

Aspecten van de water- en zouthuishouding van de zager,

Nereis virens Sars (Polychaeta), bij de aanpassing

aan zoutgehalte en temperatuur

van het milieu

door

Martien Baars

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLICATIES EN VERSLAGEN

nummer 1972-11

13010

Aspecten van de water- en zouthuishouding van de zager,
Nereis virens Sars (Polychaeta), bij de aanpassing
aan zoutgehalte en temperatuur
van het milieu

door

Martien Baars

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLICATIES EN VERSLAGEN

nummer 1972-11

Rechten voorbehouden

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

Aspecten van de water- en zouthuishouding van de zager,

Nereis virens Sars (Polychaeta), bij de aanpassing

aan zoutgehalte en temperatuur

van het milieu

door

Martien Baars

Intern verslag

over

onderzoek verricht als doctoraal onderwerp

van 1 juli 1971 t/m 30 december 1971

aan

het NIOZ te Texel

voor

Prof. Dr. G.P. Baerends

Zoölogische Laboratorium

Rijks Universiteit te Groningen

onder supervisie van

Dr. Roy E. Weber

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLICATIES EN VERSLAGEN:

nummer 1972-11

Inhoud

	bladzijde
I. Samenvatting	2
II. Summary	4
III. Inleiding	
1. Algemeen	6
2. Regulatiemechanismen bij Nereiden	8
3. Bestaande gegevens over regulatie- krommes van Nereiden	13
IV. Materiaal en methoden	
1. Biologie van <u>Nereis virens</u>	16
2. Proefopzet	17
3. Bemonstering	19
4. Bepalingen	
1. Vriespuntsdaling	21
2. Geleidbaarheid	23
3. Ionenconcentraties	24
4. NPS bepaling	25
5. Watergehalte	27
V. Resultaten	
1. Adaptatiesnelheid	29
2. De osmotische concentraties bij een reeks zoutgehalten ("steady-state")	30
3. De relatie tussen het watergehalte en de totale osmotische concentratie van het weefsel	39
VI. Discussie	46
VII. Dankbetuiging	54
VIII. Literatuur	56

I. Samenvatting.

1. Bij 8 zoutgehalten (5 - 40‰ S) en 2 temperaturen (5 en 15° C) werden monsters coeloomvloeistof en spierweefsel verzameld van Nereis virens Sars. Aan coeloomvloeistof en weefselhomogenaat werden vriespuntsverlaging, geleidbaarheid, concentratie NPS ("non-protein ninhydrine positive substances") en concentraties Cl^- , Na^+ en K^+ gemeten. Van het weefsel werd tevens het watergehalte bepaald.
2. In de "steady-state" (na acclimatie van 1-2 weken aan zoutgehalte en temperatuur) was de totale osmotische concentratie (vriespuntsverlaging) van de coeloomvloeistof zowel bij een watertemperatuur van 5 als van 15°C isosmotisch met het milieu in het zoutgehalte-traject 10 - 40‰ S. Onder 10 ‰ S trad bij 15°C een geringe hyperosmotischeit op, maar van een duidelijke osmoregulatie leek geen sprake, temeer omdat het kritische zoutgehalte waaronder de wormen stierven tussen 5,8 en 7,5‰ S lag, terwijl daarentegen bij 5°C, waar de coeloomvloeistof onder 10‰ S eveneens praktisch isosmotisch met het milieu bleef, de dieren bij 5,6‰ S goed in leven bleven.

Van de osmotische concentratie van de coeloomvloeistof maakten over het hele onderzochte traject de electrolyten een zeer groot deel uit. De bijdrage van NPS ("non-protein ninhydrin positive substance") aan de osmotische concentratie was te verwaarlozen, waarbij tevens opviel dat de hoeveelheid NPS i.t.m. de electrolyten niet toenam met het zoutgehalte.

Van de electrolyten waren de concentraties Cl^- en Na^+ in de coeloomvloeistof bij 5° C gelijk of iets lager aan die van het milieu, wat bevestigde dat Nereis virens een osmoconformer is. De kwantitatief veel minder belangrijke K^+ ionen werden in de coeloomvloeistof in hogere concentraties aangetroffen als in het milieu.

3. De concentraties van electrolyten en NPS in het weefsel namen beide toe met toenemend zoutgehalte van het milieu en vormen bij beide temperaturen in de "steady-state" elk ongeveer 1/3 van de totale osmotische concentratie van het weefselvocht.

Van de electrolyten bedragen de concentraties Cl^- en Na^+ nog geen $\frac{1}{4}$ van die van coeloomvloeistof en milieu, terwijl daarentegen de K^+ concentratie 10 - 20 x zo groot is als in coeloomvloeistof en milieu.

4. Het watergehalte van het weefsel nam bij beide temperaturen in de "steady-state" sterk toe met afnemend zoutgehalte : van ruim 70 % bij 40 ‰ S tot 85 - 90 % bij 5 - 10 ‰ S. Het watergehalte bij 5° C lag steeds hoger als dat van 15° C.
5. Overplaatsing van wormen geadapteerd aan 30 ‰ S in 15 ‰ S gaf een snelle afname van de osmotische concentraties en een snelle toename van het watergehalte van het weefsel. Bij 15° C was de coeloomvloeistof na 24 uur isosmotisch met het nieuwe milieu en bij 5° C was de coeloomvloeistof na 48 uur isosmotisch met het milieu. Metingen van het watergehalte van het weefsel bij 5° C toonden een piek bij 48 uur waarna een significante maar relatief zwakke daling inzette. Hierbij veranderden de osmotische concentraties niet. Een zwakke aanwijzing werd verkregen dat i.i.g. NPS uit het weefsel in de coeloomvloeistof gedumpt werd. Na 16 dagen in 15 ‰ S bedroeg het watergehalte van het weefsel nog 82 % tegen 75 % bij de start vanuit 30 ‰ S.
6. Aannemelijk wordt gemaakt dat de grote toename van het watergehalte van het weefsel bij afname van het zoutgehalte van het milieu voor een deel de gevonden afnames in de osmotische concentraties verklaart en wel voor ongeveer $\frac{2}{3}$ bij 5° C en voor ongeveer $\frac{1}{2}$ bij 15° C. Het resterende deel van de concentratieveranderingen moet door het vermindern van de hoeveelheid opgeloste stof in het weefsel veroorzaakt worden. In deze isosmotische intracellulaire regulatie is geen duidelijke rol van electrolyten of NPS gevonden, bij daling van het zoutgehalte verdwenen alle onderzochte componenten in ongeveer dezelfde mate uit het weefsel.
7. In tegenstelling met de in de literatuur op schaarse gegevens gebaseerde opinie komt Nereis virens uit dit onderzoek naar voren als een osmoconformer met een zeer zwakke regulatie van het weefselwater en zonder duidelijke rol van bepaalde stoffen in de isosmotische intracellulaire regulatie.

II. Summary

1. Specimens of the polychaete Nereis virens Sars were adapted to a range of 8 salinities from 5 up to 40 ‰ at temperatures of 5 and 15° C, samples of coelomic fluid and body wall tissue were used to determine the concentrations of some osmotically important components. Measurements were made of freezing point, conductivity, concentration of NPS (non-protein ninhydrine positive substances), Cl^- , Na^+ , K^+ and water content as a function of the osmotic concentration of the medium.
2. In the steady-state (after 1-2 weeks' acclimation to salinity and temperature) the total osmotic concentration of the coelomic fluid was isosmotic with the medium in the salinity range 10 - 40 ‰ at both experimental temperatures. Below 10 ‰ there was a weak hyperosmoticity at 15 °C, but this did not seem to indicate osmoregulation, because the critical salinity under which the worms died was between 5,8 and 7,5 ‰, while at 5 °C, where the coelomic fluid was similarly nearly isosmotic below 10 ‰ too, the animals survived well at a salinity of 5,6 ‰.

Over the whole salinity range the electrolytes formed a very big part of the osmotic concentration of the coelomic fluid. The concentration of NPS non-protein ninhydrin positive substances was negligible. It was further striking that compared to the electrolytes the amount of NPS did not increase with the salinity. With regard to the electrolytes the concentrations of Cl^- and Na^+ in the coelomic fluid at 5 °C were equal or a little lower than those in the medium; these data confirm that Nereis virens is an osmoconformer. The quantitatively less important K^+ ions occur at higher concentrations in the coelomic fluid than in the medium.

3. The tissue concentration of electrolytes and NPS increased with the salinity each forming about $1/3$ of the total osmotic concentration of the tissue at both temperatures studied. The tissue concentrations of Cl^- and Na^+ amounted to less than $1/4$ of those of coelomic fluid and the medium, while the K^+ concentration was about 10 to 20 times those in the coelomic fluid and medium.
4. The water content of the tissue show strong increase with decreasing salinity at both temperatures in the steady-state ranging from more than 70 % at 40 ‰ S up to 85 - 90 % at 5 - 10 ‰ S.
The water content was constantly at 5 °C than at 15 °C.
5. Transferring worms adapted to a salinity of 30 ‰ to 15 ‰ resulted in a rapid lowering of the osmotic concentration, both in coelomic fluid and tissue, and a rapid increase of the water content of the tissue. At 15 °C the coelomic fluid became isosmotic with the new medium in 24 hours, at 5 °C the coelomic fluid needed 48 hours to become isosmotic. Measurements of the water content of the tissue at 5 °C gave a peak 48 hours after transfer, after which a significant but relatively small decrease followed. At the same time the osmotic concentrations showed no further change. A poor indication was obtained that in the period of adaptation to the new medium NPS was extruded from the tissue cells into the coelomic fluid. After 16 days in 15 ‰ S the water content of the tissue was 82 % against 75 % at the start from 30 ‰ S.
6. It is indicated that the strong increase of the water content of the tissue with decreasing salinity of the medium account in part for the found declines in the osmotic concentrations (as much as about $2/3$ at 5 °C and about $1/2$ at 15 °C). The remaining part of the concentration changes appears due to a decrease in the amount dissolved matter in the tissue. Considering this isosmotic

intracellular regulation it was not possible to detect a dominating role of electrolytes or NPS with decreasing salinity; all studied components of the osmotic concentration seemed to disappear in the same ratio.

7. In contrast to the general opinion in literature (based on a little experimental evidence) Nereis virens was found to be a osmoconformer with a very weak powers of regulation of the tissue water and without a clear role of one of the osmotic components in the isosmotic intracellular regulation.

III.I. Inleiding

1. Algemeen

Alle chemische reacties die men bij organismen aantreft vinden plaats in een oplossing met water als oplosmiddel. Om de cellulaire machinerie zo optimaal mogelijk te laten werken, kan verwacht worden dat storende effecten op de concentraties van opgeloste stoffen door veranderingen in de hoeveelheid water bij veel dieren zo goed mogelijk beperkt worden.

Bij landdieren is het grootste probleem betreffende de waterhuishouding het voorkómen van te grote verliezen aan water door verdamping en urineproductie. Dit is bereikt door ondoorlaatbare huidoppervlakken en vooral door het produceren van weinig of praktisch geen water bevattende faeces en urine.

Zoetwaterorganismen vertonen inwendig vergelijkbare concentraties opgeloste stof als landdieren, maar dit betekent hier dat voorkomen moet worden dat teveel water het lichaam binnendringt. Celmembranen fungeren als semi-permeabele membranen zodat het concentratieverschil tussen dier en milieu genivelleerd dreigt te worden door een waterstroom naar binnen door osmose. De verdunning van de celinhoud wordt tegengegaan door een lage permeabiliteit

van de membranen voor water, een hoge urineproductie waarbij de urine tevens lagere concentraties opgeloste stof bevat dan de andere lichaamsvloeistoffen, en door actieve opname van de weinige opgeloste stoffen aanwezig in het milieu.

Mariene organismen komen voor soortgelijke problemen te staan. Zeewater heeft een hogere concentratie opgeloste stof dan het bloed en de weefsels van land- en zoetwaterdieren. De echte zeedieren vertonen eveneens een hoge inwendige concentratie, ze zijn isosmotisch met het zeewater. Plaatst men deze dieren in verdund zeewater dan blijkt een door osmose optredende volumetoename lethaal te zijn. Deze groep wordt stenohalinen genoemd.

Er zijn echter ook een groot aantal mariene organismen die veranderingen in het zoutgehalte goed kunnen verdragen en zodoende ook in brak en zelfs zoet water aangetroffen worden. Dit zijn euryhaline dieren. Twee extreme typen zijn daarbij te onderscheiden : de zogenaamde osmoconformers waarbij de inwendige osmotische concentratie steeds gelijk is aan de uitwendige osmotische concentratie en de osmoregulators die hun inwendige osmotische concentratie constant houden, zodat ze bij lage zoutgehaltes hypersmotisch en bij hoge zoutgehaltes hyposmotisch zijn t.o.v. het milieu. Hyperosmotischeit wordt op dezelfde manieren als bij de zoetwaterdieren bereikt. Hyposmotischeit wordt gehandhaafd dankzij b.v. een actieve zoutexcretie.

Osmoconformering heeft het voordeel dat geen energie besteed hoeft te worden aan het instandhouden van een constant concentratieverschil tussen dier en milieu, maar het nadeel dat de inwendige concentraties sterk kunnen fluctueren en dat het volume voortdurend gecorrigeerd moet worden. Veel euryhaline dieren combineren osmoregulatie en osmoconformatie, in het ene zouttraject blijven hun inwendige concentraties constant, in een ander zouttraject lopen die gelijk of parallel met het milieu.

Onder de euryhaline Evertebrata vinden we veel osmoconformerende en weinig osmoregulerende soorten. Tot de

laatststen behoren alleen een groot aantal Crustacea en enkele Polychaeta. Van de Polychaeta is een duidelijk osmoregulatie bekend van Nereis limnicolla (Johnson), Nereis diversicolor (O.F. Müller), Laconereis culveri (Webster) en Nereis succinea (Lenckart).

2. Regulatiemechanismen bij Nereiden

Het onderzoek aan de osmoregulatie van de Nereiden kwam na de publicatie van SCHLIEPER (1929) op gang. Deze onderzoeker vond dat het overplaatsen van Nereis diversicolor en Nereis pelagica (L.) van zout in brak of zoet water grotere zwellingen door osmose bij de laatste soort dan bij de eerste soort gaf. N. diversicolor bleef bovendien bij lage zoutgehaltes leven. Een aantal metingen van de vriespuntsdaling als maat voor de osmotische concentraties leverden op dat N. diversicolor bij lage zoutgehaltes sterk hyperosmotisch was t.o.v. het milieu. Dit kwam overeen met het, zoals later zou blijken, algemene patroon bij Nereiden: conformatie bij hoge zoutgehaltes en regulatie bij lage zoutgehaltes, verder aangeduid als resp. het conformatie-traject en het regulatie-traject.

BEADLE (1931) kwantificeerde de mate van osmose bij het overplaatsen van dieren van zout in brak water door de wormen op verschillende tijdstippen na het overplaatsen te wegen. Hij onderzocht N. diversicolor en Perinereis cultrifera (Grube) en vond dat deze laatste sterker in gewicht toenam. Beide soorten zwollen meer naarmate de zoutsprong groter was. Evenals SCHLIEPER vond BEADLE dat bij de minst zwellende soort, in beide gevallen N. diversicolor, een verhoogd zuurstofgebruik optrad.

SAYLES (1935) testte een volgende soort, Nereis virens (Sars), op gewichtsveranderingen na overbrenging in verdunningen van zeewater. Ook N. virens vertoont grotere zwellingen dan N. diversicolor. De zwelling bleek in de tijd te verlopen, na 1 dag zette een volume-

regulatie in zodat na een week de oorspronkelijke volumetoename voor een groot deel verdwenen was. Deze afname van het volume in de loop van bovengenoemde experimenten werd door BEADLE (1937) en ELLIS (1937, 1939) verder bestudeerd bij N. diversicolor.

BEADLE mat parallel met het gewichtsverloop de veranderingen in osmotische concentraties en zag dat het bereiken van de maximale gewichtstoename samenviel met het dalen van de osmotische concentraties tot een bepaald niveau, dat aanzienlijk hoger lag dan de osmotische concentratie van het nieuwe milieu, wat overeenkomt met de resultaten van SCHLIEPER. Daarna zette een daling van het gewicht in, maar de osmotische concentratie bleef verder constant. Dit kan alleen als met de afname van de hoeveelheid water ook opgeloste stoffen uit het lichaam verdwijnen. Aan de hand van de vorm van de gevonden curves leidde BEADLE af dat urineproductie er voor zorgde dat water en zouten verwijderd werden. Met enkele elegante experimenten kreeg hij aanwijzingen dat de urineproductie evenredig is met de hydrostatische druk in de lichaamsholte en dat de urine zelf hyposmotisch kan zijn t.o.v. de lichaamsvloeistoffen, wat bij lage zoutgehaltes van belang is voor het handhaven van de hyperosmotische t.o.v. het milieu.

ELLIS (1937) mat parallel met het gewichtsverloop de veranderingen in het chloride-gehalte van het milieu. De snelle gewichtstoename ging gepaard met een toename van chloride in het milieu, maar tijdens de hierop volgende volumeregulatie veranderde de chloride concentratie in het milieu niet meer. Op grond van deze en andere proeven komt ELLIS zonder daadwerkelijk de osmotische concentraties gemeten te hebben tot de foutieve conclusie dat N. diversicolor wel volumeregulatie maar geen osmoregulatie vertoont. Metingen van de chloride uitscheiding bij P. cultrifera gaven lagere waarden en verondersteld wordt dat chloride bij N. diversicolor actief weggepompt wordt en zodoende de zwellingen bij deze soort minder zijn (ELLIS, 1939).

Het onderzoek van JØRGENSEN & DALES (1957) leidde echter tot andere conclusies. Zij werkten met radioactief chloride. Dat N. diversicolor een grotere chloride uitscheiding heeft dan P. cultrifera wijten zij aan een hogere urine-produktie bij de eerste soort. Ook deze onderzoekers veronderstellen verder een actief chloride transport, nu echter van buiten naar binnen. Na het bereiken van het maximale gewicht bij een overplaatsing in verdund zeewater vond ELLIS geen chloride uitscheiding meer, JØRGENSEN & DALES maakten het echter aannemelijk dat er wel degelijk chloride via de volumeregulerende urine en via diffusie door de huid verdween, maar dit werd gecompenseerd door een opname van chloride door de huid. Aangezien de inwendige chloride concentraties bij lage zoutgehalten beduidend hoger waren dan die van het milieu, wat de door SCHLIEPER en BEADLE gevonden osmoregulatie bevestigde, namen JØRGENSEN & DALES aan dat de gevonden chloride-opname een actief proces betekende omdat het tegen een sterke concentratiegradient in plaatsvond. Merkwaardig is echter dat bij de minder of niet osmoregulerende N. virens en N. pelagica tot 3x zo grote chloride-opnames gevonden werden door dezelfde onderzoekers en verder vond FRETTER (1955) dat radio-actief natrium 3x zoveel werd opgenomen door de niet-regulerende P. cultrifera als door N. diversicolor. Genoemde onderzoekers stellen daarom dat N. diversicolor minder permeabel is voor chloride en natrium dan de andere onderzochte soorten en dat de diffusie van zouten naar buiten op die manier wordt beperkt. Voor het regulatie-gebied wordt verder geponeerd dat de permeabiliteit voor water bij N. diversicolor sterk verminderd is en daardoor de geringe osmose door een normale produktie van isosmotische urine op te vangen is.

Door POTTS & PARRY (1964), SMITH (1963, 1964, 1970a, 1970b en 1970c) en OGLESBY (1965) ondergingen bovenstaande gegevens herinterpretaties en aanvullingen. POTTS & PARRY geloven niet dat de permeabiliteit voor water bij

N. diversicolor verandert met het zoutgehalte en berekenen met dezelfde gegevens van JØRGENSEN & DALES dat de gevonden verschijnselen evengoed verklaard kunnen worden zonder permeabiliteitsveranderingen maar met de aanname dat er in het regulatie-traject hyposmotische urine geproduceerd wordt.

SMITH (1963) kon het verschijnsel van een grotere chloride uitscheiding tijdens de osmose bij een overplaatsingsproef van een regulerende t.o.v. een conformerende soort, zoals ELLIS beweerde, niet bevestigen. SMITH's onderzoek aan N. diversicolor, aan de hieraan nauw verwante Amerikaanse soort N. limnicolla en aan N. succinea wees uit dat de meest zwellende soort, N. succinea, bij gelijke zoutsprong ruim 5x zoveel chloride verloor als de twee andere soorten. Om te onderzoeken of de sterkere zwellingen bij N. succinea door een grotere permeabiliteit voor water of door een zwakkere urineproductie veroorzaakt werden, testte SMITH (1964) deze soort en N. limnicolla voor de mate van opname van zwaar water, D_2O . Er werd geen verschil gevonden. De conclusie dat N. limnicolla door een grotere urineproductie grote zwelling vermijdt lijkt gerechtvaardigd, alhoewel de opname van D_2O als maat voor de osmose mogelijk niet correct is.

OGLESBY (1965b) bestudeerde de chloride-fluxen m.b.v. radioactief chloride tijdens de "steady-state", dat is het stadium van een overplaatsingsproef van b.v. zout naar brak water waarbij de worm volledig geadapteerd is aan het nieuwe milieu, dus de volumeregulatie voltooid heeft. Bij de sterk regulerende N. limnicolla vond er in het regulatie-traject geen chloride-uitwisseling met het milieu plaats en in het conformatie traject was er weinig chloride-uitwisseling. Bij N. succinea en N. vexillosa (Grube) was de uitwisseling veel groter en lineair met het zoutgehalte. OGLESBY komt tot de conclusie dat in alle gevallen actieve chloride-opname niet plaatsvindt en/of niet belangrijk is en dat de regulerende soorten alleen door een lagere chloride-permeabiliteit de concentratiegradient tussen dier en milieu beter handhaven. Er zijn aanwijzingen dat de

permeabiliteit samenhangt met de vorm van het lichaam : mogelijk heeft N. limnicolla een relatief kleiner permeabel oppervlak dan N. succinea en N. vexillosa, die beide veel grotere parapodia hebben. De gegevens van FRETTER en JØRGENSEN & DALES wijken in die zin van de resultaten van OGLESBY af dat natrium- en chloride-opname bij N. diversicolor groter was dan op grond van diffusie aangenomen kan worden. OGLESBY wijt dit aan het feit dat hun proefdieren niet voldoende geadapted zijn en nog midden in de volumeregulatie zitten en daardoor nog grote ionen-fluxen vertonen.

Uiteindelijk werden de chloride- en waterfluxen ook bij N. diversicolor tijdens de "steady-state" bestudeerd door SMITH (1970a, 1970b). Daarbij bleek overtuigend dat N. diversicolor in het regulatie-traject overeenkomstig de resultaten van JØRGENSEN & DALES wel degelijk chloride tegen een concentratiegradient in uit het milieu opnam. Bij zeer lage zoutgehaltes daalt deze actieve opname, vermoedelijk niet door een veranderde permeabiliteit maar door een onderbezetting van de chloride-pomp. In dit gebied vertoont het regulatieplateau dan ook een scherpe daling. Verder kreeg SMITH aanwijzingen dat de chloride-uitscheiding bij overplaatsing van de worm in een minder zout milieu inderdaad te wijten was aan urineproductie. In de "steady-state" bleek de schijnbare waterpermeabiliteit aan de hand van D₂O-metingen in het regulatie-traject veel lager dan in het conformatie-traject, wat overeenkomt met de hypothese van JØRGENSEN & DALES. Maar de aanname van deze laatste dat de urine isosmotisch is met de lichaamsvloeistoffen, kon SMITH niet ondersteunen. Berekeningen toonden aan dat de gemeten chloride-uitscheiding via de urine slechts de helft bedroeg van de waarde die volgens JØRGENSEN & DALES bij de gemeten chloride- en waterfluxen behoorde. Dit betekende dat ook POTTS & PARRY juist waren met hun veronderstelling dat in het regulatiegebied hyposmotische urine geproduceerd wordt. SMITH (1970c) slaagde erin de osmotische concentratie van de urine direct te meten en vond dat deze tussen het regulatieplateau en de isosmotische lijn lag, m.a.w. hyposmotisch t.o.v. de lichaamsvloeistoffen was.

Concluderend kunnen we stellen dat

- 1) bij de "steady-state" de osmoregulerende Nereid in het regulatietraject t.o.v. de osmoconformerende Nereid:
 - minder chloride verliest door een lagere chloride-permeabiliteit
 - minder chloride verliest door produktie van hyposmotische urine
 - actief chloride opneemt
 - minder permeabel voor water is,
- 2) bij een zoutsprong omlaag de osmoregulator t.o.v. de osmoconformer:
 - minder chloride verliest door een lagere chloride-permeabiliteit en ondanks dit en ondanks een zelfde permeabiliteit voor D₂O toch minder water opneemt, m.a.w. de urineproduktie moet hoger zijn.

III. Bestaande gegevens over regulatiekrommes van Nereiden.

De osmoregulerende capaciteiten zijn van een vijftal Nereiden goed bekend en van een drietal andere Nereiden bestaan een aantal fragmentarische gegevens. De publicatie van SMITH (1955) over N. diversicolor geeft de eerste relaties tussen inwendige en uitwendige osmotische concentraties over een groot zoutgehaltetraject. Hij vergeleek populaties van verschillende plaatsen in Groot-Brittannië met populaties in Finland en Denemarken. Alle populaties bleken in brak water sterk hyperosmotisch t.o.v. het milieu voor het traject van 0,5 ‰ saliniteit tot ongeveer 15 ‰ saliniteit (het reeds eerder vermelde regulatieplateau) en vanaf 15 ‰ S isosmotisch met het milieu. OGLESBY (1965a) bepaalde de "steady-state" over een groot zoutgehaltetraject bij 4 soorten die in Noord-Amerika aangetroffen worden. N. limnicolla en Laeonereis culveri vertonen een zelfde curve als N. diversicolor: vanaf ongeveer 15 ‰ S isosmotisch. N. vexillosa is over zijn gehele zoutgehaltetraject daarentegen isosmotisch en

N. succinea ligt tussen de vorige soorten in, deze soort vertoont een geringe hyperosmotischeit beneden 15 ‰ S.

N. limnicolla en L. culveri slechts een geringe toename bij afnemend zoutgehalte, terwijl de watergehaltes bij de twee andere soorten veel grotere toenames laten zien.

De verspreiding van de verschillende soorten sluit bij voorgaande gegevens aan. N. vexillosa leeft normaal bij 25-35 ‰ S en in dit traject zijn de waargenomen volumeschommelingen niet erg groot. N. succinea komt in brakker water voor (15-30 ‰ S), maar N. limnicolla en L. culveri worden van 0 of 0,5 ‰ S tot 35 ‰ S of ver daarboven aangetroffen. Het merkwaardige verschijnsel doet zich daarbij voor dat de regulerende soorten niet voorkomen op plaatsen waar ze wel kunnen leven maar waar de conformerende soorten ook voorkomen. Waarom de laatste soorten de regulerende soorten verdringen in gebieden waar ze beiden kunnen leven is niet duidelijk.

Van N. pelagica, P. cultrifera, N. virens en andere soorten zijn de relaties tussen inwendige en uitwendige osmotische concentraties niet of nauwelijks bekend. Het leek daarom interessant om voor N. virens deze basisgegevens te gaan verzamelen. JØRGENSEN & DALES (1957), POTTS & PARRY (1964) en OGLESBY (1965a) stellen dat N. virens zijn lichaamsvloeistoffen hyperosmotisch t.o.v. het medium kan houden en dus reguleert. Ook de volumeregulatie gegevens van SAYLES (1935) wijzen in die richting.

Naast de vraag of en hoe N. virens reguleert, leek het interessant de metingen bij verschillende temperaturen uit te voeren. HOHENDORF (1963) vond voor N. diversicolor dat de hoogte van het regulatieplateau bij 10°C het grootst was en dat bij 1°C de regulatie bij de laagste zoutgehaltes sterk terugliep. Daarmee gepaard trad er een grote sterfte bij de combinatie zeer lage temperaturen- zeer lage zoutgehaltes op. Door deze gegevens werd het begrijpelijker dat N. diversicolor niet in de Botnische en Finse Golf voorkomt ook al leeft N. diversicolor op andere plaatsen in praktisch zoet water.

Opvallend is voorts hoe weinig de osmotische relaties tussen lichaamsvloeistoffen en weefsel bij de Nereiden bestudeerd zijn. In de lichaamsvloeistoffen vormen de electrolyten verreweg het grootste gedeelte van de osmotische concentraties, terwijl in de weefsels de kleine organische molekulen minstens zo belangrijk zijn. Wanneer het zoutgehalte in het milieu verandert zal het zoutgehalte van het bloed zich meer of minder aanpassen, afhankelijk van de mate van regulatie van het betreffende dier in het betreffende zouttraject. Het weefsel heeft verschillende mogelijkheden om zich op het nieuwe niveau in te stellen. Het kan namelijk de concentraties van de verschillende osmotische componenten in gelijke mate veranderen of bijvoorbeeld slechts de concentratie van één van de componenten. Deze processen kunnen zich zowel bij osmoconformers als bij osmoregulators voordoen en worden samengevat onder de term "isosmotische intracellulaire regulatie" (FLORKIN & SCHOFFENIELS, 1969). De isosmotische intracellulaire regulatie hangt samen met de volumeregulatie. Wanneer de cellen door een verandering in osmotische concentratie van de omringende vloeistoffen opzwellen of krimpen door osmose kan alleen door een verandering van de totale hoeveelheid opgeloste stof in de cellen het watergehalte op de oorspronkelijke waarde gebracht worden. Daarbij kan dan de ene osmotisch belangrijke groep opgeloste stoffen sterker toe of afnemen dan een andere osmotisch belangrijke groep opgeloste stoffen (LANGE, 1968). JEUNIAUX, DUCHATEAU-BOSSON & FLORKING (1961) vonden bij N. diversicolor dat de hoeveelheid intracellulaire vrije aminozuren osmotisch erg belangrijk is en dat deze hoeveelheid bij afnemende saliniteit veel sterker daalt dan de totale hoeveelheid opgeloste stof. Op grond van het voorafgaande leek het daarom nuttig om bij N. virens bij alle proeven weefsel en lichaamsvloeistof gelijktijdig te volgen en zo een eventuele isosmotische intracellulaire regulatie aan te tonen.

IV. Materiaal en methoden

1. Biologie van Nereis virens

N. virens is de grootste West-Europese Nereissoort.

De worm, in Nederland zager genoemd, wordt o.a. aangetroffen in Noordzee en Oostzee met aangrenzende estuaria en leeft in met slijm beklede gangen in het zand tussen en onder stenen en in het slib onder mosselbanken. De soort wordt vooral gevonden in het onderste eulittoraal, maar misschien ligt het hoofdverspreidingsgebied in het sublittoraal. Dichtheden van 5 volwassen exemplaren per m² zijn aangetroffen. De worm is omnivoor en wordt zelf vooral gegeten door platvissen. In tijden van vorst is het waarschijnlijk dat de wormen naar dieper water trekken (GOERKE, 1971).

Bij veel Nereiden ondergaat het lichaam tegen de voortplantingstijd een verandering die leidt tot de zogenoemde heteronereis, een verschijningsvorm die in tegenstelling met de oorspronkelijke habitus kan zwemmen. Bij N. virens ontbreekt het heteronereis-stadium maar kan de normale vorm gedurende het hele leven zwemmen. De lozing van de gameten vindt plaats in mei, althans in Engeland, en schijnt samen te vallen met nieuwe maan. Vooral de ♂♂ verlaten dan hun gangen en vormen zwermen. Beide sexen sterven na het lozen van de gameten. Bij de ♀♀ scheurt de lichaamswand en komen de eieren zodoende vrij. Bij de ♂♂ verlaten de spermatozoen vooral het lichaam via de uitscheidingskanalen, de nephridia, maar ook de ♂♂ sterven hierna. Hoe en hoelang de larvale ontwikkeling plaatsvindt is niet bekend, bij N. diversicolor is dat 10 weken (DALES, 1950). De ontwikkeling van de larven tot geslachtsrijpe wormen neemt een kleine 2 jaar in beslag. De eerste oöcyten worden in februari van het 1^o levensjaar van de ♀♀ gevonden, maar deze ontwikkelen zich pas na de zomer en bereiken in februari van het 2^o levensjaar hun maximale grootte. Bij de ♂♂ worden de eerste spermatocyten pas in september/oktober van het 2^o levensjaar gevonden. Rijpe wormen nemen een groene kleur aan vanwege de door de lichaamswand

heenschijnende groene kleur van de gameten (BRAFIELD & CHAPMAN, 1967). Bij N. diversicolor werd door DALES (1950) gevonden dat bij de ontwikkeling van de gameten in de coeloomholte, cellen in de coeloomvloeistof verschijnen, die vooral bij de ++ op den duur zelfs een pseudo-weefsel kunnen vormen. Wanneer de eieren bijna rijp zijn verdwijnt dit weefsel maar dan begint een ander proces : het spierweefsel breekt af en spiervezels worden in het coeloom door fagocyten verteerd. De spierwand wordt dunner en scheurt waarna de eieren vrijkomen. Ook bij N. virens treedt bovenstaand proces waarschijnlijk op (BRAFIELD & CHAPMAN, 1967).

et in dit verslag weergegeven onderzoek is verricht aan dieren die in juli en augustus verzameld zijn. Het betreft dan volgens BRAFIELD & CHAPMAN voornamelijk ruim één jaar oude, niet geslachtsrijpe dieren. De bij de proeven gebruikte wormen zijn niet gesexed. De wormen werden betrokken bij de zeepierenhandelaars Duinker (Nieuwe Schilderweg, Oosterend) en Leijen (De Noorderhaaks, 't Horntje). Het eerst genoemde bedrijf hield de zagers in grote kisten drijvend buiten de dijk in voorraad (meerdere dagen) terwijl Leijen ze 1 of 2 dagen droog en koel bewaarde. De zagers werden bij beide bedrijven in het zelfde gebied gestoken, namelijk de mosselbanken ten NO van Oosterend. De aanvoer van zagers is sterk afhankelijk van de eb-waterstand, alleen bij springtij of bij aanhoudende oostenwind zakt het water voldoende voor de stekers om de wormen te bereiken.

2. Proefopzet.

Glazen experimenteeraquaria werden opgesteld bij een constante temperatuur. De aquaria bezaten de volgende afmetingen: 29x21x24 cm en 46x29x28 cm. De kleine bakken werden voor de reeks zoutgehalten 5-10-15-20-25-30-35-40 ‰ Saliniteit gebruikt (voor het meten van de "steady-state"), de grote bakken werden gebruikt als voorraadbakken en voor adaptatiesnelheidsmetingen bij overplaatsingsproeven. Het zeewater dat uit de NIOZ-haven opgepompt wordt had op het moment van de proefseries een zoutgehalte van ongeveer 30 ‰ en de lagere zoutgehalten werden hieruit gemaakt door verdunning met aqua dest.

De hogere zoutgehalten werden bereid door toevoeging van HW-zeezout. De bodem van de bakken werd bedekt met een laag zorgvuldig gespoeld en van organismen ontdaan zand afkomstig uit de Mokbaai. Met bruissteentjes aangesloten op de perslucht-leiding werd het water in de bakken van zuurstof voorzien. De aquaria werden afgedekt met glasplaten om verdamping van het water en de daarmee gepaard gaande zoutgehalte-toename te beperken.

De beschreven opstelling leverde een redelijk homogeen milieu qua zoutgehalte op, zie tabel 1.

Tabel 1. Zoutgehalte-gradiënten in de proefbakken aan het eind van de acclimatieperioden. Proefserie "steady-state" 5° C.

acclimatie-saliniteit	zoutgehalte uitgedrukt in vriespuntsverlaging (°C)		
	watermonstering direct vóór ver-storing van de proefbak door het verzamelen van de geacclimatiseerde wormen	watermonstering nà het ver-zamelen van de geacclimati-seerde wormen, na omroeren van de proefbak	
	bovenstaand water	interstitieel water	bovenstaand + interstitieel water
5 ‰	0,30	0,29	0,30
10 ‰	0,60	0,59	0,60
15 ‰	0,84	0,84	0,84
20 ‰	1,14	1,16	niet gemeten
25 ‰	1,36	1,43	1,37
30 ‰	1,70	1,70	1,69
35 ‰	1,90	niet gemeten	1,93
40 ‰	2,15	2,11	2,16

De zagers werden bij aankomst eerst enige dagen in voor-raadbakken met zeewater van ongeveer 30 ‰ S gehouden voor temperatuuracclimatatie aan 15° C.

Dieren die een groot stuk achterlijf misten, verwondingen hadden of zich niet ingroeven werden verwijderd. Daarna werden de intacte dieren direct overgebracht in de 15 t/m 40 ‰ S, 7 ex. per bak. De dieren voor de 5 en 10 ‰ S aquaria werden eerst minstens $1\frac{1}{2}$ dag in een 15 ‰ S bak gehouden voordat ze overgebracht werden in hun uiteindelijke media om een te grote zoutsprong te vermijden. Het water werd tijdens de adaptatie-periode niet verversst tenzij het door sterfte van dieren troebel werd. De sterfte was overigens gering, van de 126 in de adaptatiebakken gehouden wormen zijn er slechts 11 in de bak gestorven, waarvan 7 bij het laagste gebruikte zoutgehalte, 5 ‰ S. Er is gewerkt bij twee temperaturen : 15 en 5° C. De temperatuurkamer was afgesteld op 15° C. De temperatuur van de proefbakken bedroeg $15 \pm 0,5^\circ$ C. De proefserie bij 5° C werd uitgevoerd door de aquaria te plaatsen in twee grote, met koelwater gevulde, asbestonen bakken die door middel van een Colora Tauchkühler op 5° C. gebracht werden. Met behulp van pompjes is een homogene temperatuurverdeling in deze koelbakken bereikt. De temperatuur in de aquaria bedroeg $5 \pm 0,3^\circ$ C. De aquaria (met dieren) werden in twee dagen geleidelijk van 15 op 5° C gebracht; de eerste bemonstering vond pas 10 dagen later plaats. Bij 15° C vonden de eerste bemonsteringen plaats 7-14 dagen na het inzetten in de uiteindelijke media, bij 5° C werd bemonster³ op 7-12 dagen na het inzetten in de uiteindelijke media.

De zagers werden niet gevoerd. In de voorraadbakken kwam weleens kannibalisme voor, wat bleek uit het verdwijnen van een aantal wormen of het vinden van stukken worm. In de proefbakken is kannibalisme nooit opgemerkt. Alle bemonsteringen zijn binnen 4 weken na aankomst van de dieren gedaan.

III. Bemonstering

Na het nemen van watermonsters voor saliniteitscontrole, werden de wormen voorzichtig uit het zand van de betreffende proefbak gegraven. Na korte uitwendige droging met Kleenex

werd een worm op een met Kleenex bedekt bakje met ijs gelegd om heftige bewegingen van het dier te verminderen en zodoende de monstername te vergemakkelijken. Een spits glascapillair werd zodanig door de lichaamswand in de coeloomholte gestoken dat het in de coeloomholte hangende darmkanaal niet doorboord werd. Volgens HOHENDORF (1963) geeft verontreiniging van de te meten coeloomvloeistof met darmvocht een te hoge waarde voor de vriespuntsdaling en een te lage waarde voor de geleidbaarheid. Om het capillair vol te doen lopen met coeloomvloeistof werd de punt van het capillair door een aantal septen van de worm heen geprikt. Om een 2 ml buisje met coeloomvloeistof te vullen was het voldoende om het capillair op een gering aantal, soms slechts 1 of 2, plaatsen in de worm te brengen. Binnen 5 minuten, in het uiterste geval 10 minuten, was voldoende coeloomvloeistof verzameld. De plaatsen waar geprikt werd lagen over de hele lengte van de worm, behoudens het uiterste kop- en staartgedeelte.

Door 5 minuten te centrifugeren met de MSE minor centrifuge (RCF = 2300 g) werden partikels als de eerdergenoemde pseudo-weefsel vormende cellen en in ontwikkeling zijnde oöcyten afgezwaid. De bovenstaande heldere coeloomvloeistof werd daarna afgesloten in de koelkast gezet. Vervolgens werd ongeveer 5 cm achter de kop een stukje worm van ± 5 cm afgeknipt dat overlans werd opengeknipt en door het verbreken van de septen werd opengevouwen. Na verwijdering van het darmkanaal en grondig uitwendig drogen met Kleenex werd het in twee delen geknipt. Het ene deel werd gewogen en daarna in een droogstoof geplaatst voor het bepalen van het watergehalte. Het andere deel werd eveneens gewogen en vervolgens samen met 5 ml aqua dest gehomogeniseerd. De proeven bij 15° C werden met Potterbuizen gehomogeniseerd, de proeven bij 5° C met een later beschikbare Virtis "23" Micro Homogenizer. Deze verandering in homogeniseer-methode had aanzienlijke tijdwinst tot gevolg. Een kleine vergelijkingsproef gaf geen noemenswaardig verschil in uitkomsten tussen

beide homogeniseer-methoden, zie blz. ³⁵~~30~~. Met de Potterbuizen werd gehomogeniseerd tot geen grote deeltjes meer zichtbaar waren. Met de Virtis werd 5 minuten op het hoogste toerental gehomogeniseerd. Daarna werd het homogenaat 5 minuten met de MSE minor centrifuge afgezwaid en werd de bovenstaande vloeistof afgeheveld. Hiervan werd een monster genomen voor de bepaling van de concentratie aan "non-protein ninhydrine positive substances", verder kortweg NPS genoemd, waarmee stikstofverbindingen als aminozuren, ammonia e.d. kwantitatief gemeten kunnen worden. Na onteiwitten werden in reageerbuizen de voor de bepaling benodigde hoeveelheden bij -35°C opgeslagen. Het zelfde werd voor de NPS-bepaling van de coeloomvloeistof gedaan. Tenslotte werden op de zelfde dag nog vriespuntsdalingen van de coeloomvloeistof en eventueel weefselhomogenaat gemeten. Daarna werden de monsters bij -35°C ingevroren om later de geleidbaarheid en de ionen-concentraties te bepalen.

IV. Bepalingen

1. Vriespuntsdaling.

Als maat voor de totale osmotische concentratie werd van de te meten monsters het vriespunt gemeten. De mate van verlaging van het vriespunt van een oplossing, verder aan te duiden met het symbool Δ , is afhankelijk van het aantal deeltjes dat opgelost is. Hoe groter het aantal opgeloste deeltjes, onafhankelijk van de aard van de opgeloste deeltjes in het ideale geval, hoe groter deze vriespuntsdaling.

De metingen werden uitgevoerd met een Knauer vriespunts-osmometer. Met dit apparaat is het mogelijk om in 2 à 3 minuten een meting te doen. Een kleine hoeveelheid monster wordt in een houder gebracht waarna het elektroden-gedeelte in de houder geplaatst wordt. Een peltierelement koelt het monster af, de onttrokken warmte wordt via een aansluiting op een koelaggregaat afgevoerd. De temperatuur van het monster wordt op $-5,95^{\circ}\text{C}$ gebracht, de koeling wordt uitgeschakeld.

Als een roerdertje korte tijd in werking wordt gesteld begint het onderkoelde monster te bevriezen. Tijdens dit proces stijgt de temperatuur van het monster door de vrijkomende stollingswarmte tot het vries- of smeltpunt van het monster. Daarna daalt de temperatuur weer door warmteverlies aan de omgeving of loopt verder op als het monster door een warme omgeving gaat smelten. De temperatuur wordt via het zelfde peltierelement door een wijzer op het apparaat gevolgd. Bij het vriespunt blijft de wijzer stilstaan en met behulp van een door de fabrikant geleverde ijkoplossing is het dan mogelijk om de afgelezen stand om te rekenen in Δ .

De hoeveelheid monster nodig voor één meting bedraagt ongeveer 0,05 ml. Alle monsters werden 2x gemeten en voor de berekening van Δ werd het gemiddelde van deze twee waarden genomen. Het door de Hydrographic Laboratories te Kopenhagen verstrekte Standard Sea Water (chloriniteit 19,380 ‰) gaf onverdund met de Knauer een Δ van 1,91°C. Deze waarde komt overeen met die in Table 4 van BARNES (1954) en is verder als ijkwaarde gebruikt bij de geleidbaarheidsmetingen. Gezien de grote mate van lineariteit tussen Δ en de osmotische concentratie door SPAARGAREN (1969) voor de Knauer gevonden, werden alle monsters onverdund gemeten. In tegenstelling met SPAARGAREN's ervaringen met Crangon crangon leverde dit bij de coeloomvloeistof van N. virens weinig of geen moeilijkheden op. Wel werd gevonden dat de Δ 's van de weefselhomogenaten niet direct vergelijkbaar zijn met de Δ 's van de monsters coeloomvloeistof. De vóór het homogeniseren toegevoegd 5 ml aqua dest aan het gemonsterde stukje weefsel betekent een aanzienlijke verdunning van de osmotische concentraties van het weefsel. Ijkoplossingen van verschillende verdunningen Standard Sea Water tonen dat de uit de gemeten Knauer-waarden naar 100 % Standard Sea Water teruggerekende Δ 's te hoog uitvallen, zie tabel 2.

Tabel 2.

concentratie Standard Sea Water	Δ °C berekend naar 100 % Standard Sea Water
100 %	1,91
20 %	2,03
10 %	2,05
5 %	2,13
2,5%	2,17
1 %	2,27

De concentratie van de weefselhomogenaten is ongeveer 10 % van het onverdunde weefsel. Volgens tabel 2 vallen de berekende Δ 's dan ongeveer 0,14° C te hoog uit, mits opgeloste stoffen in het weefsel zich overeenkomstig die in zeewater gedragen.

2. Geleidbaarheid.

Als maat voor de bijdrage van de electrolyten aan de totale osmotische concentratie werd van de te meten monsters de geleidbaarheid bepaald. De geleidbaarheid van een bepaalde oplossing is afhankelijk van de concentratie en de beweeglijkheid van de in de oplossing aanwezige ionen. Wanneer de temperatuur constant gehouden wordt, vormt de geleidbaarheid een goede maat voor de concentratie van die ionen. Dit verband is niet lineair, bij hogere concentraties meet men te lage geleidbaarheden door sterkere polarisatie van de elektroden. De te meten monsters zijn daarom altijd verdund zodat het meettraject beperkt werd en als rechtlijnig kon worden beschouwd. Een verdunning van Standard Sea Water, die een uitslag gaf in de zelfde orde van grootte als die van de verdunde monsters, werd als ijkoplossing gebruikt. De wijzeruitslagen van de

geleidbaarheidsmeter werden meteen omgerekend in Δ 's :

$$\Delta_{\text{electrolyt monster}} = \frac{\text{verdunningscorrectie}_{\text{monster}}}{\text{verdunningscorrectie}_{\text{ijkoplossing}}} \times \frac{\text{uitslag}_{\text{monster}}}{\text{uitslag}_{\text{ijkoplossing}}} \times \Delta_{\text{Standard Sea Water}}$$

Voor Δ Standard Sea Water werd de met de Knauer gevonden waarde van $1,91^{\circ}$ C genomen. De gebruikte geleidbaarheidsmeter is de Philips PR 9501/01 met de Philips electrode PW 9513. De monsters en ijkoplossingen werden met aqua bidest verdund. De verdunde oplossingen werden in een waterbad op 20° C gehouden.

3. Ionenconcentraties.

De geleidbaarheid is een maat voor de totale ionenconcentratie. Daarnaast leek het interessant om de concentraties van de 3 talrijkst aanwezige ionen, Cl^- , Na^+ en K^+ , afzonderlijk te bepalen. Voor Cl^- gebeurde dat potentiometrisch met een chloridometer. De elektroden van deze meter worden in de te meten oplossing geplaatst, waarna een pulserende stroom op de generator-elektroden gezet wordt. Bij elke stroomstoot komt een constante hoeveelheid zilver uit de anode vrij. Deze in de oplossing gaande zilverionen vormen met de in de oplossing aanwezig zijnde chloride-ionen het onoplosbare AgCl . Wanneer al het chloride neergeslagen is, zal de bij de eerstvolgende puls vrijkomende hoeveelheid zilverionen naar de detectie-elektroden stromen en deze depolariseren. Hierdoor wordt de pulserende stroom gestopt. De waarde die de pulsen registrerende teller dan aangeeft is een directe maat van de aanwezige hoeveelheid chloride in de oplossing. Een NaCl -oplossing van 100 milligramequivalenten/liter werd als ijkoplossing gebruikt.

De gebruikte chloridometer is de Marius micro-chlor-o-counter.

Na^+ en K^+ zijn vlamspectrofotometrisch bepaald. Deze bepaling berust op het principe dat aangeslagen atomen en molekulen licht kunnen uitzenden waarvan de golflengte specifiek is voor de betreffende stoffen. De te meten vloeistoffen worden via een sproeier vergast en in een constant brandende vlam gebracht. Via spiegels wordt het emissie-licht van de zich in de vlam bevindende stoffen, in dit geval ionen, door een fotocel geregistreerd waarbij een monochromator er voor zorgdraagt dat de opstelling het meest gevoelig is voor de golflengte die de te meten ionen uitzenden. De fotocel is verbonden met een afleesapparaat en de uitslag hiervan is een maat voor de concentratie van ionen in de vloeistof. Met behulp van een serie ijkoplossingen kunnen de gevraagde concentraties worden berekend. Om interferentie tussen de verschillende ionen op te vangen zijn bij de bepaling van Na^+ en K^+ in de coeloomvloeistof-monsters ijkoplossingen gebruikt die verdunningen waren van Standard Sea Water. Gezien de hoge K^+ waarden in het weefsel werden voor de bepaling van Na^+ en K^+ in het weefselhomogenaat ijkoplossingen gebruikt waarbij de verhouding Na^+/K^+ (in gramionen) $\frac{1}{2}$ was.

De bepalingen zijn uitgevoerd met een Zeiss vlamspectrofotometer.

4. NPS-bepaling

De met de Knauer bepaalde vriespuntsverlaging minus de gemeten geleidbaarheid uitgedrukt in vriespuntsverlaging geeft het gedeelte van de vriespuntsverlaging dat te wijten is aan niet-electrolyten. Om meer informatie over deze niet-electrolyten op te doen, zijn de concentraties van een bepaalde groep niet-electrolyten, de stikstofverbindingen, afzonderlijk bepaald. Ninhydrine reageert met de NH_2 -groep van organische molekulen tot een verbinding die blauw gekleurd is. De intensiteit van de kleuring is een maat voor de concentratie van NH_2 bevattende stoffen en dus kan met fotometrisch deze concentratie bepalen.

Onder de in de lichaamsvloeistoffen en weefsels algemeen voorkomende stoffen met NH_2 -groepen vallen de vrije aminozuren, eiwitten, peptiden, aminen en ammoniak. De eiwitten nemen in dit rijtje een afwijkende plaats in omdat het aantal molekulen in vergelijking met de andere genoemde stoffen vrij laag is en dus osmotisch niet zo belangrijk is. Wel bevatten de eiwitten veel NH_2 -groepen zodat dit de ninhydrinereactie sterk intensiveert. De monsters coeloomvloeistof en weefselhomogenaat zijn daarom eerst onteiwit voordat de reactie met ninhydrine uitgevoerd werd. Bij 0,02 ml monster is daartoe 0,2 ml aqua dest en 0,6 ml methanol/aceton (3:1) gevoegd. Na roeren werd de vloeistof in de koelkast weggezet. De aanwezige eiwitten vlokken uit en werden na 1 uur afgezwaaaid (5 minuten, 2300 g) en 0,2 ml van de heldere vloeistof werd in een met parafilm afgesloten reageerbuis voor latere analyse weggezet bij -35°C .

De eigenlijke NPS-bepaling werd uitgevoerd volgens de methode van MOORE & STEIN (1948). Bij de 0,2 ml in de reageerbuis is 1 ml ninhydrine gevoegd waarna de buis direct in een kokend waterbad geplaatst is. Bij deze temperatuur hebben binnen 20 minuten alle aminozuren met ninhydrine gereageerd. Tegelijk met de buizen met monsters zijn buizen met ijkoplossingen en buizen met blanco's meegekookt. Na 20 minuten werden de buizen gelijktijdig uit het waterbad gehaald, snel in kraanwater afgekoeld en vervolgens werd bij elke buis 10 ml propanol/water (1 : 1) gepipetteerd om verdunningen te krijgen waarbij fotometrische bepalingen goed mogelijk zijn. Als ijkoplossingen zijn verdunningen van het aminozuur DL-leucine gebruikt. Met de Zeiss fotometer werden de extincties bepaald bij 5700 Å, de golflengte die het meest geabsorbeerd wordt door de leucine-ninhydrine verbinding. Andere aminozuren geven soortgelijke verbindingen waarbij de gevoeligheid eveneens bij deze golflengte het grootst is. Alleen de aminozuren proline en hydroxyproline geven een

produkt met een maximum absorptie bij 4400 Å.

Met behulp van de leucine-ijkoplossingen werden de gevonden extincties uitgedrukt in milligrammen stikstof per 100 gram coeloomvloeistof of weefselvocht. Op grond van het gegeven dat een ideaal niet-electrolyt een vriespuntsdaling geeft van $1,86^{\circ}$ C per grammolekuul/liter zijn de gevonden stikstofconcentraties omgerekend in Δ 's, er van uitgaande dat elk stikstof bevattend molekuul slechts één NH_2 -groep heeft. De NPS-bepalingen werden in duplo uitgevoerd en voor de berekening van Δ werd het gemiddelde van de twee extincties genomen.

5. Watergehalte.

Voor het berekenen van de concentraties van de verschillende osmotisch belangrijke opgeloste stoffen in het weefsel van de lichaamswand is het noodzakelijk het watergehalte van het weefsel te kennen :

$$\text{watergehalte} = \frac{\text{natgewicht} - \text{drooggewicht}}{\text{natgewicht}} \times 100 \%$$

Na de bepaling van het natgewicht van de gemonsterde stukjes weefsel zijn deze in een droogstoof bij 70° C geplaatst. Na 2 dagen drogen bleef het gewicht van de stukjes weefsel constant en werden binnen 1 week de drooggewichten bepaald. De wegingen zijn uitgevoerd met de Mettler H20T balans tot op 0,1 milligram nauwkeurig. Met behulp van een exicator is vochtaantrekking bij het transport tussen stoof en balans voorkomen.

Aangezien bij het homogeniseren 5 ml aqua dest toegevoegd is bij het gewogen weefselmonster is de volgende concentratiecorrectie, een vermenigvuldigingsfactor, gebruikt voor het berekenen van de osmotische concentraties van het weefselvocht uit de gemeten waarden van het weefselhomogenaat :

$\frac{5 + \text{watergehalte} \times \text{natgewicht}}{\text{watergehalte} \times \text{natgewicht}}$, waarbij het natgewicht in grammen uitgedrukt is.

Opgemerkt moet worden dat de bepalingen van de osmotische concentraties van het weefselvocht geen zuivere bepalingen van de intracellulaire osmotische concentraties vertegenwoordigen. Immers, bij de gevolgde methode wordt de concentratie in het celwater + de interstitiële vloeistof gemeten. De interstitiële vloeistof komt qua samenstelling vermoedelijk sterk overeen met bloed en coeloomvloeistof. De concentraties van de meeste opgeloste stoffen zijn in de extracellulaire vloeistof anders als in de intracellulaire vloeistof en dat heeft tot consequentie dat de berekende osmotische concentraties van het weefselvocht niet geheel representatief zijn voor de osmotische concentraties binnen de cel. Verder is omgekeerd ook de coeloomvloeistof die bemonsterd is verontreinigd met de intracellulaire vloeistof. Het prikken met het glascappillair door de lichaamswand heen veroorzaakt ongetwijfeld beschadigingen aan een aantal cellen. Op deze verontreinigings-problematiek wordt later in dit verslag nog teruggekomen.

Tenslotte worden hier de afkortingen vermeld die verder in dit verslag gebruikt worden :

- △ coel = de gemeten vriespuntsverlaging van de coeloomvloeistof.
- △ coel elect = de gemeten geleidbaarheid van de coeloomvloeistof omgerekend in vriespuntsverlaging.
- △ coel NPS = de gemeten NPS-concentratie van de coeloomvloeistof omgerekend in vriespuntsverlaging.
- △ weefs = de gemeten vriespuntsverlaging van het weefselhomogenaat omgerekend naar weefselvocht.
- △ weefs elect = de gemeten geleidbaarheid van het weefselhomogenaat omgerekend naar vriespuntsverlaging en naar weefselvocht.
- △ weefs NPS = de gemeten NPS-concentratie van het weefselhomogenaat omgerekend naar vriespuntsverlaging en naar weefselvocht.

V. Resultaten

1. Adaptatiesnelheid.

Alvorens metingen aan de "steady-state", de situatie waarin de worm aan het milieu geacclimatiseerd is, te kunnen verrichten, is het noodzakelijk te weten hoe snel na een zoutsprong de worm aan het nieuwe milieu aangepast is. Om van deze adaptatiesnelheid een indruk te krijgen, worden direct na een zoutsprong om de zoveel tijd monsters genomen tot de osmotische concentraties niet meer veranderen en daarmee de "steady-state" begint. Gegevens over de adaptatiesnelheid zijn daarnaast van oecologisch belang i.v.m. de grote variatie in het zoutgehalte die op korte termijn in het natuurlijke milieu kunnen optreden.

Bij 5 en 15° C zijn dieren overgebracht van ± 30 in ± 15 ‰ S. Op verschillende tijdstippen zijn twee wormen be-monsterd en is hun Δ coel gemeten, zie figuur 1. We merken op dat zowel bij 15° C als bij 5° C de coeloomvloeistof op tijdstip 0 nagenoeg isosmotisch is met het milieu. Bij 15° C is de coeloomvloeistof in 24 uur isosmotisch geworden met het nieuwe milieu. Ook bij 5° C wordt het osmotisch verschil tussen de coeloomvloeistof en het nieuwe milieu volledig overbrugd, in dit geval in 48 uur (figuur 1 en 2). De "halfwaarde tijd" is bij beide temperaturen gelijk : 3,3 uur. Dit geeft een temperatuurcoëfficiënt, Q_{10} , van 1, wat betekent dat de bij de adaptatie betrokken processen van eenvoudige fysische aard zijn (zie GIESE, 1962). Bij 5° C is de adaptatie langer gevolgd en zijn tevens Δ coel elect, Δ coel NPS, Δ weefs, Δ weefs elect, Δ weefs NPS en het watergehalte van het weefsel gemeten (figuren 2 en 3). Het blijkt dat de verschillende osmotische componenten overeenkomstige curves geven met uitzondering van Δ coel NPS. weefs ligt steeds ongeveer 18 % boven Δ coel. Algemeen wordt aangenomen dat weefsel en lichaamsvloeistoffen onderling isosmotisch zijn en het gevonden verschil moet daarom te wijten zijn aan verdunningseffecten (zie blz. ²³~~19~~) en aan autolyse (zie blz. ³³~~29~~).

Δ weefs elect en Δ weefs NPS zijn steeds ongeveer gelijk en zowel op tijdstip 0 als na 16 dagen in het nieuwe milieu zijn ze samen verantwoordelijk voor ongeveer 70 % van Δ weefs. Bij de coeloomvloeistof is Δ coel elect kwantitatief veel belangrijker dan Δ coel NPS. Het grootste deel van Δ coel wordt gevormd door Δ coel elect en van het restant van ongeveer $0,11^{\circ}$ C valt slechts $0,01^{\circ}$ C onder Δ coel NPS. Δ coel NPS wijkt af van de andere curves door geen duidelijke daling te vertonen. Uit figuur 3 blijkt dat deze daling bij de andere curves samen- gaat met een snelle stijging van het watergehalte van het weefsel. Het maximale watergehalte is na 48 uur bereikt wat overeenkomt met het tijdstip waarna de Δ 's constant blijven. Het is duidelijk dat door osmose het concentratieverschil tussen het dier en het nieuwe milieu vermindert en er zal water binnen blijven komen tot de inwendige concentraties zo verdund zijn dat binnen en buiten gelijk zijn geworden. Of naast het weefsel ook de coeloom- vloeistof verdund wordt lijkt erg waarschijnlijk, alhoewel geen metingen verricht zijn. Zie ook de opmerkingen op blz. ³¹26. Het watergehalte van het weefsel begint na 2 dagen weer af te nemen en deze afname is significant (rangcorrelatietoets van Spearman, $P = 0,001$). De afname van de hoeveelheid water in het weefsel gaat niet gepaard met een overeenkomstige stijging van de osmotische concentraties, met andere woorden met het verdwijnen van het water uit het weefsel verdwijnen er ook opge- loste stoffen.

2. De osmotische concentraties bij een reeks zoutgehalten ("steady-state").

Zoals op blz. 18 reeds vermeld waren de wormen 1 à 2 weken aan verschillende zoutgehalten geadapteerd voordat ze bemonsterd werden. Op grond van de beide adaptatiesnelheidsproeven mag verwacht worden dat zich dan een stabiele toestand ontwikkeld heeft en dat dan het uiteindelijke niveau van de osmotische concentraties en mogelijk de watergehalten gemeten wordt. De dieren bij de laagste ge- bruikte saliniteit vormen een uitzondering. Bij 15° C bleek dat de worden in 5,8 ‰ S enorm opgezwollen, zich niet ingroeven en

bewegingsloos op de zandbodem lagen. Na $5\frac{1}{2}$ dag waren er van de 7 exemplaren 4 gestorven en de 3 resterende waren stervende. Van deze laatsten is nog wel Δ coel gemeten (in figuur 5 met * aangegeven). Een tweede proef bij een iets hogere saliniteit, 7,5 ‰, werd reeds na 3 en 4 dagen bemonsterd en al deze dieren waren goed levend. Opmerkelijk was dat bij 5° C wormen in 5,6 ‰ S wel opzwollen maar bij het monstereen na $5\frac{1}{2}$ dag allen intact en goed levend bleken. Om te weten hoe lang N. virens bij deze temperatuur en saliniteit blijft leven werd een tweede groep van 7 beesten ingezet. Deze bleven 14 dagen leven bij 5° C toen door een storing de koeling van de 5° C bakken uitviel en de temperatuur de waarde aannam van de koelkamer : 15° C. Na 5 dagen waren toen alle wormen dood. Bij alle andere gebruikte zoutgehalten trad geen noemenswaardige sterfte op en waren alle wormen in staat zich in te graven en te zwemmen. Wel leken de dieren bij 10 en 15 ‰ S meer gezwollen dan bij de andere salinititeiten. Bij het monstereen van de coeloomvloeistof bleek verder dat hoe lager het zoutgehalte hoe meer coeloomvloeistof met het glascappillair uit het lichaam van de worm gezogen kon worden. Dit verschijnsel is niet kwantitatief bepaald. Uit de watergehalte bepalingen van het weefsel blijkt dat ook het weefsel meer water bevat naarmate het zoutgehalte lager wordt (figuur 4). Deze toename in het watergehalte met afnemend zoutgehalte is aanzienlijk. Kennelijk ontbreekt een goed mechanisme om het in het weefsel door osmose binnenkomend water weg te werken en is het weefsel erg tolerant voor volumeveranderingen. De bovengenoemde sterftes bij lage zoutgehalten gaan ook niet gepaard met breken of scheuren van de opgezwollen lichaamswand maar de dieren sterven geleidelijk af. Het is opvallend dat het watergehalte bij 15° C over het hele onderzochte zouttraject lager ligt als dat van 5° C. Mogelijk gebeurt het uitscheiden van water (plus opgeloste stoffen) zoals bij 5° C en wordt zodoende na 1-2 weken een lager "eindniveau" gemeten.

De metingen van de osmotische concentraties betreffen bij 15°C : Δ_{coel} , $\Delta_{\text{coel elect}}$, Δ_{weefs} , $\Delta_{\text{weefs elect}}$ en weefs NPS. Bij 5°C zijn behalve deze Δ 's verder nog bepaald $\Delta_{\text{coel NPS}}$ en de concentraties van Cl^{-} , Na^{+} en K^{+} in zowel coeloomvloeistof als weefselhomogenaat.

Uit figuur 5 en 6 blijkt dat Δ_{coel} boven 15 ‰ S praktisch gelijk loopt met de isosmotische lijn ($\Delta_i = \Delta_e$) en onder 15 ‰ S praktisch gelijk loopt met de isosmotische lijn ($\Delta_i = \Delta_e$) en onder 15 ‰ licht afwijkt van deze lijn. De afwijking is klein bij 5°C en hier kunnen we beter spreken van osmoconformiteit over het hele onderzochte traject. In figuur 7 is Δ_{coel} van beide temperaturen samengezet. Bij 15°C zou men tussen 10,7 en 7,5 ‰ S van een begin van een regulatieplateau kunnen spreken, maar gezien de onder 7,5 ‰ S optredende sterfte is van een duidelijke osmoregulatie geen sprake. Overeenkomstig de resultaten gevonden bij de adaptatiesnelheidsproeven maakt $\Delta_{\text{coel elect}}$ het grootste deel uit van Δ_{coel} (figuur 5 en 6). Uit de bij 5°C gevonden waarden voor $\Delta_{\text{coel NPS}}$ mag afgeleid worden dat ook hier het verschil tussen Δ_{coel} en $\Delta_{\text{coel elect}}$ slechts een klein deel door aminozuren, ammonia e.d. gevormd wordt. $\Delta_{\text{coel NPS}}$ toont overigens geen verband met het zoutgehalte, zie tabel 3. Wel is er een relatie met de mate van verontreiniging door bloed bij het monstere van coeloomvloeistof. De punt van het glascappillair raakt soms de bloedvaten in de coeloomholte waardoor vermenging van coeloomvloeistof met bloed optreedt. In tabel 4 zijn de coeloommonsters ingedeeld naar mate van roodheid. Door de ont-eiwit-procedure verdween de rode kleur maar van de daarna afgezwaaide NPS-monsters bleken de monsters afkomstig van de rode coeloomvloeistoffen geler van kleur dan de anderen. De verhoogde NPS waarden duiden mijns inziens op restsporen van bloed-eiwitten of, wat waarschijnlijk is, op een NPS-stof die in het bloed veel talrijker aanwezig is dan in de coeloomvloeistof.

Tabel 3. Δ coeloom NPS bij 5° C, "steady-state".

acclimatie- saliniteit	aantal dieren bemonsterd	coeloom NPS gemiddeld in ° C	standaard- afwijking
5 ‰	5	0,024	0,010
10 ‰	5	0,007	0,002
15 ‰	5	0,028	0,023
20 ‰	5	0,006	0,002
25 ‰	5	0,006	0,002
30 ‰	5	0,005	0,004
35 ‰	5	0,008	0,006
40 ‰	5	0,006	0,002

Tabel 4. Δ coeloom NPS bij 5° C, "steady-state", bij verschillende mate van verontreiniging van de coeloomvloeistof met bloed.

kleur coeloomvloeistof	aantal dieren bemonsterd	coeloom NPS gemiddeld in C	standaard- afwijking
niet rood	24	0,005	0,003
matig rood	10	0,012	0,007
intensief rood	6	0,032	0,019

De Δ 's bepaald aan de weefselhomogenaten zijn moeilijk exact met elkaar te vergelijken. Algemeen wordt in de literatuur aangenomen dat lichaamsvloeistoffen als bloed en coeloomvloeistof isosmotisch zijn met het weefsel (zie ROBERTSON 1961, 1965 en FLORKIN & SCHOFFENIELS, 1969). Celmembranen vertonen vele en diepe instulpingen, waardoor het uitwisselingsoppervlak

tussen cel en extracellulaire vloeistof erg groot kan zijn. Mogelijk is het uitgebreide membraanstelsel in de cel, het endoplasmatisch reticulum, zelfs een voortzetting van de celmembraan (zie GIESE, 1962). Een en ander maakt het vrij onwaarschijnlijk dat er een osmotisch verschil zou kunnen heersen tussen celinhoud en extracellulaire vloeistof.

SHAW (1958) vond dat bij verschillende zoutgehalten het spierweefsel van de krab Carcinus maenas een $0,10$ tot $0,20^{\circ}\text{C}$ hogere vriespuntsdaling gaf als het bloed. Alhoewel deze onderzoeker werkte bij -3°C , bleek dat het gevonden verschil te wijten was aan autolyse : reeds bij zeer lage temperaturen werden labiele fosfaat-esters als arginine fosfaat en adenosine trifosfaat afgebroken en de hierdoor optredende vermeerdering van het aantal opgeloste deeltjes leidde tot een grotere vriespuntsdaling. De in deze studie bij N. virens gevonden

Δ 's geven een overeenkomstig of groter verschil tussen weefsel en coeloomvloeistof : bij de aan 15°C geadapteerde dieren bedraagt dit verschil $0,23 - 0,46^{\circ}\text{C}$ en bij de aan 5°C geadapteerde dieren $0,06 - 0,25^{\circ}\text{C}$ (zie figuur 5 en 6).

Berekening van het op blz. 18 genoemde verdunningseffect ($0,14^{\circ}\text{C}$) kan deze grote verschillen niet voldoende verklaren.

De conclusie moet dan ook luiden dat er autolyse optreedt.

Dit blijkt ook uit de volgende waarnemingen. Bij 5°C ligt Δ coel niet anders als bij 15°C (figuur 7) maar Δ weefs ligt ligt aanmerkelijk lager. Nu zijn de weefsels bij de 5°C met Potterbuizen. Om na te gaan of de homogeniseermethode invloed heeft op de resultaten is een kleine vergelijkingsproef uitgevoerd. De resultaten staan in tabel 5.

Tabel 5. Vriespuntsdalingen van het weefsel, gehomogeniseerd op twee manieren. Wormen geadapteerd aan 31 ‰ S en 15° C. Δ milieu 1,70° C, Δ coel 1,77° C.

	dier	weefselmonster	homogeniseer- methode	Δ totaal	Δ electrolyt	Δ NPS
A		1	VIRTIS	2,14	0,93	0,53
		2	VIRTIS	2,09	0,94	0,48
		3	Potterbuis	2,06	niet bekend	0,52
		4	Potterbuis	2,22	0,91	0,50
B		1	VIRTIS	2,14	1,01	0,67
		2	VIRTIS	2,28	niet bekend	0,55
		3	Potterbuis	2,28	1,03	0,70
		4	Potterbuis	2,26	0,93	0,61

Het is duidelijk dat het verschil tussen Δ weefs bij 15° C en Δ weefs bij 5° C niet veroorzaakt werd door het verschil in homogeniseermethode. Een ander verschil in behandeling tussen beide temperaturen betreft het tijdstip waarop de vriespuntsdaling is gemeten. Bij 5° C zijn de metingen op de monsterdag of de dag ná het monstereen verricht, bij 15° C hebben de monsters 2 maanden bij - 35° C vertoefd alvorens de vriespuntsdaling gemeten werd. Een aantal weefselhomogenaten van de 5° C proefserie zijn daarom nog eens gemeten na een overeenkomstige periode van opslag bij - 35° C. Deze metingen staan in figuur 7 met * aangegeven. Alle opnieuw bepaalde Δ 's bleken te zijn gestegen waardoor de lijnen van Δ weefs bijna op het zelfde niveau komen te liggen. Door van dezelfde weefselhomogenaten ook de geleidbaarheid opnieuw te meten bleek dat de toename in vriespuntsdaling geheel of voor een groot deel te verklaren was met een toename in Δ weefs elect. Ook deze lijnen staan in figuur 7. Aangezien de weefselhomogenaten in afgesloten reageerbuisen werden bewaard is de toename in vriespuntsdaling niet te wijten aan

verdamping. De oorzaak moet autolyse zijn. Of de autolyse hier eveneens arginine fosfaat en adenosine trifosfaat betreft is niet nagegaan.

Uit het voorafgaande is te concluderen dat de waarden van Δ weefs elect aan de hoge kant zijn. In tabel 6 staat het aandeel van Δ weefs elect in Δ weefs (waarvoor de corresponderende waarden van Δ coel genomen werden) bij het laagste en het hoogste zoutgehalte.

Tabel 6. Het aandeel van electrolyt en NPS in het weefsel in de totale osmotische concentratie bij het laagste en het hoogste zoutgehalte, aangenomen dat de intracellulaire vloeistof isosmotisch is met de coeloomvloeistof.

	% van Δ coeloom totaal	
	bij 5 ‰ S	bij 40 ‰ S
Δ weefs elect 15° C	67,6 (10,0)	48,2 (2,3)
Δ weefs elect 5° C	46,8 (7,2)	39,2 (3,2)
idem, hermeting	58,2 (8,7)	43,9 (2,1)
Δ weefs NPS 15°C	22,6 (3,7)	34,6 (4,2)
Δ weefs NPS 5° C	33,9 (5,5)	36,2 (4,8)

We zien dat bij toenemend zoutgehalte het aandeel van het electrolyt afneemt. Uit de hermetingen van de 5° C homogenaten blijkt dat bij verdere autolyse het percentage electrolyt bij het laagste zoutgehalte veel sterker stijgt als bij het hoogste zoutgehalte. Wanneer dit verschijnsel ook geldt voor de eerste fase van autolyse mag men misschien stellen dat in vivo het aandeel dat het electrolyt aan Δ weefs

bijdraagt over het gemeten zouttraject niet noemenswaardig verandert en in de grootte-orde ligt van ruim $1/3$.

In tabel 6 zien we verder dat het aandeel dat de NPS aan Δ weefs bijdraagt bij 5°C vrijwel constant is en bij 15°C toeneemt bij toenemend zoutgehalte. Deze toename is significant, wanneer we met de Toets van Student de drie laagste tegen de drie hoogste zoutgehalten toetsen vinden we bij tweezijdige toetsing $P = 0,001$. Dit betekent dat bij afnemend zoutgehalte bij 15°C er relatief meer NPS dan andere opgeloste stoffen verdwijnt. Dit zou aanwijzing kunnen zijn dat NPS betrokken is bij een isosmotische intracellulaire regulatie. Gezien figuur 5 waar de concentraties van electrolyt en van NPS met toenemend zoutgehalte groter worden op een manier waarop we niet kunnen spreken dat het conformerend verloop van de totale vriespuntsdaling door alleen electrolyt of door alleen NPS bepaald wordt, geloof ik niet dat deze aanwijzing van een bijdrage van NPS aan de isosmotische intracellulaire regulatie kwantitatief van groot belang is. Wanneer bovenstaande speculaties kloppen komt de bijdrage van de restpost (fosfaten, koolhydraten e.d.) op $1/3$ als we voor de NPS bijdrage een kleine $1/3$ en voor de electrolyt bijdrage ruim $1/3$ als gemiddelde aanhouden. Deze restpost en de NPS zijn niet verder geanalyseerd. Wel zijn een aantal electrolyten nader bekeken.

De concentraties van Cl^{-} , Na^{+} en K^{+} in coeloomvloeistof en weefsel staan in de figuren 8, 9 en 10. Op de x-as staan de ion-concentraties van het milieu berekend met Table 4 van BARNES (1954) aan de hand van de Δ 's gemeten van het water uit de proefbakken.

In de coeloomvloeistof zijn de concentraties van Cl^{-} en Na^{+} gelijk of iets lager als die van het milieu. Dit is in goede overeenstemming met de geleidbaarheidsmetingen (figuur 5 en 6). De concentratie K^{+} is in de coeloomvloeistof daarentegen hoger als in het milieu. Zowel in het milieu als in de coeloomvloeistof gaat het echter om een geringe hoeveelheid K^{+} , in frappante tegenstelling hiermee staan de hoeveelheden K^{+}

die in het weefsel aangetroffen zijn. Aangezien bij het monsteren van coeloomvloeistof door de lichaamswand heen geprikt wordt, kunnen de hogere K^+ concentraties in de coeloomvloeistof t.o.v. het milieu veroorzaakt worden door verontreiniging van veel K^+ bevattend plasma van beschadigde cellen. Bij lage saliniteiten zijn de wormen meer gezwollen en om voldoende coeloommonster te verkrijgen hoeft minder geprikt te worden dan bij hoge saliniteiten. Bij lage saliniteiten zal de coeloomvloeistof dus minder verontreinigd zijn en dus de K^+ concentratie gelijk worden aan die van het milieu zoals we in figuur 10 opmerken. Echter, op grond van dezelfde overwegingen is dan de verwachting dat ook de NPS in de coeloomvloeistof te hoog uitvalt door verontreiniging met weefsel-NPS, maar het verschijnsel dat de NPS daalt bij lage saliniteiten is niet gevonden (tabel 3). Dit maakt het onwaarschijnlijker dat de gevonden K^+ concentraties in de coeloomvloeistof een vertekend beeld geven.

In het weefsel bedragen de Cl^- en Na^+ concentraties nog geen 1/4 van die in het milieu en in de coeloomvloeistof. Met verandering in Δe is geen relatieve toe- of afname te constateren. De K^+ concentraties van het weefsel liggen veel hoger dan die van milieu en coeloomvloeistof. Dit is in overeenstemming met wat bij andere organismen, zowel dierlijk als plantaardig, gevonden is (GIESE, 1962).

In verband met bovengenoemde concentratiegradiënten tussen weefsel en coeloomvloeistof zijn de gemeten weefselconcentraties niet geheel representatief voor de concentraties in de cel, zie blz. 22. De werkelijke intracellulaire concentraties van Cl^- en Na^+ zullen lager zijn dan de in figuur 8 en 9 voor het weefselvocht gegeven waarden. Sommige onderzoekers (o.a. OGLESBY, 1965a) gaan zelfs zover om uit praktische overwegingen de Cl^- concentratie in de cellen op nul te stellen, maar het werk van POTTS (1958) aan Mytilus edulis en van ROBERTSON (1961, 1965) aan Nephrops norvegicus en Sepia officinalis e.a. toont dat na een juiste correctie voor de invloed van de interstitiële vloeistof wel degelijk een niet te verwaarlozen hoeveelheid Cl^- in de cellen zit. Omgekeerd zullen de K^+ concentraties in de

cellen hoger zijn dan de in figuur 10 gegeven waarden voor het weefselvocht.

Op grond van de gevonden concentraties K^+ , Na^+ en Cl^- is het mogelijk om hun gezamenlijke vriespuntsdaling te vinden en zo een minimum voor de bijdrage van Δ weefselect aan Δ weefs te vinden. Uit het onderzoek van ROBERTSON (1961, 1965) blijkt echter dat niet alle gevonden ionen osmotisch actief zijn, zo is bij Sepia officinalis wel alle Cl^- osmotisch actief, maar van het K^+ is 20% gebonden en van het Na^+ zelfs 50 %. Door het ontbreken van dergelijke gegevens bij N. virens leek het daarom weinig zinvol om de lijn Δ weefs K^+ , Na^+ en Cl^- te construeren.

Het ontbreken van een regulatieplateau bij de lagere zoutgehalten in de figuren 8, 9 en 10 zoals bij N. diversicolor voor Cl^- en Na^+ (OGLESBY, 1970) en Ca^{2+} en Mg^{2+} (FLETCHER, 1970) gevonden is, ondersteunt de op grond van de Δ coel curves (figuur 5 en 6) getrokken conclusie dat N. virens geen osmoregulatie vertoont.

3. De relatie tussen het watergehalte en de totale osmotische concentratie van het weefsel.

De grote variatie in het watergehalte (figuur 4) doet de vraag rijzen of de gevonden concentratieveranderingen te wijten zijn aan een toenemende of afnemende hydratering of dat het werkelijke veranderingen zijn in de absolute hoeveelheden van de opgeloste stoffen of beide. Het effect van het watergehalte is op twee manieren benaderd : a) in het geval geen netto transport van opgeloste stof optreedt en b) in het geval geen netto transport van water optreedt. Gekeken is aan welke van deze twee extremen de gevonden waarden bij N. virens het dichtst naderen.

a) Wanneer er geen netto transport van opgeloste stoffen tussen milieu en dier optreedt, moeten de waargenomen veranderingen in vriespuntsdaling bij verandering van het zoutgehalte te wijten zijn aan watertransport. Met de gemeten vriespuntsdalingen is een berekening uit te voeren die ons de watergehalten geeft die verwacht zouden worden als de veranderingen in vriespuntsdaling

geheel door verdunning of concentrering van de aanwezige hoeveelheid opgeloste stof veroorzaakt worden. De gevonden waarden bij één zoutgehalte worden als standaard genomen en de andere watergehalten kunnen dan met de volgende formule berekend worden:

$$\text{watergehalte} = \frac{\Delta_{\text{standaard}}}{\Delta_{\text{gemeten}}} \times \text{gewicht water}_{\text{standaard}} \times 100 \%$$

$$\frac{\Delta_{\text{standaard}}}{\Delta_{\text{gemeten}}} \times \text{gewicht water}_{\text{standaard}} + \text{drooggewicht}_{\text{stand.}}$$

Zowel bij de proefseries van 15 als van 5° C is 40 ‰ S als standaard genomen en werd bovenstaande formule :

$$\begin{array}{ll} \text{watergehalte} = \frac{100 \ \%}{0,171 \Delta_{\text{gemeten}} + 1} & \text{watergehalte} = \frac{100 \ \%}{0,173 \Delta_{\text{gemeten}} + 1} \\ \text{(bij 15° C)} & \text{(bij 15° C)} \end{array}$$

b) Wanneer de waargenomen veranderingen in vriespuntsdaling uitsluitend te wijten zijn aan transport van opgeloste stoffen en de hoeveelheid water in de cellen en tussen de cellen gelijk blijft, zijn de bij de gemeten vriespuntsdalingen behorende watergehalten met de volgende formule te berekenen :

$$\text{watergehalte} = \frac{\text{gewicht water}_{\text{standaard}} \times 100 \ \%}{\text{gewicht water}_{\text{stand}} + \text{gew. niet-opgel.stof}_{\text{stand}} + \frac{\Delta_{\text{gemeten}}}{\Delta_{\text{standaard}}} \times \text{gewicht opgeloste stof}_{\text{standaard}}}$$

Bij deze berekening is de moeilijkheid dat het drooggewicht in tweeën gesplitst moet worden : opgeloste en niet-opgeloste stof. De gewichten van deze twee componenten zijn alleen te schatten. Wanneer we het gemiddelde molekulgewicht van de in het weefsel opgeloste stoffen weten kunnen we met behulp van de gevonden waarden van Δ de hoeveelheid opgeloste stof berekenen.

We hebben eerder gezien dat in het weefsel verschillende groepen stoffen osmotisch belangrijk zijn: ionen, kleine organische, stikstof bevattende verbindingen (NPS) en een groep onbekende organische molekulen (mogelijk fosfaten, koolhydraten, eiwitten e.d.). De ionen hebben een laag **gewicht**, de NPS molekulen zijn gemiddeld wat zwaarder en mogelijk zijn de "restmolekulen" gemiddeld het zwaarst. Het lijkt daarom niet onredelijk om het gemiddelde gewicht van de opgeloste stoffen te schatten in de buurt van dat van de NPS molekulen. De berekening is daarom uitgevoerd voor een gemiddeld molekuulgewicht gelijk aan dat van leucine ($M = 131,2$). Om een indruk te krijgen hoe de berekende lijn komt te liggen bij een ander molekuulgewicht is de berekening ook uitgevoerd voor het molekuulgewicht van NaCl ($M = 58,4$). Opgemerkt moet verder nog worden dat het gemiddelde molekuulgewicht van de stoffen die uit de oplossing gaan of in de oplossing komen niet gelijk hoeft te zijn aan het gemiddelde molekuulgewicht van de totale hoeveelheid opgeloste stof. Bovendien hoeft het gewicht van de niet-opgeloste stoffen niet constant te zijn omdat bijvoorbeeld opgeloste stoffen in onoplosbare vorm worden getransformeerd of andersom stoffen in oplossing gaan. Door het ontbreken van goede gegevens over deze zaken zijn deze complicaties niet in de berekening verwerkt. De gevonden waarden bij 40 ‰ S zijn weer als standaard genomen. De berekening voor de aanname dat het gemiddelde molekuulgewicht gelijk is aan dat van leucine gaat als volgt :

een oplossing van één grammolekuul per liter van een ideaal niet-electrolyt geeft een vriespuntsverlaging van $1,86^{\circ} \text{C}$. Bij 40 ‰ S bedraagt Δ standaard $2,23^{\circ} \text{C}$, dus in 1 liter zit dan $2,23/1,86 \times 131,2 = 157,3$ gram opgeloste stof. Een stuk weefsel van 100 gram bevat bij 40 ‰ S en 5°C 72,16 gram water, hierin zit dan $72,16/(1000-157,3) \times 157,3 = 13,47$ gram opgeloste stof. Het stuk weefsel van 100 gram heeft een drooggewicht van $100-72,16 = 27,84$ gram. De hoeveelheid niet-opgeloste stof (celmateriaal e.d.) bedraagt dan $27,84 - 13,47 = 14,37$ gram. De eerder gegeven formule wordt nu :

$$\text{watergehalte} = \frac{100 \%}{0,084 \Delta \text{ gemeten} + 1,199}$$

(bij 5° C)

Voor de 15° C proefserie en voor de aanname dat het gemiddelde molekuulgewicht gelijk is aan dat van NaCl zijn overeenkomstige formules op te stellen. De resultaten van alle berekeningen staan in de tabellen 7 en 8 en in de figuren 11 en 12.

Tabel 7. De verwachte watergehalten bij de "steady-state" proefserie bij 15° C op grond van de aannames dat : I de gevonden Δ 's geheel verklaard kunnen worden door watertransport en II de gevonden Δ 's geheel verklaard kunnen worden door verandering van de hoeveelheid opgeloste stof.

Acclimatie- saliniteit	Δ gemeten in °C	watergehalte gemeten in %	watergehalte berekend		
			I	IIa (M=131,2)	IIb (M=58,4)
5 ‰	0,57	85,23	91,12	79,59	72,45
10 ‰	0,64	83,67	90,14	79,21	72,38
15 ‰	0,86	81,04	87,18	78,06	72,18
20 ‰	1,12	77,28	83,95	76,73	71,93
25 ‰	1,37	75,87	81,02	75,50	71,70
30 ‰	1,77	73,49	76,77	73,61	71,33
35 ‰	2,12	71,84	73,39	72,04	71,01
40 ‰ (standaard)	2,42	70,73	70,73	70,73	70,73

Tabel 8. Als tabel 7, nu voor de "steady-state" proefserie
bij 5° C

Acclimatie- saliniteit	Δ gemeten in °C	watergehalte gemeten in %	watergehalte berekend		
			I	IIa (M=131,2)	IIb (M=58,4)
5 ‰	0,40	89,84	93,53	81,13	73,90
10 ‰	0,64	86,47	90,03	79,82	73,66
15 ‰	0,87	84,22	86,92	78,61	73,44
20 ‰	1,16	80,46	83,29	77,13	73,16
25 ‰	1,40	78,71	80,50	75,95	72,93
30 ‰	1,71	74,97	77,17	74,48	72,63
35 ‰	1,98	74,09	74,49	73,24	72,38
40 ‰ (stan- daard)	2,23	72,16	72,16	72,16	72,16

De conclusie die uit de tabellen 7 en 8 en de figuren 11 en 12 valt te trekken is dat wanneer onze vooronderstellingen juist zijn bij 15° C de gevonden watergehalten in het bovenste gedeelte van het onderzochte zoutgehaltetraject globaal overeenkomen met hypothese IIa, d.w.z. dat de hoeveelheid opgeloste stof vermindert, terwijl bij een verdere afname van het zoutgehalte de gevonden watergehalten tussen de hypothetische lijnen IIa en I gaat lopen en bij het laagste zoutgehalte is de helft van de gevonden verandering in vriespuntsdaling te wijten aan verdunning door binnenkomend water. Bij 5° C ligt de gevonden lijn over het hele traject tussen de hypothetische lijnen I en IIa en is bij het laagste zoutgehalte de verlaging van de gemeten vriespuntsdaling voor 2/3 door watertoeename te verklaren.

Gecombineerd met de bij de adaptatiesnelheidsproef van 5° C gevonden resultaten betekent bovenstaande dat het door osmose opgezwollen weefsel inderdaad een gedeelte van het binnenkomende water kwijt weet te raken, waarbij een

corresponderende hoeveelheid opgeloste stof verdwijnt (zie blz. ³⁰25). Zijn er bij de adaptatiesnelheidsproef van 5° C ook daadwerkelijke aanwijzingen te vinden dat er opgeloste stof uit het weefsel verdwijnt? Stel dat het weefsel meteen bij het optreden van osmose electrolyten en/of NPS molekulen en/of rest-molekulen gaat dumpen via het bloed in de coeloomvloeistof. In het geval van dumping van electrolyt kan dan verwacht worden dat Δ coel elect dichter bij Δ coel komt te liggen. In het geval van dumping van NPS is de verwachting dat Δ coel NPS sterk zal stijgen vanwege de oorspronkelijk zeer lage concentratie NPS in de coeloomvloeistof en dat het verschil tussen Δ coel en Δ coel elect groter wordt. Dit laatste is ook de verwachting bij dumping van rest-molekulen. In het geval van dumping van alle drie groepen tegelijk zal als duidelijkste teken een verhoging van NPS in de coeloomvloeistof optreden. Er zijn een paar complicaties die bovengenoemde effecten kunnen maskeren : ook de coeloomvloeistof wordt door osmose verdund zodat alle concentraties a priori al veranderen. Bovendien kan het produceren van urine uit de coeloomvloeistof via de nephridia kwantitatief mogelijk z• belangrijk zijn dat de "doorgeefsnelheid" van de coeloomvloeistof voor opgeloste stoffen van het weefsel naar het milieu zo groot is dat dumping van stoffen in de coeloomvloeistof niet opvalt.

In figuur 2 zien we bij de drie curves van de coeloomvloeistof een afwijkend verloop van Δ coel NPS ten opzichte van Δ coel en Δ coel elect. Wanneer er geen opgeloste stoffen uit het weefselvocht in de coeloomvloeistof gedumpt worden, moet Δ coel NPS redelijkerwijs een overeenkomstige concentratiedaling te zien geven als Δ coel. In tabel 9 staat nu het verloop van deze twee Δ 's waarbij op grond van de steady-state waarden van Δ coel NPS de worm nummer 2 (tijdstip 0 uur) als uitbijter beschouwd kan worden : Δ coel NPS bedraagt voor 30 en 35 ‰ S gemiddeld 0,006° C (SD 0,004). Uit tabel 9 krijgt met de indruk dat Δ coel NPS een vrijwel rechte horizontale lijn voorstelt. Dit levert een zwakke aanwijzing dat er inderdaad NPS in het

coeloom gedumpt wordt. De concentratiedaling van NPS in de coeloomvloeistof door osmose wordt als het ware gecompenseerd door dumping van NPS. Een verdere aanwijzing is daarbij het stijgen van Δ coel NPS na 2 dagen. Met 2 dagen is zoals we op blz. 29 gezien hebben Δ coel gelijk geworden aan Δ milieu waardoor de coeloomvloeistof niet verder verdund wordt. Door het wegvallen van een verdere concentratiedaling resulteert de dumping van NPS in een stijgende Δ coel NPS. Het optreden van dumping van NPS impliceert niet dat er niet tegelijk electrolyten en andere molekulen gedumpt worden. Met bovenstaande is alleen maar aanmelijk gemaakt dat NPS, een groep die door zijn hoge concentratie in het weefsel en lage concentratie in de coeloomvloeistof als eerste in aanmerking komt om bij dumping ontdekt te worden, inderdaad uit het weefsel naar de coeloomvloeistof getransporteerd wordt. De percentages die Δ weefs NPS uitmaakt van Δ totaal, zie tabel 6 op blz. 36, wijzen mijns inziens eerder op een gelijke wegwerking van zowel electrolyt als NPS als rest-molekulen, dan op een sterk eenzijdige verdwijning van NPS.

Tabel 9. Het verloop van Δ coel en Δ coel NPS bij de adaptatiesnelheidsproef van 5° C

tijdstip	dier	Δ coeloom totaal	Δ coeloom NPS
0 uur	1	1,76	0,007
"	2	1,77	0,026
1 uur	3	1,44	0,007
"	4	1,46	0,005
2 uur	5	1,39	0,005
"	6	1,42	0,007
3 uur	7	1,36	0,006
"	8	1,36	0,005
12 uur	9	1,11	0,003
"	10	1,08	0,007
24 uur	11	0,97	0,004
"	12	1,00	0,008
2 dagen	13	0,89	0,008
"	14	0,91	0,006
4 dagen	15	0,90	0,012
"	16	0,89	0,010
8 dagen	17	0,91	0,009
"	18	0,89	0,013
16 dagen	19	0,92	0,027
"	20	0,89	0,015

VI. Discussie

Het kritische zoutgehalte waar beneden de worm zich niet kan handhaven is bij dit onderzoek niet precies gemeten maar ligt voor Nereis virens volgens de op blz. 31 gegeven waarnemingen bij 5° C op 5,6 ‰ S of minder en bij 15° C tussen 5,8 en 7,5 ‰ S. Overeenkomstige fragmentarische gegevens zijn te

vinden bij SAYLES (1935) en JØRGENSEN & DALES (1957). SAYLES vond bij 20-21° C dat de sterfte van de wormen afkomstig uit zeewater bij directe overplaatsing in 2/5 zeewater (± 14 ‰ S) groot was. Bij zeer geleidelijke verdunning lukte het hem wormen in 4,4 ‰ S te houden. Bij JØRGENSEN & DALES bleef Nereis virens bij directe overplaatsing uit 17 ‰ S (het zoutgehalte van hun natuurlijke milieu in de Deense Oostzeewateren op dat moment) in 4,4 ‰ S bij 17-22° C goed in leven. De verschillen tussen bovengenoemde drie bronnen zijn mogelijk terug te voeren op aanpassing van de populaties, waar de wormen uit stammen, aan de van elkaar verschillende, zoutgehalten van de betreffende milieu's. In ieder geval is duidelijk dat Nereis virens niet de lage grens van de regulatoren N. limnicolla (t/m zoet water, OGLESBY 1965a), N. diversicolor (0,5 ‰ S, HOHENDORF 1963), L. culveri (0,5 ‰ S, OGLESBY 1965a) en N. succinea (1,5 ‰ S, OGLESBY 1965a) vertoont maar meer bij de conformers N. vexillosa (5 ‰ S, OGLESBY 1965a), N. pelagica (8 ‰ S, SCHLIEPER 1929) en P. cultrifera (9 ‰ S, FRETTER 1955) aansluit.

Het temperatuureffect op de sterfte is bij N. diversicolor uitgebreid bestudeerd door HOHENDORF (1963). Hij vond voor zeer lage zoutgehalten (0,5 ‰ S) de grootste sterfte bij de laagste temperatuur (1-2° C) en voor zeer hoge zoutgehalten (50 ‰ S) de grootste sterfte bij de hoogste temperatuur (20° C). Een dergelijke relatie werd ook door BROEKEMA (1942) en SPAARGAREN (1969) bij de osmoregulerende garnaal Crangon crangon aangetroffen. Het is daarom opvallend dat voor N. virens volgens mijn gegevens een positieve relatie tussen temperatuur en sterfte bij de laagste zoutgehalten optreedt. Mogelijk staat het type temperatuur-sterfte relatie in verband met de osmoregulerende capaciteiten, want volgens de in dit verslag gepubliceerde gegevens is N. virens duidelijk een osmoconformer.

Het uit de figuren 5 en 6 naar voren komend beeld van de osmoregulatie van N. virens wijkt aanzienlijk af van de

voorstelling die JØRGENSEN & DALES (1957) geven : " both N. diversicolor and N. virens maintain a higher chloride concentration than that of the medium when this is diluted, but the regulatory ability is greater in N. diversicolor than in N. virens". Deze bewering, overgenomen door POTTS & PARRY (1964) en OGLESBY (1965a), wordt wat betreft de osmoregulatorische capaciteiten van N. virens nergens gestaafd met cijfers.. De concentratie chloride in de coeloomvloeistof loopt bij het in dit verslag weergegeven onderzoek prachtig gelijk met de chloride concentratie in het milieu (figuur 8) en geeft geen ander beeld dan Δ coel : ook beneden 15 ‰ S conformeert N. virens met het mil u. Een geografisch verschil in osmoregulatorische capaciteiten of een verschil door aanpassing aan andere habitats is daarnaast misschien niet uit te sluiten, maar tot op heden zijn er geen publicaties verschenen die hier voorbeelden van geven. Het in de inleiding genoemde onderzoek van SMITH (1955) aan populaties van N. diversicolor in verschillende landen van Europa gaf geen verschil in osmoregulatie te zien. Ook OGLESBY (1965a) kon bij geografisch zeer verschillende populaties van N. limnicolla en N. succinea geen significante verschillen in de hoogte van het regulatieplateau vinden.

Wat betreft de volumeregulatie bij N. virens stemt de bij de 5° C adaptatiesnelheidsproef gevonden snelle toename van het watergehalte van het weefsel gevolgd door een geleidelijke afname in grote lijnen overeen met de curves van SAYLES (1935) en JØRGENSEN & DALES (1957) van het verloop van het totale gewicht van de worm bij een zoutsprong. Er zijn 2 verschilpunten :
a) het totale gewicht bereikt reeds binnen 12 uur een maximum terwijl het watergehalte van het weefsel pas na 48 uur maximaal is (figuur 3) en b) het totale gewicht is bij SAYLES binnen 10 dagen en bij JØRGENSEN & DALES binnen 4 dagen terug op het oorspronkelijke niveau terwijl het watergehalte van het weefsel na 16 dagen nog lang niet terug is op het oude niveau.

Voor deze verschillen zijn drie mogelijke oorzaken aan te wijzen:

- 1) SAYLES en JØRGENSEN & DALES maten grofweg gezegd de veranderingen in hoeveelheid coeloomvloeistof plus hoeveelheid weefselwater samen. Het is mogelijk dat de waterfluxen wat betreft de coeloomvloeistof anders verlopen dan wat betreft het weefsel.

Tot op heden zijn er geen afzonderlijke waarnemingen aan deze twee tegelijk verricht.

- 2) SAYLES werkte bij $21-22^{\circ}\text{C}$ en JØRGENSEN & DALES bij $17-22^{\circ}\text{C}$. Uit de "steady-state" proefseries (figuur 4) kwamen aanwijzingen dat het wegwerken van het binnengekomen water uit het weefsel bij 15°C sneller gebeurde dan bij 5°C .
- 3) Er zijn gegevens die wijzen op verschillen in volumeregulerend vermogen bij geografisch verschillende populaties. Zo vond ELLIS (1937) een 2x zo snelle volumeregulatie bij N. diversicolor afkomstig van Roscoff als bij wormen van dezelfde soort afkomstig van de kust van Wales en de Engelse zuidkust. Langdurige adaptatie aan plaatselijke omstandigheden zou invloed kunnen hebben op volumetoename en volumeregulatie.

Opgemerkt moet worden dat het in de osmoregulatie-literatuur zeer gebruikelijk is om volumeveranderingen te meten aan de hand van totale lichaamsgewicht, watergehalte totale dier of watergehalte weefsel, maar dat geen van deze maten correct is (zie LANGE, 1968, 1970 en LANGE & MOSTAD, 1967). Door het veranderen van het soortelijk gewicht van b.v. het weefsel door wateropname en afgifte van opgeloste stoffen is het gewicht van het dier geen juiste maat voor het volume. Ook het watergehalte is om deze redenen niet representatief, temeer omdat een substitueren van molekulen opgeloste stof door watermolekulen wel een watergehalteverandering maar geen volumeverandering inhoudt.

Door het ontbreken van een sterke regulatie van het weefselwater bij de in dit verslag beschreven proeven vertoont het watergehalte van het weefsel in de "steady-state" (figuur 4) een aanzienlijke negatieve correlatie met het zoutgehalte.

Vergelijkbare metingen van het watergehalte zijn te vinden bij OGLESBY (1965a), die het watergehalte van het hele lichaam bij verschillende soorten mat. De bij N. virens gevonden curves vertonen qua steilheid en zoutgehaltetraject de meeste gelijkenis met de osmoconformer N. vexillosa. De osmoregulators N. limnicolla en L. culveri vertonen slechts een toename van 2 % over het traject van 40 tot 0 ‰ S. Ook de osmoregulerende N. diversicolor blijkt volgens gegevens van BOGUCKI & WOJTCZAK (1964) slechts 2 % in watergehalte toe te nemen over het traject van 35 tot 0,5 ‰ S. JURGENS (1935) en BEADLE (1937) konden bij deze soort tijdens zoutsprongen geen opgezwollen weefsel ontdekken, althans niet microscopisch.

Osmoregulatie schijnt bij voornoemde soorten dus samen te hangen met een goede volumeregulatie. Het is duidelijk dat bij het optreden van een zoutsprong omlaag in het regulatiegebied de nieuwe inwendige "steady-state" concentratie bij een osmoregulator hoger ligt dan bij een osmoconformer. Dit betekent dat de hoeveelheid door osmose binnenkomend water bij een regulator kleiner is en dus in kortere tijd weggewerkt kan worden.

De vraag blijft dan waarom de grotere hoeveelheid binnengekomen water bij een osmoconformer in langzamer tempo weggewerkt wordt en bovendien waarom dit water maar voor een gedeelte weggewerkt wordt. Men krijgt de indruk dat het wegwerken van opgeloste stoffen en de produktie van urine een veel sterkere rol spelen bij de osmoregulators.

Ook de isosmotische intracellulaire regulatie, lijkt bij een osmoregulerende Nereid belangrijker te zijn dan bij een osmoconformerende Nereid. De publicatie van JEUNIAUX, DUCHÂTEAU-BOSSON & FLORKING (1961) geeft gegevens over de hoeveelheid aminozuren in het weefsel bij 2 saliniteiten bij de soorten N. diversicolor en P. cultrifera. Deze laatste soort is volgens hun (schaarse) metingen een osmoconformer. Op grond van een grote daling in de hoeveelheid aminozuren en een stijging van het watergehalte van het weefsel bij een daling van het zoutgehalte van het milieu zeggen de bovengenoemde onderzoekers dat beide soorten een intracellulaire regulatie vertonen omdat de geringe hydratatie de gevonden daling van de aminozuren bij

presenteren van de gemeten waarden is echter zeer dubieus en de hierboven genoemde conclusie is volgens mij onjuist. De verandering in watergehalte is niet op de juiste manier verdisconteerd en herberekening van de zelfde gegevens op de op blz. 40 gevolgde manier toont aan dat bij P. cultrifera de verandering in het watergehalte de verandering in Δ weefs voor 3/5 verklaart en dat bij N. diversicolor de verandering in het watergehalte voor slechts 1/4 de verandering van Δ weefs verklaart. Het kardinale punt is echter dat Δ weefs aminozuren bij N. diversicolor veel sterker daalt dan Δ weefs :

0,45 naar 0,07 tegen 2,08 naar 1,04

met andere woorden van de grote hoeveelheid opgeloste stoffen die uit het celwater verdwijnt bedraagt de hoeveelheid aminozuren een relatief grote hoeveelheid. Hier is dus met recht sprake van een belangrijke rol van aminozuren in de isosmotische intracellulaire regulatie. Bij P. cultrifera daalt Δ weefs aminozuren in gelijke mate als Δ weefs :

0,67 naar 0,33 tegen 2,08 naar 1,17.

Van de geringe hoeveelheid opgeloste stof die verdwijnt maken de aminozuren een evenredig deel uit. Deze situatie lijkt sterk op de door mij bij N. virens voor de NPS molekulen (waartoe ook de aminozuren behoren) gevonden verschijnselen. Om hier een belangrijke rol van aminozuren in de isosmotische intracellulaire regulatie te poneren lijkt mij dan ook niet juist.

Buiten de groep van de Nereiden vinden we naast vele voorbeelden van isosmotische intracellulaire regulatie bij osmoregulators, waarvan we enkele fraaie voorbeelden onder de Crustacea aantreffen, namelijk Eriocheir sinensis (DUCHATEAU & FLORKIN, 1956), Carcinus maenas (SHAW, 1958) en Crangon crangon (SPAARGAREN, 1971 en WEBER & VAN MARREWIJK, 1972), slechts enkele voorbeelden van isosmotische intracellulaire regulatie bij osmoconformers o.a.: Mytilus edulis (POTTS, 1958 en LANGE, 1963) en Arenicola marina (DUCHATEAU-BOSSON, JEUNIAUX & FLORKIN, 1961 en COWEY & SHAW, gegevens gepubliceerd als Table IV.7 in POTTS & PARRY, blz. 162 met overigens verkeerd berekende

verwachtingswaarden). Hieruit is af te leiden dat weefsels van euryhaliene osmoconformers, die door het ontbreken van buffering door hyperosmotische lichaamsvloeistoffen de volle klap van een zoutsprong te verwerken krijgen, niet over een sterkere intracellulaire regulatie beschikken dan weefsels van osmoregulators. Ook de proeven van WELLS & LEDINGHAM (1940) leiden niet in die richting. Zij plaatsten geïsoleerde spieren van N. diversicolor en P. cultrifera in verdunningen van zeewater en zagen dat bij deze zoutsprongen na een korte periode van heftige contracties de spieren uren stil bleven liggen om dan langzamerhand weer te gaan contraheren. Wanneer men het zeewater geleidelijk verdunde kreeg men geen inhibitie van de contracties. Het bleek nu dat het spierweefsel van N. diversicolor een snellere verdunning kon verdragen zonder inhibitie van de contracties als het spierweefsel van de conformerende P. cultrifera, terwijl in vivo bij gelijke zoutsprong de natuurlijke verdunning van de intracellulaire vloeistof door osmose bij N. diversicolor door zijn regulerende capaciteiten langzamer geschiedt als bij P. cultrifera.

Het weefsel van N. virens kan over een groot traject zoutsprongen opvangen, het zwelt en krimpt al naar gelang in het milieu het zoutgehalte verandert en is voor volumeveranderingen kennelijk erg tolerant. Correspondeert de zoutgehaltengrens waaronder de wormen doodgaan bij alle soorten met een bepaalde mate van zwelling? Interessant is verder de vraag welke factor bij het zwellen letaal is. Zo vonden POTTS (1958) voor Mytilus edulis en WEBBER & DEHNEL (1968) voor de slak Acmaea scutum dat bij zwellen van de weefsels de interstitiële ruimtes kleiner werden. Dit zou kunnen betekenen dat bij een bepaald laag zoutgehalte de doorbloeding van de weefsels te gering wordt en de cellen afsterven. Of dit in de praktijk een belangrijke doodsoorzaak is lijkt de vraag. Bij een geringere mate van zwelling is de worm al sterk beperkt in zijn bewegingen en is dan mogelijk een makkelijke prooi voor diverse dieren. Het is verder de vraag welke zoutgehaltevariaties het dier in zijn natuurlijke omgeving te verduren krijgt. Metingen in het veld zijn sporadisch verricht en dan vaak alleen nog maar tijdens het verzamelen van de wormen. Bovendien zijn veel van deze zoutgehaltemetingen voor de situatie waarin de

worm leeft niet relevant omdat het metingen betreffen van het oppervlaktewater en niet van het interstitiële water of het gangwater, waarvan door een aantal oorzaken (verticale zout-zout gradiënt in estuaria, slechte vermenging van regenwater met interstitiële water bij eb, invloed van zoet grondwater op interstitieel water, stopzetting doorwatering van de gang door de worm zelf, enz.) het zoutgehalte nogal op het zelfde tijdstip kan verschillen (OGLESBY, 1969). Langdurige veldregistraties van allerlei parameters van milieu en worm zijn gewenst en ook een studie van het gedrag van N. virens zou zeer welkom zijn. De reactie op langdurige extreme omstandigheden, de broedval, de zouttoleranties van de larven, de gedragingen tijdens de paartijd, enz. zijn bitter weinig bekend. Suggesties voor onderzoek en apparatuur zijn o.a. te vinden in OGLESBY (1969), KRÜGER (1964), LINDROTH (1938), VADER (1964) en WELLS & DALES (1951).

Voor het specifieke osmoregulatie-onderzoek is een hele waslijst van verder onderzoek op te stellen. Gezien de resultaten lijkt de interessantste weg om verder te volgen die van de waterfluxen. De watergehaltemetingen, die bij dit onderzoek slechts een bijzaak vormden, zullen apart verricht moeten worden voor het hele lichaam en het weefsel. Met inulineproeven kan de hoeveelheid interstitiële ruimte geschat worden. Op deze manier zal men moeten proberen het verloop van de watertoename bij een zoutsprong in coeloomvloeistof, interstitiële vloeistof en intracellulaire vloeistof afzonderlijk te volgen. Het optreden van waterverschuivingen binnen het lichaam zoals BEADLE (1934) bij de platworm Gunda ulvae vond mag op grond van het verschil in verloop van de watertoename tussen hele lichaam en weefsel (zie blz. 47) niet worden uitgesloten. Daarbij moeten tevens met een pyknometer soortelijke gewichten bepaald worden om een juiste maat te vinden voor het volume (LANGE, 1968). De door figuur 3 gesuggereerde geringe volumeafname zal uitgebreid nagegaan moeten worden en overeenkomstige metingen bij andere temperaturen zijn nodig om de gegeven verklaring van figuur 4 te onderschrijven.

Adaptatiesnelheidsproeven in omgekeerde richting, van een laag zoutgehalte naar een hoog zoutgehalte, zouden de interpretaties van de bestaande gegevens kunnen vergemakkelijken en uitdiepen (zie LANG & GAINER, 1969 en WEBER & VAN MARREWIJK, 1972).

De temperatuur-afhankelijke sterfte, zie blz. 30 en 31, moet gecontroleerd en nader bekeken worden, eventueel in combinatie met veldgegevens en proeven met de carrouselbak.

Voorts verdient de waarneming van KAMEMOTO, KATO & TUCKER (1966) dat het plaatsnemen van N. virens in verdunningen van zeewater sterke neurosecretie van bepaalde hersenkernen opwekt nadere aandacht. Geeft laedering van deze hersendelen een ander verloop bij een adaptatiesnelheidsproef?

Tenslotte zou ik willen pleiten voor een vernieuwd en uitgebreider contact met de groep onderzoekers aan het Zoofysisch Laboratorium te Kopenhagen waar Jørgen Gomme reeds enkele jaren aan de urineproductie van Nereiden werkt. Men ontkomt niet aan de indruk dat een beter begrip van de werking van de nephridia in samenhang met de andere waterfluxen de sleutel geeft voor een aantal bij de Nereiden niet opgeloste vragen. Onderzoek in die richting, na overleg met Kopenhagen om duplicatie te vermijden, lijkt erg interessant en technisch niet onoverkomelijk moeilijk gezien de reeds bestaande "know how" op het gebied van urineproductie in de werkgroep Experimentele Biologie.

VII. Dankbetuiging

Roy Weber en Dick Spaargaren stonden te allen tijde klaar om de theoretische informatie te verschaffen nodig voor het plannen van de proefseries en het interpreteren van de resultaten. Een groot aantal kritische kanttekeningen hunner hand hebben verder dit verslag vervolmaakt. Gijs Kraaij maakte mij vertrouwd met het instrumentarium en dankzij talrijke discussies met hem werden foutenbronnen bij de gebruikte methoden op hun juiste waarde geschat.

Door de hulp van Laura van Deijl was het mogelijk om de adaptatiesnelheidsproef bij 5° C intensief en uitgebreid uit te voeren. Tenslotte wil ik de prettige werk- en woonsfeer op het NIOZ vermelden, waardoor mijn vrouw en ik met veel genoegen aan ons halfjaar Texel terugdenken.

VIII: Literatuur

- BARNES, H., 1954. Some tables for the ionic composition of sea water. - J. Exp. Biol. 31: 582 - 588.
- BEADLE, L.C., 1931. The effect of salinity changes on the water content and respiration of marine invertebrates. -J. Exp. Biol. 8: 211 227.
- , 1934. Osmotic regulation in Gunda ulvae. -J. Exp. Biol. 11: 382 - 396.
- , 1937. Adaptation to changes of salinity in the polychaetes. I. Control of body volume and of body fluid concentration in Nereis diversicolor. -J. Exp. Biol. 14: 56 - 70.
- BOGUCKI, M. & A. WOJTCZAK, 1964. Content of body water in Nereis diversicolor in various medium concentrations. -Polsk. Arch. Hydrobiol. 12: 125 - 143.
- BRAFIELD, A.E. & G. CHAPMAN, 1967. Gametogenesis and breeding in a natural population of Nereis virens. -J. Mar. Biol. Ass. U.K. 47: 619 - 627.
- BROEKEMA, M.M.M., 1942. Seasonal movements and the osmotic behaviour of the shrimp Crangon crangon L. -Arch. néerl. Zool. 6: 1 - 100.
- BRYAN, G.W., 1963. The accumulation of radioactive caesium by marine invertebrates. -J. Mar. Biol. Ass. U.K. 43: 519 - 539.
- CLARK, M.E., 1964. Biochemical studies on the coelomic fluid of Nephtys hombergi (Polychaeta: Nephtyidae), with observations on changes during different physiological states. - Biol. Bull. 127: 63 -84.
- , 1968. Free amino-acid levels in the coelomic fluid and body wall of polychaetes. -Biol. Bull. 134: 35 - 47.
- DALES, R.P., 1950. The reproduction and larval development of Nereis diversicolor O.F. Müller. -J. Mar. Biol. Ass. U.K. 29: 322 - 360.
- DICE, J.F., 1969. Osmoregulation and salinity tolerance in the polychaete annelid Cirriformia spirobrancha (Moore, 1904). - Comp. Biochem. Physiol. 28: 1331 - 1343.
- DUCHÂTEAU, Gh. & M. FLORKIN, 1956. Système intracellulaire d'acides aminés libres et osmorégulation des Cruastacés. -J. de

- Physiologie 48: 520.
- DUCHÂTEAU-BOSSON, Gh., Ch. JEUNIAUX & M. FLORKIN, 1961. Rôle de la variation de la composante amino-acide intracellulaire dans l'euryhalinité d'*Arenicola marina* L. - Arch. Intern. Physiol. Biochim. 69: 30 - 35.
- ELLIS, W.G., 1933. Calcium and the resistance of *Nereis* to brackish water. - Nature 132: 748.
- _____, 1937. The water and electrolyte exchange of *Nereis diversicolor*. - J. Exp. Biol. 14: 340 - 350.
- _____, 1939. Comparative measurements of water and electrolyte exchange in a stenohaline and in a euryhaline polychaete. - J. Exp. Biol. 16: 483 - 486.
- FLETCHER, C.R., 1970. The regulation of calcium and magnesium in the brackish water polychaete *Nereis diversicolor* O.F.M. - J. Exp. Biol. 53: 425 - 443.
- FLORKIN, M. & E. SCHOFFENIELS, 1969. Molecular approach to ecology. Academic Press, New York & London, 1 - 203.
- FRETTER, V., 1955. Uptake of radioactive sodium (^{24}Na) by *Nereis diversicolor* and *Perinereis cultrifera*. - J. Mar. Biol. Ass. U.K. 34: 151 - 160.
- GIESE, A., 1962. Cell physiology. Saunders Company, Philadelphia & London, 1 - 592.
- GOERKE, H., 1971. The feeding habits of the *Nereis* species (Polychaeta, Nereidae) of the German coasts. - Veröff. Inst. Meeresf. Bremerhaven 13: 1 - 50.
- HOHENDORF, K., 1963. Der Einfluss der Temperatur auf die Salzgehaltstoleranz und Osmoregulation von *Nereis diversicolor* O.F. Muell. - Kieler Meeresforsch. 19: 196 - 218.
- JEUNIAUX, Ch., Gh. DUCHATEAU-BOSSON & M. FLORKIN, 1961. Variation de la composante amino-acide des tissus et euryhalinité chez *Perinereis cultrifera* Gr. et *Nereis diversicolor* O.F. Müller. - J. Biochemistry 49: 527 - 531.
- JØRGENSEN, C.B. & R.P. DALES, 1957. The regulation of volume and osmotic regulation in some nereid polychaetes. - Physiol. Comp. Oecol. 4: 357 - 374.
- JÜRGENS, O., 1935. Die Wechselbeziehungen von Blutkreislauf, Atmung und Osmoregulation bei Polychäten (*Nereis diversicolor*)

- Zool. Jahrb. Physiol. 55: 1 - 46.
- KAMEMOTO, F.I., K.N. KATO & L.E. TUCKER, 1966. Neurosecretion and salt and water balance in the Annelida and Crustacea. -Am. Zool. 6: 213 - 219.
- KRÜGER, F., 1964. Messungen der Pumptätigkeit von Arenicola marina L. im Watt. - Helgoländer wiss. Meeresunters. 11: 70 - 91.
- LANG, M.A. & H. GAINER, 1969. Volume control by muscle fibers of the blue crab. -J. Gen. Physiol. 53: 323 - 341.
- LANGE, R., 1963. The osmotic function of amino acids and taurine in the mussel, Mytilus edulis. -Comp. Biochem. Physiol. 10: 173 - 179.
- _____, 1968. Isosmotic intracellular regulation. - Nytt. Mag. Zool. 16: 1 - 13.
- _____, 1970. Isosmotic intracellular regulation and euryhalinity in marine bivalves. -J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 5: 170 - 179.
- _____, & A. MOSTAD, 1967. Cell volume regulation in osmotically adjusting marine animals. -J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1: 209 - 219.
- LINDROTH, A., 1938. Studien über die respiratorischen Mechanismen von Nereis virens Sars. -Zool. Bidr. Uppsala 17: 369 - 497.
- MOORE, S. & W.H. STEIN, 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. -J. Biol. Chem. 176: 367 - 387.
- OGLESBY, L.C., 1965a. Steady-state parameters of water and chloride regulation in estuarine nereid polychaetes. -Comp. Biochem. Physiol. 14: 621 - 640.
- _____, 1965b. Water and chloride fluxes in estuarine nereid polychaetes. -Comp. Biochem. Physiol. 16: 437 - 455.
- _____, 1968. Responses of an estuarine population of the polychaete Nereis limnicolla to osmotic stress. -Biol. Bull. 134: 118 - 138.
- _____, 1969. Salinity-stress and desiccation in intertidal worms. -Am. Zool. 9: 319 - 331.
- _____, 1970. Studies on the salt and water balance of Nereis diversicolor. I. Steady-state parameters. -Comp. Biochem. Physiol. 36: 449 - 466.

- POTTS, W.T.W., 1958. The inorganic and amino acid composition of some Lamellibranch muscles. -J. Exp. Biol. 35: 749 - 764.
- _____, & G. PARRY, 1964. Osmotic and ionic regulation in animals. Pergamon Press, New York & London, 1 - 423.
- PROSSER, C.L. & F.A. BROWN, 1962. Comparative animal physiology. Saunders Company, Philadelphia & London, 1 - 688.
- ROBERTSON, J.D., 1961. Studies on the chemical composition of muscle tissue. II. Abdominal flexor muscle of the lobster *Nephrops norvegicus* L. -J. Exp. Biol. 38: 707 - 728.
- _____, 1965. Studies on the chemical composition of muscle tissue. III. The mantle tissue of cephalopod molluscs. -J. Exp. Biol. 42: 153 - 175.
- SAYLES, L.P., 1935. The effects of salinity changes on body weight and survival of *Nereis virens*. -Biol. Bull. 69: 233-244.
- SCHLIEPER, C., 1929. Über die Einwirkung niederer Salzkonzentrationen auf marine Organismen. -Zeitschrift vergl. Physiol. 9: 478 - 514.
- SHAW, J., 1958. Osmoregulation in the muscle fibres of *Carcinus*. -J. Exp. Biol. 35: 920 - 929.
- SMITH, R.I., 1955a. On the distribution of *Nereis diversicolor* in relation to salinity in the vicinity of Tvärminne, Finland, and the Isefjord, Denmark. -Biol. Bull. 108: 326 - 345.
- _____, 1955b. Comparison of the level of chloride regulation by *Nereis diversicolor* in different parts of its geographical range. -Biol. Bull. 109: 453 - 474.
- _____, 1957. A note on the tolerance of low salinities by nereid polychaetes and its relation to temperature and reproductive habit. -Ann. Biol. 33: 93 - 107.
- _____, 1963. A comparison of salt loss rate in three species of brackish-water nereid polychaetes. -Biol. Bull. 125: 332 - 343.
- _____, 1964. D₂O uptake rate in two brackish-water nereid polychaetes. Biol. Bull. 126: 142 - 149.
- _____, 1970a. Chloride regulation at low salinities by *Nereis diversicolor*. I. Uptake and exchanges of chloride. -J. Exp. Biol. 53: 75 - 92.

- _____, 1970b. Chloride regulation at low salinities by *Nereis diversicolor*. II. Water fluxes and apparent permeability to water. -J. Exp. Biol. 53: 93 - 100.
- _____, 1970c. Hypo-osmotic urine in *Nereis diversicolor*. -J. Exp. Biol. 53: 101 - 108.
- SPAARGAREN, D.H., 1969. Temperatuurinvloed op de osmoregulatie van de garnaal, *Crangon crangon* L. -Intern verslag Ned. Inst. voor Onderz. der Zee 1969 - 9: 1 - 36.
- _____, 1971. Aspects of the osmotic regulation in the shrimps *Crangon crangon* and *Crangon allmanni*. -Neth. J. of Sea Res. 5: 275 - 335.
- STEPHENS, G.C., 1964. Uptake of organic material by aquatic invertebrates. III. Uptake of glycine by brackish-water annelids. - Biol. Bull. 126: 150 - 162.
- TAYLOR, A.G., 1969. The direct uptake of amino acids and other small molecules from sea water by *Nereis virens* Sars. - Comp. Biochem. Physiol. 29: 243 - 250.
- VADER, W.J.M., 1964. A preliminary investigation into the reactions of the infauna of the tidal flats to tidal fluctuations in water level. -Neth. J. Sea Res. 2: 189 -222.
- WEBBER, H.H. & P.A. DEHNEL, 1968. Ion balance in the prosobranch gastropod *Acmaea scutum*. -Comp. Biochem. Physiol. 25: 49 - 64.
- WEBER, R.E. & D.H. SPAARGAREN, 1970. On the influence of temperature on the osmoregulation of *Crangon crangon* and its significance under estuarine conditions. -Netherl. J. Sea Res. 5: 108 - 120.
- _____, & W.J.A. VAN MARREWIJK, 1972. Free amino acids in the shrimp *Crangon crangon* and their osmoregulatory significance. - Neth. J. Sea Res., in press.
- WELLS, G.P. & R.P. DALES, 1951. Spontaneous activity patterns in animal behaviour: the irrigation of the burrow in the polychaetes *Chaetopterus variopedatus* Renier and *Nereis diversicolor* O.F. Müller. -J. Mar. Biol. Ass. U.K. 29: 661 - 680.

- _____, & I.C. LEDINGHAM, 1940. Physiological effects of a hypotonic environment. I. The action of hypotonic salinities on isolated rhythmic preparations from polychaete worms (*Arenicola marina*, *Nereis diversicolor*, *Perinereis cultrifera*). -J. Exp. Biol. 17: 337 - 352.
- WOLF, A.V., 1966. Aqueous solutions and body fluids, their concentrative properties and conversion tables. Harper & Row, New York & London, 1 - 166.

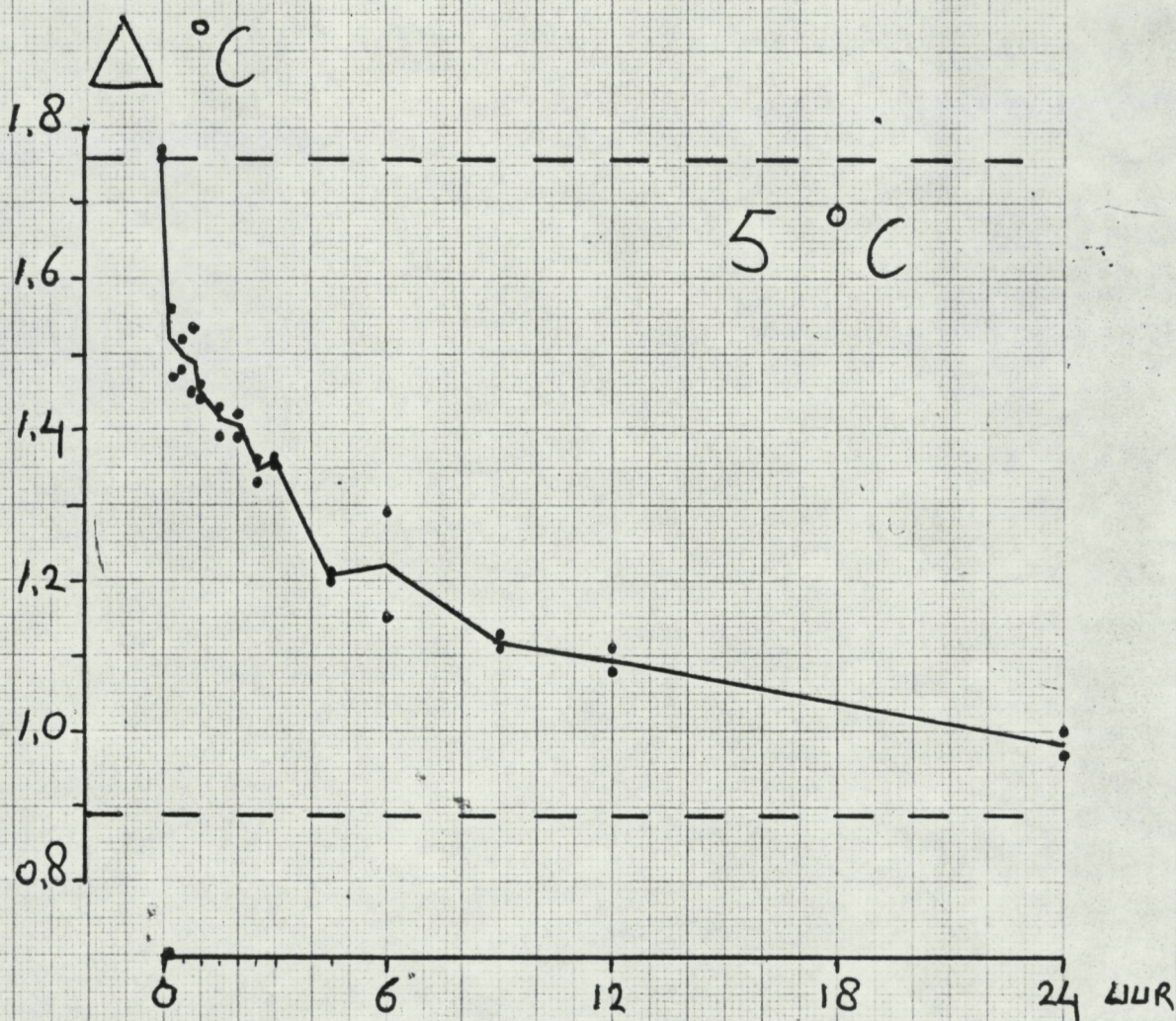
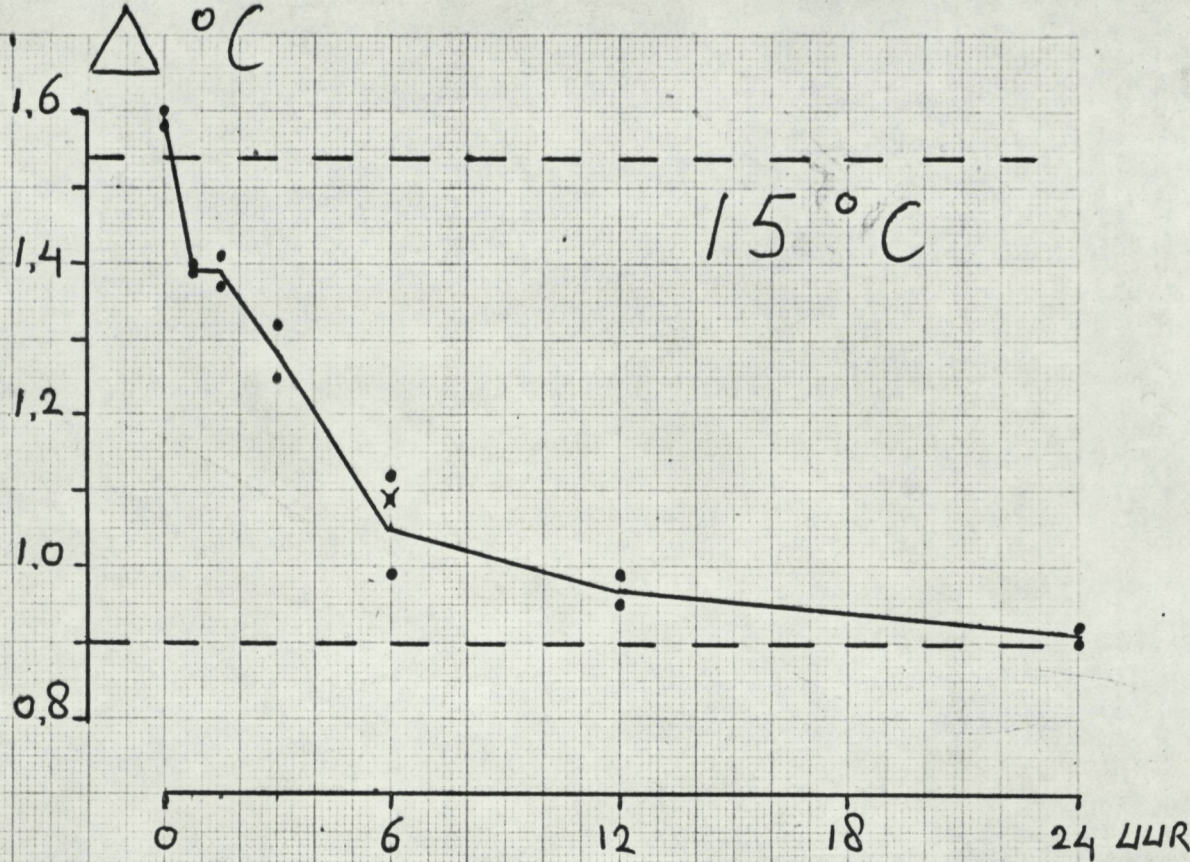


Fig. 1. Daling van de osmotische concentratie van de coeloomvloeistof bij een zoutsprong van 28,2 naar 16,8 % S bij 15 °C en van 32,3 naar 16,3 % S bij 5 °C. De strepenlijnen vertegenwoordigen de vriespuntsdalingen van genoemde zoutgehaltes.

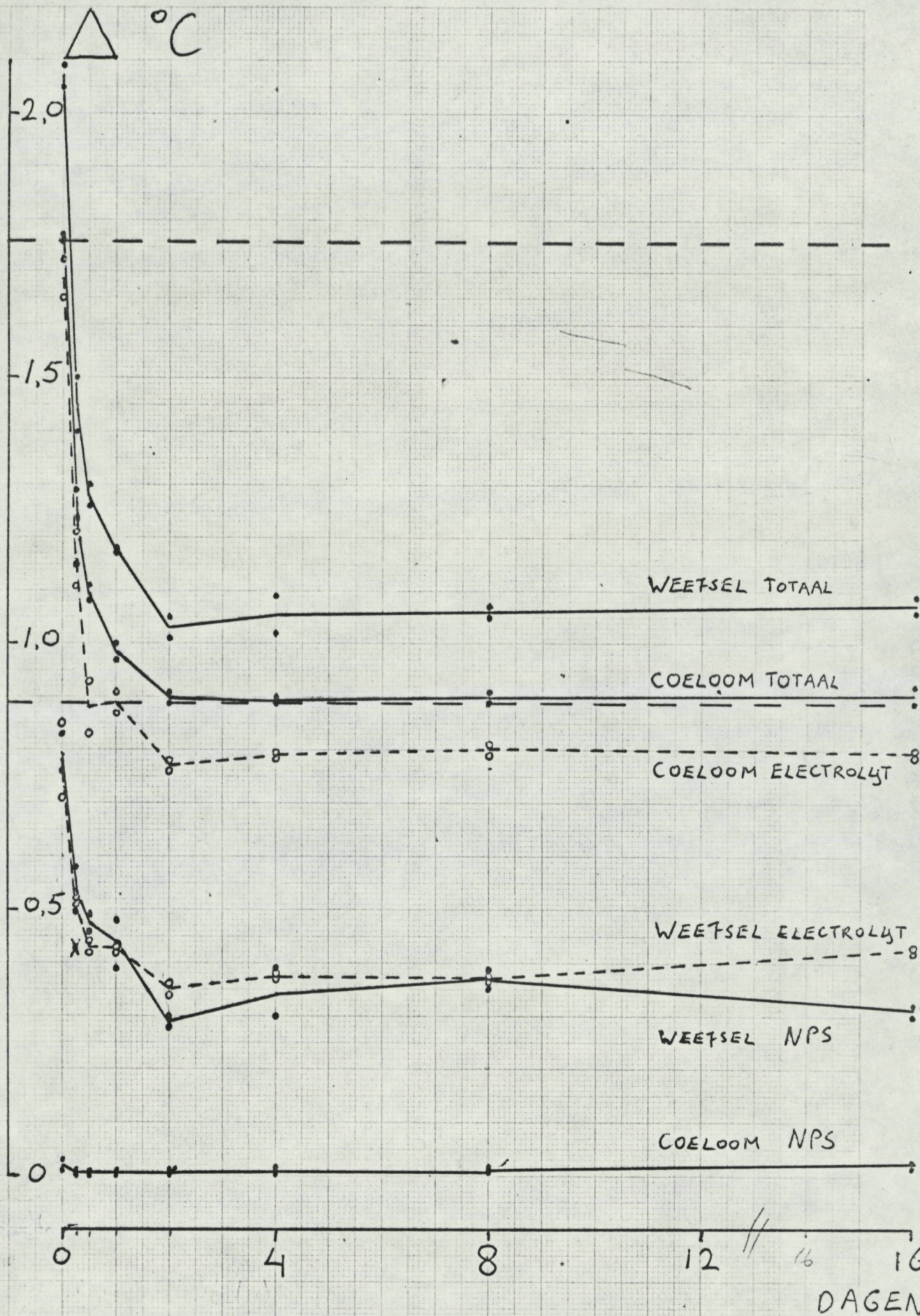


FIG. 2.

Het verloop van de osmotische concentraties van coeloom vloeistof en weefselvocht bij een zoutsprong van 32,3 naar 16,3 ‰ S bij 5 °C. De strepenlijnen vertegenwoordigen de vriespuntsdalingen van genoemde zoutgehalten. Open kringetjes = electrolyt waarden.

GEW. % WATER IN HET WEEFSEL

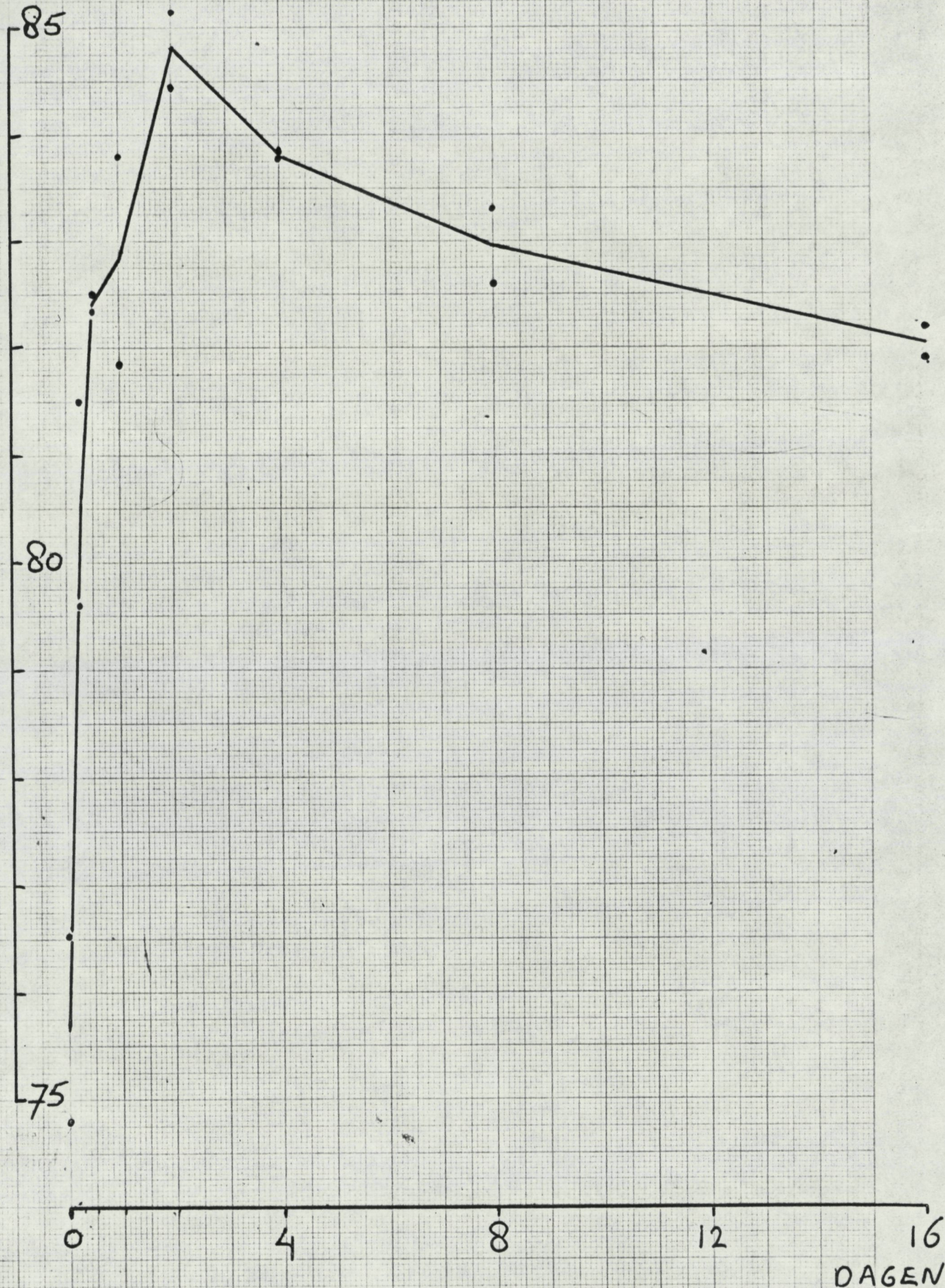


FIG. 3. Het verloop van de hoeveelheid water in het weefsel, uitgedrukt als gewichtspercentage van het natgewicht, bij een zoutsprong van 32,3 naar 16,3 % S bij 5 °C.

GEWICHTS Σ_0 WATER IN HET WEEFSEL.

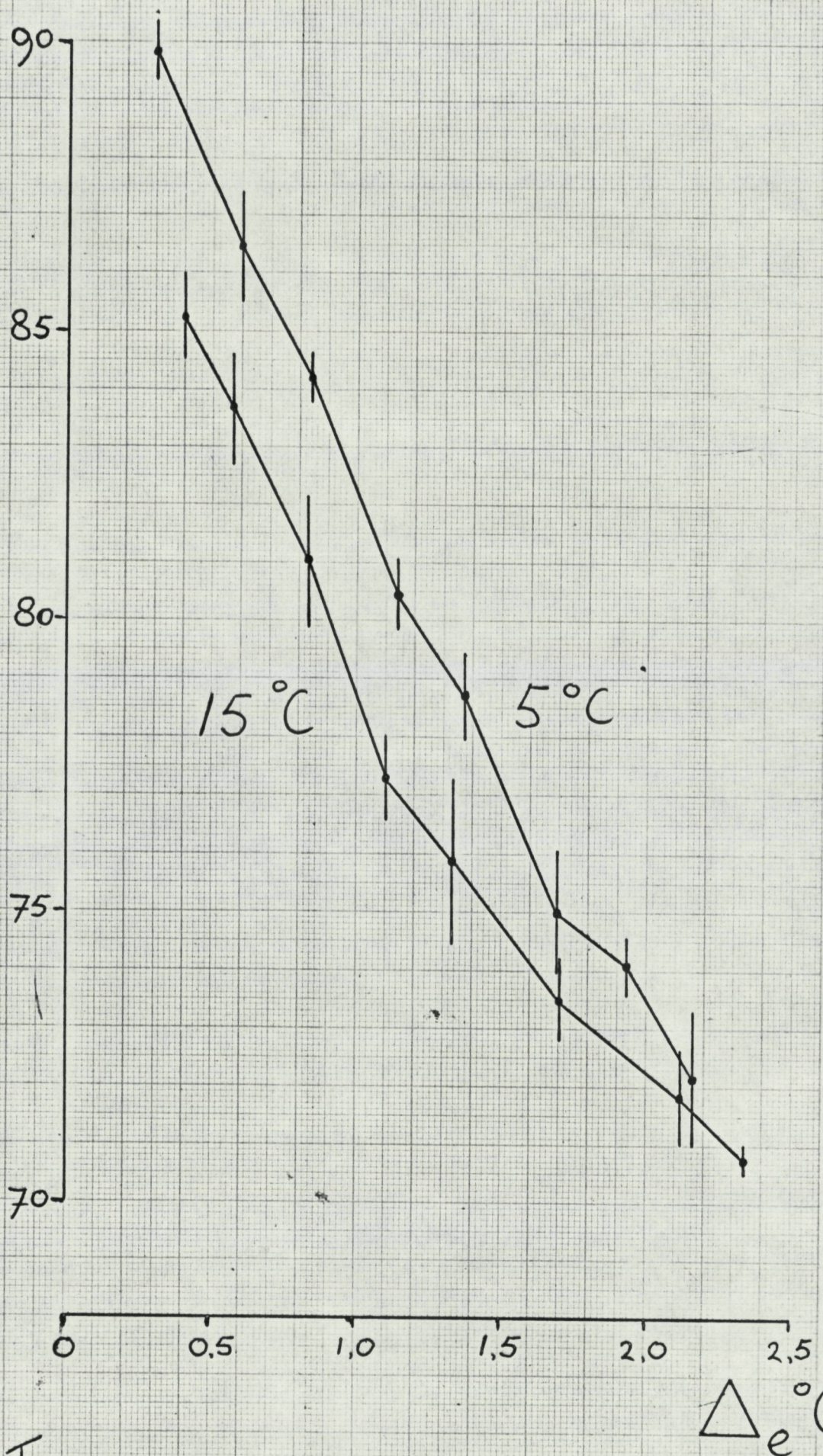


FIG. 4.

Watergehalten van het weefsel bij 5 en 15 °C na adaptatie aan verschillende zoutgehalten. De punten vertegenwoordigen de gemiddelden van 5 dieren, de streep is ± 1 standaarddeviatie.

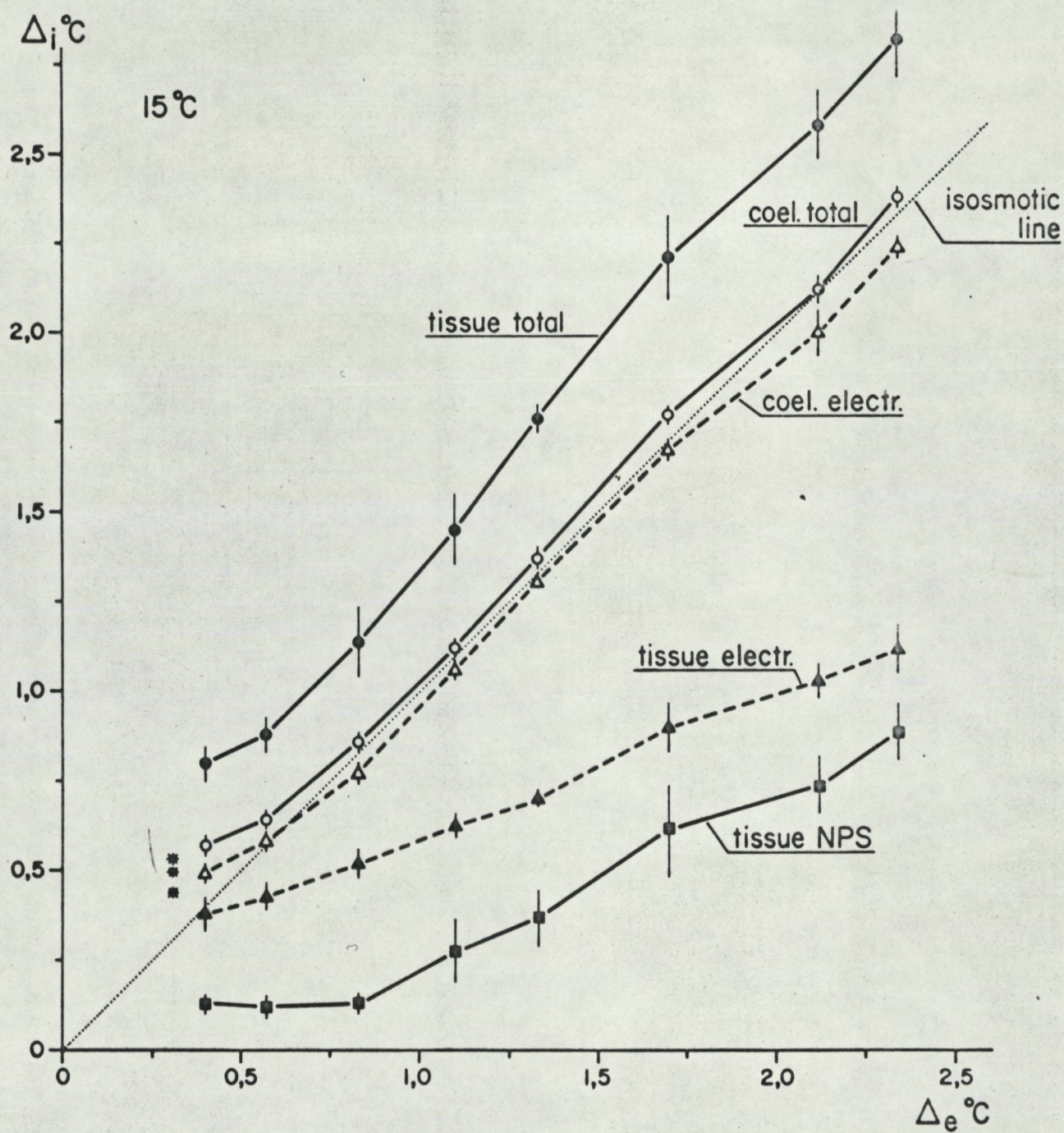


Fig. 5. De osmotische concentraties van coeloomvloeistof en weefselvocht na adaptatie bij 15 °C aan verschillende zoutgehalten uitgedrukt in vriespuntsdaling. De punten zijn gemiddelden van 5 dieren, de strepen zijn ± 1 standaarddeviatie. Met een * zijn de Δ 's van de coeloomvloeistof van stervende dieren gegeven.

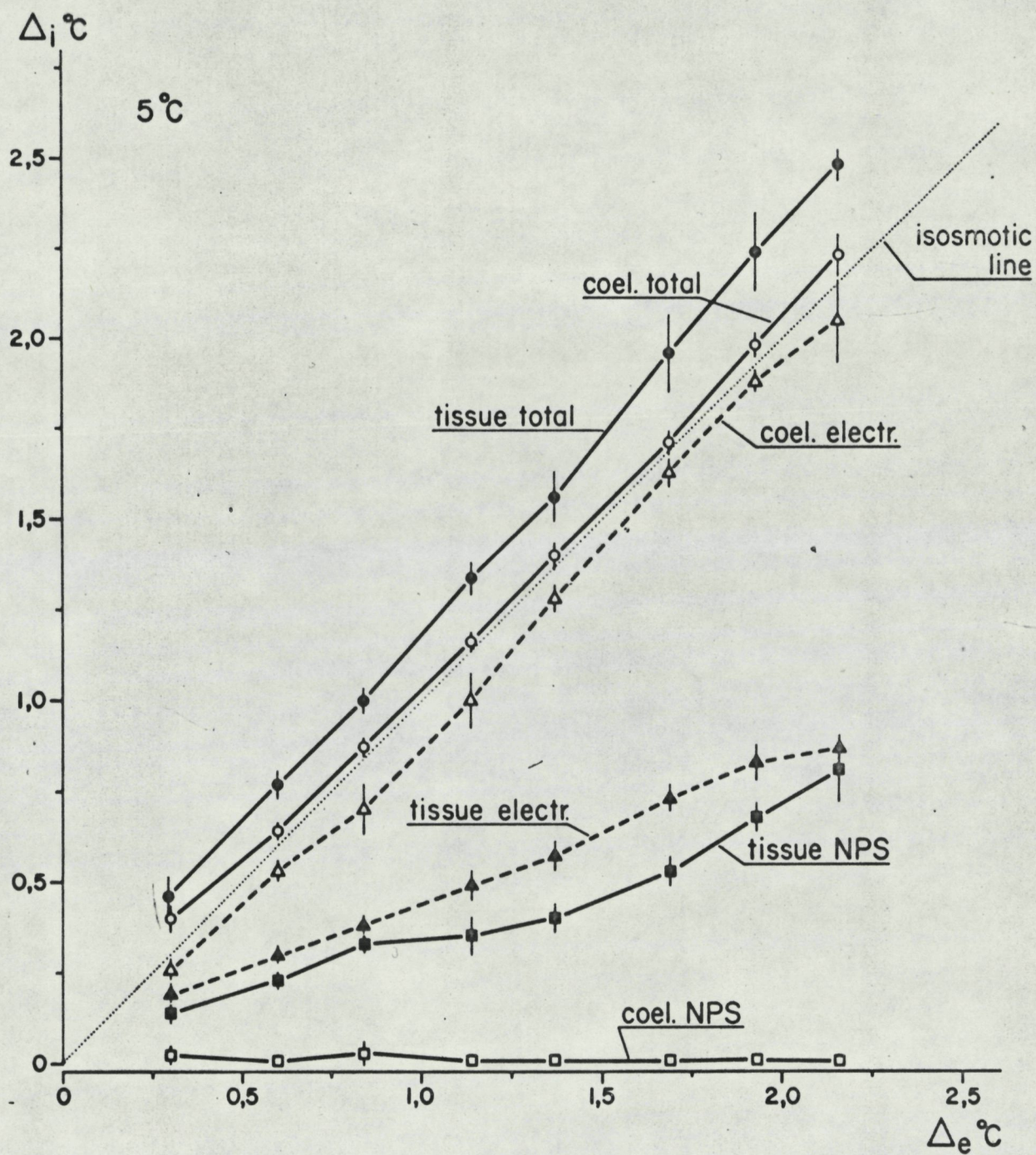


Fig. 6. De osmotische concentraties van coeloomvloeistof en weefselvo na adaptatie bij 5 °C aan verschillende zoutgehalten uitgedrukt in vriespuntsverlaging. De punten zijn gemiddelden van 5 dieren de strepen zijn ± 1 standaarddeviatie.

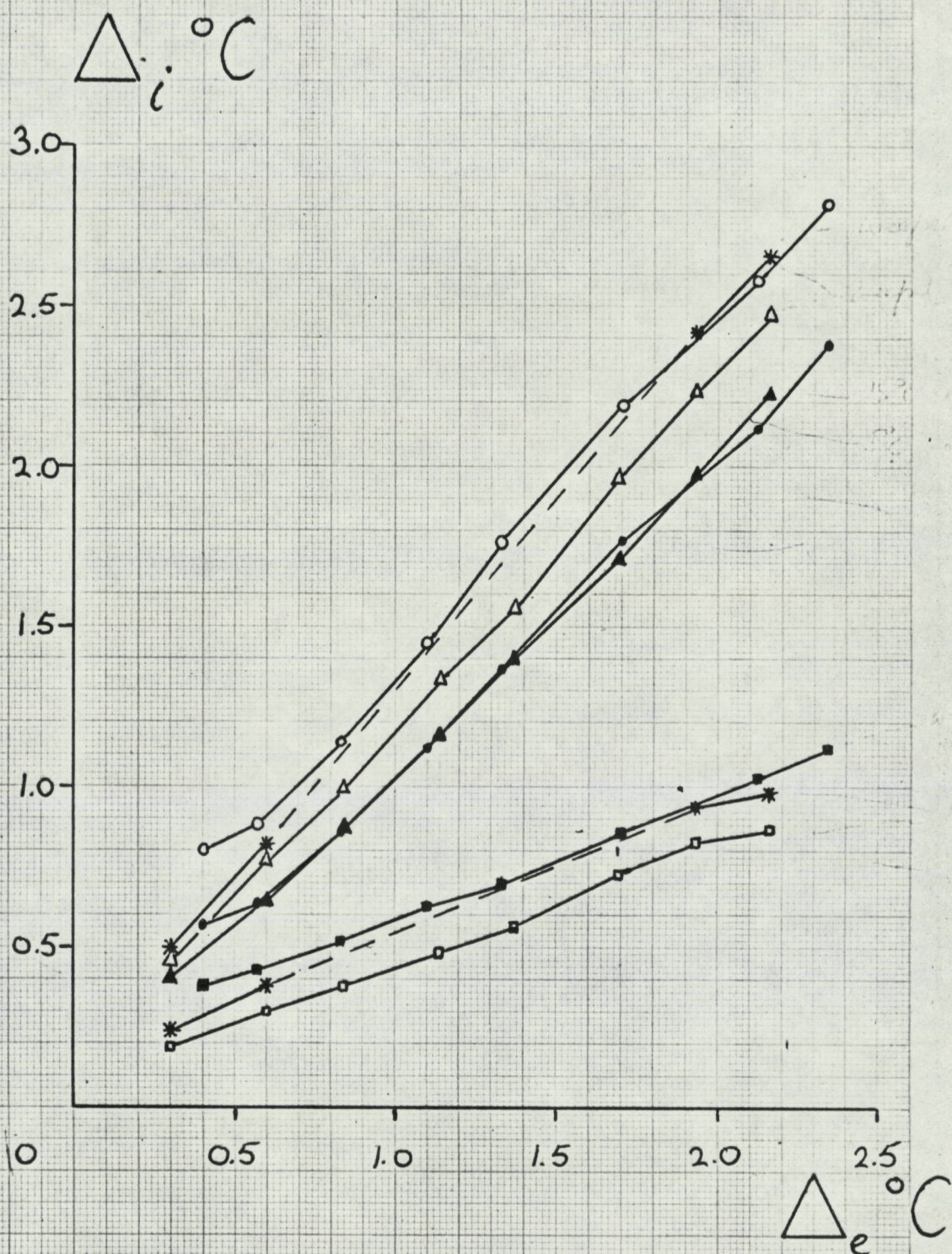


FIG. 7.

De osmotische concentraties van coeloomvloeistof en weefselvocht na adaptatie bij 15 en 5 °C aan verschillende zoutgehalten uitgedrukt in vriespuntsdaling.

- Δ coeloom totaal bij 15 °C
- ▲— Δ coeloom totaal bij 5 °C
- Δ weefsel totaal bij 15 °C
- △— Δ weefsel totaal bij 5 °C
- *—* Δ weefsel totaal bij 5 °C, hermeting
- Δ weefsel electrolyt bij 15 °C
- Δ weefsel electrolyt bij 5 °C
- *—* Δ weefsel electrolyt bij 5 °C, hermeting

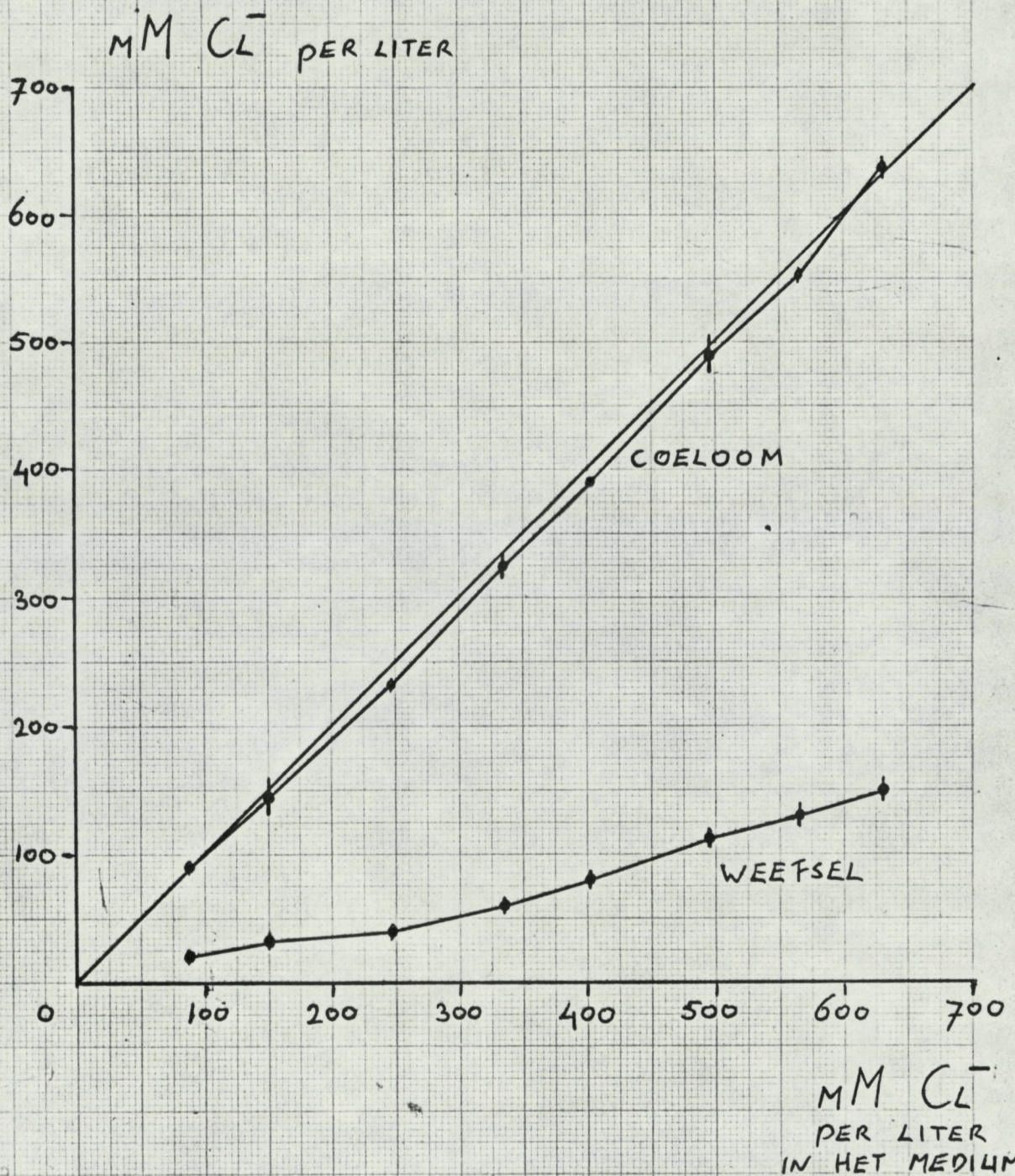


Fig. 8.

De concentraties Cl^- in coeloomvloeistof en weefselvocht na adaptatie bij 5°C aan verschillende zoutgehalten. Op de x-as staan de bij deze zoutgehalten behorende concentraties Cl^- . De punten zijn gemiddelden van 5 dieren, met strepe is ± 1 standaarddeviatie aangeduid.

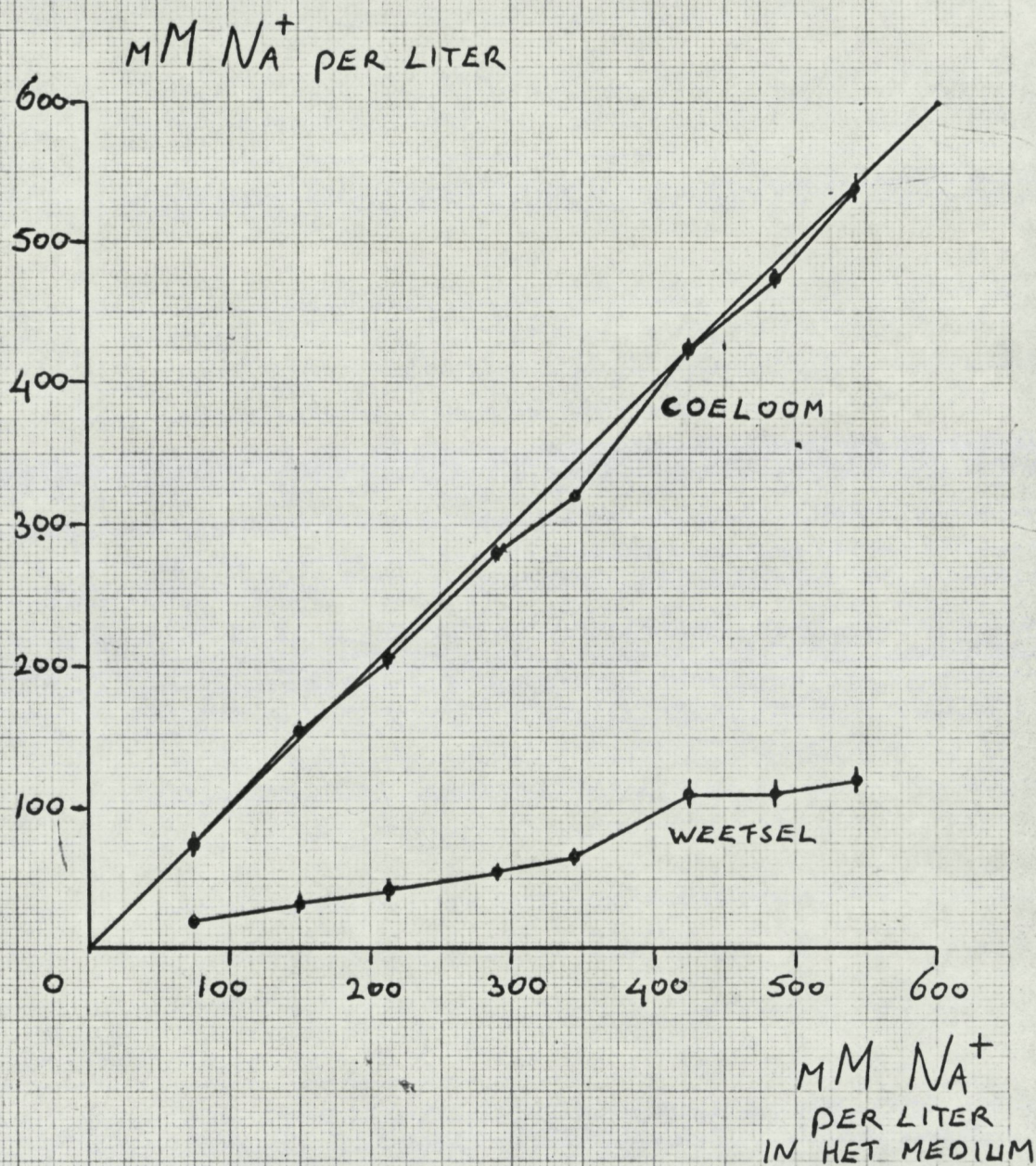


FIG. 9. De concentraties Na^+ in coeloomvloeistof en weefselvocht na adaptatie bij 5°C aan verschillende zoutgehaltes. Op de x-as staan de bij deze zoutgehaltes behorende concentraties Na^+ . De punten zijn gemiddelden van 5 dieren, met strepen is ± 1 standaarddeviatie aangeduid.

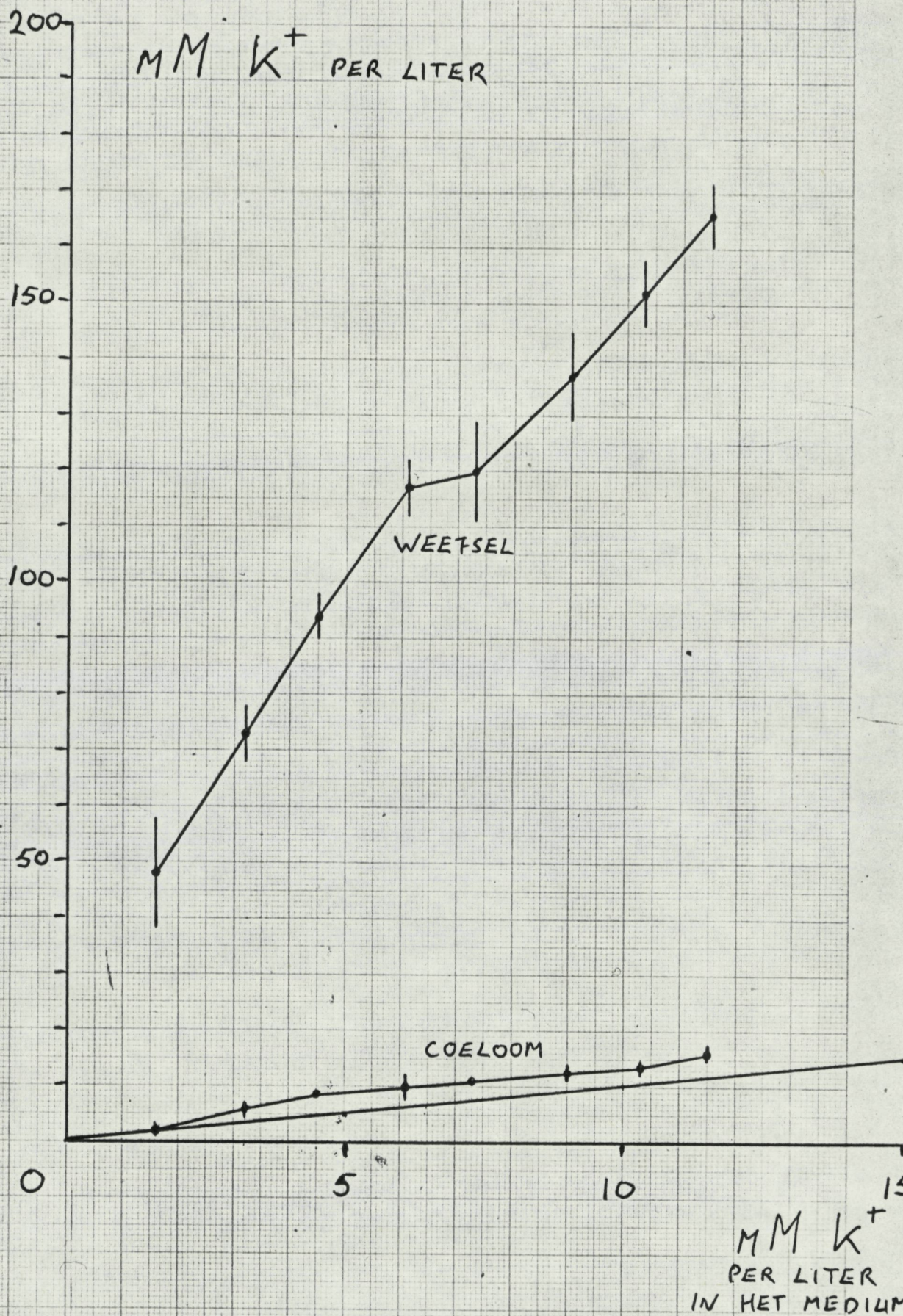


FIG. 10.

De concentraties K^+ in coeloomvloeistof en weefsel vocht na adaptatie bij $5^\circ C$ aan verschillende zoutgehaltes. Op de x-as staan de bij deze zoutgehaltes behorende concentraties K^+ . De punten zijn gemiddelden van 5 dieren, met strepen is ± 1 standaarddeviatie aangegeven.

GEWICHTS %₀ WATER IN HET WEEFSEL

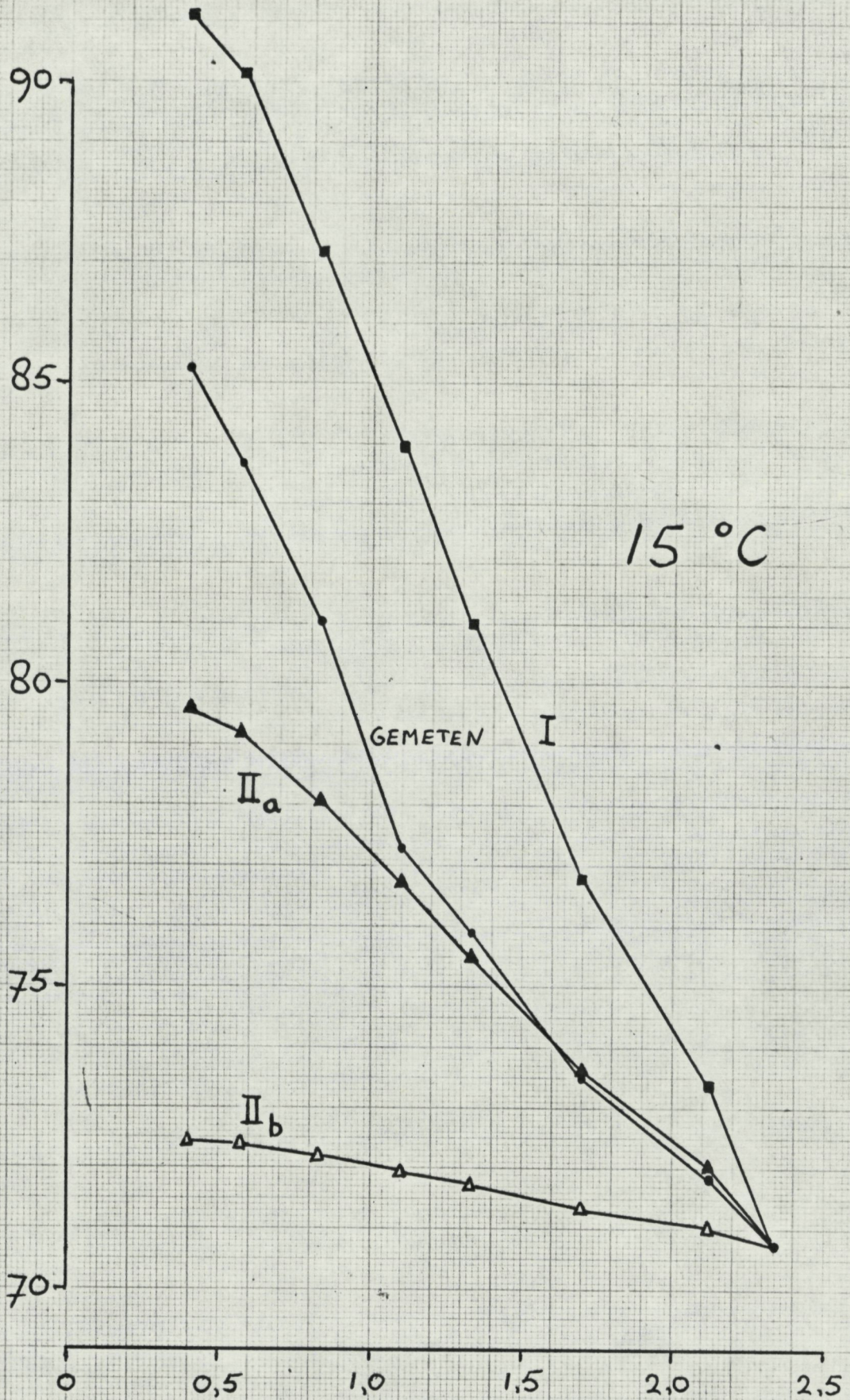


FIG. 11. Het watergehalte van het weefsel gemeten na adaptatie aan verschillende zoutgehalten bij 15 °C ($\bullet$ — $\bullet$) en de watergehalten berekend uit de gemeten Δ coeloom totaal voor de aannames dat I alleen netto transport van water optreedt ($\blacksquare$ — $\blacksquare$), II_a alleen netto transport van opgeloste stof met $M=131,2$ optreedt ($\blacktriangle$ — $\blacktriangle$) en II_b alleen netto transport van opgeloste stof met $M=58,4$ optreedt ($\triangle$ — $\triangle$).

GEWICHTS % WATER IN HET WEEFSEL

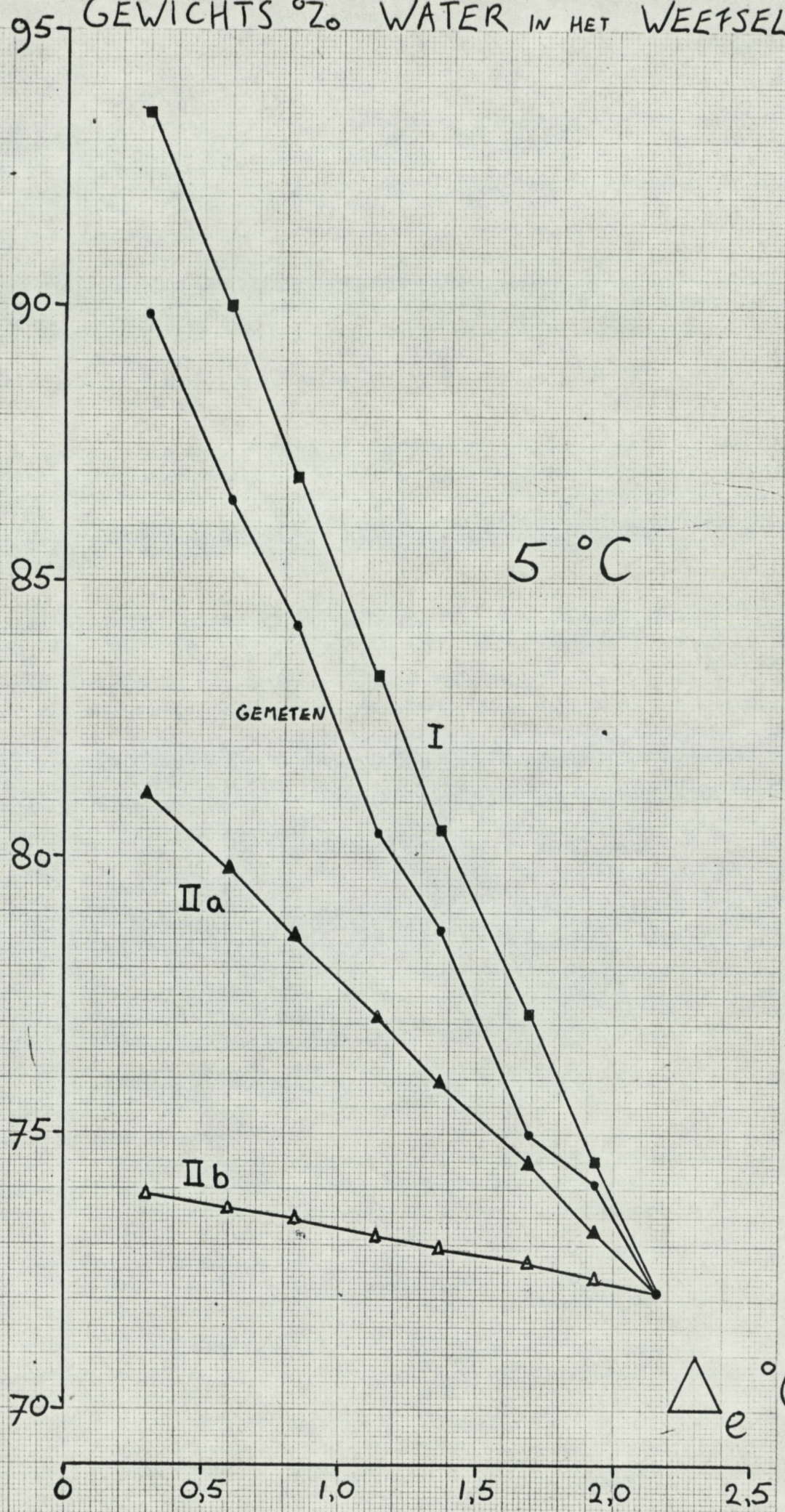


FIG. 12.

Als figuur 11 maar nu voor adaptatie aan verschillende zoutgehalten bij 5 °C.