

'n Respirometer vir akwatiese diere, geyk teen die Scholander-respirometer

W.J. van Aardt

Departement Dierkunde, PU vir CHO, Potchefstroom

H.S. Steyn

Statistiese Konsultasiediens, PU vir CHO, Potchefstroom

UITTREKSEL

'n Betroubare maar stadig werkende respirometer is vergelyk met 'n nuut ontwerpte Clark-elektroderespirometer. As metingsmateriaal is van *Labeo capensis*, 'n varswatervis, gebruik gemaak. Die resultate is statisties ontleed. Daar is gevind dat die lesings van die Clark-elektroderespirometer effens hoër is as dié van die klassieke manometriese respirometer van Scholander.

ABSTRACT

A respirometer for aquatic animals standardized against the Scholander respirometer

*A reliable but slow functioning respirometer was compared with a newly designed Clark-electrode respirometer. The material used during the measurements was *Labeo capensis*, a fresh-water mudfish. The results were statistically analysed. It was found that the Clark-electrode respirometer gave, on average, about 2% higher readings compared with the manometric respirometer developed by Scholander.*

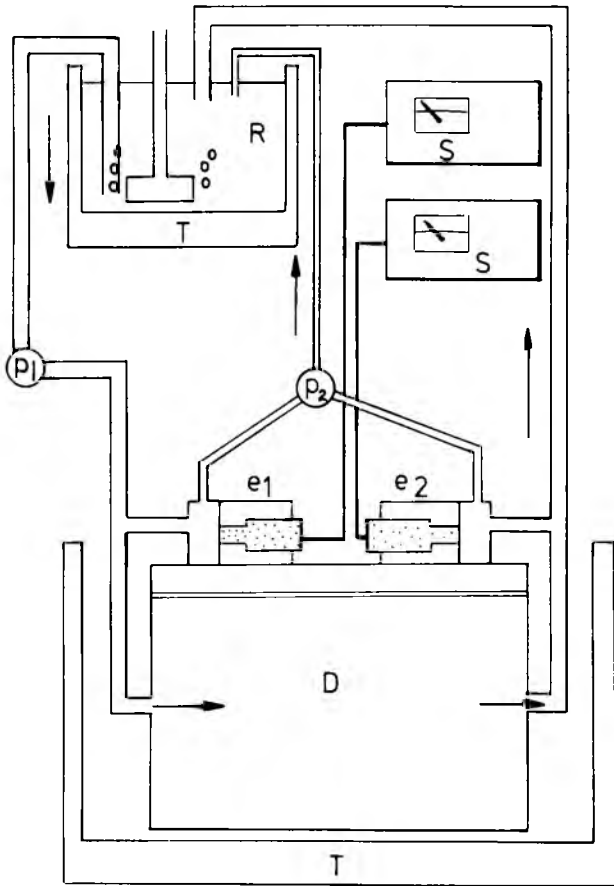
Na die uitvinding van die membraanbedekte polarografiese suurstofelektrode, ook bekend as die Clark-elektrode,^{1,2} het hierdie metode om die respirasiekoers van 'n biologiese stelsel, gemeet as 'n funksie van suurstofkonsentrasie, baie opgang gemaak. Die Clark-suurstofelektrode is gebruik in sel-suspensies, ensiemreaksies, bloedplasma, *in situ* deur direkte kontak met weefseloppervlakke en in 'n verskeidenheid respirometers.

Hoewel die suurstofelektrode gebruik is vir bepaling van die suurstofinhoud van bloedmonsters in die plek van die Van Slyke manometriese metode,³ en teenoor die Warburg-metode vir suurstofverbruik by sel- en bakteriesuspensies,⁴ is die Clark-elektrode nog nie vir makrorespirometrie uitgetoets nie. Die suurstofverbruik van groter diere word tans nog met manometriese en paramagnetiese metodes, wat al klassiek geword het, vasgestel.⁴⁻⁷ 'n Eienskap van die Clark-elektrode wat nadelig kan wees, is dat die noukeurighedsgraad beslis temperatuurgebonde is. Die relatiewe lang responstyd van die Clark-elektrode vir suurstofveranderinge kan onakkuraathede meebring. So het Winckers *et al*⁸ en Lapennas *et al*⁷ gevind dat die suurstofelektrode se respons nie lineêr vertoon met die styging van die suurstofkonsentrasie in water nie. Ook het hulle gevind dat die verskillende elektrode-ontwerpe nie altyd dieselfde noukeurigheid gee nie. Afgesien van hierdie nadele is die voordele om respirometers te bou waarby suurstofelektrodes gebruik word, bo manometriese metodes, wel bekend.^{9,10} Waar die suurstofverbruik aaneenlopend gemeet moet word, of waar die PO₂ in die stelsel geleidelik verander, is die manometriese respirometers nie geskik nie.

In hierdie ondersoek is 'n respirometer wat met twee Clark-elektrodes werk, getoets met betrekking tot die suurstofverbruik van visse teenoor 'n konstantedruk manometriese respirometer.¹¹

MATERIAAL EN METODEDES

Die Clark-suurstofelektrode-respirometer word in Figuur 1 afgebeeld. Om die meettoestande soveel moontlik vergelykbaar te hou, is die respirometerkamers – vir beide metodes – ontwerp om die suurstofopnamekoers van die varswatervis *Labeo capensis*, met 'n massa wat nie 400 gram oorskry nie, te meet. Twee Clark-suurstofelektrodes (E 5046, Radiometer, Kopenhagen) is elk binne 'n termostatische sel (Tipe D 616, Radiometer) gemonteer. So word elke elektrode se funksionele gedeelte deur 'n termostaathuls omring. Aan die een end, binne die termostaathuls, is 'n meetsel ingebou wat aan die een kant deur die membraanvlak van die elektrode en aan die ander kant deur 'n inskroefbare prop afgesluit word. Daarmee kan die volume van die meetsel gereël word. Dit is vir hierdie eksperiment ingestel op 0,4 cm³. Om die meetsel skoon te maak word die prop uitgedraai. Die meetsel is voorsien van in- en uitlaatbuisies van vlekvrystaal. Die temperatuur van die twee termostaatselle word tot ± 0,2 °C gereël deur 'n Laudawaterbad (RG20), voorsien van 'n elektroniese temperatuurreguleerder en pomp. 'n Mikroperistalspomp (Masterflex, Model C-7045, V.S.A.) onttrek water uit die hoofstroom teen 'n koers van 1,8 cm³ min⁻¹, via tygonbuisies, wat deur die meetsel loop. Die twee termostaatselle is vasgeklamp op 'n digsluitende perspektisdelsel wat op die respirasiekamer pas. Die binnemate van die kamer is 30 × 10 × 6 cm en is



FIGUUR 1: Diagrammatiese voorstelling van die gebruikte Clark-elektroderespirometer. D, respirasiekamer; e₁ en e₂, waterverkoelde huls waarin die twee Clark-elektrodes ingeskroef word; P₂, mikroperistalspomp; P₁, pomp wat water deur respirasiekamer en reservoir pomp; R, reservoir; T, waterbad; S, suurstofmeters wat elk 'n Clark-elektrode bedien.

gemaak van verswarte perspex. Die waterreservoir van 40 liter suurstofversadigde kraanwater word van 'n temperatuurbeheerde waterbad deur 'n peristalspomp met $120 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ lewering gepomp. Gedurende sirkulasie word die water met glaswol en geaktiveerde houtskool gefiltreer.

Na yking van die suurstofelektrodes is die respirometer in werking gestel sonder 'n viskeemplaar in die respirasiekamer. Daar is gevind dat die partiële suurstofdruk, soos gemeet in die meetselle by 18°C , van 3-5% laer was as wat die partiële suurstof in die suurstofversadigde water in die reservoir was. Die een elektrode (E₁) meet die partiële suurstofspanning van die inlaatwater (WPO₂) na die dierekamer, en die ander elektrode (E₂) die partiële suurstofspanning van die uitlaatwater (WPO₂). Beide PO₂-elektrodes is aan twee afsonderlike suurstofmeters (PHM 71, Radiometer, Denemarke) gekoppel (Fig. 1). Die PO₂-lesings is op die suurstofmeters geneem slegs na die bereiking van 'n konstante WPO₂-verskil tussen die in- en uitlaatwater (ΔWPO_2) van die dierekamer, en die handhawing daarvan vir minstens 15 minute. Die suurstofopnamekoers (VO₂) van 'n vis, in cm³ suurstof per uur, is bereken met behulp van die volgende vergelyking:

$$\text{VO}_2 (\text{cm}^3 \text{O}_2 \cdot \text{uur}^{-1}) = \frac{\Delta\text{WPO}_2}{760} \times \alpha \times \text{vloeisnelheid in cm}^3 \text{ min}^{-1} \times 60$$

waar α die oplosbaarheidskoeffisiënt van suurstof in water is.¹²

Die Scholander-respirometer is plaaslik volgens die voorskrifte van Scholander¹¹ gebou. Die respirasiekamer van 2,0 liter en die kompensasiestruktuur (1,3 liter) is egter van perspex gemaak. Die koppeling tussen die dryfas en die respirasiekamer, asook dié tussen die manometer en die respirasiekompensasiestruktuur, is verbeter. Die respirasiekamer is tydens meting verdonker. Dieselfde water wat in die reservoir van die Clark-elektroderespirometer voorkom, is gebruik vir die Scholander-respirometer.

Die viskeemplaar is in die Potchefstroomse munisipale dam met behulp van 'n kleinmaaskeunet gevang. Slegs visse met liggamsmassas van tussen 100 en 400 gram is vir die meting gebruik. Die visse is een week lank in deurlugte kuipe by 18°C aangehou. Die suurstofopnamekoers per vis is eers met die Scholander-respirometer by 18°C uitgevoer. Daarna is die gemerkte visse twee dae lank weer in die kuipe aangehou voordat die suurstofopnamekoers per vis met die Clark-suurstofelektrode-respirometer vasgestel is. Meting met die twee tipes respirometers is binne 5 dae afgehandel.

Om die probleem van die fisiologiese spanning tydens beide meting so konstant as moontlik te hou, is gesorg dat die visse op dieselfde wyse voor inplasing in die onderskeie respirasiekamers hanteer word. In beide gevalle is daar 30 minute gewag voordat daar met 'n meting begin is. Gedurende hierdie periode is die respirasiekamer van die Scholander-respirometer oopgelaat, sodat die PO₂ in die water nie daal nie.

RESULTATE EN BESPREKING

In tabel 1 word die koers van suurstofverbruik van die genommerde visse, soos dit deur die twee respirometers bepaal is, met mekaar vergelyk. As 'n spreidiagram van die twee stelle gegewens gemaak word, toon die punte 'n neiging om meer uitgespreid te raak hoe groter beide metings is. Daarom is daar na die verhoudings van die data van die Scholander-respirometer ten opsigte van die Clark-elektroderespirometer, as 'n persentasie (tabel 1) gekyk. Met die hulp van 'n rankitgrafiek¹³ is daar nagegaan of hierdie persentasieverhoudings normaal verspreid is. Daar is gevind dat, hoewel die simmetrie van verspreiding wel duidelik aanwesig is, daar 'n duidelike afwyking van normaliteit voorkom.

In 'n vergelyking van die Scholander-respirometer met die Clark-elektroderespirometer is die gemiddelde persentasieverhouding 102,24 met 'n standaardafwyking van 9,10.

Vanweë die nie-normale aard van die verspreiding van die data, sal nie-parametriese statistiese inferensie 'n beter moontlikheid wees. In hierdie geval kan rangordestatistieke, gebaseer op die gemiddeldes van al die verskillende pare metings en die metings self, gebruik word om 'n 95%-betroubaarheidsinterval vir die gemiddelde persentasieverhouding te bepaal.¹⁴ So

'n interval oordek die onbekende gemiddelde met 'n waarskynlikheid van 0,95.

TABEL 1

Die suurstofverbruikkoers van 16 varswatervisse, (*Labeo capensis*) soos gemeet deur twee respirometers

Scholander-respirometer		Clark-elektrode respirometer	
Visnr.	(A) (cm ³ O ₂ vis ⁻¹ uur ⁻¹)	(B) (cm ³ O ₂ vis ⁻¹ uur ⁻¹)	100 B/A
1	6,0	5,7	95,0
2	7,8	8,6	110,3
3	8,4	9,8	116,7
4	11,6	13,0	112,1
5	12,5	14,2	113,6
6	12,7	12,8	100,8
7	12,7	11,5	90,6
8	14,0	14,7	105,0
9	15,8	16,6	92,4
10	16,8	17,2	102,4
11	17,0	16,4	96,5
12	18,4	21,3	115,8
13	18,4	19,0	103,3
14	21,5	19,6	91,2
15	21,0	19,5	92,9
16	21,0	20,5	97,6
		\bar{x}	102,24
		S	9,1

Met behulp van 'n rekenaar is die 136 verskillende genoemde gemiddeldes bereken en van klein tot groot gerangskik. Daarna is die 20ste en 107de waardes geneem as die onderste en boonste grense van die gevraagde betroubaarheidsinterval, nl. 96,60; 107,22. Vir die 99%- en 90%-betroubaarheidsintervalle sal dit respektiewelik 94,66; 109,51 en 97,39; 106,43 wees.

Op grond van die statistiese ontleding kan gesê word dat die Clark-elektroderespirometer, in verhou-

ding met die Scholander-respirometer, gemiddeld effens hoër suurstofverbruikkoerse gee (~2%), met 'n variasie tussen omtrent 97% en 107% met 'n hoë (95%) waarskynlikheid.

Waarom die lesings met die Clark-elektrode-respirometer effens hoër is, kan nie afdoende verklaar word nie. Na ons mening is die variasie egter so klein dat dit binne die eksperimentele foutgrense val. Dit geld des te meer omdat die metings gedoen is met visse wat biologiese variasie kan toon wat hulle suurstofverbruikkoers van dag tot dag betref.

LITERATUURVERWYSINGS

- Clark, L. (1956). Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions, *Trans. Am. Soc. artif. internal organs*, 2, 41-48.
- Connelly, C.M. (1957). Methods for measuring tissue oxygen tension; theory and evaluation: the oxygen electrode, *Fed. Proc.*, 16, 681-684.
- Mayers, L.B. & Forster, R.E. (1966). A rapid method for measuring blood oxygen content utilizing the oxygen electrode, *J. Appl. Physiol.*, 21, 1393-1296.
- Umbreit, W.W., Burris, R.H. & Stauffer, J.F. (1972). *Manometric and biochemical techniques*, 5th ed (Burgess Publ. Co.: Mineapolis, Minnesota). 387 p.
- Wennberg, L.A. (1975). A simple method to improve the precision and accuracy of gas-phase oxygen electrodes, *J. Appl. Physiol.*, 38, 540-541.
- Hahn, C.E.W., Davis, A.H. & Albery, W.J. (1975). Electrochemical improvement of the performance of PO₂ electrodes, *Respiration Physiology*, 25, 109-133.
- Lapennas, G.N., Colacino, J.M. & Bonaventura, J. (1981). Thin-layer methods for determination of oxygen binding curves of hemoglobin solutions in blood. In *Methods in Enzymology*, Vol. 76. *Hemoglobins*. Antonini, E., Rossi-Bernardi, L., Chiancone eds. (Academic Press: New York) 449 p.
- Winckers, E.K.A., Theunissen, A.J., Van den Camp, R.A.M. & Maas, A.H.J. (1978). A comparative study of the electrode systems of three pH and blood gas apparatus. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 16, 175-185.
- Marais, J.F.K., Akers, A.F.A. & Van der Ryst, P. (1976). Apparatus for the automatic determination of oxygen consumption. *Zool. Africana*, 11, 87-95.
- Ultsch, G.R., Jackson, A.C. & Moalli, R. (1981). Metabolic oxygen conformity among lower vertebrates: The toadfish revisited. *J. Comp. Physiol.*, 142, 439-443.
- Scholander, P.F. (1949). Volumetric respirometer for aquatic animals. *Rev. Sci. Instr.*, 20, 885-887.
- Krogh, A. (1941). *The comparative physiology of respiratory mechanisms* (Univ. of Pennsylvania Press: Penn).
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. (1969). *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research* (W.H. Freeman and Co., San Francisco) 124 p.
- Lehmann, E.L. (1975). *Nonparametrics. Statistical methods based on ranks* (Holden-Day, San Francisco) 181 p.