

Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab.

Biologiske Meddelelser **XVI**, 6.

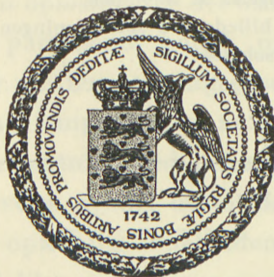
---

AKTIV  
IONOPTAGELSE HOS FLODKREPS  
OG STRANDKRABBE

MED PÅVISNING AV IONOPTAGENDE CELLER

AV

KNUT SCHMIDT-NIELSEN



KØBENHAVN

I KOMMISSION HOS EJNAR MUNKSGAARD

1941

# INNHALDSFORTEGNELSE

	Side
Innledning	
De fysikalsk-kjemiske forhold ved osmotiske prosesser .....	3
Aktiv transport gjennom membraner .....	6
Oversikt over de osmotiske forhold hos vanddyr .....	7
Undersøkelser over flodkreps	
I. Tidligere undersøkelser .....	11
II. Egne undersøkelser	
Forsøksmetodikk .....	14
Forsøk over aktiv saltoptagelse .....	17
Differentieringen i den ionoptagende mekanisme	
a. Selektiv optagelse av kationer og anioner .....	18
b. De ionoptagende mekanismers distinksjonsevne .....	23
Sammenfatning .....	28
Undersøkelser over strandkrabbe	
I. Tidligere undersøkelser .....	28
II. Egne undersøkelser	
Forsøksmetodikk .....	31
Strandkrabbens hypertoni i fortynnet saltvann .....	34
Den aktive saltoptagelse hos strandkrabben .....	36
Differentieringen i den saltoptagende mekanisme	
a. Selektiv optagelse av kationer og anioner .....	37
b. De ionoptagende mekanismers distinksjonsevne .....	42
Sammenfatning .....	45
Sammenfattende bemerkninger .....	46
Påvisning av ionoptagende celler	
Tidligere resultater .....	49
Egne forsøk .....	51
Bevis for aktiv optagelse af sølvionen .....	52
Det makroskopiske billede ved sølvfarging .....	53
Mikroskopisk undersøkelse .....	54
Sammenfatning .....	56
Literatur .....	57

## INNLEDNING

**D**en store rolle det osmotiske trykk spiller for den levende celle blev først fremhevet av PFEFFER (1877), som utførte grunnleggende fysikalsk-kjemiske og plantefysiologiske arbeider. PFEFFER beskjeftiget sig med den betydning det osmotiske trykk har for saftspenningen i planter. Planteceller kan meget vel ha et stort indre trykk, da de har en fast cellulosemembran. Før de dyriske celler gjelder helt andre forhold, da de i almindelighet ikke har noen fast membran. Før de forhold som da gjør sig gjeldende omtales, skal de almindelige osmotiske lover kort skisseres, samtidig som det redegjøres for den senere brukte terminologi.

### **De fysikalsk-kjemiske forhold ved osmotiske prosesser.**

Enhver vandig oppløsning av et stoff har som bekjent et osmotisk trykk. I en oppløsning er det osmotiske trykks størrelse avhengig av partiklenes antall, men ikke av deres størrelse. (Innenfor de temperaturgrenser som tillater liv, er avhengigheten av temperaturen av så liten størrelse at den settes ut av betraktning ved behandling av biologiske forhold.) Ved angivelse av det osmotiske trykks størrelse, går man ut fra en oppløsning inneholdende 1 grammolekyl av et oppløst stoff i 1 liter vann. Denne oppløsning inneholder  $6,06 \cdot 10^{23}$  molekyler av stoffet (LOSCHMIDT's tall), og det osmotiske trykk av denne oppløsning er 22,4 atmosfærer

(ved  $0^\circ$ ). En sådan molar opløsning har en bestemt kokepunktsforhøielse ( $0,521^\circ$ ), og likeledes en bestemt frysepunktsdepressjon ( $1,86^\circ$ ). Denne siste har særlig betydning for biologiske forhold, da måling av frysepunktsdepressjonen tidligere var den best egnede metode til bestemmelse av osmotisk trykk i biologiske væsker (BECKMANN'S metode). Man finner derfor ofte, særlig i eldre avhandlinger, det osmotiske trykk angitt som frysepunktsdepressjon (betegnet med  $\Delta$ ) i grader.

Det blev nevnt at en opløsning inneholdende  $6,06 \cdot 10^{23}$  partikler pr. liter vann har et osmotisk trykk på 22,4 atmosfærer. For stoffer som i vandig opløsning foreligger i dissociert tilstand gjelder det at de enkelte partiklers (ioners) antall og ikke molekylenes antall er bestemmende for det osmotiske trykk. Et molekyl NaCl dissociert i  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$  vil derfor utøve det dobbelte osmotiske trykk, og et molekyl  $\text{H}_2\text{SO}_4$  fullstendig dissociert i  $2\text{H}^+$  og  $\text{SO}_4^{2-}$  vil utøve det tredobbelte osmotiske trykk.

Da natriumklorid i vandig opløsning er nesten fullstendig dissociert, vil altså et grammolekyl NaCl oppløst i en liter vann utøve et osmotisk trykk på nesten  $2 \cdot 22,4$  atmosfærer. I biologien er det nu almindelig å angi det osmotiske trykk som styrken av den natriumkloridopløsning som utøver et like stort osmotisk trykk. Man går da ut fra en opløsning inneholdende et grammolekyl NaCl pr. liter, en molar opløsning; men da de osmotiske trykk som finnes i biologiske væsker som regel ligger lavere, er det praktisk å bruke en mindre enhet. Man bruker  $\frac{1}{1000}$  av den molare styrke, og angir væskens styrke i millimolaritet (mM). Denne betegnelsesmåte har mange teoretiske ulemper, bl. a. den at natriumklorid ikke er fullstendig dissociert i vandig opløsning. Derimot er den meget hensiktsmessig i eksperimentell

arbeide, og dette gjelder særlig nu når det osmotiske trykk nesten alltid bestemmes ved direkte sammenligning med kjente natriumkloridopløsninger (HILL's dampspenningsmetode). For de fleste arbeider kan man også se bort fra den lille feil som fremkommer ved at natriumkloridet ikke foreligger fullstendig dissociert, dette gjelder særlig hvor det dreier sig om relative verdier.

Ved å angi et stoffs konsentrasjon i millimolaritet, kan man straks se hvilken rolle det spiller for det samlede osmotiske trykk. En slik direkte sammenligning vil være umulig hvis stoffets konsentrasjon er oppgitt i prosent eller lignende, idet man da først må foreta en omregning hvor man skal kjenne stoffets molekylvekt. Hvis det dreier sig om flere stoffer i en oppløsning, og deres konsentrasjon kjennes i millimolaritet, kan deres osmotiske betydning også direkte sammenlignes. Disse fordeler er så iøvnefallende at man nu mer og mer angir konsentrasjoner og osmotisk trykk i millimolaritet i biologiske arbeider over osmotiske forhold. Denne betegnelsesmåte er fullstendig gjennomført i det foreliggende arbeide. Hvor det er trukket sammenligninger med tidligere arbeider, er forfatterens resultater også såvidt mulig omregnet til millimolaritet for å gjøre en direkte sammenligning mulig.

De forhold som fremkommer når væsken på de to sider av en membran har forskjellig sammensetning, vil være avhengig av membranens karakter. Hvis vi betrakter en membran som er permeabel for salter og vann, vil en forskjell i osmotisk trykk forårsake: 1) En vanntransport fra den mindre koncentrerte til den mere koncentrerte oppløsning. 2) En transport av de oppløste salter fra den mer koncentrerte oppløsning til den mindre koncentrerte. Er det samme stoff i oppløsningen på begge sider, foregår trans-

porten til det har innstilt sig en likevekt med samme kon-  
entrasjon på begge sider (forutsatt at det hydrostatiske  
trykk er det samme). Er det forskjellige stoffer eller samme  
stoffer i forskjellig forhold på de to sider, innstiller like-  
vekten sig for hvert stoff, forutsatt at membranen er per-  
meabel for de stoffer det dreier sig om. Er membranen ikke  
gjennemtregelig for alle stoffene (hvis det f. eks. er en  
blanding av salter og kolloide eggehvitestoffer som i plasma),  
innstiller det sig en mere komplisert likevektstilstand, en  
Donnanlikevekt. Det samlede osmotiske trykk vil være det  
samme på begge sider av membranen, på den side hvor  
kolloidene er, vil de diffusible stoffer derfor foreligge i en  
tilsvarende lavere konentrasjon. Da eggehvitestoffene i al-  
mindelighet utøver en meget liten del av det samlede osmo-  
tiske trykk i biologiske væsker, vil de forskjeller som opstår  
i konentrasjonen for de øvrige stoffer på grunn av Donnan-  
likevekten i almindelighet ikke være av vesentlig praktisk  
betydning for de forhold som skal behandles i det forelig-  
gende arbeide.

### **Aktiv transport gjennom membraner.**

De nu omtalte forhold gjelder den fysikalske transport  
gjennom den ikke levende membran. Det er utført et stort  
teoretisk og praktisk arbeide over membranpermeabilitet og  
stofftransport gjennom livløse membraner, hvor det er tatt  
hensyn til partiklenes og membranenes elektriske ladning  
o. s. v. Man kan kalle dette en passiv transport i motsetning  
til den aktive transport som i visse tilfeller kan foregå gjen-  
nem levende membraner, hvor aktive celleprocesser deltar  
i transporten under forbruk av energi.

For å undersøke den aktive transport, foretas under-  
søkelser av forskytninger i konentrasjonen på den ene

eller begge sider av membranen. Kriterium for en aktiv transport er at den transport som har foregått ikke kan forklares ved de simple fysiske forhold. Hvis det således har foregått en stofftransport til det mer koncentrerte medium, eller en vanntransport til det mindre koncentrerte medium, er det en aktiv transport.

Sådanne aktive stofftransporter i retning mot de osmotiske krefter er kjent i en rekke tilfeller. Transporten av salter fra de tynne oppløsninger som omgir planterøtter og inn i disse, transport gjennom tarmveggen, transport i visse avsnitt av nyren, transport av salter fra de tynne oppløsninger i ferskvann til det mer koncentrerte medium i blodet av et vanndyr, er eksempler på sådanne aktive transporters.

Nærmere klarleggelse av disse aktive transportmekanismers virkemåte foreligger ikke. Eksperimenteltt arbeide som har vært forsøkt, har ikke ført frem. Teorier for mulige forklaringer av den aktive transport er fremsatt, bl. a. av OSTERHOUT (1933) og LUNDEGÅRDH (1937) (begge botanikere), og av INGRAHAM og VISSCHER (1937) (for den aktive transport gjennom tarmveggen hos pattedyr).

Det er funksjonen av de transportmekanismer som finnes i vanndyrenes integument, som i det foreliggende arbeide er gjort til gjenstand for nærmere studium. Det manglende kjennskap til processenes natur, hindrer ikke undersøkelse av mekanismenes funksjon.

### **Oversikt over de osmotiske forhold hos vanndyr.**

De osmotiske problemer som foreligger for vanndyr, skal i det følgende kort gjennomgås.

Da vanndyrenes overflate, eller iallfall en del av den i almindelighet er noget gjennemtregelig for vann og oppløste stoffer, vil der gjennom denne membran foregå osmotiske

processer. Det gjelder for alle vanndyr at de har respiratoriske flater som er permeable for surstoff og kulldioksyd. Det kan dreie sig om hele overflaten (mange mindre organismer), eller overflaten av særlig utviklede gjeller. En membran med respiratorisk betydning må være relativt tynn, og skal den være lett gjennemtregelig for i vann oppløste gasser, kan den vanskelig tenkes impermeabel for vann og salter. (At en membran kan være noget permeabel for surstoff, og samtidig helt uigjennemtregelig for vann, er vist av KROGH og USSING (1937) på ørretegg i den første periode efter befruktningen, hvor deres surstoffbehov er meget lite.)

Da organismenes indre medium alltid avviker noget fra det omgivende medium i sammensetning, vil det foregå osmotiske prosesser gjennom overflaten som søker å utjevne denne forskjell, mens organismen selv søker å opprettholde den. De forhold som gjør sig gjeldende for en del forskjellige dyr, skal kort omtales i det følgende. Det er her umulig å følge den systematiske inndeling av dyregruppene, en mere oversiktlig fremstilling fremkommer ved en inndeling efter de økologiske forhold. Det er nemlig helt forskjellige problemer som oppstår for organismer som lever i ferskvann og saltvann.

De problemer som reiser sig for ferskvannsorganismene er lettest å overse, og skal derfor omtales først. Disse organismers osmotiske konsentrasjon er høiere enn det omgivende vann, og denne forskjell vil forårsake: 1) Et salttap for organismen på grunn av den osmotiske transport fra blodet til det omgivende vann, og 2) en osmotisk innstrømning av vann.

Overskuddet av vann skal elimineres, — det kan skje gjennom nyrene, og her oppstår igjen et salttap, idet intet



nyreorgan er i stand til å utskille rent vann. Disse osmotiske problemer er de samme for alle ferskvannsdyr; men størrelsen av de enkelte prosesser vil naturligvis variere med en rekke forhold, som overflatens størrelse, dens gjennemtregelighet, konsentrasjonsforskjellen, nyrens effektivitet o. s. v.

Av de to osmotiske prosesser som organismen må motarbeide, nevntes det at overskudd av vann kan elimineres gjennom nyreorganene. Vi har nu det forhold at organismen på tross av et stadig salttap skal oprettholde en konstant saltkonsentrasjon. Dette kan skje på to måter, enten a) at de nødvendige salter foreligger i tilstrekkelig mengde i føden og optas fra tarmen, eller b) at organismen har særlige mekanismer til å opta salter fra de meget lave konsentrasjoner som foreligger i ferskvann.

Det er påvist eksperimentelt at begge disse muligheter virkelig forekommer. For å klarlegge forholdene skal et par eksempler nevnes. Mange individer av den almindelige ål (*Anguilla vulgaris*) tilbringer en vesentlig del av sitt liv i ferskvann. KROGH (1937) har undersøkt ålens osmotiske regulasjon i ferskvann. Resultatene er at ålen dekker sitt salttap gjennom næringen, og det har ikke vært mulig å påvise at den kan skaffe sig de nødvendige salter på noen annen måte. For en lang rekke ferskvannsorganismer er det derimot funnet at de har evnen til å opta salter fra ferskvann. Som eksempel kan nevnes gullfisk (*Carassius auratus*) hvor KROGH (1937) har vist at det skjer en optagelse av salter i gjellene, således at de er i stand til å oprettholde sin saltkonsentrasjon på tross av det stadige tap, selv om de ikke får føde. Det er ingen grunn til at alle de organismer hvor sådanne optagelsesmekanismer er funnet, ikke også skulde kunne utnytte de salter som fore-

kommer i føden, men de er altså for sin saltregulering uavhengig av føden. En lang rekke organismer, særlig evertebrater, er da også i stand til å sulte i meget lange perioder.

For saltvannsdyrene er forholdene fullstendig anderledes, da de lever i et medium som er sterkt osmotisk koncentrert. Her må evertebrater og benfisk behandles hver for sig (bruskfisk viser noenlunde samme forhold som evertebratene). Evertebratene er nemlig i de fleste tilfeller i osmotisk likevekt med det omgivende vann, mens benfiskene har et osmotisk trykk som ligger vesentlig under havvannets, i størrelsesorden på  $\frac{1}{3}$  av dette.

Det har meget lenge vært kjent at de marine evertebrater er poikilosmotiske, d. v. s. deres osmotiske trykk svinger med det omgivende vann. Det finnes saltvannsorganismer som bare tåler meget små forandringer i vannets saltholdighet, det er de utpreget stenohaline saltvannsdyr. Andre tåler større variasjoner i saltholdigheten, de er euryhaline. Dette gjelder særlig organismer som lever i kystfarvann, og mange kan tåle variasjoner i blodets saltholdighet på f. eks. ned til  $\frac{1}{3}$ . Men det har vist sig at en rekke av de organismer som kan tåle lave saltholdigheter, og særlig de som trenger inn i brakkvann, har en evne til å opprettholde et høiere osmotisk trykk enn det omgivende vann. Ved sterkere fall i ytterkoncentrasjonen er de altså ikke mer strengt poikilosmotiske. Prinsipielt blir da forholdene for deres vann- og saltomsetning de samme som for ferskvannsdyr, en osmotisk innstrømning av vann og et osmotisk salttap. De har også de samme midler til å motvirke dette, nemlig vanneliminasjon gjennom nyrene og aktiv optagelse av salter fra det omgivende vann. Evnen til å opprettholde det osmotiske trykk er hos noen saltvannsdyr så sterkt utviklet at de ikke bare tåler meget saltfattig brakkvann (f. eks. i den Botniske

bukt), men endog kan trenge helt inn i ferskvann. Et velkjent eksempel er at skrubben ofte trenger langt op i elver, langt høiere op enn saltvann fra flodbølgen kan nå.

De marine benfisker holder en lavere osmotisk konsentrasjon enn det omgivende vann, og forholdene blir da det rent motsatte av forholdene for ferskvannsorganismene. De er utsatt for en osmotisk transport av salt innad, og et osmotisk vanntap til det mer koncentrerte havvann. Begge processer forårsaker en konservering av blodet. Det er vist at vanntapet kan dekkes ved at fiskene drikker av det omgivende saltvann (HOMER SMITH 1930). Det eiendommelige ved dette er at ikke bare vannet, men også saltene optas fra tarmen, og gir en videre økning av saltene i blodet. Man kunde tenke sig at dette overskudd av salt kunde utskilles gjennom nyrene, og det kan sikkert også finne sted. Men det viser sig at en hel del fisker normalt har svakt hypotonisk urin, og saltoverskuddet må derfor utskilles på en annen måte. Svarende til dette er det vist for ålen at den utskiller salt gjennom gjellene så snart konsentrasjonen utenfor overstiger blodets (KEYS 1931, SCHLIEPER 1933). Sannsynligvis har andre fisker lignende mekanismer.

## Undersøkelse av de osmoregulatoriske mekanismer hos flodkreps.

### I. Tidligere undersøkelser over flodkrepsen.

Før de undersøkelser som forfatteren utførte over de osmoregulatoriske mekanismer hos flodkrepsen (*Potamobius fluviatilis*) omtales nærmere, skal noen av de arbeider som tidligere er utført over flodkrepsens osmotiske forhold omtales.

Den som først gjorde opmerksom på at flodkrepsen har et osmotisk trykk i blodet som ligger langt over ferskvannets var FREDERICQ (1898). Flere forskere har forsøkt å overføre flodkreps til saltvann, og har konstatert at den ikke kan akklimatiseres til almindelig havvann. Den første mer systematiske undersøkelse over dette blev foretatt av FRANZISKA HERRMANN (1931) som ledd i en lang rekke undersøkelser som fremkom under ledelse av SCHLIEPER (Marburg). HERRMANN'S undersøkelser synes å vise at det er en aktiv saltoptagelse hos flodkrepsen, og den mulighet nevner hun også selv. Men det synes ikke som om problemstillingen med en aktiv saltoptagelse med koncentration i blodet på dette tidspunkt er fullt klar. EVA BERGER (1931) beskjeftiget sig også med overføring av flodkreps til fortynnet saltvann, og til destillert vann, og har fulgt forandringene i blodets saltinnhold under disse forhold. De forandringer som inntreer er at blodets saltinnhold stiger med stigende konsentrasjon i det omgivende vann, og at blodets konsentrasjon faller i destillert vann. En av hennes konklusjoner er at overflaten er permeabel for vann og ioner, mens SCHOLLES (1933) påpeker at denne konklusjon ikke er absolutt riktig da BERGER ikke har tatt hensyn til muligheten av eliminasjon av en saltholdig urin. SCHOLLES anser forøvrig at vevene har depoter av salt, som hindrer sterke fall i blodets konsentrasjon. Hans forsøk viser i virkeligheten ikke meget, da han ikke har vært opmerksom på muligheten for en aktiv saltoptagelse. SCHWABE (1933) påviser at det normalt med konstant ytre medium forekommer store svingninger i blodets konsentrasjon, f. eks. i forbindelse med sult, egglegging, skallskifte o. s. v. SCHWABE beskjeftiger sig også med stoffskiftet i forskjellig koncentrert medium, og viser at flodkrepsen får 25% lavere stoffskifte i

blodisotonisk saltvann. Dette tydes som at det større stoffskifte i ferskvann er det arbeide som er nødvendig for å oprettholde den sterke hypertoni. SCHWABE's konklusjon er altså at osmoreguleringen fordrer energi (hvor meget forsøkene i virkeligheten viser, blir ikke nærmere diskutert på dette sted), og har neppe vært i tvil om at det skjer en aktiv regulering. Men en uttalelse av HUF (1933) synes å vise at det vesentlige problem, en aktiv saltoptagelse, ikke er klart på dette tidspunkt: »Aus welchen Quellen aber die dauernden Verluste an Salz unter ganz normalen Verhältnissen gedeckt werden, bleibt vor der Hand unklar.« HUF har ellers vist at flodkrepsen dør i destillert vann når blodets kloridinnhold er sunket 30—35%; men hvis dyret i tide flyttes over til almindelig ferskvann klarer det sig.

BOGUCKI (1934) utførte en rekke analyser av mineralbestanddelene i blodet hos flodkrepsen i forskjellig ytre medium, og viste at selv om blodets konsentrasjon stiger i saltvann, skjer det en aktiv regulering av de enkelte bestanddeler. I 50% saltvann er blodet isotonisk med det omgivende vann, men f. eks. magnesiumkonsentrasjonen i blodet holdes betydelig under den ytre konsentrasjon. Det fremgår ikke av BOGUCKI's arbeide hvordan den betydelige forskjell mellom det ytre og det indre medium oprettholdes, han nevner som muligheter: 1) Legemsoverflatens forskjellige permeabilitet for forskjellige ioner, 2) Antennekjertelens ekskresjonsfunksjon, og 3) At vevene optar visse av blodets bestanddeler. Muligheten av en aktiv absorpsjon av visse ioner fra det ytre medium nevnes overhodet ikke.

ERNA WIDMANN (1935) har undersøkt en lang rekke krustaceer, og har funnet årlige svingninger i blodets osmotiske konsentrasjon, i et tilfelle (*Porcellio*) vistes det eksperimentelt at svingningene skyltes temperaturen.

I 1936 foretok KROGH noen forberedende forsøk med flodkreps. Disse forsøk viste at den har evne til aktivt å opta salter fra det omgivende vann; men disse forsøk blev ikke fullført, og publisertes først i KROGH's monografi over osmotisk regulasjon hos vanndyr (1939).

Foruten de her nevnte arbeider foreligger det en del som har behandlet forskjellige forhold som mere perifert berører problemene om den aktive saltoptagelse hos flodkrepsen. Det gjelder arbeider over nyrefunksjon, permeabilitet av integumentet o. l.

## II. Egne undersøkelser.

### Forsøksmetodikk.

Det principp som i det foreliggende arbeide er brukt for å påvise en aktiv salt- (eller ion-) optagende mekanisme, er å bringe forsøksdyrets saltinnhold noget ned under det normale, — når mekanismene derefter optar ioner, vil konsentrasjonen i blodet stige og konsentrasjonen i yttervæsken synke. Man kan ved hjelp av analyser følge forandringene begge steder, men ofte vil det ene være tilstrekkelig. Har det skjedd en transport fra den lavere konsentrasjon i omgivelsene til en høiere konsentrasjon i blodet må det, som nevnt i innledningen, være en aktiv optagelse.

Saltkonsentrasjonen i blodet hos flodkrepsen kan man bringe ned ved å sette den i destillert vann. Den vil da på grunn av de osmotiske prosesser miste noget salter til vannet. De optagende mekanismer vil søke å opta av disse salter igjen, men deres effektivitet er ikke så stor at de kan bringe konsentrasjonen i vannet ned til null, det vil bli en likevekt ved en meget lav konsentrasjon i vannet (ca. 0,01—0,02 mM), hvor saltoptagelsen dekker salttapet. Hvis man

bytter det destillerte vann med visse mellomrum (f. eks. 1 døgn), kan man på denne måten opnå å »vaske ut« en del av saltene i en kreps.

En mere bekvem fremgangsmåte for utvaskning er det å la en jevn strøm av destillert vann passere krepsen med passende hastighet.

Salttapet følges lettest ved kloridbestemmelser i utvaskningsvannet. Som eksempel på gangen i en utvaskning, kan nevnes resultater som fantes ved å bestemme salttapet på den nevnte måten, når en kreps blev utvasket med en vannpassasje på 0,2 liter/time (tabell 1).

Tab. 1. Forsøk utført <sup>2-7</sup>/<sub>9</sub> 1939.

Utvaskning av flodkreps. Vannpassasje: 0,2 l/time.

	Tidspunkt for vannprøven	Cl-konc. i vannet
1. dag	kl. 9.20 Utvaskning beg. ....	...
	kl. 9.45.....	0,007 mM
	kl. 10.20.....	0,010 -
	kl. 13.05.....	0,0125 -
	kl. 14.45.....	0,0135 -
	kl. 15.15.....	0,0125 -
2. dag	kl. 20.00.....	0,014 -
	kl. 11.00.....	0,013 -
3. dag	kl. 9.00.....	0,0125 -
	kl. 20.00.....	0,0095 -
4. dag	kl. 9.00.....	0,0085 -
	kl. 16.00.....	0,014 -
5. dag	kl. 8.00.....	0,011 -
6. dag	kl. 10.30.....	0,017 -

Man ser at størrelsesordenen av salttapet er temmelig konstant, og de variasjoner som finnes er tilsynelatende helt uregelmessige. Det må tilføies at dette likesom alle andre forsøk er gjort med dyr som har sultet i noen tid, opptil flere uker, for å forhindre at optagelse fra tarmen eller forurening av yttervæsken med ekskrementer skal kunne spille inn.

Lignende verdier for kloridmengden i utvaskningsvann er til stadighet funnet for de andre kreps, så det nevnte eksempel representerer de verdier som normalt fremkommer når en kreps settes i destillert vann.

Den metode som blev brukt til kloridbestemmelsene, er opprinnelig utarbeidet som mikrometode av REHBERG (1926). Den blev siden modifisert av SCHNOHR (1934) for bestemmelser i blod og plasma, og er beregnet til bruk på 0,1 ml menneskeplasma.

Metodens prinsipp er å felle kloridene med en kjent mengde sølvnitrat, og bestemme den overskytende mengde sølv ved titrering med tiocyanat (rhodanid).

Hele analysen foretas i et analyseglass som også brukes til en rekke andre mikroanalyser, — det er spisst for at bunnfall skal kunne samles ved centrifugering, og har en innsnevring for å kunne henges op i burettestativet.

Prøven avpipetteres direkte i glasset. Det tilsettes en avmålt mengde (0,5 ml)  $\text{AgNO}_3$  oppløst i  $\frac{4}{5}$  konc.  $\text{HNO}_3$  (5,75 g/l). Prøven ophetes så på vannbad, de organiske stoffer destrueres herved av salpetersyren. Hvis det viser sig at destruksjonen går langsomt, kan det tilsettes et par dråper  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dette har ingen innflytelse på analysens gang. Etter avkjøling av den nu praktisk talt farveløse prøve, tilsettes ca. 0,1 ml jernammoniumsulfat (mettet opl.) som indikator, og 1 ml eter. Titreringen foregår med en Rehberg kvikksølvburette som rummer 200 mm<sup>3</sup>. Glasset ophenges i stativet således at burettespissen stikker gjennom eterlaget ned i væsken. Omrøring foregår ved gjennomledning av en svak luftstrøm. Eterlaget vil ved denne blanding opta bunnfallet, og titreringen utføres i helt klar væske til det fremkommer en svak rosafarve ved tilsetning av et minimalt overskudd av ammoniumtiocyanat fra buretten. Avlesningen av buretten skjer lettest med en avleserlupe. Metodens nøiaktighet er meget god, almindelig ca. 0,5 relative %, og kan ved særlige forholdsregler bringes op til 1 : 20 000 (KEYS 1931).

Ved analyse på væsker med forskjellige konsentrasjoner, avpipetteres volumina som gir en passende kloridmengde. Den samlede kloridmengde må ligge under 15  $\mu$  Mol (= 0,9 mg), svarende til 0,1 ml 150 mM væske. De bør ikke være vesentlig under  $\frac{1}{10}$  av dette, da nøiaktigheten så blir mindre. Ved analyse på meget tynne oppløsninger (f. eks. utvaskningsvann) benyttes en inndamp-



ningskolbe (KROGH 1937), hvor analysen efter inddampning av større prøver (f. eks. 100 ml) til ca. 1 ml volum, føres videre som vanlig, idet den nederste del av samme kolbe benyttes som analyseglass. Man undgår derved enhver overføring av analysen til annet glass, en fordel av uhyre betydning for mikroanalyser.

### Forsøk over aktiv saltoptagelse.

Ved forberedende forsøk viste det sig at flodkrepsen har evne til aktiv optagelse av salt fra almindelig ferskvann, og resultatene av KROGH's forsøk blev således bekreftet. Protokollene fra forsøk med en enkelt kreps skal anføres som eksempel, da det også viser hvor effektiv optagelsen er, d. v. s. hvor langt ned krepsen kan bringe yttervæskens konsentrasjon.

Tab. 2. Forsøk nr. 9.  $3^{-6}/_{10}$  1939.

Kreps utvasket med 60 liter destillert vann (dens salttap beregnes til et fall på ca. 30 mM i blodet). Blodets konsentrasjon hos krepsen er før utvaskningen ca. 190 mM. Overført til ledningsvann fortynnet til  $1/_{10}$  med destillert vann (200 ml).

Tidspunkt for prøven	Cl-konc i væsken
1. dag kl. 17 ved forsøkets begynnelse .....	0,235 mM
4. dag kl. 9 .....	0,0885 -

Dette viser aktiv optagelse fra vann med kloridmengde som svarer til det almindelige i norske vann og elver (f. eks. Drammenselven ca. 0,2 mM).

Forsøket fortsattes umiddelbart med å sette samme kreps i en oppløsning av rent NaCl (110 ml).

Tab. 3. Forsøk nr. 10.  $6^{-13}/_{10}$  1939.

Tidspunkt for prøven	Cl-konc i væsken
1. dag kl. 16 ved forsøkets begynnelse .....	0,100 mM
7. dag kl. 11.30 .....	0,0154 ( $\pm$ 0,0005)

Her ser man at krepsen er i stand til å redusere klorid-koncentrasjonen i oppløsningen ned til de samme verdier som man får når en kreps utvaskes med destillert vann (se tab. 1, side 15). Man har derfor grunn til å slutte at når en kreps settes i destillert vann, skyldes den saltkoncentrasjon som fremkommer i vannet en balance mellom optagelsen og det stadige salttap. Grensen nedad er nådd ved at de optagende mekanismer ved denne koncentrasjon akkurat klarer å holde salttapet kompensert. Til sammenligning av mekanismens effektivitet kan anføres at den nederste grense som ved lignende forsøk kan nås av ullhåndskrabben (*Eriocheir sinensis*) er ca. 0,3 mM (KROGH 1938).

De her omtalte forsøk dokumenterer fullt ut at flodkrepsen har evnen til aktiv saltoptagelse fra det omgivende vann. Det er sannsynlig at mekanismen er lokalisert i gjellene; men på dette tidspunkt blev det ikke nærmere undersøkt, da det ikke er av prinsipiell betydning for studiet av mekanismens funksjon.

Differentieringen i den ionoptagende mekanisme.

a) *Selektiv optagelse av kationer og anioner.*

Det var planen å undersøke om kationen og anionen i et salt kan optas uavhengig av hverandre, eller om de må optas samtidig og følge hverandre.

Den svenske botaniker LUNDEGÅRDH (1937) har med meget hell undersøkt optagelsen av salter av plantenes røtter. Han har vist at anionen optas aktivt av røttene under forbruk av bestemte energimengder. Kationene følger så med på grunn av de elektrostatiske krefter. Det foreligger dog forsøk som tyder på at forholdene ikke alltid er så enkle hos planter (COLLANDER 1937).

Hos dyr har KROGH (1938) undersøkt mekanismen for

saltoptagelse hos ullhåndskrabben, og har funnet at kationer og anioner optas uavhengig av hverandre. En kation kan således meget vel optas uten at det samtidig må optas en anion, og omvendt. Princippet skal forklares her, da det samme er benyttet til undersøkelsen av flodkrepsen.

1) Bevis for selektiv optagelse av kationer. Settes en utvasket ullhåndskrabbe i en oppløsning av natriumsulfat,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , vil den opta natriumionen selektivt, konsentrasjonen av  $\text{Na}^+$  i oppløsningen vil synke, men konsentrasjonen av  $\text{SO}_4^{\ddot{-}}$ -ionen vil forbli uforandret. Oppløsningens innhold av natrium var naturligvis lavere enn blodets, så det virkelig forelå en aktiv transport av natriumionen mot konsentrasjonsforskjellen.  $\text{Na}^+$ -ionen er således optatt aktivt uten at det samtidig er fulgt noen anion med, og her foreligger det altså en aktiv selektiv kationoptagelse. Kontrollforsøk blev utført ved å vise at konsentrasjonen av natrium i blodet virkelig er steget, mens sulfatmengden er uforandret. Lignende forsøk med optagelse fra natriumkarbonatopløsninger kan også utføres. Kontrollen av anionens forhold er her vanskelig å gjennomføre, da forsøksdyret hele tiden produserer kullsyre; men en aktiv transport av  $\text{CO}_3^{\ddot{-}}$ -ionen innad er utenkelig da gjelleoverflaten a priori er fritt gjennemtregelig for oppløst  $\text{CO}_2$ .

2) Bevis for selektiv optagelse av anioner. Forsøkene med selektiv optagelse av anioner er gjort efter lignende prinsipp. Optagelse av ammoniumionen,  $\text{NH}_4^+$ , finner ikke sted, og optagelse av kalciumionen finner bare sted under særlige forhold. Kan man således fra ammoniumklorid- eller kalciumkloridopløsninger påvise en optagelse av  $\text{Cl}^-$ -ionen uten at en tilsvarende mengde av kationen fjernes fra oppløsningen, har man beviset for en selektiv anionoptagende mekanisme.

## Egne forsøk.

Forsøkene med påvisning av en kationoptagende mekanisme hos flodkrepsen utførtes etter de ovenfor omtalte prinsipper. Derfor refereres forsøkene bare ganske kort.

Tab. 4. Forsøk nr. 11. <sup>13-14</sup>/<sub>10</sub> 1939.

Utvasket kreps satt i 50 ml NaHCO<sub>3</sub>-opløsning.

Tidspunkt for prøvetagning	Na-konc i væsken
1. dag kl. 11.45 ved forsøkets begynnelse .....	2,04 mM
2. dag kl. 14.00 .....	1,32 -

Tab. 5. Forsøk nr. 13. <sup>13-17</sup>/<sub>10</sub> 1939.

Utvasket kreps satt i 50 ml NaHCO<sub>3</sub>-opløsning.

Tidspunkt for prøvetagning	Na-konc i væsken
1. dag kl. 11.45 ved forsøkets begynnelse .....	2,14 mM
2. dag kl. 14.00 .....	2,06 -
5. dag kl. 19.30 .....	1,62 -

Begge disse forsøk viser et tydelig fall i natriummengden i oppløsningen. Dyrene har således optatt natrium fra en oppløsning hvor de ikke aktivt kan opta anionen.

For analysen av disse oppløsninger blev det utarbeidet en meget enkel metodikk. De almindelige natriumbestemmelser er ellers meget kompliserte. Det finnes få natriumsalter som er relativt uopløselige, og den analytiske felling og bestemmelse av natrium er derfor meget vanskelig og beheftet med store feilmuligheter. I de oppløsninger som bruktes i de omtalte forsøk, fantes det at natrium kunde bestemmes med tilstrekkelig nøiaktighet ved en meget enkel fremgangsmåte.

Prøvene inndampes med koncentrert saltsyre på glycerinbad, og ophetes siden i elektrisk ovn til 400°. Herved blir natriumsaltene omdannet til klorider, og overskytende saltsyre avdampes. Eventuelt dannet ammoniumklorid (krepsene utskiller alltid noget ammoniak), vil ved den høie temperatur sublimeres. En vanlig kloridtitrering vil derfor gi natriummengden i prøven. Fremgangsmåten gav uten særlige forholdsregler meget gode og sikre resultater.

Som kontroll på de omtalte forsøk utførtes også forsøk med optagelse av natrium fra natriumsulfat.

Tab. 6. Forsøk nr. 18. <sup>10-11</sup>/<sub>11</sub> 1939.

Utvasket krepes satt i 50 ml Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-opløsning.

Tidspunkt for prøvetagning	Na-konc i væsken
1. dag kl. 13.05 ved forsøkets begynnelse .....	1,04 mM
2. dag kl. 10.35.....	0,78 -

Dette gir fullstendig bekreftelse av at flodkrepesen kan opta Na<sup>+</sup>-ionen fra en oppløsning hvor den ikke aktivt kan opta anionen.

Natriumanalysene kunde i disse oppløsninger ikke utføres på den nettop omtalte måte, da svovelsyreresten ikke lett lar sig fjerne med saltsyre. Bestemmelsen blev foretatt efter en modifikasjon av LINDERSTRØM-LANG's metode (1936), som blir beskrevet senere.

Forsøkene med påvisning av en selektiv anionoptagende mekanisme utførtes også efter de prinsipper som det blev omtalt at KROGH har brukt. Til forsøkene bruktes ammoniumkloridopløsninger.

I tabell 7 sees forsøksprotokollen for en utvasket krepes som er satt i 60 ml NH<sub>4</sub>Cl-oppløsning. Man ser av dette forsøk at det de to første dager bare er mindre forandringer i kloridmengden i væsken. Den tredje dag setter inn med en kraftig reduksjon av kloridkonsentrasjonen, som ialt reduseres fra 2,00 mM til 0,60 mM. Samtidig bestemmelse av NH<sub>3</sub>-mengden gav det resultat at denne blev redusert fra 2,00 mM til 1,84 mM. Fallet svarer ikke på noen måte til det store fall i kloridmengden, men er lett forklarlig. Krepesens gjeller er gjennemtregelige for oppløst NH<sub>3</sub>, og ammoniakken vil derfor diffundere inn til den foreligger i samme konsentrasjon i blodet som i yttervæsken. At konsentrasjonen

Tab. 7. Forsøk nr. 2. 7-11/9 1939.

Utvasket kreps satt i 60 ml  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -opløsning.

	Tidspunkt for prøven	Cl-konc i væsken	$\text{NH}_4$ -konc i væsken
1. dag	{ kl. 15.40.....	2,00 mM	2,00 mM
	{ kl. 16.00.....	1,95 -	...
	{ kl. 17.15.....	1,90 -	...
	{ kl. 22.00.....	1,95 -	...
2. dag	kl. 11.00.....	2,10 -	...
3. dag	{ kl. 14.30.....	1,20 -	...
	{ kl. 22.30.....	1,10 -	...
5. dag	kl. 11.00.....	0,60 -	1,84 -

i yttervæsken ikke faller så meget som man kunde beregne av forholdet mellem yttervæsken og vannfasen i dyret, skyldes at krepsen hele tiden utskiller noget ammoniak.

Tab. 8. Forsøk nr. 14. 18-19/10 1939.

Utvasket kreps satt i 60 ml  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -opløsning.

	Tidspunkt for prøven	Cl-konc i væsken	$\text{NH}_4$ -konc i væsken
1. dag	{ kl. 13.50.....	1,00 mM	1,00 mM
	{ kl. 20.00.....	0,64 -	...
2. dag	kl. 10.15.....	0,18 -	2,88 -

Dette forsøk viser likesom det foregående at det eksisterer en selektiv anionoptagende mekanisme hos flodkrepsen, d. v. s. anioner kan optas aktivt uten samtidig å følges av en kation.

Ved ammoniakbestemmelsen bruktes det av KROGH (1934) konstruerte vakuumdestillasjonsapparat. Destillasjonen foregår under lavt trykk, og derfor kommer destillasjonskolben i kok allerede ved ca. 30°. En meget svak luftstrøm ledes gjennom for å drive ut ammoniakken, og destillatet opsamles i et forlag med en avmålt mengde syre. Etter 2—3 minutters destillasjon er all ammoniak destillert over, og den overskytende mengde syre i forlaget bestemmes ved retitrering med natriumhydroksyd fra en Rehberg mikroburette. Metoden er beskrevet for en kapasitet på 0,05—2 $\gamma$ , men kapasiteten kan økes ved å øke syremengden i forlaget. Metoden

blev brukt med en kapasitet på op til  $10 \mu\text{Mol}$  ( $= 140 \gamma$ ), og metoden blir da lettere, idet man kan undlate en rekke forsiktighetsregler, man behøver f. eks. ikke ta hensyn til ammoniak i luften og det destillerte vann. Som syre bruktes istedenfor KROGH's bromvannstoffsyre, N/50 svovelsyre; og istedenfor naphtylrødt som indikator bruktes en modifikasjon av TASHIRO's indikator (CONWAY & BYRNE 1933). Denne består av metylenblått og metylrødt, og gir et meget skarpt omslag, idet den slår om fra rødt til grønt over et farveløst mellemstadium. Det titrertes til det farveløse mellemstadium.

b) *De ionoptagende mekanismers distinksjonsevne.*

Den videre interesse ved de kation-, resp. anionoptagende mekanismer ligger nu i å undersøke om disse er generelle mekanismer som tar enhver ion med vedkommende positive eller negative ladning, eller om mekanismene er selektive og bare tar visse bestemte ioner, således at de er i stand til å skille mellom forskjellige kationer, resp. anioner i en oppløsning.

KROGH (1938) har utført forsøk over dette med ullhåndskrabben. Hans resultater er i korthet: Den kationoptagende mekanisme hos ullhåndskrabben er ikke i stand til å skille mellom natrium- og kaliumionene ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ). Kalciumionen ( $\text{Ca}^{++}$ ) optas i almindelighet ikke, men kan dog optas. Noen regelmessighet fantes ikke. Den anionoptagende mekanisme kan ikke skille mellom de kjemisk sett nær beslektede klorid-, bromid-, tiocyanat-, cyanat- og azidioner ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{CNS}^-$ ,  $\text{CNO}^-$  og  $\text{N}_3^-$ ). Nitrat-, jodid- og sulfationene ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{J}^-$  og  $\text{SO}_4^{--}$ ) optas ikke aktivt.

Egne forsøk.

Ved undersøkelsen av flodkreps viste det sig at dens kationoptagende mekanisme skiller mellom natrium og kalium. Følgende forsøk viser dette.

Tab. 9. Forsøk nr. 15. <sup>6</sup>13/10 1939.

Kreps satt i 100 ml væske inneholdende samme  
konentrasjon av NaCl og KCl.

	Tidspunkt for prøven	Na-konc i Væsken	K-konc i væsken
1. dag	kl. 16.48.....	5,00 mM	4,95 mM
	kl. 22.10.....	...	5,05 -
2. dag	kl. 9.35.....	...	5,05 -
4. dag	kl. 10.15.....	1,54 mM	4,95 -
8. dag	kl. 11.45.....	0,32 -	5,05 -

Tab. 10. Forsøk nr. 19. <sup>18-20</sup>/10 1939.

Kreps satt i 50 ml væske inneholdende samme  
konentrasjon av NaCl og KCl.

	Tidspunkt for prøven	Na-konc	K-konc	Cl-konc
1. dag	kl. 13.10.....	2,10 mM	2,38 mM	4,50 mM
2. dag	kl. 17.15.....	0,30 -	2,38 -	2,80 -
3. dag	kl. 10.00.....	0,18 -	2,54 -	2,68 -

Av disse forsøk ser man at flodkrepsen optar natrium fra en blanding av natrium- og kaliumklorid, mens kaliumkonentrasjonen forblir uforandret i oppløsningen. Den kationoptagende mekanisme er således i stand til å skille mellom  $\text{Na}^+$ - og  $\text{K}^+$ -ionene. Mekanismen er altså ikke identisk med den som KROGH har funnet hos ullhåndskrabben. Av det siste av de to nevnte forsøk, hvor kloridmengden i oppløsningen blev bestemt, ser man også at det samtidig med det optatte natrium er optatt en tilsvarende mengde  $\text{Cl}^-$ -ion.

Angående analysemetodikken skal nevnes at kalium er felt som kaliumplatinklorid,  $\text{K}_2\text{PtCl}_6$ . Praktisk talt alle konvensjonelle kaliumanalyser benytter denne felling, men den videre fremgangsmåte varierer. NORBERG (1937), har utarbeidet en mikrometode, og hans fremgangsmåte blev i det vesentlige fulgt. Prøven inndampes med vannstoffplatinklorid, og bunnfallet vaskes i analyseglasset med absolutt alkohol. Herved oppløses natriumsaltet, mens kaliumsaltet forblir uoppløst. Glasset centrifugeres, og væsken suges fra bunnfallet. Denne vaskning gjentas to ganger. Bunnfallet av det rene  $\text{K}_2\text{PtCl}_6$



kan nu titreres (efter Norberg) efter at det ved tilsetning av kaliumjodid er omdannet til  $K_2PtJ_6$ . Titreringen skjer med natriumtiosulfat,  $Na_2S_2O_3$ , i en pufferopløsning for å holde  $p_H$  konstant. Kaliumplatinjodidet har en sterk rødbrun farve, som ved endt titrering går over i en skittengrøn. Denne fremgangsmåte blev brukt ved de forsøk som utførtes med strandkrabben, men da metoden ikke er særlig sikker (p. g. a. at omslaget ved titreringen ikke er helt tydelig), blev det ved forsøkene med flodkreps istedenfor gått over til å bestemme mengden av kaliumplatinjodid fotometrisk. Bunnfallet opløstes i en fosfatpuffer ( $p_H = 6,98$ ), tilsattes KJ i overskudd, og farvestyrken bestemmes så i et elektrisk fotometer ved dens filtrasjonsevne overfor grønt lys.

Videre bestemtes natrium + kalium efter samme fremgangsmåte som omtalt for natriumbestemmelse i oppløsninger som bare inneholder natrium (side 20). Natriummengden blev derefter beregnet som differencen  $(Na + K) - K = Na$ .

For den anionoptagende mekanisme viste det sig ved forsøkene at den ikke er i stand til å skille mellem klorid-, bromid-, og tiocyanationene.

Forsøkene med optagelse av bromid skal omtales først. I tabell 11 er forsøksprotokollen for et av disse forsøk referert. Man ser her at det er et sterkt fall i bromidmengden inntil den tredje dag, men så er det noen stigning igjen mot slutten av forsøket. Dette skyldes sannsynligvis den sterke virkning bromider har på nervesystemet, og krepsen var på dette tidspunkt heller ikke i god kondisjon.

Tab. 11. Forsøk nr. 8. <sup>13-18</sup>/<sub>9</sub> 1939.

Utvasket kreps satt i 50 ml natriumbromidopløsning.

	Tidspunkt for prøven	Br-konc i væsken
	kl. 16.40 forsøkets begynnelse	
1. dag	kl. 16.45 .....	1,90 mM
	kl. 22.15 .....	1,47 -
2. dag	kl. 10.20 .....	1,00 -
3. dag	kl. 16.30 .....	0,56 -
4. dag	kl. 17.15 .....	0,75 -
6. dag	kl. 8.00 .....	0,70 -

Tab. 12. Forsøk nr. 16. <sup>13-17</sup>/<sub>10</sub> 1939.

Utvasket kreps satt i 40 ml NaBr-opløsning.

	Tidspunkt for prøven	Br-kone i væsken
1. dag	{ kl. 11.50 forsøkets begynnelse	
	{ kl. 11.55.....	1,835 mM
2. dag	kl. 14.00.....	1,12 -
5. dag	kl. 19.30.....	0,551 -

Ved avslutningen av dette forsøk var krepsen øiensynlig meget sterkt forgiftet, liggende på ryggen og uten kontroll over bevegelsene. Nervesystemet var tydelig i uorden. Den blev derfor satt i almindelig ledningsvann, hvor den meget langsomt kom sig, 10 dager efter var den i full vigør igjen.

Begge disse forsøk viser en aktiv optagelse av bromid, idet konsentrasjonen i krepsen må være det mangedobbelte av konsentrasjonen i yttervæsken ved forsøkets slutt. I siste forsøk veide krepsen ca. 35 g, og den må da ha hatt en bromidkonsentrasjon av over 3 mM i blodet ved forsøkets slutt.

Bestemmelsen av bromid er utført fullstendig som kloridbestemmelsene, idet bromider ved den anvendte analysemetode opfører sig fullstendig identisk med klorider. Det kan naturligvis være kommet noget klorider ut i væsken, men dette forårsaker bare at de bromidkonsentrasjoner som er funnet i slutten av forsøkene ligger noget høiere enn de virkelige verdier. Denne analysemetodes resultater viser altså en noget mindre optagelse av bromid enn det som i virkeligheten er foregått. For tydingen av forsøkene er det altså ikke nødvendig å skille kloridene fra bromidene, og da den analytiske adskillelse er meget vanskelig, blev det heller ikke forsøkt.

Tiocyanat(rhodan)ionens forhold frembyr særlig interessante momenter, da det er en ion som aldri forekommer i ferskvann. Tiocyanationen har fysikalsk-kjemisk sett stor

likhet med en halogenion, den står endog  $\text{Cl}^-$ -ionen og  $\text{Br}^-$ -ionen nærmere enn  $\text{J}^-$ -ionen står disse. Mekanismens reaksjon overfor en sådan ion, gir derfor en interessant opplysning om hvordan mekanismen virker overfor en ion den i naturen aldri blir utsatt for.

Det forsøk som er vist i tabell 13, viser en utvilsom aktiv optagelse av tiocyanat, idet konsentrasjonen i blodet stiger langt over konsentrasjonen i yttervæsken.

Et forsøk til utførtes som kontroll. Det nevnes bare at en kreps blev satt i 100 ml 2 mM NaCNS-oppløsning. 2 dager etter var konsentrasjonen i blodet 4,68 mM.

Tab. 13. Forsøk nr. 3. <sup>14-18</sup>/<sub>9</sub> 1939.

Kreps satt i 50 ml NaCNS-oppløsning.

	Tidspunkt for prøven	CNS-konc i væsken	CNS-konc i blod
1. dag	{ kl. 13.55, begynt .....	2,00 mM	0
	{ kl. 14.25 .....	1,94 -	...
	{ kl. 16.45 .....	1,86 -	...
2. dag	kl. 13.20 .....	1,61 -	...
3. dag	{ kl. 17.15 .....	1,30 -	...
	{ kl. 17.45 .....	...	3,90 mM
5. dag	{ kl. 8.00 .....	1,18 -	...
	{ kl. 9.00 .....	...	3,64 -

Bestemmelsen av tiocyanat utførtes kolorimetrisk. Ved tilsetning av et treverdig jernsalt til oppløsningen, fremkommer en kraftig rødbrun farve (jernrhodanfarven). Tidligere udførtes dette som en sammenligning med en oppløsning av kjent styrke. Denne metode har en meget stor ulempe i at farven blekes meget hurtig, og man må derfor ved den sammenlignende kolorimetrering for hver enkelt bestemmelse tilberede en ny kjent oppløsning. Da de metoder som i den kjemiske litteratur angis å skulle kunne forhindre avblekningen, ikke fører frem, blev farveintensiteten istedenfor bestemt i et fotometer i bestemt tid (1 minutt) efter tilsetning av jernreagensen. Fotometret var bygget av en lampe som gav konstant lys, og en fotoelektrisk celle for måling av lysstyrken. Mellem disse kunde det settes inn lysfiltre av forskjellig farve.

Ved den fotometriske bestemmelse av tiocyanat bestemtes farveintensiteten ved filtreringsevnen overfor grønt lys.

Ved de første forsøk på denne bestemmelse, opnåddes en nøiaktighet som lå langt over den ønskede.

Tiocyanatmengden i blodprøver kunde ikke direkte bestemmes i fotometret. Jernreagensen inneholder salpetersyre, og eggehvite-stoffene i blodet felles av dette. Proteinet i blodet blev derfor først felt med 20% triklorreddiksyre. Efter centrifugering går bestemmelsen på den klare væske uten vanskelighet. Ved beregningen er det tatt hensyn til den filtreringsevne blod uten tiocyanatinnhold har efter tilsetning av samme reagensmengde.

Metoden fordrer så små stoffmengder at 0,1 ml av en 1 mM NaCNS-opløsning fortynnet til 25 ml volum, er tilstrekkelig til en nøiaktig bestemmelse.

### **Sammenfatning av resultatene for flodkreps.**

- 1) Flodkrepsen har to adskilte mekanismer for optagelse av kationer og anioner fra det omgivende vann.
- 2) Den kationoptagende mekanisme er i stand til å skille mellom natrium og kalium, og kan således opta bare natrium fra en oppløsning som inneholder begge ioner.
- 3) Den anionoptagende mekanisme er ikke i stand til å skille mellom klorid, bromid og den halogenlignende tiocyanation.

## **Undersøkelse av de osmoregulerende mekanismer hos strandkrabben.**

### **I. Tidligere undersøkelser.**

Det blev i innledningen nevnt at visse euryhaline evertebrater i vann med lav saltholdighet er i stand til å oprettholde et høiere osmotisk trykk enn det omgivende vann. Til denne gruppe saltvannsdyr hører strandkrabben (*Carcinus maenas*).

En av de første som har undersøkt marine dyrs osmotiske trykk er BOTAZZI (1897), som opstilte »loven om at de marine evertebrater er poikilosmotiske«. Han fremholdt at de marine evertebrater fullstendig følger det omgivende vanns osmotiske trykk. FREDERICQ (1904) undersøkte en rekke marine dyr, og fant at strandkrabben ikke følger de opstilte regler. I almindelig havvann hadde dens blod samme osmotiske trykk som det omgivende vann, men ved lavere konsentrasjoner viste dens blod en betydelig hypertoni. FREDERICQ anså dette for en ren undtagelse, og undersøkte ikke forholdet nærmere. DUVAL (1925) undersøkte blandt annet også strandkrabben. En kurve fra hans arbeide er gjengitt i fig. 1, hans viktigste resultater fremgår av denne. Man ser at krabben ved de lave konsentrasjoner opprettholder hypertoni, men ikke på et konstant nivå; det er hele tiden et fall svarende til et fall i vannets konsentrasjon, men av mindre størrelse. DUVAL betraktet fremdeles strandkrabben for et undtagelsestilfelle mellom de marine evertebrater.

I 1929 fandt SCHLIEPER at de forhold som var beskrevet for strandkrabben, er representert hos en lang rekke marine evertebrater, særlig hos brakkevannsdyr. SCHLIEPER fremhever meget sterkt at det må dreie sig om en aktiv regulering, men den nærmere mekanisme kan han på dette tidspunkt ikke si noget om. Han mener at opprettholdelsen av hypertoni er forbundet med energiforbruk, da han fant at strandkrabben i fortynnet saltvann får en betydelig økning i stoffskiftet.

SCHWABE (1933) har vist at det fall som inntreer når en strandkrabbe flyttes til fortynnet saltvann ikke skyldes en osmotisk innstrømning av vann, men et salttap. Dette forutsetter at strandkrabbens integument er gjennemtregelig for

saltvannets ioner. Tidligere var det vist at strandkrabbens integument er gjennemtregelig for jod-ioner (BETHE & BERGER 1931), men derfra kan man ikke direkte anse det bevist at integumentet i sin almindelighet er gjennemtregelig for ioner, da de konsentrasjoner av natriumjodid som blev

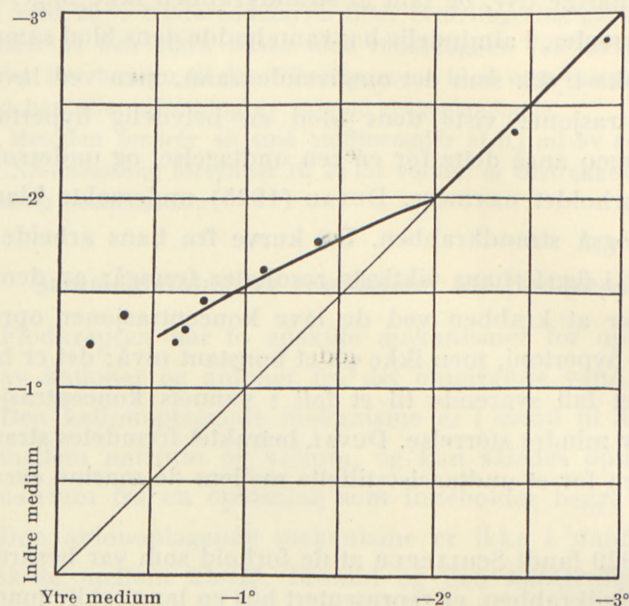


Fig. 1. Frysepunktsdepresjon i blod av *Carcinus* som funksjon av det ytre medium (etter Duval).

brukt til forsøkene kan ha hatt en skadelig innflytelse på membranenes normale funksjon. BETHE (1929 og 1934) påviste ved å forandre konsentrasjonen av en enkelt ion i det omgivende vann, at overflaten av en rekke marine dyr, deriblandt strandkrabben, er permeabel for havvannets ioner.

I de tidligste arbeider (inntil SCHLIEPER 1929), gikk man ut fra at brakkevannsdirene oprettholdt sin osmotiske konsentrasjon på den måten at overflaten var impermeabel for vann og salter. De ovenfor omtalte arbeider viser at det hos

strandkrabben må foregå et osmotisk salttap direkte gjennom huden, og videre en osmotisk vanninnstrømning (som medfører et betydelig salttap gjennom nyrene, da urinen er omtrent isotonisk med blodet), så lenge blodet opprettholder høiere osmotisk konsentrasjon enn det omgivende vann.

NAGEL (1934) har påvist hvordan strandkrabben på tross av dette salttap opprettholder hypertoni i fortynnet saltvann. Han viste at krabben har en mekanisme for aktiv salttransport fra det omgivende vann til blodet. Denne mekanisme påvistes på følgende måte: En strandkrabbe som flyttes til et fortynnet saltvann, får som omtalt et betydelig fall i blodets konsentrasjon. Øker man nu konsentrasjonen i vannet noget, men ikke mer enn at den fremdeles er under blodets konsentrasjon, får man en stigning i blodets konsentrasjon. Da blodets konsentrasjon hele tiden har ligget over konsentrasjonen i det omgivende vann, har salttransporten foregått mot det osmotiske trykk, det må være en aktiv transport. NAGEL påviste at hverken nyrene eller tarmkanalen har betydning for denne konsentrasjonsøkning, og drog den slutning at den er lokalisert i gjellene.

Efter fullførelsen av manuskriptet er det fremkommet et arbeide av WEBB (1940), som bekrefter strandkrabbens evne til osmotisk regulasjon. Ved blod og urinanalyser vises det at magnesium og sulfatkonsentrasjonen i blodet ved hjelp av nyrefunksjonen holdes på et konstant nivå. Andre forhold ved vann- og saltomsetningen diskuteres på et indirekte grunnlag.

## II. Egne undersøkelser.

Metodikken ved forsøkene med strandkrabben.

Prinsippet i forsøkene med strandkrabben er det samme som for flodkrepsen. Man bringer blodets konsentrasjon

noget ned, og undersøker derefter om mekanismene er i stand til å bringe konsentrasjonen i blodet op ved optagelse av salter (ioner) fra et vann med mindre konsentrasjon av vedkommende ion enn blodet.

Strandkrabben kan ikke utvaskes med destillert vann, men dens blodkonsentrasjon bringes ned ved å sette den i et sterkt fortynnet saltvann. Blodets konsentrasjon synker til et bestemt nivå, svarende til vannets konsentrasjon, men altså betydelig høiere enn dette. Denne steady state<sup>1</sup> opnås i løpet av 1 døgn. DUVAL (1925) har nemlig vist at konsentrasjonen ikke synker lenger ned i de følgende 14 dager enn den var 24 timer etter at krabben var flyttet til fortynnet vann (bekreftet av SCHWABE 1933). Man kan altså bringe strandkrabbens blodkonsentrasjon ned ved at man dagen før forsøket setter den i saltvann av en passende lav konsentrasjon.

Da strandkrabbens omgivende medium alltid må være relativt saltholdige oppløsninger, opstår det ved påvisningen av de ionoptagende mekanismer visse analytiske vanskeligheter. For flodkrepsen kunde en liten forandring i det omgivende vanns konsentrasjon (f. eks. på 1 mM) lett påvises, da den alltid befant sig i meget svake oppløsninger (f. eks. 2 mM, således at det konsentrasjonsfall som skulde påvises var på 50 relative  $\%$ ). Hvis en strandkrabbe nedsetter konsentrasjonen i det omgivende vann med 1 mM, er denne forandring vanskelig å påvise når vannets konsentrasjon ligger på f. eks. 50 eller 100 mM. For en rekke ioner vil en sådan forandring endog være mindre enn den gjennomsnittlige analysefeil. Analysenøiaktigheten er f. eks. for

<sup>1</sup> Mens en almindelig fysisk likevektstilstand oprettholdes uten forbruk av energi, kan der under fysiologiske forhold oprettholdes et konstant nivå avvikende fra den egentlige likevekt. Dette fordrer forbruk av energi, og en sådan tilstand kalles almindelig i fysiologien »steady state«.



alkalimetallene ca. 2 rel.  $\%$ . Selv en temmelig sterk optagelse fra vannet, gir således ofte ikke noen tydelig påvisbar forandring i dettes sammensetning, eller den forandring man finner er så liten at man ikke med sikkerhet kan si at den skyldes optagelse og ikke tilfeldige analysefeil. Derfor må man i almindelighet foreta samtidige analyser på blodet for virkelig å vise at det har funnet sted en stigning i konsentrasjonen.

Teknikken for å ta blodprøver av strandkrabben er meget lett. Etter at krabben er fiksert i en passende stilling, og vannet tørret av med filtrerpapir, klipper man hurtig et av de ytre ledd av et av dens gangben. Det vil da i almindelighet hurtig dryppe ut blod, og efter at man har tatt tilstrekkelig til analysen (oftest noen få dråper), klemmer man såret sammen med en tang. Krabben vil da nesten alltid øieblikkelig kaste benet ved selvamputasjon, og sårflaten ved den basale del er da ikke blødende. Hvis det skulde hende at krabben ikke kaster benet, er sammenklemningen tilstrekkelig til å hindre videre blødning. Man har således en meget lett metode til å skaffe blodprøver uten å foreta større inngrep, som virker forstyrrende på de fysiologiske forhold.

Den største metodiske vanskelighet i forsøkene med strandkrabben, er at konsentrasjonen av de oppløsninger den skal gå i, må være relativt stor. Da man ofte bruker oppløsninger som i sammensetning avviker meget fra almindelig havvann, kan de komme til å virke meget skadelige. I noen forsøk må også giftige salter (f. eks. ammoniumklorid) brukes i meget høie konsentrasjoner. Mens det i forsøkene med flodkreps lot sig gjøre å la dem gå i mange dager i en svak oppløsning av ammoniumklorid, blir de konsentrasjoner som man må bruke til en strandkrabbe så høie at de virker sterkt giftige. Forsøkene må derfor ofte være meget

kortvarige, og de koncentrationsforskyvninger som de osmoregulatoriske mekanismer kan fremkalle blir tilsvarende små. Man må derfor regne med at en rekke forsøk ikke viser tilstrekkelig tydelige resultater, før man finner den rette kombinasjon av de forskjellige forsøksbetingelser. Den største vanskelighet har i forsøkene med strandkrabben vært å finne en hensiktsmessig fremgangsmåte.

#### Strandkrabbens hypertoni i fortynnet saltvann.

De forfattere som tidligere har behandlet strandkrabbens hypertoni i fortynnet saltvann, har bare arbeidet med konentrasjoner i vannet på ned til ca. 100 mM (= ca. 5 ‰). En undersøkelse av hvordan strandkrabben forholder sig i vann av så lav konentrasjon at forsøksdyrene såvidt kan leve i det, vil derfor være av interesse. Jeg gjorde derfor forsøk for å undersøke forholdene ved konentrasjoner i vannet på ned til ca. 20 mM (= ca. 1 ‰).

De verdier som jeg har funnet for blodets kloridinnhold hos 18 strandkrabber i vann ved forskjellige lave konentrasjoner, er grafisk fremstilt i fig. 2. Denne kurve kan betraktes som en fortsettelse av den nedre del av den kurve som blev gjengitt fra DUVAL's arbeide (s. 30).

Av figuren fremgår hvilke verdier jeg fant for kloridmengden i blodet hos krabber (avsatt som ordinat), og de tilsvarende kloridmengder i vannet (avsatt som abscisse). Alle verdier er fra relativt meget fortynnet havvann, den høieste konentrasjon er 300 mM (= ca. 18 ‰).

Man ser at for samtlige krabber er kloridkonentrasjonen i blodet høiere enn i det omgivende vann. (Den skrå linje i 45° vinkel representerer isotoni mellom vann og blod.) Den del av kurven som er av særlig interesse, er den nederste del, svarende til de saltkonentrasjoner i vannet

som er den nederste grense hvor strandkrabben kan leve. Man ser at når kloridmengden i vannet er ca. 20 mM

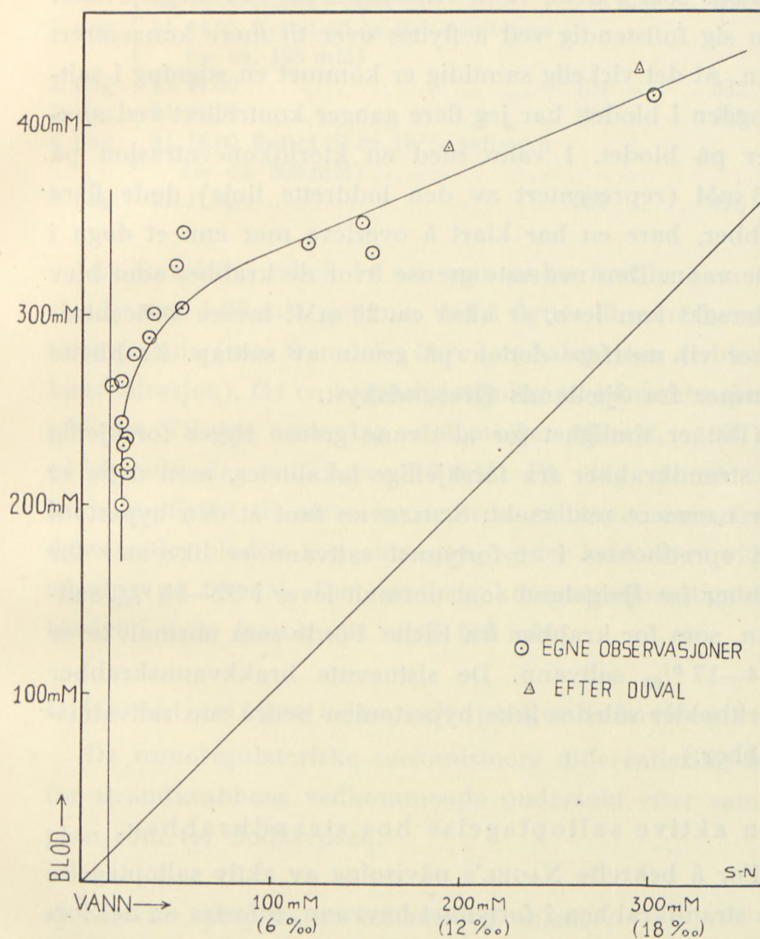


Fig. 2. Kloridinnhold i blod av *Carcinus* som funksjon av det ytre medium.

(= 1,1 ‰), viser kloridmengden i krabbeblodet tilbøielighet til et sterkt fall, samtidig som det er stor forskjell på de enkelte individer. Det viser at en del av krabbene iallfall i noen tid kan klare å holde sin saltkonentrasjon oppe i

dette medium. At noen krabber ikke klarer det, fremgår av at ikke få er døde i vann av denne konsentrasjon. Flere krabber som i dette vann efter noen tid var meget svake, kom sig fullstendig ved å flyttes over til mere koncentrert vann. At det virkelig samtidig er kommet en stigning i saltmengden i blodet, har jeg flere ganger kontrollert ved analyser på blodet. I vann med en kloridkonsentrasjon på 17,5 mM (representert av den loddrette linje) døde flere krabber, bare en har klart å overleve mer enn et døgn i dette vann. Den nederste grense hvor de krabber som blev undersøkt kan leve, er altså ca. 20 mM, lavere konsentrasjoner vil medføre døden på grunn av salttap. Krabbene stammer fra Sjællands Øresundskyst.

(Det er mulighet for at denne grense ligger forskjellig for strandkrabber fra forskjellige lokaliteter, men dette er ikke nærmere undersøkt. SCHLIEPER fant at den hypertoni som oprettholdes i et fortynnet saltvann er like stor for krabber fra Helgoland som normalt lever i 32—33 ‰ saltvann, som for krabber fra Kieler Förde som normalt lever i 14—17 ‰ saltvann. De sistnevnte brakkvannskrabber oprettholder således ikke hypertonien bedre enn saltvannskrabber.)

Den aktive saltoptagelse hos strandkrabben.

For å bekrefte NAGEL's påvisning av aktiv saltoptagelse hos strandkrabben i fortynnet havvann, utførtes en del forsøk. Som eksempel på et slikt forsøk er en forsøksprotokoll anført i tabell 14.

(Alle de forsøksresultater som omtales i det følgende, er bekreftet ved gjentagne kontrollforsøk. For å lette fremstillingen, er det bare anført karakteristiske forsøksprotokoller som eksempler for å belyse de omtalte resultater.)

Tab. 14. Forsøk nr. 3. <sup>17-21</sup>/<sub>1</sub> 1939.

	Tidspunkt for prøvetagning	Cl i vann	Cl i blod
1. dag	kl. 14.00 (steady state).....	38 mM	300 mM
	kl. 14.05, flyttet til ca. 10 <sup>0/00</sup> saltvann (= ca. 165 mM) .....	...	...
2. dag	kl. 11.00 .....	154 -	332 -
3. dag	kl. 11.00 .....	148 -	348 -
4. dag	kl. 18.00, flyttet til ca. 18 <sup>0/00</sup> saltvann (= ca. 300 mM) .....	...	...
	kl. 11.00 .....	302 -	416 -

Av forsøket i tabell 14 ser man at en krabbe som er i steady state i 38 mM sjøvann, ved å flyttes til mere koncentrert sjøvann (som fremdeles bare har halvparten av blodets konsentrasjon), får en betydelig stigning av konsentrasjonen i blodet. Til den neste dag er stigningen 32 mM, og til den påfølgende dag ytterligere 16 mM. En dag senere blev krabben flyttet til mere koncentrert saltvann, men fremdeles under blodets konsentrasjon, og der kom så en videre stigning på 68 mM. Den samlede konsentrasjonsstigning i blodet i dette forsøk var altså 116 mM.

#### Differentieringen i den saltoptagende mekanisme.

De osmoregulatoriske mekanismers differentiering blev for strandkrabbens vedkommende undersøkt efter samme plan som for flodkrepsen.

##### a) *Selektiv optagelse av kationer og anioner.*

Det dreiet sig først om å klarlegge om strandkrabben likesom flodkrepsen har to ionoptagende mekanismer som kan arbeide uavhengig av hverandre, en for optagelse av kationer og en for optagelse av anioner.

Til påvisning av den kationoptagende mekanisme bruktes likesom for flodkrepsen oppløsninger av natrium-

sulfat og natriumkarbonat. En transport fra sådanne oppløsninger med lavere natriuminnhold enn blodet, og en økning av konsentrasjonen i dette, er bevis for en aktiv optagelse av  $\text{Na}^+$ -ionen, idet sulfat- eller bikarbonationen ikke kan optas aktivt.

Forsøkene er her vanskeliggjort ved at krabbene meget dårlig tåler å gå i så sterke sulfat- henholdsvis bikarbonatopløsninger som det må brukes. Etter kort tid, ofte mindre enn en time, blir krabbenes kondisjon meget dårlig. De blir tetaniske, nesten ute av stand til å bevege sig, og dør temmelig snart hvis de ikke blir overført til almindlig saltvann igjen. Dette gjelder særlig for bikarbonatopløsningene. Det inntreer meget hurtig en likevekt mellom blodets og det omgivende vanns  $\text{CO}_2$ -tensjon, da gjelleoverflaten på grunn av den respiratoriske funksjon er lett permeabel for  $\text{CO}_2$ . For sulfatopløsningenes vedkommende inntreer tilstandene med dårlig kondisjon betydelig langsommere, da gjelleoverflaten er praktisk talt impermeabel for  $\text{SO}_4^{\pm\pm}$ -ionen. Den skadelige innflytelse av sulfatopløsningene skyldes sikkert for en stor del at krabben utsettes for et stort kloridtap når den befinner sig i en kloridfri oppløsning.

Det viste sig at forsøkene på tross av disse vanskeligheter i en del tilfeller gav utvilsomme resultater. To eksempler på sådanne forsøk hitsettes, det ene er utført med natriumsulfat, det annet med natriumbikarbonatopløsning.

Forsøket i tabell 15 er utført med en krabbe som ved forsøkets begynnelse var i steady state i fortynnet sjøvann inneholdende 28,5 mM natrium + kalium. Krabben blev herfra overført til en 270 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -opløsning.

Konsentrasjonsøkningen av natrium i blodet er utvilsom. I dette forsøk viser analysene den samlede alkalimengde i prøvene. For yttervæsken hvor det bare finnes natrium

Tab. 15. Forsøk nr. 11.  $2\frac{1}{2}$  1939.

Tidspunkt for prøven	Na (+ K) i vann	Na (+ K) i blod	Cl i blod
kl. 11.50 Forsøk beg. ....	270 mM	340 mM	325 mM
kl. 16.40 .....	...	416,6 -	184 -

spiller dette ingen rolle. For blodet er innholdet av kalium iallfall under 10 mM, sannsynligvis ca. 5 mM, og selv om verdiene for natrium i blodet i virkeligheten er 10 mM mindre enn de som finnes i tabellen, spiller dette ingen rolle for tydningen av forsøket. Den store stigning i alkali-mengden må nemlig skyldes optagelse av natrium fra vannet. Man ser også at krabben samtidig har hatt et meget stort tap av klorider, noget som man også måtte vente da yttervæsken overhodet ikke inneholder klorider. Gjelleoverflaten er jo som tidligere omtalt permeabel for blodets ioner. Som omtalt på forrige side er det grunn til å tro at klorid-tapet spiller en betydelig rolle for krabbens manglende evne til å tåle oppløsninger av denne art.

Forsøket i tabell 16 er utført med en krabbe som ved forsøkets begynnelse var i steady state i vann med klorid-konentrasjon på 21,7 mM. Krabben blev herfra overført til ca. 300 mM  $\text{NaHCO}_3$ -opløsning.

I dette forsøk er krabben satt i så liten væskemengde som mulig for å opnå størst mulig forandring i yttervæskens konentrasjon. Man ser her at det i den første periode på  $2\frac{1}{2}$  time er skjedd en sterk forøkning av natriuminnholdet i blodet. I den neste periode er forandringen ikke større

Tab. 16. Forsøk nr. 6.  $23\frac{1}{1}$  1939.

Tidspunkt for prøven	Na i vann	Na i blod	Cl i blod
kl. 16.55 Forsøk beg. ....	308 mM	319 mM	332 mM
kl. 19.30 .....	...	368 -	208 -
kl. 21.45 .....	185,5 -	371 -	208 -

enn analysenøiaktigheten. Man ser at optagelsen fullstendig svarer til det sterke fall i vannets natriumkonentrasjon. Som ventet er det også her et fall i kloridmengden i blodet, men ikke så stort som i forrige forsøk da det ytre væskelvolum er meget mindre. Ved forsøkets avslutning var krabbens kondisjon meget dårlig, og den døde kort etter. Allerede etter den første periode var kondisjonen temmelig dårlig, og dette forklarer at det i den annen periode ikke skjedde noen fortsatt optagelse.

Angående analysemetodikken er det i de to forsøk benyttet forskjellige analysemetoder.

I det først omtalte forsøk er analysen utført som total alkali-bestemmelse, fordi det da forsøkene blev utført ikke forelå noen enkel og pålitelig mikrometode til bestemmelse av natrium, derimot fantes det en metode utarbeidet av LINDERSTRØM-LANG (1936) for bestemmelse av total alkali i blod og vev.

Metoden går ut på å foraske de organiske stoffer med en blanding av  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  og  $\text{BaCl}_2$  i elektrisk ovn ved  $400^\circ$ . Herved forbrenner alt organisk stoff, og alkalisaltene omdannes til klorider. Asken oppløses i vann, og alt barium felles som karbonat ved tilsetning av ammoniumkarbonat. Etter centrifugering har man bare alkalikloridene og ammoniumklorid- og karbonat i oppløsningen. Etter inndampning ophetes til ca.  $350^\circ$ , herved sublimerer alle ammoniumsaltene, og man har bare alkalikloridene igjen. En almindelig kloridtitrering vil så gi mengden av disse. Metoden har en meget stor ulempe i at den er meget omstendelig, det tar således tre dager å gjennomføre en serie analyser.

Til de senere forsøk bruktes en metode beskrevet av HOFFMAN og OSGOOD (1938). Den går ut på å felle natrium med uranyl-zinkacetat. Det dannes et relativt uopløselig kompleks salt, som på grunn av sin sterke gule farve kan bestemmes kvantitativt i et fotometer. Denne metode gav utmerkete resultater. Det forsøk som er gjengitt i tabell 16, er utført med denne analysemetode.

For påvisning av en selektiv anionoptagende mekanisme hos strandkrabben, bruktes likesom for flodkrepsen optagelse av  $\text{Cl}^-$ -ionen fra ammoniumklorid. Det forhold



at det måtte brukes relativt koncentrerte oppløsninger i disse forsøk, gjorde sig sterkt gjeldende. Ammoniak har en sterk giftvirkning, og ved neutral reaksjon i en ammoniumklorid-oppløsning vil en vesentlig del av ammoniakken foreligge som oppløst  $\text{NH}_3$ , og ikke som ion. Gjelleoverflaten er permeabel for fri  $\text{NH}_3$ , men ikke for  $\text{NH}_4^+$ -ionen. Hvis man forskyver oppløsningens reaksjon til den sure side, vil mer av den fri ammoniak gå over i ionisert tilstand, og inntrengningen av ammoniak gjennom gjelleoverflaten går langsommere. Ved  $p_{\text{H}} = 5$  i en 0,2 Normal  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -oppløsning, vil konsentrasjonen av fri  $\text{NH}_3$  være  $1,11 \cdot 10^{-5}$ , mens resten foreligger som ion. Når oppløsningen inneholder så lite fri ammoniak, blev det antatt at en forgiftning inntreder vesentlig langsommere. Ved forsøkene viste det sig også at forgiftningen inntrådte langsommere når  $p_{\text{H}}$  blev holdt på ca. 5 enn i neutral oppløsning. Allikevel var det meget vanskelig å holde krabbene levende i en ammoniumkloridoppløsning så lenge at det kom en påviselig stigning i blodets kloridmengde. En rekke forsøk mislyktes, men det lyktes til slutt å få en rekke forsøk som viser sikker optagelse av klorid. En protokoll fra et av disse forsøk hitsettes som eksempel. Dette forsøk er utført med en krabbe som ved forsøkets begynnelse var i steady state i 20 mM sjøvann.

Ved forsøkets avslutning efter 32 minutter var krabben død, men det er inntrådt en stigning på 19 mM i kloridmengden i blodet. Riktignok har blodets konsentrasjon ved forsøkets begynnelse vært litt under væskens (200 mM mot

Tab. 17. Forsøk nr. 12.  $\frac{2}{2}$  1939.

Tidspunkt for prøven	Cl i vann	$\text{NH}_3$ i vann	Cl i blod
kl. 13.22 Forsøk beg.....	208 mM	202,4 mM	200 mM
kl. 13.40 .....	206 -	204,1 -	...
kl. 13.54 .....	202 -	198,0 -	219 -

208 mM), men konsentrasjonsstigningen op over vannets konsentrasjon er allikevel utvilksom. Dessuten er kloridkonsentrasjonen i blodet beregnet på volum av blod; men da dette inneholder betydelige mengder protein, er kloridkonsentrasjonen i blodets vannfase betydelig høiere, og denne konsentrasjon har således hele tiden vært høiere enn yttervæskens.

Det var nødvendig å arbeide med oppløsninger hvis kloridinnhold lå så nære blodets, da forgiftningen kommer så hurtig at det osmotiske tap ved store konsentrasjonsforskjeller hurtig vil overskride optagelsen.

Det fall som i slutten av forsøket i tabell 17 er kommet i ammoniakkonsentrasjonen, skyldes at  $p_H$  ved slutten av forsøket blev forskjøvet til den alkaliske side, og fallet skyldes således  $NH_3$  som er diffundert inn i forsøksdyret.

Som sammenfatning av de nu omtalte forsøk, fremgår det at strandkrabben likesom flodkrepsen har to ionoptagende mekanismer som kan arbeide uavhengig av hverandre, en for optagelse av kationer og en for anioner.

#### b) *De ionoptagende mekanismers distinksjonsevne.*

Differentieringen i den kationoptagende mekanisme.

Når krabber har gått mer enn 1 døgn og er i steady state i ca. 20 mM saltvann, vil kaliumkonsentrasjonen i deres blod være ca. 4—5 mM. I vannet er kaliumkonsentrasjonen da ca. 0,45 mM. Hvis nu dette vann tilsettes kaliumklorid, således at konsentrasjonen økes, men allikevel forblir under blodets, viser det sig at krabbene i dette vann i løpet av kort tid får sterke forgiftningssymptomer. Får de fortsatt gå i dette vann dør de, blir de derimot flyttet til almindelig vann, kommer de sig hurtig. Dette tyder sterkt

på at det er foregått en aktiv kaliumoptagelse. En kaliumforgiftning skulde ellers ikke kunne inntre når konsentrasjonen i vannet er under blodets.

I de forsøk som blev gjort, viste det sig også at kaliumkonsentrasjonen i vannet sank. Av de forsøk hvor det samtidig er utført kontroll ved å bestemme kaliummengden i blodet, anføres et eksempel (tabell 18).

Forsøket er gjort med en krabbe som ved forsøkets begynnelse var i steady state i ca. 17,5 mM saltvann. Den blev flyttet til en oppløsning inneholdende 5 mM KCl, 5 mM NaCl og 10 mM CaCl<sub>2</sub>. (CaCl<sub>2</sub> er for å øke kloridmengden uten samtidig å øke natriummengden, og for å skaffe tilstrekkelig høit osmotisk trykk.)

Tab. 18. Forsøk nr. 27.  $\frac{21}{3}$  1939.

Tidspunkt for prøven	K-kone i vann	K-kone i blod
kl. 13.50 Forsøk beg.....	4,74 mM	4,95 mM
kl. 14.30 .....	4,55 -	...
kl. 14.50 .....	4,50 -	5,19 -

I et annet forsøk blev samtidig forandringene i innholdet av Na, K og Cl i oppløsningen bestemt. Krabben var ved forsøkets begynnelse i steady state i ca. 20 mM saltvann.

Tab. 19. Forsøk nr. 16.  $\frac{10}{2}$  1939.

Tidspunkt for prøven	Cl i vann	K i vann	Na i vann	K i blod
kl. 13.52.....	138 mM	5,00 mM	62,5 mM	...
kl. 14.04.....	136 -	...	...	...
kl. 14.22.....	134 -	4,45 -	60,0 -	...
kl. 15.09.....	134 -	...	...	...
kl. 16.20.....	130 -	...	...	...
kl. 17.40.....	130 -	3,82 -	57,5 -	10,97 mM

Man ser her en avtagen i vannets klorid-, natrium- og kaliummengder. Uheldigvis var kaliummengden i blodet

ikke bestemt før forsøkets begynnelse, men sluttkoncentrasjonen ligger over det dobbelte av hvad man må anta at den har vært ved begynnelsen av forsøket (krabben var i steady state i 20 mM saltvann, og da er kaliumkoncentrasjonen i blodet normalt ca. 4,5 mM). Krabben viste også meget sterke tegn til kaliumforgiftning, men kom sig fullstendig etter å være satt over i almindelig sjøvann. (I det vann som blev brukt i forsøket, var kaliummengden ca. 4 ganger så stor som den normalt er i forhold til natriummengden.) Natriumanalysenes nøiaktighet i dette forsøk var ikke stor, men man kan allikevel se at størrelsesordenen av de natrium- og kaliummengder som er optatt er omtrent den samme.

De omtalte forsøk viser altså at den kationoptagende mekanisme hos strandkrabben ikke er i stand til å skille mellom natrium- og kaliumionene. Dette fremgår av at til tross for at de optatte kaliummengder er sterkt skadelige, eller endog så store at de virker drepende, så er dyret ikke i stand til å forhindre at optagelsen finner sted.

Differentieringen i den anionoptagende mekanisme. Strandkrabbens anionoptagende mekanisme blev undersøkt i forsøk med anvendelse av de samme ioner som i forsøkene med flodkrepsen, nemlig  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  og  $\text{CNS}^-$ -ionene. Det viste sig at mekanismen ikke er i stand til å skille mellom disse ioner. Av de forsøk som viser dette, anføres noen karakteristiske eksempler.

Et forsøk som viser optagelse av bromionen fra natriumbromidopløsning, er vist i tabell 20. Forsøket er utført med en krabbe som ved forsøkets begynnelse var i steady state i ca. 20 mM saltvann, og blev flyttet til en 100 mM natriumbromidopløsning.

Tab. 20. Forsøk nr. 31. <sup>6-7</sup>/<sub>10</sub> 1939.

	Tidspunkt for prøven	Br-konc i vann	Cl + Br-konc i blod
1. dag	kl. 16.40 Forsøk beg. . . . .	99,5 mM	251,8 mM
	kl. 17.00 . . . . .	95,0 -	...
	kl. 17.40 . . . . .	92,0 -	...
	kl. 19.45 . . . . .	86,25 -	278,2 -
2. dag,	kl. 9.00 . . . . .	72,0 -	306,2 -

Forsøket viser optagelse av Br<sup>-</sup>-ionen.

Likesom i forsøkene med flodkrepsen gjelder bestemmelsene her summen av Cl og Br.

Forsøk med optagelse av tiocyanationen fra 20 mM saltvann, som er tilsatt 1 mM NaCNS.

 Tab. 21. Forsøk nr. 26. <sup>18-19</sup>/<sub>3</sub> 1939.

	Tidspunkt for prøven	CNS-konc i vann	CNS-konc i blod
1. dag	kl. 12.00 . . . . .	1,00 mM	0
	kl. 15.00 . . . . .	0,88 -	...
	kl. 16.45 . . . . .	0,80 -	...
	kl. 17.20 . . . . .	0,79 -	1,29
2. dag	kl. 1.00 . . . . .	0,69 -	2,11
	kl. 14.00 . . . . .	0,61 -	2,31

Forsøket viser tydelig optagelse av CNS<sup>-</sup>-ionen.

Bestemmelsene er utført som omtalt under flodkrepsen, altså fotometrisk bestemmelse av farven med treverdig jern.

Av disse forsøk fremgår at den anionoptagende mekanisme hos strandkrabben ikke er i stand til å skille mellom Cl<sup>-</sup>-ionen, Br<sup>-</sup>-ionen og den halogenlignende CNS<sup>-</sup>-ion.

### Sammenfatning av resultatene for strandkrabben.

- 1) Strandkrabben har to ionoptagende mekanismer som er uavhengige av hverandre, en for optagelse av kationer, og en for anioner.

- 2) Den kationoptagende mekanisme er ikke i stand til å skille mellom natrium og kalium.
- 3) Den anionoptagende mekanisme kan ikke skille mellom klorid, bromid og den halogenlignende tiocyanation.

### Sammenfattende bemerkninger.

Efter at det i nærværende arbeide er påvist at det for de ionoptagende mekanismer hos flodkrepsen og strandkrabben finner en differentiering sted, vil en sammenligning med tidligere undersøkelser over de samme mekanismer hos andre dyr være av interesse.

Det eneste som foreligger over de optagende mekanismers distinksjonsevne er KROGH's undersøkelser (1938) over ullhåndskrabben (*Eriocheir sinensis*), gullfisk (*Carassius auratus*) og frosk (*Rana esculenta*). Ullhåndskrabben er et ekstremt euryhalint saltvannsdyr, mens de andre to er typiske ferskvannsformer. KROGH fant at det var en betydelig forskjell mellom ullhåndskrabben og de andre i differentieringen av de ionoptagende mekanismer. Ullhåndskrabbens mekanismer kan ikke skille mellom natrium og kalium; og ikke mellom klorid, bromid og tiocyanat (og en del andre ioner, cyanationen  $\text{CNO}^{\pm}$ , og azidionen  $\text{N}_3^{\pm}$ ). Gullfisk og frosk kunde derimot skille natrium og kalium, mens de ikke kunde skille mellom klorid og bromid, men kunde dog skille disse to ioner fra tiocyanationen (og andre anioner).

Sammenligner vi nu forholdene hos ullhåndskrabben med de resultater som er nådd i det foreliggende arbeide, vil man se at ullhåndskrabben har den samme mekanisme som den euryhaline strandkrabbe. Mekanismenes evne til

å skille ioner, var for de undersøkte ioner den samme. Det ser således ut som disse to dyr har den samme mekanisme utviklet, og det bare er dens effektivitet som er forskjellig for de to dyr. Mens strandkrabben kan tåle en nedsettelse av saltkonentrasjonen til ca. 20 mM, kan ullhåndskrabben tåle et fall helt ned til en konentrasjon på ca.  $\frac{1}{3}$  mM i vannet. Dette fører til at den kan trenge helt inn i ferskvann, hvis kloridmengden ligger over denne grense, således som tilfellet er for nordtyske og danske elver. (Saltinnholdet i de norske elver ligger betydelig under den nevnte grense, og noen katastrofal fremtreden av ullhåndskrabben i norske elver kan derfor neppe tenkes. Dette forhold som begrensende faktor for ullhåndskrabben er det tidligere ikke gjort oppmerksom på.)

Sammenligner vi de ionoptagende mekanismer som fantes hos den rene ferskvannsform flodkrepsen med mekanismene hos andre ferskvannsdyr, ser vi at flodkrepsen er i stand til å skille mellom natrium og kalium, slik som KROGH fant for de andre undersøkte ferskvannsdyr (gullfisk og frosk). Derimot skiller flodkrepsen ikke tiocyanationen fra klor- og bromionene. Forholdet er altså her som hos de to andre undersøkte krepsdyr, og ikke som hos de andre undersøkte ferskvannsformer. Sammenlignende fysiologisk sett er dette av særlig interesse, idet det viser at mekanismenes differensiering ikke utelukkende er betinget av de økologiske forhold, saltvann eller ferskvann.

---

The first of these is the fact that the United States is a young nation, and that its history is a history of growth and expansion. The second is the fact that the United States is a nation of immigrants, and that its history is a history of the struggle for a better life. The third is the fact that the United States is a nation of free men, and that its history is a history of the struggle for freedom.

The first of these is the fact that the United States is a young nation, and that its history is a history of growth and expansion. The second is the fact that the United States is a nation of immigrants, and that its history is a history of the struggle for a better life. The third is the fact that the United States is a nation of free men, and that its history is a history of the struggle for freedom.

The first of these is the fact that the United States is a young nation, and that its history is a history of growth and expansion. The second is the fact that the United States is a nation of immigrants, and that its history is a history of the struggle for a better life. The third is the fact that the United States is a nation of free men, and that its history is a history of the struggle for freedom.



## Påvisning av ionoptagende celler.

### Tidligere resultater.

Tidligere har to forfattere ment å påvise celler med osmoregulatorisk funksjon.

KEYS og WILLMER (1932) mente å ha funnet noen celler i ålens gjeller, som utfører den transport av klorider fra blodet til vannet som ålen utfører ved hjelp av gjellene når den lever i saltvann (KEYS 1931). KEYS og WILLMER fant ved basis av gjellene noen store runde celler som avviker fra de andre celler i ålens gjeller, men denne avvikelse i utseende er det eneste kriterium for deres formodede funksjon. Så lenge det ikke foreligger videre opplysninger om disse celler, kan man se bort fra formodningen om deres betydning for osmoregulasjonen.

Den annen påvisning av celler med osmoregulatorisk betydning er foretatt av KOCH (1934) i gjeller av visse krepsdyr og insekter. Påvisningen er foretatt ved hjelp av sølvnitrat. De omtalte celler blir nemlig sortfarvet av redusert sølv når dyrene befinner sig i en sølvnitratopløsning. Det er nødvendig å omtale disse forhold nærmere.

Allerede KIMUS (1898) hadde funnet at »la région spéciale« i exopoditten hos *Asellus* blev sortfarvet av sølvnitrat. Han satte det i forbindelse med de anatomiske forhold. GICKLHORN (1925) fant at visse celler i daphniers gjellesekk farves sort av sølvsalter, og siden har GICKLHORN og DEJDAR

(1930, 1931, 1933) funnet lignende forhold for en rekke artropoder. De setter vedkommende cellers evne til å redusere sølv i forbindelse med deres oksydasjons-reduksjonspotential (redoxpotential), — grunnen til forekomsten i vanndyrs gjeller, satte de i forbindelse med disse organers respiratoriske betydning.

KOCH påviser det manglende grunnlag for formodningen om en sammenheng slik som GICKLHORN og medarbeidere fremsatte den, han påviser de feilaktige slutninger man kan komme til, og fremholder som sin mening at alle de organer det dreier sig om, har funksjonen »absorption des constituants minéraux«, altså osmoregulatorisk betydning.

Noget virkelig bevis for dette kan KOCH ikke gi. Han konstaterer bare at den sortfarvning som fremkommer hvis vedkommende dyr settes i meget tynne sølvnitratopløsninger (3—6 mM). Senere er det i flere tilfeller vist at vedkommende organer virkelig har osmoregulatorisk betydning (KOCH og KROGH 1936, KOCH 1938, WIGGLESWORTH 1938).

Selv om det fra KOCH's side ikke foreligger noget absolutt bevis for at de celler han har påvist, har optatt sølvet ved en aktiv process, er det ingen grunn til å tvile på at det er celler med osmoregulatorisk funksjon. Den innvending man kunde fremsette mot hans forsøk er følgende: Hvis cellemembranen er permeabel for  $Ag^+$ -ionen, vil denne diffundere inn til samme konsentrasjon som i den omgivende væske er opnådd. Sølv vil før denne konsentrasjon er nådd, utfelles som sølvklorid, og stadig mer sølv vil diffundere inn. På denne måten kan store sølvmengder samles i de celler hvis membran er særlig lett gjennomtrengelig for sølvioner.

### Egne forsøk.

For å undgå den nevnte mulighet for transport av sølv ved forsøkene med å påvise celler med osmoregulatorisk betydning hos flodkrepsen, holdtes det så lav konsentrasjon av sølvnitrat i væsken at sølvklorid ikke kunde utfelles. Ved  $25^{\circ}$  er sølvkloridets oppløselighetsprodukt  $1,56 \cdot 10^{-10}$ . En mettet oppløsning av AgCl er da 0,0125 mM. Det blev derfor arbeidet med en sølvkonsentrasjon på 0,010 mM i vannet. (Det må tilføies at oppløseligheten av AgCl ikke følger massevirkningsloven, således at oppløseligheten ikke synker når det er mere Cl-ion tilstede. På grunn av kompleksdannelse er det omvente tilfelle, og ved den nevnte konsentrasjon er derfor en utfelling som AgCl utelukket.)

Ved å la en flodkreps gå i en sådan oppløsning, fremkom det i løpet av et døgn en sortfarvning i gjellene som vist i tavle I, fig. 3. Her er brystskjoldet før forsøket klippet bort, så forandringene hele tiden kunde følges. En begynnende sortfarvning inntrådte allerede efter ca. 1 time, selve mørkfarvningen (reduksjonen) var dessuten tydelig avhengig av lysets påvirkning. En kreps kunde således settes noen timer i oppløsningen uten at det kom noen kraftig sortfarvning hvis den ikke blev utsatt for sterkt dagslys. Forsøket blev avbrudt, og krepsen fiksert i 70% alkohol. Neste morgen var farven ikke tydelig mørkere, og kunde karakteriseres som en lys grå skygning på gjellene. Efter noen timers belysning i dagslys fremkom en kraftig sortfarvning.

At det har foregått en ophopning av sølv i cellene kan tydelig vises, idet så sterk sortfarvning bare kan skyldes temmelig store sølvmengder. Et forsøk på å redusere den i forsøkene brukte sølvnitratopløsning med ascorbinsyre, som opgis å redusere sølvioner fullstendig til metallisk sølv, gav det resultat at man ikke fikk noen tydelig mørkfarvning

i væsken, selv ved 20 cm lagtykkelse. Sølv et må altså i de sortfarvede celler foreligge i langt høiere konsentrasjon enn i væsken.

Når det ved mine forsøk blev benyttet så lave konsentrasjoner av sølvnitrat at en utfelling som sølvklorid er utelukket, er dette ikke i og for sig noget bevis for at den opsamling av sølv som har skjedd virkelig skyldes en aktiv optagelse av sølvioner. Man kunde tenke sig en sølvalbuminatforbindelse med mindre oppløselighet enn sølvklorid (tungt oppløselige eggehvitmetallforbindelser er velkjent). Hvis det inndiffunderte sølv ved den lave konsentrasjon felles som albuminat, kunde man få en ophopning av sølv i cellen, slik som omtalt at sølv et ved høiere sølvnitratkonsentrasjoner i væsken kunde tenkes fellet som klorid.

### Bevis for aktiv optagelse av sølvionen.

Hvis det kunde vises at optagelsen av sølv er knyttet til energiomsetningen, vil det derimot bevise at optagelsen og akkumuleringen av sølv et er en aktiv process.

Mitt første forsøk i denne retning blev gjort med å forgifte isolerte gjeller med cyanid, for derved å forhindre deres oksydative stoffskifte. Hvis disse forgiftede celler ikke optar sølv fra en sølvnitratopløsning, mens normale gjeller optar sølv fra en tilsvarende oppløsning, vilde dette være fyldestgjørende bevis for at sølvoptagelsen er forbundet med energiforbruk.

Det viste sig at det ikke fremkom noen sortfarvning i noen av de isolerte gjeller i en 0,010 mM sølvnitratopløsning, — de fysiologiske forhold er altså så meget forstyrret ved isoleringen av gjellene at optagelsen av sølv fra så tynne oppløsninger ikke kan foregå. Forsøkene viser derimot at sortfarvningen på det levende dyr ikke kan skyldes sølv

som er fellet efter inddiffusjon, da denne form for transport like fullt skulde kunne foregå i de isolerte gjeller. I en 10 ganger så sterk oppløsning, får man derimot en sortfarvning av den isolerte gjelle, som må skyldes at inddiffundert sølv er fellet (som klorid eller albuminat). Disse forhold gjør det vanskelig å søke forklaringen på akkumuleringen av sølvet i annet enn en aktiv celleprocess.

Det endelige bevis for at optagelsen av sølv fra de nevnte tynne oppløsninger er aktiv, er følgende: Hvis en kreps settes i en luftfri sølvnitratopløsning (opløsningens konsentrasjon forutsettes hele tiden å være 0,010 mM), kan den leve her noen timer. Resultatet er at det i denne tid kommer en meget svak gråfarvning i gjellene (forsøket foretas i dagslys), mens en kreps som har gått like lang tid i en luftholdig oppløsning får en kraftig sortfarve i gjellene. Sammenligningen er alltid foretatt efter at maksimal mørkfarvning er fremkaldt ved lyseksponering.

Ennu tydeligere fremgår forholdet av følgende forsøk. Hvis man setter en kreps 20 eller 30 minutter i en luftfri sølvnitratopløsning, kan den overleve dette. Flyttes den så til almindelig ledningsvann, er det til neste dag ikke kommet noen synlig mørkere farve i gjellene. Settes den samme kreps nu tilbake i samme oppløsning som i mellemtiden er mettet med luft ved gjennembobling, og får gå der like lenge som i forsøkets første del, vil man efter et døgns lyseksponering se en meget kraftig sortfarve i gjellene. Dette er det avgjørende bevis for at optagelsen av sølv er knyttet til det oksydative stoffskifte.

### **Det makroskopiske billede ved sølvfarvningen.**

Av tavle I, fig. 3 fremgår at sortfarvningen er lokalisert til den nederste del av gjellene. Som det tydeligere sees på

tavle I, fig. 4, er det en anatomisk forskjell i bygningen av den nedre og den øvre del av gjellene. Dette gjelder den ytterste gjellerekke, podobranchiene. De to indre gjellerekker, arthrobranchiene, viser samme avgrensning av sortfarvningen til den nederste del. Dette fremgår av tavle I, fig. 5, hvor podobranchiene er klippet bort. Makroskopisk er det ingen forskjell i den anatomiske bygning av de to deler av arthrobranchiene, gjellene har samme frynsete bygning helt ut til spissen. Sortfarvningen kan derfor ikke, som det kunde se ut til på podobranchiene, lokaliseres til en bestemt makroskopisk bygning i gjellene.

(Koch har i en samtale om disse forhold fortalt mig at han hadde forsøkt å finne »des cellules d'argent« hos flodkrepser, men han hadde bare opnådd en massiv sortfarvning av hele gjelleoverflaten. Dette vil jeg tilskrive at Koch har brukt vesentlig sterkere sølvnitratopløsninger, og at sølvet derfor er diffundert inn i cellene og felt som klorid.)

### Mikroskopisk undersøkelse.

Makroskopisk viser ikke alle gjelletrådene like sterk sortfarvning. Ved den mikroskopiske undersøkelse viser noen av gjelletrådene en massiv grå eller sort overflate, mens det i andre finnes lett iakttagbare sortfarvede celler (tavle II, fig. 6).

Om det virkelig dreier sig om en sortfarvning av hele den aktive celle, eller bare en funksjonell del av den, kan først avgjøres efter meget inngående cytologiske undersøkelser. I det følgende brukes betegnelsen celle med forbehold om at dette uttrykk muligens ikke dekker det cytologisk korrekte begrep, men betegner den funksjonelle enhet ved den aktive sølvoptagelse.

Karakteristisk for cellene er at de er meget små, ca. 2,5—

5  $\mu$ . KOCH gir ikke noget billedmateriale av de celler han har vist farves av sølv hos en rekke krepsdyr og insekter, så en direkte sammenligning med hans resultater er ikke mulig. Hans karakteristikk av den histologiske karakter av de organer det dreier sig om, er at cellene er meget store og protoplasmarike; men det fremgår ikke om det her dreier sig om de celler som er farvet av sølv, eller om det er den almindelige cellekarakter i organene. Det er derfor på det nuværende tidspunkt ikke mulig å trekke sammenligninger mellem de mikroskopiske funn hos flodkrepsen og de tidligere funn av celler som farves av sølv på lignende måte.

Snitt av sølvfarvet materiale er vist i tavle II, fig. 7 (preparatet er ellers ufarvet). Den flate form av cellene virker meget overraskende, da det har vært antatt at celler med osmoregulatorisk funksjon for å kunne utføre denne funksjon måtte ha en relativt stor høide. Det kunde ikke avgjøres om cellene avviker fra de almindelige overflateceller i gjellene, da bedømmelsen av det mikroskopiske billede vanskeliggjøres av den sterke sortfarvning.

Man vil av tavle II, fig. 6 se at de sølvfarvede celler ligger uregelmessig fordelt over hele overflaten i gjelletråden. Det forhold at ikke alle overflateceller har optatt sølv, behøver ikke å vise at den sølvoptagende egenskap er knyttet til bestemte celler. Det er et almindelig kjent fysiologisk fenomen at cellene i et organ kan arbeide alternerende, således at bare en mindre del av cellene er i arbeide samtidig, og deres arbeide efter noen tid overtas av andre. Den sølvoptagende egenskap, såvel som den almindelige osmoregulatoriske funksjon, kan meget vel tenkes som en generell egenskap i overflatecellene i den del av flodkrepsens gjeller som farves sort ved aktiv optagelse av sølv.

Det foreligger god grunn til å tro at optagelsen av sølv skjer ved hjelp av den i første del av dette arbeide omtalte spesifikke kationoptagende mekanisme, idet sølvionen kjemisk sett viser betydelige likhetspunkter med alkalimetallenes ioner. Noget bevis for dette kan allikevel ikke føres på det nuværende tidspunkt.

### Sammenfatning.

- 1) Det er lykket å påvise elementer i flodkrepsens gjeller, som er i stand til å opta og akkumulere sølvioner ved en aktiv process under energiforbruk.
  - 2) Denne egenskap er lokalisert til den basale del av gjellene, men kunde ikke bringes i forbindelse med den makroskopiske anatomi.
  - 3) Elementer med evne til aktiv iotnopagelse er således påvist i flodkrepsens gjeller. Det formodes at de samme elementer er sete for den spesifikke kationoptagende mekanisme.
-



### Literatur.

- BERGER, Eva. Ueber die Anpassung eines Süßwasser- und eines Brackwasserkrepses an Medien von verschiedenem Salzgehalt. Pflüg. Arch. ges. Physiol. **228**, 790—807, (1931).
- BERGER, Eva, & BETHE, A. Die Durchlässigkeit der Körperoberflächen wirbelloser Tiere für Jodionen. Pflüg. Arch. ges. Physiol. **228**, 769—789, (1931).
- BETHE, A. Ionendurchlässigkeit der Körperoberfläche von wirbellosen Tieren des Meeres als Ursache der Giftigkeit von Seewasser abnormer Zusammensetzung. Pflüg. Arch. ges. Physiol. **221**, 344—362, (1929).
- BETHE, A. Die Salz- und Wasserdurchlässigkeit der Körperoberflächen verschiedener Seetiere in ihrem gegenseitigen Verhältnis. Pflüg. Arch. ges. Physiol. **234**, 629—644, (1934).
- BETHE, A. & BERGER, E. se: BERGER & BETHE.
- BOGUCKI, M. Recherches sur la régulation de la composition minérale du sang chez l'écrevisse (*Astacus fluviatilis* L.). Arch. int. Physiol. **38**, 172—179, (1934).
- BOTAZZI, F. La pression osmotique du sang des animaux marins. Arch. ital. Biol. **28**, 61—72, (1897).
- COLLANDER, R. Ueber die Kationenelektion der höheren Pflanzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **55**, 74—81, (1937).
- CONWAY, E. J. & BYRNE, A. An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. 1) The micro-determination of ammonia. Bioch. J. **27**, 419—429, (1933).
- DEJDAR, E. Die Funktion der »Blattförmigen Anhänge« der Embryonen von *Asellus aquaticus* (Versuch einer Analyse mit Hilfe vitaler Elektivfärbung). Z. Morph. Oekol. Tiere, **19**, 321—329, (1930).
- DEJDAR, E. Die Korrelation zwischen Kiemensäckchen und Nackenschild bei Phyllopoden. Z. wiss. Zool. **136**, 422—452, (1930).

- DEJDAR, E. Bau und Funktion des sog. »Haftorgans« bei marinen Cladoceren (Versuch einer Analyse mit Hilfe vitaler Elektivfärbung). Z. Morph. Oekol. Tiere, **21**, 617—628, (1931).
- DEJDAR, E. & GICKLHORN, J. Neue Untersuchungen zum Nachweis der Funktion des Nackenschildes der Cladoceren als Atmungsorgan. Z. Morph. Oekol. Tiere. **26**, 94—109, (1933).
- DUVAL, M. Recherches physico-chimiques et physiologiques sur le milieu intérieur des Animaux Aquatiques. Modifications sous l'influence du milieu extérieur. Ann. Inst. océanogr. **2**, 232—407, (1925).
- FRÉDÉRICQ, L. La physiologie de la branchie et la pression osmotique du sang de l'écrevisse. Bull. Acad. roy. Belg. Sér. 3, **35**, 831—833, (1898).
- FRÉDÉRICQ, L. Sur la concentration moléculaire du sang et des tissus chez les animaux aquatiques. Bull. Acad. Belg. Cl. Sci. 1901.
- GICKLHORN, J. Ueber spezifische und lokale Reduktion von Silber- und anderen Metallsalzen in den Kiemensäckchen von *Daphnia M. Lotos*, **73**, 83—96, (1925).
- HERRMANN, FRANZISKA. Ueber den Wasserhaushalt des Flusskrebse. Z. vergl. Physiol. **14**, 479—524, (1931).
- HOFFMAN, W. S. & OSGOOD, BESS. A photoelectric method for the microdetermination of sodium in serum and urine by the uranyl zinc acetate precipitation. J. biol. Chem. **124**, 347—357, (1938).
- HUF, E. Ueber die Aufrechterhaltung des Salzgehaltes bei Süßwasserkrebse (*Potamobius*). Pflüg. Arch. ges. Physiol. **232**, 559—573, (1933).
- INGRAHAM, R. C. & VISSCHER, M. B. Further studies on intestinal absorption with the performance of osmotic work. Amer. J. Physiol. **121**, 771—785, (1937).
- KEYS, A. B. Chloride and water secretion and absorption by the gills of the eel. Z. vergl. Physiol. **15**, 364—388, (1931).
- KEYS, A. B. The determination of chlorides with the highest accuracy. J. chem. Soc. Lond. 1931, p. 2440—2447.
- KEYS, A. & WILLMER, E. N. »Chloride secreting cells« in the gills of fishes, with special reference to the common eel. J. Physiol. **76**, 368—378, (1932).
- KIMUS, J. Recherches sur les branchies des crustacés. La Cellule, **15**, 297—404, (1898).
- KOCH, H. Essai d'interprétation de la soit-disant »reduction vitale«

- des sels d'Argent par certains organes d'Arthropodes. Ann. Soc. Scient. Bruxelles, Sér. B. **54**, 346—361, (1934).
- KOCH, H. & KROGH, A. La fonction des papilles anales des larves de Diptères. Ann. Soc. scient. Bruxelles, Sér. B. **56**, 459—461, (1936).
- KOCH, H. The absorption of chloride ions by the anal papillae of Diptera larvae. J. exp. Biol. **15**, 152—160, (1938).
- KROGH, A. A method for the determination of ammonia in water and air. Biol. Bull. **67**, 126—131, (1934).
- KROGH, A. Osmotic regulation in fresh water fishes by active absorption of chloride ions. Z. vergl. Physiol. **24**, 656—666, (1937).
- KROGH, A. The active absorption of ions in some freshwater animals. Z. vergl. Physiol. **25**, 335—350, (1938).
- KROGH, A. Osmotic regulation in aquatic animals. Cambridge Comparative Physiology, Cambridge 1939, 242 s., inneholder en almindelig fremstilling av osmoregulatoriske problemer (monografi).
- KROGH, A. & USSING, H. H. A note on the permeability of trout eggs to D<sub>2</sub>O and H<sub>2</sub>O. J. exp. Biol. **14**, 35—37, (1937).
- LINDERSTRØM-LANG, K. Studies on enzymatic histochemistry. XIX. Microestimation of alkalies in tissue. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Sér. chimique. **21**, (1936).
- LUNDEGÅRDH, H. Untersuchungen über die Anionenatmung. Bioch. Z. **290**, 104—124, (1937).
- NAGEL, H. Die Aufgaben der Exkretionsorgane und der Kiemen bei der Osmoregulation von *Carcinus maenas*. Z. vergl. Physiol. **21**, 468—491, (1934).
- NORBERG, B. Mikrobestimmung von Kalium. Mikrochimica Acta. **1**, 212—219, (1937).
- OSTERHOUT, W. J. V. Permeability in large plant cells and in models. Ergebn. Physiol. exp. Pharm. **35**, 967—1021, (1933).
- PETERS, H. Ueber den Einfluss des Salzgehaltes im Aussenmedium auf den Bau und die Funktion der Excretionsorgane dekapoder Crustaceen (nach Untersuchungen an *Potamobius fluviatilis* und *Homarus vulgaris*). Z. Morph. Oekol. Tiere. **30**, 335—381, (1935).
- PFEFFER, W. Osmotische Untersuchungen. Studien zur Zellmechanik. Leipzig 1877.
- PIEH, SYLVIA. Ueber die Beziehungen zwischen Atmung, Osmoregulation und Hydratation der Gewebe bei euryhalinen Meeresvertebraten. Zool. Jb. Abt. allg. Zool. Physiol. Tiere. **56**, 129—160, (1936).

- REHBERG, P. B. The determination of chlorine in blood and tissues by microtitration. *Bioch. J.* **20**, 483—485, (1926).
- SCHLIEPER, C. Ueber die Einwirkung niederer Salzkonzentrationen auf marine Organismen. *Z. vergl. Physiol.* **9**, 478—514, (1929).
- SCHLIEPER, C. Ueber die osmoregulatorische Funktion der Aalkiemer. *Z. vergl. Physiol.* **18**, 682—695, (1933).
- SCHNOHR, E. A study on the cause of death in high intestinal obstruction. København, 1934. (Dissert.)
- SCHOLLES, W. Ueber die Mineralregulation wasserlebender Evertebraten. *Z. vergl. Physiol.* **19**, 522—554, (1933).
- SCHWABE, E. Ueber die Osmoregulation verschiedener Krepse (Malacostracen). *Z. vergl. Physiol.* **19**, 183—236, (1933).
- SMITH, HOMER W. The absorption of water and salts by marine teleosts. *Amer. J. Physiol.* **93**, (1930).
- WEBB, D. A. Ionic regulation in *Carcinus maenas*, *Proc. Roy. Soc. B.* **129**, 107—136, (1940).
- WIDMANN, ERNA. Osmoregulation bei einheimischen Wasser- und Feuchtluft-Crustaceen. *Z. wiss. Zool.* **147**, 132—169, (1935).
- WIGGLESWORTH, V. B. The regulation of osmotic pressure and chloride concentration in the haemolymph of mosquito larvae. *J. exp. Biol.* **15**, 235—247, (1938).
-

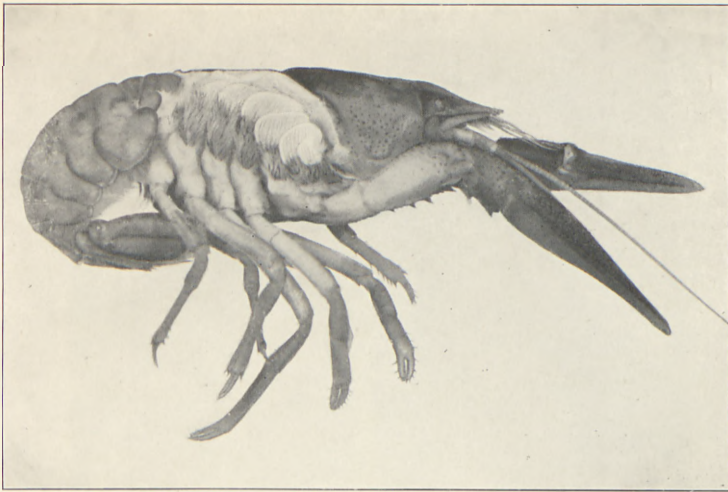


Fig. 3.



Fig. 4.

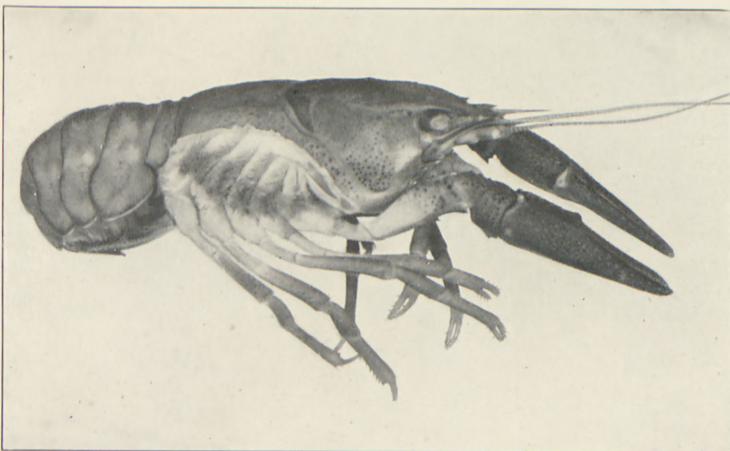


Fig. 5.

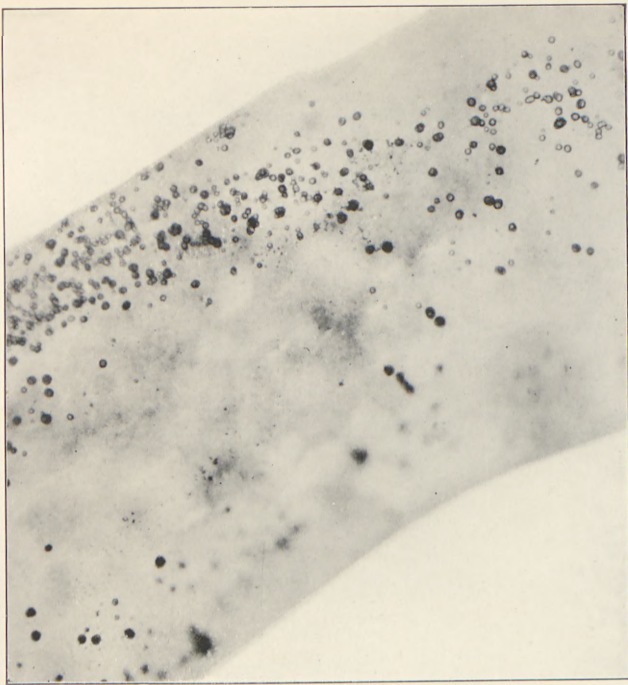


Fig. 6.

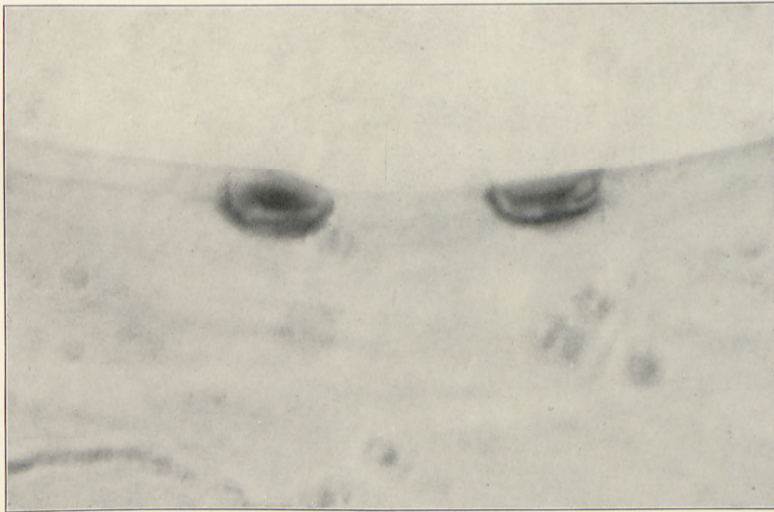


Fig. 7.