

3.2 Teil II: Ökotoxikologische Versuche

3.2.1 Phase 1

Die 1. Phase der ökotoxikologischen Versuche beinhaltete Tests zu den Endpunkten Motilität und Membranintegrität mit nativen Karpfen- und Sterletspermien. Einige Zellfärbeversuche wurden auch mit kryokonservierten Karpfenspermien durchgeführt. Dabei kamen die beschriebenen Methoden **MOT1F** (Endpunkt Motilität) und **DNA1F/K** (Endpunkt Membranintegrität) zum Einsatz. Sie sind vor allem dadurch gekennzeichnet, dass die mit der Testsubstanz inkubierten Spermien nach Ablauf der Expositionszeit und vor der eigentlichen Messung des Endpunkts nicht gewaschen wurden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Testsubstanz während der Messung, also während der Motilitäts- bzw. Färbephase, in der entsprechenden Konzentration wirken konnte.

3.2.1.1 Motilität

In Abbildung 20 soll beispielhaft aufgezeigt werden, welche Motilitätsparameter für einen zu standardisierenden Biotest geeignet sein können. Im Fall der hier aufgeführten und mit Cadmium inkubierten Karpfenspermien zeigte sich, dass aufgrund der kurzen Motilitätsphase nur die Anfangsmotilität (Motilitätsrate und VAP nach 20 s) sinnvolle KWBs aufzeigt. Außerdem erwies sich der dargestellte Mittelwert aus der Motilitätsrate der drei Messzeitpunkte, welcher das zeitliche Integral als zusätzlichen Parameter repräsentiert, als geeignet. Auffällig sind die im Vergleich zu den Kontrollen erhöhten Messwerte in den unteren Konzentrationsbereichen. Ähnliche Stimulationseffekte bei niedrigen Konzentrationen wurden auch mit den anderen Substanzen festgestellt (3,5-DCP, SDS, Digitonin). Mit den anderen Messparametern (Geschwindigkeit, Linearität, Kopfauslenkung) wurden nur wenige sinnvolle KWBs gemessen. EC50-Werte lagen hierbei in der Regel deutlich über denen des Endpunkts Motilitätsrate oder konnten gar nicht ermittelt werden.

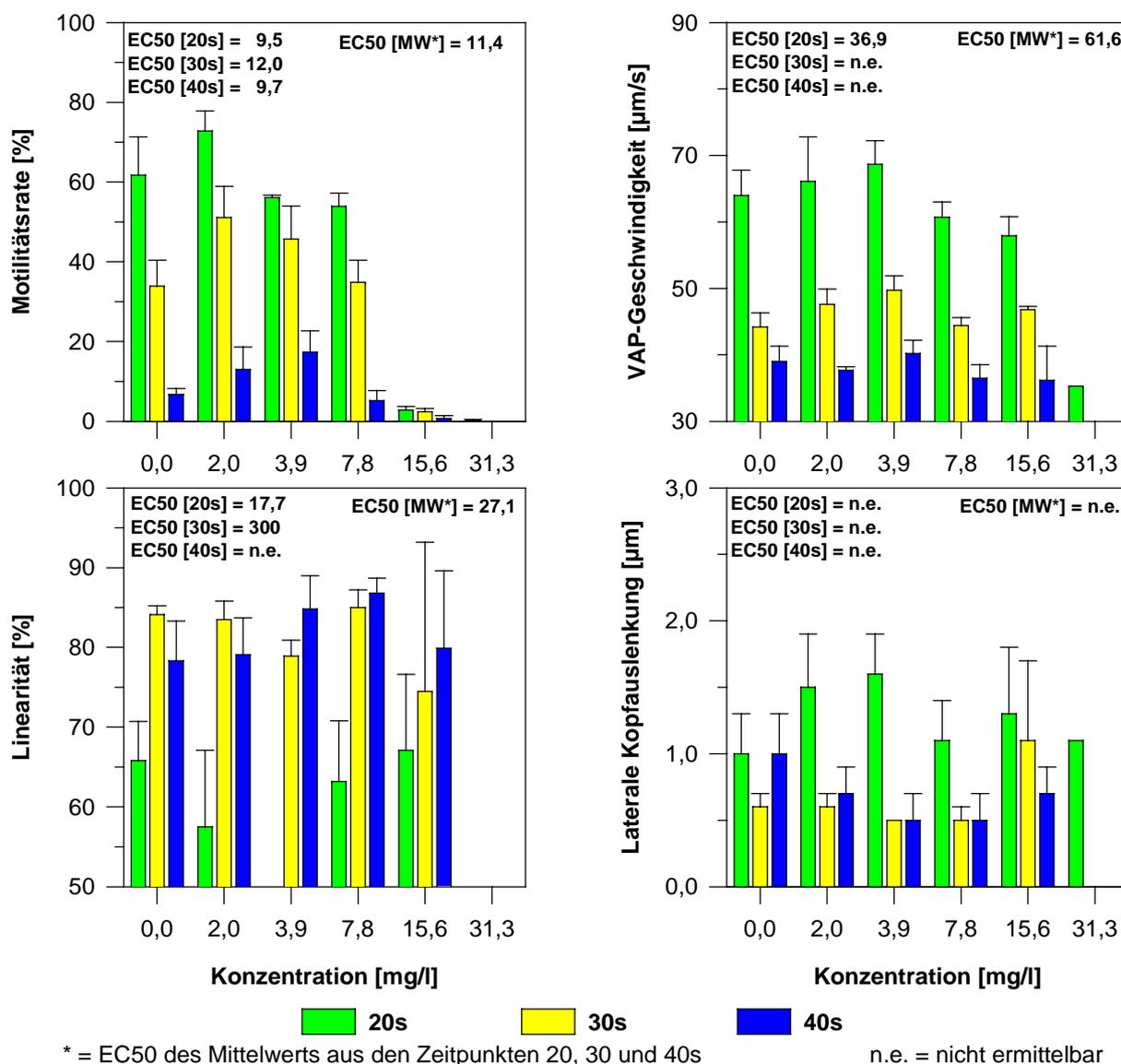


Abbildung 20: Motilitätseigenschaften von frischen Karpfenspermien und EC50-Werte nach Inkubation mit Cd(NO₃)₂ (4h/Eis)

Abbildung 21 zeigt anhand von Karpfenspermien, die mit 3,5-DCP inkubiert wurden, dass trotz niedriger Expositionstemperatur (Eisbad) eine Verdopplung der Expositionsdauer von zwei auf vier Stunden die Wirkschwellen herabsetzt. In diesem Versuch konnten auch mit dem zeitlichen Integral (Mittelwert aus den drei Messzeitpunkten) sinnvolle und empfindliche KWBs gemessen werden. Allerdings waren die Messwerte nach 40 s schon so niedrig, dass mit diesen Werten allein eine zuverlässige Bestimmung von Effektkonzentrationen nicht möglich ist.

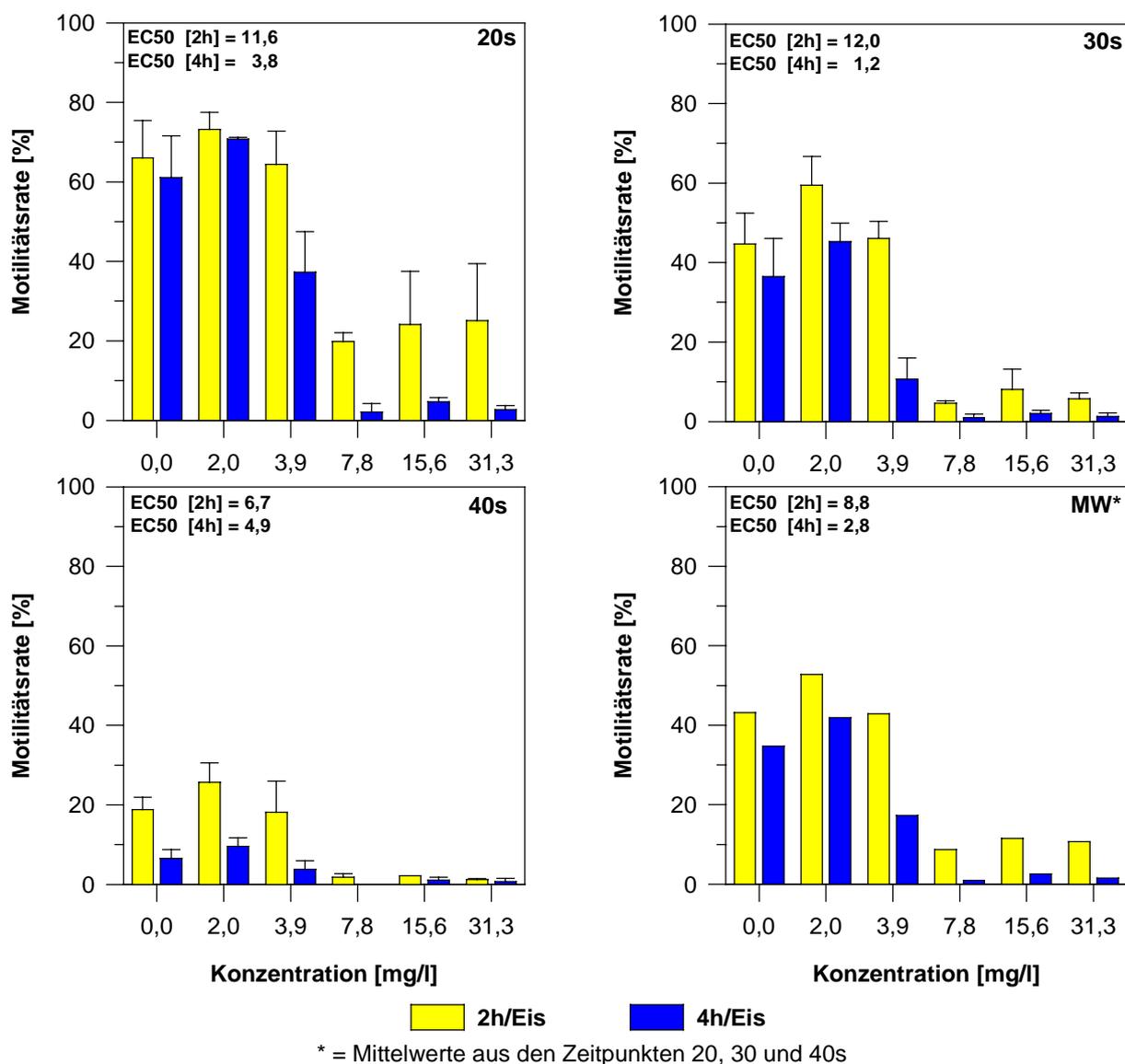


Abbildung 21: Motilitätsrate von frischen Karpfenspermien und EC50-Werte nach Inkubation mit 3,5-DCP (2 und 4h/Eis)

Bei Versuchen mit Sterletspermien und 3,5-DCP in einem breiteren Konzentrationsbereich bestätigte sich, was sich bei den Karpfenspermien angedeutet hatte: Bei Konzentrationen über etwa 15 mg/l drehte sich die KWB um und die Motilitätsrate stieg wieder an (Abbildung 22). Dieser Effekt trat jedoch nur bei zwei- und vierstündiger Exposition auf. Nach 25-stündiger Exposition konnte bei Konzentrationen von 12,5 mg/l oder höher keine Motilität mehr gemessen werden.

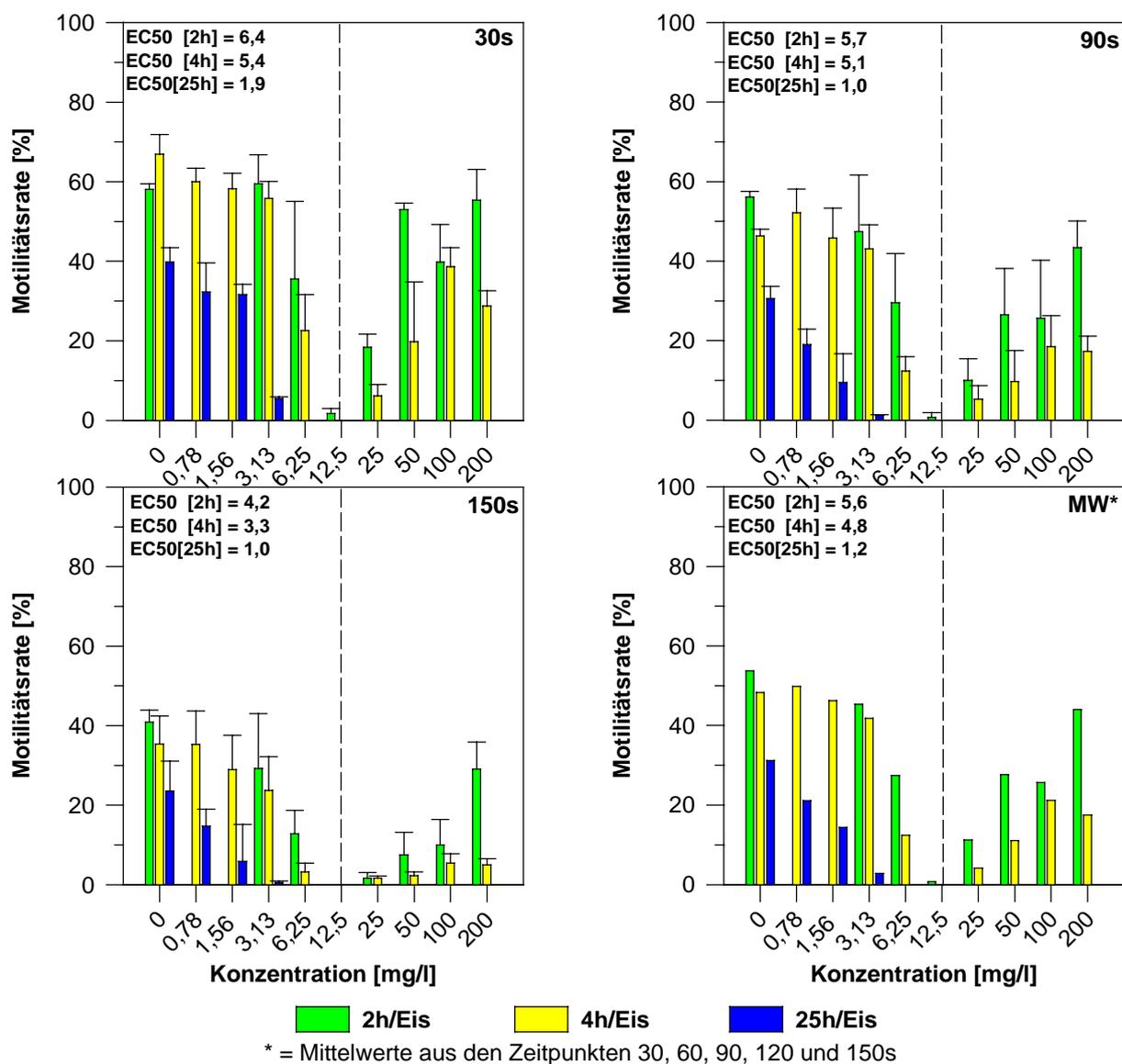


Abbildung 22: Motilitätsrate von frischen Sterletpermien und EC50-Werte nach Inkubation mit 3,5-DCP (2, 4 und 25h/Eis)

Bei Sterletpermien waren auch nach über zweiminütiger Aktivitätsphase noch sinnvolle KWBs zu messen, so dass mit den Mittelwerten aus den fünf Messzeitpunkten sinnvolle EC50-Werte ermittelt werden konnten. Auffällig ist, dass nicht nur mit zunehmender Expositionsdauer, sondern auch mit steigender Motilitätsphase die EC50-Werte niedriger werden. Dies trifft jedoch nicht auf die 25-stündige Exposition zu, da hier nach 150 s keine weitere Sensibilisierung im Vergleich zu 90 s festzustellen war.

Im Vergleich mit den Karpfenspermien (vgl. Abbildung 21) liegen die EC50-Werte für 3,5-DCP auf einem ähnlichen Niveau. Die Sterletpermien reagierten zwar nach zweistündiger Exposition etwas

empfindlicher auf 3,5-DCP, bei vierstündiger Exposition lagen jedoch die EC50-Werte der Karpfenspermien niedriger.

Die berechneten EC50-Werte zu den Motilitätsendpunkten für die in dieser Phase getesteten Substanzen sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Durchweg die niedrigsten EC50-Werte wurden mit dem Endpunkt Motilitätsrate ermittelt, wobei eine Verlängerung der Expositionszeit in allen Fällen zu einer Erhöhung der Sensitivität führte. Die Verdopplung der Expositionszeit von 2 h auf 4 h führte bei Karpfenspermien (Cd und 3,5-DCP) mindestens zu einer Halbierung der EC50-Werte für den Endpunkt Motilitätsrate; bei Sterletspermien (3,5-DCP) wurde die Erhöhung der Sensitivität erst nach längerer Exposition (1 Tag) deutlich. Ähnliche Beobachtungen wurden für den Endpunkt VAP-Geschwindigkeit gemacht, wobei in einem Fall (3,5-DCP mit Karpfenspermien) sogar eine deutliche Erhöhung des EC50-Werts nach vierstündiger Exposition auftrat. Noch uneinheitlicher reagierten die Parameter Linearität und laterale Kopfauslenkung (LHD). In einigen Versuchen konnten die Werte dieser Endpunkte nicht zur Berechnung einer EC50 herangezogen werden. Dies gilt auch für die VAP bei den Versuchen mit SDS, bei denen lediglich die Motilitätsrate eine konzentrationsabhängige Reaktion zeigte. Von dem Detergenz mussten jedoch vergleichsweise hohe Konzentrationen eingesetzt werden, um Effekte auf die Motilitätsrate messen zu können. In den unteren Konzentrationsbereichen bis etwa 30 mg/l kam es zu Stimulationseffekten.

Ein Einfluss der Aufbewahrungsdauer, die bis zu vier Tagen betragen hatte, auf die Empfindlichkeit der Testergebnisse konnte nicht aufgezeigt werden. Sofern die Qualität der Spermaproben gut genug war, um nach Ende der Aufbewahrungs- und Inkubationszeit noch Motilitätsraten in den Kontrollen von etwa 50% zu erreichen, konnten valide Ergebnisse gemessen werden.

Tabelle 13: EC50-Werte zum Endpunkt Motilität aus Phase 1

Substanz	Spezies	Qualität	Testbereich [mg/l]	Exposition	Endpunkt	EC50 [mg/l]
Cd	Karpfen	f (3h)	2,0–31,3	2h/Eis	Motilitätsrate	28
					VAP	70
					Linearität	n.e.
					LHD	69
	Karpfen	f (3h)	2,0–31,3	4h/Eis	Motilitätsrate	10
					VAP	37
					Linearität	18
					LHD	n.e.
	Sterlet	f (1d)	0,8–12,5	18h/Eis	Motilitätsrate	3,4
					VAP	6,3
					Linearität	9,0
					LHD	n.e.
3,5-DCP	Karpfen	f (2h)	2,0–31,3	2h/Eis	Motilitätsrate	12
					VAP	31
					Linearität	n.e.
					LHD	9,2
	Sterlet	f (2d)	3,1–12,5 (- 200)	2h/Eis	Motilitätsrate	5,6
					VAP	17
					Linearität	2397
	Karpfen	f (2h)	2,0–31,3	4h/Eis	Motilitätsrate	3,8
					VAP	547
					Linearität	6741
	Sterlet	f (2d)	0,8–12,5 (-200)	4h/Eis	Motilitätsrate	4,8
					VAP	11
					Linearität	100
	Sterlet	f (2d)	0,8–6,3	25h/Eis	Motilitätsrate	1,3
					VAP	8,5
					Linearität	35
					LHD	n.e.
	SDS	Sterlet	f (3h)	4–125	2h/RT	Motilitätsrate
VAP, Lin, LHD						n.e.
Digitonin	Sterlet	f (2d)	2,5–80	2h/RT	Motilitätsrate	22
					VAP	71
					Linearität	n.e.
					LHD	60

Karpfen: EC50-Berechnung auf Grundlage der Messwerte nach 20 s; Sterlet: EC50-Berechnung auf Grundlage des Mittelwerts der Messwerte nach 30, 60, 90, 120 und 150 s; f = frisch (in Klammern die Aufbewahrungsdauer auf Eis vor Testbeginn); n.e. = nicht ermittelbar

3.2.1.2 Membranintegrität

Die EC50-Werte aus den Versuchen mit der DNA-Färbemethode lagen überwiegend deutlich höher als beim Endpunkt Motilitätsrate (Tabelle 14). Lediglich mit SDS reagierte diese Methode empfindlicher als die Motilitätsrate. Mit Cadmium wurden zwar bei nativen Sterletspermien ähnlich niedrige EC50-Werte ermittelt, jedoch konnte mit kryokonservierten/aufgetauten Karpfenspermien bis zu einer Cd-Konzentration von 1000 mg/l keine konzentrationsabhängige Wirkung nachgewiesen werden. Auch beim 3,5-DCP reagierten die Spermien der beiden Fischarten unterschiedlich empfindlich. Mit dieser Substanz wurden mit frischen Karpfenspermien bei gleichen Expositionsbedingungen (2h/RT) deutlich niedrigere EC50-Werte ermittelt als mit frischen Sterletspermien. Der Einsatz von kryokonservierten Karpfenspermien produzierte bei 2h/RT mit 3,5-DCP einen EC50-Wert der vergleichbar hoch ist wie bei 4h/RT mit nativen Karpfenspermien (ca. 40 mg/l). Die zweistündige Inkubation von Sterletspermien mit 3,5-DCP auf Eis ergab einen EC50-Wert, der im Bereich von 0,2-stündiger Exposition bei Raumtemperatur lag (um 300 mg/l). Bei 24-stündiger Inkubation von Sterletspermien mit dieser Substanz wurden ähnlich niedrige EC50-Werte ermittelt wie beim Endpunkt Motilitätsrate nach zweistündiger Inkubation bei gleichen Bedingungen.

Tabelle 14: EC50-Werte zum Endpunkt Membranintegrität aus Phase 1

Substanz	Spezies	Qualität	Testbereich [mg/l]	Exposition	EC50 [mg/l]
Cd	Karpfen	k (6d)	4–1000	1h, 2h/RT	n.e.
	Sterlet	f (1d)	1,5–800	4h/RT	19
		f (3d)	0,4–200	40h/Eis	6,4
3,5-DCP	Karpfen	k (6d)	2–500	4h/RT	42
		f (2h)	2–500	2h/RT	39
				4h/RT	80
	Sterlet	f (3d)	4–2000	0,2h/RT	312
				0,5h/RT	256
				1h/RT	245
				2h/RT	227
	f (6h)	8–2000	2h/Eis	290	
	f (3d)	0,4–200	24h/Eis	6,8	
SDS	Sterlet	f (1d)	0,3–125	4h/RT	14
		f (6h)	1–500	19h/RT	7,6
		f (2d)	2–500	2h/Eis	19
Digitonin	Sterlet	f (1d)	4–1000	2h/RT	88

f = frisch (in Klammern die Aufbewahrungsdauer auf Eis vor Testbeginn); k = kryokonserviert (in Klammern die Einfrierdauer vor Testbeginn); n.e. = nicht ermittelbar

Substanzen, die in wässriger Lösung farbig sind sowie trübe oder gefärbte Abwasser konnten mit dieser Methode nicht geprüft werden, da die Farbe bzw. Trübung bei der Emissionsmessung des DNA-Farbstoffs zu Interferenzen führte. Die Folge waren offensichtlich falsche Ergebnisse oder Werte, die sich kaum voneinander unterschieden.

3.2.2 Phase 2

Die zweite Phase der ökotoxikologischen Versuche war vor allem durch die Neu-Auswahl der Chemikalien (außer Cadmium wurden 4-Nonylphenol, Crotonaldehyd und Rotenon getestet) und den zusätzlichen Endpunkt ATP-Gehalt gekennzeichnet. Die Expositionsbedingungen wurden auf vier Stunden im Eisbad bei Dunkelheit festgelegt. Auch in dieser Phase wurden die Spermien nach Ablauf der Expositionszeit nicht gewaschen, so dass Auswirkungen der Chemikalien während der Messung der Endpunkte (Motilität nach Verdünnung mit Initiatorlösung (Methode: MOT2F), ATP-Gehalt über Biolumineszenz (ATP2F), Membranintegrität über DNA-Färbung (DNA2F)) nicht ausgeschlossen werden können. Die Versuche in dieser Phase wurden ausschließlich mit nativen Karpfenspermien durchgeführt. Zu jeder Testsubstanz wurden mehrere Wiederholungsversuche (Versuchsreihen) angesetzt.

Aufgrund der Ergebnisse aus Phase 1 wurde der Anteil motiler Zellen (Motilitätsrate) als einziger Parameter für den Endpunkt Motilität ausgewählt. Zur Berechnung von EC-Werten wurde der Mittelwert (MW) aus den Messwerten der drei Zeitpunkte 20, 40 und 60 s herangezogen, da sich dieser integrale Parameter aus dem Anteil motiler Zellen und seiner zeitlichen Abhängigkeit als stabile und gleichzeitig empfindliche Größe erwiesen hatte. Im Folgenden wird dieser Endpunkt als **Motilitätsrate** bezeichnet.

3.2.2.1 *Motilitätsrate*

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus den verschiedenen Testreihen zu den einzelnen Substanzen war mit Ausnahme der Rotenon-Versuche zufriedenstellend (Abbildung 23). Bezüglich der EC-Werte wurden die geringsten Schwankungen mit 4-Nonylphenol/1%DMA (Variationskoeffizient (VK): 30,0%; n = 4) gemessen, gefolgt von Cadmium (VK: 32,5%; n = 4) und Crotonaldehyd (VK: 54,3%; n = 5). Besonders bemerkenswert waren die Versuche mit Rotenon/2,5% DMA. Die Wirkungen auf die Motilitätsrate erstreckten sich über einen weiten Bereich von ca. 1 ng/l – 100 mg/l, wobei der Bereich von Versuchsreihe zu Versuchsreihe mehr oder weniger unterschiedlich lag. Spätere Versuche zeigten, dass durch sehr sorgfältiges Verdünnen der Substanz geringere Schwankungen erreicht werden konnten und die dann ermittelten EC50-Werte auf noch niedrigerem Niveau lagen (s. Phase 3). Auffällig ist, dass

es bei allen vier Substanzen in den unteren Konzentrationsbereichen zu Steigerungen der Motilitätsrate im Vergleich zur Kontrolle ohne Chemikalie kam. Diese Stimulationseffekte waren auch Phase 1 der ökotoxikologischen Versuche beobachtet worden und traten ebenso beim Endpunkt ATP-Gehalt auf.

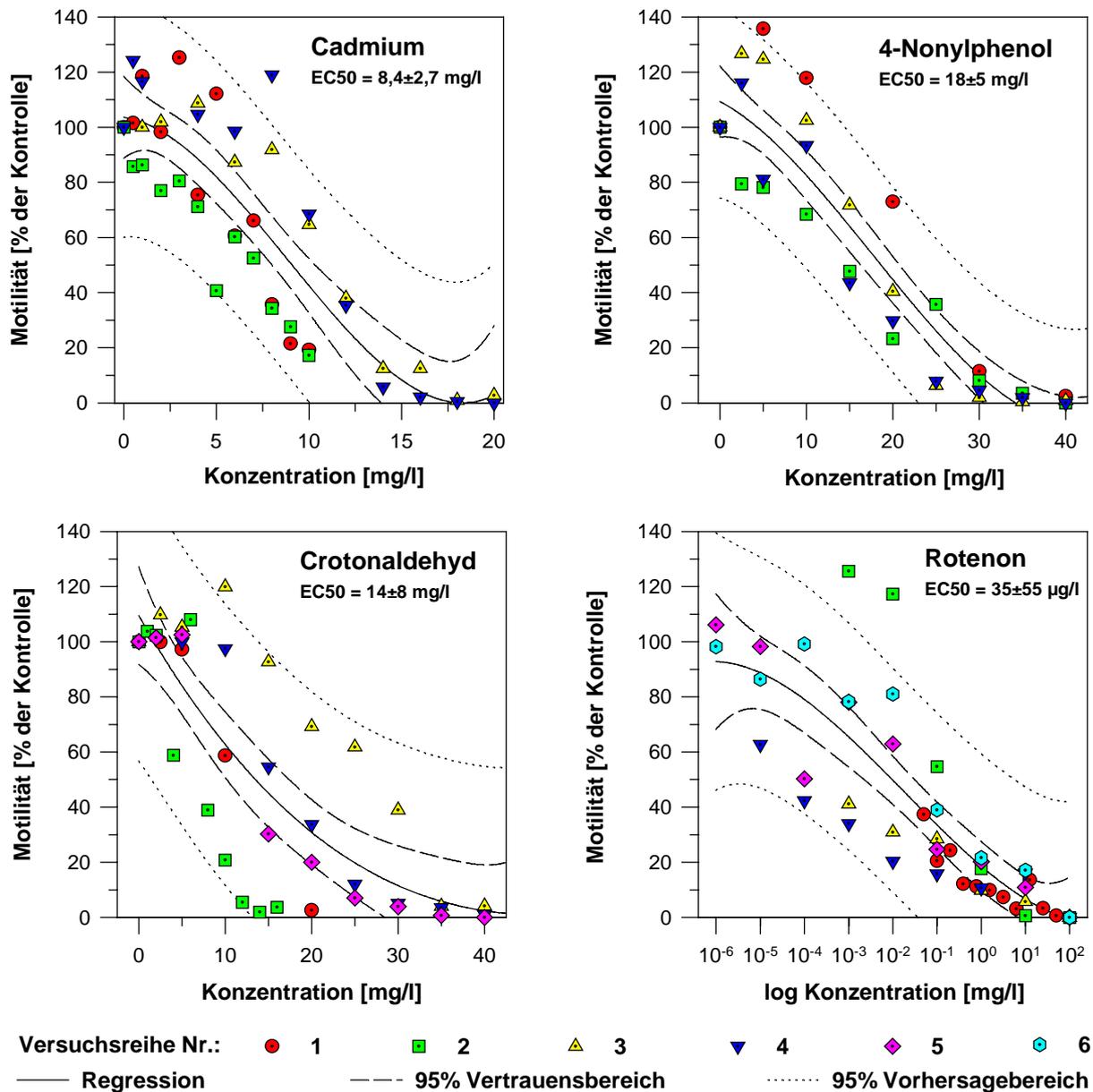


Abbildung 23: Versuchsreihen der Phase 2 zum Einfluss der Testsubstanzen auf die Motilitätsrate von frischen Karpfenspermien

3.2.2.2 ATP-Gehalt

Der in den Kontrollen gemessene ATP-Gehalt nach vierstündiger Inkubation in ImmoS lag zwischen knapp 6 und gut 12 nM ATP bezogen auf 10^8 Spermatozoen (Spz). Der Mittelwert betrug $7,7 \pm 1,6$ nM/ 10^8 Spz ($n = 15$). Durch Schadstoffeinwirkung wurde der gemessene ATP-Gehalt auf minimale Werte von unter $0,2$ nM/ 10^8 Spz reduziert. Diese geringen Werte wurden jedoch nur durch 4-NP erreicht. Die anderen drei Substanzen konnten auch in den höchsten Konzentrationen den ATP-Gehalt nicht unter 1 nM/ 10^8 Spz. drücken.

Bei den mit 4-NP behandelten Proben konnte eine deutliche positive Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Motilitätsrate ermittelt werden ($r^2 = 0,878$). Bei den Rotenon-Versuchen war dieser Zusammenhang nur schwach ausgeprägt ($r^2 = 0,278$). Die Versuchsreihen mit Cadmium und Crotonaldehyd ließen in dieser Hinsicht aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationsbereiche für die beiden Endpunkte Motilitätsrate und ATP-Gehalt keine Auswertung zu. In den Kontrollen konnte nach vierstündiger Inkubation keine Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Motilitätsrate bzw. VAP-Geschwindigkeit festgestellt werden (Abbildung 24).

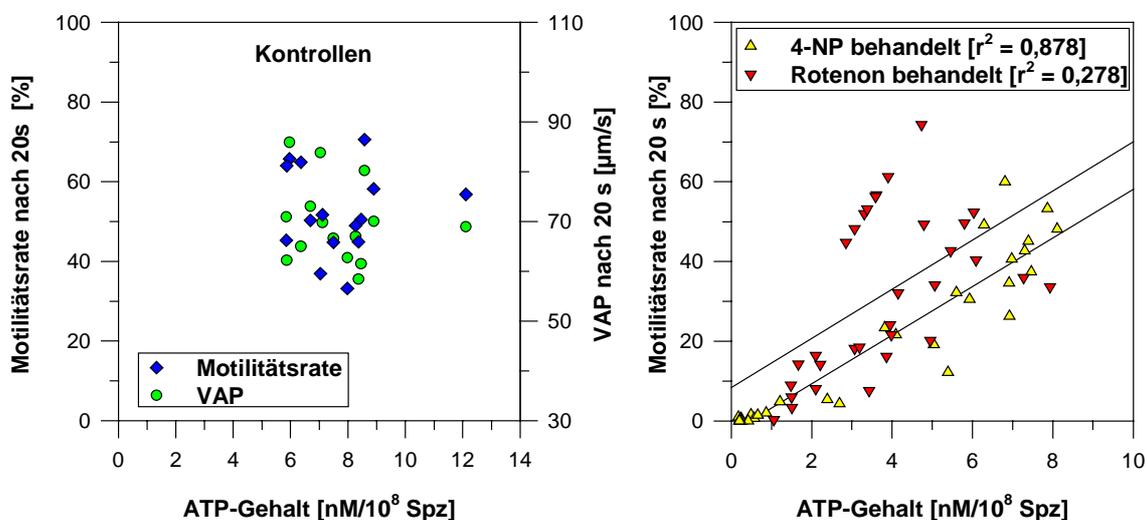


Abbildung 24: Zusammenhang zwischen ATP-Gehalt und Motilitätsrate in ImmoS (Kontrolle) sowie nach Behandlung mit 4-NP und Rotenon

Die EC50-Werte der Phase 2 zum Endpunkt ATP-Gehalt lagen mit Ausnahme der 4-NP/1% DMA - Versuche deutlich höher als beim Endpunkt Motilitätsrate (Abbildung 25). Beim Cadmium und beim

Rotenon/2,5% DMA waren die EC50-Werte um das 6–10-fache erhöht, beim Crotonaldehyd sogar um fast das 1000-fache. Die Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchsreihen waren jedoch geringer als beim Endpunkt Motilitätsrate. Die Variationskoeffizienten (VK) der EC50-Werte aus den Versuchsreihen mit Cadmium, 4-NP und Crotonaldehyd lagen zwischen 2,5 und 13,2%. In den Rotenon-Versuchen traten ähnlich wie in den Testreihen zur Motilität größere Schwankungen auf (VK = 87%).

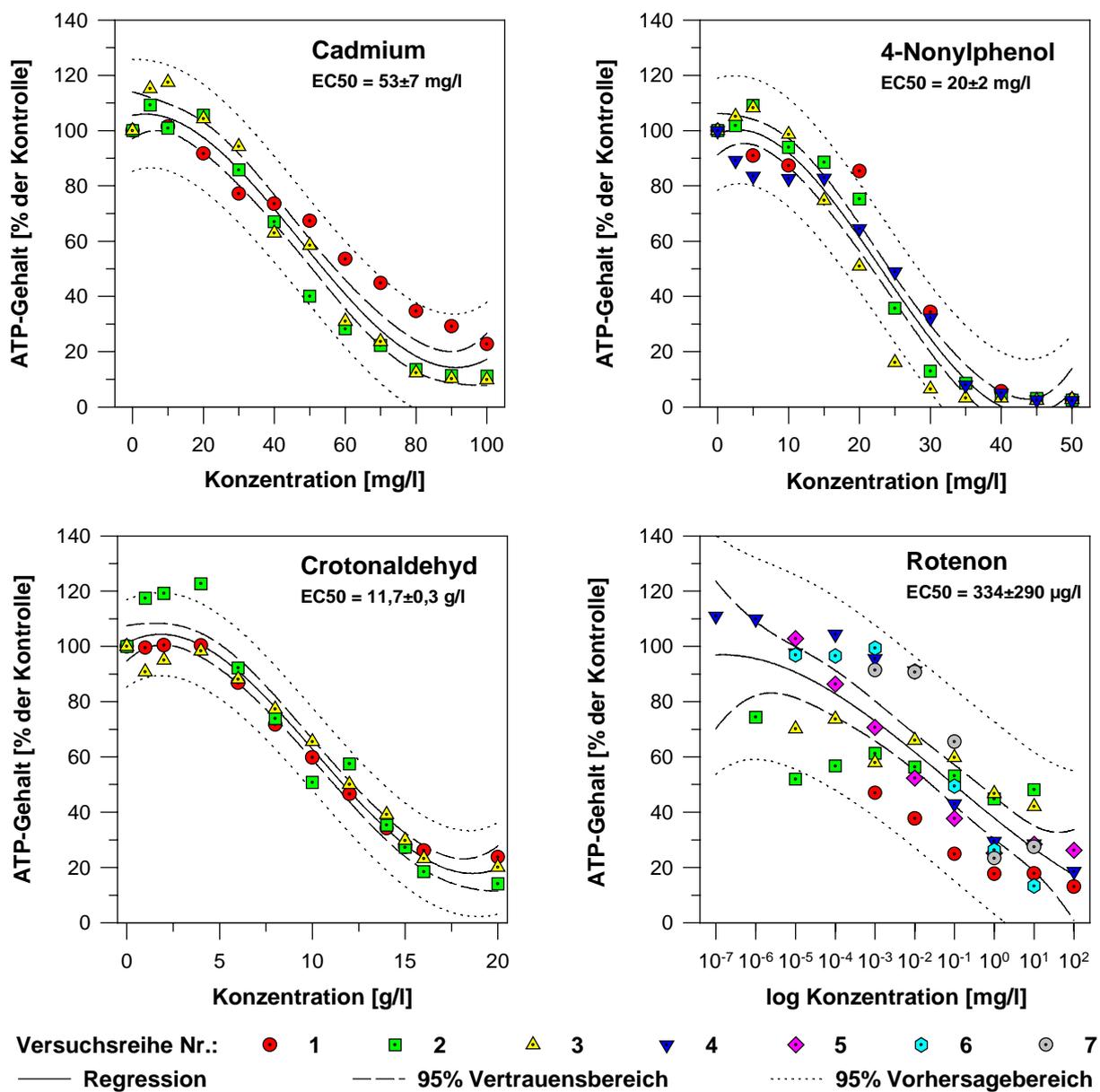


Abbildung 25: Versuchsreihen der Phase 2 zum Einfluss der Testsubstanzen auf den ATP-Gehalt von frischen Karpfenspermien

3.2.2.3 Membranintegrität

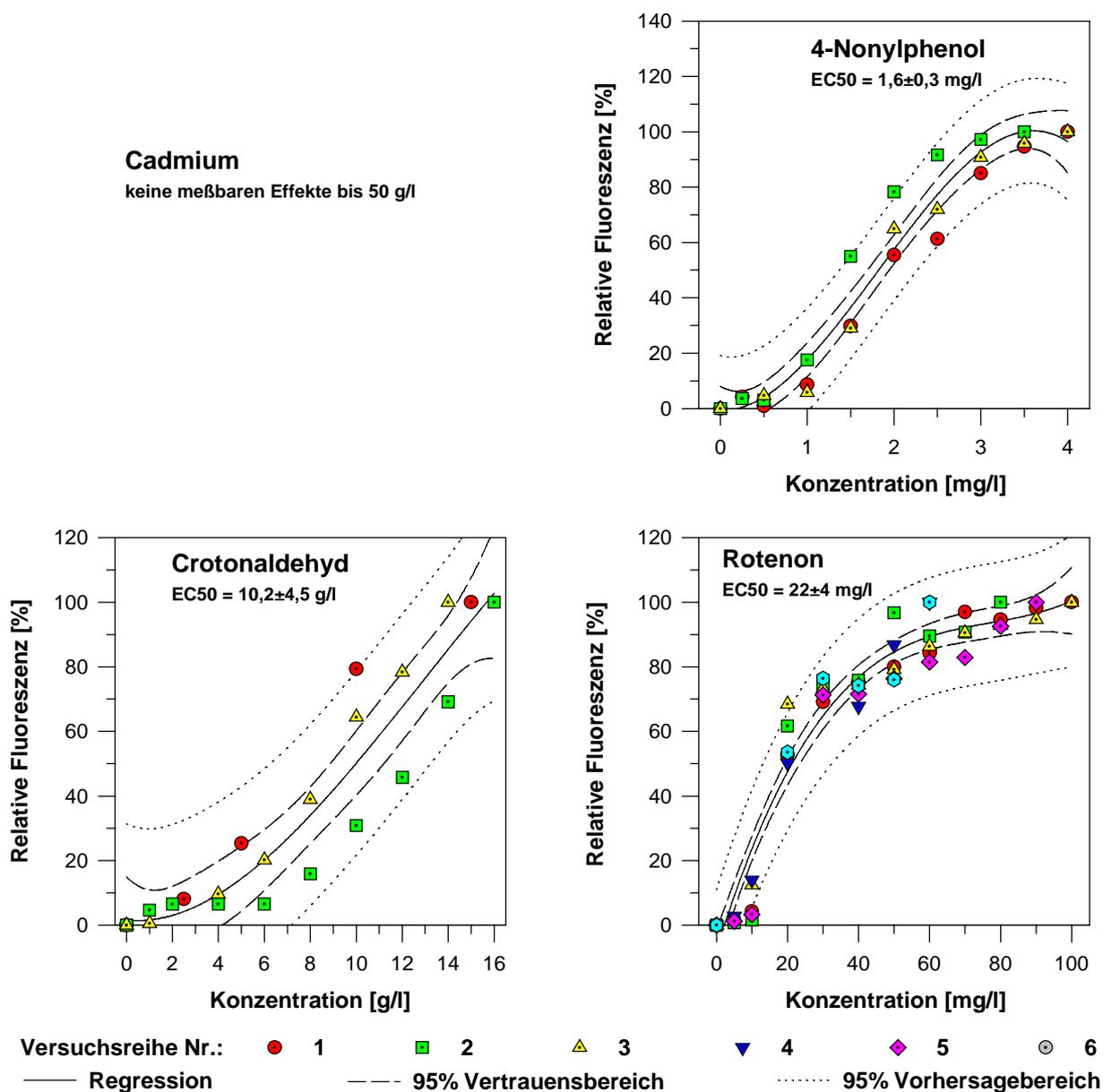


Abbildung 26: Versuchsreihen der Phase 2 zum Einfluss der Testsubstanzen auf die Membranintegrität von frischen Karpfenspermien

Die mit dieser Methode ermittelten EC50-Werte unterschieden sich überwiegend deutlich von denen aus den Motilitäts- und ATP-Versuchen (Abbildung 26). Eine Ausnahme bildet der Crotonaldehyd-Wert, der auf einem ähnlichen Niveau wie beim Endpunkt ATP-Gehalt lag. Mit Rotenon/5% DMA war dieser Test um den Faktor 100–1000 unempfindlicher als die anderen Rotenon-Tests zur Motilitätsrate und zum

ATP-Gehalt, bei denen jedoch nur 2,5% DMA zugesetzt war. Andererseits lag der EC50-Wert mit 4-NP/1% DMA im Vergleich um mehr als das 10-fache niedriger. Mit Cadmium konnte im Gegensatz zur Phase 1, in der noch deutliche Effekte auf frische Sterletspermien gemessen worden waren, keine Wirkung auf die Zellintegrität ermittelt werden. Die Reproduzierbarkeit der EC50-Werte ist mit Variationskoeffizienten zwischen 16,6% und 44,7% als gut zu bezeichnen.

3.2.2.4 Zusammenfassung Phase 2

In Abbildung 27 sind die mit den in Phase 2 angewendeten Methoden ermittelten EC10- und EC50-Werte zusammenfassend gegenübergestellt. Folgende Punkte sind hervorzuheben:

- Der Endpunkt Motilitätsrate reagierte in drei von vier Fällen am empfindlichsten, zeigte aber die größten Schwankungen zwischen den Wiederholungsversuchen.
- Der Endpunkt Membranintegrität reagierte vergleichsweise uneinheitlich: mit Cadmium konnten keine Effekte erzielt werden, ebenso rief das in den beiden anderen Testverfahren sehr stark wirkende Rotenon erst bei wesentlich höheren Konzentrationen Reaktionen hervor; andererseits wurden mit 4-NP die vergleichsweise niedrigsten EC-Werte ermittelt. Gemessen an den Variationskoeffizienten der EC50-Werte, die in keinem Fall über 50% lagen, waren die Ergebnisse gut reproduzierbar.
- Die Zuverlässigkeit und Empfindlichkeit des Endpunkts ATP-Gehalt lag zwischen den beiden anderen Endpunkten. In drei von vier Fällen lagen die Variationskoeffizienten unter 15% und die EC50-Werte im Bereich der Motilitätsrate bzw. um den Faktor 10 darüber. In einem Fall (Crotonaldehyd) war die Reaktion deutlicher unempfindlicher als beim Endpunkt Motilitätsrate und lag hier auf ähnlichem Niveau wie beim Endpunkt Membranintegrität.

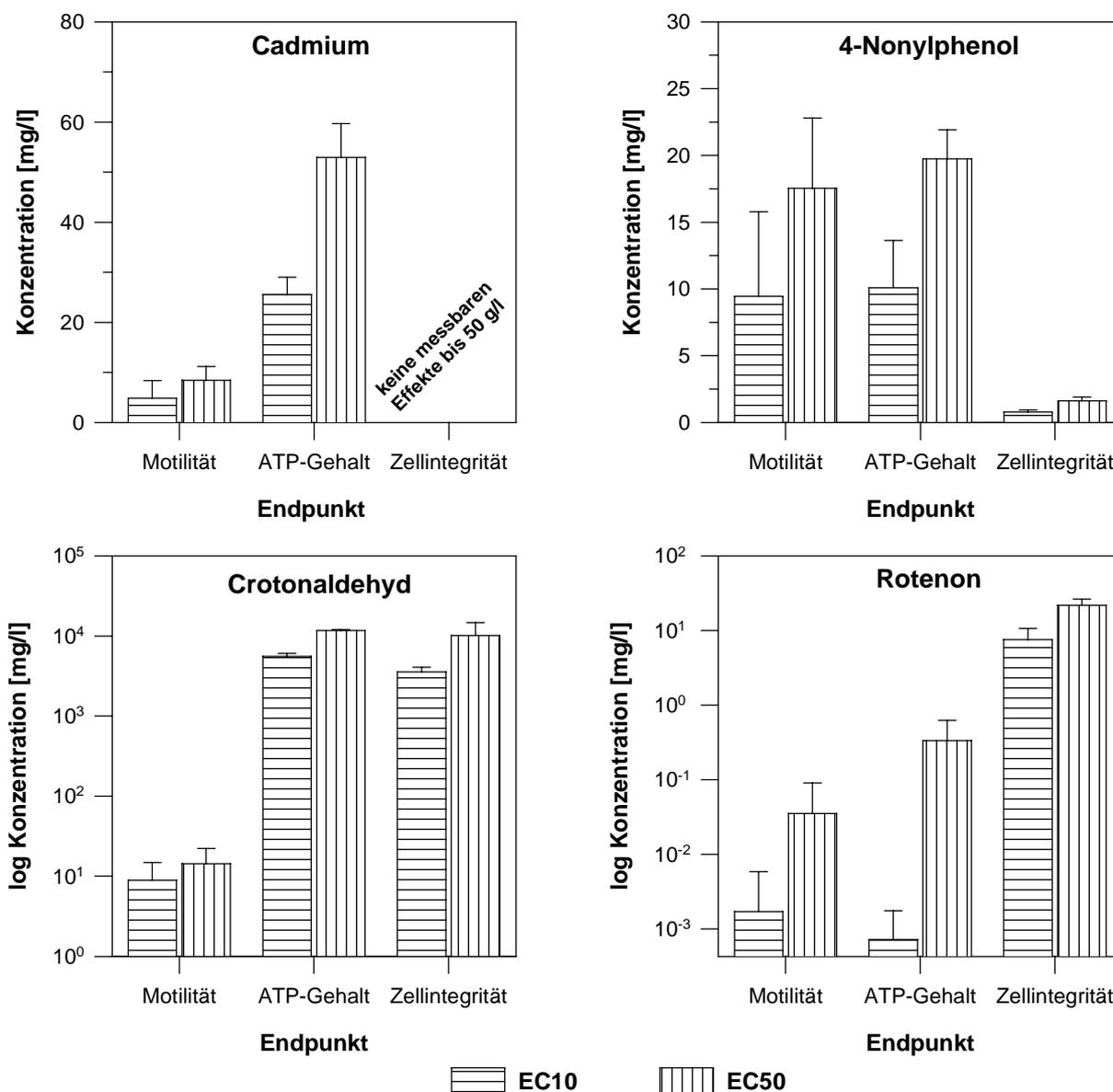


Abbildung 27: Methoden der Phase 2: Vergleich der mit den 3 Endpunkten ermittelten EC10- und EC50-Werte

3.2.3 Phase 3

In der dritten und letzten Phase der ökotoxikologischen Versuche wurden native und kryokonservierte Spermien parallel eingesetzt. Im Unterschied zu den ersten beiden Testphasen wurden die Proben nach Ablauf der Inkubation einer Waschprozedur unterzogen, um unerwünschte Effekte während der Messung der Endpunkte zu minimieren. Die Methoden wurden so aufeinander abgestimmt, dass die Ergebnisse für native und kryokonservierte Proben direkt vergleichbar sind.

Wie bereits erwähnt, war ein Einsatz von kryokonservierten Spermien im Motilitätstest nicht möglich. Nach dem Auftauen war die Motilitätsrate oft zu niedrig (< 20%) und/oder die Qualität der Proben sank innerhalb weniger Minuten beträchtlich. In der Regel waren bei aufgetautem Karpfensperma nach ca. 15 min nur noch wenige Zellen aktivierbar, und nach etwa 30 min war keine Motilität mehr messbar. Obwohl mit diesen Spermaproben keine Chemikalienversuche zum Endpunkt Motilitätsrate durchgeführt werden konnten, lieferten sie bei den beiden anderen Endpunkten sinnvolle KWBs (s.u.).

3.2.3.1 Motilitätsrate

Im Vergleich zur Phase 2 lagen die EC50-Werte, die mit den gewaschenen Spermien ermittelt wurden, bei allen vier Testsubstanzen deutlich niedriger (Abbildung 28). Die Sensitivität war beim Cadmium um den Faktor 3, beim 4-Nonylphenol um den Faktor 8, beim Crotonaldehyd um den Faktor 20 und beim Rotenon sogar um den Faktor 400 erhöht. Mit Ausnahme der Rotenon-Versuche, die wiederum stark schwankten, lagen die Variationskoeffizienten für die EC50-Werte zwischen 22% und 59% und unterschieden sich damit nur unwesentlich von Phase 2.

Die anfängliche Motilitätsrate (20 s nach Aktivierung) in den Kontrollen nach dem Ende der vierstündigen Expositionszeit lag mit durchschnittlich $40 \pm 12\%$ ($n = 16$) um 12 Prozentpunkte unter dem Durchschnitt in Phase 2 ($52 \pm 11\%$; $n = 15$). Diese Abnahme in der Motilitätsrate erklärt sich durch die beiden eingeführten Waschschrte, bei denen die Spermien zentrifugiert und resuspendiert wurden. Die Motilitätsraten der mit den Testsubstanzen behandelten Proben lagen bis auf wenige Ausnahmen, bei denen sich niedrige Konzentrationen leicht stimulierend auswirkten, entsprechend darunter.

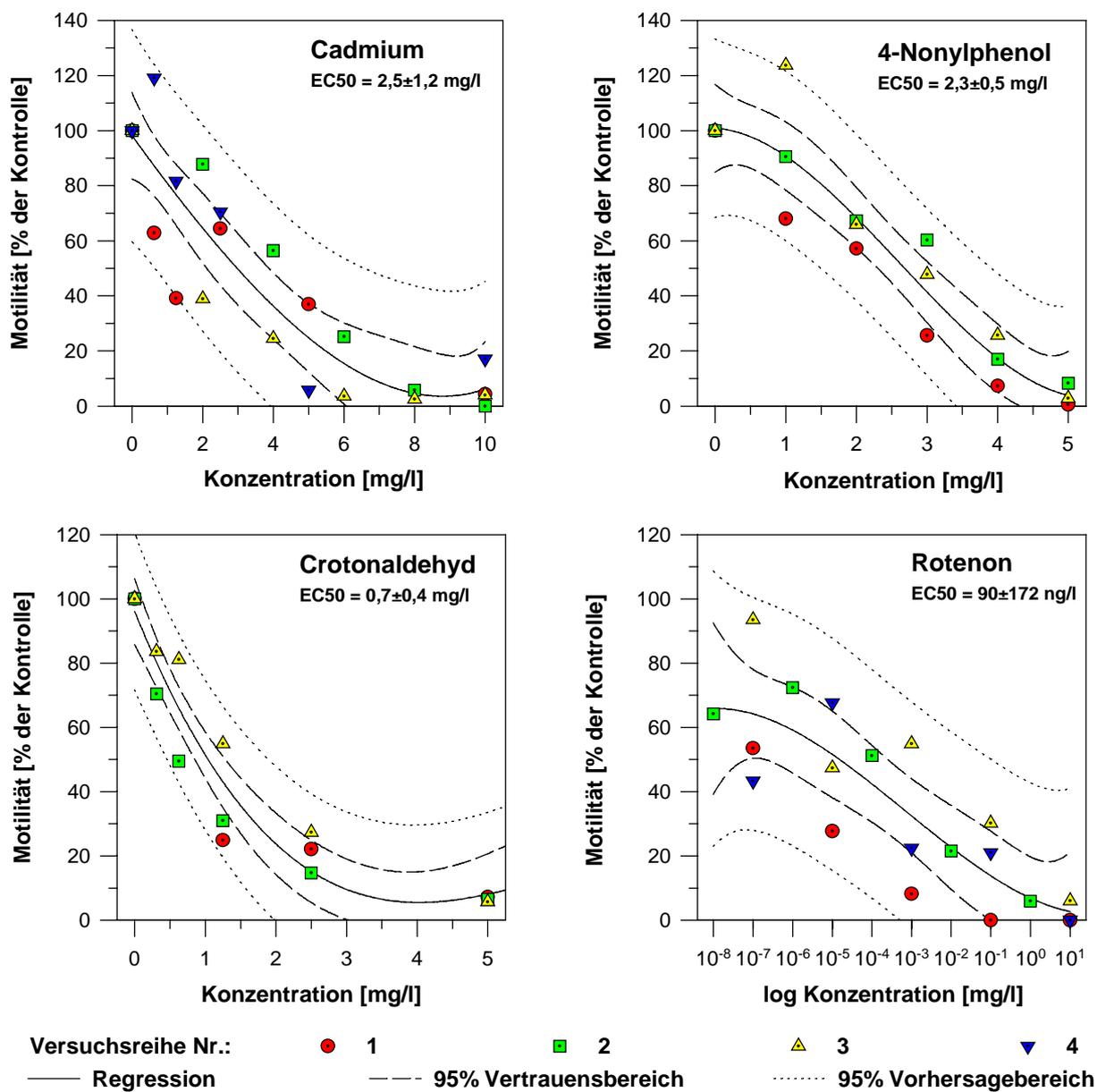


Abbildung 28: Versuchsreihen der Phase 3 zum Einfluss der Testsubstanzen auf die Motilitätsrate von frischen Karpfenspermien

3.2.3.2 ATP-Gehalt

3.2.3.2.1 Native Spermien

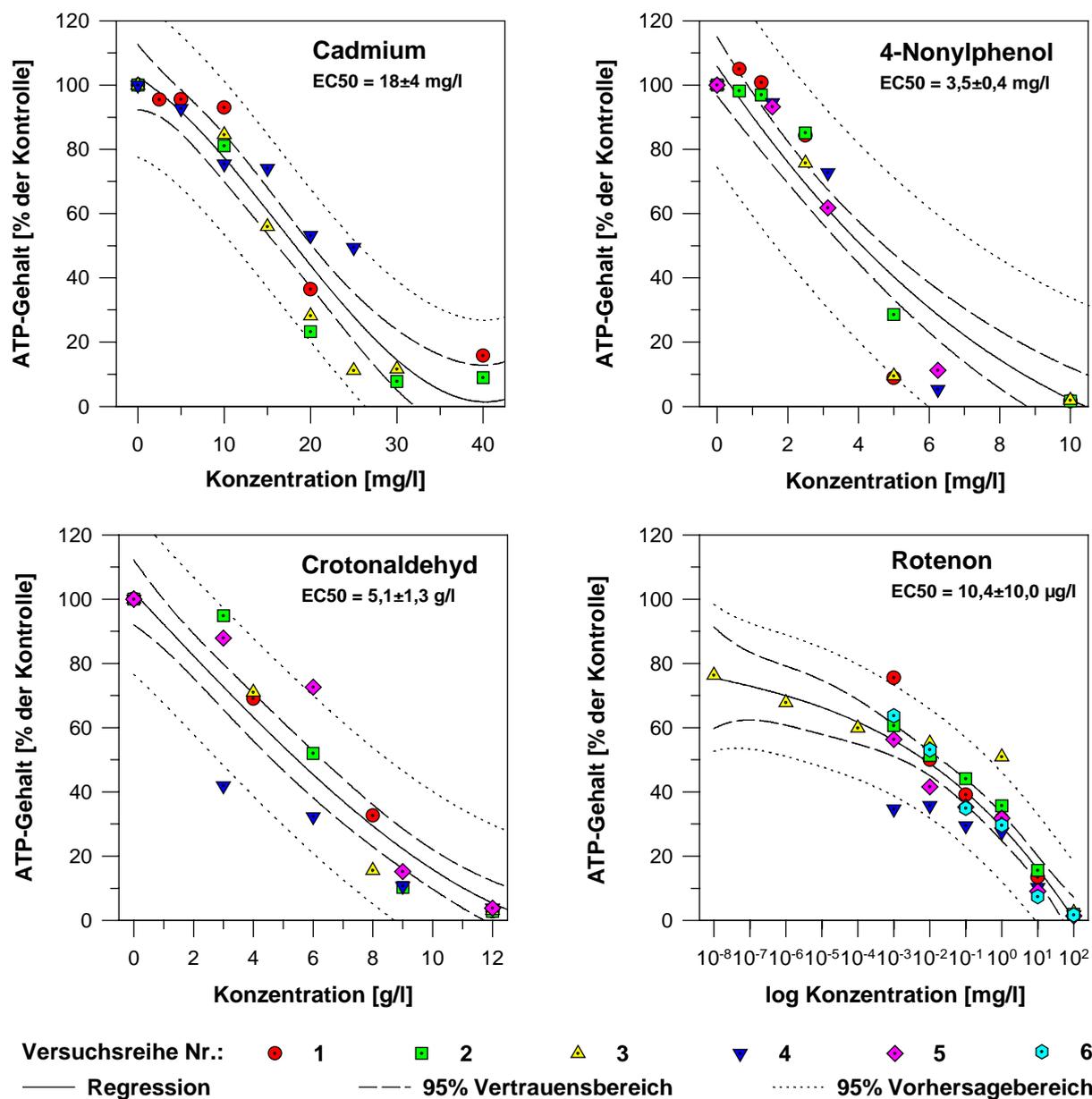


Abbildung 29: Versuchsreihen der Phase 3 zum Einfluss der Testsubstanzen auf den ATP-Gehalt von frischen Karpfenspermien

Die ATP-Konzentration in den Kontrollen lag nach der Inkubation im Durchschnitt bei $7,25 \pm 0,77$ nM/10⁸ Spz (n = 20), und war damit nur unwesentlich niedriger als in Phase 2 ($7,67 \pm 1,62$ nM/10⁸ Spz; n

= 15). Im Gegensatz zur Methode ATP2F (Phase 2) wurde mit den gewaschenen Spermien eine Reduktion des ATP-Gehalts auf unter $1 \text{ nM}/10^8 \text{ Spz}$ durch alle 4 Testsubstanzen gemessen. Bis auf Cadmium reduzierten die Testsubstanzen in den höchsten getesteten Konzentrationen den ATP-Gehalt sogar auf Werte von unter $0,2 \text{ nM}/10^8 \text{ Spz}$, was im Vergleich zur Kontrolle einem Äquivalent von etwa 2–3% entspricht. ATP-Gehalte von unter $0,1 \text{ nM}/10^8 \text{ Spz}$ wurden nicht gemessen und können in den Bereich des Messfehlers der Methode eingeordnet werden. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war im Vergleich zur Phase 2 nur unwesentlich schlechter (Abbildung 29).

Ähnlich wie beim Endpunkt Motilitätsrate wurde die Sensitivität des ATP-Tests im Vergleich zur Phase 2 durch die neue Methode deutlich erhöht. Beim Cadmium wurde der EC50-Wert um den Faktor 3, beim 4-NP um den Faktor 6, beim Crotonaldehyd um den Faktor 2 und beim Rotenon um den Faktor 30 reduziert.

Im Vergleich zum Endpunkt Motilitätsrate der Phase 3 liegen die EC50-Werte mit Ausnahme des 4-NP wiederum deutlich höher. Beim Crotonaldehyd und beim Rotenon vergrößerte sich der Sensitivitätsunterschied zur Motilität durch die neu eingeführten Methoden nochmals.

3.2.3.2.2 Aufgetaute Spermien

Der ATP-Gehalt der aufgetauten Karpfenspermien erreichte nach der vierstündigen Inkubationszeit in den unbehandelten Kontrollen Durchschnittswerte von $0,75 \pm 0,13 \text{ nM}/10^8 \text{ Spz}$ ($n = 16$), was etwa einem Zehntel des Wertes der nativen Spermien entspricht. Die niedrigsten gemessenen ATP-Werte der mit 4-NP behandelten Proben betragen $0,02 \text{ nM}/10^8 \text{ Spz}$ (ca. 3% der Kontrolle). Mit den anderen Substanzen konnte der ATP-Gehalt auch in den höchsten Schadstoffkonzentrationen nicht unter $0,1 \text{ nM}/10^8 \text{ Spz}$ gesenkt werden und blieb damit durchschnittlich bei 30% der Kontrollwerte.

Dennoch konnten für alle Substanzen gut abgesicherte EC50-Werte ermittelt werden, da der Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen (KWBs) gut reproduzierbar war (Variationskoeffizienten zwischen 9% und 36%). Im Vergleich zu den ATP-Tests der Phase 3 mit nativen Proben erhöhte sich die Empfindlichkeit der Spermien durch den Einfrier- und Auftauprozess. Zwar waren die EC50-Werte für 4-NP- und Rotenon auf einem ähnlichen Niveau, mit Cadmium (ca. Faktor 3) und noch stärker mit Crotonaldehyd (ca. Faktor 60) ergaben sich jedoch deutliche Sensitivitätssteigerungen (Abbildung 30).

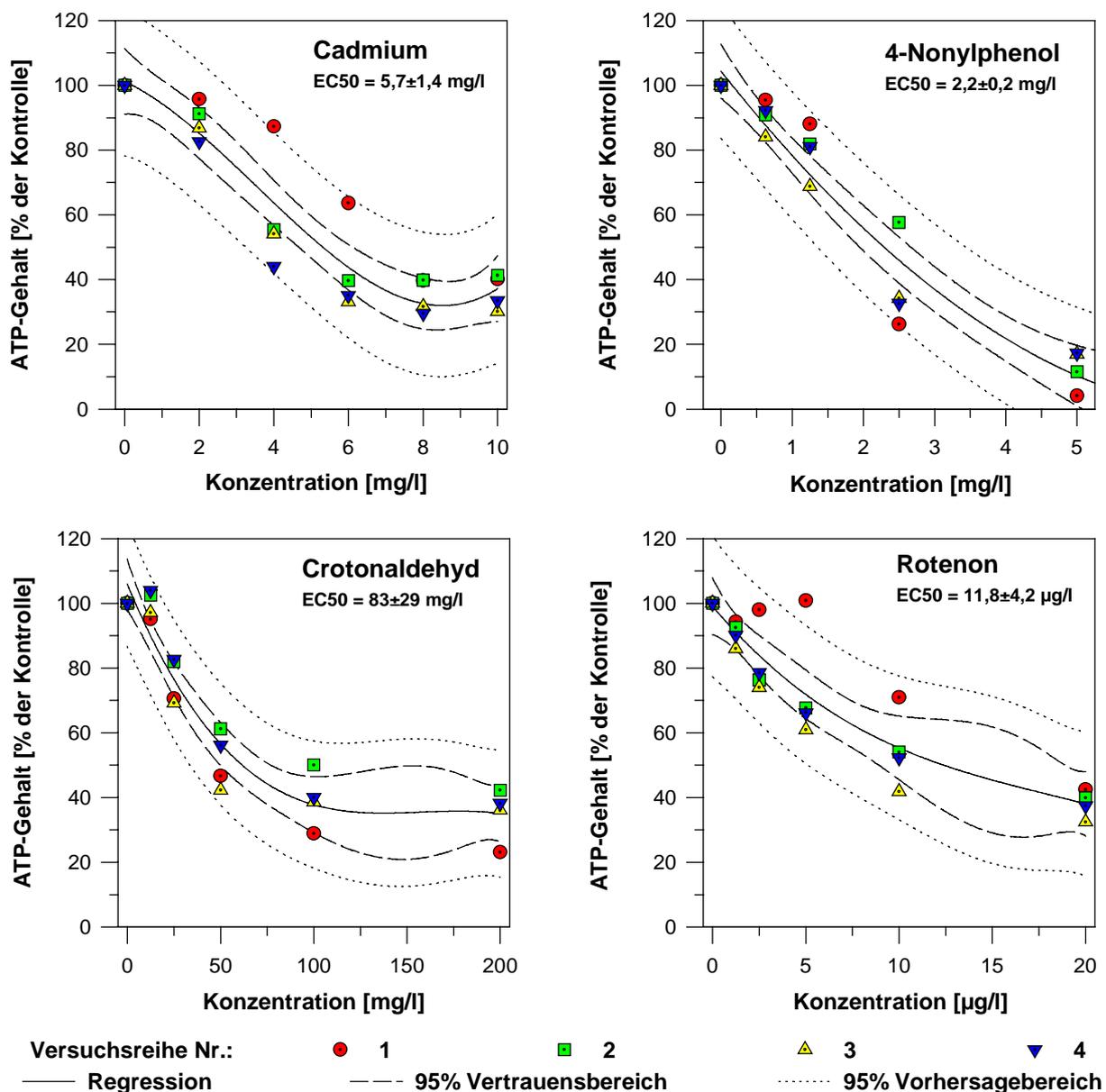


Abbildung 30: Versuchsreihen der Phase 3 zum Einfluss der Testsubstanzen auf den ATP-Gehalt von aufgetauten Karpfenspermien

3.2.3.3 Membranintegrität

3.2.3.3.1 Native Spermien

Neben Cadmium, welches bereits in den vorhergehenden Phasen keine messbaren Effekte hervorrief, konnte mit der erweiterten Methode der Phase 3 zum Endpunkt Membranintegrität (DNA3F bzw. DNA3K) auch mit Rotenon in Konzentrationen bis zu 200 mg/l keine KWB ermittelt werden. Mögliche

Gründe hierfür sind neben dem eingeführten Waschschritt im Lösemittelzusatz zu suchen, der aufgrund der Angleichung an die anderen Endpunkte von 5% auf 2,5% DMA reduziert wurde.

Im Gegensatz zu den anderen Endpunkten erhöhte sich die Sensitivität gegenüber Phase 2 durch die neue Methode nicht. Zwar konnte mit Crotonaldehyd eine etwas geringere EC50 ermittelt werden, mit 4-NP stieg die EC50 jedoch um den Faktor 5 (Abbildung 31). Dadurch lag die Empfindlichkeit dieses Endpunkts auch mit 4-NP unter der der anderen beiden Endpunkte (vgl. Phase 2). Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit den beiden verbliebenen Testsubstanzen war mit VKs von 10% und 14% sehr gut.

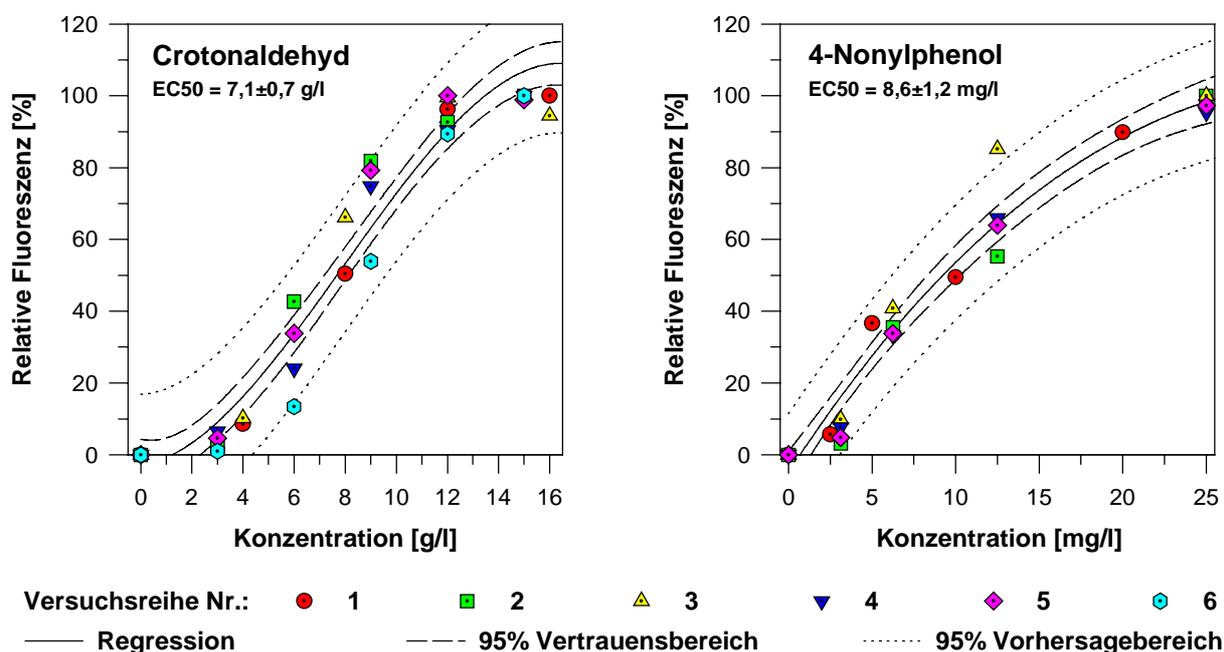


Abbildung 31: Versuchsreihen der Phase 3 zum Einfluss der Testsubstanzen auf die Membranintegrität von frischen Karpfenspermien

3.2.3.3.2 Aufgetaute Spermien

Im Vergleich zu den Versuchen mit nativen Spermien erhöhte sich die Sensitivität des Endpunkts durch den Einsatz von kryokonservierten Proben nur leicht. Mit Crotonaldehyd lag der ermittelte durchschnittliche EC50-Wert um das fünf- bis sechsfache niedriger als mit frischen Zellen; mit 4-NP reduzierte sich der Wert um etwa die Hälfte. Die VKs der EC50-Werte zeigten zwar mit 18% und 38% eine gute Reproduzierbarkeit an, lagen aber deutlich über den bei diesem Endpunkt bisher ermittelten Werten (Abbildung 32).

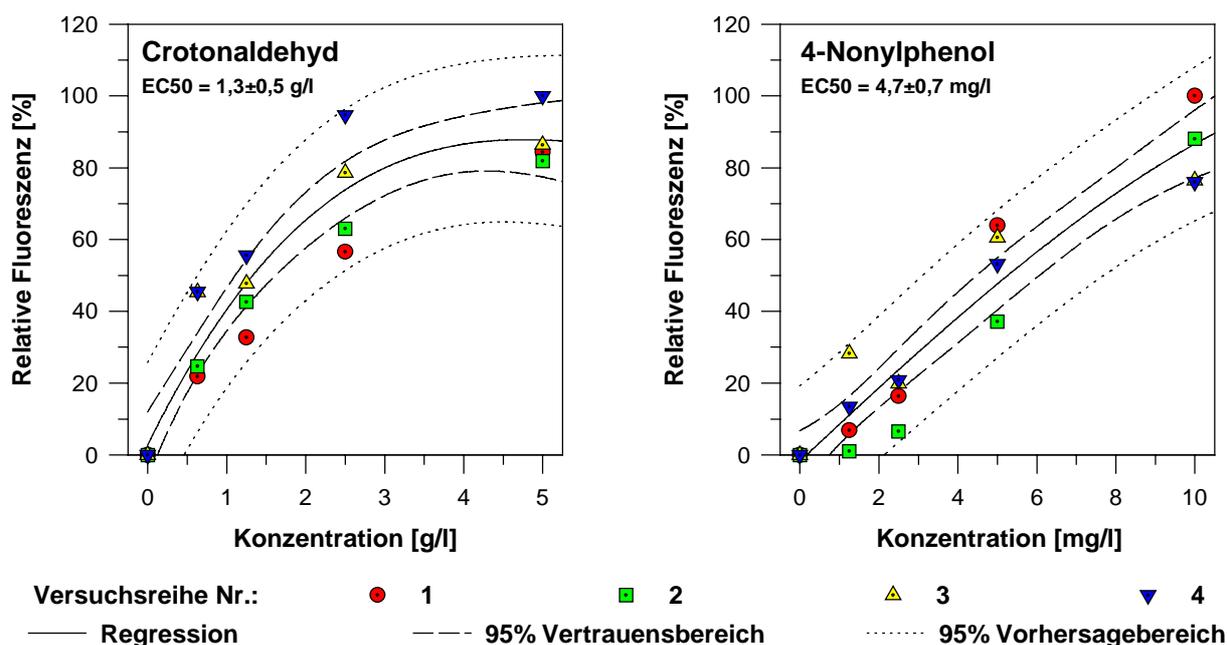


Abbildung 32: Versuchsreihen der Phase 3 zum Einfluss der Testsubstanzen auf die Membranintegrität von aufgetauten Karpfenspermien

3.2.3.4 Zusammenfassung Phase 3

Abbildung 33 vergleicht die in Phase 3 mit den drei Endpunkten ermittelten EC₅₀-Werte der 4 Testsubstanzen und stellt die Ergebnisse für native und kryokonservierte Proben gegenüber. Zusammenfassend lässt sich Folgendes aussagen:

- Im Vergleich zur Phase 2 wurde durch den Einsatz von gewaschenen Spermien die Sensitivität der Endpunkte Motilitätsrate und ATP-Gehalt gegenüber allen vier Testsubstanzen deutlich erhöht. Der Endpunkt Membranintegrität reagierte dagegen mit der neuen Methode etwas unempfindlicher, wobei lediglich mit zwei Testsubstanzen sinnvolle Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen ermittelt werden konnten.
- Der Endpunkt Motilitätsrate erreichte mit allen vier Schadstoffen die deutlich niedrigsten EC₅₀-Werte, gefolgt vom ATP-Gehalt.
- Kryokonservierte Spermien konnten in den Testverfahren zum ATP-Gehalt und zur Membranintegrität eingesetzt werden, jedoch nicht in den Motilitätstests. Im Vergleich zu den

EC50-Werten mit nativen Zellen reagierten die aufgetauten Spermien in fast allen Fällen noch empfindlicher.

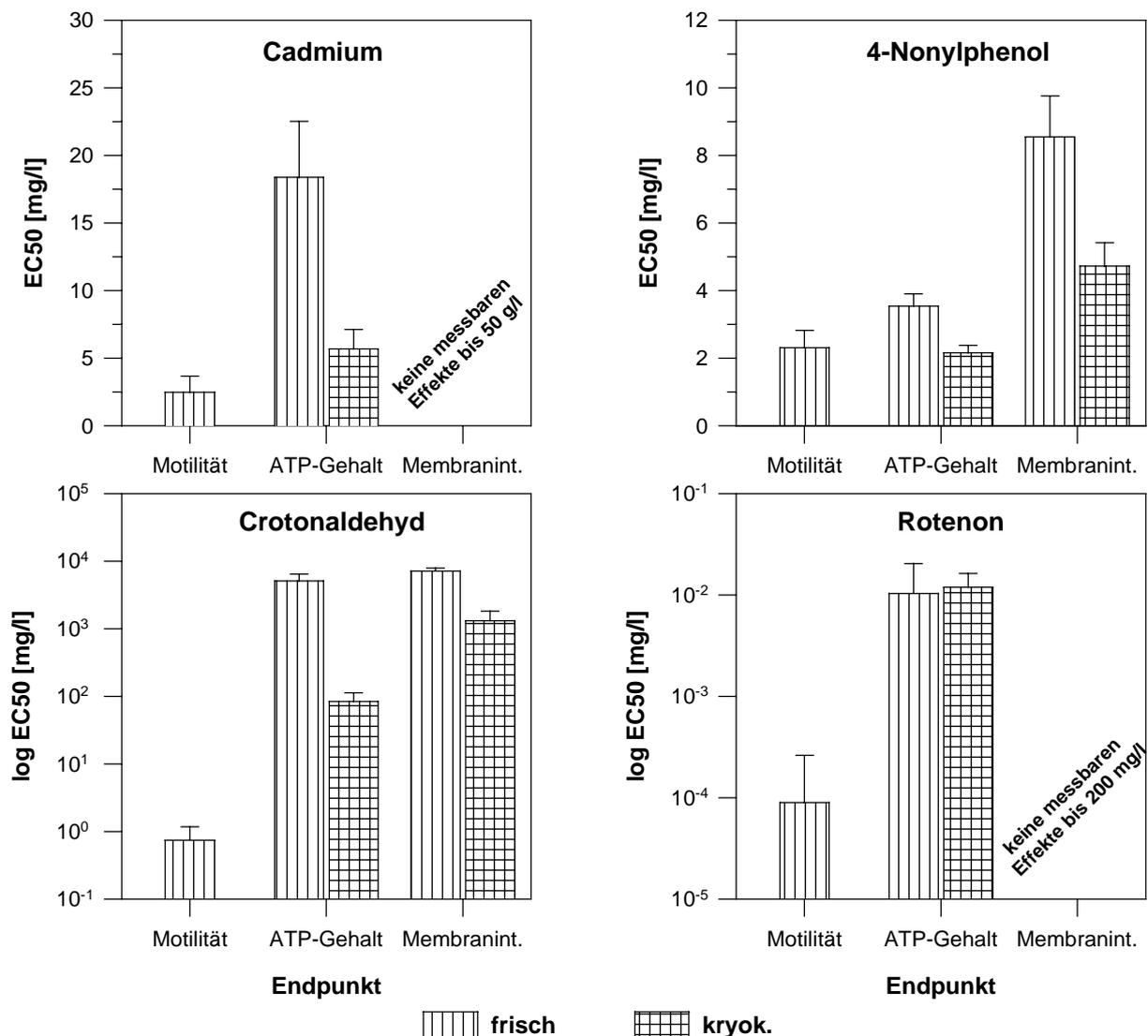


Abbildung 33: Methoden der Phase 3: Vergleich aller ermittelten EC50-Werte für frische und aufgetaute Karpfenspermien

- Die Reproduzierbarkeit der EC50-Werte war in den meisten Fällen gut. Abgesehen von den Rotenon-Versuchen, die wegen der außergewöhnlichen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen gesondert betrachtet werden müssen, lagen die Variationskoeffizienten im Durchschnitt unter 30%, wobei die geringsten Schwankungen mit den Endpunkten Membranintegrität und ATP-Gehalt ermittelt wurden.

- Im Vergleich zum Kontrollansatz ohne Schadstoff wurde die ATP-Konzentration in den kryokonservierten Proben mit Ausnahme der 4-NP-Tests durch die Einwirkung der Testsubstanzen um höchstens 70% gesenkt. Eine weitere Reduktion konnte auch durch den Einsatz höherer Schadstoffkonzentrationen nicht erreicht werden.

3.2.3.4.1 Abwasserprobe

Eine Abwasserprobe aus der chemischen Industrie Bitterfeld (v. 31.1.2000) wurde mit allen Testverfahren der Phase 3 geprüft. In Anlehnung an etablierte DIN-Verfahren zur Chemikalienprüfung (s.u.) wurde die Probe mit der Immobilisierungslösung in 1:2er-Schritten (G-Stufen) verdünnt und mit den Spermaproben wie beschrieben inkubiert (4h/Eisbad). In den Tests zum ATP-Gehalt wurden Wirkungen von G = 16 bis G = 512 gemessen. Im Motilitätstest erstreckte sich der Wirkungsbereich sogar von G = 32 bis G = 2028, jedoch ohne G = 256 und G = 1024. In den Tests zur Zellintegrität konnte hingegen weder bei nativen noch bei kryokonservierten Karpfenspermien eine Wirkung gemessen werden.

In den standardisierten Testverfahren wie Fischttest, Fischei-Test und Leuchtbakterientest wird als Endergebnis die Verdünnungs-(G)-Stufe genannt, bei der das für den Test festgelegte Toxizitätskriterium (z.B. Hemmung der Lumineszenz um mehr als 30%) nicht (mehr) erfüllt ist. Um die Ergebnisse aus den vorliegenden Testverfahren mit den standardisierten vergleichen zu können, müssen in diesem Fall für die Endpunkte Motilitätsrate und ATP-Gehalt Toxizitätskriterien eingeführt werden. In der unten aufgeführten Tabelle 15 sind die Ergebnisse für drei verschiedene mögliche Toxizitätskriterien genannt: Hemmung im Vergleich zur Kontrolle (ImmoS) um mindestens 20, 30 oder 50%.

Tabelle 15: Bewertung der Abwasserprobe unter Annahme verschiedener Toxizitätskriterien

Endpunkt	Zellqualität	G-Stufe bei Toxizitätskriterium:		
		20% Hemmung	30% Hemmung	50% Hemmung
Motilitätsrate ¹	nativ	2028	512	128
ATP-Gehalt	nativ	256	128	128
	kryokonserviert	256	256	128
Membranintegrität	nativ	-	-	-
	kryokonserviert	-	-	-

¹ G = 256 und G = 1024 wurden nicht gemessen

Bei Zugrundelegung einer 20- oder 30%igen Hemmung als Toxizitätsgrenze, ist der Endpunkt Motilitätsrate im Vergleich zum ATP-Gehalt auch mit der Abwasserprobe am empfindlichsten. Mit dem Toxizitätskriterium 30% Hemmung konnten deutliche und z.T. abgestufte Sensitivitätsunterschiede zwischen den Endpunkten ermittelt werden. So waren die kryokonservierten Zellen tendenziell wiederum etwas empfindlicher als die nativen Spermien. Bei Annahme einer 50%igen Hemmung als Toxizitätsschwelle ergab sich allerdings mit $G = 128$ die gleiche Verdünnungsstufe als Ergebnis für alle drei Endpunkte.