

MEDEDEELINGEN  
VAN DE KONINKLIJKE VLAAMSCHE ACADEMIE VOOR WETEN-  
SCHAPPEN, LETTEREN EN SCHOONE KUNSTEN, VAN BELGIË

---

STUDIES  
OVER DE OSMOREGULATIE VAN  
HET BLOED BIJ ENKELE CRUSTACEEËN

[*Asellus aquaticus* (Sars), *Gammarus pulex* (L), en *G. locusta* (L)]

DOOR

M. J. HEUTS, Dr. Sc.

Aspirant bij het Belgisch Nationaal Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek



1943

N. V. STANDAARD - BOEKHANDEL — ANTWERPEN  
UITG. MIJ W. DE HAAN N. V. — UTRECHT

STUDIES  
OVER DE OSMOREGULATIE VAN  
HET BLOED BIJ ENKELE CRUSTACEEËN



MEDEDEELINGEN  
VAN DE  
KONINKLIJKE VLAAMSCH E ACADEMIE VOOR  
WETENSCHAPPEN, LETTEREN EN SCHOONE KUNSTEN  
VAN BELGIË



KLASSE DER  
WETENSCHAPPEN

JAARGANG V

N<sup>o</sup> 2

1943

N.V. STANDAARD-BOEKHANDEL — ANTWERPEN  
UITG.MIJ W. DE HAAN N. V. — UTRECHT

STUDIES  
OVER DE OSMOREGULATIE VAN  
HET BLOED BIJ ENKELE CRUSTACEEËN

[*Aselus aquaticus* (Sars), *Gammarus pulex* (L.), en *G. locusta* (L.)]

DOOR

M. J. HEUTS, Dr. Sc.

Aspirant bij het Belgisch Nationaal Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek



1943

N. V. STANDAARD - BOEKHANDEL — ANTWERPEN  
UITG. MIJ W. DE HAAN N. V. — UTRECHT



*Mededeeling ter vergadering van 13 Juni 1942.*

M. J. HEUTS, Dr. Sc. Aspirant bij het Belgisch Nationaal Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek : *Studies over de osmoregulatie van het bloed bij enkele Crustaceeën. (Asellus aquaticus (Sars), Gammarus pulex (L.) en G. locusta (L.)).*

(Aangeboden door den Heer A. Dumon.)

Voor de ecologische studie van een biotoop zijn gegevens over physiologie in verband met milieufactoren even belangrijk als de kennis van de interactie der soorten.

De inlichtingen hierover voorhanden, zijn hoofdzakelijk schaarsch met betrekking tot de permeabiliteitsregulatie, functie die nochtans van overwegend belang is.

Uit de weinig talrijke feiten, die omtrent de osmoregulatie-physiologie der waterdieren bekend zijn (KROGH, 1939), blijkt niettemin reeds duidelijk dat deze veranderingen ondergaat in verband met wijzigingen in verschillende milieufactoren. Nog minder bestudeerd zijn periodisch voorkomende wisselingen in deze functie, berustend op activiteitsrhythmen van bepaalde organen, zooals b. v. de sexuele cyclus.

Dit laatste probleem, nl. cyclische veranderingen in de osmotische waarden van het bloed en milieuwisselingen die deze variaties tengevolge zouden kunnen hebben, werd reeds door WIDMANN (1936) bij Crustaceeën aangevat; deze opzoekingen leidden echter niet tot het gewenschte resultaat, zooals verder zal worden aangetoond.

In den loop van de studie hier uiteengezet, werd systematisch de invloed bestudeerd van uitwendige en inwendige factoren op de osmotische waarden van het bloed, bij middel van bepalingen van den totalen osmotischen druk en de chloride-concentratie van het bloed op enkele Crustaceeën, nl. *Asellus aquaticus* SARS, *Gammarus pulex* L, en *G. locusta* L. De beide eerste soorten werden betrokken uit de onmiddellijke omgeving van Leuven, terwijl de laatste in de brakwatervijvers der oude fortten van Lilloo (Antwerpen) gevangen werd.



## METHODES

Al de experimenten, met uitzondering van deze waar temperatuurinvloeden werden bestudeerd, werden doorgevoerd op een constante temperatuur van  $10 \pm 0,5^{\circ}$ .

Bovendien bevonden zich alle proefdieren op het oogenblik der metingen in éénzelfden voedingstoestand : vanaf 24 uur vóór dit oogenblik, kregen ze geen voedsel meer toegediend. Uitzondering werd gemaakt bij de proefnemingen over den invloed van den voedingstoestand.

Het proefmilieu, dat steeds minstens een volume van 200 cc had, bevatte nooit meer dan vijf proefdieren tegelijkertijd. De dieren bleven in dit milieu tot hoogstens vijf minuten vóór de meting. Het bloed werd dan met een fijne capillair, aan de inplantingsbasis der pooten genomen, natuurlijk na zorgvuldig afdrogen van het dier, met desnoods voorafgaande wassching met gedestilleerd water.

Op het aldus bekomen druppeltje werd de totale osmotische druk (in de tabellen : t. o. d.) bepaald, door middel van den thermoëlectrischen osmometer van HILL, gewijzigd door BALDES (zie BALDES en JOHNSTON, 1939). De hiermee bekomen gegevens drukken de concentratie uit van een NaCl-oplossing, die denzelfden osmotischen druk zou bezitten. De nauwkeurigheid bedraagt 1 %.

Chloridebepalingen werden uitgevoerd met de ultramicromethode van WIGGLESWORTH (1938a), met voorafgaande behandeling volgens BONE en KOCH (1942). Het ingewikkeld filtratieproces, na neerslaan der chloriden met zilvernitraat, werden weggelaten, omdat zonder dit procédé de bereikte nauwkeurigheid voldoende bleek voor onze doeleinden. Deze bedroeg 5 % bij een omvang van minder dan 1 mm<sup>3</sup> der te analyseeren vloeistoffen.

Zooals blijkt uit de tabellen, werd ieder proefdier genummerd. De aangegeven datum's zijn deze waarop de meting werd uitgevoerd.

Dikwijls werd de meting van den totalen osmotischen druk en van de chloraemie niet op eenzelfde dier en niet op denzelfden datum uitgevoerd. Soms nochtans konden beide metingen op één dier uitgevoerd worden. In de laatste kolom worden de proefvoorwaarden in 't kort herhaald, en dikwijls de verhouding van chloraemie tot den totalen osmotischen druk aangeduid, voor dieren van een bepaalde proefserie.

Bij grootere proefreeksen worden in de graphieken enkel de variaties der uitslagen door een verticale lijn aangegeven. Waar statistische berekening noodig geacht werd, werd deze op de resultaten



uitgevoerd en de waarden  $M \pm 2 \sigma_M$  (middelbare fout — zie verder) op het graphiek naast de hoogergenoemde verticale lijn aangebracht in den vorm van  $\square$ , waarin het bovenste en onderste horizontale streepje, respectievelijk de waarden  $M + 2 \sigma_M$  en  $M - 2 \sigma_M$  aanduiden.

## I. INVLOED VAN UITWENDIGE FACTOREN

### 1. VOEDINGSTOESTAND.

Afgezien van het versnellen of het verlagen van het metabolisme, en dientengevolge van alle actieve osmoregulatie-mechanismen, blijkt de invloed van de voeding als zoutenbron op de regulatie van het inwendig milieu a priori waarschijnlijk.

Om dezen invloed te bepalen, werden enerzijds de invloed der voeding met vleeschpoeder, en anderzijds het effect van hongeren op den totalen osmotischen druk en op de chloride-concentratie van het dier nagegaan.

Het vleeschpoeder werd op de volgende wijze bereid: gemalen runderspier werd enkele minuten bewerkt met aceton, gedroogd in een oven op  $120^\circ$ , uitgetrokken met ether, en fijngewreven. Het verkregen poeder werd toegevoegd aan het water waarin de dieren verbleven. Dit water werd in de experimenten op Asellus nooit verlucht. De metingen werden 24 uur na de voeding uitgevoerd. Controle-dieren verbleven gedurende denzelfden tijd zonder voedsel.

Zooals blijkt uit bijgaande tabel, stijgt bij voeding de totale osmotische druk, terwijl de Cl<sup>-</sup>-concentratie daarentegen daalt.

Men zou zich kunnen afvragen of deze daling van het chloride-gehalte statistisch eenige beteekenis heeft. Men kan nu volgens DICE en LERAAS (zie SIMPSON en ROE) aannemen, dat in dit geval de waarschijnlijkheid van het opgaan van het verschil tusschen beide proefreeksen minder dan  $5/1000$  bedraagt, indien voor beide reeksen uitslagen de waarden der ordinaatlengten  $M + 2 \sigma_M$  en  $M - 2 \sigma_M$  niet over elkaar vallen. In deze formule is  $M$  = arithmetisch gemiddelde en  $\sigma_M$  de middelbare

fout (standard error of the mean). Op zijn beurt is  $\sigma_M = \sqrt{\frac{\Sigma (fd)^2}{N(N-1)}}$ ,

waarin  $\Sigma (fd)^2$  = de som der vierkanten van de afwijkingen van iederen afzonderlijken uitslag van het arithmetisch gemiddelde en  $N$  = het aantal resultaten.



Aldus hebben wij : chlorideconcentraties in aequivalenten van NaCl-oplossingen in o/oo :

1) voor hongerende dieren (zie tabel I nr. 1-7)

$$M + 2 \sigma_M = 5.37 + 2 \times 0.113 = 6.59$$

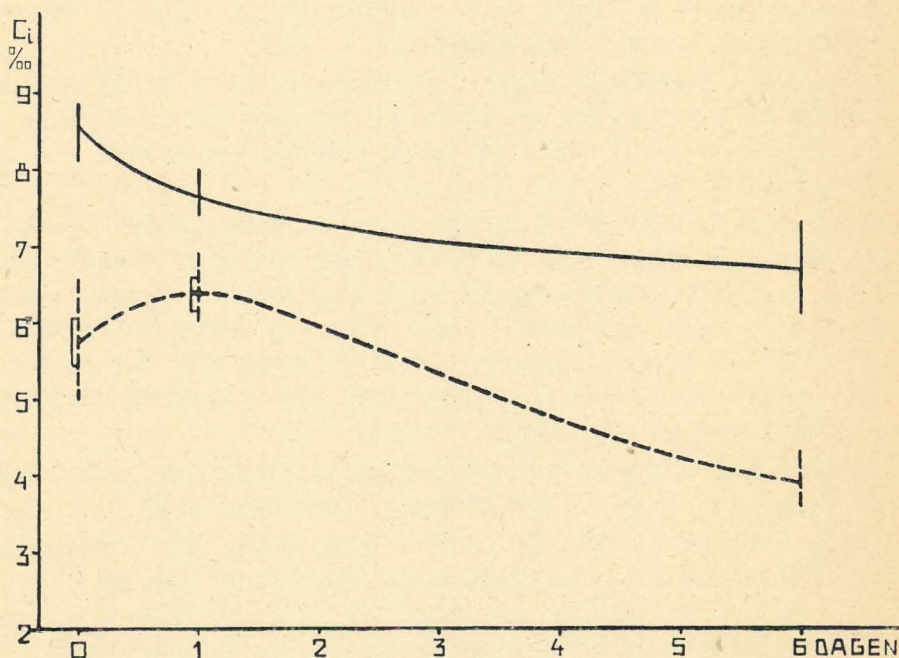
$$M - 2 \sigma_M = 6.37 - 2 \times 0.113 = 6.15$$

2) voor dieren 24 uren gevoed met vleeschpoeder zie (tabel I nr. 12-20) :

$$M + 2 \sigma_M = 5.77 + 2 \times 0.165 = 6.10$$

$$M - 2 \sigma_M = 5.77 - 2 \times 0.165 = 5.44$$

De ordinaatwaarden  $M \pm 2 \sigma_M$  die respectievelijk voor beide proefreeksen 6.59 — 6.15 en 6.10 — 5.44 bedragen overdekken elkaar dus niet, uit welk feit hun statistische waarde blijkt.



GRAPHIEK I

ASELLUS AQUATICUS : Effect van den voedingstoestand op :

— totale osmotischen druk

- - - chloride-concentratie

Op de abscis : aantal dagen, dat de dieren in honger toestand verkeeren

|| : geobserveerde verspreiding der osmotische waarden

[ ] :  $M \pm 2 \sigma_M$

TABEL I

Nr	Datum	Grootte	Tot. osm. dr. (1)	Chloride- con. (2)	Opmerkingen
1	26 Juni	9 mm.	—	6,1	mannetjes 24 uur hon- gerend.  } $\frac{\text{t. o. d.}}{\text{Cl}'} = 0,83$
2	»	8 mm.	—	6,6	
3	»	8,5 mm.	—	6,0	
4	»	8 mm.	—	6,8	
5	»	7,5 mm.	—	6,3	
6	27 Juni	12 mm.	—	6,6	
7	»	11,5 mm.	—	6,2	
8	1 Juli	12 mm.	7,72	—	
9	»	12 mm.	7,38	—	
10	»	12 mm.	7,51	—	
11	»	12 mm.	8,00	—	
12	1 Juli	8 mm.	—	5,3	mannetjes gedurende 24 uur met vleeschpoe- der gevoed.  } $\frac{\text{t. o. d.}}{\text{Cl}'} = 0,66$
13	13 »	9 mm.	—	6,15	
14	»	7,5 mm.	—	6,6	
15	2 Juli	13 mm.	8,75	6,0	
17	»	12 mm.	8,12	6,15	
18	3 Juli	8 mm.	—	5,7	
19	»	9 mm.	—	5,5	
20	»	8 mm.	—	5,0	

Op de graphieken werden genoemde ordinaat-waarden aangebracht door het teeken : ] naast de verticale lijn, die variaties der bekomen resultaten in een bepaalde proefreeks aangeeft.

Ingevolge de sterke daling der chloraemie, daalt bij voeding met vleeschpoeder het quotiënt  $\frac{\text{Cl}'\text{-conc.}}{\text{t. o. d.}}$  eveneens van 0.83 tot 0.66.

(1) De getallen geven de concentratie in gram per liter aan van NaCl-oplossingen met denzelfden osmotischen druk, als het onderzochte bloed.

(2) In gram per liter.



Anderzijds blijkt een duidelijk effect waarneembaar, wanneer men de dieren gedurende 5 dagen laat hooger. Na deze periode komt een daling voor van den totalen osmotischen druk, van gem. 0,765 % tot 0,67 %, terwijl de chloride-concentratie een nog sterkere daling ondergaat (van gem. 0,637 % tot 0,388), zoodat de verhouding  $\frac{\text{t. o. d.}}{\text{Cl}'}$  vermindert van 0,83 tot 0,56 (zie graphiek I).

De sterke daling van het Cl'-gehalte na de hongerperiode lijkt verklaarbaar. De toevoer van Cl-ionen door het voedsel is stopgezet, en het eventueel bestaande rechtstreeksch absorptiemechanisme is in zijn werking vertraagd door het dalende metabolisme, terwijl het dier toch steeds doorgaat urine, en bijgevolg Cl-ionen te excreteren. Blijkbaar compenseeren andere stoffen dit verlies aan Cl-ionen, zoodanig dat de totale osmotische druk in deze periode slechts weinig daalt ten opzichte der chloride-concentratie.

WIDMANN (1936) wier resultaten overigens niet met de onze overeenstemmen, nam bij *Asellus* en *Gammarus*, alsmede bij verschillende andere water- en vochtige-luchtcrustaceëen, eveneens een daling van den osmotischen druk waar. Men zal opmerken dat WIDMANN veel hogere waarden van den totalen osmotischen druk bij *Asellus* en *Gammarus pulex* bekam. Voor *Asellus* vond zij in Augustus een vriespuntverlaging van het bloed van  $\Delta = -0,937$ . Dit komt overeen met een totalen osmotischen druk van 1,47 % NaCl, d. i. ongeveer het dubbel van de door ons gevonden waarde. Ofschoon deze proefneming doorging bij een 5-7° hogere watertemperatuur, meenen wij toch deze resultaten sterk in twijfel te mogen trekken. Dit voornamelijk met het oog op de gebruikte methode. Immers WIDMANN had, om de noodige hoeveelheid bloed van *Asellus* te verzamelen, twee tot drie dagen nodig. Volgens metingen door ons ondernomen, vertoonde echter een druppeltje bloed, opgesloten in een met paraffine-olie dichtgestopt capillair glasbuisje, waarin verdamping dus onmogelijk was, reeds na 3 1/2 uren een stijging in den totalen osmotischen druk van 20 % der aanvangswaarde.

Dit feit veroorlooft ons, meenen wij, de resultaten van WIDMANN op verschillende Crustaceëen met de cryoscopische methode bekomen, voor zeer onnauwkeurig te houden, ofschoon de bewaring van het bloed bij lage temperatuur gebeurde.

Ook FRITZSCHE (1915) bemerkte reeds na één dag hongeren een sterke daling ( $\pm -0,10$ ) van den osmotischen druk bij *Daphnia magna*. Eveneens vindt BERGER (1931) een langzame doch gestadige daling van den osmotischen druk door hongeren bij *Astacus*.

De onderzoekingen van SCHWABE (1933) stemmen met deze bevindingen overeen. Tevens vond deze auteur een daling van den osmo-



tischen druk in hongertoestand bij *Eriocbeir sinensis*. Bij hetzelfde dier en in denzelfden toestand vond SCHOLLES (1933) een stijging van het Ca-gehalte ten opzichte van het Cl-gehalte in het bloed, terwijl het watergehalte onveranderd schijnt te blijven. Vermits volgens SCHWABE de totale osmotische druk daalt, moet men dus een sterke vermindering van het chloride-gehalte aannemen. Klaarblijkelijk spelen hier dus Ca-zouten de rol van hoogergenoemde compensatoren. Ook bij *Asellus* zou dit kunnen voorvallen, door mobilisatie der kalkconcrementen die het dier langs weerszijden van de mediodorsale lijn draagt. Deze Ca-zouten zouden dan bovendien, door vermindering der permeabiliteit die zij kunnen teweegbrengen, een rem stellen voor het overmatig chloride-verlies, bij ontbreken der zoutenbron die de voeding is. Ditzelfde veronderstelt SCHOLLES na bij hongerende *Potamobius fluviatilis* een stijging van het Ca-gehalte in de muskulatuur waargenomen te hebben.

De sterker uitgesproken verlaging van de chloride-concentratie ten opzichte van de daling in den osmotischen druk schijnt dus wel bij de crustaceën een meer voorkomend verschijnsel te zijn.

Een verhooging van den osmotischen druk bij voeding met runderbloed en wieren vond FRITZSCHE (1915) bij *Daphnia magna* en bij *D. pulex*. Het voederen met runderbloed echter verandert zeker de osmotische voorwaarden van het proefmilieu, zoodat uit die bepaalde proefnemingen geen zekere conclusies mogen getrokken worden.

## 2. VERLUCHTING.

Deze proef werd aanvankelijk gedaan om mogelijkerwijze bij zeer slechte verluchttingsvoorwaarden bij *Asellus* een deperditie van Cl-ionen vast te stellen, tengevolge van de hoogere frequentie der ademhalingsbewegingen van de kieuwen. Daartoe werd leidingwater tot op 40° onder verluchting verhit, en daarna terug afgekoeld tot op 10° in een dichtgestopten Erlenmeyer, zoodat men mag aannemen dat de zuurstofdruk in dit water zeer laag kwam te staan. Na afkoeling werden er 5 proefdieren in gebracht. Als controle-proef werden 5 proefdieren gebracht in leidingwater op 10°, waarin lucht gepompt werd. Dit laatste werd in al onze vorige proefnemingen niet gedaan.

De dieren, die gedurende 24 uren onder slechte voorwaarden van zuurstofdruk werden gehouden, vertoonden geen verschil in chloride-concentratie ten opzichte van dieren in normale proefvoorwaarden gehouden (zie tabel). Daarentegen vertoonden de dieren, die in sterk verlucht leidingwater gehouden waren, een sterke daling én van den totalen osmotischen druk, én van de Cl-concentratie. Het quotient chloride-conc./tot. osm. dr. ondergaat tevens een geringe daling van 0,83 op 0,74.



TABEL II  
Asellus aquaticus

Nr	Datum	Grootte	Tot. osm. dr. (1)	Chloride- conc. (2)	Opmerkingen
1	26 Juni	9 mm.	—	6,1	Water niet verlucht.  $\frac{Cl'}{t. o. d.} = 0,83$
2	»	8 mm.	—	6,6	
3	»	8,5 mm.	—	6,0	
4	»	mm.	—	6,8	
5	»	7,5 mm.	—	6,3	
6	27 Juni	12 mm.	—	6,6	
7	»	11,5 mm.	—	6,2	
8	1 Juli	12 mm.	7,72	—	
9	»	12 mm.	7,37	—	
10	»	12 mm.	7,51	—	
11	»	12 mm.	8,00	—	
12	22 Juli	10 mm.	—	5,45	water ver- lucht.  $\frac{Cl'}{t. o. d.} = 0,74$
13	»	9 mm.	—	4,95	
14	»	8 mm.	—	3,9	
15	»	8 mm.	—	4,55	
16	»	10 mm.	—	4,3	
17	24 Juli	9 mm.	—	4,0	
18	»	8 mm.	—	4,85	
19	»	9 mm.	—	3,6	
20	»	10 mm.	—	4,1	
21	29 Juli	8 mm.	5,97	—	
22	»	9 mm.	5,68	—	
23	»	9 mm.	6,30	—	
24	»	9 mm.	5,40	—	
25	22 Juli	8 mm.	—	5,8	water verhit en terug af- gekoeld.
26	»	8 mm.	—	6,4	
27	»	10 mm.	—	6,2	
28	»	10 mm.	—	6,6	
29	»	9 mm.	—	6,3	
30	»	dood			

(1) (2) Zelfde opmerkingen als voor tabel I.

Bekend zijn de ecologische verschillen tusschen *Asellus* en *Gammarus*. De eerste leeft steeds in zuurstofarm, de tweede daarentegen steeds in zuurstofrijk water. Dit verschil bracht ons ertoe ook *Gammarus pulex* op dit gebied te onderzoeken. Gebracht in leidingwater, dat zich in een dichtgestopten Erlenmeyer bevond, vertoonde dit dier inderdaad na 24 uren een interessante reactie, gansch verschillend van deze van *Asellus*. Een lichte neiging tot stijging van den totalen osmotischen druk, die echter niet beduidend mag genoemd worden, en een zeer sterke verlaging van de chloride-concentratie was er het gevolg van.

Stippen wij even aan dat gedurende dit experiment het bloed der proefdieren zeer donkerblauw werd, wat reeds uitwendig zichtbaar was. De dieren vertoonden op het einde der proef geen zwembewegingen meer. (Tabel III).

TABEL III

*Gammarus pulex*

Nr	Datum	Grootte	Tot. osm. dr. (1)	Chloride- conc. (2)	Opmerkingen
1	30 Juli	15 mm.	7,75	3,8	water niet verluht. Bloed zeer donker- blauw. $\frac{\text{Cl}'}{\text{t. o. d.}} = 0,53$
2	»	13 mm.	8,84	—	
3	»	15 mm.	7,14	4,4	
4	»	15 mm.	7,86	4,8	
5	»	14 mm.	—	3,6	
6-7	»	dood			
8	25 Juli	15 mm.	7,05	5,7	water ver- luht. Bloed blauw. $\frac{\text{t. o. d.}}{\text{Cl}'} = 0,81$
9	»	14 mm.	6,99	6,0	
10	»	15 mm.	6,75	5,2	
11	»	14 mm.	7,63	6,2	
12	»	13 mm.	7,84	6,4	

(1) (2) Zelfde opmerkingen als voor tabel I.



Aan de hand van deze feiten lijkt het ons voorbarig de daling (resp. stijging) der chloride-concentratie bij *Asellus* (resp. *Gammarus*) aan een welbepaalde oorzaak te willen wijten.

Het blijft inderdaad mogelijk dat b.v. de opgemerkte daling in het chloride-gehalte in verband met de verhoogde waterbewegingen, toch het gevolg zou zijn van een deperditie van ionen.

Anderzijds kan ook een verhoogde stofwisseling de oorzaak van de opgemerkte — en tegengestelde — veranderingen bij *Asellus* en *Gammarus* zijn.

#### §. SALINITEIT.

Voor de studie van den invloed der samenstelling van het uitwendig milieu op de totale concentratie en de Cl'-concentratie van het uitwendig milieu, werd gebruik gemaakt hetzij van leidingwater, hetzij van natuurlijk zeewater, die tot de beoogde concentraties eventueel verdund werden met gedestilleerd water.

a. *Asellus aquaticus*. In de maanden Juni-Juli werden een reeks proefnemingen met dit dier ondernomen, waarbij enkel mannetjes werden gebruikt.

De overvoering in de verschillende uitwendige concentraties geschiedde steeds zonder overgang, van uit leidingwater naar het bepaalde uitwendige milieu. Als uitgangspunt diende ons de concentratie van het bloed in niet verlucht leidingwater.

Bij verdunning van het uitwendig milieu door toevoegen van 1 deel gedestilleerd water aan 1 deel leidingwater, blijkt de totale osmotische druk van het bloed niet noemenswaardig te dalen. Het Cl-ionenverlies is daarentegen tamelijk uitgesproken, met een groote verspreiding nochtans. Dit schijnt op sterke individuele verschillen te duiden aangaande het resistentievermogen tegen zoutverlies in verdunde media. Deze verspreiding schijnt niet te bestaan voor den totalen osmotischen druk. Vermits de beide concentraties in dezelfde dieren gemeten worden, moet men aannemen dat bij verdunning van het uitwendig milieu de compensatie door andere (organische?) stoffen aan de individuele behoeften aangepast worden. Bij verhooging der concentratie van het uitwendig milieu, zien we eerst bij verdund zeewater van 0,7 % NaCl, den totalen osmotischen druk stijgen. De vermindering van het quotiënt chloride-conc./tot. osm. d. van 0,83 op 0,75 wijst echter op een poging tot constant houden van den totalen osmotischen druk, door een relatieve verlaging van Cl'-gehalte.



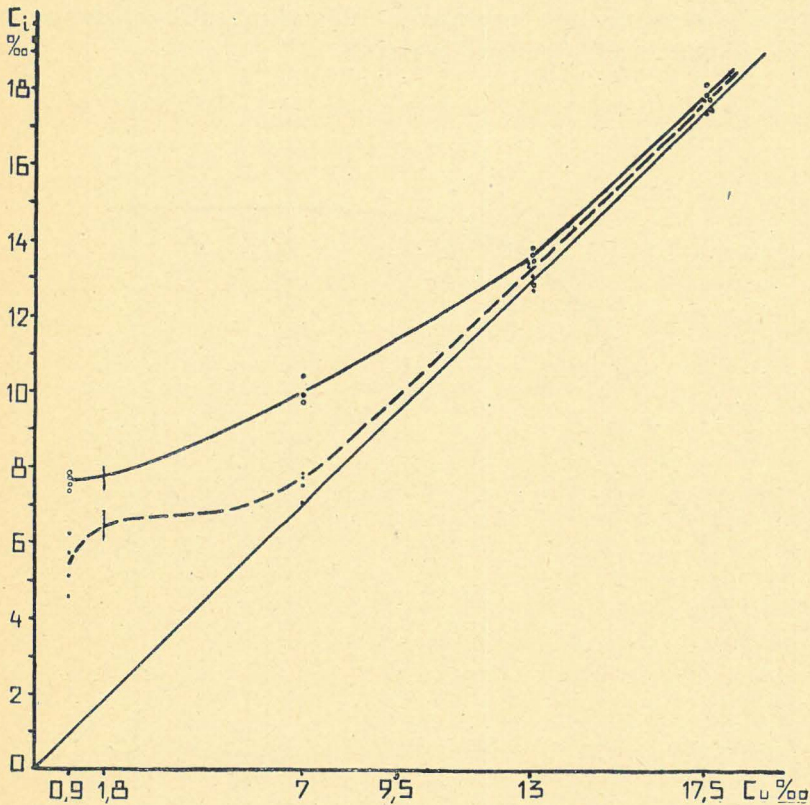
Vanaf dit punt tot hogere concentraties verhoogt dezelfde verhouding snel. Het bedraagt in 0,7 % : 0,75

1,3 % : 0,99

1,75 % : 0,99.

De totale osmotische druk wordt dus meer en meer uitgemaakt door chloriden alleen, wat een gelijkworden beduidt aan het uitwendig milieu. Nochtans blijft de totale osmotische druk steeds eenigszins hypertoonisch ten opzichte van het uitwendig milieu.

Op de concentratie 1,75 % die ongeveer overeenkomt met half verdund zeewater, kwamen sterfgevallen voor, en geraakten de dieren in minder goeden toestand. Dientengevolge werd hier het experiment afgebroken. De gegevens werden samengevat in graphiek II.



GRAPHIEK II

ASELLUS AQUATICUS : Regulatie van ——— totalen osmotischen druk  
 — — — chloride-concentratie  
 in functie van de uitwendige concentratie ( $C_u$ ).

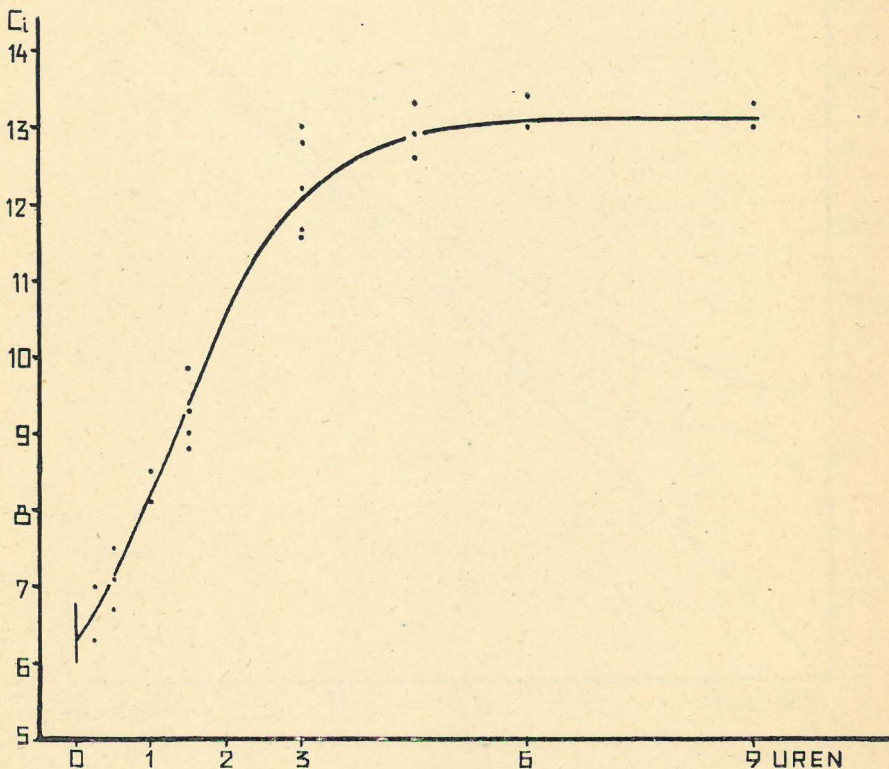


Het chloride-gehalte werd eveneens gemeten, voor een uitwendige concentratie van 0,7 % na verblijf in dit milieu van 6 dagen. Uit de volgende getallen blijkt dat het Cl'-gehalte na dien tijd niets veranderd is.

Na 24 uur	Na 6 dagen
0,77 %	0,79 %
0,70 %	0,76 %
0,75 %	0,81 %
0,78 %	

Na 24 uur blijkt dus wel een dynamische evenwichtstoestand (steady state) te zijn ingetreden. Dit blijkt trouwens duidelijk uit een volgende proefneming :

Ten einde na te gaan op welke manier *Asellus* de hypertoniciteit bij hogere zoutconcentraties tot stand brengt, werden een aantal proefdieren vanuit leidingwater plotseling in zeewater van 1,3 % NaCl overgebracht. Op verschillende tijdstippen volgend op dit overbrengen werd bij enkele dieren het Cl'-gehalte bepaald.



GRAPHIEK III

ASELLUS AQUATICUS : ————— : chloraemie na overbrenging in 1,3 ‰ zeewater, in functie van den tijd.



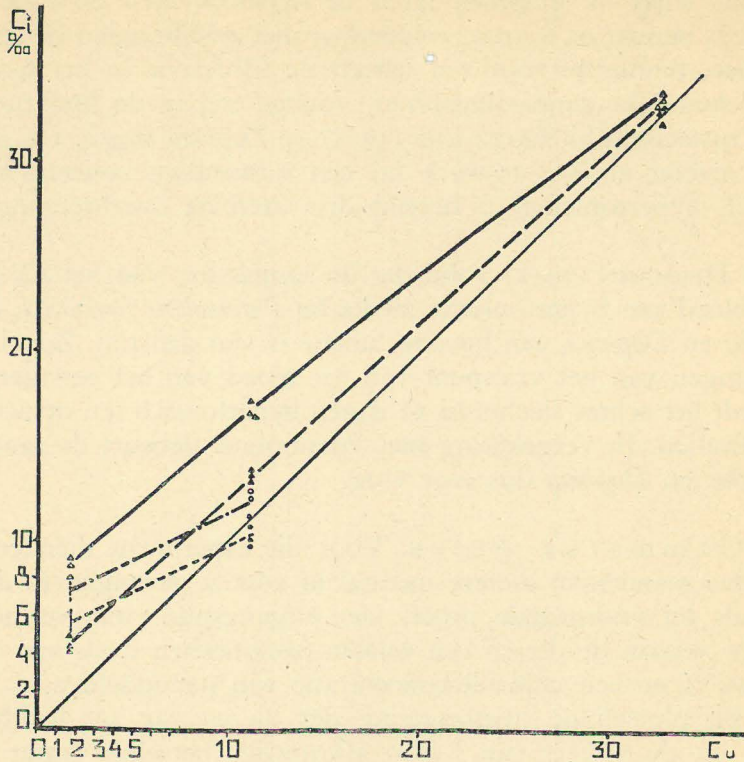
Zooals blijkt uit graphiek III is de hypertoniciteit door de proefdieren reeds bereikt na 6 uren, volgend op het overbrengen in het zoutrijke milieu, tenminste voor wat betreft de Cl'-fractie in het bloed.

Een dergelijke aanpassingsproef, vonden wij in de literatuur aan gaande Crustaceeën bij FRITZSCHE (1915) op *Daphnia magna*. Hij ging op dezelfde manier als wij te werk bij een uitwendige concentratie van 0,70 NaCl. Hypertoniciteit is bereikt drie uren na overbrenging in dit milieu.

Ook HERMANN (1931) vond dat de aanpassing van het Cl'-gehalte van het bloed aan hypertonische media bij *Potamobius fluviatilis*, evenals bij *Asellus* en *Daphnia*, een lineaire functie is van den tijd. Zooals bleek uit bepalingen van het vriespunt van het bloed van het eerstgenoemde dier, wordt het echter slechts na 32 dagen hypertonisch ten opzichte van het proefmilieu. In vergelijking met *Potamobius* gebeurt de aanpassing van *Asellus* en *Daphnia* dus zeer vlug.

b. *Gammarus pulex*. Voor dit experiment dienden eveneens slechts mannelijke dieren, meestal in copula gevangen in dezelfde periode als bij voorgaande proef. Het uitgangspunt was verlucht leidingwater waarin de dieren een totalen osmotischen druk van gemiddeld 0,726 % en een chloride-concentratie van gemiddeld 0,59 % vertoonden. Bij plotselinge overbrenging der dieren van uit leidingwater in water uit de vijvers van Lilloo afkomstig (hetzelfde water waarin *Gammarus locusta* gevangen werd) dat een totalen osmotischen druk van 1,12 % en een chloride-concentratie van 1,00 % bleek te bezitten, verhoogde de totale osmotische druk bij het proefdier tot gemiddeld 1,203 % en de chloride-concentratie tot 1,083 %. Tegelijkertijd verhoogt het quotiënt chloride-conc./tot. osm. dr. van 0,81 tot 0,84. Zoowel wat betreft de totale concentratie, als voor de Cl'-concentratie blijkt het dier dus nog hypertonisch ten opzichte van het milieu te zijn. Op dit punt waren de dieren echter in een zeer slechten toestand en vele sterfgevallen kwamen voor. Het experiment werd niet verder doorgezet (zie graphiek IV).





GRAPHIEK IV

GAMMARUS PULEX : Regulatie van osmotischen druk (—•—•—•—) en chloride-concentratie (.....) in functie van uitwendige concentratie ( $C_u$ )

GAMMARUS LOCUSTA : id. tot. osm. dr. (————); chloride-conc. (-----)

e. *Gammarus locusta* (zie graphiek IV). Als uitgangspunt diende hier steeds het milieu waarin het dier gevangen werd (t. o. d. : 1,122 ‰; chloride-conc. : 1,00 ‰). Van daaruit werd het in de onderscheiden proefmilieu's gebracht. Het water werd steeds verlucht. De proef werd gedaan in de maand Juli.

Bij overbrenging der dieren in leidingwater dalen osmotische druk en chloridegehalte zeer sterk. De eerste bereikt een peil, eenigszins hooger gelegen dan dat van *Gammarus pulex* in hetzelfde milieu, nl. gemiddeld 0,86 ‰. De chloride-concentratie daalt tot onder het peil door dit laatste dier in dit milieu ingenomen (gemiddeld 0,456 ‰). De verhouding chloride-conc. / tot. osm. dr. daalt dus in aanzienlijke mate (van 0,77 tot 0,52).



Bij overplaatsing van *Gammarus locusta* in zeewater verhoogt dit quotiënt echter van 0,77 tot 0,98. De proefdieren zijn in dit milieu nog steeds hypertonisch en zijn nog zeer levendig.

Zooals blijkt uit bovenstaande proefnemingen volgen *Asellus*, *Gammarus pulex* en *Gammarus locusta* de concentratieveranderingen van het milieu, steeds nochtans een zekere hypertoniciteit bewarend. We noemen ze « homoiosmotisch » in den breedten zin zooals KROGH (1939) aangeeft. We kunnen ze voor hogere concentraties ook « actief poikilosmotisch » noemen met HARMS (1933) (geciteerd naar WIDMANN).

Zeer duidelijk blijkt uit onze proefnemingen de verhooging van het quotiënt chloride-conc./tot. osm. dr. dat gradueel met de verhooging van de uitwendige concentratie vermeerdert. De rol der Cl<sup>-</sup>-ionen is zeer duidelijk : ze worden uit het uitwendige milieu opgenomen om de hypertoniciteit boven de omgeving in stand te houden.

Hetzelfde feit werd door WIGGLESWORTH (1938) reeds opgemerkt voor *Culex*- en *Aedes*-larven. Nochtans gebeurt deze vermeerdering slechts voor hogere concentraties. De chloriden blijven hier tot voor een hoogste concentratie, waarover het experiment loopt, hypotonisch ten opzichte van het milieu. Deze auteur merkte tevens het feit op der compensatie door de niet-chloridenfractie in den loop van dit experiment, zooals dit duidelijk blijkt uit onze proef op *Asellus* in verdund leidingwater.

Ook voor *Carcinus maenas* vond NAGEL (1934) een constante verhooging der niet-chloriden-fractie in de totale bloedconcentratie bij voortschrijdende verhooging der uitwendige concentratie.

Bij *Carcinus* is deze verhouding :

voor een uitw. conc. van 1,20 ‰ = 0,76

» » » » » 3,24 ‰ = 0,95.

Volgens KROGH (1939) zijn de Cl<sup>-</sup>-concentraties echter waarschijnlijk te hoog, zoodat de aangegeven waarden eveneens moeten verlaagd worden.

Ongeveer hetzelfde vond ook DUVAL (1925) (de visschen nog terzijde gelaten), bij de in zee levende *Platycarcinus pagurus*.

De verhoudingen zijn bij dit dier als volgt :

in 4,034 ‰ zeewater : 0,95

in 2,056 ‰ zeewater : 0,78.

Volgens DUVAL's gegevens zou het quotient in 3,14 ‰ zeewater echter 0,98 bedragen. Misschien ligt dit echter wel aan een experimenteele fout.

Dit feit schijnt ons dus wel algemeen voor te komen bij de Crustaceën, tenminste bij de « actief poikiolosmotische ».

In tegenstelling met andere euryhaliene (in de natuur over groote concentratievervallen voorkomende) crustaceën zooals *Leander serratus*



en *Palaemonetes varians* (PANIKKAR — 1940), *Eriocheir sinensis* (CONKLIN & KROGH — 1938) en *Crangon crangon* (BROEKEMA — 1941) die in zeewater hypotonisch zijn, blijkt *Gammarus locusta* daarentegen steeds hypertonisch ten opzichte van het omgevende medium te blijven.

Hetzelfde vond BOGUCKI (1932) verwezenlijkt bij het brakwaterdier *Chirodotea* (*Mesidotea*) *entomon* (geciteerd naar KROGH — 1939) en WIDMANN (1935) bij *Gammarus marinus*.

Onder de zoetwatercrustaceën vond deze auteur ook reeds bij *Asellus* waarvan reeds PLATEAU (1871) en GRESENS (1928) vastgesteld hadden dat hij zeer tolerant is ten opzichte van hoge zoutconcentraties, een hypertoniciteit verwezenlijkt bij een uitwendige concentratie van 0,85 %. Deze hypertoniteit was sterker dan deze door denzelfden auteur opgemerkt, verwezenlijkt bij *Gammarus pulex*. Deze waarden zijn echter, ook door de technische fouten in de methode, veel te hoog. *Daphnia magna* blijft eveneens steeds hypertonisch, volgens de onderzoeken van FRITZSCHE (hij experimenteerde tot op een zoutconcentratie van 0,7 % NaCl).

Isotoniteit bij hoogere concentraties van het uitwendige milieu werd waargenomen door DUVAL (1925) op *Telphusa*.

De vraag is echter of in al deze aangehaalde proefnemingen een evenwichtstoestand is bereikt. Schijnbare tegenstellingen bij verschillende auteurs blijken inderdaad daarop te wijzen. Zoo vond DUVAL (1925) bij *Potamobius flumiatilis* een sterke hypotoniteit bij verhoogde uitwendige concentratie, na 24 uren verblijf in de onderscheiden media. Hij betwijfelt echter zelf of er op dezen tijdduur een volledige uitwisseling tusschen in- en uitwendig milieu heeft kunnen plaats grijpen. Inderdaad vond dan ook HERMANN (1931) een veel steiler verloop der osmoregulatiecurve op hetzelfde dier, na een proefduur van vijf weken, zooals hooger reeds aangehaald.

Reeds toonden wij aan, dat bij *Asellus*, en waarschijnlijk ook bij de andere crustaceën door ons onderzocht, deze aanpassingsduur veel korter is, en onze curven dus den evenwichtstoestand aangeven.

Terwijl dus voor brakwatercrustaceën geen algemeene regel voorop te stellen is, schijnt men te kunnen aannemen, dat de zoetwatercrustaceën, overgebracht in media met hoogere zoutgehalten steeds hypertonisch of tenminste isotonisch blijven.

#### 4. TEMPERATUUR.

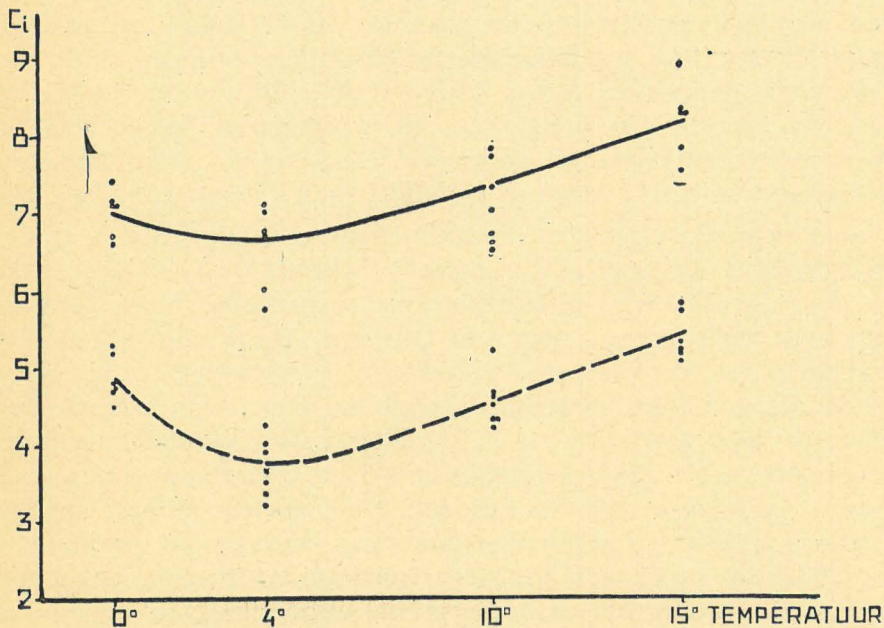
De invloed van de temperatuur op den totalen osmotischen druk en Cl<sup>-</sup>-concentratie van het bloed gingen wij na bij *Gammarus pulex* in



October. De praecisie van den osmometer gedurende deze proefnemingen was echter gedaald op 1,4 %.

De bepaling van den totalen osmotischen druk en van het chloride-gehalte werden iedermaal uitgevoerd op hetzelfde dier, na verblijf van dit laatste gedurende 24 uren op de aangegeven temperatuur zonder voedsel. Voor de temperaturen 0° en 10° werd gebruik gemaakt van een kamertje, constant gehouden op  $\pm 0,5^{\circ}$  na. Constante temperaturen van 4° en 15° werden bereikt met behulp van thermostaten nauwkeurig op 1/10° na: respectievelijk in een kamertje op 0° en 10° geplaatst. Het proefmilieu (leidingwater) werd verlucht.

Zooals duidelijk blijkt uit graphiek V, vertoonen én de chloride-concentratie én de totale osmotische druk een minimum voor een temperatuur rond 4°. En voor lagere en voor hoogere temperaturen, stijgt de chloride-concentratie. Deze stijging is meer uitgesproken voor lagere temperatuur.



GRAPHIEK V

GAMMARUS PULEX : Invloed der temperatuur op den totalen osmotischen druk (—) en chloride-concentratie (---)

Op *Asellus* verkregen wij hetzelfde temperatureffect op de chloride-concentratie, nochtans een weinig minder sterk uitgesproken. Hierbij



werd eveneens opgemerkt dat *Asellus* beter aan hoogere temperatuur weerstaat.

Een vergelijking van de verhouding  $\frac{Cl'}{\text{tot. osm. dr.}}$  op de verschillende temperaturen bij *Gammarus*, doet het reeds opgemerkte verschijnsel weer uitkomen, nl. dat de totale osmotische druk in functie van variërende uitwendige omstandigheden, meer constant blijft dan de chloride-concentratie onder dezelfde voorwaarden.

De betreffende waarden zijn nl. de volgende :

op 0° :	0,69
op 4° :	0,56
op 10° :	0,63
op 15° :	0,65.

Dit wijst eens te meer op een compensatie door de niet-chloride-fractie.

Men vraagt zich onmiddellijk af of dit verschijnsel, nl. het voorkomen van minimum-osmotische waarden van het bloed op 4°, algemeen is. In nog niet gepubliceerde proefnemingen vonden wij echter dat de totale osmotische druk, alsmede de chloride-concentratie bij *Gasterosteus aculeatus*, in functie van de temperatuur integendeel een weinig convex naar boven toe verlopen. De chloride-concentratie stijgt daarenboven tusschen + 2° en 10° gemiddeld van 3,75 tot 5,75 ‰ NaCl.

Geen bepalingen op het chloridgehalte van het bloed in functie der temperatuur zijn ons bij Crustaceën bekend. Ook bij geen enkel ander dier bestaan er aanduidingen van osmotische bijzonderheden bij 4°. Een waarneming echter van GRESENS (1928) schijnt met onze bevindingen op de Crustaceën overeen te stemmen. Deze auteur bepaalde het gemiddeld weerstandsvermogen tegen een zoutoplossing van 2,5 ‰ (voor *Asellus* van 7,5 ‰) NaCl op verschillende temperaturen tusschen 40° en 0°. Hij experimenteerde met *Glossosiphonia complanata* JOHNSEN, *Herpobdella atomaria* CARENA, *Dendrocoelum lacteum* MUELLER en *Asellus aquaticus*. Het uithoudingsvermogen vertoont een maximum bij 5° terwijl het bij hoogere en bij lagere temperaturen afneemt. Enkel voor *Asellus* bepaalde hij jammer genoeg niet het uithoudingsvermogen bij 0°.

BROEKEMA (1941) bepaalde de conductiviteit van het bloed van *Crangon crangon* L. bij temperaturen 3-5° en 20-22° in verschillende media. Er werd geconstateerd dat tusschen deze temperaturen de conductiviteit van het bloed stijgt zoolang het dier in een hypotonisch milieu leeft. Deze temperatuursverhoging heeft echter het tegenovergestelde effect, zoodra de dieren in hypertonisch midden worden gebracht : de conductiviteit daalt nl. onder deze voorwaarden.



Groter in aantal zijn de gegevens in de literatuur omtrent metingen van den totalen osmotischen druk in functie van de temperatuur.

ORTO (1934) hield verschillende exemplaren van de brakwater-decapode *Heteropanope tridentata* in gevangenschap. Na 60 dagen bemerkte hij een plotselinge daling in den osmotischen druk der krabben. Terzelfder tijd bewerkt deze daling de dood van een groot aantal individuen. Het eerst stierven de dieren die in leidingwater gehouden werden, daarna deze in brakwater. De dieren zittend in meer zoutrijk water bleven in leven. Orto wijt deze daling van den osmotischen druk aan de stijging van de temperatuur; wij denken hierbij eerder aan een invloed van het inzetten der geslachtsrijpheid. Trouwens Orto (1937) constateerde zelf dat deze verlaging in den osmotischen druk slechts ten deele kan opgeheven worden door blootstellen aan lagere temperatuur, bij *Eriocheir*, waar hetzelfde gebeurt. Voor jonge specimen van *Eriocheir*, in zoetwater, vond Orto (1937) dat echter ook in dit geval een verhooging der temperatuur een vermindering van den osmotischen druk tengevolge heeft. Hij volgde dit phenomeen bij een aantal individuen, welke achtereenvolgens op de temperaturen, 4°, 24° en 4° werden gebracht. Alle individuen vertoonden een vermindering in den osmotischen druk van het bloed na overbrenging van 4 tot 24°. De daaropvolgende overbrenging van 24° tot 4° veroorzaakte een verhooging der bloedconcentratie bij drie dieren van de zes. In de andere greep geen verandering plaats.

BATEMAN (1933) vond bij de temperaturen 2,3 en 15,7° slechts zeer kleine verschillen in den osmotischen druk van het bloed van *Carcinides maenas*; bij een temperatuur van 15,7° was de osmotische druk een weinig lager dan bij 2,3°. Men merkt op dat met deze resultaten het steeds mogelijk blijft, dat de temperatuurcurve van den totalen osmotischen druk er bij deze dieren ook zou uitzien als bij *Daphnia*.

De reeds bekende feiten laten ons dus ook niet toe te besluiten dat de gevonden verschijnselen bij *Gammarus* en *Asellus* algemeen bij lagere dieren zouden voorkomen. Deze generalisatie zou eventueel kunnen doen besluiten tot een relatie tusschen het voorkomen van een minimum in de osmotische waarden op 4°, en de speciale eigenschappen van water op dezelfde temperatuur. Het zou inderdaad kunnen zijn dat water bij 4° een grootere diffusievemogen heeft dan op elke andere temperatuur, omdat op deze temperatuur het water bijna geheel in enkelvoudige molekulen is gedissocieerd, terwijl bij hogere en bij lagere temperaturen, molecuul-groepen gevormd worden, die zekere eigenschappen gemeen hebben met polymoleculen.

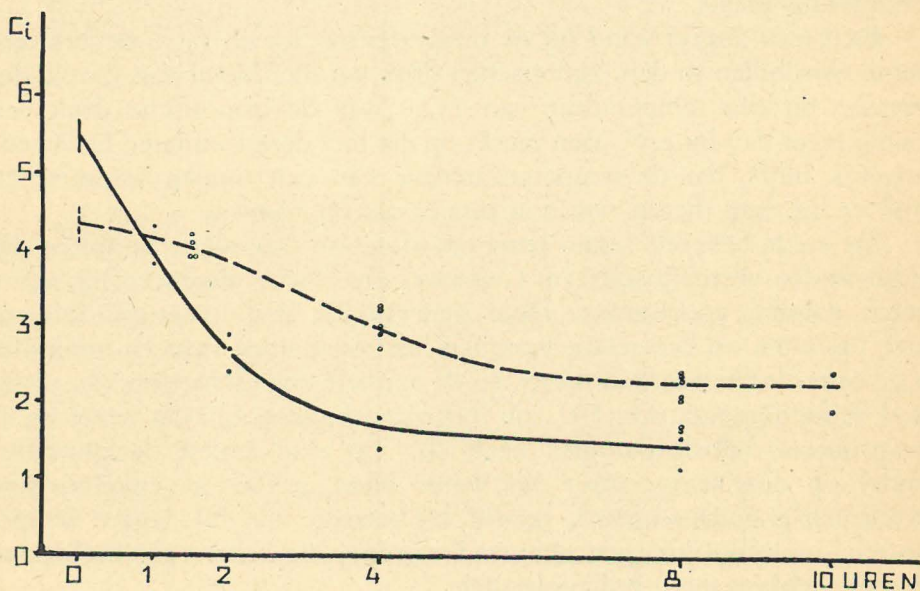
Desalniettemin is het een feit dat *Asellus* en *Gammarus*, evenals alle zoetwaterdieren homoiosmotisch zijn in dit milieu, d. i. dat ze actieve mechanismen bezitten om hun bloedconcentratie boven de concentratie



der omgeving te houden. De zoutspiegel op 4° kan dus, evenmin als op andere temperaturen, een resultante van louter passieve verschijnselen zijn.

Indien het waar is dat de osmoregulatiemechanismen dezelfde afhankelijkheidscurve van de temperatuur vertoonen als hun resultanten, die de verschillende concentraties op de onderscheiden temperaturen zijn, dan zal b.v. het rechtstreeksch zoutabsorptievermogen uit de omgevende oplossing, bij *Asellus* hooger moeten zijn op 0° dan op 10°, vermits ook het Cl<sup>-</sup>-gehalte op deze temperaturen dezelfde relativiteit vertoonen.

Om dit na te gaan werd *Asellus* eerst op 0° en dan op 10° uitgewassen met gedestilleerd water. Ieder dier werd daartoe in een afzonderlijk hokje geplaatst. Op dezelfde manier gingen we te werk om de dieren Cl-ionen te laten reabsorberen uit leidingwater. Zooals de graphieken VI en VII aanduiden, gaven de resultaten het tegenovergestelde van onze verwachtingen. De uitwassing bij 10° was langzamer dan bij 0°. Op twee uren tijd verloren de dieren reeds meer dan 50 % van hun chloriden bij 0° terwijl bij 10°, na 4 uren slechts 30 % verdwenen zijn. Na 8 uren uitwassing in gedestilleerd water op 0°, bevinden zich alle proefdieren in een zeer slechten toestand en is alle turgor uit de lichamen verdwenen. De dieren na 10 uren uitwassing op 10° zijn nog normaal.

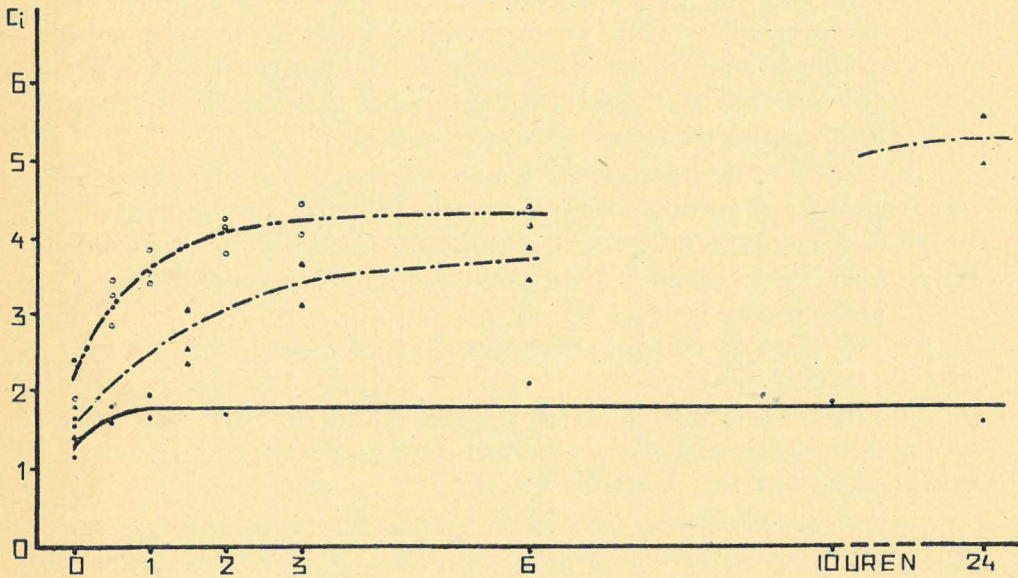


GRAPHIEK VI

ASELLUS AQUATICUS : Invloed van uitwassing met gedestilleerd water bij 10° (-----) en 0° (————) op de chloride-concentratie



De reabsorptie van chloriden in leidingwater geschiedde na 10 uren (resp. 8 en 4 uren) uitwassing in gedestilleerd water bij een temperatuur van 10° (resp. 0°). Deze reabsorptie bleek zeer vlug te geschieden op 10°. Na 3 uren reeds hebben de dieren hun normaal peil weerom bereikt. De reabsorptie gebeurt heelemaal niet meer op 0° bij dieren die voorafgaandelijk gedurende 8 uren werden uitgewassen bij dezelfde temperatuur. Zij gebeurt nog wel na uitwassing van 4 uren, doch dan zeer langzaam. Na 6 uren is nog slechts 1/3 van de hoeveelheid verloren zouten terug opgenomen. Na 24 uren is het vroeger peil echter weer bereikt.



GRAPHIEK VII

ASELLUS AQUATICUS : Overbrenging in leidingwater na uitwassing, van 10 uur bij 10° (---) en van 8 uur (—) en 4 uur (—) bij 0°

Hiermede is aangetoond dat noch het vermogen om het zout vast te houden, zooals blijkt uit de uitwassingsproeven, noch het absorptievermogen van zouten, dezelfde temperatuur-afhankelijkheid vertoonen als mocht verwacht worden volgens de curve der chloride-gehalten en we dus zodoende ook deze laatste curve niet kunnen verklaren. Het probleem blijft voor verdere discussie open, wanneer nieuw feitenmateriaal ons dit zal toelaten.



## II. INVLOED VAN INWENDIGE FACTOREN

Na de voorgaande analytische studie van de verschillende invloeden die een aantal milieufactoren kunnen uitoefenen op den totalen osmotischen druk en de Cl<sup>-</sup>-concentratie van het inwendig milieu van de proefdieren, wordt het mogelijk een onderzoek in te stellen aangaande eventuele cyclische verschijnselen in hoogergenoemde waarden, te voorschijn geroepen door een of ander physiologisch rythme in het levende systeem. Hiervoor komt voornamelijk in aanmerking de sexueele cyclus.

Het is duidelijk dat dergelijke rhythmische verschijnselen, slechts kunnen aangetoond worden indien proefnemingen uitgevoerd worden op verschillende tijdstippen van het jaar, met inachtneming van de bestudeerde uitwendige milieufactoren, zoodat deze laatste op de verschillende tijdstippen constant gehouden worden.

Bij *Asellus aquaticus* blijken schommelingen in de Cl<sup>-</sup>-concentratie voor te komen in verband met den jaarlijkschen cyclus. Inderdaad bedraagt de Cl<sup>-</sup>-concentratie in Maart onder standaardvoorwaarden (niet verlucht leidingwater op 10°, na 24 uren hongeren) gemiddeld 0,43 % (7 ex. tusschen 0,40 en 0,45 %).

In Juni-Juli daarentegen bedraagt dezelfde waarde 0,63 % (7 ex. tusschen 0,60 en 0,66 %).

De onderzochte dieren waren mannetjes (op twee na; zie verder); de waarde van den totalen osmotischen druk is ons slechts bekend voor de maanden Juni-Juli (gemiddeld 0,765 %).

*Gammarus pulex* vertoont onder standaard-voorwaarden in Juni-Juli een totalen osmotischen druk van 0,725 % chloride-concentratie van 0,59 % (gemiddelden van 5 dieren).

In October bedroegen deze waarden respectievelijk 0,715 % en 0,45 % (zie temperatuurcurve — 10°). Uit gegevens waarover wij beschikken omtrent de chloride-concentratie van dit dier in Maart bij 19° en 4°, blijkt deze waarde op dit tijdstip hoogstwaarschijnlijk te liggen tusschen 0,4 en 0,6 %, met een gemiddelde van  $\pm 0,5$  %.

Bij *Gammarus pulex* komt dus een lichte daling voor van den totalen osmotischen druk van Juli tot October, terwijl de Cl<sup>-</sup>-concentratie van Maart tot Juli stijgt, om daarna weer te dalen in October. Deze veranderingen zijn onafhankelijk van uitwendige factoren, die in al de proefnemingen constant gehouden werden (verlucht leidingwater op 10° na 24 uren hongeren).

Onderstaande tabel geeft van de uiteengezette proefnemingen een overzicht (in % NaCl).



Tijdstip	<i>Asellus</i>		<i>Gammarus</i>	
	t. o. d.	Cl—	t. o. d.	Cl—
Maart	—	0,43	—	0,5
Juni-Juli	0,765	0,63	0,725	0,59
October	—	—	0,715	0,45

Niettegenstaande al onze proefnemingen op 10° genomen werden, zou men hierbij eerst aan een langdurig temperatuureffect kunnen denken. Zooals wij verder zullen zien, stijgt ook de chloride-concentratie bij stijgende temperaturen, tenminste bij deze temperaturen die hier in aanmerking zouden kunnen komen. Inderdaad zou aldus een langdurige inwerking van steeds warmere temperaturen in de maanden Maart-Juli, een invloed op de chloride-concentratie kunnen gehad hebben, die gedurende de proefduur (24 uren) bij blootstelling aan lagere temperatuur niet zou verdwijnen.

Deze veronderstelling schijnt echter niet houdbaar te zijn, gezien de uitslagen van het volgend experiment :

Indien we in de maand Juli, wijfjes met sterk vooruitwolvend marsupium, onder standaardvoorwaarden brengen, blijken ze een chloride-concentratie te bezitten die even laag gelegen is als bij de dieren in Maart. (0,45 % = gemiddelde van 4 dieren), terwijl de totale osmotische druk ongeveer dezelfde blijft als bij de mannetjes in Juni-Juli. Het verschil in de verhouding chloride-concentratie/tot. osm. dr. is aldus groot voor mannetjes en wijfjes met marsupium voor hetzelfde tijdstip (0,83 tegen 0,62).

Indien we verder er onze aandacht op vestigen, dat zich tusschen de proefdieren in Maart twee wijfjes met marsupium bevonden met resp. 0,42 % en 0,45 % Cl'-concentratie, dan komen we tot de vaststelling, dat enkel de mannetjes gedurende de maanden Maart-Juli een stijging in hun Cl'-concentratie vertoonen. Ofschoon de wijfjes dezelfde temperatuurinvloeden gedurende deze maanden ondergaan, vertoonen zij geen dergelijke stijging. Wij kunnen dus vrij waarschijnlijk besluiten dat de stijging in de chloride-concentratie gedurende de maanden Maart-Juli in samenhang is met den sexueelen cyclus, indien men tenminste niet veronderstelt dat de wijfjes geen temperatuureffecten zouden ondergaan, wat ons ten zeerste onwaarschijnlijk lijkt.

Van welken waard deze correlatie met den sexueelen cyclus zijn



zou is moeilijk uit te maken. Inderdaad komen er geen *uiterlijke* veranderingen voor in de sexueele activiteit, noch bij wijfjes, noch bij mannetjes, gedurende de bewuste periode. Op beide tijdstippen werden inderdaad mannetjes in copula aangetroffen en in de proefnemingen gebruikt, terwijl wijfjes met marsupia gedurende heel deze periode voorkomen. Niets echter dwingt er ons toe aan te nemen dat de veranderingen in osmoregulatie in correlatie moeten zijn met *uitwendige* sexueele activiteiten. Zij zou eveneens kunnen samenhangen met voortschrijdende of verminderende spermatogenese of beide; sexueele activiteiten en osmoregulatie zouden kunnen parallel afhangen van een hooger centrum, dat beider werking zou bepalen, analoog nl. aan het mechanisme, zooals het waarschijnlijk bij vertebraten voorkomt, waar beide activiteiten aan de hypophyse onderworpen zijn.

Reeds WIDMANN zocht naar periodische veranderingen in het bloed bij water- en vochtige-luchtcrustaceën. Klaarblijkelijk worden echter de invloeden van uit- en inwendige factoren verward. De bedoelde veranderingen worden in ieder geval nooit nagegaan onder constante voorwaarden. Wij wezen hooger reeds op de overige tekortkomingen in deze metingen.

Bij *Gammarus* bekam zij volgende cijfers voor de waarden van den totalen osmotischen druk.

op 14-II-'33	:	1,423	% (mannetjes)	t. 8°
op 20-IV-'32	:	1,205	% ( » )	t. 12 — 13°
op 19-IV-'32	:	1,206	% (wijfjes)	t. 12 — 13°
op 14-IV-'32	:	1,203	% (mannetjes)	t. 11 — 17°
op 16-VIII-'32	:	1,067	% ( » )	t. 18°
op 15-VIII-'32	:	1,061	% (wijfjes)	t. 18°.

Daargelaten het feit dat de gevonden waarden veel te hoog zijn, ontstaan deze laatste uit een interactie van temperatuurinvloeden en veranderingen, als gevolg van inwendige factoren. Uit onderzoekingen op *Porcellio scaber*, een landdier, dat voor zeer lage temperaturen (rond 0°) parallele variaties in den totalen osmotischen druk vertoont, trekt WIDMANN echter de conclusie, dat de gevonden veranderingen en dezelfde waarde bij *Gammarus pulex* en andere Crustaceën, enkel het gevolg zijn van temperatuurinvloeden. Het eerste dier vertoont nl. in den winter (onder constante voorwaarden) een verhooging van den totalen osmotischen druk; brengt men in deze periode de temperatuur experimenteel nog lager, dan volgt een secundaire verhooging van den totalen osmotischen druk. Een dergelijke redeneering houdt natuurlijk geen stand! Overigens lijken de gevonden variaties veel te sterk; op twee maanden tijd (van Februari tot Maart) voor een *stijging* in temperatuur van 4-5°



vindt de auteur, zooals uit de hooger gegeven cijfers blijkt, een *verlaging* van meer dan 0,2 % in den totalen osmotischen druk !

Uit de experimenten van WIDMANN valt er aldus niets te besluiten aangaande cyclische veranderingen onder invloed der geslachtsactiviteit bij de Crustaceeën.

Daarentegen vond FRITZSCHE (1915) een welbepaalde correlatie tusschen eiproductie en osmotische druk bij *Daphnia magna* in zooverre deze proportioneel met de eiproductie daalt, en bij wijfjes die juist hun embryo's afgezet hebben een minimum vertoont. Dat de geslachtsactiviteit op de osmotische waarden in het bloed een zekeren invloed hebben, blijkt uit door meerdere auteurs aangehaalde feiten. SCHWABE (1933) experimenteerde op *Eriocheir sinensis* die, zooals men weet, in de periode van geslachtsrijpheid naar zee migreert. Hij vond dat geslachtsrijpe in zee verblijvende wijfjes bij overbrenging naar zoetwater, een zoo sterke daling der bloedconcentratie ondergaan, dat ze na enkele dagen sterven. Men weet dat buiten deze periode *Eriocheir* zeer euryhalien is.

Een zelfde bevinding deelt SCHOLLES (1933) mede, ook aangaande *Eriocheir*. Wijfjes met eieren in zoetwater overgebracht, bleven niet langer dan 5 dagen in leven. Na drie tot vier dagen verblijf in zoetwater, lag de concentratie van het bloed der geslachtsrijpe dieren veel lager dan dit der in zoetwater levende dieren.

GREENE (1904) ging de veranderingen van den osmotischen druk van het bloed van den Chinook-zalm na, gedurende de periode van sexueele activiteit; gedurende welke deze zalm een anadrome trek uitvoert van zee tot diep in de stroomen. Dezelfde auteur vond eveneens een verlaging van de aschbestanddeelen bij aankomst der dieren op de paaigronden, terwijl het watergehalte sterk stijgt.

GREENE interpreteert zijn bevindingen, nl. het hooge watergehalte der spieren en den lagen osmotischen druk op de paaiplaatsen als zijnde een aanpassingsverschijnsel: deze feiten zijn echter waarschijnlijk een gevolg van de geslachtsrijping en het nieuwe uitwendige milieu een aanpassing van den nieuwen physiologischen toestand (H. J. KOCH, 1942).

Een recente publicatie van BROEKEMA (1941), die ons in den loop van onze opzoekingen toekwam, over de osmoregulatie van *Crangon crangon* L., in verband met de jaarlijksche migratie door dit dier uitgevoerd, is echter op eerste zicht in volledige tegenspraak met alle bovenaangehaalde bevindingen. Haar resultaten berusten op conductiviteitsmetingen. Met dergelijke metingen krijgt men een aanduiding over de hoeveelheid moleculen en ionen in de oplossing aanwezig. Op deze wijze werd er geen verschil gevonden tusschen niet en wel eierdragende wijfjes. Dit zou nog te verklaren zijn, doordat de verandering in de osmoregulatorische mechanismen, niet van uitwendig zichtbare processen zou afhangen.



Doch ten tweede, werd geen zgn. « autonome » verandering in de bloedconcentratie waargenomen, noch in de periode van Mei tot Augustus noch van September tot December, Deze experimenten werden uitgevoerd op constante temperatuur. Er werd uitgemaakt dat de in de natuur normaal voorkomende verhooging (resp. verlaging) enkel tengevolge van een verlaging (resp. verhooging) der watertemperatuur tot stand komt. Ook de periodiciteit der belichting heeft geen invloed.

Men kan hiertegen opwerpen dat de Cl-ionen een autonome verandering kunnen ondergaan, waarbij telkens het verschil door toevoegen (resp. verminderen) van andere ionen zou gecompenseerd worden. Zulke compensatie schijnt er overigens te gebeuren volgens onze onderzoekingen. Immers terwijl de wijfjes van *Asellus* een verlaging ondergaan in het Cl<sup>-</sup>-gehalte ten opzichte der mannetjes, zien we niettemin voor beiden de totale osmotische druk van het bloed constant blijven.

Zeer uitgesproken wijzigingen in de chlorideregulatie bij onveranderden osmotischen druk werden gevonden bij *Gasterosteus aculeatus* (L) (H. J. KOCH en M. J. HEUTS — 1942).

Daaruit denken wij te mogen besluiten dat de methode van BROEKEMA te weinig analytisch is om zelfs bij het door haar gebruikte materiaal autonome veranderingen in de osmotische en minerale regulatie te mogen uitsluiten.

#### SAMENVATTING

De invloed van milieufactoren, evenals van geslachtsrijpheid op de osmoregulatie werden systematisch bestudeerd. Als analysemethodes werden bepalingen gebruikt van totalen osmotischen druk bij middel van den thermoëlectrischen micro-osmometer van Hill-Baldes en ultramicrochloridebepalingen volgens Wigglesworth.

1) *De voedingstoestand* heeft een invloed voornamelijk op de Cl<sup>-</sup>-concentratie van het bloed. *Asellus aquaticus*, gedurende vijf dagen in hongertoestand gehouden, vertoont een sterke daling in het chloride-gehalte, terwijl deze minder uitgesproken is voor den totalen osmotischen druk. Voeding met vleeschpoeder veroorzaakt eveneens een daling van de chloride-concentratie na 24 uren, gepaard met een lichte stijging in den totalen osmotischen druk (graphiek I).

2) *De verluchting van het proefmilieu* heeft een uitgesproken verandering voor gevolg, voornamelijk in de Cl<sup>-</sup>-concentratie van het bloed; deze verandering is echter in tegengestelde richting voor de soorten *Gammarus pulex* en *Asellus aquaticus*.

Het eerste dier vertoont nl. een daling van het Cl<sup>-</sup>-gehalte bij slechte



verluchttingsvoorwaarden, terwijl bij *Asellus* hetzelfde verschijnsel optreedt bij sterke verluchting van het proefmilieu.

3) De totale osmotische druk en de chloride-concentratie vermeerderd in functie van de uitwendige *saliniteit*. *Gammarus pulex*, *Gammarus locusta* en *Asellus aquaticus* zijn homio-osmotisch in den breeden zin volgens de terminologie van KROGH — 1939.

Bij het stijgen van de uitwendige concentratie treedt een bijna regelmatige vermeerdering der chloride-fractie in den totalen osmotischen druk op. De uitgebreidheid van het tolerantiegebied verschilt sterk van soort tot soort. Ze is het grootst voor *Gammarus locusta* en het kleinst voor *Gammarus pulex* (zie graphieken II & IV).

4) *De invloed der temperatuur* is zeer karakteristiek bij *Gammarus pulex* en *Asellus aquaticus*. Zoowel totale osmotische druk als chloride-concentratie vertoonen op 4° een minimum. Deze waarden stijgen aanzienlijk voor lagere en hogere temperaturen (graphiek V).

Dit minimum is niet de resultante van een minimum in absorptiesnelheid en retentievermogen voor Cl-ionen op deze temperatuur. Deze processen verlopen veel vlugger bij hogere dan bij lagere temperaturen (graphiek VI & VII).

Of het gevonden minimum samenhangt met de speciale eigenschappen van water bij 4°, valt nader te onderzoeken.

5) Bij standardisatie van alle opgenoemde uitwendige factoren, werd het mogelijk eventueele invloeden van den sexueelen cyclus of daarmee samenhangende verschijnselen na te gaan.

Bij *Asellus* en bij *Gammarus* werden veranderingen in het chloridepeil gedurende den loop van het jaar opgemerkt. Bij beide dieren komt nl. een verhooging voor in de genoemde waarde gedurende den zomer. Deze verandering is onafhankelijk van schommelingen in de uitwendige milieufactoren.

2

Katholieke Universiteit  
te Leuven.  
Zoölogisch Instituut.  
Afd. Zoöfysiologie (Prof. H. J. Koch)



## RESUME

L'influence de facteurs d'ambiance ainsi que de la maturité sexuelle sur la régulation de la pression osmotique est systématiquement étudiée. Comme méthodes d'analyse, il est fait usage de mesures de pression osmotique totale par le micro-osmomètre thermo-électrique de Hill-Baldes et d'ultra-micro-dosages de chlorures d'après Wigglesworth.

1) *L'état de nutrition* manifeste principalement son influence sur la concentration en chlorures du sang. Tenu à jeun pendant cinq jours, *Asellus aquaticus* présente une diminution notable de la teneur en chlorures tandis que l'effet est moins prononcé sur la pression osmotique totale. La nutrition avec de la poudre de viande provoque également après 24 heures une diminution de la concentration en chlorures; elle s'accompagne d'une légère augmentation de la pression osmotique totale (voir graphique I).

2) *L'aération du milieu d'expérience* s'accompagne de changements importants, surtout de la concentration en chlorures du sang.

Chez *Gammarus pulex* le changement est l'opposé de celui observé chez *Asellus aquaticus*. La première espèce présente une baisse de la teneur en chlorures lors d'une aération insuffisante. *Asellus* au contraire présente le même phénomène lors d'une aération intensive du milieu.

3) La concentration osmotique totale et la concentration en chlorures augmentent en fonction de la salinité externe. *Gammarus pulex*, *G. locusta* et *Asellus aquaticus* sont homoi-osmotiques au sens large d'après la terminologie de KROGH — 1939.

L'augmentation de la salinité externe s'accompagne d'une augmentation quasi régulière de l'importance de la fraction des chlorures dans la pression osmotique totale.

L'amplitude de la zone de tolérance diffère fortement d'une espèce à l'autre. Elle est la plus étendue pour *Gammarus locusta* et la plus restreinte pour *Gammarus pulex* (voir graphiques II et IV).

4) L'influence de la *température* est très caractéristique chez *Gammarus pulex* et *Asellus aquaticus*. Aussi bien la pression osmotique totale que la concentration en chlorures présentent un minimum à 4°. Les valeurs augmentent fortement de part et d'autre de cette température (graphique V).

Ce minimum ne résulte pas d'un minimum de la vitesse d'absorption et de pouvoir de rétention de chlorures à cette température. Ces phé-



nomènes s'y produisent à des vitesses supérieures comparées à celles observées aux températures plus basses (graphiques VI et VII).

Il reste à examiner si ce minimum est en relation avec les propriétés spéciales de l'eau à 4°.

5) Dans des conditions standardisées pour tous les facteurs d'ambiance, il fut possible de rechercher l'*influence* éventuelle du *cycle sexuel*, ou de phénomènes qui l'accompagnent.

Des modifications de la concentration en chlorures au cours de l'année furent observées chez *A sellus* et chez *G a m m a r u s*.

Les deux espèces présentent une hausse de la teneur en chlorures pendant l'été. Ce changement est indépendant des variations des facteurs du milieu externe.



## BIBLIOGRAPHIE

- BALDES, E.-J. & A.-F. JOHNSON, 1939 : « The thermoelectric osmometer; its construction and use ». *Biodynamica* n<sup>o</sup> XLVII, 1.
- BATEMAN, J.-B., 1933 : « Osmotic and ionic regulation in the shore crab *Carcinus maenas* ». *J. exp. Biol.*, X, 355.
- BERGER, E., 1931 : « Ueber die Anpassung eines Süßwasser- und eines Brackwasserkrebses an Medien von verschiedenen Salzgehalt ». *Arch. ges. Physiol.* CCXXVIII, 790.
- BONE, G. & H.-J. KOCH, 1942 : *Annales Soc. Roy. Zool. Belgique*, T. LXXIII, 73.
- BROEKEMA, M.-M., 1941 : « Seasonal movements and the osmotic behaviour of the shrimp (*Crangon crangon* L.) ». *Thesis*, Groningen.
- FRITZSCHE, H., 1915 : « Studien über Schwankungen des osmotischen Druckes der Körperflüssigkeit bei *Daphnia magna* ». *Dissert.*, Leipzig.
- GREENE, C.-W., 1904 : « Physiological studies on the Chinook-salmon ». *Bull. U. S. Bur. of Fish.* XXIX, 429.
- GREENE, C.-W., 1926 : « The physiology of the spawning migration ». *Physiol. Rev.* VI, 201.
- GRESENS, J., 1928 : « Versuche über die Widerstandsfähigkeit einiger Süßwassertiere gegenüber Salzlösungen ». *Z. Morph. u. Oekol.* XII.
- KOCH, H.-J., 1942 : « Cause physiologique possible de la migration des animaux aquatiques ». *Ann. Soc. Royale Zool. de Belg.* Tome LXXIII, 57.
- KOCH, H.-J. & M.-J. HEUTS, 1942 : « Influence de l'hormone thyroïdienne sur la régulation osmotique chez *Gasterosteus aculeatus* L. forme *gymnurus* CUV. ». *Ann. Soc. Roy. Zool. Belgique* LXXIII, 165.
- KROGH, A., 1939 : « Osmotic regulation in aquatic animals », Cambridge.
- OTTO, J.-P., 1934 : « Ueber den osmotischen Druck der Blutflüssigkeit von *Heteropanope tridentata* ». *Zool. Anz.* CVIII, 130.
- OTTO, J.-P., 1937 : « Ueber den Einfluss der Temperatur auf den osmotischen Wert der Blutflüssigkeit bei der Wollhandkrabbe ». *Zool. Anz.* CXIX, 98.
- PANNIKAR, N.-K., 1940 : « Osmotic properties of the common prawn ». *Nature* CXLV, 108.
- PLATEAU, F., 1871 : « Recherches physico-chimiques sur les Articulés aquatiques. Première partie ». *Mém. cour. et mém. d. savants étrangers. Acad. roy. d. Belgique*, XXVI.
- SCHOLLES, W., 1933 : « Ueber die Mineralregulation wasserlebenden Evertebraten ». *Z. vergl. Physiol.* XIX, 522.
- SCHWABE, E., 1933 : « Ueber die Osmoregulation verschiedener Krebsen ». *Z. Vergl. Physiol.* XIX, 183.
- SIMPSON, G.-G. & A. ROE, 1939 : « Quantitative Zoology », New-York, London.
- WIDMANN, E., 1936 : « Osmoregulation bei einheimischen Wasser- und Feuchtluftcrustaceen ». *Z. wiss. Zool.* CXLVII, 132.
- WIGGLESWORTH, V.-B., 1938 a. : « A simple method of volumetric analysis for small quantities of fluid; estimation of chloride in 0,3  $\mu$ l. of tissue fluid ». *Biochem. J.* XXXI, 1719.
- WIGGLESWORTH, V.-B., 1938 b. : « The regulation of osmotic pressure and chloride concentration in the haemolymph of mosquito larvae ». *J. exp. Biol.* XV, 235.



