

## DER HISTOCHEMISCHE NACHWEIS VON SCHWERMETALLEN IN DEN CHLORIDZELLEN AQUATISCHER INSEKTEN ALS INDIKATOR FÜR DIE GEWÄSSERBELASTUNG.

W. WICHARD & M. SCHMITZ<sup>1</sup>

### *Abstract*

In experiments using the methods of electrolyte histochemistry in combination with microanalysis of x-rays and with radio-active zinc it was shown that the chloride cells of mayfly larvae and other aquatic insects accumulate heavy metals. The chloride cells are suggested as indicators of heavy metal pollution in water.

### **Einleitung**

Die Osmoregulation aquatischer Organismen steht in unmittelbarem Zusammenhang mit den im Wasser gelösten Salzen. Sie bewirken einen osmotischen Druck im Wasser und induzieren in Anhängigkeit von ihrer Konzentration eine osmotische Hyper- oder Hyporegulation. Die Insekten befinden sich meist als Bewohner salzreicher Gewässer im hypotonischen Milieu und sind demzufolge zur hyperosmotischen Regulation befähigt. Zur Aufrechterhaltung der hohen ionalen Hämolympchkonzentration pumpen sie gelöste Salze aus dem wässrigen Milieu in die Hämolymphe. Für diese notwendige Salzaufnahme kommen beispielweise bei Eintagsfliegen die Chloridzellen auf dem Integument der Larven in Frage (WICHARD, KOMNICK & ABEL 1972).

Bei den Chloridzellen ist in einer Initialphase der Ionenabsorption die Akkumulation von Ionen aus dem umgebenden Wasser vorgeschaltet. Nach histochemischen Befunden werden hierbei im Apex der Zellen Kationen ( $\text{Na}^+$ ) und Anionen ( $\text{Cl}^-$ ) unter der wahrscheinlichen Beteiligung von Mucosubstanzen angereichert (WICHARD & KOMNICK, 1971; KOMNICK, RHEES & ABEL, 1972). Es bleibt weiteren Arbeiten die Klärung vorbehalten, ob und in welcher Weise den Strukturen des Apex eine allgemeine Ionenaustauscherfunktion zugeschrieben werden kann. Diese Untersuchung demonstriert allein die Schwermetallakkumulation in den Chloridzellen und will auf die Bedeutung der Chloridzellen als Indikator für die Gewässerbelastung aufmerksam machen.

### **Freilanduntersuchung**

Zum histochemischen Nachweis der Schwermetallakkumulation in den Chloridzellen wurden Larven von *Baetis rhodani* L. (Ephemeroptera, Baetidae) aus dem nur

1. Wir danken Herrn Prof. Dr. W. KLOFT, Institut für Angewandte Zoologie der Universität Bonn, für einen Arbeitsplatz und die Möglichkeit zu Szintillationsmessungen.

schwach mit Schwermetallen belasteten Pleisbach untersucht. Der Pleisbach entspringt als Logebach im Siebengebirge und entwässert nach einem ca 30 km langen Lauf über die Sieg in den Rhein. Bei Uthweiler ist die Probestelle des Pleisbachs der Güteklasse II - III ( $\beta$ - $\alpha$  mesosaprob) zugeordnet. Zur chemischen Charakterisierung mögen zwei im August und September 1974 ausgeführte Analysen dienen:

pH		7,8 – 8,0
Leitfähigkeit $\mu\text{S cm}^{-1}$		330 – 380
O <sub>2</sub>	mg/l	8,2 – 8,3
O <sub>2</sub> -Zehrung	mg/l	2,0 – 3,2
CO <sub>2</sub>	mg/l	5,3 – 6,3
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	mg/l	0,5 – 0,7
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	mg/l	0,1 – 0,25
NO <sub>3</sub>	mg/l	22,5 – 31,7
Kalzium	mg/l	43,0 – 44,4
Kalium	mg/l	7,1 – 7,2
Eisen	mg/l	0,03 – 0,11
Zink	mg/l	0,01 – 0,20

Die Larven des Pleisbachs wurden nach gründlichem Baden in aqua bidest. in 10% Ammoniumsulfid-Lösung überführt und nach 10 Minuten wiederum in aqua bidest. ausgewaschen, um sie anschließend in 70% Alkohol zu konservieren. Die Behandlung mit Ammoniumsulfid führt am Ort der Schwermetallakkumulation zu topochemischen Reaktionen, deren Reaktionsprodukte aus schwer löslichen Metallsulfidpräzipitaten bestehen. Die qualitative Analyse der so lokalisierten Metallsulfide wurde mit der Röntgenmikroanalyse in Verbindung mit dem Rasterelektronenmikroskop durchgeführt. Im energiedispersiven Röntgenspektrum zeigt dabei die Flächenanalyse über eine Tracheenkieme, die im respiratorischen Epithel mehrere hundert Chloridzellen aufweist, die Metalle Aluminium, Eisen, Kupfer und Zink an (Abb. 1 oben). Vergleichsweise zeigt die Punktanalyse innerhalb einer Chloridzelle (Abb. 1 unten) eine deutliche Intensitätsverstärkung für die metallischen Elemente Eisen und Zink, die in der K $\alpha$  und K $\beta$ , bzw. K $\alpha$  und L $\alpha$  Linie nachgewiesen werden, während Aluminium und Kupfer im Röntgenspektrum der Punktanalyse keine Intensitätsverstärkungen aufweisen. Der Nachweis von Aluminium wird auf den Al-Präparateträger und von Kupfer auf Verschmutzungen bei der Kohlebedampfung zurückgeführt. Abgesehen von diesen methodischen Fehlern weist jede Intensitätsverstärkung bei der Punktanalyse in den Chloridzellen gegenüber der Flächenanalyse einer Tracheenkieme darauf hin, daß die Orte Schwermetallakkumulation allein die Chloridzellen auf den Tracheenkiemen sind.

## Laboruntersuchung

Um die Schwermetallakkumulation in den Chloridzellen vorläufig zu charakterisieren, wurden zwei Adsorptionsversuche durchgeführt.

1. Werden die Larven von *Baetis rhodani* L. (Ephemeroptera, Baetidae) nach Entnahme aus dem Pleisbach noch zwei Stunden in aqua bidest. gehalten, wird also die kontinuierliche Zufuhr gelöster Salze mit Sicherheit unterbrochen, so weisen

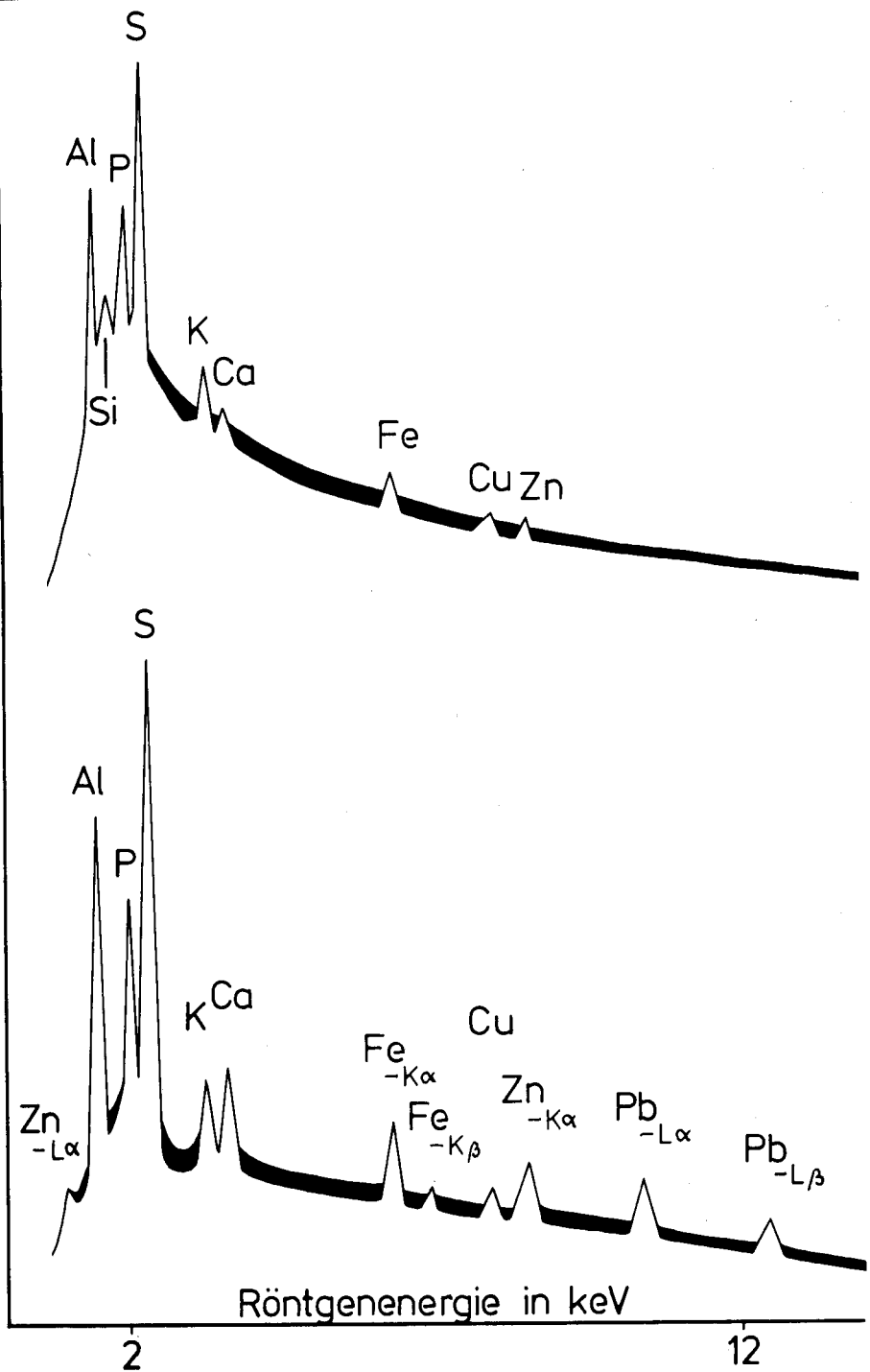


Abb. 1. Energiedispersives Röntgenspektrum einer Flächenanalyse über eine Tracheenkieme (oben) und einer Punktanalyse innerhalb einer Chloridzelle (unten) bei *Baetis rhodani* L. (Ephemeroptera, Baetidae).

die Chloridzellen im Röntgenspektrum der Punktanalyse dennoch die metallischen Elemente Eisen und Zink auf (Abb. 1 unten). Werden danach die Larven zwei weitere Stunden in 0,1 ppm Bleinitrat gehalten, so wird die Bleiakкумуляtion röntgenanalytisch ebenfalls in der  $L\alpha$  und  $L\beta$  Linie aufgezeigt (Abb. 1 unten).

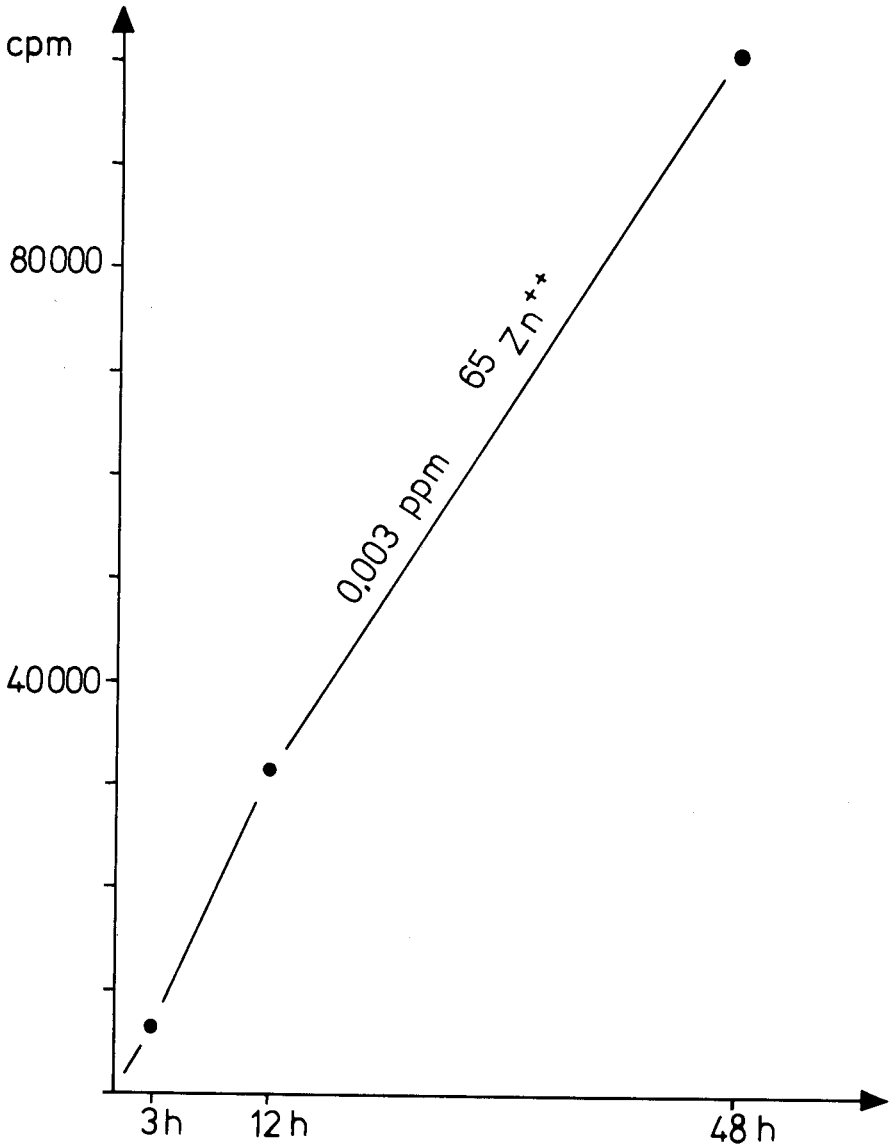


Abb. 2. Akkumulation von  $^{65}\text{Zn}^{++}$  in den Chloridzellen von *Cloeon dipterum* L. (Ephemeroptera, Baetidae) pro Larve.

2. Mit radioaktivem Zink soll die Akkumulation in den Chloridzellen veranschaulicht werden. Dazu wurden Larven von *Cloeon dipterum* L. (Ephemeroptera, Baetidae) in eine 1 mM NaCl – Lösung mit 0,003 ppm  $^{65}\text{Zn}^{++}$  exponiert und nach Ablauf der Expositionszeiten zur histochemischen Zinklokalisierung mit Ammoniumsulfid behandelt. Nach längerem Auswäschen aller anhaftenden Stoffe und der Hämolymphe wurden bei jeweils fünf Larven die  $^{65}\text{ZnS}$  – Präzipitate mit 2 ml einer 1 N HCl wieder gelöst; 1 ml dieser Lösung wurde mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und anschließend im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Die graphische Darstellung dieses Adsorptionsversuchs zeigt, daß die Chloridzellen aus einer Lösung mit nur 0,003 ppm  $^{65}\text{Zn}^{++}$  bereits nach kurzen Expositionszeiten zu einer steil ansteigenden Akkumulation von Zink befähigt sind (Abb. 2).

### Diskussion

Die Ergebnisse der Freiland- und Laboruntersuchungen deuten darauf hin, daß die Chloridzellen in der Initialphase der Ionenabsorption nicht nur physiologisch notwendige Salze wie NaCl zu akkumulieren vermögen, sondern daneben möglicherweise alle im Wasser gelösten Elektrolyte, so auch Schwermetallionen (Eisen, Zink, Blei). Der sich daran anschließende aktive Transmembrantransport ist wahrscheinlich selektiv und dürfte eine Barriere für die meisten Elektrolyte darstellen.

Durch den histochemischen Nachweis von Schwermetallen kommt den Chloridzellen die Bedeutung als Indikator (Monitor) für die Gewässerbelastung zu. Der langfristige Aussagewert dieses Indikators ist durch das Vermögen zur Akkumulation selbst bei äusserst geringen Konzentrationen und bei kurzfristigen Konzentrationsschwankungen der im Wasser gelösten Schwermetallionen prinzipiell garantiert. Darüberhinaus schafft der unmittelbare Zusammenhang mit der Osmoregulation geeignete Voraussetzungen, um mit den Methoden der physiologischen Ökologie zuverlässige Kriterien für die Grenzen und Möglichkeiten dieses Schwermetallindikators zu finden.

### LITERATUR

- KOMNICK, H., R.W. RHEES & J.H. ABEL, (1972): The function of ephemerid chloride cells. Histochemical, autoradiographic and physiological studies with radioactive chloride on *Callibaetis*. *Cytobiologie* 5: 65–82.
- WICHARD, W., & H. KOMNICK, (1971): Electron microscopical and histochemical evidence of chloride cells in tracheal gills of mayfly larvae. *Cytobiologie* 3: 215–228.
- WICHARD, W., H. KOMNICK & J.H. ABEL, (1972): Typology of ephemerid chloride cells. *Z. Zellforsch.* 132: 533–551.

Anschriften der Verfasser:

Dr. W. WICHARD, Dipl. Biol. M. SCHMITZ, Institut für Cytologie und Mikromorphologie der Universität Bonn, 53 Bonn, Gartenstr. 61 a.