

Rechten voorbehouden

Van interne verslagen zijn nadruk of aanhalingen
slechts toegestaan met uitdrukkelijke toestemming
van het NIOZ.

De voortplanting, reservestoffen en groei van de zeepiet,
Arenicola marina L.

Arenicola marina L.

door

C.G.N. de Vooy

Intern verslag

over

onderzoek, verricht in het tijdvak

september 1973 - oktober 1974

aan

het NIOZ te Texel



NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLIKATIES EN VERSLAGEN

nummer 1975 - 13

De voortplanting, reservestoffen en groei van de zeepeer,

Arenicola marina L.

door

C.G.N. de Vooy

Intern verslag

Inhoud

I. Summary	2
Samenvatting	3
II. Inleiding	4
III. Probleemstelling van het eigen onderzoek	14
IV. Materialen en methoden	15
1. Herkomst en voorbehandeling proefdieren	15
2. Voortplanting, bepalen geslachtscellen	16
3. Reservestoffen	16
a. Koolhydraten	16
b. Lipiden	18
c. Eiwitten	24
4. Bepaling drooggewichten.	26
5. Groei	26
V. Resultaten van het eigen onderzoek	26
1. Voortplanting.	26
2. Reserve stoffen	28
a. Glycogeen	28
b. Lipiden	30
c. Eiwitten	33
3. Drooggewichten.	34
4. Groei	34

VI. Discussie	35
VII. Literatuur.	44

Tabellen, Schema's en Figuren

I. SUMMARY

During a year spawning, growth and the amount of energy reserves, in particular glycogen, were investigated in a population of lugworms (Arenicola marina L.) collected on the NIOZ-wad near 't Horntje, Texel. At least two generations could be distinguished, which are called "young worms" (< 2 g) and "old worms" (> 3 g). Of the young worms growth was followed from September 1973 to June 1975. Growth stagnated from October 1973 to April 1974 (mean weight 0.77 g) and from October 1974 to April 1975 (mean weight 1.85 g). In the second year of life mean growth was 1.08 g. Growth only occurred at temperatures above 10° C. A clear connection was found between the appearance of gametes in the coelom (end of April) and the suddenly sharp fall in the glycogen content of the tissues of about 25 to 35 mg glycogen/g ashfree dry weight to about 5 to 15 mg glycogen/g ashfree dry weight. After this fall a gradual raise occurs till the old value. An exception forms the chloragogene tissue of the young worms: from September to November 1973 the glycogen content decreases from 155 to about 60 mg glycogen/g ashfree dry weight, till the end of April this last value remains constant and after a sharp fall it follows the pattern of the old worms. The lipid contents of the different tissues are low too, from 35 mg/g ashfree dry weight (muscle) to 262 mg/g dry weight (trunk gut). The chloragogene tissue had 2 to 4 times as much lipid as the muscle. The lipid content shows little variance in the course of the year.

In muscle 70% of the total lipid was phospholipid and so was 54% of the lipid of the chloragogene tissue. Of the remaining neutral lipids the chloragogene tissue contained more triglyceride (14.9%)

than the muscle (3.9%).

The small amount of reserve compounds are responsible for the fact that in autumn and winter when the relation between anabolism and katabolism are infavourable a decrease in weight can occur.

SAMENVATTING

In dit onderzoek werd van de zeepier, Arenicola marina L., afkomstig van het NIOZ-wad, 't Horntje, Texel, de voortplanting, de groei en de hoeveelheid reservestoffen, in het bijzonder glycogeen, nagegaan gedurende de loop van een jaar. Er konden tenminste 2 generaties onderscheiden worden, die in het volgende "jonge wormen" worden genoemd (< 2 g) en "oude wormen" (>3 g). De groei van de jonge wormen werd gevolgd van september 1973 tot juni 1975. De groei stond stil van oktober 1973 tot april 1974 (gemiddeld gewicht 0.77 g) en van oktober 1974 tot april 1975 (gemiddeld gewicht 1.85 g). In hun tweede levensjaar bedroeg de groei gemiddeld 1.08 g, terwijl alleen groei plaats vond bij temperaturen boven de 10° C. Een duidelijk verband werd gevonden tussen het verschijnen van de gameten in het coeloom (eind april) en de plotselinge sterke daling van het glycogeen gehalte van de weefsels van ongeveer 25 tot 35 mg glycogeen per g asvrij drooggewicht tot ongeveer 5 tot 15 mg glycogeen per g asvrij drooggewicht. Na deze daling treedt een geleidelijk herstel op tot de oude waarde. Een uitzondering op deze waarden vormt het darm + chloragogeenweefsel van de jonge wormen, dat van september tot november 1973 daalde van 155 tot ongeveer 60 mg glycogeen per g asvrij drooggewicht, tot eind april deze waarde behield, en na een scherpe daling het patroon van de oude wormen volgde. Het lipidegehalte van de weefsels is eveneens gering, van 35 tot 262 mg per g asvrij drooggewicht. Het chloragogeenweefsel bevatte 2 tot 4 x zoveel lipide als de huidspierzak; het lipidegehalte per weefsel vertoont gedurende

het jaar weinig variatie. In de huidspierzak bestond 70% van de totale hoeveelheid lipide uit phospholipiden, in het chloragogeenweefsel tot 54%. Van de resterende neutrale lipiden bevatte het chloragogeenweefsel meer triglyceriden dan de huidspierzak, respectievelijk 14,7 tegen 3,9%. De geringe hoeveelheden reservestoffen maken dat in de late herfst en in de winter, wanneer de verhouding tussen anabolisme en katabolisme ongunstig liggen, een daling in gewicht op kan treden.

De schrijver wilde Dr J.J. Zijlstra bedanken voor het ter beschikking stellen van de laboratoriumruimte voor dit onderzoek en Dr P.A.W.J. de Wilde en de Heer E.M. Berghuis voor hun belangstelling en hulp bij het onderzoek.

II. INLEIDING

In deze inleiding zal alleen die literatuur besproken worden, die verband houdt met de in de titel genoemde onderwerpen. Morphologie, zuurstofopname, bloed, haemoglobinefunctie en osmoregulatie zullen weinig of niet aan de orde komen.

De wadpier, Arenicola marina L., leeft op slikkige zandgebieden in of beneden de getijzone. Zijn verbreidingsgebied ligt op het noordelijk halfrond aan weerszijden van de Atlantische Oceaan, van de arctische gebieden tot de zône waar de temperatuur van het water gedurende langere perioden boven de 20° C uitkomt (WELLS, 1963; Fig. 1). *Arenicola* is een osmoconformer en komt in estuariën voor tot een zoutgehalte van 40 tot 70% van dat van het zeewater; dit kan lager zijn gedurende korte tijden.

Arenicola leeft in een L-vormige buis tot een diepte van 20 tot 40 cm in het wad (zie Fig. 2; KRUGER, 1959; THANDRUP, 1935; WELLS, 1950).

De diepte van de buis hangt af van de vastheid van de bodem (THAMDRUP, 1935). Aan het einde van het horizontale been van de L bevindt zich een zuil zand, die meestal een lichtere kleur heeft dan het (aneroobe) omringende materiaal en die uit materiaal is gevormd dat van de bovenste 1 tot 2 cm van het wad afkomstig is; dit is bevestigd door experimenten met gekleurd zand (THAMDRUP, 1935). De worm vreet dit zand aan de basis van de zuil op, waardoor aan de bovenkant van deze zuil een trechter ontstaat die in het water een hellingshoek van ongeveer 35° heeft (LINKE, 1939). De zuil bevat een hoger percentage organisch materiaal dan het omringende zand (JACOBSEN, 1967). Het zand waar de verteerbare delen uit verdwenen zijn wordt als faeces uitgescheiden als de bekende pierenhoopjes; hiertoe kruipt de worm achterstevoren naar boven tot de staart aan de oppervlakte komt en trekt zich direct na het vrijkomen van de faeces weer naar beneden terug. Door water door zijn gang te pompen, en wel door de L-buis naar binnen en door de zandkolom weer naar buiten voorziet de worm zich van zuurstof.

Het voorkomen van Arenicola hangt af van de structuur van de grond, wat vooral wil zeggen de stand van het grondwater bij eb en de hoeveelheid aanwezig voedsel (vooral organische slikbestanddelen). Hogere waddelen die uit grof zand bestaan die weinig slik bevatten en waar het water bij eb lager zakt dan 30 cm beneden de oppervlakte, bevatten weinig of geen pieren. Zij kunnen zich dan niet voeden omdat de bovenste laag van het zand hard wordt; de zuil werkt alleen als zand met water verzadigd is (KERMACK, 1955). Daarentegen kunnen op lagere, slibrijke wadden waar bij eb water blijft staan of de grondwaterstand niet ver zakt grote aantallen wormen voorkomen tot meer dan 100 per m^2 . Arenicola kan voorkomen van gebieden die 10% van de tijd onder water staan tot gebieden die de gehele tijd onder water staan (THAMDRUP, 1935). In het algemeen worden jonge dieren van minder dan 1 jaar oud aangetroffen

op hogere, slibrijke delen van het wad en de oudere dieren op wat lager gelegen wadgedeelten (THAMDRUP, 1935; NEWELL, 1948; SMIDT, 1951; WERNER, 1956a, 1956b; CAZAUX, 1967).

Het aantal pierenhoopjes per oppervlakteëenheid is geen juiste maat voor het aantal aanwezige wormen (NEWELL, 1948), daar dit afhangt van de mate waarin de wormen zich verplaatsen, wat weer afhangt van o.a. de voedselrijkdom van de grond (THAMDRUP, 1935). Waargenomen werd dat wormen op gunstige, rustige plaatsen 14 dagen op dezelfde plaats kunnen blijven zitten; zelfs wordt door LINKE (1939) een verblijfsduur van 6 tot 8 maanden op dezelfde plaats gemeld.

Het voedsel van *Arenicola* bestaat waarschijnlijk uit organisch materiaal in het slib, en de op dit slib aanwezige bacteriën. KRUGER (1959) veronderstelde dat de zandkolom het doorgepompte water zou filtreren, en dat dit de voedselbron zou zijn. De hoeveelheid water die de worm per uur doorpompt (50 tot 200 ml/u) is echter te gering dan dat dit een aanzienlijke voedselbijdrage zou kunnen zijn. KRUGER (1959) kon ook geen planktonorganismen in de darminhoud van *Arenicola* vinden. JAKOBSEN (1967) constateerde dat *Arenicola* zijn energiebehoefte uit filtratie niet kon dekken; bovendien haalt de worm 30 tot 50% van de zuurstof uit het door hem verpompte water, wat niet overeenkomt met de verhoudingen bij een filter feeder. Hij veronderstelde dat de microfauna van het oppervlaktmateriaal, de bacteriën en de diatomeeën de voornaamste voedselbron van *Arenicola* zouden zijn.

Longbottom (1970) toonde een duidelijk verband aan tussen de korrelgrootte van het bodemmateriaal, het percentage organische stof wat hierin aanwezig was en het voorkomen van *Arenicola*. In materiaal met deeltjesgrootte kleiner dan 80 μ , zeer rijk aan organisch materiaal, kwamen alleen zeer jonge wormen in slijmbuizen voor, geen oudere wormen. Waarschijnlijk is dit materiaal te slap om L-buizen te kunnen vormen.

Zand met korrelgrootte groter dan 0.15 tot 0.2 mm bevatten weinig of geen pieren. Dit is een voedselkwestie, daar waar op plaatsen met deze korrelgrootte veel organisch materiaal aanwezig is (b.v. riool) wel pieren voorkomen. Een aanzienlijk deel van het aanwezige organisch materiaal zou uit bacteriën kunnen bestaan.

Slechts een gering gedeelte van het door *Arenicola* opgenomen materiaal bezit voedingswaarde. De hoeveelheid opgenomen bodemmateriaal varieert volgens LINKE (1939) met het voedselgehalte van het sediment en zou op voedselarm sediment $2\frac{1}{2}$ maal zoveel kunnen zijn als op voedselrijk sediment. In Noord Wales werd 0.75 tot 1.75% organisch materiaal gevonden in al het opgenomen bodemmateriaal. De worm moet daarom grote hoeveelheden zand eten om aan voldoende voedsel te komen. Het voedsel passeert de darm dan ook vrij snel: gemiddeld 14 minuten van de proboscis tot het rectum. In de maag wordt water aan het zand toegevoegd door de maagwand; hierdoor kan het materiaal goed gemengd worden door een ventrale groeve met ciliën die de maaginhoud naar achteren transporteert en verscheidene laterale groeven met ciliën die de maaginhoud naar boven werken. Op deze wijze vindt in de maag een intensieve menging van de inhoud plaats. De vertering van het organisch materiaal vindt hoofdzakelijk plaats door extracellulaire enzymen. In de oesophagus worden geen enzymen uitgescheiden, wel in de oesophagusblaasjes (carbohydrasen) die waarschijnlijk naar de maag gaan. Deze is het hoofdtoneel van de vertering: carbohydrasen (optimale activiteit bij de pH van de maaginhoud, pH = 6,2); proteasen (dipeptidase, tripeptidase, trypsine), esterasen en zwakke lipaseactiviteit (KERMACK, 1955; LONGBOTTOM, 1970). In de darm komt zwakke activiteit van carbohydrase, esterase en lipase voor. In het rectum vindt geen vertering plaats. Er werd geen cellulase aangetoond; materiaal van plantaardige afkomst zou door *Arenicola* niet verteerd kunnen worden (LONGBOTTOM, 1970). KERMACK (1955) meende intracellulaire vertering (phagocytose) te

kunnen vaststellen; dit werd later echter weer in twijfel getrokken (LONGBOTTOM, 1970). *Arenicola*'s van ongeveer 6 g defaeceren bij een watertemperatuur van 13 tot 26° C eens per ongeveer 45 minuten (KERNACK, 1955).

Arenicola wordt geslachtsrijp in het tweede levensjaar (NEWELL, 1948; SMIDT, 1951; DUNCAN, 1960; CAZAUX, 1967). De geslachten zijn gescheiden. Volgens verreweg de meeste auteurs vindt het afzetten van eieren eens per jaar in het najaar plaats (zie Tabel I). Er zijn echter enkele auteurs (KYLE, 1896; HOWIE, 1959) die vermelden dat sommige populaties zowel in het voorjaar als in het najaar een paaitijd zouden hebben. HOWIE (1959) vermeldt dit voor sublittorale ("laminarian") populaties. Doordat de temperatuur 's winters daar hoger is, zou gametenvorming dan door kunnen gaan; de reserves hiervoor zouden beschikbaar zijn omdat deze dieren zich voortdurend kunnen voeden. Dat *Arenicola* in de getijzone alleen in het najaar paait, zou verklaard kunnen worden doordat de larven hoog in de getijzone de hoge zomertemperaturen niet overleven, zeker niet aan de zuidgrens van zijn verspreidingsgebied (HOWIE, 1959).

Het merendeel van de auteurs geeft de paaitijd op als plaats vindend in de maanden september, oktober of november. Het paaien zou in 2 tot 14 dagen plaats vinden. In het terrein is het paaien herkenbaar door de aanwezigheid van kleine spermapoeltjes (DUNCAN, 1949; HOWIE, 1959; DUNCAN, 1960; tevens waargenomen door G.C. CADÉE op het NIOZ-wad). Eipoeltjes worden maar weinig gevonden, waarschijnlijk doordat de wijfjes diep in hun gang zitten en daardoor minder gemakkelijk opvallen en daarom ook weinig of niet in deze tijd worden gevangen (HOWIE, 1959). De geslachtscellen beginnen in het coeloom te verschijnen in maart (DUNCAN, 1960), juni (NEWELL, 1948; SMIDT, 1951; DUNCAN, 1960) of juli (THAMDRUP, 1935). De eieren en spermadisci groeien snel in

de zomer en hebben enkele weken voor het paaien hun maximale grootte bereikt (NEWELL, 1948; HOWIE, 1959). Er bestaat geen verband tussen de grootte van de oocyten als ze rijp zijn en de grootte van het dier (DUNCAN, 1960; BRENNING, 1965). Er zouden 2 uitwendige stimulansen voor het paaien zijn: getijhoogteverschillen (spring- en doodtij) en een snel dalende zeewatertemperatuur. Een begin van het paaien bij springtij en een hoogtepunt bij dood tij werd beschreven door NEWELL (1948), HOWIE (1959) en DUNCAN (1960). Dit zou gunstig zijn voor de bevruchting daar onnodige verdunning van de zaadvloeistof zo vermeden wordt; bovendien komen de eieren zo niet te hoog in de getijzone terecht. Daar tegenover vonden PIRLOT (1933) en HOWIE (1959, St. Andrews) het hoogtepunt van het paaien bij springtij. HOWIE (1959) vond een verband tussen plotselinge daling van de luchttemperatuur (vorst) en het begin van het paaien. Deze luchttemperatuurdalingen geeft hij op als 3.5° tot 14° C in 2 weken, en 6° C in 1 week. Bij de "laminarian" populaties is blijkbaar de verandering van temperatuur in de lente de prikkel tot paaien; ze reageren op minder grote veranderingen in temperatuur dan littorale populaties. In experimenten werd gevonden dat littorale *Arenicola*'s niet paaien bij temperaturen van 14° C of hoger. De resultaten werden aanzienlijk beter beneden de 12° C. Elk jaar vond het paaien in hetzelfde gebied in hetzelfde tijdsbestek plaats; de eerste grote daling in de temperatuur in de herfst vond gedurende dezelfde 14 of 21 dagen elk jaar plaats.

DUNCAN (1960) meent echter dat de temperatuurdaling geen oorzaak van het paaien kan zijn omdat paaien in de herfst plaats vindt waar voortdurend temperatuurdaling plaats vindt. Bovendien heeft elke populatie zijn eigen karakteristieke paaitijd in weerwil van de temperatuurvariaties; zo vond bij WHITSTABLE (Kent) het paaien gedurende 5 jaar in oktober plaats, ondanks verschillen in de zeewater-temperatuur van 5° C.

Pogingen tot bevruchting van eieren uit het coeloom die volgroeid waren leverden weinig succes op, en in de enige gevallen waar de bevruchting optrad bleef de ontwikkeling in een vroeg stadium steken (PIRLOT, 1933; NEWELL, 1948; HOWIE, 1961). Resultaten werden geboekt met gepaaide eieren die bevrucht waren (BLEGVAD, 1923; NEWELL, 1948; DUNCAN, 1949; HOWIE, 1961). HOWIE (1961) stelde vast, dat de eerste rijpingsdeling van de eieren pas enkele uren voor het paaien plaats vindt. De trechter van de nephromixia laat alleen rijpe eieren door. De spermato-cyten bevinden zich in het coeloom van de manlijke dieren in ovale schijffjes samengeplakt (spermadisci); bij rijping komen ze vrij. De nephromixia laten alleen vrije spermatozoiden door. Aan de eieren is duidelijk te zien of ze rijp zijn; de vorm, in het bijzonder die van de dooier, verschilt duidelijk van die van een niet rijp ei, terwijl bovendien in coupes vaak een metaphasefiguur zichtbaar is.

Volgens HOWIE (1963, 1966) en HOWIE & McCLENAGHAN (1965) zouden in het proces van vorming en vrijkomen van geslachtscellen in het coeloom van *Arenicola* en het rijpen van de eieren 2 hormonen een rol spelen. Het rijpen van het ei zou veroorzaakt worden door een in de postale lobben van de hersenen aanwezig rijpingshormoon. Dit hormoon is alleen aanwezig als er gameten in het coeloom aanwezig zijn (HOWIE, 1966).

OLIVE (1972a, 1972b) onderzocht de activiteit van de mitose in de testis van *Arenicola*. In de periode na het paaien tot februari trad zeer weinig celdeling in de testis op. Van februari tot juni treedt een toenemende mitose in de testis op (exponentiële groei). Van juli tot september heerst in de testis een steady state: de mitosesnelheid is gelijk aan de hoeveelheid spermatocyten die in het coeloom vrijkomen. Van september tot de paaitijd wordt de mitosesnelheid geremd door de gametocyten die in het coeloom aanwezig zijn. Dit tweede hormonale reglings-

mechanisme werd ontdekt door HOWIE & McCLENAGHAN (1965); zij constateerden dat na het kunstmatig verwijderen van spermatocyten uit het coeloom een mitosestoot ("burst") in de testis optrad. OLIVE (1972a) toonde aan dat dit effect alleen optrad in de periode van september tot de paaitijd. In tegenstelling met HOWIE & McCLENAGHAN (1965) vond OLIVE (1972a) dat de mitose in de testis niet door een cerebraal hormoon veroorzaakt wordt.

De eieren en de spermatozoiden worden tijdens het paaien via de nephromixia uitgescheiden. De eieren en spermacellen zijn zwaarder dan zeewater en zinken spoedig naar de bodem. De eieren worden na 1 tot 3 uur kleverig en plakken vast aan de zandkorrels (NEWELL, 1948). De eieren komen uit na 1 tot 7 dagen, meest na 4 dagen (BLEGVAD, 1923; NEWELL, 1948; DUNCAN, 1949; DUNCAN, 1960). De larve zou geen pelagisch stadium hebben maar zich van het begin af aan op de bodem ontwikkelen (NEWELL, 1948). De larven zouden echter wel in staat zijn om zich over korte afstanden zwemmend te verplaatsen (BLEGVAD, 1923; NEWELL, 1948).

Verschillende onderzoekers lieten gepaaide eieren uitkomen in bakjes met zeewater en vervolgden de ontwikkeling van de larven (BLEGVAD, 1923; NEWELL, 1948; DUNCAN, 1949; HOWIE, 1961). De eieren kwamen uit 4 tot 7 dagen na het paaien; het eerste paar borstels werd gevormd na 6 tot 15 dagen, de larve is dan 0.29 mm groot; 8 tot 11 dagen later werd het tweede borstelpaar gevormd, 11 tot 15 dagen hierna het derde borstelpaar. In het laboratorium zijn geen ontwikkelingsstadia, verder dan het derde borstelstadium waargenomen, de larven gingen hierna dood. Buiten werden larvenstadia gevonden in zeewater, waarin het bovenste laagje van de bodem was opgewoeld. Deze bodem waar larven voorkomen bevond zich aan de zeewaartse zijde van de fucuszone, hoger dan de plaats waar de oudere vormen zich bevonden (NEWELL, 1948). PIRLOT (1933) vond bij Blankenburghe 2 weken na het paaien larven met 1 paar

borstels. NEWELL (1948) vond na 14 dagen larven met 2 paar borstels, na 21 dagen larven met 3 paar borstels; de larven waren toen 0.33 mm groot. SMIDT (1951) vond op Skallingen larven met 3 paar borstels van 0.44 mm groot. BLEGVAD (1923) vond bij Hyborg in september larven met 5 paar borstels. Er zijn nooit larven met meer dan 5 paar borstels gevonden. De verdere ontwikkeling van de larve gedurende de winter is onbekend. In het voorjaar werden door verschillende auteurs postlarvale stadia gevonden (BENHAM, 1893; KYLE, 1896; ASHWORTH, 1904; ALLEN, 1915; NEWELL, 1948), die naar degene die de eerste beschrijving er van gaf ook wel "Benhamstadium" genoemd worden. Ze zijn gevonden van februari tot juni en lijken in alle opzichten op een volwassen vorm, behalve de veel geringere afmeting (3 tot 6.8 mm), het niet of slechts gedeeltelijk ontwikkeld zijn van kieuwen, en het feit dat het postlarvale stadium geen L-buis maakt als de grotere dieren, maar leeft aan de oppervlakte van de bodem in een slijmbuis langer dan het dier zelf is. De slijmbuis wordt afgescheiden door kliercellen die op elk segment aanwezig zijn. Het dier kan met de buis wrikken als een paling en zelfs zwemmen (KYLE, 1896).

Jonge Arenicola's die een L-buis hebben worden voor het eerst aangetroffen in mei-juni. Ze leven in hetzelfde gebied als de larven, hoog in de getijzone, in een "broedwad" (THAMDRUP, 1935; WOHLBERG, 1937; LINKE, 1939; NEWELL, 1948; SMIDT, 1951; WERNER, 1955). Ze hebben dan een lengte bereikt van 1 tot 3 cm. Er vindt trek plaats naar lager gelegen waddelen, hetzij kort na de metamorfose (NEWELL, 1949), hetzij als ze ongeveer 1 jaar oud zijn (NEWELL, 1948; CHAPMAN & NEWELL, 1949; SMIDT, 1951; LONGBOTTOM, 1970). Er wordt ook trek van Arenicola's beschreven die optreedt wanneer het water gedurende enige tijd niet erg hoog geweest is; er vindt dan trek van hoge naar lagere waddelen plaats (SMIDT, 1951). Ook kan trek van hoge naar lagere waddelen voor-

komen in de winter, wanneer bij lage waterstanden bevroering dreigt. Deze trek omvat hoofdzakelijk jonge, niet geslachtsrijpe dieren en vindt plaats als de zeewatertemperatuur beneden de 1° tot 3° C geweest is. Als de temperatuur daarna iets steeg vond trek plaats 's nachts wanneer er springtij was (WERNER, 1955).

Groei van *Arenicola* vindt alleen 's zomers plaats en staat 's winters vrijwel stil (SMIDT, 1951), of het gewicht loopt in najaar en winter achteruit (NEWELL, 1948) of het gewicht neemt in deze periode langzaam toe (vooral jonge wormen) (THAMDRUP, 1935; CAZAUX, 1967; LONGBOTTOM, 1970). De mate van groei hangt o.a. af van de voedselrijkdom van de bodem. In zand, arm aan organische stoffen gaan de wormen in gewicht achteruit, ondanks goede primaire productie. In slibrijk grondmateriaal, afkomstig uit de Mokbaai, rijk aan organische stof, bleek een goede groei van *Arenicola* op te treden.

De leeftijdsbepaling van *Arenicola* is (nog) niet mogelijk, al kan men wel door lengte- of gewichtsklassen tegen de aantallen individuen in die klassen uit te zetten, een indruk van het aantal aanwezige generaties krijgen (CAZAUX, 1967). Uit dit type onderzoek blijkt, dat *Arenicola* tenminste 3 jaar oud kan worden. In een aquarium is waargenomen, dat *Arenicola* tenminste 6 jaar oud kan worden (THAMDRUP, 1935). Er is meermalen waargenomen dat als de dieren 3 jaar oud zijn en voor de tweede maal gepaaid hebben, een sterke vermindering van het aantal dieren in de populatie optreedt (NEWELL, 1948; CAZAUX, 1967; LONGBOTTOM, 1970), die wegmigreren of sterven. De laatste mogelijkheid is de meest waarschijnlijke. NEWELL (1948) vond na de paaitijd veel aangespoelde dode wormen. De voornaamste predatoren van *Arenicola* zijn vogels en (plat)vissen, bij heel jonge *Arenicola*'s wellicht ook Hereis-soorten. Deze predatie richt zich op het staarteinde van de wormen. Bij het defaceren komt het staarteinde een korte tijd aan de oppervlakte en de predatoren maken van deze gelegenheid gebruik om het uiteinde

van de staart te grijpen. Nu is de bouw van de staart zodanig dat het achterste stuk van de staart afgesnoerd en losgelaten kan worden, zodat de predator alleen het laatste stuk staart heeft en de worm ontsnappen kan (WELLS, 1947). Dit gaat zonder bloedverlies en in de staart zitten geen essentiële organen. Na het verlies van het staartuiteinde gaan de nu laatste ringen van de staart zich sterk verlengen zodat de staart weer langer wordt (WELLS, 1951). Ook wanneer men de gehele staart afsnijdt groeit er weer een nieuwe staart aan, mits de temperatuur niet te hoog is (ORTON, 1935).

III. PROBLEEMSTELLING VAN HET EIGEN ONDERZOEK

Bij vele evertibraten zijn reservestoffen aangetoond, die voor voedsel- en energievoorziening kunnen dienen in tijden waarin weinig voedsel opgenomen kan worden in verband met lage temperaturen, of als bouwstenen voor de vorming van de gameten. Vele Lamelliibranchiaten hebben glycogeen als reservestof (b.v. de zeemossel *Mytilus edulis*), voor sommige groepen insecten dienen koolhydraten hiervoor (Diptera, Hymenoptera), voor andere groepen weer diglyceriden (sprinkhanen).

Bij *Mytilus edulis* werd een zeer duidelijke variatie in het seizoen vastgesteld, die verband hield met de voortplantingscyclus (het al of niet vormen van eieren en spermacellen) (DE ZWAAN & ZANDEE, 1972; GABBOTT & BAYNE, 1973).

In dit onderzoek is nagegaan, in hoeverre koolhydraten en lipiden als reservestoffen aanwezig waren in de zeepier *Arenicola marina* en of in de hoeveelheid van deze eventuele reservestoffen veranderingen in de loop van het jaar optraden. Omdat in het laatste geval hoogstwaarschijnlijk verband met de voortplantingscyclus zou bestaan, werd tevens de aanwezigheid of afwezigheid van gameten nagegaan. Daar tijdens het onderzoek in de uitgespitte *Arenicola*-monsters een duidelijke verschuiving in de aantallen per gewichtsklasse met de tijd bleek,

werd de groei mede in het onderzoek betrokken.

IV. MATERIALEN EN METHODEN

1. Herkomst en voorbehandeling proefdieren

Arenicola marina L. werd uitgespit op een gedeelte van het wad ten noorden van de polder 't Horntje, Texel. In het algemeen werd een oppervlakte van 3 tot 4 m² uitgespit. Dit wad was gelegen tussen de NIOZ-haven, de noordelijke dijk van de polder 't Horntje en de oostelijke dijk van de Prins Hendrikpolder. Naar het oosten en het grootste deel van het noorden was het gebied door zandwallen afgegrensd, waarop zich slechts weinig *Arenicola*'s bevonden. De kom hierbinnen was rijk aan slik en er bevonden zich veel pieren (tot ongeveer 100 stuks per m²).

De gevangen wormen werden uitwendig met zeewater schoongespoeld en in bekerglazen overnacht in de ijskast gezet bij $\pm 4^{\circ}$ C. In deze tijd werd het grootste gedeelte van het zand in de darm ($\pm 90\%$) uitgescheiden. Er bleef wat zand in de darm achter; om de darm geheel zandvrij te krijgen is echter veel tijd nodig (tot 1 maand) en de dieren bleven, zelfs bij 4° C, slechts 2 tot 3 dagen goed. Men kan ze veel langer goed houden door ze elk afzonderlijk in een bekerglas met zeewater te bewaren, maar in verband met de grote aantallen benodigde wormen was dit hier niet mogelijk.

De wormen werden nu met behulp van kleenex-tissue van hun aanhangend water ontdaan en op een horlogeglas gewogen. Het gewicht werd als maat verkozen boven de lengte (in tegenstelling tot b.v. NEWELL (1948), SMIDT (1951) e.a.) omdat door predatie de lengte van de staart sterk kan variëren, wat bij een gewichtsbepaling een kleinere fout maakt dan bij een lengtebepaling en daar de pier zich rhythmisch blijft samentrekken is een juiste lengtebepaling, zelfs van het rompgedeelte, niet mogelijk. Voor de bepaling van de reservestoffen in de weefsels

werd de pier nu eerst verdoofd door hem ± 4 minuten in het vriesvak van een ijskast te leggen. Daarna werd de verstijfde pier bij het kopgedeelte een klein stukje opengemaakt, de uitlopende coeloomvloeistof werd in een horlogeglas opgevangen. De pier werd nu onder zeewater op een stuk polystyreen vastgeprikt en de oesophagus, maag en darm tot aan het rectum geïsoleerd: dit is de "darm + chloragogeen-weefsel" fractie. De rest is de "huidspierzak" fractie. Van een groot aantal dieren werden de "darm + chloragogeen" fracties en de "huidspierzak" fracties elk gecombineerd verzameld in voorgewogen bekerglazen in een ijsbad. Daarna werd met behulp van kleenex-tissues de aanhangende vloeistof weggenomen en werd het natgewicht van het weefsel bepaald. Het weefsel werd, wanneer de bepaling niet aansluitend plaats kon vinden, in een vrieskist (-20°C) bewaard.

2. Voortplanting, bepalen geslachtscellen

De opgevangen coeloomvloeistof werd onder een microscoop bekeken met lage vergroting ($60\times$) of eventueel bij 270-malige vergroting. De aanwezigheid van eieren of spermadisci (morulae) werd genoteerd. Tevens werd de grootte van de eieren genoteerd (groot met dooier, klein zonder dooier) en of er veel of weinig aanwezig waren. In een enkel geval werd een groot aantal eieren opgemeten; de tijd ontbrak helaas om in de loop van de groei van de geslachtscellen een reeks metingen te doen.

3. Reservestoffen

a. Koolhydraten

Het glycogeen (Fig. 3) werd als onderstaand bepaald (zie ook schema I). Per experiment werden van de oude wormen 6 tot 14 stuks gebruikt, van de jonge wormen 10 tot 25 stuks. De verhouding tussen de natgewichten van de huidspierzakfractie en de darm + chloragogeenfractie bedroeg

voor zowel grote als kleine wormen ongeveer een factor 4.

De weefsels werden fijn geknipt en er werd het viervoudige volume 30% KOH oplossing aan toegevoegd. Dit geheel werd gehomogeniseerd met een Ultraturrax homogenisator ($2 \times \frac{1}{2}$ minuut) en het homogenaat gedurende 2 uur verwarmd in een waterbad bij 50°C . Daarna werden de vaste bestanddelen afgecentrifugeerd bij 23000 g gedurende 30 min. bij 4°C . Het supernatant werd nu onteiwit door aan de centrifugebuizen, die in een ijsbad stonden, gelijke volumina 6 N HCl en 6% trichloorazijnzuur toe te voegen. Het neerslag werd afgecentrifugeerd bij 12900 g gedurende 20 min. bij 4°C . Het supernatant werd nu met gedestilleerd water verdund al naar gelang de hoeveelheid glycogeen die men in het monster verwachtte. Van elk monster verdund supernatant werden nu in drievoud in glazen Corex centrifugeerbuisen 1 ml gepipetteerd, hieraan werden 3 ml 95% alcohol en 0.05 ml van een verzadigde natriumsulfaatoplossing als coprecipitant toegevoegd. De buizen werden, na goed mengen op de whirlmix, gedurende 3 minuten in een kokend waterbad verhit, daarna gedurende tenminste 1 uur in een ijsbad gekoeld. Daar de Corex buizen niet pasten in de gekoelde MSE centrifuge, en de beschikbare Sorvall centrifuge niet gekoeld was, werden de buizen eerste enkele uren in een vrieskist bij -20°C gezet. Daarna werden de buizen gedurende 15 min. gecontrifugeerd bij 15500 g. Het supernatant werd nu voorzichtig gecanteerd en de buizen bij kamertemperatuur aan de lucht gedroogd. De neerslag werd nu weer opgelost in 0.2 ml gedestilleerd water (goed mengen op whirlmix). Hieraan werd nu 3 ml anthronreagens toegevoegd, dat vers bereid wordt. Het was als volgt samengesteld: 100 ml geconcentreerd zwavelzuur, 30 ml water en 200 mg anthron (0.15%, Fig. 4). Na goed mengen op de whirlmix werden de buizen nu in het donker gedurende 20 min. in een waterbad op 90°C verwarmd. Hierna werden de buizen in stromend water gekoeld. De buizen werden in het donker gehouden en

afgelezen bij 620 μ m op een Coleman jr. spectrophotometer, model 6/20, met ronde cuvetten met 1 cm ϕ . Hiernaast werden 2 ijklijnen gemaakt met behulp van zuiver glycogeen (Merck). In het ene geval werd van een standaard die 100 μ g glycogeen per ml gedestilleerd water bevatte een verdunningsreeks gemaakt. Het glycogeen werd als boven beschreven neergeslagen en bepaald. Hiernaast werd van een standaard die 100 μ g glycogeen per ml bevatte een rechtstreekse glycogeenbepaling gedaan. De resultaten kwamen overeen, waaruit blijkt dat de neerslagprocedure een quantitatief juiste opbrengst gaf (Fig. 5).

De verkregen resultaten uit de weefsels werden op de bovengenoemde ijklijn afgelezen; de hoeveelheid glycogeen per gram weefsel (natgewicht) werd berekend volgens de formule:

$$\frac{1}{\text{natgew. in g}} \times \frac{\text{eindvol. verzepingsmengsel}}{\text{vol. verzepingsmengsel gebr. per bepaling}} \times \frac{\text{vol. supernatant na onteiw.}}{\text{vol. verzepingsmengsel geb.}}$$

$$\frac{\text{vol. na verdunning met aq. dest}}{\text{vol. supernatant na onteiwitten}} \times \text{aantal } \mu\text{g gevonden glycogeen} \longrightarrow$$

aantal μ g glycogeen per g natgewicht.

Deze resultaten werden omgerekend per g drooggewicht (zie IV. 4).

b. Lipiden

De lipiden werden bepaald als onder beschreven (zie ook schema II).

De weefsels werden fijn geknipt en daarna gehomogeniseerd met behulp van een Ultra-Turrax homogenisator in een extractiemengsel volgens BLIGH & DYER (1959), gewijzigd naar VAL DER HORST, VAN GEMNIP & VOOGT (1969). Dit extractiemengsel heeft de volgende samenstelling: water (weefsel) : chloroform : methanol = 0.3 : 1 : 2. Het homogeniseren nam

$2 \times \frac{1}{2}$ min. in beslag.

Het extractiemengsel werd daarna in een scheitrechter gebracht en er werd water en chloroform toegevoegd tot de verhouding 1.8 : 2 : 2 bereikt was. Hierbij ontstaat een twee-fasisch systeem. Het mengsel werd meermalen goed geschud en bij 4° C gezet tot een duidelijke fase-scheiding verkregen was. De aanwezige pigmenten scheidden zich over de 2 fasen: de methanol-waterfase had een blauwgroene kleur en de chlorophormfase een sterk gele kleur. De (onderste) chlorophormfase werd afgetapt en in een voorgewogen kolfje met slijpstuk aan een Büchi-indamper drooggedampt in vacuo bij een temperatuur beneden de 45° C. Dit was de totaal-lipid (+pigment) fractie.

Deze totaal-lipidfractie werd nu kwalitatief geanalyseerd op de aanwezigheid van de verschillende lipidklassen. Dit werd gedaan met behulp van dunnelaagchromatographie op silicagel-G-dunnelaag platen zonder fluoresceïne (Baker en Merck). De silicagelplaat werd geactiveerd door hem tenminste 1 uur bij 110° C in een droogstoof te leggen en daarna monsters en referenties (opgelost in chloroform) opgebracht met behulp van een geijkt glascapillair (Camag kapillär pipet). De opgebrachte hoeveelheden varieerden van 20 μ g (referenties) tot 60 μ g (monsters). De plaat werd nu ontwikkeld in het loopmiddel petroleum-ether (60 tot 80°)-ether-mierenzuur 60 : 40 : 1.6 (opstijgend) gedurende 35 minuten. Bij het uitnemen werd het front direct met potlood aangegeven en de plaat bij kamertemperatuur aan de lucht gedroogd. De plaat werd nu bespoten met een oplossing van 0.05% Rhodamine-6G in water als detectiemiddel. De plaat werd (nog nat) bekeken onder U.V. licht bij de golflengten 254 en 366 μ m en de vlekken omcirkeld. In dit systeem vinden we de volgende RF's (RF = rate of flow = afstand van opbrengstpunt tot de vlek, gedeeld door de afstand van het opbrengpunt tot het loopfront) voor de verschillende lipidklassen:

RF	lipidklasse	RF	lipidklasse
0	fosfolipiden	0,61	vrije vetzuren
0,09-0,1	monoglyceriden	0,90	triglyceriden
0,41	diglyceriden (1-3)	0,97	koolwaterstoffen en
0,45	diglyceriden (1-2)		cholesterolesters
	en cholesterol		

De aanwezigheid van cholesterol en cholesterolesters werd nog eens apart gecontroleerd door een strook van de plaat te bespuiten met een oplossing van 25% trichloorazijnzuur in water, dit 10 min. bij 110° C te verhitten en dit onder U.V. licht te bekijken: deze verbindingen vertonen geelgroen oplichtende vlekken tegen een paarse achtergrond.

Uit het kwalitatieve onderzoek blijkt dat zowel in de huidspierzakfractie als in de darm + chloragogeënweefselfractie de structuurlipiden (koolwaterstoffen, fosfolipiden, cholesterol en cholesterolesters, zie Fig. 6) sterk overwegen. Vooral de fosfolipiden waren zeer sterk vertegenwoordigd, zodat het voordelen had eerst de fosfolipiden te verwijderen voordat de kwalitatieve analyse werd doorgevoerd (zie Schema II). Naast de structuurlipiden kunnen bij de huidspierzakfractie in veel geringere hoeveelheden triglyceriden en vrije vetzuren worden aangetoond (Fig. 6). Bij de darm + chloragogeënweefselfractie konden naast de structuurlipiden vrije vetzuren, triglyceriden en diglyceriden worden aangetoond.

De fosfolipiden werden van de andere (neutrale) lipiden gescheiden door middel van neerslag met aceton bij -20° C volgens LIPSKI et al. (1957). Hiertoe werden de totaal-lipiden opgelost in zo min mogelijk (meestal 1 ml) petroleumether (60 tot 80°) en werd hier 30 ml aceton aan toegevoegd, die tenminste 2 dagen in een vrieskast bij -20° C had gestaan. De fosfolipiden sloegen neer. Het supernatant dat de neutrale lipiden bevatte werd voorzichtig afgeschonken en de gehele behandeling naar behoefte nog 1-2 maal herhaald. De neergeslagen fosfolipiden

konden worden afgefiltreerd over diatomeeënaarde (Celite nr. 503). De vloeistof met de neutrale lipiden werd, evenals de phospholipiden, met behulp van een Büchi rotavapor in een voorgewogen kolfje in vacuo ingedampt bij een temperatuur lager dan 45°C . Bij de quantitative analyse van de lipidklassen van de neutrale lipiden werd in eerste instantie getracht, de boven beschreven dunnelaagmethode te quantificeren volgens AMENTA (1964). Deze methode berust op de oxydatie van het materiaal van de vlekken door een oplossing van bichromaat in zwavelzuur. Het restant van het biochromaat wordt dan bepaald. Deze restbepaling van bichromaat is een factor 40 gevoeliger dan het bepalen van de ontstane gereduceerde vorm.

Na het chromatograferen werd de aan de lucht gedroogde dunnelaagplaat in 30 min. bij 100°C verhit om de laatste sporen mierenzuur er uit te verwijderen. Daarna werd een strook van het chromatogram met de Rhodamine-6G oplossing bespoten, terwijl de rest van de plaat met aluminiumfolie was afgedekt. In de banen van de andere opbrengpunten werd op dezelfde hoogte een oppervlakte ter grootte van een muntstuk afgekrabd en in een buisje met ingeslepen glazen stop gebracht en fijngemaakt. Hieraan werd nu 3 ml van een oplossing van bichromaat in geconcentreerd zwavelzuur (7.5 g bichromaat per l) toegevoegd. Na goed mengen werden de buisjes gedurende 45 min. in een kokend waterbad verhit. Daarna werden de buizen in stromend water gekoeld, het silicaat afgecentrifugeerd bij 15500 g gedurende 10 min., en werd $\frac{1}{2}$ ml van de bichromaat oplossing tot 20 ml verdund met gedestilleerd water. Deze verdunde oplossing werd spectrophotometrisch bepaald bij 350 μm . Het toepassen van de boven beschreven methode leverde grote moeilijkheden op. In de eerste plaats bleken de afgekrabde vlekken+silicaat, evenals de silicaatblanco's, het bichromaatreagens in de oorspronkelijke concentratie (2.5 g biochromaat per l geconcentreerd zwavelzuur)

volledig te reduceren. Dit werd waarschijnlijk veroorzaakt door het plakmiddel, dat in de silicagel verwerkt is, waarvan de samenstelling niet wordt opgegeven (bedrijfsgeheim). Door de concentratie van het bichromaat in het reagens tot het drievoudige te verhogen kon een voldoende bichromaatoverschot boven de blanco worden verkregen. Een tweede moeilijkheid was, dat per experiment wel rechte ijklijnen verkregen konden worden maar deze bleken niet goed reproduceerbaar. Bovendien was de gevoeligheid van de gewijzigde methode de helft minder dan zoals die oorspronkelijk was beschreven. Daar vermoed werd, dat zeer kleine silicageldeeltjes die bij het centrifugeren niet werden neergeslagen, een rol konden spelen bij de verkregen wisselende resultaten, werd silicagel, gesuspenderd in chloroform, na het centrifugeren gefiltreerd door een glasvezelfilter (GF-C), en daarna indampd in een voorgewogen centrifugebuisje. Dezelfde procedure werd uitgevoerd met een bacterieglasvezelfilter (GF-F). Geconstateerd moest echter worden dat in alle gevallen een restant van wisselend gewicht overbleef. Het filter alleen leverde geen gewichtsvermeerdering van de buizen op na indamping. Dit verschijnsel maakte ook een eventuele gravimetrische bepaling van lipiden na eluering van het silicagel zeer moeilijk. Het restant is niet het plakmiddel van de silicagelplaten, daar ook een plaat gemaakt met silicagel zonder bindemiddel sterk wisselende resultaten opleverde. Ofschoon het dus niet mogelijk bleek de lipidklassen quantitatief te bepalen met de scheiding door middel van dunnelaagchromatografie als uitgangspunt, bleek het wel mogelijk de neutrale lipiden te scheiden met behulp van kolomchromatografie volgens CAROLL (1961). Op een kolom Florisil (geactiveerd magnesiumsilicaat) werd het opgebrachte neutrale lipid gefluëerd in verschillende lipidklassen door loopmiddelen van toenemende polariteit door te leiden.

25 g Florisil werd geactiveerd door het gedurende 24 uur bij 200° C in een droogstoof te plaatsen. Na afkoelen in een exsiccator werd het

in een erlenmeyer met geslepen stop gedaan, werd 1.75 ml water toegevoegd en het geheel gesloten overnacht bij kamertemperatuur bewaard. De volgende dag werd het goed geschud.

De nu volgende experimenten vonden plaats in een koelcel bij een constante temperatuur van 5.5°C . Een geheel glazen kolom, $1.9 \times 40\text{ cm.}$, werd voor de experimenten gebruikt. Op de glassinterplaat werd een schijfje glasvezelfilter (GF-C) gebracht, met dezelfde diameter als de kolom. De kolom werd gevuld met petroleumaether ($60\text{ tot }80^{\circ}$) en de Florisil met kleine beetjes tegelijk er in gebracht, zorgend dat er geen luchtbelllen in de kolom ontstaan. Daarna werd op de top van de Florisil kolom eveneens een GF-C. schijfje gelegd en het vloeistofniveau tot dit punt omlaag gebracht. Het monster neutrale lipiden, opgelost in een zo gering mogelijk volume petroleumether ($60\text{ tot }80^{\circ}$) werd op de kolom gebracht. Daarna werden per 450 mg neutraal lipid de volgende loopmiddelen in deze volgorde doorgeleid:

elutievloeistof	vol(ml)	geëlueerde componenten
petroleumether $60-80^{\circ}$	200	koolwaterstoffen
petr.eth. $60-80^{\circ}+5\%$ ether	250	sterolesters
petr.eth. $60-80^{\circ}+15\%$ ether	250	triglyceriden
petr.eth. $60-80^{\circ}+25\%$ ether	400	sterolen
petr.eth. $60-80^{\circ}+50\%$ ether	300	diglyceriden
ether + 2% methanol	400	monoglyceriden
ether + 4% azijnzuur	200	vrije vetzuren

De hoeveelheid loopmiddel werd evenredig aangepast aan de hoeveelheid opgebracht neutraal lipid; de hoeveelheid Florisil werd tot de helft van de opgegeven hoeveelheid verminderd. De loopvloeistof werd door een slangepomp (LKB 12000 varioperpex peristaltic pump) doorgevoerd (90 ml/uur), die verbonden was met een BTL fraction collector, die voorzien was met voorgewogen reageerbuizen; de fraction collector was afgesteld op 3.5 ml per buis. Het indampen van de buizen gaf aanvankelijk

enige moeilijkheden. Indampen op een waterbad in een droogstoof bij 40° C leverde slechte resultaten op. Tenslotte werd gekozen voor stikstof-doorleiding via een multi-slangverdeler en pasteurpipetten bij kamertemperatuur. De drooggedampte reageerbuizen werden teruggewogen. Er werden 2 experimenten gedaan, met neutrale lipiden van de huidspierzakfractie en van de darm + chloragogeefractie van grote wormen. De resultaten werden omgerekend per g drooggewicht (zie IV.4).

c. Eiwitten

Voor de bepaling van eiwitten werd uitgegaan van het verzepte mengsel, verkregen in de eerste fase van de glycogeenbepaling (zie aldaar). Een halve ml van het afgecentrifugeerde verzepingsmengsel werd met gedestilleerd water verdund tot 200 ml. Na goed mengen werd in drievoud met 1 ml het eiwit bepaald volgens LOWRY et al. (1951). De bepaling berust op een blauw-paarse kleurvorming tussen ringverbindingen van aminozuren in het eiwit (tyrosine en phenylalanine) en het koperreagens met het reagens van Folin-Ciocalteu (Merck). Het koperreagens was als volgt samengesteld:

A. 2% natriumcarbonaat in 0.1 N natriumhydroxyde

B. 0.5% kopersulfaat (gehydrateerd) in 1% kaliumnatriumtartraat.

50 ml A + 1 ml B bijeenvoegen.

De bepaling werd als volgt uitgevoerd: in reageerbuizen wordt bij 1 ml monster (dat tussen 20 en 80 µg eiwit per ml moet bevatten) 5 ml van het koperreagens gevoegd, op de whirlmix gemengd, in het donker bij kamertemperatuur gedurende 10 min. weggezet. Daarna wordt 0.5 ml 1 : 1 met gedestilleerd water verdund Folin-Ciocalteu reagens toegevoegd. Na goed mengen op de whirlmix worden de buizen gedurende 30 min. in het donker bij kamertemperatuur weggezet. De gevormde blauw-paarse kleur werd afgelezen op een spectrophotometer bij 750 µm.

Het verdunde homogenaat zelf gaf geen hogere optische dichtheid dan de blanco van de albuminestandaard. Naast de proefbuizen werd een standaardlijn gemaakt met behulp van runderserumalbumine van 0 - 100 µg/ml (Fig. 7).

De hoeveelheid eiwit per g weefsel (natgewicht) werd berekend met behulp van de formule:

$$\frac{1}{\text{gewicht in g}} \times \frac{\text{volume verzeeft mengsel in ml}}{\frac{1}{2}} \times \frac{400}{\text{verdunningsfactor}} \times \mu\text{g gevonden eiwit}$$

µg eiwit per g natgewicht.

Deze resultaten werden omgerekend per g drooggewicht (zie IV.4). Wanneer de resultaten van de eiwitbepalingen op het drooggewicht werden omgerekend, werd in een deel van de bepalingen uitgekomen op waarden die hoger kwamen dan 100%. Vermoed werd dat dit veroorzaakt zou worden door deelname van pigment(en) aan de kleurreacties, die een ringverbinding bevatten. Getracht werd daarom, eveneens een eiwitbepaling te doen met behulp van de biureetreactie. Dit werd gedaan met een totaalpakket voor deze reactie van Boehringer (Mannheim), volgens voorschrift van Boehringer. Deze reactie is echter een factor 60 minder gevoelig dan de reactie met het Folin-Ciocalteureagens, zoals blijkt uit het onderstaande:

albuminestandaard 0-100 µg eiwit, bepaald volgens Folin-ciocalteu:

Optische dichtheid 0.025-0.29

albuminestandaard 0-6000µg eiwit, bepaald met biureetreactie:

Optische dichtheid 0.032-0.34.

De biureetmethode was te weinig gevoelig om met het tot 1:400 verdunde verzepingsmengsel te kunnen gebruiken. Het onverdunde verzepingsmengsel bleek echter niet geleidelijk met 6 N HCl onder mengen geneutraliseerd te kunnen worden, daar neerslag optrad. Naast de hoge pH zou echter, vooral bij de oudere wormen, de donkere kleur de bepaling

wellicht onmogelijk hebben gemaakt. Daar de structuur van de pigmenten nog niet bekend is, kan de eventuele invloed daarvan op de kleurvorming niet worden aangegeven.

4. Bepaling drooggewichten

Van dieren die na een nacht in de ijskast $\pm$ 90% van het zand in hun darm verloren hadden (zie IV.1) werden de huidspierzakfractie en de darm + chloragogeenweefselfractie afzonderlijk verzameld en het natgewicht bepaald. Daarna werden zij op voorgewogen Petrischalen in een droogstoof bij 60° C gedurende 3 etmalen verwarmd. Na afkoelen werd opnieuw het gewicht bepaald. In verband met de aanwezigheid van zand, vooral in de darm + chloragogeenfractie, werd ook het asvrij drooggewicht bepaald. Het monster werd daartoe in een voorgewogen, uit aluminiumfolie vervaardigd bakje, dat in een porseleinen bakje geplaatst was, in een verbrandingsoven gedurende 3 uur bij 550° C verhit en na afkoeling in een exsiccator opnieuw gewogen. In het begin van het onderzoek werden geen resultaten hiermee verkregen, omdat de bodem van het aluminium bakje oxydeerde, zodat er gaten in vielen. Door de temperatuur van 600° C tot 550° C te verlagen werden goede resultaten verkregen.

5. Groei

De levengewichten van de uit een vangst afkomstige dieren werden in klassen van 0.5 g ingedeeld en de aantallen per klasse uitgezet in een blokdiagram. De aldus verkregen gewichtsverdeling werd op waarschijnlijkheidspapier uitgezet en de toppen van de verdelingen bepaald.

V. RESULTATEN VAN HET EIGEN ONDERZOEK

1. Voortplanting

Zowel kleine wormen (1-2 jaar oud, minder dan 2 g) als grote wormen (meer dan 3 jaar oud, meer dan 2.5 g) werden uit elk monster onderzocht

op aanwezigheid van geslachtscellen in het coclooom. Per monster werden van de kleine wormen er ongeveer 40 onderzocht, van de grote wormen 30. Het aantal dieren dat manlijke geslachtscellen (spermadisci), vrouwelijke geslachtscellen (eieren) of geen geslachtscellen bevatte, werd in procenten van het totaal aantal onderzochte dieren uitgedrukt. De resultaten zijn uitgedrukt in Figs 8 en 9.

Opvallend was, dat bij de kleine wormen, die in hun tweede levensjaar waren, het aantal kleine, weinig ontwikkelde eieren vrij hoog was. Als percentage van het totaal aantal dieren met eieren was het bij de kleine wormen in alle monsters boven de 50% en in 2 gevallen 100%. Bij de grote wormen lag dit percentage veel lager, omstreeks 20 tot 30%. De grotere wormen bevatten niet alleen grotere, meer ontwikkelde eieren, ook het aantal eieren was veel groter. In verband met de tijd konden hierover echter geen tellingen en metingen worden gedaan.

In één geval werden de grootte van zowel eieren als spermadisci van 2 grote wormen gemeten, en wel op 3 oktober 1973, dus ruim een maand voor de paaitijd. De geslachtscellen zullen dus vrijwel volgroeid zijn geweest. De grootte van de eieren werd bepaald op 0.171 ± 0.028 (s.d.) mm ($n = 25$) en de grootte van de spermadisci op 0.048 ± 0.016 (s.d.) mm ($n = 24$).

Zowel in 1973 (de periode van 9 tot 20 november) als in 1974 (de periode van 29 oktober tot 13 november) werd een zeer snelle daling van het percentage aanwezige geslachtscellen tot nul waargenomen in de monsters opgegraven dieren. Deze paaitijd in de herfst komt overeen met de opgaven in de literatuur (Tabel I). Na deze paaitijd neemt het aantal grote dieren met ongeveer 75% af. Of deze dieren na het paaien sterven, dan wel of ze naar andere gebieden trekken, is niet bekend.

Bij de kleine wormen stijgt het percentage dat geslachtscellen bevat van eind mei tot eind juli geleidelijk van ongeveer 30% tot

ongeveer 80%. Daarna treedt echter een geleidelijke daling op van het percentage wormen met geslachtscellen tot een percentage van 10 tot 20% eind oktober, waarna een vrij abrupt einde tot 0% volgt.

Bij de grote wormen ziet men een geheel ander beeld. Reeds midden juni is het percentage wormen dat geslachtscellen bevat tot boven de 80% gestegen, waarna een langzame verdere stijging optreedt tot 97% begin september. De toename van het percentage dieren met manlijke geslachtscellen stijgt in deze periode geleidelijk van 20% tot ongeveer 50% begin september. Het percentage dieren met eicellen is echter reeds begin juni 60% en neemt tegen begin september iets af tot 50%. Na begin september vindt een sterke daling van het percentage dieren met manlijke geslachtscellen plaats tot minder dan 20%, gevolgd door een stijging tot 50% eind oktober. Bij de dieren met eicellen is dit niet het geval; er is in deze periode een zeer geleidelijke daling tot 40%. Tussen 6 en 13 november treedt een zeer snelle afname van de dieren die geslachtscellen bevatten op tot 0%. De aantallen wormen, grote en kleine, per monster waren in de periode tot medio september ongeveer even groot. Daarna, en vooral na eind oktober na het paaien, treedt een duidelijke daling in het aandeel van de aantallen grote wormen in het totaal op tot een percentage van 11 tot 13%. Daar de grote wormen veel meer eieren bevatten dan de kleine wormen en daarbij de grote wormen in tegenstelling tot de kleine een zeer snelle daling van het aantal dieren dat geslachtscellen bevat optreedt in een kort tijdsbestek, zijn vooral de grote wormen bepalend voor het beeld van de "paaitijd" dat een *Arenicola* populatie oplevert.

2. Reserve stoffen

a. Glycogeen

De gevonden hoeveelheden glycogeen in de huidspierzakfractie en in de darm + chloragogeenfractie werd voor jonge zowel als voor oude wormen

per gram asvrij drooggewicht uitgedrukt uitgezet tegen de tijd (Fig. 10 en 11). De kleine wormen waren in september 1973 in hun eerste levensjaar. Ze waren toen nog niet geslachtsrijp, in geen enkel dier werden geslachtscellen gevonden. Dit is in overeenstemming met de literatuur (zie inleiding). In het volgende (tweede) levensjaar verschijnen in mei de geslachtscellen in het coeloom.

Opvallend is dat in de darm+chloragogeefractie in september 1973 hoge waarden optraden, tot 155 mg/g drooggewicht. In oktober trad een snelle daling op van het glycogeengehalte van deze fractie tot een niveau van ongeveer 40 mg/g drooggewicht, hetgeen gedurende de winter zo bleef en medio april opliep tot 50 mg/g asvrij drooggewicht. Dan treedt in mei een zeer sterke daling op tot 5 mg/g asvrij drooggewicht (10% van eerdere waarde), waarna tot september 1974 een geleidelijk herstel optreedt tot ongeveer 20 mg/g asvrij drooggewicht.

De huidspierzakfractie toont een veel gelijkmatiger beeld, met een maximum van 30 mg/g asvrij drooggewicht en een minimum van 14 mg/g asvrij drooggewicht in de periode september 1973 - april 1974. Ook hier vindt een duidelijke daling plaats in mei tot 9 mg/g asvrij drooggewicht (40% van eerdere waarde) en daarna een geleidelijke stijging tot september 1974.

De grote wormen hadden een leeftijd van 3 jaar of ouder (zie hoofdstuk "groei" V. 4.). Hier is een ander beeld te zien, met name wat de darm+chloragogeefractie betreft. In de periode september 1973 - april 1974 is het glycogeengehalte van de darm+chloragogeefractie en de huidspierzakfractie even hoog, ongeveer 20-25 mg/g asvrij drooggewicht. In mei zien we ook hier een sterke daling van het glycogeengehalte van zowel de darm + chloragogeefractie als van de huidspierzakfractie (respectievelijk tot 27% en 44% van de eerdere waarde), waarna een geleidelijke stijging optreedt en het niveau van voor april weer ongeveer bereikt wordt.

Het verschijnsel dat de darm + chloragogeefractie een duidelijk hoger gehalte aan glycogeen vertoont dan de huidspierzakfractie doet zich blijkbaar alleen in de eerste $1\frac{1}{2}$ jaar van het leven van *Arenicola* voor, dat wil zeggen tot het moment waarop bij het dan geslachtsrijp geworden dier de geslachtscellen in het coeloom verschijnen. Na de sterke daling van het glycogeengehalte in mei treedt een geleidelijk toename op, waarbij de glycogeengehalten van de darm + chloragogeefractie en de huidspierzakfractie parallel en vrijwel gelijk lopen. De jonge wormen gaan blijkbaar hier het patroon volgen dat voor de oude, geslachtsrijpe dieren geldt.

Met uitzondering van de hoge waarden van het darm + chloragogeefractie weefsel in de jonge dieren in september en oktober 1973 zijn de glycogeengehalten van *Arenicola* vrij laag. Als men de waarden uitdrukt als procenten van het totale asvrije drooggewicht verkrijgt men:

Huidspierzakfractie jonge wormen	0,72-3,14%
Darm + chloragogeefractie jonge wormen	0,71-5,71%
Huidspierzakfractie oude wormen	1,16-2,96%
Darm + chloragogeefractie oude wormen	1,25-3,25%

b. Lipiden

Op vier tijdstippen in 1974, nl. 4 februari, 13 maart, 30 mei en 23 juli werden de totaal-lipiden bepaald in de huidspierzakfractie en de darm + chloragogeefractie van zowel jonge als oude wormen. Per experiment werden van de oude wormen gemiddeld 17 exemplaren, van de jonge wormen gemiddeld 12 exemplaren gebruikt. De resultaten zijn weergegeven in Fig. 12.

In het darm + chloragogeefractie weefsel is altijd meer lipid aanwezig (in mg per g asvrij drooggewicht) dan in de huidspierzak. Bij de oude wormen is dit een factor 1,5-4,2, bij de jonge wormen een factor 2.

De huidspierzakfractie bevat sterk gele pigmenten, de darm + chloragogeefractie bevat duidelijk minder van deze pigmenten. De oudere

dieren bevatten veel meer gele pigmenten dan de jonge dieren.

De hoeveelheid totaal-lipid in de weefsels van *Arenicola* is gering. Uitgedrukt als het percentage lipiden van het totale asvrij drooggewicht, geven deze bepalingen het volgende resultaat:

Huidspierzakfractie grote wormen	3,5--6,2%
Darm + chloragogeefractie grote wormen	5,4--26,2%
Huidspierzakfractie kleine wormen	5,2--8,0%
Darm + chloragogeefractie kleine wormen	10,8--15,9%

De hoeveelheid phospholipid op de totale hoeveelheid lipid werd bepaald in 2 experimenten, in de totaal-lipidfracties van 30 mei en 23 juli 1974, en de resultaten zijn weergegeven in Tabel II. In de huidspierzakfractie, zowel bij grote als bij kleine wormen, bedraagt het percentage phospholipiden ongeveer 70% van het totaal. In de darm + chloragogeefractie liggen de percentages veel lager, bij de grote wormen 44--54% en bij de kleine wormen 34%. In Tabel III wordt een vergelijking gemaakt met de resultaten van VAN DER HORST (1972) met *Cepaea nemoralis* (L) (Mollusca, Gastropoda), welke lipiden uit het gehele dier gezamenlijk werden verkregen. Men dient bij de vergelijking te beseffen, dat de totale hoeveelheid weefsel in de huidspierzakfractie ongeveer een factor 4 groter is dan dat van de darm + chloragogeefractie.

De laatste verkregen fracties van neutraal-lipid van 23 juli 1974 werd gebruikt voor de kolomscheiding. Hiertoe werd van de grote wormen de huidspierzakfractie (93 mg neutraal lipid) en de darm + chloragogeefractie (86,5 mg neutraal lipid) gebruikt. De resultaten zijn weergegeven in Fig. 13 en 14.

Er kon een redelijke scheiding tussen de verschillende lipid-klassen worden verkregen. De gebruikte hoeveelheid neutraal-lipid is voor deze methode wat klein; de resultaten zouden met een grotere hoeveelheid materiaal duidelijker zijn geweest (VAN DER HORST (1972) gebruikte 450 mg voor een kolom). Bij de laatste twee fracties (monoglyceriden en vrije vetzuren) zijn gele pigmentfracties aanwezig van

onbekende hoeveelheid en structuur. De bepaalde hoeveelheid in deze fracties zijn dus hoogstwaarschijnlijk veel te hoog.

Opvallende verschillen tussen de lipidsamenstelling van de huidspierzakfractie en de darm + chloragogeenfractie zijn: de aanwezigheid van koolwaterstoffen in de huidspierzakfractie en de afwezigheid hiervan in de darm + chloragogeenfractie; meer triglyceriden in de darm + chloragogeenfractie vergeleken met de huidspierzakfractie, en meer diglyceriden in de huidspierzakfractie, vergeleken met de darm + chloragogeenfractie.

De verschillende lipidklassen, uitgedrukt in procenten van de totale hoeveelheid neutraal lipid voor zowel de huidspierzakfractie als de darm + chloragogeenfractie is weergegeven in Tabel IV. De verkregen resultaten worden hier tevens vergeleken met die welke door VAN DER HORST (1972) werden verkregen bij *Cepaea nemoralis*, die uit het gehele dier werden verkregen. Het blijkt dat *Cepaea* meer koolwaterstoffen, sterolesters en vooral sterolen heeft dan *Arenicola*. De hoeveelheid diglyceriden is echter veel geringer dan bij *Arenicola*, terwijl het verschil tussen de fracties monoglyceriden en vrije vetzuren in beide dieren waarschijnlijk aan het pigmentgehalte van deze fracties bij *Arenicola* moet worden toegeschreven. De hoeveelheid pigment in de fractie van de neutrale lipiden wordt door VAN DER HORST gevonden op 8,4% van het totaal. Daar bij *Arenicola* vooral de oude wormen sterk gepigmenteerd zijn, mag verwacht worden dat het percentage pigment hier hoger zal zijn dan 8,4%.

Over de pigmenten in *Arenicola marina* is enig onderzoek verricht. VAN DUYN (1951) onderscheidde tenminste 3 pigmenten. (1) Een groen pigment, dat in korrels in de epiteelcellen voorkomt werd door hem arenicochroom genoemd. De totaalformule hiervan werd als kaliumzout bepaald op $C_{21}H_{15}S_{20}I_4K_3$ (VAN DUYN, HAVINGA & LIGNAC 1951). (2) Een geelbruin tot donkerbruin pigment, dat in korrels in het bindweefsel aanwezig is en wat morphologisch en histochemisch de eigenschappen van

een melanine vertoont. (3) Een geel pigment, wat diffuus verspreid is, en door de huid (o.a. bij het hanteren van *Arenicola*!) wordt uitgescheiden. Het zou dit laatste pigment kunnen zijn wat in de lipidfractie aanwezig is.

c. Eiwitten

De gevonden eiwitgehalten, uitgedrukt in procenten van het natgewicht, zijn hieronder weergegeven:

Huidspierzakfractie grote wormen	20,6%	
Darm + chloragogeefractie grote wormen	18,3%	6 bepalingen
Huidspierzakfractie kleine wormen	15,7%	
Darm + chloragogeefractie kleine wormen	13,3%	7 bepalingen

Het darm + chloragogeefweefsel bevat minder eiwit per gewichtseenheid dan de huidspierzakfractie. Dit verschil bedraagt bij de grote wormen 2,3%, bij de kleine wormen 2,4%. Dit verschil houdt verband met het verschil in watergehalte van beide weefsels (zie V. 3.), gedeeltelijk met de opslagfunctie voor reservestoffen die de chloragogeencellen vervullen.

De kleine wormen bevatten duidelijk minder eiwit per gewichtshoeveelheid dan de grote wormen. Dit houdt verband met het verschil in watergehalte van de weefsels (zie V. 3.) en zou verband houden met het grote verschil in pigmentgehalte tussen oude en jonge wormen.

Wanneer de gevonden waarden aan eiwit per gewichtshoeveelheid natgewicht omgerekend worden op asvrij drooggewicht, vindt men getallen die boven de 100% uitkomen, hetgeen wijst op te hoge waarden voor eiwit. Zoals in het hoofdstuk methodieken reeds vermeld werd, houdt dit verband met de grote hoeveelheid pigment.

Wanneer men de geringe hoeveelheid aanwezige reservestoffen in aanmerking neemt en de asvrije drooggewichten van de weefsels (zie V. 3.), dan kan gesteld worden dat de eiwitbepalingen in grote lijnen een

bevestiging geven van deze resultaten.

3. Drooggewichten

De asvrije drooggewichtsbepalingen, uitgedrukt als procent van het natgewicht, zijn weergegeven in Fig. 15. De gemiddelden van deze bepalingen geven het volgende resultaat:

Huidspierzakfractie grote wormen	16,9%
Darm + chloragogeefractie grote wormen	16,0%
Huidspierzakfractie kleine wormen	15,3%
Darm + chloragogeefractie kleine wormen	14,0%

Hieruit blijkt dat het darm + chloragogeefweefsel meer water bevat dan de huidspierzak; het verschil bedraagt respectievelijk voor de grote wormen 0,9% en voor de kleine wormen 1,3%. Tevens blijkt dat kleine wormen een hoger watergehalte hebben in beide weefsels dan grote wormen. De verschillen bedragen voor de huidspierzak 1,6% en voor de darm + chloragogeeffractie 2,0%.

Uit Fig. 15 blijkt, dat in de loop van het seizoen weinig variaties in het asvrij drooggewicht optreden. Dit zou alleen te verwachten zijn bij sterke variaties in de saliniteit van het water, hetgeen op de monsterplaats echter slechts bij uitzondering voorkomt.

4. Groei

De hoogste piek in de gewichtsverdeling werd als verwachtingswaarde voor de groei genomen. Verwacht kan immers worden dat een monster opgespitte wormen per generatie meer of minder een normale verdeling benadert.

Uit de verdelingen (Fig. 17) blijkt, dat de jaarklasse geboren in november 1972 op het NIOZ-wad, een sterke jaarklasse was. Mede omdat deze voor het glycogeenonderzoek nodig was, werd de groei van deze jaar-klasse gevolgd van september 1973 tot mei 1975. De monsters van de winter 1973 bevatten te kleine aantallen wormen, dan dat zij met behulp van waarschijnlijkheidspapier geanalyseerd konden worden.

Wanneer men de hoogste piek (met een piekbreedte van $1/4$ g of $\frac{1}{2}g$) tegen de tijd uitzet, verkrijgt men een beeld als Fig. 17. In totaal werden in de bovengenoemde periode 26 monsters genomen. Uit Fig. 16 blijkt dat groei optreedt vanaf medio april tot medio oktober, en dat in de winter de groei stilstaat. Als men dit vergelijkt met de zeewatertemperaturen in deze periode (Fig. 16), dan blijkt dat de groei optreedt bij temperaturen boven de $10^{\circ}C$, terwijl bij temperaturen hier beneden de groei vrijwel stopt. De onregelmatigheden in Fig. 16 kunnen verklaard worden doordat tussen de monsters verschillen kunnen optreden. Echter ook kunnen bepaalde onregelmatigheden door levensverschijnselen verklaard worden. De sterke stijging in de maand mei kan worden verklaard doordat juist dan de geslachtscellen in het coeloom vrijkomen. Het inzakken van de groeilijn in de winter zou kunnen wijzen op een ongunstige anabolisme-katabolisme verhouding bij de dan heersende temperatuur.

Men kan de pieken, in plaats van tegen de tijd, ook uitzetten tegen het aantal daggraden ($^{\circ}D$). Hieronder wordt verstaan het product van de gemiddelde temperatuur over een bepaald tijdsbestek, bijv. een maand, en het aantal dagen binnen dat tijdsbestek. Dit is toegepast in Fig. 18.

VI. DISCUSSIE

In 1974 werden in mei de eerste geslachtscellen in het coeloom aangetroffen, zowel in twee jaar oude als in oudere wormen. Dit is in overeenstemming met de literatuur (THAMDRUP, 1935; NEWELL, 1948; DUNCAN, 1949; SMIDT, 1951), evenals met waarnemingen van pierenspitters in de Mokbaai die in het voorjaar (mei-juni) gele geslachtsproducten in pieren aantreffen. Het viel op dat de eieren die bij de tweejarige wormen in de loop van de zomer en de herfst werden aangetroffen vaak klein en minder ontwikkeld waren. Het was niet na te gaan of het geleidelijk verdwijnen van deze eieren na juni door resorptie kwam, of dat ze werden uitgescheiden. Dat de wormen in hun tweede levensjaar geslachtsrijp worden is in overeenstemming met de literatuur (NEWELL, 1948; SMIDT, 1951; DUNCAN, 1960; CAZAUX, 1967).

Twintig procent van de kleine wormen heeft in het geheel geen geslachtsellen gehad; dit waren vooral de kleinsten van deze groep. In de wadbak van het NIOZ werd geconstateerd, dat *Arenicola* die in $\pm$ 10 maanden bij 16°C was gegroeid van het ei- of larvestadium tot ongeveer 6 g, geslachtsrijp waren. Na aanleiding hiervan is de veronderstelling gerechtvaardigd dat de geslachtsrijpheid niet alleen door de leeftijd bepaald wordt, maar ook door de grootte.

In de literatuur werd het paaien toegeschreven aan de invloed van drie factoren: een bepaalde temperatuurgrens, waar beneden (1) een duidelijke temperatuurdaling in een korte tijd optreedt; (2) een duidelijk verschil in hydrostatische druk optreedt (springtij).

In de populatie op het NIOZ-wad die in dit onderzoek werd bestudeerd, werden over twee paaitijden waarnemingen gedaan. In 1973 werd waargenomen, dat tussen 9 en 20 november de geslachtsellen uit het coeloom verdwenen. In deze periode trad springtij op te 12-13 november, en doodtij te 17 en 18 november. De gemiddelde zeewatertemperatuur, gemeten in de NIOZ-haven bij 't Horntje, daalde van $9,55^{\circ}\text{C}$ op 13 november tot $6,7^{\circ}\text{C}$ op 18 november, dat is $2,85^{\circ}\text{C}$ in 5 dagen. Dit valt dus ook binnen het tijdsverloop van het paaien.

In 1974 werd waargenomen, dat de grote wormen tussen 29 oktober en 13 november de geslachtsellen uit het coeloom uitstootten. In deze periode kwam springtij voor op $10,0^{\circ}\text{C}$ op 29 oktober tot $7,95^{\circ}\text{C}$ op 2 november, dat is $2,05^{\circ}\text{C}$ in 4 dagen. Beide verschijnselen vallen binnen het tijdsverloop, waarin het paaien moet hebben plaats gevonden.

Het samenvallen van springtij en het optreden van een temperatuurdaling van het water kan verklaard worden doordat met eb ongeveer 50% van het wad droogvalt, en het grote verschil in de oppervlakte die met water bedekt is met het getij sterke invloed heeft op de temperatuur van het water. Doordat de getijperiode 12 uur en 25 minuten is, treedt per dag een verschuiving van 50 minuten op in de tijden van eb en vloed.

Als midden overdag en midden 's nachts vloed optreedt, zijn de instraling en het verlies van warmte maximaal, dwz dat het netto effect op de temperatuur van het zeewater maximaal is. In het omgekeerde geval (midden overdag en midden 's nachts eb) zal het netto effect op de temperatuur van het water minimaal zijn. Deze tijdstippen verschillen ongeveer 7 dagen, dus er treedt een periode in de watertemperatuur op per 14 dagen. Dit zijn de frequenties van springtij (VUGTS & ZIMMERMAN 1975). Men zal bij de constatering, dat een bepaald levensverschijnsel samenvalt met springtij, rekening moeten houden met een gelijktijdig optreden van een duidelijke verandering in de zeewatertemperatuur. In de Waddenzee bestaat een grote invloed van de windsterkte en -richting op de waterhoogte. Deze invloed is duidelijker aanwezig dan het verschil tussen springtij en dood tij. Bij Den Helder bedraagt het getijverschil gemiddeld 1,30 m, het verschil tussen springtij en dood tij maximaal 40 cm. De invloed van de wind kan al gauw 50 cm verhoging of verlaging geven. In de Waddenzee zal er, gezien de toch al geringe verhoging bij springtij, geen duidelijk effect van de hydrostatische druk optreden. Daarentegen is er wel een duidelijke daling van de temperatuur te zien, samenvallend met springtij. Deze daling van de temperatuur nam een aanvang op een niveau dat beneden de 10°C lag, en bedroeg gemiddeld meer dan $0,5^{\circ}\text{C}$ per dag. Deze temperatuur "shock" zou wellicht de voornaamste stimulans tot paaien kunnen zijn geweest.

Bepaling over de hoeveelheid glycogeen in de weefsels van *Arenicola* werden tot nu toe verricht door VON BRAND (1927) en door DALES (1957, 1958). De door VON BRAND (1927) onderzochte dieren, die uit Napels afkomstig waren, zijn hoogstwaarschijnlijk geen *Arenicola marina* L geweest, daar deze soort niet bij Napels voorkomt. *Arenicola marina* L is gebonden aan een temperatuurgrens van 20°C (WELLS 1963). De wormen van VON BRAND zijn waarschijnlijk *Arenicola branchialis* AUDOIN et MILNE

EDWARDS 1838 geweest, of *Arenicola cristata* Stimpson 1856. De levenswijze van deze wormen komt echter overeen met *Arenicola marina* L., met het verschil echter dat, daar in de Middellandse Zee slechts geringe tijverschillen voorkomen, de wormen in het sublittorale gebied leven.

VON BRAND (1927) vond bij de door hem onderzochte dieren (in september) een hoeveelheid glycogeen van 0,38% van het natgewicht, overeenkomend met 4,8% van het asvrij drooggewicht. De gebruikte wormen hadden een gemiddeld gewicht van 1.34 g.

DALES vond in 1957 bij in april verzamelde *Arenicola marina* L. voor de huidspierzak 23,3 mg glycogeen/g natgewicht en voor het darm + chloragogeenweefsel 11,6 mg glycogeen/g natgewicht. Dit komt overeen met respectievelijk 141.4 mg/g asvrij drooggewicht en 72,5 mg/g asvrij drooggewicht. De huidspierzak van de gebruikte wormen wogen gemiddeld 3,8 g, de darm woog gemiddeld 0,6 g.

In 1958 vond DALES bij "kleine" wormen in oktober voor de huidspierzak 16,82 mg glycogeen/g natgewicht en voor de darm + chloragogeenweefsel 8,32 mg glycogeen/g natgewicht, dit is respectievelijk 99,5 en 52,0 mg glycogeen/g asvrij drooggewicht. Tezamen genomen blijkt dat DALES voor alle weefsels een hoeveelheid glycogeen vond van 0,8-2,3% van het natgewicht, en 5,2-14,1% van het asvrij drooggewicht.

Er bleek in DALES' onderzoek geen verband tussen de grootte van de onderzochte dieren (3,2-11,8 g) en de hoeveelheid in de huidspierzak aanwezige glycogeen (6,3-15,6 mg/g natgewicht).

De hoeveelheden glycogeen gevonden door DALES (1957, 1958) zijn veel hoger dan die, gevonden in dit onderzoek, voor zover afkomstig van wormen van meer dan 1 jaar oud (0,1-0,4% van het natgewicht), zij komen echter overeen met die van VON BRAND (1927). De redenen van dit verschil zouden in de bepaling van de glycogeen kunnen liggen. DALES bepaalde het glycogeen, na verzeeping in sterk loog en neerslag met alcohol, met behulp van de methode van HAGEDORN & JENSEN (1922).

Deze methode behelst, na hydrolysatie met zuur en neutralisatie, de oxidatie van de glucose met behulp van ferricyanide. Het overschot aan ferricyanide reageert nu met HJ, waarbij Jodium vrijkomt. Omdat deze reactie een evenwichtsreactie is, moet om de reactie te laten verlopen het ontstane ferrocyanide als zinkverbinding worden neergeslagen. Het ontstane Jodium wordt met natriumthiosulfaat getitreerd. Het is denkbaar een methode als de boven beschrevene, die ontworpen is om het suikergehalte van bloed te bepalen, niet zonder meer geschikt is om gehydrolyseerd glycogeen uit weefsels van wormen te bepalen, b.v. doordat verbindingen aanwezig zijn die de bepaling storen en zodoende glucosehoeveelheden simuleren die in werkelijkheid niet in het weefsel aanwezig zijn.

VON BRAND (1927) isoleerde het glycogeen en bepaalde het, na omkristalliseren, gravimetrisch.

Het duidelijke verband dat in dit onderzoek blijkt tussen het tijdstip van het verschijnen van de geslachtscellen in het coeloom (eind april - begin mei) en de plotselinge sterke afname van de hoeveelheid glycogeen in zowel de huidspierzak als in het darm + chloragogeenweefsel doet veronderstellen dat het glycogeen voor de groei van de geslachtscellen wordt gebruikt. Vooral de eerste tijd groeien de geslachtscellen snel en is de "drain" op de reservestoffen het grootst.

De in het darm + chloragogeenweefsel gevonden hoge glycogeenwaarden bij Arenicola's van minder dan twee jaar oud (21,8 mg/g natgewicht in september, 6-8 mg/g natgewicht in februari - april) liggen maximaal hoger dan die gevonden door DALES (1957, 1958). Na de eerste paaitijd van deze dieren vertonen de glycogeengehalten hetzelfde patroon als die van de oude dieren. De glycogeengehalten van de huidspierzak van deze jonge dieren echter ligt gedurende de gehele tijd op hetzelfde niveau als die van de oudere dieren (1-4 mg glycogeen/g natgewicht). Men kan zich afvragen, wat de reden is van deze hoge glycogeenconcentraties in

de darm + chloragogeenweefselfractie in het eerste levensjaar van *Arenicola*. Dit verschijnsel zou verband kunnen houden met de periode van droogliggen tijdens eb. DALES (1958) onderzocht het glycogeengehalte van de huidspierzak van "kleine" wormen (gewicht niet opgegeven) direct na de vangst, na 40 uur vasten, en na 40 uur vasten in een anaeroob milieu; dit laatste werd verkregen door stikstof door het water te leiden. De gevonden hoeveelheden glycogeen bedroegen respectievelijk 16,82 , 11,95 en 7,03 mg/g natgewicht, een daling met 29% en 58% ten opzichte van de uitgangswaarde. In de darm + chloragogeenweefselfractie bedroeg het verschil tussen het glycogeengehalte van pas gevangen dieren en dieren die 40 uur in een anaerobe omgeving hadden doorgebracht, respectievelijk 8,32 en 7,11 mg/g natgewicht, een daling van 14,5%. Al eerder was gebleken dat *Arenicola marina* het in een anaerobe omgeving lang kan volhouden: HECHT (1932) nam in een aquarium waar, dat *Arenicola* bij volledig ontbreken van zuurstof gedurende 6 dagen in leven bleef.

Het blijkt dus dat reeds bij een betrekkelijk korte tijd vasten het glycogeengehalte van de huidspierzak vermindert. Het is bekend, dat wormen in een bodem met een gering gehalte aan organisch materiaal in gewicht achteruit lopen; het is dus begrijpelijk dat bij een korte tijd van vasten de voorraad reservevoedsel wordt aangesproken. Bij anaerobie echter daalt in dezelfde tijd de hoeveelheid glycogeen in de huidspierzak met de dubbele snelheid. Dit wijst op een althans gedeeltelijk anaerobe stofwisseling van *Arenicola* tijdens het droogliggen. Nu bleek reeds dat de eenjarige dieren zich op een hoger deel van het wad bevinden ("broedwad") dan de oudere dieren (zie inleiding). Zij zullen dus met eb langer droogliggen, en zij lopen, eerder dan de oudere dieren, de kans dat zij een of meer getijden "overslaan" doordat door ongunstige omstandigheden, b.v. Oosten- of Zuidenwind een verlaging van de waterstand optreedt. De hoge hoeveelheid glycogeen in het darm + chloragogeenweefsel zou een energievoorraad kunnen zijn om dergelijke perioden te kunnen

overbruggen. Wanneer na het eerste levensjaar migratie optreedt naar lagere waddelen, zou deze extra reserve niet meer nodig zijn. Daar de wadpier met een levensjaar nog niet geslachtsrijp is, kan er geen verband met de vorming van geslachtscellen bestaan.

In de Mokbaai kon in de zomer van 1975 worden waargenomen, dat bij warm weer en geen wind jonge wormen van minder dan 1 jaar oud bij eb met de staart uit hun hol kwamen en deze een sinusoïde beweging vertoonden; dit zou kunnen wijzen op zuurstoftekort (luchtademhaling). Wanneer geen zuurstof in het milieu beschikbaar is kan de zuurstof gebonden in het bloed slechts korte tijd voorzien in de behoefte: ongeveer 7 minuten (ELIASSEN 1955) tot ongeveer 15 minuten (TOULMOND 1973). De laatste auteur toonde aan, dat bij wadpieren tijdens eb een duidelijke daling van de bloed-pH optreedt (pH 7,48-pH 7,35 in 4 uur) en een stijging van de pCO₂. De zuurstofdruk in het bloed is na 1 uur emersie al op zijn laagste punt aangeland. Hij veronderstelde dat anaeroob gevormde zure metabolieten tijdens emersie werden gevormd. DALES (1958) veronderstelde, dat deze metabolieten door de lichaamswand geëxcreteerd konden worden; resynthese tot glycogeen of verbranding achtte hij minder waarschijnlijk omdat BORDEN (1931) geen zuurstofschuld kon aantonen bij wadpieren, die tot twee uur in een anaeroob milieu waren geweest. DALES (1958) vond geen stijging van het lactaatgehalte in de huidspierzak en vrijwel geen lactaat in het omringende milieu. De anaeroob gevonde zure metabolieten zullen waarschijnlijk van andere aard zijn, b.v. welke COLES (1970) vond bij de in tropische moerassen levende worm *Alma emini*: azijnzuur, propionzuur, methylboterzuur.

De hoeveelheid gevonden totaal-lipid was gering: de huidspierzak bevatte 6,0-12,3 mg lipid/g natgewicht; de darm + chloragogeefractie 8,7-41,9 mg lipid/g natgewicht. DALES (1957) vond voor de huidspierzak 12,3 mg lipid/g natgewicht en voor de darm + chloragogeefractie 28,7 mg lipid/g natgewicht.

Deze geringe hoeveelheid maakt het al weinig waarschijnlijk, dat het lipid als reservestof een belangrijke rol zal spelen. De totale hoeveelheid lipide geeft, na het verschijnen van de geslachtscellen in het coeloom, geen daling te zien. De duidelijk hogere waarde van de hoeveelheid lipid in de darm + chloragogeenweefselfractie eind mei en de daling in juli vindt alleen bij grote vormen plaats.

De totale hoeveelheid lipid is, zowel bij grote als bij kleine vormen, per g drooggewicht in de darm + chloragogeenfractie hoger dan in de huidspierzak (zie Fig. 12). Hoewel de darm + chloragogeenfractie per g drooggewicht meer glyceriden bevat dan in de huidspierzak, en als dit orgaan waarschijnlijk wat meer gespecialiseerd is voor opslag van reservestoffen dan de huidspierzak (vgl. glycogeen bij jonge vormen), is de totale massa weefsel van de huidspierzak natuurlijk een factor 4 groter dan die van de darm + chloragogeenweefselfractie. Zo er al sprake is van depôtvet, zullen beide weefsels hierin een rol vervullen.

DALES (1957) vond bij *Arenicola*'s van ongeveer 3 g, die gedurende 6 weken gehongerd hadden, een stijging van de hoeveelheid lipide in de huidspierzak met 76% en in de darm + chloragogeenfractie met 331%. Ook dit wijst op een grotere specialisatie van de darm + chloragogeenweefselfractie voor opslag.

Anaeroob bewaren gedurende 48 uur bij 18°C gaf slechts een zeer geringe afname van de hoeveelheid lipide ("oil") te zien bij "grote" dieren (-2%) en een zeer geringe toename bij "kleine" dieren (+1,3%) (DALES 1958).

De asvrije drooggewichten gedurende de jaarcyclus zijn, zover gemeten, voor de betrokken organen vrij constant (zie Fig. 15). Dit is begrijpelijk in verband met de geringe hoeveelheden reservestoffen.

De blokdiagrammen over de aantal-gewichtsklassesamenstelling kunnen verder geanalyseerd worden volgens HARDING (1949) en CASSIE (1954). Wanneer een bepaalde populatie verscheidene generaties heeft,

zal, als men de gewichten of de lengte van de individuen in klassen indeelt en de aantallen per klasse tegen de klassen uitzet, per generatie een normale verdeling kunnen worden verwacht, als men een onbeperkt aantal dieren zou kunnen verzamelen. Daar het aantal dieren dat per keer verzameld werd uiteraard beperkt was (meest om en bij 150 stuks) kan slechts een benadering van een normale verdeling worden verwacht. Daar de groeisnelheid met de leeftijd en grootte afneemt zullen de normale verdelingen van de hogere jaarklassen steeds meer over elkaar gaan vallen. Het uiteenhalen van deze over elkaar vallende verdelingen en het bepalen van de grootte van elk van deze verdelingen kan op eenvoudige wijze worden bereikt met behulp van een graphische methode die gebruik maakt van waarschijnlijkheidspapier, die door de bovengenoemde auteurs wordt beschreven. In deze methode wordt het aantal dieren van elke klasse uitgedrukt als het percentage van het totaal aantal dieren. Deze percentages werden vervolgens tezamen met alle voorafgaande percentages per klasse weergegeven. Deze werden nu op waarschijnlijkheidspapier tegen de klassen uitgezet. De "knikken" in deze kurve werden aangegeven. Nu werden van elke sector de percentates zó omgerekend, dat zij een traject van nul tot honderd procent bestreken. Deze nieuwe percentages werden op dezelfde grafiek uitgezet. Deze blijken op rechte lijnen te liggen; aan de uiteinden komen afwijkingen voor als gevolg van de overlapping van de verdelingen, hiervoor kan gecorrigeerd worden (CASSIE 1954).

De loodlijnen uit de snijpunten van deze lijnen met de 50% verdelingslijn op de as waarop de klassen zijn uitgezet, geven de gewichten/lengten van de toppen van de verdelingen. Dit zijn dus de verwachtingswaarden van de verschillende jaarklassen per tijdseenheid. In dit onderzoek werd speciaal de jaarklasse, geboren in november 1972, gevolgd. Het resultaat is uitgezet in Fig. 16.

Over de maanden oktober, november 1973 en januari 1974 waren de

aantallen dieren per monster te gering om deze graphische methode te kunnen toepassen. Het blijkt dat gedurende de winter van 1973 de groei stilstond, en het is mogelijk dat er gewichtsverlies optrad. Een begin van groei treedt in 1974 op in de maand april bij watertemperaturen van 8 tot 11°C. De groei wordt in 1974 weer beëindigd in de maand oktober bij watertemperaturen van 9 tot 13°C. Groei vindt blijkbaar plaats als de watertemperatuur boven de 10°C stijgt; hier beneden vindt geen groei plaats. Een terugval in gewicht kan plaats hebben gevonden in de winter 1974-1975 (Fig. 16).

Het gemiddelde levensgewicht van de bestudeerde *Arenicola*-generatie van september 1973 tot april 1974 was 0,77 g; het gemiddelde gewicht van september 1974 tot april 1975 was 1,85 g, zodat in de zomer van 1974 (het tweede levensjaar) een gemiddelde groei van 1,08 g is opgetreden.

VII. LITERATUUR

- ALLEN, E.J., 1915. Polychaeta of Plymouth and the South Devon Coast. -- J. mar. biol. Ass. U.K. 10 : p. 592-646.
- AMENTA, J.S., 1964. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin layer chromatography. -- J. lipid Res. 5 : p. 270-272.
- ASHWORTH, J.H., 1904. *Arenicola*. -- L.M.B.C. Memoirs no. 11.
- BENHAM, J.H., 1893. The post-larval stage of *Arenicola marina*. -- J. mar. biol. Ass. U.K. 3 : p.47-52.
- BLEGVAD, H., 1923. Preliminary note on the eggs and larvae of *Arenicola marina* L. -- Vidensk. Medd. fra Dansk naturh. Foren. 76 : p. 1-3.
- BLIGH, E.G. & W.J. DYER, 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. -- Can. J. Biochem. Physiol. 37 : p. 911-917.
- BORDEN, M.A., 1930-1931. A study of the respiration and of the function of haemoglobin in *Planorbis corneus* and *Arenicola marina*. -- J. mar. biol. Ass. U.K. 17 : p. 709-738.

- BRAND, T.F. von, 1927. Stoffbestand und Ernährung einiger Polychäten und anderer mariner Würmer. -- Z. vergl. Physiol. 5 : p. 643-698.
- BRENNING, U., 1965. Beiträge zum Gonadenzyklus von *Arenicola marina* L (Annelida, Polychaeta) im Raum der Wismar-Bucht. -- Wiss. Z. Univ. Rostock, Math-Naturwiss. Reihe 14 : p. 633-643.
- CASSIE, R.M., 1954. Some uses of probability paper in the analysis of size frequency distributions. -- Austr. J. mar. freshw. Res. 5 : p. 513-522.
- CARROLL, K. K., 1961. Separation of lipid classes by chromatography on florisil. -- J. Lipid Res. 2 : p. 135-141.
- CAZAUX, C., 1967. Evolution d'une population d'*Arenicola marina* (L) à Arcachon. Cycle annuel--periode de reproduction. -- Bull. Stat. Biologique D'Arcachon, nouvelle série no. 19.
- CHAPMAN, G. & G.E. NEWELL, 1949. The distribution of lugworms (*Arenicola marina* L) over the flats at Whitstable. -- J. mar. biol. Ass. U.K. 28 : p. 627-634.
- COLES, G.C., 1970. Some biochemical adaptation of the swamp worm *Alma emini* to low oxygen levels in tropical swamps. -- Comp. Biochem. Physiol. 34 : p. 481-489.
- DALES, R.P., 1957. Preliminary observations on the role of the coelomic cells in food storage and transport in certain polychaetes. -- J. mar. biol. Ass. U.K. 36 : p. 91-110.
- , 1958. Survival of anaerobic periods by two intertidal polychaetes, *Arenicola marina* L and *Owenia Fusiformis* Delle Chiaje. -- J. mar. biol. Ass. U.K. 37 : p. 521-529.
- DUNCAN, A., 1960. The spawning of *Arenicola marina* L in the British Isles. -- Proc. zool. soc. Lond. 134 : p. 137-156.
- , N., 1949. Spawning of *Arenicola marina* in captivity. -- Ann. Rep. Mar. Biol. Sta., Port Erin (I. o. M.) nr. 62 : 27-30.

- DUYN, P. VAN, 1951. Arenicochroom, een nieuwe kleurstof uit *Arenicola marina* L. -- Dissertatie Rijksuniversiteit . Leiden.
- DUYN, P. VAN, E. HAVINGA & G. C.E. LIGNAC, 1951. Arenicochrome, a new pigment from *Arenicola marina* L. -- *Experientia* 7 : p. 376-377.
- EHLERS, E., 1892. Die Gehörorgane der Arenicolen. -- *Z. f. wiss. Zool.* 53 (suppl) : p. 217-286.
- ELIASSEN, E., 1955. The oxygen supply during ebb of *Arenicola marina* L in the Danish Wadden Sea. -- *Aarbok Univ. Bergen, Naturv. Rekke* nr 12.
- GABBOTT, P.A. & B.L. BAYNE, 1973. Biochemical effects of temperature and nutritive stress on *Mytilus edulis* L. -- *J. mar. biol. Ass. U.K.* 53 : 269-286.
- HAGEDORN, H.C. & B.N. JENSEN, 1922. Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid. -- *Biochem. Z.* 135 : p. 46-58.
- HANDEL E. VAN, 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. -- *Anal. Biochem.* 11 : p. 256-265.
- HARDING, J.P., 1949. The use of probability paper for the graphical analysis of polymodal frequency distributions. -- *J. mar. biol. Ass. U.K.* 28 : p.141-153.
- HECHT, F., 1932. Der chemische Einfluss organischer Zersetzungsstoffe auf das Benthos, dargelegt an Untersuchungen mit marinen Polychaeten insbesondere *Arenicola marina* L. -- *Senckenbergiana* 14 : p. 199-220.
- HORST, D.J. VAN DER, 1972. De lipiden van de landslak *Cepaea nemoralis* L. Dissertatie Rijksuniversiteit Utrecht.
- HORST, D.J. VAN DER, A.H. VAN GENNIP & P.A. VOOGT, 1969. A simplified method for extracting lipids from large quantities of tissue abundant in water. -- *Lipids* 4 : p. 300-301.
- HOWIE, D.I.D., 1959. The spawning of *Arenicola marina*. 1. The breeding season. -- *J. mar. biol. Ass. U.K.* 38 : p. 395-406.

- , 1961. The spawning of *Arenicola marina* L. 3. Maturation and shedding of the ova. -- J. mar. biol. Ass. U.K. 41 : p. 771-783.
- , 1963. Experimental evidence for the humoral stimulation of ripening of the gametes and spawning in the polychaete *Arenicola marina* L. -- Gen. comp. endocrinol. 3 : p. 660-668.
- , 1966. Further data relating to the maturation hormone and its site of secretion in *Arenicola marina* L. -- Gen. comp. endocrinol. 6 : p. 347-361.
- HOWIE, D.I.D. & C.M. McCLENAGHAN, 1965. Evidence for a feedback mechanism influencing spermatogonial division in the lugworm (*Arenicola marina* L). -- Gen. comp. endocrinol. 5 : p. 40-44.
- JAKOBSEN, V.J., 1967. The feeding of the lugworm *Arenicola marina* L; quantitative studies. -- *Ophelia* 4 : p. 91-109.
- KERMACK, D.M., 1955. The anatomy and physiology of the polychaete *Arenicola marina* L. -- Proc. zool. soc. Lond. 125 : p. 347-381.
- KRÜGER, F., 1959. Zur Ernährungsphysiologie von *Arenicola marina* L. -- Zool. Anz. 22 (Suppl Bd) : p. 115-120.
- KYLE, H.M., 1896. On the nephridia, reproductive and post-larval stages of *Arenicola*. -- Ann. Mag. Nat. Hist. 18 (6th ser) : p. 29-301.
- LIPSKI, S.R., A. HAAVIK, C.L. HOPPER & R.W. McDIVITT, 1957. The biosynthesis of the fatty acids in the plasma of man. 1. The formation of certain chromatographically separated higher fatty acid of the major lipide complexes from acetate-1-C¹⁴. -- J. Clin. Invest. 36 : p. 233-244.
- LINKE, O., 1939. Die Biota des Jadebusenwattes. -- Helgolander wiss. Meeresunters. 1 : p. 201-348.
- Longbottom, M.R., 1970. Distribution of *Arenicola marina* (L) with particular reference to the effects of particle size and organic matter of the sediments. -- J. exp. mar. Biol. Ecol. 5 : p. 138-157.

- , M.R., 1970. Distribution of the digestive enzymes in the gut of *Arenicola marina*. -- J. mar. biol. Ass. U.K. 50 : p. 121-128.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR & R.J. RANDALL, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. -- J. Biol. Chem. 193 : p. 265-277.
- NEWELL, G.E., 1948. A contribution to our knowledge of the life history of *Arenicola marina* L. -- J. mar. biol. Ass. U.K. 27 : p. 554-580.
- , 1949. The later larval life of *Arenicola marina* L. -- J. mar. biol. Ass. U.K. 28 : p. 635-639.
- OLIVE, P.W.J., 1972a. Regulation and kinetics of spermatogonial proliferations in *Arenicola marina* (Annelida, Polychaeta). 1. The annual cycle of mitotic index in the testis. -- Cell and tissue kinetics 5 : p. 245-253.
(Dove Marine Laboratory, Contributions no. 15 1972)
- , 1972b. Regulation and kinetics of spermatogonial proliferations in *Arenicola marina* (Annelida, Polychaeta). 2. Kinetics. -- Cell and tissue kinetics 5 : p. 255-267.
(Dove Marine Laboratory, Contributions no. 15 1972)
- ORTON, J.H., 1935. Experimental regeneration in the sea of the hind body in *Arenicola marina* Linn. -- Ann. Mag. Nat. Hist. 10 : (ser 16) : p. 641-643.
- PIRLOT, J.M., 1933. La ponte de l'*Arenicola marina* Linné à la côte belge. -- Bull. Mus. Roy. Hist. Naturelle Belg. 9 no. 49 (7pp).
- SMIDT, E.L.B., 1951. Animal production in the Danish Wadden Sea. -- Medd. Komm. Danm. Fisk-og Havunders., Ser. Fisk. 11 (nr. 6) : p. 67-71.
- STORROW, B., 1925. Faunistic notes. -- Rep. Dove mar. Lab. 14 : p. 57.
- THAMDRUP, H.M., 1935. Beiträge zur Ökologie der Wattenfauna auf experimenteller Grundlage. -- Medd. fra Komm for Danm. Fisk-og Havunders., Ser. Fisk. 10 : p. 1-125.

- TOULMOND, A., 1973. Tide-related changes of blood respiratory variables in the lugworm *Arenicola marina*. - *Resp. Physiol.* 19 : p. 130-144.
- VUGTS, H.F. & J.T.F. ZIMMERMAN, 1975. Interaction between the daily heat balance and the tidal cycle. - *Nature* 255 (nr. 5504) : p. 113-118.
- WELLS, G.P., 1947. The mode of life of *Arenicola marina* L. - *J. mar. biol. Ass. U.K.* 26 : p. 170-207.
- , 1951. The anatomy of the body wall and appendages in *Arenicola marina* L., *Arenicola claparedii* Levinsen and *Arenicola ecaudata* Johnston. - *J. mar. biol. Ass. U.K.* 29 : p. 1-44.
- , 1963. Barriers and speciation in lugworms. - *Publs. Syst. Ass.* 5 : p. 79-98.
- WERNER, B., 1954. Eine Beobachtung über die Wanderung von *Arenicola marina* L. - *Helgolaender wiss. Meeresunters.* 5 : p. 93-102.
- , 1956. Über die Winterwanderung von *Arenicola marina* L. (*Polychaeta, sedentaria*). - *Helgolaender wiss. Meeresunters.* 5 : p. 353-376.
- WOHLENBERG, E., 1937. Die Wattenmeer-Lebensgemeinschaften im Königshafen von Sylt. - *Helgolaender wiss. Meeresunters.* 1 : p. 1-92.
- ZWAAN, A. DE, & D.I. ZANDEE, 1972. Body distribution and seasonal changes in the glycogen content of the common sea mussel *Mytilus edulis*. - *Comp. Biochem. Physiol.* 43A : p. 53-58.

Tab. I

De voortplantingstijd van de zeepier Arenicola marina L. in diverse gebieden in Groot-Brittannië en Europa volgens verschillende auteurs.

Auteur	Afkomst wormen	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
DUNCAN	Port St. Mary											X	
	Strandhall											X	
	Whitstable										X		
	Fort Dale										X		
	St. Andrews											X	
	Plymouth											X	
	Millport											X	
	Aberffraw											X	
	Llanfairfechan											X	
	Derbyhaven												X
	Belfast												X
NEWELL	Whitstable										X		
HOWIE	St. Andrews										X	X	
OLIVE	Boosterstown										X	X	
CUNNINGHAM	Firth of Forth								X	X			
KYLE	St. Andrews				X						X		
ASHWORTH	Lancashire				X								
STORROW	Cullercoats								X				
PIRLOT	Blankenberge										X		
THAMDRUP	Skallingen											X	
RULLIER, CORNET	Roscoff								X				
CAZAUX	Arcachon									X			
KRUGER	Sylt								X	X			
SMIDT	Skallingen										X		
BRENNING	Wismar (Oostzee)				X				X	X	X	X	

Tabel II

Verhouding phospholipid-totaal lipid

	Totaal	fosfolipid	% van totaal-lipid
Wormen 30 mei 1974			
Huidspierzak oude wormen	285 mg	161 mg	74
Darm + chlorago-- oude wormen geen weefsel	272 mg	89 mg	54
Wormen 23 juli 1974			
Huidspierzak oude wormen	287 mg	207 mg	69
Darm + chlorago-- oude wormen geen weefsel	154 mg	69 mg	44
Huidspierzak jonge wormen	146 mg	110 mg	68
Darm + chlorago-- jonge wormen geen weefsel	93 mg	30 mg	34

Tabel III

Vergelijking *Arenicola marina* (L) (oude wormen, 23 juli 1974)
en *Cepaea nemoralis* (L).

	<u>% van totaal-lipid</u>		
	Fosfolipiden	sterolen	tezamen
<i>Arenicola marina</i> L			
huidspierzak	69	6	75
darm + chloragogeen-- weefsel	44	10	54
<i>Cepaea nemoralis</i> L			
gehele dier	67	13	80

Tabel IV

Neutrale lipiden

	Arenicola marina L				Cepaea nemoralis L
	Huidspierzak		darm+chloragogeën- weefsel		gehele dier
	mg	%	mg	%	%
Koolwaterstoffen	5,3	<u>4,8</u>	0,4	<u>0,37</u>	1,63
Sterolesters	5,9	5,4	3,4	3,1	10,77
Triglyceriden	4,3	<u>3,9</u>	15,9	<u>14,7</u>	8,04
Sterolen	19,4	17,8	19,5	18,1	40,01
Diglyceriden	31,0	<u>28,4</u>	17,6	<u>16,3</u>	2,54
Monoglyceriden	50,1	46,0	50,8	47,1	5,34
Vrije vetzuren					14,69
Pigmenten					8,4

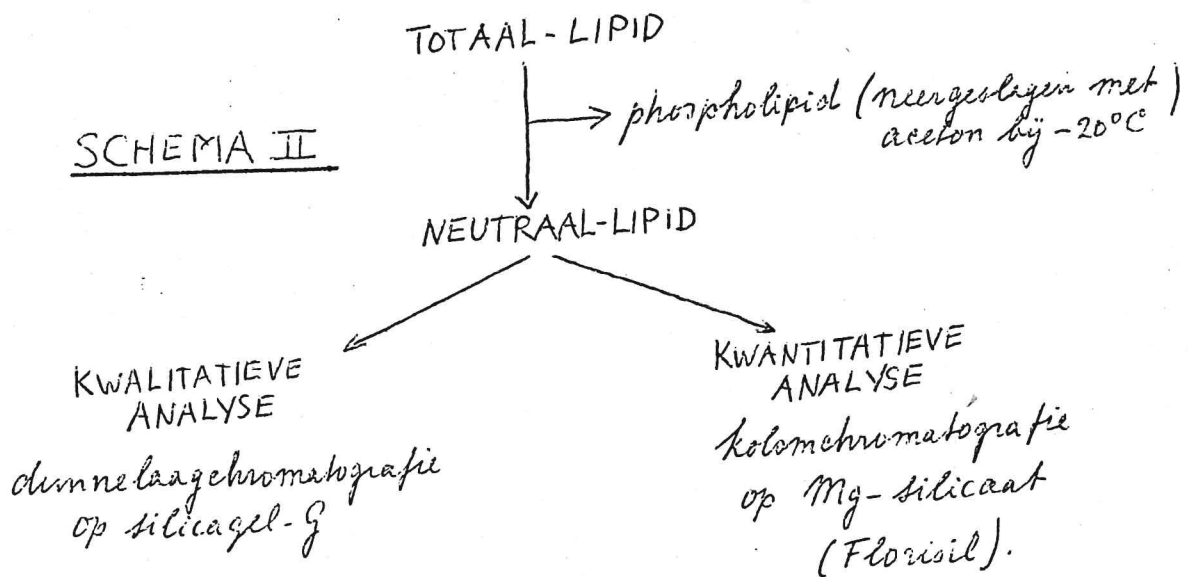
28,43

Schema I

Schema glycogeenbepaling



SCHEMA II



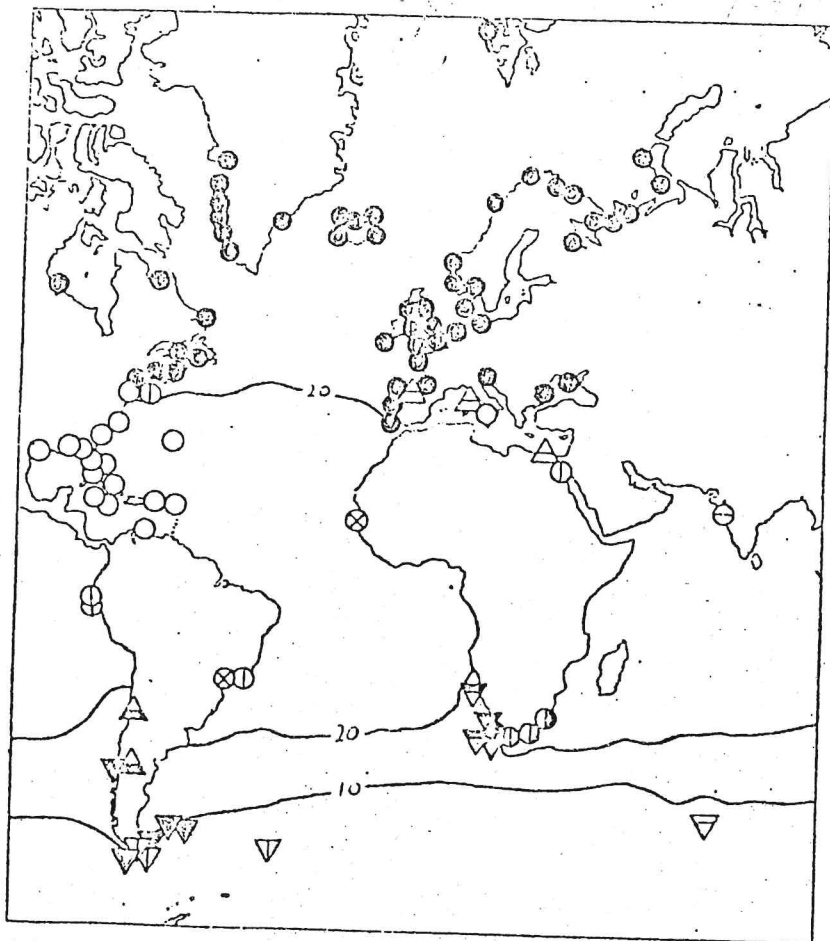


FIG. 1. The geographical distribution of the forms. The firm lines are the summer surface-water isotherms for 20° and 10° C., the latter in the Southern Hemisphere only. An additional subspecies (*Abarenicola affinis clarki* Wells 1963, from Tasmania) has been named since this figure was drawn.

Key to the forms:

genus *Arenicola*

- ⊙ *marina marina* (L.)
- ⊖ *marina schantaria* Zachs 1929
- ⊗ *marina glacialis* Murdoch 1885
- ⊕ *loveni loveni* Kinberg 1866
- ⊖ *loveni sudaustraliense* Stach 1944

the "cristata group":

- *cristata* Stimpson 1856
- ⊕ *brasiliensis* Nonato 1958
- ⊗ *glasselli* Berkeley & Berkeley 1939
- ⊖ *bombayensis* Kewalramani *et al.* 1959

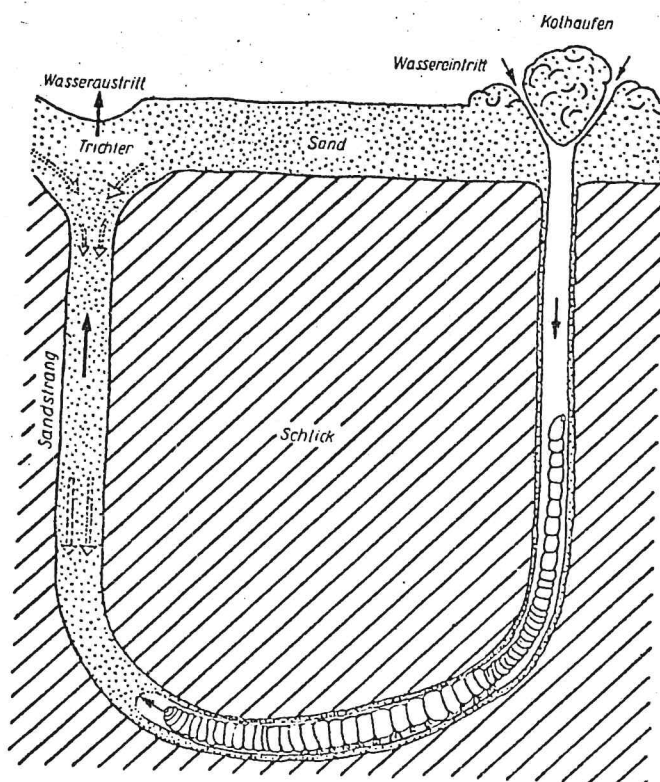


FIG. 2

FIG. 2. Schema des Wohnhauses von *Arenicola marina*. Die schwarzen Pfeile geben die Richtung des Wasserstromes, die hellen Pfeile die Bewegungsrichtung des Sandes an.

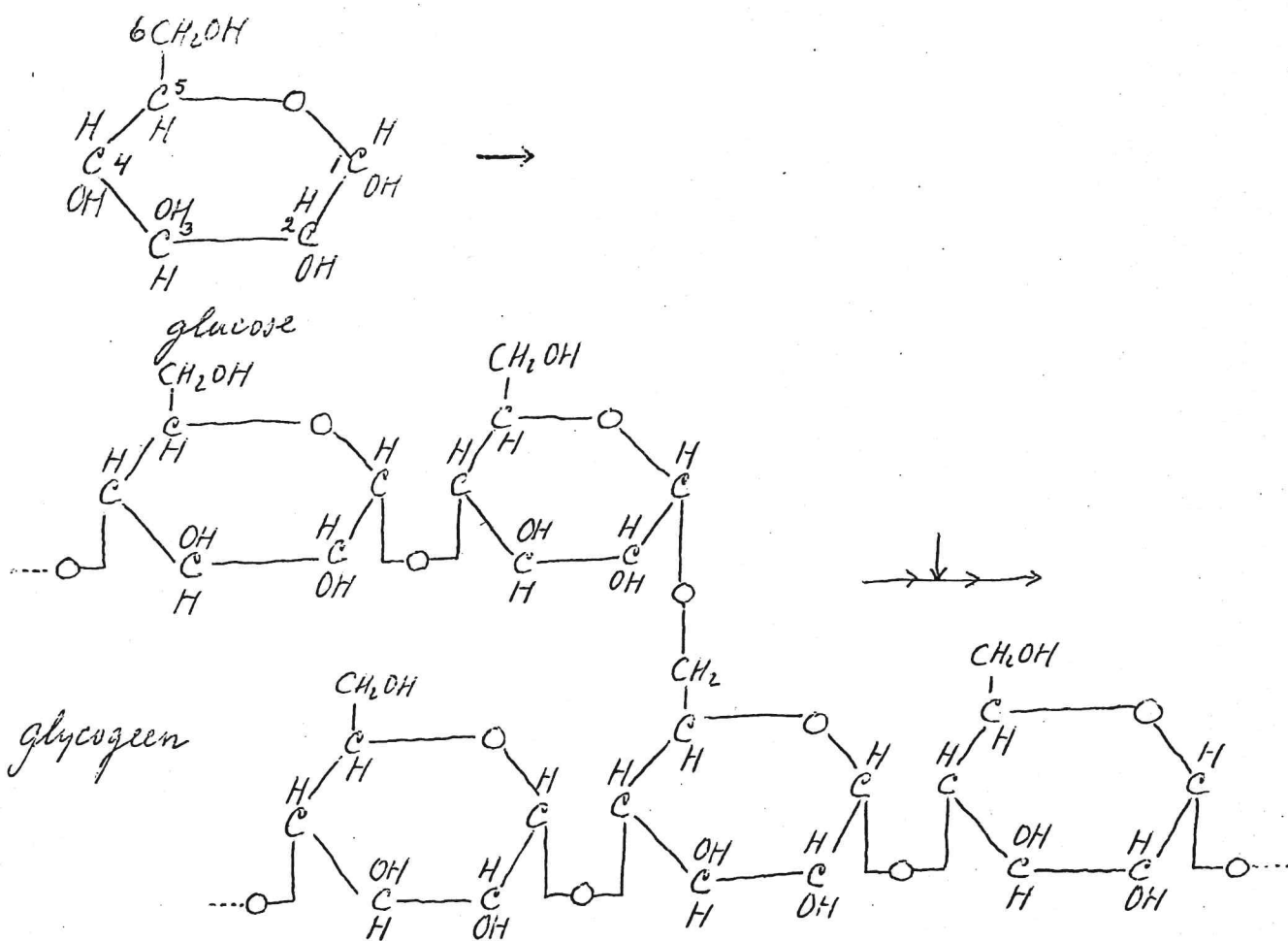


FIG. 3

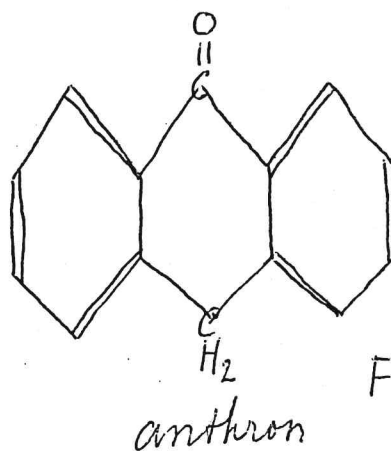
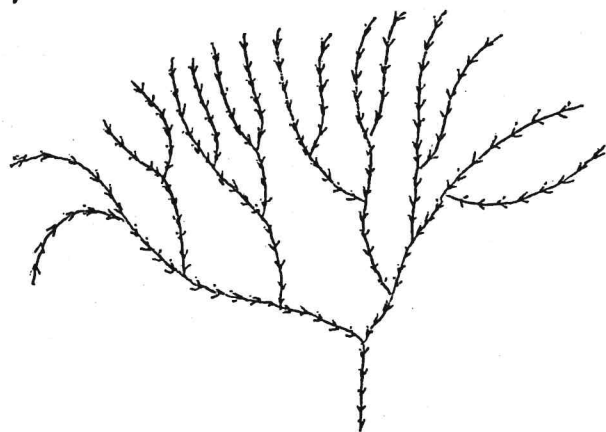
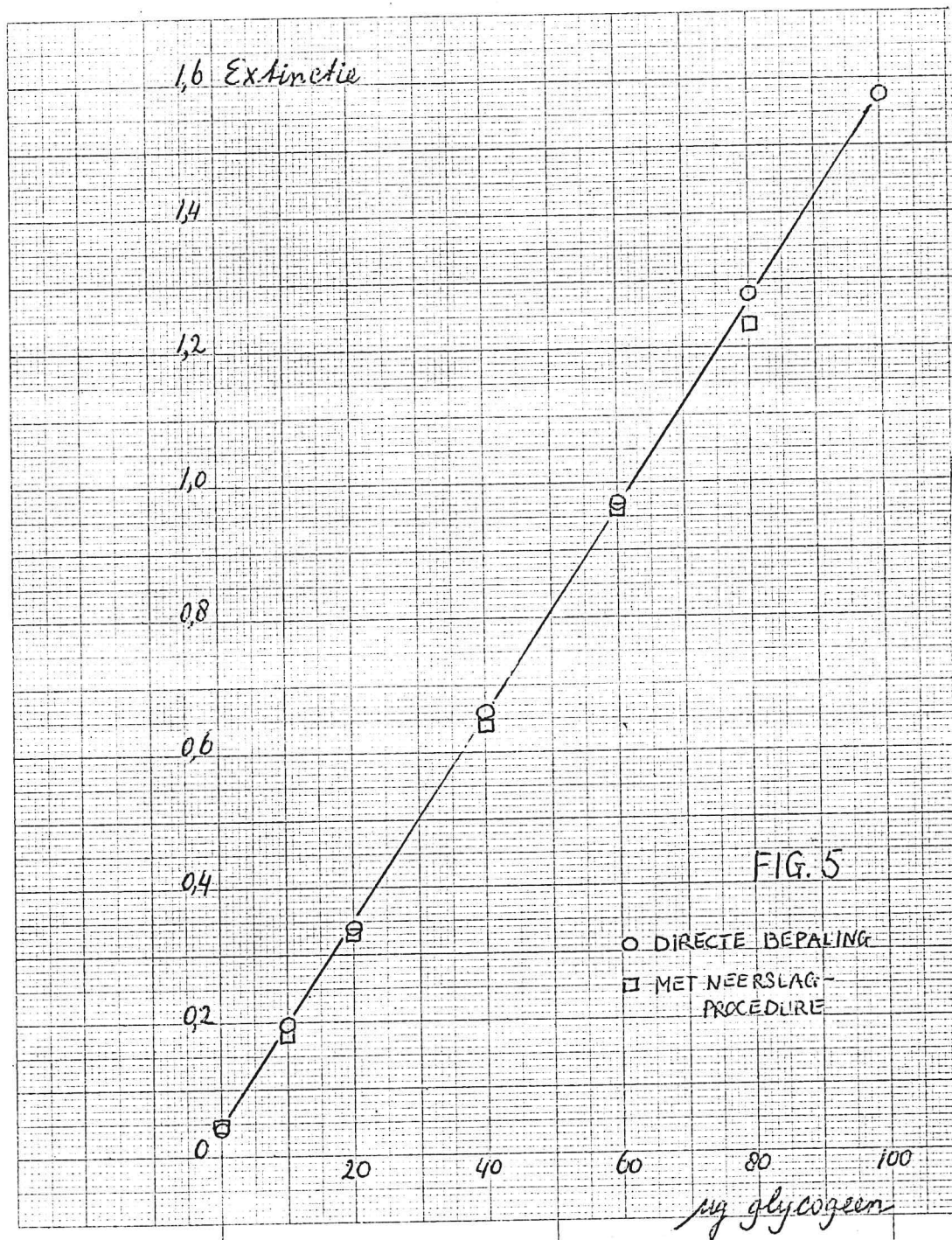


FIG. 4.



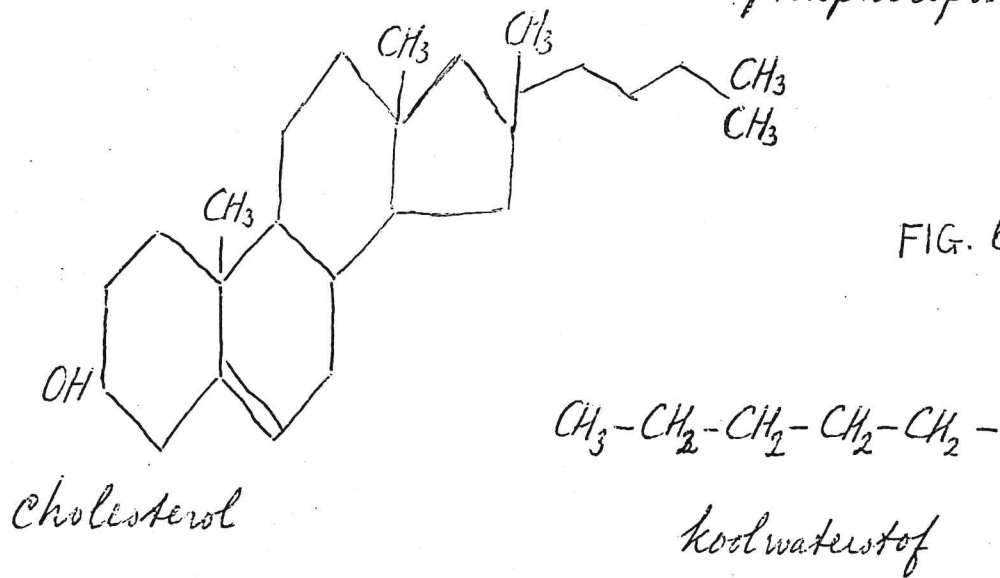
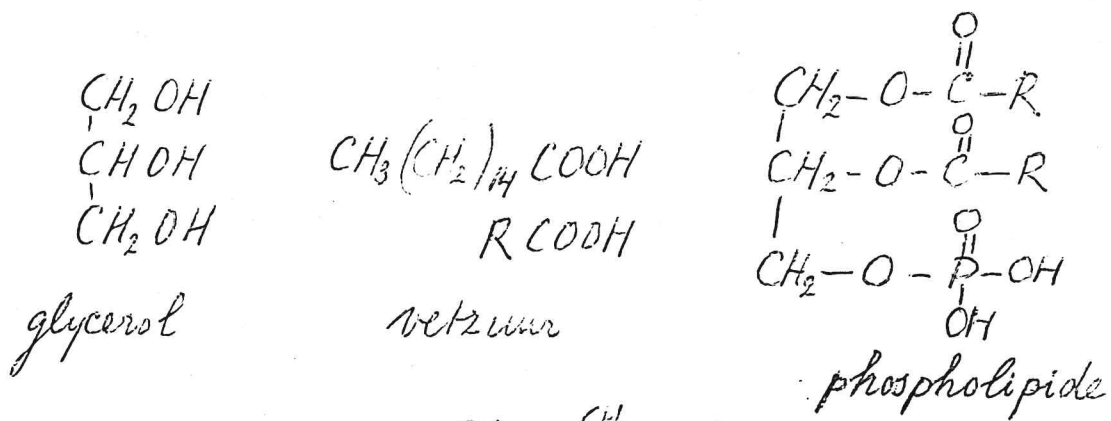
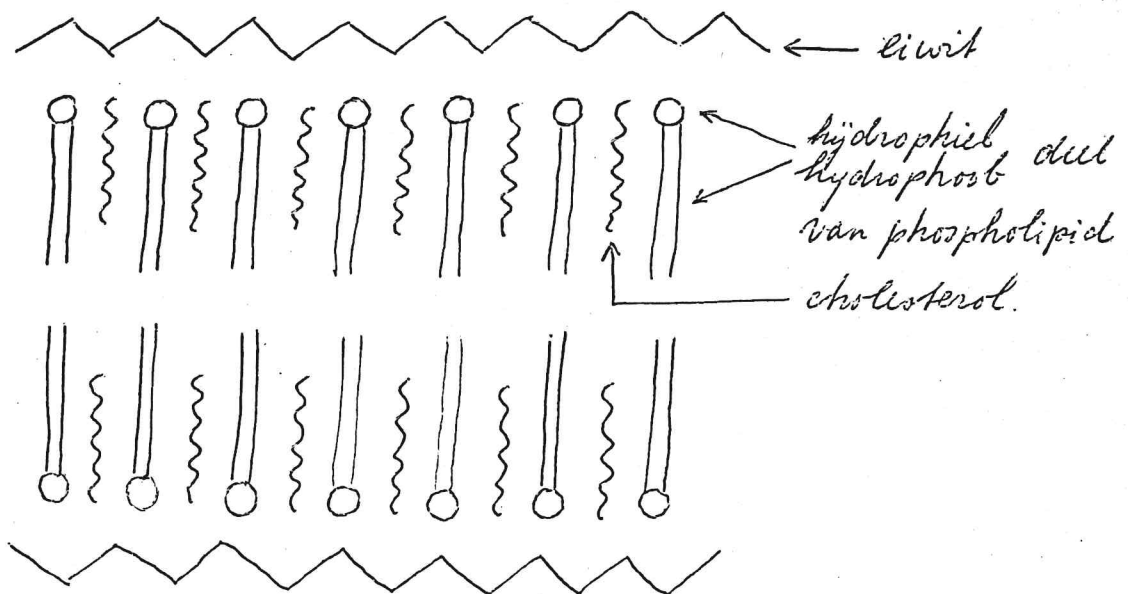
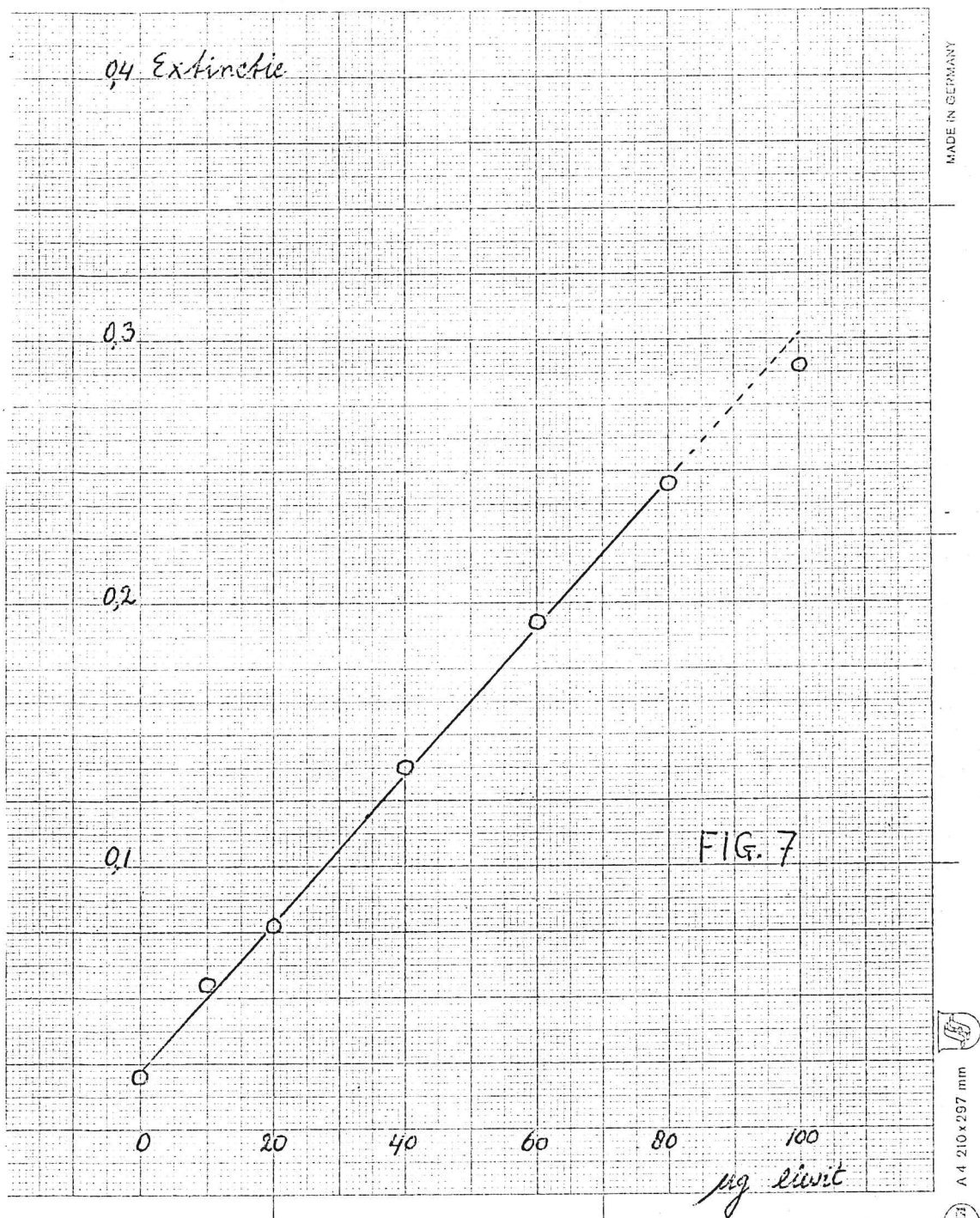


FIG. 6.



Membraanmodel van Danielli.



MADE IN GERMANY



A 4 210x297 mm



FIG. 8. GESLACHTSCELLEN ARENICOLA MARINA

KLEINE WORMEN.

Δ ♂ GESLACHTSCELLEN.

$\circ$ ♀ GESLACHTSCELLEN.

$\square$ GEEN GESLACHTSCELLEN.

100 % of total animals

80

60

40

20

0

M 1971

J

J

A

S

N

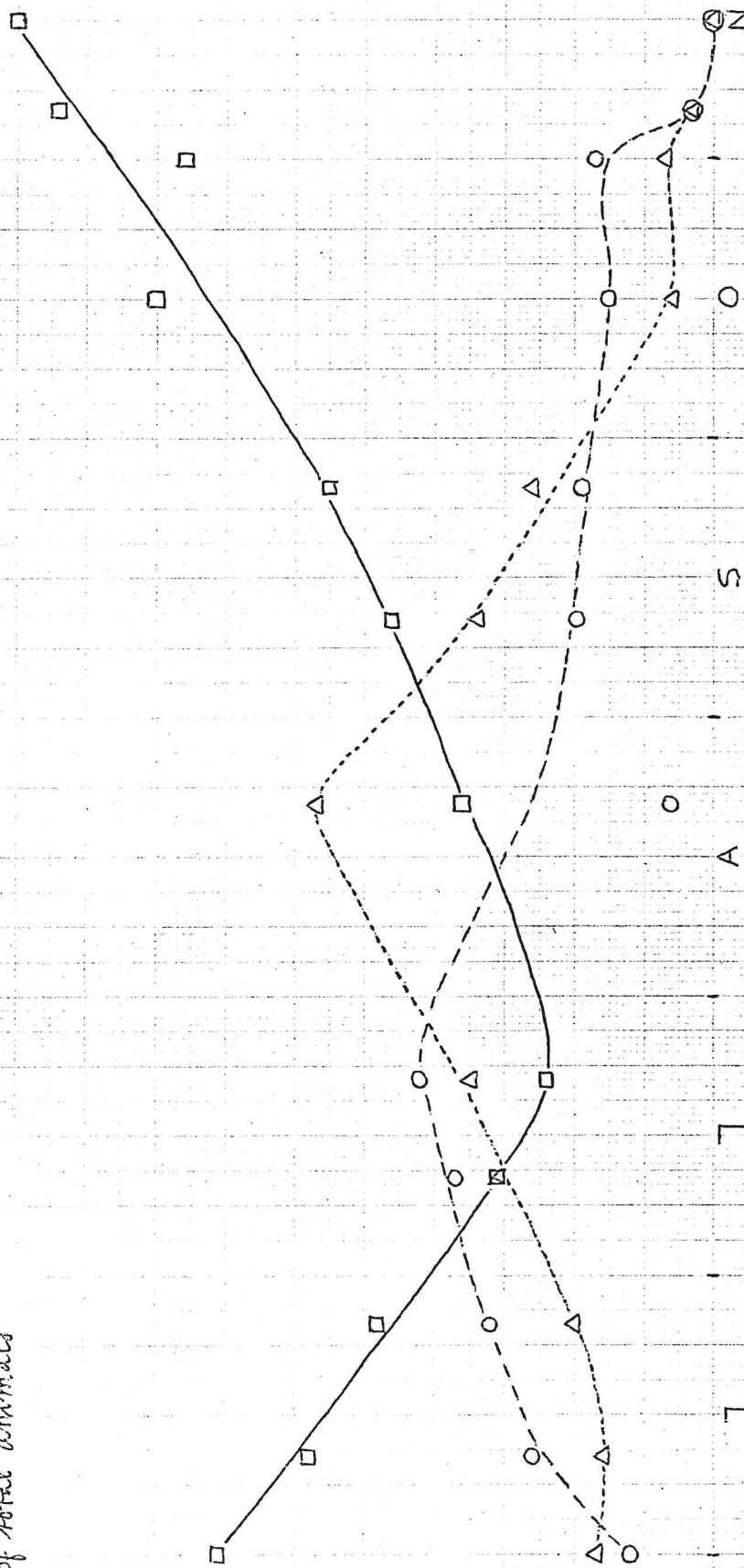
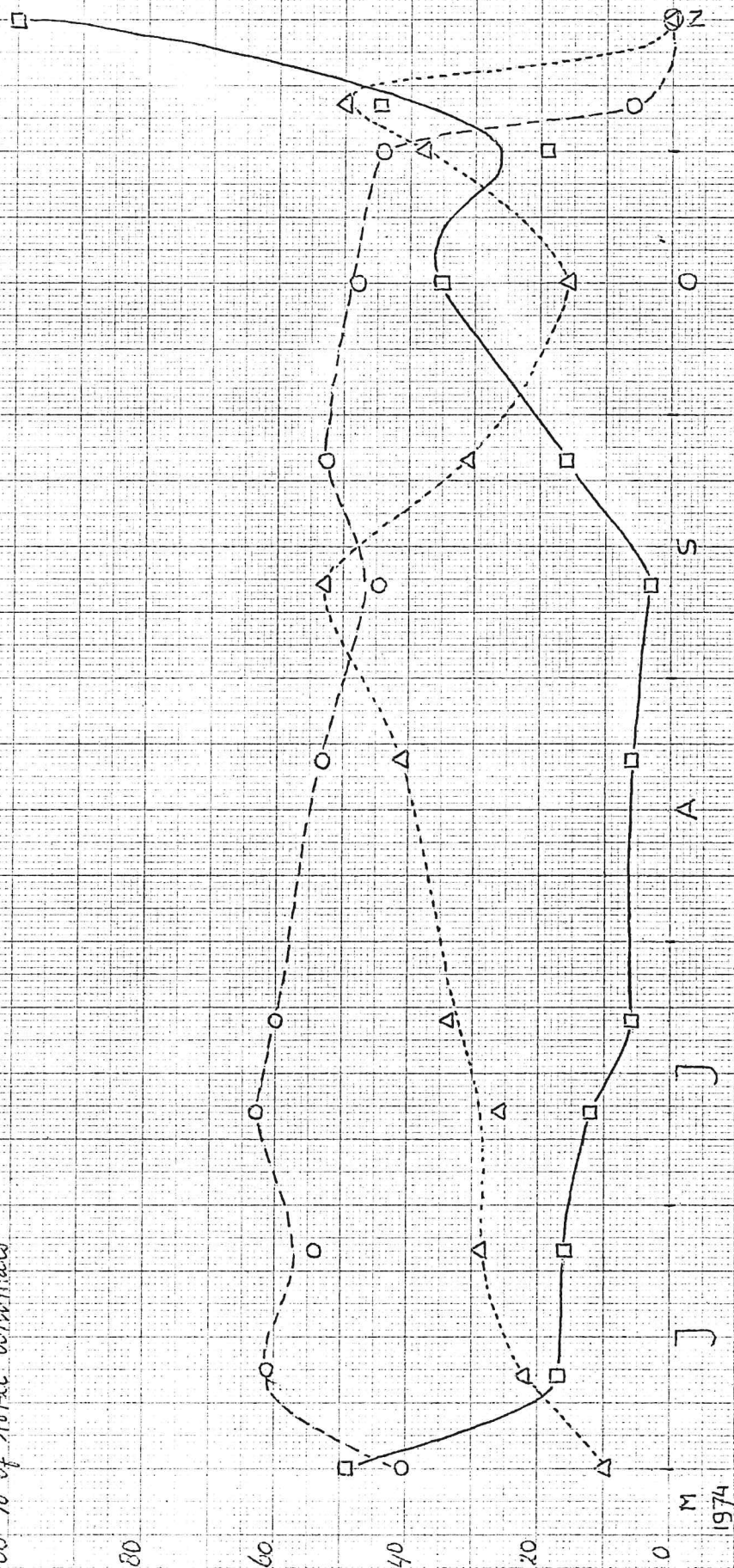


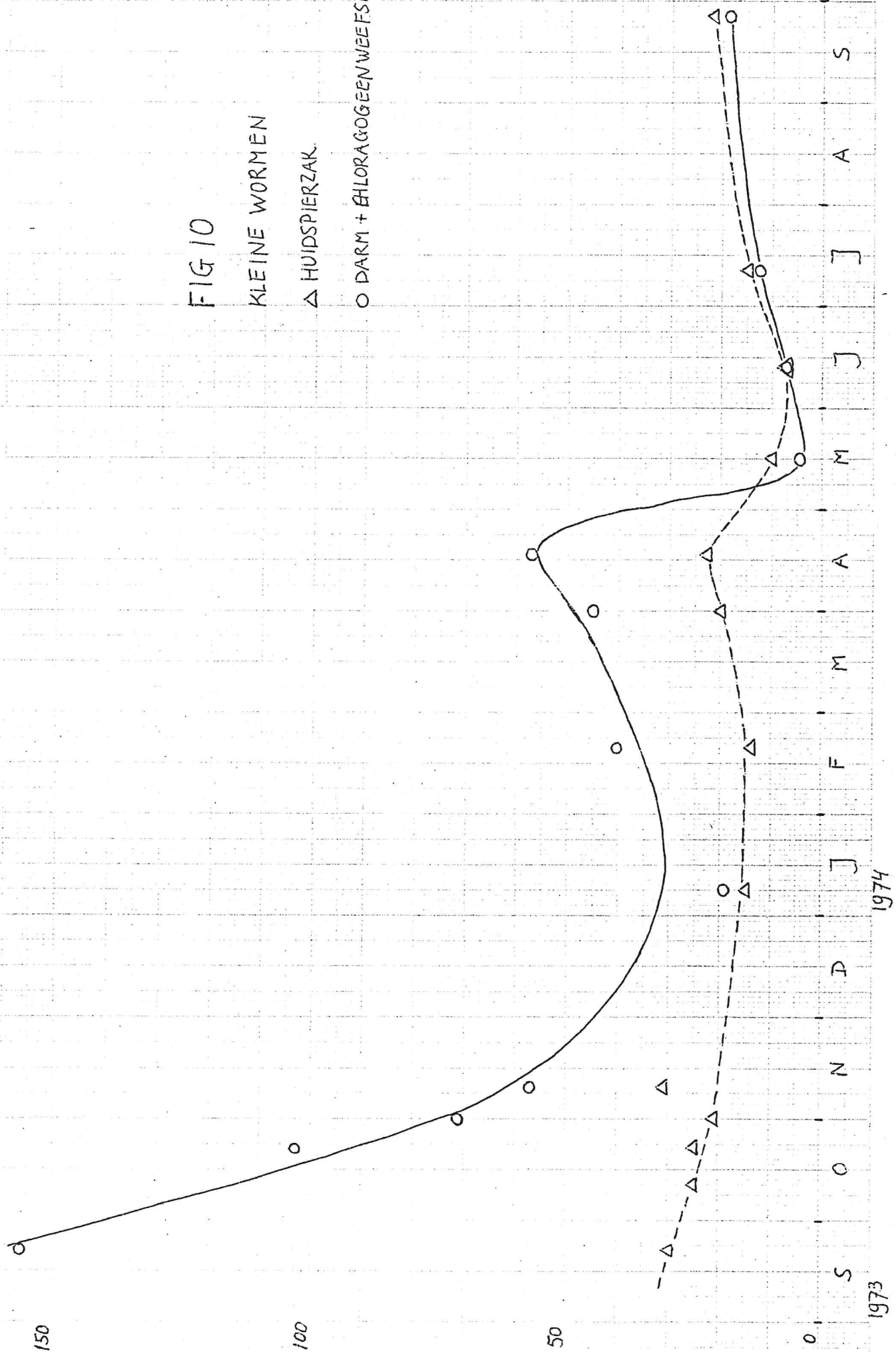
FIG 9. GESLACHTSCELLEN ARENICOLA MARINA
GROTE WORMEN.

△ ♂ GESLACHTSCELLEN
○ ♀ GESLACHTSCELLEN
□ GEEN GESLACHTSCELLEN

100 % of total animals



mg glycogen / g ashfree dry weight



mg glycogen / g ash free dry weight

150

100

50

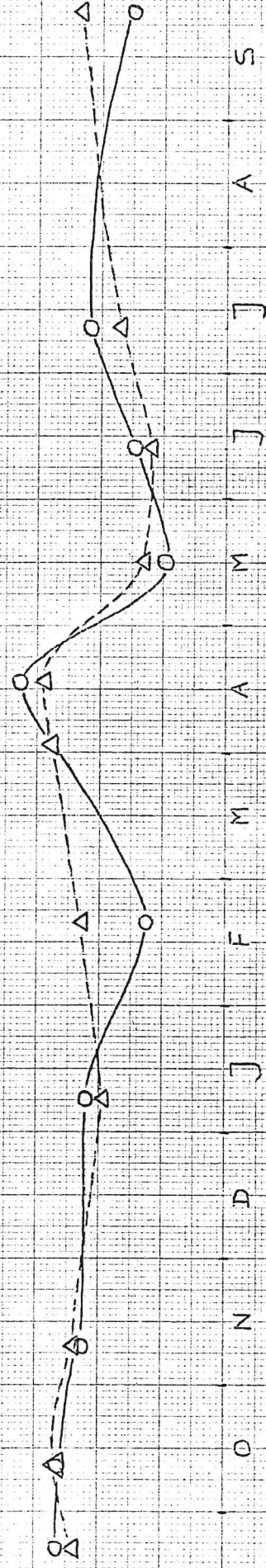
0

FIG. 11

GROTE WORMEN

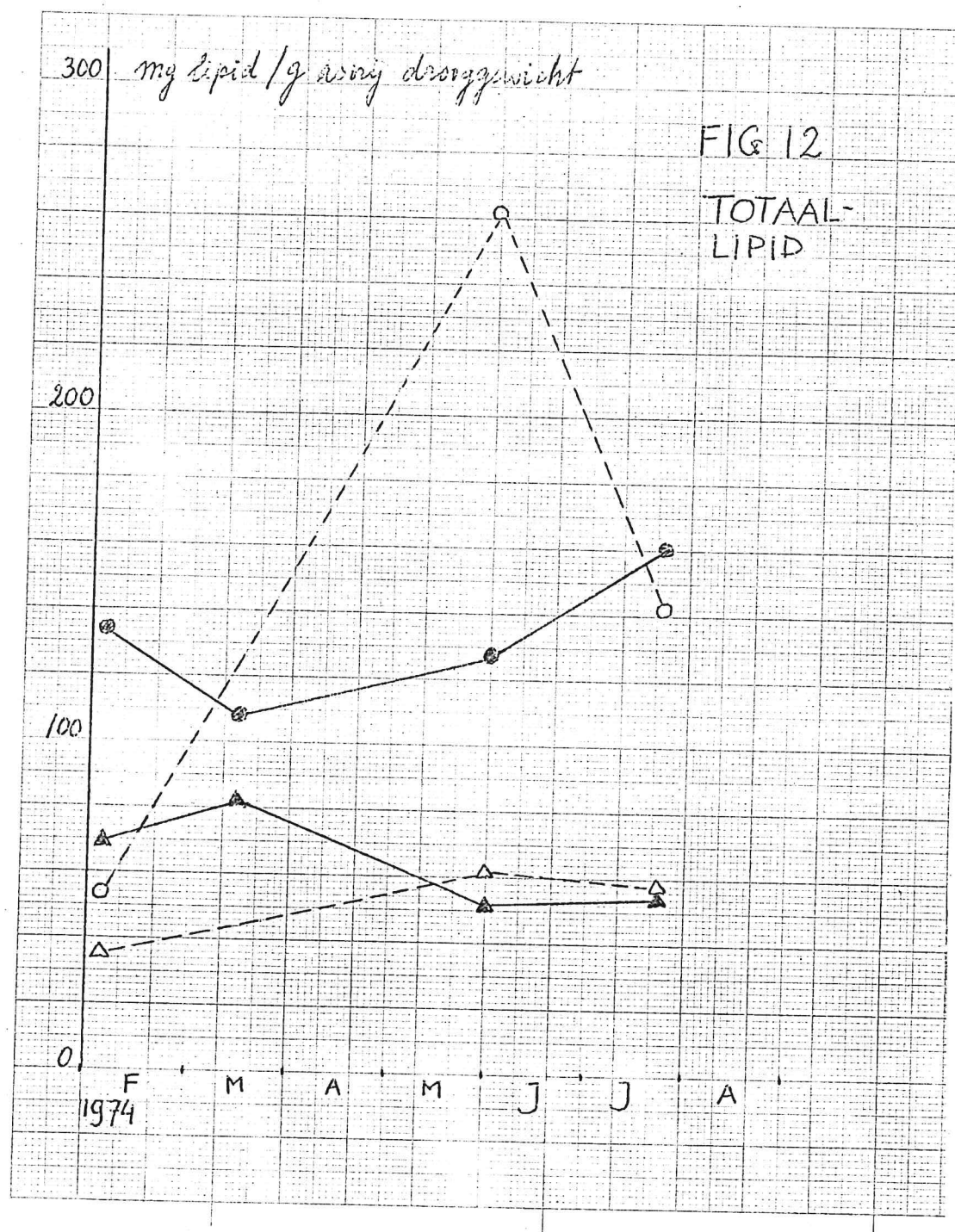
△ HUIDSPIERZAK

○ DARM + CHLORAGOGEEN WEEFSEL



1973

1974



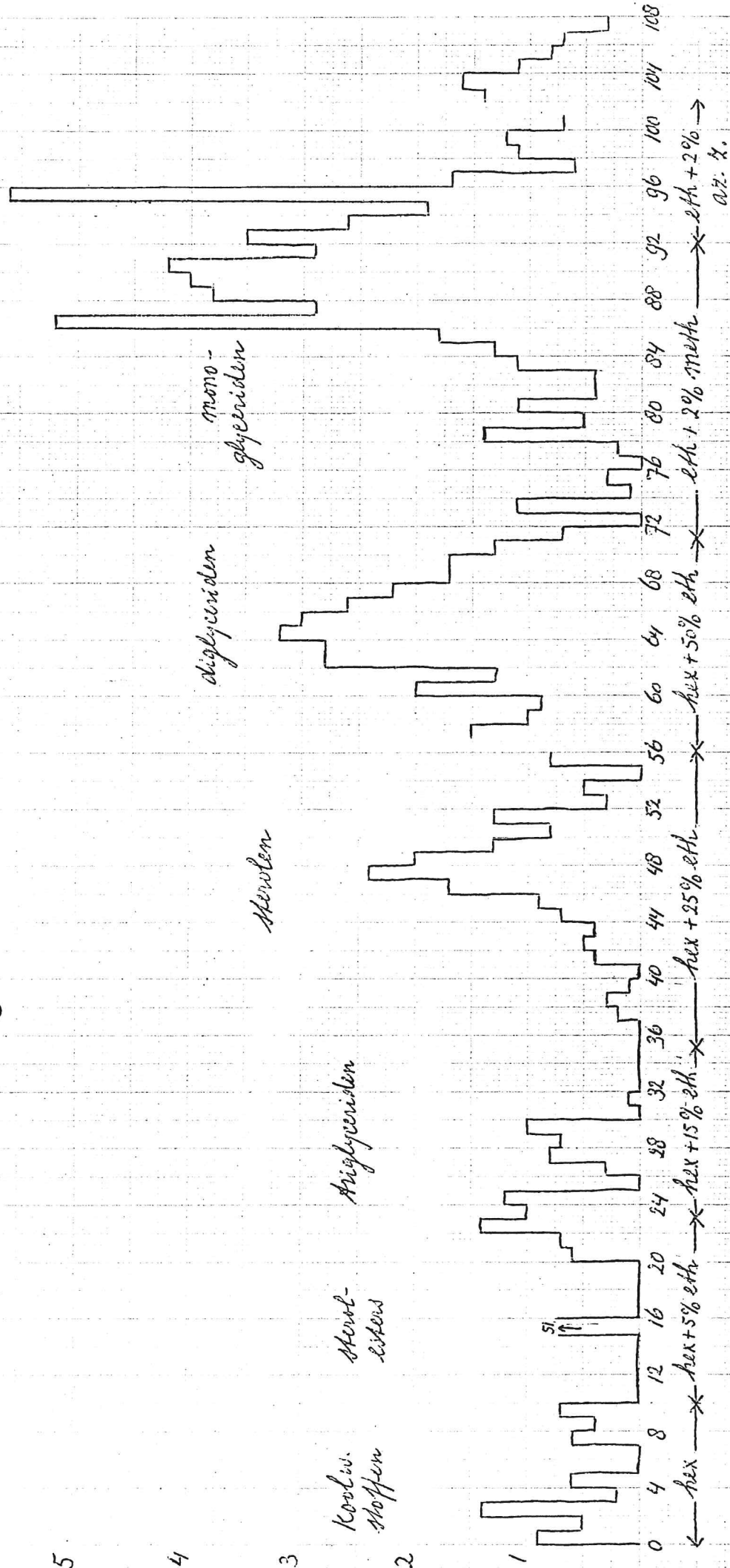
7 mg lipide.

FIG. 13

NEUTRALE LIPIDEN HUIDSPIERZAK GROTE WORMEN

23 JULI 1974

vojeveturen

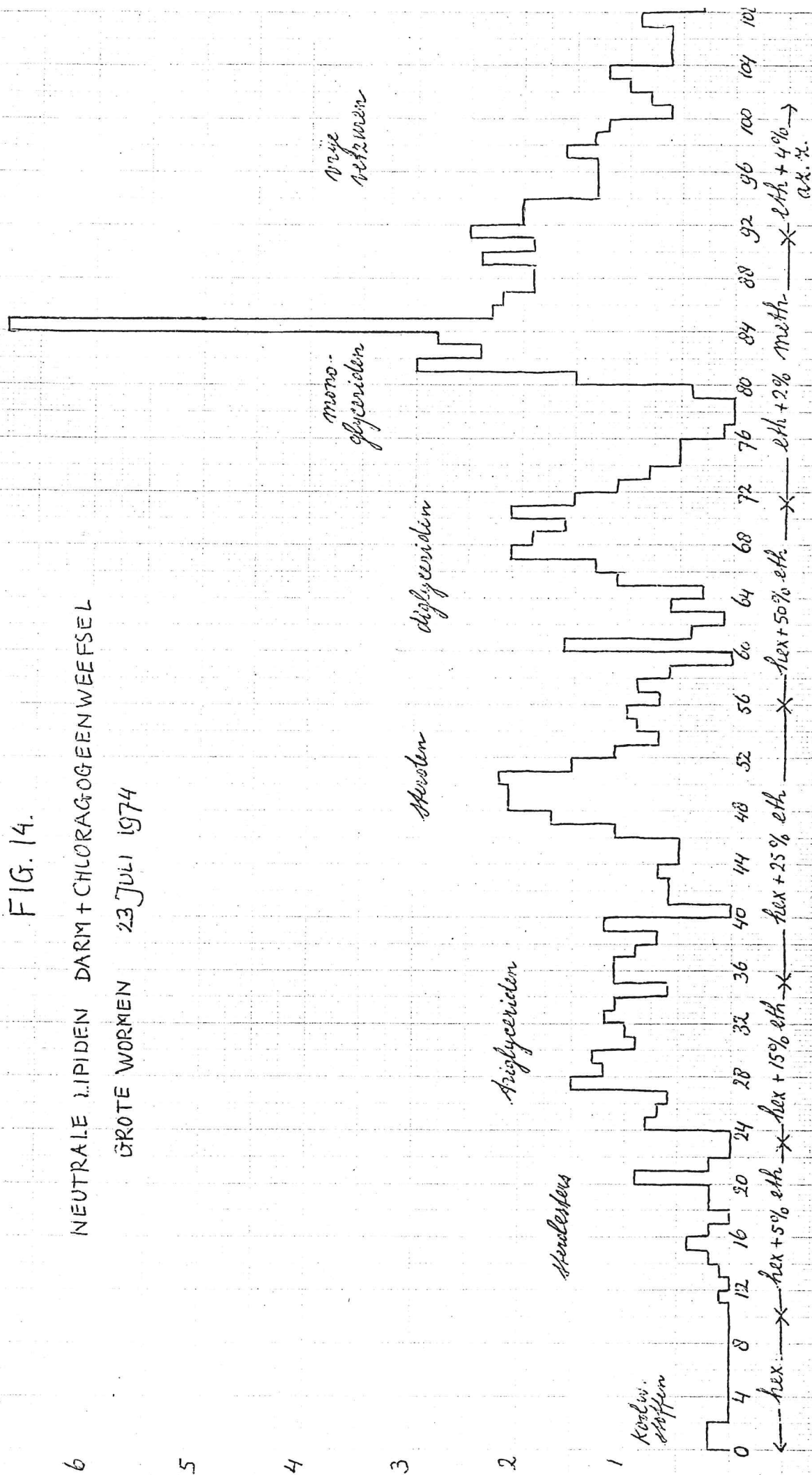


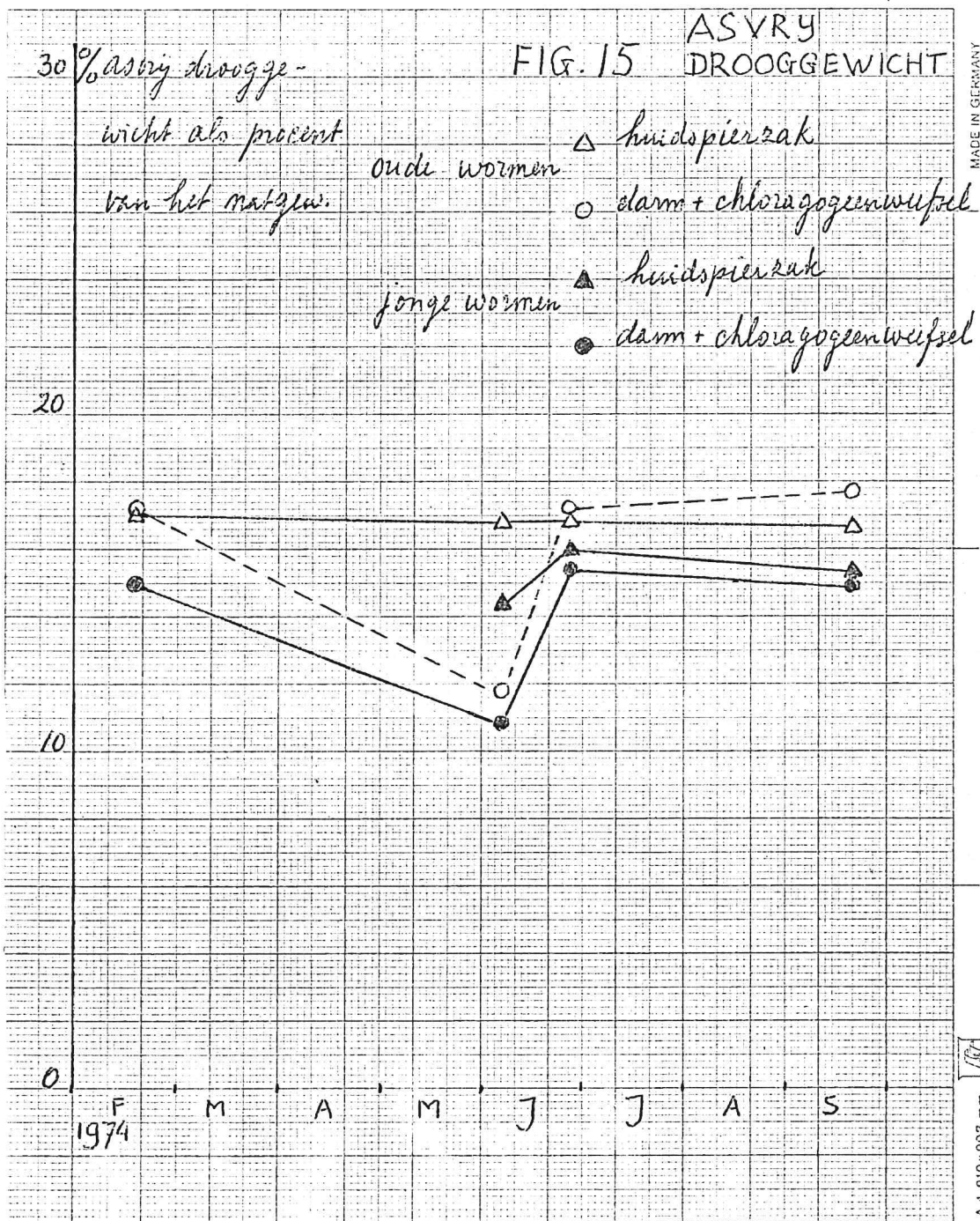
7 my lipide

FIG. 14.

NEUTRALE LIPIDEN DARM + CHLORAGOGEENWEEFSEL

GROTE WORMEN 23 JULI 1974





MADE IN GERMANY



A 4 210 x 297 mm



2,4 gram
gewicht

19 °C x
Temp

FIG. 16

GROEI EN

TEMPERATUUR

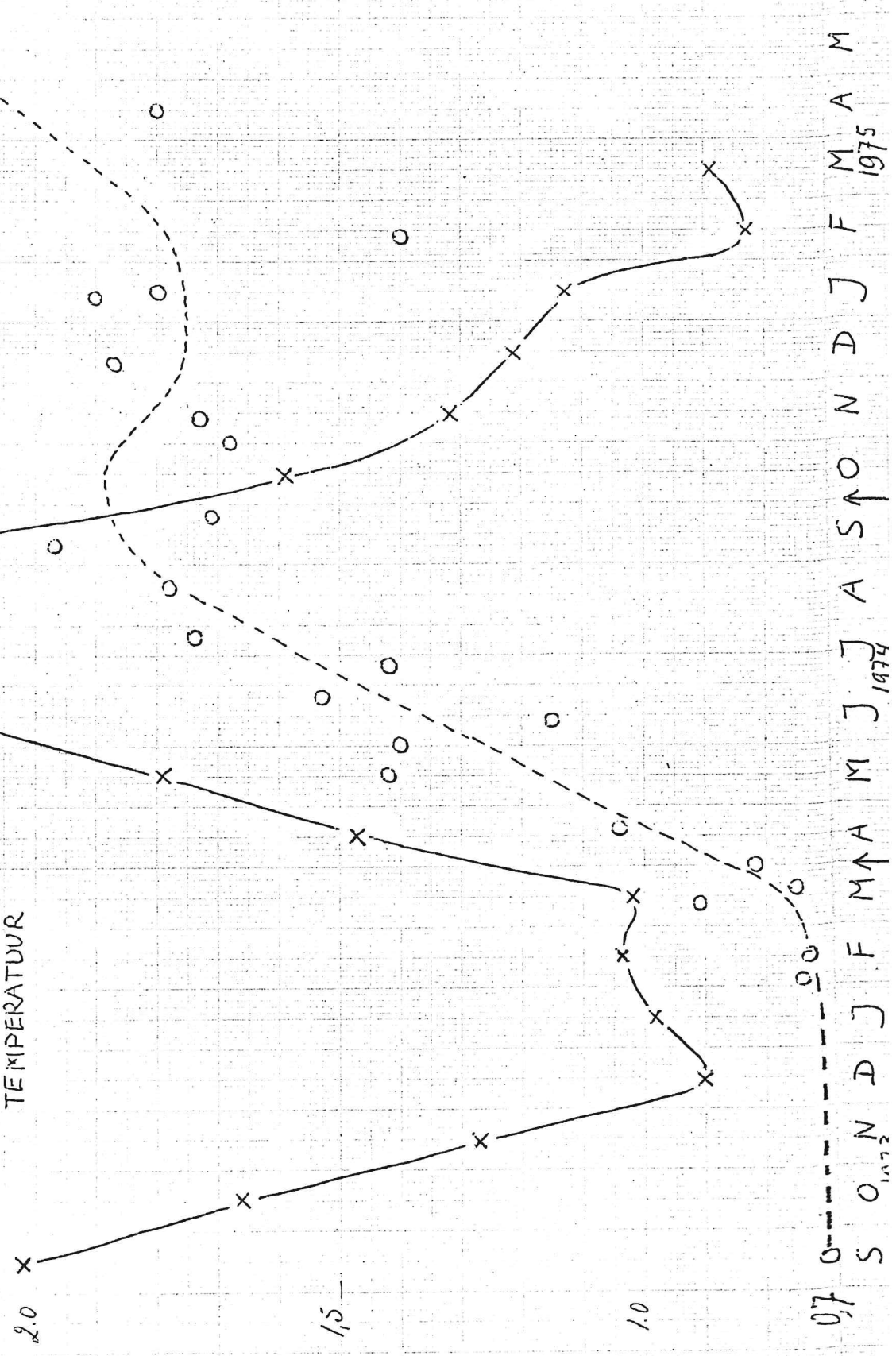


FIG. 17 GEWICHTS VERDELING ARENICOLA MET DE TYD.

56 N

48

40

32

24

16

8

0

17 April 1974
n = 83

gew. in g

56 N

48

40

32

24

16

8

0

11 Juni 1974
n = 80

gew. in g

56 N

48

40

32

24

16

8

0

23 Juli 1974
n = 120

gew. in g

56 N

48

40

32

24

16

8

0

25 Sept 1974
n = 147

gew. in g

56 N

48

40

32

24

16

8

0

10 Dec. 1974
n = 154

gew. in g

56 N

48

40

32

24

16

8

0

12 Mart 1975
n = 173

gew. in g

gewicht in g.

200D°

FIG. 18

GEWICHTSTOENAME ARENICOLA

TEGEN DAGGRADEN UITGEZET

1,5

1,0

0,5

1973

1974

J

J

A

S

C

N

J

F

M

D°

1975