



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 27.08.76 (P. 192037)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 13.03.78

Opis patentowy opublikowano: 31.12.1980

Int. Cl.²
G01N 7/02
G01N 33/16

Twórcy wynalazku: Romuald Klekowski, Kazimierz Myszkorowski

Uprawniony z patentu: Polska Akademia Nauk Instytut Biologii Doświadczałnej im. M. Nenckiego, Warszawa; Polska Akademia Nauk Instytut Ekologii, Dziekanów k/Warszawy (Polska)

**Sposób mierzenia intensywności zużycia tlenu i wydzielania CO₂
przez organizmy wodne oraz mikrorespirometr ekspedycyjny
morski do stosowania tego sposobu**

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób mierzenia intensywności zużycia tlenu i wydzielania CO₂ przez organizmy wodne takie jak pierwotniaki, skorupiaki i inne, o rozmiarach liniowych do 3—4 mm, oraz mikrorespirometr ekspedycyjny morski do stosowania tego sposobu.

Znany jest sposób mierzenia intensywności zużycia tlenu i wydzielania CO₂ przez małe organizmy wodne, zgodnie z którym pojedynczy egzemplarz badanego organizmu umieszcza się w zamkniętym od góry cylindrycznym szklanym pojemniku. W górnej części pojemnika umieszcza się kroplę wody ograniczoną od góry i od dołu meniskiem wodno-powietrznym, a w tej kropli wody umieszcza się badany organizm. Pojemność powietrza wypełniająca dolną część pojemnika jest ograniczona meniskiem gazowo-cieczowym, przy czym jako ciecz stosuje się korzystnie ciecz mającą zdolność pochłaniania CO₂. Tak przygotowany pojemnik zanurza się swobodnie w zamkniętym naczyniu wypełnionym tą samą cieczą, która wypełnia dolną przewężoną część pojemnika. Górną przestrzeń naczynia, wypełnioną powietrzem, łączy się z ramieniem manometru płynowego o kształcie U zaopatrzonego w urządzenie zmieniające poziom płynu w ramionach.

Wymiary opisanego pojemnika oraz wielkość przestrzeni wypełnionych powietrzem w jego górnej i środkowej części są tak dobrane, że swobodnie zanurzony pojemnik pływa w cieczy wypełnia-

2

jącej naczyniu, utrzymując położenie pionowe. Na początku doświadczenia za pomocą umocowanego przy naczyniu katetrometru ustala się położenie pojemnika w kierunku pionowym oraz rejestruje się ciśnienie panujące w naczyniu.

W czasie trwania doświadczenia badany organizm pobiera tlen z powietrza znajdującego się w kropli wody, w której ten organizm jest umieszczony; ubytki pobranego tlenu są uzupełniane z powietrza zamkniętego w pojemniku pod i nad kropką. Równocześnie badany organizm wydziela dwutlenek węgla, który jest absorbowany przez ciecz wypełniającą dolną część pojemnika. W rezultacie więc w czasie trwania doświadczenia zmniejsza się ilość gazu w pojemniku, a jego miejsce zajmuje ciecz wchodząca przez dolny otwarty koniec pojemnika. Pojemnik tonie w cieczy wypełniającej naczynie. Po upływie okresu czasu, dla którego ma być zmierzone zużycie tlenu przez badany organizm, za pomocą opisanego manometru płynowego zmniejsza się ciśnienie panujące w naczyniu. To zmniejszenie ciśnienia powoduje wypływ pewnej części płynu z pojemnika, w wyniku czego pojemnik wypływa ku górze. Ciśnienie w naczyniu doprowadza się do takiej warstowości, przy której pojemnik przyjmuje w kierunku pionowym to samo położenie, jakie zajmował na początku doświadczenia. Zarejestrowana różnica ciśnień, przy znanej początkowej objętości powietrza w pojemniku, po-

zwala określić zużycie tlenu przez badany organizm w określonym przeciągu czasu.

Urządzenie do stosowania opisanej metody składa się ze szklanych cylindrycznych pojemników z niewielką przewężoną i zamkniętą częścią górną oraz wydłużoną, przewożoną i otwartą częścią dolną a dalej z hermetycznego naczynia wypełnionego w części objętości cieczy, którego to naczynia górna część jest połączona z wcześniej opisanym manometrem plynowym.

Znana metoda i urządzenie pozwalają na przeprowadzenie pomiarów intensywności zużycia tlenu i wydzielania dwutlenku węgla w zakresie od 0,0001 μ l do 1 μ l na godzinę, który to zakres całkowicie zaspokaja potrzeby występujące przy badaniu małych organizmów wodnych. Równocześnie jednak poważną niedogodnością znanego rozwiązania jest konieczność umieszczania go na nieruchomej, wolnej od wstrząsów podstawie, co wyklucza możliwość stosowania na statkach prowadzących badania oceanologiczne. Tym samym brak było w dotychczasowym stanie techniki metody i urządzenia, które umożliwiałyby zdobywanie precyzyjnych danych dotyczących intensywności oddychania pojedynczych osobników wspomnianej klasy wielkości, gdy równocześnie wiadomo, że takie właśnie organizmy odgrywają decydującą rolę w produkcji ekosystemów morskich. Badania organizmów morskich po ich dowiezieniu na ląd, a więc po upływie znacznego okresu czasu, dawały wyniki tak zakłócone, że nie miały one wartości naukowej.

Wynalazek ma na celu opracowanie metody mierzenia intensywności zużycia tlenu i wydzielania CO_2 przez małe organizmy wodne, którą można by zastosować na pokładzie statku, w czasie jego ruchu i w warunkach chwiejby spowodowanej falowaniem, bezpośrednio po wyłowieniu zwierząt na pokład. Dalszym celem wynalazku jest skonstruowanie mikrorespirometru przydatnego do stosowania tej metody, który to respirometr byłby zdolny do prawidłowego funkcjonowania bez stosowania specjalnych urządzeń żyrostatycznych.

Sposób według wynalazku polega na tym, że badany organizm umieszcza się w pojemniku szklanym w kropli wody ograniczonej od góry i od dołu dokładnie znaną objętością powietrza, zaś w dolnej przewężonej części wspomnianego pojemnika umieszcza się pęcherzyk powietrza o długości 1–1,5 mm. Tak przygotowany pojemnik umieszcza się nieruchomo w cylindrycznej komorze szklanej wypełnionej cieczą identyczną jak ciecz w dolnej przewężonej części pojemnika. Górną część wspomnianej komory, wypełnioną powietrzem, łączy się z jednym ramieniem znanego manometru plynowego o kształcie U, zaś drugie ramię manometru łączy się z dużą pojemnością powietrza. Komorę zawierającą umocowany pojemnik oraz wspomnianą pojemność powietrza umieszcza się w warunkach stałej temperatury, co uniezależnia układ od wpływu zmian ciśnienia barometrycznego w atmosferze.

Wskaźnikiem zużycia tlenu przez badany organizm jest ruch ku górze pęcherzyka powietrza umieszczonego w przewężonej części pojemnika.

Pierwotne położenie tego pęcherzyka, określane za pomocą katetrometru, przywraca się za pomocą zmniejszenia ciśnienia w komorze, zaś zmiany ilości gazów w pojemniku określa się na podstawie zarejestrowanych w nim zmian ciśnienia i znanej pierwotnej objętości powietrza.

Mikrorespirometr ekspedycyjny morski do stosowania opisanego sposobu posiada hermetycznie zamknięty zbiornik, w którym znajduje się łaźnia plynowa. Zbiornik jest zaopatrzony w mieszkadło, termometr kontaktowy, grzałkę i chłodnicę, które to urządzenia służą do utrzymywania temperatury łaźni w zakresie od -5°C do $+50^{\circ}\text{C}$ z dokładnością $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$.

W opisanym zbiorniku jest umieszczony obrotowy stojak do którego są przytwierdzone komory respirometryczne o kształcie wydłużonych cylindrów wykonane ze szkła. Komory są od góry hermetycznie zamknięte i połączone za pomocą giętkiego przewodu z umieszczonym w górnej części stojaka obrotowym zaworem wielowypustowym. Każda komora jest zaopatrzona wewnątrz w uchwyt do mocowania pojemnika respirometrycznego.

Pojemnik respirometryczny stanowi kapilara szklana o średnicy od 0,3 do 6,0 mm. W górnej części pojemnik ma przewężenie zamknięte za pomocą zatopienia szkła; w dolnej ma wydłużone otwarte przewężenie o średnicy od 0,1 do 0,5 mm. W pojemniku w pobliżu górnego przewężenia jest umieszczona kropla wody z badanym zwierzęciem. Nad i pod kroplą wody znajduje się powietrze. Dolne przewężenie pojemnika jest wypełnione cieczą, korzystnie cieczą pochłaniającą dwutlenek węgla, zaś w tej cieczy, w pobliżu dolnego końca pojemnika, jest umieszczony pęcherzyk powietrza o długości 1–2 mm. Pojemnik jest nieruchomo umocowany w opisaną wcześniej komorze respirometrycznej i jest całkowicie pogrążony w wypełniającej ją komorę cieczy, przy czym jest to ta sama ciecz, którą znajduje się w dolnej części pojemnika.

Mikrorespirometr ma dalej znany manometr plynowy z urządzeniem zmieniającym poziom płynu w ramionach. Jedno ramię manometru jest połączone ze wspomnianym zaworem wielowypustowym i za jego pośrednictwem uzyskuje się połączenie z poszczególnymi komorami respirometrycznymi. Drugie ramię manometru jest połączone ze zbiornikiem powietrza umieszczonym we wspomnianej łaźni plynowej, przy czym objętość zbiornika powietrza jest około 1000 razy większa od pojemności gazowej nad cieczą w komorze respirometrycznej wraz z pojemnością rury łącznikowej i powietrza w połączonym z nią ramieniu manometru. Manometr jest umocowany na osi w pobliżu regulatora ciśnienia i jest połączony z zaworem obrotowym oraz zbiornikiem powietrza za pomocą elastycznych przewodów.

Wynalazek umożliwia pomiary intensywności zużycia tlenu i wydzielania CO_2 przez małe zwierzęta bezpośrednio po ich wyłowieniu, nawet w warunkach silnej chwiejby spowodowanej falowaniem. Otrzymywane wyniki są uniezależnione od zmian ciśnienia atmosferycznego i temperatury oto-

czenia. Zastosowanie w respirometrze więcej niż jednej komory respirometrycznej pozwala uzyskać dużą wydajność badań.

Wynalazek jest dokładniej objaśniony na przykładzie w związku z rysunkiem, na którym fig. 1 przedstawia schemat respirometru morskiego, a fig. 2 — pojemnik respirometryczny wraz z zamocowaniem w widoku z boku.

Hermeticznie zamknięty zbiornik 1 jest wypełniony wodą utrzymywaną w stałej i określonej z dokładnością do 0,01°C temperaturze. Do utrzymania stałej temperatury łaźni wodnej służą kontaktowy termometr 2, grzałka 3 i chłodnica 4. Ponadto zbiornik 1 jest zaopatrzony w mieszadło 5. W łaźni wodnej jest umieszczony obrotowy stojak 6, do którego są przytwierdzone rozmieszczone na okręgu koła respirometryczne komory 7 w liczbie dwunastu. Każda komora 7 jest hermeticznie zamknięta a jej górna część jest połączona za pomocą giętkiego przewodu z wielowypustowym zaworem 8. W każdej komorze 7 jest nieruchomo umocowany respirometryczny pojemnik 9. Ponadto w łaźni wodnej jest umieszczony zbiornik 10 o pojemności 10 l mieszający powietrze.

Obok zbiornika 1 znajduje się umocowany wahliwie płynowy manometr 11 o kształcie U wyposażony w znane urządzenie 12 do zmieniania poziomu płynu w ramionach manometru. Jedno ramię manometru jest połączone przewodem 13 z zaworem 8, za pomocą którego jest dalej łączone z poszczególnymi komorami 7. Drugie ramię manometru 11 jest połączone przewodem 14 ze zbiornikiem 10.

Pokazany w powiększeniu na fig. 2 rysunku respirometryczny pojemnik 9 ma cylindryczną część 15, która w górnej części przechodzi w zamknięte od góry przewężenie 16. Dolna część pojemnika 9 ma wydłużone przewężenie 17. W górnej części pojemnika jest umieszczona kropla 18 wody z badanym zwierzęciem. Nad i pod kroplą 18 znajduje się powietrze. Dolne otwarte przewężenie 17 jest wypełnione 0,1 N roztworem NaOH a w tej cieczy w pobliżu dolnego końca pojemnika znajduje się powietrzny pęcherzyk 19. Do utrzymywania pojemnika w stałym położeniu służą stalowe płaskie sprężyny 20.

Respirometryczne komory 7 przygotowuje się do pracy przez napełnienie ich tą samą cieczą, która wypełnia dolną część pojemników 9, do takiego poziomu, aby następnie umieszczone w nich pojemniki były całkowicie pogrążone w cieczy. Łaźnię wodną znajdującą się w zbiorniku 1 doprowadza się do temperatury, w której mają być prowadzone badania, po czym pojemniki 9 umieszcza się i zamocowuje w komorach 7. Następnie obracając stojak 6 kolejne komory 7 ustawia się przed wizerunkiem. W tym położeniu stojaka 6 obserwowana komora zostaje połączona za pośrednictwem zaworu 8 z manometrem 11. Przez odpowiednie regulowanie poziomu płynu w ramionach manometru 11 oraz przy użyciu nie pokazanego na rysunku katetrometru doprowadza się górny lub dolny punkt pęcherzyka 19 do określonego położenia w pionie. Opisanie czynności przeprowadza się kolejno na wszystkich komorach 7.

W czasie trwania badania oddychające zwierzęta zużywają tlen z powietrza znajdującego się po obu stronach kropli 18. Na skutek tego, przy nie zmieniającym się ciśnieniu w komorach 7, pęcherzyki 19 w dolnej części pojemników przesuwają się ku górze. W przewidzianych potrzebach badania okresach czasu komory 7 łączy się kolejno z manometrem 11 i przez operowanie poziomem płynu w ramionach manometru doprowadza się ciśnienie w danej komorze 7 do wartości, przy której pęcherzyk 19 zajmuje położenie takie jak na początku badania. Zmiana wartości ciśnienia gazów w pojemniku, przy znanej pierwotnej objętości powietrza w tym pojemniku, pozwala precyzyjnie określić zużycie tlenu przez badane zwierzę w danym okresie czasu.

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób mierzenia intensywności zużycia tlenu i wydzielania CO₂ przez organizmy wodne, w którym badany organizm umieszcza się w cylindrycznym szklanym pojemniku w kropli wody ograniczonej meniskami wodno-powietrznymi a zmiany ilości gazów w pojemniku określa się za pomocą okresowych pomiarów ciśnienia gazów w pojemniku, **znamienny tym**, że w dolnej przewężonej części pojemnika umieszcza się pęcherzyk powietrza o długości 1—1,5 mm a pojemnik umieszcza się nieruchomo w cylindrycznej komorze szklanej wypełnionej cieczą identyczną jak ciecz wypełniająca dolną część pojemnika, komorę łączy się z jednym ramieniem manometru płynowego, którego drugie ramię jest połączone z dużą pojemnością powietrza umieszczoną w warunkach stałej temperatury i uniezależnienia układu od wpływu zmian ciśnienia barometrycznego w atmosferze, zaś wspomniany pęcherzyk powietrza sprowadza się okresowo do pierwotnego położenia przez operowanie poziomem płynu w ramionach manometru płynowego, a wywołane tym zmiany wartości ciśnienia w komorze i pojemniku wykorzystuje się do określenia zmian ilości gazów w pojemniku.

2. Mikrorespirometr ekspedycyjny morski do mierzenia intensywności zużycia tlenu i wydzielania CO₂ przez organizmy wodne, wyposażony w szklany cylindryczny pojemnik z dolną częścią przewężoną i otwartą na zewnątrz oraz w manometr płynowy o kształcie U z urządzeniem do zmieniania poziomu płynu w ramionach, **znamienny tym**, że ma hermeticznie zamknięty zbiornik (1) wypełniony płynem i zaopatrzony w urządzenie do utrzymywania płynu w stałej temperaturze oraz ma obrotowy stojak (6) z więcej niż jedną szklaną cylindryczną komorą (7) przystosowaną do umocowania w niej nieruchomo respirometrycznego pojemnika (9) a w górnej części stojaka (6) znajduje się wielowypustowy obrotowy zawór (8) połączony za pomocą przewodów z komorami (7) oraz z ramieniem płynowego manometru (11), którego drugie ramię jest połączone z powietrznym zbiornikiem (10) umieszczonym w łaźni płynowej zbiornika (1).

3. Mikrorespirator według zastrz. 2, **znamienny tym**, że zbiornik (1) jest zaopatrzony w kontakto-

7

wy termometr (2), grzałkę (3), chłodnicę (4) i mieszadło (5).

4. Mikrorespirometr według zastrz. 2, **znamienny tym**, że komory (7) mają sprężynowe uchwyty (20) do mocowania w stałym położeniu pojemników (9) i są wypełnione cieczą do poziomu zapewniającego całkowite pogrążenie umocowanych pojemników.

5. Mikrorespirometr według zastrz. 2, **znamienny tym**, że wielowypustowy zawór (8) zapewnia połączenie z manometrem (11) tej komory (7) która

8

jest aktualnie ustawiona przed wziernikiem mikrorespirometru.

6. Mikrorespirometr według zastrz. 2, **znamienny tym**, że objętość powietrznego zbiornika (10) jest około 1000 razy większa od pojemności gazowej nad cieczą w komorze (7) wraz z pojemnością przewodu łączącego i powierza w połączonym z nią ramieniem manometru (11).

7. Mikrorespirometr według zastrz. 2, **znamienny tym**, że manometr (11) jest umocowany wahliwie na osi w pobliżu regulatora ciśnienia.

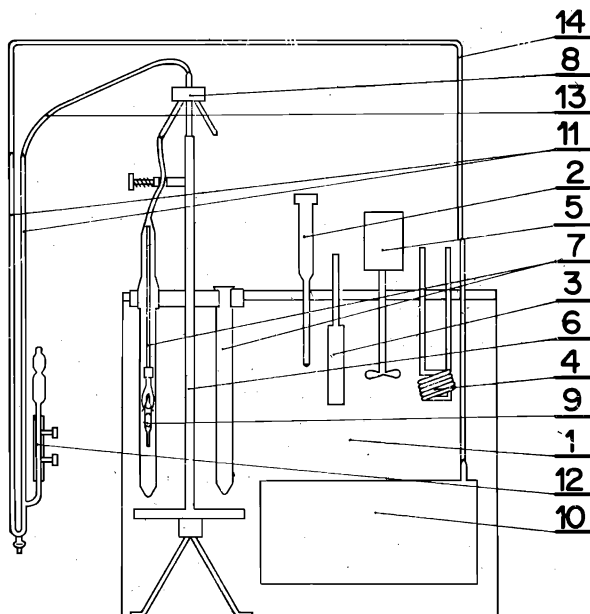


Fig. 1

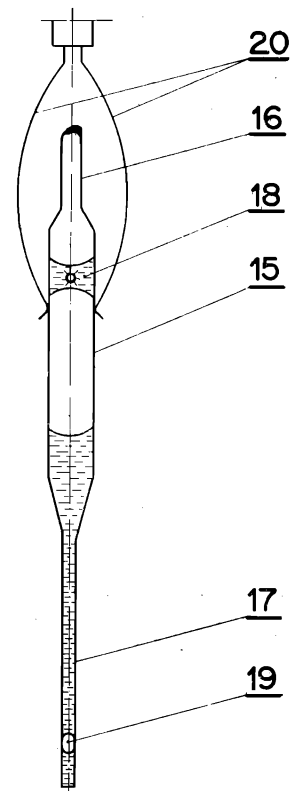


Fig. 2