Osmoregulatie van de strandkrab (*Carcinus maenas* L.)

door

F.J. Engelsma

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLIKATIES EN VERSLAGEN

nummer 1973-8

1300 F

Osmoregulatie van de strandkrab (*Carcinus maenas* L.)

door

F.J. Engelsma

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLIKATIES EN VERSLAGEN

nummer 1973-8

Rechten voorbehouden

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

Osmoregulatie van de strandkrab
(Carcinus maenas L.)

door

F.J. Engelsma

Intern verslag
over
werkzaamheden verricht als doctorale studie
in het tijdvak december 1971 - juni 1972
aan
NIOZ te Texel
voor
Prof. Dr. G.P. Baerends
o.l.v.
Dr. D.H. Spaargaren

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE
PUBLIKATIES EN VERSLAGEN
nummer 1973-8

Osmoregulatie van de strandkrab (Carcinus maenas L.)

door

F.J. Engelsma

Inhoud:

I. Samenvatting 1
I. Summary 2
II. Inleiding 3
III. Materiaal en methoden 4
1. Proefdieren 4
2. Bloedmonstername 5
3. Bepaling van de osmotische concentratie 5
4. Geleidbaarheidsmetingen 8
5. Chloridebepalingen 10
6. Bepaling van de urineproductie 12
7. Theorie, urinevorming bij Crustacea 14
IV. Resultaten en discussie 15
1. Regulatie-curven 15
2. Correlatie met het milieu 17
3. Fysiologische rasverschillen 19
4. Metabolisme en energievoorziening 21
5. Urineproductie van Carcinus maenas 24
6. De plaats van de urineproductie in de osmoregulatie 27
7. Het verband tussen de urineproductie en de grootte van de proefdieren 31
8. Het verband tussen de urineproductie en het osmotische drukverschil tussen intern en extern medium 32
9. Q_{10}-waarden voor het urineproductieproces van C. maenas 33
10. Hormonale regulatie 34
V. Literatuur 35

I. Samenvatting

Van Carcinus maenas zijn gegevens verzameld van de osmotische concentratie, geleidbaarheid en chloride concentratie van de haemolymphe bij verschillende saliniteiten. Tussen plm. 18 en 30 °/oo S worden genoemde grootheden op een min of meer constant niveau gehouden (regulatie),

bij hogere saliniteiten kan gesproken worden van conformiteit, bij lagere saliniteiten van beperkte conformiteit, c.q. regulatie.
Er is een duidelijk aanwijsbaar temperatuureffect, genoemde grootheden zijn negatief gecorreleerd met de mediumtemperatuur, bovendien vertoont Carcinus bij hogere temperaturen een grotere regulatie-capaciteit, de hellingshoek van de regulatie-krommen is kleiner.
De regulatiecurven geven gecombineerd met het temperatuureffect een correlatie te zien met door Carcinus vertoonde migratiepatroon. (Broekhuysen jr., 1937).
Vergelijking met literatuurgegevens suggereert het bestaan van geografische rassen.
De urineproductie van Carcinus maenas is gemeten bij zoutgehaltes beneden ± 25 °/oo S.
Saliniteit en frequentie van urineproductie vertonen een negatieve correlatie; daarnaast is er een positief temperatuur-effect op de urineproductie. Het verband tussen urineproductie en verschil in osmotische druk tussen intern en extern medium is bij benadering proportioneel.
Bij het urineproductie-proces moet vooreerst gedacht worden aan een fysisch proces, gezien de uit de urineproductie-resultaten berekende Q_{10}-waarden.

I. Summary

Osmoregulation of the shore crab (Carcinus maenas L.). Regulation curves dealing with osmotic concentration, conductivity and chloride concentration of the haemolymph have been obtained for Carcinus maenas. Between about 18 and 30 °/oo S the quantities mentioned above are maintained at a more or less constant level (regulation), at higher salinities conformity is found, at lower salinities a weak regulation exists. There is a distinct temperature effect, the quantities are correlated negatively with the medium temperature, moreover a greater regulation capacity at higher temperatures is shown; the curve slope angle is smaller.
Combined with the temperature effect the regulation curves show a relation with the migration pattern of Carcinus. Comparison with literature data suggests geographical races.
The urine production has been measured at salinities below about 25 °/oo S.
Salinity and frequency of urine production show a negative correlation; in addition a positive temperature influence on urine production is found.

A lineair relationship is found between urine production and difference of osmotic pressure between the internal and external medium.
In urine production a physical process is most likely, considering the Q_{10}-values, calculated from the results of the experiments on urine production.

II. Inleiding

De eerste ontwikkeling van het dierenrijk heeft plaatsgevonden in zee. Dit wordt onder andere nog steeds weerspiegeld in een zekere mate van overeenkomst in samenstelling van zeewater en lichaamsvloeistoffen van vele dieren.
Beperken we ons tot de osmotische waarde van zeewater en lichaamsvloeistoffen, dan kunnen we onderscheiden:
Conformiteit, het volgen van variaties in de mediumconcentraties door de osmotische waarde van het bloed en regulatie, het handhaven van een constante bloedconcentratie, onafhankelijk van de osmotische waarde van het medium.
Prosser en Brown (1961) geven voor de groep van de Crustacea een uitgebreide indeling op grond van hun osmoregulatie-vermogen. Hieruit kunnen drie groepen gehaald worden, die ook aan de Nederlandse kust hun vertegenwoordigers hebben.
Namelijk ten eerste Crustacea, beperkt tot zeewater.(de stenohaliene Crustacea met als voorbeeld Maja). Verder Crustacea met een beperkt osmoregulatievermogen. Deze zijn in staat te migreren naar een niet al te zeer verdund milieu. Bijvoorbeeld: Cancer.
Ten slotte Crustacea met een sterke osmoregulatie (euryhalien). Ze zijn typerend voor brak-water-kustgebieden. Bijvoorbeeld: Carcinus.
Het Waddenzee-estuarium is een brakwatergebied met een sterk wisselende saliniteit (plm. 15 tot 33 °/oo S).
Ondermeer van invloed op het zoutgehalte zijn de getijdebewegingen en de afvoer van zoet water van het land.
Vergeleken met de Noordzee liggen de jaarlijkse temperatuuruitersten van de Waddenzee verder uit elkaar.
Twee vertegenwoordigers van de groep der Crustacea, die kenmerkend zijn voor een gebied als de Waddenzee, zijn de euryhaliene soorten Crangon crangon (L.) en Carcinus maenas (L.). Beide vertonen een seizoengekoppeld migratiepatroon. 's Winters houden ze zich op in de qua temperatuur en zoutgehalte stabielere wateren, de kustwateren van de Noordzee en de diepere geulen van de Waddenzee; de rest van het jaar bevinden ze zich tot diep in de Waddenzee, tot op de

ondiepe en bij laag water droogvallende platen (Broekhuysen jr., 1937).
Uit de literatuur is reeds bekend het sterke osmoregulatievermogen van Carcinus maenas (Schlieper, 1929, Flügel, 1963, e.a.); daarnaast blijkt er een sterk temperatuureffect aanwezig te zijn (Flügel, 1963).
In het werk van Theede (1969) wordt gewezen op het gevaar van vergelijking van absolute waarden verkregen voor dieren afkomstig uit verschillende gebieden.
Doel van deze studie was het verkrijgen van enig inzicht in het osmoregulatiepatroon van de in de Waddenzee en Noordzee voorkomende vertegenwoordigers van Carcinus. Dit ter vergelijking met resultaten verkregen van Carcinus maenas uit andere gebieden, ter ondersteuning van de idee, dat in Noord- en Oostzee meerdere geografische rassen van Carcinus voorkomen.
Verder zijn proeven ter bepaling van de urineproductie gedaan om de betekenis van de urineproductie voor de osmoregulatie na te gaan.

III. Materiaal en methoden

1. Proefdieren

Carcinus maenas werd in grote getale gevangen in het Marsdiep, tegen de Z.O.-kust van Texel, in de aldaar uitgezette netten van het NIOZ.
Zo C. maenas in voorraad in gevangenschap gehouden werd alvorens ze te gebruiken voor de proefnemingen, gebeurde dit in een bak (150 x 75 x 25 cm) gevuld met zeewater (plm. 30 °/oo S.), kontinue zeewaterdoorstroming en doorluchting, temperatuur 12-15°C, geen filtering.
Voor adaptatie aan een bepaalde saliniteit en temperatuur werden de proefdieren verdeeld over een achttal volglasaquaria (30 x 21 x 25 of 35 x 25 x 25 cm), gevuld met zeewater met saliniteiten varierend tussen 5 en 40 °/oo. De aquaria stonden opgesteld in een bak, gevuld met leidingwater, dat met behulp van een Colora Tauchkühler resp. een thermostaat-dompelaar eenheid op de vereiste temperatuur (5 of 20°C) werd gehouden.
Om te voorkomen, dat een temperatuur-gradient tussen de diverse aquaria zou ontstaan, werd het water in deze bak met behulp van een circulatiepomp gehomogeniseerd.
Filtering van de acht aquaria geschiedde via een bodemfilter, bestaande uit een omgekeerde glazen trechter, aan de onderzijde voorzien van een bruissteentje, het geheel gedeeltelijk bedekt door de bodembedekking, een mengsel van fijn zand en schelpengrit.

De aquaria werden afgedekt met dekruiten om overmatige verdamping tegen te gaan. Desondanks was een geleidelijke verhoging van het zoutgehalte, met name in de 20°C-bakken niet tegen te gaan.
De verschillende zoutgehaltes werden verkregen via menging van zeewater uit het laboratorium (plm. 30 °/oo S.) en leidingwater. De hiermee niet te verkrijgen saliniteiten van 35 en 40 °/oo S. werden bereikt door toevoeging van zeezout (Dr. Ritter Südsalz) aan het laboratoriumzeewater.
Als adaptatie-tijd aan een bepaalde saliniteit en temperatuur werd als minimum een tijd van vijf etmalen genomen.
De proefdieren werden twee maal per week gevoerd met stukjes vis (zandspiering, platvis), krabben gehouden bij lage temperatuur zijn echter weinig actief en nemen nauwelijks voedsel tot zich.
Niet gebruikt als proefdier werden krabben, die bezig waren te vervellen of meerdere extremiteiten misten en bovendien vrouwtjes, die eieren met zich meedroegen.

2. Bloedmonstername

De te bemonsteren krab wordt uit het aquarium genomen en met behulp van tissues zorgvuldig afgedroogd. Vervolgens wordt een van de pereiopoden halverwege het laatste lid afgeknipt en het eruit druppelende bloed opgevangen in een glazen monsterbuisje, inhoud 3 cc.
De krab wordt na afloop teruggezet in zijn aquarium.
Het afgetapte bloed is steeds meteen gebruikt voor meting van de osmotische concentratie en zo mogelijk voor bepaling van de geleidbaarheid. Daarna wordt het bewaard in het vriesvak van de ijskast en één of meerdere dagen later gebruikt ter bepaling van het chloride gehalte.
Op de dag van bloedmonstering wordt tevens de saliniteit van de betreffende aquaria gemeten door middel van meting van de vriespuntsdaling en/of geleidbaarheid van het water.

3. Bepaling van de osmotische concentratie

De osmotische concentratie van een monster wordt bepaald door middel van meting van de vriespuntsverlaging (Δ).

Theoretische beschouwing over de gebruikte methode

De tweede wet van Raoul zegt: (Verbrugh, 1962)
De vriespuntsverlaging van een oplossing is evenredig met de moleculaire concentratie van de opgeloste stof, maar onafhankelijk van de aard van die stof, mits de oplossing verdund is en het oplosmiddel zuiver uitvriest, d.w.z. er mogen bij het uitkristalliseren geen mengkristallen gevormd worden.

De vriespuntsverlaging hangt af van de aard van het oplosmiddel. De moleculaire vriespuntsverlaging (K_v) is de theoretische waarde van de vriespuntsverlaging (v.p.v.), die zou worden veroorzaakt door het oplossen van één mol. stof in 100 gram oplosmiddel (indien bovenstaande wet van Raoul zou gelden in deze geconcentreerde oplossing).

Voor water is K_v 18,6°C, of overgaand op mol.l^{-1} 1,858°C. De methode van het meten van de molecuulgewichten uit de vriespuntsverlaging noemt men de kryoskopie.

De relatie tussen de v.p.v. en de osmotische concentratie: (Verbrugh, 1962)

Er geldt de algemene betrekking:

$$^{e}\log\frac{N}{n+N} = \frac{Q}{R}\left(\frac{1}{T_o} - \frac{1}{T}\right)$$

waarin:

$\frac{N}{n+N}$: de moleculaire fractie van het oplosmiddel in de oplossing.

Q : de moleculaire smeltwarmte (de warmte nodig om 1 mol. gestold oplosmiddel bij gelijkblijvende temperatuur in vloeibare toestand te doen overgaan).

R : de gasconstante

T_o : de temperatuur van het stolpunt van het zuivere oplosmiddel.

T : de temperatuur van het stolpunt van de oplossing.

Beide temperaturen worden uitgedrukt in graden Kelvin.

Voor verdunde oplossingen gelden de volgende benaderingen:

a. $^{e}\log(1-x) \approx -x$ voor een kleine x.

dus $\ln\{(N/n+N)\} = \ln\{1-n/(n+N)\} \approx -n/(n+N)$.

$\approx -n/N$ (in verdunde oplossingen).

dus $-n/N = \frac{Q}{R}\left(\frac{1}{T_o} - \frac{1}{T}\right) = \frac{Q}{R}\left(\frac{T-T_o}{T.T_o}\right) = -\frac{Q}{R}\left(\frac{T_o-T}{T.T_o}\right)$

b. $T.T_o \approx T_o^2$

dus $+n/N = +\frac{Q}{R} \cdot \frac{T_o-T}{T_o^2}$ dus $T_o-T = n.R.T_o^2/Q.N$

m.a.w. $= T_o-T = \frac{R.T_o^2.M.C}{Q}$

waarin C = osmotische concentratie in mol./l.

M = mol.gewicht oplosmiddel.

Voor waterige oplossingen is de moleculaire vriespuntsverlaging dus 1,858°C.

Indien de vriespuntsverlagingen van verschillende verdunningen van zeewater worden uitgezet tegen deze verdunningen, valt een lineair verband waar te nemen (Spaargaren, 1969).

Met water als oplosmiddel is een onderkoeling mogelijk van -5 tot -8°C. Een dergelijk sterke onderkoeling is gunstig voor het ontstaan van een zeer fijnkristallig ijs na uitkristalliseren, hetgeen weer een snelle instelling van het temperatuur-evenwicht bewerkstelligt.
Omdat het vriespunt mede afhankelijk is van de mate van onderkoeling, is het van groot belang tot een konstante temperatuur te onderkoelen.

Uitvoering:

De metingen worden verricht met een Knauer-micro-osmometer. Het meetvat is geschikt voor een monstergrootte van ongeveer 50 µl; de monsters worden met een Eppendorf-pipet van 50 µl. overgebracht in het meetvat. Het monster wordt met behulp van een peltierelement afgekoeld tot -5,95°C.
Hierna wordt door roeren een plotselinge kristallisatie opgewekt. De temperatuur loopt dan snel op naar een evenwichtsstand, die na enige seconden bereikt wordt.
Met behulp van een instelknop kan deze waarde op een gevoeliger schaal worden afgelezen.
Alvorens de metingen verricht worden, moet de micro-osmometer gecontroleerd worden op juiste instelling voor waterige oplossingen (8,1,1).
Voor het aanbrengen van een monster in het meetvat moet dit enige malen gespoeld worden met gedestilleerd water en zorgvuldig gedroogd worden met behulp van tissues.
Omdat de schaalverdeling geen temperatuur-eenheden aangeeft, is een omrekeningsfactor noodzakelijk.
Indien de micro-osmometer juist is ingesteld, gelden de volgende betrekkingen:
Uitslag 100 bij schaalversterking 16 x : v.p.v. = 0,7432°C.
Uitslag 0 : v.p.v. = 0,0000°C.
Gezien het lineaire verband (zie pag. 8) kunnen alle gevonden waarden omgerekend worden tot °C v.p.v.
Saliniteit en vriespuntsverlaging van zeewater zijn evenredig (Wolf, 1966).
Ter afsluiting nog enige betrekkingen tussen de v.p.v. enerzijds en de chloriniteit en de osmotische druk anderzijds.(Miyake, 1939).

a. voor zeewater: $\Delta = 0{,}102710 . Cl^-$
   waarbij : $S = 0{,}030 + 1{,}8050 . Cl^-$

b. verband tussen osmotische druk en chloriniteit:

$$\pi_t = 1{,}240 . Cl^- + 0{,}00454 . Cl^- . t$$

In deze formule is:

Π_t de osmostische druk bij temperatuur t in atmosfeer.
t de temperatuur in ^{o}C.
Cl^- de chloriniteit in $^{o}/oo$.
Uit a en b volgt nog de volgende betrekking:
$\Pi_t = (12,0728 + 0,044202.t).\Delta$
Geconcludeerd kan worden, dat de vriespuntsverlaging slechts een functie van de osmotische concentratie is, terwijl de osmotische druk een functie van èn de osmotische concentratie èn de temperatuur is.

4. Geleidbaarheidsmetingen

Theoretische beschouwing: (Verbrugh, 1962)

Het geleidingsvermogen van een oplossing is de reciproke waarde van de electrische weerstand en wordt gemeten in ohm^{-1}.
Het geleidingsvermogen van een oplossing in reciproke ohm's is in getalwaarde gelijk aan de stroomsterkte (in ampères), die door de oplossing gaat bij een werkelijke spanning van 1 volt tussen de electroden.
Het specifieke geleidingsvermogen, K, van een electrolytoplossing is het geleidingsvermogen van die oplossing bij gebruik van twee electroden, die elk de eenheid van oppervlakte ($1\ m^2$) bezitten en die op een afstand van 1 m van elkaar zijn opgesteld.
Des te beter bij gelijkblijvende concentratie de ionisatie is, des te groter is het geleidingsvermogen (hetgeen dus volledig afhankelijk is van de electrolyten aanwezig in de oplossing).

Metingen van de geleidbaarheid

In principe wordt het geleidbaarheidsvat, gevuld met de te meten oplossing, als onbekende weerstand opgenomen in een schakeling volgens Wheatstone.
Voor de berekening van de geleidbaarheid K, in feite dus de reciproke waarde van de weerstand van het meetvat, is het een vereiste, dat bekend zijn:
a. de oppervlakte van de electroden (m^2)
b. de afstand tussen de electroden (m)
In plaats van deze waarden wordt meestal gegeven de constante van het meetvat (cm^{-1}).
In aansluiting kunnen twee opmerkingen gemaakt worden:
a. men gebruikt wisselstroom en géén gelijkstroom om electrolyse te voorkomen.
b. de mate van verdunning van de oplossing kan van invloed zijn op het specifieke geleidingsvermogen. Een betere splitsing van de beschikbare moleculen bij grotere verdunning kan aldus een relatief grotere K ten gevolge hebben.

Omdat de geleidbaarheid sterk temperatuur-afhankelijk is, moet steeds gewerkt worden bij dezelfde temperatuur, in dit geval 20°C. in stand gehouden met behulp van een waterbad met thermostaat, verwarming en aansluiting op een koelaggregaat, waarbij temperatuurschommelingen kleiner dan 0,01°C. mogelijk zijn.

De geleidbaarheid wordt gemeten met behulp van een Philips Laboratory Conductivity Meter P.W. 9501/01, met gebruikmaking van een meetcel, Philips P.W. 9513, celconstante 1,4 cm^{-1}.

Aflezing van de geleidbaarheid geschiedt op een digitale voltmeter (Schneider Electronique digitest 500).

Voor de ijking wordt gebruik gemaakt van standaard zeewater met een chloriniteit van 19,380 °/oo.

Omdat een uit een strandkrab verkregen bloedmonster voor meerdere metingen gebruikt moet worden, is het noodzakelijk om het monster, dat gebruikt wordt voor de geleidbaarheidsmetingen, te verdunnen.

Met behulp van een ijklijn gebaseerd op verdunningen van standaard zeewater wordt gecontroleerd of er in het gebruikte concentratie-gebied een lineair verband bestaat tussen de verschillende aldaar te meten geleidbaarheden.

Dit lineaire verband is afhankelijk van de dissociatiegraad van de in de oplossing aanwezige electrolyten.

De dissociatiegraad is op zijn beurt afhankelijk van de concentratie van deze electrolyten.

Voor opstelling van de genoemde ijklijn zijn de volgende verdunningen van standaard zeewater (met gedestilleerd water) gebruikt: 1/11, 1/21, 15/515 en 1/51.

De gemeten K-waarden worden uitgezet tegen de bijbehorende saliniteiten, waarbij uit de aldus verkregen grafiek blijkt, dat het verloop lineair is.

Dat wil zeggen, dat mits een overeenkomstig verdunningstraject wordt genomen, uit deze ijklijn via de gemeten K-waarden bijbehorende saliniteits-waarden verkregen kunnen worden.

Uit deze waarden kunnen de corresponderende v.p.v.-waarden voor het onverdunde bloedmonster verkregen worden via de betrekking:

$y/35 \times 1{,}99 \times (\text{verdunning})^{-1}$, waarin

y de uit de ijklijn gevonden saliniteit

1,99 de v.p.v. van standaard zeewater (35 °/oo)

De te meten bloedmonsters zijn als volgt verdund: 300 µl monster + 3 ml. aqua destillata, hetgeen dus een verdunning van 1/11 van de ware concentratie betekent.

Verdunning van de monsters geschiedt met behulp van een Eppendorf-pipet (100 µl) en een dispenser gevuld met aqua bidestillata (3 ml). De aldus verkregen verdunningen worden tijdig voor het meten in het waterbad geplaatst (temperatuur 20°C).
Elke meting wordt voorafgegaan door het goed drogen van de buitenzijde van de meetcel met behulp van tissues, plus het opzuigen van een deel van het monster, teneinde het meetvat aan de binnenzijde te spoelen. Door dit spoelen en door konsekwent van een lagere naar een steeds hogere concentratie te werken wordt verontreiniging van het te meten monster met vloeistof van een afwijkende concentratie tot een minimum beperkt. Deze methode verdient de voorkeur boven het steeds tussen elke meting spoelen met aqua destillata. Elk monster werd in duplo gemeten, afwijkingen waren zeergering.

5. Chloride bepalingen

Chloride bepalingen worden uitgevoerd met behulp van een Marius-Micro-Chloro-Counter.
Deze Chloro-Counter heeft o.a. een electrodenblok met twee generator-electroden en twee detectieelectroden, allen van zilver. Het meetvat kan aan dit electrodenblok vastgeklemd worden, zodanig dat de electroden zich in de te meten vloeistof bevinden. Verder is op de Counter een roermechanisme, een teller met nulinstelling en een bereikschakelaar (1 µ aeq. = 1000 counts, of 1 µ g. = 10 counts) aanwezig.
De chloride aanwezig in het meetvat wordt getitreerd met behulp van de zilverionen, die electrochemisch uit de zilveranode worden gegenereerd door toepassing van een blokspanning. De lading van de stroompuls toegevoerd aan de generatorelectrode is constant binnen het gekozen gevoeligheidsbereik.
Elke puls maakt uit de electrode eenzelfde hoeveelheid Ag^+ vrij, die zich als volgt kan binden: $Ag^+ + Cl^- \longrightarrow AgCl \downarrow$.
Is deze titratie afgelopen, dan wordt de kleine overmaat Ag^+-ionen gedetecteerd, namelijk door depolarisatie van de detectie-electroden, waardoor de titratie beeindigd wordt. Een eindpuntsantecipatie is ingebouwd, waardoor vlak voor het eindpunt van de titratie de titratiesnelheid verlaagd wordt ter verhoging van de nauwkeurigheid.
Het aantal door de teller geregistreerde pulsen is een directe maat voor de aanwezige hoeveelheid chloride.
Voor het uitvoeren van de titratie zijn de volgende oplossingen nodig:
a. een basisoplossing: 10 % azijnzuur met 0,1 n salpeterzuur.

b. een gelatineoplossing: bevattend per 100 ml 600 mg gelatine, 10 mg thymol (tegen schimmelvorming) en 10 mg thymol-blauw (pH-indicator).

c. standaardoplossing: 100 mg aeq. Cl^-/l; 2922 mg NaCl p.a. opgelost in aqua destillata in een 500 ml maatkolf, aangevuld tot de streep.

Van belang is, dat de electroden, die bestaan uit 1 mm dik fijn zilverdraad, bij voorkeur gehard, blanke uiteinden hebben. Verder moeten ze over een constante lengte in het meetvat (dus te meten vloeistof) steken.

Voor uitvoering van de metingen wordt het meetvat gevuld met 6 ml basisoplossing en 0,5 ml gelatineoplossing. In een zuur milieu geeft het methyl-blauw een rode kleur aan de vloeistof. Alle Cl^- wordt er uit getitreerd, waarna 10 µl standaardoplossing wordt toegevoegd en getitreerd om het juiste aantal counts/µ aeq. Cl^- te bepalen (plm. 1000). Dit moet minimaal in triplo gedaan worden om een nauwkeurige waarde te verkrijgen.

Van de te meten monsters wordt eveneens steeds 10 µl met behulp van een Eppendorf-pipet aan de inhoud van het meetvat toegevoegd, waarbij de nauwkeurigheid van het pipetteren essentieel is.

Wanneer de kleur van de vloeistof in het meetvat omslaat naar blauw (d.w.z. uitputting van de basisoplossing), moet nieuwe basisvloeistof genomen worden.

Bepaling van het chloride-gehalte:

De chloriniteit kan bepaald worden met de volgende betrekking:
aantal pulsen in onbekende oplossing/aantal pulsen in standaard oplossing, vermenigvuldigd met 100 (eenheid $mE.l^{-1}$).

Enige belangrijke punten, die van invloed zijn op het resultaat:

a. Het gevormde AgCl slaat wit neer, maar kan onder invloed van het licht weer ontleden, hetgeen bij een erop volgende meting een aanzienlijke meetfout kan opleveren. Snel achtereen werken èn direct (zon)licht vermijden is dus van belang.
Het afwisselend werken met twee meetvaatjes is om bovenstaande reden dus af te raden.

b. Fouten en afwijkingen in en van de meetresultaten zullen vooral liggen aan de pipetteertechniek, waarbij ook de bloedstolling storend kan werken.

c. Tijdens het aanbrengen van het monster tegen de wand van het meetvat treedt ogenblikkelijk neerslag van eiwitten op. Dit is niet van invloed op de metingen, mits het geschiedt onder het vloeistofniveau (uitgaande van een meetvat in horizontale stand).

6. Bepaling van de urineproductie

In het verleden zijn diverse methoden gebruikt ter bepaling van de urineproductie van Crustacea (o.a. Nagel, 1934; Webb, 1940; Parry, 1955; Shaw, 1961).

De hier gebruikte methode (Spaargaren, 1971) gaat uit van het principe, dat een dier via opname en excretie van water en electrolyten de samenstelling van het medium, waarin het dier zich bevindt, beïnvloedt.

Deze veranderingen kunnen, mits het mediumvolume voldoende beperkt wordt en mits de apparatuur voldoende gevoelig is, geregistreerd worden via een continu aflezing van de geleidbaarheid van het medium.

Figuur 1 geeft de gebruikte opstelling schematisch weer.

Een meetvat (1) bevindt zich in een getermostreerd waterbad (2), waarvan de temperatuurschommelingen geringer zijn dan 0,01°C.

Links boven op figuur 1 wordt dit in meer detail weergegeven:

Het kunststof meetvat (a), waarin het proefdier wordt ondergebracht, vormt samen met de meetcel (b) (Philips P.W. 9513) en een kunststof buisje (c) een gesloten systeem, waarbinnen via luchtvoorziening uit een lange injectienaald, die geplaatst wordt in c, een vloeistofcirculatie teweeg gebracht wordt.

Vooral bij de proeven uitgevoerd bij 5°C is het van belang, dat de bovenzijde van het waterbad zoveel mogelijk wordt afgedekt met temperatuur-isolerend materiaal.

Luchtvoorziening geschiedt uit het persluchtsysteem van het laboratorium; verzadiging met waterdamp van deze lucht wordt verkregen via doorvoering van deze lucht door twee gas-was-flessen gevuld met aqua destillata (3).

De meetcel wordt aangesloten op een geleidbaarheidmeter (4) (Philips Laboratory Conductivity Meter P.W. 9501/01). waarop tevens aangesloten zijn een referentie-weerstand (5) en een referentie-capaciteit (6).

Hierdoor is het mogelijk om over een zeer klein geleidbaarheidstraject zeer nauwkeurige geleidbaarheidsmetingen te verrichten (de volle schaaluitslag komt overeen met een 2% verandering van de geleidbaarheid).

De recorder-uitgang van de meter wordt verbonden met een twaalfpunts recorder (7) (Philips PR 3500), waarop tevens de in het waterbad heersende temperatuur wordt geregistreerd.

Veranderingen in de geleidbaarheid, te meten in het meetvat, kunnen ingedeeld worden in twee soorten:

a. de veranderingen, die geleidelijk optreden, b.v. tengevolge van de uitwisseling van electrolyten.

b. de veranderingen, die abrupt optreden tengevolge van de afgifte van urine.

<u>De betrekking tussen de recorder-uitslag en de ermee corresponderende hoeveelheid afgegeven urine (Spaargaren, 1971)</u>

Uitgegaan wordt van b ml medium met een bekende saliniteit S ‰ (C_o /umol NaCl equiv.) en temperatuur t°C.

Bij urinelozing voegt een krab hieraan toe x ml urine met een concentratie van y /umol NaCl equiv.

De door de aan het medium toegevoegde urine veroorzaakte concentratie-verandering is:

$$dC = \frac{b.C_o + x.y}{b + x} - C_o \text{ of } dC = \frac{y - C_o}{\frac{b}{x} + 1} \qquad (1)$$

Binnen bepaalde concentratiegrenzen bestaat het volgende verband tussen geleidbaarheid en concentratie:

$$d\mathcal{K}^t = K_{t,C}.dC \qquad (2)$$

M.a.w. de factor $K_{t,C}$ geeft aan de verandering in geleidbaarheid, die optreedt bij een bepaalde concentratieverandering. Bij de uitgevoerde experimenten varieerde $K_{t,C}$ tussen 0,0532 en 0,0915.

De volledige schaalbreedte van de recorder is 250 mm; via een bepaalde gevoeligheidsinstelling van de recorder komt dit overeen met een 2% verandering in geleidbaarheid.

Wordt de uitslag op de recorderschaal ΔU genoemd, dan volgt de betrekking:

$$U = \frac{250.d\mathcal{K}^t}{0,02.\mathcal{K}^t_o} \qquad (3)$$

Door combinatie van (1), (2) en (3) wordt verkregen:

$$\Delta U = 250K_{t,C} \frac{y - C_o}{\frac{b}{x} + 1} (0,02\mathcal{K}^t_o)^{-1} \qquad (4)$$

Waarin:

ΔU	schaaluitslag	mm
$K_{t,C}$	factor voor gevoeligheid van de meter bij verandering in de concentratie.	$m\Omega^{-1}.cm^{-1}$ per /umol NaCl/ml
Y	urine-concentratie	/umol NaCl/ml
C_o	concentratie medium bij aanvang	/umol NaCl/ml
b	volume van het medium	ml
x	urine-volume (de onbekende)	ml

κ_o^t geleidbaarheid van de te meten vloeistof bij t^oC bij aanvang. $m\Omega^{-1}.cm^{-1}$

Hiervan is de factor $K_{t,C}$ bepaald aan de hand van Bruns (1962) en Wolf (1966), C_o bepaald aan de hand van Wolf (1966) en b berekend uit de inhoud van het meetvat en de inhoud van het proefdier (gewichtbepaling).

Verder kan κ_o^t bepaald worden en wordt ter bepaling van y aangenomen, dat de urine isosmotisch met het bloed is.

Δ U tenslotte kan opgemeten worden in de registratie van de geleidbaarheid.

Voor de urine-productie-proeven zijn krabben gebruikt, die op overeenkomstige wijze als proefdieren, die gebruikt zijn ter opstelling van de regulatiecurven, geadapteerd zijn aan een bepaalde saliniteit en temperatuur.

Als medium-vloeistof wordt steeds gebruikt het water uit het aquarium, waaruit het proefdier afkomstig is; hiervan wordt de vriespuntsverlaging of de geleidbaarheid bepaald.

Na afloop van de proefneming, maximale duur enkele etmalen bij een temperatuur van 5^oC, wordt de krab gewogen, na met behulp van tissues uitwendig zorgvuldig afgedroogd te zijn.

Voor uitvoering van de urine-productie-proef bij 5^oC werd de gehele opstelling verplaatst naar een klimaat-kamer, waar een temperatuur van $5\text{-}7^oC$ gehandhaafd kon worden.

7. Urinevorming bij Crustacea

Bij Crustacea, waarvan de osmotische haemolymhe concentratie hypertonisch is ten opzichte van het medium zal door osmose wateropname uit het medium plaats vinden.

Goed werkende excretie-organen zijn dan ook van groot belang. Excretie-organen, de zogenaamde antenne-klieren, bestaan uit de volgende componenten (Potts en Parry, 1964).

Interne eindzak, tubulus excretorius, of labyrinth en ductus, soms vergroot tot een blaas.

De uitmonding van de ductus zit aan de basis van de antennae, dus rostraal.

Via een arteriele bloedstroom wordt in een coeloomholte (de eindzak) een ultrafiltraat gevormd, dat qua electrolyt-compositie ongeveer overeenkomt met de haemolymhe met dien verstande, dat de in de haemolymhe aan proteinen gebonden ionen niet aanwezig zijn in het ultrafiltraat.

In het labyrinth bestaat de mogelijkheid tot verandering van samenstelling van de urine-vloeistof, die er doorheen wordt gevoerd.
De urine van Crustacea is over het algemeen isotonisch met de haemolymhe; hierop zijn enige uitzonderingen te vinden onder zoetwater bewonende Crustacea, zoals Astacus.
In verband hiermee kan gesteld worden, dat vorming van een hypoosmotische urine voordelig zou zijn voor brak- en vooral zoetwater Crustacea.
De ionen-samenstelling van de urine kan echter wel afwijken van die van de haemolymhe.

IV. Resultaten en discussie

1. Regulatie-curven

In figuur 2 worden weergegeven bij twee temperaturen, 4 en 20°C:

a. De relatie tussen de osmotische concentratie van de haemolymhe en de saliniteit van het medium. (Δ_i).
b. De relatie tussen de geleidbaarheid van de haemolymhe en de saliniteit van het medium. (K_i).
c. De relatie tussen de chloriniteit van de haemolymhe en de saliniteit van het medium. (Cl_i^-).

De waarden, waardoor de krommen zijn getekend, geven aan de gemiddelden, verkregen uit de waarden van vijf tot zeven proefdieren per saliniteit.
Voor elke saliniteit is berekend het gemiddelde plus of min de standaard deviatie (s.d.), maar in verband met de duidelijkheid van de figuur zijn deze s.d.'s niet aangegeven. Gedeeltelijke overlap van de s.d.'s behorend bij de gemiddelden voor een bepaalde saliniteit bij twee temperaturen treedt hoofdzakelijk op buiten het regulatieplateau.
Algemeen gesproken vertonen de curven a, b en c een overeenkomst in vorm:
Binnen saliniteitsgrenzen van ongeveer 18 en 32‰S bevindt zich een gebied van duidelijke regulatie, daarbuiten worden twee gebieden met zekere mate van conformiteit aangetroffen.
Bij vergelijking van beide temperaturen valt op dat er een negatief verband bestaat tussen de grootheden Δ_i, K_i en Cl_i^- enerzijds en de temperatuur anderzijds en wel vooral bij de saliniteiten in het gebied van het regulatieplateau.

Aannemende, dat de regulatie maximaal is, als de helling van de regulatie-kromme minimaal is, dan blijkt, dat deze zogenaamde regulatiecapaciteit bij 4°C geringer is dan bij 20°C en dat het gebied van maximale regulatie bij hoge temperaturen naar een lager saliniteitsgebied verschuift.

Nadere beschouwing van de diverse curven.

Δ_i. Het regulatieplateau bij 20°C is gelegen tussen 18 en 29 °/oo S; bij 4°C is het minder duidelijk, de bovenste grens is verschoven naar ongeveer 33 °/oo S. Bij hogere saliniteiten dan de genoemde bovengrenzen is sprake van conformiteit, de krommen lopen nagenoeg samen met de isoosmotische lijn. Bij saliniteiten gelegen beneden het regulatiegebied kan gesproken worden van een gebied met beperkte regulatie.

K_i. De electrolyten dragen in belangrijke mate bij aan de totale osmotische concentratie van het bloed, er is een sterke overeenkomst in curve-vorm tussen Δ_i en K_i.

De grenzen van duidelijke regulatie, hoewel moeilijk vast te stellen op een bepaalde saliniteit, vallen ongeveer samen met de waarden zoals genoemd onder Δ_i.

Ook hier is de regulatie-capaciteit bij 4°C minder dan bij 20°C, terwijl bovendien weer bij saliniteiten boven en beneden de saliniteiten behorende bij het regulatiegebied sprake is van conformiteit resp. beperkte regulatie.

Cl_i^-. Chloride is een belangrijke component van zeewater èn van de haemolymhe van Crustacea. Ook de chloride-curven vertonen een regulatiegebied, de grenzen komen ongeveer overeen met die van de voorgaande curven (Δ_i en K_i).

De rechte getrokken door de Cl_i^--curven is de isosmotische lijn gebaseerd op de Cl_i^--gehaltes in zeewater en verdunningen daarvan.

Uit de hier boven beschreven curven zijn de volgende betrekkingen af te leiden: (1) het aandeel van de non-electrolyten in de osmotische concentratie van het bloed bij 4 en 20°C, afgebeeld in figuur 3a. Voor beide temperaturen vallen de minima binnen het regulatiegebied, voor 4°C bij een iets hogere saliniteit dan voor 20°C. In het regulatie-gebied vallen beide curven nagenoeg samen, daarbuiten komt een temperatuur effect duidelijker naar voren.

(2) het aandeel van electrolyten, anders dan Cl^- (figuur 3a). Beide curven lopen nagenoeg samen. Uit de figuur blijkt een evenredige toename bij oplopen van de saliniteit van het medium, en (3) het temperatuur-effect op Δ_i, K_i, Cl_i^- en Δ_i n.e. (figuur 3b).

In deze figuur staat tegen de saliniteit met het medium uitgezet Δ_i (lage temp.) - Δ_i (hoge temp.) (resp. K_i, etc.). Alle vier curven vertonen een overeenkomstig georienteerd maximum, gelegen namelijk bij plm. 26 °/oo S., echter het opvallende van de figuur is hierin gelegen, dat bij Δ_i n.e. een evenredige relatie bestaat tussen saliniteit en temperatuur en géén negatief verband.

2. Correlatie met het milieu

De gebruikte proefdieren zijn afkomstig uit de Waddenzee; vangplaats Texelstroom/Marsdiep.

Figuur 4 geeft de volgende abiotische factoren van dit gebied: (a) het jaarlijkse temperatuurverloop en (b) het jaarlijkse saliniteitsverloop, verkregen aan de hand van gegevens van het N.I.O.Z. (physische en chemische hydrografie, mondelinge informatie) uit de jaren 1960-1969, gemeten aan de Z.O. dijk van het eiland ter hoogte van het experimenteerquarium. De temperatuurcurve, een gemiddelde curve samengesteld uit de jaarlijkse curven gebaseerd op de maandgemiddelden, vertoont een winter minimum van 3°C, hetgeen impliceert, dat lagere temperaturen (1 à 2°C) voor kunnen komen en een zomermaximum van 17°C, hetgeen impliceert, dat temperaturen van ongeveer 20°C gedurende enige dagen per jaar normaal kunnen zijn. Voor het opstellen van de saliniteitscurven over dezelfde periode is steeds uitgegaan van een maandelijks maximum, minimum en gemiddelde, waarbij de curven dan weer steeds de gemiddelden over de tien genoemde jaren weergeven. De maxima liggen rond 30-31,5 °/oo, de minima rond 22-27 °/oo (en vertonen dus een veel sterkere variatie), terwijl de gemiddelde saliniteiten rond 27-29,5 °/oo S liggen. Van veel groter belang voor een in een dergelijk milieu levend dier is echter, hoe snel veranderingen kunnen optreden in deze grootheden. Watertemperaturen veranderen uiteraard slechts langzaam, aanzienlijke saliniteitsveranderingen kunnen echter zeer snel optreden, zoals in extrema wordt getoond in geval van de N.I.O.Z.-haven op Texel, waar mede door de bijzondere structuur van de haven veranderingen van 5 °/oo of meer binnen 15 minuten kunnen optreden (Van Bennekom, 1972, pers. informatie).

Bovenstaande abiotische factoren moeten in gedachte gehouden worden, wanneer gekeken wordt naar het migratie-patroon van Carcinus maenas (Broekhuysen jr., 1937).

In het najaar en het begin van de winter migreert C. maenas naar de diepere geulen van de Waddenzee en de grensgebieden van Wadden- en Noordzee. C. maenas bevindt zich dan in gebieden met hogere (én stabielere) saliniteit (max. plm. 33 °/oo S) en stabielere temperatuur (4-5°C).

In het voorjaar migreert C. maenas weer tot diep in de Waddenzee.

Vergelijken we het bovenstaande met de gegevens in figuur 2 (het verband tussen Δ_i, resp. K_i, resp. Cl_i^- en de saliniteit) dan blijkt, dat C. maenas zich 's winters bevindt in gebieden met een saliniteitstraject, waarbij hij min of meer conform is. Tijdens de rest van het jaar bevindt C. maenas zich in omstandigheden, waarbij hij zal reguleren.

In gebieden, die verder de Waddenzee in gelegen zijn dan de Texelstroom/Marsdiep zal de saliniteit overwegend lager zijn met het gevolg, dat de zich aldaar ophoudende strandkrabben zich centraler "op het regulatieplateau" zullen bevinden. Een sterke seizoengekoppelde migratie zou een regulatiegebied bij lage temperatuur nagenoeg overbodig maken. Dat de regulatiecurve, zoals bij deze studie voor 4°C verkregen toch een, zij het minder duidelijk dan bij 20°C, regulatie-plateau vertoont is als het ware een afspiegeling van het feit, dat er geen sprake is van een volledige seizoens gekoppelde migratie, maar dat eerder gesproken kan worden van een najaarsmigratie in de richting van gebieden met stabielere temperatuur- en saliniteitsomstandigheden en een tegengestelde migratie in het voorjaar, daarbij in het midden latend in hoeverre deze trek volledig of gedeeltelijk uitgevoerd wordt.

Vroeger werd C. maenas aangetroffen in Nederland tot in gebieden met een zeer lage saliniteit (Zuiderzee, 4-7 °/oo als laagste saliniteitswaarden) (Broekhuysen jr., 1937).

Vergelijking met de regulatiecurve van 20°C toont, dat dan sprake geweest zal zijn van beperkte regulatie/conformiteit. De osmoregulatiecurve is dus als het ware opgebouwd uit drie gedeelten:

Een centraal gedeelte met osmoregulatie met als eventueel voordeel een relatief constante bloedosmolariteit en twee randgebieden met conformiteit, resp. beperkte conformiteit met als eventueel voordeel bij de betreffende zoutgehaltes het handhaven van een relatief constante osmotische gradient over de lichaamswand.

Bovenstaande toont overeenkomstig Crangon crangon aan, dat bij de zouthuishouding van beide systemen (regulatie en conformiteit) gebruik gemaakt wordt. (Weber en Spaargaren, 1970)

3. Fysiologische rasverschillen

In figuur 5 zijn de hier verkregen resultaten vergeleken met literatuurgegevens omtrent de osmoregulatie van C. maenas. Figuur 5a geeft weer de geleidbaarheden K_i bij 4 en 20°C van deze studie plus de gegevens van Flügel (1963) bij 5 en 15°C, uitgezet tegen de saliniteit, terwijl figuur 5b de osmotische concentraties Δ_i bij 4 en 20°C van deze studie, bij 16,5°C van Theede (1969) en bij een onbekende temperatuur van Schlieper (1929) vertoont.

De resultaten van Theede tonen, dat beneden 20 °/oo S C. maenas uit de Oostzee (gemiddelde saliniteit plm. 15 °/oo) sterker hypertonisch is dan C. maenas uit de Noordzee (Helgoland, gemiddelde saliniteit ongeveer 32 °/oo), wat dus een sterkere mate van regulatie betekent bij deze zoutgehaltes.

Bovendien is het regulatie-plateau van de Oostzeedieren veel duidelijker en strekt het zich uit over een breder en overwegend lager saliniteitstraject (12-25 °/oo, resp. 20-28 °/oo).

Vergelijking met Flügel (1963) van de electrolytconcentratie in het bloed (fig. 5a) toont in overeenkomst hiermee een sterkere hypertoniciteit voor de dieren, die Flügel gebruikte (Oostzeekrabben!) bij een saliniteit beneden plm. 28 °/oo. Vergelijking met Theede (1969) van de vriespuntsverlagingen van het bloed (fig. 5b) toont, dat bij saliniteiten beneden ongeveer 18 °/oo de "Oostzeedieren" sterker hypertonisch zijn dan de "Waddenzeedieren" en dat bij saliniteiten beneden ongeveer 23 °/oo de "Helgolanddieren" minder sterk hypertonisch zijn dan de "Waddenzeedieren".

Bovenstaande vergelijking wordt enigszins bemoeilijkt door het verschil in medium-temperatuur tijdens de proeven (16,5, resp. 4 en 20°C).

Verder onderzoek van Theede, 1969 uitgevoerd met C. maenas uit Noordzee en Oostzee duidt op een aanwezigheid van fysiologische verschillen tussen populaties uit beide zeeën. Overeenkomstige fysiologische verschillen zijn vermeld voor Crangon crangon (Weber en Spaargaren, 1970).

Dat dergelijke fysiologische verschillen zich verder kunnen uitstrekken dan over het gebied van de osmoregulatie, volgt uit hetgeen Broekhuysen jr. (1937) zegt over de eiontwikkeling van C. maenas in verband met de seizoensmigratie.
Uit berekeningen van gegevens (en helaas niet uit directe proeven bij 4°C) volgt, dat eieren voor een goede ontwikkeling in het betreffende stadium (dec., jan., febr.) bij 4°C een zoutgehalte van minimaal 32 °/oo nodig hebben. Voor de erop volgende ontwikkelingsperiode van de eieren (voorjaar) kan de saliniteit lagere waarden aannemen.
Een ander aspect, dat uit het werk van Theede (1969) naar voren komt is, dat C. maenas enige mate van "long term" acclimatisatie kan vertonen. Theede toonde dit aan met Oostzeekrabben, die gedurende drie weken in Noordzee-, is Helgolandwater werden gehouden en vervolgens werden verplaatst naar een zeewaterverdunning van 5,8 °/oo S. Daar vertoonden ze weliswaar nog een duidelijk hogere osmotische waarde dan de Noordzeedieren, maar een enigszins geringere waarde dan de Oostzeedieren, die gedurende de drie weken gehouden waren bij 15 °/oo S. Dit toont tevens het gevaar van het te lang houden van C. maenas in aquaria met een bepaalde, lage saliniteit.
Ook Shaw (1955) duidt op het mogelijke bestaan van verschillende rassen, dit wordt gebaseerd op vertoonde verschillen in bloedsamenstelling.
Binnen één ras kan de spreiding in de onderzochte grootheden deels verklaard worden uit verschillen tussen sexen en grootte der dieren (Gilbert, 1959).

Het is aantrekkelijk om de osmoregulatie-curven van C. maenas uit het Texel-gebied te vergelijken met die van C. crangon uit hetzelfde gebied (Spaargaren, 1969 en Weber en Spaargaren, 1970). Immers beide diersoorten komen in hetzelfde gebied voor en vertonen een overeenkomstig seizoengekoppeld migratiepatroon. Er zijn echter twee duidelijke verschillen, namelijk:

a. C. maenas is of hyper- of isotonisch met het medium, terwijl C. crangon beneden een bepaalde saliniteit hyper-, maar daarboven hypotonisch is.

b. anders dan van C. crangon vertonen de regulatiekrommen van C. maenas bij verschillende temperaturen over het gehele (hypertonische) traject een omgekeerde relatie tussen temperatuur en osmotische concentratie van het bloed.
In deze verschilt C. maenas van het Texelgebied niet van C. maenas uit de Oostzee, echter ook C. crangon uit de Oostzee vertoont, tenminste in het hypertonische gebied, een dergelijk beeld, d.w.z. géén crossing-over van de verschillende temperatuur-curven (Flügel, 1960, 1963).
Uit de discussie over het adaptieve karakter van het temperatuureffect bij C. crangon (Weber en Spaargaren, 1970) blijkt wel dat ook verschillen in temperatuurregimes van invloed kunnen zijn op het bestaan van verschillende populaties van in dit geval C. maenas.

4. Meta-bolisme en energievoorziening.
Omdat de haemolymphe van C. maenas bij de meeste zoutgehaltes sterk hypertonisch t.o.v. het medium is, heeft dit consequenties voor de energievoorziening voor de osmoregulatie. Hypertoniciteit heeft ten gevolge een osmotische opname van water, hetgeen impliceert, dat uitscheiding van water nodig is om de inwendige concentratie op peil te houden.
Voor handhaving van de meta-bolische functies is een bepaalde minimale osmotische druk van het bloed noodzakelijk; deze minimaal noodzakelijke druk zou lager zijn bij stijging van temperatuur (Pannikar, 1940).
Osmotische wateropname is uiteraard afhankelijk van de permeabiliteit van de betreffende Crustacea.
Bij temperatuurstijging zal de diffusie-coëfficient stijgen, hetgeen een grotere osmotische wateropname met zich mee zal brengen, waardoor meer energie besteed zal moeten worden aan de osmoregulatie.
Met andere woorden een daling van de osmotische concentratie van het bloed bij een temperatuurstijging zal energiebesparend zijn.
Ongetwijfeld zullen bij de evolutie van de osmoregulatie het voorgaande en de noodzaak van een minimale osmotische concentratie om de levensfuncties te handhaven een rol gespeeld hebben.
De osmotische concentratie en in mindere mate de temperatuur bepalen de osmotische druk via de volgende relatie:

$P = 1{,}240\ Cl^- + 0{,}00454\ Cl^- t$ (Miyake, 1939), waarin Cl^-, de chloriniteit uitgedrukt in °/oo t, de temperatuur uitgedrukt in °C, en P, de osmotische druk uitgedrukt in atmosfeer.
Aan de hand van deze relatie en de gegevens van Broekema (1941) verkregen van C. crangon vond Verwey (1957) aanwijzingen om de volgende hypothese te postuleren.
Bij daling van de medium-temperatuur in het najaar zal de inwendige osmotische concentratie stijgen met als gevolg een ongeveer gelijkblijven van de inwendige osmotische druk P_i. Echter de externe osmotische druk P_e zal dalen ten gevolge van de temperatuurdaling van het medium, hetgeen een toename van het verschil in osmotische druk van bloed en medium met zich mee zal brengen. Migratie naar gebieden met een hogere saliniteit zal een groter worden van dit verschil tegen gaan.
Met behulp van de gegevens van Broekema vond Verwey de volgende waarden voor het genoemde osmotische drukverschil:
3,99 atm. voor 4°C en 33 °/oo S en 4,00 atm. voor 22°C en 28,5 °/oo S.
De gebruikte saliniteiten 33 en 28,5 °/oo waren optima verkregen door Broekema via overleveringsexperimenten.
Spaargaren (1969) gebruikte dezelfde saliniteiten voor overeenkomstige berekeningen met behulp van de door hem verkregen gegevens van C. crangon en verkreeg de volgende waarden:
2,70 atm. voor 4°C en 33 °/oo S en 1,30 atm. voor 22°C en 28,5 °/oo S.
Wordt dezelfde berekening uitgevoerd voor C. maenas met de gegevens van deze studie, dan krijgen we de volgende verschillen, uitgedrukt in atm.:
1,60 atm. voor 4°C en 33 °/oo S en 0,83 atm. voor 20°C en 28,5 °/oo S.
Bovenstaande gegevens roepen de volgende opmerkingen op:

a. In genoemd saliniteitsgebied is C. maenas hypertonisch en C. crangon hypotonisch, hetgeen inhoudt, dat bij C. maenas P_i groter is dan P_e en bij C. crangon P_e groter dan P_i.
b. Men kan zich afvragen, wat de saliniteitsoptima zijn voor de dieren. De bij de berekeningen gebruikte saliniteiten vallen buiten de trajecten met maximale regulatie. Maar moet het regulatieplateau van de curven overeenkomen met de qua salini-

teit en temperatuur optimale omstandigheden? Afgaande op de overlevingsexperimenten van Broekema en Caudri (1937) blijkbaar niet, volgens Todd (1963) wel.

Verwey's hypothese wordt dus niet ondersteund door de latere gegevens van C. crangon en uit deze studie. Een seizoengekoppelde migratie (hoe beperkt eventueel) zal echter bij genoemde saliniteiten toch een factor zijn, die er voor zorgt, dat het genoemde osmotische drukverschil geen grote waarden zal aannemen. Echter, zoals we later zullen zien (p. 32; fig. 11), bij lagere saliniteiten kunnen aanzienlijk hogere waarden optreden voor het genoemde osmotische drukverschil.

Verder is het van belang de energie, nodig voor het handhaven van homeostasie te beschouwen. Bij te grote daling van de mediumsaliniteit zal hieraan te veel energie moeten worden besteed, het vóórkomen van een "break-down point", waar beneden min of meer conformiteit voorkomt.

Tot slot van dit gedeelte van de discussie zijn nog enkele opmerkingen omtrent figuur 3 noodzakelijk.

Deze figuur geeft o.a. (3a) het aandeel van de non-electrolyten in de opbouw van de osmotische waarde van de haemolymphe. Dit vertoont een minimum (bij beide temperaturen) bij plm. 26 °/oo S, d.w.z. in het regulatieplateau.

Bij lagere èn hogere saliniteiten neemt het aandeel van de non-electrolyten toe om bij die saliniteiten, waarbij de regulatiecurven overgaan van regulatie naar beperkte regulatie, c.q. conformiteit, weer af te nemen . (Een uitzondering hierop zijn de non-electrolyten bij 20°C bij hoge saliniteiten). Er is dus een correlatie te vinden tussen het bovenstaande en het al eerder genoemde break-down punt.

Figuur 3b (het temperatuur-effect op de diverse grootheden) toont in afwijking met de andere grootheden een positieve relatie tussen temperatuur en aandeel van de non-electrolyten. Een verklaring hiervoor zou gevonden kunnen worden in het feit, dat temperatuurverlaging de diffusie verlaagt, met het gevolg, dat per tijdseenheid minder deeltjes door de lichaamswand tussen intern en extern medium diffunderen. Met andere woorden het handhaven van

een gradient zal bij lage temperatuur minder energie vergen dan bij hoge temperatuur, hetgeen zich uit in een geringer aandeel van de non-electrolyten bij lage temperatuur in het tot stand komen van de vereiste osmotische concentratie. Dit effect zal sterker worden naarmate de gradient toeneemt.

5. De urineproductie van Carcinus maenas

Enige voorbeelden van registraties van de urine-productie van Carcinus maenas worden gegeven in figuur 6 (temp. 20°C) en figuur 7 (temp. 5°C).

In deze figuren loopt de tijdas verticaal, terwijl horizontaal de schaaluitslag van de recorder, een maat voor de geleidbaarheid van het medium, geregistreerd staat.

Een toename van de geleidbaarheid komt evereen met een schaaluitslag naar rechts.

Er is een vast patroon te zien een geleidelijk verloop, onderbroken door sprongsgewijze veranderingen van de geleidbaarheid. Deze abrupt optredende veranderingen zijn het gevolg van urineafgifte door het proefdier ze voltrekken zich binnen zeer korte tijd, iets wat af te leiden is uit het feit, dat de tijdsinterval tussen twee op elkaar volgende registratiepunten 80 seconden bedraagt.

In beide figuren zijn slechts registraties tot plm. 15 °/oo weergegeven; registraties bij hogere saliniteiten (tot plm. 26 °/oo S) zijn echter ook uitgevoerd.

Uit de figuren kunnen onder meer de volgende twee grootheden bepaald worden:

De frequentie van de urine-afgifte en de hoeveelheid per tijdseenheid afgegeven urine.

Figuur 8 geeft weer de frequentie van urine-afgifte; tegen de saliniteit van het medium staat uitgezet het uit de diverse waarnemingen berekende gemiddelde met de er bij behorende standaard deviatie.

Bij elk gemiddelde wordt met een getal aangegeven het aantal waarnemingen (= stappen van urine-afgifte) gebruikt bij de berekening van dat gemiddelde.

De frequentie van urine-afgifte is afhankelijk van zoutgehalte

en temperatuur (figuur 8). Toename van de medium-saliniteit heeft een afname van de frequentie van urine-afgifte ten gevolge, daarnaast is bij 20°C de frequentie hoger dan bij 5°C. Spaargaren (1971) vindt door Crangon crangon bij een bepaalde lage saliniteitswaarde een maximum om bij nog lagere saliniteiten weer geringere waarden voor de frequentie van urine-afgifte aan te treffen.
Dit in tegenstelling tot Parry (1955) bij Palaemonetes varians en Shaw (1961) bij Carcinus maenas, waar een overeenkomstig beeld als bij deze studie gevonden wordt.
Dit verschil zou zijn oorzaak kunnen hebben in het feit, dat bij dergelijke lage saliniteiten bij C. maenas en P. varians geen sprake is van volledige conformiteit, dit in tegenstelling tot C. crangon.
Zoals reeds gezegd daalt de frequentie van urine-afgifte bij toename van de medium-saliniteit waarschijnlijk zal de frequentie zeer geringe waarden bereiken bij saliniteiten boven 30 °/oo S, waar immers haemolymphe en extern medium nagenoeg isosmotisch zijn.
In figuur 8 vallen de hoge waarden op, die de standaard deviaties bij de 20°C gemiddelden aannemen, hetgeen contrasteert met de relatief geringe waarden van de standaard deviaties bij 5°C. Bovendien is het verloop van de gemiddelden bij toename van de medium-saliniteit bij 5°C veel vloeiender dan bij 20°C. Misschien speelt bij het bovenstaande een rol de geringere activiteit van het proefdier bij lage temperaturen.
In de literatuur wordt meestal gewerkt met de hoeveelheid urine, per tijdseenheid geproduceerd en uitgedrukt als percentage van het lichaamsgewicht.
Deze waarden zijn uitgezet in figuur 9.
Overeenkomstig het beeld van voorgaande figuur van frequentie urine-afgifte ook hier een afname vanaf een maximum bij de laagste gebruikte saliniteit tot een minimum bij de hoogste gebruikte saliniteit, met de volgende waarden:
Voor wat betreft 20°C bij 5 °/oo S: 24 % lichaamsgewicht per dag en bij 26 °/oo S: 10 % lichaamsgewicht per dag,
voor wat betreft 5°C bij 5 °/oo S: 11,5 % lichaamsgewicht per dag en bij 22 °/oo S: 4,5 % lichaamsgewicht per dag.

Ter vergelijking van deze waarden enige literatuur-gegevens:
Nagel (1934) vond via meting van de gewichtstoename na afsluiting van de excretieporiën (de temperatuur is onbekend) in 100 % zeewater een urine-productie van 10 % lichaamsgewicht per dag.
Verdere resultaten: 33 °/oo S: 11,2 % lich.gew./dag
17 °/oo S: 12,6 % lich.gew./dag
16 °/oo S: 17,0 % lich.gew./dag
Webb (1940) kwam via dezelfde methode (temperatuur eveneens onbekend) tot 4,7 % lichaamsgewicht per dag in 100 % zeewater.
Shaw (1961) berekende de urine-productie via de excretie van radioactief gemerkt sulfaat bij 16°C: 100-40 % zeewater: 4-32 % lichaamsgewicht per dag.
Bovendien rekende Shaw (1961) de oude gegevens van Webb (1940) om met behulp van zijn methode en verkreeg in 100 % zeewater een urine-productie van 2,4 % lichaamsgewicht per dag.
Bij vergelijking van dergelijke resultaten moet wel degelijk rekening gehouden worden met de gebruikte methode.
Parry (1955) bepaalde bij Palaemonetes varians via vier verschillende methoden de urine-productie als functie van de saliniteit van het medium. (P. varians vertoont een sterk regulerend vermogen met een isosmotisch punt bij plm. 20 °/oo S).
Parry bepaalde de urine-productie als volgt: (a) via de grootte van de epigastrische zak, (b) via de "clearance" van een kleurstof, (c) via gewichtsveranderingen na blokkeren van de excretieporiën en (d) via cannulatie van één van beide excretieporiën.
In het saliniteitsgebied van 50 tot 100 % zeewater geeft dit geen grote verschillen te zien, bij lage saliniteiten echter (plm. 10 % zeewater) zijn de verschillen aanzienlijk.
Methode (c) (blokkeren van de poriën) geeft de hoogste waarde (1,9 % van het lichaamsgewicht per uur), methode (a) (grootte van de epigastrische zak) geeft een waarde, die ongeveer 10 % lager ligt, methode (b) (kleurstof) geeft een ongeveer 25 % lager gelegen waarde, terwijl methode (d) (cannulatie) zeer sterk variërende waarden oplevert.
Uiteraard verdienen methoden, waarbij zo weinig mogelijk met de proefdieren wordt gemanipuleerd, de voorkeur.
De urine-productie is dus saliniteit en temperatuur afhankelijk.

De bij deze studie gevonden waarden voor de urine-productie zijn in het algemeen iets lager dan die van de op deze pagina genoemde literatuurstudies. Vergelijking met recentere gegevens volgt op pagina 29.(Fig. 10).

6. De plaats van de urineproductie in de osmoregulatie

In een brakwatermedium zal Carcinus maenas een bepaalde gradiënt onderhouden tussen intern en extern medium.

Dit osmotisch concentratieverschil zal een bepaalde mate van diffusie en osmotische waterverplaatsing met zich mee brengen, een uitwisseling, die sterk afhankelijk zal zijn van de permeabiliteit van het lichaamsoppervlak. Voor uitwisseling van water en ionen tussen uit- en inwendig milieu zullen vooral de kieuwen in aanmerking komen.

Bateman (1933), er vanuit gaande, dat de kieuwen de enige plaats van uitwisseling zijn, meent uit zijn proeven te moeten concluderen, dat de kieuwen van C. maenas nagenoeg geheel impermeabel zijn voor water, acetaat en glucose in verdunde oplossing, maar wel permeabel voor Na^+ en K^+.

Nagel (1934) kwam echter bij zijn proeven met C. maenas tot andere conclusies:

De kieuwen zijn permeabel voor water en zouten en wel in beide richtingen. Bovendien zijn de kieuwen van homoioosmotische krabben (o.a. dus C. maenas) minder doorlaatbaar voor water en zouten dan de kieuwen van poikiloosmotische krabben (Zie ook Potts en Parry, 1964).

Bovenstaande, samen met het feit, dat de kieuwen in staat zijn om zouten tegen een gradiënt in op te nemen, helpt mee om de gradiënt in stand te houden.

De excretieorganen van C. maenas produceren een urine, die isotonisch is met het bloed, echter de concentratie van bepaalde ionen kan aanzienlijk verschillen;zo wordt jodide in verhoogde concentratie uit het bloed gehaald en via de urine uitgescheiden. (Nagel, 1934).

Het gevolg is echter, dat via urineproductie en -excretie een continu zoutverlies optreedt en wel in toenemende mate bij daling van de medium-saliniteit.

Uit het werk van Nagel kan dus geconcludeerd worden, dat de excretie-

organen van C. maenas bepaald niet functioneren als osmoregulerende organen, afgezien van het feit, dat in het labyrinth bepaalde ionen weer selectief aan het bloed kunnen worden afgegeven of eruit opgenomen kunnen worden.
Shaw (1961) ondersteunt de resultaten van Nagel en stelt, dat in de osmoregulatie van C. maenas vooral 2 ionen van belang zijn, Na^+ en Cl^-.
Het Na^+-transport tussen in- en uitwendig medium kan bijvoorbeeld als volgt opgesplitst worden:

Na^+-opname : passieve component (diffusie)
actief transport-systeem

Na^+-verlies: passieve component (diffusie)
via de excretie-organen
mogelijkerwijs actieve Na^+-secretie

Uit metingen van de Na^+-outflux wordt geen aanwijzing gevonden voor een afname van de oppervlakte-permeabiliteit voor Na^+ in verdund zeewater. (Shaw, 1961).
Smith (1970) concludeert uit D_2O-influx metingen echter, dat C. maenas bij verschillende mediumsaliniteiten een variabele permeabiliteit voor water vertoont.
Een maximale permeabiliteit wordt gevonden bij 75% zeewater, terwijl de permeabiliteit lagere waarden vertoont bij 94% zeewater èn bij zeewaterverdunningen van minder dan 75%. (temperatuur 15-18°C).
Het hierboven gestelde is in contrast met hetgeen Rudy (1967) uit T_2O-metingen concludeert. Hij stelt namelijk, dat C. maenas zijn integument-permeabiliteit niet significant kan veranderen.
Uit het percentage saturatie met D_2O, na plaatsing gedurende bepaalde tijd in een medium van bepaalde saliniteit en met D_2O, berekent Smith de netto water-influx per tijdseenheid. Rudy (1967) (proeftemperatuur 10°C) verkrijgt via T_2O-metingen dezelfde grootheid en uit de verschillen tussen beider uitkomsten vindt Smith aanwijzingen om (bij een Q_{10} van 2) de aanwezigheid van een isotopeneffect te veronderstellen. Om zijn influx-waarden te kunnen vergelijken met de urine-productie-waarden van Shaw (1961) en Binns (1969) rekent Smith zijn resultaten om tot de dagelijkse netto influx als percentage van het lichaamgewicht. (Uitgaande dus van het principe, dat urine-productie in principe gelijk is aan de netto-influx).

In het traject 50-70% zeewater corresponderen de aldus verkregen uitkomsten met genoemde literatuurwaarden, echter èn voor onverdund zeewater èn voor sterkere verdunningen vindt Smith lagere waarden dan Shaw en Binns.
Smith veronderstelt dan ook, dat C. maenas naast een (passieve) osmotische influx van water, die dus bij 50-70% zeewater een urineproductie als gevonden door o.a. Shaw kan verklaren, nog een andere vorm van watertransport moet vertonen, bijvoorbeeld een vorm van isotonisch watertransport.
Hierbij moet echter wel gesteld worden, dat men er altijd vanuit is gegaan, dat actief watertransport een ongewoon verschijnsel is bij Crustacea. (Potts en Parry, 1964).
Ter vergelijking worden in Figuur 10 de gegevens verkregen in deze studie omtrent de urineproductie weergegeven naast de resultaten van Shaw (1961), Binns (1969) (beide urine-productie), Rudy (1967), Smith (1970) (beide netto water-influx).
Resumerend kan dus gesteld worden:

30 en 40% Z.W.: waarden van Shaw en Binns zijn aanzienlijk hoger dan de andere.

50 % Z.W.: waarden van Smith en de eigen studie komen ongeveer overeen.

40 % Z.W.: waarden van Rudy zijn iets hoger dan de waarden van deze studie.

50 % Z.W.: waarden van deze studie zijn aanzienlijk lager dan die van de andere studies.

75 % Z.W.: alle waarden liggen dicht bij elkaar.

100 % Z.W.: geen waarden van eigen studie; Rudy en Smith vinden geen influx, Shaw en Binns wel enige urineproductie.

Rest nu nog, bij het bestuderen van Fig. 10 de vraag, of de urineproductie een functie van de mediumtemperatuur is, hetgeen gezien de resultaten van deze studie positief moet worden beantwoord.
Omdat de osmotische concentratie van het bloed negatief gecorreleerd is met de mediumtemperatuur, zal een verlaging van de wateruitwisseling bij verlaging van temperatuur (waarbij de wateruitwisseling correspondeert met de door Smith (1970) gebruikte

grootheid K, "het percentage water uitgewisseld per tijdseenheid", een grootheid, die sterk afhankelijk is van de permeabiliteit) in zekere mate teniet worden gedaan door het oplopen van de gradiënt tussen in- en uitwendig milieu.
Bovenstaande maakt een direct met elkaar vergelijken van de verschillende waarden in Fig. 10 gevaarlijk; vooral de resultaten van Binns (1969) zullen, indien ook hier het temperatuureffect geldt, aanzienlijk hogere waarden geven bij omrekening naar 20°C.
Ten slotte kan uit het werk van Smith afgeleid worden, dat een bepaalde mate van variatie in de uitkomsten het gevolg kan zijn van verschillen in gewicht van de proefdieren.

Worden de resultaten van deze studie vergeleken met die van Spaargaren (1971) (Crangon crangon) dan is in ieder geval duidelijk, dat met behulp van deze methode slechts een urineproductie kan worden gemeten in media, die een lagere of hogere osmotische concentratie bezitten dan de haemolymphe van de proefdieren.
Zoals hier al eerder opgemerkt is en zoals ook zou kunnen blijken uit het werk van Parry (1955), hoeft dit niet te betekenen, dat bij de saliniteiten, waarbij dit het geval is, geen urineproductie optreedt.
Spaargaren (1971) vindt enige aanwijzingen, dat in hypertonische saliniteiten de urine van C. crangon een iets hogere geleidbaarheid bezit dan het bloed, echter de verschillen, zo ze aanwezig zijn, zijn wel zeer gering; bovendien is de situatie bij C. crangon wezenlijk verschillend van C. maenas gezien het feit, dat bij de laatste bij hoge saliniteiten sprake is van isotoniciteit tussen haemolymphe en medium.
Zoals reeds eerder opgemerkt geven C. maenas en C. crangon een overeenkomstig verband te zien tussen urineproductie per gewichts- en tijdseenheid en mediumsaliniteit met dien verstande, dat C. crangon in tegenstelling tot C. maenas bij lage saliniteiten een maximum vertoont met $\pm$ constant blijven van de urineproductie bij verdere daling van de saliniteit. (Spaargaren, 1971).
Spaargaren noemt als eventuele verklaring het volgende:
In het gebied met maximale regulatie zal bij daling van de saliniteit de waterinflux steeds toenemen, een hoeveelheid, die via een

evenredige toename van de urineproductie uitgescheiden kan worden. Bij een bepaalde of nog lagere saliniteit zal echter de excretie niet meer voldoende zijn om de influx te compenseren en zal het watergehalte van het dier stijgen, iets wat door bepalingen van het watergehalte van C. crangon bij verschillende zoutgehaltes wordt bevestigd.

In dit lage saliniteitsgebied zal een toename van het watergehalte dan ook een belangrijke rol spelen bij de aldaar optredende verlaging van de osmotische concentratie van het bloed (conformiteit). C. maenas vertoont echter bij deze lage saliniteiten een veel mindere mate van conformiteit en (dus) geen maximum, maar een voortdurend stijgen van de urineproductie, iets wat suggereert, dat bij C. maenas bij genoemde lage saliniteiten een toename van het watergehalte zal uitblijven of veel geringer van omvang zal zijn.

Helaas kan dit met de gegevens van deze studie niet met cijfers getoetst worden.

Rudy (1967) en Smith (1970) gaan bij hun berekeningen van de waterinflux van C. maenas uit van een constant watergehalte van 70%, zonder helaas te stellen waarom deze waarde constant zou zijn.

7. Het verband tussen de urineproductie en de grootte van de proefdieren

Spaargaren (1971) vindt voor C. crangon een lineair verband tussen de grootte van de proefdieren en het gemiddelde volume geproduceerde urine per tijdseenheid: $V_u = 9,86.w$, waarin V_u is het urinevolume in µl. en w het gewicht in gr.

Verder stelt hij het volume urine, dat per keer wordt afgegeven aan het medium op 1,07% van het lichaamsgewicht. De variatie is hier bij ongestoorde proefdieren slechts gering. De variatie is in de uitkomsten bij deze studie echter aanzienlijk, zowel in de hoeveelheid urine per keer afgegeven, als in de tijdsruimte tussen 2 urinelozingen.

Wordt desalniettemin de factor bepaald, die (gemiddeld) de relatie tussen V_u en w aangeeft bij C. maenas, dan krijgen we: voor 5°C: 4,44, voor 20°C: 3,25 en voor 5 en 20°C tesamen: 3,75.

Bij een gemiddeld soortelijk gewicht van de proefdieren van 1,012 levert dit op als percentage van het lichaamsgewicht per urinelozing: 0,4%.
Deze waarde ligt beduidend lager dan die voor C. crangon, hetgeen te verwachten is, omdat aangenomen kan worden, dat de urineproductie evenredig zal zijn met het lichaamsoppervlak (c.q. kieuwoppervlak) en niet met het gewicht.
Dit duidt trouwens ook op een mogelijke variatie bij gebruik van proefdieren van sterk uiteenlopende grootte.
De grootte van de urineblazen kan afgeleid worden uit het volume van de urinelozingen. Dit varieert, zoals al eerder gesteld sterk. De waarden af te leiden uit de berekeningen varieren van 40 tot 549 µl., bij proefdiergewichten van 18 tot 50 gram. Aangezien dit waarden betreft afgeleid uit gemiddelden, zullen de volumina van maximaal gevulde urineblazen nog hogere waarden kunnen aannemen.

8. Het verband tussen de urineproductie en het osmotische drukverschil tussen intern en extern medium

Als er vanuit gegaan wordt, dat de urineproductie gelijk is aan de influx van water en dat dit passief als gevolg van een osmotisch verschil tussen intern en extern medium optreedt, kan gesteld worden, dat er een lineair verband zal bestaan tussen urineproductie en het verschil in osmotische druk tussen dier (Π_i) en zeewater (Π_e).
Miyake (1939) (p. 22) geeft enkele relaties tussen osmotische druk en chloriniteit en tussen saliniteit en chloriniteit.
Uit de aldus berekende waarden kan Fig. 11 worden geconstrueerd, de betrekking tussen de urineproductie, uitgedrukt als volume per lichaamsgewicht per tijdseenheid, en het osmotische drukverschil, de gradiënt.
Spaargaren (1971) heeft voor C. crangon een overeenkomstige figuur geconstrueerd en de verschillen tussen C. crangon en C. maenas zijn in deze opvallend.
Het verband bij C. maenas lijkt ongeveer proportioneel te zijn (Fig. 11), bij C. crangon echter blijft de urineproductie achter bij oplopen van het osmotisch drukverschil.
Spaargaren geeft voor dit laatste drie mogelijke verklaringen:

(a) een afname van de permeabiliteit voor water bij lage saliniteiten, zoals Smith (1970) voor C. maenas aantoont, (b) een verhoging van de interne hydrostatische druk en (c) een meer dan proportionele toename van extrarenale excretie.
Voor C. crangon kan de reductie van de urineproductie, zoals hierboven beschreven, kwantitatief verklaard worden uit toename van de hydrostatische druk; uit extrarenale electrolyt efflux blijkt bovendien, dat de permeabiliteit bij C. crangon constant is in verschillende zoutgehalten.
Indien uit het bovenstaande mag worden geconcludeerd, dat C. maenas geen verhoging van de interne hydrostatische druk (hiervoor zijn geen gegevens aanwezig!) vertoont bij lage saliniteiten, dan is dit in overeenstemming met de gegevens verkregen omtrent de urineproductie bij lage saliniteiten, waar C. maenas immers in tegenstelling tot C. crangon geen maximum vertoont (zie pag. 25).

9. Q_{10}-waarden voor het urineproductieproces van C. maenas

Het temperatuureffect op de urineproductie kan worden uitgedrukt in de Q_{10}-waarde:
$\log Q_{10} = \frac{10}{t_1 - t_2} (\log f_1 - \log f_2)$, waarin f_1 en f_2 weergeven de urineproductie bij temperaturen t_1 en t_2.
Uitgaande van de waarden in Fig. 9 worden de volgende Q_{10}-waarden gevonden: bij ongeveer 5 ‰ S: Q_{10} 2,160; bij ongeveer 10 ‰ S: Q_{10} 1,710; bij ongeveer 22 ‰ S: Q_{10} 1,585.
Hierbij dient te worden opgemerkt, dat processen, die worden gekatalyseerd door enzymen een Q_{10}-waarde hebben van 2-3, terwijl fysische processen, zoals b.v. diffusie, een Q_{10} hebben, die niet veel groter is dan 1.
Spaargaren (1971) vond voor Crangon crangon, eveneens voor het urineproductie-proces, een Q_{10}-waarde van 1,36.
Bovenstaande waarden doen veronderstellen, dat bij processen als water-influx en urineproductie vooral gedacht moet worden aan een fysisch proces.
Afsluitend kan gesteld worden, dat de urineproductie van groot belang is voor de osmoregulatie, het compenseert de osmotische influx van water.

Primair moet gedacht worden aan een fysisch proces, waarbij de urineproductie een proportioneel verband schijnt te vertonen met de osmotische drukgradient over de lichaamswand.
De gevonden waarden voor de urineproductie vertonen een grote variabiliteit, waarschijnlijk geeft de opsomming van de verschillende literatuurwaarden in Fig. 10 een vrij goed beeld van de urineproductie van C. maenas.

10. Hormonale regulatie

Waarschijnlijk is, dat de waterinflux en eventueel ook de urineproductie zelf hormonaal gereguleerd wordt.
Hormonale invloed is onder andere bestudeerd met betrekking tot de vervellingscyclus. Vóór de eigenlijke vervelling vindt namelijk een verhoogde opname van water via integument en kieuwen plaats, iets wat eveneens het gevolg is van het operatief verwijderen van oogstelen.
In Carlisle, 1955 is een kleine samenvatting te vinden over voorgaande studies; resumerend kan gesteld worden, dat de neurosecretie van één of meerdere hormonen in de oogstelen met controle over waterbalans en vervellingscyclus zelf verondersteld wordt.
Carlisle, 1955 (onderzoek Carcinus maenas) postuleert uit zijn proefresultaten een factor, die wordt gesecreteerd uit het X-orgaan (in de oogsteel), die de waterbalans van Carcinus beinvloedt en die wezenlijk zou verschillen van de vervellings- en gonadotrofe factoren.
Gezien de ook bij deze studie aangehaalde discussie over al of niet mogelijke variatie van permealiteit van de barriere extern/intern medium is het moeilijk een oordeel uit te spreken over het feit of deze factor de waterinflux of de urine-productie zelf controleert. (zie ook Spaargaren, 1971).
Uitgaande van de veronderstelling, dat afgifte van in de oogsteel geproduceerde hormonen verhinderd kan worden via het aanleggen van een ligatuur rond de basis van de oogsteel (Kato & Kamemoto, 1969), zijn enige urine-productie-metingen uitgevoerd met krabben voorzien van zo'n ligatuur echter zonder enig meetbaar resultaat.
De veronderstelling is wellicht gerechtvaardigd, dat de aangelegde ligaturen niet in staat waren de afgifte van hormonale factoren te verhinderen en dat dus een ingrijpender methode toegepast zal moeten worden.

V. Literatuur

BATEMAN, J.B., 1933. Osmotic and ionic regulation in the shore crab, Carcinus maenas, with notes on the blood concentrations of Gammarus locusta and Ligia oceanica. - J. exp. Biol. 10: 355-371.

BINNS, R., 1969. The physiology of the antennal gland of Carcinus maenas, L. - J. exp. Biol. 51: 1-10

BROEKEMA, M.M.M., 1942. Seasonal movements and the osmotic behaviour of the shrimp Crangon crangon L. - Archs. néerl. Zool. 6: 1-100.

BROEKHUYSEN jr., G.J., 1937. On development, growth and distribution of Carcinus maenas L. - Archs néerl. Zool. 2: 257.

BRUNS, E., 1962. Ozeanologie. Ozeanometrie 1. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 2: 1-494.

CARLISLE, D.B., 1956. On the hormonal control of water balance in Carcinus. - Pubbl. Staz. zool. Napoli 27: 227.

CAUDRI, L. W. D., 1937. Einfluss der Temperatur und des Salzgehalts auf die Sterblichkeit von Garnelen (Crangon crangon L.) - Archs néerl. Zool. 3: 179-196.

FLUGEL, H., 1960. Uber den Einfluss der Temperatur auf die osmotische Resistenz und die Osmoregulation der decapoden Garnele Crangon crangon L. - Kieler Meeresforsch. 16: 186-200.

———, 1963. Elektrolytregulation und Temperatur bei Crangon crangon L. und Carcinus maenas L. - Kieler Meeresforsch. 19: 189-195.

GILBERT, A.B., 1959. The composition of the blood of the shore crab Carcinus maenas, Pennant, in relation to sex and body size. - J. exp. Biol. 36: 113-356.

KATO, J.K. & F.I. KAMEMOTO, 1969. Neuroendocrine involvement in osmoregulation in the grapsid crab Metapograpsus mesor. - Comp. Biochem. Physiol. 28: 665-674.

KNUDSEN, M., 1901. Hydrographical Tables. Copenhagen, London.

LOCKWOOD, A.P.M., 1962. The osmoregulation of Crustacea. - Biol. Rev. 37: 257-305.

MIYAKE, Y., 1939. Chemical studies of the Western Pacific Ocean. III. Freezing point, osmotic pressure, boiling point and vapour pressure of sea water. - Bull. chem. Soc. Japan 14: 58-62.

NAGEL, H., 1934. Die Aufgaben der Exkretionsorgane und der Kiemen bei der Osmoregulation von Carcinus maenas. - Z. vergl. Physiol. 21: 468-491.

PANNIKAR, N.K., 1941a. Osmoregulation in some palaemonid prawns. - J. mar. biol. Ass. U.K. 25: 317-359.

PARRY, G., 1955. Urine production by the antennal glands of Palaemonetes varians, Leach. - J. exp. Biol. 32: 408-422.

PICKEN, L.E.R., 1935. The mechanisme of urine formation in Invertebrates I. The excretion mechanisme in certain Arthropoda. - J. exp. Biol. 13: 309-328.

POTTS, W.T.W. & G. PARRY, 1964. Osmotic and ionic regulation in animals. Pergamon Press, New York and London: 1-423.

PROSSER, C.L. & F.A. BROWN jr., 1962. Comparative Animal Physiology. Second ed. W.B. Saunders Comp., Phil. and London: 1-688.

RUDY jr., P.P., 1967. Water permeability in selected Crustacea.- Comp. Biochem. Physiol. 22: 581-589.

SCHLIEPER, C., 1929. Die Osmoregulation der Süsswasserkrebse. - Verh. dt. zool. Ges. 33: 214.

SHAW, J., 1955. Ionic regulation in the muscle fibres of Carcinus maenas. - J. exp. Biol. 32: 383-396; 664-680.

———, 1961. Studies on ionic regulation in Carcinus maenas L. I. Sodium balance. - J. exp. Biol. 38 (I): 135-153.

SMITH, R.I., 1970. The apparent water permeability of Carcinas maenas (Crust., Brachyura, Portunidae) as a function of salinity. - Biol. Bull. 139: 351-362.

SPAARGAREN, D.H., 1969. Temperatuurinvloed op de osmoregulatie van de ganaal, Crangon crangon L. - N.I.O.Z., Publ. en Versl. 1969 - 9: 1-36.

————————, 1971. Aspects of the osmotic regulation in the shrimps Crangon crangon and C. allmanni. - Neth. J. Sea Res. 5 (3): 275-333.

THEEDE, H., 1969. Osmoregulation von Carcinus maenas. - Mar. Biol. 2: 114-120.

TODD, M.E., 1963. Osmoregulation in Ligia oceanica and Idotea granulosa. - J. exp. Biol. 40: 381-392.

VERBRUGH, A.J., 1962. Elementaire Inleiding tot de Fysische Scheikunde. Deel I. J.B. Wolters, Groningen: 1-444.

VERWEY, J., 1957. A plea for the study of temperature influence on osmotic regulation. - Annls. Biol. 33: 129-149

WEBB, D.A., 1940. Ionic regulation in Carcinus maenas. - Proc. R. Soc. (B) 129: 107-136.

WEBER, R.E. & D.H. SPAARGAREN, 1970. On the influence of temperature on the osmoregulation Crangon crangon and its significance under estuarine conditions. - Neth. J. Sea Res. 5 (1): 108-119.

WOLF, A.V., 1966. Aqueous solutions and body fluids, their concentrative properties and conversion tables. Harper & Row, New York, London: 1-166.

Onderschriften bij de Figuren

Fig. 1. Opstelling voor het meten van de urineproductie. Voor de verklaring van de letters en cijfers zie tekst. (hoofdstuk 3.6.).

Fig. 2. Carcinus maenas: osmotische concentratie, geleidbaarheid en chloride-gehalte van het bloed als functie van de osmotische concentratie van het medium, bij 4 en 20°C.

Fig. 3. Concentratie van de niet-electrolyten en electrolyten (andere dan Cl^-) bij 4 en 20°C (a) en het temperatuur-effect op de osmotische concentratie, geleidbaarheid, chloride-gehalte en concentratie niet-electrolyten (b) van het bloed van C. maenas als functie van de osmotische concentratie van het medium.

Fig. 4. Vliestroom: jaarlijks verloop van de temperatuur (a) en saliniteit (b).

Fig. 5. Resultaten van deze studie vergeleken met litteratuur gegevens: (a) Flügel (1963) (geleidbaarheid; bij (1) 5 en (2) 15°C) en (b) Schlieper (1929) (osmotische concentratie (1)) en Theede (1969) (osmotische concentratie voor (2) Oostzee en (3) Noordzee, temperatuur 16,5°C).

Fig. 6. Enige voorbeelden van registraties van urineproductiemetingen bij 20°C.

Fig. 7. Enige voorbeelden van registraties van urineproductiemetingen bij 5°C.

Fig. 8. Frequentie van urine afgifte als functie van de saliniteit van het medium bij 5 en 20°C.

Fig. 9. Urineproductie als functie van de saliniteit van het medium bij 5 en 20°C.

Fig. 10. Gegevens van de urineproductie van deze studie (bij 20°C) vergeleken met Shaw (1961) (△, 16°C), Binns (1969) (+, 9°C), Rudy (1967) (o, 20°C) en Smith (1970) (□, 18°C).

Fig. 11. Urineproductie als functie van het verschil in osmotische druk tussen bloed en medium bij 5 (a) en 20°C (b).

Tabel I

Vriespuntsverlaging (Δ_i), geleidbaarheid (K_i) en chloride-concentratie (Cl_i^-) in het bloed van C. maenas bij verschillende saliniteiten en 2 temperaturen. (4 en 20° C). Concentraties uitgedrukt in °C v.p.v.

t °C	S.(°/oo)	Δ_i	K_i	Cl_i^-
20	6,6	0,724	0,592	0,379
	6,3	0,986	0,839	0,458
		1,272	0,989	0,547
		1,091	0,933	0,426
		1,208	1,014	0,463
		1,373	1,200	0,569
		gem. 1,109±0,230	0,928±0,203	0,474±0,072
	12,5	1,157	0,946	0,639
	13,2	1,370	1,238	0,591
		1,400	1,232	
		1,395	1,232	0,600
		1,307	1,112	0,614
		1,258	1,094	0,594
		gem. 1,314±0,089	1,142±0,116	0,608±0,019
	16,9	1,451	1,198	0,700
	17,9	1,482	1,294	0,631
		1,513	1,375	0,681
		1,552	1,357	0,701
		1,495	1,250	0,700
		gem. 1,498±0,031	1,295±0,074	0,683±0,030
	22,0	1,440	1,250	0,736
	23,2	1,548	1,407	0,731
		1,558	1,412	0,704
		1,613	1,400	0,708
	23,7	1,608	1,407	0,726
		gem. 1,553±0,063	1,375±0,070	0,721±0,014

Tabel I (vervolg)

Vriespuntsverlaging (Δ_i), geleidbaarheid (K_i) en chloride-concentratie (Cl_i^-) in het bloed van C. maenas bij verschillende saliniteiten en 2 temperaturen (4 en 20°C). Concentraties uitgedrukt in °C v.p.v.

t °C	S.(°/oo)	Δ_i	K_i	Cl_i^-
20	25,6	1,460	1,331	0,780
	25,1	1,576	1,438	0,769
		1,573	1,450	0,735
		1,628	1,425	0,729
	25,4	1,570	1,456	0,662
		gem. 1,561±0,054	1,420±0,051	0,735±0,046
	32,6	1,835	1,600	0,905
	35,4	1,888	1,720	0,868
		1,912	1,738	0,832
		1,900	1,730	0,860
		1,912	1,712	0,829
		1,928	1,745	0,906
		gem. 1,897±0,032	1,708±0,054	0,867±0,034
	36,6	2,066	1,774	1,084
	37,9	2,106	1,888	
		2,078	1,875	1,010
		2,090	1,907	0,930
		2,065	1,880	
		gem. 2,081±0,014	1,865±0,052	1,008±0,077
	42,2	2,395	2,080	1,197
	34,1	1,873		
		1,880		
		1,877		
		1,866		
		gem. 1,874±0,004		

Tabel I (vervolg)

Vriespuntsverlaging (Δ_i), geleidbaarheid (K_i) en chloride-concentratie (Cl_i^-) in het bloed van C. maenas bij verschillende saliniteiten en 2 temperaturen (4 en 20°C). Concentraties uitgedrukt in °C v.p.v.

t °C	S.(°/oo)	Δ_i	K_i	Cl_i^-
5	6,6	1,215	1,032	0,615
		1,276	1,058	0,632
	7,1	1,022	0,834	0,464
		1,324	1,125	0,626
		0,869		0,294
		1,344	1,150	0,604
		1,372	1,169	0,644
		gem. 1,203±0,188	1,061±0,123	0,554±0,130
	12,6	1,012	0,914	0,541
		1,315	1,182	0,676
	12,8	1,540	1,344	
		1,534	1,357	0,802
		1,282	0,925	0,593
		1,548	1,367	
		1,240	0,938	0,574
		gem. 1,353±0,200	1,147±0,216	0,637±0,105
	17,1	1,540	1,314	0,800
		1,340	1,200	0,746
	17,3	1,730	1,558	0,905
		1,702	1,367	
		1,690	1,513	0,622
		1,592	1,262	0,709
		gem. 1,572±0,151	1,369±0,142	0,756±0,105

Tabel I(vervolg)

Vriespuntsverlaging (Δ_i), geleidbaarheid (K_i) en chloride-concentratie (Cl_i^-) in het bloed van C. maenas bij verschillende saliniteiten en 2 temperaturen (4 en 20°C). Concentraties uitgedrukt in °C v.p.v.

t °C	S.(°/oo)	Δ_i	K_i	Cl_i^-
5	21,7	1,446	1,270	0,803
		1,517	1,400	0,828
	21,9	1,574	1,450	0,842
		1,800	1,670	0,922
		1,570	1,288	0,753
		1,747	1,613	0,900
		1,780	1,498	0,856
		gem.1,633±0,140	1,456±0,152	0,842±0,057
	26,0	1,608	1,500	0,864
	26,5	1,877	1,632	0,876
		1,825	1,620	0,906
		1,862	1,657	0,885
		1,820	1,647	0,840
		1,874	1,606	0,820
		gem.1,811±0,102	1,610±0,057	0,865±0,031
	33,8	1,955	1,860	1,068
		1,943	1,725	0,950
	34,3	1,958	1,820	0,855
		2,004	1,834	0,900
		1,954	1,717	0,985
		1,995	1,785	0,876
		2,038	1,858	0,941
		gem.1,978±0,035	1,800±0,060	0,939±0,072

Tabel I(vervolg)

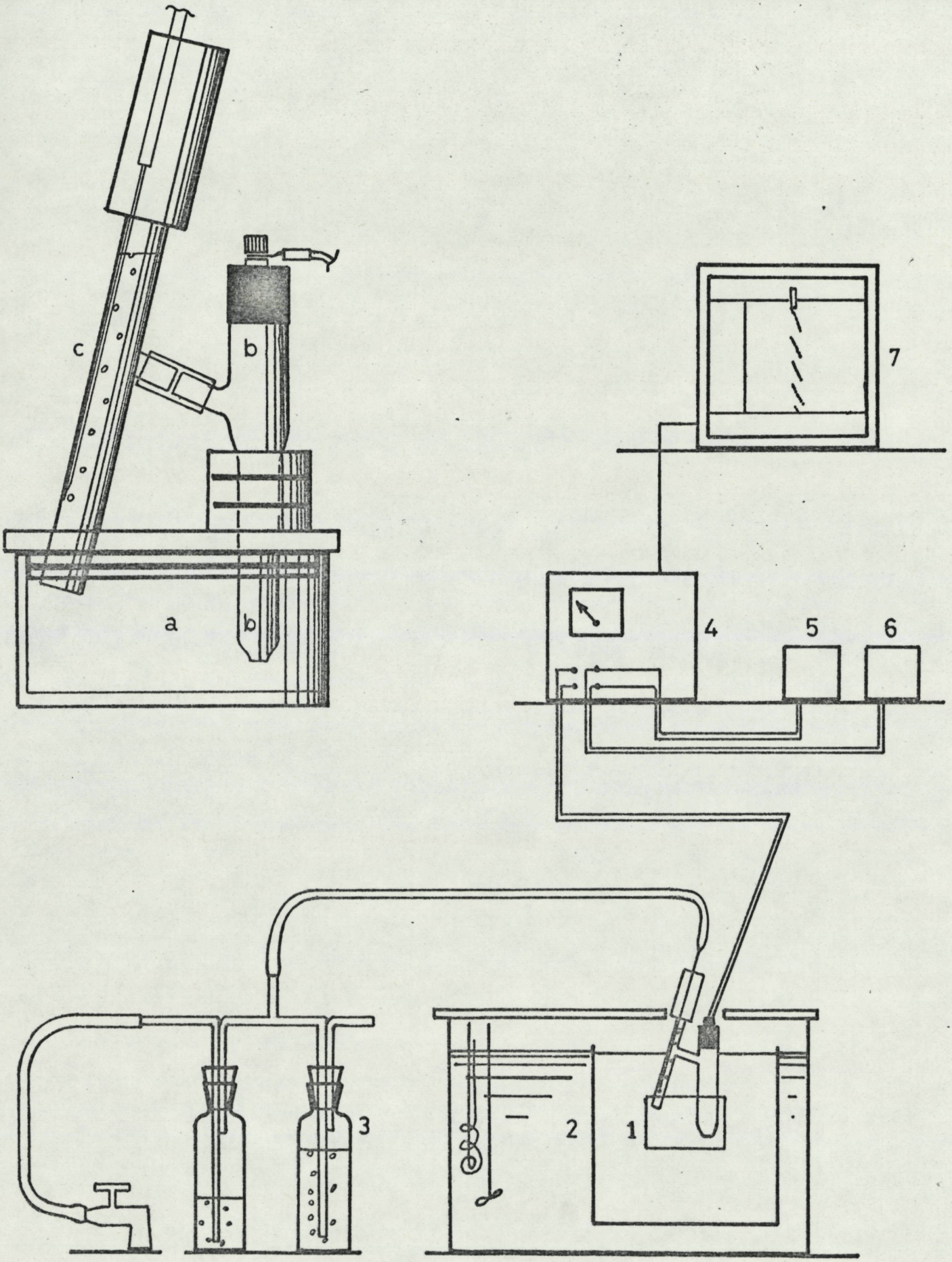
Vriespuntsverlaging (Δ_i), geleidbaarheid (K_i) en chloride-concentratie (Cl_i^- in het bloed van C. maenas bij verschillende saliniteiten en 2 temperaturen (4 en 20°C). Concentraties uitgedrukt in °C v.p.v.

t °C	S.(°/oo)	Δ_i	K_i	Cl_i^-
5	36,9	2,098	1,910	1,145
		2,062	1,845	1,065
	37,3	2,063	1,904	0,889
		2,100	1,904	0,987
		2,090	1,825	1,009
		2,180	1,967	1,091
		2,137	1,948	1,060
		gem. 2,104±0,042	1,900±0,051	1,035±0,083
	42,5	2,364	2,230	1,207
		2,374	2,250	1,270
		gem. 2,369±0,006	2,240±0,014	1,239±0,044

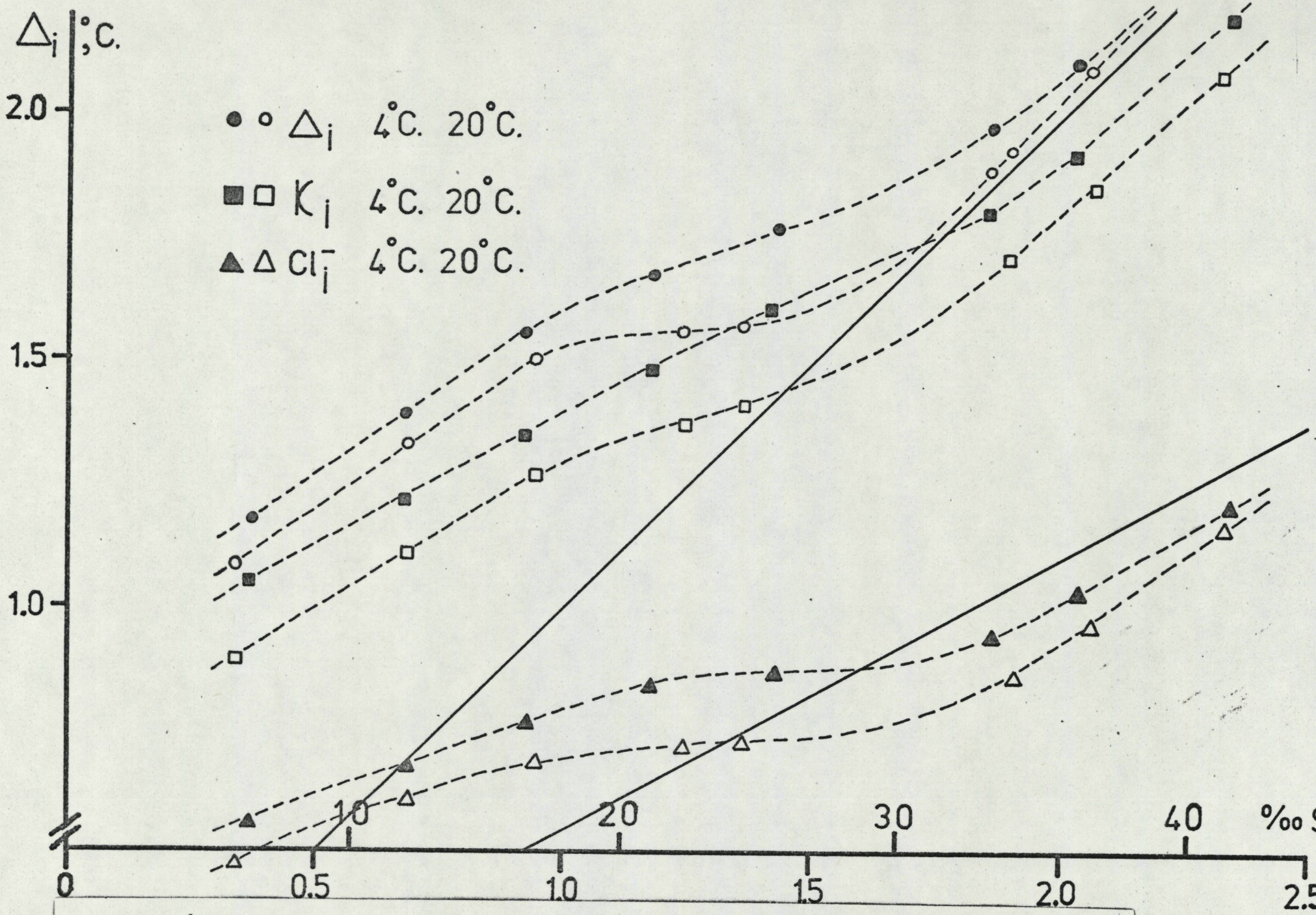
Tabel II

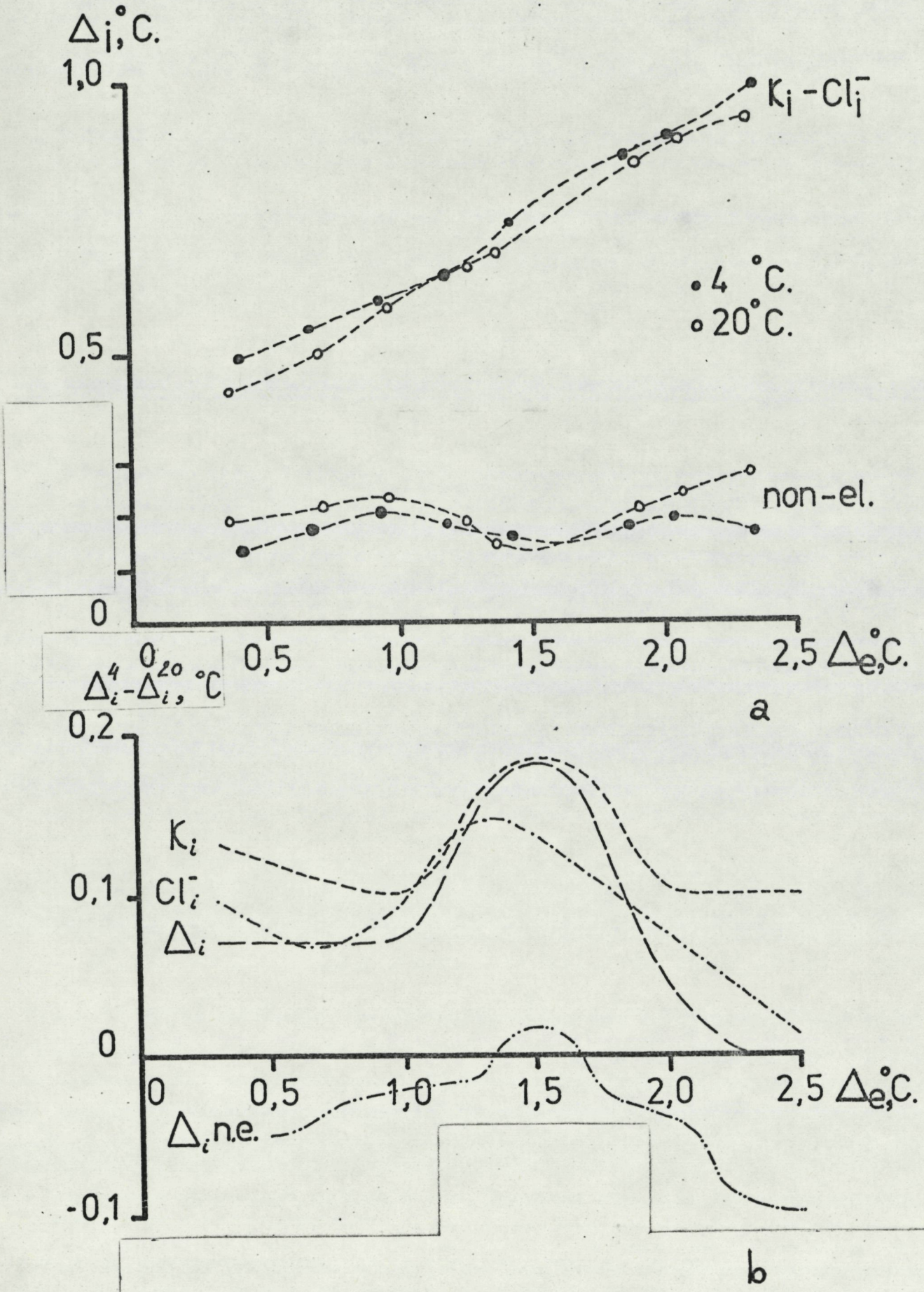
Urineproductie van C. maenas bij verschillende saliniteiten en 2 temperaturen.

T °C	S °/oo	G gram	Urineproductie		
			ml per keer	freq. (min.)	% lich. gew. dag^{-1}
20	4,8	38,9	0,077	9	32,2
	5,2	39,2	0,214	42	18,9
	5,2	31,9	0,122	25	22,2
	7,2	34,2	0,055	10	23,0
	10,9	27,4	0,134	34	20,7
	12,0	31,8	0,085	54	7,1
	15,0	37,8	0,079	22	13,8
	15,0	18,1	0,141	62	18,4
	15,7	32,2	0,046	26	8,0
	15,9	23,9	0,037	28	7,9
	21,8	35,0	0,081	35	8,9
	26,3	49,6	0,161	49	9,7
5	4,8	33,1	0,076	29	11,4
	5,0	33,0	0,052	24	9,5
	6,8	32,7	0,110	37	13,2
	9,8	32,9	0,069	38	8,1
	10,0	49,9	0,256	76	9,8
	13,3	36,3	0,117	190	2,5
	14,3	25,3	0,450	174	14,9
	22,3	42,7	0,542	411	4,5

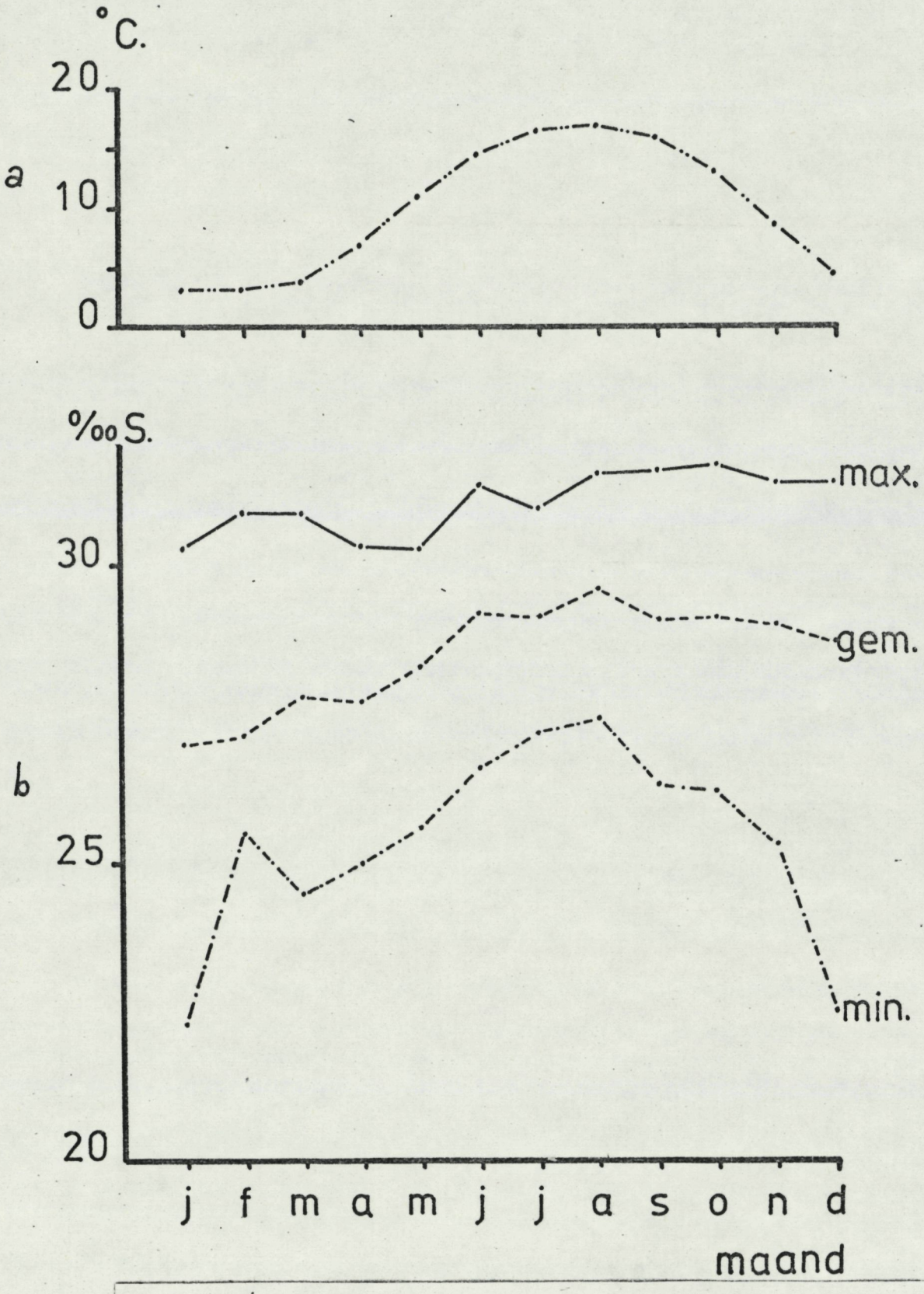


Figuur 1

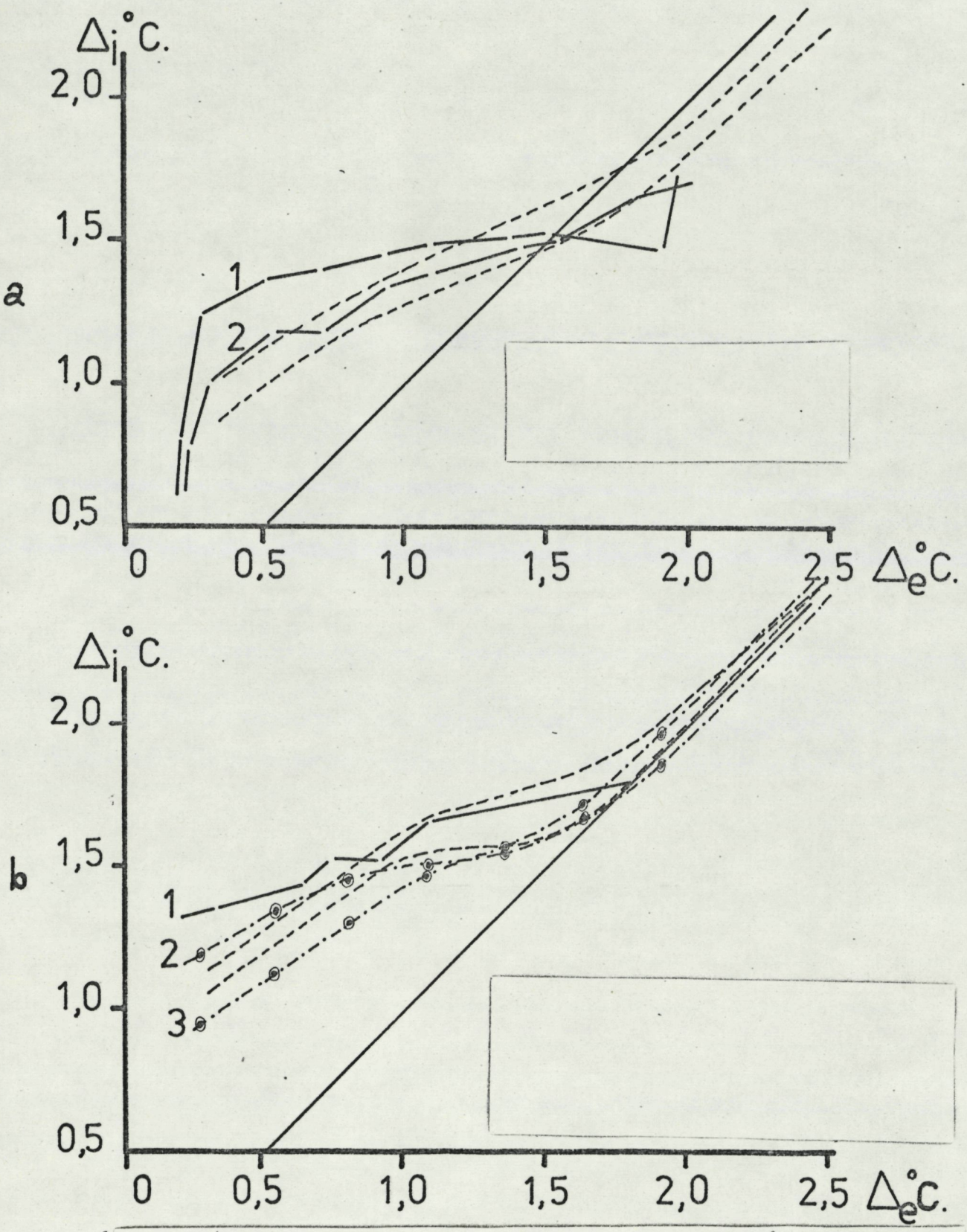

Δi °C.
2.0
1.5
1.0
● ○ Δi 4°C. 20°C.
■ □ Ki 4°C. 20°C.
▲ △ Cl⁻i 4°C. 20°C.
10
20
30
40
‰ S.
0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5


Δi°C.
1,0
0,5
0
K_i - Cl_i^-
• 4 °C.
○ 20°C.
non-el.
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5 Δe°C.
a
Δ_i^4 - Δ_i^20 °C
0,2
0,1
0
-0,1
K_i
Cl_i^-
Δ_i
Δ_i n.e.
0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5 Δe°C.
b

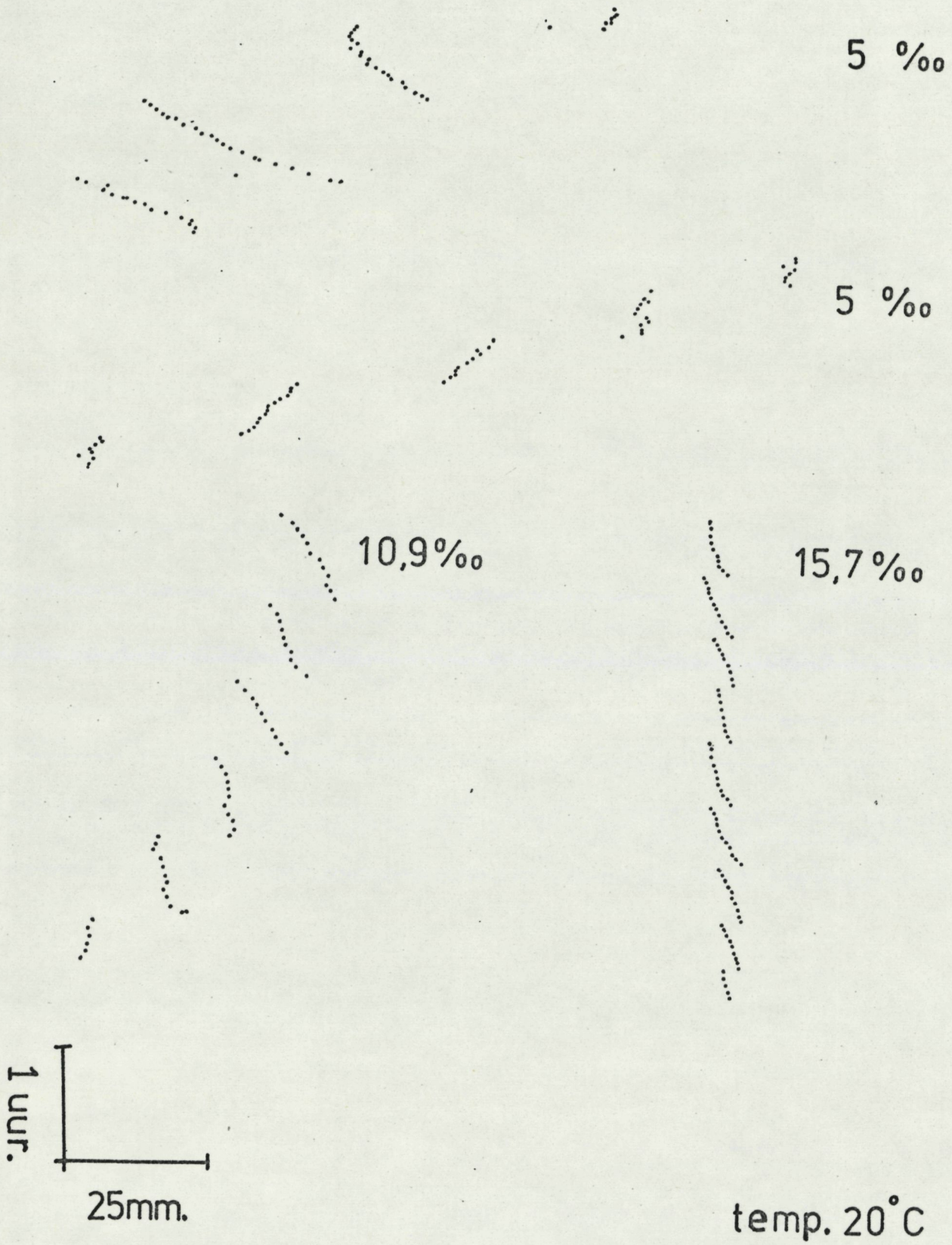
Figuur 3



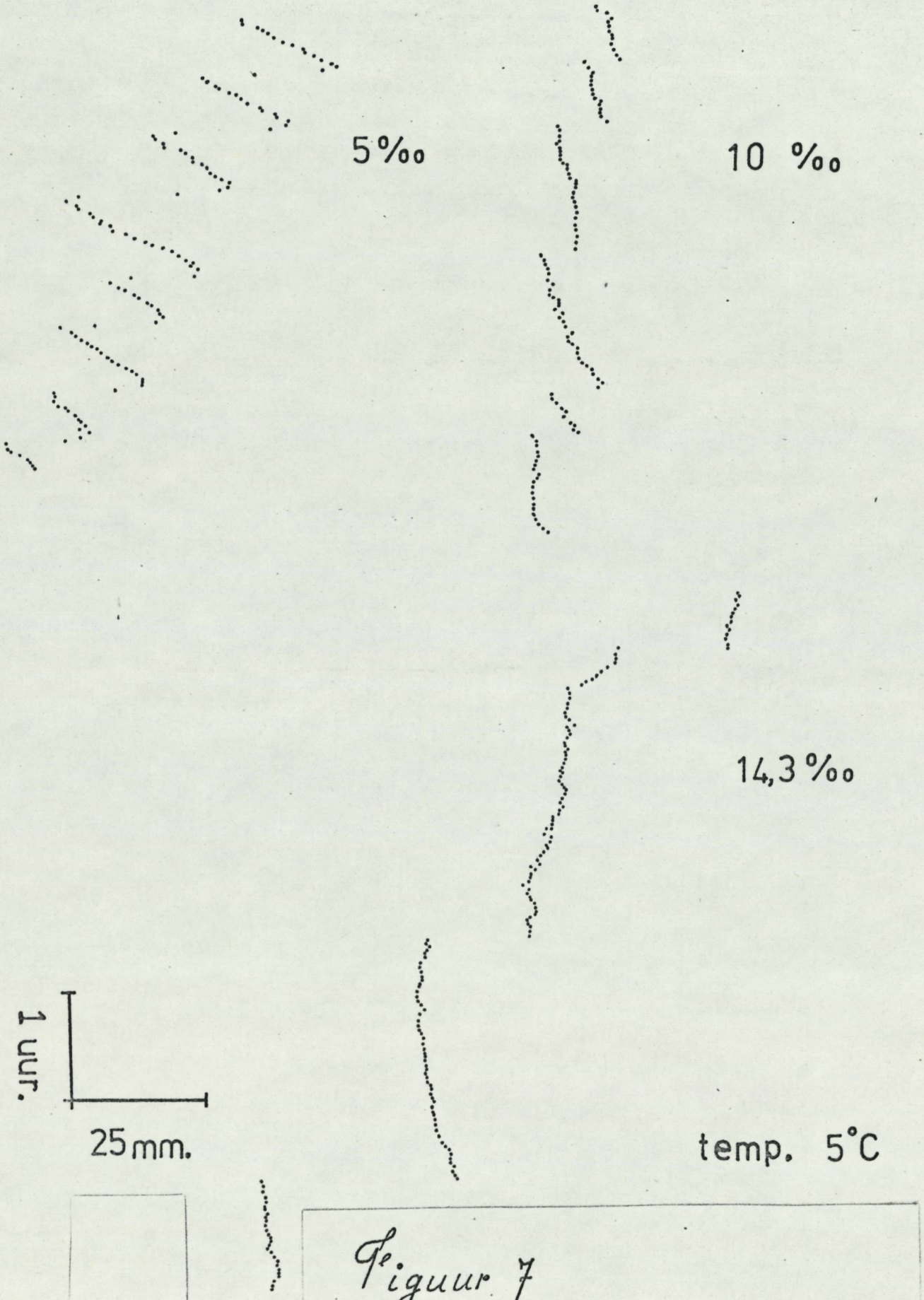
Figuur 4


a
Δ_i°C.
2,0
1,5
1,0
0,5
1
2
0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
Δ_e°C.
b
Δ_i°C.
2,0
1,5
1,0
0,5
1
2
3
0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
Δ_e°C.

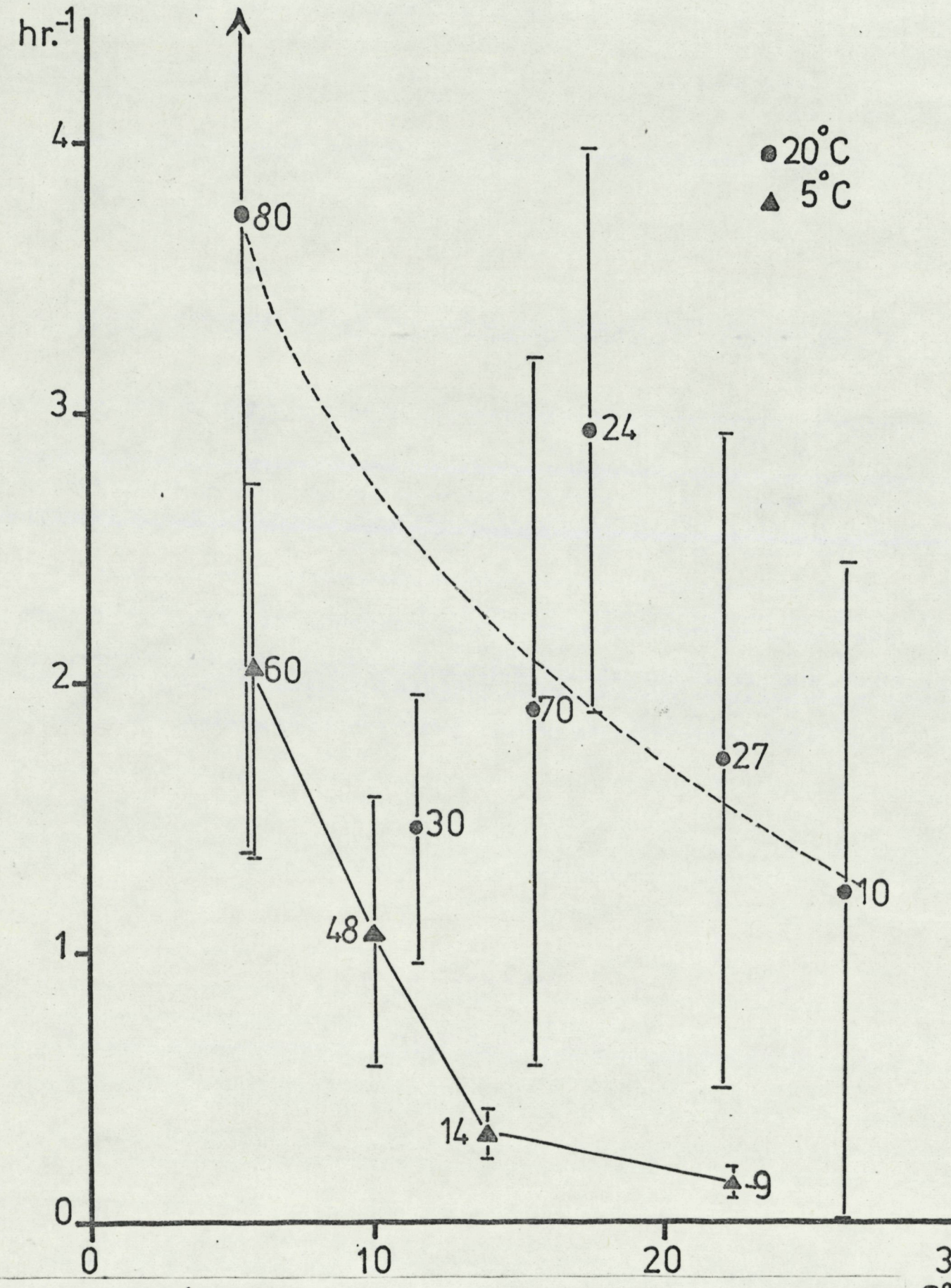
Figuur 5



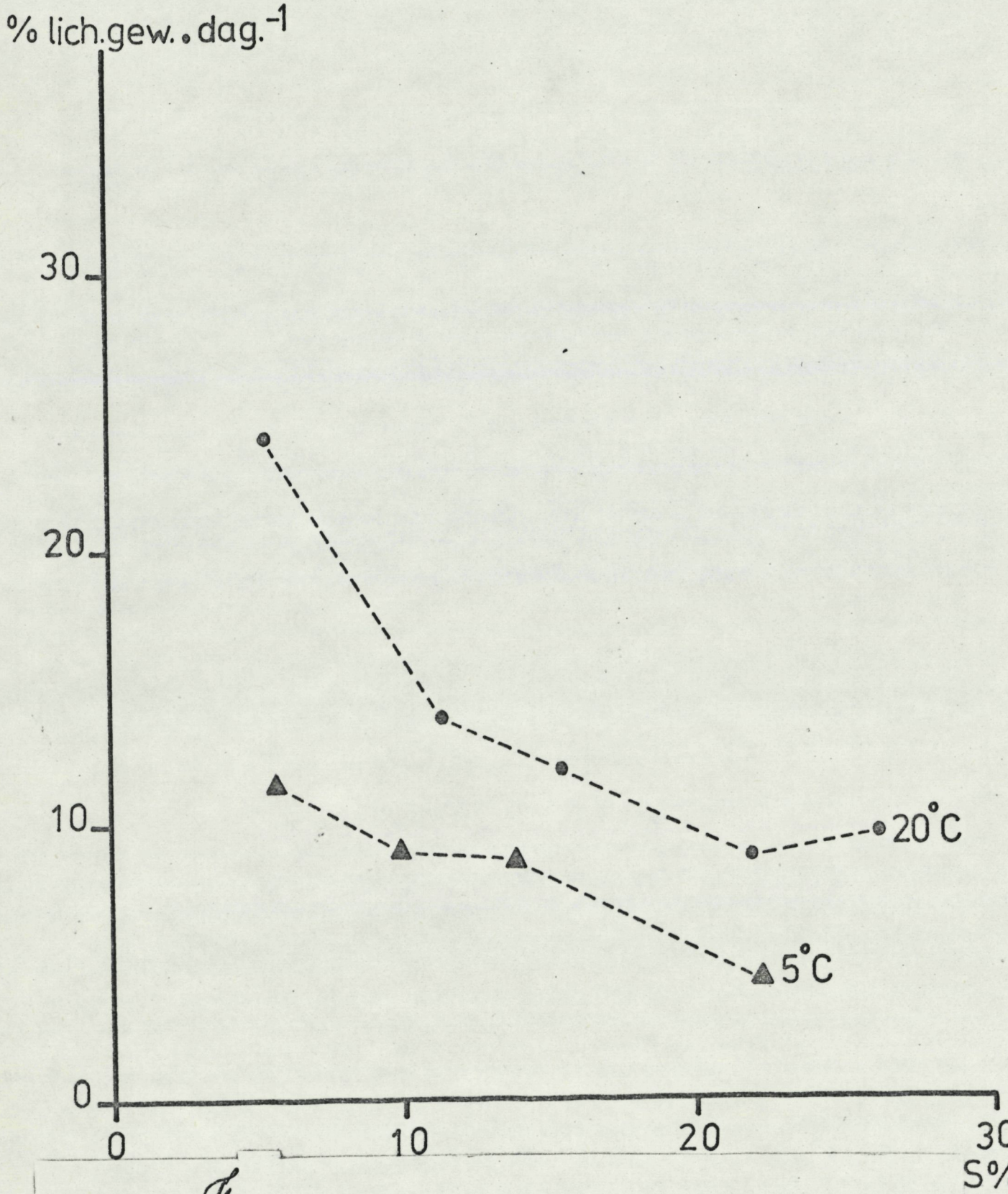
Figuur 6.



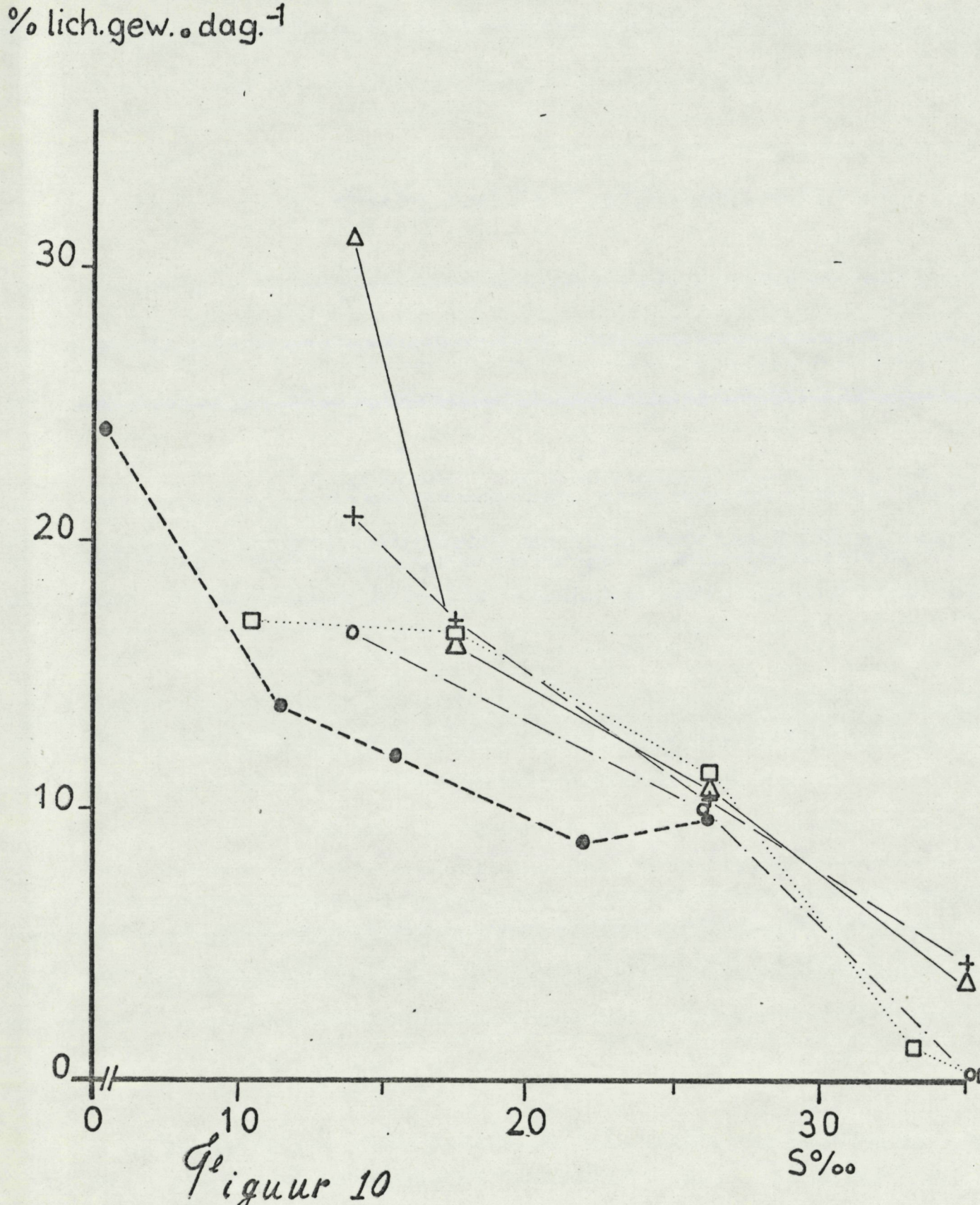
Figuur 7



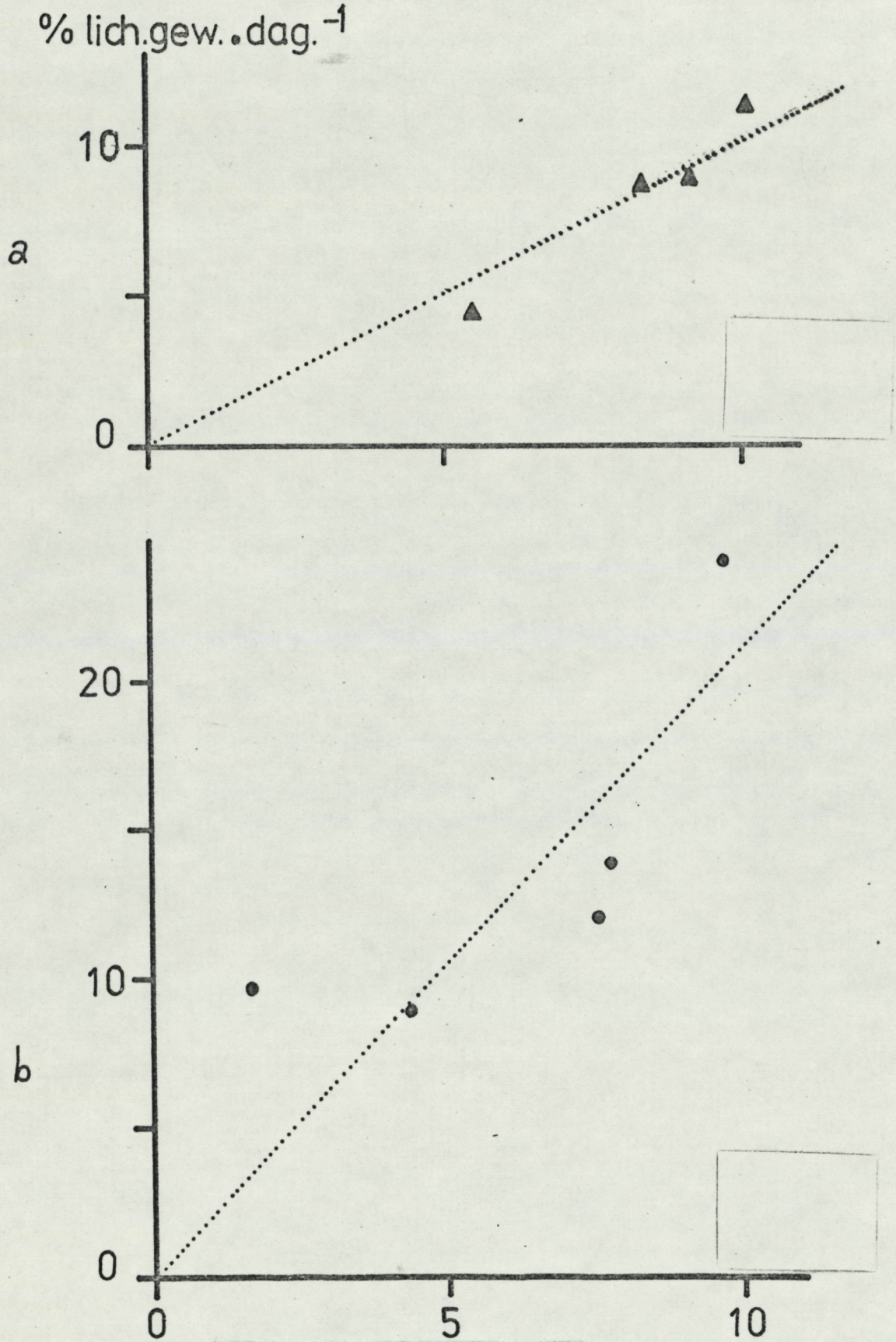
Figuur 8



Figuur 9



Figuur 10



Figuur 11