

Die pH-Abhängigkeit der zellulären Druckresistenz bei *Mytilus edulis*

ANITA PONAT und HANS THEEDE

Institut für Meereskunde, Kiel

ABSTRACT: The pH-dependence of cellular pressure resistance of *Mytilus edulis*. Isolated gill tissue of *Mytilus edulis* survives in the laboratory under standard conditions (air pressure, 10° to 20° C, habitat salinity of 15 ‰ S); best results are obtained in a basic medium (pH 7 to 10). The time of maintenance of ciliary activity under the influence of pressure (500 atm) increases nearly logarithmically over the pH range 5 to 9. When pressure is increased up to 600 atm, the sensitivity of the tissue towards this factor increases, especially in the basic medium. These data are not representative for pressure resistance. Values for this resistance are obtained by observing the survival of tissue after exposure to pressure and decompression after a specific period of time. The maximum of cellular pressure resistance of isolated gill tissue shifts from the basic to the acid range, when a 3 hour exposure to hydrostatic pressure is increased from 400 to 600 atm.

EINLEITUNG

Eine Reihe Tiere, die nur Flachwasser bewohnen, können im Experiment hohe hydrostatische Drücke ertragen, wie sie in der Tiefsee herrschen (REGNARD 1891, EBBECKE 1944, KITCHING 1957). SCHLIEPER et al. (1967) bestimmten die artspezifischen zellulären Druckresistenzgrenzen verschiedener Muschelarten und fanden, daß litorale stenöke Arten weniger druckresistent sind als euryöke Arten. PONAT (1967) untersuchte darüber hinaus auch die Einwirkungen verschiedener hydrographischer Faktoren wie Temperatur, Salzgehalt und ionale Zusammensetzung des Außenmediums auf die zelluläre Überlebensfähigkeit unter Druck. In der vorliegenden Arbeit soll die Wirkung des pH auf die zelluläre Druckresistenz analysiert werden. Diese Untersuchungen erscheinen deshalb notwendig, weil mit zunehmender Wassertiefe der Dissoziationsgrad des für die Pufferung im Meerwasser wichtigen Karbonatsystems sowie des in den Organismen wichtigen Phosphatsystems zunimmt und damit der pH-Wert deutlich verringert wird. Ein pH-Wert von 8,00 an der Wasseroberfläche wird zum Beispiel durch einen hydrostatischen Druck von 1000 atm, wie er in 10 000 m Wassertiefe herrscht, auf 7,78 erniedrigt (5° C, 19,5 ‰ Cl). Geht man von niedrigeren pH-Werten an der Wasseroberfläche aus, so ist der Effekt noch stärker. Meerwasser mit einem pH-Wert von 7,5 ergibt bei Einwirkung von 1000 atm ein pH von 7,16 (BUCH et al. 1932). Bei Untersuchungen über Stoffwechsel und Resistenz mariner Organismen unter Tiefseebedingungen müssen die pH-Änderungen berücksichtigt werden.

Auch die Ionisierung organischer Moleküle (z. B. Eiweiße) kann mit einer Volumenverringerung verbunden sein und so durch den hohen Druck gefördert werden. Da auch der pH-Wert die Ionisierung von Eiweißen beeinflusst, ist es ebenfalls aus diesem Grunde aufschlußreich, dessen Wirkung mit der von hohem hydrostatischem Druck zu kombinieren. Letzten Endes dürfte die Resistenz von Zellen gegenüber Streßfaktoren in vielen Fällen auf die Resistenz wichtiger empfindlicher Enzyme zurückzuführen sein (vgl. USHAKOV 1966 für Hitzeresistenz). Von verschiedenen Enzymen ist bereits bekannt, daß deren Druckempfindlichkeit unter anderem deutlich pH-abhängig ist (CURL & JANSEN 1950, GUTHE et al. 1954, BROWN et al. 1958).

In dieser Arbeit soll die zelluläre Druckresistenz isolierter Gewebestücke eines euryöken marinen Evertebraten untersucht werden. Bei dem ausgewählten Versuchsobjekt, der litoralen Miesmuschel *Mytilus edulis* L., ist es schon deshalb zweckmäßig, isoliertes Gewebe zu untersuchen, weil sich die ganzen Tiere bei Einwirkung eines ungünstigen äußeren Faktors durch Schalenschluß leicht vom Außenmedium abkapseln können. Außerdem haben die ganzen Tiere durch Kalkreserven, insbesondere in der Perlmutterchicht ihrer Schalen, eine zusätzliche Pufferwirkung.

MATERIAL UND METHODE

Für die Untersuchungen wurden isolierte Kiemenrandstücke (etwa 3 mm breit) von Miesmuscheln aus der Kieler Förde verwendet. Die Tiere wurden bis zum Versuchsbeginn im Fundortwasser von etwa 15 ‰ S bei 10° C gehalten.

Die pH-Werte der Versuchsmedien wurden durch Zugabe von HCl oder NaOH zum Meerwasser eingestellt. Vor und nach den Versuchen wurde der pH-Wert mit einer Glaselektrode (Einstabmeßkette) und einem Präzisions-pH-Meter (Knick, Berlin) gemessen.

Zelluläre Druckresistenz

Einem Versuchstier wurden eine Reihe Kiemenstücke entnommen und je zwei davon in die verschiedenen pH-Stufen gebracht. Dann wurde eine Serie davon drei Stunden einem hohen hydrostatischen Druck (z. B. 500 atm) ausgesetzt, während die andere Serie als Kontrolle dieselbe Zeit unter sonst gleichen Bedingungen, nur bei Luftdruck, gehalten wurde.

Während der Druckeinwirkung befanden sich die Kiemenstücke von verschiedenen Tieren zu je drei in einem mit Gummistopfen verschlossenen PVC-Zylinder (Inhalt etwa 35 ml). Drei solcher Zylinder hatten in einem Stahlbehälter Platz. Eine genaue Beschreibung der Versuchsapparatur zur Erzeugung des hohen hydrostatischen Druckes findet sich bei PONAT (1967). Das Gerät besteht im wesentlichen aus zwei mit Nadelventilen (Aminco) verschlossenen nichtrostenden Stahlzylindern, einem Manometer und hydraulischer Pumpe.

Nach Dekompression wurden die Gewebestücke nach etwa 15 Minuten Aufenthalt bei Luftdruck und Zimmertemperatur um 20° C auf ihre Überlebensfähigkeit hin untersucht. Das geschah mittels mikroskopischer Beobachtung der Aktivitätsrate der termi-

nenen Cilien. Die Charakterisierung der Cilienaktivität erfolgte nach dem in der Legende zur Abbildung 2 angegebenen Schema. Die Einzelbeobachtungen von je 12 Tieren wurden zu Mittelwerten zusammengefaßt. Diese Werte dienten als Maß für die Überlebensfähigkeit der isolierten Gewebestücke unter Druck und damit für die zelluläre Druckresistenz.

Dauer des Cilienschlages unter Druck

Bei der Messung der Cilienschlagdauer während der Druckeinwirkung wurde ein Behälter aus Edelstahl verwendet, der oben und unten je eine druckbeständige Hartglasscheibe enthält. Auf der unteren Glasplatte wurden die zu untersuchenden Kiemestückchen mit Hilfe von Glasfäden und Hahnfett befestigt. Während der Druckeinwirkung wurde dann der Cilienschlag durch ein Umkehrmikroskop beobachtet (vgl. PONAT 1967).

ERGEBNISSE

Nach GRAY (1922, 1928) ist die mechanische Aktivität (Transportleistung) der Kiemencilien von *Mytilus edulis* stark abhängig vom pH des Außenmediums. Bei Verringerung des pH nimmt die Cilienaktivität ab; bei pH 5,6 kommt es zum Stillstand der Cilien. Erhöhung des pH-Wertes über den des normalen Meerwassers (7,8–8,2)

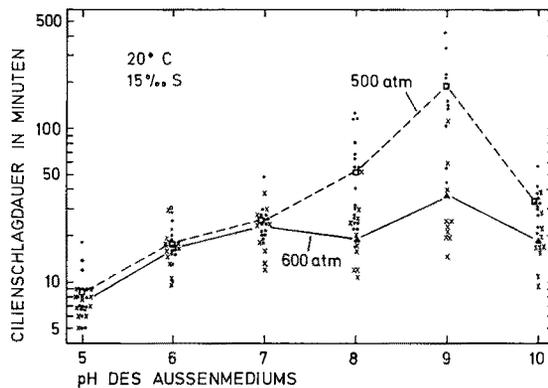


Abb. 1: Fortdauer des Cilienschlages während der Einwirkung von hohem hydrostatischem Druck. Untersucht wurde isoliertes Kiemengewebe von *Mytilus edulis* aus der Ostsee bei 20° C in Fundortwasser von 15 ‰ S. Jeder Punkt entspricht einem Kiemestück. Dreiecke und Quadrate stellen Mittelwerte dar

hinaus, bis auf 9,2, bewirkt eine Zunahme der mechanischen Aktivität der Cilien. Insgesamt wird deutlich, daß der Cilienschlag, gemessen an der Transportleistung, in einem schwach alkalischen Medium am wirkungsvollsten ist.

Beobachtet man nun die pH-Abhängigkeit der Fortdauer des Cilienschlages während der Einwirkung eines hohen hydrostatischen Druckes (500 atm), so ergibt sich bei

Erhöhung des pH-Wertes von pH 5 bis pH 9 eine gleichmäßige Zunahme der mittleren Cilienschlagdauer. Diese ist in Abbildung 1 in einem semilogarithmischen Koordinatensystem dargestellt. Auffallend ist die besonders große Streuung der Einzelwerte im schwach alkalischen Bereich. Bei pH 9 beträgt die Fortdauer des Cilienschlages bei den Gewebestücken von Miesmuscheln in manchen Fällen das Sieben- bis Zehnfache des Wertes in normalem Meerwasser; in anderen Fällen macht sich schon frühzeitig eine Schädigung bemerkbar. Die mittlere Cilienschlagdauer bei pH 8 beträgt 52 Minuten, bei pH 9 dagegen 190 Minuten (Abb. 1).

Im Vergleich zu diesen bei 500 atm erhaltenen Werten ist die Fortdauer des Cilienschlages bei 600 atm im alkalischen Bereich deutlich verringert. Bei pH 5 bis 7 liegen dagegen keine signifikanten Abweichungen vor (Abb. 1).

Interessant ist die Erscheinung, daß der Cilienschlag bei isolierten Kiemenstücken während einer Druckeinwirkung stundenlang zur Ruhe kommen kann, ohne daß deshalb das Gewebe abstirbt. Zur Ermittlung der Resistenz wird deshalb festgestellt, ob das Gewebe nach Druckeinwirkung noch Aktivität zeigt oder sich wieder erholt. Bei

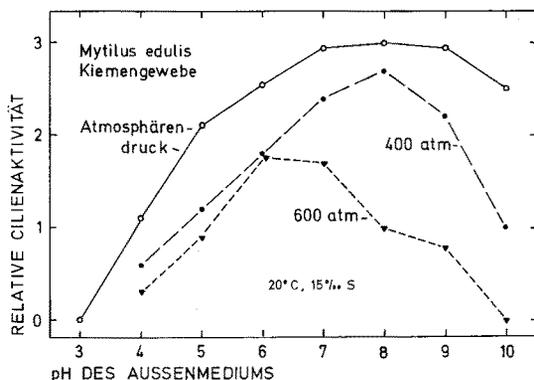


Abb. 2. Einfluß des pH-Wertes auf die zelluläre Druckresistenz. Als Maß für diese Resistenz wurde bei isolierten Kiemenstücken von *Mytilus edulis* aus der Ostsee nach 3 Stunden Druckeinwirkung und anschließender Dekompression die Aktivitätsrate der terminalen Cilien nach folgendem Schema charakterisiert: 3 = normale Aktivität; 2 = Aktivität etwas verringert; 1,5 = Aktivität auf 50% verringert; 1 = Aktivität über 50% verringert; 0,5 = 10–1% der Cilien noch aktiv; 0 = Ciliestillstand. Die eingezeichneten Punkte sind Mittelwerte aus jeweils 12 Einzelbeobachtungen, Standardabweichungen $\pm 0,5$ – $0,7$. Für die bei Luftdruck gemessenen Kontrollwerte betragen die Standardabweichungen $\pm 0,3$ – $0,5$. Temperatur 20° C, Salzgehalt 15‰ S, Druck und pH wie in der graphischen Darstellung angegeben

den folgenden Untersuchungen zur zellulären Druckresistenz wurde isoliertes Kiemen-gewebe jeweils 3 Stunden bei verschiedenem pH einem hohen hydrostatischen Druck ausgesetzt. Nach Dekompression verstrichen noch etwa 15 Minuten bis zur mikro-skopischen Beobachtung.

Die während der gleichen Zeit bei verschiedenem pH zur Kontrolle gehaltenen Gewebestücke lassen – ähnlich wie bei GRAY (1928) – erkennen, daß ihre Cilienschlag-aktivität bei Verringerung des pH unter etwa 7 deutlich abnimmt. Ciliestillstand tritt unter diesen Bedingungen bei pH 3 ein. Im Bereich von pH 7 bis 10 erscheint die

Cilienaktivität normal. Die benutzte Methode gestattet keine weitere Abstufung der Aktivitätsrate in diesem Bereich. Die geschilderten Beobachtungen gelten für 10° C und annähernd auch für 20° C. Bei 20° C deutet sich allerdings bei pH 10 bereits eine geringfügige Aktivitätsabnahme an.

Bei dreistündiger Einwirkung verschieden hoher hydrostatischer Drücke ergibt sich erst dann ein deutlicher Effekt gegenüber den Kontrollwerten, wenn der Druck mindestens 400 atm beträgt (Abb. 2 und 3). Die Resistenzkurven bei 10° und 20° C liegen in diesem Fall deutlich unterhalb derjenigen für die Kontrollwerte. Der optimale

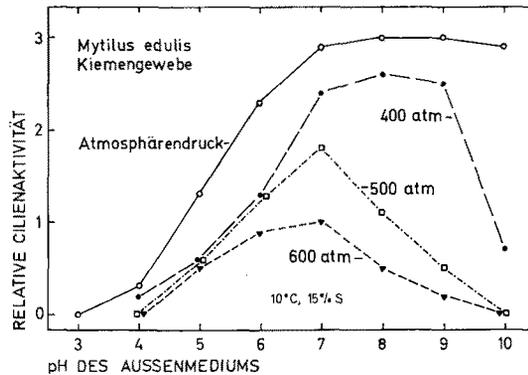


Abb. 3: Der Einfluß des pH-Wertes auf die zelluläre Druckresistenz. Temperatur 10° C. Weitere Einzelheiten wie in Abbildung 2

Resistenzbereich erstreckt sich bei 400 atm von etwa pH 7 bis 9. Bei 20° C ist das Gewebe nach Druckeinwirkung bei niedrigen pH-Werten (pH 4 bis 6) leistungsfähiger als bei 10° C.

Nach Einwirkung von 500 atm ist die Aktivität des Gewebes im gesamten pH-Bereich geringer als bei 400 atm. Durch höheren Druck (600 atm) wird dieser Effekt noch verstärkt (Abb. 3). Die schädigende Wirkung des Druckes nimmt im Vergleich zu den Kontrolltieren im alkalischen Bereich stark zu. Vergleicht man die nach Einwirkung verschiedener hydrostatischer Drücke (400 bis 600 atm) sowohl bei 10° C als auch bei 20° C erzielten Aktivitätskurven, so fällt auf, daß sich das Maximum der mittleren Aktivitätsrate bei Zunahme der Druckhöhe weiter in den sauren pH-Bereich verschiebt (Abb. 2 und 3). Das bedeutet, daß das Maximum der zellulären Druckresistenz bei zunehmendem Druck in den sauren Bereich rückt.

DISKUSSION

Nach GRAY (1922) ist die mechanische Aktivität der Kiemencilien von *Mytilus edulis* deutlich vom pH des Außenmediums abhängig. Sie ist im schwach alkalischen Bereich am größten. Auch nach mehrstündigem Aufenthalt des isolierten Kiemengewebes in Meerwasser von verschiedenem pH wird der Cilienschlag am besten im

alkalischen Milieu (bei pH 7 bis 10) aufrechterhalten; die Transportleistung der Cilien ist dort am größten. Mißt man nun die Fortdauer des Cilienschlages während Einwirkung eines hohen hydrostatischen Druckes (500 atm), so ergibt sich, daß diese in einem pH-Bereich von 5 bis 9 in einem annähernd logarithmischen Sinne ansteigt (vgl. Abb. 1). Die weitaus längsten Zeiten treten im alkalischen Bereich bei pH 9 auf. Bei Erhöhung des Druckes auf 600 atm wird die Schlagdauer insbesondere im alkalischen Bereich verringert.

Interessant ist nun die Beobachtung, daß die maximale zelluläre Druckresistenz des gleichen Gewebes, gemessen an der Rate der Cilienaktivität nach mehrstündiger Druckeinwirkung, bei niedrigeren pH-Werten liegt. Das bedeutet, daß die Dauer des Cilienschlages während einer Druckeinwirkung (bis zum Eintritt des Comas) nicht als ein Maß für die zelluläre Druckresistenz angesehen werden kann. Vielmehr geht aus den Untersuchungen deutlich hervor, daß die zelluläre Druckresistenz bei verschiedenen pH-Werten gerade in dem Bereich besonders abnimmt, in dem die Cilien bei Luftdruck ihre größte mechanische Aktivität und unter Hochdruck die längste Schlagdauer erkennen lassen. Offensichtlich steigt die Druckempfindlichkeit des Gewebes, wenn die Stoffwechselintensität bei Erhöhung des pH-Wertes einen „Optimalbereich“ überschreitet. In einem solchen Bereich erhöhter Druckempfindlichkeit nehmen dann die Schäden bei lang andauernder oder erhöhter Druckeinwirkung relativ stärker zu. Bei Erhöhung des hydrostatischen Druckes auf 600 atm verschiebt sich der Bereich der maximalen Druckresistenz auf diese Weise sogar bis in den sauren pH-Bereich (vgl. Abb. 2 und 3).

Es ist zu vermuten, daß bei der zellulären Druckresistenz auch enge Beziehungen zur Resistenz wichtiger empfindlicher Enzyme bestehen, wie es bereits bei der zellulären Hitzeresistenz nachgewiesen ist (USHAKOV 1966). Zur Erläuterung dieser Arbeitshypothese möchten wir einige Mechanismen heranziehen, durch die hohe Drücke wahrscheinlich die Stabilität der Proteine beeinflussen. Wichtig ist dabei die Erscheinung, daß Druckanstieg die Ionisierung verschiedenster Moleküle begünstigt, da diese gewöhnlich mit einer Volumenabnahme verbunden ist. Auffällig ist dieser Effekt schon bei den eingangs erwähnten Puffersystemen. Sowohl beim Karbonat- als auch beim Phosphatsystem nimmt die Dissoziation mit ansteigendem Druck, das heißt mit größerer Wassertiefe, zu (BUCH et al. 1932, SVERDRUP et al. 1942). Bei großen Molekülen wie Proteinen addieren sich solche Effekte der Volumenverringering für die verschiedenen ionisierten Gruppen, so daß die gesamte Volumenabnahme wesentlich stärker und der Einfluß des Druckes viel deutlicher ist. Die Ionisierung kann zur Entfaltung der Eiweißmoleküle führen. Diese ist aber mit einer Volumenvergrößerung verbunden. Der Effekt des Druckes auf das Maß der Ionisierung und Entfaltung verläuft also in entgegengesetzter Richtung. Die relative Bedeutung des einen oder anderen Faktors wird je nach den Bedingungen und je nach dem Protein verschieden sein (JOHNSON, EYRING & POLISSAR 1954).

Auch pH-Änderungen beeinflussen sowohl das Ausmaß der Ionisierung als auch die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbindungen, die für den Faltungszustand der Eiweiße eine wichtige Rolle spielen. Die bei Druckerhöhung beobachtete Verschiebung des zellulären Resistenzmaximums zu niedrigeren pH-Werten hin könnte demnach durch entsprechende Veränderungen der Stabilität im molekularen

Bereich bedingt sein. Enzymatische und molekularbiologische Untersuchungen könnten hier weitere Aufschlüsse geben.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Isoliertes Kiemenepithel von *Mytilus edulis* überlebt unter „Normalbedingungen“ (Luftdruck, 10° bis 20° C, Fundortwasser von 15 ‰ S) im alkalischen Milieu (pH 7 bis 10) am besten.
2. Die Dauer des Cilienschlages während Druckeinwirkung (500 atm) steigt in dem pH-Bereich von 5 bis 9 in einem annähernd logarithmischen Sinne. Bei Erhöhung des Druckes auf 600 atm nimmt die Empfindlichkeit des Gewebes im alkalischen Bereich deutlich zu.
3. Das Maximum der zellulären Druckresistenz wird bei Erhöhung des hydrostatischen Druckes vom alkalischen in den sauren Bereich verschoben.

Die Untersuchungen wurden durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft an Herrn Prof. Dr. C. SCHLIEPER ermöglicht.

ZITIERTE LITERATUR

- BUCH, K. & GRIPENBERG, S., 1932. Über den Einfluß des Wasserdruckes auf pH und das Kohlensäuregleichgewicht in größeren Meerestiefen. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer* **7**, 233–245.
- BROWN, D. E. S., GUTHE, K. F., LAWLER, H. C. & CARPENTER, M. P., 1958. The pressure, temperature and ion relations of myosin ATPase. *J. cell. comp. Physiol.* **52**, 59–77.
- CURL, A. L. & JANSEN, E. F., 1950. The effect of high pressures on pepsin and chymotrypsinogen. *J. biol. Chem.* **185**, 713–724.
- EBBECKE, U., 1944. Lebensvorgänge unter Einwirkung hoher Drucke. *Ergebn. Physiol.* **45**, 34–183.
- GRAY, J., 1922. The mechanism of ciliary movement. *Proc. R. Soc.* **93**, 104–121.
- 1928. Ciliary movement. Univ. Press, Cambridge, 162 pp.
- GUTHE, K. F., LAWLER, H. C., CARPENTER, M. P. & BROWN, D. E. S., 1954. Activity of myosin and actomyosin ATPase in relation to pressure, temperature and pH. *Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol.* **13**, 63.
- JOHNSON, F. H., EYRING, H. & POLISSAR, M. J., 1954. The kinetic basis of molecular biology. Wiley, New York, 874 pp.
- KITCHING, J. A., 1957. Effects of high hydrostatic pressures on the activity of Flagellates and Ciliates. *J. exp. Biol.* **34**, 494–510.
- KNIGHT-JONES, E. W. & MORGAN, E., 1966. Responses of marine animals to changes in hydrostatic pressure. *Oceanogr. mar. Biol. A. Rev.* **4**, 267–299.
- PONAT, A., 1967. Untersuchungen zur zellulären Druckresistenz verschiedener Evertrebraten der Nord- und Ostsee. *Kieler Meeresforsch.* **23**, 21–47.
- REGNARD, P., 1891. Recherches expérimentales sur les conditions physiques de la vie dans les eaux. Masson & Cie, Paris.
- SCHLIEPER, C., 1963. Biologische Wirkungen hoher Wasserdrucke. Experimentelle Tiefsee-Physiologie. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* **8**, 31–48.
- FLÜGEL, H. & THEEDE, H., 1967. Experimental investigations of the cellular resistance ranges of marine temperate and tropical bivalves: Results of the Indian Ocean Expedition of the German Research Association. *Physiol. Zool.* (im Druck).
- SVERDRUP, H. U., JOHNSON, M. W. & FLEMING, R. H., 1942. The oceans. Their physics, chemistry and general biology. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1087 pp.
- USHAKOV, B. P., 1966. The problem of associated changes in protein thermostability during the process of speciation. *Helgoländer wiss. Meeresunters.* **14**, 466–481.