

## Anhang

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung eines Säugerspermiums (immotil/motil) .....	11
Abbildung 2:	Behandlungen des Fischspermas für die Motilitätsanalyse und die Substanztests .....	19
Abbildung 3:	Spiegelkarpfen ( <i>Cyprinus carpio</i> ) .....	20
Abbildung 4:	Sterlet ( <i>Acipenser ruthenus</i> ) .....	21
Abbildung 5:	Spermaabnahme beim Sterlet .....	22
Abbildung 6:	Verwendetes System für die computergestützte Videomikrographie (CASA) .....	24
Abbildung 7:	REM-Aufnahmen von kryokonservierten Karpfenspermien .....	28
Abbildung 8:	REM-Aufnahmen von kryokonservierten Sterletspermien .....	34
Abbildung 9:	Motilitätseigenschaften von frischen Sterletspermien mit und ohne Ca <sup>2+</sup> -Zusatz .....	60
Abbildung 10:	Motilitätseigenschaften von frischen Karpfenspermien in Abhängigkeit von der Messtemperatur .....	61
Abbildung 11:	Motilitätseigenschaften von frischen Karpfenspermien in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer in Immo1 .....	63
Abbildung 12:	Motilitätseigenschaften von frischen Sterletspermien nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen in ImmoA .....	64
Abbildung 13:	Motilitätseigenschaften von frischen Sterletspermien in Abhängigkeit von der Equilibrierungsdauer mit 35% EG (KryoE) .....	66
Abbildung 14:	Motilitätseigenschaften von frischen Sterletspermien nach 15-minütiger Equilibrierung mit 30–50% EG (Kryo B–D) .....	67
Abbildung 15:	Motilitätseigenschaften von aufgetauten Sterletspermien nach dem Einfrieren mit 30–50% EG (Kryo B–D; Profil I und II) .....	69
Abbildung 16:	Motilitätseigenschaften zum Zeitpunkt 30 s von aufgetauten Sterletspermien nach dem Einfrieren mit 40% EG (KryoC) und Sucrose in verschiedenen Konzentrationen (Profil I und III) .....	70
Abbildung 17:	Motilitätseigenschaften zum Zeitpunkt 20 s von aufgetauten Karpfenspermien nach dem Einfrieren mit 15% DMA/MK2 und Sucrose in verschiedenen Konzentrationen (Kryo1–4; Profil, I, II und III) .....	72
Abbildung 18:	Motilitätseigenschaften zum Zeitpunkt 20 s von aufgetauten Karpfenspermien nach dem Einfrieren mit 15–25% DMA und den Verdünnern Immo1 (Kryo6–8) bzw. MK2/200 mM Trehalose (Kryo9–11; alle Profil III) .....	73

Abbildung 19: Motilitätseigenschaften zum Zeitpunkt 20 s von aufgetauten Karpfenspermien nach dem Einfrieren mit Kryo3 (15% DMA/MK2/200 mM Sucrose) und Kryo10 (20% DMA/MK2/200 mM Trehalose) (Profil I und III).....	74
Abbildung 20: Motilitätseigenschaften von frischen Karpfenspermien und EC50-Werte nach Inkubation mit Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (4h/Eis) .....	80
Abbildung 21: Motilitätsrate von frischen Karpfenspermien und EC50-Werte nach Inkubation mit 3,5-DCP (2 und 4h/Eis).....	81
Abbildung 22: Motilitätsrate von frischen Sterletspermien und EC50-Werte nach Inkubation mit 3,5-DCP (2, 4 und 25h/Eis).....	82
Abbildung 23: Versuchsreihen der Phase 2 zum Einfluss der Testsubstanzen auf die Motilitätsrate von frischen Karpfenspermien.....	87
Abbildung 24: Zusammenhang zwischen ATP-Gehalt und Motilitätsrate in ImmoS (Kontrolle) sowie nach Behandlung mit 4-NP und Rotenon .....	88
Abbildung 25: Versuchsreihen der Phase 2 zum Einfluss der Testsubstanzen auf den ATP-Gehalt von frischen Karpfenspermien.....	89
Abbildung 26: Versuchsreihen der Phase 2 zum Einfluss der Testsubstanzen auf die Membranintegrität von frischen Karpfenspermien.....	90
Abbildung 27: Methoden der Phase 2: Vergleich der mit den 3 Endpunkten ermittelten EC10- und EC50-Werte .....	92
Abbildung 28: Versuchsreihen der Phase 3 zum Einfluss der Testsubstanzen auf die Motilitätsrate von frischen Karpfenspermien.....	94
Abbildung 29: Versuchsreihen der Phase 3 zum Einfluss der Testsubstanzen auf den ATP-Gehalt von frischen Karpfenspermien.....	95
Abbildung 30: Versuchsreihen der Phase 3 zum Einfluss der Testsubstanzen auf den ATP-Gehalt von aufgetauten Karpfenspermien.....	97
Abbildung 31: Versuchsreihen der Phase 3 zum Einfluss der Testsubstanzen auf die Membranintegrität von frischen Karpfenspermien.....	98
Abbildung 32: Versuchsreihen der Phase 3 zum Einfluss der Testsubstanzen auf die Membranintegrität von aufgetauten Karpfenspermien .....	99
Abbildung 33: Methoden der Phase 3: Vergleich aller ermittelten EC50-Werte für frische und aufgetaute Karpfenspermien.....	100
Abbildung 34: Übersicht: Angewendete Testverfahren sowie Forschungs- und Verbesserungsbedarf zu den Endpunkten Motilität (native Probe) und ATP-Gehalt (aufgetaute Probe) .....	146

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Messparameter und ihre Bedeutung .....	25
Tabelle 2:	Klassifizierung der Spermien .....	25
Tabelle 3:	Eingesetzte Gefrierprofile .....	26
Tabelle 4:	Zusammensetzung der wichtigsten mit Karpfensperma verwendeten Kryomittel.....	30
Tabelle 5:	Zusammensetzung der wichtigsten mit Sterletsperma verwendeten Kryomittel.....	34
Tabelle 6:	Getestete Substanzen und Bedingungen zum Endpunkt Motilität .....	47
Tabelle 7:	Getestete Substanzen und Bedingungen zum Endpunkt ATP-Gehalt .....	50
Tabelle 8:	Getestete Substanzen und Bedingungen zum Endpunkt Membranintegrität .....	53
Tabelle 9:	Motilitätseigenschaften von frischen Karpfen- und Sterletspermien .....	57
Tabelle 10:	Motilitätseigenschaften von aufgetauten Karpfen- und Sterletspermien .....	76
Tabelle 11:	Bedingungen und Ergebnisse aus den Befruchtungsversuchen mit Karpfensperma.....	77
Tabelle 12:	Bedingungen und Ergebnisse aus den Befruchtungsversuchen mit Sterletsperma .....	78
Tabelle 13:	EC50-Werte zum Endpunkt Motilität aus Phase 1 .....	84
Tabelle 14:	EC50-Werte zum Endpunkt Membranintegrität aus Phase 1 .....	85
Tabelle 15:	Bewertung der Abwasserprobe unter Annahme verschiedener Toxizitätskriterien .....	101
Tabelle 16:	Einzelstofftests: Vergleich der EC-Werte mit standardisierten Testsystemen.....	135
Tabelle 17:	Bitterfeld-Abwasser: Vergleich der G-Werte mit standardisierten Testverfahren.....	139
Tabelle 18:	Ermittelte EC50-Werte und G-Stufen aus Phase 3 der ökotoxikologischen Versuche ....	149

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben habe. Ich versichere außerdem, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat und dass sie, abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen, noch nicht veröffentlicht worden ist.

Dietmar Warnecke

Berlin, im Dezember 2002

### Teilpublikationen:

Warnecke, D. & Pluta, H.-J. (2003): Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. *Aquaculture* 215(1–4), 167–185

Jähnichen, H., Warnecke, D., Trölsch, E., Kohlmann, K., Bergler, H. & Pluta, H.-J. (1999): Motility and fertilizing capability of cryopreserved *Acipenser ruthenus* L. sperm. *Journal of Applied Ichthyology* 15, 204–206

Warnecke, D., Trölsch, E. & Pluta, H.-J. (1998): Kryopräservation von Fischspermien zur saisonunabhängigen Durchführung von Biotests (Fertilitätstests) nach § 7a WHG und ChemG. Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben des Umweltbundesamtes (FKZ 106 04 126)

## Lebenslauf

Name: Dietmar Warnecke

Geburtsdatum: 29. April 1964

Geburtsort: Flensburg

### Schulzeit

1970 – 1974: Grundschule Friedheim in Flensburg

1974 – 1983: Fördegymnasium Flensburg

26. Mai 1983: Abitur (Prüfungsfächer: Biologie, Französisch, Geschichte, Sport)

### Wehrdienst

Juli 1984 – Dezember 1986: Zeitsoldat (Funker bei der Bundesmarine)

### Studium

April 1987 – März 1994: Biologie-Studium an der Freien Universität (FU) Berlin

7. Oktober 1993: Diplom (Diplomarbeit an der Technischen Universität (TU) Berlin; Titel: „Erfassung und Bewertung der Entgiftungsaktivität und der genotoxischen Belastung bei *in situ* exponierten Organismen im Zu- und Ablauf einer Phosphateliminationsanlage“)

April 1991 – März 1994: Tutor am Institut für Tierphysiologie der FU Berlin

### Beruf

April 1994 – Januar 1995: Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der TU Berlin (Forschungsprojekt „METIER“, gefördert von der Europäischen Union)

Februar 1995 – Oktober 1997: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Umweltbundesamt (UBA-Forschungsvorhaben: „Kryopräservierung von Fischspermien zur saisonunabhängigen Durchführung von Biotests (Fertilitätstests) nach § 7a WHG und ChemG“)

November 1997– März 1999: Fortführung des o.g. Forschungsvorhabens als freier Mitarbeiter am UBA mit Doktorandenvertrag

April 1999 – März 2002: Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der FU Berlin, Institut für Biologie (Bodenökotoxikologie: u.a. Biotestentwicklung, Ringtestkoordination)

April – Dezember 2002: Verfassen der Dissertation

Vorauss. Februar 2003: Disputation und Promotion

### Publikationsliste

- Warnecke, D. & Pluta, H.-J. (2003): Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. *Aquaculture* 215(1–4), 167–185
- Hund-Rinke, K., Achazi, R., Römbke, J. & Warnecke, D. (2002): Avoidance test with *Eisenia fetida* as indicator for the habitat function of soils - results of a laboratory comparison test. *Journal of Soils and Sediments*, (OnlineFirst, DOI: <http://dx.doi.org/10.1065/jss2002.11.062>)
- Warnecke, D., Chroszcz, G., Schäfer, R. & Achazi, R.K. (2002): Bodenfauna-Tests. In: Hund-Rinke, K., Kördel, W., Erb, R. & Heiden, S. (Hrsg.): Ökotoxikologische Testbatterien - Ergebnisse eines DBU-geförderten Ringtests. Erich Schmidt Verlag, Berlin
- Hund-Rinke, K., Kördel, W., Hennecke, D., Achazi, R., Warnecke, D., Wilke, B.-M., Winkel, B. & Heiden, S. (2002): Bioassays for the ecotoxicological and genotoxicological assessment of contaminated soils. Part II: Assessment of the habitat function of soils - tests with soil microflora and fauna. *Journal of Soils and Sediments* 2(2), 83–90
- Jähnichen, H., Warnecke, D., Trölsch, E., Kohlmann, K., Bergler, H. & Pluta, H.-J. (1999): Motility and fertilizing capability of cryopreserved *Acipenser ruthenus* L. sperm. *Journal of Applied Ichthyology* 15, 204–206
- Warnecke, D., Trölsch, E. & Pluta, H.-J. (1998): Kryopräservation von Fischspermien zur saisonunabhängigen Durchführung von Biotests (Fertilitätstests) nach § 7a WHG und ChemG. Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben des Umweltbundesamtes (FKZ 106 04 126)
- Hansen, P.-D., Herbert, A., Pluta, H.-J., Jung, D., Wittekindt, E., Reinicke, A. & Warnecke, D. (1996): Recent studies on genotoxicity in the North Sea (I) - DNA damage in sediment exposed organisms. 8<sup>th</sup> International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 8), Pacific Grove, California/USA, April 2–5, 1995. *Marine Environmental Research* 42(1–4), 276
- Herbert, A., Warnecke, D., Dethlefsen, V. & Hansen, P.-D. (1996): Recent studies on genotoxicity in the North Sea (II) - DNA damage in adults and embryos of dab (*Limanda limanda*). 8<sup>th</sup> International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 8), Pacific Grove, California/USA, April 2–5, 1995. *Marine Environmental Research* 42(1–4), 277
- Herbert, A., Warnecke, D., Krumbek, H. & Hansen, P.-D. (1995): Parallel monitoring of mixed-functional oxygenase (MFO) induction and DNA damage in marine organisms. 7<sup>th</sup> International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 7), Göteborg, Sweden, April 20–22, 1993. *Marine Environmental Research* 39(1–4), 355–356

## Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Rudolf K. Achazi möchte ich mich außer für die hilfreiche Betreuung der Promotion besonders dafür bedanken, dass er mir die Freiräume gegeben hat, die zum Voranbringen und Fertigstellen der Dissertation notwendig waren.

Herrn P.D. Dr. Wolfgang Heger danke ich für sein kurzfristiges und spontanes Einspringen als Gutachter sowie für die konstruktiven Diskussionen und seine vielen nützlichen Anregungen.

Herr Dr. Hans-Jürgen Pluta hat mir die Möglichkeit gegeben, auf dem Versuchsfeld Marienfelde an dieser interessanten und herausfordernden Aufgabe zu arbeiten. Dafür und für die freundliche Unterstützung nach Beendigung des Projekts sowie für alle sonstigen Infos möchte ich mich bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Erika Trölsch, die mich in die Arbeitstechniken eingearbeitet hat, mir viele theoretische und praktische Dinge erklärt hat, mich auf Dienstreisen begleitet und unterstützt hat und immer offen für fachliche Diskussionen war.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Horst Jähnichen für die gute Zusammenarbeit und die nette gemeinsame Zeit während der Sterlet-Experimente in Wöllershof/Oberpfalz sowie für die wertvollen Tipps bei den Karpfen-Befruchtungsversuchen.

Dank auch an Herrn Fischzuchtmeister Bergler, an Herrn Dr. Schmeller und an alle beteiligten Mitarbeiter des Teichwirtschaftlichen Beispielsbetriebs Wöllershof für die vielfältige Unterstützung während der dortigen Aufenthalte.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch allen anderen Einrichtungen und ihren Mitarbeitern danken, die mich auf den „Forschungsreisen“ unterstützt haben: Bundesforschungsanstalt für Fischerei (Außenstelle Ahrensburg: Herr Dr. Kuhlmann; Institut für Ostseefischerei in Rostock: Frau Dr. Bleil), Fischzuchtanlage „Butt“ in Kiel-Strande (Herr Dr. Quantz, Herr Dr. Witt) und die Freester Heringsfischer.

Tolle Arbeit geleistet hat Herr Rolf Stenzel vom Fachbereich Geowissenschaften der FU Berlin bei der Präparation und den anschließenden REM-Aufnahmen der kryokonservierten Karpfen- und Sterletspermien. Ihm sowie Herrn Dr. Tischendorf und Herrn Michael Wehner möchte ich ganz herzlich für die Hilfe und unbürokratische Zusammenarbeit bei der Anfertigung der Aufnahmen danken.

Mein spezieller Dank gilt Billi (Dr. Pauli) für seine Hilfe bei der Auswahl geeigneter Testsubstanzen sowie für seine wertvollen Anregungen und Informationen während unserer Diskussionen über die gefundenen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen und die molekularen Wirkmechanismen der getesteten Substanzen.

Kristina (Dr. Heupel) und Jürgen (Dr. Kronshage) sei ganz herzlich für das zügige Korrekturlesen, die wertvollen Verbesserungsvorschläge und das humorvolle Aufbauen meiner Arbeitsmoral gedankt. Das angenehme Arbeitsklima in unserer Arbeitsgruppe (Dank auch allen anderen daran Beteiligten!) hat mir die Arbeit sehr erleichtert!

Allen sonstigen Mitarbeitern der FU Berlin und des UBA-Versuchsfelds sowie allen anderen netten Menschen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben und die ich hier nicht namentlich erwähnt habe, sei ebenfalls gedankt.

Last but not least gilt mein größtes Dankeschön meiner Freundin und Lebensgefährtin Karyn Anne, ohne die ich wahrscheinlich immer noch an dieser Arbeit sitzen würde oder es längst aufgegeben hätte. Sie hat mir während der Schreiberei immer den Rücken frei gehalten, mich moralisch unterstützt, mich positiv angegraben, mein Englisch verbessert und natürlich meine freie Zeit versüßt. ☺