

2.4 Teil II: Ökotoxikologische Versuche

2.4.1 Chemikalien und Abwasser

2.4.1.1 Chemikalien: Auswahl und Eigenschaften

Die Auswahl der Testsubstanzen wurde nach folgenden Kriterien getroffen:

- (1) Verschiedene Substanzklassen (anorganisch/organisch, apolar/polar) und Wirkungsweisen (unspezifisch/spezifisch: narkotisierend, adduktbildend, entkoppelnd, etc.) sollten abgedeckt sein.
- (2) Es sollten Vergleichsdaten (EC_x-Werte) aus anderen aquatischen Biotestsystemen vorhanden sein.
- (3) Zumindest ein Teil der Substanzen sollte zugleich im industriellen Maßstab produziert werden und in nennenswerten Konzentrationen in der Umwelt vorkommen können (ökologische Relevanz).

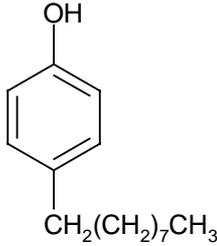
Im Folgenden werden die verwendeten Substanzen chemisch/physikalisch charakterisiert und soweit Daten vorhanden sind auch ökotoxikologisch bewertet. Die Quellenangaben zu den Chemikalieninformationen befinden sich gesondert hinter dem Literaturverzeichnis.

a) Cadmium (Cd) als Cadmiumnitrat-Tetrahydrat ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

Hersteller:	Merck	
CAS-Nr.:	10022-68-1	
MG:	308,47	
Summenformel:	$\text{CdN}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	
Löslichkeit:	1090 g/l H_2O (0°C)	
Biokonzentrationsfaktor:	160–1220 (hoch bioakkumulativ)	
Kennzeichnung:	gesundheitsschädlich, umweltgefährlich	
R-Sätze:	20/21/22-50/53	
S-Sätze:	60-61	
Wassergefährdungsklasse:	3 (stark wassergefährdend)	
Biochemische Wirkweise:	anorganisch-unspezifisch	
Umweltgefahren:	sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben	
Fischtoxizität (LC50):	0,15 mg/l (48 h / <i>Oncorhynchus mykiss</i>)	
Daphnientoxizität (EC50):	0,05 mg/l (48 h / <i>Daphnia magna</i>)	

Weltweit werden jährlich etwa 15.000–20.000 t des Schwermetalls Cadmium (Cd) als Nebenprodukt bei der Zinkgewinnung aus Zinkerzen gewonnen. In die Umwelt gelangt es in gelöster Form über industrielles Abwasser aus der Metall-, Chemie- und Textilindustrie, aber auch über alte verzinkte Dachrinnen und Regenrohre. In die Atmosphäre gelangt Cd durch Metallhütten, Müllverbrennungsanlagen und städtische Emissionen. Über den Niederschlag gelangt Cd (bis zu 2 µg/l) überwiegend in gelöster Form in Böden und Gewässer. In der Elbe wurden 1988 Konzentrationen von bis zu 620 ng/l gemessen, 1991 nur noch bis 160 ng/l. Im Sediment von belasteten Flüssen werden häufig bis zu 800 µg/kg (Mittelrhein 1990 ca. 500–1500 µg/kg) gefunden, die besonders im Mündungsbereich mobilisiert werden können. Toxische Effekte auf einzelne Wasserorganismen sind ab 1 µg/l im Süßwasser und ab 7 µg/l im Meerwasser zu erwarten. Cadmium gilt als sehr giftig für Wasserorganismen. Beim Menschen kann die Inhalation von Cadmium-haltigen Aerosolen krebserregend sein.

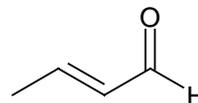
b) 4-Nonylphenol (4-NP)

Synonyme:	p-Nonylphenol; (Nonylphenol)	
Hersteller:	Aldrich	
CAS-Nr.:	84852-15-3 (4-NP); 104-40-5 (Isomerengemisch von 4-NP); 25154-52-3 (Isomerengemisch von Nonylphenol)	
MG:	220,4	
Summenformel:	C ₁₅ H ₂₄ O	
Löslichkeit:	praktisch unlöslich in H ₂ O (20°C)	
log P _{ow} :	3,28	
Biokonzentrationsfaktor:	90–320 (<i>C. carpio</i> , 8 Wochen 0,01 u. 0,1 mg/l)	
Kennzeichnung:	gesundheitsschädlich	
R-Sätze:	22, 34	
S-Sätze:	26, 27, 28, 36/39	
Wassergefährdungsklasse:	3 (stark wassergefährdend)	
Biochemische Wirkweise:	organisch-unspezifisch, polar, entkoppelnd, protonophor, narkotisierend, hormonähnlich	
Umweltgefahren:	schädlich für die Umwelt, vor allem für Wasserlebewesen; Meeresschadstoff	
Fischtoxizität (LC50):	0,9 mg/l (48 h / <i>Oryzias latipes</i>)	
Daphnientoxizität (EC50):	0,09–0,18 mg/l (48 h / <i>D. magna</i>)	

In Westeuropa werden jährlich etwa 70.000 t Nonylphenol produziert, weltweit ein Vielfaches davon. Das in Gewässern vorkommende Nonylphenol kommt überwiegend aus dem anaeroben Abbau von Nonylphenolethoxylaten. In den Abläufen von Kläranlagen wurden bis zu 60 µg/l gefunden. In industriellen Vorflutern der USA wurden bis 1000 µg/l gemessen. Der weltweite industrielle Eintrag über Abwässer wird auf über 100 t pro Tag geschätzt. 1986 haben westdeutsche Industrieverbände freiwillig darauf verzichtet, Nonylphenolethoxylate in Wasch- und Reinigungsmitteln und einigen anderen Industriebereichen einzusetzen. Unter aeroben Bedingungen sind Nonylphenole abbaubar. Für Nonylphenol sind endokrine (östrogene) Wirkungen auf Wasserorganismen nachgewiesen worden.

c) Crotonaldehyd (Cro)

Synonyme:	2-Butenal, Crotonal, Aldehydether, Methyl-Acrolein, 1,2-Ethandiol, u.a.
Hersteller:	Merck
CAS-Nr.:	4170-30-3
MG:	70,1
Summenformel:	C ₄ H ₆ O
Löslichkeit:	150–180 g/l H ₂ O
log P _{ow} :	0,63
Biokonzentrationsfaktor:	kein Potential vorhanden
Kennzeichnung:	sehr giftig, umweltgefährlich
R-Sätze:	11-23-36/37/38
S-Sätze:	1/2-29-33-45
Wassergefährdungsklasse:	3 (stark wassergefährdend)
Biochemische Wirkweise:	reaktiv, adduktbildend, mutagen
Umweltgefahren:	sehr giftig für Wasserorganismen; Meeresschadstoff
Fischtoxizität (LC50):	0,65 mg/l (96 h / <i>O. mykiss</i>)
Daphnientoxizität (EC50):	2 mg/l (48 h / <i>D. magna</i>)



Crotonaldehyd tritt in der chemischen Industrie als Zwischenprodukt bei der Herstellung von n-Butanol, Crotonsäure und Sorbinsäure auf. Außerdem dient es zur Herstellung von Insektiziden, zur Reinigung von Mineralölen, als Antioxidans und Ähnlichem. Crotonaldehyd wirkt wahrscheinlich karzinogen auf den Menschen (nachgewiesene Schädigung des genetischen Materials in Körperzellen von Mensch oder Tier). Der umu-Test auf bakterielle Mutagenität ergab ebenfalls positive Ergebnisse.

d) Rotenon (Rot)

Synonyme (Handelsnamen): Canex; Dri-Kil; Fish-Tox; Tubatoxin; u.v.a.

Hersteller: Sigma (enthält Dimethylphthalat)

CAS-Nr.: 83-79-4

MG: 394,4

Summenformel: $C_{23}H_{22}O_6$

Löslichkeit: sehr gering löslich in H_2O (20°C)

$\log P_{ow}$: 4,10

Biokonzentrationsfaktor: 181

Kennzeichnung: giftig

R-Sätze: 25/36/37/38

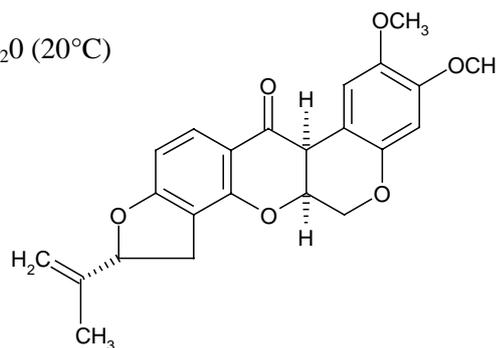
S-Sätze: 24/25/36/45

Biochemische Wirkweise: organisch-spezifisch: Hemmung des mitochondrialen Elektronentransports; teratogen

Umweltgefahren: giftig für die Umwelt, besonders für Fische; Meeresschadstoff

Fischtoxizität (LC50): 0,031 mg/l (48 h / *O. mykiss*)

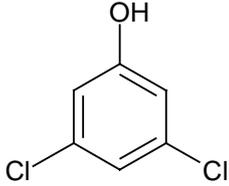
Invertebratentoxizität (EC50): 0,002–100 mg/l



Rotenon ist ein biologisches Insektizid und Akarizid, welches aus der Derris-Wurzel (*Derris elliptica*; 5% Rotenongehalt) gewonnen wird. Es wirkt als Kontakt- und Fraßgift. In den USA wird aus außerdem zur Regulation der Fischbestände eingesetzt. Rotenon ruft Lähmungen hervor, welche auf biochemischer Ebene auf die Hemmung des mitochondrialen Elektronentransports (Hemmung von Enzymkomplex I der Atmungskette: NADH-Dehydrogenase) zurückzuführen sind. Der Aufbau des energieliefernden Protonengradienten an der Mitochondrienmembran wird behindert und die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP beeinträchtigt. Außerdem katalysiert Rotenon auf der Pflanzenoberfläche die Photoisomerisierung von Dieldrin und anderen Cyclodieninsektiziden. Photodieldrin ist toxischer und persistenter als Dieldrin. In Kombination mit Organophosphaten und Methylcarbamaten beschleunigt Rotenon deren Photoabbau. Im Freiland wird Rotenon schnell abgebaut und darf bis zu 7 Tage vor der Ernte eingesetzt werden. Neuerdings steht Rotenon im Verdacht, die Parkinsonsche Krankheit auszulösen. Eine Studie der Stanford Universität hat gezeigt, dass Anwender von Pestiziden häufiger an Parkinson erkranken als Kontrollpersonen. In Laborversuchen wurde zudem festgestellt, dass Ratten, denen hohe Mengen an Rotenon verabreicht wurden (Dosis: 1–12 mg/kg), Parkinson-ähnliche Symptome

entwickelten (Nelson, 2000; Betarbet et al., 2000; Giasson und Lee, 2000). Rotenon ist in Deutschland nicht zugelassen, wohl aber in Nachbarländern wie z.B. der Schweiz.

e) 3,5-Dichlorphenol (3,5-DCP)

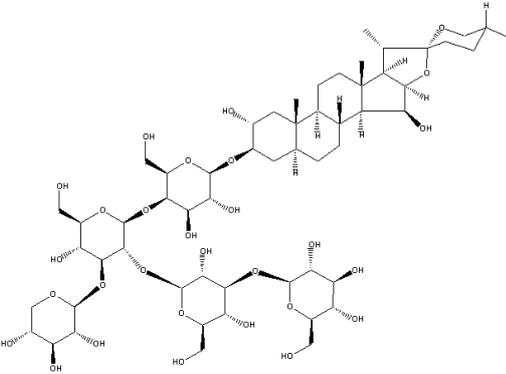
Synonyme:	1-Hydroxy-3,5-dichlorbenzol	
Hersteller:	Riedel-de Haën (PESTANAL®)	
CAS-Nr.:	591-35-5	
MG:	163,1	
Summenformel:	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	
Löslichkeit:	gering (< 1 mg/ml H ₂ O (20°C))	
log P _{ow} :	3,68	
Biokonzentrationsfaktor:	9–152	
Kennzeichnung:	giftig	
R-Sätze:	22/36/38	
S-Sätze:	26/36/37/39	
Wassergefährdungsklasse:	3 (stark wassergefährdend; gilt für 2,3-, 2,4- und 3,4-DCP)	
Biochemische Wirkweise:	organisch-unspezifisch, polar, entkoppelnd, protonophor, narkotisierend	
Umweltgefahren:	schädlich für die Umwelt, besonders für Wasser und Boden; Anreicherung in der Nahrungskette des Menschen (Fisch); Meeresschadstoff	
Fischtoxizität (LC50):	3,5 mg/l (96 h / <i>Platichthys flesus</i>)	
Daphnientoxizität (EC50):	2,1 mg/l (48 h / <i>D. magna</i>)	
Bakterientoxizität (EC50):	2,8 mg/l (30 min / <i>Photobacterium phosphoreum</i>)	

3,5-Dichlorphenol ein Isomer der Gruppe der Chlorphenole und wird in einigen standardisierten aquatischen Biotestverfahren wie dem Leuchtbakterientest als Referenzsubstanz eingesetzt. Ein besser bekanntes Isomer ist 2,4-DCP, welches einen etwas geringeren log P_{ow} (n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient) und eine bessere Wasserlöslichkeit besitzt. Es wird als Insektizid eingesetzt und ist auch Zwischenprodukt bei der Herstellung des Herbizids 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure. Es kann außerdem durch biologische Umwandlungen (pflanzlich, tierisch, mikrobiell) von Lindan und anderen

Pflanzenschutzmitteln auftreten. In Abwässern der Papierindustrie (Sulfat-Zellstoff-Chlorbleiche) wurden 0,7–2,0 g 2,4-DCP pro Tonne Zellstoff gefunden. In deutschen Oberflächengewässern wurden bis zu 0,7 µg/l nachgewiesen, in anderen Ländern (Niederlande, USA, Finnland) sogar bis zu 11 µg/l. Insgesamt gelangen jährlich etwa 1.000–10.000 t 2,4-DCP in die Umwelt. Die Wirkschwellen in den Standardbiotests für 2,4-DCP liegen in vergleichbarer Größenordnung zu 3,5-DCP:

Fischtoxizität (LC50):	2,6 mg/l (96 h / <i>O. mykiss</i>)
Daphnientoxizität (EC50):	2,6 mg/l (96 h / <i>D. magna</i>)
Bakterientoxizität (EC50):	5,5 mg/l (30 min / <i>P. phosphoreum</i>)

f) Digitonin

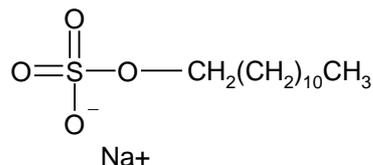
Synonyme:	Digitin	
Hersteller:	Merck	
CAS-Nr.:	11024-24-1	
MG:	1229,5	
Summenformel:	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₉	
Löslichkeit:	praktisch unlöslich in H ₂ O (20°C)	
Kennzeichnung nach EG:	giftig	
R-Sätze:	25-35	
S-Sätze:	22-37-45	
Wassergefährdungsklasse:	3 (stark wassergefährdend)	
Biochemische Wirkweise:	organisch-spezifisch (Na ⁺ /K ⁺ -Pumpen), permeabilisierend, hämolytisch	

Digitonin ist ein Glykosid der Gruppe der Steroidsaponine, das aus dem Roten Fingerhut (*Digitalis purpurea*) gewonnen wird. Digitonin hemmt gezielt Na⁺/K⁺-Pumpen und permeabilisiert Zellmembranen. Außerdem bildet es mit 3β-Hydroxysteroiden (z.B. Cholesterin) eine schwerlösliche Additionsverbindung, die hämolytisch, also Erythrozyten-zerstörend wirkt. Medizinisch wird es zum Nachweis von Cholesterin im Blutplasma, in der Galle und sonstigem Gewebe verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde es in erster Linie als Positivkontrolle in Zellfärbeversuchen eingesetzt, aber auch in der 1. Phase der Substanztests verwendet. Quantitative ökotoxikologische Daten liegen lediglich

zum Endpunkt Motilitätsrate von kryokonservierten/aufgetauten Rinderspermien vor. Demnach lag die EC20 nach 1 h Inkubation bei 37°C bei ca. 10 mg/l (Kolossa & Seibert, 1991).

g) Natriumdodecylsulfat (SDS)

Synonyme:	Sodiumdodecylsulfat; Natriumlaurylsulfat; Laurylschwefelsäure; u.a.
Hersteller:	Merck
CAS-Nr.:	151-21-3
MG:	288,4
Summenformel:	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S
Löslichkeit:	100 g/l H ₂ O
log P _{ow} :	1,60
Biokonzentrationsfaktor:	kein nennenswertes Potential
Kennzeichnung:	gesundheitsschädlich
R-Sätze:	20/22/36-38/42/44
S-Sätze:	23/26/33
Wassergefährdungsklasse:	2 (wassergefährdend)
Biochemische Wirkweise:	organisch-unspezifisch, grenzflächenaktiv, protein-degenerierend
Umweltgefahren:	giftig für Wasserorganismen.
Fischtoxizität (LC50):	4,3 mg/l (48 h / <i>O. mykiss</i>)
Daphnientoxizität (EC50):	6,3 mg/l (48 h / <i>D. magna</i>)
Algentoxizität (EC50):	3,7 mg/l (8 d / <i>Selenastrum capricornutum</i>)
Bakterientoxizität (EC50):	0,5–1,2 mg/l (30 min / <i>P. phosphoreum</i>)



Das anionische Detergenz (Tensid) SDS hat vielfältigen Gebrauch in Chemie, Pharmazie, Kosmetik- und Waschmittelindustrie. Es wird u.a. als Emulgator für Salben und Lotionen und als Zusatz in Wasch- und Reinigungsmitteln verwendet.

2.4.1.1.1 Löslichkeit der Testsubstanzen

Die Löslichkeit einiger Testsubstanzen (3,5-DCP, Digitonin, 4-Nonylphenol, Rotenon) war so gering, dass ein Lösevermittler zugesetzt werden musste. Da sich DMA (Karpfen) bzw. EG (Sterlet) als Lösevermittler für die betroffenen Testsubstanzen eignete und auch im Kryomittel vorhanden war, wurde es als Lösemittel ausgewählt. Bei 3,5-DCP und Digitonin verdünnte sich der Lösevermittler (EG) beim Ansetzen der wirksamen Konzentrationen in vernachlässigbare Größenordnungen von unter 0,1% (1 g/l \approx 16 mM). Bei 4-Nonylphenol und Rotenon musste DMA in Konzentrationen von bis zu 5% eingesetzt werden. Die DMA-Endkonzentrationen betragen in der Regel 1% mit 4-Nonylphenol und 2,5% mit Rotenon. Alle zu testenden Konzentrationen einer Substanz (Testreihe) enthielten den gleichen Anteil an DMA. Als Kontrolle diente in diesen Fällen die Immobilisierungslösung mit der entsprechenden Konzentration an DMA. Alle Konzentrationsangaben in der vorliegenden Arbeit sind Nominalwerte. Die Testchemikalien wurden wöchentlich neu angesetzt und im Kühlschrank aufbewahrt. Vor den eigentlichen Tests wurden Rangefinding-Tests durchgeführt, um die optimalen Konzentrationsbereiche für die einzelnen Substanzen in den verschiedenen Testverfahren zu ermitteln.

2.4.1.2 Abwasserprobe

Zum Abschluss der ökotoxikologischen Versuche wurde auch eine industrielle Abwasserprobe aus Bitterfeld (Probenahme: 31.1.2000) getestet. Diese Abwasserprobe wurde vom Umweltbundesamt im Rahmen eines Ringtests zur Validierung des Fischei-Tests (DIN Arbeitskreis 7.6) an verschiedene Laboratorien in Deutschland verschickt. Aus Vergleichsgründen wurden dabei von einigen Laboratorien neben dem Fischei-Test nach DIN 38415-6 auch akute Fischtests nach DIN 38 412, Teil 15 und Teil 31 durchgeführt. Diese Daten wurden durch jeweils ein Ergebnis aus einem Leuchtbakterientest nach DIN 38 412, Teil 341 und einem Daphnientest nach DIN 38412, Teil 30 ergänzt und können mit den Ergebnissen aus den vorliegenden Testverfahren verglichen werden.

Folgende Informationen zur chemisch/physikalischen Charakterisierung der Abwasserprobe liegen vor:

pH = 2,0; O₂ = 0,8 mg/l; AOX = 15,4 mg/l; TOC = 650 mg/l; Cl⁻ = 0,77 mg/l.

Die Proben mussten mindestens 16-fach verdünnt in den Versuchen eingesetzt werden. Die weitere Verdünnung erfolgte in 1:2er-Schritten (G-Stufen: 16–2028). Für die hier behandelten Endpunkte wurde die Verdünnung mit der Immobilisierungslösung vorgenommen (s.u.).

2.4.2 Endpunkte

Ökotoxikologische Versuche wurden zu drei Endpunkten durchgeführt: **Motilität**, **Adenosin-5'-Triphosphat (ATP)-Gehalt** und **Membranintegrität** mittels DNA-Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Letztere sollte als einfache Alternativmethode zur Motilitätsmessung erprobt und bewertet werden. Die Reaktion und Empfindlichkeit von nativen und von kryokonservierten/aufgetauten Spermien sollten mit den Testverfahren ermittelt und miteinander verglichen werden. Da Motilitätstests mit kryokonservierten Spermien nicht möglich waren, wurde der Endpunkt ATP-Gehalt aufgrund des direkten Zusammenhangs zur Motilität - der zumindest für Karpfenspermien (s. 1.5.4) nachgewiesen ist - zusätzlich getestet.

In der Regel wurden in den Versuchen mit nativen Spermien nur Proben von guter Qualität eingesetzt (Motilitätsraten von > 70%). Dabei wurden sowohl Einzel- als auch Mischproben verwendet. Aufgrund der Empfindlichkeit der Spermazellen wurden die meisten Expositionen im Eisbad und im Dunkeln vorgenommen. Anfänglich wurden auch Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt und verschiedene Expositionszeiten erprobt. Mit Ausnahme der Zellfärbeversuche der Phase 1 (s.u.), bei denen Testsubstanz und Zellen direkt auf der Mikrotiterplatte zusammen pipettiert wurden, erfolgte die Exposition in geschlossenen 1,5- oder 2,0-ml-Kunststoff-Reaktionsgefäßen.

Prinzipiell können die Chemikalienversuche in drei Phasen unterteilt werden. In der ersten Testphase (**Phase 1**) wurden Voruntersuchungen zu Testbedingungen (Mischungsverhältnisse, Expositionsdauer und -temperatur, Konzentrationsbereich („Rangefinding“)) vorgenommen. Die Verfahren wurden überwiegend an frischen Sterlet- und Karpfenspermien getestet und beschränkten sich auf die Endpunkte Motilität und Membranintegrität. Die Tests wurden je Testsubstanz in der Regel einmal mit drei Replikaten je Testkonzentration durchgeführt. Zum Einsatz kamen Cadmium (Cd), 3,5-Dichlorphenol (3,5-DCP), Digitonin und Natriumdodecylsulfat (SDS). Es wurden auch einige Zellfärbetests mit kryokonservierten Karpfenspermien vorgenommen.

In der zweiten Testphase (**Phase 2**) wurde zusätzlich der Endpunkt ATP-Gehalt gemessen. Verwendete Substanzen waren Cd, 4-Nonylphenol (4-NP), Rotenon (Rot) und Crotonaldehyd (Cro). Bei allen Endpunkten wurde zugunsten der Praktikabilität (Testdauer) auf Replikate bei den Konzentrationen verzichtet. Alle Chemikalienversuche wurden dafür mehrfach wiederholt. Die Testverfahren wurden aus Gründen der Verfügbarkeit nur mit nativen Karpfenspermien durchgeführt.

Die dritte Testphase (**Phase 3**) unterschied sich von der zweiten Phase durch den zusätzlichen Einsatz von kryokonservierten Karpfenspermien. Methodisch wurde ein Waschschriff eingeführt, um die Testsubstanzen nach Ablauf der Inkubation aus der Zellsuspension herauszuwaschen. Die Testdesigns wurden so angepasst, dass die Bedingungen für native und kryokonservierte Zellen vergleichbar sind. Die

Testsubstanzen waren die gleichen wie in Phase 2. Zum Abschluss der ökotoxikologischen Versuche wurde die oben beschriebene industrielle Abwasserprobe aus Bitterfeld mit allen Prüfmethode der Phase 3 einmalig getestet.

2.4.2.1 Endpunkt Motilität

Der Endpunkt Motilität beinhaltete mehrere Testparameter, die sich aus den Daten der computergestützten Videomikrographie ergaben. In erster Linie zu nennen sind hierbei die Motilitätsrate (prozentualer Anteil an motilen Spermien), die Geschwindigkeit der Spermien (z.B. VAP), die laterale Kopfauslenkung (LHD) und die Linearität (Lin). Die verschiedenen Parameter wurden auf ihre Eignung und Empfindlichkeit bei der Substanztestung untersucht. Die Tests wurden, wie bereits erläutert, nur mit frischen Spermien durchgeführt. Im Verlauf der Untersuchungen kamen drei etwas unterschiedliche Testmethoden zum Einsatz. Das ursprüngliche Testdesign (MOT1F) wurde zweimal aufgrund neuer Erkenntnisse und angestrebter besserer Vergleichbarkeit mit den anderen Endpunkten abgewandelt.

2.4.2.1.1 Testmethode 1 mit nativen Sterlet- und Karpfenspermien (MOT1F, Phase 1)

Zur Durchführung der Toxizitätstests wurden die Testsubstanzen in der Immobilisierungslösung aufgenommen (Karpfen: Immo1; Sterlet: ImmoA). Inklusive Kontrolle wurden bis zu 12 Konzentrationen angesetzt. Als Kontrolle diente die Immobilisierungslösung ohne Chemikalienzusatz. Je Konzentration wurden die ausgewählten Spermaproben in drei Parallelansätzen mit der Testchemikalie im Verhältnis 1:10 gemischt und im Dunkeln inkubiert. Nach dem Ende der Expositionszeit wurde die Spermien mit der jeweiligen Initiatorlösung aktiviert (Karpfen: 1:10 mit Ini4Ca; Sterlet: 1:5 mit IniCa). Details zu den Expositionsbedingungen sind Tabelle 6 zu entnehmen.

2.4.2.1.2 Testmethode 2 mit nativen Karpfenspermien (MOT2F, Phase 2)

Die Versuche wurden nur noch mit Karpfenspermien durchgeführt, wobei Immo1 als Inkubationsmedium durch ImmoS ersetzt wurde. Dies war nötig geworden, um die Vergleichbarkeit mit den Zellfärbe- bzw. ATP-Tests mit kryokonservierten Karpfenspermien zu gewährleisten, in denen ImmoS als Medium eingesetzt werden musste. Die Exposition wurde auf 4 h im Eisbad bei Dunkelheit festgelegt. Inklusive Kontrolle wurden 5–7 Konzentrationen ohne Replikate angesetzt. Der gesamte Versuch wurde jedoch für jede Testsubstanz mindestens dreimal wiederholt ($4 \leq n \leq 6$).

Tabelle 6: Getestete Substanzen und Bedingungen zum Endpunkt Motilität

Methode	Spezies	Qualität	Substanz	Expositionsbedingungen	Anzahl Tests/ Repl./Parallel. ¹
MOT1F (Phase 1)	Karpfen	nativ	Cd	Eisbad: 2h, 4h	1 / 3 / 3
			3,5-DCP	Eisbad: 2h, 4h	1 / 3 / 3
	Sterlet	nativ	Cd	Eisbad: 2h, 4h, 25h	1 / 3 / 3
			3,5-DCP	Eisbad: 18h	1 / 3 / 3
			Digitonin	RT: 2h	1 / 3 / 3
			SDS	RT: 2h	1 / 3 / 3
MOT2F (Phase 2)	Karpfen	nativ	Cd	Eisbad: 4h	4 / 1 / 3
			4-NP (1% DMA)	Eisbad: 4h	4 / 1 / 3
			Cro	Eisbad: 4h	5 / 1 / 3
			Rot (2,5% DMA)	Eisbad: 4h	6 / 1 / 3
MOT3F (Phase 3)	Karpfen	nativ	Cd	Eisbad: 4h	4 / 1 / 3
			4-NP (1% DMA)	Eisbad: 4h	4 / 1 / 3
			Cro	Eisbad: 4h	4 / 1 / 3
			Rot (2,5% DMA)	Eisbad: 4h	4 / 1 / 3
			Abwasser (BTF)	Eisbad: 4h	1 / 1 / 3

¹ Gesamtanzahl der mit dieser Methode durchgeführten Tests je Substanz sowie die Anzahl der Replikate (Repl. = Anzahl Testgefäße je Konzentrationsstufe) und Parallelen (Parallel. = Anzahl Wiederholungsmessungen aus demselben Testgefäß) je Test

2.4.2.1.3 Testmethode 3 mit nativen und gewaschenen Karpfenspermien (MOT3F, Phase 3)

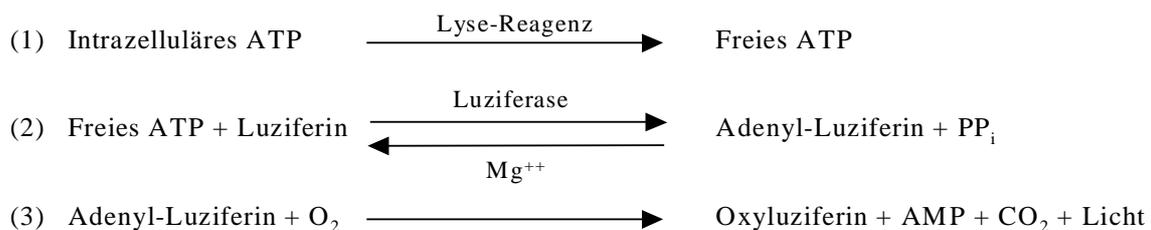
Die Testmethode wurde erneut etwas verändert, da sich herausstellte, dass ein Waschen der Spermien nach der Exposition nötig wurde. Im Motilitätstest wurden die Messkammern durch einige der Substanzen so stark verunreinigt, dass die Spermienmotilität in den darauffolgenden Kontrollmessungen mit denselben Messkammern - auch ohne Chemikalienzusatz - beeinträchtigt war. Erst durch aufwändiges Waschen der Messkammern mit verschiedenen Lösemitteln konnten die Kammern gereinigt werden. Auch in den anderen Testverfahren führte das Vorhandensein der Testsubstanzen während der Messung zu störenden Einflüssen, die verhindert werden sollten. Das Testdesign wurde wie folgt abgewandelt:

Die frische Spermaprobe wurde zunächst 1:50 mit ImmoS verdünnt. Je Konzentrationsstufe wurden 250 µl der verdünnten Spermalösung mit 250 µl der Testsubstanz für 4 h im Eisbad bei Dunkelheit inkubiert (Endverdünnung des Spermas 1:100). **Waschen:** Anschließend wurden die Ansätze bei 500•g und 2°C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Spermazellen wurden in 500 µl ImmoS resuspendiert und erneut wie beschrieben abzentrifugiert. Der 2. Überstand wurde ebenfalls verworfen und die Zellen in 60 µl ImmoS aufgenommen. Für die anschließende Motilitätsmessung wurden 10 µl der gewaschenen Zellsuspension mit 50–70 µl Ini4Ca aktiviert.

2.4.2.2 Endpunkt ATP-Gehalt

Alle ATP-Messungen wurden an immobilisierten (schadstoff-inkubierten), also nicht-aktivierten Spermien vorgenommen. Die ATP - Bestimmung wurde mit einem Testkit der Fa. Sigma (ATP Bioluminescent Somatic Cell Assay Kit; Stock no. FL-ASC) durchgeführt. Das Messprinzip beruht auf einer biochemischen Reaktion bei der Licht emittiert wird (Biolumineszenz; s. Gleichung 1–3). Die Menge an emittiertem Licht ist proportional zur ATP-Konzentration und kann im Luminometer gemessen werden. Zur Kalibrierung kann eine ATP-Lösung mit bekannter ATP-Konzentration als interner oder externer (Kalibrierkurve) Standard verwendet werden.

Gleichung 1–3: Reaktionsprinzip



Chemikalien:

- SAR (Somatic Cell ATP Releasing Reagent): Lyse-Reagenz
- AAM (ATP Assay Mix): Luziferase, Luziferin, Magnesiumsulfat (MgSO₄), Dithiothreit (DTT), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Rinderserumalbumin (RSA), Tricine-Puffersalze; pH 7,8
- AAB (ATP Assay Mix Dilution Buffer): Verdünnungspuffer für das AAM bestehend aus MgSO₄, DTT, EDTA, RSA und Tricine-Puffersalzen zur Verdünnung des AAB im Verhältnis 1:25

- AAS (ATP Assay Standard): ATP Standard Stammlösung (181 μM)

(Quelle: Sigma Tech. Bulletin No. BSCA-1 (12-87); die genaue Zusammensetzung wird nicht angegeben).

- Immobilisierungslösung (ImmoS)

Material:

- Luminometer (Lumac Biocounter M2010)
- Glasküvetten (Macherey-Nagel)

Messung:

100 μl des verdünnten AAM/AAB wurden in einer Glasküvette vorgelegt. In ein zweites Reaktionsgefäß wurden 200 μl SAR und 100 μl H₂O bzw. 100 μl Immobilisierungslösung pipettiert. 100 μl der zu bestimmenden Zellsuspension wurden hinzu gegeben und stark gemischt. Sofort wurden hieraus 100 μl entnommen, zum AAM/AAB in die Küvette pipettiert, gemischt und im Luminometer gemessen. Die ATP-Konzentration der Zellsuspension wurde über einen internen ATP-Standard (AAS) mit bekannter Konzentration ermittelt.

Methoden:

Der ATP-Test wurde mit nativen und kryokonservierten Karpfenspermien durchgeführt. Die Methode wurde zunächst analog zum Motilitätstest durchgeführt und später durch den Waschprozess erweitert. Die 2. und 3. Methode mit gewaschenen Spermien unterscheiden sich vor allem in der Qualität des Spermias (nativ vs. kryokonserviert). In Tabelle 7 sind die Details zu den Expositionsbedingungen beim ATP-Test aufgeführt.

2.4.2.2.1 Testmethode 1 mit nativen Karpfenspermien (ATP2F, Phase 2)

Inklusive Kontrolle wurden bis zu 12 Konzentrationen ohne Replikate angesetzt. Als Kontrolle diente wiederum die Immobilisierungslösung (ImmoS) ohne Chemikalienzusatz. Wie bei Mot2F wurden die frischen Spermien mit der Testchemikalie im Verhältnis 1:10 gemischt und im Dunkeln inkubiert. Der gesamte Versuch wurde für jede Substanz mindestens zweimal wiederholt ($3 \leq n \leq 7$). Nach Ablauf der Expositionszeit wurden die Proben 1:100 mit ImmoS verdünnt (Endverdünnung: 1:1000) und mit dem ATP-Testkit gemessen. Zu jeder Konzentration wurden drei Messwerte genommen (drei Messungen aus einem Gefäß).

2.4.2.2.2 Testmethode 2 mit nativen und gewaschenen Karpfenspermien (ATP3F, Phase 3)

Analog zu Mot3F wurde die frische Spermaprobe zunächst 1:50 mit ImmoS verdünnt. Je Konzentrationsstufe wurden 250 µl der verdünnten Spermalösung mit 250 µl der Testsubstanz für 4 h im Eisbad bei Dunkelheit inkubiert (Endverdünnung des Spermas 1:100). **Waschen:** Die Ansätze wurden nach dem Ende der Expositionszeit bei 500•g und 2°C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Spermazellen wurden in 250 µl ImmoS resuspendiert. 100 µl davon wurden für die ATP-Bestimmung verwendet.

Tabelle 7: Getestete Substanzen und Bedingungen zum Endpunkt ATP-Gehalt

Methode	Spezies	Qualität	Substanz	Expositionsbedingungen	Anzahl Tests/ Repl./Parallel.¹
ATP2F (Phase 2)	Karpfen	nativ	Cd	Eisbad: 4h	4 / 1 / 3
			4-NP (1% DMA)	Eisbad: 4h	3 / 1 / 3
			Cro	Eisbad: 4h	3 / 1 / 3
			Rot (2,5% DMA)	Eisbad: 4h	7 / 1 / 3
ATP3F (Phase 3)	Karpfen	nativ	Cd	Eisbad: 4h	4 / 1 / 3
			4-NP (1% DMA)	Eisbad: 4h	5 / 1 / 3
			Cro	Eisbad: 4h	5 / 1 / 3
			Rot (2,5% DMA)	Eisbad: 4h	6 / 1 / 3
			Abwasser (BTF)	Eisbad: 4h	1 / 1 / 3
ATP3K (Phase 3)	Karpfen	kryokonserviert	Cd	Eisbad: 4h	4 / 1 / 3
			4-NP (1% DMA)	Eisbad: 4h	4 / 1 / 3
			Cro	Eisbad: 4h	4 / 1 / 3
			Rot (2,5% DMA)	Eisbad: 4h	4 / 1 / 3
			Abwasser (BTF)	Eisbad: 4h	1 / 1 / 3

¹ Gesamtanzahl der mit dieser Methode durchgeführten Tests je Substanz sowie die Anzahl der Replikate (Repl. = Anzahl Testgefäße je Konzentrationsstufe) und Parallelen (Parallel. = Anzahl Wiederholungsmessungen aus demselben Testgefäß) je Test

2.4.2.2.3 Testmethode 3 mit aufgetauten und gewaschenen Karpfenspermien (ATP3K, Phase 3)

Die Proben waren etwa ein Jahr zuvor mit Profil I eingefroren worden. Als Kryomittel war Kryo3 (15% DMA in MK2/200 mM Sucrose) verwendet worden, das Mischungsverhältnis betrug 1:6. Je Chemikalienversuch wurden drei Straws aufgetaut und vermischt. Hiervon wurden 500 µl sofort mit 3750 µl ImmoS verdünnt (=1:8,5; Verdünnung des Spermas inklusive Kryoverdünnung: 1:51). Inklusive Kontrolle wurden 6 Konzentrationen ohne Replikate angesetzt. Der gesamte Versuch wurde für jede Testsubstanz mindestens dreimal wiederholt ($4 \leq n \leq 6$). Je Konzentration wurden 250 µl der verdünnten aufgetauten Probe mit 250 µl der Testsubstanz vermischt und für 4 h auf Eis im Dunkeln inkubiert (Endverdünnung 1:102). Waschen: Analog zu ATP3F wurden die Ansätze anschließend bei 500•g und 2°C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Spermazellen wurden in 250 µl ImmoS resuspendiert. Hiervon wurden 100 µl für die ATP-Bestimmung verwendet.

2.4.2.3 Endpunkt Membranintegrität

In Vorversuchen sind verschiedene Farbstoffe (Trypan-Blau, Ethidiumbromid, Bis-benzimid) an nativen (Regenbogenforelle) und kryokonservierten (Sterlet, Sibir. Stör) Spermien getestet worden. Am empfindlichsten erwies sich die Bis-benzimid-Methode, mit der DNA von geschädigten Zellen fluoreszierend angefärbt wird (Modifiziert nach Cesarone et al., 1979). Intakte Zellmembranen verhindern eine DNA-Bindung durch das Bis-benzimid - Molekül. Die Methode wurde auf Mikrotiterplattenniveau wie folgt angepasst:

Chemikalien:

- Immobilisierungslösung je nach Fischart (Karpfen: ImmoS; Sterlet: ImmoA)
- Bis-benzimid Trihydrochlorid (BB) = Hoechst Farbstoff No. 33258 (Sigma)
 - BB-Stammlösung: 1 mg/ml aqua bidest. (wöchentlich neu)
 - BB-Arbeitslösung: 2 µg/ml (Stammlösung direkt vor der Messung 1:500 mit Immobilisierungslösung verdünnt)

Material:

- Mikrotiterplatten (Greiner, transparent, flacher Boden, 96 Kavitäten)
- Vertikalfloreszenzphotometer (Dynex Fluorolite 1000; λ_{Ex} 365 nm, λ_{Em} 450nm)

Messung:

Die Spermaproben wurden mit der Immobilisierungslösung auf eine Zellkonzentration von $1-10 \cdot 10^6$ Spz/ml verdünnt. Je Kavität wurden 50 µl der verdünnten Spermaprobe mit 200 µl BB-Arbeitslösung gemischt. Die Mikrotiterplatte wurde für 10 min bei Raumtemperatur mit einem Mikrotiterplattenschüttler geschüttelt und danach im Vertikalfluorometer gemessen.

Methoden:

Die Lampenspannung am Vertikalfluoreszenzphotometer wurde so gewählt, dass die Fluoreszenz den linearen Bereich nicht überschritt. Der lineare Bereich wurde in Vorversuchen mit Werten von 0–1000 RFU (relative Fluoreszenzeinheiten) bestimmt. Bei Einhaltung der oben genannten Zellkonzentration konnte die Lampenspannung jedoch konstant bei 8,0 V gehalten werden. Nach Abzug des Blindwerts (Testsubstanz in Konzentration x + Puffer + BB-Arbeitslösung) sowie des Kontrollwerts (Zellen + Puffer + BB-Arbeitslösung), wurden in Abhängigkeit von der Methode und der Testsubstanz Fluoreszenzwerte zwischen 0–500 RFU (max. 1000) gemessen. Der in einer Testreihe mit den eingestellten Konzentrationen ermittelte höchste Fluoreszenzwert wurde als größte erreichbare Schädigung angesehen und auf 100% gesetzt. Die anderen Messwerte wurden entsprechend mit diesem Wert verrechnet und der Prozentsatz der Schädigung zur Ermittlung der EC50 kalkuliert. Der Kontrollwert ohne Schadstoff entsprach demzufolge immer einer Schädigung von 0%. Anfänglich (Phase 1) wurde die Exposition direkt auf der Mikrotiterplatte durchgeführt, wobei am Ende des Tests die Färbelösung hinzupipettiert wurde. Später (Phase 2 und 3) wurde wie bei den anderen beiden Endpunkten in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf die Mikrotiterplatte pipettiert.

2.4.2.3.1 Testmethode 1 mit nativen Sterletspermien sowie mit nativen und kryokonservierten Karpfenspermien (DNAIF/K, Phase 1)

Inklusive Kontrolle wurden bis zu 12 Konzentrationen angesetzt. Als Kontrolle diente die jeweilige Immobilisierungslösung. Die Testsubstanz wurde entsprechend der gewünschten Endkonzentration in Immobilisierungslösung verdünnt und in die Kavitäten der Mikrotiterplatte vorgelegt. Je Konzentration wurden 4 Kavitäten bestückt. Je nach Art der Spermaprobe (Fischart, nativ oder kryokonserviert) wurden die Spermien entsprechend der optimalen Zellkonzentration (s.o.) vorverdünnt (1:100–1:1000) und bei Start des Tests in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platten wurden mit Klebefolie verschlossen und im Dunkeln inkubiert (Details zu den Expositionsbedingungen sind Tabelle 8 zu entnehmen).

2.4.2.3.2 Testmethode 2 mit nativen Karpfenspermien (DNA2F, Phase 2)

Die Exposition wurde entsprechend den anderen Testverfahren in 1,5-ml Kunststoff-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Inkubationsverdünnung des Spermias mit der Testsubstanz betrug 1:1000 in ImmoS. Inklusive Kontrolle wurden bis zu 12 Konzentrationen ohne Replikate angesetzt. Zur Messung wurden 400 µl eines jeden Konzentrationsansatzes auf 8 Kavitäten (8 x 50 µl) verteilt und mit der Färbelösung wie beschrieben versetzt. Der gesamte Versuch wurde je Testsubstanz mindestens zweimal wiederholt ($3 \leq n \leq 6$).

Tabelle 8: Getestete Substanzen und Bedingungen zum Endpunkt Membranintegrität

Methode	Spezies	Qualität	Substanz	Expositionsbedingungen	Anzahl Tests/Repl./Parallel. ¹
DNA1F/K (Phase 1)	Karpfen	nativ	3,5-DCP	RT: 2h, 4h	1 / 4 / 0
		kryokonserviert	Cd	RT: 1h, 2h	1 / 4 / 0
			3,5-DCP	RT: 2h	1 / 4 / 0
	Sterlet	nativ	Cd	RT: 4h	1 / 4 / 0
				Eisbad: 40h	1 / 4 / 0
			3,5-DCP	RT: 0,2, 0,5, 1, 2h	1 / 4 / 0
				Eisbad: 24h	1 / 4 / 0
			SDS	RT: 4h, 19h	1 / 4 / 0
				Eisbad: 2h	1 / 4 / 0
DNA2F (Phase 2)	Karpfen	nativ	4-NP (1% DMA)	Eisbad: 4h	3 / 1 / 8
			Cro	Eisbad: 4h	3 / 1 / 8
			Rot (5% DMA)	Eisbad: 4h	6 / 1 / 8
DNA3FK (Phase 3)	Karpfen	nativ	4-NP (1% DMA)	Eisbad: 4h	5 / 1 / 8
			Cro	Eisbad: 4h	6 / 1 / 8
			Abwasser (BTF)	Eisbad: 4h	1 / 1 / 8
DNA3K (Phase 3)	Karpfen	kryokonserviert	4-NP (1% DMA)	Eisbad: 4h	4 / 1 / 8
			Cro	Eisbad: 4h	4 / 1 / 8
			Abwasser (BTF)	Eisbad: 4h	1 / 1 / 8

¹ Gesamtanzahl der mit dieser Methode durchgeführten Tests je Substanz sowie die Anzahl der Replikate (Repl. = Anzahl Testgefäße je Konzentrationsstufe) und Parallelen (Parallel. = Anzahl Wiederholungsmessungen aus demselben Testgefäß) je Test

2.4.2.3.3 Testmethode 3 mit nativen und gewaschenen Karpfenspermien (DNA3F, Phase 3)

Analog zu Mot3F und ATP3F wurde die frische Spermaprobe zunächst 1:50 mit ImmoS verdünnt. Je Konzentrationsstufe wurden 250 µl der verdünnten Spermalösung mit 250 µl der Testsubstanz für 4 h im Eisbad bei Dunkelheit inkubiert (Endverdünnung des Spermas 1:100). **Waschen:** Analog zur ATP-Messung in Phase 3 wurden die Ansätze nach dem Ende der Expositionszeit bei 500•g und 2°C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Spermazellen wurden in 250 µl ImmoS resuspendiert und nochmals 1:5 mit ImmoS verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden je Kavität 50 µl auf die Mikrotiterplatte übertragen und wie beschrieben angefärbt.

2.4.2.3.4 Testmethode 4 mit aufgetauten und gewaschenen Karpfenspermien (DNA3K, Phase 3)

Die Methode ist bis auf den letzten Verdünnungsschritt analog zu ATP3K. Die Proben waren etwa ein Jahr zuvor mit Profil I eingefroren worden. Als Kryomittel war Kryo3 (15% DMA in MK2/200 mM Sucrose) verwendet worden, das Mischungsverhältnis betrug 1:6. Je Chemikalienversuch wurden drei Straws aufgetaut und vermischt. Hiervon wurden 500 µl sofort mit 3750 µl ImmoS verdünnt (= 1:8,5; Verdünnung des Spermas inklusive Kryoverdünnung: 1:51). Inklusive Kontrolle wurden 6 Konzentrationen ohne Replikate angesetzt. Der gesamte Versuch wurde für jede Testsubstanz mindestens dreimal wiederholt ($4 \leq n \leq 6$). Je Konzentration wurden 250 µl der verdünnten aufgetauten Probe mit 250 µl der Testsubstanz vermischt und für 4 h auf Eis im Dunkeln inkubiert (Endverdünnung 1:102). **Waschen:** Anschließend wurden die Ansätze bei 500•g und 2°C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Spermazellen wurden in 250 µl ImmoS resuspendiert und nochmals 1:5 mit ImmoS verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden je Kavität 50 µl auf die Mikrotiterplatte übertragen und wie beschrieben angefärbt.

2.5 Statistische Auswertung

Statistische Tests wurden je nach Erfüllung der Voraussetzungen (Prüfung der Normalverteilung: χ^2 -Test oder Test nach Kolmogoroff-Smirnoff; Prüfung der Varianzgleichheit: Bartlett- bzw. Cochran-Test) mit parametrischen oder parameterfreien Verfahren durchgeführt. In der Regel lagen unverbundene Stichproben mit kleinem Umfang vor. Bei parametrischen Verfahren wurde für die Signifikanzprüfung der t-Test oder eine einfache Varianzanalyse (ANOVA, F-Test) durchgeführt. Als parameterfreies Verfahren wurden der H-Test nach Kruskal und Wallis (Rangvarianzanalyse) herangezogen. Stichprobenunterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p \leq 0,05$) mit dem Tukey- bzw. Student-Newman-Keuls-Test geprüft. EC50-Werte für gemessene Konzentrations-Wirkungs-

Beziehungen wurden durch Probitanalyse nach Finney (1971; 1978) ermittelt. Als Hilfsmittel wurden die Statistikprogramme SigmaStat V2.0 (© SPSS) und *Critical Values* V3.0 (© Ratte) sowie das Grafikprogramm SigmaPlot V2.0 (© Jandel) benutzt. Mit diesem Grafikprogramm wurden für die Darstellung der Ergebnisse aus den Substanztests (s. Teil II: Ökotoxikologische Versuche) Konzentrations-Wirkungs-Kurven auf der Basis von Regressionen 3. Ordnung erstellt. Das Programm bietet die Möglichkeit, neben dem Vertrauensbereich für die Lage der Regression (confidence interval) auch den Vorhersagebereich für die einzelnen Daten (prediction interval) anzuzeigen. In der vorliegenden Dissertation werden für die Ergebnisse aus den Testphasen 2 und 3 beide Bereiche auf der Grundlage von 95%iger Wahrscheinlichkeit angegeben.