

Temperatuurinvloed op de osmoregulatie

van de

garnaal, Crangon crangon L.

door

D.H. Spaargaren



Intern verslag

over

werkzaamheden verricht als doctorale studie

in het tijdvak augustus 1968 - januari 1969

aan

het NIOZ te Den Helder

voor

Prof. Dr. H.P. Wolvekamp

Zoölogisch Laboratorium

Rijks Universiteit te Leiden

onder supervisie van

Dr. Roy E. Weber

januari 1969

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLICATIES EN VERSLAGEN:

nummer 1969-9

Temperatuurinvloed op de osmoregulatie van
de garnaal, Crangon crangon L.

door

D.H. Spaargaren

(intern verslag)

Inhoud

1.	Samenvatting-----	p. 1
	Summary-----	p. 1
2.	Inleiding-----	p. 2
3.	Materiaal en methodes-----	p. 4
4.	Experimenten-----	p. 11
	A. Variatie van de inwendige concentratie na adaptatie aan bepaalde temperatuur en zoutgehalte-----	p. 11
	B. Δ_i verloop bij verandering van de externe concentratie-----	p. 13
	C. De relatie tussen Δ_i en Δ_e bij verschillende temperaturen-----	p. 15
	D. Reversibiliteit van het temperatuureffekt op de inwendige osmotische concentratie-----	p. 22
	E. Sterfte bij verschillende temperaturen en zoutgehaltes-----	p. 23
	F. Bepalingen van het watergehalte van <u>C. crangon</u>	p. 24
5	Discussie-----	p. 33
	Literatuur-----	p. 36

1. Samenvatting

1. Door middel van vriespuntsmetingen werd het verband bepaald tussen de osmotische concentratie van het bloed van Crangon crangon.L. en het zoutgehalte van het milieu bij 4-6°, 15° en 22°C. Δ_i past zich snel aan bij verandering van Δ_e ; bij 4-6° en 22°C werden bij overgang van 30‰ naar 15‰ S voor de interne verandering "halfwaarde tijden" gevonden van resp. 10,2 en 1,2 uur. Tussen ca 16‰ en 29‰ S bestaat een omgekeerde relatie tussen de temperatuur en Δ_i .
2. De ligging van de 4-6° en 22° curven ten opzichte van elkaar komen globaal overeen met de corresponderende curven van BROEKEMA (1941). Substitutie van de hier gevonden Δ_i waarden in de berekeningen van VERWEY (1957) toont een geringe afname van de interne osm. druk (0,5 atm.) als de temperatuur stijgt en migratie naar zoeter water plaats vindt. Deze compenseert slechts gedeeltelijk de afname van de osmotische druk van het omringende zeewater (1,9 atm.). Waarschijnlijk worden bij de migratie saliniteiten opgezocht waarbij Δ_i minder varieert.
3. Overlevingsproeven leverden zwakke aanwijzingen voor een verschuiving van de saliniteitstolerantie naar lagere waarden bij stijging van de temperatuur.
4. Er bestaat een significant negatieve correlatie tussen het watergehalte van C. crangon en het zoutgehalte van het medium. In verband met de gemeten bloedconcentraties duidt dit op een beperking van het waterverlies bij hoge en van het zoutverlies bij lage saliniteit van het milieu.

Summary

1. The variation in osmotic concentration of C. crangon blood with salinity of the medium was determined as Δ_i/Δ_e , at temperatures

of 4-6°C, 15°C and 22°C. Δ_i adapts quickly to changes in Δ_e ; at 4-6°C and 22°C the respective "half-value times" for internal change were 10,2 and 1,2 hours, for a transfer from 30 ‰ to 15 ‰ S. Between approx. 16 ‰ and 29 ‰ an inverse relationship exists between temperature and Δ_i .

2. The mutual positions of 4-6°C and 22°C curves show general agreement with corresponding ones of BROEKEMA (1941). However substitution the present Δ_i values into VERWEY's calculations indicate that the decrease in internal osmotic pressure with the Spring temperature increase and migration to less salt water (0,5 atm.) compensates only partly for the external osmotic change (1,9 atm.). The migration more probably represents movements to salinity ranges where Δ_i is more constant.
3. Survival experiments show slight evidence for increased tolerance in lower salinities with increased temperatures.
4. A significant negative correlation exists between the water content of C. crangon and salinity. Considered together with the measured internal concentrations this evidences a limitation of water loss at high, and loss of salt at low environmental salinity.

2. Inleiding

Vele organismen zijn in staat verschillende eigenschappen van hun lichaamsvloeistoffen konstant te houden. Onderwerp van deze studie is de regulatie van de osmotische concentratie van de haemolympe bij de garnaal, Crangon crangon L.

In de bloedvloeistof van C. crangon komen in oplossing verschillende stoffen voor, waarvan zowel de totale hoeveelheid als de onderlinge verhouding van de componenten kan variëren. De hier beschouwde osmotische concentratie heeft slechts betrekking op het totale aantal deeltjes aan opgeloste stof.

In de loop van het jaar treden veranderingen op in het milieu waaraan de dieren zijn blootgesteld o.a. wat betreft temperatuur, zoutgehalte, hydrostatische druk, licht, voedsel. Gedurende de winter treft men de dieren voor de kust van de Noordzee in gebieden met betrekkelijk diep en zout water. In het voorjaar treedt migratie op naar de kust en naar het ondiepe, wat brakkere water van de Waddenzee, waarin de dieren gedurende de zomermaanden en het najaar verblijven. Aan het eind van de herfst keren de dieren terug naar dieper zouter water met een meer gematigde temperatuur (HAVINGA, 1929).

Over de uitwerking van deze verschillende omstandigheden op de osmotische concentratie van het bloed zijn een aantal gegevens bekend geworden. BROEKEMA (1941), bepaalde in laboratorium-experimenten de relatie tussen inwendige osmotische concentratie en saliniteit van het omringende milieu bij temperaturen van 4° en 22°C (zie fig. 6). Zij vond hierbij in het saliniteits-gebied waarin het bloed hypotonisch is t.o.v. het milieu een negatieve correlatie tussen temperatuur en inw. osm. concentratie. De inwendige concentratie werd bepaald door geleidbaarheidsmetingen, waarbij de in het bloed aanwezige niet-elektrolyten niet evenredig meetellen. Uit deze gegevens berekende VERWEY (1957) de osmotische druk en vond daarbij een gelijk verschil in osm. druk tussen bloed en zeewater onder optimale zomer en winteromstandigheden resp. 22°C , 28,5 ‰ S en 4°C , 33 ‰ S.

Latere bepalingen van FLUGEL (1963) leverden een ander beeld, (figuur 6). In het hypotonisch gebied werd bij 5°C juist een lagere interne concentratie gevonden als bij 15°C . De concentratiebepalingen berustten zowel op vriespuntsmetingen als conductiviteitsmetingen.

Deze tegenstrijdigheid wierp de vraag op of het verschil in methode of een verschil in de voor de proeven gebruikte garnalen (resp. uit Noord- en Waddenzee en Oostzee) de oorzaak van de ongelijke uitkomsten was. Door deze onzekerheid rees tevens twijfel aan de door Verwey gegeven hypothese waarmee de osmoregulatiegegevens in de migratieverschijnselen konden worden gepast.

Door recente ontwikkelingen die het eenvoudig mogelijk maakten vriespunten van geringe hoeveelheden vloeistof nauwkeurig te meten leek het aantrekkelijk deze controverse tot een oplossing te brengen. Dit impliceerde de bepaling van het verband tussen inwendige osmotische concentratie en zoutgehalte van het medium bij verschillende temperaturen. Uit deze gegevens zou het tevens mogelijk zijn iets naders te weten over de betekenis van de osmoregulatie voor de migratie en zou nagegaan kunnen worden in hoeverre de hypothese van Verwey hiervoor opging.

3. Materiaal en methodes

proefdieren

Het onderzoek werd verricht aan de in de Waddenzee en in het kustwater van de Noordzee zeer algemeen voorkomende garnaal, Crangon crangon L. Het in leven houden van één grote laboratorium populatie is niet mogelijk omdat onder andere bij grote dichtheid aanzienlijke verliezen door kannibalisme optreden. Het was daarom niet mogelijk alle proeven uit te voeren met een éénmaal gevangen voorraad. Er zijn echter geen aanwijzingen gevonden dat hier de verschillen in herkomst invloed hebben op de osmoregulatorische capaciteit na voldoende acclimatisering aan het proefmilieu.

De dieren werden, na met een sleepnet gevangen te zijn, aan boord gesorteerd en verder vervoerd in geaereerd zeewater.

In het lab. werden de dieren gehouden in ondiepe bassins met een

zandbodem. Om de twee dagen werden ze gevoerd met gehakte horsmakreef
aquaria

Voor de adaptatie aan bepaalde temperaturen en zoutgehaltes zijn de dieren in aquaria geplaatst van 22 x 23 x 30 cm., doorgaans 15 dieren per bak. Voor proef D (zie hoofdstuk III) zijn grotere bakken gebruikt - 28 x 28 x 41 cm. - waarin 30 dieren werden geplaatst.

Voor de aeratie en mikrobiologische zuivering van het aquariumwater diende een bodemfilter, bestaande uit een omgekeerd op de bodem staande trechter, waaronder een met perslucht gedreven aquariumsteentje bruist. Met de door de steel van de trechter opstijgende belletjes wordt water meegevoerd dat via de bodem, een laag schelpengrit van ca. 6 cm. waarop een laagje zand van ca. 2 cm., wordt aangevoerd.

Overdag graven de dieren zich onder het zand. In een aldus ingericht aquarium wordt de dieren een betrekkelijk natuurlijk milieu geboden. De sterfte in de bakken is, behalve bij hoge temperatuur (22°C) en zeer lage saliniteit (5 ‰), gering: zie III - E.

aquariumwater

Voor het verkrijgen van lage saliniteiten werd zeewater vermengd met kraanwater. Hogere saliniteiten werden bereikt door toevoeging van ingedampt zeezout. (Dr. Ritter's Südsalz) aan niet verdund zeewater. Hiervan is te verwachten dat de relatieve ionensamenstelling weinig verschilt met natuurlijk zeewater. Het toegevoegde Sudsalz bevat relatief minder Ca omdat bij het indampen een gedeelte irreversibel onoplosbaar neergeslagen wordt. Het voor de permeabiliteit van dierlijke membranen belangrijke Ca zal echter aanvulling krijgen vanuit het op de bodem gebruikte schelpengrit.

meting van de osmotische concentratie

physisch-chemische betrekkingen

De concentratie van het totaal aan opgeloste deeltjes kan bepaald worden aan een aantal colligatieve eigenschappen van de oplossing: osmotische druk, vriespuntsverlaging, kookpuntsverhoging, dampdrukverlaging. In deze studie is de osmotische concentratie bepaald uit de vriespuntsverlaging (Δ).

1. relatie tussen Δ en de osmotische concentratie

$$\ln \frac{N}{n+N} = \frac{q}{R} \left(\frac{1}{T_o} - \frac{1}{T} \right)$$

(zie bv. GLASSSTONE & LEWIS)

N = molen oplosmiddel

n = molen opgeloste stof

Q = moleculaire smeltwarmte: het benodigd aantal calorieën om 1 mol oplosmiddel van gestolde naar gesmolten toestand te brengen.

R = gaskonstante (1,986 kal/°K)

T = stolpuntstemperatuur van het zuivere oplosmiddel

T^o = gemeten stolpunt

Bij lage concentraties is de vriespuntsdaling nagenoeg lineair met de osmotische concentratie. Indien we ervan uitgaan dat dit geldt kunnen we de algemeen geldende relatie omwerken tot:

$$\Delta = T_o - T = \frac{R T_o^2 M}{q} C$$

C = osmotische concentratie in mol/l.

M = moleculair gewicht van het oplosmiddel

Berekend voor water als oplosmiddel geeft dit: $\Delta = 1.858 C$

Om te verifiëren of in het concentratiegebied waarbinnen de waarnemingen vallen een eenvoudig lineair verband is te vinden, werd van verschillende verdunningen zeewater de vriespuntsverlaging gemeten: zie figuur 1.

Zowel bij het meten van de osm. concentratie van bloedmonsters

als bij de bepaling van de concentratie van zeewater zijn in de praktijk verdunningen met aqua dest. toegepast. Hiermee kwamen alle gemeten vriespunten tussen waarden van 0,00 tot 0,95 °C te liggen. De grafiek toont dat het verband lineair blijft zelfs nog bij hogere concentraties dan waarbij de metingen zijn uitgevoerd.

2. relatie tussen Δ en chloriniteit

Miyake (1939) geeft voor het verband tussen en de chloriniteit van zeewater de empirische formule:

$$\Delta = 0,102710 \text{ Cl'}$$

De chloriniteit kan worden omgerekend tot saliniteit volgens het verband:

$$S = 0,030 + 1,8050 \text{ Cl'}$$

3. relatie tussen Δ en osmotische druk (π_t)

Het verband tussen osmotische druk en chloriniteit wordt gegeven door:

$$(\text{Miyake, l.c.}) \quad \pi_t = 1,240 \text{ Cl' } + 0,00454 \text{ Cl' } t$$

Met bovenstaande formule voor de relatie tussen Cl' en levert dit:

$$\pi_t = (12,0728 + 0,044202 t) \Delta$$

Δ , t in °C, π in atmosf.

De osmotische druk is dus i.t.t. de vriespuntsverlaging niet slechts een functie van de osmotische concentratie, maar ook afhankelijk van de temperatuur.

uitvoering van de vriespuntsmetingen

Van een garnaal wordt met sterk absorberend papier (Kleenex) zorgvuldig het aanhangende water afgezogen. Voor het nemen van het bloedmonster wordt een pasteurpipet vlak achter de carapax door het vlies op de overgang naar het eerste abdominale segment gestoken. Door capillaire werking vult zich de horizontaal, of iets omlaag gerichte

glasnaald met bloed uit de dorsale bloedsinus. Slechts in enkele gevallen is het nodig het vollopus van het cappillair in het begin wat op gang te brengen door voorzichtig aan de pipet te zuigen. FLÜGEL (1963) verkrijgt zijn bloedmonsters door de pipet tussen 1^e en 2^e abdominale segment in te brengen. Daar de glasnaald in dit geval dieper door moet dringen en eerst een bindweefsel laag tussen twee longitudinale spierbundels moet passeren blijkt de kans op verstopping van de holle naald groter. Daarnaast is door het meer ondoorzichtig zijn van de spieren moeilijker te beoordelen hoe ver de punt in het dier verdwijnt.

Het bloedmonster wordt vervolgens verdund in 50 μ l aqua dest. dat met behulp van een Eppendorf micropipet is afgemeten in een meetvatje van de osmometer.

Voor het meten van de vriespuntsverlaging van zeewater werd dit afhankelijk van de te verwachten saliniteit niet, tot de helft of tot 1/3 verdund met aqua dest. Hierdoor kwam de concentratie in die orde van grootte te liggen waarbij het induceren van de kristallisatie bij een bepaalde onderkoeling goed mogelijk is.

het meten van een monster

Het vriespunt werd gemeten met een vriespuntsosmometer van het fabrikaat Knauer. Hierbij wordt een klein monster ($\pm 50 \mu$ l.) d.m.v. een peltierelement afgekoeld tot een bepaalde temperatuur beneden het vriespunt. Door roeren wordt een plotselinge kristallisatie opgewekt, waarbij de temperatuur oploopt, door het vrijkomen van stollingswarmte, tot een mengsel van vloeistof en ijs de temperatuur van het vriespunt heeft. Door uitvriezingsverschijnselen is de van een oplossing gemeten waarde enigzins afhankelijk van de mate van onderkoeling (figuur. 2). Om de waarden vergelijkbaar te houden is het vriespunt geijkt voor een onderkoeling van 5,95 °C.

ijking

Op het pasteurpipet waarmee de bloedmonsters zijn genomen is op de volgende wijze een ijkstreep aangebracht. Plastic lijm (Collal) wordt gemengd met O.I. inkt. Een kleverige dunne draad hiervan wordt om het glascappillair gedraaid. Bij geringe verhitting hecht de zwarte lijm zeer vast op het glas. Door het aanbrengen van een constriktie in het pipet op de plaats van de ijkstreep kan de nauwkeurigheid nog worden vergroot.

Het cappillair wordt geijkt met een 400 mosmol NaCl oplossing welke een bekende vriespuntsverlaging van $0,7432^{\circ}\text{C}$ heeft.

De vriespuntsverlaging van een monster volgt dan uit:

$$\Delta = 0,7432 \frac{S_{\text{ijking}}}{S_{\text{monster}}} \frac{U_{\text{monster}}}{U_{\text{ijking}}} \text{ } ^{\circ}\text{C}$$

S = gevoeligheidsinstelling osmometer

U = gevonden verschil in ligging tussen meetwaarde van oplossing en gedestilleerd water.

Uit de ijkwaarden van pipetten die bij de metingen gebruikt zijn is af te leiden dat hun volume ligt tussen 16 en 50 μl . Bij grote garnalen is het mogelijk tweemaal een hoeveelheid van 50 μl bloed af te nemen.

Een geijkt cappillair kan vele malen gebruikt worden. Na het nemen van het bloedmonster wordt een 10% oplossing van RBS 25, een synthetisch detergens, doorgezogen. Vervolgens wordt de pipet gespoeld met aqua dest. Voor het drogen wordt zuivere aceton doorgezogen.

nauwkeurigheid Δ metingen

Het afmeten van een bepaalde hoeveelheid vloeistof in het pipet kan met grote nauwkeurigheid gebeuren (geschatte fout $\pm 1\%$). Herhaaldelijk spoelen van het pipet in de voor de verdunning in het

meetbuisje gepipetteerde hoeveelheid aqua dest. levert hiermee een voldoende menging, zodat in het pipet achter blijvende vloeistof de meting niet beïnvloed. Een behandeling met "dessicote", dat een hydrofoob laagje op de binnenwand van het glas geeft, is door het gebruik van aceton niet mogelijk. De monsterbuisjes worden voor het gebruik 4 x gespoeld met aqua dest. en zorgvuldig gedroogd met absorberend papier. Voor het afpipetteren van 50 μ l. aqua dest. in het buisje met het Eppendorf pipet geeft de fabrikant op als abs. meetfout: 0,5 μ l. standaardafwijking 0,15 μ l. Aldus uitgevoerde metingen van een standaard zoutoplossing ($\pm$ 50% zeewater) leveren een vriespuntsvariatie van 0,01 $^{\circ}$ C.

Bij het overbrengen van een bloedmonster in het meetbuisje kunnen echter grotere meetfouten optreden door verschillen in eigenschappen van de bloedmonsters. Het bloed van garnalen is evenals bij een aantal andere Crustaceae stolbaar. In sommige gevallen kon worden waargenomen dat het bloed in het cappillair een gedeeltelijke stolling onderging, waarbij na spoelen van het pipet stolsel tegen de glaswand van het cappillair achterbleven. In andere gevallen trad stolling op zodra bloed uit het pipet in het monster buisje vloeide. Daar het eiwit in verhouding tot het elektrolyte een geringere bijdrage in de osmotische concentratie wordt verondersteld te leveren kan de fout die hierin ligt misschien beperkt zijn. Het was in dit bestek niet mogelijk nauwkeurig na te gaan welk aandeel de soms aanwezige stolling in de gevonden variatie uitmaakte.

De gemeten waarde van het vriespunt van een monster staat afhankelijk van de concentratie van dat monster meer of minder onder invloed van de onderkoelingstemperatuur (Zie boven, figuur 2). Het is doorgaans mogelijk de temperatuur waarbij kristallisatie wordt ingezet vrij nauwkeurig gelijk te nemen. Alle gegeven meetwaarden zijn verkregen

na onderkoeling van 5,6 - 6,3 °C.

bepaling van het watergehalte van C. crangon.

Nadat de dieren bloed is afgenomen wordt het natgewicht bepaald met een nauwkeurigheid van $\pm 0,2$ mg. Gedurende ongeveer 14 dagen worden de dieren hierna gedroogd in een stoof van 70 °C. Opnieuw wegen levert het drooggewicht. Het watergehalte kan worden berekend uit:

$$\frac{G_{\text{nat}} - G_{\text{droog}}}{G_{\text{nat}}} \times 100\%$$

De nauwkeurigheid van de drooggewichtbepalingen is hoog (0,2 % rel. fout). In het natgewicht is echter een onnauwkeurigheid te verwachten door het in meer of mindere mate achterblijven van water aan de buitenzijde van het dier. Verder is de dieren een niet altijd gelijk volume bloed afgenomen. De hierbij betrokken hoeveelheden zijn echter gering in verhouding tot het hoge watergehalte van de dieren ($\pm 75\%$), zodat deze onnauwkeurigheden slechts een vrij beperkte relatieve fout geven.

4. Experimenten

A. Variatie van de inwendige concentratie na adaptatie aan bepaalde temperatuur en zoutgehalte.

Om een indruk te krijgen van de spreiding van de Δ_i bepalingen zijn van een aantal aan bepaalde omstandigheden aangepaste dieren bloedmonsters genomen waarvan het vriespunt werd gemeten. De resultaten hiervan zijn weergegeven in onderstaande tabel.

Individuele variatie van Δ_i . Akklimatisatie 17 dagen.

Temperatuur	4 - 6 °C	15 °C	
Δ_e	0,57 - 0,63 °C	0,85 - 0,90 °C	1,61 - 1,67 °C
Δ_i	0,89 °C	1,18 °C	1,46 °C
	0,89	1,18	1,46
	0,95	1,18	1,48
	0,96	1,19	1,50
	0,96	1,21	1,50
	0,96	1,22	1,51
	0,98	1,23	1,53
	0,98	1,26	1,54
	0,99		1,54
			1,57
			1,59
			1,62
gemiddelde	0,95	1,21	1,53
standaard afwijking	0,037	0,029	0,050

Mogelijke oorzaken van deze variatie zijn:

1. meetfouten. Zie II Materiaal en methodes.
2. variatie in medium concentratie. In de aquaria blijft het zoutgehalte op den duur niet konstant. Tabel 1 (bijlage). De toename van saliniteiten moet worden toegeschreven aan indamping via het oppervlak en vooral waarschijnlijk ook via de luchtstroom die de aeratie en filtering van het water verzorgt. Glazen afdekplaten op de aquaria verhinderen dit waterverlies slechts voor een deel. Het in de aquaria vloeien van condenswater verklaart de incidentele daling van het zoutgehalte die in enkele bakken bij lage temperatuur gevonden wordt.
3. variatie in het bloed van verschillende garnalen. Bij het nemen van de bloedmonsters vallen verschillen op in helderheid (van glashelder tot ondoorzichtig troebel) en kleur (kleurloos - lichtblauw). Dit laatste hangt samen met de oxygenatietoestand van het haemocyanine. De verschillen later zich moeilijk correleren met verschillen in gemeten vriespunt.

Bij de keuze van de proefdieren is geen onderscheid gemaakt tussen

~~consp.~~, noch tussen dieren van verschillende grootte. Wel werden ei-dragende ~~egg~~ uitgesloten. De gemeten vriespuntswaarden leidden echter niet tot een duidelijke suggestie voor het bestaan van verschillen tussen deze groepen. (Vergelijk BROEKEMA, 1941)

Gedurende de vervelling vermindert het verschil tussen inwendige en externe concentratie. Er bestaan aanwijzingen dat deze afname slechts van korte duur is (enkele uren). [H.J. Fhyn - persoonlijke mededeling aan R.E. Weber.] De mogelijkheid bestaat echter dat ook dit verschijnsel verantwoordelijk zal zijn voor een deel van de variatie in de vriespuntsbepalingen. Hierin ligt ook een mogelijke verklaring voor enkele - soms sterk afwijkende meetuitkomsten, die zich bij een tweede monster van hetzelfde dier herhaalden en daarom niet aan meetfouten te wijten waren.

B. 4. Verloop bij verandering van de externe concentratie.

Voor de bepaling van de relatie tussen interne concentratie en de saliniteit van het medium is het noodzakelijk te weten of de dieren volledig geïmpadteerd zijn aan een bepaald milieu of dat er zich na verloop van tijd nog veranderingen voor doen in de interne concentratie. De mogelijkheid bestaat dat bij lagere temperatuur deze aanpassing meer tijd vergt zodat bij meting na onvoldoende acclimatisatie zich verschillen voordoen die niet aan een temperatuursinvloed op de osmoregulatie mogen worden toegeschreven.

De snelheid van adaptatie werd bepaald door in een voorlopige proef-opzet, dieren vanuit het voorraad bassin (temp $\pm 20^{\circ}\text{C}$, S = $\pm 30^{\circ}/\text{oo}$) over te brengen naar aquaria bij resp. 5, 15 en 22°C met een saliniteit van $15^{\circ}/\text{oo}$. Deze temperaturen waarbij ook de waarnemingen voor de relatie tussen interne en externe osm. concentratie zijn gedaan (zie III C) waren zodanig gekozen dat de resultaten vergeleken konden worden met welke waren verkregen door BROEKEMA (1941) en FLÜGEL

(1963) die resp. werkten bij 4 en 22 °C en 5, 15 °C.

Bij de overgang naar de aquaria ondergingen de dieren niet slechts een daling van de saliniteit, doch ook een verandering van de temperatuur.

Fig. 3 toont het verloop van het verschil van inwendige en externe concentratie in de loop van een maand. Hieruit blijkt dat bij overgang naar tot de helft verdund zeewater de osm. concentratie van het bloed een daling doormaakt die reeds binnen enkele dagen stopt. Hierna schommelen de gemeten waarden om een konstant niveau. Er laat zich hier voor de verschillende temperaturen geen verschil in adaptatiesnelheid onderscheiden. Evenmin bestaat er bij dit zoutgehalte een significant verschil in eindniveau waarop de interne concentratie bij deze temperaturen wordt gehandhaafd.

Een uitbreiding van het onderzoek naar de snelheid van de adaptatie leverde verdere aanwijzingen voor een zeer snelle aanpassing. Dieren die gedurende 7 dagen bij 30 ‰ S in resp 5, 15 en 22 °S hadden doorgebracht werden overgeplaatst naar 15 ‰ S bij dezelfde temperatuur. Ongeveer om de drie uur werd van enkele dieren het vriespunt van de haemolympe bepaald. Fig 4. Tevens blijkt een sterke invloed van de temperatuur op de verandering van de osmotische concentratie:

<u>Temp.</u>	<u>"halfwaarde tijd"</u>	
5 °C	10,2	uur
15 °C	2,4	uur
22 °C	1,2	uur

Een temperatuuroptoe name van 10°C geeft dus een adaptatiesnelheid die ruim 4 x zo hoog ligt. Deze grote invloed van de temperatuur suggereert dat de hierbij betrokken processen niet van eenvoudig fysische aard zijn (Q_{10} 2 à 3).

In de hieronder te beschrijven experimenten, waarbij het uiteindelijk niveau van primair belang was, werden de dieren altijd langer dan 5 dagen geakklimatiseerd aan een proefomstandigheid. Deze door FLÜGEL aangehouden periode lijkt hieruit ruimschoots voldoende voor volledige adaptatie.

C. De relatie tussen Δ_i en Δ_e bij verschillende temperaturen.

Daar de spreiding in de Δ_i bepalingen vrij groot is, was het van belang voor de bepaling van het verband tussen interne osm. concentratie en externe zoutgehalte dat de dieren een zo uniform mogelijke behandeling kregen opdat de gemeten punten zo goed mogelijke vergelijkbaar zouden zijn. Er is hier uitgegaan van eenzelfde groep dieren die, 15 per aquarium, over 24 bakken werden verdeeld met zoutgehalten van 5, 10, 15, 20, 25, 30, en 40 ‰ bij temperaturen van 4-6, 15 en 22°C. 1) De dieren zijn in een bepaald schema kort na elkaar in de aquaria gebracht, waarbij na 8 en 14 dagen, wanneer volledige adaptatie heeft plaatsgevonden, het vriespunt van de haemolympe werd gemeten.

OSMOTISCHE CONCENTRATIE

In Fig 5. zijn de meetresultaten uitgezet. Ter vergelijking zijn op dezelfde schaal de door BROEKEMA en FLUGEL bepaalde relaties weergegeven in Fig 6. Aan de grafieken zijn verschillende eigenschappen te onderscheiden die we hier onderling zullen vergelijken.

1. Algemene vorm van de functie $(\Delta_i)_{\Delta_e}$

Een toename van de externe concentratie correspondeert doorgaans met een toename van de interne concentratie. In het algemeen blijft de verandering van de interne osm. concentratie wat achter bij de externe

verandering: bij lage concentratie treedt bij daling van de externe concentratie geen evenredige afname op in de interne concentratie, bij hoge concentraties wordt geen evenredige toename gevonden bij een externe stijging. Hiertussen wordt een saliniteitsgebied gevonden waarin een externe verandering slechts tot zeer geringe interne veranderingen leidt.

De hier bij drie verschillende temperaturen bepaalde krommen blijken in vorm identiek. Door een verschuiving in X en Y richting kunnen zij elkaar nagenoeg geheel overlappen.

Het verloop is eveneens gelijk aan het door BROEKEMA gevonden verband bij 22°C. Een verschuiving in horizontale richting kan de curve doen samenvallen met de hier voor deze temperatuur gevonden relatie.

(Merkwaardigerwijs is hier geen verschuiving in verticale richting nodig welke te verwachten was om het aandeel van niet-elektrolyt deeltjes voor de osmotische concentratie in rekening te brengen). In de door FLÜGEL bepaalde relatie komt vooral bij 15°C het karakteristieke regulatie verloop minder duidelijk tot uiting.

2. De isoosmotische concentratie.

Bij de lage zoutconcentraties waarin C. crangon nog kan leven is het bloed hyperosmotisch ten opzichte van het milieu. Bij hoge saliniteiten is de interne concentratie lager. Hieronder volgt een overzicht van de isoosmotische punten zoals deze hier en bij de bepalingen van BROEKEMA en FLÜGEL gevonden werden.

<u>Isoosmotische waarden</u>				
		4 - 6 °C	15 °C	22 °C
BROEKEMA ')	(1942)	(22,5) ‰	-	(21,1) ‰
FLÜGEL	(1963)	25,5 ‰	25,2 ‰	-
hier bepaald	(1968)	26,4 ‰	22,0 ‰	21,3 ‰

) geleidbaarheidsmeting.

In alle gevallen blijkt hieruit bij hogere temperatuur een verschuiving van het isoosmotisch punt naar lagere saliniteit op te treden.

3. Het osmotisch verschil $\Delta_i - \Delta_e$.

verloop met de saliniteit

In het traject waarin de haemolympe hypertonisch is t.o.v. het milieu wordt in bijna alle gegeven curves een voorbij het isoosmotisch punt, eerst vrij snel, daarna geleidelijk minder, toenemend osmotisch verschil met het milieu gevonden bij lagere externe saliniteit.

Dit impliceert dat het dier hierbij een toenemende hoeveelheid arbeid zal moeten verrichten om dit verschil te handhaven. De hoge sterfte die bij lage saliniteit wordt gevonden (zie III E) hangt mogelijk hiermee samen.

De saliniteiten waarbij het bloed hypotonisch is t.o.v. het milieu leveren een analoog beeld. In de door BROEKEMA en FLUGEL gegeven relaties verdwijnt de toename van het verschil bij hogere saliniteiten, waarmee dan een externe verandering met een evengrote interne verandering wordt beantwoord.

Effekt van de temperatuur op de bloedconcentratie

FLUGEL vond bij lagere temperatuur over het gehele saliniteitsbereik een groter verschil tussen bloedconcentratie en concentratie van het medium. Dit betekent dat in een hypotonisch milieu een temperatuurstijging een daling van de bloedconcentratie levert, in een hypertonisch medium wordt een stijging van de bloedconcentratie gevonden bij hogere temperatuur. Dit is in tegenspraak met BROEKEMA's vondsten. Een en ander wordt geïllustreerd in Figuur 7 waarin tegen de saliniteit uitgezet zijn de verschillen tussen bloedconcentratie bij lage temperatuur en bloedconcentratie bij hogere temperatuur ($\Delta_{i \text{ lage temp}} - \Delta_{i \text{ hoge temp}}$). Een positief verschil duidt dan op een

omgekeerde correlatie tussen Δ_i en temperatuur. Een omgekeerde relatie wordt in BROEKEMA's werk voornamelijk gevonden tussen 22 en 36 ‰.

Ditzelfde vinden we hier verschoven tot saliniteiten tussen 16 en 29,5 ‰. Bezien we de resultaten bij 5 en 15 °C dan vinden we hier een negatieve correlatie tussen Δ_i en temp. van 16 tot 29,5 ‰, bij FLUGEL beneden 26,5 ‰.

In een groot traject van brakwatersaliniteiten ($\pm 16 - 29$ ‰) die in de waddenzone worden aangetroffen bestaat dus een omgekeerde correlatie tussen temperatuur en inwendige concentratie. Dit is een voorwaarde voor de hypothese van VERWEY (Zie p. 20).

4. Het osmoregulatie effect.

Het effect van de osmoregulatie kan gedefinieerd worden als het quotient $d\Delta_e / d\Delta_i$, dat is de cotangens van de hoek die de raaklijn aan de Δ_i/Δ_e curve maakt met de horizontaal. Dit quotient wordt 1 als een externe verandering wordt beantwoordt met een even grote interne verandering; het quotient neemt hogere waarden aan als een kleinere interne verandering resulteert.

Zetten we deze "mate van horizontaliteit" van de Δ_i curve uit tegen de saliniteit dan verschijnen de min of meer horizontale stukken van de Δ_i/Δ_e curven als toppen in de grafiek (Figuur 8). Bij lage temperatuur vallen saliniteit van maximale onafhankelijkheid en isoosmotisch punt nagenoeg samen. Bij hogere temperatuur verschuift dit punt verder naar lagere saliniteit als de isoosmotisch saliniteit.

Meting van de inw. osm. concentratie onder natuurlijke omstandigheden.

Om een contrôle te hebben met dieren die onder natuurlijke omstandigheden leefden en tevens om informatie te krijgen over de mogelijke samenhang van de migratieverschijnselen met de osmoregulatie zijn ongeveer om de maand Δ_i metingen op zee uitgevoerd. Onmiddellijk nadat de dieren waren gevangen werden bloedmonsters afgenomen. Tevens zijn temperatuur en zoutgehalte van het bodemwater bepaald. In onderstaande

bel zijn de resultaten weergegeven.

De metingen op zee.

datum	plaats	diepte ft.	T _{bodem} °C	Δ_e °C	Δ_i °C	aantal gevangen garnalen
19. 9.68	Voor Callantsoog:					
	ge 4600 rb 1800	10	16,6	1,44	1,49 1,51 1,52 1,50	veel
	ge 4640 rb 1835	25	17,0	1,59	1,43 1,50 1,45	matig
	Boven Texel:					
	ge 4265 rc 0530	26	16,4	1,61	1,36 1,40 1,39	massa's
22.10.68	Voor Callantsoog:					
	ge 4550 rb 1800	10	12,9	1,64	1,50 1,44 1,42 1,43 1,45	veel
	ge 4640 rb 1840	30	13,3	1,69	1,48 1,49	veel")
19.11.68	Texel,					
	Molengat 8:	15	8,2	1,70	1,42 1,41 1,39	veel
	ingang Molengat:					
	ge 4200 rc 0550	20	8,1	1,68	1,43 1,54 1,49 1,49	veel
4.12.68	De Scheer:	25	6,5	1,62	1,37 1,43 1,38 1,51 1,43 1,38 1,54 1,42 1,50 1,41	matig
	Wierbalg, zwarte drijfbal 17-15:	12	4,7	1,30	1,35 1,39 1,42 1,40 1,46 1,41 1,41 1,40	enkele")

") voornamelijk kleine dieren.

Door de grotere spreiding die-in verband met de moeilijke omstandigheden-
aan meetfouten moet worden toegeschreven laten de resultaten hier geen
conclusies toe over het temperatuureffekt op de inwendige osmotische
concentratie. Bij de vangsten kon wel de winterse migratie van de garnalen
van de kust af en uit de Waddenzee worden geconstateerd. Voor de binding
van grotere dieren aan dieper water werden uit deze beperkte gegevens
geen aanwijzingen gevonden.

De gemeten vriespuntswaarden lagen gemiddeld tussen 1,38 en 1,50 °C, een relatief geringe variatie gezien de grote spreiding in meetwaarden van op één plaats gevangen dieren.

Een strikt verband tussen voorkomen en zoutgehalte wordt niet gevonden. Bij de zoutgehalten van het water waarin de dieren voorkwamen is slechts een gering temperatuureffekt op de inwendige concentratie te vinden. Hierdoor wordt het verschil met het tengevolge van de temperatuursverandering sterk verschoven regulatieniveau groter. Het is denkbaar dat in dit verschil tussen actuele uitwendige concentratie en regulatieniveau bij die temperatuur een motief voor de seizoenstrek is gelegen.

OSMOTISCHE DRUK

Naast de osmotische concentratie heeft de temperatuur een - geringe - invloed op de osmotische druk, zoals blijkt uit de formule (Zie p. 7)

$$\pi_t = (12,0728 + 0,044202 t) \Delta$$

Rekenen we de gemeten Δ_i waarden om in osmotische druk, dan leveren deze uitgezete tegen de evenzo berekende osmotische druk van het zeewater vrijwel hetzelfde beeld als de relatie tussen Δ_i/Δ_e . De invloed van de temperatuur die zich vooral bij hoge saliniteiten doet gelden levert boven 30 ‰ een iets verdere differentiatie der bij verschillende temperaturen gemeten Δ_i waarden.

VERWEY (1956) berekende bij 28,5 en 33 ‰ S de osmotische druk van de haemolyse. Hij ging hierbij uit van door BROEKEMA door geleidbaarheidsmetingen verkregen concentratiewaarden. De saliniteiten zijn overlevingsoptima bij resp. 22 en 4 °C.

Met de hier verkregen gegevens zijn eveneens deze berekeningen uitgevoerd.

temp., Saliniteit	4 °C, 33 ‰		22 °C, 28,5 ‰	
	π_i	π_e	π_i	π_e
gegevens Broekema	19,0	22,99	17,1	21,10
hier verkregen waarden	20,3	22,99	19,8	21,10 atm.

Uit de gegevens van BROEKEMA is het verschil in osmotische druk intern - extern onder winteromstandigheden (4 °C, 33 ‰ S) en onder zomeromstandigheden (22 °C, 28,5 ‰ S) vrijwel gelijk, nml resp.

3,99 en 4,00 atm. VERWEY geeft hiervoor de volgende verklaring: in de zomer daalt in het dier de concentratie dermate dat ook de toename van de osmotische druk door de hogere temperatuur teniet wordt gedaan. Bij migratie naar zoeter water treft het dier die osmotische druk die bij deze temperatuur hetzelfde verschil in osmotische waarde geeft.

In de hier verkregen gegevens is het verschil tussen osmotische druk binnen en buiten niet gelijk. In het saliniteitsbereik waarin de garnalen aan de Noordzee kust zijn aan te treffen ($1.5 < \Delta_e < 1.8$) is het temperatuureffekt slechts zeer gering, waarbij de inwendige concentratie bij temperatuurtoename stijgt. Hier vindt de door VERWEY gegeven verklaringsmogelijkheid geen steun. Eeder suggereert de gekombineerde veranderingen van temperatuur en saliniteit een regulatie van de interne osmotische druk.

Door het wegvallen van de aanwijzingen dat een dier een konstant verschil in osm. druk met zijn omgeving tracht te behouden verdient een eenvoudiger verklaring de voorkeur. Deze verklaring zou kunnen zijn dat voor een dier het saliniteitsgebied waarin zijn bloedconcentratie het minst varieert bij zoutgehalteveranderingen in het medium het gunstigst is. Het valt hierbij dan niet uit te maken of het temperatuureffekt op het regulatieniveau het dier noodzaakt naar

minder zout water te migreren bij temperatuurstijging of omgekeerd het temperatuureffekt een osmotische aanpassing is voor een om andere redenen noodzakelijke migratie.

D. Reversibiliteit van het temperatuureffekt op de inw. concentratie.

Om na te gaan of de temperatuur een reversibele invloed had op de inwendige osmotische concentratie is een proef opgezet, waarbij in de temperatuur in stappen werd veranderd. In de loop van 30 dagen doorliepen twee aquaria perioden met temperaturen van 15, 5, 15, 21, en 15 °C. Als zoutconcentraties van het water werd gekozen ca 10, en 20 ‰. Bij deze twee zoutgehalten was het temperatuureffekt relatief groot en tegengesteld in richting: bij 10 ‰ was, een positieve correlatie met temperatuursveranderingen te verwachten, bij 20 ‰ zou een omgekeerd verband met de temperatuur moeten bestaan. Voor de proef werden alle proefdieren geakklimatiseerd aan een milieu van 15 ‰ S bij 15 °C.

Figuur 9 toont het verloop van de inwendige concentratie tegen de tijd. De osmotische concentratie van het bloed van de dieren die bij 10,7

‰ S verblijven vertoont aanvankelijk wel enige positieve correlatie met de temperatuurdaling. Een significante respons is bij de grote spreiding van de meetwaarden niet te verwachten.

Bij 20, 2 ‰ wordt een duidelijk negatieve correlatie met de temperatuurwisseling gevonden. Op dag 14 verschilden de meetwaarden sterk, doch er was geen gelegenheid om verdere waarnemingen te doen. Op de 17^e dag spreiden de gevonden waarden aanzienlijk, de metingen werden voortgezet tot 3 x dezelfde waarde werd gevonden. Het verschil tussen de meetwaarden bij de hoogste en de laagste temperatuur is significant, zodat de omkeerbaarheid van het temperatuureffekt op de interne osm. concentratie althans bij deze saliniteit zeer waarschijnlijk is.

E. Sterfte bij verschillende temperaturen en zoutgehaltes.

Bij de in III C beschreven experimenten verbleven de dieren geruime tijd in aquaria met verschillende zoutgehaltes bij temperaturen van 5, 15 en 22 °C. Onder deze omstandigheden zijn nu tevens waarnemingen verzameld over de sterfte.

In figuur 10 is het cumulatieve sterftepercentage uitgezet tegen de tijd. Gedurende de eerste dagen treedt de grootste sterfte op. Bij 4 - 6 °C en 15 °C komt na verloop van tijd minder sterfte voor en blijft daarmee het cumulatieve sterftepercentage nagenoeg constant. Ook bij 22 °C worden na enige dagen een daling van de sterfte gevonden. Na de grote initiële sterfte blijft het cumulatieve sterfte cijfer echter stijgen.

Het ligt voor de hand de grote sterfte in het begin toe te schrijven aan adaptatiemoeilijkheden. Een deel zal ook voor rekening moeten komen voor tijdens het transport en bij het inzetten in de aquaria opgelopen schade.

Het blijven toenemen van het cumulatief sterftecijfer bij 22 °C duidt erop dat hier een andere sterftefactor een belangrijke rol speelt waartegen de dieren ook na adaptatie zich niet kunnen verdedigen.

Het vermoeden bestaat dat hier schimmel- en bacterieziekten de oorzaak zijn. Een proefopzet waarbij een antibioticum aan het water toegevoegd is zou uitsluitsel kunnen geven. Het nadeel hierbij is echter dat daarmee ook de essentiële werking van het bodemfilter teniet wordt gedaan. Een ophoping van schadelijke afvalprodukten kan een nieuwe sterftefactor introduceren. Een andere oplossing kan zijn een voortdurende verversing met water dat gesterilliseerd is door U.V. licht of een antibioticum.

Voorts blijkt bij 22 °C een toenemende sterfte bij saliniteiten hoger dan 15 ‰. Dit lijkt in overeenstemming met BROEKEMA's conclusie

dat bij hoge temperatuur de hoge saliniteiten schadelijk zijn voor C. crangon. Helaas zijn geen gegevens verkregen over de sterfte bij lager saliniteit voor deze temperatuur.

Bij lagere temperaturen blijken de dieren in een breed saliniteitsbereik betrekkelijk onverschillig voor het zoutgehalte. Slechts bij zeer lage zoutconcentraties ($< 10 \text{ ‰}$) treedt grote sterfte op, voornamelijk korte tijd na het inzetten.

De verschillende optima die BROEKEMA bij deze temperaturen vindt ($28,5 \text{ ‰ S}$ bij 22 °C en 33 ‰ S bij 4 °C) komen hier zeker niet naar voren. Wel komt in grote lijnen het verschijnsel van een grotere tolerantie voor lage zoutconcentraties bij hogere temperaturen tot uiting. Tot 15 ‰ S is de sterfte bij 15 °C lager dan bij 5 °C , bij 40 ‰ S juist omgekeerd. In het gebied van $15 - 30 \text{ ‰ S}$ is de sterfte bij deze temperaturen nagenoeg gelijk.

De temperatuursinvloed op de sterfte levert geen argument voor de migratie zoals deze in Noord-en Waddenzee wordt gevonden, daar de trek geheel in het saliniteitsbereik verloopt waarin geen samenhang tussen sterfte en zoutconcentratie wordt gevonden.

Voorts zal als deze sterfte dan nog toegeschreven moet worden aan adaptatiemoeilijkheden gedurende de plotselinge overgang naar een andere saliniteit, deze in de natuur, waar de overgang met name in de Noordzee slechts zeer geleidelijk plaats vindt, geen belangrijke rol spelen. De mogelijke verschillen in geschiktheid van een bepaald zoutgehalte bij een bepaalde temperatuur zal hier een nog geringer absoluut verschil in sterfte opleveren. Sterfte is echter een grove maat en daarom weinig geschikt om een subtiele drijfveer voor migratie mee te meten.

P. Bepalingen van het watergehalte van C. crangon.

Om na te gaan of de verschillen in inwendige concentratie die bij de

garnalen gevonden zijn corresponderen met watertransport of uitsluitend tot stand kwamen door opname en afgifte van zouten leek het nuttig te proberen hiervan een idee te krijgen aan de hand van het watergehalte van de dieren.

Voor de bepalingen zijn dezelfde dieren gebruikt als voor de in III C beschreven proeven, zodat de watergehalten direkt in verband konden worden gebracht met de interne osmotische concentratie bepalingen.

De hierbij gevolgde methode is beschreven in sectie 3. In de te meten waarden is ten gevolge van de niet te vermijden onnauwkeurigheid die aan de bepaling kleeft, voornamelijk in de bepaling van het natgewicht, en door individuele verschillen een grote spreiding te verwachten. Zijn de verschillen bij meting van een groot aantal dieren niet significant, dan kan worden aangenomen dat watertransport geen belangrijke rol speelt. Zijn de verschillen echter wel significant, dan werpt dit de vraag op of de verschillen in osmotische concentratie door watertransport of wel door een combinatie van water en zouttransport tot stand komen.

Resultaten

verband met de grootte van de proefdieren

In de proeven is met dieren van verschillende grootte gewerkt. Het blijkt dat er geen correlatie bestaat tussen deze twee zodat de gegevens van dieren van verschillende grootte bij elkaar genomen mogen worden.

verband met de temperatuur

Uit de cumulatieve frequentieverdeling van de gemeten watergehalten blijkt het gemiddelde watergehalte van de garnalen 73,7 % te zijn, met een standaardafwijking van 3,25. Wordt deze verdeling onderscheiden naar de verschillende temperaturen dan blijken hiertussen geen significante verschillen te bestaan. Dit suggereert dat de variatie in Δ_1 geïnduceert door de temperatuur geen invloed heeft op het watergehalte en dus alleen

op zouttransport berust. Een conclusie is echter gevaarlijk daar per temperatuur te weinig gegevens beschikbaar zijn om kleine verschillen significant te doen blijken.

verband met de saliniteit

Voor het nagaan van de invloed van de adaptatie aan verschillende zoutgehaltes op het watergehalte zijn zowel alle gegevens van dieren van verschillende grootte als van dieren die bij verschillende temperaturen aan een saliniteit zijn geakklimatiseerd samengenomen. Dit levert de waarden die weergegeven zijn in figuur 11.

Bij toenemend zoutgehalte van het zeewater waarin de dieren minstens 6 dagen verbleven wordt een lager watergehalte gevonden. Dit is in tegenspraak met BROEKEMA, die 1. geen verschillen in watergehalte vindt bij dieren die zijn aangepast aan verschillende salinititeiten; 2. bij het nemen van bloedmonsters de indruk kreeg dat dieren die aan lager saliniteit waren geadapteerd een geringere hoeveelheid bloed bevatten.

Dit laatste is echter te begrijpen uit mijn waarneming, dat deze dieren wat visceuzer bloed hebben. Bij het nemen van bloedmonsters van dieren uit lage salinititeiten plakken na verdunning meer eiwitdeeltjes aan de wand van het glascappillair zodat de pipet vaker gespoeld moet worden.

De gemiddelde watergehalten bij dieren uit 10 ‰ en 40 ‰ zijn significant verschillend. (toets van Student met correctie van Bessel. $P < 0,01$).

relatie tussen watergehalte en inwendige osmotische concentratie

Een volgende stap was na te gaan of de gevonden variatie in watergehalte de concentratieverschillen in een garnaal zou kunnen verklaren.

Er zijn hiertoe een tweetal berekeningen uitgevoerd:

1. berekend is de variatie in de inwendige concentratie als slechts

watertransport op zou treden.

2. de variatie in watergehalte als slechts zouttransport verantwoordelijk zou zijn voor de interne concentratieverschillen.

De in een dier voorkomende molekulen zijn te verdelen in drie groepen:

1. watermolekulen in de haemolymphe (N molen)
2. molekulen die opgelost voorkomen in de haemolymphe (n molen)
3. andere molekulen

Van de garnalen is het watergehalte (W) en de vriespuntsdaling van het bloed (Δ_i) bepaald.

Het watergehalte kunnen we nu schrijven als:

$$W = \frac{\text{gewicht van de watermolekulen}}{\text{totaalgewicht}} \times 100 \%$$

$$= \frac{100 \cdot N \cdot M_{H_2O}}{N \cdot M_{H_2O} + n \cdot a + b}$$

Hierin is M_{H_2O} : molekuulgewicht van water

a : konstante, gewogen gemiddelde van de molekuulgewichten van de in de haemolymphe opgeloste stoffen

b : gewicht van de andere molekulen

Voor de vriespuntsdaling geldt:

$$(\text{zie II}) \quad \Delta_i = \frac{RT_o^2}{Q N} n = C \frac{n}{N}$$

Uit de gemeten watergehalten blijkt een (geringe) stijging bij lage externe concentraties, welke gepaard gaat met een daling van de inwendige osmotische concentratie. De mogelijkheid bestaat dat deze althans gedeeltelijk uit elkaar verklaard kunnen worden. Bij akklimatie van de

garnalen aan de verschillende saliniteiten kan de gevonden variatie in watergehalte en inwendige concentratie op drie manieren tot stand komen:

1. geen netto zouttransport, slechts transport van water bij de adaptatie bij andere saliniteiten, 2. geen netto watertransport,
3. zowel water als zouttransport.

1^e hypothese: geen netto zouttransport bij adaptatie aan verschillende externe saliniteiten. ($n = \text{konstant}$)

Een daling van de interne concentratie komt hierbij voort uit hydratatie die gevonden wordt in het hogere watergehalte van dieren bij lage saliniteit.

$$W = \frac{100 \cdot N \cdot M_{H_2O}}{N \cdot M_{H_2O} + n \cdot a + b} \quad \Delta_i = C \cdot n / N$$

vereenvoudig de konstanten: $1/M_{H_2O}(n \cdot a + b) = d$
 $C \cdot n = f$

dit geeft:

$$W = \frac{100 N}{N + d} \quad \Delta_i = f / N$$

$$N = \frac{W d}{100 - W}$$

Substitutie van N geeft:

$$\Delta_i = \frac{f/d (100 - W)}{W}$$

Gaan we uit van een dier dat bij 30 ‰ heeft verbleven; hierbij wordt een gemiddeld watergehalte gevonden van 73,54 % en een gemiddeld vriespuntsdaling van het bloed van 1,52 °C. Dit ingevuld in de formule

levert een waarde voor de konstante f/d . Met het hier verkregen verband kan nu de variatie in watergehalte worden berekend die nodig is om de gemeten interne concentratieveranderingen te veroorzaken.

<u>S</u>	<u>W_{gemeten}</u>	<u>—_{igemeten}</u>	<u>bij gemeten Δ_i berekende W</u>	<u>bij gemeten W berekende Δ_i</u>
5	76,17	0,87	82,92	1,32
10	75,97	1,02	80,55	1,34
15	74,03	1,21	77,74	1,48
20	74,64	1,25	77,17	1,44
25	73,58	1,31	76,33	1,52
30	73,54	1,52	73,54	1,52
40 ‰	73,45 ‰	1,99 °C	67,98 ‰	1,53 °C

De gemeten verandering van het watergehalte blijkt hieruit niet voldoende om de veranderingen in de osmotische concentratie te verklaren.

2^o hypothese: geen netto watertransport.

Als we veronderstellen dat geen netto watertransport optreedt, slechts transport van zout bij adaptatie aan een andere externe concentratie, kan ook een verloop in het watergehalte worden verwacht, zij het van veel geringere omvang.

In de hierboven gegeven relaties nemen we nu N, het aantal molen water in het dier, konstant.

$$W = \frac{100 \cdot N \cdot M_{H_2O}}{N \cdot M_{H_2O} + n \cdot a + b}$$

$$= \frac{100}{n \cdot a / N \cdot M_{H_2O} + b / N \cdot M_{H_2O} + 1} \quad \left. \vphantom{\frac{100}{n \cdot a / N \cdot M_{H_2O} + b / N \cdot M_{H_2O} + 1}} \right\} W = \frac{100}{a \Delta_i / c \cdot M_{H_2O} + b / N \cdot M_{H_2O} + 1}$$

$$\Delta_i = c \cdot n / N \quad n = \frac{\Delta_i \cdot N}{c}$$

Dit is een vergelijking van de vorm $y = 1 / (ax + b)$, een hyperbool waarvan de ligging bepaald wordt door de waarde van de twee parameters a en b . Gaan we voor de berekening van deze konstanten ook hier weer uit van een dier dat bij 30 ‰ S is geakklimatiseerd en waarbij dan een watergehalte van 73,54 % wordt gemeten en een vriespuntsdaling van 1,52 °C. Deze waarden moeten dan aan de vergelijking voldoen:

$$73,54 = \frac{100}{1,52 \cdot a / c M_{H_2O} + b / N M_{H_2O} + 1}$$

In deze vergelijking komen nog een aantal onbekenden voor waarvan aan enkele een precieze waarde kan worden toegekend, andere zijn te schatten.

(M_{H_2O} = molekuulgewicht van water, 18.00)

N = aantal molen water in een dier. Uit de relatie blijkt dat de ligging van de grafiek afhankelijk is van de verhouding tussen drooggewicht en watergewicht van een dier. Kiezen we om hier een schatting van te maken een middelmatig groot dier uit de waarnemingen:

$\Delta_i = 1,53$ °C $W = 73,3$ % natengewicht 1366,5 mg drooggewicht 364,5 mg.

Het gewicht van het water ($N M_{H_2O}$) heeft voor dit dier dus de waarde 1002,0 mg.

b = het drooggewicht van het dier minus het gewicht van de in oplossing voorkomende stoffen.

De schatting van het gewicht van de oploste stoffen vormt in dit geheel een onzekere faktor, die echter van geringe betekenis is. Nemen we daarom grofweg aan dat in 1002,0 mg water met een vriespuntsdaling van 1,52 °C slechts NaCl voorkomt, dan is een schatting van het gewicht hiervan mogelijk:

1 mol NaCl/1. Δ_i 3,38 °C v.p.v. (Zie Wolf, 1966)

1,52 °C v.p.v. Δ_i 0,45 mol NaCl Δ_i 26,3 mg.

Vullen we de numerieke waarden in de formule dan kan hieruit de konstante $a/c \cdot M_{H_2O}$ verkregen worden.

De relatie tussen W en Δ_i volgens de 2^e hypothese wordt dan:

$$W = \frac{100}{0,01469 \Delta_i + 1,3375}$$

Bij de gevonden variatie in Δ_i wordt nu de geschatte variatie in het watergehalte berekend welke zou resulteren als geen netto transport van water optreedt, maar de verandering van de inwendige concentratie slechts door zouttransport tot stand kwam:

<u>S</u>	<u>Δ_i gemeten</u>	<u>$\bar{W}$ gemeten</u>	<u>W berekend</u>
5	0,87	76,17	74,06
10	1,02	75,77	73,94
15	1,21	74,03	73,78
20	1,25	74,64	73,75
25	1,31	73,58	73,71
30	1,52	73,54	73,54
40 ‰	1,99 °C	73,45 ‰	73,17 ‰

De volgens de twee hypothesen berekende relatie tussen Δ_i en W zijn, met de gemeten waarden van Δ_i en W, uitgezet in figuur 12.

Wanneer de schatting van het gewicht van de opgeloste stof, in de berekening volgens de 2^e hypothese - geen netto watertransport - te

laag ligt, betekent dit dat de in de grafiek weergegeven hyperbool een minder steil verloop heeft. Hierbij dient vermeld te worden dat enige variatie in deze schatting slechts een geringe invloed op de vorm van de hyperbool heeft.

Bij vergelijking van de waarnemingen met de beide hypothetische relaties tussen vriespuntsdaling en watergehalte krijgt men de indruk met een samenspel van twee processen te doen te hebben. Bij hoge externe saliniteiten volgens de waarnemingen de curve die berekend werd met de veronderstelling dat geen netto watertransport optreedt. (25;30 en 40 ‰ S). Dit wil zeggen dat het dier ondanks de dehydraterende werking van het hypertonische water de in het lichaam aanwezige hoeveelheid water kan vasthouden. Weliswaar kan de toename van het zoutgehalte niet worden tegengegaan bij hoge saliniteit.

Bij lagere externe concentraties verliest het dier zout, maar kan dit na een zekere hoeveelheid beperken. De waargenomen veranderingen in het watergehalte volgen het verloop van de lijn die te verwachten was als een bij 30 ‰ aangepast dier geen zout zou verliezen bij overgang lagere saliniteiten. Terwijl dus het verlies aan zout bij lage saliniteiten in zekere mate beperkt kan worden neemt de hoeveelheid water in het lichaam wel toe (5, 10, 15, 20 en 25 ‰).

zoutgehalte zeewater:

	laag (hypotonisch)	hoog (hypertonisch)
watertransport	opname	beperkte afgifte
zouttransport	beperkte afgifte	opname

Een aanname van twee afzonderlijke mechanismen vindt zijn grond in het niet met dezelfde kromming verlopende verband tussen de waargenomen

watergehalten en vriespuntsdalingen en de theoretisch berekende hyperbolen. De werking van beide mechanismen, één welke het waterverlies kan beperken bij hoge externe saliniteiten en één welke het zoutverlies van het dier kan beperken in lage externe concentraties, staat dus niet in een vaste verhouding tot elkaar, maar kan ten opzichte van elkaar in effectiviteit variëren.

5. Discussie

1. de relatie tussen interne en externe concentratie.

vergelijking van de hier verkregen resultaten met de waarnemingen van BROEKEMA en FLUGEL.

De in de inleiding geschetste tegenstrijdigheid in de door BROEKEMA en FLUGEL beschreven relaties tussen interne osmotische concentratie en externe zoutgehalte kon in dit onderzoek geen oplossing vinden in een volledige bevestiging van één van de gevonden relaties van het verband tussen Δ_i en Δ_e met de temperatuur. De invloed van temperatuursverandering op Δ_i toont wel overeenstemming met de resultaten van BROEKEMA, doch het saliniteitstraject waarin een negatieve correlatie tussen Δ_i en t wordt gevonden ligt bij enigszins lagere waarden voor het zoutgehalte. De verschillen met FLUGEL's uitkomsten zijn groter, vooral in de extreme saliniteitsgebieden. Het veel bredere traject van osmoregulatie dat deze auteur beschrijft suggereert dat een verschil in materiaal van de door hem gebruikte dieren in het spel is.

het regulatie verloop

De relatie tussen Δ_i en Δ_e vertoont het karakteristieke beeld van een regulatiekromme, met deze bijzonderheid dat buiten het regelbereik niet direkt een gelijk oplopen van interne en externe veranderingen, maar over een groot gebied externe veranderingen nog in geringere interne veranderingen resulteren.

In het temperatuursgebied van 4 tot 22 °C ligt het isoosmotisch punt in het saliniteitstraject waarin C. crangon een externe verandering

het een geringe interne verandering beantwoordt. Het nabij het isoosmotisch punt maximaal zijn van de osmotische efficiëntie heeft mogelijk een energetische gevolg. Verder van het isoosmotisch punt moet het regulatiesysteem meer energie leveren, waarmee het vermogen om een extra hoeveelheid energie te leveren voor de compensatie van sterkere externe veranderingen afneemt.

Het bij hoge temperatuur asymmetrisch liggen van het isoosmotisch punt in het regeltraject kan voor het dier van betekenis zijn. Door een niet strikte koppeling tussen isoosmotisch punt en punt van maximaal osmotische onafhankelijkheid kan het dier bij deze temperatuur bij lagere externe saliniteiten de inwendige concentratie nog reguleren. Een behoefte die ook tot uiting komt in de verschuiving van het regulatieniveau naar lagere saliniteiten bij toenemende temperatuur.

2. osmoregulatie in verband met sterfte en migratie

Zowel de hier verkregen gegevens als de door BROEKEMA gevonden resultaten van overlevingsproeven bij verschillende temperaturen en zoutgehalten suggereren een verband tussen het niveau van osmoregulatie en overlevingskansen. Bij toename van de temperatuur verschuift zowel de saliniteit van optimale overleving alsook het saliniteitstraject waarbij de inwendige concentratie de minste invloed ondergaat van veranderingen van het omringende zeewater naar lagere zoutgehalten. In de Noordzee hebben de garnalen slechts een beperkte zoutkeus. Zowel 's zomers als in de winter zijn de zoutgehalten hier hoger dan de saliniteitswaarden waarbij C. crangon een maximale osmotische onafhankelijkheid manifesteerd. De migratie in het voorjaar naar het wat zoetere water van de kust komt in richting overeen met de verschuiving van de saliniteit waarbij een maximaal osmoregulatie effect wordt gevonden. In het begin van de winter, als de saliniteit zou samenvallen met de saliniteit van maximale onafhankelijkheid verlaten de dieren

echter dit gebied.

Een grotere overeenstemming tussen de zoutgehalten waarbij het dier voorkomt en waarbij een minimaal effect van externe veranderingen in de bloedconcentratie optreedt is elders - in de waddenzee - ondertussen wel mogelijk.

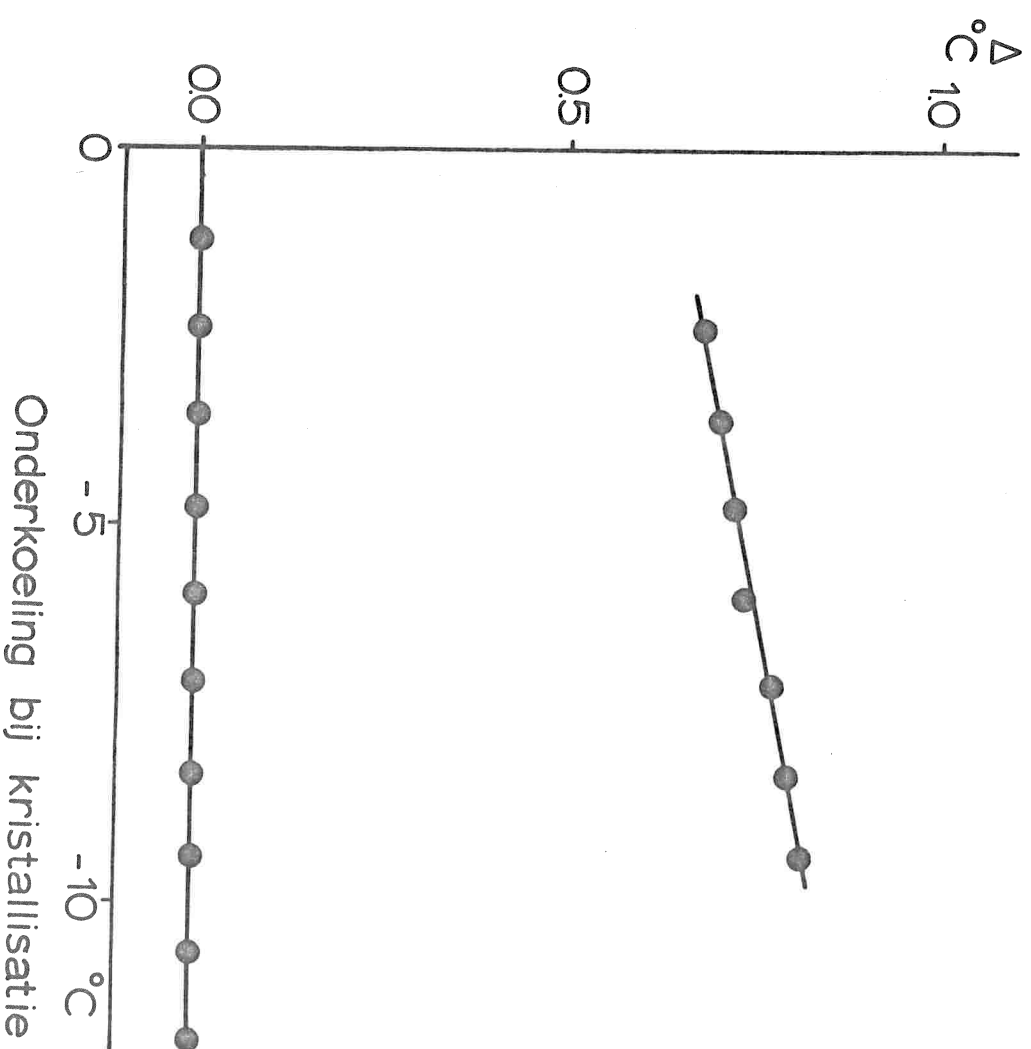
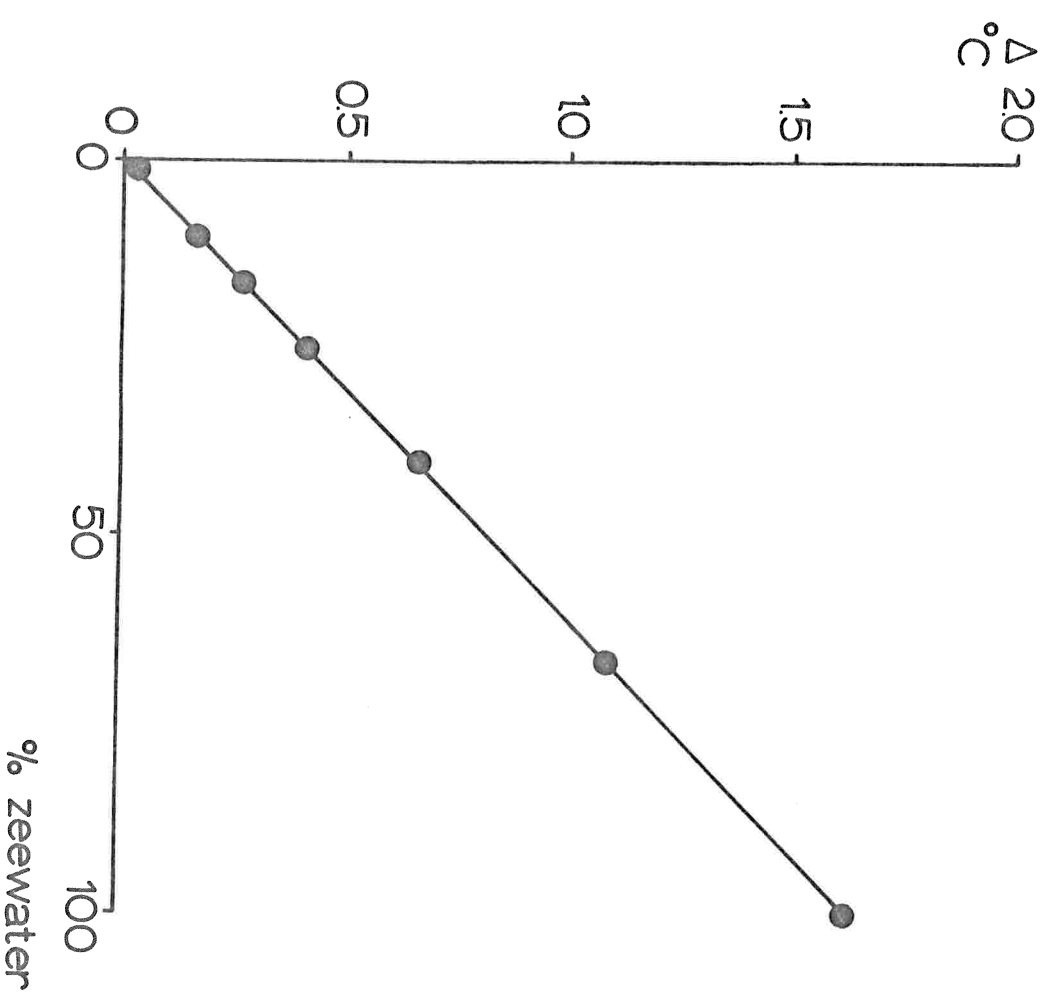
Tierwelt Deutschland vermeldt het voorkomen van garnalen in de mond van de Elbe bij 1 ‰ zoutgehalte. Dit voorkomen van C. crangon bij zeer lage en bij hoge saliniteiten, tezamen met een geringe differentiatie in sterfte over een breed saliniteitsgebied, wijst op een geringe zoutpreferentie. Keuzeproeven die hierover meer opheldering zouden geven bleken voorlopig niet uitvoerbaar.

Migratie vereist een aktiverende en een richtende prikkel. Het lijkt aannemelijk dat het temperatuureffect op de inwendige concentratie van het bloed van garnalen hierin een rol speelt. Uit bovenstaande gegevens is echter reeds te concluderen dat het effect hiervan niet altijd zo groot is dat een strikte binding tussen optimale saliniteit en zoutgehalte waarbij een maximaal regulatieeffect optreedt bestaat. Hierdoor is het dier in staat in een groter gebied optimale levensomstandigheden te kiezen.

Literatuur.

- BROEKEMA, M.M.H., 1941. Seasonal movements and the osmotic behaviour of the shrimp Crangon crangon L. - Archs néerl. Zool. 6 : 1-100.
- FLUGEL, H., 1963. Elektrolyregulation und temperatur bei Crangon crangon L. und Carcinus maenas L. - Kiel. Meeresf. 19 (2): 189-195.
- GLASSTONE, S. and D. LEWIS, 1965. Elements of physical chemistry. Macmillan & Co. London.
- HAVINGA, B., 1929. Krebse und Weichtiere. Handbuch der Seefischerei Nordeuropas. 3 (2): 1-76.
- MIYAKE, Y., 1939. Chemical studies of the western pacific ocean. III. Freezing point, Osmotic pressure, boiling point and vapour pressure of sea water. Bull. Chem. Soc. Japan, 14: 58-62.
- POTTS, W.T.W. and G. PARRY, 1964. Osmotic and Ionic regulation in animals. Pergamon Press. London.
- VERWEY, J., 1957. A plea for the study of temperature influence on osmotic regulation. Ann. Biol. 33: 129-149.
- WOLF, A.V., 1966. Aquaeous solutions and body fluids, their concentrative properties and conversion tables. Harper & Row. New York, London.

Fig. 2 De vriespuntsdeling van een oplossing van 12,687 g (400 mosmol) NaCl/l en het vriespunt van aqua dest. na bij verschillende temperaturen opgewek kristallisatie.



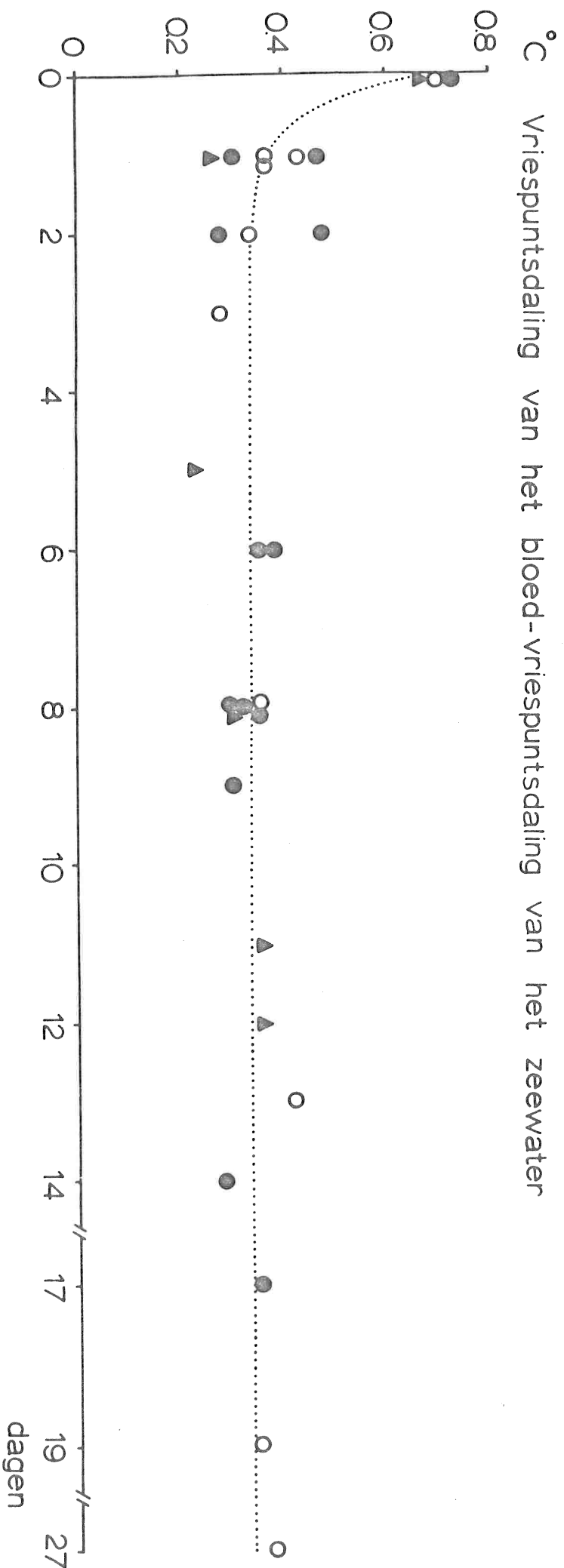
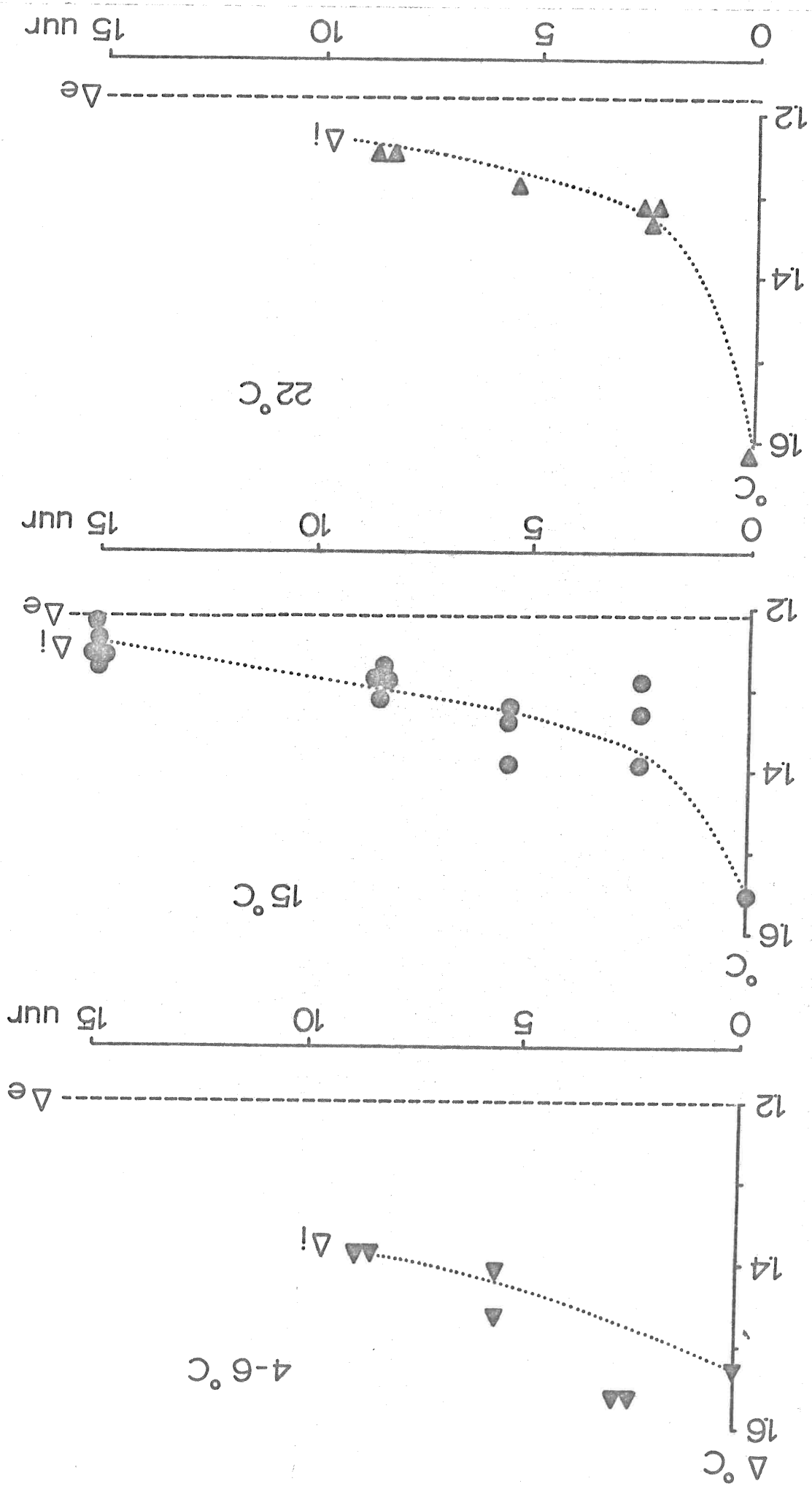


Fig. 3 Veranderingen in de osmotische concentratie van het bloed van C. crangon na het overbrengen van dieren uit 30 °/oo S naar zeewater van 15 °/oo S. Om het in de loop van 27 dagen optredend verloop in zoutgehalte van het medium te verrekennen is op de ordinaat het verschil tussen vriespuntsdaling van het bloed en het medium uitgezet. 0 0 4-6 °C ● 15 °C ▲ 21 °C

Fig. 4 Daling van de osmotische concentratie van het bloed na het overbrengen van C. crangon van 50‰ naar ± 15‰ S voor 3 verschillende temperaturen



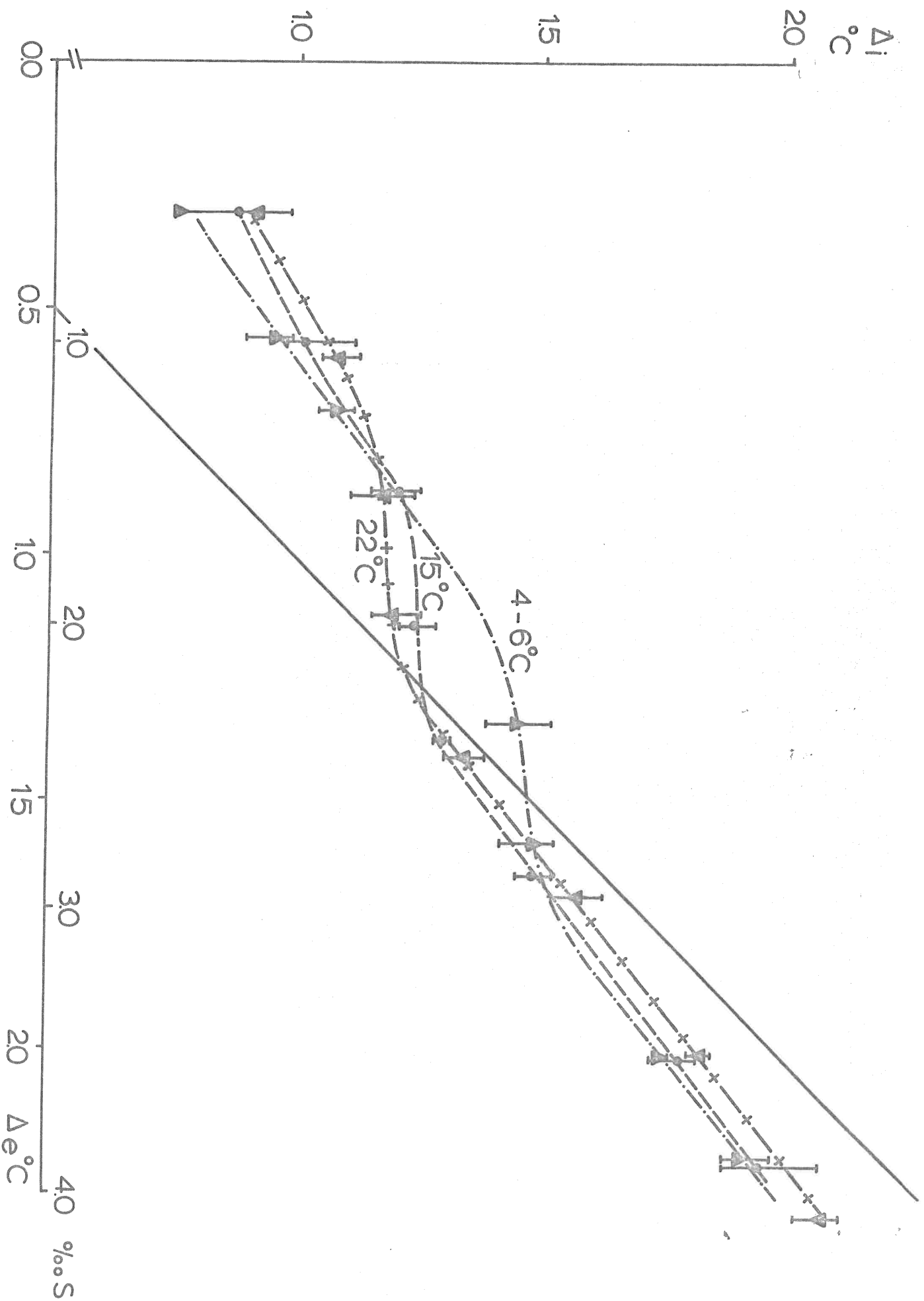


Fig. 5 De osmotische concentratie van het bloed van *A. muscivora* bij verschillende temperaturen

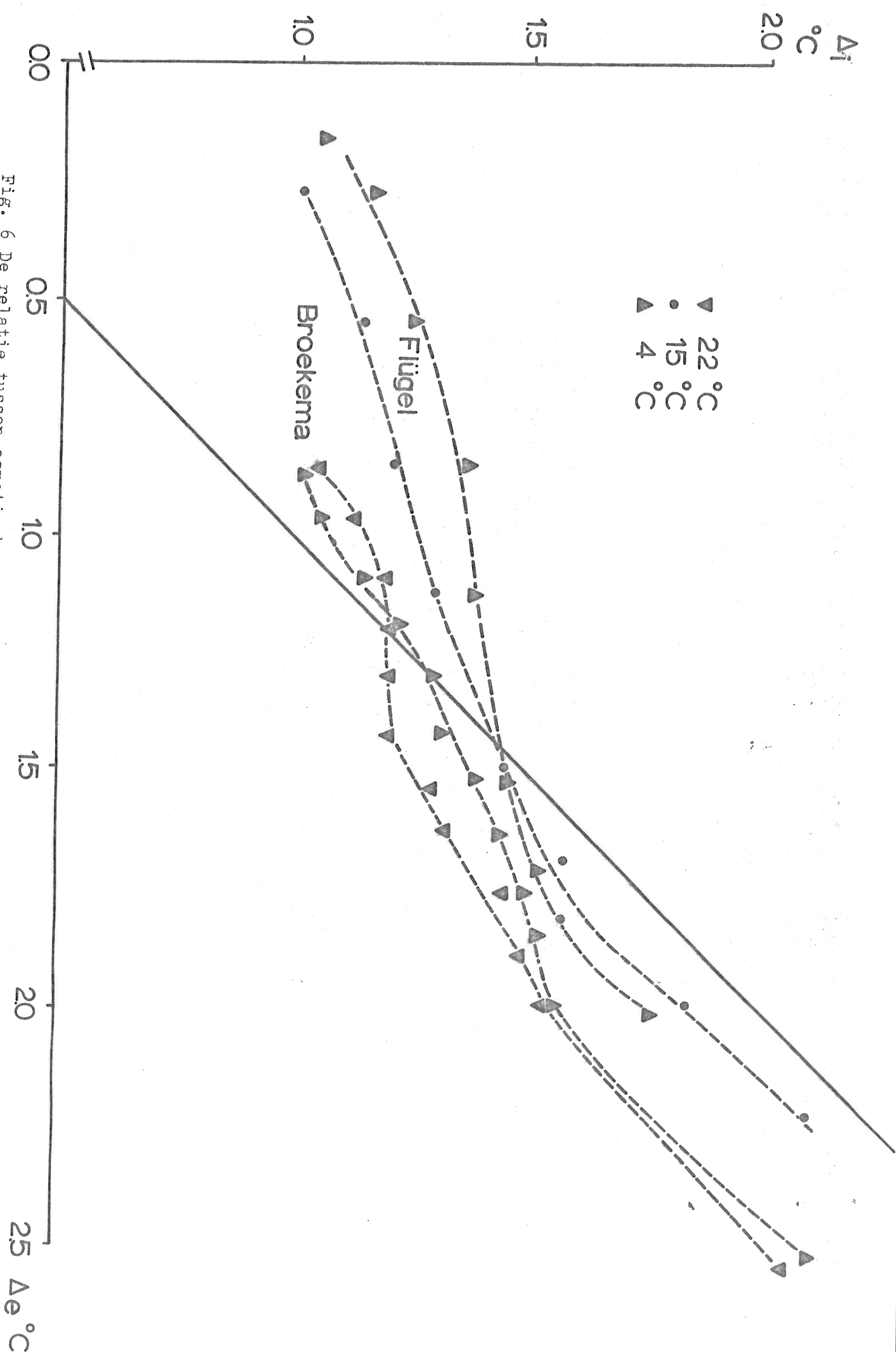


Fig. 6 De relatie tussen osmotische concentratie van het bloed van *C. crangon* en saliniteit van het medium zoals door Flügel en Broekema

Δ_i - Δ_i
lage temp. hoge temp.

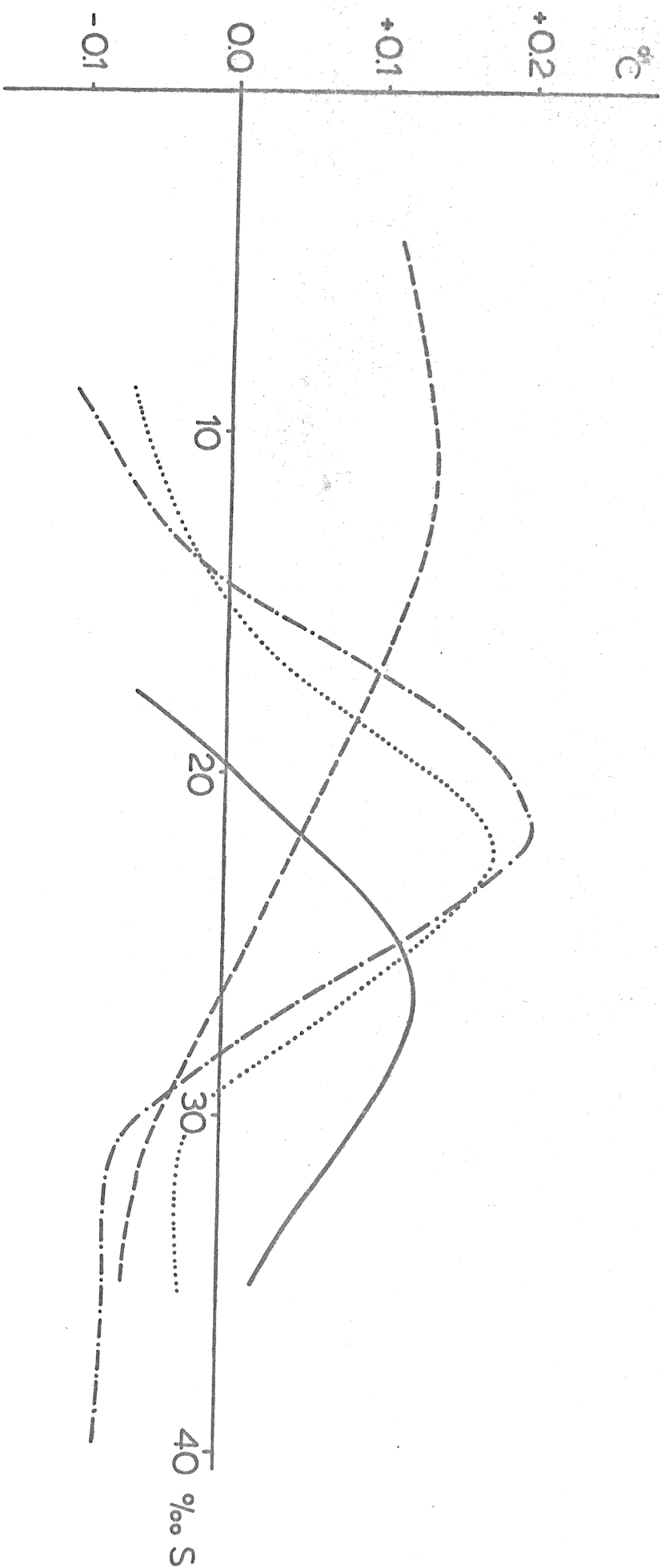


Fig. 7 Crangon crangon. Verschil tussen bloedconcentraties bij lage en hoge temperatuur afhankelijk van de saliniteit van het medium.

RPDUTVMA / 1 00 80

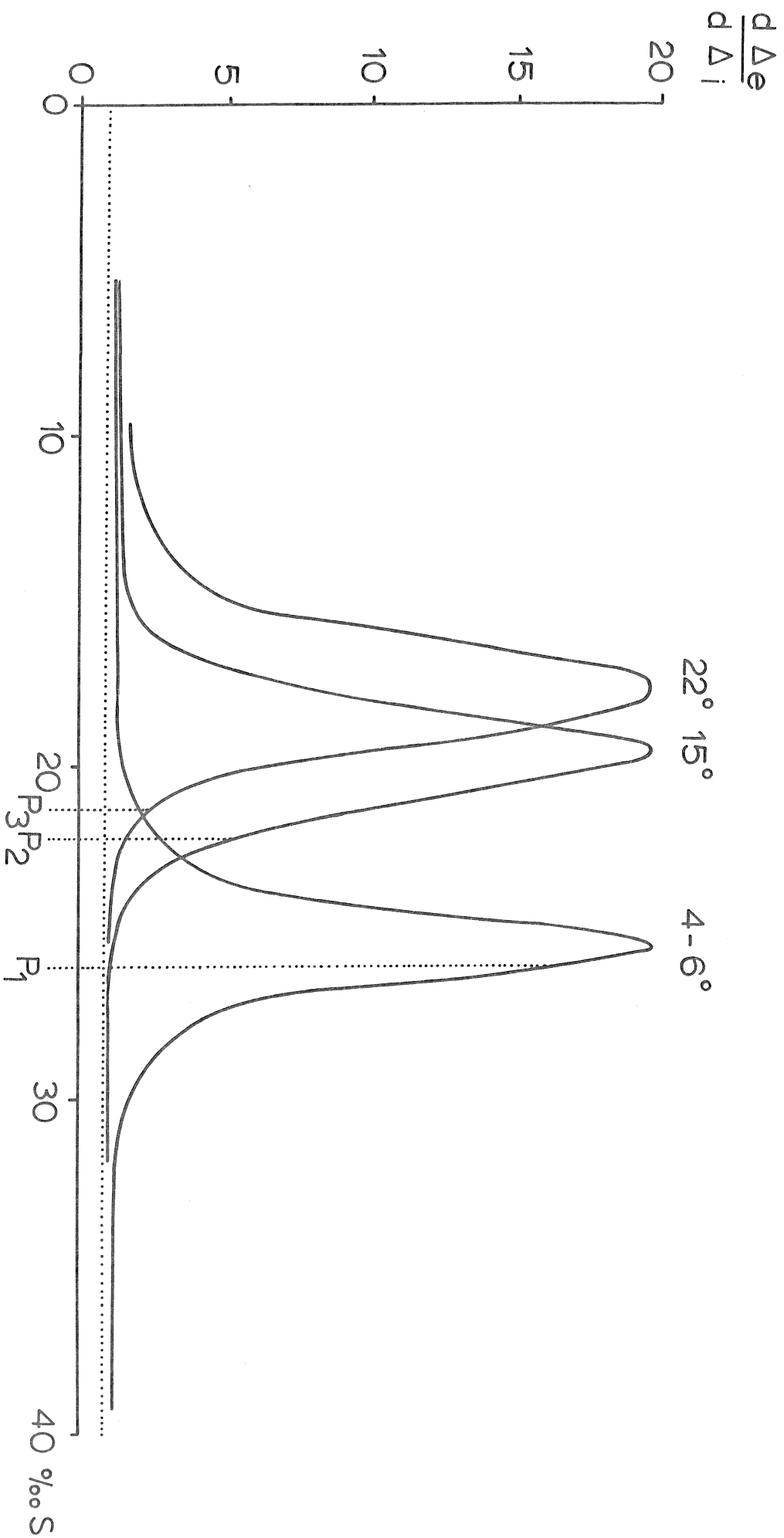
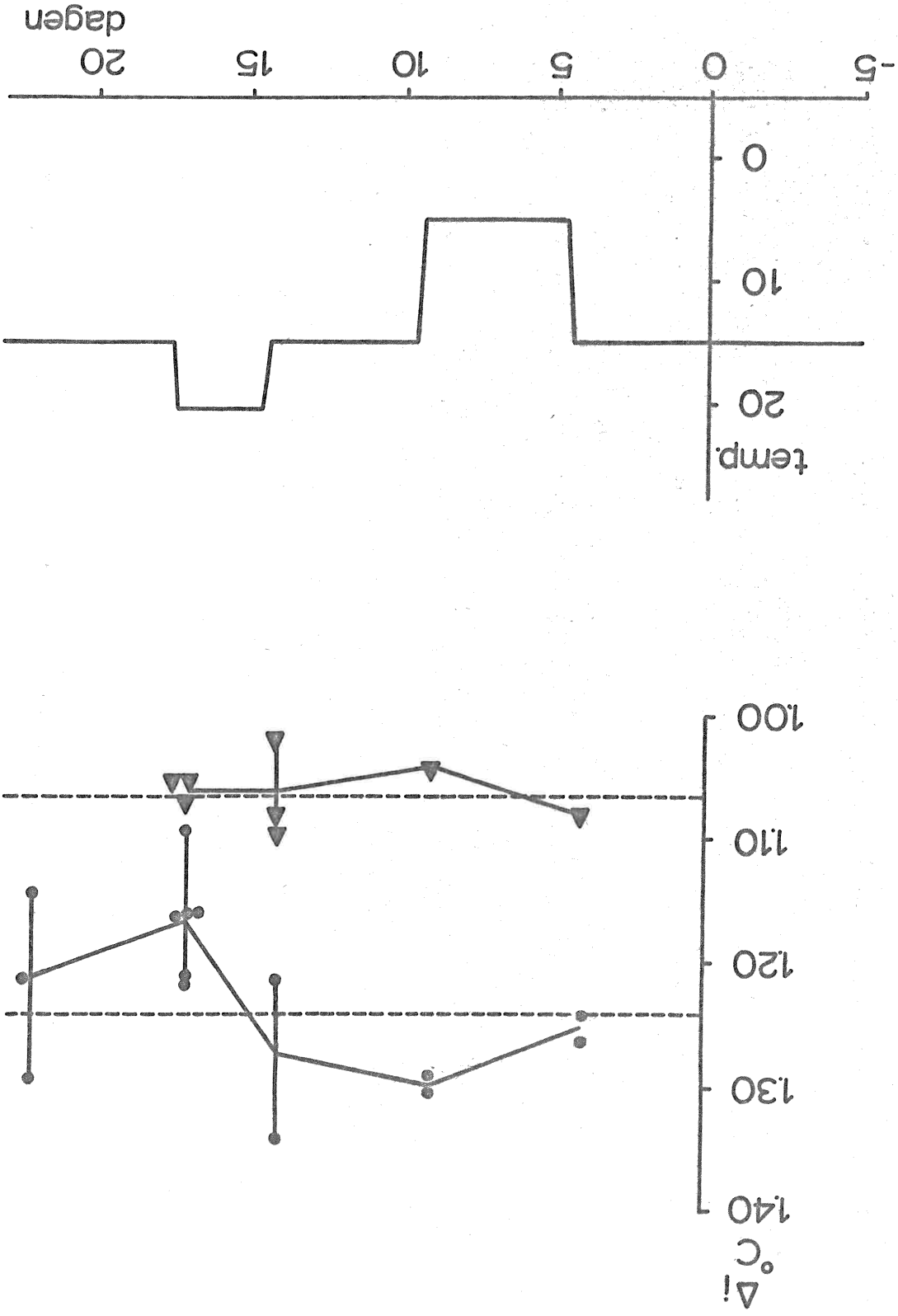


Fig. 8 Konstanzheid van de bloedconcentratie van *C. crangon* bij geringe concentratieveranderingen van het medium. Tegen het zoutgehalte van het medium is uitgezet de kotangens van de raaklijn aan de curve die het verband weergeeft tussen inwendige osmotische concentratie en saliniteit van het medium. P_1 , P_2 en P_3 isotonisch punt bij resp. 4-6, 15 en 22 °C.

Fig. 9 Effect van temperatuurswisseling op de inwendige osmotische concentratie van *C. crangon*. Zoutgehalte van het zeewater (▲) 10,7 en (●) 20,2 ‰ S.



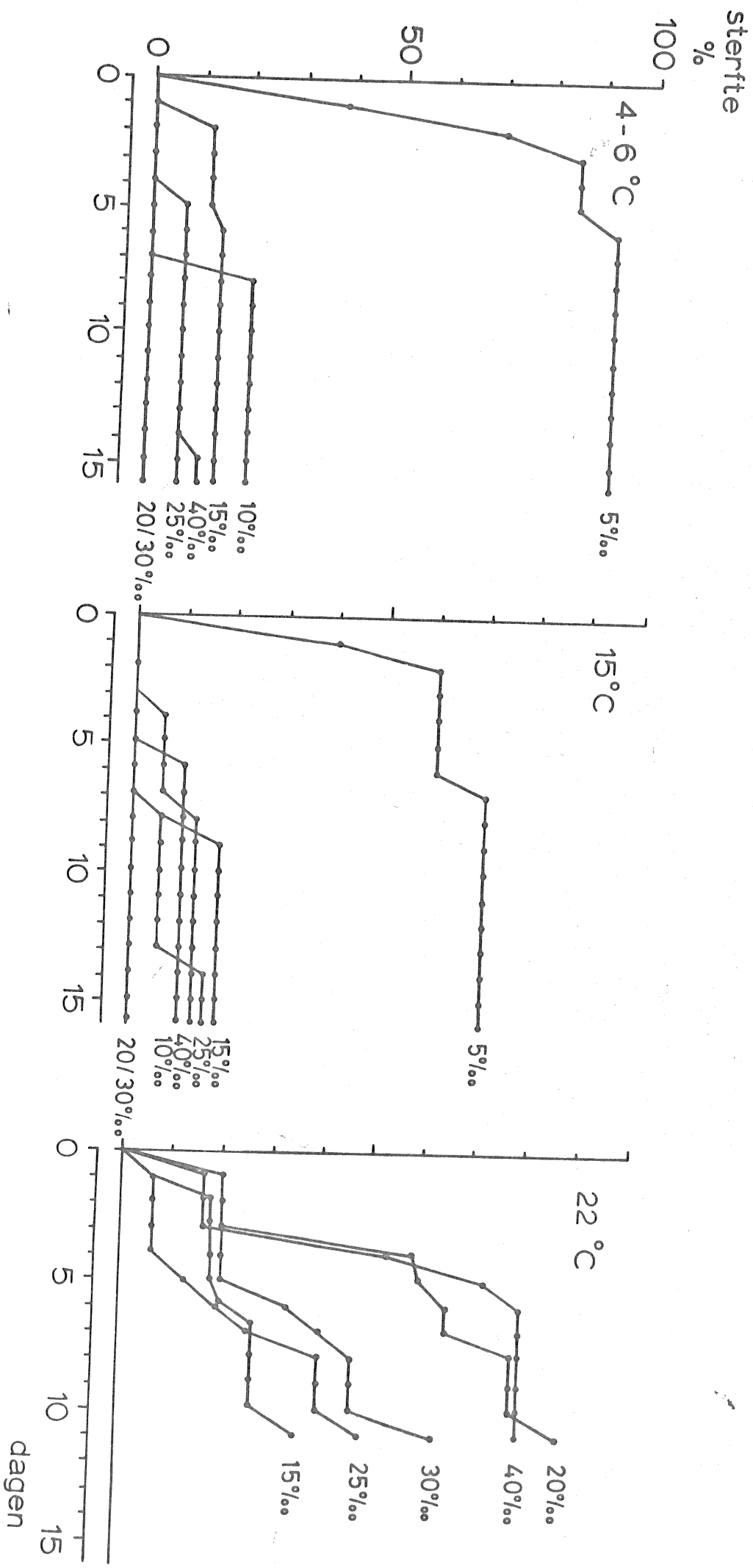


Fig. 10 Sterfte van *C. crangon* gedurende 16 dagen wanneer dieren overgebracht zijn uit een bassin (30 ‰ S, 18 °C) naar aquaria met verschillende zoutgehalten en temperaturen.

Watergehalte

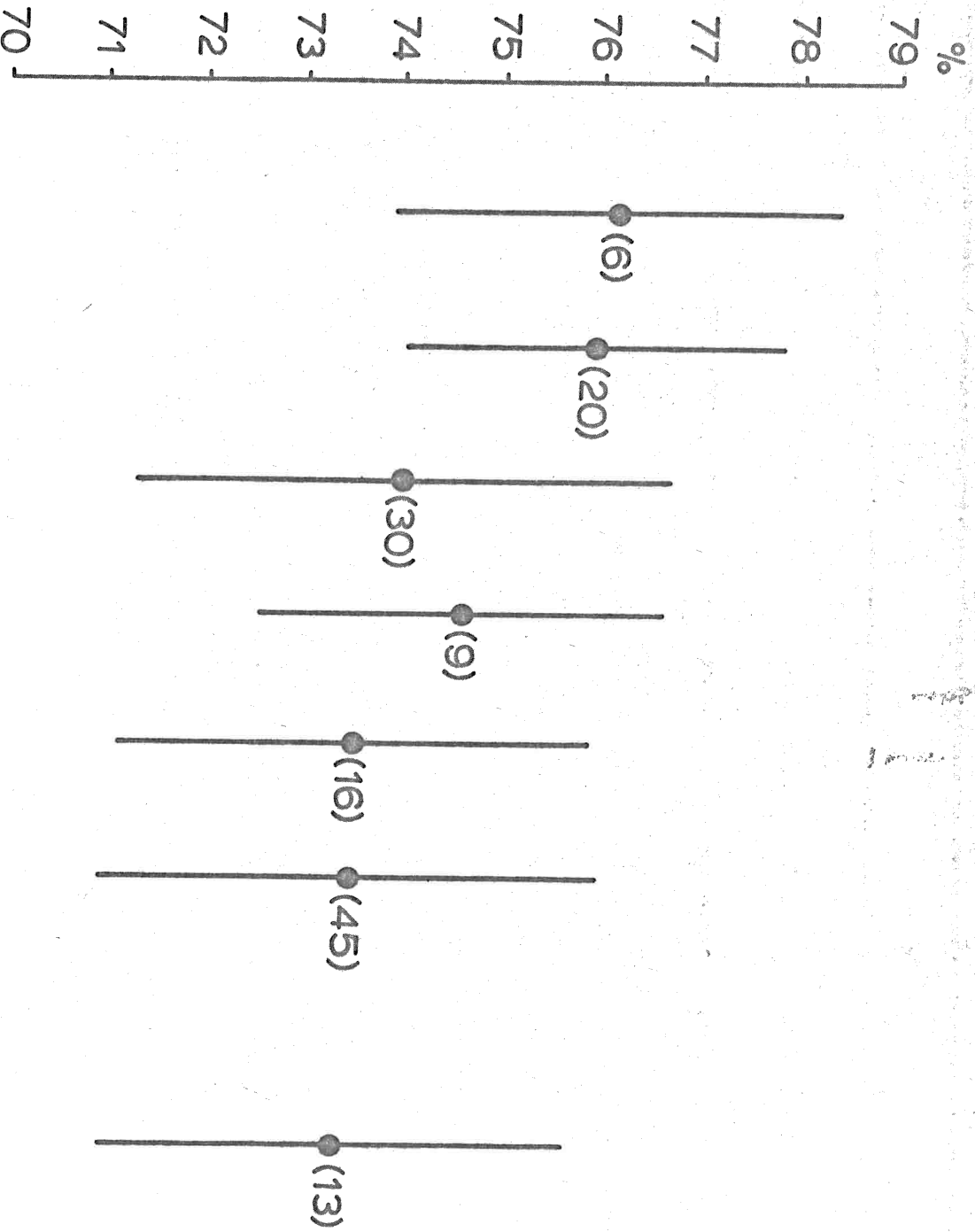


Fig. 11 Watergehalten van *C. crangon* na adaptatie aan verschillende zoutgehalten. De tussen hakjes geplaatst cijfers geven het aantal dieren

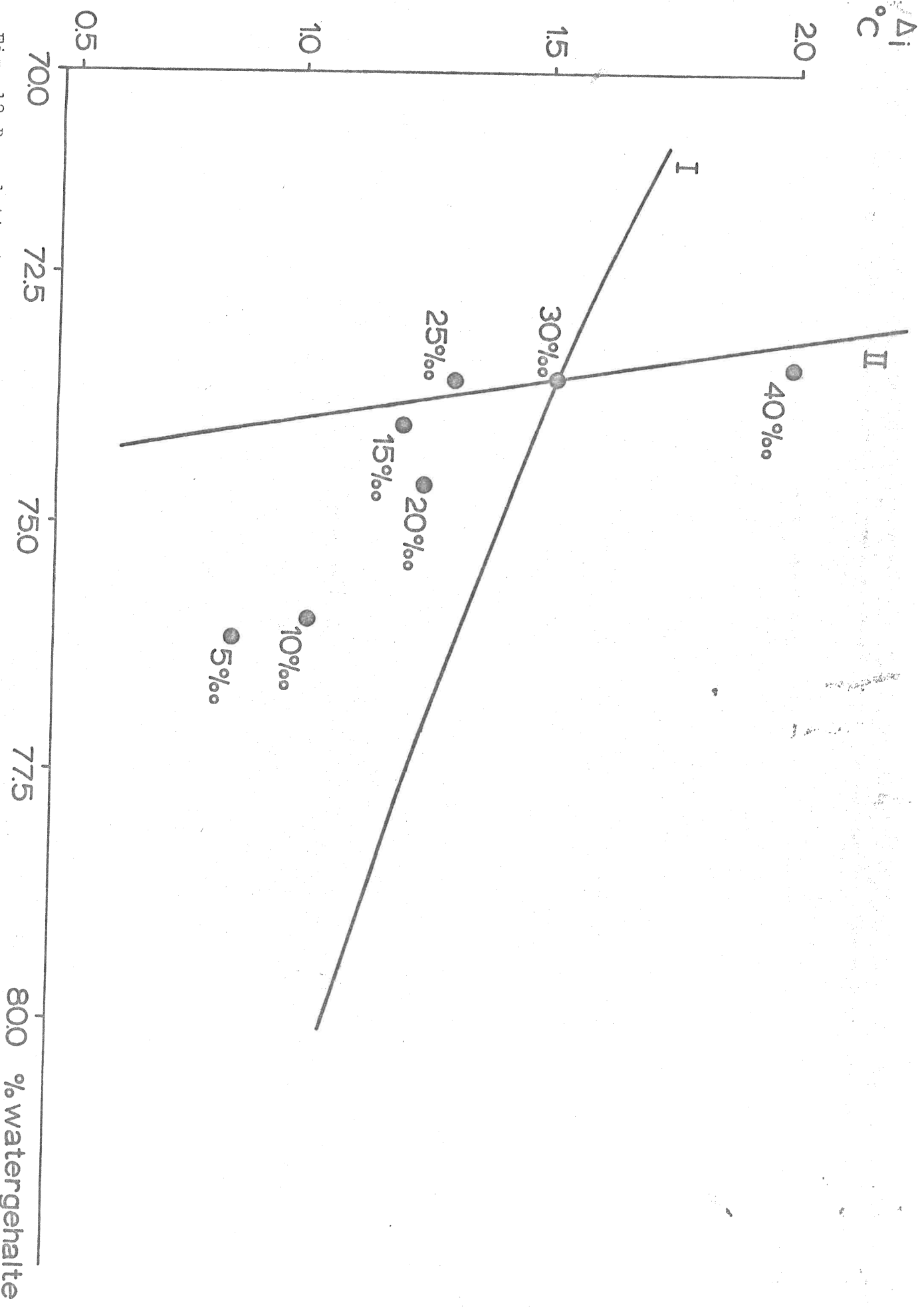


Fig. 12 De relatie tussen de osmotische concentratie van het bloed en het watergehalte van de rode bloedcellen