. Die ermittelten EC50-Werte lagen jedoch überwiegend auf einem höheren Niveau. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass das getestete Modell grundsätzlich für den Einsatz in der Ökotoxikologie geeignet sei, aber für eine umfassende Nutzung bzw. einen routinemäßigen Einsatz noch erheblicher weiterer Forschungsbedarf bestünde. Sie empfahlen u.a., spermatologisch-biochemische Messparameter wie den intrazellulären Adeninnukleotid (ATP, ADP, AMP, cAMP)-Gehalt zur Steigerung der Empfindlichkeit einzubeziehen. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit war die Vitalität der Zellen nach dem Auftauen recht instabil. Als maximale Expositionszeit gaben sie zwei

Stunden an und empfohlen, dies vor dem Hintergrund der gewünschten Sensitivitätssteigerung ebenfalls zu überprüfen. Als weiteren kritischen und nachzuprüfenden Punkt wiesen sie auf den hohen Proteinanteil im Kryomedium hin, der möglicherweise Chemikalien adsorbiert und dadurch das Testergebnis beeinflussen kann.

Gegenüber dem hier vorgestellten Modell mit Fischspermien hat das Rinderspermienmodell den Vorteil, dass kryokonservierte Zellen im Test zum Endpunkt Motilität eingesetzt werden können. Möglicherweise verhindern jedoch die für Rindersperma eingesetzten Kryomedien einen empfindlichen Toxizitätstest. Abgesehen von der geringeren ökologischen Relevanz von Rinderspermien für aquatische Testsysteme scheinen die Zellen auch unempfindlicher als Fischspermien gegenüber Schadstoffen zu reagieren. Ein direkter Vergleich ist jedoch aufgrund zu geringer Datengrundlage nicht möglich.

Um die beschriebenen Ergebnisse mit dem Bitterfeld-Abwasser (s. Tabelle 15, S. 101) mit den Daten aus den standardisierten Verfahren vergleichen zu können, wird hier als Toxizitätskriterium (G-Wert) die Verdünnungsstufe herangezogen, bei der die Motilitätsrate bzw. der ATP-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle wenigstens 70% reduziert erreicht (Hemmung $\leq 30\%$). Es zeigt sich, dass die Motilitätsrate der nativen Karpfenspermien gegenüber den meisten anderen Verfahren empfindlicher reagierte oder mindestens genauso empfindlich war (Tabelle 17). Ähnliche Wirkschwellen wie in den etablierten Verfahren wurden mit dem Endpunkt ATP-Gehalt ermittelt. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die Versuche nicht wiederholt und beim Endpunkt Motilitätsrate die Verdünnungsstufen $G = 256 + 1024$ nicht getestet wurden. Dennoch ist unter Berücksichtigung der Expositionsbedingungen und der Tatsache, dass bei Zugrundelegung einer 20%igen Hemmung der G-Wert = 2028 betragen würde, anzunehmen, dass der Endpunkt Motilitätsrate vergleichsweise am sensitivsten ist.

Zum Endpunkt ATP-Gehalt ist insgesamt zu bemerken, dass mit Ausnahme der Crotonaldehyd-Ergebnisse die Empfindlichkeit in einem akzeptablen Rahmen liegt. Besonders die Werte mit kryokonservierten Proben zeigen eine relativ hohe Empfindlichkeit an. Auch hier gilt das gleiche wie für die Motilitätsrate: die Expositionsbedingungen waren wesentlich ungünstiger als in den Standard-Verfahren; bei gleicher Expositionszeit und gleichen Temperaturen sind deutlich niedrigere EC50-Werte zu erwarten.

Aufgrund der geringen Datenlage ist ein Vergleich des Endpunkts Membranintegrität mit den anderen Verfahren nur unzureichend möglich. Eine relativ niedrige Empfindlichkeit ist jedoch nicht zu übersehen.

Tabelle 17: Bitterfeld-Abwasser: Vergleich der G-Werte mit standardisierten Testverfahren

Testgut	Testart	Organismus	Endpunkt	Expositionsbedingungen	G-Wert	Quelle ¹
Abwasser	Fisch	<i>L. idus</i>	Mortalität	48h/19–21°C	64–192 ²	[13]
	Fischeier	<i>D. rerio</i>	Embryomortalität	48h/25–27°C	24–256 ³	[13]
	Daphnien	<i>D. magna</i>	Schwimmfähigkeit	48h/18–22°C	96 ³	[13]
	Leuchtbakterien	<i>P. phosphoreum</i>	Leuchthemmung	0,5h/15°C	> 256 ⁴	[13]
Fischspermien	<i>C. carpio</i>	Motilitätsrate (nativ)	4h/Eis	512 ^{4,5}	[5]	
		ATP-Gehalt (nativ)	4h/Eis	128 ⁴	[5]	
		ATP-Gehalt (kryo.)	4h/Eis	256 ⁴	[5]	

¹ Die Quellenangabe zum Abwasser-Ringtest befindet sich hinter dem Literaturverzeichnis

² Verdünnungsstufe, bei der alle Fische überleben

³ Verdünnungsstufe, bei der die Hemmung des Endpunkts im Vergleich zur Kontrolle $\leq 10\%$ ist

⁴ Verdünnungsstufe, bei der die Hemmung des Endpunkts im Vergleich zur Kontrolle $\leq 30\%$ ist

⁵ G = 256 + 1024 wurden nicht getestet

4.2.5 Abschließende Bewertung der Testverfahren

Für alle hier vorgestellten Methoden zur Ermittlung toxischer Wirkungen gilt, dass es sich um Ersatzmethoden zu Tierversuchen handelt, da keine ganzen Organismen zum Einsatz kommen, sondern lediglich ihre Gameten. Beim fachgerechten Abstreifen des Spermas kommen die Fische nicht zu Schaden und können innerhalb einer Minute wieder ins Wasser zurück gesetzt werden.

Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass sich eine hormonelle Stimulierung (Hypophysierung) der Fische günstig auf die Spermagewinnung auswirkt. Für die Hypophysierung werden den Fischen in der Regel 24 h vor dem geplanten Abstreifen mit einer dünnkanuligen Spritze Hypophysenextrakte (1–2 mg/kg) unter die Haut bzw. in die Muskulatur gespritzt, wobei das einzelne Tier kurzzeitig aus dem Wasser genommen wird. Diese Hypophysen stammen in der Regel von geschlachteten Speisefischen. Die injizierten Hormone greifen in den natürlichen Stoffwechsel des Fisches ein und verändern diesen. Die Notwendigkeit der Hypophysierung ist vor dem Hintergrund des Tierschutzgesetzes zu begutachten.

Für Karpfen gilt im allgemeinen, dass sie bei Warmwasserhälterung ganzjährig zur Laichreife gebracht werden können. Zur Sicherstellung der Verfügbarkeit kann jedoch nicht vollständig auf die Unterstützung durch Hypophysenextrakte verzichtet werden. Letzteres gilt sogar während der Laichzeit für die meisten anderen in Aquakulturen gehaltenen Fischarten, so auch für den Sterlet. Auch die beschriebenen Schwierigkeiten bei der Zucht der Tiere sowie die relativ lange Entwicklungsphase bis zur

Laichreife machen das Sperma vom Sterlet im Vergleich zu dem des Karpfens weniger qualifiziert für den angestrebten Toxizitätstest.

Dass sogar GREENPEACE auf einem aktuellen Poster („Welcher Fisch darf auf den Tisch?“) den Karpfen als „anspruchlos“ einstuft und seine Zucht „auch in konventionellen Betrieben“ für „eher unproblematisch“ hält, qualifiziert das Sperma dieser Fischart neben seinen erwähnten Qualitäten auch unter ökonomischen, ökologischen und ethischen Gesichtspunkten als gut geeignet.

4.2.5.1 Motilitätsrate

Das hier in Phase 3 angewendete Verfahren zur Ermittlung der Motilitätshemmung bei nativen Karpfenspermien hat sich als überaus empfindliche Methode zum Nachweis toxischer Wirkungen von Substanzen unterschiedlichsten Typs erwiesen. Trotz relativ kurzer Expositionszeit von vier Stunden und niedrigen Inkubationstemperaturen (Eisbad) wurden mit den vier Testsubstanzen EC50-Werte ermittelt, die im Vergleich zu etablierten Verfahren in einem ähnlichen Bereich (Cadmium, Nonylphenol, Crotonaldehyd) oder sogar deutlich darunter (Rotenon) lagen. Die Testung einer Abwasserprobe aus Bitterfeld ergab ein ähnlich sensitives Ergebnis. Durch Erhöhung der Inkubationstemperatur und/oder Verlängerung der Expositionsdauer sind weitere Sensitivitätssteigerungen möglich. Für einen schnellen und gleichzeitig empfindlichen Test sind kurzzeitige Inkubationen von frischen Karpfenspermien über 30–120 min bei Raumtemperatur denkbar und würden möglicherweise noch niedrigere EC50-Werte liefern. Die Empfindlichkeit des Endpunkts sollte durch die Messung von weiteren ausgewählten Substanzen und Abwasserproben genauer charakterisiert werden.

Leider konnten im Rahmen dieser Untersuchungen keine Toxizitätstests mit kryokonservierten Zellen zum Endpunkt Motilitätsrate vorgenommen werden. Erfolgreiche Tests mit aufgetauten Spermien würden sicherlich die Praktikabilität der Methode im Hinblick auf eine einfachere Verfügbarkeit von qualitativ einheitlichen Proben erhöhen. Auch wenn es während der vorliegenden Studie nicht gelang, die Spermien so zu konservieren, dass die Qualität nach dem Auftauen über einen längeren Zeitraum (> 0,5 h) stabil blieb, scheint dieses Ziel nicht unerreichbar zu sein. Die bereits zitierten Ergebnisse aus jüngeren Studien von Linhart et al. (2000) und Lahnsteiner et al. (2000) sowie von Linhart & Cosson (1997) lassen hoffen, dass nicht nur die Motilitätsrate von kryokonservierten Karpfenspermien auf über 50% gesteigert werden kann, sondern dass durch geeignete Behandlung nach dem Auftauen auch die Qualität über einen längeren Zeitraum stabil gehalten werden kann.

Jedoch ist aufgrund der leichten und ganzjährigen Verfügbarkeit von frischem Karpfensperma an dieser Stelle die grundsätzliche Notwendigkeit des Einsatzes von kryokonservierten Proben zu überdenken.

Zwar ist eine weitere Steigerung der Sensitivität der Zellen durch den Einfrier- und Auftauprozess anzunehmen, doch ist eine solche vor dem Hintergrund der aktuellen Erkenntnisse nicht unbedingt notwendig bzw. kann durch andere Maßnahmen (s.o.) erzielt werden. Auch ist die generelle Akzeptanz eines solchen Toxizitätstests mit kryokonservierten Zellen aufgrund verminderter ökologischer Relevanz in Frage gestellt. In diesem Zusammenhang ist der möglicherweise durch das Kryoprotektivum (DMA) vermittelte bzw. verstärkte toxische Effekt einiger Substanzen, wie er bei den beiden anderen Endpunkten festgestellt wurde, zu berücksichtigen. Sicherlich ist nicht jedem Labor oder Institut, welches in Zukunft solche Tests durchführen möchte, zuzumuten, eine eigene Karpfenzucht zu unterhalten. Denkbar ist jedoch eine zentrale Verschickung von gekühlten Spermaproben, die bei geeigneter Behandlung (Medium, Antibiotika, Sauerstoff) über mehrere Tage verwendbar bleiben (Saad & Billard, 1988; Jähnichen, 1992).

Für einen routinemäßigen Einsatz als Reproduktionstest im Vollzug umweltrelevanter Gesetze (WHG, ChemG, AbwAG) wäre sicherlich der Einsatz von tiefgekühlten bzw. aufgetauten Spermien und Eiern optimal. Wie die Ergebnisse aus den Befruchtungsversuchen (s. Tabelle 11, S. 77) zeigen, sind die kryokonservierten Spermien in der Lage frische Eier zu befruchten und einen hohen Prozentsatz an normal entwickelten Fischen hervorzubringen. Das Einfrieren von Fischeiern mit dem Ziel, nach dem Auftauen lebensfähige Embryonen produzieren zu können, ist jedoch nach dem heutigen Stand der Wissenschaft nicht möglich.

Die praktische Anwendbarkeit der computergestützten Videomikrographie für die Bewertung der Spermienmotilität (CASA) wurde bereits in Teil I im Abschnitt „Bewertung der Methoden“, Kapitel 4.1.2.1 Videomikrographie diskutiert. Zusammenfassend lässt sich dazu wiederholen, dass der relativ hohe apparative Aufwand (Mikroskop, Videokamera und -rekorder, PC mit entsprechender Hard- und Software) heutzutage im finanziellen Rahmen für solche Biotestverfahren bleibt. Die Technik ist soweit ausgereift, dass eine gleichzeitige objektive Messung und Beurteilung einer Vielzahl von Zellen sekundenschnell und präzise vorgenommen werden kann. Obwohl für den hier beschriebenen Toxizitätstest hauptsächlich der Anteil an beweglichen Spermien (Motilitätsrate) von Interesse ist, sollten auch andere Parameter wie Geschwindigkeit und Kopfschlagfrequenz nicht gänzlich vernachlässigt werden. Möglicherweise tragen sie in Zukunft zu einer besseren und detaillierteren Charakterisierung von Schadstoffwirkungen auf Spermien bei.

Ein großer Vorteil dieser Messmethode im Vergleich zu den anderen beiden Endpunkten sowie gegenüber anderen luminometrischen (Leuchtbakterientest) und spektrometrischen Verfahren liegt neben der größeren Chemikaliensensitivität in der Toleranz gegenüber gefärbtem oder trübem Testgut. Farbige Lösungen (z.B. von Kupfersulfat oder Kaliumdichromat) können ohne Beeinträchtigung der Messung

genauso gut getestet werden wie z.B. tiefschwarze Abwässer. Allerdings sollte das Testgut möglichst partikelfrei sein, was jedoch durch entsprechende Filtrierung erreicht werden kann.

Trotz der guten Datengrundlage mit mehreren Hundert Zellen pro Messvorgang ließ die Reproduzierbarkeit der EC50-Werte im Vergleich zu den beiden anderen Endpunkten etwas zu wünschen übrig. Die Gründe hierfür sind, wie ebenfalls bereits erwähnt, in verschiedenen Bereichen zu suchen:

- Biologische Variabilität der Spermaproben (z.B. individuell/saisonal sowie innerhalb der Population)
- Inhomogenität einzelner Spermaproben (z.B. lagerungsbedingt)
- Inexakte Proben- bzw. Testbearbeitung (z.B. durch Fehler beim Pipettieren)
- Uneinheitliche Messkammern (z.B. durch Rest-Kontaminationen)

Der erste Punkt ist nicht zu ändern, fällt aber auch am wenigsten ins Gewicht, zumal jeder Versuch immer auf die jeweilige Kontrolle mit derselben Spermaprobe bezogen wird. Bei den anderen Punkten ist eine verstärkte Qualitätskontrolle angebracht. So sollte geprüft werden, welche Art der Lagerung für die Spermaproben am günstigsten ist (Gefäßart, Sauerstoffverhältnisse, Lichteinwirkung, Temperatur, Medien, etc.). Auch die Verdünnungs- und Mischungsweisen vor der Messung sind zu überprüfen (Häufigkeit des Mischens, u.a.).

Als wichtigster Punkt sind die verwendeten Messkammern (Stroemberg/Mika) zu nennen. Sie sind aus exakt geschliffenem Qualitätsglas und müssen mit einem Deckglas so verschlossen werden, dass zwei separate Messkammern mit einer Tiefe von 10 μm entstehen. Sie sind relativ teuer und müssen nach jedem Gebrauch gewaschen werden. Dadurch ergeben sich zwei Probleme. Zum einen treten durch den häufigen Gebrauch der Messkammern relativ schnell Abnutzungserscheinungen auf. Durch Kratzer und Abrieb verändert sich der Zustand der Messkammer. Verunreinigungen durch die getesteten Chemikalien sind nicht immer vollständig entfernbar und können das Testergebnis beeinflussen. Zum anderen können aufgrund der geringen Anzahl an Messkammern nur wenige Messungen (mehr oder weniger) zeitgleich durchgeführt werden. Eine Verbesserung wäre hier sicherlich der Einsatz von standardisierten Einweg-Objektträgern, die allerdings trotz erforderlicher exakter Kammertiefe von 10–20 μm relativ preisgünstig sein müssten. Gleichzeitig sollten solche Objektträger über möglichst viele Messkammern verfügen (wünschenswert wären mindestens 12). Zur Zeit ist nicht bekannt, dass solche Messkammern auf dem Markt erhältlich sind bzw. ob ihre Entwicklung möglich ist.

Die Messung der Spermienmotilität müsste in Zukunft nicht, wie es in der vorliegenden Arbeit praktiziert wurde, über einen längeren Zeitraum (eine Minute) mit mehreren Messzeitpunkten erfolgen. Eine Messung zu Beginn der Motilitätsphase (z.B. nach 20 s) reicht in der Regel aus, um den Einfluss des Testguts zu bewerten. Wie die Ergebnisse aus Phase 1 zeigen, würde die Sensitivität des Verfahrens

dadurch nur unwesentlich beeinträchtigt werden. Eine Beschleunigung der Messung und des gesamten Tests (inklusive Auswertung) könnte somit erreicht werden.

4.2.5.2 ATP-Gehalt

Die Empfindlichkeit des in Phase 3 eingesetzten Verfahrens mit nativen und kryokonservierten Karpfenspermien ist insgesamt als gut zu bewerten. Lediglich gegenüber einer Substanz (Crotonaldehyd) wurde eine unzureichende Sensitivität, besonders beim Einsatz von frischen Zellen, nachgewiesen. Die Erkenntnisse reichen jedoch nicht aus, um eine abschließende Beurteilung dieses Endpunkts vorzunehmen. Tests mit einer Reihe weiterer Substanzen sind erforderlich.

Die Methode kann als Alternative bzw. Ergänzung zum Motilitätstest eingesetzt werden. Sie ist relativ einfach durchführbar und benötigt nur ein Luminometer oder Photometer mit geeigneten Filtern. Dass dabei auch kryokonservierte Spermien eingesetzt werden können macht die Methode im Gegensatz zum Motilitätstest unabhängig von der Verfügbarkeit laichreifer Fische.

Als ein Nachteil des Verfahrens ist die Instabilität des Leuchtsignals zu nennen. Dieses nimmt innerhalb kurzer Zeit rasch ab und erschwert Wiederholungsmessungen sowie den Ansatz von vielen Parallelmessungen. Auch lassen sich die für den ATP-Nachweis benötigten Substanzen, die relativ teuer sind, nicht ohne Qualitätsverlust über einen längeren Zeitraum aufbewahren. Die Reproduzierbarkeit der EC50-Werte war dennoch recht gut. Die Methode sollte so überarbeitet werden, dass mehrere Parallelmessungen, z.B. auf einer Mikrotiterplatte, möglich sind.

Auch muss geprüft werden, inwieweit farbige oder trübe Lösungen das Ergebnis beeinträchtigen und inwieweit Quencheffekte eine Rolle spielen.

4.2.5.3 Membranintegrität

Diese Methode hat sich als weitestgehend ungeeignet erwiesen, um toxische Effekte durch Umweltchemikalien auf Fischspermien zuverlässig und sensitiv nachzuweisen. Zwei der vier Testsubstanzen konnten in Phase 3 der ökotoxikologischen Versuche nicht getestet werden, da mit ihnen keine Wirkungen auf den Endpunkt zu messen waren. Gleiches gilt für den Test mit der Bitterfelder Abwasserprobe. Lediglich mit einer der beiden verbliebenen Substanzen (4-NP) konnten relativ niedrige EC50-Werte ermittelt werden.

Neben den Schwierigkeiten mit farbigen und trüben Lösungen können offenbar auch andere Substanzen wie Schwermetalle mit diesem System nicht ausreichend detektiert werden. Der Test mit der Abwasserprobe, die unverdünnt eine schwarz-bräunliche Farbe hatte, zeigte auch, dass trotz Verdünnung der Probe und dem Waschen der Zellen nach Testablauf gefärbte Lösungen als Testgut nur äußerst bedingt in Frage kommen. Möglicherweise müssen hierfür die Zellen vor dem Anfärben mit Bis-benzimid noch intensiver gewaschen werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass Methoden mit anderen Färbesubstanzen, von denen eine Vielzahl zur Auswahl steht, eventuell zu besseren Ergebnissen kommen. Denkbar ist auch eine Färbung unter dem Mikroskop mit manueller oder automatischer Bildauswertung ähnlich dem hier angewendeten Videomikrographie-Verfahren. Eine hohe Sensitivität ist mit einer solchen Methode jedoch nicht zu erwarten.

Ein positiver Aspekt dieses Verfahrens ist die schnelle und einfache Messung von mehreren Testansätzen (Konzentrationen) mit vielen Parallelen. Dies führte in der vorliegenden Studie zu einer guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und EC50-Werte. Vom Arbeitsaufwand her ist diese Methode sehr praktikabel. Allerdings ist ein Mikrotiterplatten-Fluorometer mit entsprechender PC-Anbindung und Software zur Messung notwendig.

4.3 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass Fischspermien geeignete und sensitive Indikatoren für Umweltbelastungen sind. Besonders durch die Erfassung der Spermienmotilität können schädliche Wirkungen bestimmter Substanzen in z.T. deutlich geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden als dies mit etablierten aquatischen Testverfahren der Fall ist. Eine Beeinträchtigung der Beweglichkeit der Zellen führt direkt oder indirekt zu einer verminderten Fertilität, da die abgelaichten Eier dadurch schwerer erreichbar werden bzw. weniger Eier von der gleichen Anzahl an Spermien befruchtet werden können. Das Ziel, die Grundlagen für einen Fertilitätstest mit dem Endpunkt Motilität zu entwickeln, ist somit erreicht worden.

Auch der ATP-Gehalt der Fischspermien hat sich als geeigneter Endpunkt zur Bewertung von Umweltchemikalien erwiesen. Die ermittelten EC50-Werte lagen zwar über denen des Endpunkts Motilitätsrate, erreichten aber ein vergleichsweise niedriges Niveau. Da eine ausreichend hohe ATP-Konzentration in der Spermazelle eine Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen und insbesondere der Beweglichkeit ist, kann auch für diesen Endpunkt zumindest ein indirekter Zusammenhang zur Fertilität hergestellt werden.

Ein Vorteil dieses Endpunkts ist die Möglichkeit, kryokonservierte Zellen im Test einzusetzen und damit ähnlich empfindliche Ergebnisse wie mit nativen Spermien erzielen zu können. Hierdurch ist dieser Test auch für eine routinemäßige Anwendung praktikabel, da saisonunabhängig qualitativ einheitliches Zellmaterial zur Verfügung steht.

Als Endpunkt des Fertilitätstests sollte dennoch möglichst die Motilitätsrate verwendet werden, da sie einen direkteren Bezug zur Befruchtungsfähigkeit aufweist und sensibler reagiert. Der Einsatz von kryokonservierten Zellen in diesem Test scheint bei relativ geringem Forschungsaufwand möglich zu sein. Die routinemäßige Durchführbarkeit mit nativem Karpfensperma ist als Alternative zu prüfen.

Für beide Endpunkte ist die Reaktion gegenüber weiteren Chemikalien und Abwässern zu testen. Die Messmethoden sind zu überarbeiten und zu verbessern.

Abbildung 34 gibt abschließend eine Übersicht über die verwendeten Testmethoden zu den Endpunkten Motilität (mit nativen Proben) und ATP-Gehalt (mit kryokonservierten/aufgetauten Proben) und verweist auf den jeweiligen Forschungs- und Verbesserungsbedarf.

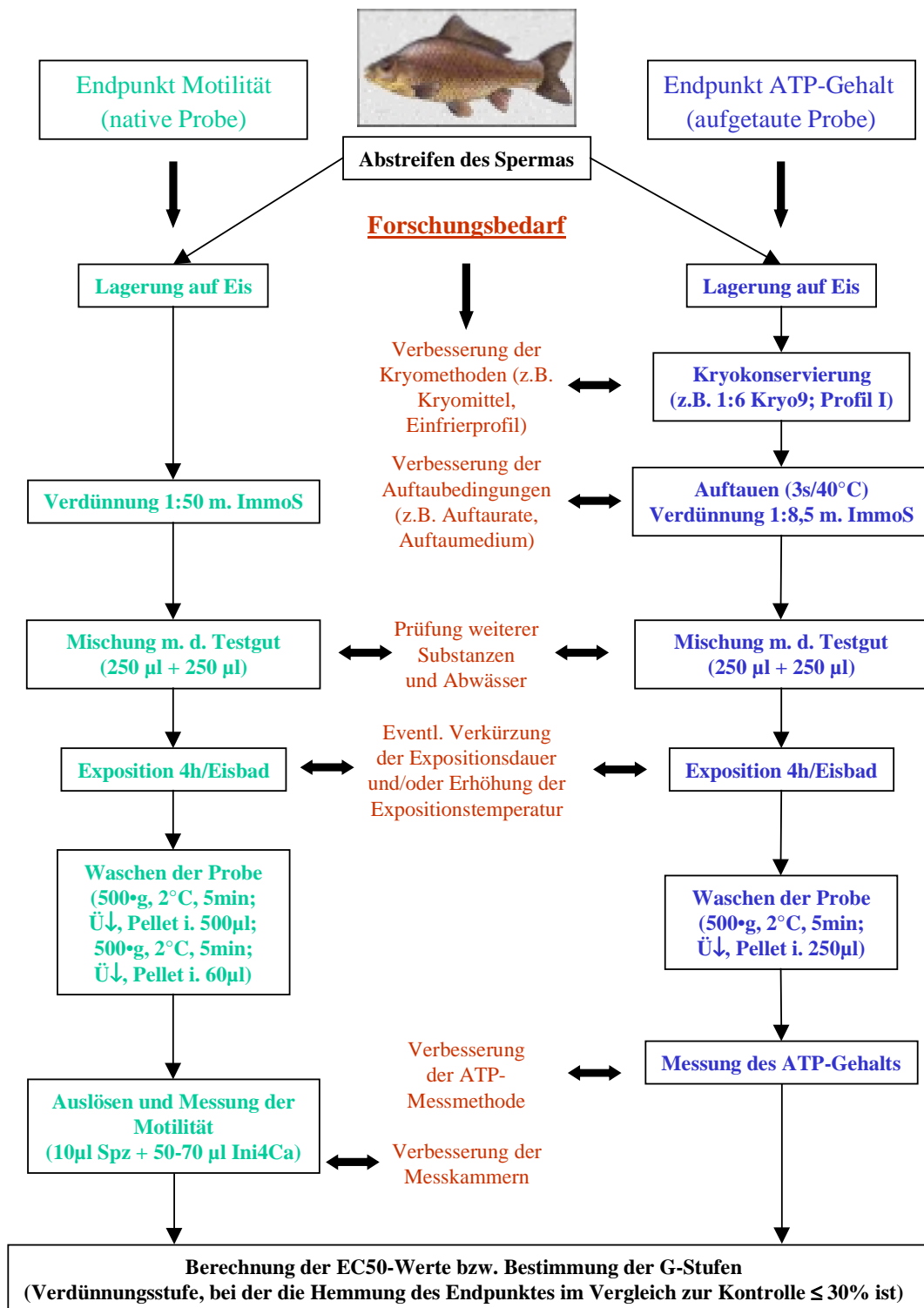


Abbildung 34: Übersicht: Angewendete Testverfahren sowie Forschungs- und Verbesserungsbedarf zu den Endpunkten Motilität (native Probe) und ATP-Gehalt (aufgetaute Probe)