

**PRÜFUNG EINES ORGANISMUS AUF SEINE
EIGNUNG ALS TIERISCHER BIOINDIKATOR
MIT DER ELEKTRONENMIKROSKOPIE**



PRÜFUNG EINES ORGANISMUS AUF SEINE EIGNUNG ALS TIERISCHER BIOINDIKATOR MIT DER ELEKTRONENMIKROSKOPIE

UBA-BE-037

Wien, Juni 1995

Bundesministerium für Umwelt



Autoren: Hans Ditrich
Cristina Trimbacher

Projektleitung: Dr. Hans Ditrich

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung und EDX–Analysen: Hans Ditrich

Impressum:

Medieninhaber und Herausgeber: Umweltbundesamt, 1090 Wien, Spittelauer Lände 5

© Umweltbundesamt, Wien, Juni 1995

Alle Rechte vorbehalten
ISBN 3–85457–254–9

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|-------------------------|----|
| 1. Vorbemerkung | 1 |
| 2. Material und Methode | 3 |
| 3. Befunde | 5 |
| 4. Schlußfolgerungen | 9 |
| 5. Literatur | 11 |
| 6. Abbildungen | 13 |



1. Vorbemerkung

Die röntgenenergie-dispersive Mikroanalyse (EDX) ist als Methodik besonders geeignet, Schwermetallbelastungen in kleinsten Proben festzustellen. Es kann nicht nur das Vorhandensein einer Gesamtkontamination eines Organismus nachgewiesen werden, sondern auch die Verteilung von Schwermetallen innerhalb des Körpers. Zum Unterschied von den (meist empfindlicheren) analytisch-chemischen Verfahren kann mittels EDX - Analyse eine evtl. vorhandene belastende Substanz mit der spezifischen Anatomie des Organismus (Nervensystem, Muskulatur, etc.) korreliert werden. Darüberhinaus werden mit dieser Methodik sämtliche Elemente mit einer Ordnungszahl ab elf (Natrium) simultan erfaßt. Es werden also unter Umständen nicht erwartete Kontaminationen sicher erkannt.

Untersuchungen über die Aufnahme ökotoxikologisch relevanter Substanzen in Lebewesen im Freiland sind ein zur Zeit noch wenig bearbeiteter Bereich der Umweltüberwachung, jedoch von steigender Bedeutung. Vergleichbare Studien wurden vor allem im marinen Bereich durchgeführt (NOTT 1991). Für Österreich existieren nur wenige ähnliche Untersuchungen (z.B.: HÖNLINGER UND WITTMANN 1991, DORNINGER UND WITTMANN 1991).

Eine wesentliche Voraussetzung für aussagekräftige Daten ist die Wahl eines geeigneten Modells, d.h. möglichst weitgehende Kenntnisse über Art und toxikologische Wirkungsweise der Belastung sind für die Auswahl der Indikator-Organismen notwendig.

Ein geeigneter Organismus sollte unter anderem die folgenden Eigenschaften aufweisen: Eine weite Verbreitung ist wichtig, um an derselben Tierart Aussagen über einen möglichst großen Teil des Einflußgebietes treffen zu können. Es wurde allgemein davon ausgegangen, daß sich Schwermetalle in bestimmten Zellen anreichern. Dieser Effekt kann unter Umständen auch bei einer relativ niederen Konzentration dieser Stoffe in der Umwelt (Nahrung, Substrat) selbst, durch selektive Transportmechanismen eintreten. Zusätzlich wird durch die Nahrungskette

eine für den Organismus selbst nicht pathogene Konzentration von Stoffen im weiteren stark angereichert, so daß es in der Folge zur umweltbedingten Schädigung anderer Lebewesen kommen kann. Die allgemeine Belastung der Umwelt mit Schwermetallen ist glücklicherweise in den letzten Jahren rückläufig. Lokal können jedoch erhöhte Konzentrationen aus verschiedenen, auch natürlichen Ursachen bestehen.

In niederen Tieren, wie Anneliden werden Schwermetalle vorwiegend in der Umgebung des Darms und im Nervensystem gespeichert. In der toxikologischen Praxis werden Regenwürmer als Testorganismen bereits erfolgreich eingesetzt (siehe OECD-Richtlinie 207).

Die Ziele der gegenständlichen Untersuchung können also wie folgt zusammengefaßt werden: Sind Regenwürmer durch ihre Fähigkeit, Schwermetallverbindungen in ihren Geweben anzureichern geeignet, als Bioindikator auf mögliche derartige Bodenbelastungen hinzuweisen?

2. Material und Methode

2.1. Untersuchungsstandorte

In den Monaten Dezember 1991 und Jänner 1992 wurden im Raum Wien und im Waldviertel (NÖ) Mischproben von Regenwürmern gesammelt. Als urbane Standorte wurden Grünstreifen entlang zweier stark verkehrsbelasteter Straßen in Wien (Währinger Gürtel / Nußdorfer Straße, Spittelauer Lände / Friedensbrücke) ausgewählt. Zu Vergleichszwecken für eine eventuell auftretende Schwermetallakkumulation wurden mit gleicher Methodik Regenwürmer aus einem weitgehend unbeeinflussten Hintergrundstandort untersucht, sowie Exemplare der im Labor gezüchteten Spezies *Eisenia foetida*, die gemäß OECD-Richtlinie 207 zu Toxizitätsprüfungen herangezogen werden *). Die sicherlich notwendige bzw. wünschenswerte Parallelmessung der entsprechenden Elemente im Erdreich konnte nicht durchgeführt werden.

2.2. Probenvorbereitung

Die Regenwürmer wurden vor Ort in 3,6 %-iger Formaldehydlösung fixiert. Anschließend wurden sie im Labor in 70 %-iges Ethanol übergeführt und im Kühlschrank bei 4° C gelagert. Nach einer Entwässerung über 80%, 90%, 96% Alkohol und dreimaligem Spülen in 100% Aceton wurden Stücke des Regenwurmmaterials kritisch-punkt-getrocknet (BALZERS CPD 020). Danach wurden Querschnitte von Regenwürmern (ca. 0,5 mm dick) angefertigt, mittels Doppelklebeband auf Aluminium-Trägertischen montiert und mit einer leitenden Goldschicht versehen (BALZERS SCD 040). Die Proben des Vergleichsmaterials wurden mit Kohle bedampft.

2.3. Untersuchungsmethodik

Die Untersuchungen wurden in einem ZEISS DSM 950 Rasterelektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV mittels röntgenenergie-dispersiver Mikroanalyse (EDX) durchgeführt. Im Rasterelektronenmikroskop werden beim Auftreffen des Primärelektronenstrahles auf der zu untersuchenden

*) Die Autoren danken Fr. Dr. Britta Grillitsch - Institut für Versuchstierkunde der Universität für Veterinärmedizin für die freundliche Überlassung des Materials.

Objektoberfläche unterschiedliche Energieformen, unter anderem auch Röntgenstrahlen frei, die mittels eines Halbleiterdetektors empfangen werden. Röntgenstrahlen entstehen dann, wenn die durch den Primärelektronenstrahl angeregten Elektronen der Probe in ihre ursprüngliche Atomschale zurückkehren und dabei die durch die Anregung erhöhte Energie in Form eines Röntgenquants wieder abgeben. Die Verstärkung und Auswertung des Röntgensignals erfolgt mit der röntgenenergie-dispersiven Mikroanalyse. Jedes in der Probe vorhandene Element kann Röntgenquanten mit exakt definierten Energieniveaus (eV) emittieren. Die elementare Zusammensetzung eines Objektes kann dann in Form eines Elementspektrums wiedergegeben werden. Darüberhinaus bieten sog. "EDX - mappings" die Möglichkeit, die Verteilung bzw. Anreicherung bestimmter anorganischer Elemente in der Probe zu lokalisieren. Dabei werden die Proben durch einen Elektronenstrahl abgetastet, die dabei entstehende Röntgenstrahlung im elementspezifischen Energiebereich gemessen und zur Bilderzeugung weiter verarbeitet. Diese Methode wurde in der vorliegenden Studie zur Analyse eventuell in bestimmten Geweben der Regenwürmer akkumulierten Schwermetalle angewendet, und zur Lokalisierung der Elemente Cadmium, Blei, Eisen, Aluminium, Chlor und Schwefel durchgeführt. Die in den Elementspektren ausgewiesenen Gold-Peaks sind präparationsbedingt. Es wurden Punkt- und Teilflächenintegralmessungen durchgeführt und die entsprechenden Röntgenspektren bis 10 000 eV verglichen. Quantitative Werte können aus diesen Spektren ohne Korrekturen für Atomgewicht, Röntgenabsorption und Röntgenfluoreszenz (ZAF) nicht abgelesen werden. Zur Erhöhung der Anschaulichkeit der Ergebnisse wurden die Verteilungsmuster zum Teil mit einem Bild der Probe überlagert.

3. Befunde

3.1. Röntgenspektralmessungen

Diese Gruppe von Messungen wurde durchgeführt, um etwaige Änderungen der für das Tier notwendigen Elemente bzw. der gewöhnlichen Zusammensetzung der Gewebe (soweit detektierbar) unter Belastung festzustellen. Der gemessene Energiebereich wurde daher mit 10 000 eV (leichtere Elemente) begrenzt. Es wurden zunächst die Röntgenenergiespektren von einzelnen Arealen am Querschnitt der Würmer (Abb.1) gemessen. Diese wurden mit entsprechenden Mes-

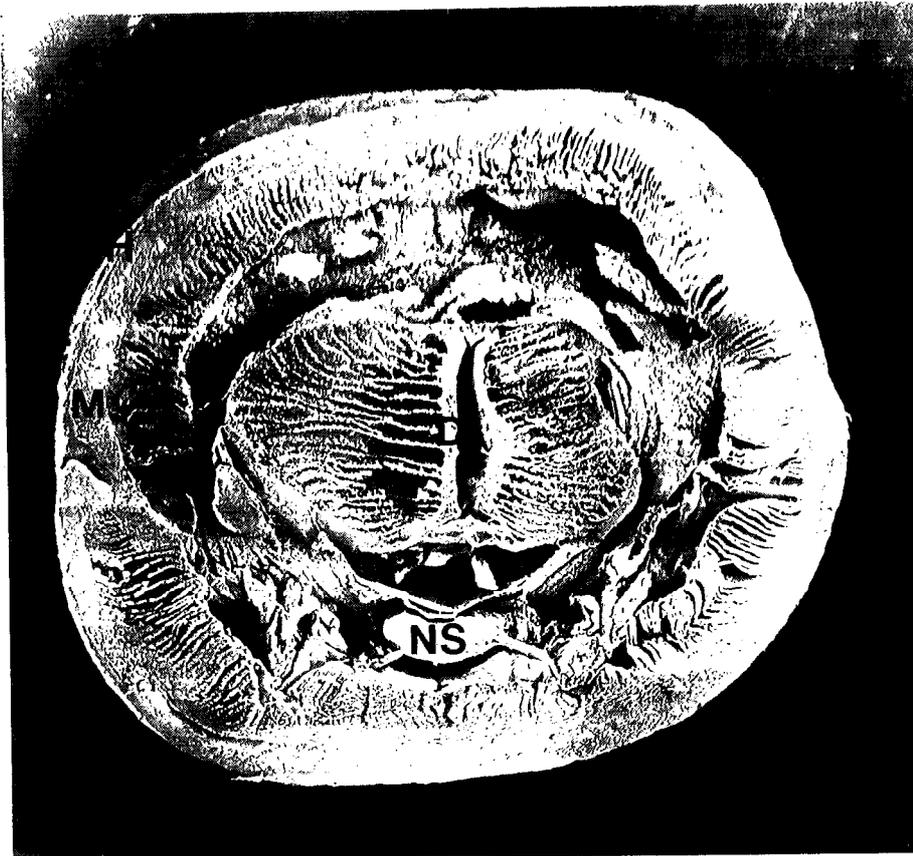


Abb. 1: REM-Aufnahme, Wurm quer - Meßareale markiert, D...Darm, H...Haut, M...Muskulatur, NS...Nervensystem, Vergrößerung: 50fach.

sungen von Organen der Kontrollgruppe verglichen *). Die Vergrößerung des Rasterelektronenmikroskops wurde derart justiert, daß nur die Röntgenquanten aus den entsprechenden Organbereichen gemessen wurden.

3.1.1. Haut / Cuticula

Der Körperbedeckung der Tiere wurde besonderes Augenmerk gewidmet, da erwartet werden kann, daß evtl. schädigende Einflüsse ihre unmittelbaren Auswirkungen zuerst an der Körperoberfläche zeigen. Zusätzlich zu etwaigen Störungen des Stoffwechsels werden Schadstoffe teilweise auch über die Körperoberfläche (Einlagerung, Schleimzellen, etc.) abgeschieden.

Der direkte Vergleich der möglicherweise belasteten Exemplare mit der Kontrollgruppe zeigt eine deutliche Verringerung des Kalzium- und Magnesiumgehaltes und Einlagerung von Zink. Die Schwefel- und Phosphoranteile der Haut sind möglicherweise bei den belasteten Tieren ebenfalls verringert, doch kann durch die Goldbeschichtung der Anteil dieser Elemente nicht unmittelbar verglichen werden (Abb. 2).

3.1.2. Muskulatur

Die Muskulatur ist wegen ihrem großen Anteil an der Körpermasse der Tiere (Hautmuskelschlauch) von besonderer Bedeutung. Es kann außer der oben bereits genannten Erhöhung des Zinkgehaltes im Vergleich zu den Kontrolltieren eine Verminderung der Elemente Kupfer und Eisen festgestellt werden (Abb. 3). Es sind diese Elemente wesentliche Bestandteile der Pigmente (z.B.: Eisen - Haemoglobin), sodaß diese Unterschiede auf eine mögliche Schädigung des Stoffwechsels hindeuten. Eine Erhöhung des Chlorgehaltes könnte ebenso im Zusammenhang mit derartigen Schäden stehen.

*) Da die Präparate der Kontrollgruppe mit Kohle bedampft wurden, sind die entsprechenden Spektren durch das unspezifische Bremsstrahlungskontinuum der Kohleschicht überlagert.

3.1.3. Nervensystem

Vom Strickleiternnervensystem der Würmer kann, wie bei allen Nervenzellen, vermutet werden, daß es eine spezifische Affinität für bestimmte Metalle zeigt. Eine derartige Belastung geht stets mit Schäden der Vitalität einher. Der Vergleich der Spektren von diesen Zellen zeigt eine auffallende Erhöhung der Gehalte an Kupfer und Zink. Ebenso ist Chlor, Kalium und Kalzium gegenüber der Kontrollgruppe verstärkt festzustellen (Abb. 4). Letztgenannte Elemente sind für die Funktion der Nervenleitung von ausschlaggebender Bedeutung. Es wäre zweifellos wünschenswert, künftige Untersuchungen auf diesen Problemkreis zu konzentrieren.

3.1.4. Darm bzw. Chloragogengewebe

Das den Darm umgebende Chloragogengewebe führt bei Würmern ähnliche Funktionen wie die Leber der Wirbeltiere durch. Es ist daher neben anderen Organen auch für den Abbau und die Ausscheidung von evtl. schädlichen Substanzen zuständig. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt die Verteilung der Elemente Kalzium und Chlor eine Anreicherung, während die Gehalte an Eisen und Kupfer vermindert sind. Ebenso wie bei den oben genannten Proben ist bei der belasteten Gruppe das Element Zink vermehrt nachzuweisen (Abb. 5).

3.2. Element-Mappings

Es wurden die Elementverteilungsmuster von Querschnitten von Vorderenden der belasteten Tiere für einige Elemente graphisch dargestellt. Bei einer bestmöglichen Auflösung der EDX - Methode von ca. 1000 ppm, die unter den gegebenen Voraussetzungen (Probenrelief, Coating, Kanteneffekte, ...) sicherlich deutlich niedriger lag, war es notwendig, die betreffenden Proben 30fach abzutasten und die dadurch erhaltenen Verteilungsmuster zu überlagern. Das aufgetretene "Hintergrundrauschen" (zufallsbedingte, falsch positive Signale) wurde unterdrückt, die Resultate mit Falschfarben belegt.

Bei dieser Darstellung wurden einige der oben beschriebenen, natürlich im Tier vorkommenden Elemente verwendet. Schwefel (r.o.) und Chlor (r.u.) sind in etwa homogen in den Geweben verteilt. Aluminium (l.o.) und Eisen (l.u.) sind hingegen verstärkt im Bereich des Darmes (Chloragogengewebe), Aluminium auch in Teilen des Hautmuskelschlauchs vorhanden (Abb. 6).

Eine Darstellung eines Ausschnitts eines Präparats (r.u. - Bild) zeigt ähnliche Verteilung von Eisen (l.u.) wie im vorhergehenden Übersichtspräparat. Eisen ist besonders im Darmbereich vorhanden. Eine etwas unterschiedliche Verteilung weisen die Elemente Cadmium (l.o.) und Blei (r.o.) auf. Cadmium scheint in etwa gleichmäßig in den Geweben vorhanden zu sein, Blei dürfte hingegen besonders im Hautbereich angereichert werden (Abb. 7).

Bei einem anderen Präparat scheint auch Blei (r.o.) homogener verteilt zu sein. Dies könnte auf höhere Belastung mit diesem Element zurückzuführen zu sein. Zink (l.u.), jenes Element, das in den Spektralmessungen stets im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe verstärkt gefunden wurde, ist sowohl im Darmbereich als auch im Hautmuskelschlauch konzentriert. Es kann aber im gesamten Gewebe nachgewiesen werden. Die Cadmiumverteilung (l.o.) und die Abbildung des Präparats (r.u.) sind zum Vergleich dargestellt (Abb. 8).

Die Detailabbildungen der Verteilungsmuster von Blei (Abb. 9) und Cadmium (Abb. 10) stellen die oben genannten Verhältnisse genauer dar. Es wurde die Konzentration der jeweiligen Elemente in Falschfarben nach steigender Menge von blau über grün, gelb, und rot nach cyan dargestellt. Während in diesen Abbildungen Cadmium nur in geringerem Ausmaß enthalten ist, kann die Bleibelastung in Haut, Muskulatur und Darmumgebung deutlich nachgewiesen werden. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, daß die Aufnahme durch den Darm für zumindest einige der Schwermetalle die hauptsächliche Belastungsquelle sein dürfte, während andere Metallverbindungen über die Körperoberfläche eindringen.

4. Schlußfolgerungen

Innerhalb der Bodenfauna nimmt die Familie der *Lumbricidae* oder Regenwürmer eine zentrale Stellung als Hauptgruppe der Destruenten ein. Ihre Vertreter, die bekanntesten davon *Lumbricus terrestris* und *Eisenia foetida*, können insgesamt bis über 90 % der Mikrofauna-Biomasse ausmachen (VOLZ 1967), wodurch ihnen als Basisgruppe für eine ganze Anzahl von Nahrungsketten eine wichtige Rolle zukommt. Ebenso lassen ihre weltweite Verbreitung, ihre weitgehend stationäre Lebensweise sowie die relativ einfache Altersklassifizierung (Regenwürmer erreichen im Freiland ein durchschnittliches Alter von drei Jahren) annehmen, daß es sich bei den Regenwürmern um ideale Monitoringorganismen für die Bewertung von Trends unter Langzeituntersuchungsbedingungen handelt. Daher war es von Interesse, diese Organismen, die eine sehr sensible Stelle in terrestrischen Ökosystemen einnehmen, auf ihre Eignung als tierische Indikatoren, insbesondere in Hinblick auf eine mögliche Anreicherung von Schwermetallen, zu untersuchen.

Die Aufnahme ökotoxikologisch relevanter Substanzen durch Freilandtiere, und hier vor allem durch Evertebraten, und deren mögliche Auswirkungen auf das gesamte Ökosystem stellen einen wichtigen Bereich in der Umweltüberwachung dar. Es ist anzunehmen, daß dieser Problematik in Zukunft steigende Bedeutung zukommen wird. Es ist bereits seit längerem bekannt, daß Regenwürmer verschiedene Schwermetalle in weit höheren Konzentrationen in ihrem Gewebe anreichern können, verglichen mit dem Metallgehalt des umgebenden Bodens (IRELAND 1979). Untersuchungen von ASH & LEE (1980) ergaben, daß Regenwürmer, die aus unmittelbarer Nähe stark verkehrsfrequenter Straßen stammten, sowohl Blei als auch Cadmium, Kupfer und Eisen anreicherten. Regenwürmer aus einer weitgehend verkehrsfreien Umgebung hingegen wiesen nur Spuren der genannten Schwermetalle auf. In einem Bericht, der im Auftrag des Umweltbundesamtes Berlin an der Universität des Saarlandes erstellt wurde (RISS & MÜLLER 1989), wurden hauptsächlich anaökische, d. h. tiefgrabende Regenwurmarten, einer Eignungsprüfung als Indikatororganismen für die Anreicherung von Schwermetallen, halogenierten und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen für die Umweltdatenbank unterzogen, da in einem umfassenden ökosystemaren Untersuchungsprogramm diese wichtigen Vertreter der Destruentengruppe nicht fehlen sollten.

Die in der vorliegenden Studie des Umweltbundesamtes eingesetzte Untersuchungsmethodik der röntgenenergie-dispersiven Mikroanalyse (EDX) in Kombination mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) zeichnet sich vor allem dadurch aus, daß Schwermetallbelastungen auch in kleinsten Proben festgestellt werden können. Nicht nur das Vorhandensein einer Gesamtkontamination eines Organismus durch Schwermetalle kann damit nachgewiesen werden, sondern auch deren spezifische Verteilung innerhalb des Körpers. Zum Unterschied zu den naß-chemischen Analyseverfahren, die jedoch meist weit empfindlicher sind, kann mittels EDX-Analyse ein eventuell vorhandenes belastendes anorganisches Element mit der spezifischen Anatomie des Organismus, wie z. B. Magen-Darm-Trakt, Nervensystem oder Muskulatur, in Zusammenhang gebracht werden. Die Untersuchungen von Regenwürmern aus belasteten Standorten ergaben, daß besonders im Bereich des Nervensystems auffällige Erhöhungen der Elemente Kupfer und Zink zu verzeichnen waren. Dies deutet darauf hin, daß bedingt durch eine spezifische Affinität der Nervenzellen für bestimmte Schwermetalle vor allem hier Schwermetallakkumulationen nachgewiesen werden können. Auch in der Muskulatur konnten erhöhte Zinkgehalte detektiert werden. ANDERSEN & LAURSEN (1982) konnten gleichfalls hohe Gehalte an Zink in der Muskulatur von *Lumbricus terrestris* nachweisen. Wahrscheinlich erfolgt die Exkretion zu hoher Mengen von Schwermetallen über die Kalkdrüsen. Grundsätzlich läßt sich feststellen, daß Regenwürmer zur Indikation von Schwermetallen geeignet sind. Es sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig, um die bisherigen Untersuchungsergebnisse zu bestätigen.

5. Literatur

ANDERSEN, C., LAURSEN, J. (1982):

Distribution of heavy metals in *Lumbricus terrestris*, *Apporectodea longa* and *A. rosea* measured by atomic absorption and X-ray fluorescence spectrometry. *Pedobiol.* 24, 347-356.

ASH, C. P. J., LEE, D. L. (1980):

Lead, cadmium, copper and iron in earthworms from roadside sites. *Environ. Poll.* 22, 59-67.

DORNINGER, C., K.J. WITTMANN (1991):

Aquatische Gastropoden als Reaktions- und Akkumulationsindikatoren. *VDI Berichte* 901, 1231-1246.

HÖNLINGER, M., K.J. WITTMANN (1991):

Terrestrische Isopoden als Indikatororganismen in der Stadtökologie. *VDI Berichte* 901, 1071-1081.

IRELAND, M., P. (1979):

Metal accumulation by the earthworms *Lumbricus rubellus*, *Dendrobaena veneta* and *Eiseniella tetraedra* living in heavy metal polluted sites. - *Environ. Pollut.* 19/3, 201-207.

NOTT, J.A. (1991):

Cytology of pollutant metals in marine invertebrates: A review of microanalytical applications. *Scanning Microsc.*: 5, 191-205.

OECD-Richtlinie 207(1984):

Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia fetida* (Savigny) 1826 in künstlichem Boden.

RISS, B., MÜLLER, P. (1989):

Ökologische und rückstandsanalytische Untersuchungen zur Eignungsprüfung von Regenwurmarten als Indikatororganismen für die Umweltprobenbank. - Abschlußbericht zum Forschungsvorhaben 108 08 059 des BM f. Umwelt, Naturschutz & Reaktorsicherheit, Deutschland.

VOLZ, P. (1967):

Vorarbeiten für ein System der tierischen Boden- Lebensgemeinschaften. - In GRAFF & SATCHELL ed., Braunschweig/Amsterdam, 575-584.

6. Abbildungsteil

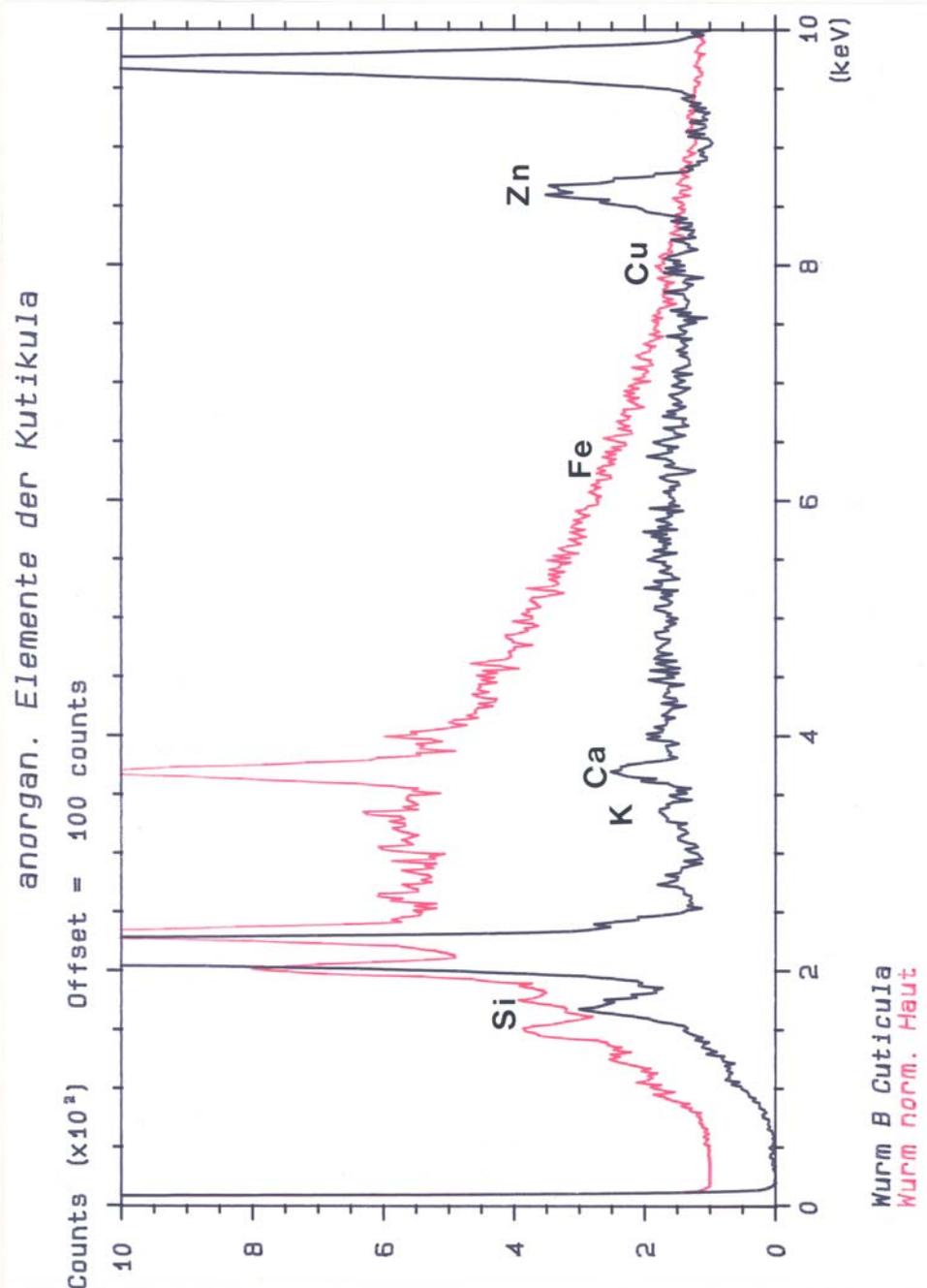


Abb.2: EDX-Spektrum der Cuticula, schwarz: Regenwurm belastet, rot: Normwurm unbelastet.

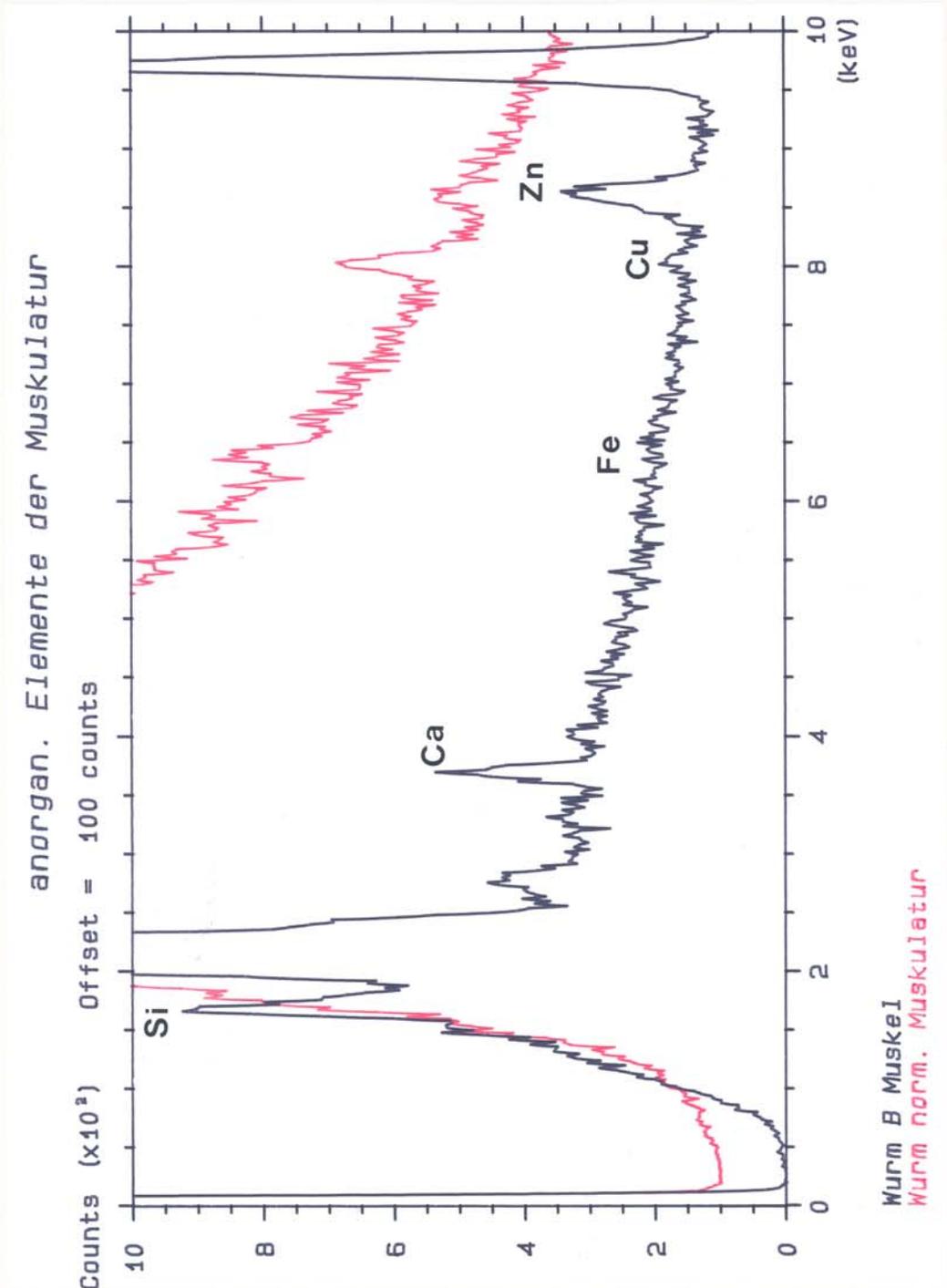


Abb.3: EDX-Spektrum der Muskulatur, schwarz: Regenwurm belastet, rot: Normwurm unbelastet.

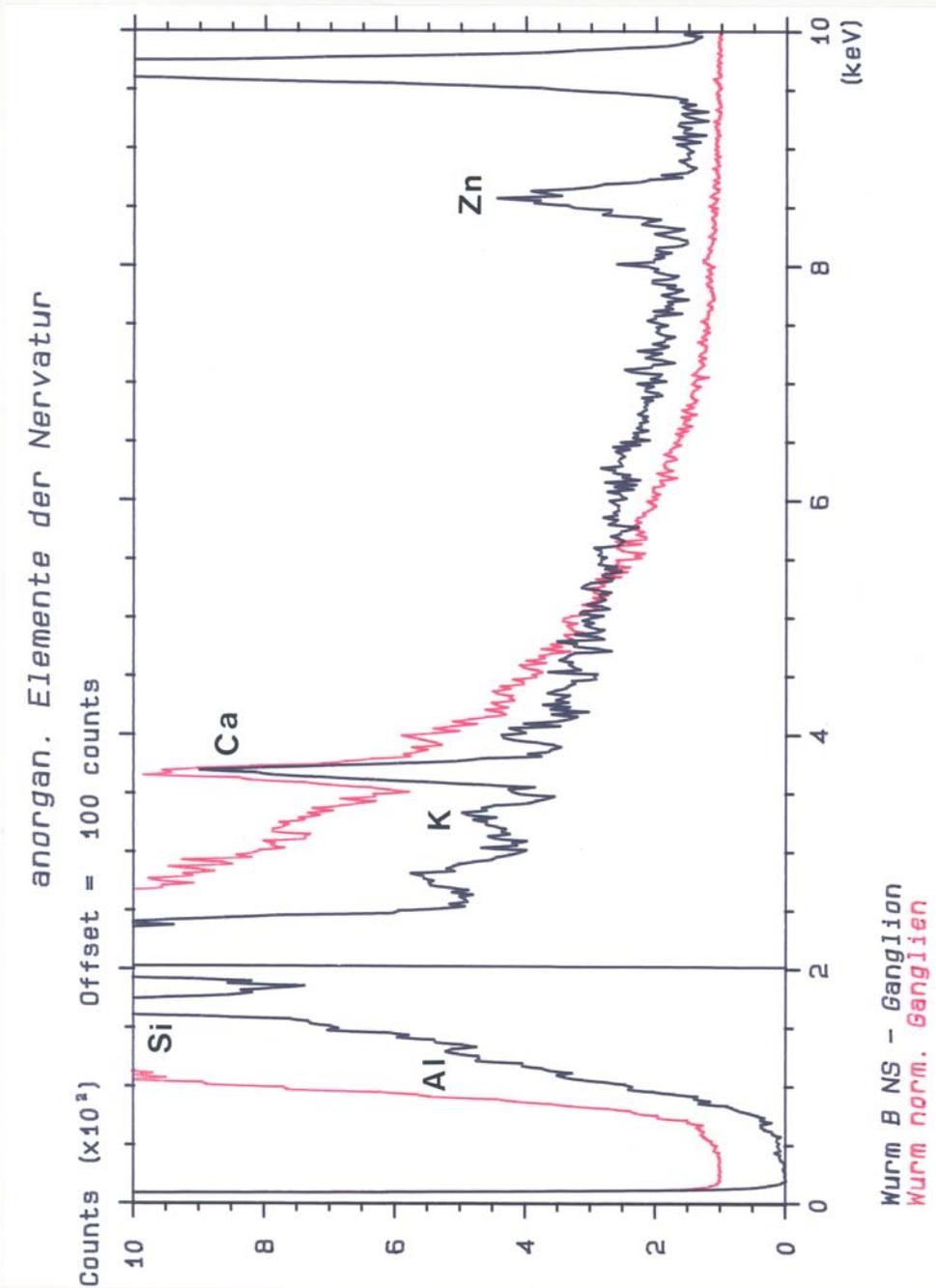


Abb. 4: EDX-Spektrum der Nervatur, schwarz: Regenwurm belastet, rot: Normwurm unbelastet.

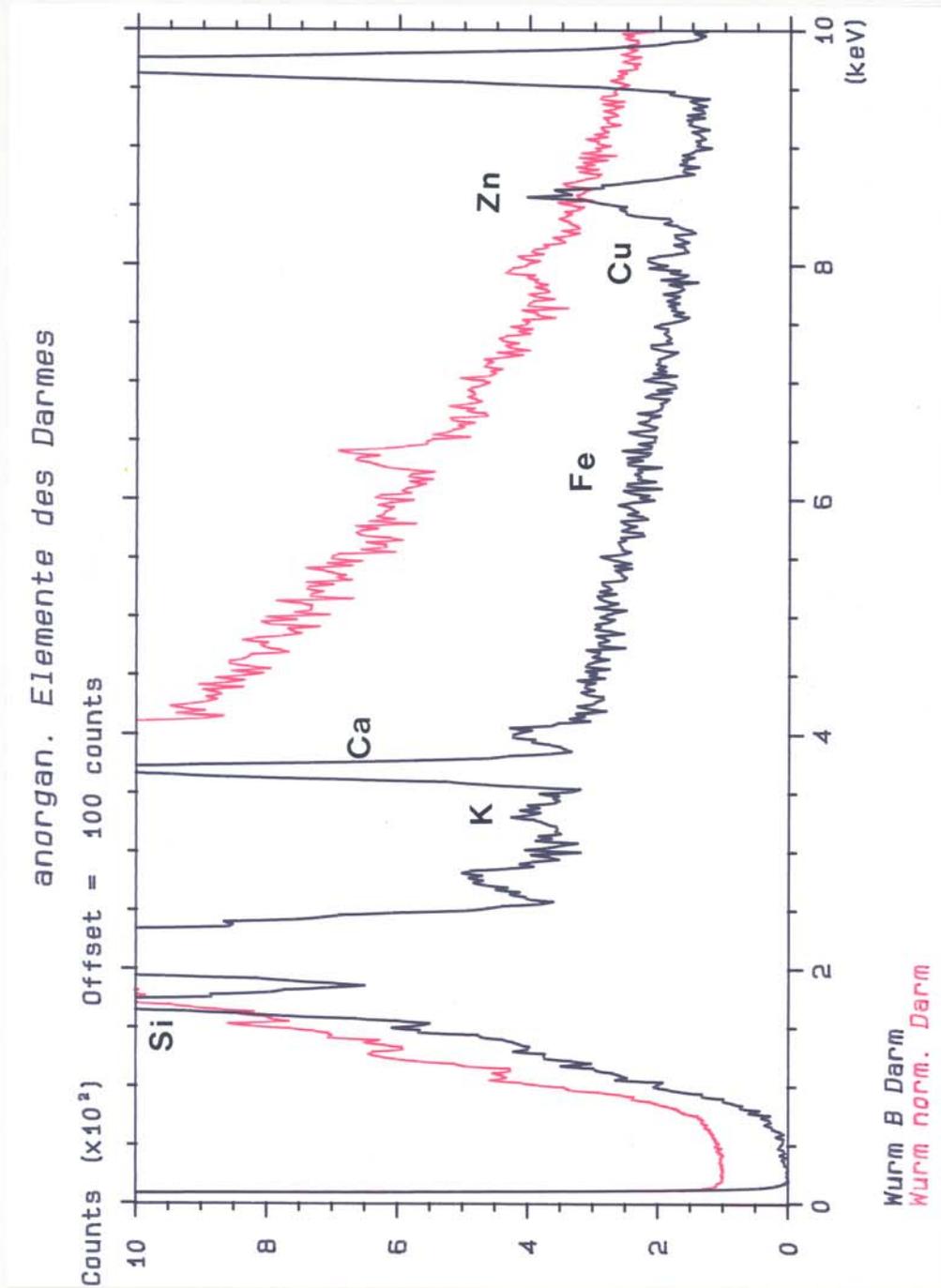


Abb.5: EDX-Spektrum des Darmes, schwarz: Regenwurm belastet, rot: Normwurm unbelastet.

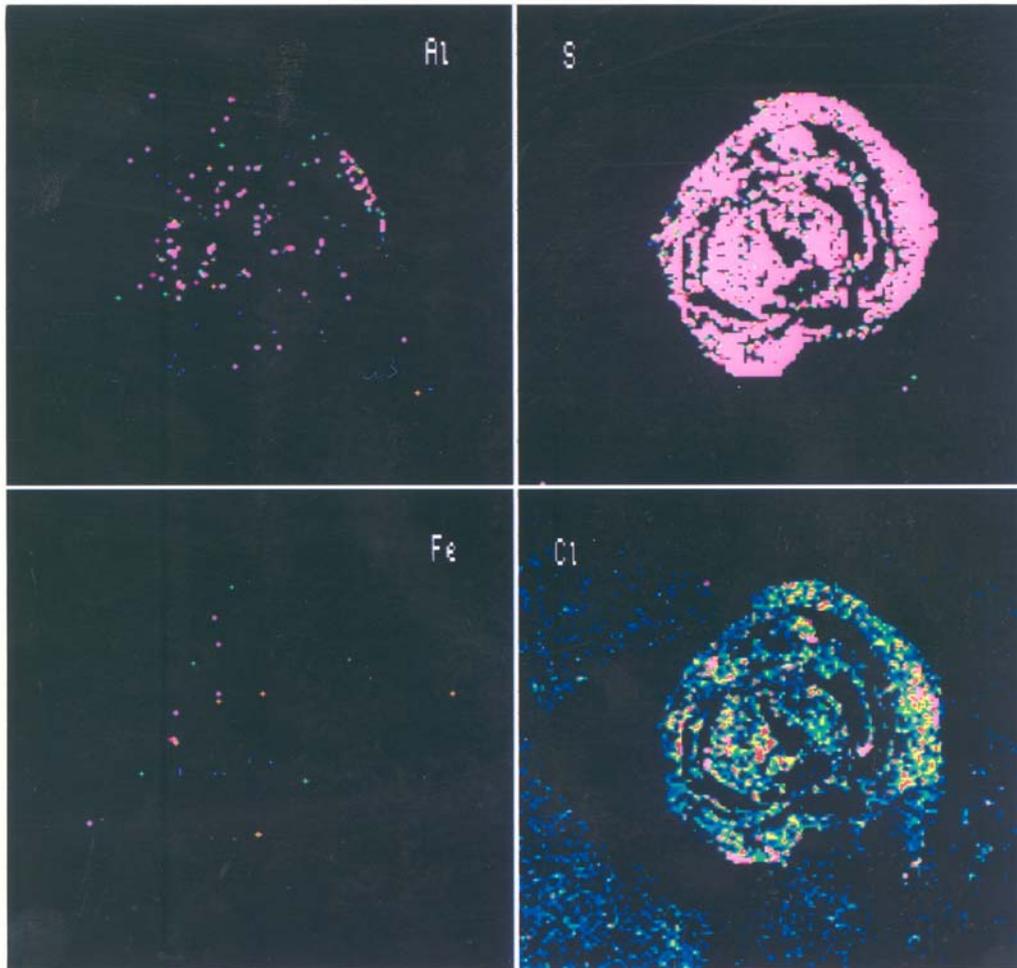


Abb. 6: Elementverteilungsmuster (EDX-mapping) der Elemente Al, S, Fe und Cl an Querschnitten von belasteten Regenwürmern.

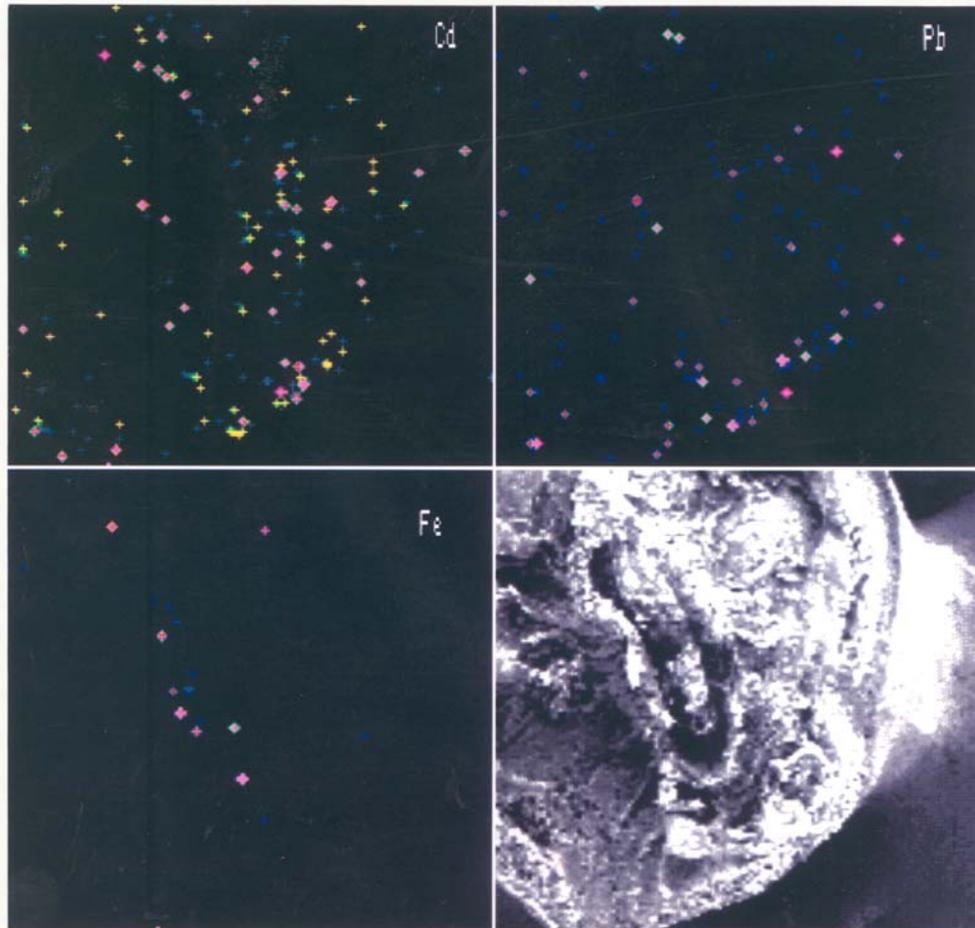


Abb. 7: Elementverteilungsmuster (EDX-mapping) der Elemente Cd, Pb und Fe an Querschnitten von belasteten Regenwürmern.

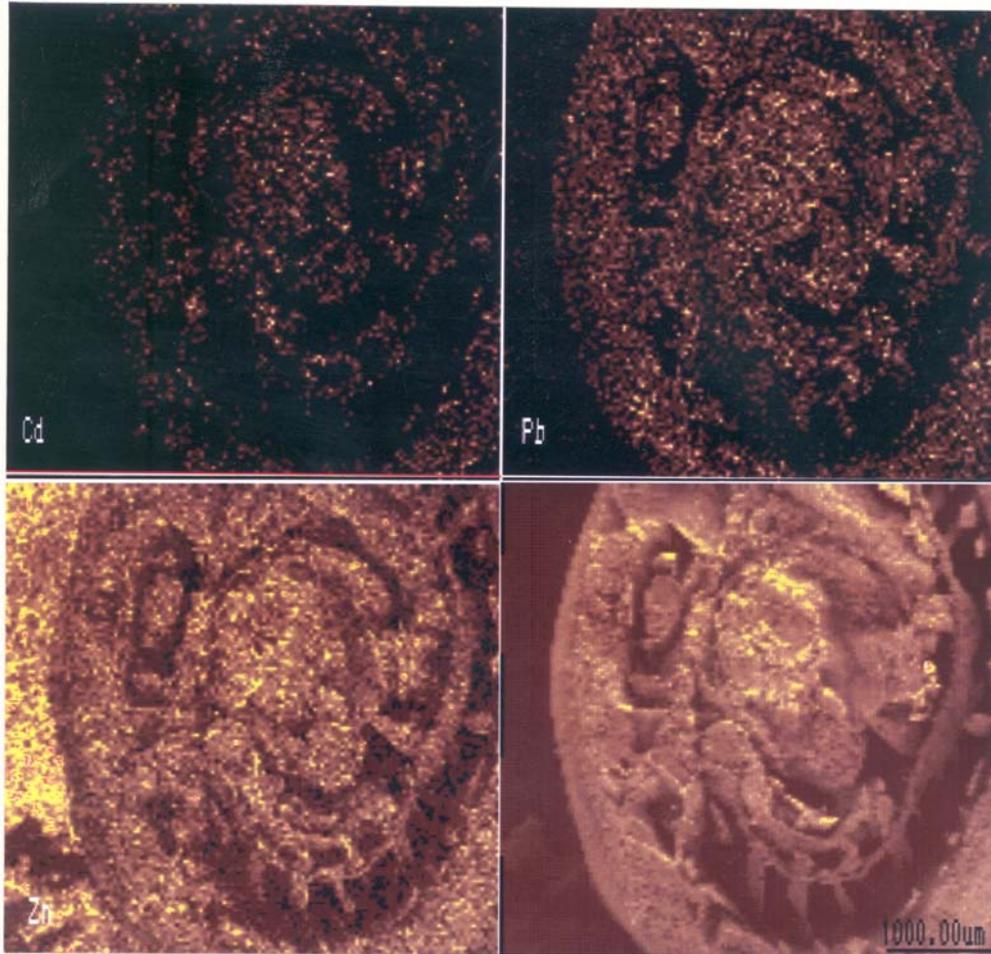


Abb. 8: Elementverteilungsmuster (EDX-mapping) der Elemente Cd, Pb und Zn an Querschnitten von belasteten Regenwürmern.

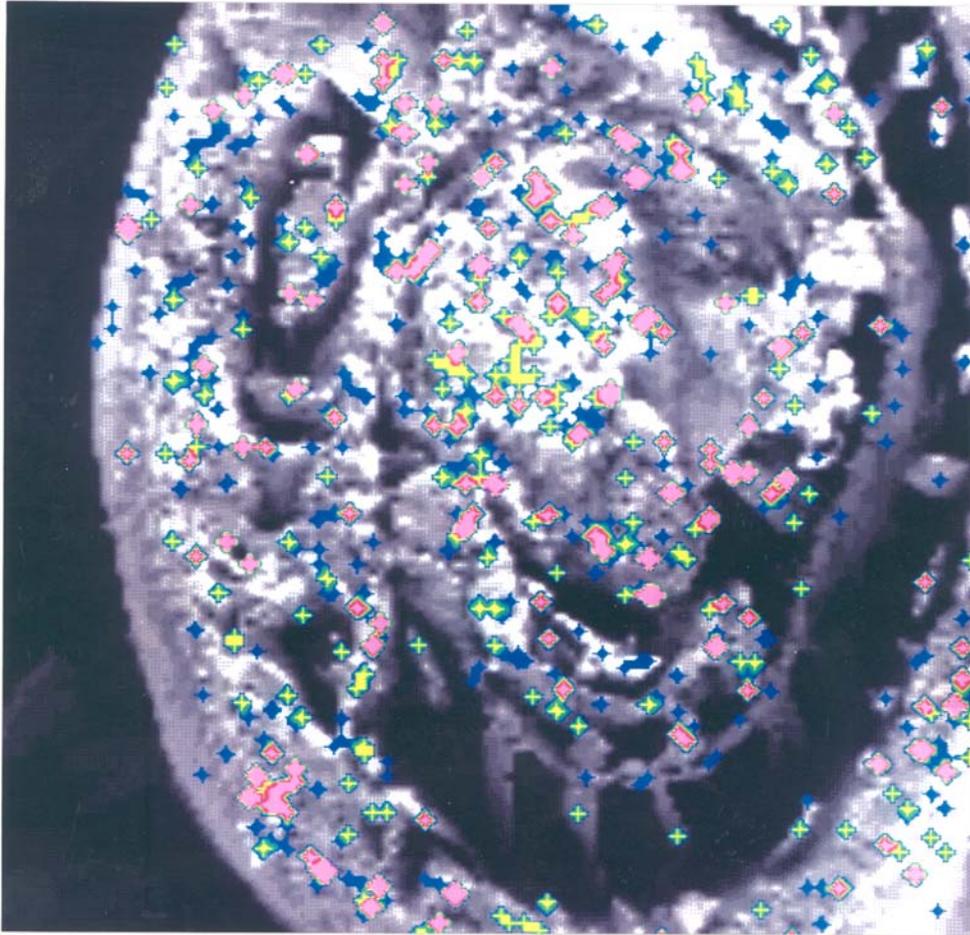


Abb. 9: Elementverteilungsmuster (EDX-mapping) von Blei an einem Querschnitt eines belasteten Regenwurmes.

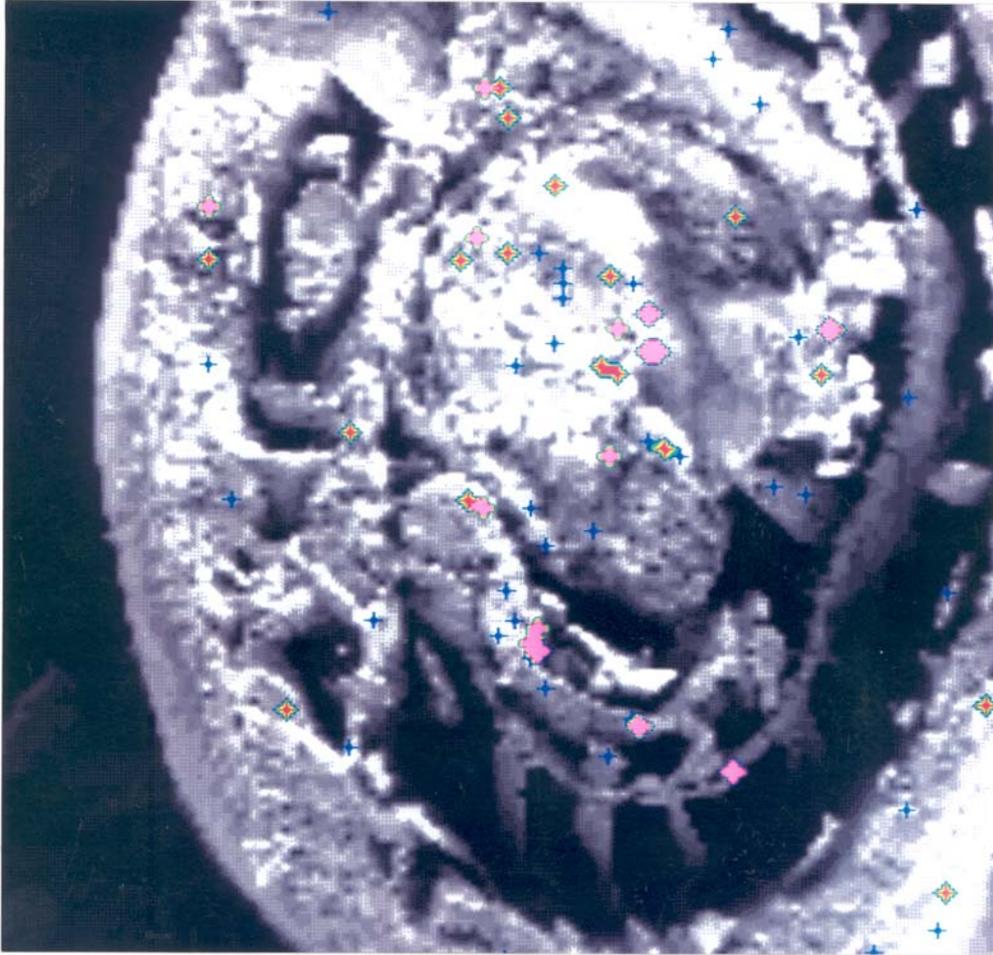


Abb. 10: Elementverteilungsmuster (EDX-mapping) von Cadmium an einem Querschnitt eines belasteten Regenwurmes.