

УДК 597—105+ (597.08:001.8)

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТАНДАРТНОГО ОБМЕНА У РЫБ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕМБРАННОГО ЭЛЕКТРОДА**

Л. Б. КЛЯШТОРИН, А. А. ЯРЖОМБЕК

С интенсивностью обмена у рыб связаны многие стороны их жизнедеятельности. Изучение этого вопроса имеет большое значение как для исследований в области физиологии рыб, так и для решения практических задач рыбного хозяйства.

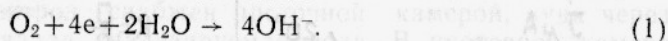
Уровень обмена отражает величину энергетических затрат, что непосредственно влияет на кормовые потребности рыб. Об интенсивности обмена у рыб можно судить по потреблению ими кислорода. Интенсивность потребления кислорода является не только самым распространенным, но и наиболее содержательным показателем обмена, в особенности у гидробионтов (Винберг, 1956).

В литературе, посвященной измерению интенсивности обмена у рыб, приводится целый ряд методов измерения скорости потребления ими кислорода (Строганов, 1962а и б). Большинство из предложенных установок сложны и громоздки, а содержание кислорода в них определяют при помощи метода Винклера (Ковальцов, Алексовский, 1961). Этот метод, разработанный более 80-ти лет тому назад, достаточно точен и имеет целый ряд достоинств, однако он трудоемок и не может служить методической основой для создания систем непрерывного и автоматического определения содержания кислорода.

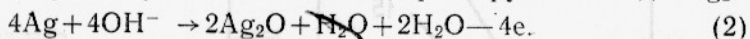
Недостатками использования ртутно-капельного электрода для измерения содержания кислорода в воде являются неудобство работы со ртутью, трудность стабилизации работы ртутного капилляра и др. Положение изменилось с введением в практику полярографического анализа твердых электродов из благородных металлов. В строго контролируемой среде с соблюдением ряда предосторожностей определение содержания растворенного кислорода на твердых электродах открытого типа дает воспроизводимые результаты, но использование таких датчиков для анализа содержания кислорода в природных водах (Эпштейн, 1959; Сперанская, Хайдаров, 1963) выявило их серьезные недостатки. Адсорбция примесей из воды вызывает «отравление» открытых электродов, а выделение посторонних продуктов электролиза значительно снижает их чувствительность. Кроме того, работа электродной ячейки в значительной мере зависит от электропроводности среды. Практическое использование такого типа датчиков в настоящее время ограничено или вообще прекращено.

В 1953 г. Кларк (Clark and all., 1953) предложил использовать в качестве датчика содержания кислорода твердоэлектродную ячейку, изолированную от анализируемого раствора газопроницаемой мембраной. В качестве мембраны используются тонкие пленки из полиэтилена или тефлона. Из-за частичной поляризации связи «углерод—водород»

в полимерных цепях полиэтилена пленка не пропускает положительно и отрицательно заряженные ионы, но электронейтральные молекулы газов, обладающие достаточной кинетической энергией, проходят через пленку и достигают поверхности катода (рис. 1). Восстановление кислорода на катоде происходит при разности потенциалов 0,7—0,9 в. Реакции, происходящие на платиновом катоде (1) и хлоросеребряном аноде (2), могут быть записаны в общем виде:



Образованные в результате реакции ионы гидроксила мигрируют к хлоросеребряному аноду, где окисляются, фиксируясь в виде Ag_2O



Для измерений был использован платиново-хлоросеребряный электрод, конструкция которого приведена в ряде работ: (Хайдарова, 1965; Соловьев, 1964; Carrit and Konwissker, 1959). Сохранение постоянства толщины диффузионного слоя под мембраной электрода осуществляется при помощи магнитной мешалки.

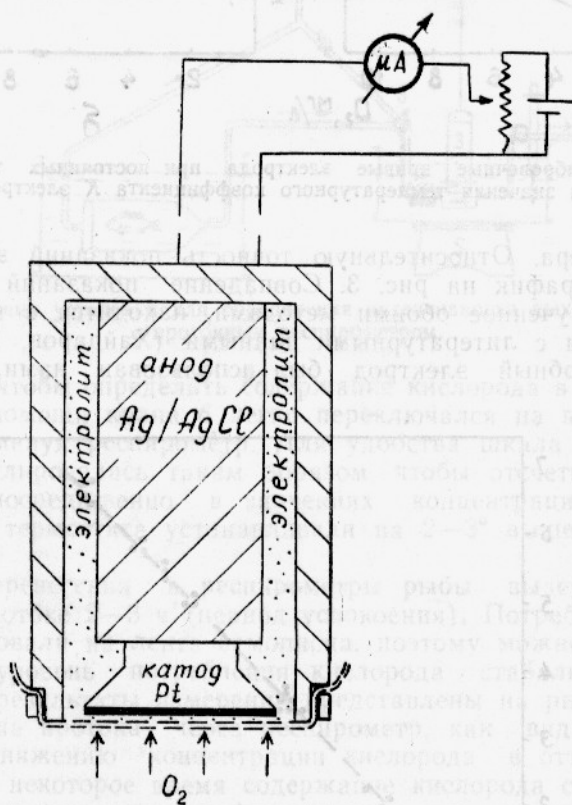


Рис. 1. Схема устройства мембранного электрода.

Величина тока датчика существенно зависит от температуры. С ее увеличением при постоянной концентрации кислорода величина тока в приборе растет. Если же проводить измерения при фиксированной температуре, то, как можно видеть из рис. 2а, ток в ячейке находится в линейной зависимости от концентрации кислорода. На величину температурного коэффициента ячейки (рис. 2б) влияет толщина и материал мембраны, а также размер и геометрия электрода.

При измерении содержания кислорода в полевых условиях необходимо вводить температурную поправку в показания прибора, а в условиях лаборатории ячейку удобно термостатировать, чтобы избавиться от температурной поправки. Калибруется прибор при помощи

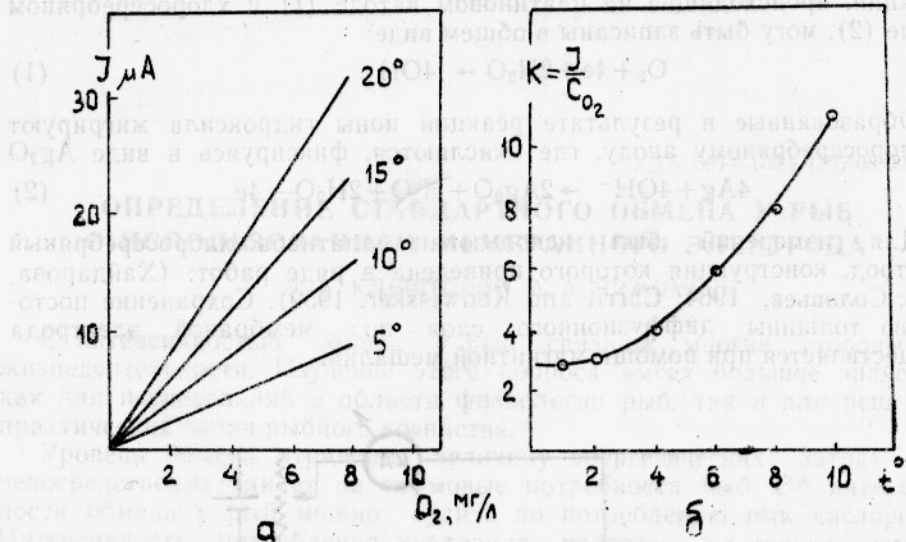


Рис. 2. Калибровочные кривые электрода при постоянных температурах (а) и значения температурного коэффициента K электрода (б).

метода Винклера. Относительную точность показаний электрода характеризует график на рис. 3. Совпадение показаний содержания кислорода, полученное обоими методами, находится в пределах 2%, что согласуется с литературными данными (Хайдаров, 1965; Соловьев, 1964). Подобный электрод был использован нами, как датчик

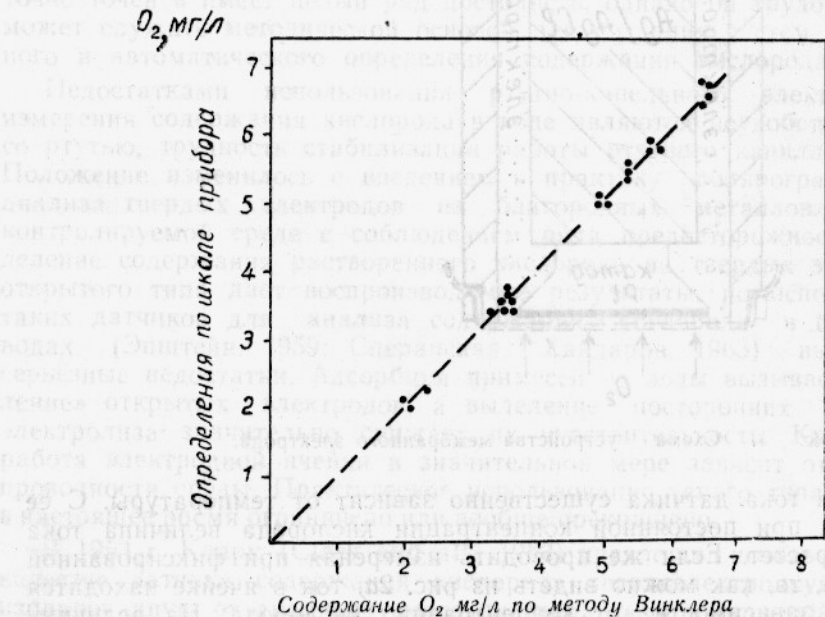


Рис. 3. Корреляция между определением содержания кислорода методом Винклера и с помощью мембранного электрода.

содержания кислорода в воде для измерений интенсивности дыхания рыб. Схема установки приведена на рис. 4.

Вода в резервуаре 1 поддерживалась на постоянном уровне при помощи перистальтического насоса 2. Из респирометра объемом 150 мл вода подавалась в термостатированную ячейку электрода 3, показания которого регистрировались на микроамперметре измерительного блока 7 и параллельно на ленте самопишущего потенциометра ПС-1-02 8. Электрод снабжен проточной камерой, куда через теплообменник 4 попадала анализируемая вода. В проточной камере вода перемешивалась изолированным магнитным стержнем, приводимым во вращение магнитной мешалкой 5.

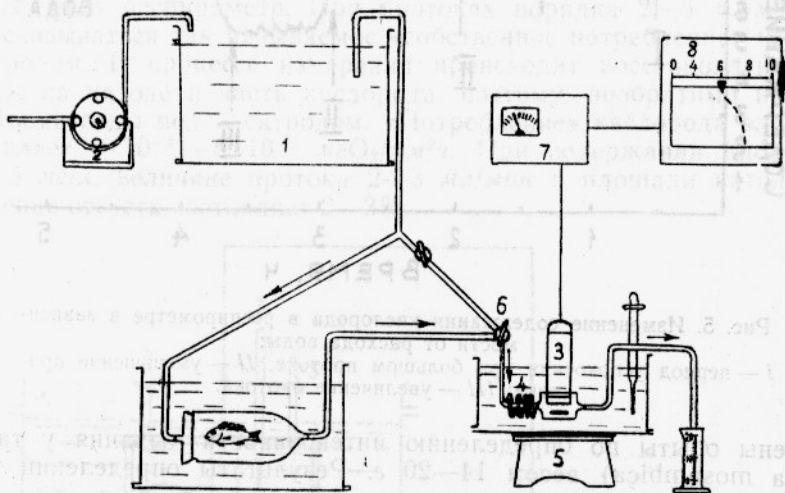


Рис. 4. Схема установки для определения интенсивности дыхания рыб с проточным респирометром.

Для того чтобы определить содержание кислорода в исходной воде, датчик при помощи крана 6 легко переключался на подачу воды из резервуара, минуя респирометр. Для удобства шкала прибора и самописца регулировалась таким образом, чтобы отсчеты можно было снимать непосредственно в значениях концентрации O_2 в мг/л. Температуру термостата устанавливали на 2—3° выше, чем в респирометре.

После перенесения в респирометры рыбы выдерживались при усиленном протоке 2—3 ч (период успокоения). Потребление кислорода регистрировали на ленте самописца, поэтому можно было установить, когда уровень потребления кислорода стабилизируется. Для наглядности результаты измерений представлены на рис. 5.

Уменьшение протока через респирометр, как видно из рисунка, приводит к снижению концентрации кислорода в оттекающей воде, однако через некоторое время содержание кислорода стабилизируется на более низком уровне и формируется так называемое «плато» потребления. При исследовании дыхания рыб в респирометрах с протоком уровень «плато» не должен падать более чем на 30% по сравнению с содержанием кислорода в исходной воде (Строганов, 1962б).

С использованием данного метода уровень потребления кислорода легко можно отрегулировать таким образом, чтобы он не превышал допустимых величин. В правой части кривой показано влияние изменения режима проточности на уровень потребления кислорода рыбами в респирометре. После окончания опыта, переключая подачу воды,

получали отметку содержания кислорода в исходной воде, что позволяло судить о постоянстве его концентрации в питающей респирометр воде. Зная расход воды через респирометр, исходную концентрацию кислорода и значения «плато» дыхания, легко рассчитать потребление кислорода рыбой в любой момент времени, снимая эти данные прямо с ленты самописца. С использованием проточного респирометра были



Рис. 5. Изменение содержания кислорода в респирометре в зависимости от расхода воды:

I — период успокоения при большом протоке; II — уменьшение протока; III — увеличение протока.

проведены опыты по определению интенсивности дыхания у тилляпий (*Tilapia mosambica*) весом 14—20 г. Результаты определений приведены ниже.

Потребление кислорода тилляпиями весом 14—20 г в проточном респирометре при температуре 23° (потребление кислорода выражено в мг O₂/ч на 10 г веса)

Число определений	22
Средняя	1,86
Ошибка средней	±0,07
Коэффициент вариации, %	12,5
Крайние значения потребления кислорода	1,11—2,6

Анализ полученных данных не выявил изменений интенсивности потребления кислорода рыбами в зависимости от веса. Для определения такой зависимости необходимы весовые различия подопытных рыб в несколько десятков раз (Винберг, 1956). Имевшиеся в наших опытах рыбы могут быть отнесены к одной весовой группе.

Как видно из приведенных данных, интенсивность дыхания рыб сходного веса максимально различается в 2—3 раза. Значительный диапазон отклонений крайних значений интенсивности дыхания является следствием различий в степени двигательной активности отдельных рыб в респирометрах. Наиболее близкими к величинам стандартного обмена представляются наименьшие значения интенсивности потребления кислорода, однако в этом случае теряется ценность массовых определений. Действительный уровень стандартного обмена у рыб при таком способе измерений является в определенной степени условным. Эта условность свойственна респирометрическому способу определения стандартного обмена у рыб вообще, если отсутствует точная количественная регистрация уровня двигательной активности рыб в экспериментальных сосудах.

При работе с проточными респирометрами удобно определить интенсивность потребления кислорода у нескольких рыб, подключая

поочередно выходные трубки респирометров к электродной ячейке, что существенно увеличивает производительность работы. Вместе с тем этот способ не лишен недостатков. Несмотря на достаточно высокую точность определения содержания в воде кислорода, воспроизводимость результатов, по существу, определяется точностью измерения расхода воды в респирометрах. При малых величинах протока (порядка 10—15 мл/мин) точно определить проток довольно трудно. Кроме того, величина протока во времени испытывает некоторые колебания, причину которых не всегда удается точно установить, что снижает общую точность метода.

Помимо этого, при измерении малых величин потребления кислорода у рыб небольшого размера приходится значительно уменьшать проток через респирометр. При протоках порядка 2—5 мл/мин начинает сказываться так называемое «собственное потребление» кислорода электродом. В процессе измерения происходит восстановление молекул O_2 на катоде и часть кислорода, поэтому, необратимо изымается из объема воды под электродом. «Потребление» кислорода электродом составляет $2 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-5}$ мг O_2 /мм²ч. При содержании кислорода в воде 5 мг/л, величине протока 2—3 мл/мин и площади катода 1 см² снижение отсчета составляет 2—3%.

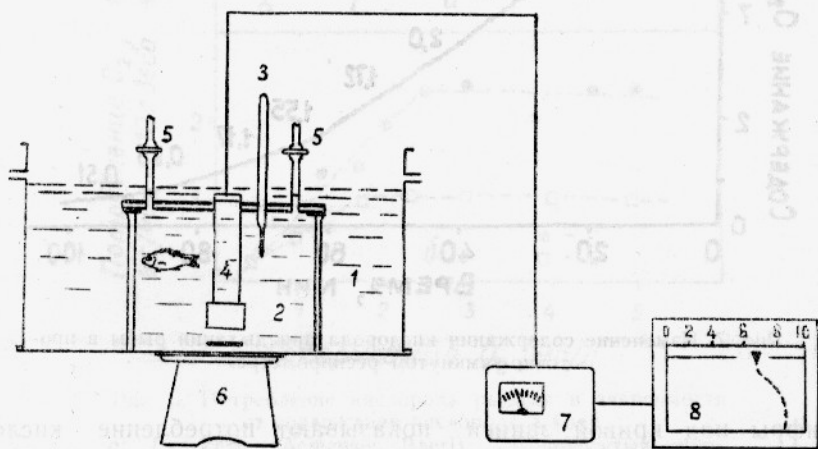


Рис. 6. Схема установки для определения интенсивности дыхания рыб с проточно-замкнутым респирометром.

По ряду причин практически эта величина составляет 5—7%, что заставляет вводить соответствующие поправки в показания прибора. Точно определить величину поправки трудно, и поэтому использованные установки с проточной камерой по существу ограничиваются минимальным протоком 10—15 мл/мин. При измерении интенсивности дыхания крупных рыб с протоком свыше 200 мл/мин необходимо более мощное термостатирующее устройство, что усложняет установку.

Пытаясь найти более рациональное решение, мы остановились на конструкции проточно-замкнутого респирометра, схема которого представлена на рис. 6.

В аквариуме из оргстекла 1 помещен респирометрический сосуд 2 из того же материала, снабженный крышкой с резиновой прокладкой. В крышку герметично вмонтированы электрод 4, термометр 3 и патрубки 5 с кранами. Под электродом находится изолированный магнитный стержень, приводимый в движение магнитной мешалкой 6. Вращаясь, стержень не только создает необходимую скорость потока под мембраной, но также медленно перемешивает воду в респиромет-

ре, благодаря чему содержание кислорода в объеме сосуда выравнивается и запись получается достаточно ровной, без «ступенек». В респирометрический сосуд объемом 1,3 л помещали одну рыбу весом 20—40 г или 2—4 рыбы весом по 5—10 г, верхнюю крышку герметично фиксировали на сосуде и выдерживали рыб в течение 1—2 ч, осуществляя постоянный водообмен в сосуде с помощью патрубков 5. После того как рыбы успокаивались, патрубки перекрывали и изменения содержания кислорода в респирометре фиксировали через регистрирующий блок 7 на ленте электронного потенциометра ПС-1-02 8, шкала которого была отрегулирована в значениях содержания кислорода в мг/л. Пример записи дыхания карпа (вес 31 г) дан на рис. 7.

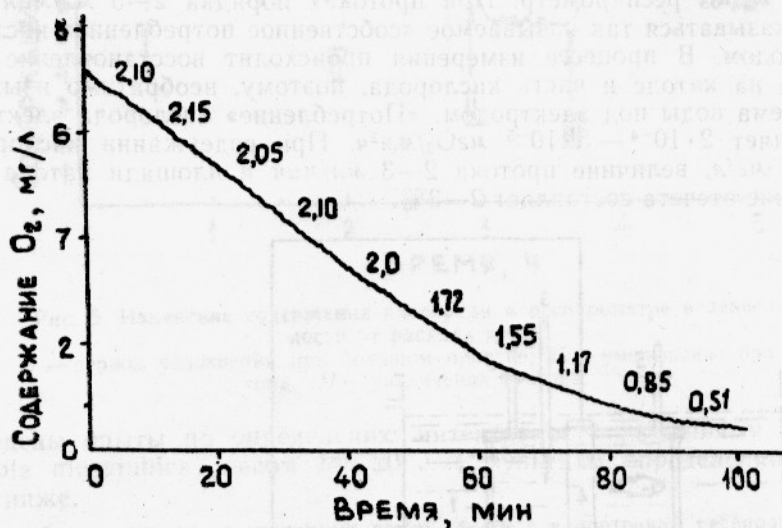


Рис. 7. Изменение содержания кислорода при дыхании рыбы в точно-замкнутом респирометре.

Цифры над кривой записи показывают потребление кислорода в мг на 10 г веса за час, рассчитанное по пятиминутным интервалам. Из рисунка видно, что после того как рыба успокоится, потребление кислорода становится постоянным во времени при постепенном снижении содержания кислорода в респирометре.

Почти у всех рыб, так называемый «независимый» тип дыхания, т. е. они потребляют кислород в определенных пределах концентраций O₂ независимо от содержания его в воде. При этом снижение содержания кислорода компенсируется усилением вентиляции жаберной полости за счет учащения ритма дыхательных движений жаберных крышек. При падении концентрации кислорода ниже некоторого минимума, связывание кислорода гемоглобином становится неполным, усиленная вентиляция жаберной полости не может компенсировать дефицита кислорода, и после достижения так называемой «критической» концентрации кислорода, потребление кислорода переходит в фазу «зависимого дыхания», т. е. уменьшается с падением содержания кислорода.

При дальнейшем снижении концентрации кислорода его уровень может достичь «пороговой» концентрации, при которой дыхание прекращается и рыба гибнет. Как видно из рис. 7, прямой участок записи по достижении «критической» концентрации изгибается, делаясь более пологим, а потребление кислорода уменьшается по мере приближения к «пороговой» концентрации кислорода.

Открывая краны на патрубках 5 (см. рис. 6), можно быстро обменять воду в респирометре и после полного успокоения рыбы повторно определить интенсивность дыхания. Для измерения величины стандартного обмена нет необходимости в достижении «критической» концентрации кислорода в респирометре, а достаточно повторно измерить интенсивность дыхания на прямолинейном участке записи. Тем не менее, определение значений «критических» концентраций кислорода может быть полезным при ряде специальных физиологических исследований. По этой причине для выявления полных возможностей метода были определены зависимости интенсивности дыхания четырех видов рыб от содержания кислорода в воде (рис. 8).

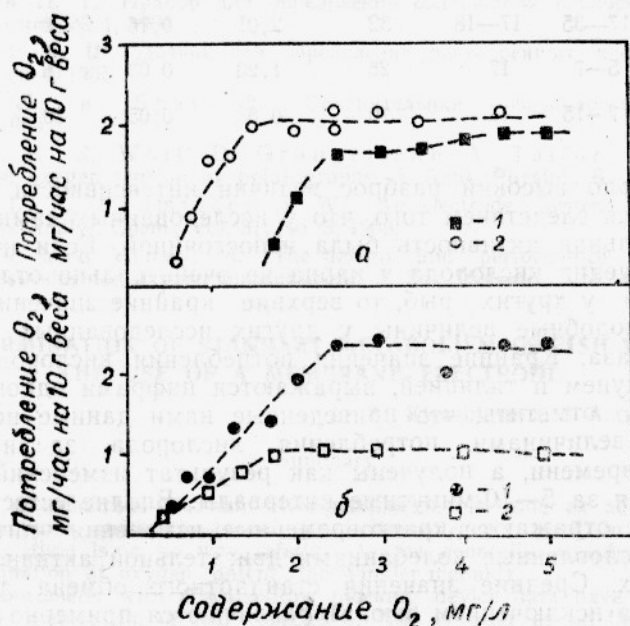


Рис. 8. Потребление кислорода рыбами в зависимости от содержания кислорода в воде.

а: 1 — осетр (*Acipenser baeri*); 2 — полосатый окунь (*Morone saxatilis*); б: 1 — карп (*Cyprinus carpio*); 2 — тилапия (*Tilapia mosambica*).

Исследования показали, что проточно-замкнутый респирометр значительно более удобен по сравнению с проточным для определения интенсивности дыхания рыб. Имея набор крышек с герметичными вводами для электрода и термометра можно пользоваться сосудами различного размера и геометрии для определения уровня обмена у рыб разных видов в широком диапазоне размеров.

Использовали респирометры объемом от 1,3 до 6 л, в которых определяли дыхание рыб весом от 5 до 55 г. Данные по стандартному обмену подопытных рыб пяти видов сведены в таблице.

Для всех исследованных рыб, величины стандартного обмена колебались в пределах от 0,63 до 2,01 мг O₂/ч на 10 г веса. Крайние значения потребления кислорода вьюном варьировали от 0,2 до 1,5 мг O₂/ч на 10 г веса. Необычно низкие значения величины потребления кислорода вьюном объясняются тем, что являясь кишечной рыбой, вьюн может использовать для дыхания кислород заглатываемого воздуха, а это приводит к уменьшению потребления кислорода из объема респирометра. Полученные данные, поэтому, вряд ли могут характеризовать уровень стандартного обмена вьюна.

Потребление кислорода (в мг $O_2/ч$ на 10 г веса) рыбами разных видов в опытах с проточно-замкнутым респирометром

Вид рыбы	Вес, г	$T, ^\circ C$	Количество измерений	Средняя М	Ошибка средней	Коэффициент вариации, %	Крайние значения потребления кислорода
Осетр	37—51	15	8	1,69	0,03	5	1,10—2,20
Полосатый окунь	21—23	16—18	34	1,92	0,03	13	0,87—2,16
Карп	17—35	17—18	32	2,01	0,16	30	1,25—4,80
Тилляпия	5—7	17	28	1,20	0,03	16	0,70—1,90
Вьюн	7—15	16	20	0,63	0,05	30	0,20—1,50

Относительно высокий разброс величин интенсивности дыхания у карпа является следствием того, что у исследованных нами рыб этого вида двигательная активность была непостоянной. Если нижние значения потребления кислорода у карпа не очень сильно отличаются от этих значений у других рыб, то верхние крайние значения у карпа превышают подобные величины у других исследованных рыб более, чем в два раза. Крайние значения потребления кислорода осетром, полосатым окунем и тилляпией, выражаются цифрами одного порядка. Следует особо отметить, что приведенные нами данные не являются суммарными величинами потребления кислорода за значительный промежуток времени, а получены как результат измерений интенсивности дыхания за 5—10-минутные интервалы. Вполне естественно, что эти величины отражают кратковременные изменения интенсивности дыхания, обусловленные колебаниями двигательной активности рыб в респирометрах. Средние значения стандартного обмена для разных видов рыб (за исключением вьюна) различаются примерно в 1,5 раза. Принимая во внимание разный видовой состав исследованных рыб, эти результаты можно признать удовлетворительными.

Для точности измерения интенсивности потребления кислорода рыбами во время опыта очень важно постоянство температуры воды в камере с электродом. В опытах с проточным респирометром использовали термостатированную электродную ячейку. Проточно-замкнутый респирометр в лабораторных условиях удобно термостатировать, подключая внешний сосуд к циркуляционной системе ультратермостата. В помещениях со стабильной температурой необходимости в принудительном термостатировании не возникает. При использовании прибора в условиях, приближающихся к полевым, перекалибровки электрода можно избежать, введя в схему регистрирующего прибора термокомпенсирующее устройство (Briggs and Viney, 1964).

ВЫВОДЫ

Проведенные нами эксперименты показали, что с помощью проточно-замкнутого респирометра со встроенным в него кислородным электродом можно быстро и с достаточной точностью измерять интенсивность дыхания у рыб. Большим достоинством применяемой методики является возможность непрерывной и автоматической регистрации динамики содержания кислорода во времени.

Установки такого типа могут быть широко использованы при рыбохозяйственных исследованиях для определения кормовых потребностей рыб и будут весьма полезны при изучении физиологии рыб.

ЛИТЕРАТУРА

- Винберг Г. Г. Интенсивность обмена и пищевые потребности рыб. Минск, 1956.
- Строганов Н. С. Экологическая физиология рыб. Изд-во МГУ, М., 1962а.
- Строганов Н. С. Методика определения дыхания у рыб. Изд-во АН СССР, М., 1962б.
- Ковальцов В. Н., Алексовский В. Б. Определение растворенного в воде кислорода. Госхимиздат, 1961.
- Эпштейн И. М. Опыт определения кислорода в водоеме с помощью кислородного лота. Тр. Всес. Гидробиол. об-ва, 9, 1959.
- Сперанская А. А., Хайдаров И. Ш. Полярнограф для определения содержания кислорода в пресных водоемах. Вестн. МГУ, сер. физ., астр., № 5, 1963.
- Соловьев Л. Г. Прибор для определения содержания кислорода в морской воде. «Океанология», № 1, 1964.
- Хайдаров И. Ш. Датчик для определения растворенного кислорода. Вестн. МГУ, серия VI, № 4, 1965.
- Проссер Л. и Браун Ф. Сравнительная физиология животных. Изд-во «Мир», 1968.
- Clark, L. C., R. Wolf, D. Granger and A. Taylor. Continuous recording of blood oxygen tension by polarography. J. Appl. Physiol., 6, 1953.
- Carritt, D. E., Kanmisher, J. W. An electrode system for measuring dissolved oxygen. Analyt. Chem., Vol. 31, No. 5, 1959.
- Briggs, R. and Viney, M. The design and performance of temperature compensated electrodes for oxygen measurement. J. Sci. Instrum., Vol. 41, No. 1, 1954.

DETERMINATION OF STANDART METABOLISM IN FISH WITH THE USE OF A MEMBRANE ELECTRODE

L. B. Klyashtorin and A. A. Yarzhombek

Summary

The use of a membrane platinum-silver-perchloride electrode as an oxygen meter allowed a continuous automatic recording of the oxygen content in respirometers. The suggested method is in no way inferior to the generally accepted methods of chemical determination of oxygen content (the Winkler method).

Using a respirometer with a water-flow blocking device data have been obtained on the standard metabolism in four species of fish as well as on the relationship between the respiration rate in some species of fish and the oxygen content of the water.