

Protokoll

Wasserhaushalt: Osmo- und Ionenregulation bei *Carcinus maenas*

Till Biskup

Matrikelnummer: 155567

02. März 2000

Einführung

Die Aufrechterhaltung eines konstanten Ionenmilieus ist besonders für höhere Lebewesen außerordentlich wichtig, da viele Körperfunktionen empfindlich auf eine Änderung dieses Milieus reagieren. Viele Ionen sind Cofaktoren für Proteine, beeinflussen also direkt das Stoffwechselgeschehen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Tonizität, die gesondert im dritten Teil des Versuches betrachtet wird.

Von besonderem Interesse für Experimente bezüglich der Osmo- und Ionenregulation sind natürlich solche Tiere, deren natürlicher Lebensraum starke Schwankungen des Ionenmilieus aufweist, die aber trotzdem in ihrem Inneren konstante Bedingungen aufrechterhalten. Beispielhaft werden im ersten Versuchsteil daher die osmoregulatorischen Fähigkeiten von *Carcinus maenas*, einer in der Gezeitenzone lebenden Strandkrabbe, näher untersucht.

Aufgaben

Osmo- und Ionenregulation bei *Carcinus maenas*

1. Messen Sie die Chloridkonzentration in den verschiedenen Meerwasserkonzentrationen und den Hämolympfproben der Strandkrabben.
2. Bestimmen Sie die Konzentration von Na^+ und Mg^{2+} in den Wasser- und Hämolympfproben.
3. Tragen Sie jeweils die in der Hämolymphe gemessene Größe gegen die korrespondierende Größe im Meerwasser auf. Tragen Sie zusätzlich die Ausgleichsgerade (innere und äußere Konzentration gleich) ein.
4. Wie weichen die Konzentrationen in der Hämolymphe von denen im Meerwasser ab? Gibt es Unterschiede bei verschiedenen Meerwasserkonzentrationen? Bestehen Unterschiede zwischen den einzelnen Ionen?

Osmoregulatorische Funktion der pulsierenden Vakuole von *Paramecium*

1. Tragen Sie die Pulsationsfrequenz der Vakuolen (Mittelwert mit Standardabweichung der Messungen von allen Gruppenteilnehmern) gegen die Meerwasserkonzentration auf. Wie und warum verändert sich die Frequenz der Vakuolenentleerung bei den verschiedenen Osmolalitäten?

Untersuchung der osmotischen Resistenz von Erythrocyten aus Säugerblut

1. Berechnen Sie die jeweiligen NaCl- bzw. Harnstoffkonzentrationen der einzelnen Proben. Wann beginnt die Hämolyse und bei welcher Salz- bzw. Harnstoffkonzentration ist sie vollständig? Welche der Lösungen sind untereinander isoosmotisch, welche hypo- iso- bzw. hypertone zu den Erythrocyten? Was sagen die Ergebnisse über die Durchlässigkeit der Erythrocytenmembran für NaCl und Harnstoff aus?

1 Osmo- und Ionenregulation bei *Carcinus maenas*

1.1 Osmolalität

Die Osmolalität ist die Summe aller osmotisch aktiven Teilchen. Da die Elektrolyte nicht vollständig frei dissoziiert vorliegen — sie sind z. T. an Proteine gebunden oder nicht vollständig dissoziiert — ist die Osmolalität nur eingeschränkt als Maß für die Konzentration gelöster Teilchen verwendbar.

Osmolalität Meerwasser/ $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$						Osmolalität Hämolymphe/ $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$					
	35%	50%	75%	100%	125%		35%	50%	75%	100%	125%
1	421	611	747	966	1205	1	564	776	782	884	1066
2	410	621	743	952	1205	2	573	794	771	890	1055
3	413	622	742	963	1203	\bar{x}	569	785	777	887	1061
\bar{x}	415	618	744	960	1204						

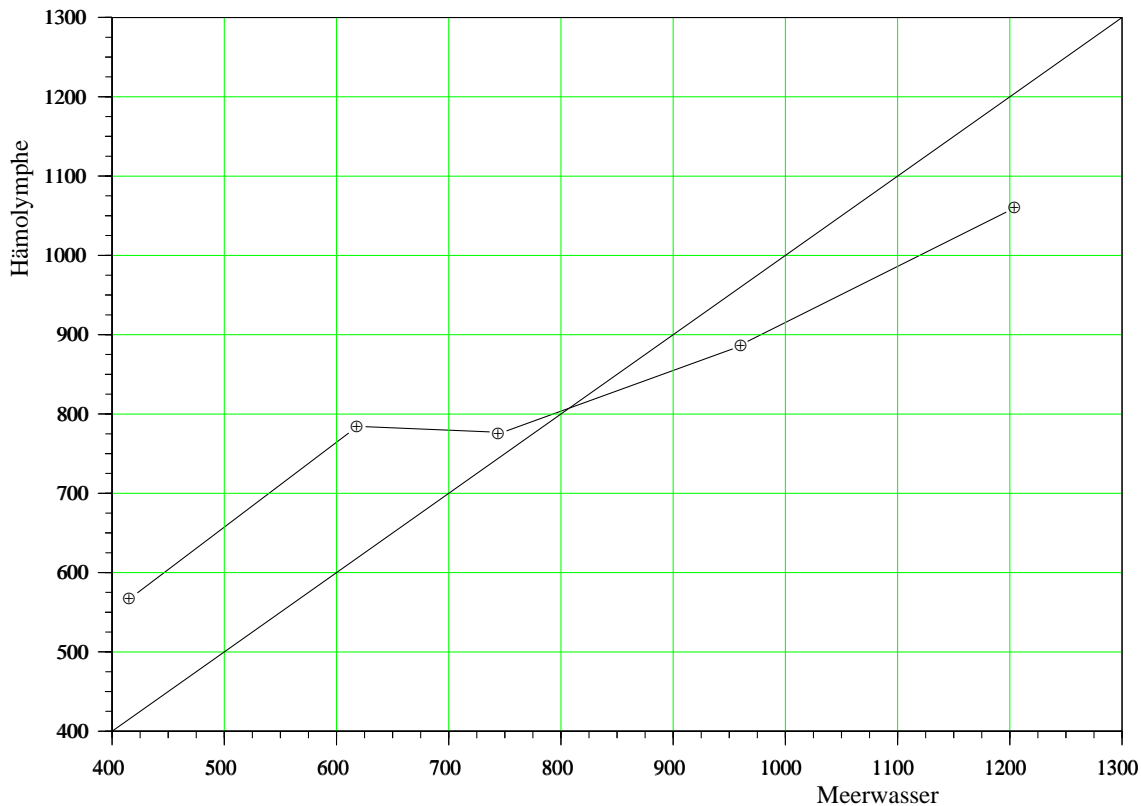


Abbildung 1: Osmolalität

1.2 Chlorid-Konzentration

Die Bestimmung von Chlorid, dem häufigsten Ion des Meerwassers, erfolgte mit einem Chloridtitrator wie im Skript beschrieben. Aufgetragen wurde die Chlorid-Konzentration des Meerwassers gegen jene der Hämolymphe. Zusätzlich wurde als Orientierung die Osmoconformer-Linie, entsprechend gleicher Konzentrationen im Meerwasser und der Hämolymphe, aufgetragen. Oberhalb dieser Linie liegende Werte weisen auf eine gegenüber dem Außenmedium hyperosmotische Hämolymphe, darunter liegende auf eine hyposmotische Hämolymphe hin.

[Cl ⁻]/mM — Meerwasser						[Cl ⁻]/mM — Hämolymphe					
	35%	50%	75%	100%	125%		35%	50%	75%	100%	125%
1	106.3	149.9	149.5	93.0	122.5	1	40.8	63.1	83.6	78.7	93.3
2	95.6	153.4	159.8	92.3	118.7	2	31.3	65.6	81.7	83.0	81.6
3	106.3	152.8	151.8	78.9	121.9	3	27.9	64.35	74.5	74.9	84.5
4	102.7	152.03	153.7	88.1	121.0	4	33.3			78.8	87.5
\bar{x}_v	102.7	152.0	153.7	88.1	121.0	\bar{x}_v	33.3	64.4	79.9	78.9	86.7
\bar{x}	205.5	304.1	307.4	440.3	605.2	\bar{x}	166.6	321.8	399.7	394.3	433.6

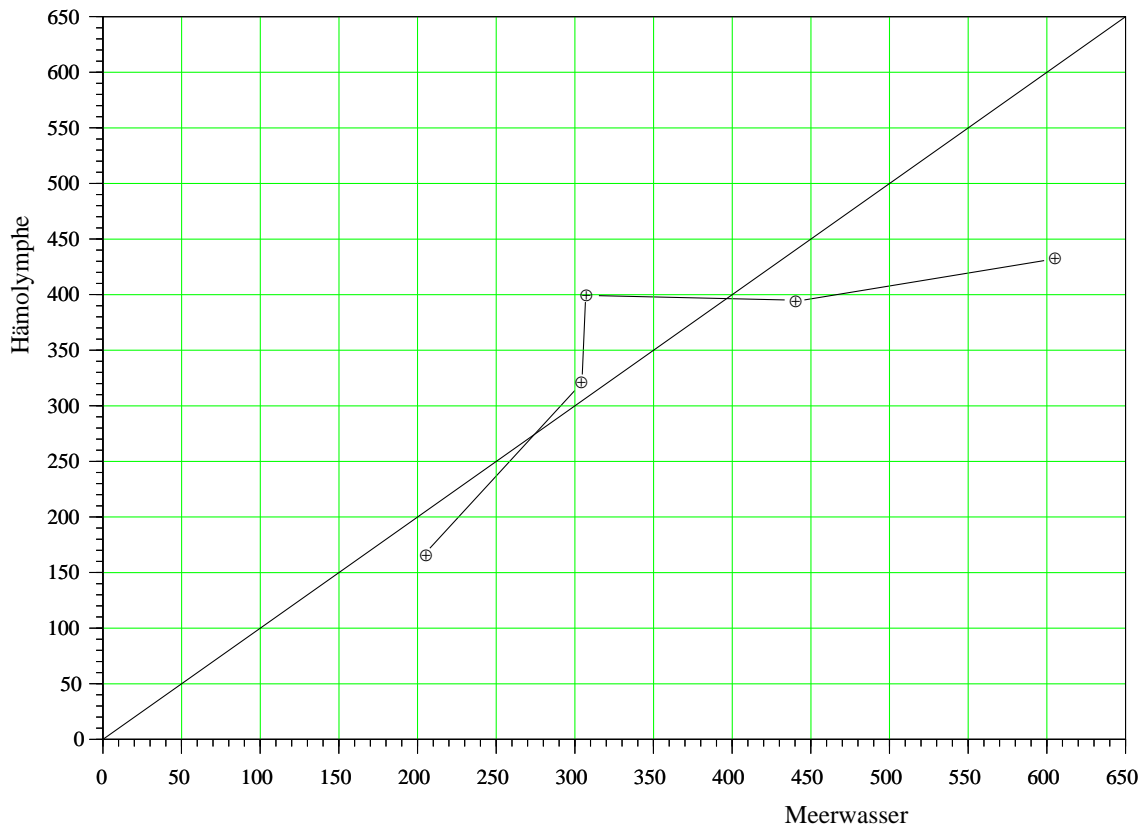


Abbildung 2: Chlorid-Konzentration

1.3 Kationenbestimmung: Konzentration von Na⁺ und Mg²⁺

Zur Bestimmung der Konzentrationen von Na⁺ und Mg²⁺ kam ein Atomabsorptionsspektrometer zum Einsatz. Folgende Abweichungen des verwendeten Verdünnungsschemas von demjenigen im Skript sind zu nennen:

	Skript	Versuch
Probenmenge	400 μ l	200 μ l
Verdünnungsfaktor Magnesium	2000	4000
	1000	2000
[Na] Eichgerade	0.2/0.8/1.4/2 μ g · ml ⁻¹	0.2/1.0/1.8 μ g · ml ⁻¹
[Mg] Eichgerade	0.1/0.4/0.7/1 μ g · ml ⁻¹	0.05/0.25/0.45 μ g · ml ⁻¹

Dargestellt werden im folgenden jeweils die aus drei vorgegebenen Konzentrationen sowie einem als Offset dienenden Blindwert ermittelten Eichgeraden als Auftragung der Konzentration c in μ mol gegen die Extinktion E sowie die anhand dieser Eichgeraden ermittelten Konzentrationen c in mmol der Kationen als Auftragung der Meßwerte der Meerwasserproben gegen die Hämolympheproben.

In die Graphen der Ionenkonzentrationen in Meerwasser und Hämolymphe wurde, wie schon bei der Auftragung für Chlorid-Ionen, als Orientierung die Osmoconformer-Linie eingezeichnet.

Na-Eichgerade							
$c/\mu\text{g}$	$c/\mu\text{mol}$	E_1	E_2	E_3	E	u_E	ΔE
Blindwert		0.0318	0.0268	0.0269	0.0285	0.0016503	
0.2	8.73	0.0587	0.0575	0.0541	0.0567667	0.0013776	0.0282667
1	43.66	0.2109	0.199	0.2064	0.2054333	0.0034691	0.1769333
1.8	78.59	0.3542	0.3583	0.3451	0.3525333	0.0039006	0.3240333

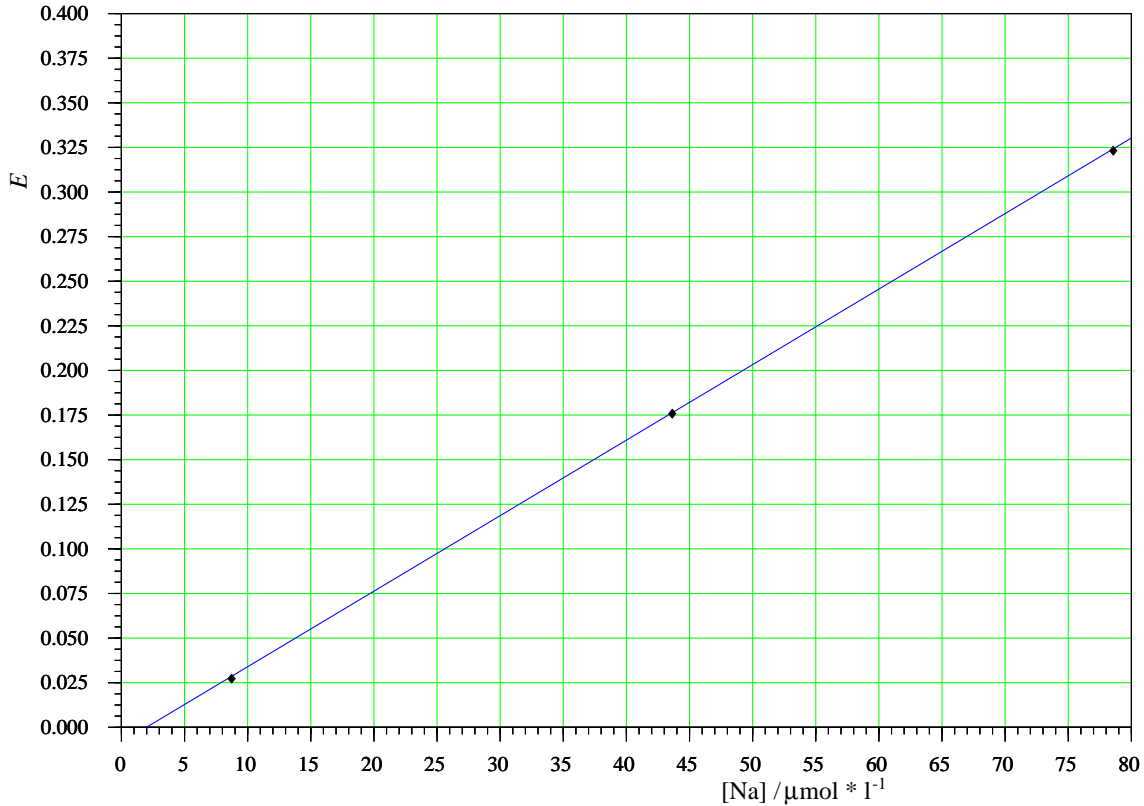


Abbildung 3: Natrium-Eichgerade

[Na] Meerwasser					
E	Meerwassergehalt / %				
	35	50	75	100	125
1	0.1598	0.2477	0.1409	0.206	0.2273
2	0.1628	0.2315	0.1561	0.1843	0.2304
3		0.223	0.131	0.1805	0.206
\bar{x}	0.8065	1.1703333	1.4266667	1.9026667	2.2123333
$c/\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	192.48681	278.42414	338.97	451.40106	524.54423

[Na] Hämolymphe					
E	Meerwassergehalt / %				
	35	50	75	100	125
1	0.24	0.3457	0.1883	0.2192	0.215
2	0.2447	0.3466	0.1724	0.115	0.2388
3	0.2242	0.3543			0.2424
\bar{x}	1.1815	1.7443333	1.8035	1.671	2.3206667
$c/\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	281.0617	414.00277	427.97792	396.68146	550.13253

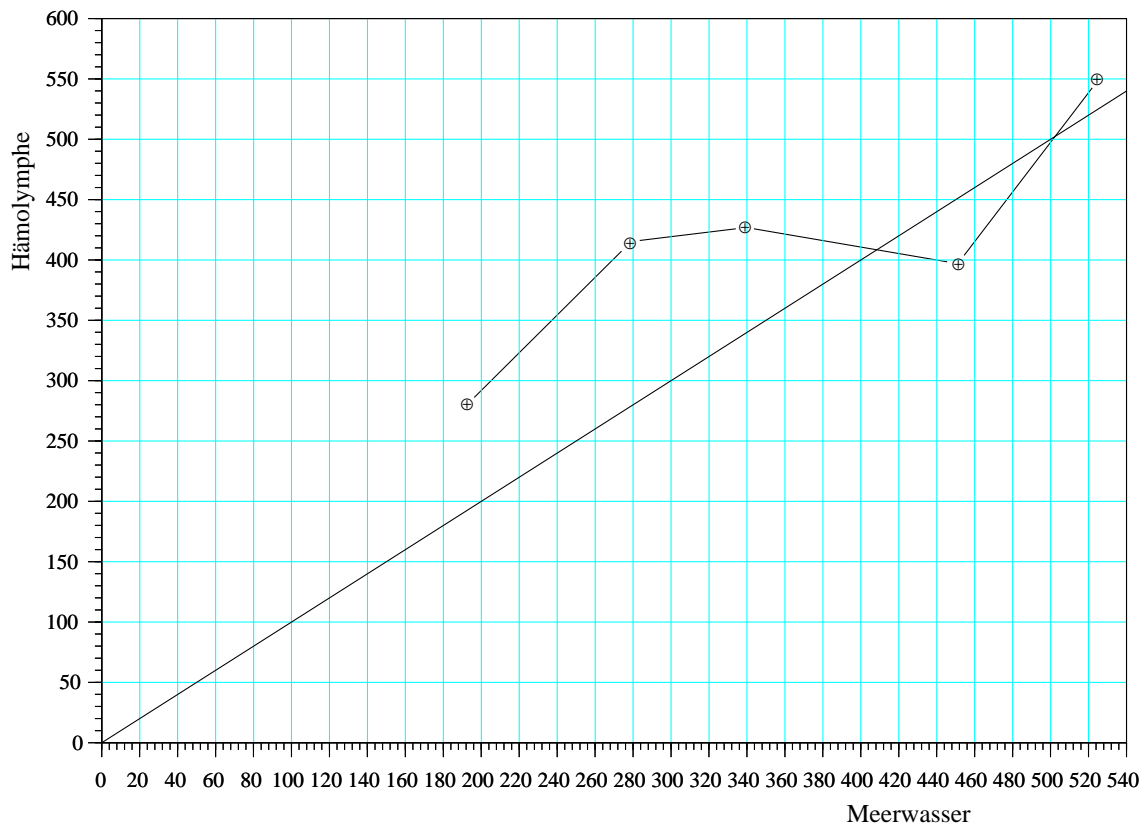


Abbildung 4: Natrium-Konzentration

Mg-Eichgerade							
$c/\mu\text{g}$	$c/\mu\text{mol}$	E_1	E_2	E_3	E	u_E	ΔE
Blindwert		0.0049	0.0043	0.0049	0.0047	0.0002	
0.05	2.06	0.0214	0.0227	0.0229	0.0223333	0.0004702	0.0176333
0.25	10.29	0.0886	0.0881	0.0902	0.0889667	0.0006333	0.0842667
0.45	18.52	0.1808	0.1781	0.1793	0.1794	0.0007810	0.1747

[Mg] Meerwasser					
E	Meerwassergehalt / %				
	35	50	75	100	125
1	0.077	0.0752	0.1359	0.1196	0.1334
2	0.0853	0.0772	0.1335	0.1169	0.1329
3	0.0736			0.1183	0.1249
\bar{x}	0.1572667	0.1524	0.5388	0.4730667	0.5216
$c/\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	17.108744	16.598735	57.092012	50.203404	55.289516

[Mg] Hämolymphe					
E	Meerwassergehalt / %				
	35	50	75	100	125
1	0.0393	0.0283	0.0388	0.055	0.0556
2	0.034	0.0295	0.0363	0.049	0.0615
3	0.034	0.028	0.0376	0.0497	0.0544
\bar{x}	0.0715333	0.0572	0.0751333	0.1024667	0.1143333
$c/\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	8.1242105	6.6221307	8.5014771	11.365908	12.609491

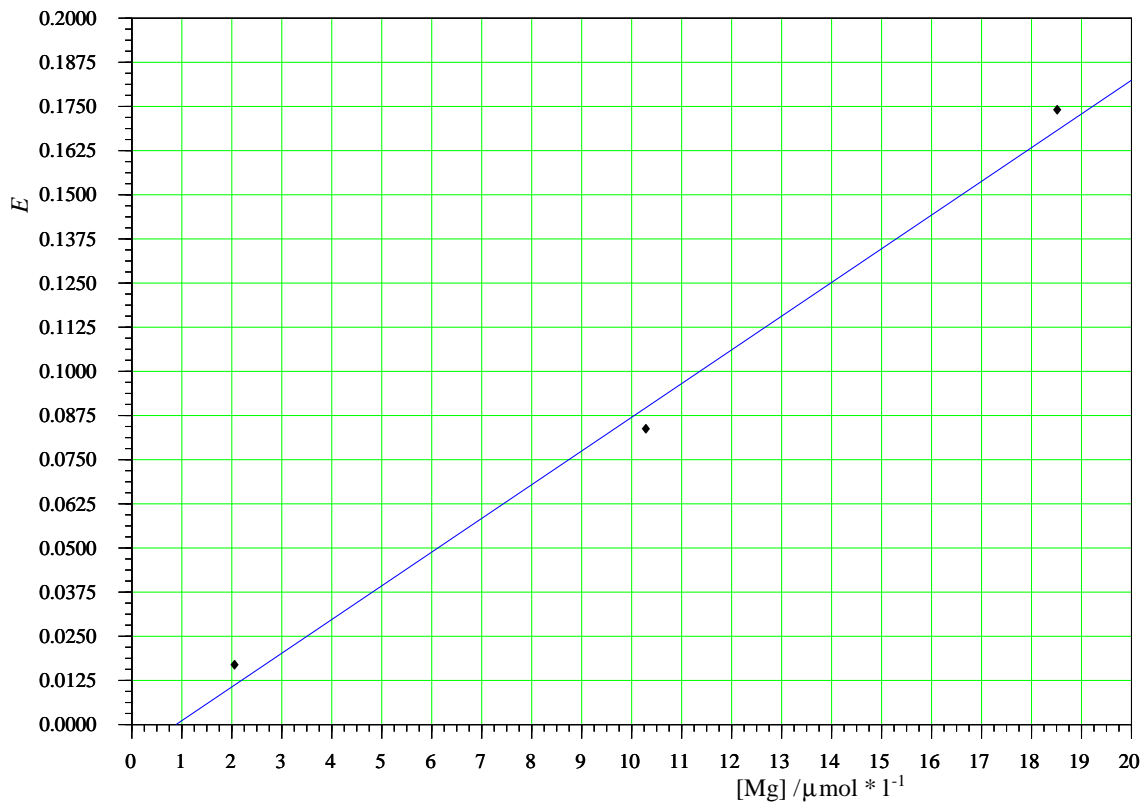


Abbildung 5: Magnesium-Eichgerade

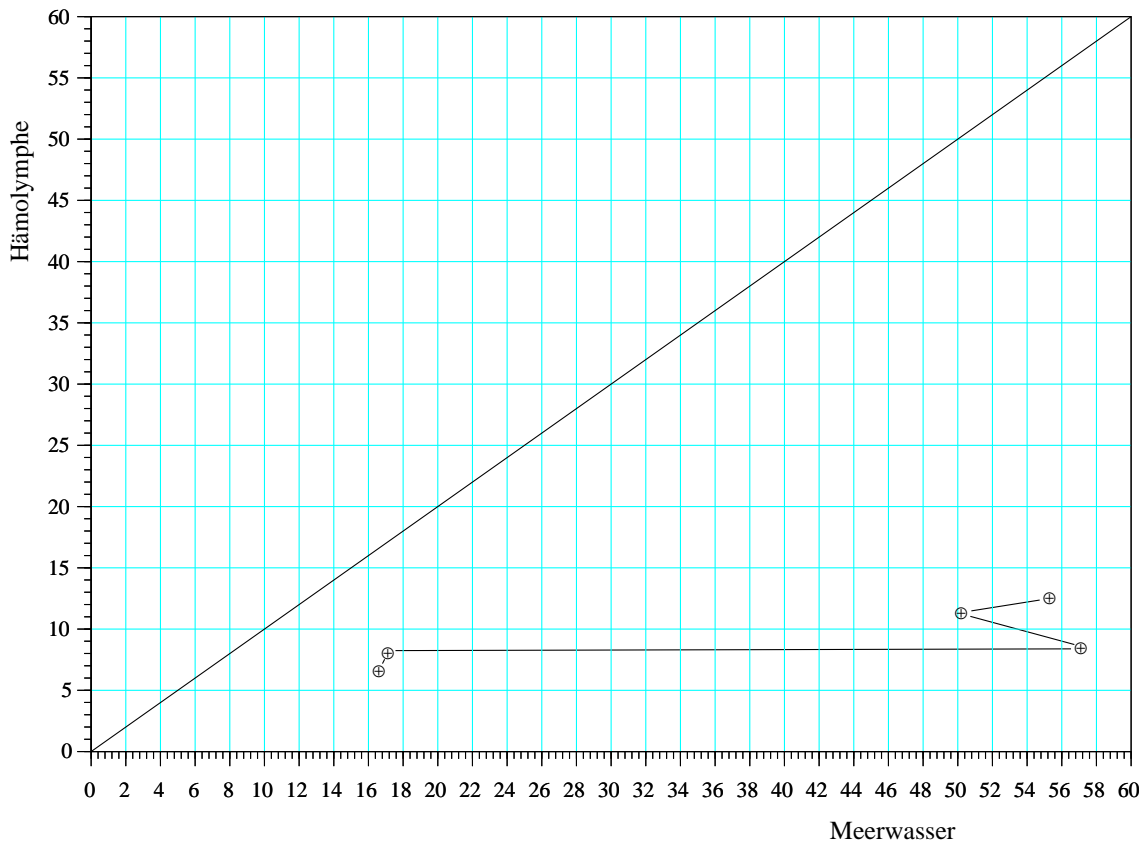


Abbildung 6: Magnesium-Konzentration

Beschreibung der Graphen Der Vergleich der Osmolalitäten in Meerwasser und Hämolymphe (vgl. Abb. 1) zeigt, daß es eine Tendenz in der Hämolymphe, die Osmolalität in einem bestimmten Bereich zu halten, gibt. So liegt sie für eine Meerwasserkonzentration von 35–50% deutlich über der des Meerwassers, bleibt dann bis etwa zu einer Konzentration von 100% relativ konstant und erst wieder für eine Konzentration von 125% deutlich höher, allerdings hier unter der Osmolalität des Meerwassers.

Wie aus Abb. 2 hervorgeht, liegt die Cl-Ionen-Konzentration in der Hämolymphe für eine Verdünnung von 35%, 100% und 125% Meerwasser unter der des Meerwassers, für die beiden anderen Werte darüber. Bemerkenswert ist, daß die Konzentration der Chlorid-Ionen in der Hämolymphe über einen weiten Bereich konstant gehalten werden. Das trifft für einen Meerwassergehalt von 75–125% zu.

Grundsätzlich gleiche Verhältnisse liegen auch bei der Na-Ionen-Konzentration (Abb. 4) vor, auch wenn diese etwas größere Ähnlichkeit zu Abb. 1 zeigt.

Ganz anders verhält sich dagegen die Mg-Ionen-Konzentration, die in der Hämolymphe gegenüber dem Meerwasser konstant auf einem sehr niedrigen Niveau bleibt.

1.4 Diskussion

Da, wie sich im nachhinein herausstellte, die Meßwerte auf dem Meßprotokoll des Atomabsorptionsspektrometers verrutscht waren, ergeben sich zwar nach Korrektur dieser Fehler bessere Graphen, die Frage nach der Verlässlichkeit eines solchen Gerätes bleibt hingegen im Raum stehen. Schließlich kann ich bei einem Versuch normalerweise nicht einfach so lange die Meßwerte eines in seinem Ansatz hochpräzisen Meßgerätes verbiegen, bis ich in der Auswertung genau die Ergebnisse erhalte, die ich sehen wollte.

Daher bleibt nach wie vor die Frage bestehen, warum das Gerät diese Werte ausgab, und warum die Korrektur derselben nicht noch während der Versuchsdurchführung von fachkundiger Seite erfolgte (das hätte unnötige Arbeit auf beiden Seiten erspart). Abgesehen davon ist die Streuung der Meßwerte, wie an den Angaben für “PK Area” bei der Na-Ionen-Messung im zu 125% konzentrierten Meerwasser deutlich zeigt, immer noch relativ hoch.

Trotz dieser teilweise stark streuenden Meßwerte und dem Zweifel an ihrer Verlässlichkeit läßt sich eine Grundtendenz der Osmoregulation bezüglich der unterschiedlichen Ionen feststellen.

Grundsätzlich ist festzuhalten, daß *Carcinus maenas* innerhalb eines bestimmten Bereiches durchaus fähig ist, ihr inneres Milieu gegenüber Veränderungen des Außenmediums konstant zu halten. So verhält sie sich im Bereich der Meerwasserkonzentration von etwa 50 bis 100% wie ein hyperosmotischer Regulierer, da die Hämolymphekonzentrationen der Ionen in aller Regel in diesem Bereich über denen des Meerwassers liegen. Bei besonders hohen oder niedrigen Salinitätswerten verhält sich *Carcinus maenas* dagegen ähnlich eines Osmoconformers, d. h. die Osmolalität der Hämolymphe steigt oder fällt proportional zu der des umgebenden Meerwassers.

Eine Besonderheit ist bezüglich der Magnesium-Konzentration in der Hämolymphe festzustellen: Sie wird konstant über den gesamten Bereich auf einem relativ niedrigen Niveau, hyposmotisch zum Meerwasser, gehalten.

Allgemein sei zu den Graphen noch angemerkt, daß eine Verbindung der einzelnen Meßpunkte vielleicht die Anschaulichkeit verbessert, durch die große Streuung und Unsicherheit der Meßwerte bedingt allerdings keine wirklichen Aussagen über das Verhältnis der Konzentrationen zwischen Hämolymphe und Meerwasser erlaubt.

Fehlerquellen Neben Fehlern bei der Erstellung der recht umfangreichen Meßreihen geben insbesondere die vom Atomabsorptionsspektrometer ausgegebenen Werte Anlaß zur Frage nach ihrer Glaubwürdigkeit. So kam es bei diesen Dreifachbestimmungen mehr als einmal zu

erheblichen Abweichungen in der Größenordnung von 10^2 , die mittlerweile durch das Fehlen von Messungen während des Meßvorgangs und die sich daraus ergebende Verschiebung teilweise erklärt werden konnten, sowie teilweise sogar zu intern vom Gerät berechneten negativen Konzentrationen, die m. E. keinen Sinn ergeben. Zwar lassen sich letztere durch einen fehlerhaften Geradenausgleich bei der Errechnung der Eichkurve erklären, zudem wurde die Eichkurve auch aus den vom Gerät direkt gemessenen Werten selbst bestimmt, eine nicht unerhebliche Restunsicherheit bleibt jedoch bestehen.

2 Pulsierende Vakuole von *Paramecium*

Paramecium ist aufgrund der leichten Beobachtbarkeit seiner pulsierenden Vakuole, dem der Osmoregulation dienenden Organ, ein häufiges Versuchsobjekt. Da der Ciliat normalerweise in einem hyposmotischen Milieu lebt, muß er ständig das in ihn mit dem Konzentrationsgefälle eindiffundierende Wasser aktiv durch Kontraktion der pulsierenden Vakuole nach außen abgeben. Im Versuch wurde nun schrittweise die Osmolalität des Außenmediums erhöht, was gleichbedeutend damit ist, daß die Osmolalitätsdifferenz zwischen Ciliat und Außenmedium verringert wurde. Damit geht die im Versuch trotz großer Abweichungen der Werte gut sichtbare Tendenz einer Verlangsamung der Pulsationsfrequenz einher.

$c/\%$	Messungen											\bar{x}	$u_{\bar{x}}$		
0	9	10	9	6	5	4	5	11	9	8	12	9	12	9.7	0.47
15	7	7	7	4	5	3	4	4	4					5.125	0.58
30	2	3	3	2	3	1	2	2	2					2.25	0.25

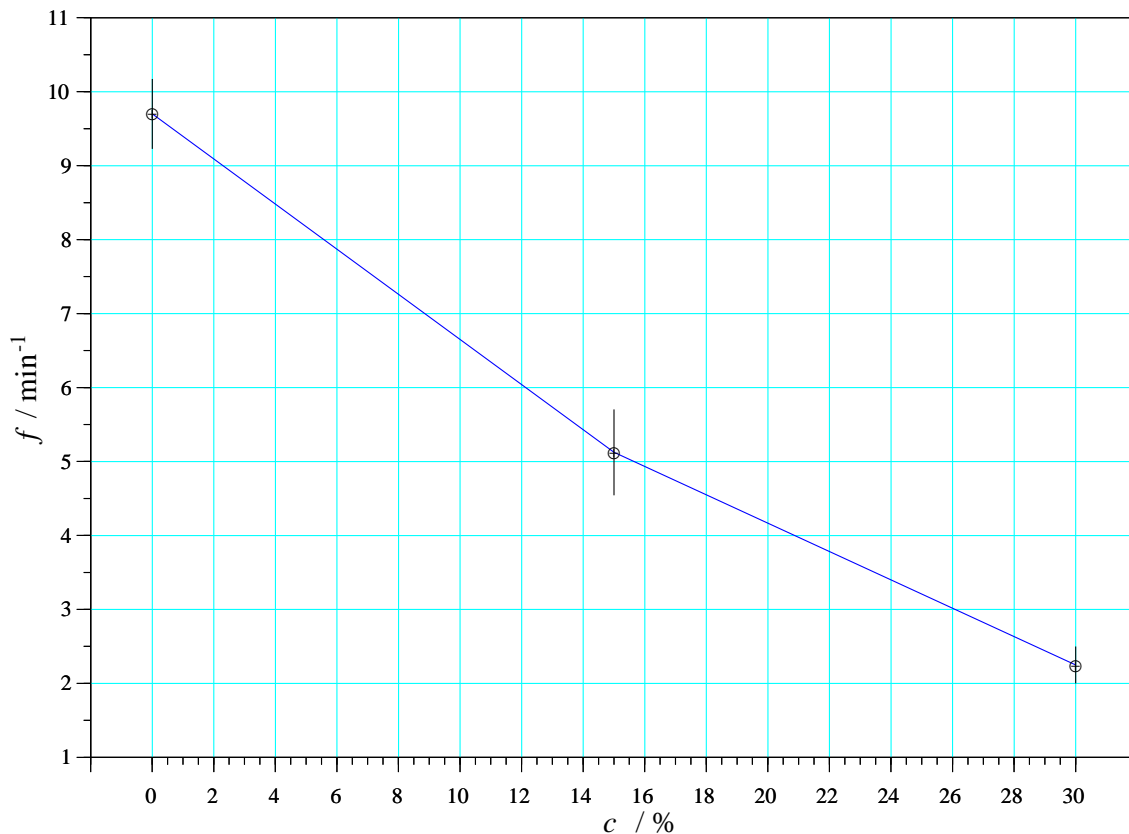


Abbildung 7: Pulsationsfrequenz bei *Paramecium*

Diskussion Die großen Schwankungen bei der Ermittlung der mittleren Pulsationsfrequenz können zum einen darin begründet sein, daß die Tiere sich bewegen und sich dadurch teilweise einer genauen Beobachtung entziehen, zum anderen bleibt völlig offen, inwiefern die "Fixierung" der Paramecien mit Methylcellulose zu Streßreaktionen und unüblichem Verhalten führt. Hierüber kann nur spekuliert werden.

3 Osmotische Resistenz von Erythrocyten aus Säugerblut

Sinn des Versuches war es, den prinzipiellen Unterschied zwischen Tonizität und Osmolalität deutlich herauszustellen. Als Versuchsobjekt dienten dabei Erythrocyten, die aus Schweineblut gewonnen wurden. Die Tonizität unterscheidet sich dadurch von Osmolalität und Osmolarität, daß sie nicht errechnet, sondern nur experimentell ermittelt werden kann. Das hängt damit zusammen, daß für die Tonizität auch die Permeabilität der Membran eine große Rolle spielt.

Gibt man in das Umgebungsmedium einer Zelle eine Substanz, die frei durch die Zellmembran diffundieren kann, so erhöht sich, wenn gleichzeitig in der Zelle nichtpermeable Substanzen vorliegen, die Osmolalität in der Zelle, da die frei permeierende Substanz ihrem Konzentrationsgefälle folgend bestrebt ist, dieses auszugleichen.

Genau das wird im Versuch durch Zugabe von Harnstoff demonstriert. Bringt man Erythrocyten in eine isoosmotische Harnstofflösung, so diffundiert der Harnstoff durch die Erythrocytenmembran hindurch und erhöht die Osmolalität im Inneren der Zelle auf den doppelten Wert. Das daraufhin nachströmende Wasser bringt die Erythrocyten zum Platzen, ein Vorgang der Hämolyse genannt wird und sich im Aufklaren der Lösung im Reagenzglas bemerkbar machte.

RG	E	c	Osmolarität			Hämolyse
			x_1	x_2	\bar{x}	
1	0.033	150	311	272	291.5	-
2	0.043	133	253	247	250.0	-
3	0.357	117	250	236	243.0	-
4	0.819	108	206	214	210.0	-
5	1.075	100	188	186	187.0	-
6	1.121	92	179	174	176.5	+
7	1.489	83	167	170	169.5	+
8	1.164	75	157	159	158.0	+
9	1.423	67	138	142	140.0	+
10	1.940	304	295	308	301.5	+++
11	1.691	228	203	197	200.0	+++
12	1.473	152	158	156	157.0	+++

Bemerkenswerterweise war eine vollständige Hämolyse (+++) nur bei Harnstoff feststellbar, hier allerdings ohne Ausnahme. Bei NaCl-Lösung trat im Konzentrationsbereich zwischen 150 und 100 mM keine, darüber hinaus nur unvollständige Hämolyse auf. Daraus läßt sich die große Bedeutung der sogenannten physiologischen Kochsalzlösung, zum Beispiel als kurzzeitiger Volumenersatz bei schweren Blutungen, erkennen: Sie weist in etwa die gleiche Osmolalität wie das Blut auf, ist aber gleichzeitig isoton mit den Erythrocyten.

	zum Erythrocyten			
	isoosmotisch	hypoton	isoton	hyperton
Lösungen	1+10; 4+11; 8+12	6-12	3-5	1+2

Für die Permeabilität der Erythrocytenmembran läßt sich anhand des Versuches zeigen, daß sie für Harnstoff ausreichend hoch ist, für NaCl dagegen keine Rolle spielt. Tatsächlich ist

es so, daß Harnstoff trotz seines Molekulargewichtes und der relativen Molekülgröße wesentlich besser durch die Membran diffundieren kann als das in seine Ionen zerfallende NaCl. Als Begründung wird hier i. A. die sich um Ionen in wässriger Lösung herausbildende Hydrathülle herangezogen, die die Na^+ - und Cl^- -Ionen zum einen größer macht als das Harnstoffmolekül und zum anderen wohl auch eine stärkere Polarität als letzteres aufweist.

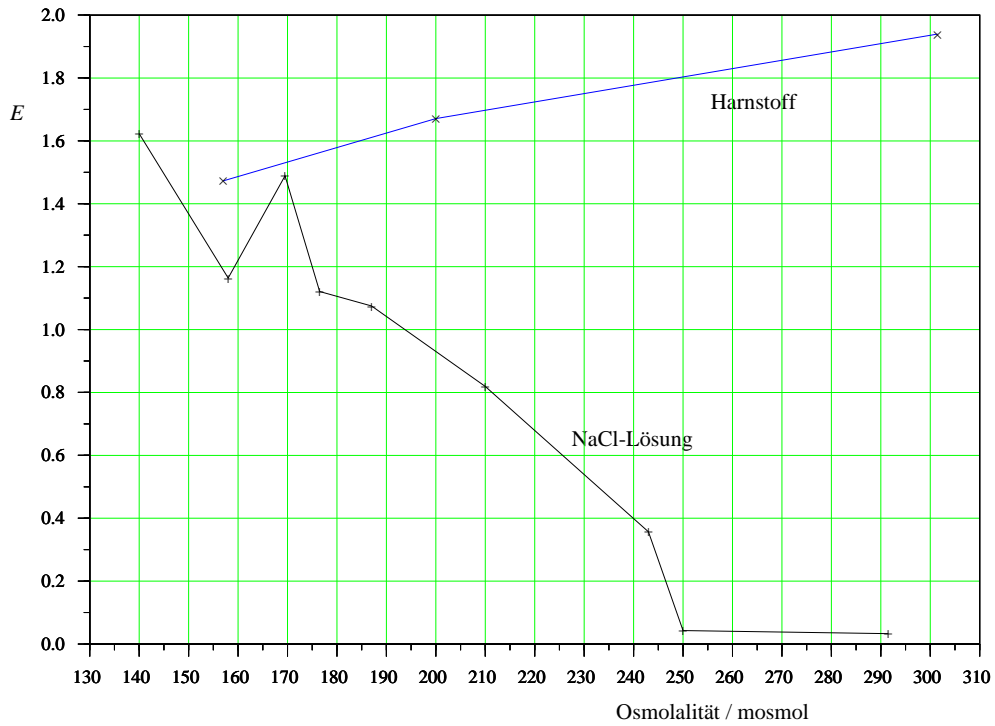


Abbildung 8: Auftragung der Extinktion gegen die Osmolalität