

**Mechanismen und Grenzen der  
Temperaturanpassung beim Pierwurm**

*Arenicola marina* (L.)

**Temperature adaptation in the polychaete worm**

*Arenicola marina* (L.). Mechanisms and limitations

---

**Angela Sommer**

**Ber. Polarforsch. 285 (1998)**

**ISSN 0176 - 5027**

*Machte man sich alle Möglichkeiten und Schwierigkeiten eines Werkes im voraus klar und kenne man seinen eigenen Willen, der sich von dem des Autors häufig gar sehr unterscheidet, so ließe man wohl die Arme sinken und hätte gar nicht den Mut zu beginnen. Ein Werk hat unter Umständen seinen eigenen Ehrgeiz, der den des Autors weit übertreffen mag, und das ist gut so.*

(Thomas Mann, Einführung in den Zauberberg)

**Angela Sommer**

Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung  
Postfach 12 01 61  
Columbusstr.  
D - 27568 Bremerhaven

Die vorliegende Arbeit ist die Zusammenfassung einer Dissertation, die in kumulativer Form in der Sektion Biologie I/Ökophysiologie bei Prof. Dr. H.-O. Pörtner angefertigt und im Juni 1998 dem Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der Universität Bremen vorgelegt wurde.

---

**Inhaltsverzeichnis**

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	III
<b>Zusammenfassung</b> .....	V
<b>Summary</b> .....	VII
<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>2. Material und Methoden</b> .....	13
2.1. Beschaffung und Hälterung der Versuchstiere .....	13
2.2. Temperaturinkubation .....	13
2.3. Sauerstoffverbrauchsmessung .....	14
2.4. Ermittlung des Präferenztemperaturbereiches .....	15
2.5. Gewinnung und Aufbreitung der Gewebeprobe(n) .....	15
2.6. Analysen .....	15
2.6.1. Bestimmung des intra- und extrazellulären pH-Wertes .....	15
2.6.2. Pufferwertbestimmung .....	16
2.6.3. Quantifizierung von Metaboliten des Energiestoffwechsels .....	17
2.6.4. Bestimmung von Enzymaktivitäten .....	17
2.6.5. Berechnung der Aktivierungsenergie .....	18
2.6.6. Berechnung der $Q_{10}$ -Werte .....	18
2.7. Elektronenmikroskopische Untersuchung .....	19
2.8. Analyse des Isoenzymmusters .....	19
2.9. Statistik .....	20
<b>3. Gesamtdiskussion</b> .....	21
3.1. Charakterisierung zweier kritischer Temperaturen .....	21
3.1.1. Der Einfluß der Temperatur auf den aeroben Stoffwechsel .....	21
3.1.2. Temperaturbedingte Anaerobiose .....	23
3.1.3. Intrazellulärer pH-Wert in Abhängigkeit von der Temperatur .....	26
3.1.4. Zusammenfassung: Charakterisierung zweier kritischer Temperaturen .....	30
3.2. Mechanismen der Kälteakklimatisation .....	30
3.2.1. Unterschiede in der Mitochondriendichte zwischen den Populationen .....	30
3.2.2. Die Rolle einzelner Enzyme bei der Kälteanpassung .....	33

3.3. Mechanismen und Grenzen der Akklimationsfähigkeit .....	39
3.3.1. Kälteakklimation .....	39
3.3.2. Energiestoffwechsel während der Akklimation an hohe Temperaturen .....	41
3.3.3. Säure-Basen-Haushalt unter Hitzestreß .....	45
3.3.4. Bedeutung der Ammoniumakkumulation .....	47
3.3.5. Mögliche Auswirkungen der Erderwärmung .....	48
3.4. Mögliche Ursachen für die unterschiedliche Anpassungsfähigkeit der Tiere beider Populationen .....	48
3.5. Die Bedeutung von Acetat: eine Hypothese .....	49
3.6. Isoenzymvergleich .....	51
3.6.1. Genfluß zwischen den atlantischen und der Weißmeer-Population .	51
3.6.2. Einfluß der Temperatur bzw. des Genflusses auf die Allelfrequenz einzelner Isoenzyme .....	52
3.6.3. Grad der Heterozygotie .....	54
<b>4. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
<b>5. Anhang .....</b>	<b>72</b>
Liste der Publikationen und Erklärung über den von mir geleisteten Anteil .....	72
I Temperature induced anaerobiosis in two populations of the polychaete worm <i>Arenicola marina</i> (L.) .....	74
II Mechanisms of metabolic cold compensation in the lugworm <i>Arenicola marina</i> (L.): comparison of a White Sea and a North Sea population .....	86
III Exposure of <i>Arenicola marina</i> (L.) to extreme temperatures: adaptiv flexibility of a boreal and a subpolar population .....	122
IV Variation in genetic traits of the lugworm <i>Arenicola marina</i> : temperature related expression of mitochondrial allozymes? .....	160
<b>Danksagung .....</b>	<b>168</b>

**Abkürzungen**

$\alpha_{\text{CO}_2}$	Löslichkeitskoeffizient von $\text{CO}_2$
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
$\beta_{\text{NB}}$	Nichtphosphat-Nichtbikarbonat-Pufferwert
Bic	Bikarbonat
C	Kontrolle
$C_{\text{CO}_2}$	Gesamtgehalt des Kohlendioxids
$\Delta H^\ddagger$	Reaktionsenthalpie
$\Delta H^+_{\text{met.}}$	metabolische Protonenproduktion
$\Delta H^+_{\text{nicht-resp.}}$	nicht-respiratorische Protonenproduktion
$\Delta S^\ddagger$	Reaktionsentropie
DMO	Dimethylloxazolidindion
DNA	Desoxyribonucleinsäure
$E_a$	apparente Aktivierungsenergie
F-1,6-P	Fruktose-1,6-Bisphosphat
FG	Frischgewicht
$F_{\text{st}}$	Fixation Index, für Unterschiede in der Allelfrequenz einzelner Loci zwischen Populationen
GPI	Glukosephosphatisomerase
$\text{HbO}_2/\text{Hb}$	Hämoglobin (oxidiertes/reduziertes)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
IDH	Isocitratdehydrogenase
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
$\text{MO}_2$	Sauerstoffverbrauch
MTT	3-[4,5-Dimethylethylthiazol-2-yl]-2-5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Zahl der Versuche
NAD/NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidiertes/reduziertes)
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (oxidiertes)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduziertes)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
$P_{\text{CO}_2}$	Kohlendioxidpartialdruck
PGM	Phosphoglukomutase
$\text{pK}''''$	negativ dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante $K''''$ von $\text{H}_2\text{CO}_3$

## Abkürzungen

---

PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
pH <sub>i</sub>	intrazellulärer pH-Wert
P <sub>O<sub>2</sub></sub>	Sauerstoffpartialdruck
PTC	Phosphotaurocyamin
Q <sub>10</sub>	Temperaturquotient, Maß für die Beschleunigung von physiologischen Prozessen bei einer Temperaturerhöhung um 10 °C
R	allgemeine Gaskonstante (8,3143 J · K <sup>-1</sup> · mol <sup>-1</sup> )
S.	Seiten
S.D.	Standardabweichung
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
T <sub>c</sub>	kritische Temperatur
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
v	Volumen

## Zusammenfassung

Für den Pierwurm *Arenicola marina* wurden eine untere und eine obere kritische Temperatur definiert, die durch die Akkumulation von anaeroben Metaboliten charakterisiert sind. Außerhalb des tolerierten Temperaturbereiches reichte die Sauerstoffaufnahme bzw. -verteilung nicht mehr aus, um den Energiebedarf der Tiere auf aerobem Wege zu decken, so daß anaerober Stoffwechsel zur zusätzlichen Energieproduktion herangezogen werden mußte. Der intrazelluläre pH-Wert im Hautmuskelschlauch von *A. marina* verminderte sich mit steigender Temperatur gemäß der alphastat Hypothese, dies allerdings nur zwischen den kritischen Temperaturen. Außerhalb der kritischen Werte kam es dagegen zu einer Abweichung von der Linearen. Zum einen trat eine metabolische Azidifizierung auf, zum anderen könnte zusätzlich ein Versagen der aktiven Säure-Basen-Regulation verantwortlich sein.

Es wurden einige Anpassungsmechanismen an annuelle Temperaturänderungen sowie an die unterschiedlichen Temperaturregime vom Weißen Meer und Nordsee untersucht. Latitudinale und saisonale Kälteakklimatisation führte in *A. marina* zu einer Verschiebung beider kritischen Temperaturen zu niedrigeren Werten. Dies konnte für Tiere vom Weißen Meer auf eine erhöhte aerobe Kapazität zurückgeführt werden. Zum einen war die Mitochondriendichte erhöht, zum anderen die oxidative Kapazität der einzelnen Mitochondrien verbessert. Letzteres spiegelte sich in einer höheren Aktivität und in einer niedrigeren Aktivierungsenergie der Cytochrom c-Oxidase der subpolaren Tiere wider. Des weiteren besaß die NADP-abhängige Isocitratdehydrogenase der Weißmeer-Tiere eine höhere Aktivität bei hohen Temperaturen sowie eine niedrigere Aktivierungsenergie und höhere Affinität zu NADH bei niedrigen Temperaturen als in Nordsee-Würmern. Dadurch verbesserte sich die Energieproduktion bei niedrigen Temperaturen und die untere kritische Temperatur sank auf niedrigere Werte. Gleichzeitig stieg mit der Mitochondriendichte auch die gesamte Stoffwechselrate, wodurch im Warmen das Verhältnis zwischen energieverbrauchenden und -liefernden Prozessen schon bei niedrigeren Temperaturen gestört wurde. Als Folge davon verschob sich auch die obere kritische Temperatur zu niedrigeren Werten.

Untersuchungen zur Akklimationsfähigkeit beider Populationen zeigten deutliche Unterschiede in der Toleranz gegenüber Hitzestreß. Im Gegensatz zu Würmern aus der Nordsee überlebten die Weißmeer-Tiere nicht nur Inkubationen bei Temperaturen oberhalb der oberen kritischen Temperatur, sondern sie waren auch in der Lage, trotz andauernder Hitze den anfänglich einsetzenden anaeroben Stoffwechsel sowie Störungen des Säure-Basen-Haushaltes wieder rückgängig zu machen. Der nahezu vollständige

## Zusammenfassung

---

Abbau der ATP Vorräte sowie die hohe anaerobe Stoffwechselrate während der ersten 24 Stunden der Hitzeexposition wiesen zusammen mit der Fähigkeit, Hitzestreß zu überleben, auf einen energieverbrauchenden Mechanismus hin, der die Hitzetoleranz verbessert. Als ein möglicher Mechanismus wird die Synthese von Hitze-Schock-Proteinen diskutiert. Auch eine Reduzierung der Mitochondriendichte während der Inkubation bei höheren Temperaturen könnte zur Akklimation beigetragen haben. Dadurch würden die Kosten für den Erhalt von Ionen- und Protonengradienten gesenkt und der  $Q_{10}$ -Effekt auf die Stoffwechselrate kompensiert.

Die Anpassungsfähigkeit an Kältestreß war in Tieren beider Populationen begrenzt, wobei aber auch unter diesen Bedingungen die Überlebensfähigkeit der subpolaren Tiere die der borealen überstieg. Acetat, welches bei niedrigen Temperaturen im Hautmuskelschlauch akkumulierte, induzierte einen Anstieg des Sauerstoffverbrauches in kaltakklimatisierten Tieren der Nordsee. Da auch in kaltangepaßten Würmern vom Weißen Meer ein Anstieg des Sauerstoffverbrauches bei niedrigen Temperaturen zu beobachten war, wurde die Hypothese aufgestellt, daß Acetat als Vermittler zwischen der niedrigen Temperatur und einer Verhaltens- und Stoffwechseländerung in kaltadaptierten Tieren fungierte und so die Überlebensfähigkeit unter extremen Bedingungen verbesserte. Das größere Ausmaß an Temperaturschwankungen sowie die niedrigeren jährlichen Durchschnittstemperaturen am Weißen Meer im Vergleich zur Nordsee scheinen genauso im Zusammenhang mit der höheren adaptiven Kapazität der Weißmeer-Tiere zu stehen wie die fehlende Möglichkeit, am Weißen Meer den Temperaturschwankungen durch tiefere Bauten zu entgehen.

Eine elektrophoretische Isoenzymanalyse zeigte, daß die genetische Identität zwischen den atlantischen Populationen (von Frankreich über die Niederlande und Deutschland bis nach Norwegen) hoch war, die Weißmeer-Population sich dagegen signifikant von den atlantischen Populationen unterschied. Der hohe Wert der Gendifferenz weist auf einen stark eingeschränkten Genaustausch mit der Weißmeer-Population hin, wahrscheinlich aufgrund der hydrographischen und geographischen Isolation des Weißen Meeres. Der eingeschränkte Genaustausch spiegelte sich auch in den signifikant unterschiedlichen Allelfrequenzen in der Weißmeer-Population für die Glukosephosphatisomerase und die Phosphoglucomutase wider. Die Expression des mitochondrialen Enzyms Isocitratdehydrogenase 2 (IDH2) scheint dagegen eher von der Temperatur beeinflusst zu werden, da eine lineare Korrelation der Allelfrequenz für IDH2-A und IDH2-B mit der Jahresdurchschnittstemperatur des Wassers bestand. Dies unterstützt die Hypothese, daß Mitochondrien im Pierwurm eine entscheidende Rolle bei der Anpassung an unterschiedliche Temperaturregime spielten.



---

**Summary**

A low and a high critical temperature were identified in the lugworm, *Arenicola marina*, both of which are characterised by the onset of anaerobic metabolism. Beyond each critical temperature energy demand could not be met by adequate oxygen supply owing to an insufficient capacity of ventilatory and circulatory mechanisms even under normoxia. Additional anaerobic energy production was required. Intracellular pH in the body wall musculature of *A. marina* changed in accordance with the alphastat hypothesis, but only between critical temperatures. Beyond the critical thresholds slopes were no longer linear. The deviation from linearity was caused by metabolic acidification and, possibly, by a failure of active  $\text{pH}_i$  adjustment.

Mechanisms were studied, which define and adjust critical temperatures to annual temperature changes and to the different environmental temperature regimes of the North and the White Sea. In *A. marina* latitudinal or seasonal temperature adaptation led to a shift of both critical temperature thresholds to lower values. In lugworms from the White Sea this was achieved by an increase in aerobic capacity, effected by a higher mitochondrial density as well as an elevated oxidative capacity of individual mitochondria. The latter was reflected by an elevated activity and reduced activation energy of cytochrome c-oxidase. Furthermore, NADP dependent isocitrate dehydrogenase of White Sea animals possessed a higher activity at high temperatures as well as a reduced activation energy and higher affinity for NADP at very low temperatures. This raised the capacity of aerobic energy production at low temperatures and the low critical temperature shifted to lower values. However, the higher mitochondrial density induced a rise in standard metabolic rate causing a discrepancy between oxygen consuming and providing processes at lower temperatures. In consequence, the high critical temperature was shifted to a lower value.

Lugworms from the North or White Sea possessed different capacities to cope with heat stress above critical temperatures. In contrast to North Sea specimens, lugworms from the White Sea not only survived long term exposure to temperatures 4 °C above critical, but even exhibited an adaptive reversal of anaerobic metabolism and acid-base disturbances after three days. The depletion of ATP stores to very low levels as well as the high rates of anaerobic metabolism observed during the first 24 h of heat stress led to the conclusion that an energy consuming process is required to ensure survival. As a likely mechanism the synthesis of heat shock proteins was discussed. Additionally, it seems possible that mitochondrial density was reduced in the subpolar animals during acclimation to high temperatures. This process reduced the costs of mitochondrial maintenance and compensated for the  $Q_{10}$  effect on oxygen demand.

## Summary

---

The ability to adapt to cold stress was limited in summer animals from both populations. Adjustment to very low temperatures as seen in White Sea animals in winter is therefore likely to require much longer time periods with slowly decreasing temperatures than offered during the experimental conditions. Cold acclimation apparently is more time consuming than acclimation to heat. However, the ability to survive under cold stress was again higher in the subpolar than in the boreal animals.

Acetate, which accumulated at low temperatures in the body wall tissue, was able to elicit a rise in oxygen consumption rate in cold acclimated lugworms from the North Sea. Additionally, a rise in oxygen consumption rate was found at very low temperatures in cold adapted lugworms from the White Sea. These findings suggest, that acetate may be a mediator between extreme temperatures and the reaction norm of the lugworm, thereby supporting survival at extreme temperatures. The larger flexibility in the subpolar animals was seen as an adaptation to the larger variability of temperatures and the lower mean annual temperature at the White Sea. Since the subpolar lugworms are forced to dwell closer to the sediment surface they are exposed to even more variable surface temperatures than North Sea animals.

An electrophoretic analysis of the genetic constitution of *A. marina* revealed, that the genetic identity in lugworms of all European Atlantic populations (from France via the Netherlands and Germany to Norway) was high, whereas the similarity with the White Sea population was significantly low. An average high and significant gene differentiation of Atlantic and White Sea populations indicates a strongly hampered gene flow, probably due to the geographic and hydrographic isolation of the White Sea. The absence of a considerable gene flow was mirrored in significantly different allele frequencies of glucose phosphate isomerase and phosphoglucomutase in the White Sea population. The expression of mitochondrial isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2), however, seemed to be influenced more by temperature, indicated by a very strong correlation between the allele frequencies of IDH2-A and IDH2-B and average water temperature. These findings support the hypothesis, that mitochondria play a key role in adaptation to different temperature regimes.

## 1. Einleitung

Das gesamte Schelfgebiet der westeurasischen und amerikanischen Arktis war während der pleistozänen Vereisungen und vor allem während des Maximums der letzten Kaltzeit, der sogenannten Würm oder Weichsel Kaltzeit, mit Eis bedeckt (Nesis 1983). Schelfmeere wie das russische Weiße Meer waren in dieser Zeit vollständig mit Eis gefüllt und hörten dadurch auf, als Meer zu existieren (Badyukov 1979). Gletscherausläufer reichten sogar bis tief in den Ozean hinein und verdrängten die bodenlebenden Tiere des Flachwasserbereiches nicht nur aus dem Weißen Meer, sondern aus der gesamten westeurasischen und amerikanischen Arktis (Nesis 1983). Erst seit der sogenannten atlantischen Phase vor ca. 5.500 Jahren gilt das Weiße Meer wieder als eisfrei, und eine rein marine Phase begann. Tiere aus der arktischen Tiefsee und aus südlicheren Gebieten des Nordatlantiks konnten nun das Weiße Meer wieder besiedeln (Govberg 1973, Badyukov 1979, Nesis 1983).

Für Tiere aus südlicheren Regionen war die Eroberung der neuen (unbesiedelten) Gebiete des Weißen Meeres damit verknüpft, daß sie nun einem extremeren Temperaturregime ausgesetzt wurden. Nicht nur die durchschnittliche Jahrestemperatur, sondern auch die minimalen Temperaturen im Winter waren und sind noch heute am Weißen Meer niedriger als zum Beispiel in der Nordsee oder dem südlichen Nordatlantik. Auch erfolgten Temperaturänderungen während der kurzen eisfreien Zeit am Weißen Meer wesentlich schneller als in der Nordsee. Im offenen Bereich der Kandalaksha Bucht des Weißen Meeres erhöht sich beispielsweise die durchschnittliche Temperatur des Oberflächenwassers von  $-1,5\text{ °C}$  im März auf  $13,5\text{ °C}$  innerhalb von nur 5 Monaten. In den folgenden 4 Monaten sinkt die Temperatur wieder auf  $0\text{ °C}$  ab (Zenkevitch 1963). Die Oberflächentemperatur der südlichen Nordsee ändert sich dagegen innerhalb von 7 Monaten nur um ca.  $11\text{ °C}$  (Wolff 1983, Prandle und Lane 1995). Temperaturschwankungen in Küstengewässern und im Sediment sind sogar noch größer als im offenen Wasser, so daß beispielsweise in den norddeutschen Watten maximale Jahrestemperaturschwankungen von  $40\text{ °C}$  auftreten können (Dörjes 1970).

Extreme Temperaturen oder Temperaturschwankungen besitzen einen großen Einfluß auf den Zustand von Tieren, da u. a. physiologische und biochemische Prozesse von der Temperatur abhängen und extreme Temperaturen Schädigungen verursachen können. Die Verbreitung von Organismen ist folglich neben anderen Faktoren wie Nahrungsangebot oder Fraßdruck maßgeblich durch die jeweilige obere und untere Letaltemperatur sowie durch den Temperaturbedarf für Wachstum und Fortpflanzung bestimmt (Prosser 1991, Bischoff-Bäsmann 1997). Globale Temperaturveränderungen oder extreme Wetter-

ereignisse führten daher in der Vergangenheit immer wieder zu Verschiebungen von Verbreitungsgrenzen derjenigen Organismen, die nicht ausreichend angepaßt waren (Beukema 1979, 1992, Southward *et al.* 1995). Die Fähigkeit zur Kälteanpassung ist keine grundlegende Eigenschaft aller Organismen, sondern sie entwickelte sich in einigen Warmwasserorganismen, die so die Möglichkeit erhielten, in kältere Regionen einzuwandern (Arntz *et al.* 1994, Thiel *et al.* 1996). Daraus ergab sich die Frage, welche Mechanismen der Kälteanpassung zugrunde liegen und welche ihr Grenzen setzen und so die einfache Ausbreitung von Organismen in Kaltwassergebiete verhindern. Untersuchungen an ins Weiße Meer eingewanderte, ektotherme Tiere können, im Vergleich mit ihren in gemäßigten Zonen lebenden Verwandten, Aufschlüsse über physiologische und biochemische Mechanismen der Kälteanpassung liefern sowie über Prozesse, die einer Begrenzung des Lebensraumes zugrunde liegen.

Bei kältesensitiven Organismen treten schon bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes Kälteschäden auf, ein Phänomen, das als Kältekoma bezeichnet wird (Cossins und Bowler 1987). Eine Hauptursache besteht darin, daß lebensnotwendige Prozesse unter suboptimalen Temperaturen langsamer ablaufen oder ganz zum Erliegen kommen (Franks 1986). Dies ist auf kurze Dauer beschränkt oft unschädlich, kann aber langfristig einen Organismus so schwächen, daß er stirbt oder wenigstens gegenüber anderen Mortalitätsfaktoren anfälliger wird (Begon *et al.* 1991). Niedrige Temperaturen beeinträchtigen des weiteren die Flexibilität und die Durchlässigkeit von Membranen, wodurch die Osmoregulation oder das Nervensystem gestört werden können (Friedlander *et al.* 1976, Cossins und Bowler 1987, Begon *et al.* 1991).

Neben diesen Ursachen, die zum Kältekoma führen können, besitzt Eisbildung im Tier einen großen Einfluß auf die Kältesensitivität vieler Arten. Entsteht in der Zelle Eis, kommt es gewöhnlich zu einer tödlichen, irreversiblen Zerstörung der zellulären Ultrastruktur. Bei zu starker extrazellulärer Eisbildung kann eine Austrocknung der Zelle für den Organismus letale Folgen haben. Die Umwandlung von extrazellulärem Wasser zu Eis läßt eine konzentrierte Lösung von Salzen und Makromolekülen zurück, die einen osmotischen Gradienten aufbaut und so der Zelle Wasser entzieht. Durch diese Dehydrierung steigt zum einen die Salzkonzentration in der Zelle auf ein möglicherweise toxisches Niveau an (Murphy und Pierce 1975, Aarset 1982), zum anderen können Schäden direkt durch die Schrumpfung der Zellen, vor allem an der Plasmamembran, verursacht werden (Cossins und Bowler 1987). Bei den meisten untersuchten Organismen tritt der Zelltod ein, wenn mindestens zwei Drittel des intrazellulären Wassers ausgetreten sind (Kanwisher 1955, Aarset 1982). Auch sekundär kann Eisbildung negative Auswirkungen auf den Zustand der Tiere haben. So wurde im Gewebe aller

bisher untersuchten gefriertoleranten Arten unter Frost eine Akkumulation anaerober Endprodukte beobachtet (Storey und Storey 1988, Hermes-Lima und Storey 1993, Churchill und Storey 1996), vermutlich weil ein Gefrieren der extrazellulären Flüssigkeit den Sauerstofftransport verhindert. Eine Gefriertoleranz kann folglich nur dann wirkungsvoll sein, wenn die Tiere gleichzeitig tolerant gegen eine Sauerstoffmangelsituation ("Hypoxie") sind (s. u.).

Auch hohe Temperaturen können für einen Organismus gefährlich sein, wenn sich die Geschwindigkeit einzelner, biochemischer Reaktionen unterschiedlich erhöht und es zu Ungleichgewichten oder zu einer Verschiebung zwischen einzelnen Reaktionen kommt. Eine mögliche Folge ist, daß die Stoffwechselrate so beschleunigt wird, daß die Versorgung mit Nährstoffen oder Sauerstoff nicht mehr aufrechterhalten werden kann und Organismen verhungern oder ersticken. Außerdem sind viele biochemische Strukturen von sogenannten schwachen Bindungen abhängig. Sie halten Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen, Membran- und Nucleinsäurestrukturen, Enzym-Liganden-Komplexe und Bindungen zwischen Hormonen und Rezeptorproteinen aufrecht (Hochachka und Somero 1984). Die schwachen Bindungen können sich bei hohen Temperaturen lösen und so zu einer Inaktivierung oder Denaturierung von Enzymen führen. Schließlich wird auch die Genregulation sowie die Translationsgenauigkeit durch hohe Temperaturen gestört. Welche Mechanismen letztendlich zur Schädigung und zum Hitzetod führen, ist meist schwer zu beurteilen, da in der Regel einzelne Zellen, verschiedene Gewebe und der ganze Organismus unterschiedliche Hitzeresistenzen besitzen (Cossins und Bowler 1987). Oft sind Enzyme wesentlich thermostabiler als die Zellen oder Gewebe, aus denen die Enzyme extrahiert wurden, und Stoffwechselprozesse sind oft hitzeresistenter als das Ganztier. Verschiedene Untersuchungen an Fischen zeigten, daß das Kiemenepithel durch Hitze geschädigt wird (Cossins und Bowler 1987). Dies beeinträchtigt sowohl die Osmoregulation als auch die Sauerstoffaufnahme. Es entsteht Hypoxie und die Gehirnfunktion wird gestört. Der Tod der untersuchten Fischarten wird infolgedessen durch eine Gehirnschädigung verursacht, die jedoch nur indirekt auf die hohe Temperatur zurückzuführen ist.

Die oben beschriebene Temperaturabhängigkeit physiologischer und biochemischer Prozesse und die Möglichkeit von letalen Schädigungen durch extreme Temperaturen und Temperaturänderungen zeigen die Bedeutung der Umwelttemperaturen für den Zustand von Organismen (Hochachka & Somero 1984). Organismen müssen aus diesem Grund an das in ihrem Lebensraum vorherrschende Temperaturregime adaptiert sein, um erfolgreich siedeln, wachsen und sich reproduzieren zu können.

Ihrem Zeitbedarf entsprechend, werden drei Grundtypen von umweltbedingten Anpassungen unterschieden (Hochachka und Somero 1984, Clarke 1991):

1. *Evolutionsbedingte Anpassung oder Adaptation*. Dieser langwierigste Anpassungsprozeß beinhaltet den Erwerb von neuen genetischen Informationen und erfordert deshalb immer einen Zeitraum von vielen Generationen. Je mehr Zeit hierbei zur Verfügung steht, desto tiefgreifender und erfolgreicher kann die Anpassung sein (Wiencke *et al.* 1994, Bischoff-Bäsmann 1997).
2. *Akklimatisation*. In jedem Individuum erfolgt dieser Anpassungstyp wahrscheinlich mehrmals im Leben, z. B. während jahreszeitlicher Veränderungen. Meistens spielen mehrere Umweltfaktoren gleichzeitig eine Rolle. Für die Bestimmung des auslösenden Faktors und die Untersuchung des Zeitverlaufes dieser phänotypischen Veränderungen konzentriert man sich daher auf die Anpassung von Organismen an einen einzigen Faktor unter Laborbedingungen (*Akklimation*).
3. *Unmittelbare Anpassung*: Es gibt einige stoffwechselimmanente Mechanismen, die Umweltveränderungen sofort ausgleichen. Hierzu gehören verschiedene Modulationsstrategien, die die Affinität zwischen Enzymen und Substraten beeinflussen, indem z. B. Ladungs- oder Konformationsänderungen die katalytischen Eigenschaften eines Enzyms verändern. Bei lysosomalen Enzymen führt eine Temperaturerhöhung zu einer Zunahme der Substrataffinität und damit zu einer Aktivitätssteigerung ("positive Temperaturmodulation") - zusätzlich zum  $Q_{10}$ -Effekt. Häufiger findet sich allerdings eine Abnahme der Substrataffinität mit steigender Temperatur ("negative Temperaturmodulation"). Dadurch wird die Enzymaktivität entgegen dem  $Q_{10}$ -Effekt gesenkt, und die Geschwindigkeit von Stoffwechselreaktionen wird temperaturinsensitiver.

Alle drei Anpassungstypen stehen in Wechselbeziehung zueinander. So kann sich die Kapazität zur unmittelbaren Anpassung mit der Adaptation verändern, oder der Temperaturbereich, in dem die Stoffwechselrate temperaturinsensitiv ist, variiert mit einer jahreszeitlichen Akklimatisation (Newell und Pye 1970a, b). Die individuelle Flexibilität, im Verlauf von Jahreszeitenwechseln auf Umweltveränderungen einzugehen, ist wiederum von der genetischen Adaptation abhängig.

Strategien zur Temperaturanpassung können sowohl verhaltensbedingte als auch physiologische oder biochemische Mechanismen beinhalten. Im Allgemeinen gilt, daß eine biochemische Anpassung nur erfolgt, wenn den Organismen keine Verhaltensweisen

oder physiologischen Möglichkeiten zur Verfügung stehen, umweltbedingten Belastungen zu entgehen (Hochachka & Somero 1984). Verhaltensanpassungen zielen in erster Linie darauf ab, extremen Temperaturen oder größeren Temperaturschwankungen auszuweichen. So wandern viele marine Evertebraten der Gezeitenzone im Winter ins Sublitoral ab (Werner 1954, 1956, Wallace 1972, Beukema 1973, Beukema und Vlas 1979, Günther 1992), wo sie unter extremsten Bedingungen Temperaturen von  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt sind, während im Gezeitenbereich bei Niedrigwasser Temperaturen von bis zu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  auftreten können (Kanwisher 1955). Extreme Temperaturen bzw. Temperaturschwankungen vermeiden viele Evertebraten der Gezeitenzone auch dadurch, daß sie sich bei ungünstigen Bedingungen in Höhlen zurückziehen, in denen die Temperaturen weniger variieren (Eshky *et al.* 1996). Auch durch ein Leben im Sediment können ektotherme Gezeitenbewohner Schwankungen der Körpertemperatur vermindern, denen aufsitzende Arten (die Epifauna) im Gegensatz dazu unterworfen sind.

Kann oder soll extremen Temperaturen oder Temperaturschwankungen nicht ausgewichen werden, müssen andere Strategien eine Anpassung an das jeweilige Temperaturregime ermöglichen. Dies gilt z. B. für Tiere, die in polaren Regionen oder im Winter dauerhaft niedrigen Temperaturen ausgesetzt sind. In ektothermen Vertebraten geht eine Anpassung an niedrige Temperaturen mit einer Erhöhung der Kapazität zur aeroben Energiegewinnung einher, so daß alle nötigen zellulären Funktionen trotz der niedrigen thermischen Aktivität der Enzyme aufrecht erhalten werden können (siehe Übersichtsartikel von Prosser 1991, Guderley 1998, Pörtner *et al.* 1998). Unterschiedliche Mechanismen können daran beteiligt sein, wie Aktivitätssteigerungen einzelner Enzyme (Crockett und Sidell 1990, Guderley 1990, Dahlhoff und Somero 1993, Foster *et al.* 1993, Vetter und Buchholz 1998), eine Erhöhung der Mitochondrien- oder der Blutgefäßdichte (Campbell und Davies 1978, Sisson und Sisson 1987, Guderley und Blier 1988, Egginton und Sidell 1989, Londrville und Sidell 1990), Änderungen der Mitochondrienstruktur (Gaebel und Roots 1989, Archer und Johnston 1991) oder Änderungen in der Zusammensetzung von Membranen (Prosser 1991, Miranda und Hazel 1996). Diesen Mechanismen ist gemeinsam, daß durch sie zum einen die Verteilung von Sauerstoff und Metaboliten im Tier und innerhalb von Geweben und Zellen aufrecht erhalten bleibt oder daß zum anderen die Stoffwechselaktivität erhöht wird. Letzteres wird entweder durch eine Konzentrationserhöhung der am Stoffwechsel beteiligten Enzyme oder durch eine qualitative Veränderung von Enzymen bzw. der Enzymumgebung erreicht.

Marine Evertebraten der Gezeitenzone borealer oder polarer Gebiete müssen sich aber nicht nur an den temperaturbedingten Einfluß auf die Stoffwechselrate anpassen, sondern es besteht auch - zumindest im Winter - die Gefahr des Gefrierens, mit den oben

beschriebenen Folgen. Gefrierschutzproteine oder -glycoproteine, die bei verschiedenen Fischen vorkommen (Goddard *et al.* 1991, Davenport 1992), wurden in Evertrebraten bisher nicht gefunden (Schmidt-Nielsen 1990). Viele wirbellose Bewohner des Gezeitenbereiches besitzen jedoch Anpassungsmechanismen, die sie gegenüber extrazellulärer Eisbildung unempfindlich machen. Die meisten Anpassungen sind mit der Toleranz gegen Trockenfallen (bei Niedrigwasser) verknüpft (Johnston 1990, Churchill und Storey 1996). So können gefriertolerante Tiere in der Regel ihre Stoffwechselrate deutlich senken und die nötige Energie auf anaerobem Wege produzieren, wenn aufgrund von extrazellulärer Eisbildung die Verteilung von Metaboliten und Sauerstoff im Körper eingeschränkt ist. Es sind aber auch "echte" Anpassungen zur Erhöhung der Gefrier-toleranz bekannt, wie die Synthese von niedermolekularen "*ice-nucleatures*", die die extrazelluläre Eisbildung kontrollieren und dadurch osmotischen Streß minimieren (Loomis und Hayes 1987, Aunaas und Denstad 1988). In *Mytilus edulis* wurde des weiteren die Synthese von "*thermal hysteresis*" Proteinen nachgewiesen, die eine Rekristallisation von Eiskristallen unterbinden sollen. Dadurch wird verhindert, daß Eiskristalle zu groß werden, die sonst Zellschäden verursachen würden (Davenport 1992). Die Konzentrationen von "*ice-nucleatures*" und "*thermal hysteresis*" Proteinen sind jedoch von verschiedenen Faktoren, wie der Zonierung im Gezeitenbereich (Theede 1973), der geographischen Breite (Hilbish 1981) und der Jahreszeit (Murphy 1979, Bourget 1983), aber auch von der Salinität und des Sauerstoffgehaltes des Seewassers (Theede 1973, Murphy und Pierce 1975, Loomis *et al.* 1989) sowie von der Geschwindigkeit der Gefrier- und Auftauprozesse (Murphy und Johnson 1980) abhängig. Folglich ist auch die Toleranz gegenüber tiefen Temperaturen in einzelnen Individuen und zu unterschiedlichen Zeiten verschieden ausgeprägt.

Wie Untersuchungen von Murphy (1977a) zeigten, führt eine Akklimation an niedrige Temperaturen zu eine Änderung der ionalen Zusammensetzung in den Körperflüssigkeiten der Großen Miesmuschel *Modiolus demissus*. Während die  $Mg^{2+}$ -Konzentration reduziert wird, steigt die  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Blut an und die intrazelluläre Prolin-konzentration erhöht sich. Dies geht mit einer Verstärkung der Gefriertoleranz einher (Murphy 1977a, b). Wahrscheinlich ist die Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Blut die Folge des anaeroben Stoffwechsels, der auch zu einer Anreicherung von Alanin im Gewebe führte (Murphy 1977a). Alanin und Prolin besitzen genauso wie einige Metabolite des anaeroben Stoffwechsels Schutzwirkung gegen Gefrierschäden an Membranen oder Enzymen, in dem über hydrophobe Wechselwirkungen die Struktur der Lipiddoppelschicht bzw. Proteinstrukturen stabilisiert werden. (Loomis *et al.* 1989, Kück 1997). Dadurch kann auch erklärt werden, warum Hypoxie zu einer erhöhten Gefrier-resistenz der Muschel *Mytilus edulis* führt (Theede 1972).

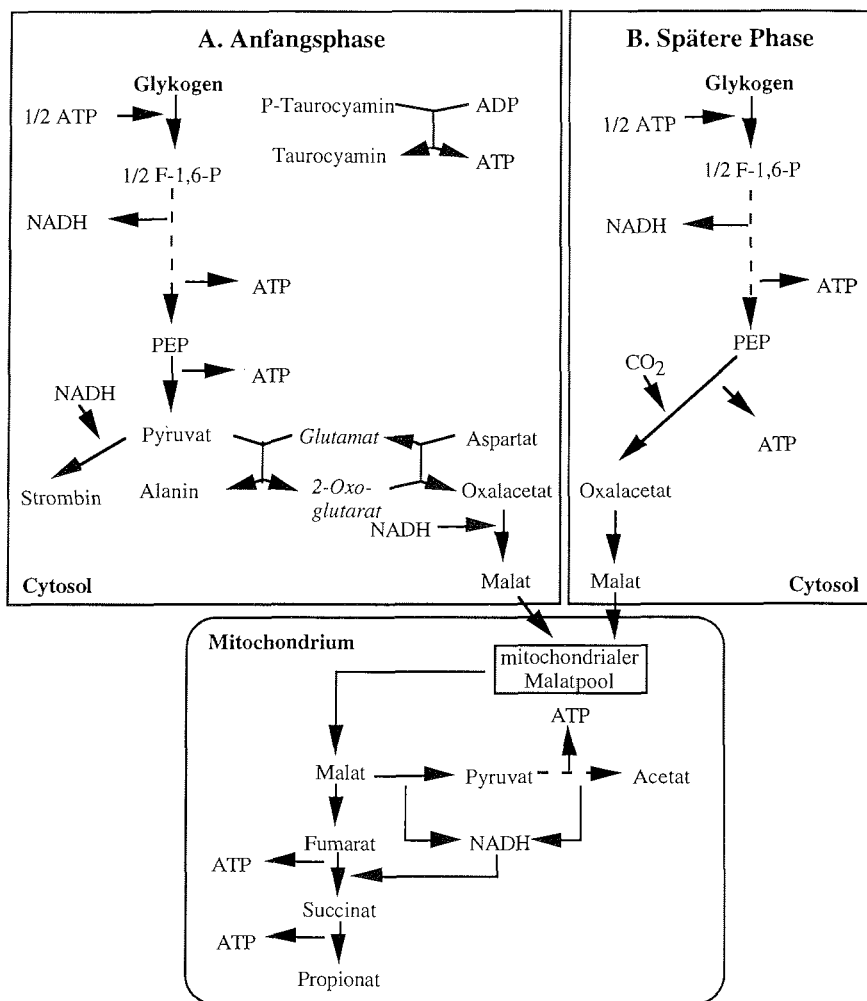


Anaerober Stoffwechsel, der der Aufrechterhaltung des Energiestatus bei Hypoxie dient, spielt demnach auch eine Rolle bei der Kälteanpassung. Im folgenden soll daher kurz erklärt werden, unter welchen Bedingungen anaerober Stoffwechsel einsetzt und wodurch er charakterisiert ist. Der wichtigste Energieüberträger der Zelle ist das durch den Energiestoffwechsel bereitgestellte ATP. Tiere oxidieren hierfür überwiegend Kohlenhydrate und Fette zu  $\text{CO}_2$  und Wasser, wobei ATP durch die Substratkettenphosphorylierung und zum größeren Teil durch oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette der Mitochondrien entsteht. Unter anaeroben Bedingungen ist der letzte Schritt der Atmungskette, die Oxidation von Wasserstoff zu Wasser, gehemmt, so daß zum einen die ATP-Produktion vermindert wird und es zum anderen zu einem Rückstau an NADH kommt. NADH entsteht im Verlauf der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus aus  $\text{NAD}^+$  und führt zur Übertragung von Wasserstoff aus dem Kohlenstoffgerüst (bzw. vom Fett) auf die Cytochrome der Atmungskette und damit auf Sauerstoff. Eine Sauerstoffmangelsituation kann entstehen, wenn z. B. bei intensiver Muskelarbeit der Sauerstoffverbrauch die Sauerstoffzufuhr übersteigt. In diesem Fall spricht man von funktioneller Anaerobiose, die meist nur sehr kurze Zeit dauert (Zebe *et al.* 1980). Eine biotopbedingte Anaerobiose liegt vor, wenn in dem das Tier umgebenden Milieu zu wenig Sauerstoff vorhanden ist. Dieser Situation sind marine Evertebraten der Gezeitenzone besonders bei Niedrigwasser und hohen Temperaturen häufiger ausgesetzt.

Bei funktioneller Anaerobiose werden, um die ATP-Konzentration in der Zelle zu puffern, zunächst die Phosphagene erschöpft, indem deren Phosphatgruppe auf ADP übertragen wird. Phosphagene stellen im Muskel einen Vorrat an energiereichem Phosphat dar, der mehrfach größer ist als der des ATP's. Eine Regeneration dieses Vorrates ist unter anaeroben Bedingungen jedoch nicht möglich (Grieshaber 1978). Ist der Phosphagenvorrat erschöpft, erfolgt die ATP-Bildung durch Substratkettenphosphorylierung in der Glykolyse. Das dafür notwendige  $\text{NAD}^+$  wird durch die Bildung von Opinen aus Pyruvat und einer Aminosäure regeneriert. Auch in der frühen Phase einer biotopbedingten Anaerobiose wird ATP aus dem Phosphagenabbau und der Glykolyse gewonnen. Die Reaktionsschritte, die hierbei zur ATP-Bildung und zum  $\text{NAD}^+$ -Umsatz beitragen, sind in Abb. 1 beispielhaft für den Pierwurm *Arenicola marina* aufgeführt. Hält die Hypoxie länger an, wird die ATP-Produktion in den Mitochondrien verstärkt. Diese Phase ist durch einen Anstieg der Konzentrationen von Succinat und Propionat gekennzeichnet (Pörtner *et al.* 1984b). Die Glykolyse wird dafür bei Phosphoenolpyruvat (PEP) unterbrochen, und Oxalacetat entsteht direkt durch dessen Carboxylierung (Abb. 1), statt über eine Transaminierungsreaktion von Aspartat und 2-Oxoglutarat. Ersteres wird von der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) katalysiert, die wahrscheinlich durch die Akkumulation von  $\text{CO}_2$  während der Anaerobiose aktiviert wird

Einleitung

(Pörtner 1987b, 1989). Das aus Oxalacetat entstehende Malat dient nun im Mitochondrium als Kohlenstoffgerüst für die Synthese von Succinat, Acetat und Propionat, wobei über Substratkettenphosphorylierung Energie in Form von ATP gewonnen wird (Abb. 1). Aufgrund der Akkumulation verschiedener Metabolite im Gewebe unter hypoxischen Bedingungen können Opine, wie Alanopin und Strombin, die



**Abb. 1** Schema der Stoffwechselwege, die im Pierwurm *Arenicola marina* an der Energieproduktion bei biotopbedingter Hypoxie beteiligt sind (nach Schöttler und Bennet 1991).

organischen Säuren Acetat, Propionat und Succinat sowie Alanin als Marker für anaeroben Stoffwechsel gelten.

Enzymatische Reaktionen und als Folge davon auch der gesamte Energiestoffwechsel, stehen im engen Zusammenhang mit dem Säure-Basen-Haushalt, da die Säure-Basen-Parameter (pH,  $P_{CO_2}$ , Bikarbonat) einen Einfluß auf die Aktivität verschiedener Enzyme ausüben (Pörtner 1989). Die oben erwähnte Aktivierung der PEPCK ist ein Beispiel für die Abhängigkeit des Stoffwechsels vom Säure-Basen-Haushalt. Phosphoenolpyruvat (PEP) kann in der Glykolyse durch die Pyruvatkinase zu Pyruvat umgesetzt werden, es ist aber auch die Carboxylierung durch die PEPCK zu Oxalacetat möglich. Beide Enzyme konkurrieren um das Substrat PEP, wobei unter aeroben Bedingungen die Pyruvatkinase begünstigt ist, während bei Anaerobiose die Aktivität der PEPCK überwiegt. Nach einer Hypothese führt unter hypoxen Bedingungen ein Absinken des pH-Wertes als Folge der Akkumulation saurer Stoffwechselprodukte zu der Verschiebung des Reaktionsschwerpunktes von der Pyruvatkinase zur PEPCK, da beide Enzyme unterschiedliche pH-Optima besitzen (Zebe *et al.* 1980). Zusätzlich begünstigt der Anstieg der Phosphatkonzentration beim Phosphagenabbau die Hemmung der Pyruvatkinase durch kovalente Phosphorylierung (Grieshaber *et al.* 1994).

Ein weiterer Zusammenhang zwischen Stoffwechsel und Säure-Basen-Haushalt besteht darin, daß beim Gasaustausch und bei verschiedenen Stoffwechselprozessen Protonen oder  $CO_2$ <sup>1</sup> freigesetzt oder verbraucht werden. Dadurch kann es zu der oben erwähnten Ansäuerung unter anaeroben Bedingungen kommen. Bei vielen Bewohnern der Gezeitenzone tritt in einer Sauerstoffmangelsituation eine respiratorische Azidose (= ventilationsbedingte Ansäuerung) auf, da das Stoffwechselprodukt  $CO_2$  nicht oder nur unzureichend an die Umgebung abgegeben wird. Setzt außerdem anaerober Stoffwechsel ein, kommt es zusätzlich zu einer metabolischen Azidose, da durch die Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat in der Glykolyse Protonen freigesetzt werden (Pörtner 1987a, b). Im aeroben Stoffwechsel werden diese bei der Veratmung von Kohlenhydraten im Zitronensäurezyklus wieder gebunden und die Netto-Protonenbilanz ist gleich Null. Unter anaeroben Bedingungen entfällt dieser Protonenverbrauch, so daß die Synthese von Opinen mit einer Freisetzung einer äquimolaren Menge an Protonen gekoppelt ist. Zur Verringerung der Säurelast kann die Bildung der flüchtigen Fettsäuren Acetat und Propionat bei langanhaltender Anaerobiose beitragen, wenn diese in

<sup>1</sup>Die Abhängigkeit des pH-Wertes von der  $CO_2$ -Konzentration ergibt sich aus dem  $CO_2$ -Bikarbonat-Gleichgewicht nach Gleichung (1):



## Einleitung

---

protonierter Form ins Seewasser abgegeben werden (Pörtner 1987a). Auch ist im Gegensatz zur Fettsäure- und Opinsynthese der Phosphagenabbau mit einem Protonenverbrauch verknüpft. Daher kann in der ersten Phase der Anaerobiose, zumindest beim Spritzwurm *Sipunculus nudus*, der pH-Wert sogar leicht ansteigen (Pörtner *et al.* 1984a, b).

Für Organismen ist die Regulation des pH-Wertes wichtig, nicht nur wegen der oben beschriebenen Abhängigkeit des Stoffwechsels vom Säure-Basen-Haushalt, sondern auch da starke Abweichungen des pH-Wertes die Durchlässigkeit von Membranen und die Elektrolytverteilung über die Membranen beeinflussen können (Silbernagel und Despopoulos 1988). Verschiedene Puffersysteme spielen daher bei der Regulation des pH-Wertes im Organismus eine entscheidende Rolle. In landlebenden Wirbeltieren ist das CO<sub>2</sub>-Bikarbonat-System (s. Gleichung 1) der wichtigste Puffer, da beide Pufferkomponenten weitestgehend unabhängig voneinander verändert werden können: die CO<sub>2</sub>-Konzentration wird über die Atmung reguliert, während Leber und Niere an der Ausscheidung von Bikarbonat beteiligt sind. In wasseratmenden Tieren ist dagegen einer Regulation über das CO<sub>2</sub>-Bikarbonat-System aufgrund der geringen Unterschiede zwischen dem körpereigenen CO<sub>2</sub>-Partialdruck (Pco<sub>2</sub>) und dem Pco<sub>2</sub> der Umgebung Grenzen gesetzt.

Auch beim Verbrauch der Phosphagene freigesetztes anorganisches Phosphat besitzt Pufferwirkung. Da sich die apparente Dissoziationskonstante pK' des Phosphates bei diesem Prozeß dem intrazellulären pH nähert, steigt dessen Pufferkapazität bzw. die Fähigkeit Protonen zu binden an, und es folgt eine Erhöhung des pH-Wertes beim Phosphagenabbau (Pörtner 1987a). Neben diesen anorganischen Puffersystemen spielen Hämoglobin und vor allem Proteine, die als Enzyme und Strukturelemente intrazellulär in hohen Konzentrationen vorliegen, eine wichtige Rolle. Das relativ saure, oxygenierte Hämoglobin (HbO<sub>2</sub>) nimmt weniger H<sup>+</sup> auf bzw. gibt mehr H<sup>+</sup> ab als das weniger saure, desoxygenierte Hb. Wird z. B. in den Kiemen Hb zu HbO<sub>2</sub> oxygeniert, werden Protonen frei. Sie können den pH-Anstieg ausgleichen, der dort durch die gleichzeitig ablaufende CO<sub>2</sub>-Abgabe entstehen würde. Proteine tragen ihrerseits zur Pufferung bei, da die Endgruppen vieler Aminosäuren, aus denen Proteine aufgebaut sind, als Protonendonatoren oder -akzeptoren dienen können (Stryer 1990). Eine besondere Bedeutung wird dabei dem Histidin zugeschrieben, welches in freier Form und in Dipeptiden gebunden bis zu 62 % der gesamten intrazellulären Pufferkapazität besitzen kann (Somero 1981, Abe *et al.* 1985).

Histidin ist häufig im katalytischen Zentrum von Enzymen zu finden, wo seine Imidazolseitenkette rasch zwischen den Ionisationsformen positiv geladen oder neutral umschalten kann, um das Knüpfen und Lösen von Bindungen zu katalysieren (Stryer 1990). Der Ladungszustand der sowohl temperatur- als auch pH-abhängigen Imidazolgruppe spielt daher für die Funktion vieler Enzyme eine besondere Rolle. Zusammen mit der relativen Häufigkeit dieser Aminosäure führte dies zu der Theorie, daß bei einer Temperaturänderung nicht die Konstanz des intrazellulären pH-Wertes wichtig ist, sondern die Konstanz der Dissoziation der Imidazolgruppe (alphastat Hypothese, Reeves 1972). Die Dissoziationsenthalpie für die Protonierung dieser Gruppe beträgt ungefähr  $29 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , übertragen in eine pH-Änderung in Abhängigkeit von der Temperatur ( $\Delta\text{pH}/\Delta T$ ) ergibt sich ein Wert von  $-0,017 \text{ pH-Einheiten pro } ^\circ\text{C}$  (Hochachka und Somero 1984). In anderen Worten bedeutet dies, daß der pH-Wert mit steigender Temperatur um  $0,017 \text{ pH-Einheiten pro } ^\circ\text{C}$  fallen muß, um Enzymaktivitäten zu stabilisieren (Reeves 1972, Somero 1981, 1983). Verschiedene Untersuchungen an Evertebraten und Vertebraten bestätigten weitgehend die alphastat Hypothese (Howell *et al.* 1973, Toulmond 1977, Walsh und Moon 1982, Whiteley und Taylor 1993, van Dijk *et al.* 1997, Sartoris und Pörtner 1997). Es gibt allerdings Befunde, die zeigen, daß diese Hypothese keine Allgemeingültigkeit besitzt. Hierzu gehören Untersuchungen von Boutilier *et al.* (1987), die für Gewebe bestimmter Amphibien nichtlineare Verläufe der pH-Werte ermittelt haben, sowie eine Arbeit von Butler und Day (1993), die je nach Gewebetyp im Lachs *Salmon trutta* sowohl steigende, konstante als auch sinkende pH-Werte mit steigender Temperatur bestimmten.

Aufgrund dieser Untersuchungen ergab sich die Frage, welchen Einfluß das neue Temperaturregime auf die nach dem Abschmelzen der Gletscher ins Weiße Meer einwandernden Arten besessen haben mußte und welche Mechanismen zur Kälteanpassung geführt haben. Eine weitere Frage nach der Kapazität und der Plastizität der Anpassungsmechanismen, auf akute Temperaturschwankungen zu reagieren stellte sich in bezug auf die für die letzten hundert Jahre bestimmte und weiterhin prognostizierte Erderwärmung (Easterling *et al.* 1997, Kerr 1998), die mit einer Erhöhung der Amplitude von Temperaturschwankungen und einer Vermehrung von extremen Wetterereignissen einhergehen soll (Knutson *et al.* 1998).

Der marine Polychaet *Arenicola marina* ist heute von Sibirien bis zur Pazifikküste von Nordamerika über fast die gesamte eurasische und amerikanische Arktis verbreitet (Wesenberg-Lund 1953, Zenkevitch 1963, Hartmann-Schröder 1971), in die er wahrscheinlich aus gemäßigten atlantischen Gebieten einwanderte. Sowohl am Weißen Meer als auch in der südlichen Nordsee lebt dieser Wurm im Sublitoral bzw. im Mischwatt der

Gezeitenzone (Dörjes 1970), wo er je nach Jahreszeit und Ort 10 bis 70 cm tiefe L-förmige Röhren gräbt. Er ist daher nicht nur an unterschiedliche Klimate angepaßt, sondern auch an diurnale und saisonale Temperaturschwankungen. Damit eignet sich der Pierwurm, der schon in bezug auf anaeroben Stoffwechsel und Säure-Basen-Haushalt gut untersucht ist (Zebe 1975, Toulmond 1977, Pörtner *et al.* 1979, Schöttler *et al.* 1983, 1984a, b, Conti und Toulmond 1986, Hardewig *et al.* 1994), auch als Modellorganismus für Kälteanpassung bei eurythermen Evertebraten.

Mit der vorliegenden Arbeit sollten einige Fragen zur Temperaturanpassung im latitudinalen Gradienten geklärt werden. Hierzu wurden sowohl subpolare Würmer vom Weißen Meer mit Tieren einer borealen Population aus der südlichen Nordsee verglichen als auch Sommer- mit Wintertieren aus dem Gezeitenbereich des deutschen Wattenmeeres.

1. Welchen Einfluß besitzt die Temperatur auf den aeroben und anaeroben Stoffwechsel sowie auf den Säure-Basen-Haushalt von *A. marina*?
2. Trägt in Pierwürmern eine Steigerung der aeroben Kapazität zur Kälteanpassung bei und wenn ja, welche Mechanismen sind daran beteiligt?
3. Sind die Tiere vom Weißen Meer an die Grenzen ihrer Anpassungsfähigkeit gelangt oder besitzen sie noch eine ausreichende Kapazität, sich an akute Temperaturschwankungen anzupassen?
4. Sind eventuelle physiologische Unterschiede zwischen den Populationen auf eine phänotypische Akklimatisation individueller Tiere oder auf eine genetische Adaptation der gesamten Populationen zurückzuführen?

## 2. Material und Methoden

Nachfolgend werden die angewendeten Methoden kurz erläutert sowie gegebenenfalls Vorteile und Grenzen der einzelnen Methoden aufgezeigt. Die ausführlichen Beschreibungen finden sich zusammen mit einer Aufstellung der verwendeten Geräte in den einzelnen Veröffentlichungen (s. Anhang).

### 2.1. Beschaffung und Hälterung der Versuchstiere

Pierwürmer der Art *Arenicola marina*, die im Sand-Schlick-Mischwatt des unteren Gezeitenbereiches der deutschen Nordsee bei Dorum bzw. des Weißen Meeres bei Kartesh in Rußland zwischen 1994 und 1997 gegraben wurden, dienten als Versuchstiere. Im folgenden werden diese Tiere als "Nordsee-Tiere" ("North Sea animals") bzw. als "Weißmeer-Tiere" ("White Sea animals") bezeichnet. Die borealen Tiere besaßen ein Gewicht von 5 - 8 g, die subpolaren Tieren wogen 1 - 4 g. Im Labor wurden sie in einer geschlossenen rezirkulierenden Brackwasseranlage (22 ‰) in Becken gehältert, die bis zu 10 cm mit Sediment des natürlichen Lebensraumes gefüllt waren. Die Hälterung der Nordsee-Tiere erfolgte bei  $11 \pm 0,5$  °C im Sommer bzw. bei  $2 \pm 0,5$  °C im Winter und einer Tag-Nacht Rhythmik von je 12 Stunden. Die Tiere vom Weißen Meer wurden bei  $3,5 \pm 0,5$  °C oder  $6 \pm 0,5$  °C und Dauerbeleuchtung gehältert. Diese Temperaturen entsprechen den Kontrolltemperaturen. Nach dem Transport ins Labor lag die Mortalität in den ersten Tagen bei etwa 10 % und sank danach für ca. 4 Wochen auf Werte nahe Null. Für die Isoenzymuntersuchungen wurden zusätzlich Tiere in Frankreich (Bucht von Arcachon), den Niederlanden (Westerscheldemündung) und Norwegen (Tromsø) gegraben, wobei die Hälterung entfiel.

### 2.2. Temperaturinkubationen

Die Tiere wurden einzeln in Behälter, die mit Sediment und belüftetem Brackwasser gefüllt waren, für 24 Stunden an die experimentellen Bedingungen gewöhnt, bevor diese in vortemperierte Brackwasseraquarien umgesetzt wurden. Die Inkubationstemperaturen lagen zwischen -1,7 und 26 °C. Die Inkubationen erfolgten im Sediment, um möglichst natürliche Bedingungen zu simulieren und streßbedingte Bewegungsaktivität zu minimieren. Damit der Einfluß von Sauerstoffmangel im Sediment ausgeschlossen werden konnte, wurden zusätzliche Untersuchungen mit Tieren im freien Wasser durchgeführt.

### 2.3. Sauerstoffverbrauchsmessung

Die Stoffwechselrate als Äquivalent des ATP-Umsatzes kann über die Abnahme von Substraten oder die Zunahme von Endprodukten des Energiestoffwechsels quantifiziert werden. Da unter aeroben Bedingungen Sauerstoff als alleiniger Elektronenakzeptor bei der vollständigen Nahrungsumsetzung von Tieren gelten kann, wurde die aerobe Stoffwechselrate über den Sauerstoffverbrauch bestimmt. Die Messung erfolgte in einem Durchflußsystem. Zu den Nachteilen dieses Systems gehört, daß Tiere ihre Sauerstoffversorgung nicht selber über die Ventilationsrate regulieren können. Ein offenes System wurde dennoch dem geschlossenen vorgezogen, um ein konstantes Sauerstoffangebot zu gewährleisten und Stoffwechselprodukte zu entfernen. Außerdem konnte im Durchfluß der Bakterienbewuchs im Sediment gering gehalten werden.

Eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen sauerstoffverbrauchenden und energieproduzierenden Prozessen tritt allerdings auf, wenn elementarer Sauerstoff nicht von der Cytochrom c-Oxidase, sondern von anderen Enzymen oder Verbindungen im Organismus reduziert wird, zum Beispiel von den sogenannten alternativen Oxidasen, wie dem Cytochrom o-Komplex. Cyanidinsensitive, alternative Oxidasen wurden neben Bakterien und Pflanzen auch für verschiedene oxykonforme Evertebraten, u. a. für *A. marina* beschrieben oder postuliert (Mendis und Evans 1984, Paget *et al.* 1988, Pörtner und Grieshaber 1993, Völkel und Grieshaber 1996, Tschischka *et al.* 1998). Die Bedeutung dieser Oxidasen soll in der Reduzierung überschüssigen Sauerstoffs liegen, wenn die Cytochrom c-Oxidase bereits gesättigt ist (Pörtner und Grieshaber 1993). Dies wird durch die Tatsache bestätigt, daß alle bisher untersuchten oxykonformen Evertebraten Bewohner von Gebieten niedriger Sauerstoffpartialdrücke sind. Ein Abzweig von der klassischen Elektronentransportkette führt zu einer Verminderung des Verhältnisses zwischen gebildetem ATP und verbrauchtem Sauerstoff, wodurch die Sauerstoffverbrauchsrate bei gleichbleibender ATP-Produktion ( $\approx$  ATP-Verbrauch) ansteigen kann. Über die Temperaturabhängigkeit der alternativen Oxidasen ist bisher sehr wenig bekannt, so daß deren Beitrag zur Temperatursensitivität bei Evertebraten ungeklärt ist. In verschiedenen pflanzlichen Mitochondrien erwies sich die cyanidresistente Atmung jedoch als sehr thermolabil (Lance *et al.* 1978). Gilt dies auch für die alternativen Oxidasen bei Evertebraten, kann ein Einfluß auf den Sauerstoffverbrauch bei schnellen Temperaturänderungen vermutlich ausgeschlossen werden. Dies gilt jedoch nicht im Bereich hoher Sauerstoffkonzentrationen (Hyperoxie), wenn alternative Oxidasen einen größeren, allerdings unbekanntem Anteil am Gesamtstoffwechsel haben.



#### **2.4. Ermittlung des Präferenztemperaturbereiches**

Die Bestimmung eines bevorzugten Temperaturbereiches erfolgte in einem mit Brackwasser gefüllten Thermogradienten von 2 m Länge und 0,25 m Breite, dessen Boden leicht mit Sediment bedeckt war. Die Bewegung der Tiere in Temperaturbereichen von 4 - 22 bzw. 30 °C wurde unter Rot- und Infrarotlicht mittels einer Infrarotvideokamera verfolgt und mit einem Zeitraffervideorecorder aufgezeichnet. Da alle Würmer in den ersten 3 Durchgängen starben, nachdem sie die höchste, letale Temperatur wählten, wurde die maximale Temperatur von 30 auf 22 °C gesenkt.

#### **2.5. Gewinnung und Aufbereitung der Gewebeproben**

Zur Gewinnung der Gewebeproben wurden die Tiere im Anschluß an die Temperaturinkubationen vom Sediment befreit und trocken getupft. Die Öffnung des Hautmuskelschlauches erfolgte mit einer feinen Schere in Höhe des 6. borstentragenden Segmentes, woraufhin die Cölomflüssigkeit, bedingt durch den hohen Innendruck, austrat und in gekühlten Eppendorfgläsern aufgefangen werden konnte. Diese wurden nach dem Verschließen unverzüglich in flüssigen Stickstoff überführt. Anschließend wurden Kopf und Schwanz der Tiere abgetrennt, der Hausmuskelschlauch vollständig geöffnet sowie Darm und Gonaden entfernt. Um unerwünschte Abbauprozesse während der mehr oder weniger langfristigen Aufbewahrung zu vermeiden, wurde das Gewebe schockgefroren und in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

#### **2.6. Analysen**

##### **2.6.1. Bestimmung des intra- und extrazellulären pH-Wertes**

Der intrazelluläre pH-Wert wurde mit einer von Pörtner *et al.* (1990) entwickelten Homogenatmethode bestimmt. Bei dieser Methode wird in Stickstoff eingefrorenes Gewebe in einem wässrigen Medium aus Nitrilotriessigsäure und Kaliumfluorid aufgetaut und im Ultraschallbad aufgeschlossen. Der pH-Wert wird anschließend mittels einer temperierten Glaskapillarelektrode bestimmt. Nitrilotriessigsäure und Kaliumfluorid bewirken eine Komplexierung bzw. Fällung von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen. Hierdurch werden ATPasenabhängige Reaktionen, die einen Einfluß auf den Säure-Basen-Haushalt besitzen könnten, im Gewebehomogenat weitestgehend unterbunden. Mit dieser Methode können daher, im Gegensatz z. B. zur DMO-Methode (Bestimmung durch die pH-

abhängige Verteilung der schwachen Säure Dimethyloxazolindion), auch sehr schnelle pH-Änderungen, zum Beispiel bei starker Muskelarbeit erfaßt werden. Aufgrund der starken Pufferung des Intrazellulärraumes und einer im Vergleich dazu geringen Pufferung der Extrazellulärflüssigkeit und des Mediums entspricht der im Homogenat gemessene pH-Wert mit einer nur geringen Abweichung von unter 0,01 pH-Einheiten dem intrazellulären pH (Pörtner *et al.* 1990). Der extrazelluläre pH-Wert der Cölomflüssigkeit wurde mittels einer temperierten Glaskapillarelektrode bestimmt. Vorausgehende Untersuchungen zeigten, daß das Einfrieren der Cölomflüssigkeit in flüssigem Stickstoff keinen Einfluß auf den pH-Wert hatte (Klein 1994).

### 2.6.2. Pufferwertbestimmung

Der intrazelluläre Nichtphosphat-Nichtbikarbonat-Pufferwert ( $\beta_{NB}$ ) wurde mittels einer Methode nach Pörtner (1990) in Homogenaten aus Hautmuskelschlauchgewebe bestimmt. Im Stoffwechsel durch Nitrilotriessigsäure und Kaliumfluorid gehemmtes Gewebekomogenat wurde hierbei mit verschiedenen  $CO_2$ -Partialdrücken ( $P_{CO_2}$ ) äquilibriert. Die Änderung des pH-Wertes im Homogenat ist ein Maß für die Fähigkeit des Gewebes, die zugeführte Kohlensäure als flüchtige Säure zu puffern. Nach jedem Äquilibrierungsschritt wurde eine Probe genommen und die  $CO_2$ -Gesamtkonzentration (Pörtner *et al.* 1990) sowie der Phosphatgehalt nach Pörtner (1990) bestimmt. Aus dem  $CO_2$ -Gesamtgehalt ( $C_{CO_2}$ ), der gaschromatographisch ermittelt wurde, und dem pH-Wert können der  $CO_2$ -Partialdruck ( $P_{CO_2}$ ) und die Bikarbonatkonzentration ( $[HCO_3^-]$ ) gemäß der Henderson-Hasselbalch-Gleichung wie folgt berechnet werden:

$$P_{CO_2} = \frac{C_{CO_2}}{10^{(pH-pK''')} \cdot \alpha_{CO_2} + \alpha_{CO_2}} \quad (2)$$

$$[HCO_3^-] = C_{CO_2} - \alpha_{CO_2} \cdot P_{CO_2} \quad (3)$$

für:  $pK''' =$  negativ dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante  $K'''$  von  $H_2CO_3$  unter physiologischen Bedingungen, berechnet für die verschiedenen pH-Werte nach Heisler (1986).

$\alpha_{CO_2} =$  Löslichkeitskoeffizient von  $CO_2$ , berechnet nach Heisler (1986).

### 2.6.3. Quantifizierung von Metaboliten des Energiestoffwechsels

Vor der Bestimmung verschiedener Metabolite des Energiestoffwechsels, mußten diese aus den in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Hautmuskelschläuchen mit Perchlorsäure extrahiert werden (Beis und Newsholme 1975, modifiziert nach Pette und Reichmann 1982). Daraufhin erfolgte die Quantifizierung folgender Metabolite photometrisch gemäß enzymatischer Standardmethoden: ADP und AMP nach Jaworek und Welsh (1989), ATP gemäß Trautschold *et al.* (1989), Ammonium entsprechend einer modifizierten Methode nach Bergmeyer und Beutler (1990) und Succinat nach Beutler (1989). Die flüchtigen Fettsäuren Acetat und Proionat wurden mittels Ionenchromatographie gemäß einer veränderten Methode nach Hardewig *et al.* (1991) bestimmt. Die Ermittlung der Konzentrationen der Opine Alanopin und Strombin erfolgte durch chromatographische Bestimmung mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC). Zur Trennung diente eine Fertigsäule des Typs Polyspher ARAC für organische Säuren (Merck, Darmstadt) oder eine Interaction ARH-601 Säule für aromatische Säuren (ICT-Ass-Chem, Bad Homburg) mit  $5 \cdot 10^{-5}$  N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  als Laufmittel bei 45 °C. Die Fließgeschwindigkeit betrug  $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Die Opine wurden mit einem Leitfähigkeitsdetektor bestimmt. In Proben mit geringen Extraktvolumina wurden die Adenylate AMP, ADP und ATP nicht enzymatisch, sondern chromatographisch nach einer modifizierten Methode nach Fischer (1995) bestimmt. Die Trennung erfolgte dabei auf einer Spherisorb C18 Säule (Latek, Eppelheim) bei 20 °C und einer Flußrate von  $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Die mobile Phase bestand aus  $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  11-Aminoundecanoischer Säure in  $25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  Kaliumphosphatpuffer mit 8 % (v/v) Methanol (pH = 6). Die Adenylate wurden bei 210 nm mit Hilfe eines Diodenstrahl-Detektormoduls ermittelt.

### 2.6.4. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Zur Bestimmung der Aktivität der Cytochrom c-Oxidase wurden Homogenate aus frischen (nicht eingefrorenen) Hautmuskelschläuchen hergestellt und ein photometrischer Test gemäß Hand und Somero (1983) durchgeführt. Die Oxidation des reduzierten Cytochrom c wurde durch die Absorptionsabnahme bei 550 nm verfolgt. Eine Methode von Sugden und Newsholme (1975) wurde angewandt, um die Aktivität der NADP-abhängigen Isocitratdehydrogenase zu bestimmen. Die Bestimmung der Substratabnahme diente hierbei der Quantifizierung der Enzymaktivität.

### 2.6.5. Berechnung der Aktivierungsenergie

Die Daten der Enzymaktivitäten wurden nach der Arrhenius-Gleichung (4) ausgewertet. Diese Gleichung beschreibt die Temperaturabhängigkeit enzymatischer Reaktionen:

$$k = A e^{-E_a/RT} \quad (4)$$

Dabei ist A eine für die untersuchte Reaktion charakteristische Konstante, e die Basis des natürlichen Logarithmus,  $E_a$  die Aktivierungsenergie ( $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), R die allgemeine Gaskonstante ( $8,3143 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) und T die absolute Temperatur in Kelvin. Der Faktor ( $e^{-E_a/RT}$ ) gibt den Bruchteil von Teilchen an, deren Energie größer oder gleich der Aktivierungsenergie ist (Maxwell-Verteilungsgesetz). Durch eine Umformung der Gleichung kann die Aktivierungsenergie einer Reaktion wie folgt berechnet werden (Segal 1976):

$$E_a = 2,3 \cdot R \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot \log(k_2/k_1) \cdot (T_2 - T_1)^{-1} \quad (5)$$

für:  $T_1, T_2$  = tiefere bzw. höhere Temperatur (Kelvin)  
 $k_1, k_2$  = Stoffwechselrate bei der tieferen bzw. der höheren Temperatur  
 R = allgemeine Gaskonstante

Graphisch kann die Aktivierungsenergie direkt aus der Steigung der Geraden im Arrhenius-Plot abgelesen werden. Hierfür werden der Logarithmus der Reaktionsgeschwindigkeit gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur ( $1/T$ ) aufgetragen.

### 2.6.6. Berechnung der $Q_{10}$ -Werte

Die Berechnung der  $Q_{10}$ -Werte erfolgte nach einer modifizierten Van't Hoff'schen Gleichung für die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur, mit der auch Temperaturintervalle von  $< 10 \text{ }^\circ\text{C}$  berücksichtigt werden können:

$$Q_{10} = (k_2/k_1)^{10/(T_2 - T_1)} \quad (6)$$

für:  $T_1, T_2$  = tiefere bzw. höhere Temperatur (Kelvin)  
 $k_1, k_2$  = Stoffwechselrate bei der tieferen bzw. der höheren Temperatur

## 2.7. Elektronenmikroskopische Untersuchung

Hautmuskelschlauchgewebe von frisch gegrabenen Tieren wurde sofort nach der Präparation in Natrium-Phosphatpuffer mit Glutaraldehyd fixiert sowie mit Osmiumtetroxid nachfixiert, um eine Veränderung der Mitochondriendichte oder -struktur während der Analyse zu verhindern. Zum Schneiden wurde das Gewebe anschließend in Epoxidharz eingebettet. Eine Kontrastierung der Ultradünnschnitte (50 - 70 nm) erfolgte mit Uranylacetat und Bleicitrat. Zur Bestimmung des Mitochondriengehaltes im Muskelgewebe wurde die Anzahl der Mitochondrien in zufällig ausgewählten, einzelnen Muskelzellen ermittelt und auf die Gesamtfläche des Muskelquerschnittes bezogen. Die Identifizierung der Mitochondrien und deren Zählung wurde unter dem Mikroskop durchgeführt, während die Flächenbestimmung des Querschnittes anhand von Photos erfolgte. Die häufig angewendete sogenannte "point-sampling-method", bei der ein Raster über den Muskelquerschnitt gelegt und die Anzahl der Punkte über Mitochondrien ins Verhältnis zu Punkten ohne Mitochondrien gesetzt wird, fand in der vorliegenden Arbeit keine Verwendung. Die Mitochondrien im Pierwurmmuskel sind sehr unregelmäßig verteilt, und aus technischen Gründen war die Identifizierung der Mitochondrien auf den Photos nicht immer exakt möglich. Eine nach der "point-sampling-method" ermittelte Dichte wäre daher zu gering ausgefallen.

## 2.8. Analyse des Isoenzymmusters

Die genetische Konstitution von Pierwürmern wurde mittels elektrophoretischer Isoenzymanalyse gemäß Menken (1982) und Hummel *et al.* (1995) ermittelt. Hierzu wurden Hautmuskelschläuche in Tris-Zitronensäure Puffer homogenisiert und die Proteine auf einem nativen, horizontalen Stärkegel im Spannungsfeld bei konstanten 100 mA getrennt. Anschließend erfolgte eine Färbung mittels enzymatischen Tests, bei dem spezifische Stoffe (für die hier untersuchten Enzyme wurde 3-[4,5-Dimethylethylthiazol-2-yl]-2-5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) eingesetzt) durch Protonen ihre Farbe erhalten, die bei einer Reaktion des zu untersuchenden Enzyms freigesetzt wurden. Der Ort des Farbstoffes auf dem Gel gibt so die Lage eines spezifischen Enzyms wieder, wobei verschiedene Allele durch unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten voneinander getrennt wurden. Die Daten wurden auf die Häufigkeit einzelner Allele, auf den Grad der Heterozygotie und auf die Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht analysiert. Außerdem wurden Unterschiede der Allelhäufigkeit jeder Loci zwischen den Populationen (Fixation Index  $F_{st}$ ) und die genetische Gleichheit der Gene zwischen den

Populationen (Genetische Identität nach Nei, 1975) mit Hilfe des Biosys Computerprogrammes (Swaffort und Selander 1981) berechnet.

## 2.9. Statistik

Gemessenen Daten wurden auf Ausreißer nach Nalimov (Noak 1980) geprüft. Aus einem ausreißerverdächtigen Wert wurde eine Prüfgröße  $r_A$  ermittelt. Lag die Prüfgröße außerhalb der  $r(95)$ -Grenze einer  $r$ -Verteilung ( $r_A > r(95)$ ), wurde der Wert als Ausreißer betrachtet.

Die Signifikanz physiologischer und metabolischer Veränderungen sowie von Unterschieden zwischen den Populationen wurde mit Hilfe einer Varianz- (ANOVA) oder Kovarianzanalyse (ANCOVA) durchgeführt. Ergaben sich signifikante Unterschiede, konnte durch einen anschließenden Student-Newman-Keuls-Test ermittelt werden, welche Paarungen sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  signifikant unterschieden.

Für Regressionsgraden wurde der Maßkorrelationskoeffizient ( $r$ ) auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  getestet. Der Verlauf einer Gerade wurde als signifikant angesehen, wenn die Regressionsgleichung den F-Test im Anschluß an die Varianzanalyse passierte.

### 3. Gesamtdiskussion

Im folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse zusammenfassend diskutiert. Hierbei soll zuerst der Einfluß der Temperatur auf den Stoffwechsel vom Pierwurm *Arenicola marina* erläutert werden, um dann verschiedene Anpassungsmechanismen an unterschiedliche Temperaturregime zu behandeln. Dabei wurde zwischen der Akklimatisation, einer Anpassung an verschiedene Jahreszeiten oder Klimate, der Akklimation, einer Anpassung an nur einen einzigen Faktor unter Laborbedingungen und der genetischen Adaptation unterschieden.

Eine detailliertere Diskussion der einzelnen Daten ist in den entsprechenden Veröffentlichungen im Anhang zu finden.

#### 3.1. Charakterisierung zweier kritischer Temperaturen

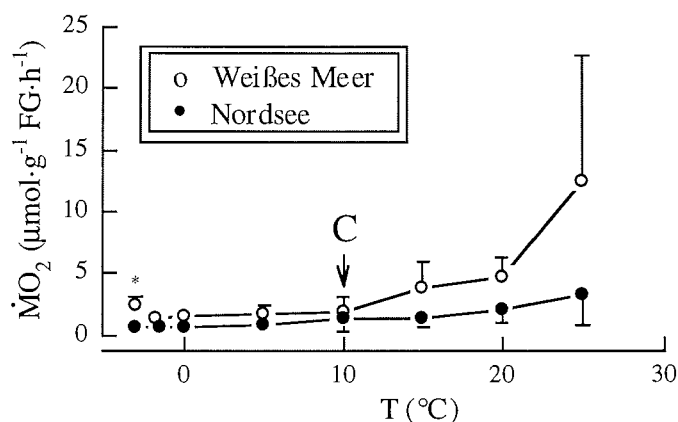
##### 3.1.1. Der Einfluß der Temperatur auf den aeroben Stoffwechsel

Der Einfluß der Temperatur auf den Stoffwechsel von Tieren wurde bisher vor allem anhand der Temperaturabhängigkeit des Sauerstoffverbrauches bestimmt, der als Maß der aeroben Stoffwechselrate gilt. Die Untersuchungen ergaben, daß sich bei den meisten Tieren der Sauerstoffverbrauch mit steigender Temperatur, gemäß van 't Hoff's Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel (RGT-Regel) erhöht. Dagegen besitzen viele marine Evertibraten der Gezeitenzone über einen weiten Temperaturbereich einen relativ temperaturinsensitiven Stoffwechsel (Newell 1969, Newell und Pye 1971). Auch beim Pierwurm *Arenicola marina* findet ein sofortiger Ausgleich der Stoffwechselrate statt (Krüger 1964), wobei der Temperaturbereich, in dem die Kompensation stattfindet, mit der Akklimationstemperatur variiert (Publikation II). Eine Verschiebung des Kompensationsbereiches mit der Jahreszeit wurde auch bei anderen marinen Evertibraten nachgewiesen (Newell und Pye 1970a, b). Für den Pierwurm bedeutet dies, daß er seinen Energieverbrauch trotz der tidenbedingt sich schnell ändernden Temperaturen konstant halten kann. Die Mechanismen, die der Regulation des Energieverbrauches zugrunde liegen, sind bisher nicht bekannt. Der konstante Energieverbrauch muß jedoch mit einer Regulation der Energieproduktion gekoppelt sein, deren Mechanismen genauer untersucht sind. So weiß man, daß die Affinität zwischen Enzymen und Substraten mit der Temperatur moduliert wird, um konstante Enzymaktivitäten zu erhalten. Änderungen der Enzymkonzentrationen oder die Bildung von Isoenzymen sind dagegen nicht beteiligt, da die Regulation der Energieproduktion bei Temperaturänderungen sehr rasch erfolgt. Die Verschiebung des

## Diskussion

Kompensationsbereiches kann dagegen von der Expression unterschiedlicher, regulatorisch wichtiger Isoenzyme begleitet werden (Hazel und Prosser 1974).

Trotz der Fähigkeit zur Temperaturkompensation über einen begrenzten Temperaturbereich kam es bei *A. marina* außerhalb dieses Bereiches zu einem Anstieg der  $Q_{10}$ -Werte und damit zu einem Anstieg des Sauerstoffverbrauches bei hohen Temperaturen. Bemerkenswert ist jedoch, daß bei den subpolaren Tieren nicht nur bei extrem hohen, sondern auch bei sehr niedrigen Temperaturen (-3 °C) ein Anstieg des Sauerstoffverbrauches zu beobachten gewesen war (Abb. 2). Dies paßt zu Daten von Krüger (1964), der in einzelnen Nordsee-Würmern einen Anstieg des Sauerstoffverbrauches bei Temperaturen unter 5 °C, also unterhalb der entsprechenden unteren kritischen Temperatur (s. u.), beobachtete. Die Ventilationsrate kann aber nicht beliebig erhöht werden, um den Kiemen mehr sauerstoffreiches Wasser zuzuführen, da die Ventilation zu den wichtigsten energieverbrauchenden Prozessen gehört (Trevor 1978, Toulmond und Dejours 1994). Stattdessen wird sie wie bei anderen Polychaeten bei hohen Temperaturen abrupt eingeschränkt (Seymour 1972, Kristensen 1983). Dies wurde bisher auf einen internen Mechanismus zurückgeführt, der die Ventilationsaktivität unterbrechen soll, wenn das Oberflächenwasser aus irgendeinem Grund schädlich ist (Wells und Albrecht 1951, zitiert in Kristensen 1983). Diese Interpretation setzt jedoch die Existenz eines



**Abb. 2** Die Sauerstoffverbrauchsrate ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Frischgewicht} \cdot \text{h}^{-1}$ ) von *Arenicola marina* aus der Nordsee und vom Weißen Meer in Abhängigkeit von der Temperatur im Sediment. Die subpolaren Tiere besaßen über den gesamten Temperaturbereich einen signifikant höheren Verbrauch als die borealen Würmer ( $p = 0,002$ ). Interessant ist, daß der Sauerstoffverbrauch der Weißmeer-Tiere bei einem Temperaturabfall von -1,7 auf -3 °C signifikant anstieg (Mittelwerte  $\pm$  S.D.; n: zwischen 3 und 14; \* = signifikant verschieden von dem Wert bei -1,7 °C; aus Publikation II).



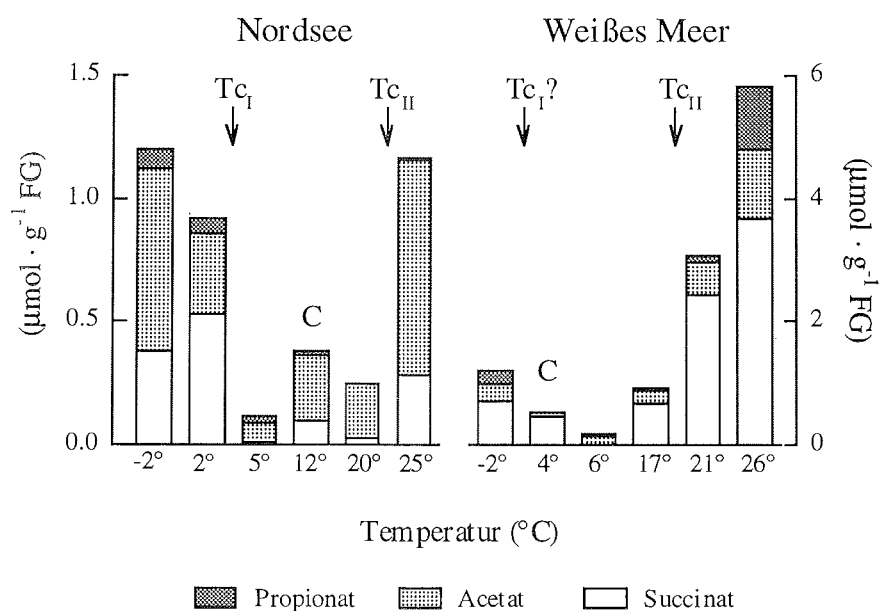
Thermosensors voraus, der Temperaturen oberhalb eines kritischen Wertes erkennen kann. Konnten Pierwürmer in einem Thermogradienten einen Bereich mit ihrer bevorzugten Temperatur frei aufsuchen, wählten sie in den meisten Fällen die höchste zur Verfügung stehende Temperatur, selbst wenn diese letal war (Publikation II). Es ist daher zu vermuten, daß Pierwürmer über keinen internen Mechanismus verfügen, der die Ventilationsaktivität unterbricht, um die Tiere vor zu hohen Temperaturen zu schützen. Stattdessen scheint die Senkung der Ventilationsrate ein Anzeichen von Hitzestress nahe oder an der Letaltemperatur zu sein.

### 3.1.2. Temperaturbedingte Anaerobiose

Bei niedrigen Temperaturen ist die Löslichkeit von Sauerstoff im Wasser erhöht. Dennoch kann es auch bei niedrigen Temperaturen zu einer Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff kommen, wenn Atmungs- und Kreislauffunktionen bei niedrigen Temperaturen gedrosselt werden (Pörtner *et al.* 1998). Baumfalk (1979) beobachtete, daß peristaltische Bewegungen von *A. marina* nach einem Temperaturabfall abnehmen, wodurch die Zufuhr sauerstoffreichen Wassers zu den Kiemen reduziert wird. Auch verringert sich die Rate des Blutflusses, und die Verteilung sauerstoffreichen Blutes im Gewebe wird eingeschränkt (Seymour 1972). Schließlich wird bei niedrigen Temperaturen auch die Abgabe von Sauerstoff ins Gewebe behindert. Zum einen verstärkt sich aufgrund der niedrigen Temperaturen die Bindung zwischen Sauerstoff und Hämoglobin, zum anderen weist das Hämoglobin im Blut von *A. marina* einen Bohreffekt auf (Mangum 1978). Dadurch daß der pH-Wert des Blutes mit sinkender Temperatur steigt (Toulmond 1977, Mangum 1978), erhöht sich die Affinität des Sauerstoffs zum Hämoglobin noch weiter, und die Abgabe ins Gewebe wird zusätzlich erschwert.

Zur Untersuchung, ob der aerobe Stoffwechsel im Pierwurm ausreichte, um den gesteigerten Energiebedarf bei extremen Temperaturen zu decken (s. 3.1.1. und 3.3.2.), wurden die Konzentrationen der organischen Säuren Acetat, Propionat und Succinat sowie der Opine Alanopin und Strombin im Hautmuskelschlauch nach einer Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen als Indikatoren für anaeroben Stoffwechsel gemessen. Diese Metabolite werden im Cytosol bzw. in den Mitochondrien gebildet, sobald der Sauerstoffpartialdruck unter einen kritischen Wert sinkt und die Energiegewinnung aus aeroben Prozessen nicht mehr ausreicht (Zebe 1975, Pörtner *et al.* 1984b). Es zeigte sich, daß sowohl bei sehr hohen, als auch bei niedrigen Temperaturen anaerobe Endprodukte im Hautmuskelschlauch akkumulierten (Abb. 3). Es ließen sich dadurch zwei kritische Temperaturen definieren, eine niedrige und eine hohe, die durch

das Einsetzen des anaeroben Stoffwechsels charakterisiert sind. Ein unzureichendes Sauerstoffangebot in der Umgebung als Ursache für die Anaerobiose jenseits der kritischen Temperaturen konnte durch Versuche mit Tieren ausgeschlossen werden, die ohne Sediment in belüftetem Seewasser inkubiert wurden. Stattdessen reichte sowohl bei hohen als auch bei niedrigen Temperaturen die Sauerstoffaufnahme oder -verteilung nicht aus, um auf aerobem Wege genügend Energie zu produzieren. Auch in dem Spritzwurm *Sipunculus nudus* konnte eine Abnahme ventilatorischer Bewegungen bei niedrigen Temperaturen im Sediment mit einem Abfall des Sauerstoffpartialdruckes ( $P_{O_2}$ ) in der Cöloflüssigkeit und dem Einsetzen von anaerobem Stoffwechsel korreliert werden (Zielinski und Pörtner 1996).



**Abb. 3** Konzentrationen der anaeroben Endprodukte Succinat, Acetat und Propionat ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  Frischgewicht) im Hautmuskelschlauch von *A. marina* aus der Nordsee und vom Weißen Meer nach 10stündiger Inkubation bei verschiedenen Temperaturen. Sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Temperaturen kam es zum Einsetzen anaeroben Stoffwechsels, wodurch sich zwei kritische Temperaturen ( $T_c$ ) definieren ließen, die durch die Akkumulation anaerober Endprodukte charakterisiert sind. In den subpolaren Tieren stiegen bei hohen Temperaturen die Succinat- und Propionatkonzentrationen signifikant höher an als in den borealen Würmern, während sich die Acetatkonzentrationen nicht unterschieden (hierbei ist die verschiedene Skalierung in den Graphen zu beachten; Mittelwerte;  $n = 4-5$ ; C = Kontrolltiere; modifiziert nach Publikation I).

Der Schwellenwert, bei dem der anaerobe Stoffwechsel einsetzte, lag in den Wintertieren aus der Nordsee bei Werten unter 2 °C und in Sommertieren bei etwa 5 °C. In Pierwürmern des Weißen Meeres war auch bei -1,7 °C nur ein leichter Anstieg der Acetat-, Propionat- und Succinatwerte im Muskelgewebe zu beobachten. Daher konnte der untere Schwellenwert nicht genau definiert werden (Publikation I). Die Tendenz der Weißmeer-Tiere, bei -1,7 °C anaerobe Stoffwechselprodukte zu akkumulieren, läßt jedoch die Existenz eines niedrigen Schwellenwertes vermuten. Auch der signifikante Anstieg des Sauerstoffverbrauches bei -3 °C, einer Temperatur, bei der kein anaerober Stoffwechsel untersucht werden konnte, läßt auf die Überschreitung einer kritischen Temperatur schließen, die mit Änderungen im Energiestoffwechsel einhergeht. Die obere kritische Temperatur lag in Sommertieren aus der Nordsee bei über 20 °C und ist damit höher als bei Tieren vom Weißen Meer, in denen der Schwellenwert bei etwa 17 °C lag. Dieser Schwellenwert entspricht in etwa der maximalen Temperatur, die im Lebensraum der Weißmeer Tiere (in der Tiefe der Wurmbauten) im Sommer gemessen wurde (Tab. 1). Zusammen mit dem Befund, daß die Acetatakkumulation bei niedrigen Temperaturen bei den Weißmeer-Würmern geringer als bei den Tieren aus der Nordsee war, scheint es, daß sowohl die obere als auch die untere kritische Temperatur nach saisonaler oder latitudinaler Kälteanpassung zu niedrigeren Werten verschoben sind. Die Rate der Acetat- oder Succinatbildung bei niedrigen Temperaturen war dagegen unabhängig von saisonaler oder latitudinaler Anpassung der kritischen Temperaturen.

Tab. 1 Temperatur (°C) des Sediments im unteren Gezeitenbereich des Lebensraumes der Weißmeer-Tiere bei Kartesh im Hochsommer. An allen Meßtagen schien die Sonne und bis auf den ersten Tag wehte eine leichte Brise. Alle dargestellten Messungen erfolgten an den Standorten (a - c) bei Niedrigwasser, eine halbe Stunde vor auflaufendem Wasser (Mittelwerte; n = 3; unveröffentlichte Daten).

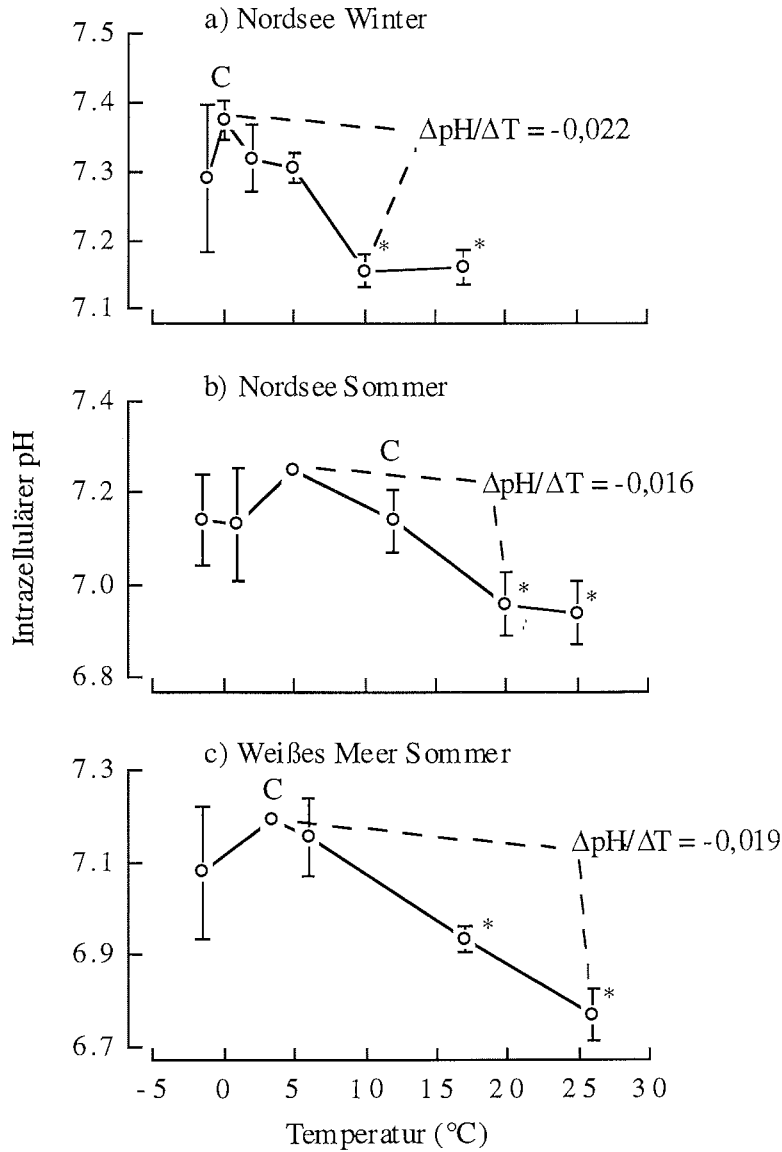
Tiefe (cm)		Temperatur (°C)		
		07.08.1996	12.08.1996	18.08.1996
1-2	a	22,4	18,5	18,3
	b	20,2	18,7	19,8
	c	21,1	20,5	21,7
10-15	a	16,8	16,6	14,1
	b	17,1	16,4	15,3
	c	18,0	16,6	16,6

Auffällig ist, daß nach 10stündiger Inkubation bei hohen Temperaturen im Hautmuskelschlauch der Weißmeer-Tiere signifikant mehr Propionat und Succinat akkumulierte als in den Würmern aus der Nordsee, während sich die Acetatakkumulation nicht unterschied. Dies deutet auf einen höheren Energiebedarf der subpolaren Tiere verglichen mit den Nordsee-Würmern hin, der durch einen höheren Fluß durch den Succinat-Propionat-Weg und dadurch einer verstärkten mitochondrialen ATP-Produktion gedeckt wurde. Wie lassen sich jedoch die Unterschiede zwischen der Acetat- und Propionatbildungsrate in Tieren beider Populationen erklären? Es ist seit längerem bekannt, daß die Propionatbildungsrate in verschiedenen marinen Evertebraten pH-abhängig ist (Schulz und Kluytmans 1983, Giebels 1993) und die Propionatakkumulation mit fallendem intrazellulärem pH-Wert ansteigt. Da in den subpolaren Tieren vor allem bei hohen Temperaturen der intrazelluläre pH-Wert deutlich niedrigerer war als in den borealen Würmern, könnte dies die höheren Propionatkonzentrationen erklären. Andererseits zeigt auch die Acetatbildung eine steigende Aktivität mit fallendem pH, während bei sauren pH-Werten die Succinatkonzentration im Hautmuskelschlauch von *A. marina* abnimmt (Giebels 1993). Unterschiede im intrazellulären pH-Wert können also nicht für die gesteigerte Succinat- und Propionatakkumulation in *A. marina* aus dem Weißen Meer bei gleicher Acetatbildungsrate in Würmern beider Populationen verantwortlich sein. Der Stoffwechselweg, der zur Bildung von Succinat und Propionat führt, beinhaltet Reaktionen des Zitronensäurezyklus (Zebe *et al.* 1980). Acetat entsteht intramitochondrial aus Pyruvat über Acetyl-CoA (Wienhausen 1981), wobei über den genauen Mechanismus der Freisetzung von Acetat aus Acetyl-CoA wenig bekannt ist. Da bei *A. marina* bisher keine Thiokinaseaktivität für die Freisetzung von Acetat nachgewiesen worden ist, postulierten Schöttler und Bennet (1991), daß die Acetyl-CoA-Transferase diese Reaktion katalysiert. Im Gegensatz zur Succinat- und Propionatbildung ist bei der Acetatfreisetzung demnach kein Enzym des Zitronensäurezyklus beteiligt. Die erhöhte Akkumulation von Succinat und Propionat bei gleicher Acetatbildung ließe sich deshalb durch eine Mengen- oder Aktivitätssteigerung derjenigen Enzyme erklären, die am Zitronensäurezyklus beteiligt sind. In den subpolaren Tieren konnte tatsächlich sowohl eine erhöhte Mitochondriendichte (und damit eine Erhöhung der Menge mitochondrialer Enzyme) als auch eine erhöhte aerobe Kapazität individueller Mitochondrien nachgewiesen werden (3.2.).

### 3.1.3. Intrazellulärer pH-Wert in Abhängigkeit von der Temperatur

Änderungen des Stoffwechsels können mit Verschiebungen im Säure-Basen-Gleichgewicht einhergehen, wenn Stoffwechselreaktionen mit der Bindung oder Freisetzung von Protonen gekoppelt sind (Pörtner 1987a, b, Pörtner *et al.* 1984b, 1986a, b, Pörtner

1989). Andererseits hängen Enzymaktivitäten auch vom pH-Wert ab. Daher wurde neben den Analysen des aeroben und anaeroben Stoffwechsels auch die Abhängigkeit des

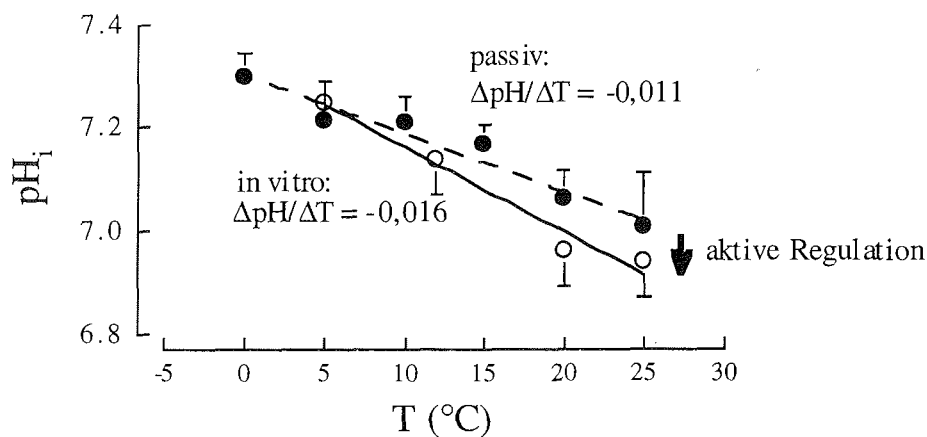


**Abb. 4** Intrazellulärer pH-Wert im Hautmuskelschlauch von Pierwürmern aus der Nordsee und vom Weißen Meer nach 10stündiger (Sommertiere) bzw. 24stündiger (Wintertiere) Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen (Mittelwerte  $\pm$  S.D.; n=5; \* = signifikant verschieden vom Kontrollwert (C); aus Publikation I).

## Diskussion

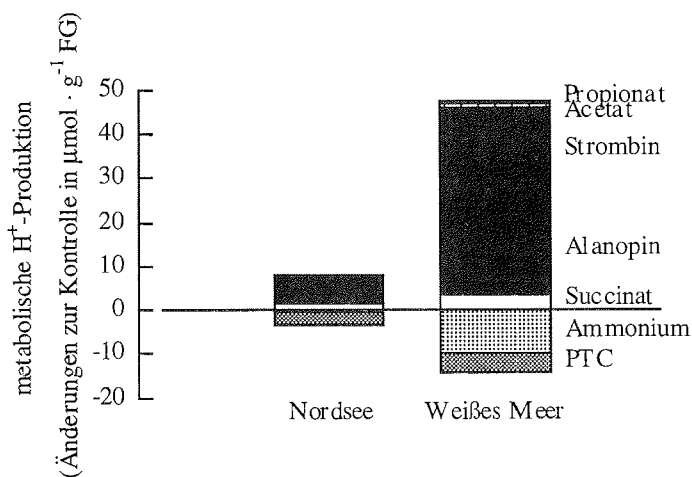
intrazellulären pH-Wertes von der Temperatur untersucht. Mit steigender Temperatur kam es im Pierwurm zu einem Absinken des intrazellulären pH-Wertes im Hautmuskelschlauch (Abb. 4). Diese pH-Änderungen lagen im Bereich von -0,016 bis -0,022 pH-Einheiten/°C. Ähnliche Werte wurden für das Blut von *A. marina* und für einige andere marine, darunter polare Evertibraten genannt (Toulmond 1977, Pörtner *et al.* 1998). Damit verhält sich die pH-Änderung beim Pierwurm entsprechend der alaphastat Hypothese ( $\Delta\text{pH}_i/\Delta T = -0,017$ ). Diese besagt, daß der pH-Wert mit steigender Temperatur sinken muß, wenn eine konstante Dissoziation der Imidazolgruppen des Histidins erhalten werden soll (Reeves 1972, Howell *et al.* 1973, Walsh und Moon 1982), um auf diese Weise Enzymaktivitäten trotz Temperaturänderungen zu stabilisieren (Somero 1981, 1983).

Dennoch kam es außerhalb der kritischen Temperaturen während einer *non-steady state* Situation zur Abweichung von der Linearen. Diese Abweichung ist ein Hinweis, daß auch die pH-Regulation von extremen Temperaturen beeinflusst wird. In eurythermen Tieren erfolgt die Änderung des pH-Wertes mit der Temperatur sowohl durch passive



**Abb. 5** Anteil der passiven physikochemischen Reaktion an der intrazellulären pH-Regulation beim Pierwurm *A. marina* aus der Nordsee. Der Unterschied zwischen dem passiven Verlauf und dem *in vitro* gemessenen pH<sub>i</sub> der Tiere quantifiziert den aktiven Anteil an der pH-Regulation. Für den *in vitro* Wert wurden Würmer bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und der pH-Wert im Hautmuskelschlauch bei den entsprechenden Inkubationstemperaturen bestimmt. Der passive Verlauf ergab sich, indem Tiere nur bei Kontrolltemperatur (10 °C) inkubiert, der pH<sub>i</sub> im Gewebe jedoch bei verschiedenen Temperaturen gemessen wurde (Mittelwerte  $\pm$  S.D.; n = 5; *in vitro*-Werte: modifiziert nach Publikation I; passive Werte: Sartoris und Sommer, unveröffentlichte Daten).

Dissoziationsvorgänge, die auf temperaturbedingten Änderungen der pK-Werte körpereigener Puffersysteme zurückzuführen sind, als auch durch eine aktive Säure-Basen-Regulation (van Dijk *et al.* 1997, Sartoris und Pörtner 1997). Die aktive Regulation erfolgt in wasseratmenden Tieren vor allem über Ionenaustauschprozesse, da einer Regulation über das CO<sub>2</sub>-Bikarbonat-System aufgrund der geringen Unterschiede zwischen dem körpereigenen CO<sub>2</sub>-Partialdruck (Pco<sub>2</sub>) und dem Pco<sub>2</sub> der Umgebung Grenzen gesetzt sind. Zur Abweichung vom linearen pH-Temperatur Verhältnis könnte daher ein Versagen der aktiven pH-Regulation geführt haben. In Hautmuskelschlauchgewebe war die passive pH-Änderung mit der Temperatur mit -0,011 pH-Einheiten/°C wesentlich geringer als die *in vitro* gemessene Änderung im Tier (Abb. 5). Wenn eine durch einen drastischen Temperaturanstieg hervorgerufene Störung den aktiven Anteil an der pH-Regulation vermindert, kann der intrazelluläre pH-Wert nicht so stark abgesenkt werden und ein höherer intrazellulärer pH-Wert stellt sich ein, als aufgrund der alphastat Hypothese zu erwarten wäre. Solch eine Abweichung konnte bei hohen Temperaturen aber nur in den borealen Würmern gefunden werden. Eine Steigerung der Kapazität und der Geschwindigkeit der pH-Regulation, wie sie bei kaltadaptierten Crustaceen gefunden wurde (Sartoris und Pörtner 1997), kann möglicherweise bei den subpolaren



**Abb. 6** Anteile der Konzentrationsänderungen verschiedener Metabolite im Hautmuskelschlauch von Nordsee- und Weißmeer-Tieren an der metabolischen Protonenproduktion innerhalb von 4 Stunden nach einer Temperaturerhöhung um 4 °C über die entsprechende obere kritische Temperatur. Die Protonenbalance wurde aus den gemittelten Konzentrationsänderungen (n = 5; Daten aus Publikation III) nach Pörtner (1987a, b) berechnet. Die Protonenbalance durch die geschätzten Änderungen der Phosphotaurocyaninkonzentrationen (PTC, vergleiche Publikation III) wurden für den pH<sub>i</sub>-Wert nach 4stündiger Inkubation berechnet.

Pierwürmern die Abweichung verhindert haben. Außerdem akkumulierten in den Weißmeer-Tieren signifikant mehr anaerobe Metabolite als bei den Nordsee-Tieren, wodurch eine stärkere Ansäuerung hervorgerufen wurde (Abb. 6). Die metabolische Ansäuerung und die aktive pH-Regulation sind bei Temperaturerhöhung gleichgerichtet, weshalb der anaerobe Stoffwechsel die pH-Regulation bei hohen Temperaturen unterstützen konnte. Der deutliche Abfall des intrazellulären pH-Wertes bei Temperaturen unterhalb der unteren kritischen Temperatur korrelierte ebenfalls mit der Akkumulation anaerober Metabolite im Hautmuskelschlauch sowohl von Nordsee- als auch von Weißmeer-Tieren (Abb. 3). Bei niedrigen Temperaturen ist die metabolische Ansäuerung jedoch der aktiven Regulation entgegen gerichtet und verursachte so die deutliche Abweichung von der alaphastat Steigung (Abb. 4).

#### **3.1.4. Zusammenfassung: Charakterisierung zweier kritischer Temperaturen**

Aus dem oben Beschriebenen ergibt sich, daß kurzfristige, extreme Temperaturänderungen eine Steigerung des Energiebedarfes von *A. marina* hervorrufen, die nicht allein durch aeroben Stoffwechsel gedeckt werden können. Dadurch lassen sich zwei kritische Temperaturen definieren, die durch den Einsatz des anaeroben Stoffwechsels charakterisiert sind. Stoffwechseländerungen außerhalb der kritischen Temperaturen können zusätzlich von einem deutlichen Anstieg des Sauerstoffverbrauches begleitet sein. Änderungen des intrazellulären pH-Wertes, die nicht mit der alaphastat Hypothese korrelieren, können ebenfalls als Indikatoren für Temperaturstreß angesehen werden.

### **3.2. Mechanismen der Kälteakklimatisation**

#### **3.2.1. Unterschiede in der Mitochondriendichte zwischen den Populationen**

Eine Anpassung an niedrigere durchschnittliche Jahrestemperaturen ging in *A. marina* vom Weißen Meer mit einer Erhöhung der Mitochondriendichte in Muskelzellen einher (Publikation II). In den subpolaren Würmern wurden 2,4 mal mehr Mitochondrien pro  $\mu\text{m}^2$  Muskelquerschnitt als in den borealen gefunden. Dies ist das erste Mal, daß solche morphologischen Änderungen bei einem Evertebraten nachgewiesen wurden. Dieser Anpassungsmechanismus ist offensichtlich nicht auf die Tiergruppe der Fische beschränkt (z. B. Campell und Davies 1978, Sisson und Sidell 1987, Guderley und Blier



1988, Archer und Johnston 1991), sondern kann als ein - auf evolutionärer Zeitskala - sehr alter und daher grundsätzlicher Mechanismus der Kälteanpassung angesehen werden.

Ein Grund für die Erhöhung der Mitochondriendichte während der Kälteanpassung liegt in einer Kapazitätssteigerung der aeroben Energiegewinnung. Temperaturerniedrigungen führen zu einer erhöhten Viskosität des Cytoplasmas (Sidell und Hazel 1978). Zusammen mit der Verstärkung von Dipol-Bindungen mit sinkender Temperatur ist dies die Hauptursache für die langsamere Verteilung von kleinen Molekülen wie Laktat,  $\text{Ca}^{2+}$ , Glukose und Sauerstoff bei niedrigen Temperaturen (Sidell und Hazel 1978, Penzlin 1989), die innerhalb der Zelle durch Diffusion erfolgt. Eine verminderte Diffusion von Metaboliten und Substraten führt wiederum zu einer Reduktion enzymatischer Aktivität und der Energieproduktion. Kälteanpassung ist daher auf eine Kompensation dieser Prozesse gerichtet. Sidell und Hazel (1987) zeigten, daß im Gegensatz zu anderen kleinen Molekülen die Diffusion von ATP-Analoga *in vitro* nicht durch die Temperatur beeinflusst wird, was später durch Hubley *et al.* (1997) mittels  $^{31}\text{P}$ -Kernspinresonanzspektroskopie *in vivo* für verschiedene energiereiche Phosphate bestätigt wurde. Sidell und Hazel (1987) postulierten, daß es durch einen temperaturbedingten Anstieg des pH-Wertes im Cytosol zu Ladungsänderungen des Phosphates am ATP (und anderer energiereicher Phosphate) kommt, wodurch die Diffusion des ATP's beeinflusst und der direkte Temperatureinfluß kompensiert wird. Eine andere Kompensationsmöglichkeit für die verminderte Diffusion bei dauerhaft niedrigen Temperaturen liegt in der Verkürzung von Diffusionsstrecken, z. B. durch eine erhöhte Mitochondriendichte. In Goldfischen unterschied sich die Mitochondriendichte um das 3,4fache zwischen Tieren die an 5 bzw. 25 °C angepaßt wurden (Tyler und Sidell 1984). Auf der Grundlage einer eindimensionalen Diffusionsgleichung berechneten Sidell und Hazel (1987), daß diese strukturellen Unterschiede im Goldfisch den  $Q_{10}$ -Effekt der Diffusion, dessen Wert für kleine Moleküle im Zytosol zwischen 1,75 und 2 liegt, ausgleichen konnten. Auf den Pierwurm angewandt bedeutet dies, daß die höhere Mitochondriendichte der Weißmeer-Tiere im Vergleich zu den Nordsee-Würmern eine Temperaturdifferenz von über 10 °C ausgleichen kann. Dies wiederum entspricht in etwa der Differenz der durchschnittlichen Jahrestemperaturen zwischen Nordsee und Weißem Meer. Es gibt allerdings noch keine Untersuchungen die bestätigen oder widerlegen könnten, daß die Stoffwechselrate in nicht akklimierten Organismen bei niedrigen Temperaturen *in vivo* tatsächlich vor allem durch die Diffusion von Sauerstoff limitiert wird. Die Erhöhung der Mitochondriendichte und damit verknüpfte Vermehrung mitochondrialer Enzyme erhöht die aerobe Kapazität aber auch direkt, wenn die gesenkte Umsatzrate jedes einzelnen Enzyms durch eine Konzentrationserhöhung der stoffwechselaktiven Enzyme kompensiert werden kann (s.

3.2.2.). Durch die Erhöhung der Mitochondriendichte wird folglich die aerobe Energieversorgung bei niedrigen Temperaturen verbessert, und eine zusätzliche anaerobe Energiegewinnung ist nicht mehr nötig. Dadurch verschiebt sich die untere kritische Temperatur zu niedrigeren Werten.

Die Frage, ob es sich bei der Erhöhung der Mitochondriendichte um eine populationspezifische oder eine altersbedingte Anpassung handelt, ist noch nicht eindeutig geklärt, da keine vergleichenden Daten über Wachstumsraten der Tiere beider Populationen vorliegen. Feststeht, daß Tiere der Weißmeer-Population im unteren Gezeitenbereich durchschnittlich kleiner waren (1 - 4 g im Vergleich zu 5 - 8 g der Nordsee-Tiere) und eine höhere Mitochondrienanzahl in ihren Muskelzellen besaßen. Laut Brand (1990) sinkt die Mitochondriendichte mit der Größe von Organen und Organismen, wobei die Größe wiederum vom Alter abhängt. Daraus lassen sich 2 Möglichkeiten herleiten, wie diese Unterschiede im Zusammenhang mit der Kälteanpassung hervorgerufen werden konnten. Die erste ist, daß eine relativ festgelegte Mitochondriendichte die limitierende Größe für das Vorkommen im Gezeitenbereich darstellt. Mit zunehmendem Alter und damit sinkender Mitochondriendichte wären die Tiere am Weißen Meer verglichen mit den Nordsee-Würmern früher, d. h. jünger und kleiner, dazu gezwungen, ins Sublitoral abzuwandern (Vergleiche 3.5.). Dagegen spricht allerdings, daß auch am Weißen Meer mehrere Jahre alte Adulte im Litoral vorkommen und dort überwintern (Kolyakina 1980). Wahrscheinlicher ist, daß Tiere beider Populationen im gleichen Litoralbereich vergleichbaren Altersgruppen angehören, die Weißmeer-Tiere aber populationsbedingt eine geringe Wachstumsrate aufweisen und daher kleiner sind. Denn genetische Unterschiede können das Wachstum entscheidend beeinflussen. So beschrieb Duncan (1959) deutliche Unterschiede in Pigmentierungsgrad und Größe adulter Tiere (zwischen durchschnittlich 1 bis 8 g) selbst in benachbarten Populationen entlang der englischen Küste. Auch zeigen die Tiere vom Weißen Meer verglichen mit Nordsee-Würmern einen geringeren Grad an Heterozygotie (Publikation IV), die in vielen Organismen mit einer geringeren Wachstumsrate korreliert (Koehn und Gaffney 1984, Zouros 1987, Koehn *et al.* 1988).

Eine größere Mitochondriendichte erhöht neben der aeroben Kapazität auch den Energiebedarf des ganzen Tieres, da die Kosten für den Erhalt von Ionen- und Protonengradienten über die innere Membran jedes einzelnen Mitochondriums gedeckt werden müssen (Brand und Murphy 1987, Brand 1990, Pörtner *et al.* 1998). Dies spiegelt sich in einem erhöhten Sauerstoffverbrauch der Weißmeer- gegenüber den Nordsee-Tieren über den gesamten gemessenen Temperaturbereich wider (Abb. 2). Selbst wenn die Größenunterschiede der Tiere nach der von Krüger (1964) angegebenen allometrischen Formel für *A. marina* mit eingerechnet werden, besitzen die Weißmeer-Tiere über den gesamten

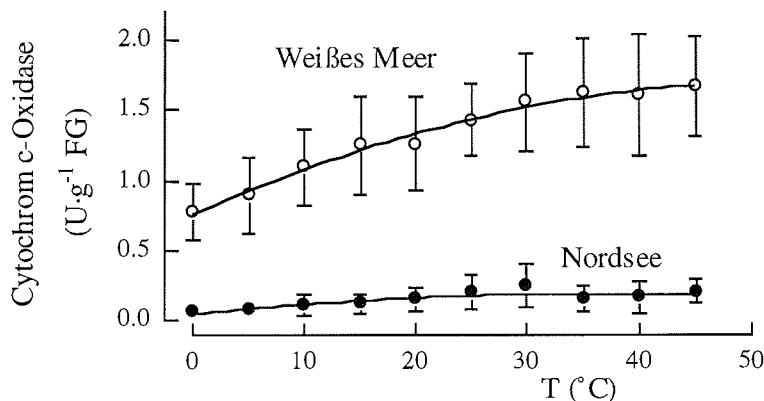
gemessenen Temperaturbereich eine 2,1mal so hohe Stoffwechselrate wie Pierwürmer aus der Nordsee. Aufgrund der höheren Mitochondrienzahl und dem damit gekoppelten höheren Sauerstoffverbrauch kommt es bei begrenzter Sauerstoffzufuhr in den subpolaren Würmern schneller zu einem Absinken des intrazellulären Sauerstoffpartialdruckes als in den borealen Tieren. Obwohl ein steilerer Gradient der Sauerstoffpartialdrücke zwischen Seewasser, extrazellulären Kompartimenten und Zelle die Sauerstoffaufnahme aus dem Seewasser verbessert, wird der Stoffwechsel sensitiver gegenüber hypoxen Bedingungen in der Zelle. Wird bei steigenden Temperaturen nicht genügend Sauerstoff angeliefert, sinkt bei einer höheren Mitochondriendichte der Sauerstoffpartialdruck in den Zellen früher ab, und anaerober Stoffwechsel muß schon bei niedrigeren Temperaturen zusätzlich zur Energiegewinnung beitragen. Da die kritischen Temperaturen über das Einsetzen von anaeroben Stoffwechsel charakterisiert wurden, verschiebt sich die obere kritische Temperatur mit steigender Mitochondriendichte zu niedrigeren Werten. Eine Reduzierung der unteren kritischen Temperatur aufgrund einer Erhöhung der Mitochondriendichte führt daher auch zu einer Verschiebung der oberen kritischen Temperatur.

Die Kosten der Erhöhung der Mitochondriendichte können nur dann teilweise oder ganz kompensiert werden, wenn gleichzeitig der Energieverbrauch andere Mechanismen abgesenkt wird. Dies kann z. B. durch Modifikationen oder eine Verkürzung der inneren Mitochondrienmembran erreicht werden (Pörtner *et al.* 1998) oder durch das Umschalten auf effizientere Ionenpumpen (Reipschläger und Pörtner 1996). Die Kompensation mitochondrialer Kosten besitzt allerdings einen Einfluß auf andere Prozesse, wie die aerobe Kapazität, das Aktivitätsniveau oder die Fähigkeit zur Ionenregulation (Pörtner *et al.* 1998, Reipschläger und Pörtner 1996) und ist folglich mit einer gesteigerten Sensitivität gegenüber Hitze gekoppelt. Eine Verkürzung der inneren Mitochondrienmembran konnte daher bisher auch nur bei antarktischen, stenothermen Fischen (Archer und Johnston 1991), nicht jedoch bei kaltakklimierten, eurythermen Tieren nachgewiesen werden (Campbell und Davies 1978, Egginton und Sidell 1989, Gaebel und Roots 1989).

### 3.2.2. Die Rolle einzelner Enzyme bei der Kälteanpassung

Eine größere Mitochondriendichte impliziert auch eine Erhöhung der Konzentration an mitochondrialen Enzymen, wie der Cytochrom c-Oxidase, welches als letztes Glied der klassischen Elektronentransportkette eine wichtige Rolle bei der Energieproduktion spielt. Unter optimalen *in vitro* Bedingungen führt dies zu einer gesteigerten Enzymaktivität gemessen pro Gramm Frischgewicht (Abb. 7). Im Vergleich zu Nordsee-Tieren besaßen

die Würmer vom Weißen Meer im Mittel eine 10fach erhöhte Aktivität der Cytochrom c-Oxidase über den gesamten untersuchten Temperaturbereich (0 - 45 °C), wobei der Mitochondriengehalt nur um den Faktor 2,4 vermehrt wurde. Es ist daher auszuschließen, daß eine Erhöhung des Mitochondriengehaltes und der damit verbundene Anstieg der Menge mitochondrialer Enzyme der einzige Grund für die Aktivitätssteigerung war. Es ist jedoch möglich, daß sich die Enzymmenge in jedem einzelnen Mitochondrium erhöht hat. Dabei ist zu beachten, daß das Lösungsvermögen der Zelle begrenzt ist und die Anzahl membrangebundener Enzyme in der Membran eingeschränkt werden muß, um die Fluidität der Membran nicht zu verändern (Hochachka und Somero 1984). Außerdem ist die Modulation der Enzymkonzentration im Zuge von Temperaturanpassung sehr energieaufwendig (Atkinson 1977, Hawkins 1991) und sollte daher für Organismen, die häufig Temperaturschwankungen ausgesetzt sind, recht uneffektiv sein (Somero 1978). Unter der Voraussetzung, daß die entsprechenden Enzyme bei niedrigen Temperaturen überhaupt funktionsfähig sind, kann diese quantitative Strategie bei saisonaler oder latitudinaler Kälteanpassung aber sinnvoll sein, wenn sich die Gefrierresistenz von Enzymen durch Selbststabilisierung mit der Enzymmenge erhöht (Kück 1997). Eine eventuelle quantitative Strategie der Kälteanpassung der Cytochrom c-Oxidase wurde im Pierwurm auf jeden Fall durch eine qualitative ergänzt. Dies zeigt sich in der Absenkung der Aktivierungsenergie für die Entstehung des Enzym-Substrat-

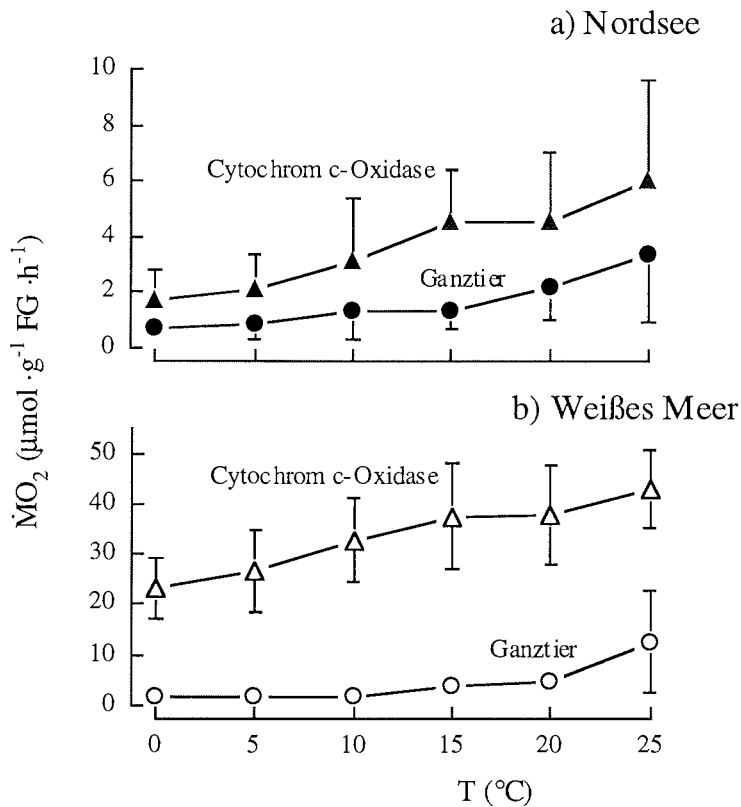


**Abb. 7** Aktivität ( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$  Frischgewicht) der Cytochrom c-Oxidase im Hautmuskelschlauchgewebe von *A. marina* aus der Nordsee ( $\bullet$ ;  $n = 5$ ) und vom Weißen Meer ( $\circ$ ;  $n = 7$ ) bei verschiedenen Temperaturen zwischen 0 und 45 °C. Die Aktivität unterscheidet sich signifikant zwischen beiden Populationen (Mittelwerte  $\pm$  S.D.; aus Publikation II).

Komplexes von  $31,01 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  in den Nordsee-Würmern auf  $14,85 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  in *A. marina* vom Weißen Meer bei Temperaturen zwischen 0 und  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (Publikation II). Auch für den Goldfisch und den Taschenkrebs konnte nachgewiesen werden, daß die Cytochrom c-Oxidase bei Kälteanpassung nicht über die Enzymmenge, sondern über eine Modulation der Aktivität reguliert wird (Hazel und Prosser 1970, 1974). Pogson (1988) stellte die These auf, daß biochemische Anpassung generell in zwei Schritten abläuft: 1. durch Änderung der Enzymmenge und 2. durch Modulationen der katalytischen Eigenschaften von Enzymen. Letzteres kann durch Änderungen der näheren Umgebung des Enzyms hervorgerufen werden, z. B. durch Modulation von Membraneigenschaften (Prosser 1991, Miranda und Hazel 1996), durch temperaturbedingte Unterschiede in der Enzymfaltung (Hochachka und Somero 1984) oder durch die Expression verschiedener Isoenzyme (Hochachka und Somero 1984, Prosser 1991). Welcher Mechanismus beim Pierwurm die Aktivitätsänderung der Cytochrom c-Oxidase verursachte, muß jedoch noch geklärt werden.

Interessanterweise übersteigt bei Substratsättigung die Energieproduktionskapazität der Cytochrom c-Oxidase bei weitem den Energieverbrauch der Tieren beider Populationen (Abb. 8). Die Kapazität zur aeroben Energiegewinnung kann daher auch bei niedrigen Temperaturen nicht limitierend auf den Stoffwechsel wirken. Daten zur Temperaturabhängigkeit der Cytochrom c-Oxidase bei physiologischen Substrat- und Inhibitorkonzentrationen liegen allerdings noch nicht vor. Aus diesem Grund kann über die Bedeutung der Aktivitätssteigerung der Cytochrom c-Oxidase *in vivo* für die Kälteanpassung von Pierwürmern aus dem Weißen Meer nur spekuliert werden.

Für die mitochondriale NADP-abhängige Isocitratdehydrogenase (IDH) konnte eine Korrelation zwischen dem Vorkommen bestimmter Isoformen und der durchschnittlichen Jahrestemperatur im Lebensraum gezeigt werden (Publikation IV). In verschiedenen Geweben von Vertebraten, Mollusken und Insekten kommen zwei Isocitratdehydrogenasen vor. Die NAD-spezifische IDH aus Mitochondrien ist Bestandteil des Zitronensäurezyklus und katalysiert dort die oxidative Decarboxylierung des Isocitrats zu 2-Oxoglutarat. Die NADP-abhängige IDH kommt sowohl in Mitochondrien als auch im Cytosol vor und soll vor allem der Bereitstellung von NADPH für biosynthetische Zwecke dienen (Urich 1990). Die NAD-spezifische IDH in Anneliden und Crustaceen besitzt jedoch nur sehr geringe Aktivität (Sugden und Newsholme 1975, Alp *et al.* 1976, Urich 1990). Hier muß die NADP-abhängige IDH nicht nur NADPH bereitstellen, sondern auch die Decarboxylierung von Isocitrat im Zitronensäurezyklus katalysieren. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß die NADP-abhängige IDH das ursprünglichere Enzym ist, aus



**Abb. 8** Kapazität der aeroben Energiegewinnung der Cytochrom c-Oxidase (berechnet als Sauerstoffverbrauch in  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Frischgewicht} \cdot \text{h}^{-1}$ ) von *Arenicola marina* (a) aus der Nordsee und (b) vom Weißen Meer verglichen mit der Sauerstoffverbrauchsrate der Ganztiere in Abhängigkeit von der Temperatur (Mittelwerte  $\pm$  S.D.; n = 5-7 (Cytochrom c) bzw. 5-15 (Ganztier); modifiziert nach Publikation II).

dem später die NAD-spezifische IDH hervorgegangen ist (Dean und Golding 1997). Wie oben erwähnt, korreliert in *A. marina* die Expression zweier Isoformen der NADP-abhängigen IDH mit der durchschnittlichen Jahrestemperatur im Seewasser (siehe auch 3.6.2.). Änderungen in der Aminosäuresequenz von Enzymen, die zur Trennung in verschiedene Isoformen führen kann, müssen aber nicht immer Änderungen der katalytischen Eigenschaften der betreffenden Enzyme nachsichziehen (Dean und Golding 1997, Fields und Somero 1997). Eine photometrische Aktivitätsanalyse zeigt jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Enzymen von Nordsee- und Weißmeer-Tieren (Tab. 2). Das Enzym der subpolaren Tiere ist verglichen mit dem Enzym der borealen Pierwürmer in einem Temperaturbereich zwischen 3 und 20 °C deutlich temperatur-

Tab. 2 Verschiedene Parameter, mit denen die katalytischen Eigenschaften der NADP-abhängigen Isocitratdehydrogenase von *Arenicola marina* aus der Nordsee und vom Weißen Meer charakterisiert werden (Mittelwerte; n = 6; in Klammern ist der jeweilige Temperaturbereich (°C) genannt, für den die Angaben gelten).

Herkunft der Population	Q <sub>10</sub>	K <sub>m</sub> (NADP) (μmol · l <sup>-1</sup> )	Aktivierungsenergie (kJ · mol <sup>-1</sup> )
Nordsee	1,27 (1 - 5)	33,3	10,55 (1 - 5)
	2,53 (5 - 31)	(1)	55,05 (5 - 31)
Weißes Meer	1,09 (1 - 3)	16,8	3,07 (1 - 3)
	3,79 (3 - 20)	(1)	82,03 (3 - 20)
	2,29 (20 - 30)		21,93 (20 - 30)

sensitiver, d. h. daß die Aktivität mit steigender Temperatur stärker ansteigt und die Decarboxylierung des Isocitrats bei hohen Temperaturen signifikant schneller erfolgen kann. Möglicherweise kann dadurch eine höhere Fluxrate durch den Zitronensäurezyklus gewährleistet werden, die wegen der höheren Stoffwechselrate dieser Tiere benötigt wird. Die maximale Aktivität der IDH bei niedrigen Temperaturen unterscheidet sich dagegen nicht zwischen den Populationen. Jedoch ist die Affinität des Enzyms für das Co-Substrat NADP in den Würmern vom Weißen Meer höher als in denen aus der Nordsee. Zusammen mit einer geringeren Aktivierungsenergie bei Temperaturen unter 5 °C scheinen so Mechanismen entwickelt worden zu sein, um die (geographisch bedingt) durchschnittlich geringere thermische Energie in Weißmeer-Tieren zu kompensieren.

Im Arrheniusplot sind ein bzw. zwei Brüche zu erkennen (Tab. 2, Publikation II). Die Ursache für Diskontinuitäten im Arrheniusplot sind bisher nicht bekannt. Sie können aber bei hohen Temperaturen Schädigungen in der Enzymfunktion anzeigen, oder aber die betroffenen Enzyme besitzen verschiedene, ineinander umformbare Zustände, die durch unterschiedliche katalytische Eigenschaften ausgezeichnet sind (Silvius *et al.* 1978, Kaletha und Skladanowski 1981). Der Bruch bei 3 bzw. 5 °C, der in Enzymen beider Populationen zu finden ist, führt dazu, daß die geringste Aktivierungsenergie bei niedrigen Temperaturen benötigt wird, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit stabilisiert werden kann. Die Temperaturinsensitivität zeigt sich auch in den niedrigen Q<sub>10</sub>-Werten von 1,09 (Weißmeer-Würmer) oder 1,27 (Nordsee-Tiere) im Temperaturbereich zwischen 1 und 3 bzw. 5 °C. In der Weißmeer-Population ist im Arrheniusplot zusätzlich ein Bruch bei 20 °C zu erkennen. Dadurch wird die Aktivierungsenergie bei extrem hohen Temperaturen wieder gesenkt und die Reaktionsgeschwindigkeit nicht weiter erhöht. Dies

ist möglicherweise eine Anpassung an die drastischen Temperaturschwankungen im Lebensraum, die zeitweise die kritische Temperatur von 17 °C überschreiten können. Bei der Interpretation von Arrheniusplots, vor allem in bezug auf Diskontinuitäten und deren Lage, ist jedoch zu bedenken, daß Fehler auftreten können, wenn sich mit der Temperatur die Substrataffinität des Enzyms ändert, da eine Substratsättigung *in vivo* nicht gesichert ist (Silvius *et al.* 1978). Auch zeigte sich, daß der entscheidende Parameter der thermodynamischen Aktivierung nicht die Aktivierungsenergie ( $E_a$ ), sondern das Verhältnis aus Reaktionsentropie ( $\Delta S^\ddagger$ ) und -enthalpie ( $\Delta H^\ddagger$ ) ist (Johnston und Goldspink 1975, Clarke 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte weder  $\Delta S^\ddagger$  berechnet werden, noch fand eine Untersuchung über die Temperaturabhängigkeit der Substrataffinität der IDH statt. Daher dürfen die Unterschiede in den untersuchten kinetischen Parametern, vor allem mit Bezug auf Diskontinuitäten im Arrheniusplot und deren Lage, im Vergleich von der IDH aus Nordsee- und Weißmeer-Tieren nicht zu stark gewichtet werden.

Bei den Aktivitätsuntersuchungen der NADP-abhängigen Isocitratdehydrogenase konnte nicht ausgeschlossen werden, daß auch cytosolisches Enzym an der gemessenen Reaktion beteiligt war, da elektrophoretische Untersuchungen zeigten, daß sowohl im Cytosol als auch im Mitochondrium IDH vorliegt (Publikation IV). Allerdings konnten nur in den mitochondrialen Fraktionen von Nordsee- und Weißmeer-Tieren Unterschiede im Isoenzymmuster gefunden werden. Gonzalez-Villaseñor und Powers (1986) zeigten, daß die mitochondriale IDH in *Fundulus heteroclitus* einen höheren  $Q_{10}$ -Wert besitzt als die cytosolische. Unter der Annahme, daß dies auch für die IDH vom Pierwurm gilt und in der Muskelpräparation sowohl cytosolische wie mitochondriale Enzyme vorlagen, würde die höhere Mitochondriendichte in den Weißmeer-Tieren zu einem höheren Anteil an mitochondrialem Enzym und damit zu einem höheren  $Q_{10}$ -Wert der Enzymmischung führen. Dies stände in Einklang mit den hier dargestellten Ergebnissen. Auf der anderen Seite wurden für die cytosolische IDH im Verlauf von Kälteanpassung bisher weder Änderungen der katalytischen Eigenschaften (Sautin und Malinovskaya 1988) noch des Isoenzymmusters (Publikation IV) beschrieben. In den oben beschriebenen Untersuchungen zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede in den kinetischen Eigenschaften der Enzyme beider Populationen (Tab. 2). Ein Einfluß der cytosolischen Isocitratdehydrogenase auf die Untersuchung scheint daher, wie im Muskelgewebe verschiedenen Säuger (Plaut *et al.* 1983), minimal.

Offensichtlich fand im Zuge der Kälteanpassung in *Arenicola marina* vom Weißen Meer neben einer Erhöhung der Mitochondriendichte auch eine qualitative Anpassung mitochondrialer Enzyme, wie der Cytochrom c-Oxidase und der NADP-abhängigen Isocitratdehydrogenase statt. Damit konnte die aerobe Kapazität gesteigert werden, ohne



---

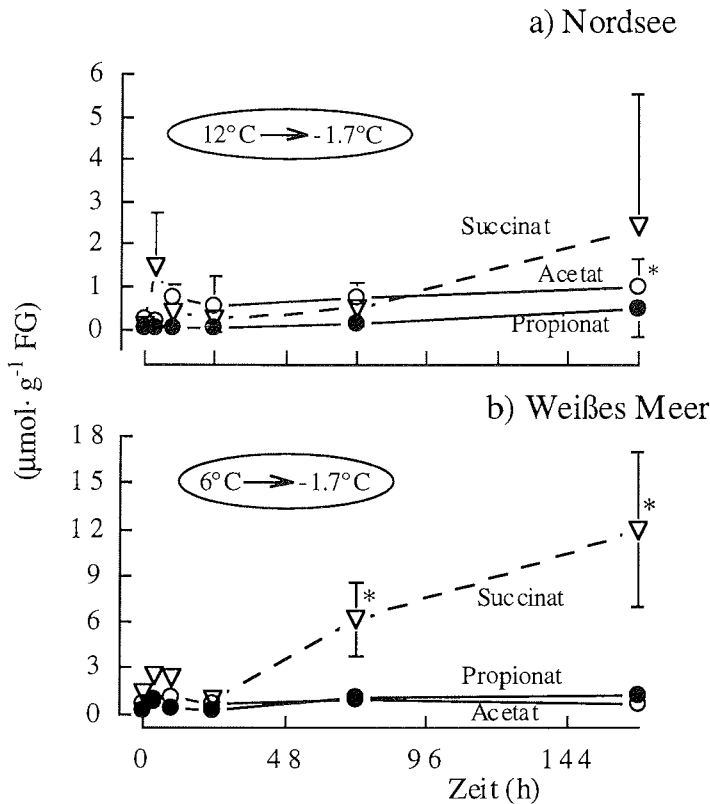
gleichzeitig den Energiebedarf der Tiere noch weiter zu erhöhen. Folglich schien zur Optimierung der Kälteanpassung beim Pierwurm neben der Erhöhung der Mitochondriendichte auch eine qualitative Änderung der aeroben Kapazität individueller Mitochondrien und mitochondrialer Enzyme notwendig.

### 3.3. Mechanismen und Grenzen der Akklimationsfähigkeit

#### 3.3.1. Kälteakklimation

In seinem Lebensraum ist der Pierwurm *A. marina* nicht nur klimatischen und jahreszeitlichen, sondern auch tagesperiodischen Temperaturschwankungen unterworfen. Um das Ausmaß der Anpassungsfähigkeit an akute Temperaturschwankungen zu untersuchen, wurden Tiere beider Populationen extremen Temperaturen ausgesetzt und Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels nach unterschiedlicher Inkubationszeit als Indikatoren für etwaigen Temperaturstreß gemessen. Inkubationen bei niedrigen Temperaturen zeigten, daß weder Tiere aus der Nordsee noch vom Weißen Meer in der Lage waren, Kältestreß unterhalb der niedrigen kritischen Temperatur zu tolerieren, wobei die Überlebensfähigkeit der subpolaren Tiere die der borealen überstieg (Publikation II). Das Ausmaß der Anpassungsfähigkeit zeigte sich in den Konzentrationsänderungen von Succinat, Acetat und Propionat im Hautmuskelschlauch in Abhängigkeit von der Dauer der Exposition bei  $-1,7\text{ °C}$  (Abb. 9). Nach einem anfänglichen, geringen Anstieg fielen die Werte nach 24 Stunden auf ihr Kontrollniveau zurück. Bei längerer Inkubation kam es allerdings zu einem kontinuierlichen Konzentrationsanstieg dieser anaeroben Metabolite. In den Nordsee-Tieren erreichte Acetat nach sieben Tagen signifikant erhöhte Werte, während in den subpolaren Würmern Succinat signifikant angestiegen war. Daß bei den subpolaren Tieren im Vergleich zu den Nordsee-Würmern die Fluxrate durch den Succinat-Propionat-Weg auch bei niedrigen Temperaturen erhöht war, paßt mit der Vermutung zusammen, daß die gesteigerte Succinatakkumulation die Folge einer Erhöhung der Mitochondriendichte im Muskelgewebe sowie der Steigerung der aeroben und anaeroben Stoffwechsellkapazität individueller Mitochondrien ist.

Es stellt sich allerdings die Frage, warum beide Populationen unter den Laborbedingungen nicht in der Lage waren sich an Temperaturen nahe am Gefrierpunkt für Seewasser zu akklimieren, zumal latitudinale und saisonale Kälteanpassung in Pierwürmern mittels einer Steigerung der aeroben Energiegewinnung möglich ist. Außerdem können Pierwürmer vom Weißen Meer sehr wohl Temperaturen von  $-1,7\text{ °C}$  überleben



**Abb. 9** Konzentrationen ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  Frischgewicht) der organischen Säuren Succinat, Acetat und Propionat im Hautmuskelschlauch von *Arenicola marina* nach einem Temperaturabfall im Sediment auf  $-1,7^\circ\text{C}$  (Mittelwerte  $\pm$  S.D.;  $n = 5$ ; ● Propionat; ○ Acetat; ▽ Succinat; \* = signifikant verschieden vom Kontrollwert bei 0h; aus Publikation III).

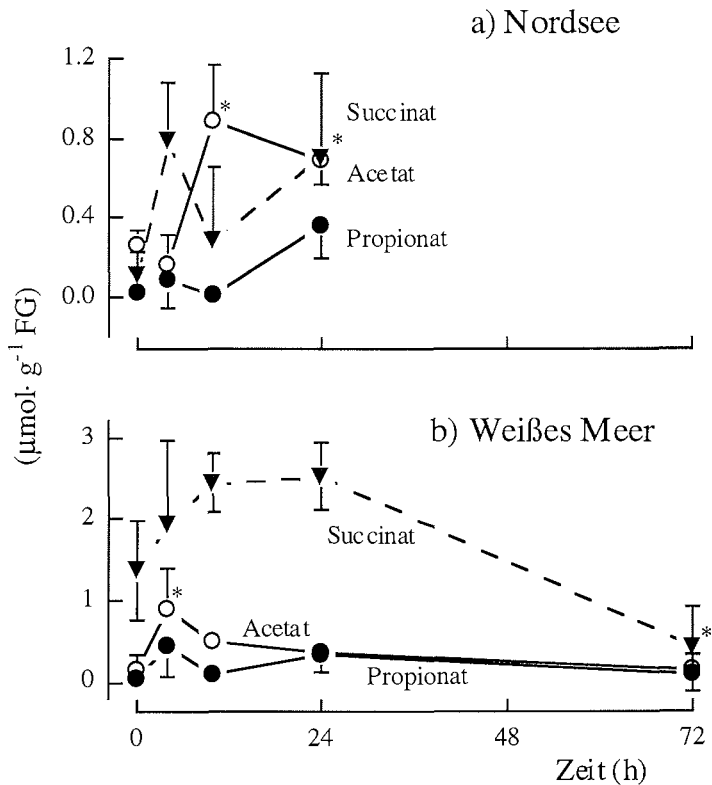
(Kolyakina 1980). In der Kislaja Bucht wurden im Winter Temperaturen im Sediment von unter  $-3^\circ\text{C}$  gemessen. Unter solchen Bedingungen hörten die Tiere für maximal 1,5 Tage mit Fressen und Koten auf. Anschließend wurde die normale Aktivität wieder aufgenommen. Wahrscheinlich ist ein längerer Zeitraum mit langsam sinkenden Temperaturen nötig, damit *A. marina* sich an so niedrige Temperaturen anpassen kann. Denn generell gilt, daß eine Anpassung um so tiefgreifender und erfolgreicher sein kann, um so mehr Zeit einem Organismus zur Verfügung steht (Hochachka und Somero 1984). Auch weiß man, daß Kälteanpassung langsamer erfolgt als z. B. Wärmeakklimation (Hochachka und Somero 1984). Bei dem hier vorgestellten Versuch wurden die Tiere sehr plötzlichen Temperaturänderungen ausgesetzt und damit offensichtlich an die

---

Grenzen ihrer Anpassungsfähigkeit gebracht. Dies kann mit einer begrenzten Fähigkeit verbunden sein, die Mitochondriendichte innerhalb einer kurzen Zeitspanne anzupassen oder die aerobe Kapazität noch weiter zu steigern. Die Kosten der Mitochondrien- oder Enzymsynthese und der Erhaltung von Ionen- und Protonengradienten könnten der Anpassungsfähigkeit genauso Grenzen setzen wie das eingeschränkte Platzangebot in der Zelle für mehr Enzyme oder Mitochondrien (Suarez *et al.* 1997). Durch eine langsame Anpassung können Synthesekosten über einen längeren Zeitraum verteilt werden, vor allem wird aber die Möglichkeit zur qualitativen Anpassung gegeben. Diese Möglichkeit ist im Lebensraum bei saisonaler Temperaturänderung gewährleistet.

### 3.3.2. Energiestoffwechsel während der Akklimation an hohe Temperaturen

Die Fähigkeit zur Akklimation an Hitzestress wurde bei Temperaturen untersucht, die 4 °C oberhalb der entsprechenden kritischen Temperatur lagen. Nordsee-Tiere mit einer oberen kritischen Temperatur von ca. 21 °C wurden einer Temperatur von 25 °C ausgesetzt, während Weißmeer-Tiere mit einer oberen kritischen Temperatur von 17 °C bei 21 °C inkubiert wurden. Es zeigte sich, daß Tiere aus der Nordsee nicht in der Lage waren, sich akut an Temperaturen oberhalb der kritischen Temperatur anzupassen. Im Gegenteil, sie überlebten nur knapp einen Tag, nachdem die Konzentrationen der organischen Säuren Acetat, Propionat und Succinat sowie der Opine Alanopin und Strombin im Hautmuskelschlauch signifikant angestiegen waren (Abb. 10, Publikation III). Im Gegensatz dazu überlebten die Weißmeer-Würmer die Hitzeinkubation nicht nur für mindestens eine Woche, sondern sie waren auch in der Lage, trotz andauernder Hitze die anfängliche Akkumulation der anaeroben Endprodukte (Abb. 10) sowie Störungen des Säure-Basen-Gleichgewichtes (Abb. 12) rückgängig zu machen. Der Mechanismus, der der Erholung zugrunde liegt, ist nicht bekannt. Es ist aber möglich, daß die Mitochondriendichte, die aufgrund der Kälteanpassung erhöht war, im Laufe der Inkubation bei hohen Temperaturen wieder reduziert wurde. Dies steht in Einklang mit der begrenzten Lebenserwartung der Mitochondrien von 5 Tagen (Alberts *et al.* 1986). Da die Mitochondrien bei eingeschränkter Sauerstoffzufuhr (s. 3.1.1.) weniger Energie produzieren können und die Diffusion von Metaboliten bei hohen Temperaturen nicht mehr limitierend ist, würden durch eine Senkung der Mitochondriendichte die Kosten für den Erhalt von Ionen- und Protonengradienten gesenkt und der  $Q_{10}$ -Effekt auf die Stoffwechselrate teilweise kompensiert. Folglich würde die obere kritische Temperatur, welche durch das Ungleichgewicht von sauerstoffliefernden und -verbrauchenden Prozessen charakterisiert ist, zu



**Abb. 10** Konzentrationen ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  Frischgewicht) der organischen Säuren Succinat, Acetat und Propionat im Hautmuskelschlauch von *Arenicola marina* (a) aus der Nordsee oder (b) vom Weißen Meer vor und nach einem Temperaturanstieg im Sediment auf  $4^\circ\text{C}$  über die entsprechende obere kritische Temperatur. Nordsee-Tiere waren einer Temperaturänderung von  $12$  auf  $25^\circ\text{C}$  und Weißmeer-Würmer von  $6$  auf  $21^\circ\text{C}$  ausgesetzt. Alle Tiere aus der Nordsee starben zwischen  $24$  und  $72$  Stunden nach der Temperaturänderung. Die Succinatkonzentrationen unterschieden sich signifikant zwischen den Populationen ( $p = 0,0001$ ; Mittelwerte  $\pm$  S.D.;  $n = 4 - 5$ ; \* = signifikant verschieden vom Kontrollwert bei  $0\text{h}$ ; aus Publikation III).

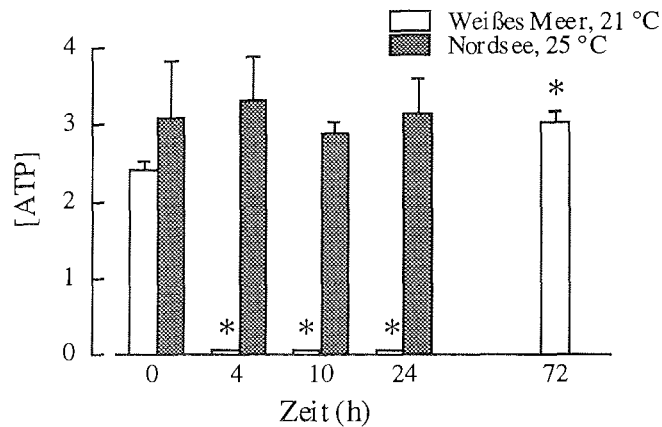
höheren Temperaturen verschoben. Das Unvermögen der Nordsee-Tiere, sich an hohe Temperaturen anzupassen, mag daher auf eine begrenzte Fähigkeit zur Anpassung der Mitochondriendichte zurückzuführen sein. Ob diese Reduktion der Mitochondriendichte in den subpolaren Pierwürmern aber tatsächlich stattfindet und wie sie induziert wird, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Die Regulation der Mitochondriendichte erfolgt über die Biogenese der Mitochondrien, die größtenteils durch das Genom des Zellkerns kontrolliert wird, vor allem über die

---

Syntheseregulation mitochondrialer Proteine (Darnell *et al.* 1986). Hefen, die unter anaeroben Bedingungen wachsen, besitzen keine vollständige Elektronentransportkette, und Enzyme des Zitronensäurezyklus fehlen. Dennoch repliziert sich mitochondriale DNA normal und sogenannte Promitochondrien entstehen. Durch die Zufuhr von Sauerstoff wird die Verlängerung der Membranen der Promitochondrien sowie die Synthese mitochondrialer Proteine induziert, die durch das Kern- oder Mitochondriengenom kodiert sind, so daß sich ausgereifte Mitochondrien entwickeln (Darnell *et al.* 1986). Die Autoren vermuten, daß Sauerstoff die Hämsynthese anregt, die in anaeroben Hefen mit sehr geringer Rate erfolgt. Häm seinerseits ist für die Transkription einiger im Kern kodierter mitochondrialer Proteine notwendig. Häm scheint, zumindest in Hefen, an der Regulation der Transkription und der Koordination zwischen Kern und mitochondrialem Genom unter Hypoxie beteiligt zu sein. Die Frage bleibt allerdings, ob ähnliche Regulationsmechanismen auch unter Temperaturstreß bei Evertrebraten wirksam sind.

In durch Kälte gestreßten *Sipunculus nudus* schien ein Abfall der freien Energie unter den kritischen Wert von  $-52 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  mit schweren Störungen zellulärer Funktionen einherzugehen, die wahrscheinlich den Tod der Tiere nach 4 Tagen hervorriefen (Zielinski und Pörtner 1996). Auch in dem Kalmar *Lolliguncula brevis* ließen sich akute Erschöpfungszustände mit einem Abfall der freien Energie auf Werte unter  $44 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  korrelieren (Pörtner *et al.* 1996, Zielinski *et al.* 1998a, b). In Nordsee-Tieren änderten sich die ATP-Konzentrationen im Hautmuskelschlauch dagegen trotz der letalen Temperaturen nicht (Abb. 11). Ein Energiemangel und evtl. damit verknüpfter Zusammenbruch von Membranpotentialen, wie er z. B. bei anoxiesensitiven Säugern diskutiert wurde (Hochachka 1986, Storey und Storey 1990), scheidet daher als Todesursache aus, die so weiterhin unklar bleibt. In Tieren des Weißen Meeres kam es dagegen schon innerhalb der ersten vier Stunden bei  $21 \text{ }^\circ\text{C}$  zu einem nominellen Abbau der ATP-Vorräte (Abb. 11). Normalerweise wird unter anaeroben Bedingungen der Energieverbrauch gedrosselt, um ATP-Vorräte zu schonen (Zebe *et al.* 1980, Hand und Gnaiger 1988, Storey 1996). Im Gegensatz dazu finden wir bei Pierwürmern vom Weißen Meer einen drastischen Anstieg des Energieverbrauches bei Temperaturen oberhalb der oberen kritischen Temperatur, der nicht ausreichend durch anaeroben Stoffwechsel oder durch die Phosphatvorräte gepuffert werden konnte. In diesem Zusammenhang muß wiederholt werden, daß sich auch nur in Weißmeer-Tieren die aerobe Stoffwechselrate erhöhte, wenn die Tiere Temperaturen unterhalb der unteren kritischen Temperatur ausgesetzt wurden. Im Vergleich zu den Nordsee-Würmern, bei denen kein signifikanter Anstieg der aeroben Stoffwechselrate zu sehen war, überlebten die subpolaren Tiere sowohl extrem hohe als auch niedrige Temperaturen deutlich besser



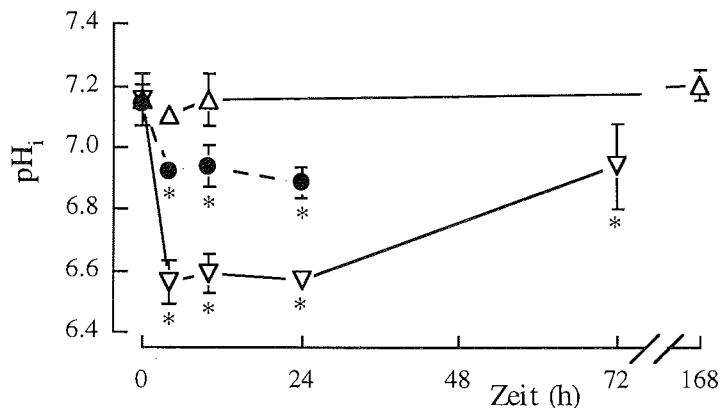
**Abb. 11** ATP-Konzentrationen ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  Frischgewicht) im Hautmuskelschlauch von *Arenicola marina* aus der Nordsee oder vom Weißen Meer vor und nach einem Temperaturanstieg im Sediment auf  $4\text{ }^\circ\text{C}$  über die entsprechende obere kritische Temperatur (Mittelwerte  $\pm$  S.D.;  $n = 5$ ; \* = signifikant verschieden vom Kontrollwert bei 0h; modifiziert nach Publikation III).

(Publikation II). Die Würmer vom Weißen Meer scheinen demnach energieverbrauchende Mechanismen zu besitzen, die die Toleranz gegenüber extremen Temperaturen erhöhen. Möglich erscheint die Synthese von Hitze-Schock-Proteinen, die andere Proteine stabilisieren, die Aggregation von denaturierten Proteinen verhindern und bei der Wiederherstellung der Tertiärstruktur geschädigter Proteine helfen (Hoffmann und Parson 1994). Hinzu könnte die Synthese von sogenannten *ice-nucleatures* kommen, die in einigen Muscheln die Gefriertoleranz erhöhen (Loomis und Hazel 1987), ein Anstieg des Gehaltes an Ubiquitinkonjugaten, die beschädigte Proteine abbauen (Hofmann und Somero 1995, 1996) oder die Erhöhung der Konzentration an *thermal-hysteresis* Faktoren, welche die Eiskristallisation im Plasma verhindern (Aarset 1982). Da die Synthese dieser Faktoren und Proteine energieaufwendig ist (Atkinson 1977, Hawkins 1991), könnten diese Mechanismen sowohl den Anstieg des aeroben und anaeroben Stoffwechsels erklären als auch die erhöhte Toleranz der Weißmeer-Tiere gegenüber extremen Temperaturen. Bei dieser Betrachtungsweise darf allerdings nicht vergessen werden, daß auch temperaturbedingte Schäden zu einer Erhöhung der Stoffwechselrate führen können, z. B. indem die Durchlässigkeit von Mitochondrienmembranen erhöht und damit der Energieverlust durch Protonenleaks vergrößert wird (Hardewig und Pörtner, unveröff. Daten). Eine erhöhte Stoffwechselrate wiederum kann zu einer Verstärkung des oxidativen Stresses und damit zu Schädigungen führen. Daher muß eine Steigerung der Stoffwechselrate auch mit einer Erhöhung der antioxidativen Kapazität einhergehen. Tatsächlich konnte eine Verdopplung der Aktivität der Superoxiddismutase

im Chloragoggewebe von *A. marina* nach einer Akklimation von 5 auf 20 °C nachgewiesen werden (Buchner *et al.* 1996). Dieses Enzym entgiftet im Tier gebildete Superoxidanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ). Populationsbedingte Variationen in der antioxidativen Kapazität sind bisher jedoch nicht bekannt. Allerdings besitzen kleinere, stoffwechselaktivere Pierwürmer der Nordsee verglichen mit größeren Tieren der gleichen Population eine höhere Aktivität der Superoxiddismutase (Buchner *et al.* 1996).

### 3.3.3. Säure-Basen-Haushalt unter Hitzestress

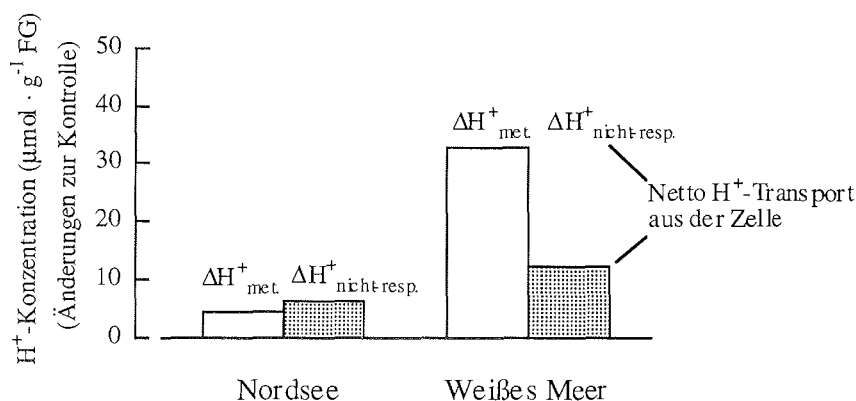
Unterschiede zwischen den Populationen in der Reaktion auf Hitzestress zeigten sich auch in der Fähigkeit zur pH-Regulation. Bei 4 °C oberhalb der oberen kritischen Temperatur kam es schon innerhalb von 4 Stunden zu einem drastischen Abfall des intrazellulären pH-Wertes (Abb. 12). In Nordsee-Tieren wurde eine Ansäuerung um 0,2 pH-Einheiten gemessen, während bei Würmern des Weißen Meeres ein Abfall um 0,6 pH-Einheiten auftrat. Die Ansäuerung in den subpolaren Tieren überschritt damit bei weitem den Wert, der gemäß der alphastat Hypothese (Reeves 1972) nach einer Temperaturerhöhung zu erwarten gewesen wäre. Der Populationsunterschied läßt sich sowohl auf die



**Abb. 12** Nach einem Temperaturanstieg im Sediment auf 4 °C über die obere kritische Temperatur von Nordsee- (von 12 °C auf 25 °C) und Weißmeer-Tieren (von 6 °C auf 21 °C) fiel der intrazelluläre pH-Wert innerhalb von 4 Stunden signifikant ab. Nach 1 Tag begann der  $pH_i$ -Wert in Weißmeer-Tieren wieder zu steigen, während alle Nordsee-Tiere innerhalb von 3 Tagen starben (Mittelwerte  $\pm$  S.D.;  $n = 5$ ;  $\Delta$  = Kontrollen (Weißes Meer, 6 °C);  $\bullet$  = Weißmeer-Tiere (21 °C);  $\bullet$  = Nordsee-Tiere (25 °C); modifiziert nach Publikation I).

## Diskussion

metabolische Protonenproduktion zurückführen, die in Weißmeer-Tieren deutlich ausgeprägter war als bei den Nordsee-Tieren (Abb. 6, 11), als auch auf Unterschiede in der intrazellulären Pufferkapazität. Der intrazelluläre Nichtbikarbonat-Pufferwert ( $\beta_{NB}$ ) war bei den borealen Pierwürmern um 23 % höher, so daß in den subpolaren Würmern die metabolisch freigesetzten Protonen nicht so gut abgefangen werden konnten. Dies könnte teilweise auf den höheren Mitochondriengehalt der Weißmeer-Tiere zurückgeführt werden, da die mitochondriale Matrix eine geringere Pufferkapazität besitzt als das Zytosol (Pörtner und Sartoris 1998). Hinzu kommt, daß die Weißmeer-Tiere aufgrund ihrer Kälteanpassung wahrscheinlich die Fähigkeit zur schnelleren pH-Regulation besitzen (Pörtner und Sartoris 1998), was sich auch in einem deutlichen netto Protonentransport aus der Zelle während 4stündiger Hitzeexposition zeigte (Abb. 13). Vermutlich können sich die subpolaren Würmer wegen der höheren Mitochondriendichte auch schneller von einer Anaerobiose erholen (Moyes *et al.* 1992), ihr Pufferwert ist aber aufgrund der Kälteanpassung geringer als bei den Nordsee-Würmern. In einer *non-steady*



**Abb. 13** Änderungen der Protonenkonzentration ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  Frischgewicht) im Hautmuskelschlauch von *Arenicola marina* aus der Nordsee und vom Weißen Meer nach einer Temperaturerhöhung im Sediment auf 4 °C über der oberen kritischen Temperatur. Die Protonenbalance aus anaerobem Stoffwechsel ( $\Delta\text{H}^+_{\text{met.}}$ ) ergab sich aus Daten der Publikation III, wie in Abb. 6 dargestellt. Die nicht-respiratorische Protonenproduktion ( $\Delta\text{H}^+_{\text{nicht-resp.}}$ ) wurde mittels folgender Gleichung berechnet:

$$\Delta\text{H}^+_{\text{nicht-resp.}} = |\beta_{NB}| \times \Delta\text{pH}_i - \Delta\text{Bic} \text{ (mmol} \cdot \text{l}^{-1}\text{)}$$

(für: nicht-resp., nicht respiratorisch;  $\beta_{NB}$ , Nichtbikarbonat-Pufferwert; Bic, Bikarbonat). Änderungen der Bikarbonatkonzentrationen wurden vernachlässigt, da bisher keine temperaturbedingten Änderungen derselben in Geweben vom Pierwurm beschrieben wurden (Toulmond 1977, Klein 1994). Die Unterschiede in der metabolischen und nicht-respiratorischen Protonenproduktion in Weißmeer-Würmern lassen auf einen Netto-Protonentransport aus der Zelle schließen (Pörtner 1987b; Mittelwerte; n = 5; modifiziert nach Publikation III).



---

*state* Situation, wie sie nach dem Überschreiten der kritischen Temperatur auftritt, ist der intrazelluläre pH-Wert in den kaltadaptierten Tieren daher stärker von der metabolischen Protonenproduktion abhängig.

### 3.3.4. Bedeutung der Ammoniumakkumulation

Hitzestreß geht auch mit einer Akkumulation von Ammoniumionen im Hautmuskelschlauch einher, obwohl unter den experimentellen Bedingungen genug Seewasser vorhanden war, in das Ammoniak bzw. Ammonium hätte ausgeschieden werden können. Da nur das ungeladene Ammoniak die lipophilen Membranen permeieren kann und das Verhältnis von Ammoniak zum geladenen Ammonium pH-abhängig ist, ist auch die Zahl der diffundierenden Teilchen pH-abhängig. Beim Absinken des intrazellulären pH-Wertes werden daher mehr Ammoniumionen in der Zelle zurückgehalten. Der Konzentrationsanstieg kann aber auch auf eine gesteigerte Ammoniumproduktion zurückzuführen sein, z. B. durch eine Erhöhung der Stoffwechselrate oder durch eine Verschiebung vom Kohlenhydrat- zum Proteinstoffwechsel. Auch beim Adenylatabbau werden Ammoniumionen freigesetzt. Da aber bei den Weißmeer-Würmern netto nur etwa  $2 \mu\text{mol Adenylate} \cdot \text{g}^{-1}$  Frischgewicht abgebaut wurden, während die Ammoniumkonzentration um ca.  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  Frischgewicht anstieg, kann der Adenylatabbau nicht allein für den Konzentrationsanstieg verantwortlich sein. Klein (1994) beobachtete, daß im Pierwurm bei Inkubationen unter hohen Temperaturen Muskelgewebe abgebaut wird. Auch bei den hier vorgestellten Experimenten könnte der streßbedingte Anstieg des Energiebedarfes zum Teil durch den Abbau von Muskelproteinen gedeckt worden sein, wobei die dabei anfallenden Ammoniumionen durch den niedrigen pH-Wert im Gewebe zurückgehalten wurden. Die Erholung des Säure-Basen-Haushaltes nach drei Tagen konnte so auch zur Normalisierung der Ammoniumkonzentrationen beitragen.

Findet tatsächlich ein Abbau von Muskelproteinen statt, steigt der Anteil der Mitochondrien am Gesamtvolumen der Zelle. Von den geänderten Volumenverhältnissen sind in diesem Fall weder der mitochondriale Energieverbrauch noch die Energieproduktion beeinflusst. Lediglich der extramitochondriale Energieverbrauch sinkt und die Energieversorgung des restlichen Gewebes wird verbessert. Dadurch ergibt sich eine Rückkopplung, die mit zur Erholung der Tiere beitragen kann.

### 3.3.5. Mögliche Auswirkungen der Erderwärmung

Es liegt die Vermutung nahe, daß an den Grenzen ihres Ausbreitungsgebietes lebende Tiere die Grenzen ihrer Anpassungsfähigkeit erreicht haben und daher auch sensibler gegen verschiedenste Formen von Stress sind, wie extreme Temperaturen oder Temperaturschwankungen. Mit einer Erhöhung der Amplitude von Temperaturschwankungen und einer Vermehrung von extremen Wetterereignissen ist aber im Zuge der Erderwärmung in Zukunft zu rechnen (Easterling *et al.* 1997, Kerr 1998, Knutson *et al.* 1998).

Mit der Besiedlung des Weißen Meers hat der Pierwurm fast seine nordöstlichste Verbreitung im Gezeitenbereich erreicht, so daß die Besiedlung polarer Gebiete nur noch im Sublitoral stattfinden konnte, wo relativ konstante Temperaturen von  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorherrschen. Ist damit seine Kapazität zur Temperaturanpassung erschöpft, so daß in Folge der Erderwärmung mit Verschiebungen der Verbreitungsgrenzen zu rechnen ist? Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen eher das Gegenteil, daß Pierwürmer vom Weißen Meer eine recht hohe Kapazität zur Temperaturanpassung besitzen, deutlich ausgeprägter sogar als Tiere aus der Nordsee. Es ist daher unwahrscheinlich, daß der Anstieg der durchschnittlichen Jahrestemperatur einen negativen Effekt auf die Tiere vom Weißen Meer ausüben wird. Sekundäre Effekte, wie Parasitenbefall oder eine Verschiebung des Nahrungsspektrums sind allerdings nicht auszuschließen. Würmer der Nordsee waren dagegen sehr empfindlich gegen Hitzestress, so daß eine Verschiebung der Verbreitungsgrenzen von *A. marina* nach Norden möglich erscheint.

### 3.4. Mögliche Ursachen für die unterschiedliche Anpassungsfähigkeit der Tiere beider Populationen

Bisher bleibt unklar, warum die entsprechenden Mechanismen in Nordsee-Tieren nicht ausreichen, um die Toleranz gegenüber extremen Temperaturen zu verbessern. Vermutlich besitzen die Tiere beider Populationen unterschiedliche Überlebensstrategien, die eng mit ihrem Lebensraum verbunden sind. Eine Stabilisierung des ATP-Spiegels und des Säure-Basen-Status, wie sie bei Nordsee-Tieren beobachtet wurde, ist notwendig, wenn die lokomotorischen Fähigkeiten aufrecht erhalten werden müssen (Hand und Hardewig 1996). Ein niedriger pH-Wert und ein hoher Energieverbrauch, z. B. für die Synthese von Hitze-Schock-Proteinen, können dagegen von Vorteil sein, wenn die Bewegungsfähigkeit keine Rolle spielt. Es ist daher wahrscheinlich, daß Nordsee-Tiere Hitze- oder Kältestress vermeiden, indem sie tiefere Bauten graben, die über 50 cm tief

sein können (unveröffentlichte Beobachtung). Hierzu ist es notwendig, daß sie ihre Bewegungsaktivität behalten. Unter Laborbedingungen konnten die Tiere dagegen nicht fliehen und starben. Im Gegensatz dazu ist wegen einer im Untergrund liegenden Fels- und Lehmschicht die maximale Tiefe der Bauten der Weißmeer-Tiere auf ca. 10 - 15 cm begrenzt (unveröffentlichte Beobachtung). Diese Würmer sind daher besser angepaßt, ungünstige Umweltbedingungen zu überdauern. Ein Vergleich mit Tieren anderer Gebiete des Weißen Meeres oder anderer subpolarer Regionen, in denen die Bodenbeschaffenheit vergleichbar mit den Bedingungen ist, denen die Nordsee-Tiere ausgesetzt sind, könnte helfen diese Hypothese zu überprüfen. Denn Kälteanpassung an sich scheint schon einen Einfluß auf die Resistenz mariner Evertrebraten gegen widrige Umstände zu haben. So zeigten von Oertzen und Schlungbaum (1972), daß Muscheln arktischen Ursprungs zwar hitzeempfindlicher sind, dagegen aber deutlich höhere Sauerstoffmangel- und H<sub>2</sub>S-Resistenzen besitzen als boreale Arten. Eine weitere Ursache für die größere Kapazität der subpolaren Würmer, sich an Temperaturänderungen anzupassen, mag an den größeren Temperaturschwankungen liegen, denen die Tiere vom Weißen Meer gegenüber den Nordsee-Würmern in ihrem Lebensraum ausgesetzt sind (s. Einleitung).

### 3.5. Die Bedeutung von Acetat: eine Hypothese

Acetat, welches in das Muskelgewebe vom Pierwurm diffundieren kann (Holst und Zebe 1984), rief bei Zugabe zum Inkubationswasser (Endkonzentration 7 mmol·l<sup>-1</sup>) eine 6fache Erhöhung des Sauerstoffverbrauches in kaltadaptierten Pierwürmern hervor (Publikation II). In verschiedenen Evertrebraten und Vertebraten, darunter Menschen, wurden Laktat oder Ethanol, Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels, als Mittler zwischen ungünstigen Umweltbedingungen und einer Verhaltens- und Stoffwechseländerung identifiziert (z. B. Crawshaw *et al.* 1989, Ferrannini *et al.* 1993, Pörtner *et al.* 1994, de Wachter *et al.* 1997). Auch wird zum Beispiel die Stoffwechselregulation unter hypoxischen Bedingungen bei anoxietoleranten Schildkröten über eine ganze Kaskade von Prozessen gesteuert, die mit einem Sauerstoffsensoren beginnt, über verschiedene hämhaltige Proteine weitergeleitet wird und in einer Reduktion des Energieumsatzes und anderen Schutzmechanismen endet (Hochachka *et al.* 1997). Im Gewebe von *A. marina* wird kaum Laktat gebildet, stattdessen akkumuliert bei temperaturbedingter Anaerobiose u. a. Acetat. Es ist daher möglich, daß im Pierwurm Acetat die Rolle als Mittler zwischen ungünstigen Umweltbedingungen und einer Verhaltens- und Stoffwechseländerung übernimmt, die Laktat in anderen Tieren spielt, und damit die Überlebensfähigkeit der kaltadaptierten Tiere steigert. Die vermutete Synthese von Hitze-Schock-Proteinen oder anderen Schutzmechanismen gegen extreme Temperaturen könnte so - statt

(ausschließlich) neuronal über einen Temperaturrezeptor - zum Beispiel durch Acetat zusammen mit Catecholaminen induziert werden. Die Erhöhung der aeroben Kapazität während der Kälteanpassung könnte von Bedeutung sein, da durch die Steigerung der Stoffwechselrate die acetatbedingte Änderung des Stoffwechsels deutlicher hervortrat und so für uns meßbar wurden. Wahrscheinlich werden aber während der Kälteanpassung auch noch weitere Faktoren, wie das Hormonsystem, verändert, die ihrerseits die Signalkaskade beeinflussen können. Auch im Menschen kann eine Acetatinfusion zu einem Anstieg des Sauerstoffverbrauches führen, allerdings sind auch hier noch andere Faktoren von Bedeutung, wie eventuell der Gesundheitszustand (Burnier *et al.* 1992).

Sowohl im Küstenbereich der Deutschen Bucht als auch in der Kandalaksha Bucht des Weißen Meeres, findet man im oberen Litoral nur junge Pierwürmer, während im Sublitoral ausschließlich Adulte leben (Werner 1954, Beukema und De Vlas 1979, Kolyakina 1980). Anhand von Wurmfängen in Planktonnetzen (Beukema und De Vlas 1979), Tierfunden am Strand (Werner 1954, 1956) und Magenuntersuchungen von Fischen (Kolyakina 1980) zeichnete sich das Bild ab, daß im Laufe des Winters Tiere des oberen Gezeitenbereiches aktiv in die Wassersäule aufsteigen, ins Sublitoral wandern und sich dort wieder eingraben. Diese Wanderung ist zwar mit vielen Verlusten verbunden, eine Wanderung durchs Sediment ist aber zu energieaufwendig (Trevor 1978) und daher auf einen Radius von weniger als einen Meter begrenzt (Kolyakina 1980). Werner (1956) vermutete, daß der Auslöser für diese horizontale Winterwanderung in der Temperaturänderung zu finden ist, genauer, daß die Winterwanderung einsetzt, wenn nach einer längeren Frostperiode eine geringe Erwärmung stattfindet. Solche Wanderungen sind auch von der Plattmuschel *Macoma balthica* bekannt. Dazu kommen die sonst im Sediment lebenden jungen Muscheln zwischen Januar und März an die Oberfläche und lassen sich mit den Ebbströmen verdriften, um sich in tieferliegenden Gebieten wieder anzusiedeln (de Vlas 1973). Sörlin (1988) zeigte, daß *M. balthica* durch Kältereize angeregt werden kann, aus dem Sediment zu kommen. Unbekannt ist dagegen bisher, wie der Kältereiz sowohl in der Plattmuschel als auch im Pierwurm auf die Verhaltensänderung einwirkt, zumal ein einfacher Kältereiz nicht ausreichte, warm adaptierte Pierwürmer aus dem Sediment zu treiben (unveröffentlichte Daten). Es ist möglich, daß Acetat in kalt angepaßten Tieren (s. o.) den Kältereiz transformiert und damit die Winterwanderung auslöst. Untersuchungen zum Verhalten der Tiere im Thermogradienten sowie weitere Analysen zur Wirkung des Acetats auf die Stoffwechselrate müßten hier in Zukunft Klärung verschaffen. Zu dieser Hypothese paßt, daß kleinere Pierwürmer später, d. h. bei niedrigeren Temperaturen abwandern als große Würmer (Werner 1956). Kleine Tiere besitzen im allgemeinen eine höhere Mitochondriendichte (Brand 1990) und ihre untere kritische Temperatur müßte demnach bei niedrigeren

---

Werten liegen als bei großen Tieren. Nach der oben beschriebenen Hypothese würde Acetat daher erst bei niedrigeren Temperaturen akkumulieren und das Signal zum Abwandern kommt folglich später als für große Würmer.

### 3.6. Isoenzymvergleich

#### 3.6.1. Genfluß zwischen den atlantischen und der Weißmeer-Population

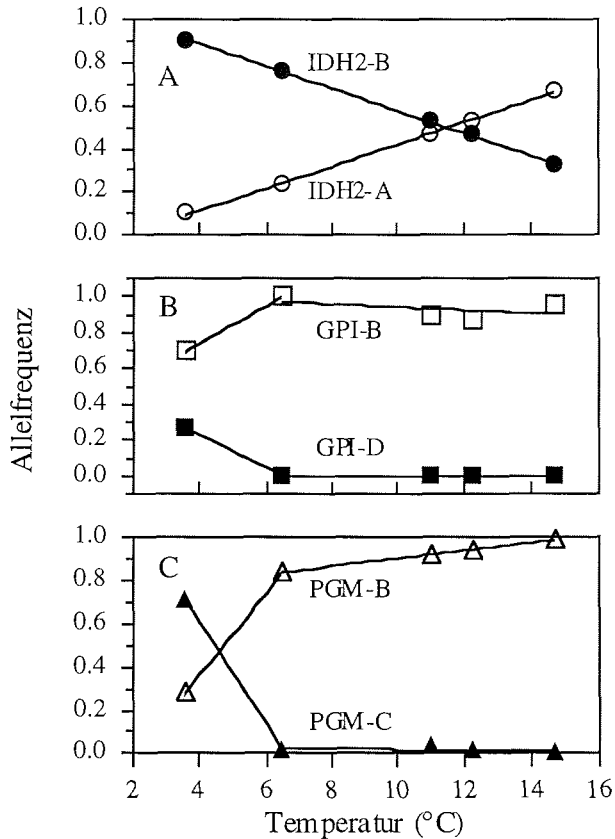
Der Verwandtschaftsgrad zwischen der Nordsee- und der Weißmeer-Populationen wurde mittels elektrophoretischer Isoenzymanalyse bestimmt, um der Frage nachzugehen, ob es sich bei den Populationsunterschieden um eine phänotypische Akklimation oder um genetische Adaptation handelt. Eventuelle geographische Abhängigkeiten sollten dabei von der genetischen Varianz getrennt werden, indem zusätzliche Populationen aus südlicheren (Frankreich und Niederlande) und nördlichen (Norwegen) Gebieten in die Untersuchung mit einbezogen wurden (Publikation IV). Es zeigte sich, daß sich die untersuchten Gene (Nei's genetische Identität, Nei 1975) zwischen den einzelnen atlantischen Populationen (von Frankreich über die Niederlande und Deutschland nach Norwegen) kaum voneinander unterschieden. Die Weißmeer-Population differierte dagegen mit einem Identitätswert von 0,89 signifikant von den anderen Populationen. Eine genetische Identität von unter 0,9 ist ein Hinweis, daß die Populationen zu unterschiedlichen Unterarten gehören können, die Isoenzymanalyse alleine reicht jedoch nicht aus, um diesen Punkt zu klären. Unterschiede zwischen den atlantischen und der Weißmeer-Population zeigten sich auch in den Werten der Gendifferenz  $F_{st}$ . Dieser Index ist ein Maß für die Unterschiede in der Allelfrequenz einzelner Loci zwischen den Populationen. Wenn alle Populationen in die Berechnung eingingen, war der Durchschnitts- $F_{st}$ -Wert aller Loci hoch (0,21), so daß sich eine signifikante Gendifferenz zwischen allen Populationen ergab. Betrachtete man dagegen nur die atlantischen Populationen, sank der Wert auf durchschnittlich 0,06. In Muschelpopulationen mit hohem Genfluß liegt die Gendifferenz zwischen 0,01 bis 0,03, falls die Populationen nur einige hundert Kilometer von einander entfernt sind. Bei einer geographischen Trennung von einigen tausend Kilometern steigt der  $F_{st}$ -Wert auf 0,04 bis 0,06 (Dillon und Manzi 1992, Grant *et al.* 1992, Saavedra *et al.* 1993, Hummel *et al.* 1994, 1995). Dies zeigt, daß der Genfluß zwischen den atlantischen Populationen als stark angesehen werden kann, der Austausch mit der Weißmeer-Population jedoch unbedeutend ist. Der Pierwurm besitzt kein planktonisches Larvenstadium, Eier können aber mit der Strömung verdriftet werden. Auch wird häufiger eine postlarvale Migration beobachtet (Wolff 1973). Dieser Transport bzw. die postlarvale Wanderung scheinen auf jeden Fall auszureichen, um

einen starken Genaustausch zwischen den atlantischen Populationen zu erreichen. Ein Genaustausch mit der Weißmeer-Population wird wahrscheinlich durch die hydrographische und geographische Isolation des Weißen Meeres unterbunden (Zenkevitch 1963). Starke Strömungen im nordöstlichen Bereich des Weißen Meeres (im Gorlo und Voronka Sund) sorgen für starke Turbulenzen der Wassersäule. Als Folge davon ist der Boden mit extrem hartem Sediment bedeckt, welches kaum Flora und Fauna beherbergt. Außerdem schaffen die Gezeiten keinen Wasseraustausch zwischen dem Weißen Meer und der Barentsee, sondern die Wassermassen werden im Gorlo nur hin und her verschoben, so daß eine Barriere für Larven und Gameten entsteht.

### 3.6.2. Einfluß der Temperatur bzw. des Genflusses auf die Allelfrequenz einzelner Isoenzyme

Die starke Gendifferenz zwischen den Populationen im Atlantik und im Weißen Meer ging mit abrupten Änderungen in der Allelfrequenz einzelner Isoenzyme einher. So unterschieden sich die Frequenzen der Glukosephosphatisomerase (GPI) und der Phosphoglukomutase (PGM) in den Weißmeer-Tieren signifikant von den Frequenzen in den atlantischen Populationen (Abb. 14). Dies spricht dafür, daß die Frequenzen dieser Allele vor allem durch die hydrographische und geographische Isolation des Weißen Meeres beeinflusst sind. Auch in der Seeanemone *Metridium senile* zeigen die Allelfrequenzen von GPI und PGM eine geographische Abhängigkeit (Hoffmann 1981a, b), allerdings scheint hier die Temperatur den Ausschlag für die latitudinale Verteilung der verschiedenen Allele zu geben. Änderungen in der Allelfrequenz der Isocitratdehydrogenase 2 (IDH2), die als mitochondriales Enzym identifiziert wurde, erfolgten im Pierwurm kontinuierlich mit der Entfernung der Populationen voneinander. Besonders auffällig sind die Frequenzänderungen der Allele für IDH2-A und IDH2-B, die gegenläufig linear mit Unterschieden in der Jahresdurchschnittstemperatur des Wassers korrelierten (Abb. 14). Geographische Abhängigkeiten des Genotypes innerhalb einer Art wurden häufig beobachtet und ließen sich meist mit Unterschieden in der Salinität oder der Temperatur in Beziehung setzen, auch wenn die direkte Ursache solcher Verläufe bisher ungeklärt blieb (z. B. Koehn *et al.* 1976, Endler 1977, Hoffmann 1985, Hummel *et al.* 1995). Auch die Änderung des Isoenzymmusters während der Larvalentwicklung von Heringen ist temperaturabhängig. Hier scheint die aerobe Kapazität, die in Larven größer ist als in Jungfischen, eine entscheidende Rolle zu spielen, da bei niedrigen Temperaturen das larvale Isoenzymmuster länger erhalten bleibt (Johnston *et al.* 1997). Für die Isocitratdehydrogenase von Nordsee- und Weißmeer-Tieren konnten signifikante Unterschiede u. a. in der Temperaturabhängigkeit ihrer Aktivität nachgewiesen werden

(Publikation II). Es ist daher möglich, daß die Temperatur einen entscheidenden Selektionsdruck auf die Expression verschiedener Isoenzyme im Pierwurm ausüben konnte.



**Abb. 14** Allelfrequenzen verschiedener Enzyme im Pierwurm *Arenicola marina* in Abhängigkeit von der durchschnittlichen Jahrestemperatur im Seewasser im entsprechenden Sammelgebiet. (A) Die Allelfrequenz der Isocitratdehydrogenase 2 (IDH2) korrelierte linear mit der Temperatur im Lebensraum. (B) Die Allelfrequenzen der Glukosephosphatisomerase (GPI) und (C) der Phosphoglucomutase (PGM) zeigten dagegen eher eine geographische Abhängigkeit: die Frequenzen der Weißmeer-Population (bei 3,6 °C) unterschieden sich signifikant von den Frequenzen in den atlantischen Populationen (modifiziert nach Publikation IV).

### 3.6.3. Grad der Heterozygotie

Der mittlere Heterozygotiegrad, der ein Maß für den Anteil von Individuen mit heterozygoten Allelen innerhalb einer Population ist, korreliert in vielen Organismen mit der Wachstumsrate (Koehn und Gaffney 1984, Zouros 1987, Koehn *et al.* 1988) oder mit der Kapazität zur anaeroben Energiegewinnung (Vockaert und Zouros 1989, Bayne und Hawkins 1997). Es wird vermutet, daß durch die Diversität von vorhandenen Enzymen heterozygote Individuen effizienter auf Änderungen von Umweltfaktoren reagiert können. Dies ist mit einer Senkung der Umsatzrate von Proteinen gekoppelt (Hawkins 1991), so daß mehr Energie für den Erhaltungsstoffwechsel, Wachstum und Fortpflanzung oder für körperliche Höchstleistungen bei Flucht und Jagd zur Verfügung steht (Vockaert und Zouros 1989). Tieren mit einem geringeren mittleren Heterozygotiegrad wird daher eine geringere Fitneß zugeschrieben. Dies paßt zu dem Befund, daß Organismen, die unter stabilen Umweltbedingungen leben, meist einen geringeren Grad an Heterozygotie zeigen (Moon und Hochachka 1971). Der mittlere Heterozygotiegrad war in Pierwürmern vom Weißen Meer mit 0,129 nicht signifikant geringer als in Tieren aus der Nordsee mit 0,148 (Publikation IV). Jedoch war die Überlebensfähigkeit der subpolaren Würmer unter Temperaturstreß deutlich größer als die der borealen. Offensichtlich hat bei diesen Tieren der mittlere Grad an Heterozygotie, der anhand verschiedener Enzyme mit 7 Loci bestimmt wurde, keinen Einfluß auf die Fitneß unter den experimentell gegebenen Bedingungen. Allerdings zeigten die Phosphoglucomutase und die Glukosephosphatisomerase in der Weißmeer-Population nicht nur eine unterschiedliche Allelfrequenz (Abb. 14), sondern auch einen deutlich höheren Grad an Heterozygotie als in der Nordsee-Population. Es scheint daher, daß verschiedene Enzyme, die unterschiedlich wichtige Rollen im Stoffwechsel spielen, auch einen unterschiedlichen Beitrag zu dem Verhältnis des Heterozygotiegrades und der Fitneß leisten (Koehn *et al.* 1988).



---

**4. Literaturverzeichnis**

- Aarset AV (1982) Freezing tolerance in intertidal invertebrates. *Comp Biochem Physiol* 73A: 571-580
- Abbiati M, Maltagliati F (1992) Genetic population structure of *Neanthes succinea* (Polychaeta: Nereididae). *J mar biol Ass UK* 72: 511-517
- Abe H, Dobson GP, Hoeger U, Parkhouse WS (1985) Role of histidine-related compounds to intracellular buffering in fish skeletal muscle. *Am J Physiol* 249: R449-R454
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1986) *Molekularbiologie der Zelle*, VCH, Weinheim, S. 584-602
- Alp PR, Newsholme EA, Zammit VA (1976) Activities of citrate synthase and NAD<sup>+</sup>-linked and NADP<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 154: 689-700
- Arntz WE, Brey T, Gallardo VA (1994) Antarctic Zoobenthos. *Ocean Mar Biol Ann Rev* 32: 241-304
- Archer SD, Johnston IA (1991) Density of cristae and distribution of mitochondria in the slow muscle fibers of antarctic fish. *Physiol Zool* 64: 242-258
- Atkinson DE (1977) *Cellular energy metabolism and its regulation*. Academic Press, New York, London, S. 70-79
- Aunaas T, Denstad J-P (1988) Triggering of ice-nucleator activity in the blue mussle (*Mytilus edulis*). *Cryo Letters* 9: 427
- Avise JC (1974) Systematic value of electrophoretic data. *Syst Zool* 23: 465-481
- Badyukov DD (1979) Sea level changes on the Soviet shores of the White, Baltic and Black Seas during the past 15 thousand years. *Oceanology* 19: 177-181
- Baumfalk YA (1979) On the pumping activity of *Arenicola marina*. *Neth J Sea Res* 13: 422-427
- Bayne BL, Hawkins AJS (1997) Protein metabolism, the costs of growth, and genomic heterozygosity: experiments with the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Physiol Zool* 70: 391-402
- Beaumont AR (1982) Geographic variation in allele frequencies at three loci in *Chlamys opercularis* from Norway to the Brittany coast. *J mar biol Ass UK* 62: 243-261
- Becker GA (1981) Beiträge zur Hydrographie und Wärmebilanz der Nordsee. *Deutsche Hydrogr Zeitschr* 34: 167-262
- Begon M, Harper JL, Townsend CR (1991) *Ökologie: Individuen, Populationen, Lebensgemeinschaften*. Birkhäuser Verlag, Berlin, S. 52-64, 175-182
- Beis I, Newsholme EA (1975) The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 152: 23-32

- Berger EM (1983) Population genetics of marine gastropods and bivalves. In: Russell-Hunter WD (Hrsg.) The mollusca, Vol 6, Ecology. Academic Press, Orlando, S. 563-596
- Bergmeyer HU, Beutler HO (1990) Ammonia. in: Bergmeyer HU (Hrsg.) Methods of enzymatic analysis, Vol VIII, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, S. 454-461
- Beukema JJ (1973) Migration and secondary spatfall of *Macoma balthica* (L.) in the western part of the Wadden Sea. Neth J Zool 23: 356-357
- Beukema JJ (1979) Biomass and species richness of macrozoobenthic animals living on a tidal flat area in the Dutch Wadden Sea: Effects of a severe winter. Neth J Sea Res 13: 203-223
- Beukema JJ (1992) Expected changes in the Wadden Sea benthos in a warmer world: lessons from periods with mild winters. Neth J Sea Res 30: 73-79
- Beukema JJ, De Vlas J (1979) Population parameters of the lugworm, *Arenicola marina*, living on tidal flats in the dutch wadden sea. Neth J Sea Res 13: 331-353
- Beutler H-O (1990) Succinate. in: Bergmeyer HU (Hrsg.) Methods of enzymatic analysis, Vol VII, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, S. 25-33
- Bischoff-Bäsmann B (1997) Temperaturbedarf und Biogeographie mariner Makroalgen - Anpassung mariner Makroalgen an tiefe Temperaturen. Berichte zur Polarforschung 245
- Bourget E (1983) Seasonal variations of cold tolerance in intertidal mollusks and relation to environmental conditions in the St. Lawrence Estuary. Can J Zool 61: 1193-1201
- Boutilier RG, Glass ML, Heisler N (1987) Blood gases, and extracellular/intracellular acid-base status as a function of temperature in the anuran amphibians *Xenopus laevis* and *Bufo marinus*. J exp Biol 130: 13-25
- Brand MD (1990) The contribution of the leak of protons across the mitochondrial inner membrane to standard metabolic rate. J theor Biol 145: 267-286
- Brand MD, Murphy MP (1987) Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells. Biol Bull 62: 141-193
- Buchner T, Abele-Oeschger D, Theede H (1996) Aspects of antioxidant status in the polychaete *Arenicola marina*: tissue and subcellular distribution, and reaction to environmental hydrogen peroxide and elevated temperatures. Mar Ecol Prog Ser 143: 141-150
- Burnier P, Tappy L, Jéquier E, Schneeberger D, Chioléro R (1992) Metabolic and respiratory effects of infused sodium acetate in healthy human subjects. Am J Physiol 263: R1271-R1276
- Buroker NE (1983) Population genetics of the American oyster *Crassostrea virginica* along the Atlantic coast and the Gulf of Mexico. Mar Biol 75: 99-112
- Burton RS (1983) Protein polymorphism and genetic differentiation of marine invertebrate populations (Review). Mar Biol Lett 4: 193-206

- Butler PJ, Day N (1993) The relationship between intracellular pH and seasonal temperature in the brown trout *Salmo trutta*. *J exp Biol* 177: 293-297
- Cadman PS, Nelson-Smith A (1990) Genetic evidence for two species of lugworm (*Arenicola*) in South Wales. *Mar Ecol Prog Ser* 64: 107-112
- Cadman PS, Nelson-Smith A (1993) A new species of lugworm: *Arenicola defodiens* sp. nov. *J mar biol Ass UK* 73: 213-223
- Campbell CM, Davies PS (1978) Temperature acclimation in the teleost, *Blennius pholis*: changes in the enzymes activity and cell structure. *Comp Biochem Physiol* 61B: 165-167
- Chiba A, Hamaguchi M, Tokuno T, Asai T, Okuda H, Chichibu S (1991) Changes in high-energy phosphate metabolism in the water scorpion, *Ranatra chinensis*, under cold water-warm water stress. *Comp Biochem Physiol* 100: 399-405
- Childress JJ (1995) Are there physiological and biochemical adaptations of metabolism in deep-sea animals? *TREE* 10: 30-36
- Churchill TA, Storey KB (1996) Metabolic response to freezing and anoxia by the periwinkle *Littorina littorea*. *J therm Biol* 21: 57-63
- Clarke A (1991) What is cold adaptation and how should we measure it? *Am Zool*: 81-92
- Clarke A (1998) Temperature and energetics: an introduction to cold ocean physiology. in: Pörtner HO, Playle RC (Hrsg.) *Cold ocean physiology*. Cambridge University Press, S. 3-30
- Conti E, Toulmond A (1986) Ventilatory response to ambient hypo- and hypercapnia in the lugworm, *Arenicola marina* (L.). *J Comp Physiol* 156B: 797-802
- Cossins AR, Bowler K (1987) *Temperature biology of animals*. Chapman and Hall, London, S. 204-247
- Crawshaw LI, Wollmuth LP, O'Connor CS (1989) Intracranial ethanol and ambient anoxia elicit selection of cooler water by goldfish. *Am J Physiol* 25: R133-R137
- Crockett EL, Sidell BD (1990) Some pathways of energy metabolism are cold adapted in antarctic fishes. *Physiol Zool* 63: 472-488
- Dahlhoff E, Somero G (1993) Kinetic and structural adaptations of cytoplasmic malate dehydrogenases of eastern pacific abalone (genus: *Haliotis*) from different thermal habitats: biochemical correlations of biogeographical patterning. *J exp Biol* 185: 137-150
- Darnell J, Lodish H, Baltimore D (1986) *Molecular cell biology*. Scientific American Books, New York, S. 635
- Davenport J (1992) *Animal life at low temperature*. Chapman & Hall, London
- Dean AM, Golding GB (1997) Protein engineering reveals ancient adaptive replacements in isocitrate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3104-3109

- van Dijk PLM, Hardewig I, Pörtner HO (1997) Temperature-dependent shift of  $pH_i$  in fish white muscle: contributions of passive and active processes. *Am J Physiol* 272: R84-R89
- Dillon RT, Manzi JJ (1992) Population genetics of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, at the Northern limit of its range. *Can J Fish Aquat Sci* 49: 2574-2578
- Dörjes J (1970) Ökofaktoren. In: Reineck H-E (Hrsg.) *Das Watt*. Dr. Kramer Verlag, Frankfurt/Main, S. 17
- Duncan A (1959) Local races in lugworms (*Arenicola marina* (L.)). *Nature* 184: 71-72
- Easterling DR, Horton B, Jones PD, Peterson TC, Karl TR, Parker DE, Salinger MJ, Razuvayev V, Plummer N, Jamason P, Folland CK (1997) Maximum and minimum temperature trends for the globe. *Science* 277: 364-367
- Egginton S, Sidell BD (1989) Thermal acclimation of subcellular structure of fish muscle. *Am J Physiol* 256: R1-R10
- Endler JA (1977) *Geographic variation, speciation, and clines*. Princeton University Press, Princeton, S. 246
- Eshky AA, Taylor AC, Atkinson RJA (1996) The effect of temperature on aspects of respiratory physiology of the semi-terrestrial crabs, *Uca inversa* (Hoffmann) and *Metopograpsus messor* (Forskål) from the Red Sea. *Comp Biochem Physiol* 114A: 297-304
- Ferrannini E, Natli A, Brandi LS, Bonadonna R, Vigili De Kreuzenberg S, del Prato S, Santoro D (1993) Metabolic and thermogenic effects of lactate infusion in humans. *Am J Physiol* 265: E504-E512
- Fields PA, Somero GN (1997) Amino acid sequence differences cannot fully explain interspecific variation in thermal sensitivities of gobiid fish A<sub>4</sub>-lactate dehydrogenases (A<sub>4</sub>-LDHs). *J exp Biol* 200: 1839-1850
- Fischer JH (1995) Specific detection of nucleotides, creatine phosphate, and their derivatives from tissue in a simple, isocratic, recycling, low volume system. *LC GC int* 8: 254
- Fong PP, Garthwaite RL (1994) Allozyme electrophoretic analysis of the *Hediste limnicola* - *H. diversicolor* - *H. japonica* species complex (Polychaeta: Nereidae). *Mar Biol* 118: 463-470
- Foster AR, Hall SJ, Houlinan DF (1993) The effects of temperature acclimation on organ/tissue mass and cytochrome c oxidase activity in juvenile cod. *J Fish Biol* 42: 947-957
- Franks F (1986) *Molekulare Grundlagen der Kälteresistenz von Lebewesen*. *Chemie in unserer Zeit* 20: 146-155
- Friedlander MJ, Kotchaphakdi N, Prosser CL (1976) Effects of cold and heat on behaviour and cerebellar function in goldfish. *J Comp Physiol* 112: 19-45
- Gaebel K, Roots BI (1989) Stereological analysis of mitochondria from brains of temperature acclimated goldfish, *Carassius auratus* L (5 and 30°C). *J therm Biol* 14: 187-190

- Gaffney PM (1994) Heterosis and heterozygote deficiencies in marine bivalves: More light? In: Beaumont AR (Hrsg.) Genetics and evolution of aquatic organisms. Chapman & Hall, London, S. 146-153
- Giebels B (1993) Einfluß des pH<sub>i</sub> auf die Propionatsynthese beim Wattwurm *Arenicola marina*. Diplomarbeit, Universität Düsseldorf
- Goddard SV, Kao MH, Fletcher GL (1991) Antifreeze production, freeze resistance, and overwintering of juvenile northern atlantic cod (*Gadus morhua*). Can J Fish Aquat Sci 49: 516-522
- Gonzalez-Villaseñor LI, Powers DA (1986) A multilocus system for studying tissue and subcellular specialisation. J Biol Chem 261: 11471-11477
- Govberg LI (1973) Holocene molluscs of the White Sea. Shirshov Institute of Oceanology, USSR Academy of Science, S. 547-551
- Grant WS, Schneider AC, Leslie RW, Cherry MI (1992) Population genetics of the brown mussel *Perna perna* in southern Africa. J exp mar Biol Ecol 165: 45-58
- Grieshaber MK (1978) Breakdown and formation of high energy phosphates and octopine in the adductor muscle of the scallop, *Chlamys opercularis* (L.) during escape swimming and recovery. J Comp Physiol 126: 269-276
- Grieshaber MK, Hausschild K, Sommer A, Völkel S (1993) Anaerobiosis and sulphobiosis in the lugworm, *Arenicola marina* L. In: Eleftherious A, Ansell AD, Smith CJ (Hrsg.) Biology and Ecology of shallow coastal waters. Olsen & Olsen, Fredensborg, S. 131-137
- Grieshaber MK, Hardewig I, Kreuzer U, Pörtner HO (1994) Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. Physiol Biochem Pharmacol 125: 43-147
- Guderley H (1990) Functional significance of metabolic responses to thermal acclimation in fish muscle. Am J Physiol 259: R245-R252
- Guderley H (1998) Temperature and growth rates as modulators of the metabolic capacities of fish muscle. in: Pörtner HO, Playle RC (Hrsg.) Cold Ocean Physiology. Cambridge University Press, S. 58-87
- Guderley H, Blier P (1988) Thermal acclimation in fish: conservative and labile properties of swimming muscle. Can J Zool 66: 1105-1115
- Günther C-P (1992) Dispersal of intertidal invertebrates: a strategy to react to disturbances of different scales? Neth J Sea Res 30: 45-56
- Hand SC, Somero GM (1983) Energy metabolic pathways of hydrothermal vent animals: Adaptation to food-rich and sulfid-rich deep-sea environment. Biol Bull 165: 167-181
- Hand SC, Gnaiger E (1988) Anaerobic dormancy quantified in *Artemia* embryos: a calorimetric test of control mechanism. Science 239: 1425-1427
- Hand SC, Hardewig I (1996) Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanisms and implications. Annu Rev Physiol 58: 539-563

- Hardewig I, Addink ADF, Grieshaber MK, Pörtner HO, van den Thillart G (1991) Metabolic rates at different oxygen levels determined by direct and indirect calorimetry in the oxyconformer *Sipunculus nudus*. *J exp Biol* 157: 143-160
- Hardewig I, Pörtner HO, Grieshaber MK (1994) Interaction of anaerobic propionate formation and acid-base status in *Arenicola marina*: an analysis of propionyl-CoA carboxylase. *Physiol Zool* 67: 892-909
- Hartman-Schröder G (1971) Annelida, Borstenwürmer, Polychaeta. in: Dahl M, Peus F (Hrsg.) Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeresteile. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- Hawkins AJ (1991) Protein turnover: a functional appraisal. *Funct Ecol* 5: 222-233
- Hazel JR, Prosser CL (1970) Interpretation of inverse acclimation to temperature. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 67: 217-228
- Hazel JR, Prosser CL (1974) Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiol Rev.* 54: 620-677
- Heisler N (1986) Buffering and transmembrane ion transfer processes. in: Heisler N (Hrsg.) Acid-base regulation in animals. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, S. 3-47
- Hermes-Lima M, Storey KB (1993) Antioxidant defense in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *Am J Physiol* 265: R646-R652
- Hilbish TJ (1981) Latitudinal variation in freezing tolerance of *Melampus bidentatus* (Say) (Gastropoda: Pulmonata). *J exp mar Biol Ecol* 52: 283-297
- Hilbish TJ (1985) Demographic and temporal structure of an allele frequency cline in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 86: 163-172
- Hilbish TJ, Deaton LE, Koehn RK (1982) Effect of allozyme polymorphism on regulation of cell volume. *Nature* 298: 688-689
- Hochachka PW (1986) Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 231: 234-241
- Hochachka PW, Somero GN (1980 bzw. 1984) Biochemical adaptation. Princeton University Press, Princeton, New Jersey
- Hochachka PW, Land SC, Buck LT (1997) Oxygen sensing and signal transduction in metabolic defense against hypoxia: lessons from vertebrate facultative anaerobes. *Comp Biochem Physiol* 118A: 23-29
- Hoffmann RJ (1981a) Evolutionary genetics of *Metridium senile*. I. Kinetic differences in phosphoglucose isomerase allozymes. *Biochem Genetics* 19: 129-144
- Hoffmann RJ (1981b) Evolutionary genetics of *Metridium senile*. II. Geographic patterns of allozyme variation. *Biochem Genetics* 19: 145-154
- Hoffmann RJ (1985) Thermal adaptation and the properties of phosphoglucose isomerase allozymes from a sea anemone. In: Gibbs PE (Hrsg.) Proceedings Nineteenth European Marine Biology Symposium. Cambridge University Press, Cambridge, S. 505-514

- Hoffmann AA, Parsons PA (1994) Evolutionary genetics and environmental stress. Oxford science publications, Oxford University Press, Oxford, New York, S. 284
- Hofmann GE, Somero GN (1995) Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp 70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *J exp Biol* 198: 1509-1518
- Hofmann GE, Somero GN (1996) Interspecific variation in thermal denaturation of proteins in the congeneric mussels *Mytilus trossulus* and *M. gallorovincialis*: evidence from heat shock response and protein ubiquitination. *Mar Biol* 126: 65-75
- Holst H, Zebe E (1984) Absorption of volatile fatty acids from ambient water by the lugworm *Arenicola marina*. *Mar Biol* 80: 125-130
- Howell BJ, Rahn H, Goodfellow D, Herreid C (1973) Acid-base regulation and temperature in selected invertebrates as a function of temperature. *Amer Zool* 13: 557-563
- Huble MJ, Locke BR, Moerland TS (1997) Reaction-diffusion analysis of the effects of temperature on high-energy phosphate dynamics in goldfish skeletal muscle. *J exp biol* 200: 975-988
- Hummel H, Bogaards RH, de Wolf L, Wijnholds JA (1989) The interrelation of length, age and heterozygosity in *Mytilus edulis* in the delta area of the Netherlands. In: Aldrich JC (Hrsg.) Phenotypic responses and individuality in aquatic environments. JAPAGA Ashford Co, Wicklow, Ireland, S. 65-71
- Hummel H, Wolowicz M, Bogaards RH (1994) Genetic variability and relationships for populations of *Cerastoderma edule* and of the *C. glaucum* complex. *Neth J Sea Res* 33: 81-89
- Hummel H, Bogaards RH, Amiard-Triquet C, Bachelet G, Desprez M, Marchand J, Sylvand B, de Wit Y, de Wolf L (1995) Uniform variation in genetic traits of a marine bivalve related to starvation, pollution and geographic clines. *J exp mar Biol Ecol* 191: 133-150
- Hummel H, Bogaards R, Bek T, Polishchuk L, Amiard-Triquet C, Bachelet G, Desprez M, Strelkov P, Sukhotin A, Naumov A, Dahle S, Denisenko S, Gantsevich M, Sokolov K, de Wolf L (1997) Sensitivity to stress in the bivalve *Macoma balthica* from the most northern (Arctic) to the most southern (French) populations: low sensitivity in Arctic populations because of genetic adaptations? *Hydrobiologia* (in press).
- Jaworek D, Welsch J (1989) Adenosin 5'-Diphosphate and Adenosin 5'-Monophosphate. in: Bergmeyer HU (Hrsg.) *Methods of enzymatic analysis*, Vol VII, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, S. 365-370
- Johnston IA (1990) Cold adaptation in marine organisms. *Phil Trans R Soc Lond* 326B: 655-667
- Johnston IA, Goldspink G (1975) Thermodynamic activation parameters of fish myofibrillar ATPase enzyme and evolutionary adaptation to temperature. *Nature* 257: 620-622

- Johnston IA, Cole NJ, Vieira VLA, Davidson I (1997) Temperature and developmental plasticity of muscle phenotype in herring larvae. *J exp Biol* 200: 849-868
- Jollivet D, Desbruyères D, Bonhomme F, Moraga D (1995) Genetic differentiation of deep-sea hydrothermal vent alvinellid populations (Annelida: Polychaeta) along the East Pacific Rise. *Heredity* 74: 376-391
- Kaletha K, Skladanowski A (1981) Effect of temperature on the activity of AMP deaminase from chicken heart and skeletal muscle at different stages of development. *Experientia* 27: 232-234
- Kanwisher JW (1955) Freezing in intertidal animals. *Biol Bull mar biol Lab* 109: 56-63
- Kerr RA (1998) The hottest year, by a hair. *Science* 279: 315-316
- Klein B (1994) Zur Temperaturabhängigkeit physiologischer Prozesse bei *Arenicola marina* (L.): Energiestoffwechsel und Säure-Basen-Haushalt. Diplomarbeit, Düsseldorf
- Knutson TR, Tuleya RE, Kurihara Y (1998) Simulated increase of hurricane intensities in a CO<sub>2</sub>-warmed climate. *Science* 279: 1018-1020.
- Koehn RK, Siebenaller JF (1981) Biochemical studies of aminopeptidase polymorphism in *Mytilus edulis*. II. Dependence of reaction rate on physical factors and enzyme concentration. *Biochemical Genetics* 19: 1143-1162
- Koehn RK, Gaffney PM (1984) Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 82: 1-7
- Koehn RK, Milkman R, Mitton JB (1976) Population genetics of marine pelecypods. IV. Selection, migration and genetic differentiation in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Evolution* 30: 2-32
- Koehn RK, Bayne BL, Moore MN, Siebenaller JF (1980a) Salinity related physiological and genetic differences between populations of *Mytilus edulis*. *Biol J Linn Soc* 14:319-334
- Koehn RK, Newell RIE, Immermann F (1980b) Maintenance of an aminopeptidase allele frequency cline by natural selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 5385-5389
- Koehn RK, Hall JG, Innes DJ, Zera AJ (1984) Genetic differentiation of *Mytilus edulis* in eastern North America. *Mar Biol* 79: 117-126
- Koehn RK, Diehl WJ, Scott TM (1988) The differential contribution by individual enzymes of glycolysis and protein catabolism to the relationship between heterozygosity and growth rate in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics* 118: 121-130
- Kolyakina NM (1980) [The seasonal and age characteristics in the distribution of lugworm *Arenicola marina* (Polychaeta) in the Kislaya inlet of the Kandalaksha Bay.] *Biology of the White Sea* 5: 77-92
- Kristensen E (1983) Ventilation and oxygen uptake by three species of *Nereis* (Annelida: Polychaeta) II. Effects of temperature and salinity changes. *Mar Ecol Prog Ser* 12: 299-306



- Krüger F (1964) Versuche zur Abhängigkeit der Atmung von *Arenicola marina* (Annelides Polychaeta) von Größe und Temperatur. Helg wiss Meeresunters 10: 28-63
- Kück K (1997) Der Einfluß kompatibler Substanzen und Kryoprotektoren auf die Enzyme Malatdehydrogenase (MDH) und Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) aus *Acrosiphonia arcta* (Chlorophyta) der Arktis und Antarktis. Berichte zur Polarforschung 227
- Lance C, Dizengremel P, Chauveau M (1978) Effect of temperature on cyanide-sensitive and cyanide-resistant plant mitochondria. S. 133-139
- Levinton JS, Lassen HH (1978) Selection, ecology and evolutionary adjustment within bivalve mollusc populations. Phil Trans R Soc London, Ser B, 284: 403-415
- Li CC (1955) Population genetics. University of Chicago Press, Chicago, S. 366
- Londraville RL, Sidell BD (1990) Ultrastructure of aerobic muscle in antarctic fishes may contribute to maintenance of diffusion fluxes. J exp Biol 150: 205-220
- Loomis SH (1995) Freezing tolerance of marine invertebrates. Ocean Mar Biol 33: 337-350
- Loomis SH, Hayes D (1987) Effect of temperature, food deprivation and photoperiod on the cold tolerance of intertidal pulmonate gastropod, *Melampus bidentatus*. Cryo Letters 8: 25-34
- Loomis SH, Carpenter JF, Anchordoguy TJ, Crowe JH, Branchini BR (1989) Cryoprotective capacity of end products of anaerobic metabolism. J exp Zool 252: 9-15
- Mangum CP (1978) Temperature adaptation. In: Mill PJ (Hrsg.) Physiology of annelids. Academic Press, London, New York, S. 447-478
- May RC, Kelly RA, Mitch WE (1986) Metabolic acidosis stimulates protein degradation in rat muscle by a glucocorticoid-dependent mechanism. J Clin Invest 77: 614-621
- Mendis AHW, Evans AAF (1984) First evidence for the occurrence of cytochrome-o in a free-living nematode. Comp Biochem Physiol 78B: 729-735
- Menken SBJ (1982) Biochemical genetics and systematics of small ermine moths (Lepidoptera, Yponomeutidae). Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung 20: 131-143
- Miranda EJ, Hazel JR (1996) Temperature-induced changes in the transbilayer distribution of phosphatidylethanolamine in mitoblasts of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. J exp Zool 274: 23-32
- Moon TW, Hochachka PW (1971) Effect of thermal acclimation on multiple forms of the liver-soluble NADP<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase in the family salmonidae. Comp Biochem Physiol 40: 207-213
- Moyes CD, Schulte PM, Hochachka PW (1992) Recovery metabolism of trout white muscle: role of mitochondria. Am J Physiol 262: R295-R304

- Murphy DJ (1977a) Metabolic and tissue solute changes associated with changes in the freezing tolerance of the bivalve mollusc *Modiolus demissus*. J exp Biol 69: 1-12
- Murphy DJ (1977b) A calcium-dependent mechanism responsible for increasing the freezing tolerance of the bivalve mollusc *Modiolus demissus*. J exp Biol 69: 13-21
- Murphy DJ (1979) A comparative study of the freezing tolerances of the marine snails *Littorina littorea* (L.) and *Nassarius obsoletus* (Say). Physiol Zool 52: 219-230
- Murphy DJ, Pierce SK jr. (1975) The physiological basis for changes in the freezing tolerance of intertidal molluscs. J exp Zool 193: 313-322
- Murphy DJ, Johnson LC (1980) Physical and temporal factors influencing the freezing tolerance of the marine snail *Littorina littorea* (L.). Biol Bull 158: 220-232
- Nei M (1975) Molecular population genetics and evolution. North Holland Publ. Co., Amsterdam, S. 288
- Nei M (1977) F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. Ann hum Genet 41: 225-233
- Nesis KN (1983) A hypothesis on the origin of Western and Eastern Arctic distribution areas of marine bottom animals. Biologya Morya 5: 3-13
- Nevo E (1978) Genetic variation in natural populations: patterns and theory. Theor Pop Biol 13: 121-177
- Newell RC (1969) Effect of fluctuations in temperature on the metabolism of intertidal invertebrates. Am Zool 9: 293-307
- Newell RC, Pye VI (1970a) Seasonal changes in the effect of temperature on the oxygen consumption of the winkle *Littorina littorea* (L.) and the mussle *Mytilus edulis* (L.). Comp Biochem Physiol 34: 367-383
- Newell RC, Pye VI (1970b) The influence of thermal acclimation on the relationship between oxygen consumption and temperature in *Littorina littorea* (L.) and the mussle *Mytilus edulis* (L.). Comp Biochem Physiol 34: 385-397
- Newell RC, Pye VI (1971) Quantitative aspects of the relationship between metabolism and temperature in the winkle *Littorina littorea* (L.). Comp Biochem Physiol 38B: 635-650
- Noack S (1980) Statistische Auswertung von Meß- und Versuchsdaten mit Taschenrechner und Tischcomputer. Walter de Gruyter, Berlin, S. 373-382
- von Oertzen JA, Schlungbaum G (1972) Experimentell-ökologische Untersuchungen über O<sub>2</sub>-Mangel und H<sub>2</sub>S-Resistenz an marinen Evertebraten der westlichen Ostsee. Beitr Meeresk 29: 79-91
- Paget TA, Fry M, Lloyd D (1988) The O<sub>2</sub>-dependence of respiration and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the parasitic nematode *Ascaridia galli*. Biochem J 256: 633-639
- Penzlin H (1989) Lehrbuch der Tierphysiologie. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, S. 58-69

- Pette D, Reichmann H (1982) A method for quantitative extraction of enzymes and metabolites from tissue samples in the milligram range. *J Histochem Cytochem* 30: 401-402
- Plaut WE, Cook M, Aogaichi T (1983) The subcellular location of isozymes of NADP-isocitrate dehydrogenase in tissue from pig, ox and rat. *Biochem Biophys Acta* 760: 300-308
- Pogson GH (1988) Constraints on the genetic process of biochemical adaptation. *Can J Zool* 66: 1139-1145
- Pörtner HO (1987a) Contribution of anaerobic metabolism to pH-regulation in animal tissues: theory. *J exp Biol* 131: 69-87
- Pörtner HO (1987b) Anaerobic metabolism and changes in acid-base status: Quantitative interrelationships and pH regulation in the marine worm *Sipunculus nudus*. *J exp Biol* 131: 89-105
- Pörtner HO (1989) The importance of metabolism in acid-base regulation and acid-base methodology. *Can J Zool* 67: 3005-3017
- Pörtner HO (1990) Determination of intracellular buffer values after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. *Resp Physiol* 81: 275-288
- Pörtner HO (1993) Multicompartmental analyses of acid-base and metabolic homeostasis during anaerobiosis: Invertebrate and lower vertebrate examples. in: Hochachka PW, Lutz PL, Sick T, Rosenthal M, van den Thillart G. (Hrsg.) *Surviving hypoxia: Mechanisms of control and adaptation*. CRC Press Inc., Boca Raton Fl., S.139-156
- Pörtner HO, Grieshaber MK (1993) Critical  $P_{O_2}(s)$  in oxyconforming and oxyregulating animals: gas exchange, metabolic rate and the mode of energy reduction. in: Bicundo JEPW (Hrsg.) *The vertebrate gas transport cascade - adaptations to environment and mode of life*. CRC Press, Boca Raton, S. 330-357
- Pörtner HO, Sartoris FJ (1998) Invasive studies of intracellular acid-base parameters: environmental and functional aspects. in: Taylor EW, Egginton S, Raven JA (Hrsg.) *Regulation of tissue pH in plants and animals: A reappraisal of current techniques*. Cambridge University Press, in press
- Pörtner HO, Surhold B, Grieshaber M (1979) Recovery from anaerobiosis of the lugworm, *Arenicola marina* L.: Changes of metabolite concentrations in the body-wall musculature. *J Comp Physiol* 133: 227-231
- Pörtner HO, Grieshaber MK, Heisler N (1984a) Anaerobiosis and acid-base status in marine invertebrates: effect of environmental hypoxia on extracellular and intracellular pH in *Sipunculus nudus* L. *J Comp Physiol B* 155: 13-20
- Pörtner HO, Kreuzer U, Siegmund B, Heisler N, Grieshaber MK (1984b) Metabolic adaption of the intertidal worm *Sipunculus nudus* to functional and environmental hypoxia. *Mar Biol* 79: 237-247
- Pörtner HO, Vogeler S, Grieshaber MK (1986a) Recovery from anaerobiosis in the intertidal worm *Sipunculus nudus*. I. Restoration of aerobic, steady-state energy metabolism. *J exp Biol* 122: 37-50

- Pörtner HO, Vogeler S, Grieshaber MK (1986b) Recovery from anaerobiosis in the intertidal worm *Sipunculus nudus*. II. Gas exchange and changes in the intra- and extracellular acid-base status. *J exp Biol* 122: 51-64
- Pörtner HO, Boutilier RG, Tang Y, Toews DP (1990) Determination of intracellular pH and Pco<sub>2</sub> after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. *Resp Physiol* 81: 255-274
- Pörtner HO, Branco LGS, Malvin GM, Wood SC (1994) A new function for lactate in the toad *Bufo marinus*. *J Appl Physiol* 76: 2405-2410
- Pörtner HO, Finke E, Lee PG (1996) Effective Gibbs free-energy change of ATP hydrolysis and metabolic correlates of intracellular pH in progressive fatigue of squid (*Lolliguncula brevis*) mantle muscle. *Am J Physiol* 271: R1403-R1414
- Pörtner HO, Hardewig I, Sartoris FJ, van Dijk PLM (1998) Acid-base balance, ion regulation and energetics in the cold. in: Pörtner HO, Playle RC (Hrsg.) *Cold ocean physiology*. Cambridge University Press, S. 88-120
- Prandle D, Lane A (1995) Stability of the annual temperature cycles in shelf seas. *J therm Biol* 20: 110-120
- Prosser CL (1991) Temperature. in: Prosser CL (Hrsg.) *Environmental and metabolic animal physiology*. Wiley-Liss, New York, S.109-165
- Reeves RB (1972) An imidazole alphastat hypothesis for vertebrate acid-base regulation: Tissue carbon dioxide content and body temperature in bullfrogs. *Resp Physiol* 14: 219-236
- Reipschläger A, Pörtner HO (1996) Metabolic depression during environmental stress: the role of extracellular versus intracellular pH in *Sipunculus nudus*. *J exp Biol* 199: 1801-1807
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J cell Biol* 17: 208
- Rose RL (1984) Genetic variation in the oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), in relation to environmental variation. *Estuaries* 7: 128-132
- Saavedra C, Zapata C, Guerra A, Alvarez G (1993) Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Mar Biol* 115: 85-95
- Sartoris FJ, Pörtner HO (1997) Temperature dependence of ionic and acid-base regulation in boreal and arctic *Crangon crangon* and *Pandalus borealis*. *J exp mar Biol Ecol* 211: 69-83
- Sarver SK, Landrum MC, Foltz DW (1992) Genetics and taxonomy of ribbed mussels (*Geukensia* spp.). *Mar Biol* 113: 385-390
- Sautin Yu Yu, Malinovskaya MV (1988) [Effect of temperature acclimation on NADP<sup>+</sup>-dependent dehydrogenase activity in the carp liver and some mechanisms of its regulation] *Ukrain biochim zh* 60: 29-34
- Schiedek D, Schöttler U (1990) The energy production of juvenile *Arenicola marina* (Polychaeta) under anoxia and hypoxic conditions. *Helv Wiss Meeresunters* 44: 135-145

- Schmidt H, Westheide W (1994) Isozymes and general protein patterns as taxonomic markers in the taxon Nephthyidae (Annelida, Polychaeta). *Mar Biol* 119: 31-38
- Schmidt R, Schiedek D, Schöttler U (1992) Der Einfluß der Temperatur auf den anaeroben Energiestoffwechsel von *Arenicola marina* L. (Polychaeta). *Verh Dtsch Zool Ges* 92: 167
- Schmidt-Nielsen K (1990) *Animal Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge
- Schöttler U, Bennet EM (1991) Annelids. in: Bryant C (Hrsg.) *Metazoan life without oxygen*. Chapman and Hall, London, S. 165-237
- Schöttler U, Wienhausen G, Zebe E (1983) The mode of energy production in the lugworm *Arenicola marina* at different oxygen concentrations. *J Comp Physiol* 149: 547-555
- Schöttler U, Surholt B, Zebe E (1984a) Anaerobic metabolism in *Arenicola marina* and *Nereis diversicolor* during low tide. *Mar Biol* 81: 69-73
- Schöttler U, Wienhausen G, Westermann (1984b) Anaerobic metabolism in the lugworm *Arenicola marina* L.: the transition from aerobic to anaerobic metabolism. *Comp Biochem Physiol* 79B: 93-103
- Schulz TKF, Kluytmans JH (1983) Pathway of propionate synthesis in the sea mussel *Mytilus edulis* L. *Comp Biochem Physiol* 75: 365-372
- Segal IH (1976) *Biochemical calculations*. John Wiley & Sons, New York, S. 203-204
- Seymour MK (1972) Effects of temperature changes on irrigation rate in *Arenicola marina*. *Comp Biochem Physiol* 43A: 553-564
- Sidell BD, Hazel JR (1987) Temperature affects the diffusion of small molecules through cytosol of fish muscle. *J exp Biol* 129: 191-203
- Siegmund B, Grieshaber MK (1983) Determination of meso-alanopine and D-strombine by high pressure liquid chromatography in extracts from marine invertebrates. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem* 364: 807-812
- Silbernagel S, Despopoulos A (1988) *Taschenatlas der Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 110-119
- Silvius JR, Read BD, McElhaney RN (1978) Membrane enzymes: Artifacts in Arrhenius plots due to temperatures dependence of substrate-binding affinity. *Science* 199: 902-904
- Singh SM, Green RH (1984) Excess of allozyme homozygosity in marine molluscs and its possible biological significance. *Malacologia* 25:569-581
- Sisson J, Sidell BD (1987) Effect of thermal acclimation on recruitment of muscle fibers in striped bass. *Physiol Zool* 60: 310-320
- Skibinski DOF, Beardmore JA, Cross TF (1983) Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae; Mollusca) in the British isles. *Biol J Linn Soc* 19: 137-183

## Literaturverzeichnis

---

- Sörlin T (1988) Floating behaviour in the tellnid bivalve *Macoma balthica* (L.). *Oecologia* 77: 273-277
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995) *Biometry*. Freeman & Co, New York, S. 887
- Somero GN (1978) Temperature adaptation of enzymes: optimization through structure-function compromises. *Ann Rev Ecol Syst* 9: 1-29
- Somero GN (1981) pH-temperature interactions on proteins: principles of optimal pH and buffer system design. *Mar Biol Lett* 2: 163-178
- Somero GN (1983) Environmental adaptation of proteins: strategies for the conservation of critical functional and structural traits. *Comp Biochem Physiol* 76A: 621-633
- Sommer A, Hummel H, Pörtner HO (1996) Adaptation of *Arenicola marina* to changing temperatures: a comparison of boreal and subpolar populations. *Verh dt Zool Ges* 89: 186
- Southward AJ (1958) Note on the temperature tolerance of some intertidal animals in relation to environmental temperatures and geographical distribution. *J mar Biol Ass UK* 37: 49-66
- Southward AJ, Hawking SJ, Burrows MT (1995) Seventy years' observation of changes in distribution and abundance of zooplankton and intertidal organisms in the western english channel in relation to rising sea temperature. *J therm Biol* 20: 127-155
- Storey KB (1996) Metabolic adaptations supporting anoxia tolerance in reptiles: recent advances. *Comp Biochem Physiol* 113B: 23-25
- Storey KB, Storey JM (1988) Freeze tolerance: constraining forces, adaptive mechanisms. *Can J Zool* 66: 1122-1127
- Storey KB, Storey JM (1990) Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Quarterly Rev Biol* 65: 145-174
- Stryer L (1990) *Biochemie*. Spektrum der Wissenschaft, Spektrum der Wissenschaft Verlag GmbH, Heidelberg, S. 406-409
- Suarez RK, Staples JF, Lighton JRB, West TG (1997) Relationships between enzymatic flux capacities and metabolic flux rates: Nonequilibrium reactions in muscle glycolysis. *Proc Natl Acad Sci* 94: 7065-7069
- Sugden PH, Newsholme EA (1975) Activities of citrate synthase, NAD<sup>+</sup>-linked and NADP<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenases, glutamate dehydrogenase, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in nervous tissues from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 150: 105-111
- Swofford DL, Selander RB (1981) Biosys-1: a Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J Heredity* 72: 281-283
- Tewari YB, Goldberg RN, Advani JV (1991) Thermodynamics of the disproportionation of adenosine 5'-diphosphate to adenosine 5'-triphosphate and adenosine 5'-monophosphate. II. Experimental data. *Biophys Chem* 40: 263-276

- Theede H (1972) Vergleichende ökologisch-physiologische Untersuchungen zur zellulären Kälteresistenz mariner Evertebraten. *Mar Biol* 15: 160-191
- Theede H (1973) Resistance adaptation of marine invertebrates and fish to cold. in: Wiesner W (Hrsg.) *Effects of temperature on ectothermic organisms*. Springer Verlag, Berlin, S. 249-269
- Theisen BF (1978) Allozyme clines and evidence of strong selection in three loci in *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) from Danish waters. *Ophelia* 17: 135-142
- Thiel H, Pörtner HO, Arntz WE (1996) Marine life at low temperatures - a comparison of polar and deep-sea characteristics. in: Uiblein F, Ott J, Stachowitsch M (Hrsg.) *Deep-sea and extreme shallow-water habitats: affinities and adaptations*. *Biosys Ecol Ser* 11: 183-219
- Thorpe JP (1983) Enzyme variation, genetic distance and evolutionary divergence in relation to levels of taxonomic separation. in: Oxford GS, Rollinson D (Hrsg.) *Protein polymorphism: Adaptive and taxonomic significance*. Academic Press, London, S. 131-152
- Toulmond A (1975) Blood oxygen transport and metabolism of the confined lugworm *Arenicola marina*. *J exp Biol* 63: 647-660
- Toulmond A (1977) Temperature-induced variations of blood acid-base status in the lugworm, *Arenicola marina* (L.) I. *in vitro* study. *Resp Physiol* 31: 139-149
- Toulmond A, Tchernigovtzeff C (1984) Ventilation and respiratory gas exchange of the lugworm *Arenicola marina* (L.) as a function of ambient pO<sub>2</sub> (20-700 Torr). *Respir Physiol* 57: 349-363
- Toulmond A, Dejours P (1994) Energetics of the ventilatory piston pump of the lugworm, a deposit feeding polychaete living in a burrow. *Biol Bull* 186: 213-220
- Trautschold I, Lamprecht W, Schweizer J (1989) UV-method with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. in: Bergmeyer HU (Hrsg.) *Methods of enzymatic analysis*, Vol VII, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, S. 346-357
- Treshnikov AF (1985) *Atlas of the Arctic*. GYGK (Soviet Ministry of Geodesy and Cartography), Moscow, S. 204
- Trevor JH (1978) The dynamics and mechanical energy expenditure of the polychaetes *Nephtys cirrosa*, *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina* during burrowing. *Estuar coast mar Sci* 6: 605-619
- Tschischka K, Abele D, Pörtner HO (1998) Mitochondrial oxyconformity and cold adaptation in the polychaete *Nereis pelagica* and the bivalve *Arctica islandica* from the Baltic and White Seas. (in Vorbereitung)
- Tyler S, Sidell BD (1984) Changes in mitochondrial distribution and diffusion distances in muscle of goldfish upon acclimation to warm and cold temperatures. *J exp Zool* 232: 1-9
- Urich K (1990) *Vergleichende Biochemie der Tiere*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, S. 614-619

- Väinölä R, Varvio S-L (1989) Biosystematics of *Macoma balthica* in northwestern Europe. in: Ryland JS, Tyler PA (Hrsg.) Reproduction, genetics and distributions of marine organisms. Olsen & Olsen, Fredensborg, S. 309-316
- Vernberg FJ, Vernberg WB (1964) Metabolic adaptation of animals from different latitudes. Helg wiss Meeresunters 9: 476-487
- Vetter RAH, Bucholz F (1998) Kinetics of enzymes in cold-stenothermal invertebrates. in: Pörtner HO, Playle RC (Hrsg.) Cold ocean physiology. Cambridge University Press, S. 190-211
- De Vlas J (1973) Migratie via getijstroom van jonge nonnetjes, *Macoma balthica* L., op en rond het Balgzand. Doktorarbeit, Nederland institut voor onderzoek der Zee, Yerseke
- Vockaert F, Zouros E (1989) Allozyme and physiological variation in the scallop *Placopecten magellanicus* and a general model for the effects of heterozygosity on fitness in marine molluscs. Mar Biol 103: 51-61
- Völkel S, Grieshaber MK (1992) Mechanisms of sulphide tolerance in the peanut worm, *Sipunculus nudus* (Sipunculidae) and in the lugworm *Arenicola marina* (Polychaeta). J Comp Physiol B 162: 469-477
- Völkel S, Grieshaber MK (1996) Mitochondrial sulfide oxidation in *Arenicola marina*: some evidence for alternative electron pathways. Euro J Biochem 35: 231-237
- de Wachter B, Sartoris FJ, Pörtner HO (1997) The anaerobic endproduct lactate has a behavioural and metabolic function in the shore crab *Carcinus maenas*. J exp Biol 200: 1015-1024
- Wallace JC (1972) Activity and metabolic rate in the shore crab, *Carcinus maenas* (L.). Comp Biochem Physiol 41A: 523-533
- Walsh J, Moon W (1982) The effect of temperature on intracellular pH of eel hepatopancreas: An in vitro test of the alphastat hypothesis. Physiologist 25 (4): 214
- Watson CL, Few WL, Panoë G, Jackson DC (1994) Lactic acidosis transiently increases metabolic rate of turtle myocytes. Am J Physiol 266: R1238-R1243
- Wells GP (1964) Temperature, taxonomic technique and the zoogeography of lugworms (Arenicolidae, Polychaeta). Helg Wiss Meeresunters 10: 404-410
- Werner B (1954) Eine Beobachtung über die Wanderung von *Arenicola marina* L. (Polychaeta sedentaria). Helg Wiss Meeresunters 5: 93-102
- Werner B (1956) Über die Winterwanderung von *Arenicola marina* (L.) (Polychaeta sedentaria). Helg Wiss Meeresunters 5: 353-378
- Wesenberg-Lund E (1953) The Zoology of East Greenland, bd 122, No 3, C.A. Reitzel Forlag, Kopenhagen
- Whiteley NM, Taylor EW (1993) The effects of seasonal variations in temperature on extracellular acid-base status in a wild population of the crayfish *Austropotamobius pallipes*. J exp Biol 181: 295-311



- Wiencke C, Bartsch I, Bischoff B, Peters AF, Breeman AM (1994) Temperature requirements and biogeography of antarctic, arctic and amphiequatorial seaweeds. *Botanica Marina* 37: 247-259
- Wienhausen G (1981) Anaerobic formation of acetate in the lugworm *Arenicola marina*. *Naturwiss* 68: 206
- Wolff WJ (1973) The estuary as a habitat. An analysis of data on the soft-bottom macrofauna of the estuarine area of the rivers Rhine, Meuse, and Scheldt. *Zoologische Verhandelingen*, No 126. Brill, Leiden, S. 242
- Wolff WJ (Hrsg.) (1983) Ecology of the Wadden Sea. Vol 1, Chap. 2: Hydrography. A A Balkema, Rotterdam, S. 24-33
- Wollenberger AO, Ristau O, Schoffa G (1960) Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung großer Gewebestücke. *Pflügers Arch.* 270: 399-412
- Wood SC, Gonzales R (1996) Hypothermia in hypoxic animals: mechanisms, mediators and functional significance. *Comp Biochem Physiol* 113B: 37-43
- Workman PL, Niswander JD (1970) Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *Am J Hum Gen* 22: 24-49
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420
- Zebe (1975) *In vivo*-Untersuchungen über den Glucose-Abbau bei *Arenicola marina* (Annelida, Polychaeta). *J Comp Physiol* 101: 133-145
- Zebe E, Grieshaber M, Schöttler U (1980) Biotopbedingte und funktionsbedingte Anaerobiose. *Biologie in unserer Zeit* 6: 175-182
- Zenkevitch L (1963) *Biology of the Seas of the U.S.S.R.*. George Allen & Unwin Ltd, London, S. 181-184
- Zielinski S, Pörtner H.O. (1996) Energy metabolism and ATP free-energy change of the intertidal worm *Sipunculus nudus* below a critical temperature. *J Comp Physiol B* 166: 492-500.
- Zielinski S, Lee PG, Pörtner HO (1998a) Metabolic performance of the squid *Lolliguncula brevis* (Cephalopoda) during hypoxia: an analysis of critical  $P_{O_2}$ . (in Vorbereitung)
- Zielinski S, Klein B, Finke E, Lee PG, Pörtner HO (1998b) Critical temperatures of cephalopods from different latitudes and enzyme activities in antarctic cephalopods. (in Vorbereitung)
- Zouros E (1987) On the relation between heterozygosity and heterosis: An evaluation of the evidence from marine mollusks. in: Rattazi MC, Scabdalijs JG, Whitt GS (Hrsg.) *Isozymes: Current topics in biological and medical research*. Vol 15 Genetics, Development, and Evolution. Liss Inc, New York, S. 255-270
- Zouros E, Mallet AL (1989) Genetic explanations of the growth/heterozygosity correlation in marine mollusks. in: Ryland JS, PA Tyler (Hrsg.) *Reproduction, genetics and distribution of marine organisms*. Olsen & Olsen, Fredensborg, S. 317-324

## **5. Anhang**

Liste der Publikationen und Erklärung über den von mir geleisteten Anteil

### **Publikation I**

Sommer A, Klein B, Pörtner H-O (1997) Temperature induced anaerobiosis in two populations of the polychaete worm *Arenicola marina* (L.).

**Journal of Comparative Physiology** 167: 25-35

Die diesen Untersuchungen zugrunde liegende Idee entstand in Zusammenarbeit mit den Koautoren. Die Experimente wurden zum größten Teil von mir durchgeführt. Die Untersuchungen an Tieren im freien Wasserkörper führte der Zweitautor durch. Ich habe die erste Version des Manuskriptes geschrieben, dessen Überarbeitung in Kooperation mit dem Drittautor erfolgte.

### **Publikation II**

Sommer A, Pörtner H-O (eingereicht) Mechanisms of metabolic cold compensation in the lugworm *Arenicola marina* (L.): comparison of a White Sea and a North Sea population.

**Journal of Comparative Physiology**

Der experimentelle Grundansatz wurde zusammen mit dem Koautor entworfen. Die Experimente und Messungen wurden von mir geplant und durchgeführt. Das Manuskript wurde von mir geschrieben, an dessen Überarbeitung der Koautor beteiligt war.

### **Publikation III**

Sommer A, Pörtner H-O (eingereicht) Exposure of *Arenicola marina* (L.) to extreme temperatures: adaptive flexibility of a boreal and a subpolar population.

#### **Marine Ecology Progress Series**

Die diesen Untersuchungen zugrunde liegende Idee entstand in Kooperation mit dem Koautor. Die Experimente wurden von mir geplant und durchgeführt. Ich habe die erste Version des Manuskriptes geschrieben, das dann zusammen mit dem Koautor überarbeitet wurde.

### **Publikation IV**

Hummel H, Sommer A, Bogaards RH, Pörtner H-O (1997) Variation in genetic traits of the lugworm *Arenicola marina*: temperature related expression of mitochondrial allozymes?

#### **Marine Ecology Progress Series 159: 189-195**

Der experimentelle Grundansatz wurde zusammen mit den Koautoren entworfen. Die Experimente und Messungen wurden von mir und dem Drittautor durchgeführt. Teile der ersten Fassung des Manuskriptes wurden von mir, der größere Teil vom Erstautor geschrieben. Die Überarbeitung erfolgte gemeinsam mit den Koautoren.

**Publikation I**

Temperature induced anaerobiosis in two populations of the  
polychaete worm *Arenicola marina* (L.)

A. Sommer, B. Klein, H.-O. Pörtner

(1997)

JOURNAL OF COMPARATIVE PHYSIOLOGY

167: 25-35

A. Sommer · B. Klein · H. O. Pörtner

## Temperature induced anaerobiosis in two populations of the polychaete worm *Arenicola marina* (L.)

Accepted: 20 August 1996

**Abstract** Temperature dependent changes in the mode of energy metabolism and in acid-base status were studied in the range from  $-1.7$  to  $26$  °C in two populations of *Arenicola marina* collected in summer as well as in winter from intertidal flats of the North Sea (boreal) and the White Sea (subpolar). Extreme temperatures led to an accumulation of anaerobic end products, indicating the existence of both a low and a high critical temperature, beyond which anaerobic metabolism becomes involved in energy production. In summer animals from the North Sea the high critical temperature was found at temperatures above  $20$  °C, and the low critical temperature below  $5$  °C. Latitudinal or seasonal cold adaptation lead to a more or less parallel shift of both high and low critical temperature values to lower values. Between critical temperatures intracellular pH declined with rising temperature. Slopes varied between  $-0.012$  and  $-0.022$  pH-units/°C. In summer animals from the North Sea, the slope was slightly less than in White Sea animals, but differences appeared independent of the season. However, slopes were no longer linear beyond critical temperatures. A drop in intracellular pH at low temperatures coincided with the accumulation of volatile fatty acids in the body wall tissue of North Sea animals. A failure of active pH<sub>i</sub> adjustment is held responsible for the reduced  $\Delta\text{pH}_i/\Delta T$  at temperatures above the high critical temperature. Extracellular pH was kept constant over the whole temperature range investigated. The ability of North Sea animals to adapt to temperatures beyond the critical temperature is poor compared to White Sea specimens. The larger range of temperature fluctuations at the White Sea is seen as a reason for the higher adaptational capacity of the subpolar animals. A hypothesis is proposed that among other mechanisms critical temperature values are set by an

adjustment of mitochondrial density and thus, aerobic capacity.

**Key words** Acid-base status · Alpha-stat regulation · Anaerobic metabolism · Cold adaptation · Critical temperatures · Intracellular pH · Temperature adaptation · Volatile fatty acids

**Abbreviations** PCA perchloric acid ·  $T_c$  critical temperature ·  $T_{c1}$  lower critical temperature ·  $T_{c11}$  high critical temperature ·  $\text{pH}_i$  intracellular ·  $\text{pH}_e$  extracellular pH

### Introduction

Animals are directly influenced by temperature since the rates of biochemical and physiological processes change and extreme temperatures or temperature variations can cause lethal injuries [reviews: Hochachka and Somero (1980); Prosser (1991)]. Recently, the effects of temperature on marine coastal ecosystems have come into focus owing to the process of global warming (Beukema 1979, 1992; Southward et al. 1995). An increase in mean global temperature is paralleled by a rise in the frequency and magnitude of thermal fluctuations. Therefore, animals must not only adapt to changing temperature ranges but also have to cope with extreme events. If the limits of adaptability are passed, the borders of distribution of a species will change.

Temperature effects on biochemical and physiological processes likely relate to changes in the protonation of macro- and micromolecules and therewith also to the acid-base status. The details of these interrelations are not very well understood. Based on his work with bullfrogs, Reeves (1972) postulated that pH in various body compartments changes with temperature at  $-0.017$  pH units per °C ( $\Delta\text{pH}/^\circ\text{C}$ ), such that the protonation of histidine imidazole residues in enzymes is kept constant ( $\alpha$ -stat hypothesis). The constant degree of protonation is interpreted to maintain the functional properties of a

A. Sommer · B. Klein · H.O. Pörtner (✉)  
Alfred-Wegener-Institut für Polar und Meeresforschung,  
Biologie I/Ökophysiologie, Columbusstrasse,  
D-27568 Bremerhaven, Germany.  
Tel.: +49-471/4831 307, Fax: +49-471/4831 149,  
e-mail: hpoertner@AWI-Bremerhaven.de

protein. However, values of  $\Delta\text{pH}/^\circ\text{C}$  differ between plasma and tissue and between different tissues. Therefore, Butler and Day (1993) concluded that intra- and extracellular pH are regulated independently. Since pH and metabolic regulation are interdependent processes (Pörtner 1989), the effects of temperature induced changes in intra- and extracellular acid-base status on metabolic regulation need to be addressed.

Most studies of the influence of temperature on metabolism have focussed primarily on  $\text{O}_2$  consumption. For many invertebrates it has been shown that an increase in temperature leads to a rising  $\text{O}_2$  consumption until a temperature threshold is surpassed, above which  $\text{O}_2$  consumption decreases (Kristensen 1983). For some invertebrates of the intertidal zone, the relationship between temperature and  $\text{O}_2$  consumption rate is peculiar in that the metabolic rate is independent of ambient temperature over a wide temperature range (Vernberg and Vernberg 1964; Newell and Pye 1970a,b).

The lugworm *Arenicola marina* can be found in the coastal area of nearly the whole northern hemisphere, from Siberia via Western Greenland to the Pacific coast of North America, from Iceland and Spitsbergen via the North Sea up to the Mediterranean (Hartmann-Schröder 1971; Wesenberg Lund 1953), where it builds L-shaped burrows in the sediment of the inter- or subtidal zone (Dörjes 1972). In this habitat *A. marina* is not only exposed to different climates – from polar to subtropical – but also to seasonal and diurnal temperature changes. The metabolic rate of the lugworm remains nearly constant between 10 and 20 °C and therefore a higher rate prevails at lower temperatures than expected from the reaction velocity-temperature relationship (Krüger 1964). On the other hand, the rate of ventilation, which is a main energy consuming process (Toulmond and Dejours 1994), is reduced at low temperatures (Seymour 1972). The question therefore arises whether the balance between the changes in  $\text{O}_2$  delivering mechanisms and in  $\text{O}_2$  consuming processes is disturbed beyond specific temperature values, which may lead to hypoxia in the tissue and the onset of anaerobic metabolism.

The present study was designed to compare the influence of temperature on the aerobic or anaerobic mode of energy metabolism in *A. marina* from boreal and subpolar regions, and to investigate how potential changes in metabolism are related to changes in acid-base status. Critical temperatures could be identified which were characterised by a transition to anaerobic metabolism. Therefore, the question was addressed as to whether an adaptation to changing temperatures and to latitudinal, climatic differences is associated with differences or a shift in those critical temperatures.

## Materials and methods

### Animals

Specimens of *Arenicola marina* were collected in 1994 from intertidal flats of the North Sea near Dorum, Germany ("North Sea

animals") and of the White Sea near Kartesh, Russia ("White Sea animals"). They were kept in the laboratory in aquaria filled with well-aerated natural brackish sea water (22‰) and a 10 cm bottom layer of sediment. Temperatures varied around 2 °C (winter) and between 10 and 12 °C (summer) ("North Sea animals") or was maintained at  $3.5 \pm 0.5$  °C and  $6.4 \pm 0.5$  °C ("White Sea animals"). These temperatures are referred to as control temperatures.

### Experimental procedure

The animals were moved to separate containers filled with sediment and sea water at control temperatures where they were allowed to construct burrows. After 24 h of preincubation, the containers were placed into aquaria containing sea water with different pre-set temperatures. North Sea animals collected in January were exposed to -1.7, 0, 2 (control temperature), 5, 10 or 17 °C, specimens collected in August or September to temperatures between -1.7 and 25 °C (North Sea) or 26 °C (White Sea) for 10 h.

In order to compare animals exposed to temperature changes while dwelling in sediment or unburied in open sea water, winter or summer animals from the North Sea were placed into a darkened 20-container filled with 2 or 10 °C sea water (in accordance with the control temperature maintained in holding tanks) without sediment for 24 h. Worms collected in winter were moved into aquaria containing aerated sea water at -1.5, 0, 2 (control temperature), 8 or 15 °C, where they remained for another 24 h. Summer animals kept at 10 °C were incubated at temperatures between 0 and 25 °C.

Long-term incubations of summer animals from the North and the White Seas took place at -1.7 °C, at control temperature or at temperatures 4 °C above the respective high  $T_c$  which had been determined in the previous experiments.

Coelomic fluid was obtained by opening the body wall at the 6th segment. The liquid was collected in ice-cold Eppendorf caps, which were immediately transferred into liquid  $\text{N}_2$  after closing. Head and tail were dissected, the body wall opened completely and gonads as well as the digestive tract removed by use of tissue paper. The body wall musculature was blotted dry and freeze clamped in liquid  $\text{N}_2$  by means of a precooled Wollenberger clamp (Wollenberger et al. 1960). Samples were stored in liquid  $\text{N}_2$  until analysed.

### Analyses

Analysis of intracellular pH was performed according to Pörtner et al. (1990). To reduce the period during which the tissue or tissue powder may become contaminated by  $\text{CO}_2$  condensation, the body wall musculature was only coarsely crushed in liquid  $\text{N}_2$  using mortar and pestle. The coarse powder was transferred into Eppendorf caps filled with 200  $\mu\text{l}$  of ice-cold medium consisting of 2  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  nitrilotriacetic acid and 160  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  potassium fluoride. After filling with medium, caps were sealed air bubble free, and final extraction took place in an ultrasonic water bath at -7 °C for 1 min. Coelomic fluid collected as described above was analysed for  $\text{pH}_i$  using a temperature-controlled capillary pH electrode (Radiometer, Copenhagen). Preliminary experiments had shown that freezing in liquid  $\text{N}_2$  prior to analysis had no influence on coelomic fluid pH.

For the determination of metabolite concentrations body wall tissue was powdered using a mortar cooled with liquid  $\text{N}_2$ . Approximately 300 mg of powder were added to an excess (3x) volume of precooled 0.6  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  PCA. An Ultra-Turrax T8 (Janke & Kunkel, FRG) was used to homogenize the tissue. Precipitated protein was removed by centrifugation. The extract was neutralized with 5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  potassium hydroxide and a 1:6-mixture of solid  $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{KHCO}_3$ . A second centrifugation withdrew precipitated potassium perchlorate.

After PCA extraction succinate was measured spectrophotometrically in an enzymatic test according to Beutler (1989). ATP according to Trauttschold et al. (1989) and ADP and AMP following Jaworek and Welsch (1989). Determination of inorganic

phosphate occurred as described by Pörtner (1990). A method modified from Hardewig et al. (1991) was used to measure the concentrations of the fatty acids propionate and acetate in PCA extracts, diluted with deionized water, using a Dionex BIO LC ion chromatograph (Idstein, FRG). Fatty acids were separated on an ion exclusion column (Dionex ICE-AS 1), using  $0.125 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  octanesulphonic acid as an eluent with a flow rate of  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  at  $40^\circ\text{C}$ . Peaks were monitored with a conductivity detector. A micro membrane suppressor (Dionex AMMS-ICE) regenerated with  $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  tetrabutylammonium hydroxide was used to decrease background conductivity. Calibration curves were linear between acetate and propionate concentrations of 10 and  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Alanopine and strombine were measured by ion exclusion chromatography using a High Performance Liquid Chromatograph (Beckman Instruments GmbH, Munich). Separation was carried out at  $45^\circ\text{C}$  on a Polyspher ARAC column for organic acids (Merck, Darmstadt), using  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  HCl as an eluent with a flow rate of  $0.6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . A conductivity detector was utilized to monitor the peaks. Standard opine solution for calibration was obtained by means of in vitro synthesis following a method modified from Siegmund and Grieshaber (1983).

#### Statistics

Data were checked for outliers beyond the  $r(95)$  limits of an  $r$ -distribution ( $r_A > r(95)$ ) using Nalimov's test (Noack 1980). Statistical significance of differences was tested at the  $p \leq 0.05$  level using analysis of variance (ANOVA) or Covariance (ANCOVA) and the post-hoc Student-Newman-Keuls test for independent samples. Data are given as means  $\pm$  standard deviation.

## Results

In summer animals from the North Sea, anaerobic metabolites accumulated at both very low and very high temperatures (Fig. 1a). The  $T_c$  for the onset of anaerobic metabolism were between  $2$  and  $5^\circ\text{C}$  (low  $T_c$ ) and above  $20^\circ\text{C}$  (high  $T_c$ ). Acetate concentrations in the body wall musculature increased significantly within 10 h after temperature was elevated to  $26^\circ\text{C}$  or lowered to  $-1.7^\circ\text{C}$ , while propionate concentration rose only with falling temperatures. An increase in the levels of both acetate and propionate, although not yet significant, became apparent when the incubation water was cooled from  $12^\circ\text{C}$  (control temperature) to  $2^\circ\text{C}$ . In North Sea animals collected in January the low  $T_c$  was found between  $0$  and  $2^\circ\text{C}$  (Fig. 1b) somewhat lower than in summer animals where the levels of acetate and propionate were already slightly elevated at  $2^\circ\text{C}$ . In these lugworms acetate accumulated to a level of  $1.30 \pm 0.37 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt ( $n = 3$ ) after a small temperature drop from  $2$  to  $-1.7^\circ\text{C}$  for 24 h. Thus, the rate of acetate accumulation at  $-1.7^\circ\text{C}$  did not differ significantly between animals collected in summer ( $0.07 \pm 0.03 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt  $\cdot \text{h}^{-1}$ ) and in winter ( $0.05 \pm 0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt  $\cdot \text{h}^{-1}$ ). In contrast to summer animals, no propionate accumulated in winter. Changes in succinate levels were insignificant in winter as well as in summer animals (Table 1).

Lugworms from the subpolar region of the White Sea showed a similar temperature dependence of the transition to anaerobic metabolism as North Sea lugworms. However, a low  $T_c$  could not be clearly identified, since

concentration changes were too small. Propionate and succinate concentrations reached significantly higher values when White Sea animals were exposed to  $26^\circ\text{C}$  for 10 h than in North Sea worms exposed to  $25^\circ\text{C}$  (Fig. 1a, c; Table 1). Overall, the high temperature threshold for the onset of anaerobic metabolism was found slightly above  $17^\circ\text{C}$  in animals from the White Sea. Changes in metabolite levels were already significant at  $21^\circ\text{C}$  in these animals, whereas North Sea specimens were still completely aerobic at  $20^\circ\text{C}$ . This observation suggests that the  $T_c$  is lower in White Sea animals than in lugworms from the North Sea.

Anaerobic metabolism occurred at both very high and very low temperatures also when North Sea animals were permanently exposed to normoxia in open sea

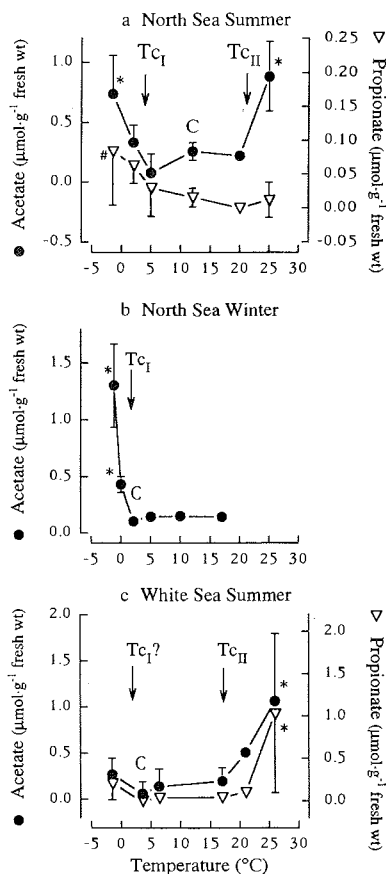
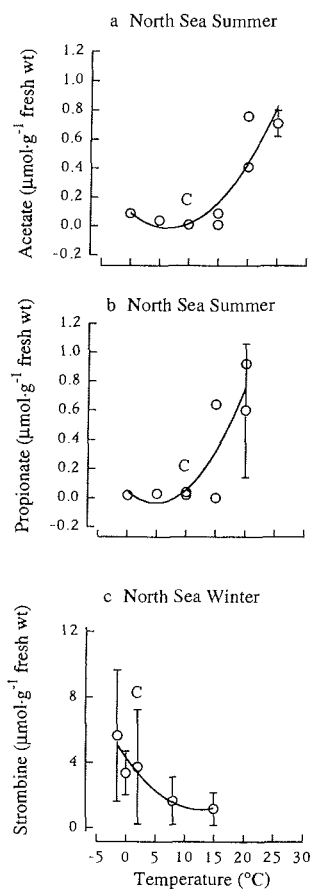


Fig. 1a-c Concentrations of volatile fatty acids in the body wall tissue of *Arenicola marina* dwelling in sediment at different temperatures: a North Sea summer animals, after 10 h; b North Sea winter animals, after 24 h; c White Sea animals, after 10 h. No propionate could be detected in the body wall tissue of winter animals from the North Sea ( $n = 5$ ; mean  $\pm$  SD; ● Acetate; ▽ Propionate; \* = significantly different from the control value; # = significantly different from the value at  $20^\circ\text{C}$ )

**Table 1** Succinate concentrations in the body wall of *Arenicola marina* dwelling in sediment after 10 h of exposure to different temperatures ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  fresh wt; mean  $\pm$  SD)

North Sea animals			White Sea animals		
Summer			Winter		
				Summer	
-1.7 °C	0.38 $\pm$ 0.28	(n = 4)	-1.7 °C	0.04 $\pm$ 0.07	(n = 4)
2 °C	0.53 $\pm$ 0.61	(n = 4)	0 °C	0.00 $\pm$ 0.00	(n = 3)
5 °C	0.01 $\pm$ 0.01	(n = 4)	2 °C	0.03 $\pm$ 0.05	(n = 4)
12 °C	0.03 $\pm$ 0.12	(n = 4)	5 °C	0.10 $\pm$ 0.10	(n = 5)
20 °C	0.03 $\pm$ 0.06	(n = 4)	10 °C	< 0.01	(n = 4)
25 °C	0.28 $\pm$ 0.37	(n = 5)	17 °C	$\leq$ 0.01	(n = 5)
				Summer	
				-1.7 °C	0.71 $\pm$ 0.62
				3.6 °C	0.47 $\pm$ 0.57
				6.4 °C	< 0.01
				17 °C	0.68 $\pm$ 0.54
				21 °C	2.45 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>
				26 °C	3.67 $\pm$ 2.30 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>significantly different from the control value



**Fig. 2a-c** Anaerobic metabolism in the body wall tissue of summer (a, b) and winter (c) animals from the North Sea after 24 h of incubation in sea water without sediment at different temperatures. Curves of regression (2<sup>nd</sup> order) were significant ( $r = 0.85$  for acetate,  $r = 0.71$  for propionate,  $r = 0.5$  for strombine; (a, b) data of individual animals, except for those collected at 0 °C; mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ; and 25 °C; mean  $\pm$  SD,  $n = 4$ ); (c) mean  $\pm$  SD;  $n = 6$  for 2 and -1.5 °C,  $n = 4$  for 0, 8 and 15 °C)

water (Fig. 2). After a temperature rise in the sea water from 10 °C (control temperature) to 25 °C, acetate and propionate concentrations in the body wall musculature of summer animals increased significantly. When the sea water was cooled to below 10 °C changes in volatile fatty acid levels were not indicative of a low  $T_c$ , however, the opine strombine rose in winter animals incubated for 24 h at -1.5 °C. When dwelling in sediment at low temperatures, there was only a non-significant trend for strombine to accumulate in winter animals (Table 2). The higher level of muscular activity in animals without sediment is probably the reason for the higher level of strombine, which is known to accumulate during functional anaerobiosis. Alanopine levels neither changed with temperature in animals incubated in open sea water nor in those dwelling in sediment (Table 2).

The concentrations of ATP, ADP and AMP remained unaffected by temperature in the body wall tissue of animals incubated in open sea water, while the level of inorganic phosphate ( $P_i$ ) rose slightly at higher temperatures (Fig. 3). Obviously, ATP-producing and ATP-consuming processes were more or less in equilibrium under those conditions.

Lugworms incubated in open sea water showed a linear  $pH_i$ /temperature relationship for the whole temperature range investigated (Fig. 4).  $pH_i$  fell with rising temperature in both summer ( $\Delta pH_i/\Delta t = -0.019$  pH-units/°C) and winter animals ( $\Delta pH_i/\Delta t = -0.012$  pH-units/°C) during 24 h. In contrast,  $pH_e$  showed no dependence on temperature. Therefore, the values of  $pH_i$  and  $pH_e$  became significantly different at higher temperature.

In animals dwelling in sediment intracellular  $pH$  declined with rising temperature only between 0 and 20 °C. Slopes varied around -0.020 pH-units/°C. In summer animals from the North Sea the slope of -0.016 pH-units/°C was slightly less than in White Sea animals with -0.019 pH-units/°C, but differences in slopes were not significant and appeared independent of the season and the length of the incubation period. With one exception, however, slopes were no longer linear beyond  $T_c$ . Only in White Sea animals was the slope seen to remain constant above  $T_{c1}$ . Below  $T_{c1}$  the  $pH_i$ /temperature



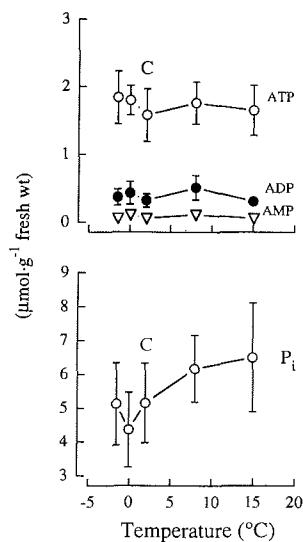
**Table 2** Opine concentrations in the body wall musculature of *Arenicola marina* (winter animals) dwelling in sediment or incubated in open sea water at different temperatures for 24 h. Strombine levels in animals incubated without sediment are depicted Fig. 2 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  fresh wt; mean  $\pm$  SD; none were significantly different from the control value at 2 °C)

In sediment Temperature	Strombine	Alanopine	In open sea water Temperature	Alanopine
-1.7 °C	1.35 $\pm$ 1.23 (n = 4)	0.22 $\pm$ 0.32 (n = 5)	-1.5 °C	0.54 $\pm$ 0.70 (n = 7)
0 °C	0.34 $\pm$ 0.19 (n = 4)	< 0.01 (n = 4)	0 °C	0.01 $\pm$ 0.01 (n = 4)
2 °C	0.24 $\pm$ 0.06 (n = 4)	< 0.01 (n = 5)	2 °C	1.22 $\pm$ 1.12 (n = 6)
5 °C	1.04 $\pm$ 0.71 (n = 4)	0.06 $\pm$ 0.05 (n = 4)	8 °C	0.30 $\pm$ 0.36 (n = 4)
10 °C	0.81 $\pm$ 0.28 (n = 4)	0.10 $\pm$ 0.02 (n = 4)	15 °C	0.16 $\pm$ 0.05 (n = 4)
17 °C	0.42 $\pm$ 0.25 (n = 5)	0.13 $\pm$ 0.02 (n = 4)		

relationship showed a significant deviation from linearity. In summer animals, e.g. from the North Sea,  $\text{pH}_i$  no longer rose but fell from  $7.25 \pm 0.01$  ( $n = 4$ ) at 5 °C to  $7.14 \pm 0.10$  ( $n = 5$ ) at -1.7 °C and in winter animals  $\text{pH}_i$  fell from  $7.38 \pm 0.03$  ( $n = 4$ ) at 0 °C to  $7.29 \pm 0.11$  ( $n = 5$ ) at -1.7 °C (Fig. 5). In lugworms from the North Sea the decrease in  $\text{pH}_i$  at low temperatures coincided with the accumulation of acetate in the body wall.

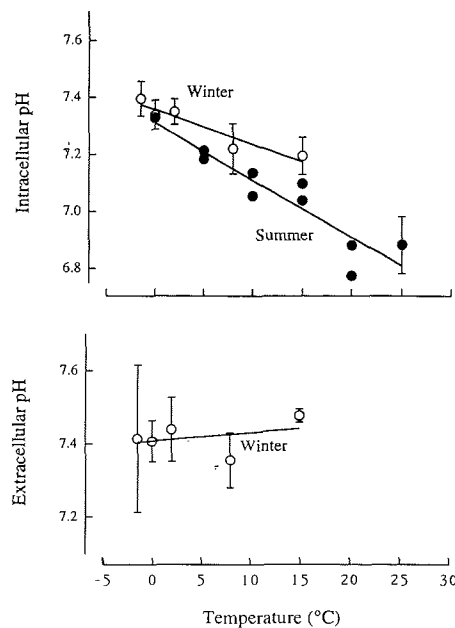
#### Latitudinal and seasonal adaptation

The presence and extent of adaptational processes during exposure to extreme temperatures was studied in summer animals from the North and the White Seas



**Fig. 3** Adenylate concentrations and the concentration of inorganic phosphate in body wall tissue of winter animals from the North Sea at different temperatures after a 24 h period of incubation in open sea water (mean  $\pm$  SD;  $n = 7$  for 2 and -1.5 °C,  $n = 4$  for 0, 8 and 15 °C; \* = significantly different from the control value at 2 °C)

during long-term incubations. The ability to adapt is interpreted to be associated with the reversal of an initial transition to anaerobiosis during long-term exposure to cold or heat. After a temperature drop from 12 to -1.7 °C the concentrations of succinate, propionate and acetate rose in the body wall musculature of lugworms from the North Sea, but acetate only reached a significantly higher level after 7 days. There were no significant changes in the levels of the other metabolites and in intracellular pH (Table 3). However, no adaptive reversal of acetate accumulation could be detected, although all animals survived cold exposure for 7 days, a



**Fig. 4** Intra- and extracellular pH in North Sea animals incubated for 24 h in aerated open sea water at different temperatures (summer: data from individual animals, except for those collected at 0 °C: mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ; and 25 °C: mean  $\pm$  SD,  $n = 4$ ; winter: mean  $\pm$  SD;  $n = 6$  for 2 and -1.5 °C,  $n = 4$  for 0, 8 and 15 °C)

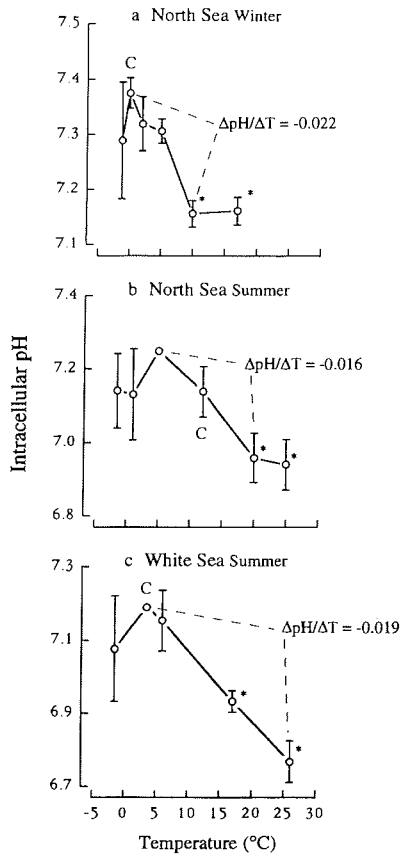


Fig. 5a-c Intracellular pH in animals from the North and the White Seas after 10 h of incubation in sediment at different temperatures ( $n = 5$ ; mean  $\pm$  SD; \* = significantly different from the control value)

period not unusual for weather and temperature conditions in the German Bight.

When sediment was warmed to 4 °C above the high  $T_c$ , for example from 12 to 25 °C in North Sea speci-

mens, these animals survived for only slightly longer than 1 day. Death of all animals occurred within 3 days. The respective metabolite data are summarized in Table 4. Succinate concentrations increased significantly during the first 4 h, acetate reached a significantly higher concentration after 10 h and a significant rise in propionate concentration occurred within 24 h. Intracellular pH dropped significantly during 4 h, after which this low value was kept constant.

In contrast to North Sea animals, all White Sea lugworms not only survived long-term exposure to high temperatures but also exhibited an adaptive reversal of acetate accumulation. After a temperature increase in the sediment from 6.4 to 21.0 °C (4 °C above the high  $T_c$ ) the concentrations of acetate in the body wall musculature of White Sea animals rose significantly only during the first 4 h and decreased again thereafter (Fig. 6). Finally, control values were reached within 3 days. Propionate concentrations showed no significant changes.  $pH_i$  dropped to far lower levels in White Sea than in North Sea specimens under these conditions within 4 h but started to rise again after 1 day at 21 °C.

## Discussion

### Characterisation of two critical temperatures

Incubation of *A. marina* dwelling in sediment at very low temperatures led to rising acetate and propionate concentrations in the body wall, which indicated that anaerobic metabolism became involved in energy production. However, no fatty acids were accumulated in lugworms kept at low temperatures in a large volume of sea water without sediment. This can be explained by passive diffusion of acetate and propionate into the larger volume of ambient water, whereas fatty acid efflux into the sea water was reduced in animals dwelling in sediment. Moreover, the degree of hypoxia was certainly less in animals dwelling in open sea water than in those exposed to low temperatures in the sediment. Nevertheless, the accumulation of strombine in the body wall indicates that anaerobiosis is induced at low tempera-

Table 3 Anaerobic metabolites and intracellular pH in the body wall of *Arenicola marina* ("North Sea animals") in summer after a temperature drop in the sediment from 12 to -1.7 °C (mean  $\pm$  SD)

Time (h)	Acetate	Propionate ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ fresh wt)	Succinate	$pH_i$
0	$0.26 \pm 0.08$ ( $n = 5$ )	$0.02 \pm 0.01$ ( $n = 5$ )	$0.10 \pm 0.12$ ( $n = 4$ )	$7.14 \pm 0.07$ ( $n = 5$ )
4	$0.19 \pm 0.10$ ( $n = 5$ )	$0.02 \pm 0.01$ ( $n = 5$ )	$1.45 \pm 1.28$ ( $n = 5$ )	$7.21 \pm 0.01$ ( $n = 5$ )
10	$0.74 \pm 0.32$ ( $n = 5$ )	$0.05 \pm 0.04$ ( $n = 4$ )	$0.38 \pm 0.28$ ( $n = 4$ )	$7.14 \pm 0.10$ ( $n = 5$ )
24	$0.53 \pm 0.73$ ( $n = 5$ )	$0.01 \pm 0.02$ ( $n = 5$ )	$0.25 \pm 0.34$ ( $n = 5$ )	$7.15 \pm 0.15$ ( $n = 5$ )
72	$0.73 \pm 0.36$ ( $n = 5$ )	$0.14 \pm 0.29$ ( $n = 5$ )	$0.51 \pm 0.42$ ( $n = 4$ )	$7.13 \pm 0.10$ ( $n = 5$ )
168	$1.00 \pm 0.64^a$ ( $n = 5$ )	$0.50 \pm 0.69$ ( $n = 5$ )	$2.42 \pm 3.14$ ( $n = 5$ )	$7.05 \pm 0.29$ ( $n = 5$ )

<sup>a</sup>Significantly different from the control value (0 h)

**Table 4** Anaerobic metabolites and intracellular pH in the body wall of *Arenicola marina* ("North Sea animals") in summer after a temperature rise in the sediment from 12 to 25 °C (mean  $\pm$  SD). Animals started to die after 24 h and none were alive after 3 days

Time (h)	Acetate	Propionate ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ fresh wt)	Succinate	pH <sub>i</sub>
0	0.26 $\pm$ 0.08 (n = 5)	0.02 $\pm$ 0.01 (n = 5)	0.10 $\pm$ 0.12 (n = 4)	7.14 $\pm$ 0.07 (n = 5)
4	0.16 $\pm$ 0.15 (n = 5)	0.08 $\pm$ 0.14 (n = 5)	0.79 $\pm$ 0.29 (n = 4)	6.92 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> (n = 5)
10	0.88 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup> (n = 5)	0.01 $\pm$ 0.03 (n = 5)	0.28 $\pm$ 0.37 (n = 5)	6.94 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup> (n = 5)
24	0.69 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup> (n = 5)	0.36 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup> (n = 5)	0.70 $\pm$ 0.42 (n = 4)	6.89 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup> (n = 5)

<sup>a</sup>Significantly different from the control value (0 h)

tures even in animals incubated in normoxic open sea water.

The low threshold for the onset of anaerobic metabolism was found at temperatures below 5 °C regardless of whether the animals were incubated in sediment or in open sea water. However, this threshold seemed to be lower in winter animals from the North Sea (below 2 °C) than in summer animals (between 2 and 5 °C). In summer animals from the White Sea a low threshold could not be significantly confirmed, but the trend of metabolite accumulation at -1.7 °C suggests that it may be present.

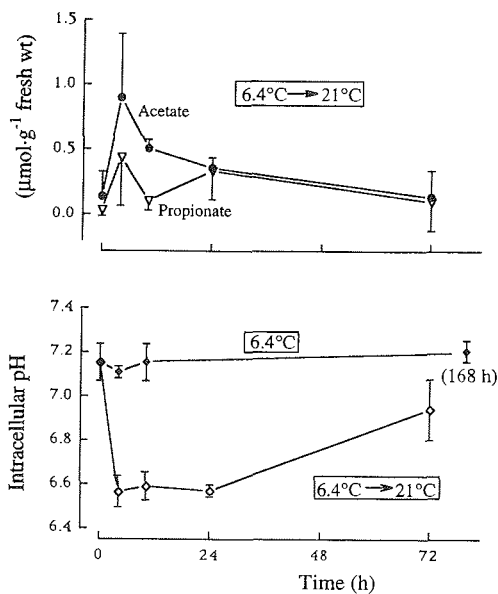
The relationship between temperature and the concentrations of free fatty acids in the body wall musculature can be described by a more or less U-shaped

curve. Therefore, exposure of *A. marina* to high temperatures is also linked to a transition to anaerobic metabolism. Available evidence indicates that the reason for the onset of anaerobic metabolism at both low and high temperatures is an insufficient uptake and distribution of O<sub>2</sub>.

Mangum (1978) reported that the haemoglobin in the blood of *A. marina* shows a Bohr effect and that blood pH rises with declining temperature. At low temperatures this would reduce O<sub>2</sub> transport via the blood since O<sub>2</sub> affinity rises with decreasing temperature. A 50% reduction in oxygen transport could be elicited by a temperature drop from 23 to 6 °C. Moreover, Baumfalk (1979) observed a decrease in peristaltic movements in *A. marina* with declining temperature and Seymour (1972) added that pulsation of the dorsal vein also diminishes. As a corollary, O<sub>2</sub> uptake and distribution in *A. marina* was not sufficient to meet O<sub>2</sub> demand at low temperatures even under normoxia, e.g. in well-oxygenated open sea water. This conclusion is supported by recent findings in *Sipunculus nudus* dwelling in sediment, where a decrease in ventilation resulted in insufficient O<sub>2</sub> supply and transition to anaerobiosis below a low T<sub>c</sub> (Zielinski and Pörtner 1996). However, the findings in *A. marina* are different from those in *Sipunculus nudus*, in that neither opiens nor volatile fatty acids accumulated in *Sipunculus nudus* incubated in cold open sea water. This may be due to the fact that *A. marina* possesses a circulatory system, whereas *Sipunculus nudus* does not, emphasising that insufficient ventilation and circulation of body fluids are setting the low T<sub>c</sub>.

At high temperatures in *A. marina* the temperature-dependent rise in energy demand can also not be met by the ventilatory and circulatory mechanisms of O<sub>2</sub> supply, especially, since ventilation rate drops sharply at high temperatures (Seymour 1972). Additional, anaerobic energy production is therefore required. Consequently, a low and a high critical temperature (T<sub>cI</sub> and T<sub>cII</sub>) can be defined, which are characterised by the onset of anaerobic metabolism (Fig. 1).

The question remains open why propionate accumulation is less in North Sea than in White Sea animals under temperature induced hypoxia. In lugworms from the North Sea, Schmidt et al. (1992) found a uniform Q<sub>10</sub> as high as 4 for propionate formation during extreme hypoxia in a temperature range from 2 to 20 °C.



**Fig. 6** Concentrations of volatile fatty acids and intracellular pH in the body wall tissue of *Arenicola marina* (White Sea animals) after an increase in temperature in the sediment from 6.4 to 21 °C (n = 5; mean  $\pm$  SD; ● Acetate; ▽ Propionate \* = significantly different from the control value at 0 h)

The high  $Q_{10}$  might be the reason for the low accumulation rate of propionate below  $T_{c1}$  in North Sea specimens, but this does not explain the higher rate of propionate accumulation in White Sea than in North Sea animals. It is hypothesised (see below) that lugworms from the White Sea possess a higher mitochondrial density in their body wall musculature, explaining elevated succinate and propionate levels and a higher anaerobic mitochondrial metabolic rate.

#### Acid-base status

Intracellular pH in the body wall musculature of lugworms incubated at different temperatures changed in accordance with the  $\alpha$ -stat hypothesis ( $\Delta p\text{H}_i/\Delta T = -0.017$ ) such that changes in the dissociation equilibria of functional groups in enzymes would be kept in a narrow range (Reeves 1972; Howell et al. 1973; Walsh and Moon 1982). Values of  $\Delta p\text{H}_i/\Delta T$  varied between  $-0.012$  and  $-0.022$ . Similar values are reported by Toulmond (1977) for the blood of *Arenicola* and some other marine invertebrates. However, coelomic fluid is thought to represent the true extracellular fluid of the tissues in *A. marina* and coelomic fluid pH remained constant, such that extra- and intracellular pH changed independently in *A. marina*. A significant pH difference between body wall tissue and coelomic fluid resulted at rising temperatures, but the pH difference was still in the typical range of 0.1–0.2 units for *A. marina* (Pörtner 1993). In contrast to *A. marina*,  $p\text{H}_i$  in different tissues of the brown trout *Salmo trutta* remained constant and unaffected by rising temperature, whereas blood pH declined (Butler and Day 1993). In the sipunculid *Sipunculus nudus*  $p\text{H}_e$  could be identified as a key parameter controlling metabolic rate (Reipschläger and Pörtner 1996). If this is also true for vertebrates and other invertebrates like *A. marina*, a constant  $p\text{H}_e$  at changing  $p\text{H}_i$  could be one reason why metabolic rate is relatively temperature independent in the lugworm between 10 and 25 °C, as well as between 2 and 5 °C (Krüger 1964). These questions certainly require further investigation.

In water breathing animals intra- and extracellular pH are adjusted by ion exchange mechanisms with some respiratory influence involved. Accordingly, the regulation of  $p\text{H}_i$  with changing temperature is attributed not only to a passive but also to an active component, which is high in eurythermal species (Sartoris and Pörtner 1996; van Dijk et al. 1996). However, the slope of the  $p\text{H}_i$ /temperature relationship deviates from linearity beyond the critical temperatures in animals dwelling in sediment, indicating transition to a non-steady state situation. On the one hand, gas exchange declines with reduced ventilation leading to respiratory acidification. On the other hand, anaerobic metabolic reactions influence pH by releasing or binding protons (Pörtner 1987a,b; Pörtner et al. 1984b, 1986a,b). For example, propionate and acetate accumulation cause pH to fall

and, actually, in North Sea animals an accumulation of volatile fatty acids at low temperatures was accompanied by the development of an acidosis, seen as a significant reduction in the temperature induced pH rise (Fig. 5). Above the high  $T_c$ , a failure of active  $p\text{H}_i$  adjustment might be a reason for the slope of  $\Delta p\text{H}_i/\Delta T$  being reduced in North Sea animals. This deviation from the linear slope beyond  $T_{cII}$  was not seen in lugworms from the White Sea. Here the higher extent of volatile fatty acid accumulation compared with North Sea specimens might have caused the higher extent of acidification above  $T_{cII}$ . Alternatively, cold adaptation increases the velocity and capacity of pH regulatory mechanisms (Sartoris and Pörtner 1996). The reason for the lower intracellular pH in the body wall musculature of White Sea than of North Sea lugworms (Fig. 1) remains obscure. Similar results were obtained in *Crangon crangon* from the White and the North Seas (Sartoris and Pörtner 1996). This may indicate that some animals exposed to latitudinal cold have a lower intracellular pH, possibly related to the increased mitochondrial contents (Pörtner et al. 1990).

#### Latitudinal and seasonal adaptation

In North Sea animals there were no seasonal differences in the rate of acetate accumulation at  $-1.7$  °C. It reached  $0.074 \pm 0.032 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ fresh wt} \cdot \text{h}^{-1}$  in summer animals and  $0.054 \pm 0.015 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ fresh wt} \cdot \text{h}^{-1}$  in winter. But the low  $T_c$ , beyond which acetate accumulated, seemed to be lower in lugworms collected in winter. In White Sea specimens the rate of acetate accumulation was  $0.027 \pm 0.017 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ fresh wt} \cdot \text{h}^{-1}$  and not significantly lower than in North Sea worms in both summer and winter. Rates of acetate accumulation at temperatures above the high  $T_c$  were also not significantly different in summer animals from the North Sea ( $0.088 \pm 0.029 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ fresh wt} \cdot \text{h}^{-1}$  at 25 °C) and the White Sea ( $0.051 \pm 0.007 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ fresh wt} \cdot \text{h}^{-1}$  at 21 °C) indicating similar capacities of acetate formation. From our data it can be concluded that a seasonal or latitudinal adjustment of the low or high  $T_c$  had no significant influence on the capacity of acetate formation.

The high threshold for the onset of anaerobic metabolism was found above 20 °C in summer animals from the North Sea. This temperature threshold is higher than in animals from the White Sea, where the  $T_c$  is close to 17 °C. Together with the finding that acetate concentrations reached significantly lower values in White Sea than in North Sea specimens at low temperatures, it seems that both low and high thresholds are shifted to lower temperatures in subpolar worms. The mechanism of the shift is still unknown, but the pattern of changes in succinate and propionate levels could support a general hypothesis as described below.

Concentrations of propionate and succinate were higher in White Sea than in North Sea animals after 10 h of incubation of high temperatures with a similar rate of

acetate formation. This means an increased flux through the succinate-propionate pathway and a higher rate of mitochondrial ATP production in subpolar compared to North Sea lugworms. Obviously, White Sea animals have a higher energy demand at high temperatures, which might be related to the smaller size of the subpolar worms (1–3 g compared to 5–8 g of North Sea animals). On the other hand, the number of mitochondria was demonstrated to increase during cold acclimation in fish muscle (Sisson and Sidell 1987; Egginton and Sidell 1989). The following hypothesis arises from the combined observations of lower  $T_{cI}$ s and higher mitochondrial ATP production in White Sea as compared to North Sea animals. Mitochondrial proliferation and the cost of maintenance of a higher number of mitochondria (e.g. maintenance of ion (proton) gradients) could lead to a rise (a higher “idling”) of basal metabolism. This would explain elevated rates of succinate and propionate formation at high temperatures in White Sea animals, which are living at lower annual mean temperatures than North Sea worms. The rise in aerobic capacity associated with an acclimation to cold may be required to shift  $T_{cI}$  to lower values, but owing to increased mitochondrial energy turnover, may cause  $T_{cII}$  to fall as well. Further study is required to investigate whether these predictions really hold true.

Long term incubations demonstrated that, within 1 week, North Sea animals were not able to adapt to temperatures beyond both high or low  $T_c$ . Rising concentrations of acetate, propionate and succinate were caused by a temperature change from 12 to 25 or  $-1.7^\circ\text{C}$ . The onset of anaerobic metabolism and the pH decrease as well as the death of animals incubated at temperatures above the high  $T_c$  indicate a time-limited situation, but the exact mechanisms limiting survival are not known. Death after cold stress linked to the onset of anaerobic metabolism, acidosis and the decrease in energy status below a possibly fatal level could be observed in *Sipunculus nudus* (Zielinski and Pörtner 1996).

In the White Sea mean monthly surface temperatures in the open parts of the Kandalaksha Guba increase from  $-1.5^\circ\text{C}$  in March to  $13.5^\circ\text{C}$  within 5 months and decrease again to  $0^\circ\text{C}$  during the subsequent 4 months (Zenkevitch 1963). The surface temperature in the southern North Sea changes from February to August from about 5 to  $16^\circ\text{C}$  (Wolff 1983; Prandle and Lane 1995). The temperature change near the coast is even larger in both areas. Therefore, the fluctuations which White Sea animals are exposed to, are larger than the ones experienced by North Sea worms. This is probably the reason for a higher capacity to adapt to temperature changes in the subpolar compared to the boreal worms. A correlation between geographical distribution and zonation on the shore and the tolerance to temperature changes was also found in intertidal barnacles and limpets (Southward 1958).

After elevating the temperature to a value  $4^\circ\text{C}$  above  $T_{cII}$ , White Sea animals not only survived, but were actually able to acclimate as indicated by the reversal of

an initial transition to anaerobiosis (Fig. 6). The concentrations of volatile fatty acids in the body wall tissue were highest after 4 h and declined again after 3 days.  $\text{pH}_i$  also rose again after an initial drop. The mechanisms of recovery remain unexplained. In the context of the above discussion it appears possible that the elevated mitochondrial content hypothesized above to prevail in White Sea specimens as a consequence of cold adaptation, may be reduced during long-term acclimation to high temperatures. Thereby, the cost of mitochondrial maintenance (“idling”) is reduced, compensating for the  $Q_{10}$  effect. In consequence,  $T_{cII}$  would be shifted to higher values. The limited ability to acclimate to temperature changes in North Sea specimens may therefore be linked to a limited capacity to adjust mitochondrial density. However, this hypothesis also requires further investigations.

## Conclusions

A low and a high  $T_c$  can be defined, both of which are characterised by the onset of anaerobic metabolism. Beyond each  $T_c$  energy demand cannot be met by adequate  $\text{O}_2$  supply owing to an insufficient capacity of ventilatory and circulatory mechanisms even under normoxia. Additional anaerobic energy production is required. Acetate is a main end product of temperature induced anaerobiosis in *Arenicola marina* both at low and high temperatures. Latitudinal or seasonal temperature adaptation lead to a more or less parallel shift of both  $T_c$  values.

Between critical temperatures intracellular pH in the body wall musculature of *A. marina* changes in accordance with the  $\alpha$ -stat hypothesis but slopes are no longer linear beyond the  $T_{cI}$ s. The deviation from linearity is caused by metabolic acidification or may be due to a failure of active  $\text{pH}_i$  adjustment.

The ability of North Sea animals to adapt to temperatures beyond the  $T_c$  is poor when compared to White Sea specimens. The larger range of temperature fluctuations at the White Sea is seen as a reason for the higher adaptational capacity of the subpolar animals. However, the exact mechanisms enabling survival under extreme temperature conditions and causing an adaptive shift of the  $T_c$  are unknown. A hypothesis is developed that, among other mechanisms,  $T_c$  is set by an adjustment of mitochondrial density and thus, aerobic capacity. The downward shift of the low  $T_c$  would require a rise in mitochondrial content, whereas an upward shift of the high  $T_c$  would call for a downward adjustment of mitochondrial density. With a more or less constant “distance” between the two  $T_c$  values, setting the adequate  $T_c$  requires a trade-off between cold or heat resistance and the associated rise or drop in energy turnover.

**Acknowledgements** This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (Po 278). Alfred-Wegener Institute publication no.: 1140

## References

- Baumfalk YA (1979) On the pumping activity of *Arenicola marina*. *Neth J Sea Res* 13: 422-427
- Beukema JJ (1979) Biomass and species richness of macrozoobenthic animals living on a tidal flat area in the Dutch Wadden Sea: effects of a severe winter. *Neth J Sea Res* 13: 203-223
- Beukema JJ (1992) Expected changes in the Wadden Sea benthos in a warmer world: lessons from periods with mild winters. *Neth J Sea Res* 30: 73-79
- Beutler H-O (1989) Succinate. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*, vol VII. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, pp 25-33
- Butler PJ, Day N (1993) The relationship between intracellular pH and seasonal temperature in the brown trout *Salmo trutta*. *J Exp Biol* 177: 293-297
- Dijk PLM van, Hardewig I, Pörtner HO (1996) The adjustment of intracellular pH during temperature changes in fish white muscle: contribution of passive and active processes. *Am J Physiol* (in press)
- Dörjes J (1972) Ökofaktoren. In: Reineck H-E (ed) *Das Watt*. Dr. Kramer Verlag, Frankfurt/Main p 17
- Egginton S, Sidell BD (1989) Thermal acclimation of subcellular structure of fish muscle. *Am J Physiol* 256: R1-R10
- Hardewig I, Addink ADF, Grieshaber MK, Pörtner HO, Thillart G van den (1991) Metabolic rates at different oxygen levels determined by direct and indirect calorimetry in the oxygen-conformer *Sipunculus nudus*. *J Exp Biol* 157: 143-160
- Hartman-Schröder G (1971) Annelida, Borstenwürmer, Polychaeta. In: Dahl M, Peus F (eds) *Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeressteile*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, pp 406-409
- Hochachka PW, Somero GN (1980) *Biochemical adaptation*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey
- Howell BJ, Rahn H, Goodfellow D, Herreid C (1973) Acid-base regulation and temperature in selected invertebrates as a function of temperature. *Am Zool* 13: 557-563
- Jaworek D, Welsch J (1989) Adenosin 5'-Diphosphate and Adenosin 5'-Monophosphate. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*, vol VII. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp 365-370
- Kristensen E (1983) Ventilation and oxygen uptake by three species of *Nereis* (Annelida: Polychaeta) II. Effects of temperature and salinity changes. *Mar Ecol Prog Ser* 12: 299-306
- Krüger F (1964) Versuche zur Abhängigkeit der Atmung von *Arenicola marina* (Annelides Polychaeta) von Größe und Temperatur. *Helgol Wiss Meeresunters* 10: 28-63
- Mangum CP (1978) Temperature adaptation. In: Mill PJ (ed) *Physiology of annelids*. Academic Press, London, New York, pp 447-478
- Newell RC, Pye VI (1970a) Seasonal changes in the effect of temperature on the oxygen consumption of the winkle *Littorina littorea* (L.) and the mussle *Mytilus edulis* (L.). *Comp Biochem Physiol* 34: 367-383
- Newell RC, Pye VI (1970b) The influence of thermal acclimation on the relationship between oxygen consumption and temperature in *Littorina littorea* (L.) and the mussle *Mytilus edulis* (L.). *Comp Biochem Physiol* 34: 385-397
- Noack S (1980) Statistische Auswertung von Meß- und Versuchsdaten mit Taschenrechner und Tischcomputer. Walter de Gruyter, pp 373-382
- Pörtner HO (1987a) Contribution of anaerobic metabolism to pH-regulation in animal tissues: theory. *J Exp Biol* 131: 69-87
- Pörtner HO (1987b) Anaerobic metabolism and changes in acid-base status: quantitative interrelationships and pH regulation in the marine worm *Sipunculus nudus*. *J Exp Biol* 131: 89-105
- Pörtner HO (1989) The importance of metabolism in acid-base regulation and acid-base methodology. *Can J Zool* 67: 3005-3017
- Pörtner HO (1990) Determination of intracellular buffer values after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. *Respir Physiol* 81: 275-288
- Pörtner HO (1993) Multicompartmental analyses of acid-base and metabolic homeostasis during anaerobiosis: Invertebrate and lower vertebrate examples. In: Hochachka PW et al. (eds) *Surviving hypoxia: mechanisms of control and adaptation*. CRC Press, Boca Raton, pp 139-156
- Pörtner HO, Grieshaber MK, Heisler N (1984a) Anaerobiosis and acid-base status in marine invertebrates: effect of environmental hypoxia on extracellular and intracellular pH in *Sipunculus nudus* L. *J Comp Physiol B* 155: 13-20
- Pörtner HO, Kreuzer U, Siegmund B, Heisler N, Grieshaber MK (1984b) Metabolic adaptation of the intertidal worm *Sipunculus nudus* to functional and environmental hypoxia. *Mar Biol* 79: 237-247
- Pörtner HO, Vogeler S, Grieshaber MK (1986a) Recovery from anaerobiosis in the intertidal worm *Sipunculus nudus*. I. Restoration of aerobic, steady-state energy metabolism. *J Exp Biol* 122: 37-50
- Pörtner HO, Vogeler S, Grieshaber MK (1986b) Recovery from anaerobiosis in the intertidal worm *Sipunculus nudus*. II. Gas exchange and changes in the intra- and extracellular acid-base status. *J Exp Biol* 122: 51-64
- Pörtner HO, Boutilier RG, Tang Y, Toews DP (1990) Determination of intracellular pH and  $P_{CO_2}$  after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. *Respir Physiol* 81: 255-274
- Prandel D, Lane A (1995) Stability of the annual temperature cycle in shelf seas. *J Therm Biol* 20: 110-120
- Prosser CD (ed) (1991) *Environmental and metabolic animal physiology*. Wiley-Liss, New York, pp 109-165
- Reeves RB (1972) An imidazole alaphastat hypothesis for vertebrate acid-base regulation: tissue carbon dioxide content and body temperature in bullfrogs. *Respir Physiol* 14: 219-236
- Reipschläger A, Pörtner HO (1996) Metabolic depression during environmental stress: the role of extra- versus intracellular pH in *Sipunculus nudus*. *J Exp Biol* (in press)
- Sartoris FJ, Pörtner HO (1996) Temperature dependence of ionic and acid-base regulation in boreal and arctic *Crangon crangon* and *Pandalus borealis* (submitted)
- Schmidt R, Schiedek D, Schöttler U (1992) Der Einfluß der Temperatur auf den anaeroben Energiestoffwechsel von *Arenicola marina* L. (Polychaeta). *Verh Dtsch Zool Ges*: 167
- Seymour MK (1972) Effects of temperature changes on irrigation rate in *Arenicola marina*. *Comp Biochem Physiol* 43A: 553-564
- Siegmund B, Grieshaber MK (1983) Determination of meso-alanopine and D-strombine by high pressure liquid chromatography in extracts from marine invertebrates. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem* 364: 807-812
- Sisson J, Sidell BD (1987) Effect of thermal acclimation on recruitment of muscle fibers in striped bass. *Physiol Zool* 60: 310-320
- Southward AJ (1958) Note on the temperature tolerance of some intertidal animals in relation to environmental temperatures and geographical distribution. *J Mar Biol Assoc UK* 37: 49-66
- Southward AJ, Hawking SJ, Burrows MT (1995) Seventy years observation of changes in distribution and abundance of zooplankton and intertidal organisms in the western english channel in relation to rising sea temperature. *J Therm Biol* 20: 127-155
- Toulmond A (1977) Temperature-induced variations of blood acid-base status in the lugworm *Arenicola marina* (L.): *in vitro* study. *Respir Physiol* 31: 139-149
- Toulmond A, Dejours P (1994) Energetics of the ventilatory piston pump of the lugworm, a deposit feeding polychaete living in a burrow. *Biol Bull* 186: 213-220
- Trauttschold I, Lamprecht W, Schweizer J (1989) UV-method with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*, vol VII. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp 346-357
- Vernberg FJ, Vernberg WB (1964) Metabolic adaptation of animals from different latitudes. *Helgol Wiss Meeresunters* 9: 476-487

- Walsh J, Moon W (1982) The effect of temperature on intracellular pH of eel hepatopancreas: an *in vitro* test of the alphastat hypothesis. *Physiologist* 25: 214
- Wesenberg-Lund E (1953) The zoology of East Greenland, bd 122, No 3. C.A. Reitzel Forlag, Kopenhagen
- Wollenberger AO, Ristau O, Schoffa G (1960) Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung großer Gewebestücke. *Pfügers Arch* 270: 399-412
- Wolff WJ (ed) (1983) Ecology of the Wadden Sea, vol 1, Chap 2. Hydrography. A A Balkema, Rotterdam, pp 24-33
- Zenkevitch L (1963) Biology of the Seas of the U.S.S.R. Allen & Unwin, London, pp 179-192
- Zielinski S, Pörtner H.O. (1996) Energy metabolism of the intertidal worm *Sipunculus nudus* below a critical temperature. *J Comp Physiol* (in press)

Communicated by G. Heldmaier

## **Publikation II**

Mechanisms of metabolic cold compensation in the lugworm  
*Arenicola marina* (L.): comparison of a White Sea and a North  
Sea population

A. Sommer, H.-O. Pörtner

(eingereicht)

JOURNAL OF COMPARATIVE PHYSIOLOGY



**Mechanisms of metabolic cold compensation in the lugworm *Arenicola marina* (L.): comparison of a White Sea and a North Sea population.**

A. Sommer and H. O. Pörtner

Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Biologie I/ Ökophysiologie,  
Columbusstrasse, 27568 Bremerhaven, F.R.G.

Correspondence address:

Prof. Dr. H.O. Pörtner  
Alfred-Wegener-Institut  
für Polar- und Meeresforschung  
Biologie I/Ökophysiologie  
Columbusstrasse  
27568 Bremerhaven  
Germany

Telephone: (471) 4831307 Fax: (471) 4831149

e-mail: hoertner@awi-bremerhaven.de

## Abstract

The mechanisms, which define and adjust critical temperatures to the environmental temperature regime, were studied in two populations of the polychaete worm *Arenicola marina* from the North Sea (boreal) and the White Sea (subpolar).

Adaptation to lower mean annual temperatures is reflected by a higher density of mitochondria in *Arenicola marina* from the White Sea as well as by a higher aerobic capacity of individual mitochondria. In the subpolar animals 2.4 times more mitochondria per  $\mu\text{m}^2$  muscle cell cross section were found, which correlates with a higher oxygen consumption rate of White Sea compared to North Sea animals. Moreover, mitochondria from White Sea lugworms are characterised by a higher activity of cytochrome c-oxidase as well as by a NADP dependent isocitrate dehydrogenase with higher activities at high temperatures and lower values for the activation energy at low temperatures. These findings emphasize that a downward shift of the low critical temperature during cold adaptation implies a rise in oxygen demand and, in consequence, a concomitant lowering of the high tolerance threshold.

Within the range of thermal tolerance metabolic rate is quite temperature insensitive in lugworms of both populations. Nevertheless, below the low critical temperature oxygen consumption rate of White Sea animals rises. Acetate, which accumulates at low temperatures in the body wall tissue, is able to elicit a rise in oxygen consumption rate in cold acclimated lugworms. The increase in metabolic rate is discussed to reflect the enhanced aerobic capacity and ability of White Sea animals to survive low temperatures.

*Key Words:* Aerobic capacity, *Arenicola marina*, Cold adaptation, Cytochrome c-oxidase, NADP dependent isocitrate dehydrogenase, Metabolic rate, Mitochondria, North Sea, Polychaeta, Temperature, White Sea

## Introduction

During the Pleistocene glaciations and particularly during the maximum of the Würm Glaciation, the White Sea ceased to exist as a body of water, as its basin was filled entirely by ice (Badyukov 1979). After the ice began to melt, first glacial lakes were formed and only thereafter began to communicate with the ocean waters from the North Polar Sea. But not before the second half of the Atlantic time (about 5.5 thousand years ago) the White Sea became free of ice and a purely marine stage developed (Badyukov 1979). During the glaciation the entire shelf of the West Eurasian and American Arctic was covered by ice and outlet glaciers even descended deep into the ocean. Therefore, shallow water benthos was driven away not only from the White Sea, but from the whole West Eurasian Arctic (Nesis 1983). The resettlement of the White Sea occurred, therefore, with animals from the Arctic deep sea and with species from more southern areas of the North Atlantic (Govberg 1973, Nesis 1983).

For species from the more southern regions, the conquest of new (free) areas in the White Sea was combined with the exposure to more extreme temperature conditions. Not only the mean annual temperature but also the minimum temperature in winter was and is still lower, and temperature changes in the short ice-free period of the White Sea are much faster than in the southern North Atlantic or in the North Sea (Zenkevitch 1963, Wolff 1983, Prandle and Lane 1995). Since temperature influences the rates of biochemical and physiological processes, such extreme temperatures or temperature changes can cause lethal injuries (for review see: Hochachka and Somero 1984, Prosser 1991). Therefore, successful settlement and reproduction under the new temperature conditions of the White Sea required adequate adaptation.

In ectothermic vertebrates cold adaptation comprises a rise in aerobic capacity, which permits to maintain cell functions in spite of low temperatures (for review see: Prosser 1991, Guderley 1998, Pörtner *et al.* 1998). Associated processes are adjustments in enzyme capacities (Crockett and Sidell 1990, Guderley 1990, Dahlhoff and Somero 1993, Foster *et al.* 1993), an increase in mitochondrial or capillary densities (Campbell and

Davies 1978, Sisson and Sidell 1987, Guderley and Blier 1988, Eggington and Sidell 1989, Londraville and Sidell 1990), changes in mitochondrial structure (Gaebel and Roots 1989, Archer and Johnston 1991) or alterations in membrane compositions (Prosser 1991, Miranda and Hazel 1996). In contrast to vertebrates, studies on invertebrates focussed primarily on freeze resistance or mechanisms of freeze avoidance (for review see: Aarset 1982, Storey and Storey 1988, Loomis 1995). Comparatively little is known about the adjustment of aerobic metabolism with cold adaptation in marine invertebrates.

Sommer *et al.* (1996, 1997) studied the capacity and constraints of temperature adaptation in the lugworm *Arenicola marina*. It is thought, that this polychaete, which is distributed over the whole West Eurasian and American Arctic, from the Siberian Sea to the Pacific coast of North America (Wesenberg-Lund 1953, Hartmann-Schröder 1971), has immigrated the White Sea from temperate Atlantic waters. Therefore, the worm is a suitable model to study cold adaptation in marine, eurythermal invertebrates not only to harsh winter conditions (seasonal cold) but also to life at lower mean annual temperatures (latitudinal cold). Previously, a low and a high critical temperature ( $T_c$ ) were identified, which are characterised by the onset of anaerobic metabolism (Sommer *et al.* 1997). Owing to an insufficient capacity of ventilatory and circulatory mechanisms beyond each  $T_c$ , the energy demand of the lugworm could not be met by adequate oxygen supply, and additional anaerobic energy production was required. Comparisons of North Sea with White Sea lugworms as well as of Winter with Summer animals revealed that latitudinal or seasonal temperature adaptations led to a more or less parallel shift of both  $T_c$ 's (Sommer *et al.* 1997).

The present study was designed to investigate the mechanisms, which define the  $T_c$ 's and which adjust the critical thresholds to the environmental temperature regime. Therefore, in comparison with lugworms from the North Sea, specimens from the White Sea were examined for their rate of aerobic metabolism, for mitochondrial densities in the muscle tissue and for the activity of key enzymes of aerobic metabolism. The comparison is restricted to summer animals from both populations.

## Materials and Methods

### *Animals*

Specimens of *Arenicola marina* were collected from intertidal flats of the North Sea near Dorum, Germany ("North Sea animals") and of the White Sea near Kartesh, Russia ("White Sea animals") near low water line. The boreal animals had a size of 5 to 8 g, compared to 1 to 3 g of the subpolar worms. Animals for the analysis of oxygen consumption and enzyme activity were kept in the laboratory in aquaria filled with well aerated natural brackish sea water (22 ‰ salinity, equivalent to natural conditions) and a 10 cm bottom layer of sandy sediment. Temperature varied around  $11 \pm 1$  °C ("North Sea animals") or was maintained at  $6 \pm 0.5$  °C ("White Sea animals").

### *Oxygen consumption measurements*

Measurements were performed in the dark with worms inhabiting slightly bent Plexiglas tubes filled with heat-sterilised, natural sediment. The water flow through the tube was set to values between 2 and 3 ml·min<sup>-1</sup> by means of a peristaltic pump Perimax 12 (Spetec, Erdingen). Oxygen consumption was recorded continuously by a Clark Po<sub>2</sub>-electrode (Eschweiler, Kiel). The experiments started at 10 °C and temperature was lowered to -3 °C or was elevated to 25 °C in a stepwise procedure. After an acclimation period of up to 12 h for each temperature, oxygen consumption was recorded and the mean rate calculated for a period of 3 h. To prevent errors due to oxygen uptake by bacteria or the Po<sub>2</sub>-sensor, oxygen concentrations in the water were monitored at each temperature in experiments with tubes containing sediment only.

In another experimental set-up, measurements started directly at  $1 \pm 0.5$  °C and the oxygen tension in the aerated sea water was reduced close to the expected critical partial pressure (P<sub>cO<sub>2</sub></sub>), to  $25.7 \pm 0.2$  Torr, by mixing air and N<sub>2</sub> gas (Messer Griesheim,

Düsseldorf) using a gas mixing pump 2M303/a-F (Wösthoff, Bochum). An acclimation period of about 3 hours was followed by the analysis of the rate of oxygen consumption of individual worms. After another 3 hours sodium acetate (final concentration  $7 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) was added to the sea water and changes in the oxygen uptake were monitored.

#### *Enzyme activities*

The activity of cytochrome c-oxidase (CYTOX; EC 1.9.3.1.) was assayed according to a method modified from Hand and Somero (1983). After decapitation of the worms, tails were removed and longitudinal incisions were made in the body wall musculature to open the animals. The digestive tracts and gonads were removed. The body wall tissues of 3-7 animals (about 1.5 g) were pooled and washed in ice-cold extraction buffer ( $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  potassium phosphate buffer, pH = 7.4). The tissue was minced and homogenised using a Teflon pestle and glass tube with a Heidolph RZR 1 drive and speed controller (Heidolph, Kehlheim). The homogenate was centrifuged twice at  $2,000 \text{ g}$  for 15 min and the supernatant of both centrifugation steps were pooled. For reversible acid precipitation of mitochondrial proteins  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  acetic acid was added to the supernatant (pH = 5.6). Activity of cytochrome c-oxidase was determined in the pellet after a third centrifugation at  $5,000 \text{ g}$  for 15 min. The assay was performed with this resuspended precipitate. The reaction mixture consisted of  $200 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  potassium phosphate buffer (pH = 6.0) with  $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  EDTA and 0.2 % reduced cytochrome c. The reaction was initiated by adding the enzyme. Oxidation of reduced cytochrome c was monitored by following the decrease in absorption at 550 nm at controlled temperatures between 0 and 45 °C (Spectrophotometer DU 7400, Beckman Instruments, Fullerton, California).

A method by Sugden and Newsholme (1975) was used to determine the activity of NADP dependent isocitrate dehydrogenase (IDH; EC 1.1.1.42) in homogenates prepared from muscle tissue. Approximately 300 mg of body wall tissue were carefully rinsed with cold sea water and plotted dry by the use of tissue paper before they were

minced and homogenised using a Teflon pestle and glass tube (see above) in 5 ml ice-cold extraction buffer. The latter consisted of 50 mmol·l<sup>-1</sup> triethanolamine, 1 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA, 2 mmol·l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> and 30 mmol·l<sup>-1</sup> mercaptoethanol adjusted with KOH to pH = 7.5. Mitochondria were ruptured by sonication for 2 x 25 s before the homogenate was centrifuged for 10 min at 600 g to withdraw cellular debris. Activity in the supernatant was assayed by following changes in absorption at  $\lambda = 339$  nm. Temperatures varied between 0 and 30 °C (Spectrophotometer DU 7400, Beckman Instruments, Fullerton, California). The assay medium consisted of 70 mmol·l<sup>-1</sup> TRIS hydrochloride buffer (pH = 7.5) with 1 mmol·l<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>, 8 mmol·l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> and NADP concentrations between 0.5 and 2500  $\mu$ mol·l<sup>-1</sup>. The reaction was initiated by adding 22.5 mmol·l<sup>-1</sup> citrate/ 3 mmol·l<sup>-1</sup> D,L-isocitrate.

#### *Measurement of the preferred temperature range*

The preferred temperature range was identified under infrared and red light by the use of a temperature gradient, constructed in an aquarium, 2 m long and 0.25 m wide, filled with 70 l of natural brackish sea water (22 ‰) and an 0.5 cm bottom layer of sediment. The temperature gradient along the length of the aquarium was set to a range between 4 to 22 or 30 °C. Maximum temperature was reduced from 30 to 22 °C after all animals had died in the first 3 runs by choosing the highest available temperature. 5 North Sea animals were placed simultaneously into the aquarium at about 10 °C. Movements of the lugworms were monitored for 3 days using a TV-Camera CCD 100S (Scharp, Dreieich) connected to a Panasonic Time Lapse Video Cassette Recorder AG 6730 and a Panasonic Video Monitor BT-H1450y (Matsushita Electric Industrial Co., Osaka).

### *Electron microscopy*

The tissue of the body wall musculature was obtained from freshly collected animals. Head and tail were dissected, the animals opened completely and gonads as well as digestive tracts removed by use of tissue paper. The body wall tissue was cut into cubes of about 1 mm<sup>3</sup> with a sharp blade. Samples were fixed by immersion in 0.1 mol·l<sup>-1</sup> sodiumphosphate buffer containing 2.5 % (v/v) glutaraldehyde (pH = 7.2). Fixation was allowed to proceed for 30 min. Tissue was washed directly after fixation and periodically during storage time with cold sodiumphosphate buffer (0.1 mol·l<sup>-1</sup>) without glutaraldehyde. Samples were stored at 4 °C in the dark until further analysis. Then, post fixation was carried out with phosphate buffer containing 2 % (w/v) osmium tetroxide, followed by dehydration in acetone at increasing concentrations (40-100 % (v/v)) and immediate embedding in epoxide resin. Ultra thin sections (50-70 nm) were stained with uranyl acetate for 6 min and, subsequently, with lead citrate (Reynolds 1963) for 4 min. Sections were viewed on 200 mesh grids with a transmission electron microscope CEM 902 (Carl Zeiss, Oberkochen). Cross sections of the muscle cells were chosen at random, mitochondria counted and the area of this cross section evaluated using an area-weighting method. This method was preferred to the point-sampling technique, since mitochondrial distribution in the muscle cells was patchy.

### *Statistics*

Data were checked for outliers beyond the r(95) limits of an r-distribution ( $r_A > r(95)$ ) using Nalimov's test (Noack 1980). Statistical significance of differences was tested at the  $p \leq 0.05$  level using analysis of variance (ANOVA) or covariance (ANCOVA) and the post-hoc Student-Newman-Keuls test for independent samples. If not indicated otherwise, data are given as means  $\pm$  standard deviation.



## Results

### *Temperature dependence of metabolic rate*

The influence of temperature on metabolic rate was investigated by oxygen consumption measurements in whole animals during exposure to temperatures from -3 to 25 °C. When temperature was lowered in a stepwise procedure from 10 to -3 °C oxygen consumption decreased in North Sea animals from  $1.31 \pm 1.01 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. (means  $\pm$  S.D.;  $n = 14$ ) to a minimum value of  $0.50 \pm 0.55 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. ( $n = 5$ ), (Fig. 1). With rising temperatures oxygen consumption increased to a value of  $3.35 \pm 2.44 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. ( $n = 4$ ) at 25 °C. However, the increase in metabolic rate with rising temperatures was not uniform.  $Q_{10}$ -values showed a minimum value of 1.37 at temperatures between 5 and 15 °C, indicating metabolic rate to be relatively insensitive to temperature changes around the acclimation temperature (11 °C). Lugworms from the White Sea also increased their oxygen consumption rate with rising temperatures from  $1.38 \pm 0.62 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. ( $n = 3$ ) at -1.7 °C to  $12.49 \pm 10.15 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. ( $n = 4$ ) at 25 °C. The  $Q_{10}$  increased with rising temperatures from a low value of 1.27 between 0 and 10 °C to a maximum of 3.25 between 15 and 25 °C. The temperature range characterised by the low  $Q_{10}$ -value, was shifted in these animals according to the acclimation temperature of 6 °C. In the whole temperature range investigated oxygen consumption rate was significantly by 1.4 to 3.0 times higher in White Sea than in North Sea worms. Even when the allometric parameter given by Krüger (1964) for the metabolic rate of *A. marina* is taken into account, metabolic rate was at all temperatures on average 2.1 times higher in White Sea than in North Sea animals.

Another peculiarity was seen in White Sea animals at low temperatures. When temperature was reduced from -1.7 to -3 °C oxygen consumption did not decrease, as expected from the reaction velocity-temperature relationship, but even showed a significant rise to  $2.46 \pm 0.70 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. ( $n = 7$ ). The addition of 7

mmol·l<sup>-1</sup> sodium acetate into the sea water at 1 °C shows (Fig. 2) that acetate, which accumulates in the tissue of the lugworm at low temperatures (Sommer *et al.* 1997), induces a rise in oxygen consumption rate from  $0.31 \pm 0.13 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{g fresh wt.} \cdot \text{h}^{-1}$  (n = 4) to  $1.67 \pm 0.56 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{g fresh wt.} \cdot \text{h}^{-1}$  (n = 4). The higher metabolic rate was maintained for a maximum period of 1 hour, after which time it returned to control values. Changes in water pH did not occur during the addition of acetate. However, a rise in oxygen consumption rate at low temperatures or under acetate exposure was seen only in White Sea animals (during summer) or in North Sea lugworms acclimatised to cold (during winter). In spite of the accumulation of acetate in summer animals from the North Sea at low temperatures, no rise in oxygen consumption was observed.

In North Sea animals acclimated to 11 °C the ability to survive temperatures below 0 °C or above 20 °C was limited and many specimens died already during the acclimation period. In contrast, all subpolar worms survived the experimental procedure. Nevertheless, when lugworms from the North Sea were allowed to choose their preferred environment in a temperature gradient (4-22 or 30 °C), most of the animals chose the highest available temperature, even if it was lethal (Table 1). Although most worms swam at least once through the whole aquarium, no worm stayed in an area with a temperature below its acclimation temperature. However, no specific preference temperature of the lugworm could be identified with the experimental set-up chosen.

#### *Population specific aerobic capacities*

According to the hypothesis of Sommer *et al.* (1997) mitochondria are involved in setting the T<sub>c</sub>'s in lugworms. Histological analysis of mitochondrial density in the body wall musculature (Table 2) actually demonstrated that the number of mitochondria in the body wall musculature was significantly higher in White Sea than in North Sea specimens. The number of mitochondria in the subpolar worms was  $0.12 \pm 0.02$  (mean  $\pm$  S.E., n = 63) per  $\mu\text{m}^2$  cross-sectional muscle area, whereas North Sea animals possessed only  $0.05 \pm$

0.01 ( $n = 27$ ) mitochondria per  $\mu\text{m}^2$ . No differences in the ultrastructure or size of mitochondria were visible. Obviously, the elevated mitochondrial density in White Sea worms is quantitatively reflected by their higher metabolic rate (see discussion). The difference in mitochondrial density by a factor of 2.4 is mirrored by a similar increment in the oxygen consumption rate of whole animals (Fig. 1).

The activity of cytochrome c-oxidase ( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt.), which is a measure of the capacity of aerobic energy production, was about 10 times higher in the subpolar than in the boreal animals over the whole temperature range investigated. A higher mitochondrial density in cold adapted animals could explain a higher enzyme content in the cells and therewith a higher activity, however, only by a factor of 2.4. Therefore, the rise in mitochondrial density cannot be the only reason for the difference in the activity of cytochrome c-oxidase. This is also supported by the fact, that the activation energy for the oxidation of cytochrome c at temperatures between 0 and 30 °C was lower for the enzyme of the White Sea lugworms (Table 3). Otherwise, the pattern of change in cytochrome c-oxidase activity with temperature in the range between 0 and 45 °C was similar in the two populations (Fig. 3). Cytochrome c-oxidase activity increased between 0-30 °C according to a  $Q_{10}$  value of 1.62 in North Sea animals and of 1.26 in White Sea lugworms, reaching a maximum activity at about 30 °C. Above this temperature  $Q_{10}$  values decrease in both populations below 1.1.

Differences between NADP dependent isocitrate dehydrogenases of both populations were not only expressed in absolute activities ( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt.) of the isoenzymes, but also in the pattern of temperature dependence. Below 3 or 5 °C activity was nearly independent of temperature changes in both populations. In the temperature range between 3 and 20 °C the activity of the White Sea isoenzyme, however, increased according to a  $Q_{10}$  value of 4.28, and decreased again to a  $Q_{10}$  value of 2.29 above 20 °C. In North Sea worms a  $Q_{10}$  value of 2.53 was determined for the temperature range between 5 and 31 °C (Fig. 4a). Enzyme activity was significantly higher in the subpolar lugworms at temperatures above 20 °C, while at low temperatures the maximum activity was the same in both populations (Fig. 4a and 5b). In the present study the method of

extraction did not allow us to distinguish between the activity of cytosolic or mitochondrial isocitrate dehydrogenases. The higher  $Q_{10}$ -value may therefore be explained by a higher mitochondrial density in the subpolar worms and, consequently, an increase in the fraction of the mitochondrial enzyme, which may show higher  $Q_{10}$ -values compared to the cytosolic enzyme, as found in the teleost fish *Fundulus heteroclitus* (Gonzalez-Villaseñor and Powers 1986). However, neither the change in kinetic characteristics (Sautin and Malinovskaya 1988) nor in the isozyme pattern (Hummel *et al.* 1997) following cold acclimation or adaptation indicate the presence of cytosolic isocitrate dehydrogenase. Since we found significant differences in the kinetic properties of the enzymes of both populations it can be expected, that the activity of the cytosolic enzyme is neglectable, like in the muscle tissue of different mammals (Plaut *et al.* 1983).

The enzyme of White Sea lugworms was also characterised by a higher affinity for NADP ( $K_m = 16.8 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) at low temperatures compared to North Sea worms ( $K_m = 33.3 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , Fig. 5b). The Arrhenius plot (Fig. 5a) shows a biphasic or even triphasic temperature dependence of the isocitrate dehydrogenase from North and White Sea animals, respectively. For both populations the plots revealed a significant break temperature at low temperatures (3 or 5 °C), and the subpolar animals showed a second break at 20 °C. The values of activation energy ( $E_a$ ) - the energy required for activation of the enzyme-substrate complex - are seen in Table 3. In enzymes of both populations,  $E_a$  was lowest at low temperatures, whereas  $E_a$  values were especially high in the range of thermal tolerance of the cold adapted lugworms.

## Discussion

### *Latitudinal cold compensation of metabolic rate*

Previously, the metabolic rate of *Arenicola marina* has been investigated under varying oxygen tensions in the sea water (Toulmond 1975, Schöttler *et al.* 1983, Toulmond and

Tchernigovtzeff 1984), but little is known about the influence of temperature. In an early study Krüger (1964) found a temperature independent rate of oxygen consumption in lugworms from Helgoland, North Sea, between 10 and 20 °C during acute exposure after acclimation to 18 °C. Our data confirm, that the change in metabolic rate is minimized within the range of thermal tolerance. However, this range can shift depending on the acclimation temperature. North Sea animals acclimated to 11 °C exhibited acute metabolic compensation between 5 and 15 °C, while this range was shifted to temperatures between 0 and 10 °C in cold (6 °C) adapted White Sea animals. Compensatory mechanisms are, therefore, suitable to minimize short term metabolic fluctuations within the window of tide-related and diurnal temperature changes in the respective habitat. The molecular mechanisms underlying acute temperature compensation of catabolism are complex and have been discussed extensively in an early review by Hazel and Prosser (1974). In contrast, comparatively little is known about the causes of the temperature insensitivity of energy consumption within the range of thermal tolerance and about the shift of the temperature insensitive range with acclimation.

The concept of metabolic cold compensation implies, that organisms living under different temperature regimes strive to adjust metabolic rate to similar values regardless of acclimatisation temperature (Hochachka and Somero 1984). Figure 1 shows in contrast to this concept, that the metabolic rate of the subpolar worms at their acclimation temperature of 6 °C was not the same, but even higher than the one of North Sea animals acclimated to 11 °C, and that rates were above those of North Sea animals at each temperature investigated. The higher mitochondrial density in conjunction with an increase in aerobic capacity of each individual mitochondrion in lugworms from the White Sea (Table 2) is held responsible for the higher metabolic rate (see below). The higher mitochondrial density is likely to be a prerequisite for the maintenance of high activity levels at the subzero temperatures, which prevail for up to 9 months per year at the White Sea, and for a downward shift of the low  $T_c$  (for review see Pörtner *et al.* 1998). For example, Kolyakina (1980) found that lugworms interrupted their feeding behaviour for only 1.5 days when sediment temperatures in the Kandalaksha Bay, White Sea, dropped to -3.5

°C. After that time normal feeding cycles were restored. Cold overcompensation may be visible in northern lugworm populations, since the species is eurythermal, whereas cold compensation has been questioned to exist for cold stenothermal polar or even more so, deep sea species (Clarke 1991, Childress 1995, Thiel *et al.* 1996).

The increase in oxygen consumption rate in White Sea animals at extremely low temperatures (Fig. 1) cannot be explained by the mechanisms of metabolic cold compensation or overcompensation (Hochachka and Somero 1984). Obviously, there is a drastic increase in energy demand at temperatures below the low  $T_c$  identified by Sommer *et al.* (1997). In lugworms from the North Sea such a rise in oxygen consumption was not evident. Moreover, a rise in metabolic rate was seen in the subpolar animals at high temperatures, which exceeded the increment observed in the temperate worms (Fig. 1). This may be interpreted in the context of the observation that the ability to survive temperatures beyond both critical values was more limited in North Sea animals (see also Sommer *et al.* 1996, 1997, Sommer and Pörtner 1998). In White Sea animals an energy demanding mechanism seems to exist, which improves survival at temperatures beyond critical thresholds. Potential candidates are: the synthesis of heat shock proteins, which stabilise proteins, prevent the aggregation of denaturated proteins and enable a refolding (Hoffmann and Parsons 1994); the synthesis of ice nucleatures, which improve survival in some mussels at temperatures below freezing (Loomis and Hayes 1987); an increase in the concentration of the thermal hysteresis proteins, which prevents ice crystallisation in the plasma (Aarset 1982); or a rise in the levels of ubiquitin conjugates, which eliminate irreversibly damaged proteins (Hofmann and Somero 1995, 1996). The synthesis of peptides or proteins is linked to high energetic costs. With the assumption that approximately 5 mol ATP are synthesised per mol of consumed  $O_2$ , and that for the synthesis of 1 mol protein (using equal amounts of all 20 amino acids, with a mean mass of 0.12 g per mol) about 0.36 mol ATP equivalents are required (based on 4 ATP/peptide bond, indirect costs like costs of cellular transport or RNA synthesis excluded, Atkinson 1977), the increase in oxygen consumption rate in White Sea animals at low temperatures could reflect, according to a calculation by Atkinson (1977), synthesis of 7  $\mu$ g stress

proteins·g<sup>-1</sup> fresh wt·h<sup>-1</sup>. We hypothesize that at least some of these mechanisms are involved in enabling the survival of White Sea animals at extreme temperatures.

An additional or alternative explanation arises from the observation that the addition of acetate (7 mmol·l<sup>-1</sup> end concentration) to the sea water at 1 °C induced a 6-fold rise in oxygen consumption in Winter animals from the North Sea (Fig. 2). Acetate in the sea water can be absorbed by *A. marina* (Holst and Zebe 1984). Depending on the pH gradient between sea water and extracellular fluid (about 0.4 pH units), acetate concentrations in the animals would be by a factor of 4 below those in the medium. However, animals can metabolise acetate (Holst and Zebe 1984) and low temperatures (1 ± 0.5 °C) reduce diffusibility (Sidell and Hazel 1987), so that a somewhat lower concentration may build up inside the worms. This acetate level may therefore be close to the one found in the body wall tissue of *A. marina* at temperatures below the low T<sub>c</sub> (about 1 μmol·g<sup>-1</sup> fresh wt., Sommer *et al.* 1997). In different vertebrates and invertebrates lactate, which is their specific anaerobic end product, was identified to be a mediator between unfavourable environmental conditions and the adequate behavioural and physiological response, including a rise in the oxygen consumption rate (Pörtner *et al.* 1994, Watson *et al.* 1994, Wood and Gonzales 1996, de Wachter *et al.* 1997). Acetate causes a similar response in humans (Burnier *et al.* 1992). In *A. marina* volatile fatty acids like acetate or propionate accumulate in the tissue instead of lactate. We hypothesize, that in the lugworm acetate plays a role similar to that which lactate has in vertebrates, as a mediator between low temperatures and the reaction norm (behavioural and physiological) of cold adapted animals, thereby supporting survival at extreme temperatures. However, in spite of the accumulation of acetate in summer animals from the North Sea at low temperatures no rise in oxygen consumption rate was induced. Only in cold adapted lugworms from the White Sea (latitudinal cold adaptation) and from the North Sea (seasonal cold acclimatisation) a rise in oxygen consumption rate was observed below the low T<sub>c</sub> or under acetate exposure (Fig. 1 and 2). This indicates, that besides the changes in acetate concentration, some other factors, which change during cold adaptation, must be involved to pass on or transform the signal. The acetate induced

change in oxygen consumption in humans is also dependent on different factors like illness, stress or nutritional support (Burnier *et al.* 1992). Possibly a rise in aerobic capacity as seen during cold adaptation (see below) is required for the changes in metabolism to become visible.

At high temperatures, but below short-term lethal limits, the ventilation rate of *A. marina*, dwelling in artificial burrows, drops drastically, like in other polychaetes (Seymour 1972, Kristensen 1983). This cessation of ventilation was interpreted to be due to an internal mechanism that reduces or stops ventilation activity when the surface water is in some way noxious for the animals (Wells and Albrecht 1951, cited in Kristensen 1983). This interpretation assumes the existence of a thermoreceptor, which should be able to identify temperatures above a specific threshold. However, when lugworms were allowed to choose their preferred environment in a temperature gradient, most of the worms chose the highest available temperature, even if it was lethal (Table 1). The drop in ventilation may actually be a response to the development of hypoxia, when oxygen demand can no longer be met and anaerobic metabolism sets in. The drop in ventilation is an adaptational energy saving response typically involved in long term tolerance to anaerobiosis (for review see Grieshaber *et al.* 1994). However, in contrast to ventilation (Seymour 1972), overall metabolic rate is not reduced at high temperatures, as evidenced by the high oxygen consumption rates at 20 and 25 °C. Consequently, the discrepancy is enforced between processes consuming and providing oxygen, exacerbating hypoxia and anaerobic metabolism. Actually, the accumulation of anaerobic end products in lugworms was observed at temperatures above a high critical value by Sommer *et al.* (1997). Therefore, it appears likely that the cessation of ventilation in *A. marina* and the accumulation of anaerobic end products are correlated and indicate heat stress close to lethal temperatures.



*Mitochondrial proliferation in the cold*

Adaptation to lower mean annual temperatures is reflected by a proliferation of mitochondria in *Arenicola marina* (Table 2). 2.4 times more mitochondria per  $\mu\text{m}^2$  muscle cell cross section were found in the subpolar than in temperate zone animals. This is the first time, that such morphological changes are reported in invertebrates, indicating that this adaptational feature is not restricted to fish (e.g. Campell and Davies 1978, Sisson and Sidell 1987, Guderley and Blier 1988, Eggington and Sidell 1989, Londrville and Sidell 1990, Archer and Johnston 1991) but, on an evolutionary time scale, must be seen as an old mechanism.

The main advantage of an increase in mitochondrial density is a rise in aerobic capacity at low temperatures. In addition, it may compensate for a rise in the viscosity of the cytoplasm (Sidell and Hazel 1987). An increase in dipole bonding with changing temperatures may also lead to a decrease in the diffusibility of small molecules, like oxygen or glucose, at low temperatures. Reduced diffusibility of metabolites and enzymatic substrates would restrict substrate turnover and energy production. Cold adaptation is directed, therefore, to compensate for this process. When the calculations by Sidell and Hazel (1987) using a one-dimensional diffusion equation for metabolites are applied to the data of White Sea lugworms, the higher mitochondrial density would compensate for the cold induced reduction of diffusion velocity to an extent which is equivalent to a temperature rise by approximately 10 °C. This correlates roughly with the difference in mean annual temperatures between White and North Seas (Zenkevitch 1963, Wolff 1983). However, a main role of the diffusibility of small substances has been questioned (Hubley *et al.* 1997) emphasizing that the capacity of aerobic metabolism may be the limiting factor owing to the temperature sensitivity of mitochondrial respiration. The increase in mitochondrial density causes a rise in aerobic energy production and, concomitantly, a shift of the low  $T_c$  to lower values (Sommer *et al.* 1997).

However, cold adaptation by an increase in mitochondrial density may cause a rise in standard metabolic rate, as seen in the higher oxygen consumption rate of White Sea

animals (Fig. 1). Even when the population specific differences in size are taken into account using the allometric parameter given by Krüger (1964) for *A. marina*, metabolic rate was at all temperatures on average 2.1 times higher in White Sea than in North Sea specimens. With any mitochondria present, the maintenance costs of ionic and proton gradients across the mitochondrial membrane have to be met (Pörtner *et al.* 1998). This baseline idling of mitochondria mainly compensates for the effect of proton leaks (Brand and Murphy 1987). A higher standard metabolism results, which becomes relevant in determining the tolerance to high temperatures. The advantage is that the balance between oxygen supply to tissues and oxygen consumption is disturbed at lower temperatures in the subpolar than in the boreal animals. As a corollary, mitochondrial proliferation not only causes a downward shift of the low T<sub>c</sub> but also a drop in the high T<sub>c</sub> (Sommer *et al.* 1997).

A higher mitochondrial content ultimately implies a higher concentration of mitochondrial enzymes, like cytochrome c-oxidase and proton ATPase. Compared with animals from the North Sea we found a 10 times higher activity of cytochrome c-oxidase in lugworms from the White Sea (Fig. 3), far more than expected from the rise in mitochondrial density which occurred by a factor of 2.4. A change in the catalytic properties of the enzyme is reflected by the difference in activation energies. Cytochrome c-oxidase in cold acclimated goldfish is regulated by a modulation of activity and not by enzyme quantity (Hazel and Prosser 1974). In general, biochemical adaptation is assumed to proceed as a two-step process: first, involving changes in enzyme quantities and secondly, by alterations in catalytic properties (Pogson 1988). The latter can be achieved by changes in the enzyme environment (Prosser 1991, Miranda and Hazel 1996), by temperature dependent folding of enzymes (Hochachka and Somero 1984) or by alterations in isozyme expression (Hochachka and Somero 1984, Prosser 1991). However, independent of how the kinetic properties of cytochrome c-oxidase of White Sea lugworms were changed, the increase in maximum capacity was higher than the concomitant rise in resting (standard) metabolic rate.

In *A. marina* the expression of different isozymes of mitochondrial NADP dependent isocitrate dehydrogenase, an enzyme which may play a role in the regulation of the flux through the citric acid cycle (Urich 1990), correlates with the mean annual temperatures in the respective habitat (Hummel *et al.* 1997). In this case, temperature may have a selective influence on the expression of different isozymes, since the kinetic properties of isocitrate dehydrogenase differ in both populations (Fig. 4 and 5). The affinity of the enzyme for NADP is higher in cold adapted worms, and the required activation energy at temperatures below 3 or 5 °C is lower in White Sea than in North Sea animals. At higher temperatures, the sensitivity of North and White Sea enzymes to temperature differs, reflected in higher  $Q_{10}$ -values in the subpolar than in the boreal worms, leading to a higher maximum activity at high temperatures in White Sea animals. The higher activity of the isocitrate dehydrogenase may contribute to the higher flux rate through the citric acid cycle in the subpolar lugworms at high temperatures, as mirrored in the higher metabolic rate of these animals. The break temperatures seen in the Arrhenius plot (Fig. 5a) indicate, that there may be interconvertible forms of the enzyme which differ in their catalytic properties. The break at low temperatures suggests that activation energy is lowest at times when only very little energy is available to stabilise reaction velocity. Surprisingly, highest activation energy was found in the cold adapted White Sea animals in the range of thermal tolerance (Table 3). This may be explained by the fact, that the determining factor of thermodynamic activation is not the activation energy but the ratio of reaction entropy to enthalpy (Johnston and Goldspink 1975, Clarke 1998). However, the low break temperature of the isocitrate dehydrogenase does not clearly match the low  $T_c$  of the respective animals, opposite to the high break temperature, which matches the high  $T_c$  in White Sea animals and in the Antarctic clam *Laternula elliptica* (H.O. Pörtner, I. Hardewig and L.S. Peck, unpubl. data). In general, the significance and mechanisms of these break temperatures remains obscure.

## Conclusions

A shift of the  $T_c$ 's to lower values is achieved in lugworms from the White Sea by an increase in aerobic capacity, effected by a higher mitochondrial density as well as an elevated oxidative capacity of individual mitochondria. The latter is reflected by an elevated cytochrome c-oxidase activity, a higher affinity for NADP of the NADP dependent isocitrate dehydrogenase and a reduction in the activation energy of isocitrate dehydrogenase at very low temperatures. The rise in the capacity of aerobic energy production explains a shift of the low  $T_c$  to lower values. However, the higher mitochondrial density induces a rise in standard metabolic rate and, therefore, a concomitant shift of the high  $T_c$  to a lower value.

An improved ability to shift both  $T_c$ 's was found in White Sea compared to North Sea lugworms (studied in detail in Sommer and Pörtner 1998). At extreme temperatures, a drastic rise in oxygen consumption in the subpolar animals indicates that energy consuming processes may be involved in the mechanisms of improved thermal tolerance. Acetate, which accumulates in the body wall tissue at temperatures beyond the critical values, induced a rise in the oxygen consumption rate of cold acclimatised animals from the North Sea. It is therefore assumed, that acetate may support survival at extreme temperatures by being a mediator between extreme temperatures and the reaction norm of the lugworm.

## *Acknowledgements*

Parts of the work was carried out at the White Sea Biological Station / Zoological Institute of the Russian Academy of Science in St. Petersburg, Russia. We are grateful for the excellent support by Dr. V. Fedjakov and Dr. A. A. Sukhotin and all the helpful hands at the station. A special thanks goes to K. Beyer, Alfred-Wegener-Institute, for her help and introduction to electron microscopy techniques. Alfred-Wegener-Institute Publication No.

## References

- Aarset AV (1982) Freezing tolerance in intertidal invertebrates. *Comp Biochem Physiol* 73A: 571-580
- Archer SD, Johnston IA (1991) Density of cristae and distribution of mitochondria in the slow muscle fibers of antarctic fish. *Physiol Zool* 64: 242-258
- Atkinson DE (1977) Cellular energy metabolism and its regulation. Academic Press, New York, London, pp. 70-79
- Badyukov DD (1979) Sea level changes on the Soviet shores of the White, Baltic and Black Seas during the past 15 thousand years. *Oceanology* 19: 177-181
- Brand MD, Murphy MP (1987) Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells. *Biol Bull* 62: 141-193
- Burnier P, Tappy L, Jéquier E, Schneeberger D, Chioléro R (1992) Metabolic and respiratory effects of infused sodium acetate in healthy human subjects. *Am J Physiol* 263: R1271-R1276
- Campell CM, Davies PS (1978) Temperature acclimation in the teleost, *Blennius pholis*: changes in the enzymes activity and cell structure. *Comp Biochem Physiol* 61B: 165-167
- Childress JJ (1995) Are there physiological and biochemical adaptations of metabolism in deep-sea animals? *TREE* 10: 30-36
- Clarke A (1991) What is cold adaptation and how should we measure it? *Am Zool*: 81-92
- Clarke A (1998) Temperature and energetics: an introduction to cold ocean physiology. in: Pörtner HO, Playle RC (eds.) *Cold ocean physiology*. Cambridge University Press, pp. 3-30
- Crockett EL, Sidell BD (1990) Some pathways of energetic metabolism are cold adapted in antarctic fish. *Physiol Zool* 63: 472-488
- Dahlhoff E, Somero G (1993) Kinetic and structural adaptations of cytoplasmic malate dehydrogenases of eastern pacific abalone (genus: *Haliotis*) from different thermal

- habitats: biochemical correlations of biogeographical patterning. *J exp Biol* 185: 137-150
- Egginton S, Sidell BD (1989) Thermal acclimation of subcellular structure of fish muscle. *Am J Physiol* 256: R1-R10
- Foster AR, Hall SJ, Houlinan DF (1993) The effects of temperature acclimation on organ/tissue mass and cytochrome c oxidase activity in juvenile cod. *J Fish Biol* 42: 947-957
- Gaebel K, Roots BI (1989) Stereological analysis of mitochondria from brains of temperature acclimated goldfish, *Carassius auratus* L (5 and 30 °C). *J therm Biol* 14: 187-190
- Gonzalez-Villaseñor LI, Powers DA (1986) A multilocus system for studying tissue and subcellular specialisation. *J Biol Chem* 261: 11471-11477
- Govberg LI (1973) Holocene molluscs of the White Sea. Shirshov Institute of Oceanology, USSR Academy of Science, pp. 547-551
- Grieshaber MK, Hardewig I, Kreuzer U, Pörtner HO (1994) Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. *Physiol Biochem Pharmacol* 125: 43-147
- Guderley H (1990) Functional significance of metabolic responses to thermal acclimation in fish muscle. *Am J Physiol* 259: R245-R252
- Guderley H (1998) Temperature and growth rates as modulators of the metabolic capacities of fish muscle. in: Pörtner HO, Playle RC (eds.) *Cold Ocean Physiology*. Cambridge University Press, pp. 58-87
- Guderley H, Blier P (1988) Thermal acclimation in fish: conservative and labile properties of swimming muscle. *Can J Zool* 66: 1105-1115
- Hand SC, Somero GM (1983) Energy metabolic pathways of hydrothermal vent animals: Adaptation to food-rich and sulfid-rich deep-sea environment. *Biol Bull* 165: 167-181
- Hartman-Schröder G (1971) Annelida, Borstenwürmer, Polychaeta. in: Dahl M, Peus F (eds.) *Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeresteile*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

- Hazel JR, Prosser CL (1974) Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiol Rev.* 54: 620-677
- Hochachka PW, Somero GN (1984) *Biochemical adaptation*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey
- Hoffmann AA and Parsons PA (1994) *Evolutionary genetics and environmental stress*. Oxford University Press, Oxford, pp. 40-56
- Hofmann GE, Somero GN (1995) Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp 70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *J exp Biol* 198: 1509-1518
- Hofmann GE, Somero GN (1996) Interspecific variation in thermal denaturation of proteins in the congeneric mussels *Mytilus trossulus* and *M. gallorovincialis*: evidence from heat shock response and protein ubiquitination. *Mar Biol* 126: 65-75
- Holst H, Zebe E (1984) Absorption of volatile fatty acids from ambient water by the lugworm *Arenicola marina*. *Mar Biol* 80: 125-130
- Hubley MJ, Locke BR, Moerland TS (1997) Reaction-diffusion analysis of the effects of temperature on high-energy phosphate dynamics in goldfish skeletal muscle. *J exp biol* 200: 975-988
- Hummel H, Sommer A, Bogaards RH, Poertner HO (1997) Variation in genetic traits of the lugworm *Arenicola marina*: temperature related expression of mitochondrial allozymes? *Mar Ecol Prog Ser* 159: 189-195
- Johnston IA, Goldspink G (1975) Thermodynamic activation parameters of fish myofibrillar ATPase enzyme and evolutionary adaptation to temperature. *Nature* 257: 620-622
- Kolyakina NM (1980) [The seasonal and age characteristics in the distribution of lugworm *Arenicola marina* (Polychaeta) in the Kislaya inlet of the Kandalaksha Bay.] *Biology of the White Sea* 5: 77-92
- Kristensen E (1983) Ventilation and oxygen uptake by three species of *Nereis* (Annelida: Polychaeta) II. Effects of temperature and salinity changes. *Mar Ecol Prog Ser* 12: 299-306

- Krüger F (1964) Versuche zur Abhängigkeit der Atmung von *Arenicola marina* (Annelides Polychaeta) von Größe und Temperatur. Helg wiss Meeresunters 10: 28-63
- Londrville RL, Sidell BD (1990) Ultrastructure of aerobic muscle in antarctic fishes may contribute to maintenance of diffusion fluxes. J exp Biol 150: 205-220
- Loomis SH (1995) Freezing tolerance of marine invertebrates. Ocean Mar Biol 33: 337-350
- Loomis SH, Hayes D (1987) Effect of temperature, food deprivation and photoperiod on the cold tolerance of intertidal pulmonate gastropod, *Melampus bidentatus*. Cryo Letters 8: 25-34
- Miranda EJ, Hazel JR (1996) Temperature-induced changes in the transbilayer distribution of phosphatidylethanolamine in mitoblasts of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. J exp Zool 274: 23-32
- Nesis KN (1983) A hypothesis on the origin of Western and Eastern Arctic distribution areas of marine bottom animals. Biologia Morya 5: 3-13
- Noack S (1980) Statistische Auswertung von Meß- und Versuchsdaten mit Taschenrechner und Tischcomputer. Walter de Gruyter, Berlin, pp. 373-382
- Plaut WE, Cook M, Aogaichi T (1983) The subcellular location of isozymes of NADP-isocitrate dehydrogenase in tissue from pig, ox and rat. Biochem Biophys Acta 760: 300-308
- Pogson GH (1988) Constraints on the genetic process of biochemical adaptation. Can J Zool 66: 1139-1145
- Pörtner HO, Branco LGS, Malvin GM, Wood SC (1994) A new function for lactate in the toad *Bufo marinus*. J Appl Physiol 76: 2405-2410
- Pörtner HO, Hardewig I, Sartoris FJ, van Dijk PLM (1998) Energetic aspects of cold adaptation: critical temperatures in metabolic, ionic and acid-base regulation. in: Pörtner HO, Playle RC (eds.) Cold ocean physiology. Cambridge University Press, pp. 88-120



- Prandle D, Lane A (1995) Stability of the annual temperature cycles in shelf seas. *J therm Biol* 20: 110-120
- Prosser CL (1991) Temperature. in: Prosser CL (ed.) *Environmental and metabolic animal physiology*. Wiley-Liss, New York, pp.109-165
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J cell Biol* 17: 208
- Sautin Yu Yu, Malinovskaya MV (1988) [Effect of temperature acclimation on NADP<sup>+</sup>-dependent dehydrogenase activity in the carp liver and some mechanisms of its regulation] *Ukrain biochim zh* 60: 29-34
- Schoettler U, Wienhausen G, Zebe E (1983) The mode of energy production in the lugworm *Arenicola marina* at different oxygen concentrations. *J Comp Physiol* 149: 547-555
- Seymour MK (1972) Effects of temperature changes on irrigation rate in *Arenicola marina*. *Comp Biochem Physiol* 43A: 553-564
- Sidell BD, Hazel JR (1987) Temperature affects the diffusion of small molecules through cytosol of fish muscle. *J exp Biol* 129: 191-203
- Sisson J, Sidell BD (1987) Effect of thermal acclimation on recruitment of muscle fibers in striped bass. *Physiol Zool* 60: 310-320
- Sommer A, Hummel H, Pörtner HO (1996) Adaptation of *Arenicola marina* to changing temperatures: a comparison of boreal and subpolar populations. *Verh dt Zool Ges* 89: 186
- Sommer A, Klein B, Pörtner HO (1997) Temperature induced anaerobiosis in two populations of the polychaete worm *Arenicola marina* (L.). *J Comp Physiol* 167B: 25-35
- Sommer A, Pörtner HO (1998) Exposure of *Arenicola marina* (L.) to extreme temperatures: adaptive flexibility of a boreal and a subpolar population. (submitted)
- Storey KB, Storey JM (1988) Freeze tolerance: constraining forces, adaptive mechanisms. *Can J Zool* 66: 1122-1127

- Sugden PH, Newsholme EA (1975) Activities of citrate synthase, NAD<sup>+</sup>-linked and NADP<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenases, glutamate dehydrogenase, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in nervous tissues from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 150: 105-111
- Thiel H, Pörtner HO, Arntz WE (1996) Marine life at low temperatures - a comparison of polar and deep-sea characteristics. in: Uiblein F, Ott J, Stachowitsch M (eds.) *Deep-sea and extreme shallow-water habitats: affinities and adaptations*. *Biosys Ecol Ser* 11: 183-219
- Toulmond A (1975) Blood oxygen transport and metabolism of the confined lugworm *Arenicola marina*. *J exp Biol* 63: 647-660
- Toulmond A, Tchernigovtzeff C (1984) Ventilation and respiratory gas exchange of the lugworm *Arenicola marina* (L.) as a function of ambient pO<sub>2</sub> (20-700 Torr). *Respir Physiol* 57: 349-363
- Urich K (1990) *Vergleichende Biochemie der Tiere*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, S. 614-619
- de Wachter B, Sartoris FJ, Pörtner HO (1997) The anaerobic endproduct lactate has a behavioural and metabolic function in the shore crab *Carcinus maenas*. *J exp Biol* 200: 1015-1024
- Watson CL, Few WL, Panoe G, Jackson DC (1994) Lactic acidosis transiently increases metabolic rate of turtle myocytes. *Am J Physiol* 266: R1238-R1243
- Wesenberg-Lund E (1953) *The Zoology of East Greenland*, bd 122, No 3, C.A. Reitzel Forlag, Kopenhagen
- Wolff WJ (ed.) (1983) *Ecology of the Wadden Sea*. Vol 1, Chap. 2: Hydrography. A A Balkema, Rotterdam, pp. 24-33
- Wood SC, Gonzales R (1996) Hypothermia in hypoxic animals: mechanisms, mediators and functional significance. *Comp Biochem Physiol* 113B: 37-43
- Zenkevitch L (1963) *Biology of the Seas of the U.S.S.R.*. George Allen and Unwin Ltd, London, pp.179-192

Table 1. Number of North Sea animals settled within 24 h at a specific temperature range within a non-linear temperature gradient (4 - 22 or 30 °C). 50 % of all animals chose their preferred temperature within 3.5 h. Maximal temperature was reduced from 30 to 22 °C after all animals died during the first 3 runs by choosing the highest available temperature (mean  $\pm$  S.D.; n = 7; 5 animals each; numbers in parenthesis = length of the respective temperature range; \* = significantly different from the number of animals found at the other temperatures).

4 - 8 °C (70 - 100 cm)	9 - 14 °C (50 - 75 cm)	15 - 22 or 30 °C (25 - 40 cm)
0 $\pm$ 0	0.9 $\pm$ 1.2	4.1 $\pm$ 1.2*

Table 2. Mitochondrial density in the body wall musculature of *Arenicola marina* from 2 different populations. Populations differed significantly from each other ( $p \leq 0.005$ ; mean  $\pm$  S.E.; number of randomly analysed muscle pieces from 3 animals in parenthesis).

	North Sea - boreal -	White Sea - subpolar -
Number of mitochondria / muscle area in the cross section ( $\mu\text{m}^{-2}$ )	$0.05 \pm 0.01$ (27)	$0.12 \pm 0.02$ (63)

Table 3. Values of activation energy ( $E_a$ ) for the reaction catalyzed by North and White Sea lugworm NADP dependent isocitrate dehydrogenase (NADP-IDH;  $n = 6$ ) and cytochrome c-oxidase (CYTOX;  $n = 5 - 7$ ).

	Population	temperature range (°C)	$E_a$ (kJ/mol)
NADP-IDH	North Sea	1 - 5	10.554
		5 - 31	55.047
	White Sea	1 - 3	3.071
		3 - 20	82.028
		20 - 30	21.931
CYTOX	North Sea	0 - 30	31.006
		30 - 45	-8,216
	White Sea	0 - 30	14.854
		30 - 45	3.136

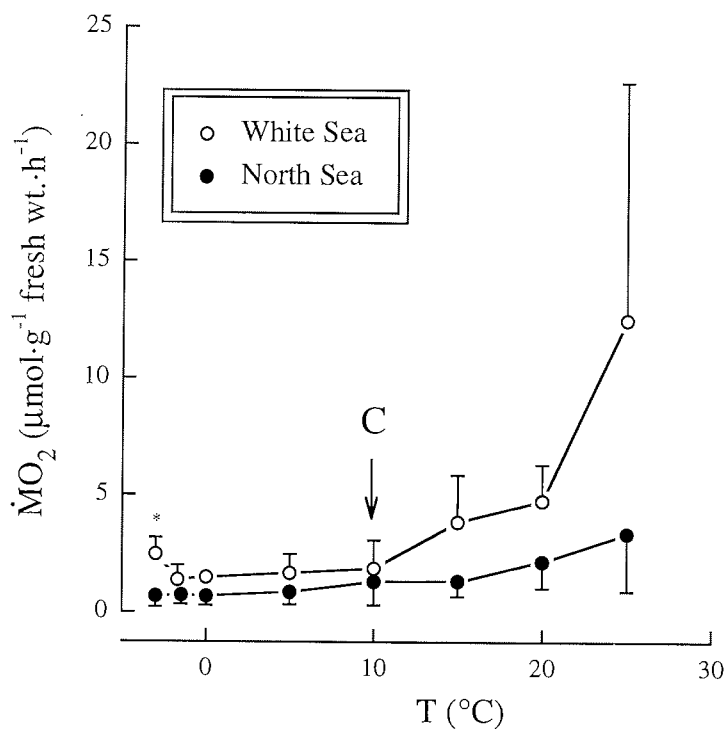
**Fig. 1** Oxygen consumption ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ fresh wt.} \cdot \text{h}^{-1}$ ) of *Arenicola marina* collected in summer from the North (●) or White (o) Seas at different temperatures. Oxygen consumption differs significantly between both populations ( $p = 0.002$ ; mean  $\pm$  S.D.; n: between 4-14 (North Sea) or between 3-13 (White Sea); \* = significantly different from the value at  $-1.7^\circ\text{C}$ ; C = control temperature).

**Fig. 2** Oxygen consumption ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ fresh wt.} \cdot \text{h}^{-1}$ ) of cold (winter) acclimatised *A. marina* from the North Sea, during the first hour after addition of  $7 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  sodium acetate to the sea water (mean  $\pm$  S.D.; n = 4; temperature:  $1 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ;  $\text{P}_{\text{O}_2}$ :  $25.7 \pm 0.2$  Torr; \* = significantly different from the rate without acetate).

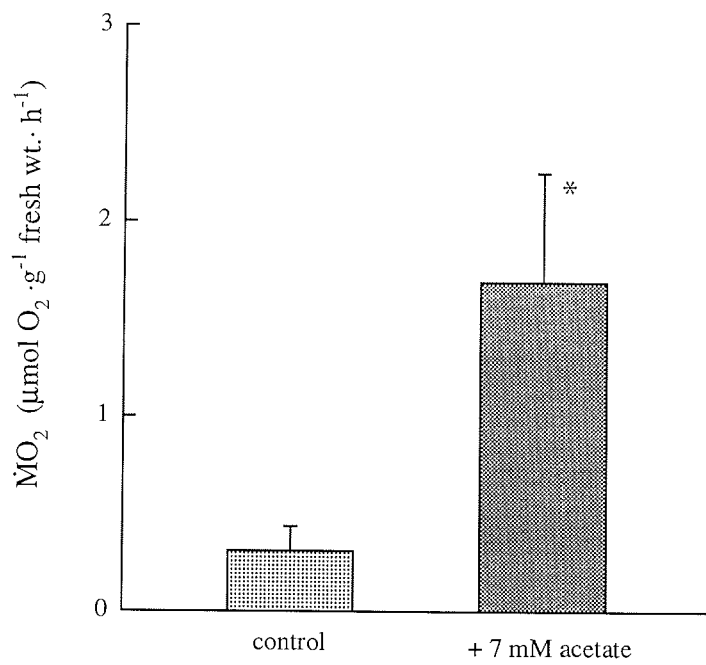
**Fig. 3** (a) Activity ( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ fresh wt.}$ ) of cytochrome c-oxidase in the body wall tissue of *A. marina* from the North (●; n = 5) or White Sea (o; n = 7) at various temperatures between 0 and  $45^\circ\text{C}$ . Activity differs significantly between both populations (mean  $\pm$  S.D.;  $T_{\text{AB}}$  = Arrhenius break temperature). (b) Arrhenius plot of (a).

**Fig. 4** (a) Activity ( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ fresh wt.}$ ) of NADP dependent isocitrate dehydrogenase in the body wall tissue of *A. marina* from the North (●; n = 6) or White Sea (o; n = 6) at various temperatures between 1 and  $31^\circ\text{C}$  and a NADP concentration of  $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Activity differs significantly between both populations (mean  $\pm$  S.D.;  $T_{\text{AB}}$  = Arrhenius break temperature). (b) Arrhenius plot of (a).

**Fig. 5** (a) Activity ( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ fresh wt.}$ ) of the NADP dependent isocitrate dehydrogenase of the body wall tissue of *A. marina* from the North (●) or White Sea (o) at various NADP concentrations between 2.5 and  $2500 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  at  $1^\circ\text{C}$  (mean  $\pm$  S.D.; n = 6). (b) Double-reciprocal (Lineweaver-Burk) plot of (a). The straight lines were fitted by the method of linear regression.

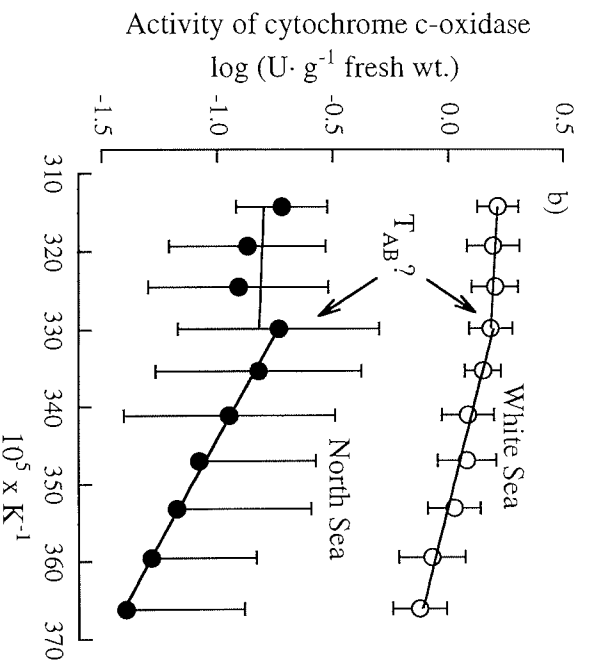
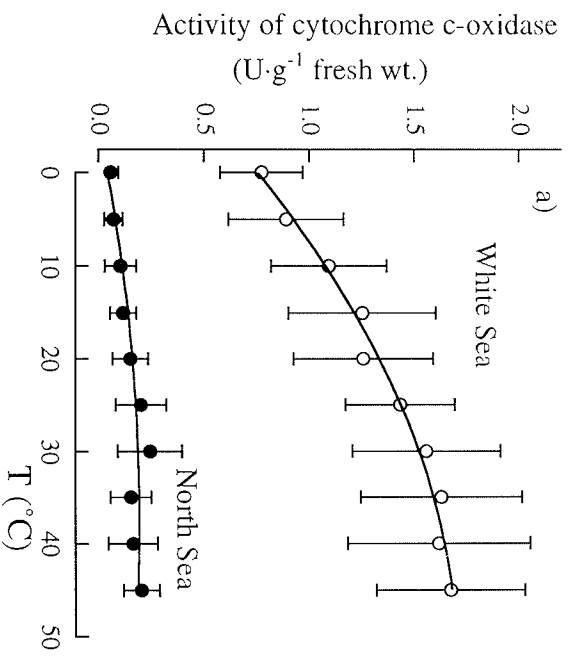


**Fig. 1** Oxygen consumption ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ fresh wt}\cdot\text{h}^{-1}$ ) of *Arenicola marina* collected in summer from the North (●) or White (○) Seas at different temperatures. Oxygen consumption differs significantly between both populations ( $p = 0.002$ ; mean  $\pm$  S.D.;  $n$ : between 4-14 (North Sea) or between 3-13 (White Sea); \* = significantly different from the value at  $-1.7^{\circ}\text{C}$ ; C = control temperature).



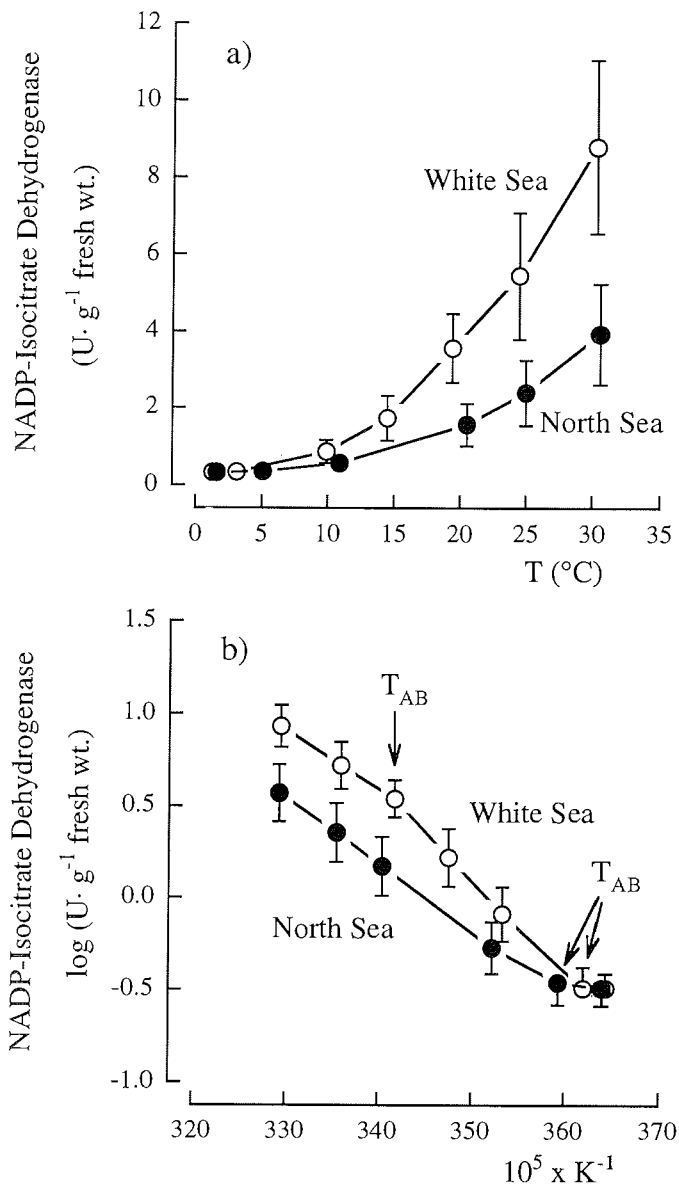
**Fig. 2** Oxygen consumption ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ fresh wt.} \cdot \text{h}^{-1}$ ) of cold (winter) acclimatised *A. marina* from the North Sea, during the first hour after addition of  $7 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  sodium acetate to the sea water (mean  $\pm$  S.D.;  $n = 4$ ; temperature:  $1 \pm 0.5$  °C;  $P_{\text{O}_2}$ :  $25.7 \pm 0.2$  Torr; \* = significantly different from the rate without acetate).



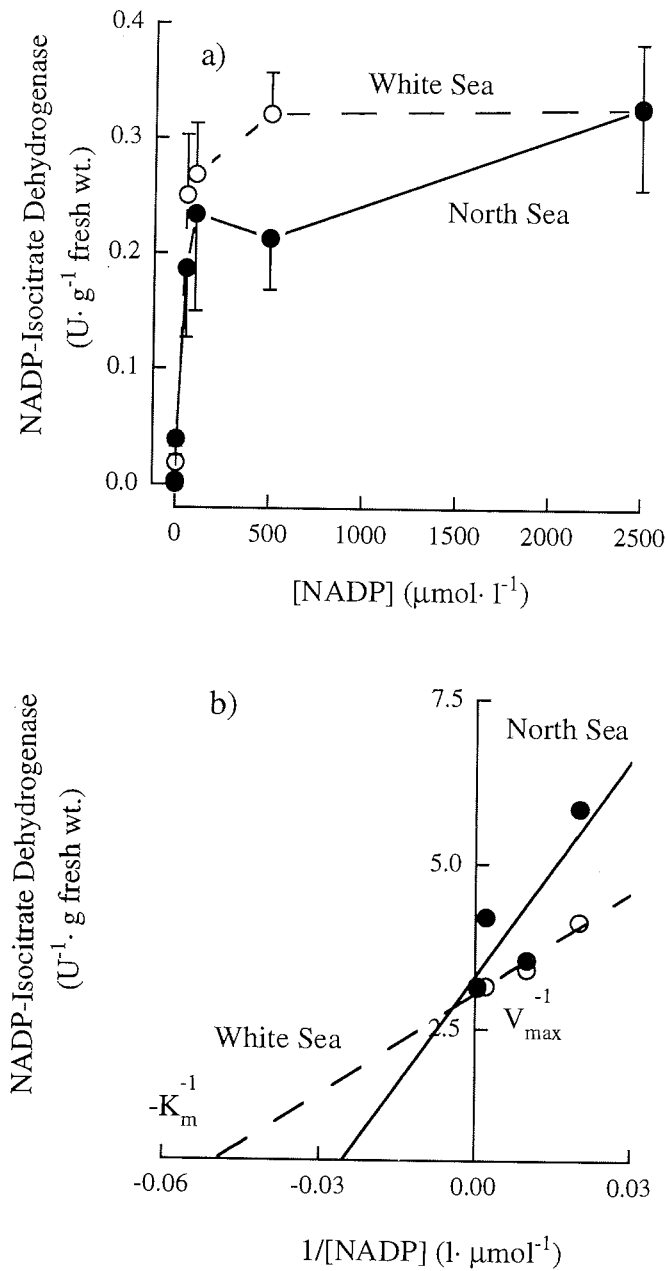


**Fig. 3** (a) Activity (U·g<sup>-1</sup> fresh wt.) of cytochrome c-oxidase in the body wall tissue of *A. marina* from the North (●; n = 5) or White Sea (○; n = 7) at various temperatures between 0 and 45 °C. Activity differs significantly between both populations (mean ± S.D.; T<sub>AB</sub> = Arrhenius break temperature). (b) Arrhenius plot of (a).

**Fig. 4** (a) Activity ( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt.) of NADP dependent isocitrate dehydrogenase in the body wall tissue of *A. marina* from the North ( $\bullet$ ;  $n = 6$ ) or White Sea ( $\circ$ ;  $n = 6$ ) at various temperatures between 1 and 31  $^{\circ}\text{C}$  and a NADP concentration of  $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Activity differs significantly between both populations (mean  $\pm$  S.D.;  $T_{\text{AB}}$  = Arrhenius break temperature). (b) Arrhenius plot of (a).



**Fig. 5** (a) Activity ( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt.) of the NADP dependent isocitrate dehydrogenase of the body wall tissue of *A. marina* from the North ( $\bullet$ ) or White Sea ( $\circ$ ) at various NADP concentrations between 2.5 and 2500  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  at 1 °C (mean  $\pm$  S.D.;  $n = 6$ ). (b) Double-reciprocal (Lineweaver-Burk) plot of (a). The straight lines were fitted by the method of linear regression.



**Publikation III**

Exposure of *Arenicola marina* (L.) to extreme temperatures:  
adaptive flexibility of a boreal and a subpolar population

A. Sommer, H.-O. Pörtner

(eingereicht)

MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES

**Exposure of *Arenicola marina* (L.) to extreme temperatures: adaptive flexibility of a boreal and a subpolar population**

A. Sommer and H. O. Pörtner

Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Biologie I/ Ökophysiologie,  
Columbusstrasse, 27568 Bremerhaven, F.R.G.

Correspondence address:

Prof. Dr. H.O. Pörtner  
Alfred-Wegener-Institut  
für Polar- und Meeresforschung  
Biologie I/Ökophysiologie  
Columbusstrasse  
27568 Bremerhaven  
Germany

Telephone: (471) 4831307 Fax: (471) 4831149

email: hpoertner@AWI-Bremerhaven.DE

## Abstract

Adaptive flexibility after temperature changes was studied in a boreal and a subpolar population of *A. marina* from the North and White Seas. The ability to acclimate is interpreted to be associated with the reversal of an initial transition to anaerobiosis. Therefore, end products of anaerobic metabolism as well as adenylate and ammonium concentrations were measured as indicators of temperature stress. The results reveal that both populations differ in their ability to acclimate to temperatures 4 °C above their respective critical temperature. Lugworms from the North Sea survived for only slightly longer than 1 day, while concentrations of alanopine and strombine were significantly elevated. However, adenylate and ammonium levels remained close to control values. In contrast, White Sea specimens showed drastic changes in the concentrations of anaerobic end products and ammonium, and ATP pools were depleted to undetectable low levels during the first 24 h at extreme, high temperatures. A higher metabolic proton production in White Sea animals, together with a lower intracellular, non-bicarbonate buffer capacity led to the drastic drop in intracellular pH, whereas the acidosis was only moderate in North Sea animals. Unexpectedly, the subpolar lugworms not only survived heat exposure, but even exhibited an adaptive reversal of metabolic changes.

Whereas heat exposure was compensated in White Sea animals only, short term ability to acclimate to acute cold (-1.7 °C) is limited in summer animals from both populations. Therefore, after an initial reversal of anaerobic metabolism, concentrations of volatile fatty acids and succinate increased again after 3 days. Since White Sea animals can adapt to temperatures below -2 °C during winter, our data suggest, that opposite to warm acclimation, cold acclimation requires a long term moderate decline in temperature.

*Key words:* Adenylates, Ammonium, Anaerobic metabolism, *Arenicola marina*, Buffer capacity, Cold stress, Heat stress, North Sea, Opines, Polychaeta, Succinate, Temperature acclimation, Volatile fatty acids, White Sea

*Abbreviations:*  $\beta_{\text{NB}}$  intracellular buffer value, NTA nitrilotriacetic acid, PCA perchloric acid,  $\text{pH}_i$  intracellular pH,  $T_c$  critical temperature,  $\Delta\text{H}^+_{\text{met}}$  metabolic proton changes,  $\Delta\text{H}^+_{\text{non-resp.}}$  non-respiratory proton changes

## **Introduction**

The intertidal zone is one of the harshest marine environments characterised by large fluctuations in abiotic factors. Therefore, intertidal animals must not only be able to tolerate changes in salinity, oxygen availability, carbon dioxide and sulphide concentrations both during diurnal and seasonal cycles, but also must cope with large temperature fluctuations. One of the model organisms studied extensively with respect to survival strategies in the intertidal is the lugworm *Arenicola marina*. Research focussed on hypoxia adaptation (e.g. Toulmond 1975, Schöttler *et al.* 1983, Toulmond & Tchernigovtzeff 1984) and some studies permitted insights into the survival under sulphidic conditions (Völkel & Grieshaber 1992, Grieshaber *et al.* 1993). Temperature was an issue in early studies by Krüger (1964), Wells (1964), Seymour (1972) and Toulmond (1977) and has only recently regained interest (Schmidt *et al.* 1992, Hummel *et al.* 1997, Sommer *et al.* 1997). The most recent studies focussed on limiting temperature conditions and the metabolic adjustments during temperature adaptation.

Sommer *et al.* (1997) identified a high and a low critical temperature ( $T_c$ ) in the lugworm, which are both characterised by the onset of anaerobic metabolism, when temperature rises or falls beyond those threshold values. The hypothesis arose that, at temperatures beyond each  $T_c$ , the energy demand of the lugworm cannot be met by adequate oxygen supply owing to insufficient capacity of ventilatory and circulatory mechanisms. In consequence, additional anaerobic energy production is required. Between the  $T_c$  values, intracellular pH in the body wall musculature of the lugworm changes in accordance with the  $\alpha$ -stat hypothesis (Reeves 1972), but the pH/temperature relationship is no longer linear beyond the  $T_c$ 's (Sommer *et al.* 1997). The drop in  $\text{pH}_i$  at

low temperatures coincided with the accumulation of anaerobic end products in the body wall tissue.

T<sub>c</sub>'s are variable during temperature acclimation and between populations of the same species. A shift to lower values was seen in winter adapted lugworms and lower T<sub>c</sub> values were observed in lugworms from the White Sea compared to North Sea animals. The lower T<sub>c</sub> in White Sea specimens is associated with a higher aerobic capacity in these animals. An elevated density of mitochondria as well as a rised oxidative capacity of individual mitochondria lead to a higher rate of aerobic energy production at low temperatures and, consequently, to a shift of the low T<sub>c</sub> to a lower value (Sommer & Pörtner 1998). However, the higher mitochondrial density causes a rise in standard metabolic rate at all temperatures (Sommer & Pörtner 1998) and, therefore, a concomitant shift of the high T<sub>c</sub> to a lower value. This explains previous observations that latitudinal or seasonal temperature adaptation in *A. marina* leads to a more or less parallel shift of both T<sub>c</sub> values (Sommer *et al.* 1997).

The studies mentioned so far could explain how the lugworm was able to conquer the subarctic waters of the White Sea some thousand years ago (Govberg 1973, Nesis 1983). However, they also lead to the question of how flexible the different populations may be with respect to present day temperature fluctuations, especially in the light of rising daily maximum temperatures due to global warming (Easterling *et al.* 1997, Kaufmann & Stern 1997, Gregory & Oerlemans 1998, Kerr 1998), which should be accompanied by a rise in the frequency and magnitude of thermal fluctuations. Our study was designed to investigate the potential to acclimate to acute heat stress (in comparison with cold stress) in a boreal and a subpolar population of the lugworm *A. marina* during a short term period of a few days, a period not unusual for weather and temperature conditions in the German Bight (North Sea) or the Kandalaksha Bay (White Sea). End products of anaerobic metabolism as well as p*H*<sub>i</sub> were measured as indicators of temperature stress, since the ability to acclimate is interpreted to be associated with the reversal of an initial transition to anaerobiosis (see above). Adenylate and ammonium



concentrations were monitored for a more complete consideration of energy status and metabolism.

## **Materials and Methods**

### *Animals*

Specimens of *Arenicola marina* were collected in 1994 from intertidal flats slightly above low water level of the North Sea near Dorum, Germany ("North Sea animals") and of the White Sea near Kartesh, Russia ("White Sea animals"). The body weight of boreal animals was 5 - 8 g, compared to 1 - 3 g of the subpolar worms. They were kept in the laboratory in aquaria filled with well aerated natural brackish sea water (22 ‰) and a 10 cm bottom layer of sediment. Temperatures were maintained at  $11 \pm 0.5$  °C ("North Sea animals") or  $6 \pm 0.5$  °C ("White Sea animals"). These temperatures are referred to as control temperatures.

### *Experimental procedure*

The animals were placed individually in 1 l-containers filled with sediment and sea water at control temperatures, where they were allowed to construct burrows. After 24 hours of preincubation, the containers were transferred into aquaria containing sea water with different, pre-set temperatures 4 degrees above the respective high  $T_c$ , to 21 °C (White Sea animals) or 25 °C (North Sea animals) or animals were incubated at -1.7 °C for up to 168 h, which was the lowest possible sea water temperature above freezing. The  $T_c$  thresholds had been determined in previous experiments (Sommer *et al.* 1997). To exclude handling artefacts, White Sea animals were also exposed to control temperatures for up to 1 week.

After removal of head and tail, the lugworms were opened by longitudinal dissection and gonads as well as the digestive tract were removed by use of tissue paper. The body wall musculature was blotted dry and freeze clamped in liquid nitrogen by means of a precooled Wollenberger clamp (Wollenberger *et al.* 1960). Samples were stored in liquid nitrogen until analysed.

### *Analyses*

For the determination of metabolite concentrations body wall tissue was powdered under liquid nitrogen using precooled mortar and pestle. Approximately 300 mg of powder were added to an excess (3x) volume of  $0.6 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  perchloric acid (PCA) precooled on ice. An Ultra-Turrax T8 (Janke & Kunkel, Staufen, F.R.G.) was used to homogenize the tissue. Precipitated protein was removed by centrifugation. The extract was neutralised by the addition of  $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  potassium hydroxide and a 1:6-mixture of solid  $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{KHCO}_3$ . A second centrifugation withdrew precipitated potassium perchlorate.

After PCA extraction succinate was measured spectrophotometrically in an enzymatic test according to Beutler (1990). Ammonium concentrations were determined enzymatically (Spectrophotometer Biochrom 4060, Pharmacia LKB, Uppsalla, Sweden) following a procedure modified after Bergmeyer & Beutler (1990). The reaction mixture consisted of  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  NADH,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  ADP,  $7 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  2-oxoglutarate in  $150 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  triethanolamine buffer (pH 8.0). Reaction was initiated by adding glutamate dehydrogenase diluted in glycerol.

A method modified from Fischer (1995) was used to measure the concentrations of the adenylates ATP, ADP and AMP using a High Performance Liquid Chromatograph (Beckman Instruments GmbH, Munich, F.R.G.). Separation was carried out at a Spherisorb C18 column (Latek, Eppelheim) at  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  and a flow rate of  $0.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . The mobile phase consisted of  $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  11-Aminoun-decanoic acid in  $25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  phosphate buffer with 8 % (v/v) methanol (pH = 6). Peaks were monitored at 210 nm,

using a Diode Array Detector Module 168 (System Gold, Beckman Instruments GmbH, Munich, F.R.G.).

A method modified from Hardewig *et al.* (1991) was used to measure the concentrations of the fatty acids propionate and acetate in PCA extracts, diluted with deionized water, using a Dionex BIO LC ion chromatograph (Dionex, Idstein, F.R.G.). Fatty acids were separated on an ion exclusion column (Dionex ICE-AS 1), using  $0.125 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  octanesulphonic acid as an eluent at a flow rate of  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  and  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Peaks were monitored with a conductivity detector. A micro membrane suppressor (Dionex AMMS-ICE) regenerated with  $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  tetrabutylammonium hydroxide was used to decrease background conductivity. Calibration curves were linear between acetate and propionate concentrations of 10 and  $500 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Alanopine and strombine were measured by cation exchange chromatography. Separation was carried out at  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  on an Interaction ARH-601 column for aromatic acids (ICT-ASS-Chem, Bad Homburg, F.R.G.), using  $6 \cdot 10^{-5} \text{ N H}_2\text{SO}_4$  as an eluent at a flow rate of  $0.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . A conductivity detector was utilised to monitor the peaks. Standard opine solution for calibration was obtained by means of *in vitro* synthesis following a method modified from Siegmund & Grieshaber (1983).

The intracellular buffer value ( $\beta_{\text{NB}}$ ) of body wall tissue under resting conditions was determined at  $15$  or  $7 \text{ }^\circ\text{C}$  following the method of Pörtner (1990). Briefly,  $0.3 \text{ g}$  of ground tissue were suspended in  $4 \text{ ml}$  ice-cold medium ( $540 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ KF}$ ,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NTA}$ ) in a temperature controlled tonometer (Instrumentation Laboratory, Padorno Dugano, Italy). The homogenate was equilibrated with different mixtures of  $\text{CO}_2$  in air ( $1.5$ ,  $2.0$  and  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ CO}_2$ ) for at least  $10 \text{ min}$  before analysis of pH and  $\text{Cco}_2$  took place according to Pörtner *et al.* (1990). Values of free inorganic phosphate were measured enzymatically according to Pörtner (1990).

### *Calculations of metabolic proton production*

The proton balance of anaerobic metabolism ( $\Delta H^+_{\text{met}}$ ) was evaluated from concentration changes ( $\Delta C$ ) between control values and 4 h of heat exposure (Pörtner 1987a, b) assuming that the accumulation of opines and volatile fatty acids is accompanied by an equal amount of protons, while succinate production is coupled with the release of 2 mol protons per mol. In a simplified approach changes in adenylate levels were treated to occur without influence on pH due to the low pH after 4 hours of heat stress (Pörtner 1987a). Ammonia is expected to buffer an equimolar amount of protons. Concentration changes of the phosphagen phosphotauro-cyamine were not analysed. Therefore, mean control levels were adopted from the literature (Pörtner *et al.* 1979, Schöttler *et al.* 1983, 1984a, Schiedek & Schöttler 1990). Proton binding by the phosphate buffer was calculated for the final pH; assuming maximum depletion of the phosphagen. The fraction of protonized phosphate (F) is calculated using equation (1) for  $\text{pK}_a(21\text{ }^\circ\text{C}) = 6.802$  and  $\text{pK}_a(25\text{ }^\circ\text{C}) = 6.790$ :

$$F = 1/(10^{\text{pH}-\text{pK}_a} + 1) \quad (1)$$

The amounts of non-respiratory protons were calculated according to:

$$\Delta H^+_{\text{non-resp.}} = -|\beta_{\text{NB}}| \times \Delta \text{pHi} - \Delta \text{Bic} \text{ (mmol} \cdot \text{l}^{-1}\text{)} \quad (2)$$

(non-resp.: non respiratory;  $\beta_{\text{NB}}$ : non-bicarbonate buffer value; Bic: bicarbonate)

However, changes in bicarbonate concentrations were neglected, since no temperature dependent changes had been observed in *Arenicola marina*, neither in blood (Toulmond 1977) nor in coelomic fluid or body wall tissue (Klein 1994).

## Statistics

Data were checked for outliers beyond the  $r(95)$  limits of an  $r$ -distribution ( $r_A > r(95)$ ) using Nalimov's test (Noack 1980). Statistical significance of differences was tested at the  $p \leq 0.05$  level using analysis of variance (ANOVA) and the post-hoc Student-Newman-Keuls test for independent samples. Data are given as means  $\pm$  standard deviation.

## Results

When lugworms from the North Sea were brought from 12 to 25 °C, 4 °C above the high  $T_c$  of 21 °C (Sommer *et al.* 1997), the concentrations of the opines strombine and alanopine rose in the body wall tissue (Fig. 1a). Strombine reached a significantly higher level already after 4 h at 25 °C, while the concentrations of alanopine were significantly elevated after 24 h only. No adaptive reversal of opine accumulation was seen during 24 h of exposure to high temperatures. In fact, animals survived for only slightly longer than one day. Death of all animals occurred within 3 days. In contrast to North Sea lugworms, animals from the White Sea not only survived exposure to high temperatures, but also exhibited an adaptive reversal of anaerobic metabolism (Fig. 1b). When temperature was elevated from 6 to 21 °C, 4 °C above their high  $T_c$  of 17 °C, the concentrations of both alanopine and strombine increased significantly during the first 4 h, reaching far higher levels than in North Sea specimens. However, the concentrations decreased again after 10 h and reached control levels within 72 h (Fig. 1). Succinate reached a high level of  $2.53 \pm 0.41 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. ( $n = 4$ ) in White Sea animals after 24 h at 21 °C, compared to  $0.07 \pm 0.42 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. ( $n = 4$ ) in North Sea specimens at 25 °C, and decreased again thereafter to a significantly reduced concentration after 3 days (Fig. 2).

In spite of early death, concentrations of ATP in the body wall tissue of North Sea animals remained unaffected by temperature (Fig. 3a). Obviously, metabolism maintained

ATP levels, even under these lethal conditions. The concentrations of ADP and AMP increased significantly after temperature was elevated in the sediment to 25 °C, leading to significant changes in the [ATP]:[ADP] ratio after 4 h (Fig. 3b) and a slight, although insignificant rise in the sum of adenylate levels (Fig. 3c). This picture differs in lugworms from the White Sea (Fig. 4). When temperature was elevated to 21 °C in the sediment, the ATP store in the body wall tissue was depleted to levels below 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. during the first 4 h in the subpolar animals and was not replenished before 24 h (Fig. 4a). Nevertheless, the ability of White Sea lugworms to adapt to high temperatures was demonstrated when ATP concentrations reached a value after 72 h, which was even significantly higher than under control conditions. AMP concentrations were significantly elevated in the body wall tissue of these animals within 4 hours, reaching the highest concentration of  $0.56 \pm 0.22 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. ( $n = 5$ ) after 10 h (Fig. 4c). However, an adaptive reversal of AMP accumulation was seen after 72 h, when concentrations had returned to a low level of  $0.14 \pm 0.03 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. ( $n = 5$ ).

The time course of changes in ammonia concentrations ( $[\text{NH}_3] + [\text{NH}_4^+]$ ) in the body wall tissue is depicted in figure 5a. Compared to White Sea animals, lugworms from the North Sea showed small concentration changes only. However, the rise from  $0.33 \pm 0.20 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. ( $n = 5$ ) at 0 h to  $2.59 \pm 0.96 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. ( $n = 5$ ) after 10 h was significant. In White Sea animals ammonia accumulated to a high level of  $11.26 \pm 1.90 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. ( $n = 5$ ) already during the first 4 h, after which time the concentration remained constant for 20 h but returned to control values within 72 h. In lugworms from the White Sea the data reveal a significant correlation between intracellular pH (Fig. 6) and ammonia levels (Fig. 5b).

Heat stress caused a significant drop in intracellular pH during the first 4 h of exposure (Fig. 6). Acidification by about 0.2 pH-units was observed in North Sea animals, while in specimens from the White Sea  $\text{pH}_i$  fell by 0.6 pH-units. These differences can partly be related to the intracellular, non-bicarbonate buffer capacity ( $\beta_{\text{NB}}$ ), being significantly higher in lugworms from the North Sea ( $26.08 \pm 4.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{pH}^{-1}$ ).

pH<sup>-1</sup>· kg<sup>-1</sup> fresh wt.; n = 4) than in White Sea specimens (20.07 ± 2.07 mmol· pH<sup>-1</sup>· kg<sup>-1</sup> fresh wt.; n= 4) when measured at 15 °C (Table 1). This comparison of measurements at the same temperature indicates, that the buffer capacity decreases with cold adaptation. In addition, the assay temperature influences β<sub>NB</sub> (van Dijk *et al.* 1997). In North Sea specimens β<sub>NB</sub> was slightly and non-significantly lower when measured at 7 °C (22.79 ± 2.64 mmol· pH<sup>-1</sup>· kg<sup>-1</sup> fresh wt.; n= 5) compared to a value of 26.08 ± 4.05 mmol· pH<sup>-1</sup>· kg<sup>-1</sup> fresh wt. (n = 4) at 15 °C, found in animals acclimated to the same temperature of 11 °C (Table 1). Metabolic proton production was 7 times higher in the subpolar than in the boreal animals (Table 2). This together with the lower buffer capacity in the White Sea lugworms can explain the differences in the pH drop between animals of both populations. An excess of metabolic protons even remains in White Sea animals which is unexplained by the non-respiratory proton quantities.

For comparison with the adjustment to extremely high temperatures, metabolic flexibility was also tested during acute cold exposure. The time course of changes in metabolite levels (Fig. 7) shows, that although lugworms from both the White or North Sea survived a temperature drop from 6 or 12 °C to -1.7 °C for more than one week, short term cold acclimation in summer animals from both areas was insufficient. After an initial rise in the concentrations of succinate, acetate or propionate in the body wall musculature, values returned to control levels after 24 h. Nevertheless, the concentrations increased again thereafter and succinate reached high values of 2.42 ± 3.14 μmol· g<sup>-1</sup> fresh wt. in North Sea animals or even 12.01 ± 5.00 μmol· g<sup>-1</sup> fresh wt. in White Sea animals within 7 days.

## Discussion

Populations of the lugworm *Arenicola marina* are not only exposed to different climates - from polar to subtropic - but also to seasonal and diurnal temperature changes (Wesenberg-Lund 1953, Hartmann-Schröder 1971, Dörjes 1970). Our study was designed to investigate the plasticity of adaptational processes after such temperature changes. End products of anaerobic metabolism were measured as indicators of temperature stress and cold and warm exposure were compared with respect to the time course of acclimation.

### *Adaptational capacity during heat exposure*

Our results indicate that within 3 days, North Sea animals were not able to adapt to temperatures 4 °C above the high critical temperature ( $T_c$ ). The opines alanopine and strombine, the volatile fatty acids and succinate were accumulated in the body wall tissue in response to a temperature change from 12 to 25 °C followed by the death of all animals after 1 to 3 days (Fig. 1a, 2a). It seems that the temperature dependent rise in energy demand, due to an increased metabolic rate with rising temperatures, cannot be met by the ventilatory and circulatory mechanisms of oxygen supply. Additional anaerobic energy production is required, indicating transition to a time limited situation.

In contrast to North Sea animals, specimens from the White Sea not only survived for more than 3 days after temperature was elevated 4 °C above the high  $T_c$ , but were actually able to acclimate as indicated by the reversal of an initial transition to anaerobiosis (Fig. 1b, 2b). Concentrations of the opines alanopine and strombine were highest after 4 h and declined thereafter. Only succinate levels remained elevated during the first 24 h, but decreased again to even significantly reduced concentrations within 3 days (Fig. 2b). The accumulation of volatile fatty acids and the development of acid-base disturbances was also reversed 3 days after the onset of heat exposure (Fig 2b; 6). The mechanisms of



recovery are unexplained, however, as a consequence of cold adaptation, White Sea animals possess a higher content of mitochondria (Sommer & Pörtner 1998). The costs of maintenance for ionic and proton gradients across mitochondrial membranes are expected to be proportional to the number of mitochondria present per unit cell volume (Brand & Murphy 1987, Pörtner *et al.* 1998). As discussed by Sommer *et al.* (1997), it may be possible, that mitochondrial density is reduced during acclimation to higher temperatures, a process, which could be accomplished within 5 days considering the life span of mitochondria (Alberts *et al.* 1986). In consequence, the cost of mitochondrial maintenance is decreased, compensating for the  $Q_{10}$  effect on metabolic rate. Owing to the relative drop in standard metabolic rate, the high  $T_c$ , which indicates a discrepancy between oxygen consuming and delivering processes, will shift to higher values (Sommer & Pörtner 1998).

These conclusions imply that the limited ability to acclimate to temperature changes in North Sea specimens may be linked to a limited capacity to adjust mitochondrial density. The range of daily and seasonal temperature fluctuations in the habitat of the White Sea animals, which is larger than in the North Sea habitat (Zenkevitch 1963, Wolff 1983) can be seen as a reason for the higher adaptational capacity of the subpolar animals.

#### *Energy demand and survival strategy*

ATP concentrations in the body wall tissue did not change in lugworms from the North Sea during exposure to high temperatures (Fig. 3a). During anaerobiosis energy turnover is usually depressed in comparison to aerobic metabolism (Zebe *et al.* 1980, Hand & Hardewig 1996). Therefore, ATP concentrations in *A. marina* decrease only slightly under anoxic conditions at constant temperatures, especially, since ATP levels are buffered at the expense of phosphotaurocyamine (Schöttler *et al.* 1983, 1984a, 1984b). Constant ATP concentrations in spite of heat stress were also found in the water scorpion

*Ranatra chinensis* (Chiba *et al.* 1991). However, in North Sea lugworms concentrations of ADP and particularly AMP increased significantly at high temperatures and, in consequence, a downward shift in [ATP]:[ADP] ratios occurred (Fig. 3b). A higher fraction of AMP in the adenylate pool leads to a diminished allosteric inhibition of the phosphofructokinase by ATP (Stryer 1990) and a rise in glycolytic rate. This regulatory feature helps to keep the ATP pool constant during periods of elevated anaerobic energy demand. However, rising concentrations of ADP and AMP at constant ATP levels imply a net synthesis of adenylates at increasing temperatures. Interestingly, Zielinski & Pörtner (1996) found a net depletion of adenylates at low temperatures in *S. nudus* and discussed this phenomenon to be caused by a temperature dependent shift in the reaction equilibrium of AMP deaminase favouring IMP formation at the expense of AMP. If this process is reversed during warming via enhanced flux through the purine nucleotide cycle, high temperatures would cause net AMP accumulation as seen in the lugworm. This process must subsequently lead to rising ADP levels since the equilibrium of adenylate kinase is rather temperature insensitive (Tewari *et al.* 1991). The changes observed are consistent with a build up of adenylates at high temperatures but do not explain why the animals died, since obviously, energy levels were not limiting, at least not in the musculature. The data suggest that a large rise in energy expenditure did not occur in North Sea animals, whereas such a rise is evident from the data collected in White Sea specimens. In these animals ATP stores were depleted to a level below detection already during the first 4 h at 21 °C. This process was not mirrored by a concomitant rise in ADP levels, actually, only AMP contents increased to some extent. Obviously, a net depletion of adenylates occurred (Fig. 4d). Instead of a decrease in metabolic rate due to hypoxic conditions a drastic rise in energy demand occurred, which could not be buffered by phosphotaurocyamine or anaerobic metabolism. Unfortunately, no data are available about differences in the phosphagen stores of both populations.

Since the ability to survive heat exposure was improved in White Sea animals, it seems that an energy demanding mechanism exists in this population, which supports survival. The nature of the energy demanding process is unclear, but may involve the

synthesis of heat shock proteins, which are induced by a variety of stressors, like heat or cold shock. These proteins are protective since they prevent the aggregation of denaturated proteins and enable refolding and stabilisation of other proteins (Hoffmann & Parsons 1994). The pool and the threshold temperature for the synthesis of heat shock proteins was found to vary with latitudinal and seasonal temperature adaptation in different marine invertebrates (Hofman & Somero 1995, 1996). In the light of that the cost for protein synthesis already ranges between 18 and 26 % of ATP turnover in different tissues and cells under resting conditions (Hawkins 1991), it is likely that the synthesis of heat shock proteins is involved in the adaptational process to extreme temperatures in lugworms from the White Sea. A down-regulation of protein synthesis after 1 day may then contribute to the restoration of aerobic control conditions. Whatever the mechanisms of survival are, it remains unclear why they are insufficient to support survival at extreme temperatures in North Sea lugworms. Possibly, a behavioural avoidance strategy evolved instead in the North Sea population.

In this context, it is intriguing that White Sea animals can tolerate a tremendous drop in ATP levels during the period of elevated energy demands beyond  $T_c$ 's. Tight regulation of intracellular pH (see below) and ATP concentrations close to control levels may be necessary for the maintenance of locomotory capacity (Hand & Hardewig 1996). In contrast, a low intracellular pH at high energy expenditure, for example during the synthesis of heat shock proteins, may be tolerated when locomotory performance is not critical. North Sea animals may manage to avoid heat stress by deepening their burrows, which are up to 70 cm deep (unpubl. observation). Therefore, North Sea animals may maintain their locomotory capacity to escape unfavourable conditions (which was not possible in the experimental set-up and therefore lethal). In contrast, White Sea animals in their natural environments are restricted to a maximum depth of 10 - 15 cm, because of a thick layer of clay in the underground (unpubl. observations). This may also contribute to why White Sea specimens are adapted to withstand more extreme temperatures than North Sea lugworms.

### *Ammonia accumulation*

Heat stress is accompanied by an accumulation of ammonia in the body wall tissue of *A. marina*. Under the experimental conditions, with a big water volume being available for ammonia excretion, the accumulation in the tissue could either be caused by an increased trapping of ammonium ions in the animal at low intracellular pH or by increased ammonia production reflecting a rise in metabolic rate or a shift from carbohydrate to protein catabolism. Additionally, ammonia may be generated by the net depletion of adenylates. However, a net depletion of adenylates occurred by about  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. in White Sea animals during the first 4 h of heat stress, whereas ammonia concentrations increased by about  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt.. Since equimolar concentrations of ammonia are released by the hydrolysis of AMP to IMP (Pörtner 1987a) the depletion of adenylates cannot be the only reason for ammonia accumulation. However, the drop in intracellular pH was more drastic in White Sea than in North Sea animals (Fig. 6) suggesting that high proton concentrations led to a trapping of ammonium ions in the tissue (e.g. Pörtner 1989). Accordingly, a significant correlation was found between intracellular pH and ammonia concentrations in White Sea animals (Fig. 5b). The rise in metabolic rate during acidosis could lead to an increase in protein catabolism (May *et al.* 1986) and thereby to ammonia accumulation in the tissue. Actually, Klein (1994) found a reduction of muscle tissue dry weight in *A. marina* during short term exposure to high temperatures, indicating that muscle proteins were depleted. Altogether, it seems likely that heat stress led to a rise in metabolic rate, supported by enhanced degradation of proteins. Due to the simultaneous drop in intracellular pH, ammonium ions produced were trapped in the tissue. During 3 days of heat stress, the observed recovery in acid-base balance of the subpolar animals (Fig. 6) would then also explain why ammonia was able to return to control levels.

### *Heat stress and acid-base regulation*

Heat stress caused a significant drop in  $\text{pH}_i$  during the first 4 h of exposure (Fig. 6). Acidification by about 0.2 pH-units was observed in North Sea animals, while in specimens from the White Sea  $\text{pH}_i$  fell by 0.6 pH-units exceeding by far the value expected according to the  $\alpha$ -stat hypothesis by Reeves (1972). The degree of acidification reflects the effects of metabolic and respiratory proton production on cellular buffers. The  $\beta_{\text{NB}}$ -value in the body wall of North Sea animals was significantly and by 23 % higher than in White Sea animals (Table 1), possibly reflecting the priority of pH maintenance in North Sea specimens (see above). In addition, the lower buffer values in White Sea animals may partly be related to the higher mitochondrial density (Sommer & Pörtner 1998), since the non-bicarbonate buffer value in the mitochondrial matrix is far lower than in the cytosol (Pörtner & Sartoris 1998). However, the difference in  $\beta_{\text{NB}}$ -values cannot fully explain the larger pH drop in White Sea animals. No data are available about differences in bicarbonate contents in the body wall between both populations, however, its contribution to the buffering process is expected to be lower at the lower  $\text{pH}_i$  of White Sea specimens. Moreover, no temperature dependent changes in bicarbonate concentrations in *A. marina* have been reported, neither in blood (Toulmond 1977) nor in coelomic fluid or body wall tissue (Klein 1994). Therefore, the influence of bicarbonate on acid-base changes due to temperature stress should be small.

Calculations of metabolic proton production from the accumulation of metabolites during heat stress according to Pörtner (1987a) revealed a maximum amount of 32.9  $\mu\text{mol H}^+ \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. in White Sea animals, a quantity 7 times larger than in North Sea specimens where a maximum of 4.6  $\mu\text{mol H}^+ \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. was generated (Table 2). A discrepancy was observed in both populations, between the accumulation of protons derived from metabolic pathways ( $\Delta\text{H}^+_{\text{met.}}$ ) and the non-respiratory changes seen in acid-base status (changes caused by either ion exchange or metabolism,  $\Delta\text{H}^+_{\text{non-resp.}}$ ; Table 2). This can only partly be explained by the incomplete survey of acid-base relevant metabolite changes. The main proton consuming process is the cleavage of phosphagens

buffering the ATP stores. The depletion of ATP stores in White Sea animals, compared to the minor changes in North Sea lugworms, indicates that the phosphagen stores of the subpolar animals were completely depleted, leading to an assumed maximum proton consumption of  $4.4 \mu\text{mol H}^+ \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt. at the final  $\text{pH}_i$  reached. However, metabolic proton quantities are still far in excess of non-respiratory amounts. These calculations strongly suggest that net proton release occurs from muscle tissues into the coelomic fluid or ambient water (Pörtner 1987b). In *Sipunculus nudus* the amount of protons released into the ambient water covers quite well the discrepancy between intracellular and extracellular metabolic and non-respiratory proton quantities. During anaerobiosis the proton-equivalent ion transfer to extracellular compartments is predominant and rises depending on the degree of acidification. Assuming that a quantitative correlation prevails between the proton balance of metabolism and changes in the acid-base status (Pörtner 1987b), proton-equivalent ion transfer is likely to explain the large discrepancy between metabolic and non-respiratory proton amounts in White Sea lugworms.

In contrast, the discrepancy between non-respiratory and metabolic proton quantities is far less in North Sea animals, where non-respiratory protons even exceeded the maximum metabolic proton production calculated assuming maximum phosphagen depletion. This either indicates that the use of phosphagen stores was overestimated or argues for a downregulation of intracellular pH during anaerobiosis (Pörtner 1993). As a corollary, the high metabolic proton production together with the lower buffer values can explain the stronger acidification seen in White Sea compared to North Sea lugworms and reflects the huge difference in anaerobic metabolic rate between the two populations.

#### *Acclimation to cold*

Cold stress causes phenomena similar to heat exposure, as seen in an onset of anaerobic metabolism and a decrease in intracellular pH in cold exposed *A. marina* as well as in the peanut worm *Sipunculus nudus* (Fig. 7; Zielinski & Pörtner 1996, Sommer *et al.* 1997).

In *S. nudus* a drop in coelomic  $P_{O_2}$  and a concomitant onset of anaerobic metabolism was correlated with reduced ventilation at low temperatures (Zielinski & Pörtner 1996). Summer animals from both *Arenicola* populations were only able to tolerate short term cold stress below the low  $T_c$  (Fig. 7). The absence of cold acclimation could be seen in both White Sea and North Sea animals after a temperature drop from 6 or 12 °C to -1.7 °C. After an initial rise in the concentrations of succinate, acetate or propionate in the body wall musculature, values returned to control levels after 24 h. Nevertheless, the concentrations increased again thereafter and acetate or succinate reached even significantly higher levels after 7 days in North or White Sea lugworms. As discussed above, latitudinal cold adaptation in *A. marina* is reflected by the proliferation of mitochondria in muscle tissue as well as by an increase in the aerobic capacity of individual mitochondria (Sommer & Pörtner 1998). This rise in aerobic capacity at low temperatures caused a suppression of anaerobic metabolism and a shift of the low  $T_c$  to values close to 0 °C (Sommer *et al.* 1997). A failure of both populations to acclimate to temperatures close to freezing may be linked to a limited capacity to adjust mitochondrial density or to further increase the aerobic capacity of each individual mitochondrion under the experimental conditions. This failure is interesting, since lugworms from the White Sea are quite able to adapt to subzero temperatures in winter (Kolyakina 1980). Longer periods with slowly decreasing temperatures seem to be required to acclimate to cold conditions. Probably, mitochondrial synthesis at low temperatures is much more time consuming than mitochondrial depletion in the heat. In general, cold adaptation is slower than acclimation to high temperatures (Hochachka & Somero 1984). Costs of mitochondrial synthesis or of enzyme production as well as limitations in available space for more enzymes or mitochondria may be constraints limiting the degree and velocity of cold acclimation. The adaptive advantage of prolonged acclimation would be that it allows to spread the costs of mitochondrial or enzyme synthesis over longer periods.

## Conclusions

Lugworms from the North or White Seas possess different capacities to cope with heat stress. In contrast to North Sea specimens, lugworms from the White Sea not only survived long term exposure to temperatures above critical, but even exhibited an adaptive reversal of anaerobic metabolism after three days. The depletion of ATP stores to very low levels as well as the high rates of anaerobic metabolism observed during the first 24 h of heat stress lead to the conclusion that an energy consuming process, like the synthesis of heat shock proteins, is required to ensure survival. Additionally, it seems possible that mitochondrial density is reduced in the subpolar animals during acclimation to high temperatures. This process reduces the costs of mitochondrial maintenance, compensates for the  $Q_{10}$  effect on metabolic rate and allows the costs of potential heat shock protein synthesis to be paid. A higher rate of metabolic proton production, together with a lower intracellular, non-bicarbonate buffer capacity can explain the drastic drop in intracellular pH, observed in *A. marina* from the White Sea. The larger flexibility in these animals is seen as an adaptation to the larger variability of temperatures at the White Sea and the fact that White Sea lugworms are forced to dwell closer to the sediment surface, thereby being even more exposed to more variable surface temperatures than North Sea animals.

The ability to survive cold stress is limited in summer animals from both populations. After an initial reversal of anaerobic metabolism, concentrations of volatile fatty acids and succinate continued to increase, indicating insufficient aerobic capacity at temperatures just above freezing. Adjustment to very low temperatures as seen in White Sea animals in winter is therefore likely to require much longer time periods with slowly decreasing temperatures.



### *Acknowledgements*

Parts of the work was carried out at the White Sea Biological Station / Zoological Institute of the Russian Academy of Science in St. Petersburg, Russia. We are grateful for the excellent support of Dr. V. Fedjakov and Dr. A. A. Sukhotin and all the helpful hands at the station. We also thank T. Hirse for his technical assistance. Alfred-Wegener-Institute Publication No.

### **References**

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1986) Molekularbiologie der Zelle. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Bergmeyer HU, Beutler HO (1990) Ammonia. In: Bergmeyer HU (ed) Methods of enzymatic analysis, Vol VIII. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, p 454-461
- Beutler H-O (1990) Succinate. In: Bergmeyer HU (ed) Methods of enzymatic analysis, Vol VII. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, p 25-33
- Chiba A, Hamaguchi M, Tokuno T, Asai T, Okuda H, Chichibu S (1991) Changes in high-energy phosphate metabolism in the water scorpion, *Ranatra chinensis*, under cold water-warm water stress. Comp Biochem Physiol 100: 399-405
- van Dijk PLM, Hardewig I, Pörtner HO (1997) Temperature-dependent shift of  $pH_i$  in fish white muscle: contributions of passive and active processes. Am J Physiol 272: R84-R89
- Dörjes J (1970) Ökofaktoren. In: Reineck H-E (ed) Das Watt. Dr. Kramer Verlag, Frankfurt/Main, p 17
- Easterling DR, Horton B, Jones PD, Peterson TC, Karl TR, Parker DE, Salinger MJ, Razuvayev V, Plummer N, Jamason P, Folland CK (1997) Maximum and minimum temperature trends for the globe. Science 277: 364-367

- Fischer JH (1995) Specific detection of nucleotides, creatine phosphate, and their derivatives from tissue in a simple, isocratic, recycling, low volume system. *LC GC int* 8: 254
- Gregory JM, Oerlemans J (1998) Stimulated future sea-level rises due to glacier melt based on regionally and seasonally resolved temperature changes. *Nature* 391: 474-476
- Govberg LI (1973) Holocene molluscs of the White Sea. Shirshov Institute of Oceanology, USSR Academy of Science, pp. 547-551
- Grieshaber MK, Hausschild K, Sommer A, Völkel S (1993) Anaerobiosis and sulphobiosis in the lugworm, *Arenicola marina* L. In: Elefthariou A, Ansell AD, Smith CJ (eds) *Biology and Ecology of shallow coastal waters*. Olsen & Olsen, Fredensborg, p 131-137
- Hand SC, Hardewig I (1996) Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanisms and implications. *Annu Rev Physiol* 58: 539-563
- Hardewig I, Addink ADF, Grieshaber MK, Pörtner HO, van den Thillart G (1991) Metabolic rates at different oxygen levels determined by direct and indirect calorimetry in the oxyconformer *Sipunculus nudus*. *J exp Biol* 157: 143-160
- Hartman-Schröder G (1971) Annelida, Borstenwürmer, Polychaeta. In: Dahl M, Peus F (eds) *Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeresteile*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- Hawkins AJS (1991) Protein turnover: a functional appraisal. *Funct Ecol* 5: 222-233
- Hochachka PW, Somero GN (1984) *Biochemical adaptation*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey
- Hoffmann AA & Parsons PA (1994) *Evolutionary genetics and environmental stress*. Oxford University Press, Oxford
- Hofmann GE, Somero GN (1995) Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp 70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *J exp Biol* 198: 1509-1518

- Hofmann GE, Somero GN (1996) Interspecific variation in thermal denaturation of proteins in the congeneric mussels *Mytilus trossulus* and *M. gallorovincialis*: evidence from heat shock response and protein ubiquitination. *Mar Biol* 126: 65-75
- Hummel H, Sommer A, Bogaards RH, Poertner HO (1997) Variation in genetic traits of the lugworm *Arenicola marina*: temperature related expression of mitochondrial allozymes? *Mar Ecol Prog Ser* 159: 189-195
- Kaufmann RK, Stern DI (1997) Evidence for human influence on climate from hemispheric temperature relationships. *Nature* 388: 39-44
- Kerr RA (1998) The hottest year, by a hair. *Science* 279: 315-316
- Klein B (1994) Zur Temperaturabhängigkeit physiologischer Prozesse bei *Arenicola marina* (L.): Energiestoffwechsel und Säure-Basen-Haushalt. Diplomarbeit, Düsseldorf
- Kolyakina NM (1980) [The seasonal and age characteristics in the distribution of lugworm *Arenicola marina* (Polychaeta) in the Kislaya inlet of the Kandalaksha Bay.] *Biology of the White Sea* 5: 77-92
- Krüger F (1964) Versuch über die Abhängigkeit der Atmung von *Arenicola marina* (Annelides Polychaeta) von Größe und Temperatur. *Helg Wiss Meeresunters* 10: 38-63
- May RC, Kelly RA, Mitch WE (1986) Metabolic acidosis stimulates protein degradation in rat muscle by a glucocorticoid-dependent mechanism. *J Clin Invest* 77: 614-621
- Nesis KN (1983) A hypothesis on the origin of Western and Eastern Arctic distribution areas of marine bottom animals. *Biologiya Morya* 5: 3-13
- Noack S (1980) Statistische Auswertung von Meß- und Versuchsdaten mit Taschenrechner und Tischcomputer. Walter de Gruyter, Berlin
- Pörtner HO (1987a) Contribution of anaerobic metabolism to pH-regulation in animal tissues: theory. *J exp Biol* 131: 69-87
- Pörtner HO (1987b) Anaerobic metabolism and changes in acid-base status: Quantitative interrelationships and pH regulation in the marine worm *Sipunculus nudus*. *J exp Biol* 131: 89-105

- Pörtner HO (1989) The importance of metabolism in acid-base regulation and acid-base methodology. *Can J Zool* 67: 3005-3017
- Pörtner HO (1990) Determination of intracellular buffer values after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. *Resp Physiol* 81: 275-288
- Pörtner HO (1993) Multicompartmental analyses of acid-base and metabolic homeostasis during anaerobiosis: Invertebrate and lower vertebrate examples. In: Hochachka PW, Lutz PL, Sick T, Rosenthal M, van den Thillart G (eds) *Surviving hypoxia: Mechanisms of control and adaptation*. CRC Press Inc., Boca Raton Fl., p 139-156
- Pörtner HO, Sartoris FJ (1998) Invasive studies of intracellular acid-base parameters: environmental and functional aspects. In: Taylor EW, Egginton S, Raven JA (eds) *Regulation of tissue pH in plants and animals: A reappraisal of current techniques*. Cambridge University Press, in press
- Pörtner HO, Surhold B, Grieshaber M (1979) Recovery from anaerobiosis of the lugworm, *Arenicola marina* L.: Changes of metabolite concentrations in the body-wall musculature. *J Comp Physiol* 133: 227-231
- Pörtner HO, Boutilier RG, Tang Y, Toews DP (1990) Determination of intracellular pH and Pco<sub>2</sub> after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. *Resp Physiol* 81: 255-274
- Pörtner HO, Hardewig I, Sartoris FJ, van Dijk PLM (1998) Acid-base balance, ion regulation and energetics in the cold. In: Pörtner HO, Playle RC (eds) *Cold ocean physiology*. Cambridge University Press, p 88-120
- Reeves RB (1972) An imidazole alaphastat hypothesis for vertebrate acid-base regulation: Tissue carbon dioxide content and body temperature in bullfrogs. *Resp Physiol* 14: 219-236
- Schiedek D, Schöttler U (1990) The energy production of juvenile *Arenicola marina* (Polychaeta) under anoxia and hypoxic conditions. *Helg Wiss Meeresunters* 44: 135-145

- Schmidt R, Schiedek D, Schöttler U (1992) Der Einfluß der Temperatur auf den anaeroben Energiestoffwechsel von *Arenicola marina* L. (Polychaeta). Verh Dtsch Zool Ges 92: 167
- Schöttler U, Wienhausen G, Zebe E (1983) The mode of energy production in the lugworm *Arenicola marina* at different oxygen concentrations. J Comp Physiol 149: 547-555
- Schöttler U, Surholt B, Zebe E (1984a) Anaerobic metabolism in *Arenicola marina* and *Nereis diversicolor* during low tide. Mar Biol 81: 69-73
- Schöttler U, Wienhausen G, Westermann (1984b) Anaerobic metabolism in the lugworm *Arenicola marina* L.: the transition from aerobic to anaerobic metabolism. Comp Biochem Physiol 79B: 93-103
- Seymour MK (1972) Effects of temperature changes on irrigation rate in *Arenicola marina* (L.). Comp Biochem Physiol 43: 553-564
- Siegmund B, Grieshaber MK (1983) Determination of meso-alanopine and D-strombine by high pressure liquid chromatography in extracts from marine invertebrates. Hoppe Seyler's Z Physiol Chem 364: 807-812
- Sommer A, Klein B, Pörtner HO (1997) Temperature-induced anaerobiosis in two populations of the polychaete worm *Arenicola marina* (L.). J Comp Physiol 167B: 25-35
- Sommer A, Pörtner HO (1998) Mechanisms of metabolic cold compensation in the lugworm *Arenicola marina* (L.): comparison of a White Sea and a North Sea population. (in prep.)
- Stryer L (1990) Biochemie. Spectrum der Wissenschaft, Spectrum der Wissenschaft Verlag GmbH, Heidelberg
- Tewari YB, Goldberg RN, Advani JV (1991) Thermodynamics of the disproportionation of adenosine 5'-diphosphate to adenosine 5'-triphosphate and adenosine 5'-monophosphate. II. Experimental data. Biophys Chem 40: 263-276
- Toulmond A (1975) Blood oxygen transport and metabolism of the confined lugworm *Arenicola marina*. J exp Biol 63: 647-660

- Toulmond A (1977) Temperature-induced variations of blood acid-base status in the lugworm, *Arenicola marina*. (L.) I. *in vitro* study. *Resp Physiol* 31: 139-149
- Toulmond A, Tchernigovtzeff C (1984) Ventilation and respiratory gas exchange of the lugworm *Arenicola marina* (L.) as a function of ambient pO<sub>2</sub> (20-700 Torr). *Respir Physiol* 57: 349-363
- Völkel S, Grieshaber MK (1992) Mechanisms of sulphide tolerance in the peanut worm, *Sipunculus nudus* (Sipunculidae) and in the lugworm *Arenicola marina* (Polychaeta). *J Comp Physiol* 162B: 469-477
- Wesenberg-Lund E (1953) *The Zoology of East Greenland*, Vol 122(3), C.A. Reitzel Forlag, Kopenhagen
- Wells GP (1964) Temperature, taxonomic technique and the zoogeography of lugworms (Arenicolidae, Polychaeta). *Helg Wiss Meeresunters* 10: 404-410
- Wolff WJ (ed) (1983) *Ecology of the Wadden Sea*. Vol 1, Chap. 2: Hydrography. A A Balkema, Rotterdam
- Wollenberger AO, Ristau O, Schoffa G (1960) Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung großer Gewebestücke. *Pflügers Arch* 270: 399-412
- Zebe E, Grieshaber M, Schöttler U (1980) Biotopbedingte und funktionsbedingte Anaerobiose. *Biologie in unserer Zeit* 6: 175-182
- Zenkevitch L (1963) *Biology of the Seas of the U.S.S.R.*. George Allen & Unwin Ltd, London
- Zielinski S, Pörtner H.O. (1996) Energy metabolism and ATP free-energy change of the intertidal worm *Sipunculus nudus* below a critical temperature. *J Comp Physiol* 166B: 492-500.

Table 1. Intracellular, non-bicarbonate buffer values ( $\beta_{NB}$ ) of resting body wall tissue of *Arenicola marina* from the North or White Seas. Samples were analysed at 15 or 7 °C, while animals were incubated at their respective control temperature of 11 °C (North Sea) or 6 °C (White Sea). Values were significantly different between populations at 15 °C ( $p < 0.05$ ;  $\text{mmol} \cdot \text{pH}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  fresh wt.; mean  $\pm$  S.D.;  $n = 4$ ).

North Sea - 7 °C -	North Sea - 15 °C -	White Sea - 15 °C -
22.79 $\pm$ 2.64	26.08 $\pm$ 4.05	20.07 $\pm$ 2.07

Table 2. Concentrations ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt.; mean  $\pm$  S.D.) and mean concentration changes ( $\Delta\text{C}$ ) of metabolites in the body wall tissue of *A. marina* 4 h after a temperature rise in the sediment from 12 to 25 °C (North Sea animals) or 6 to 21 °C (White Sea animals).

a) North Sea animals

	Control	heat stress	concentration changes	mean
	0h	4h	$\Delta\text{C}$	$\Delta\text{H}^+_{\text{met}}$
Alanopine	0.43 $\pm$ 0.22	0.53 $\pm$ 0.20	+0.10	+0.10
Strombine	2.03 $\pm$ 1.70	8.46 $\pm$ 3.93	+6.43	+6.43
Acetate	0.26 $\pm$ 0.08	0.16 $\pm$ 0.15	- 0.10	- 0.10
Propionate	0.02 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.14	+0.06	+0.06
Succinate	0.10 $\pm$ 0.12	0.79 $\pm$ 0.29	+0.69	+1.38
ATP	3.08 $\pm$ 0.75	3.31 $\pm$ 0.57	+0.23	--
ADP	0.12 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.15	+0.54	--
Ammonia	0.33 $\pm$ 0.20	0.67 $\pm$ 0.26	+0.34	-0.34
P-taurocyamine	7.11 $\pm$ 0.63	< 0.1	-7.01	-2.98
			$\Delta\text{H}^+_{\text{met}}$ :	+4.55
			$\Delta\text{H}^+_{\text{non-resp.}}$ :	+6.19
			Discrepancy:	-1.64 (-26%)

b) White Sea animals

Alanopine	0.14 $\pm$ 0.21	18.74 $\pm$ 11.02	+18.60	+18.60
Strombine	2.89 $\pm$ 2.50	26.72 $\pm$ 9.23	+23.83	+23.83
Acetate	0.15 $\pm$ 0.12	0.90 $\pm$ 0.50	+0.75	+0.75
Propionate	0.03 $\pm$ 0.04	0.44 $\pm$ 0.37	+0.41	+0.41
Succinate	0.09 $\pm$ 0.10	1.93 $\pm$ 1.03	+1.84	+3.68
ATP	2.41 $\pm$ 0.11	< 0.1	-2.31	--
ADP	0.64 $\pm$ 0.20	0.45 $\pm$ 0.30	-0.19	--
Ammonia	1.26 $\pm$ 0.26	11.26 $\pm$ 1.90	+10.00	-10.00
P-taurocyamine	7.11 $\pm$ 0.63	< 0.1	-7.01	-4.42
			$\Delta\text{H}^+_{\text{met}}$ :	+32.85
			$\Delta\text{H}^+_{\text{non-resp.}}$ :	+12.07
			Discrepancy:	+20.78 (+63%)

Note: The proton balance of anaerobic metabolism ( $\Delta\text{H}^+_{\text{met}}$ ) was evaluated from concentration changes ( $\Delta\text{C}$ ) according to Pörtner (1987a,b). Data for phosphotaurocyamine consider a maximum effect (see text) during complete depletion at the  $\text{pH}_i$  value measured after 4h.



**Fig. 1** Concentrations ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt.) of the opines alanopine and strombine in the body wall tissue of *Arenicola marina* from (a) the North or (b) the White Sea before and after a temperature rise in the sediment 4 °C above their respective critical temperatures. North Sea lugworms were exposed to a temperature elevation from 12 to 25 °C and White Sea worms from 6 to 21 °C. All North Sea animals died between 24 and 72 hours after the temperature change occurred ( $n = 5$ ; mean  $\pm$  S.D.; \* = significantly different from the control value at 0h).

**Fig. 2** Concentrations of volatile fatty acids and succinate in the body wall tissue of *Arenicola marina* from (a) the North or (b) the White Sea after a temperature rise in the sediment 4 °C above their respective critical temperatures. Differences in succinate concentrations between populations are highly significant ( $p = 0.0001$ ;  $n = 4 - 5$ ; mean  $\pm$  S.D.; \* = significantly different from the control value at 0h; data from North Sea animals and volatile fatty acids in White Sea animals as reported by Sommer *et al.* 1997).

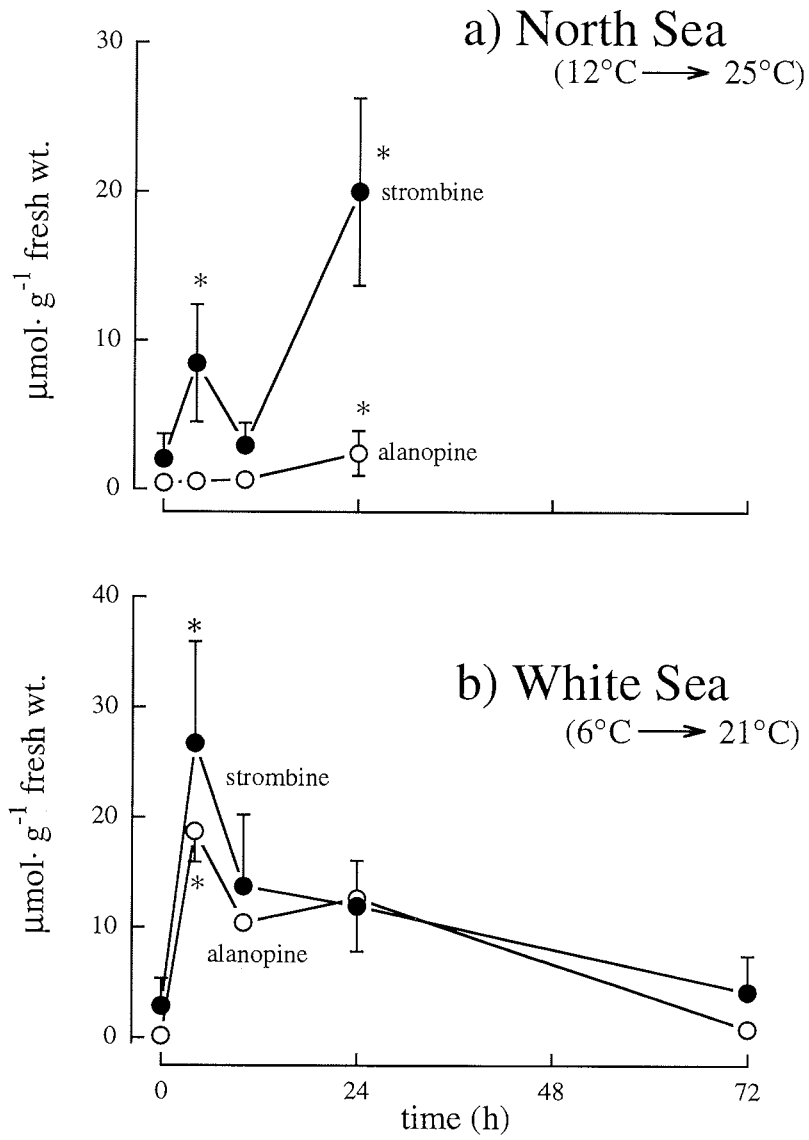
**Fig. 3** (a) Adenylate concentrations ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt.), (b) ratio of [ATP]:[ADP] and (c) summed concentrations ( $\Sigma\text{Ade}$ ) of all adenylates (AMP, ADP and ATP) in the body wall tissue of lugworms from the North Sea after an increase in temperature in the sediment from 12 to 25 °C ( $n = 5$ ; mean  $\pm$  S.D.; \* = significantly different from the control value at 0h).

**Fig. 4** Concentrations ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt.) of (a) ATP, (b) ADP (c) AMP and (d) summed concentrations ( $\Sigma\text{Ade}$ ) of all adenylates (AMP, ADP and ATP) in the body wall tissue of *Arenicola marina* (White Sea animals) at constant temperature of 6 °C (●) and after an increase in temperature in the sediment from 6 to 21 °C (o) ( $n = 5$ ; mean  $\pm$  S.D.; \* = significantly different from the control value at 0h).

**Fig 5** (a) Concentrations ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh wt.) of ammonium ions ( $[\text{NH}_3] + [\text{NH}_4^+]$ ) in the body wall tissue of *Arenicola marina* from the North or White Seas after an increase in temperature in the sediment to a value 4 °C above their respective critical temperatures (n = 5; mean  $\pm$  S.D.; \* = significantly different from the control value at 0h). (b) Ammonium concentrations in the body wall tissue of White Sea lugworms as a function of intracellular pH during exposure to 21 °C. The relationship between both parameters is highly significant (p = 0.0001; pH<sub>i</sub> data adopted from Sommer *et al.* 1997).

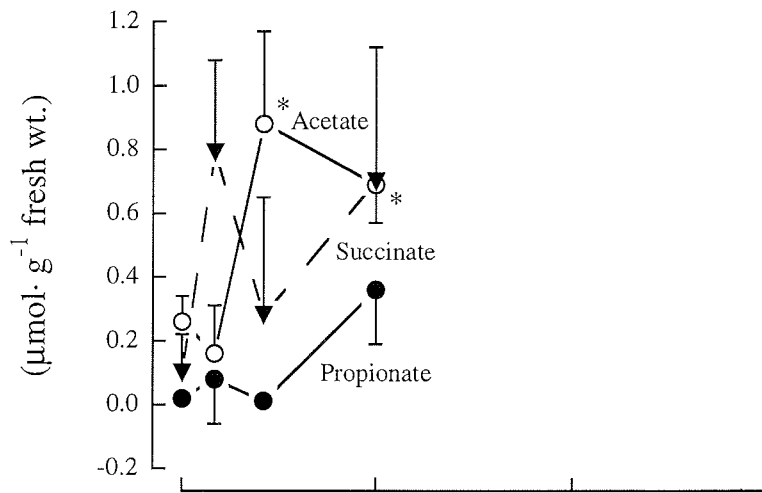
**Fig. 6** Intracellular pH in the body wall tissue of *Arenicola marina* from the North or White Seas (n = 5; mean  $\pm$  S.D.;  $\blacktriangle$  = White Sea control animals (6 °C);  $\blacktriangledown$  = White Sea warmed animals (6 to 21 °C); o = North Sea warmed animals (12 to 25 °C); \* = significantly different from the control value at 0h; data as reported by Sommer *et al.* 1997).

**Fig. 7** Concentrations of volatile fatty acids and succinate in the body wall tissue of *Arenicola marina* after a temperature drop in the sediment from 12 °C (North Sea animals) or 6 °C (White Sea animals) to -1.7 °C (n = 5; mean  $\pm$  S.D.;  $\bullet$  propionate; o acetate;  $\nabla$  succinate; \* = significantly different from the control value at 0h; data from North Sea animals as reported by Sommer *et al.* 1997).



**Fig. 1**

### a) North Sea



### b) White Sea

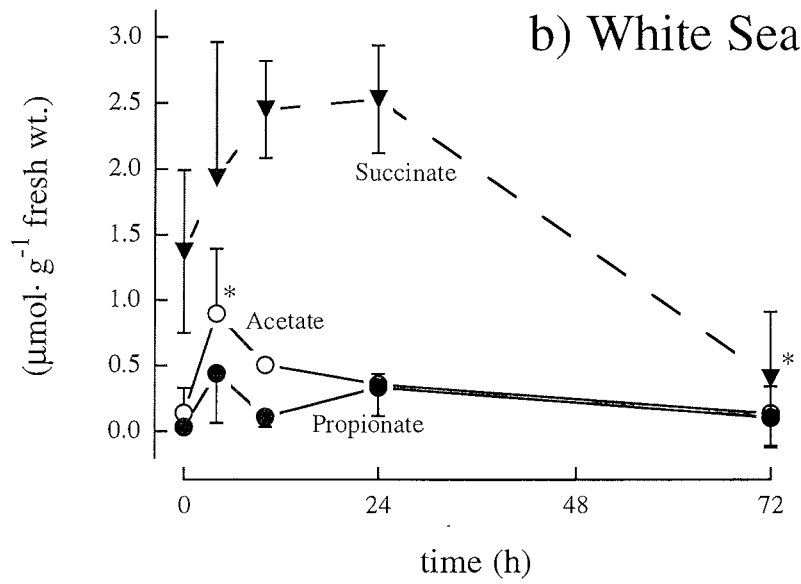


Fig. 2

# North Sea

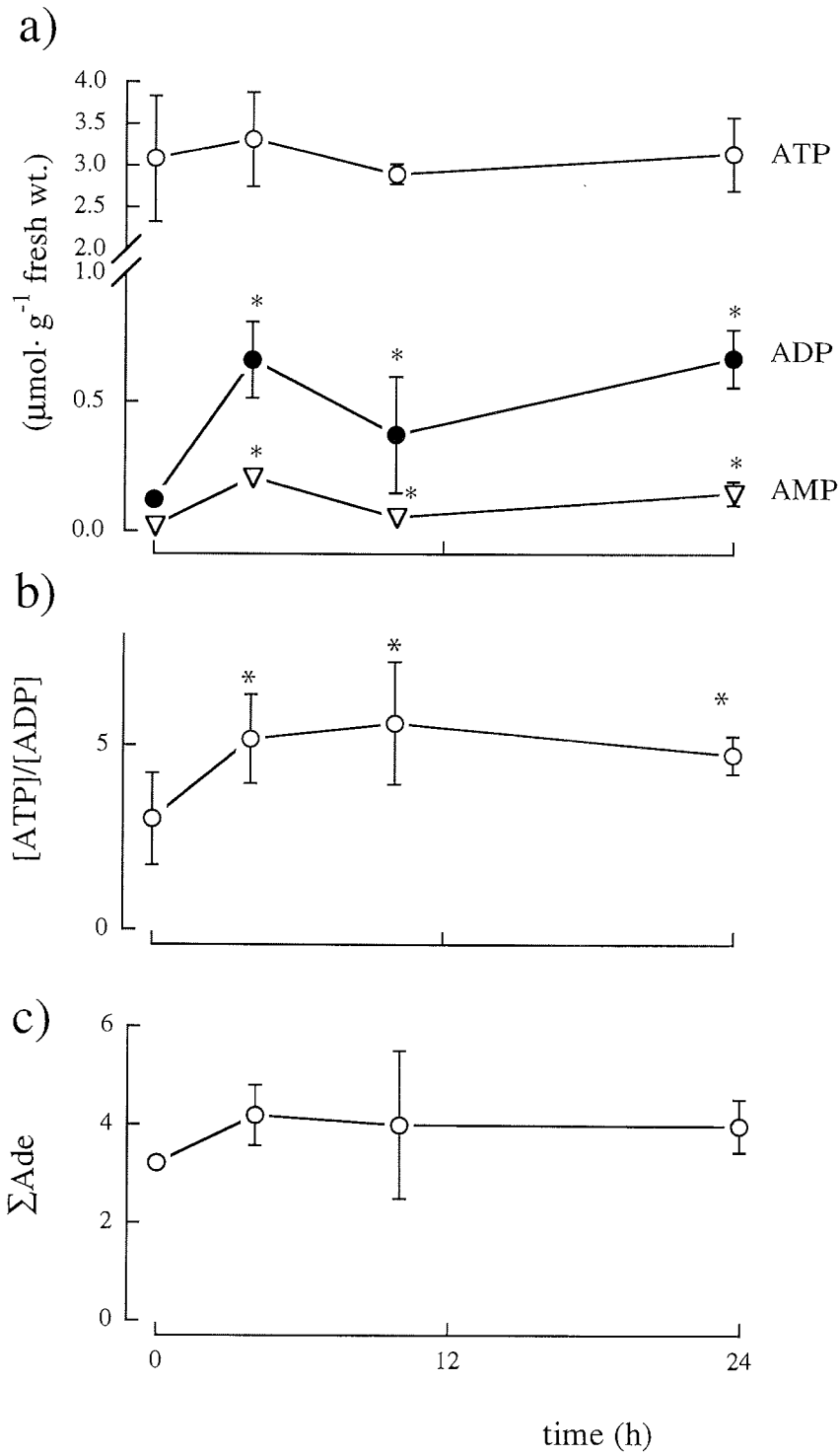


Fig. 3

# White Sea

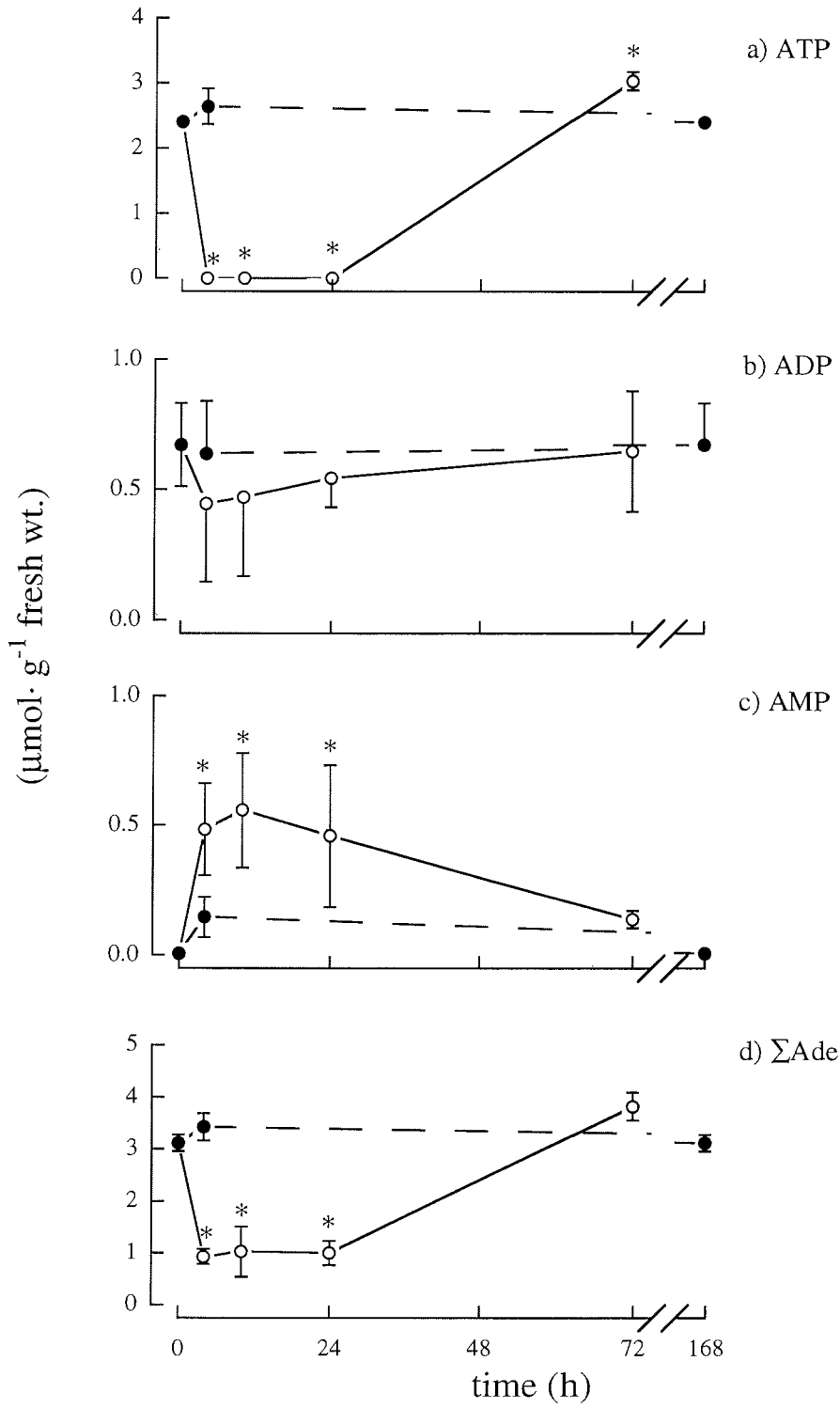


Fig. 4

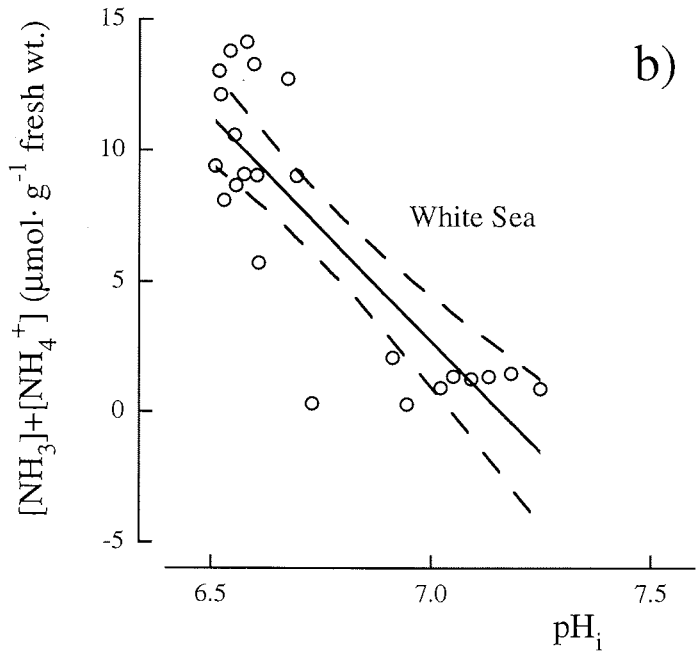
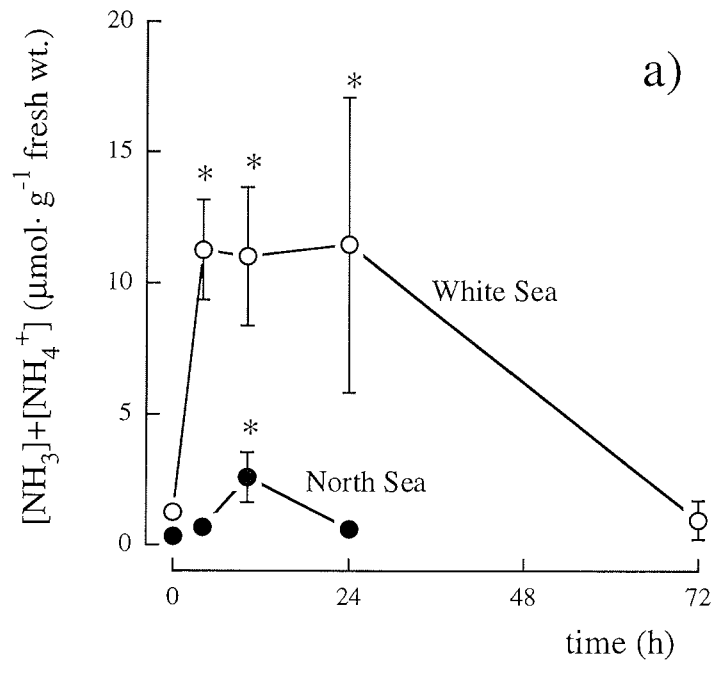


Fig. 5

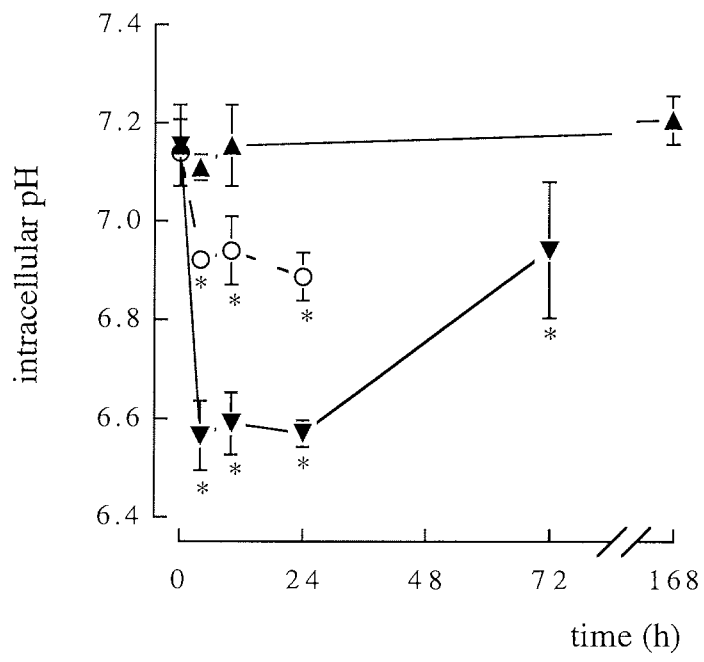
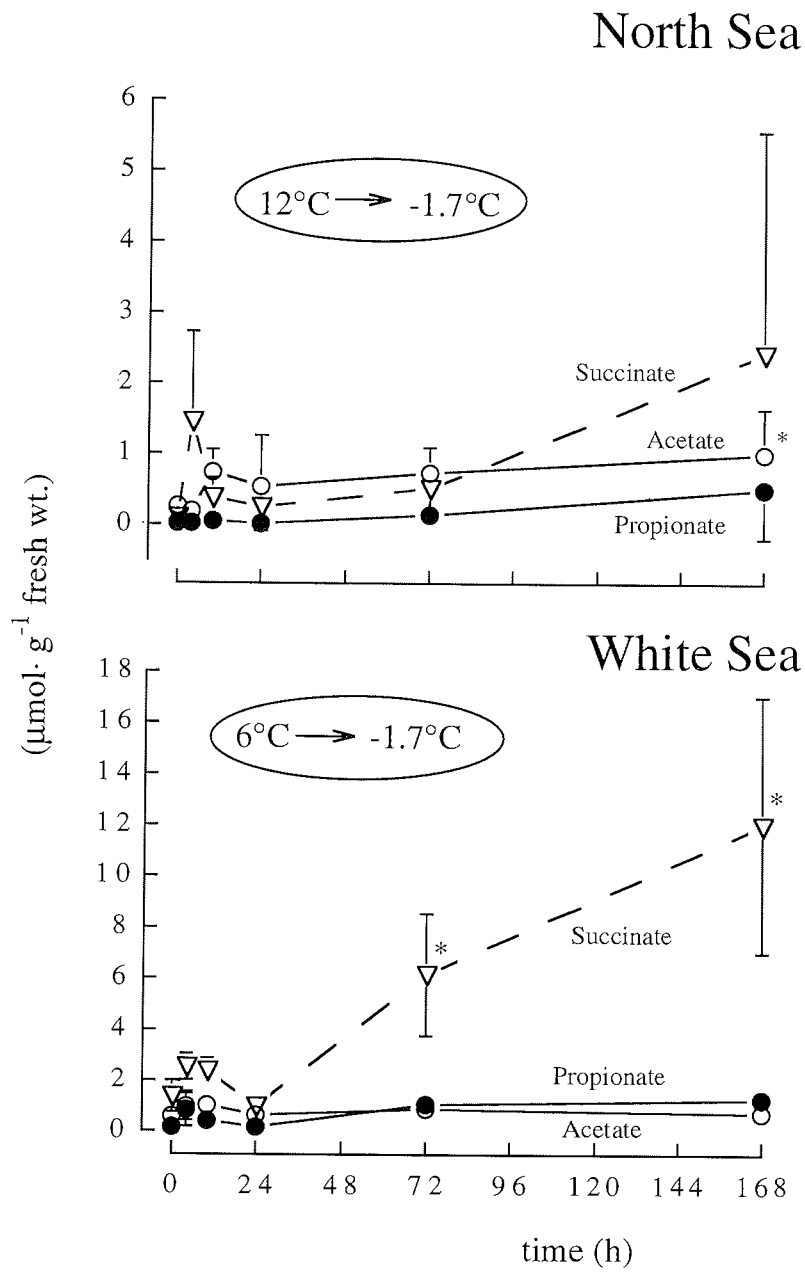


Fig. 6





**Fig. 7**

**Publikation IV**

Variation in genetic traits of the lugworm *Arenicola marina*:  
temperature related expression of mitochondrial allozymes?

H. Hummel, A. Sommer, R. Bogaards, H.-O. Pörtner

(1997)

MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES

159: 189-195

## Variation in genetic traits of the lugworm *Arenicola marina*: temperature related expression of mitochondrial allozymes?

Herman Hummel<sup>1,\*</sup>, Angela Sommer<sup>2</sup>, Roelof H. Bogaards<sup>1</sup>, Hans O. Pörtner<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centre for Estuarine and Coastal Ecology, Netherlands Institute of Ecology, Vierstraat 28, 4401 EA Yerseke, The Netherlands  
<sup>2</sup>Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research, Columbusstr., D-27568 Bremerhaven, Germany

**ABSTRACT:** Genetic traits of the lugworm *Arenicola marina* were determined for 4 Atlantic populations from France to Norway and compared with a population from the sub-arctic White Sea in Russia. Seven loci were analysed using horizontal starch gel electrophoresis. A low heterozygosity (0.09 to 0.17) and a non-significant heterozygote deficiency were found in all populations. The genetic identity between lugworms of European Atlantic populations was high, whereas similarity of the Atlantic populations with the population from the White Sea was low. The gene flow between the Atlantic and the White Sea populations must be considered negligible, as deduced from the average high and significant gene differentiation  $F_{ST}$ . In particular, differences in allele frequencies of glucose phosphate isomerase (*Gpi*) and phosphoglucosmutase (*Pgm*) showed that the White Sea population differed significantly from the others. A very strong correlation existed between the frequency of the alleles of isocitrate dehydrogenases 2-A and -B (*Idh2-A* and *Idh2-B*) and the average water temperature. It is concluded that temperature had a selective influence on isocitrate dehydrogenase 2, which, in contrast to isocitrate dehydrogenase 1, was identified as a mitochondrial enzyme. These findings support the hypothesis that mitochondria play a key role in temperature adaptation and the adjustment of critical temperatures.

**KEY WORDS:** *Arenicola marina* · Genetics · Geographic cline · Isozyme · Lugworm · Polychaeta · Temperature · Mitochondria

### INTRODUCTION

Differences in the metabolic reaction to temperature changes have been observed between 2 populations of the lugworm *Arenicola marina* from the German North Sea and from the Russian White Sea (Sommer et al. 1997). The tolerance of both populations to temperature fluctuations is limited, as indicated by the existence of low and high critical temperatures ( $T_{c1}$  and  $T_{cH}$ ), both of which are characterised by the onset of anaerobic metabolism. In White Sea lugworms these critical temperatures were shifted to lower values when compared with North Sea specimens. Additionally, the ability of North Sea lugworms to adapt to tem-

peratures beyond the critical temperatures was poor compared to that of White Sea lugworms (Sommer et al. 1996, 1997). The larger range of temperature fluctuations at the White Sea was seen as a reason for the higher adaptational capacity of the sub-polar lugworms.

The exact mechanisms enabling survival under extreme temperature conditions and causing an adaptive shift of the  $T_c$  are unknown. A hypothesis was developed that, among other mechanisms,  $T_c$  values are set by an adjustment of mitochondrial density and thus, aerobic capacity (Pörtner et al. 1997, Sommer et al. 1997). The differences in the ability to acclimate to temperature changes may, therefore, be linked to differences in the capacity to adjust mitochondrial density. This may either be explained as (phenotypic) acclimation of congenial populations to environmental temperatures or as (genetic) adaptation of remote pop-

\*E-mail: hummel@cemo.nioo.knaw.nl

ulations (Nevo 1978). Statistical, biochemical and physiological correlates provide circumstantial evidence supporting the hypothesis that environmental heterogeneity can be a major factor in maintaining and structuring genetic variation in natural populations. However, direct experimental evidence establishing cause-effect relationships between ecophysiological and genetic structures is still sparse (e.g. Hilbish et al. 1982, Hoffmann & Parsons 1994).

As a further step toward unravelling the differences in temperature acclimation in lugworms, whether it is phenotypic acclimation or genetic adaptation, the degree of relationship between the different populations of lugworms, from the North Sea and White Sea, was assessed by determination of the genetic constitution through electrophoretic isoenzyme analysis. For an identification of eventual geographic patterns in the genetic variability of the lugworm, some additional populations at more southern (warmer) and northern (sub-arctic) locations were sampled in the Oosterschelde (Netherlands), Gironde (France) and near Tromsø (Norway).

#### MATERIAL AND METHODS

At each sampling station (Fig. 1) lugworms were collected from intertidal flats between mean tidal level and low water level. The stations were located at: (1) France, Bay of Arcachon, 44°40.5'N, 1°11.0'W, (2) The Netherlands, Oosterschelde sea arm, Yerseke,

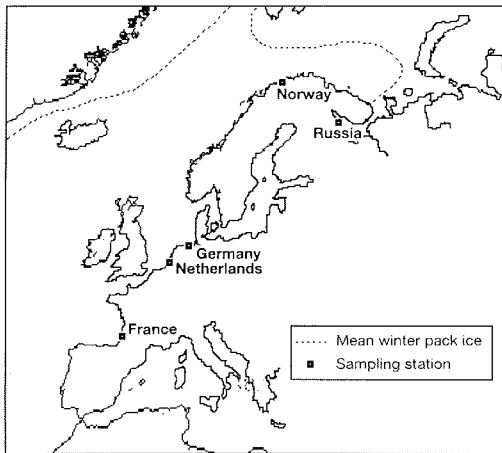


Fig. 1. Sampling stations in the Atlantic (France, Bay of Arcachon; The Netherlands, Oosterschelde sea arm; Germany, Wadden Sea near Bremerhaven; Norway, near Tromsø) and in the White Sea (Russia near Kartesh)

51°29.5'N, 4°03.5'E, (3) Germany, Wadden Sea, 53°42'N, 8°35'E, (4) Norway, Tromsø, 69°38.8'N, 18°54.3'E and (5) Russia, White Sea, Kandalaksha Bay, Chupa Inlet, 66°20.8'N, 33°35.8'E.

Heads and tails of the worms were dissected, gonads and intestines were removed and only the body wall musculature was frozen in liquid nitrogen. The genetic constitution of the worms was examined using electrophoretic isoenzyme analysis of 7 loci according to Menken (1982) and Hummel et al. (1995): glucose phosphate isomerase (*Gpi*, E.C. 5.3.1.9), NADP-dependent isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (*Idh*, E.C. 1.1.1.42), malate dehydrogenase (*Mdh*, E.C. 1.1.1.37), malic enzyme (*Me*, E.C. 1.1.1.40), phosphogluconate dehydrogenase (*Pgd*, E.C. 1.1.1.44), and phosphoglucomutase (*Pgm*, E.C. 5.4.2.2). Fractions of the body walls (about 0.5 g) of 40 to 80 lugworms were homogenized individually for a few seconds in about 0.2 ml of gel buffer using a hand-made mortar and pestle. Electrophoresis was carried out in horizontal 12% starch gels (50% Sigma, 50% Connaught) at a temperature of 0°C. The buffer systems used were Tris-citric acid gel buffer (8 and 3 mM resp.; pH 6.7) and Tris-citric acid electrode buffer (0.223 and 0.086 M resp.; pH 6.3). The electrophoresis was performed for 5 h with a constant current of 100 mA. Staining procedures used Bush B Tris-hydrochloric acid (0.102 M; pH 8.4) according to Menken (1982).

The fastest allele is called A, the slower B, C, and so on. The data were analysed and statistically tested for allele frequencies, heterozygosity, conformance to Hardy-Weinberg equilibrium [fixation index  $F_{IS}$ ; approximating the deviation of the observed heterozygosity from the expected one ( $H_o - H_e$ )/ $H_e$ ], coefficient of gene differentiation (fixation index  $F_{ST}$ ; measure of differences in allele frequencies at each locus between populations) and genetic identities of genes between populations (standard genetic identity according to Nei 1975) by the Biosys computer programme (Swofford & Selander 1981). Differences in allele frequencies and heterozygote frequencies of different groups were tested with the  $\chi^2$  analysis (Sokal & Rohlf 1995). All statistics were performed with Bonferroni correction. The  $F$ -statistics  $F_{IS}$  and  $F_{ST}$  are defined according to Nei (1977), and have properties similar to that of Wright's (1965) definition.  $F_{IS}$  measures the deviation of genotype frequencies from Hardy-Weinberg proportions and the null hypothesis  $F_{IS} = 0$  was tested for significance with  $\chi^2 = NF_{IS}^2(b-1)$  and  $b(b-1)/2$  degrees of freedom ( $N$  is the number of specimens analysed in the sub-populations, and  $b$  is number of alleles) (Li 1955).  $F_{IS}$  measures the degree of genetic differentiation of sub-populations and was tested for significance with  $\chi^2 = 2NF_{ST}(b-1)$  and  $df = (b-1)(n-1)$  ( $n$  is the number of sub-populations) (Workman & Niswander

1970). Computation of  $F_{IS}$  is not appropriate for almost-monomorphic loci (i.e. the dominant allele has a frequency >0.8) because of the predominant influence of rare alleles. These statistics were performed with Bonferroni correction, at a critical probability level of  $\alpha' = 0.05/x$  ( $x$  is number of repetitions of the same test, i.e. 4 for  $F_{IS}$  and 8 for  $F_{ST}$ ; Sokal & Rohlf 1995).

For preparation of mitochondria, about 1.5 g of body wall tissue was homogenized in 40 ml buffer containing 40 mM Tris (pH 7.5) and 0.55 M glycine as well as 0.25 M saccharose, 4 mM EDTA and 0.2% bovine serum albumin. The homogenate was centrifuged at  $4000 \times g$  for 15 min at 0°C. Mitochondria were found in the pellet after a second centrifugation for 60 min at  $16000 \times g$ . The pellets were further used for electrophoretic isoenzyme analysis and treated as the body wall sections described above.

## RESULTS AND DISCUSSION

The loci *Mdh*, *Pgd*, *Me* and *Idh1* were monomorphic according to the 5% criterion (Table 1). The other loci had a higher allelic variability, but the 2 most common alleles together had a frequency of 0.9 or more (Table 1). The average heterozygosity across the 7 loci was around 0.13 (Table 1). A trend toward heterozygote deficiency ( $F_{IS} = 0.09$ ) occurred, yet the deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were, in all but 1 example (*Pgm* in the Russian population), non-significant (Table 1). Such a heterozygote deficiency trend is a common, but not yet understood, phenomenon in marine invertebrates (Berger 1983, Singh & Green 1984, Zouros 1987, Zouros & Mallet 1989, Gaffney 1994).

The genetic diversity, as measured by heterozygosity, of the lugworm is low when compared to bivalves analysed in the same geographic territory with the same set of isoenzymes. In bivalves with a strong gene flow, *Cerastoderma edule*, *Macoma*

Table 1. *Arenicola marina*. Allele (A-F) frequencies and measures of genetic variability in lugworm populations from the Atlantic (Nether.: The Netherlands) and the White Sea (see Fig. 1). N = number of specimens; for abbreviation of isoenzymes see 'Materials and methods'; He = expected heterozygosity; Ho = observed heterozygosity;  $F_{IS}$  = conformance to Hardy-Weinberg equilibrium,  $F_{ST}$  = gene differentiation; n alleles = average number of alleles. Bonferroni correction for tests on significance of  $F_{IS}$ :  $\alpha' = \alpha/4$ ; Bonferroni correction for tests on significance of  $F_{ST}$ :  $\alpha' = \alpha/8$ ; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, na: not applicable

	N:	Population					$F_{ST}$	
		France 80	Nether. 80	Germany 80	Norway 40	Russia 80	All	All - Russia [avg $F_{IS}$ ]
<i>Mdh</i>	A	0.006	0.063	0.063	0.025	0.000	0.024	0.016
	B	0.988	0.938	0.931	0.975	1.000	0.023	0.014
	C	0.006	0.000	0.006	0.000	0.000	0.004	0.003
Avg $F_{ST}$						0.023	0.015	
Ho		0.025	0.125	0.138	0.050	0.000		
He		0.025	0.118	0.130	0.049	0.000		
<i>Pgd</i>	A	0.050	0.019	0.056	0.013	0.000	0.018	0.011
	B	0.950	0.975	0.938	0.988	1.000	0.018	0.011
	D	0.000	0.006	0.006	0.000	0.000	0.004	0.003
$F_{ST}$						0.018	0.011	
Ho		0.100	0.050	0.125	0.025	0.000		
He		0.096	0.049	0.119	0.025	0.000		
<i>Me</i>	A	0.006	0.038	0.025	0.063	0.000	0.020	0.013
	B	0.988	0.925	0.962	0.938	1.000	0.023	0.013
	E	0.006	0.013	0.013	0.000	0.000	0.005	0.003
	D	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.020	0.019
$F_{ST}$						0.020	0.013	
Ho		0.025	0.125	0.075	0.125	0.000		
He		0.025	0.143	0.073	0.119	0.000		
<i>Pgm</i>	A	0.013	0.038	0.025	0.112	0.006	0.040	0.034
	B	0.988	0.944	0.925	0.837	0.287	0.414**	0.042
	C	0.000	0.019	0.038	0.013	0.706	0.581**	0.011
	D	0.000	0.000	0.013	0.038	0.000	0.021	0.019
$F_{ST}$						0.426**	0.034	
Ho		0.025	0.063	0.100	0.275	0.287		
He		0.025	0.108	0.143	0.288	0.421		
$F_{IS}$ [avg]		na	na	na	na	0.313**	[0.233]	na
<i>Gpi</i>	A	0.031	0.106	0.081	0.000	0.025	0.033	0.033
	B	0.956	0.875	0.900	1.000	0.700	0.105*	0.038
	C	0.013	0.013	0.019	0.000	0.000	0.006	0.004
	D	0.000	0.000	0.000	0.000	0.269	0.227**	0.000
	E	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000	0.005	0.005
	F	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	0.005	0.000
$F_{ST}$						0.113*	0.033	
Ho		0.087	0.225	0.138	0.000	0.412		
He		0.085	0.224	0.184	0.000	0.440		
$F_{IS}$ [avg]		na	na	na	na	0.056	[0.070]	[0.082]
<i>Idh1</i>	A	0.006	0.013	0.006	0.000	0.013	0.003	0.003
	B	0.994	0.962	0.981	1.000	0.988	0.011	0.013
	C	0.000	0.025	0.013	0.000	0.000	0.013	0.012
$F_{ST}$						0.010	0.011	
Ho		0.013	0.050	0.025	0.000	0.025		
He		0.013	0.073	0.037	0.000	0.025		
<i>Idh2</i>	A	0.669	0.531	0.469	0.237	0.100	0.175**	0.097*
	B	0.325	0.463	0.525	0.762	0.900	0.180**	0.100*
	C	0.000	0.006	0.006	0.000	0.000	0.004	0.003
	D	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.005
$F_{ST}$						0.176**	0.098**	
Ho		0.375	0.575	0.438	0.275	0.175		
He		0.450	0.507	0.508	0.367	0.181		
$F_{IS}$ [avg]		0.161	-0.141	0.133	0.241	na	[0.080]	[0.085]
Averages							0.205**	0.059
$F_{ST}$								
Ho		0.093	0.173	0.148	0.107	0.129		
He		0.103	0.175	0.171	0.121	0.152		
$F_{IS}$ [avg]		0.097	0.011	0.135	0.116	0.151	[0.092]	[0.076]
n alleles		2.6	3.1	3.1	2.0	2.0		

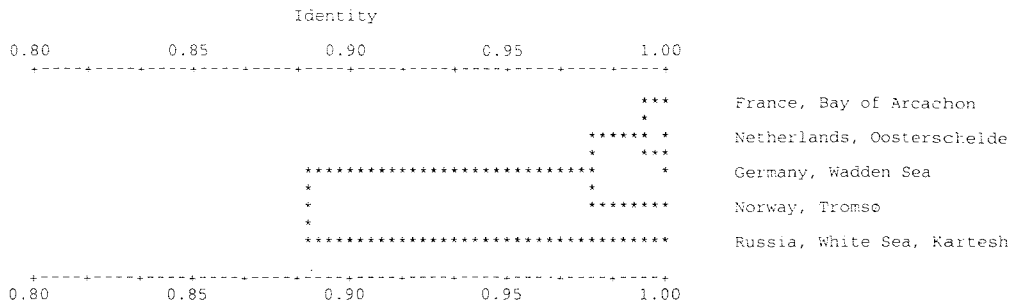


Fig. 2. *Arenicola marina*. Cluster analysis on the genetic identity between lugworm populations using the unweighted pair group method (coefficient used: Nei's genetic identity)

*balthica* and *Mytilus edulis*, the heterozygosity ranged from 0.21 to 0.39 (vs 0.09 to 0.17 in lugworms) (Hummel et al. 1989, 1994, 1995). However, in the cockle *Cerastoderma glaucum*, a species with restricted gene flow inhabiting semi-isolated shallow non-tidal biotopes and estuaries, the heterozygosity was as low as in the lugworm, 0.09 to 0.17 (Hummel et al. 1994). The picture for other polychaetes is not as uniform as in the abovementioned bivalves; but, similar to the lugworms, the genetic diversity of other polychaetes seems to be lower in general. In *Hediste limnicola*, *H. diversicolor* and *H. japonica* heterozygosity ranged from 0.01 to 0.02 (Fong & Garthwaite 1994), in *Neanthes succinea* from 0.02 to 0.04 (Abbiati & Maltagliati 1992), and in 3 alvinellid polychaetes (*Alvinella pompejana*, *A. caudata* and *Paralvinella grasslei*) from 0.10 to 0.24 (Jollivet et al. 1995). Seven *Nephtys* species from different European locations proved even to be monomorphic in all 6 isoenzyme systems investigated (Schmidt & Westheide 1994).

The genetic identities (Nei 1975) between (the Atlantic) lugworms from France, through The Netherlands and Germany, to Norway were high (Fig. 2). The genetic identity of the Atlantic populations with the Russian White Sea population was low (0.89). A genetic identity below 0.9 might indicate that the populations belong to different subspecies (Avisé 1974, Thorpe 1983). Confusion with the recently recognized black lugworm *Arenicola defodiens* (Cadman & Nelson-Smith 1990, 1993) is thought to be of no importance. The allelic patterns distinctive for *A. defodiens* at the diagnostic loci *Pgd* and *Gpi* (Cadman & Nelson-Smith 1990) did not occur at all in our populations.

The differentiation between the Atlantic stations and the Russian station is also indicated by the average high and significant gene differentiation  $F_{ST}$  (on average 0.21) when including the Russian station, but low and non-significant ( $F_{ST} = 0.06$ ) when excluding the Russian station (Table 1). For marine bivalves with

high gene flow, the average gene differentiation amounts to 0.01 to 0.03 between populations at geographic distances of hundreds of kilometres, and 0.04 to 0.06 at distances of thousands of kilometres (Skibinski et al. 1983, Dillon & Manzi 1992, Grant et al. 1992, Sarver et al. 1992, Saavedra et al. 1993, Hummel et al. 1994, 1995). Similarly, the gene differentiation among the Atlantic populations, at mutual distances of several thousands of kilometres, amounted to 0.06. In populations with limited gene flow, a much higher  $F_{ST}$  can be found, e.g. 0.19 as found for *Cerastoderma glaucum* (Hummel et al. 1994). Therefore, gene flow between *Arenicola marina* populations from the Atlantic coasts can be considered to be strong, whereas gene flow between the White Sea and Atlantic populations must be considered negligible. Although *A. marina* has no pelagic larval stage (eggs are spawned at the sediment surface, hatching larvae immediately penetrate into the sediment), transport of eggs by currents and migration during post-larval stages has been observed frequently (Wolff 1973). Thus, transport by currents and migration are strong enough in the Atlantic to cause a considerable gene flow. The low or absent gene flow between the Atlantic and the White Sea is then probably due to the geographic and hydrographic isolation of the White Sea (Zenkevitch 1963). Very strong currents at the outer parts of the White Sea (in Gorlo and Voronca sounds) cause very violent turbulences of the whole water column. As a consequence the sea bed is covered with an extremely hard sediment which is poor in fauna and flora. Moreover, these tidal oscillations do not bring water of the Barents Sea into the White Sea. They only shift the masses of water within Gorlo sound, causing a separation of water masses and building a barrier for larvae or gametes. This separation is probably so strong that even for the bivalve *Macoma balthica*, which has a pelagic larval stage of several weeks, a similar hampered gene flow was observed between the Atlantic and White Sea populations (Hummel et al. 1997).

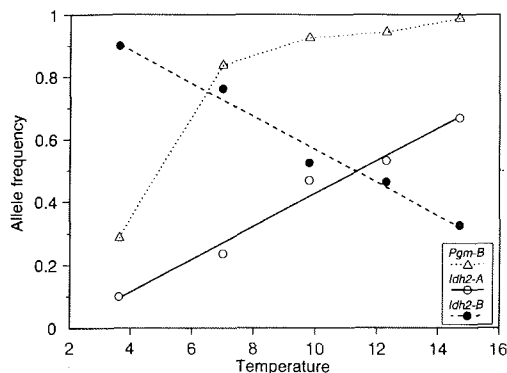


Fig. 3. *Arenicola marina*. Relation between allele frequencies of various enzymes in lugworms and the annual average temperature at the sampling locations [temperatures for France and The Netherlands from Hummel et al. 1995; for Germany from Becker 1981; for Norway from Treshnikov 1985; for Russia from T. Bek and O. Kozlova (based on daily measurements in 1987–1991, WSBS Poyakonda, Moscow State University, pers. comm.)]

The strong gene differentiation between the Atlantic and White Sea populations coincided with abrupt changes in the allele frequencies of *Gpi* and *Pgm* (Table 1, Fig. 3). A  $\chi^2$  analysis of differences in allele frequencies of *Gpi* and *Pgm* showed that indeed only the White Sea population differed significantly from all others (Table 2). In contrast, the changes in allele frequencies of *Idh2* were more gradual when going from France to Russia (Table 2), as can be deduced from the gradually increasing  $\chi^2$  with increasing distance between stations, marking, e.g., a significant difference between France and Norway but no sig-

Table 2. Statistical analyses ( $\chi^2$ ) of differences in allele frequencies between *Arenicola marina* populations for the loci *Gpi*, *Pgm* and *Idh2*. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

	The Netherl.	Germany	Norway	Russia
<b><i>Gpi</i></b>				
France	4.05	2.01	1.81	26.26**
The Netherlands		0.87	5.45	29.08**
Germany			4.29	27.89**
Norway				15.00*
<b><i>Pgm</i></b>				
France	2.58	4.55	10.41	87.52**
The Netherlands		1.78	5.76	81.99**
Germany			5.31	76.82**
Norway				54.40**
<b><i>Idh2</i></b>				
France	3.20	6.58	20.54**	55.75**
The Netherlands		0.62	9.80	35.24**
Germany			6.38	27.52**
Norway				4.03

nificant difference between Norway and the White Sea. A significant gene differentiation for *Idh2* between the Atlantic populations was still found when the White Sea station was excluded (Table 1). The gradual geographic cline is most remarkable for the allele frequencies of *Idh2*-A and *Idh2*-B: a very strong correlation between the allele frequency and annual average water temperature existed, even when the Russian station was excluded (Fig. 3;  $r = 0.99$ ,  $p < 0.01$  for both comparisons).

Geographic clines in genotypes within a species, especially in a north-south direction, are a common phenomenon, and are mostly related to temperature and salinity (Koehn et al. 1976, 1980b, Endler 1977, Theisen 1978, Buroker 1983, Burton 1983, Rose 1984, Hoffman 1985, Dillon & Manzi 1992, Hummel et al. 1995). The direct cause of such clines is not clearly known, although for leucine aminopeptidase (*Lap*) in *Mytilus edulis* and *Gpi* in *Metridium senile* it has been shown that differential activities of allozymes are coupled to temperature or salinity (Koehn et al. 1976, 1980a, Koehn & Siebenaller 1981, Hoffmann 1985). This may lead to genotype dependent differential selection, most probably during juvenile stages (Levinton & Lassen 1978, Hilbish 1985). Some clines might also be caused by introgression of races or subspecies (Levinton & Lassen 1978, Theisen 1978, Beaumont 1982, Koehn et al. 1984, Väinölä & Varvio 1989). Yet, the genetic similarity of the Atlantic populations in this study clearly showed no difference at subspecies levels. So, the geographic cline found in this study is most probably an adaptive variation connected to temperature. Moreover, when a substantial migration between different populations exists, then the selective pressure of an environmental factor must be very strong, so that a specific allele can be fixed in the genome of a population (Pogson 1987). Since gene flow is strong between the Atlantic populations ( $F_{ST} = 0.06$ ), we can conclude that the selective pressure of temperature on the *Idh* loci must be considerable.

The electrophoretic isoenzyme analysis of the mitochondrial fraction identified *Idh2* to be a mitochondrial enzyme, whereas *Idh1* seems to be found in the cytosol. Further study revealed that latitudinal cold adaptation in *Arenicola marina* is linked to mitochondrial proliferation and an increase in the activity of cytochrome oxidase (A. Sommer & H. Pörtner unpubl.) suggesting that mitochondria are an important site of temperature adaptation. This finding agrees with the picture arising from studies in cold ocean fish (Guderley 1997) and suggests that cold adaptation in general appears to be achieved by an increase in mitochondrial density as well as in oxidative capacity of individual mitochondria. This phenomenon led to the general hypothesis that changes in the density and functional properties of

mitochondria are involved in setting the critical temperatures as the upper and lower limits of temperature tolerance (Sommer et al. 1997, Pörtner et al. 1997).

Expression of different *Idh2* isoenzymes with changing temperature may play an important role in this context. *Idh* has a central role in regulating the flow through the citric acid cycle (Stryer 1990), and therefore in metabolic regulation. Nothing is known about the differences in kinetic properties between the 2 isoforms *Idh2-A* and *-B*. However, these differences should optimize function at the respective temperatures and may involve a maintenance of  $K_m$  values and maximum velocity at low temperatures. Together with mitochondrial proliferation and the rise in aerobic capacity this could explain the observed shift in critical temperatures at the whole-animal level (Sommer et al. 1996, 1997, Sommer & Pörtner unpubl.).

In conclusion, the genetic constitution of the specimens studied showed that the genetic identity for the lugworm in European Atlantic populations is high, whereas the similarity with a population from the White Sea is low. Both geographic and hydrographic isolation of the White Sea as well as average water temperatures seem to influence the genetic constitution of the populations. Whereas the expression of *Gpi* and *Pgm* seems to be influenced by geographic and hydrographic isolation, the expression of *Idh2* isoforms is predominantly influenced by temperature.

**Acknowledgements.** Collection of specimens from France and Norway was made possible by funds from The Netherlands Marine Research Foundation (SOZ, presently Geosciences Foundation GOA; within the programme for French-Dutch cooperation), UNESCO-COMAR, Paris, and from the International Association for the Promotion of Cooperation with Scientists from the Independent States of the former Soviet Union (INTAS project 94-391). We thank S. Cochrane and Akvaplan-Niva for taking samples from tidal flats near Tromsø and G. Bachelet for help in taking samples from the Bay of Arcachon. Isolation of mitochondria reported in this paper was supported by K. Tschischka, Alfred Wegener Institute, and is gratefully acknowledged. NIOO-CEMO communication no. 23235, Alfred-Wegener-Institute publication no. 1334.

#### LITERATURE CITED

- Abbiati M, Maltagliati F (1992) Genetic population structure of *Neanthes succinea* (Polychaeta:Nereididae). *J Mar Biol Assoc UK* 72:511–517
- Avise JC (1974) Systematic value of electrophoretic data. *Syst Zool* 23:465–481
- Beaumont AR (1982) Geographic variation in allele frequencies at three loci in *Chlamys opercularis* from Norway to the Brittany coast. *J Mar Biol Assoc UK* 62:243–261
- Becker GA (1981) Beiträge zur Hydrographie und Wärmebilanz der Nordsee. *Deutsche Hydrogr Zeitschr* 34:167–262
- Berger EM (1983) Population genetics of marine gastropods and bivalves. In: Russell-Hunter WD (ed) *The mollusca*, Vol 6, Ecology. Academic Press, Orlando, p 563–596
- Buroker NE (1983) Population genetics of the American oyster *Crassostrea virginica* along the Atlantic coast and the Gulf of Mexico. *Mar Biol* 75:99–112
- Burton RS (1983) Protein polymorphism and genetic differentiation of marine invertebrate populations (Review). *Mar Biol Lett* 4:193–206
- Cadman PS, Nelson-Smith A (1990) Genetic evidence for two species of lugworm (*Arenicola*) in South Wales. *Mar Ecol Prog Ser* 64:107–112
- Cadman PS, Nelson-Smith A (1993) A new species of lugworm: *Arenicola defodiens* sp. nov. *J Mar Biol Assoc UK* 73:213–223
- Dillon RT, Manzi JJ (1992) Population genetics of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, at the Northern limit of its range. *Can J Fish Aquat Sci* 49:2574–2578
- Endler JA (1977) Geographic variation, speciation, and clines. Princeton University Press, Princeton
- Fong PP, Garthwaite RL (1994) Allozyme electrophoretic analysis of the *Hediste limnicola*—*H. diversicolor*—*H. japonica* species complex (Polychaeta: Nereidae). *Mar Biol* 118:463–470
- Gaffney PM (1994) Heterosis and heterozygote deficiencies in marine bivalves: more light? In: Beaumont AR (ed) *Genetics and evolution of aquatic organisms*. Chapman & Hall, London, p 146–153
- Grant WS, Schneider AC, Leslie RW, Cherry MI (1992) Population genetics of the brown mussel *Perna perna* in southern Africa. *J Exp Mar Biol Ecol* 165:45–58
- Guderley H (1997) Temperature and growth rates as modulators of the metabolic capacities of fish muscle. In: Pörtner HO, Playle R (eds) *Cold ocean physiology*. Cambridge University Press, Cambridge (in press)
- Hilbish TJ (1985) Demographic and temporal structure of an allele frequency cline in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 86:163–172
- Hilbish TJ, Deaton LE, Koehn RK (1982) Effect of allozyme polymorphism on regulation of cell volume. *Nature* 298:688–689
- Hoffmann RJ (1985) Thermal adaptation and the properties of phosphoglucose isomerase allozymes from a sea anemone. In: Gibbs PE (ed) *Proc 19th Eur Mar Biol Symp*. Cambridge University Press, Cambridge, p 505–514
- Hoffmann AA, Parsons PA (1994) *Evolutionary genetics and environmental stress*. Oxford Science Publications, Oxford University Press, Oxford
- Hummel H, Bogaards RH, Amiard-Triquet C, Bachelet G, Desprez M, Marchand J, Sylvand B, de Wit Y, de Wolf L (1995) Uniform variation in genetic traits of a marine bivalve related to starvation, pollution and geographic clines. *J Exp Mar Biol Ecol* 191:133–150
- Hummel H, Bogaards R, Bek T, Polishchuk L, Amiard-Triquet C, Bachelet G, Desprez M, Strelkov P, Sukhotin A, Naumov A, Dahle S, Denisenko S, Gantsevich M, Sokolov K, de Wolf L (1997) Sensitivity to stress in the bivalve *Macoma balthica* from the most northern (Arctic) to the most southern (French) populations: low sensitivity in Arctic populations because of genetic adaptations? *Hydrobiologia* (in press)
- Hummel H, Bogaards RH, de Wolf L, Wijnholds JA (1989) The interrelation of length, age and heterozygosity in *Mytilus edulis* in the delta area of the Netherlands. In: Aldrich JC (ed) *Phenotypic responses and individuality in aquatic environments*. JAPAGA Ashford Co, Wicklow, Ireland, p 65–71
- Hummel H, Wolowicz M, Bogaards RH (1994) Genetic variability and relationships for populations of *Cerastoderma edule* and of the *C. glaucum* complex. *Neth J Sea Res*



- 33:81–89
- Jollivet D, Desbruyères D, Bonhomme F, Moraga D (1995) Genetic differentiation of deep-sea hydrothermal vent alvinellid populations (Annelida: Polychaeta) along the East Pacific Rise. *Heredity* 74:376–391
- Koehn RK, Bayne BL, Moore MN, Siebenaller JF (1980a) Salinity related physiological and genetic differences between populations of *Mytilus edulis*. *Biol J Linn Soc* 14:319–334
- Koehn RK, Hall JG, Innes DJ, Zera AJ (1984) Genetic differentiation of *Mytilus edulis* in eastern North America. *Mar Biol* 79:117–126
- Koehn RK, Milkman R, Mitton JB (1976) Population genetics of marine pelecypods. IV. Selection, migration and genetic differentiation in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Evolution* 30:2–32
- Koehn RK, Newell RIE, Immermann F (1980b) Maintenance of an aminopeptidase allele frequency cline by natural selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5385–5389
- Koehn RK, Siebenaller JF (1981) Biochemical studies of aminopeptidase polymorphism in *Mytilus edulis*. II. Dependence of reaction rate on physical factors and enzyme concentration. *Biochem Genet* 19:1143–1162
- Levinton JS, Lassen HH (1978) Selection, ecology and evolutionary adjustment within bivalve mollusc populations. *Phil Trans R Soc Lond, Ser B* 284:403–415
- Li CC (1955) Population genetics. University of Chicago Press, Chicago
- Menken SBJ (1982) Biochemical genetics and systematics of small ermine moths (Lepidoptera, Yponomeutidae). *Z Zool Syst Evolutionsforsch* 20:131–143
- Nei M (1975) Molecular population genetics and evolution. North Holland Publ Co, Amsterdam
- Nei M (1977) F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann Hum Genet* 41:225–233
- Nevo E (1978) Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theor Pop Biol* 13:121–177
- Pogson GH (1987) Constraints on the genetic process of biochemical adaptation. *Can J Zool* 66:1139–1145
- Pörtner HO, Hardewig I, Sartoris FJ, van Dijk P (1997) Energetic aspects of cold adaptation: critical temperatures in metabolic, ionic and acid-base regulation? In: Pörtner HO, Playle R (eds) Cold ocean physiology. Cambridge University Press (in press)
- Rose RL (1984) Genetic variation in the oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), in relation to environmental variation. *Estuaries* 7:128–132
- Saavedra C, Zapata C, Guerra A, Alvarez G (1993) Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Mar Biol* 115:85–95
- Sarver SK, Landrum MC, Foltz DW (1992) Genetics and taxonomy of ribbed mussels (*Geukensia* spp.). *Mar Biol* 113:385–390
- Schmidt H, Westheide W (1994) Isozymes and general protein patterns as taxonomic markers in the taxon Nephthyidae (Annelida, Polychaeta). *Mar Biol* 119:31–38
- Singh SM, Green RH (1984) Excess of allozyme homozygosity in marine molluscs and its possible biological significance. *Malacologia* 25:569–581
- Skibinski DOF, Beardmore JA, Cross TF (1983) Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae; Mollusca) in the British Isles. *Biol J Linn Soc* 19:137–183
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995) Biometry. Freeman & Co, New York
- Sommer A, Hummel H, Pörtner HO (1996) Adaptation of *Arenicola marina* to changing temperatures: a comparison of boreal and subpolar populations. *Verh Dtsch Zool Ges* 89:186
- Sommer A, Klein B, Pörtner HO (1997) Temperature induced anaerobiosis in two populations of the polychaete worm *Arenicola marina* (L.). *J Comp Physiol B* 167:25–35
- Stryer L (1990) Biochemie. Spektrum der Wissenschaft. Spektrum der Wissenschaft Verlag GmbH, Heidelberg, p 406–409
- Swofford DL, Selander RB (1981) Biosys-1: a Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J Heredity* 72: 281–283
- Theisen BF (1978) Allozyme clines and evidence of strong selection in three loci in *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) from Danish waters. *Ophelia* 17:135–142
- Thorpe JP (1983) Enzyme variation, genetic distance and evolutionary divergence in relation to levels of taxonomic separation. In: Oxford GS, Rollinson D (eds) Protein polymorphism: adaptive and taxonomic significance. Academic Press, London, p 131–152
- Treshnikov AF (1985) Atlas of the Arctic. GYKG (Soviet Ministry of Geodesy and Cartography), Moscow
- Väinölä R, Varvio SL (1989) Biosystematics of *Macoma balthica* in northwestern Europe. In: Ryland JS, Tyler PA (eds) Reproduction, genetics and distributions of marine organisms. Olsen & Olsen, Fredensborg, p 309–316
- Wolff WJ (1973) The estuary as a habitat. An analysis of data on the soft-bottom macrofauna of the estuarine area of the rivers Rhine, Meuse, and Scheldt. Zoologische Verhandlungen, No. 126. Brill, Leiden
- Workman PL, Niswander JD (1970) Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *Am J Hum Gen* 22:24–49
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395–420
- Zenkevitch L (1963) Biology of the seas of the U.S.S.R. George Allen & Unwin Ltd, London, p 181–184
- Zouros E (1987) On the relation between heterozygosity and heterosis: an evaluation of the evidence from marine mollusks. In: Rattazi MC, Scabdalijs JG, Whitt GS (eds) Isozymes: current topics in biological and medical research, Vol 15. Genetics, development, and evolution. Liss Inc, New York, p 255–270
- Zouros E, Mallet AL (1989) Genetic explanations of the growth/heterozygosity correlation in marine mollusks. In: Ryland JS, Tyler PA (eds) Reproduction, genetics and distribution of marine organisms. Olsen & Olsen, Fredensborg, p 317–324

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Pörtner für die Betreuung dieser Arbeit und für seine wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen bedanken und für alles was ich von ihm gelernt habe: Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Hummel, der mir den konstruktiven und schönen Aufenthalt am NIOO-CEMO in Yerseke, Niederlande, ermöglichte. Ein großes Dankeschön geht natürlich an die Kollegen des Alfred-Wegener-Institutes und besonders an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Ökophysiologie für die gute Arbeitsatmosphäre, deren ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank gehört Herrn Dr. V. Fedjakov und allen Mitarbeitern der Biologischen Station am Weißen Meer des Zoologischen Institutes in St. Petersburg, ohne die meine Arbeit am Weißen Meer nicht möglich gewesen wäre und die mit sehr viel Einsatz und Geschick halfen, technische und bürokratische Probleme zu lösen. Slava, Andrej, Alexej, Inna und Juri danke ich im Besonderen für die herzliche Aufnahme auf der Station.

Особую благодарность я хотела бы выразить господину доктору Федякову и всем сотрудникам Беломорской биостанции Зоологического института Российской академии наук (г. Санкт Петербург), без которых моя работа на Белом море вообще была бы невозможна и которые всеми силами и стараниями помогали решить технические и организационные проблемы. Славу, Андрея, Алексея, Инну и Юрия я благодарю за теплый и сердечный приём на станции.

Nicht zuletzt geht ein sehr großes Dankeschön an meine Eltern, Geschwister und alle Freunde, die immer an mich geglaubt haben, mir meine Launen verziehen und über so manches Tief hinweggeholfen haben.





## Folgende Hefte der Reihe „Berichte zur Polarforschung“ sind bisher erschienen:

- \* **Sonderheft Nr. 1/1981** – „Die Antarktis und ihr Lebensraum“  
Eine Einführung für Besucher – Herausgegeben im Auftrag von SCAR  
**Heft Nr. 1/1982** – „Die Filchner-Schelfeis-Expedition 1980/81“  
zusammengestellt von Heinz Köhnen
- \* **Heft-Nr. 2/1982** – „Deutsche Antarktis-Expedition 1980/81 mit FS ‚Meteor‘“  
First International BIOMASS Experiment (FIBEX) – Liste der Zooplankton- und Mikronektonnetzfüge  
zusammengestellt von Norbert Klages.  
**Heft Nr. 3/1982** – „Digitale und analoge Krill-Echolot-Rohdatenerfassung an Bord des Forschungsschiffes ‚Meteor‘“ (im Rahmen von FIBEX 1980/81, Fahrtabschnitt ANT III), von Bodo Morgenstern  
**Heft Nr. 4/1982** – „Filchner-Schelfeis-Expedition 1980/81“  
Liste der Planktonfänge und Lichtstärkemessungen  
zusammengestellt von Gerd Hubold und H. Eberhard Drescher
- \* **Heft Nr. 5/1982** – „Joint Biological Expedition on RRS ‚John Biscoe‘, February 1982“  
by G. Hempel and R. B. Heywood
- \* **Heft Nr. 6/1982** – „Antarktis-Expedition 1981/82 (Unternehmen ‚Eiswarte‘)“  
zusammengestellt von Gode Gravenhorst  
**Heft Nr. 7/1982** – „Marin-Biologisches Begleitprogramm zur Standorterkundung 1979/80 mit MS ‚Polarstern‘ (Pre-Site Survey)“ – Stationslisten der Mikronekton- und Zooplanktonfänge sowie der Bodenfischerei  
zusammengestellt von R. Schneppenheim  
**Heft Nr. 8/1983** – „The Post-Fibex Data Interpretation Workshop“  
by D. L. Cram and J.-C. Freytag with the collaboration of J. W. Schmitt, M. Mall, R. Kresse, T. Schwinghammer
- \* **Heft Nr. 9/1983** – „Distribution of some groups of zooplankton in the inner Weddell Sea in summer 1979/80“  
by I. Hempel, G. Hubold, B. Kaczmaruk, R. Keller, R. Weigmann-Haass  
**Heft Nr. 10/1983** – „Fluor im antarktischen Ökosystem“ – DFG-Symposium November 1982  
zusammengestellt von Dieter Adelung  
**Heft Nr. 11/1983** – „Joint Biological Expedition on RRS ‚John Biscoe‘, February 1982 (II)“  
Data of micronekton and zooplankton hauls, by Uwe Piatkowski  
**Heft Nr. 12/1983** – „Das biologische Programm der ANTARKTIS-I-Expedition 1983 mit FS ‚Polarstern‘“  
Stationslisten der Plankton-, Benthos- und Grundschieppnetzfüge und Liste der Probenahme an Robben und Vögeln, von H. E. Drescher, G. Hubold, U. Piatkowski, J. Plötz und J. Voß
- \* **Heft Nr. 13/1983** – „Die Antarktis-Expedition von MS ‚Polarbjörn‘ 1982/83“ (Sommerkampagne zur Atka-Bucht und zu den Kraul-Bergen), zusammengestellt von Heinz Köhnen
- \* **Sonderheft Nr. 2/1983** – „Die erste Antarktis-Expedition von FS ‚Polarstern‘ (Kapstadt, 20. Januar 1983 – Rio de Janeiro, 25. März 1983)“, Bericht des Fahrtleiters Prof. Dr. Gotthilf Hempel  
**Sonderheft Nr. 3/1983** – „Sicherheit und Überleben bei Polarexpeditionen“  
zusammengestellt von Heinz Köhnen
- \* **Heft Nr. 14/1983** – „Die erste Antarktis-Expedition (ANTARKTIS I) von FS ‚Polarstern‘ 1982/83“  
herausgegeben von Gotthilf Hempel  
**Sonderheft Nr. 4/1983** – „On the Biology of Krill *Euphausia superba*“ – Proceedings of the Seminar and Report of the Krill Ecology Group, Bremerhaven 12.–16. May 1983, edited by S. B. Schnack  
**Heft Nr. 15/1983** – „German Antarctic Expedition 1980/81 with FRV ‚Walther Herwig‘ and RV ‚Meteor‘“ – First International BIOMASS Experiment (FIBEX) – Data of micronekton and zooplankton hauls  
by Uwe Piatkowski and Norbert Klages  
**Sonderheft Nr. 5/1984** – „The observatories of the Georg von Neumayer Station“, by Ernst Augstein  
**Heft Nr. 16/1984** – „FIBEX cruise zooplankton data“  
by U. Piatkowski, I. Hempel and S. Rakusa-Suszczewski  
**Heft Nr. 17/1984** – „Fahrtbericht (cruise report) der ‚Polarstern‘-Reise ARKTIS I, 1983“  
von E. Augstein, G. Hempel und J. Thiede  
**Heft Nr. 18/1984** – „Die Expedition ANTARKTIS II mit FS ‚Polarstern‘ 1983/84“,  
Bericht von den Fahrtabschnitten 1, 2 und 3, herausgegeben von D. Fütterer  
**Heft Nr. 19/1984** – „Die Expedition ANTARKTIS II mit FS ‚Polarstern‘ 1983/84“,  
Bericht vom Fahrtabschnitt 4, Punta Arenas–Kapstadt (Ant-II/4), herausgegeben von H. Köhnen  
**Heft Nr. 20/1984** – „Die Expedition ARKTIS II des FS ‚Polarstern‘ 1984, mit Beiträgen des FS ‚Valdivia‘ und des Forschungsflugzeuges ‚Falcon 20‘ zum Marginal Ice Zone Experiment 1984 (MIZEX)“  
von E. Augstein, G. Hempel, J. Schwarz, J. Thiede und W. Weigel  
**Heft Nr. 21/1985** – „Euphausiid larvae in plankton samples from the vicinity of the Antarctic Peninsula, February 1982“ by Sigrid Marschall and Elke Mizdalski  
**Heft Nr. 22/1985** – „Maps of the geographical distribution of macrozooplankton in the Atlantic sector of the Southern Ocean“ by Uwe Piatkowski  
**Heft Nr. 23/1985** – „Untersuchungen zur Funktionsmorphologie und Nahrungsaufnahme der Larven des Antarktischen Krills *Euphausia superba* Dana“ von Hans-Peter Marschall

- Heft Nr. 24/1985** – „Untersuchungen zum Periglazial auf der König-Georg-Insel Südshetlandinseln/ Antarktika. Deutsche physiogeographische Forschungen in der Antarktis. – Bericht über die Kampagne 1983/84“ von Dietrich Barsch, Wolf-Dieter Blümel, Wolfgang Flugel, Roland Mäusbacher, Gerhard Stablein, Wolfgang Zick
- \* **Heft-Nr. 25/1985** – „Die Expedition ANTARKTIS III mit FS ‚Polarstern‘ 1984/1985“ herausgegeben von Gotthilf Hempel.
- \* **Heft-Nr. 26/1985** – „The Southern Ocean“; A survey of oceanographic and marine meteorological research work by Hellmer et al.
- Heft Nr. 27/1986** – „Spatpleistozäne Sedimentationsprozesse am antarktischen Kontinentalhang vor Kapp Norvegia, östliche Weddell-See“ von Hannes Grobe
- Heft Nr. 28/1986** – „Die Expedition ARKTIS III mit ‚Polarstern‘ 1985“ mit Beiträgen der Fahrtteilnehmer, herausgegeben von Rainer Gersonde
- \* **Heft Nr. 29/1986** – „5 Jahre Schwerpunktprogramm ‚Antarktisforschung‘ der Deutschen Forschungsgemeinschaft.“ Rückblick und Ausblick. Zusammenge stellt von Gotthilf Hempel. Sprecher des Schwerpunktprogramms
- Heft Nr. 30/1986** – „The Meteorological Data of the Georg-von-Neumayer-Station for 1981 and 1982“ by Marianne Gube and Friedrich Obleitner
- Heft Nr. 31/1986** – „Zur Biologie der Jugendstadien der Notothenioidei (Pisces) an der Antarktischen Halbinsel“ von A. Kellermann
- Heft Nr. 32/1986** – „Die Expedition ANTARKTIS IV mit FS ‚Polarstern‘ 1985/86“ mit Beiträgen der Fahrtteilnehmer, herausgegeben von Dieter Fütterer
- Heft Nr. 33/1987** – „Die Expedition ANTARKTIS-IV mit FS ‚Polarstern‘ 1985/86 – Bericht zu den Fahrtabschnitten ANT-IV/3–4“ von Dieter Karl Fütterer
- Heft Nr. 34/1987** – „Zoogeographische Untersuchungen und Gemeinschaftsanalysen an antarktischem Makroplankton“ von U. Piatkowski
- Heft Nr. 35/1987** – „Zur Verbreitung des Meso- und Makrozooplanktons in Oberflächenwasser der Weddell See (Antarktis)“ von E. Boysen-Ennen
- Heft Nr. 36/1987** – „Zur Nahrungs- und Bewegungsphysiologie von *Salpa thompsoni* und *Salpa fusiformis*“ von M. Reinke
- Heft Nr. 37/1987** – „The Eastern Weddell Sea Drifting Buoy Data Set of the Winter Weddell Sea Project (WWSP)“ 1986 by Heinrich Hoerber und Marianne Gube-Lehnhardt
- Heft Nr. 38/1987** – „The Meteorological Data of the Georg von Neumayer Station for 1983 and 1984“ by M. Gube-Lehnhardt
- Heft Nr. 39/1987** – „Die Winter-Expedition mit FS ‚Polarstern‘ in die Antarktis (ANT V/1–3)“ herausgegeben von Sigrid Schnack-Schiel
- Heft Nr. 40/1987** – „Weather and Synoptic Situation during Winter Weddell Sea Project 1986 (ANT V/2) July 16–September 10, 1986“ by Werner Rabe
- Heft Nr. 41/1988** – „Zur Verbreitung und Ökologie der Seegurken im Weddellmeer (Antarktis)“ von Julian Gutt
- Heft Nr. 42/1988** – „The zooplankton community in the deep bathyal and abyssal zones of the eastern North Atlantic“ by Werner Beckmann
- Heft Nr. 43/1988** – „Scientific cruise report of Arctic Expedition ARK IV/3“ Wissenschaftlicher Fahrtbericht der Arktis-Expedition ARK IV/3, compiled by Jörn Thiede
- Heft Nr. 44/1988** – „Data Report for FV ‚Polarstern‘ Cruise ARK IV/1, 1987 to the Arctic and Polar Fronts“ by Hans-Jürgen Hirche
- Heft Nr. 45/1988** – „Zoogeographie und Gemeinschaftsanalyse des Makrozoobenthos des Weddellmeeres (Antarktis)“ von Joachim Voß
- Heft Nr. 46/1988** – „Meteorological and Oceanographic Data of the Winter-Weddell-Sea Project 1986 (ANT V/3)“ by Eberhard Fahrbach
- Heft Nr. 47/1988** – „Verteilung und Herkunft glazial-mariner Gerölle am Antarktischen Kontinentalrand des östlichen Weddellmeeres“ von Wolfgang Oskierski
- Heft Nr. 48/1988** – „Variationen des Erdmagnetfeldes an der GvN-Station“ von Arnold Brodscholl
- \* **Heft Nr. 49/1988** – „Zur Bedeutung der Lipide im antarktischen Zooplankton“ von Wilhelm Hagen
- Heft Nr. 50/1988** – „Die gezeitenbedingte Dynamik des Ekström-Schelfeises, Antarktis“ von Wolfgang Kobarg
- Heft Nr. 51/1988** – „Ökomorphologie nototheniider Fische aus dem Weddellmeer, Antarktis“ von Werner Ekau
- Heft Nr. 52/1988** – „Zusammensetzung der Bodenfauna in der westlichen Fram-Straße“ von Dieter Piepenburg
- \* **Heft Nr. 53/1988** – „Untersuchungen zur Ökologie des Phytoplanktons im südöstlichen Weddellmeer (Antarktis) im Jan./Febr. 1985“ von Eva-Maria Nöthig
- Heft Nr. 54/1988** – „Die Fischfauna des östlichen und südlichen Weddellmeeres: geographische Verbreitung, Nahrung und trophische Stellung der Fischarten“ von Wiebke Schwarzbach
- Heft Nr. 55/1988** – „Weight and length data of zooplankton in the Weddell Sea in austral spring 1986 (Ant V/3)“ by Elke Mizdalski
- Heft Nr. 56/1989** – „Scientific cruise report of Arctic expeditions ARK IV/1, 2 & 3“ by G. Krause, J. Meincke und J. Thiede

- Heft Nr. 57/1989** – „Die Expedition ANTARKTIS V mit FS ‚Polarstern‘ 1986/87“  
Bericht von den Fahrtabschnitten ANT V/4–5 von H. Miller und H. Oerter
- \* **Heft Nr. 58/1989** – „Die Expedition ANTARKTIS VI mit FS ‚Polarstern‘ 1987/88“  
von D. K. Fütterer
- Heft Nr. 59/1989** – „Die Expedition ARKTIS V/1a, 1b und 2 mit FS ‚Polarstern‘ 1988“  
von M. Spindler
- Heft Nr. 60/1989** – „Ein zweidimensionales Modell zur thermohalinen Zirkulation unter dem Schelfeis“  
von H. H. Hellmer
- Heft Nr. 61/1989** – „Die Vulkanite im westlichen und mittleren Neuschwabenland,  
Vestfjella und Ahlmannryggen, Antarktika“ von M. Peters
- \* **Heft-Nr. 62/1989** – "The Expedition ANTARKTIS VII/1 and 2 (EPOS I) of RV 'Polarstern'  
in 1988/89", by I. Hempel
- Heft Nr. 63/1989** – „Die Eisalgenflora des Weddellmeeres (Antarktis): Artenzusammensetzung und Biomasse  
sowie Ökophysiologie ausgewählter Arten“ von Annette Bartsch
- Heft Nr. 64/1989** – "Meteorological Data of the G.-v.-Neumayer-Station (Antarctica)" by L. Helmes
- Heft Nr. 65/1989** – „Expedition Antarktis VII/3 in 1988/89“ by I. Hempel, P. H. Schalk, V. Smetacek
- Heft Nr. 66/1989** – „Geomorphologisch-glaziologische Detailkartierung  
des arid-hochpolaren Borgmassivet, Neuschwabenland, Antarktika“ von Karsten Brunk
- Heft-Nr. 67/1990** – „Identification key and catalogue of larval Antarctic fishes“,  
edited by Adolf Kellermann
- Heft-Nr. 68/1990** – „The Expedition Antarktis VII/4 (Epos leg 3) and VII/5 of RV 'Polarstern' in 1989“,  
edited by W. Arntz, W. Ernst, I. Hempel
- Heft-Nr. 69/1990** – „Abhängigkeiten elastischer und rheologischer Eigenschaften des Meereises vom  
Eisgefüge“, von Harald Hellmann
- Heft-Nr. 70/1990** – „Die beschalteten benthischen Mollusken (Gastropoda und Bivalvia) des  
Weddellmeeres, Antarktis“, von Stefan Hain
- Heft-Nr. 71/1990** – „Sedimentologie und Paläomagnetik an Sedimenten der Maudkuppe (Nordöstliches  
Weddellmeer)“, von Dieter Cordes.
- Heft-Nr. 72/1990** – „Distribution and abundance of planktonic copepods (Crustacea) in the Weddell Sea  
in summer 1980/81“, by F. Kurbjeweit and S. Ali-Khan
- Heft-Nr. 73/1990** – „Zur Frühdiagenese von organischem Kohlenstoff und Opal in Sedimenten des südlichen  
und östlichen Weddellmeeres“, von M. Schlüter
- Heft-Nr. 74/1990** – „Expeditionen ANTARKTIS-VIII/3 und VIII/4 mit FS ‚Polarstern‘ 1989“  
von Rainer Gersonde und Gotthilf Hempel
- Heft-Nr. 75/1991** – „Quartäre Sedimentationsprozesse am Kontinentalhang des Süd-Orkey-Plateaus im  
nordwestlichen Weddellmeer (Antarktis)“, von Sigrun Grünig
- Heft-Nr. 76/1990** – „Ergebnisse der faunistischen Arbeiten im Benthal von King George Island  
(Südshetlandinseln, Antarktis)“, von Martin Rauschert
- Heft-Nr. 77/1990** – „Verteilung von Mikroplankton-Organismen nordwestlich der Antarktischen Halbinsel  
unter dem Einfluß sich ändernder Umweltbedingungen im Herbst“, von Heinz Klöser
- Heft-Nr. 78/1991** – „Hochauflösende Magnetostratigraphie spätquartärer Sedimente arktischer  
Meeresgebiete“, von Norbert R. Nowaczyk
- Heft-Nr. 79/1991** – „Ökophysiologische Untersuchungen zur Salinitäts- und Temperaturtoleranz  
antarktischer Grünalgen unter besonderer Berücksichtigung des  $\beta$ -Dimethylsulfoniumpropionat  
(DMSP) - Stoffwechsels“, von Ulf Karsten
- Heft-Nr. 80/1991** – „Die Expedition ARKTIS VII/1 mit FS ‚Polarstern‘ 1990“,  
herausgegeben von Jörn Thiede und Gotthilf Hempel
- Heft-Nr. 81/1991** – „Paläoglazilogie und Paläozeanographie im Spätquartär am Kontinentalrand des  
südlichen Weddellmeeres, Antarktis“, von Martin Melles
- Heft-Nr. 82/1991** – „Quantifizierung von Meereseigenschaften: Automatische Bildanalyse von  
Dünnschnitten und Parametrisierung von Chlorophyll- und Salzgehaltsverteilungen“, von Hajo Eicken
- Heft-Nr. 83/1991** – „Das Fließen von Schelfeisen - numerische Simulationen  
mit der Methode der finiten Differenzen“, von Jürgen Determann
- Heft-Nr. 84/1991** – „Die Expedition ANTARKTIS-VIII/1-2, 1989 mit der Winter Weddell Gyre Study  
der Forschungsschiffe „Polarstern“ und „Akademik Fedorov“, von Ernst Augstein,  
Nikolai Bagriantsev und Hans Werner Schenke
- Heft-Nr. 85/1991** – „Zur Entstehung von Unterwassereis und das Wachstum und die Energiebilanz  
des Meereises in der Atka Bucht, Antarktis“, von Josef Kipfstuhl
- Heft-Nr. 86/1991** – „Die Expedition ANTARKTIS-VIII mit „FS Polarstern“ 1989/90. Bericht vom  
Fahrtabschnitt ANT-VIII / 5“, von Heinz Miller und Hans Oerter
- Heft-Nr. 87/1991** – "Scientific cruise reports of Arctic expeditions ARK VI / 1-4 of RV "Polarstern"  
in 1989", edited by G. Krause, J. Meincke & H. J. Schwarz
- Heft-Nr. 88/1991** – „Zur Lebensgeschichte dominanter Copepodenarten (*Calanus finmarchicus*,  
*C. glacialis*, *C. hyperboreus*, *Metridia longa*) in der Framstraße“, von Sabine Diel

- Heft-Nr. 89/1991** – „Detaillierte seismische Untersuchungen am östlichen Kontinentalrand des Weddell-Meeress vor Kapp Norvegia, Antarktis“, von Norbert E. Kaul
- Heft-Nr. 90/1991** – „Die Expedition ANTARKTIS-VIII mit FS „Polarstern“ 1989/90. Bericht von den Fahrtabschnitten ANT-VIII/6-7“, herausgegeben von Dieter Karl Fütterer und Otto Schrems
- Heft-Nr. 91/1991** – „Blood physiology and ecological consequences in Weddell Sea fishes (Antarctica)“, by Andreas Kunzmann
- Heft-Nr. 92/1991** – „Zur sommerlichen Verteilung des Mesozooplanktons im Nansen-Becken, Nordpolarmeer“, von Nicolai Mumm
- Heft-Nr. 93/1991** – „Die Expedition ARKTIS VII mit FS „Polarstern“, 1990. Bericht vom Fahrtabschnitt ARK VII/2“, herausgegeben von Gunther Krause
- Heft-Nr. 94/1991** – „Die Entwicklung des Phytoplanktons im östlichen Weddellmeer (Antarktis) beim Übergang vom Spätwinter zum Frühjahr“, von Renate Scharek
- Heft-Nr. 95/1991** – „Radioisotopenstratigraphie, Sedimentologie und Geochemie jungquartärer Sedimente des östlichen Arktischen Ozeans“, von Horst Bohrmann
- Heft-Nr. 96/1991** – „Holozäne Sedimentationsentwicklung im Scoresby Sund, Ost-Grönland“, von Peter Marienfeld
- Heft-Nr. 97/1991** – „Strukturelle Entwicklung und Abkühlungsgeschichte der Heimefrontfjella (Westliches Dronning Maud Land/Antarktika)“, von Joachim Jacobs
- Heft-Nr. 98/1991** – „Zur Besiedlungsgeschichte des antarktischen Schelfes am Beispiel der Isopoda (Crustacea, Malacostraca)“, von Angelika Brandt
- Heft-Nr. 99/1992** – „The Antarctic ice sheet and environmental change: a three-dimensional modelling study“, by Philippe Huybrechts
- \* **Heft-Nr. 100/1992** – „Die Expeditionen ANTARKTIS IX/1-4 des Forschungsschiffes „Polarstern“ 1990/91“, herausgegeben von Ulrich Bathmann, Meinhard Schulz-Baldes, Eberhard Fahrbach, Victor Smetacek und Hans-Wolfgang Hubberten
- Heft-Nr. 101/1992** – „Wechselbeziehungen zwischen Schwermetallkonzentrationen (Cd, Cu, Pb, Zn) im Meewasser und in Zooplanktonorganismen (Copepoda) der Arktis und des Atlantiks“, von Christa Pohl
- Heft-Nr. 102/1992** – „Physiologie und Ultrastruktur der antarktischen Grünalge *Prasiola crista* ssp. *antarctica* unter osmotischem Streß und Austrocknung“, von Andreas Jacob
- Heft-Nr. 103/1992** – „Zur Ökologie der Fische im Weddellmeer“, von Gerd Hubold
- Heft-Nr. 104/1992** – „Mehrkanalige adaptive Filter für die Unterdrückung von multiplen Reflexionen in Verbindung mit der freien Oberfläche in marinen Seismogrammen“, von Andreas Rosenberger
- Heft-Nr. 105/1992** – „Radiation and Eddy Flux Experiment 1991 (REFLEX I)“, von Jörg Hartmann, Christoph Kottmeier und Christian Wamser
- Heft-Nr. 106/1992** – „Ostracoden im Epipelagial vor der Antarktischen Halbinsel - ein Beitrag zur Systematik sowie zur Verbreitung und Populationsstruktur unter Berücksichtigung der Saisonalität“, von Rüdiger Kock
- Heft-Nr. 107/1992** – „ARCTIC '91: Die Expedition ARK-VIII/3 mit FS „Polarstern“ 1991“, von Dieter K. Fütterer
- Heft-Nr. 108/1992** – „Dehnungsbeben an einer Störungszone im Ekström-Schelfeis nördlich der Georg-von-Neumayer Station, Antarktis. – Eine Untersuchung mit seismologischen und geodätischen Methoden“, von Uwe Nixdorf.
- Heft-Nr. 109/1992** – „Spätquartäre Sedimentation am Kontinentalrand des südöstlichen Weddellmeeres, Antarktis“, von Michael Weber.
- Heft-Nr. 110/1992** – „Sedimentfazies und Bodenwasserstrom am Kontinentalhang des nordwestlichen Weddellmeeres“, von Isa Brehme.
- Heft-Nr. 111/1992** – „Die Lebensbedingungen in den Solekanälchen des antarktischen Meereises“, von Jürgen Weissenberger.
- Heft-Nr. 112/1992** – „Zur Taxonomie von rezenten benthischen Foraminiferen aus dem Nansen Becken, Arktischer Ozean“, von Jutta Wollenburg.
- Heft-Nr. 113/1992** – „Die Expedition ARKTIS VIII/1 mit FS „Polarstern“ 1991“, herausgegeben von Gerhard Kattner.
- \* **Heft-Nr. 114/1992** – „Die Gründungsphase deutscher Polarforschung, 1865-1875“, von Reinhard A. Krause.
- Heft-Nr. 115/1992** – „Scientific Cruise Report of the 1991 Arctic Expedition ARK VIII/2 of RV „Polarstern“ (EPOS II)“, by Eike Rachor.
- Heft-Nr. 116/1992** – „The Meteorological Data of the Georg-von-Neumayer-Station (Antarctica) for 1988, 1989, 1990 and 1991“, by Gert König-Langlo.
- Heft-Nr. 117/1992** – „Petrogenese des metamorphen Grundgebirges der zentralen Heimefrontfjella (westliches Dronning Maud Land / Antarktis)“, von Peter Schulze.
- Heft-Nr. 118/1993** – „Die mafischen Gänge der Shackleton Range / Antarktika: Petrographie, Geochemie, Isotopengeochemie und Paläomagnetik“, von Rüdiger Hotten.
- \* **Heft-Nr. 119/1993** – „Gefrierschutz bei Fischen der Polarmeere“, von Andreas P.A. Wöhrmann.
- \* **Heft-Nr. 120/1993** – „East Siberian Arctic Region Expedition '92: The Laptev Sea - its Significance for Arctic Sea-Ice Formation and Transpolar Sediment Flux“, by D. Dethleff, D. Nürnberg, E. Reimnitz, M. Saarlo and Y. P. Sacchenko. – „Expedition to Novaja Zemlja and Franz Josef Land with RV. 'Dalnie Zelentsy'“, by D. Nürnberg and E. Groth.



- \* **Heft-Nr. 121/1993** – „Die Expedition ANTARKTIS X/3 mit FS 'Polarstern' 1992“, herausgegeben von Michael Spindler, Gerhard Dieckmann und David Thomas.
- Heft-Nr. 122/1993** – „Die Beschreibung der Korngestalt mit Hilfe der Fourier-Analyse: Parametrisierung der morphologischen Eigenschaften von Sedimentpartikeln“, von Michael Diepenbroek.
- \* **Heft-Nr. 123/1993** – „Zerstörungsfreie hochauflösende Dichteuntersuchungen mariner Sedimente“, von Sebastian Gerland.
- Heft-Nr. 124/1993** – „Umsatz und Verteilung von Lipiden in arktischen marinen Organismen unter besonderer Berücksichtigung unterer trophischer Stufen“, von Martin Graeve.
- Heft-Nr. 125/1993** – „Ökologie und Respiration ausgewählter arktischer Bodenfischarten“, von Christian F. von Dörrien.
- Heft-Nr. 126/1993** – „Quantitative Bestimmung von Paläoumweltparametern des Antarktischen Oberflächenwassers im Spätquartär anhand von Transferfunktionen mit Diatomeen“, von Ulrich Zielinski.
- Heft-Nr. 127/1993** – „Sedimenttransport durch das arktische Meereis: Die rezente lithogene und biogene Materialfracht“, von Ingo Wollenburg.
- Heft-Nr. 128/1993** – „Cruise ANTARKTIS X/3 of RV 'Polarstern': CTD-Report“, von Marek Zwierz.
- Heft-Nr. 129/1993** – „Reproduktion und Lebenszyklen dominanter Copepodenarten aus dem Weddellmeer, Antarktis“, von Frank Kurbjweit.
- Heft-Nr. 130/1993** – „Untersuchungen zu Temperaturregime und Massenhaushalt des Filchner-Ronne-Schelfeises, Antarktis, unter besonderer Berücksichtigung von Anfrrier- und Abschmelzprozessen“, von Klaus Grosfeld.
- Heft-Nr. 131/1993** – „Die Expedition ANTARKTIS X/5 mit FS 'Polarstern' 1992“, herausgegeben von Rainer Gersonde.
- Heft-Nr. 132/1993** – „Bildung und Abgabe kurzketziger halogener Kohlenwasserstoffe durch Makroalgen der Polarregionen“, von Frank Laturnus.
- Heft-Nr. 133/1994** – „Radiation and Eddy Flux Experiment 1993 (REFLEX II)“, by Christoph Kottmeier, Jörg Hartmann, Christian Wamser, Axel Bochert, Christof Lüpkes, Dietmar Freese and Wolfgang Cohrs.
- \* **Heft-Nr. 134/1994** – „The Expedition ARKTIS-IX/1“, edited by Hajo Eicken and Jens Meincke.
- Heft-Nr. 135/1994** – „Die Expeditionen ANTARKTIS X/6-8“, herausgegeben von Ulrich Bathmann, Victor Smetacek, Hein de Baar, Eberhard Fahrback und Gunter Krause.
- Heft-Nr. 136/1994** – „Untersuchungen zur Ernährungsökologie von Kaiserpinguinen (*Aptenodytes forsteri*) und Königspinguinen (*Aptenodytes patagonicus*)“, von Klemens Pütz.
- \* **Heft-Nr. 137/1994** – „Die kanozoische Vereisungsgeschichte der Antarktis“, von Werner U. Ehrmann.
- Heft-Nr. 138/1994** – „Untersuchungen stratosphärischer Aerosole vulkanischen Ursprungs und polarer stratosphärischer Wolken mit einem Mehrwellenlängen-Lidar auf Spitzbergen (79 N, 12 E)“, von Georg Beyerle.
- Heft-Nr. 139/1994** – „Charakterisierung der Isopodenfauna (Crustacea, Malacostraca) des Scotia-Bogens aus biogeographischer Sicht: Ein multivariater Ansatz“, von Holger Winkler.
- Heft-Nr. 140/1994** – „Die Expedition ANTARKTIS X/4 mit FS 'Polarstern' 1992“, herausgegeben von Peter Lemke.
- Heft-Nr. 141/1994** – „Satellitaltimetrie über Eis – Anwendung des GEOSAT-Altimeters über dem Ekstromisen, Antarktis“, von Clemens Heidland.
- Heft-Nr. 142/1994** – „The 1993 Northeast Water Expedition. Scientific cruise report of RV 'Polarstern' Arctic cruises ARK IX/2 and 3, USCG 'Polar Bear' cruise NEWP and the NEWLAND expedition“, edited by Hans-Jürgen Hirche and Gerhard Kattner.
- Heft-Nr. 143/1994** – „Detaillierte refraktionsseismische Untersuchungen im inneren Scoresby Sund Ost-Grönland“, von Notker Fechner.
- Heft-Nr. 144/1994** – „Russian-German Cooperation in the Siberian Shelf Seas: Geo-System Laptev Sea“, edited by Heidemarie Kassens, Hans-Wolfgang Hubberten, Sergey M. Pryamikov und Rüdiger Stein.
- \* **Heft-Nr. 145/1994** – „The 1993 Northeast Water Expedition. Data Report of RV 'Polarstern' Arctic Cruises IX/2 and 3“, edited by Gerhard Kattner and Hans-Jürgen Hirche.
- Heft-Nr. 146/1994** – „Radiation Measurements at the German Antarctic Station Neumayer 1982-1992“, by Torsten Schmidt and Gert König-Langlo.
- Heft-Nr. 147/1994** – „Krustenstrukturen und Verlauf des Kontinentalrandes im Weddell Meer / Antarktis“, von Christian Hübscher.
- Heft-Nr. 148/1994** – „The expeditions NORILSK/TAYMYR 1993 and BUNGER OASIS 1993/94 of the AWI Research Unit Potsdam“, edited by Martin Melles.
- \*\* **Heft-Nr. 149/1994** – „Die Expedition ARCTIC '93. Der Fahrtabschnitt ARK-IX/4 mit FS 'Polarstern' 1993“, herausgegeben von Dieter K. Fütterer.
- Heft-Nr. 150/1994** – „Der Energiebedarf der Pygoscelis-Pinguine: eine Synopse“, von Boris M. Culik.
- Heft-Nr. 151/1994** – „Russian-German Cooperation: The Transdrift I Expedition to the Laptev Sea“, edited by Heidemarie Kassens and Valeriy Y. Karpiy.
- Heft-Nr. 152/1994** – „Die Expedition ANTARKTIS-X mit FS 'Polarstern' 1992. Bericht von den Fahrtabschnitten / ANT-X / 1a und 2“, herausgegeben von Heinz Miller.
- Heft-Nr. 153/1994** – „Aminosäuren und Huminstoffe im Stickstoffkreislauf polarer Meere“, von Ulrike Hubberten.
- Heft-Nr. 154/1994** – „Regional und seasonal variability in the vertical distribution of mesozooplankton in the Greenland Sea“, by Claudio Richter.

- Heft-Nr. 155/1995** – "Benthos in polaren Gewässern", herausgegeben von Christian Wiencke und Wolf Arntz.
- Heft-Nr. 156/1995** – "An adjoint model for the determination of the mean oceanic circulation, air-sea fluxes und mixing coefficients", by Reiner Schlitzer.
- Heft-Nr. 157/1995** – "Biochemische Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel antarktischer Copepoden", von Kirsten Fahl.
- \*\* Heft-Nr. 158/1995** – "Die Deutsche Polarforschung seit der Jahrhundertwende und der Einfluß Erich von Drygalskis", von Cornelia Lüdecke.
- Heft-Nr. 159/1995** – "The distribution of  $\delta^{18}O$  in the Arctic Ocean: Implications for the freshwater balance of the halocline and the sources of deep and bottom waters", by Dorothea Bauch.
- \* Heft-Nr. 160/1995** – "Rekonstruktion der spätquartären Tiefenwasserzirkulation und Produktivität im östlichen Südatlantik anhand von benthischen Foraminiferenvergesellschaftungen", von Gerhard Schmiedl.
- Heft-Nr. 161/1995** – "Der Einfluß von Salinität und Lichtintensität auf die Osmolytkonzentrationen, die Zellvolumina und die Wachstumsraten der antarktischen Eisdiatomeen *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. unter besonderer Berücksichtigung der Aminosäure Prolin", von Jürgen Nothnagel.
- Heft-Nr. 162/1995** – "Meereistransportiertes lithogenes Feinmaterial in spätquartären Tiefseesedimenten des zentralen östlichen Arktischen Ozeans und der Framstraße", von Thomas Letzig.
- Heft-Nr. 163/1995** – "Die Expedition ANTARKTIS-XI/2 mit FS "Polarstern" 1993/94", herausgegeben von Rainer Gersonde.
- Heft-Nr. 164/1995** – "Regionale und altersabhängige Variation gesteinsmagnetischer Parameter in marinen Sedimenten der Arktis", von Thomas Frederichs.
- Heft-Nr. 165/1995** – "Vorkommen, Verteilung und Umsatz biogener organischer Spurenstoffe: Sterole in antarktischen Gewässern", von Georg Hanke.
- Heft-Nr. 166/1995** – "Vergleichende Untersuchungen eines optimierten dynamisch-thermodynamischen Meereismodells mit Beobachtungen im Weddellmeer", von Holger Fischer.
- Heft-Nr. 167/1995** – "Rekonstruktionen von Paläo-Umweltparametern anhand von stabilen Isotopen und Faunen-Vergesellschaftungen planktischer Foraminiferen im Südatlantik", von Hans-Stefan Niebler.
- Heft-Nr. 168/1995** – "Die Expedition ANTARKTIS XII mit FS 'Polarstern' 1993/94. Bericht von den Fahrtabschnitten ANT XII/1 und 2", herausgegeben von Gerhard Kattner und Dieter Karl Fütterer.
- Heft-Nr. 169/1995** – "Medizinische Untersuchung zur Circadianrhythmik und zum Verhalten bei Überwinterern auf einer antarktischen Forschungsstation", von Hans Wortmann.
- Heft-Nr. 170/1995** – DFG-Kolloquium: Terrestrische Geowissenschaften - Geologie und Geophysik der Antarktis.
- Heft-Nr. 171/1995** – "Strukturentwicklung und Petrogenese des metamorphen Grundgebirges der nördlichen Heimfrontfjella (westliches Dronning Maud Land/Antarktika)", von Wilfried Bauer.
- Heft-Nr. 172/1995** – "Die Struktur der Erdkruste im Bereich des Scoresby Sund, Ostgrönland: Ergebnisse refraktionsseismischer und gravimetrischer Untersuchungen", von Holger Mandler.
- Heft-Nr. 173/1995** – "Paläozoische Akkretion am paläopazifischen Kontinentalrand der Antarktis in Nordvictorialand – P-T-D-Geschichte und Deformationsmechanismen im Bowers Terrane", von Stefan Matzer.
- Heft-Nr. 174/1995** – "The Expedition ARKTIS-X/2 of RV 'Polarstern' in 1994", edited by Hans-W. Hubberten.
- Heft-Nr. 175/1995** – "Russian-German Cooperation: The Expedition TAYMYR 1994", edited by Christine Siegert and Dmitry Bolshiyarov.
- Heft-Nr. 176/1995** – "Russian-German Cooperation: Laptev Sea System", edited by Heidemarie Kassens, Dieter Piepenburg, Jörn Thiede, Leonid Timokhov, Hans-Wolfgang Hubberten and Sergey M. Priamikov.
- Heft-Nr. 177/1995** – "Organischer Kohlenstoff in spätquartären Sedimenten des Arktischen Ozeans: Terrigener Eintrag und marine Produktivität", von Carsten J. Schubert.
- Heft-Nr. 178/1995** – "Cruise ANTARKTIS XII/4 of RV 'Polarstern' in 1995: CTD-Report", by Jüri Sildam.
- Heft-Nr. 179/1995** – "Benthische Foraminiferenfaunen als Wassermassen-, Produktions- und Eisdriftanzeiger im Arktischen Ozean", von Jutta Wollenburg.
- Heft-Nr. 180/1995** – "Biogenopal und biogenes Barium als Indikatoren für spätquartäre Produktivitätsänderungen am antarktischen Kontinentalhang, atlantischer Sektor", von Wolfgang J. Bonn.
- Heft-Nr. 181/1995** – "Die Expedition ARKTIS X/1 des Forschungsschiffes 'Polarstern' 1994", herausgegeben von Eberhard Fahrbach.
- Heft-Nr. 182/1995** – "Laptev Sea System: Expeditions in 1994", edited by Heidemarie Kassens.
- Heft-Nr. 183/1996** – "Interpretation digitaler Parasound Echolotaufzeichnungen im östlichen Arktischen Ozean auf der Grundlage physikalischer Sedimenteigenschaften", von Uwe Bergmann.
- Heft-Nr. 184/1996** – "Distribution and dynamics of inorganic nitrogen compounds in the troposphere of continental, coastal, marine and Arctic areas", by Maria Dolores Andrés Hernández.
- Heft-Nr. 185/1996** – "Verbreitung und Lebensweise der Aphroditiden und Polynoiden (Polychaeta) im östlichen Weddellmeer und im Lazarevmeer (Antarktis)", von Michael Stiller.
- Heft-Nr. 186/1996** – "Reconstruction of Late Quaternary environmental conditions applying the natural radionuclides  $^{210}Pb$ ,  $^{210}Po$  and  $^{238}U$ : A study of deep-sea sediments from the eastern sector of the Arctic Circumpolar Current System", by Martin Frank.
- Heft-Nr. 187/1996** – "The Meteorological Data of the Neumayer Station (Antarctica) for 1992, 1993 and 1994", by Gert König-Langlo and Andreas Herber.
- Heft-Nr. 188/1996** – "Die Expedition ANTARKTIS-XI/3 mit FS 'Polarstern' 1994", herausgegeben von Heinz Miller und Hannes Grobe.
- Heft-Nr. 189/1996** – "Die Expedition ARKTIS-VII/3 mit FS 'Polarstern' 1990", herausgegeben von Heinz Miller und Hannes Grobe.

- Heft-Nr. 190/1996** – “Cruise report of the Joint Chilean-German-Italian Magellan ‘Victor Hensen’ Campaign in 1994”, edited by Wolf Arntz and Matthias Gorny.
- Heft-Nr. 191/1996** – “Leitfähigkeits- und Dichtemessung an Eisbohrkernen”, von Frank Wilhelms.
- Heft-Nr. 192/1996** – “Photosynthese-Charakteristika und Lebensstrategie antarktischer Makroalgen”, von Gabriele Weykam.
- Heft-Nr. 193/1996** – “Heterogene Reaktionen von  $N_2O_5$  und HBr und ihr Einfluß auf den Ozonabbau in der polaren Stratosphäre”, von Sabine Seisel.
- Heft-Nr. 194/1996** – “Ökologie und Populationsdynamik antarktischer Ophiuroiden (Echinodermata)”, von Corinna Dahm.
- Heft-Nr. 195/1996** – “Die planktische Foraminifere *Neogloboquadrina pachyderma* (Ehrenberg) im Weddellmeer, Antarktis”, von Doris Berberich.
- Heft-Nr. 196/1996** – “Untersuchungen zum Beitrag chemischer und dynamischer Prozesse zur Variabilität des stratosphärischen Ozons über der Arktis”, von Birgit Heese.
- Heft-Nr. 197/1996** – “The Expedition ARKTIS-XI/2 of ‘Polarstern’ in 1995”, edited by Gunther Krause.
- Heft-Nr. 198/1996** – “Geodynamik des Westantarktischen Riftsystems basierend auf Apatit-Spaltspuranalysen”, von Frank Lisker.
- Heft-Nr. 199/1996** – “The 1993 Northeast Water Expedition. Data Report on CTD Measurements of RV ‘Polarstern’ Cruises ARKTIS IX/2 and 3”, by Gereon Budéus and Wolfgang Schneider.
- Heft-Nr. 200/1996** – “Stability of the Thermohaline Circulation in analytical and numerical models”, by Gerrit Lohmann.
- Heft-Nr. 201/1996** – “Trophische Beziehungen zwischen Makroalgen und Herbivoren in der Potter Cove (King George-Insel, Antarktis)”, von Katrin Iken.
- Heft-Nr. 202/1996** – “Zur Verbreitung und Respiration ökologisch wichtiger Bodentiere in den Gewässern um Svalbard (Arktis)”, von Michael K. Schmid.
- Heft-Nr. 203/1996** – “Dynamik, Rauigkeit und Alter des Meereises in der Arktis - Numerische Untersuchungen mit einem großskaligen Modell”, von Markus Harder.
- Heft-Nr. 204/1996** – “Zur Parametrisierung der stabilen atmosphärischen Grenzschicht über einem antarktischen Schelfeis”, von Dörthe Handorf.
- Heft-Nr. 205/1996** – “Textures and fabrics in the GRIP ice core, in relation to climate history and ice deformation”, by Thorsteinn Thorsteinsson.
- Heft-Nr. 206/1996** – “Der Ozean als Teil des gekoppelten Klimasystems: Versuch der Rekonstruktion der glazialen Zirkulation mit verschiedenen komplexen Atmosphärenkomponenten”, von Kerstin Fieg.
- Heft-Nr. 207/1996** – “Lebensstrategien dominanter antarktischer Oithonidae (Cyclopoida, Copepoda) und Oncaidae (Poecilostomatoida, Copepoda) im Bellingshausenmeer”, von Cornelia Metz.
- Heft-Nr. 208/1996** – “Atmosphäreneinfluß bei der Fernerkundung von Meereis mit passiven Mikrowellenradiometern”, von Christoph Oelke.
- Heft-Nr. 209/1996** – “Klassifikation von Radarsatellitendaten zur Meereisererkennung mit Hilfe von Line-Scanner-Messungen”, von Axel Bochert.
- Heft-Nr. 210/1996** – “Die mit ausgewählten Schwämmen (Hexactinellida und Demospongiae) aus dem Weddellmeer, Antarktis, vergesellschaftete Fauna”, von Kathrin Kunzmann.
- Heft-Nr. 211/1996** – “Russian-German Cooperation: The Expedition TAYMYR 1995 and the Expedition KOLYMA 1995”, by Dima Yu. Bolshiyakov and Hans-W. Hubberten.
- Heft-Nr. 212/1996** – “Surface-sediment composition and sedimentary processes in the central Arctic Ocean and along the Eurasian Continental Margin”, by Ruediger Stein, Gennadij I. Ivanov, Michael A. Levitan, and Kirsten Fahl.
- Heft-Nr. 213/1996** – “Gonadenentwicklung und Eiproduktion dreier *Calanus*-Arten (Copepoda): Freilandbeobachtungen, Histologie und Experimente”, von Barbara Niehoff.
- Heft-Nr. 214/1996** – “Numerische Modellierung der Übergangszone zwischen Eisschild und Eisschelf”, von Christoph Mayer.
- Heft-Nr. 215/1996** – “Arbeiten der AWI-Forschungsstelle Potsdam in Antarktika, 1994/95”, herausgegeben von Ulrich Wand.
- Heft-Nr. 216/1996** – “Rekonstruktion quartärer Klimaänderungen im atlantischen Sektor des Südpolarmeeres anhand von Radiolarien”, von Uta Brathauer.
- Heft-Nr. 217/1996** – “Adaptive Semi-Lagrange-Finite-Elemente-Methode zur Lösung der Flachwassergleichungen: Implementierung und Parallelisierung”, von Jörn Behrens.
- Heft-Nr. 218/1997** – “Radiation and Eddy Flux Experiment 1995 (REFLEX III)”, by Jörg Hartmann, Axel Bochert, Dietmar Freese, Christoph Kottmeier, Dagmar Nagel and Andreas Reuter.
- Heft-Nr. 219/1997** – “Die Expedition ANTARKTIS-XII mit FS ‘Polarstern’ 1995. Bericht vom Fahrtabschnitt ANT-XII/3”, herausgegeben von Wilfried Jokat und Hans Oerter.
- Heft-Nr. 220/1997** – “Ein Beitrag zum Schwerfeld im Bereich des Weddellmeeres, Antarktis. Nutzung von Altimetermessungen des GEOSAT und ERS-1”, von Tilo Schöne.
- Heft-Nr. 221/1997** – “Die Expeditionen ANTARKTIS-XIII/1-2 des Forschungsschiffes ‘Polarstern’ 1995/96”, herausgegeben von Ulrich Bathmann, Mike Lucas und Victor Smetacek.
- Heft-Nr. 222/1997** – “Tectonic Structures and Glaciomarine Sedimentation in the South-Eastern Weddell Sea from Seismic Reflection Data”, by László Oszkó.

- Heft-Nr. 223/1997** – “Bestimmung der Meereisdicke mit seismischen und elektromagnetisch-induktiven Verfahren”, von Christian Haas.
- Heft-Nr. 224/1997** – “Troposphärische Ozonvariationen in Polarregionen”, von Silke Wessel.
- Heft-Nr. 225/1997** – “Biologische und ökologische Untersuchungen zur kryopelagischen Amphipodenfauna des arktischen Meereises”, von Michael Poltermann.
- Heft-Nr. 226/1997** – “Scientific Cruise Report of the Arctic Expedition ARK-XI/1 of RV ‘Polarstern’ in 1995”, edited by Eike Rachor.
- Heft-Nr. 227/1997** – “Der Einfluß kompatibler Substanzen und Kyroprotektoren auf die Enzyme Malatdehydrogenase (MDH) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) aus *Acrosiphonia arctica* (Chlorophyta) der Arktis”, von Katharina Kück.
- Heft-Nr. 228/1997** – “Die Verbreitung epibenthischer Mollusken im chilenischen Beagle-Kanal”, von Katrin Linse.
- Heft-Nr. 229/1997** – “Das Mesozooplankton im Laptevmeer und östlichen Nansen-Becken - Verteilung und Gemeinschaftsstrukturen im Spätsommer”, von Hinrich Hanssen.
- Heft-Nr. 230/1997** – “Modell eines adaptierbaren, rechnergestützten, wissenschaftlichen Arbeitsplatzes am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung”, von Lutz-Peter Kurdelski.
- Heft-Nr. 231/1997** – “Zur Ökologie arktischer und antarktischer Fische: Aktivität, Sinnesleistungen und Verhalten”, von Christopher Zimmermann.
- Heft-Nr. 232/1997** – “Persistente chlororganische Verbindungen in hochantarktischen Fischen”, von Stephan Zimmermann.
- Heft-Nr. 233/1997** – “Zur Ökologie des Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)-Gehaltes temperierter und polarer Phytoplanktongemeinschaften im Vergleich mit Laborkulturen der Coccolithophoridae *Emiliana huxleyi* und der antarktischen Diatomee *Nitzschia lecointei*”, von Doris Meyerdierks.
- Heft-Nr. 234/1997** – “Die Expedition ARCTIC '96 des FS ‘Polarstern’ (ARK XII) mit der Arctic Climate System Study (ACSYS)”, von Ernst Augstein und den Fahrteilnehmern.
- Heft-Nr. 235/1997** – “Polonium-210 und Blei-210 im Südpolarmeer: Natürliche Tracer für biologische und hydrographische Prozesse im Oberflächenwasser des Antarktischen Zirkumpolarstroms und des Weddellmeeres”, von Jana Friedrich.
- Heft-Nr. 236/1997** – “Determination of atmospheric trace gas amounts and corresponding natural isotopic ratios by means of ground-based FTIR spectroscopy in the high Arctic”, by Arndt Meier.
- Heft-Nr. 237/1997** – “Russian-German Cooperation: The Expedition TAYMYR / SEVERNAYA ZEMLYA 1996”, edited by Martin Melles, Birgit Hagedorn and Dmitri Yu. Bolshyanow.
- Heft-Nr. 238/1997** – “Life strategy and ecophysiology of Antarctic macroalgae”, by Iván M. Gómez.
- Heft-Nr. 239/1997** – “Die Expedition ANTARKTIS XIII/4-5 des Forschungsschiffes ‘Polarstern’ 1996”, herausgegeben von Eberhard Fahrbach und Dieter Gerdes.
- Heft-Nr. 240/1997** – “Untersuchungen zur Chrom-Speziation im Meerwasser, Meereis und Schnee aus ausgewählten Gebieten der Arktis”, von Heide Giese.
- Heft-Nr. 241/1997** – “Late Quaternary glacial history and paleoceanographic reconstructions along the East Greenland continental margin: Evidence from high-resolution records of stable isotopes and ice-rafted debris”, by Seung-Il Nam.
- Heft-Nr. 242/1997** – “Thermal, hydrological and geochemical dynamics of the active layer at a continuous site, Taymyr Peninsula, Siberia”, by Julia Boike.
- Heft-Nr. 243/1997** – “Zur Paläoozeanographie hoher Breiten: Stellvertreterdaten aus Foraminiferen”, von Andreas Mackensen.
- Heft-Nr. 244/1997** – “The Geophysical Observatory at Neumayer Station, Antarctica. Geomagnetic and seismological observations in 1995 and 1996”, by Alfons Eckstaller, Thomas Schmidt, Viola Gaw, Christian Müller and Johannes Rogenhagen.
- Heft-Nr. 245/1997** – “Temperaturbedarf und Biogeographie mariner Makroalgen - Anpassung mariner Makroalgen an tiefe Temperaturen”, von Bettina Bischoff-Bäsmann.
- Heft-Nr. 246/1997** – “Ökologische Untersuchungen zur Fauna des arktischen Meereises”, von Christine Friedrich.
- Heft-Nr. 247/1997** – “Entstehung und Modifizierung von marinen gelösten organischen Substanzen”, von Berit Kirchhoff.
- Heft-Nr. 248/1997** – “Laptev Sea System: Expeditions in 1995”, edited by Heidemarie Kassens.
- Heft-Nr. 249/1997** – “The Expedition ANTARKTIS XIII/3 (EASIZ I) of RV ‘Polarstern’ to the eastern Weddell Sea in 1996”, edited by Wolf Arntz and Julian Gutt.
- Heft-Nr. 250/1997** – “Vergleichende Untersuchungen zur Ökologie und Biodiversität des Mega-Epibenthos der Arktis und Antarktis”, von Andreas Starmans.
- Heft-Nr. 251/1997** – “Zeitliche und räumliche Verteilung von Mineralvergesellschaftungen in spätquartären Sedimenten des Arktischen Ozeans und ihre Nützlichkeit als Klimaindikatoren während der Glazial/Interglazial-Wechsel”, von Christoph Vogt.
- Heft-Nr. 252/1997** – “Solitäre Ascidien in der Potter Cove (King George Island, Antarktis). Ihre ökologische Bedeutung und Populationsdynamik”, von Stephan Kühne.
- Heft-Nr. 253/1997** – “Distribution and role of microprotozoa in the Southern Ocean”, by Christine Klaas.
- Heft-Nr. 254/1997** – “Die spätquartäre Klima- und Umweltgeschichte der Bunger-Oase, Ostantarktis”, von Thomas Kulbe.

- Heft-Nr. 255/1997** – “Scientific Cruise Report of the Arctic Expedition ARK-XIII/2 of RV ‘Polarstern’ in 1997”, edited by Ruediger Stein and Kirsten Fahl.
- Heft-Nr. 256/1998** – “Das Radionuklid Tritium im Ozean: Meßverfahren und Verteilung von Tritium im Südatlantik und im Weddellmeer”, von Jürgen Sültenfuß.
- Heft-Nr. 257/1998** – “Untersuchungen der Saisonalität von atmosphärischen Dimethylsulfid in der Arktis und Antarktis von Christoph Kleefeld.
- Heft-Nr. 258/1998** – “Bellinghausen- und Amundsenmeer: Entwicklung eines Sedimentationsmodells”, von Frank-Oliver Nitsche.
- Heft-Nr. 259/1998** – “The Expedition ANTARKTIS-XIV/4 of RV ‘Polarstern’ in 1997”, by Dieter K. Fütterer.
- Heft-Nr. 260/1998** – “Die Diatomeen der Laptevsee (Arktischer Ozean): Taxonomie und biogeographische Verbreitung von Holger Cremer.
- Heft-Nr. 261/1998** – “Die Krustenstruktur und Sedimentdecke des Eurasischen Beckens, Arktischer Ozean: Resultate aus seismischen und gravimetrischen Untersuchungen”, von Estella Weigelt.
- Heft-Nr. 262/1998** – “The Expedition ARKTIS-XIII/3 of RV ‘Polarstern’ in 1997”, by Gunther Krause.
- Heft-Nr. 263/1998** – “Thermo-tektonische Entwicklung von Oates Land und der Shackleton Range (Antarktis) basierend auf Spaltspuranalysen”, von Thorsten Schäfer.
- Heft-Nr. 264/1998** – “Messungen der stratosphärischen Spurengase ClO, HCl, O<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O und OH mittels flugzeugtragener Submillimeterwellen-Radiometrie”, von Joachim Urban.
- Heft-Nr. 265/1998** – “Untersuchungen zu Massenhaushalt und Dynamik des Ronne Ice Shelves, Antarktis”, von Astrid Lambrecht.
- Heft-Nr. 266/1998** – “Scientific Cruise Report of the Kara Sea Expedition of RV ‘Akademik Boris Petrov’ in 1997”, edited by Jens Matthiessen and Oleg Stepanets.
- Heft-Nr. 267/1998** – “Die Expedition ANTARKTIS-XIV mit FS ‘Polarstern’ 1997. Bericht vom Fahrtabschnitt ANT-XIV/3<sup>\*</sup> herausgegeben von Wilfried Jokat und Hans Oerter.
- Heft-Nr. 268/1998** – “Numerische Modellierung der Wechselwirkung zwischen Atmosphäre und Meereis in der arktischen Eisrandzone”, von Gerit Birnbaum.
- Heft-Nr. 269/1998** – “Katabatic wind and Boundary Layer Front Experiment around Greenland (KABEG ‘97)”, by Günther Heinemann.
- Heft-Nr. 270/1998** – “Architecture and evolution of the continental crust of East Greenland from integrated geophysical studies”, by Vera Schlindwein.
- Heft-Nr. 271/1998** – “Winter Expedition to the Southwestern Kara Sea - Investigations on Formation and Transport of Turbid Sea-Ice”, by Dirk Dethleff, Peter Loewe, Dominik Weiel, Hartmut Nies, Gesa Kuhlmann, Christian Bahe and Gennady Tarasov.
- Heft-Nr. 272/1998** – “FTIR-Emissionsspektroskopische Untersuchungen der arktischen Atmosphäre”, von Edo Becker
- Heft-Nr. 273/1998** – “Sedimentation und Tektonik im Gebiet des Agulhas Rückens und des Agulhas Plateaus (‘SETA-RAP’)”, von Gabriele Uenzelmann-Neben.
- Heft-Nr. 274/1998** – “The Expedition ANTARKTIS XIV/2”, by Gerhard Kattner.
- Heft-Nr. 275/1998** – “Die Auswirkung der ‘NorthEastWater’-Polynya auf die Sedimentation vor NO-Grönland und Untersuchungen zur Paläo-Ozeanographie seit dem Mittelwechsel”, von Hanne Notholt.
- Heft-Nr. 276/1998** – “Interpretation und Analyse von Potentialfelddaten im Weddellmeer, Antarktis: der Zerfall des Superkontinents Gondwana”, von Michael Studinger.
- Heft-Nr. 277/1998** – “Koordiniertes Programm Antarktischforschung”. Berichtskolloquium im Rahmen des Koordinierten Programms “Antarktischforschung mit vergleichenden Untersuchungen in arktischen Eisgebieten”, herausgegeben von Hubert Miller.
- Heft-Nr. 278/1998** – “Messung stratosphärischer Spurengase über Ny-Ålesund, Spitzbergen, mit Hilfe eines bodengebundenen Mikrowellen-Radiometers”, von Uwe Raffalski.
- Heft-Nr. 279/1998** – “Arctic Paleo-River Discharge (APARD). A New Research Programme of the Arctic Ocean Science Board (AOSB)”, edited by Ruediger Stein.
- Heft-Nr. 280/1998** – “Fernerkundungs- und GIS-Studien in Nordostgrönland”, von Friedrich Jung-Rothenhäusler.
- Heft-Nr. 281/1998** – “Rekonstruktion der Oberflächenwassermassen der östlichen Laptevsee im Holozän anhand aquatischen Palynomorphen”, von Martina Kunz-Pirrung.
- Heft-Nr. 282/1998** – “Scavenging of <sup>231</sup>Pa and <sup>230</sup>Th in the South Atlantic: Implications for the use of the <sup>231</sup>Pa/<sup>230</sup>Th ratio as a paleoproductivity proxy”, by Hans-Jürgen Walter.
- Heft-Nr. 283/1998** – “Sedimente im arktischen Meereis - Eintrag, Charakterisierung und Quantifizierung”, von Frank Lindemann.
- Heft-Nr. 284/1998** – “Langzeitanalyse der antarktischen Meereisbedeckung aus passiven Mikrowellendaten”, von Christian H. Thomas.
- Heft-Nr. 285/1998** – “Mechanismen und Grenzen der Temperaturanpassung beim Pierwurm *Arenicola marina* (L.)”, von Angela Sommer.

\* vergriffen / out of print.

\*\* nur noch beim Autor / only from the author.

